



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

**Síntesis químico-enzimática y actividad antineoplásica
de nuevas fenilacetilricinoleilamidas que incorporan el
sistema (1*S*,4*S*)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano**

T E S I S E X P E R I M E N T A L

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
CHRISTIAN AXEL LUVIANO JARDÓN

DIRECTOR

DR. JOSÉ IGNACIO REGLA CONTRERAS

ASESOR

DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

MÉXICO DF, 11 DE ABRIL DE 2011





Universidad Nacional
Autónoma de México

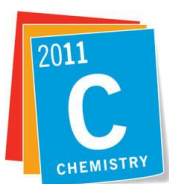


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



International Year of
CHEMISTRY
2011



Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Investigación en Síntesis de Fármacos, L-9 Planta Alta y en el Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia UIDCC, L-8 Planta Baja, ambos de la Unidad Multidisciplinaria de investigación Experimental de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza-UNAM, bajo la supervisión y dirección del Dr. José Ignacio Regla Contreras, Dr. Edelmiro Santiago Osorio y M. en C. María Patricia Shirley Demare Negrete.



Hasta el momento, de este trabajo se han derivado las siguientes publicaciones:

López-Ortíz M, Herrera-Solís A, **Luviano-Jardón A**, Reyes-Prieto N, Castillo I, Monsalvo I, Demare P, Méndez-Díaz M, Regla I, Prospéro-García O. Chemoenzymatic synthesis and cannabinoid activity of a new diazabicyclic amide of phenylacetylricinoleic acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 3231-3234.

Castillo E, Regla I, Demare P, **Luviano-Jardón A**, López-Munguía A. Efficient chemoenzymatic synthesis of phenylacetylirinvanil, an ultrapotent capsaicinoid. *Synlett* **2008**, 2869 – 2873.



Este trabajo será presentado en el Congreso Internacional de Farmacología México 2011. Reunión conjunta del XXXIV Congreso Nacional de Farmacología y el 54th Annual Meeting of the Western Pharmacology Society. Del 16 – 20 de mayo de 2011, Palacio de la Antigua Escuela de Medicina, Centro Histórico, México DF.



Actualmente se encuentra en preparación un manuscrito para publicación con los resultados de esta tesis.

Dedicatorias

A mi Familia

A mi Madre Mirey Jardón Salgado quien ha sido luz en la oscuridad y el motor principal para culminar mis estudios profesionales, a quien le debo lo que soy y de quien he recibido tanto apoyo y amor durante mi vida.

A mi hermano Dante Valdemar Luviano Jardón in memoriam; de quien recibí amor, apoyo y fuerza para seguir en el camino.

A mi hermana Danira Mirey Luviano Jardón, una fuerza impulsora que me llevó siempre hacia adelante.

A todos mis sobrinos: Dante Valdemar Luviano Avilés, Eddy Valdemar Luviano Morales, Yerick Damar Luviano Morales, José Luis Jiménez Luviano (Pepe), Joselyn Danira Jiménez Luviano, Johana Mirey Jiménez Luviano y Jessica Jiménez Luviano (Yiyi).

A mi Papa Gregorio Luviano Hernández, por el apoyo brindado durante los estudios.

A mis amigos

Pedro Cardoso Solís, Julio Cesar Cardoso Solís, Heriberto Ramos Lorenzana, Ivan Gabriel Valdovines Alcalá, Jazmín Valdez Pavón y Karina Martínez, por todos los inolvidables momentos juntos.

Mención especial a mi Amigo, Maestro y Profesor José Ignacio Regla Contreras, por todo el apoyo y afecto brindado en estos 5 años y medio. No tengo palabras para agradecerle lo que ha hecho por mí.

Mención especial también a mi Amiga y Profesora la Mtra. Patricia Demare, quien me formo e inició en este camino y que aun no descubro con claridad que cualidades vio en mí, pero le agradezco por todo.

“Maestro no es el que enseña, sino el que inspira”

Anónimo

Agradecimientos

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio, por sus enseñanzas pero sobre todo por su amistad. También por haberme permitido trabajar en su laboratorio y formar parte de su grupo de trabajo.

A mis compañeros y amigos de Síntesis Orgánica: Manuel López Ortíz, Ivan Monsalvo Montiel, Viridiana Pérez, Erick de los Santos (la ardilla), Araceli Guevara por todo el tiempo que convivimos juntos y los buenos y malos ratos que pasamos.

A mis compañeros y amigos de Hematopoyesis: Reynaldo Tiburcio Felix, Claudia, Itzen Aguiñiga, Vaniamin Domínguez, Oswaldo Silvestre, Edgar Ledesma, Yolanda Córdova, Damian, Jessi, Lulu, Lupita y Vero, quienes hicieron muy amena y divertida mi estancia en el Labo de Hematopoyesis.

A mis profesores de la carrera quienes con sus enseñanzas me impulsaron siempre hacia adelante y me dieron siempre muchos ánimos, QFB Enriqueta Castrejón, IQ Enrique Gil, QFB Patricia Vidal, QFB Ricardo Domínguez, Dra. Raquel Retana, M en C María José Márquez Dos Santos, Dra. Isabel Soto Cruz.

Al profesor QFB Oscar Gonzales Moreno, por su amistad y sus enseñanzas en tantas clases que tome con él.

A la QFB Evangelina Mercado Marín por su amistad y sus comentarios tan acertados en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Arturo Valle Mendiola por su amistad y revisión de este trabajo.

A la FES Zaragoza

A la UNAM

A Dios

Agradecimientos



Este trabajo contó con el financiamiento del proyecto ciencia básica CONACYT “Síntesis de nuevos derivados de (1*S*,4*S*) y (1*R*,4*R*)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano con potencial aplicación en química medicinal y catálisis asimétrica” con clave 101855.



Instituto de Química
UNAM

Al equipo de espectroscopia del Instituto de Química de la UNAM: Q. Ma de los Ángeles Peña, por la realización de los espectros de RMN. QFB Rocío Patiño y Dr. Javier Pérez, por la realización de los espectros de IR, masas y rotaciones ópticas

Instituto de
Biotecnología



Al Dr. Alejandro Torres, del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por la realización de los análisis por HPLC.

novozymes®



A la empresa Novozymes-México por su generosa donación de la lipasa B de *C. antarctica* (Novozym 435®).

**Al tapón
esmerilado**



*Jamás desesperes, aún estando en las más sombrías aflicciones, pues de las nubes negras
cae agua limpia y fecundante.*

Miguel de Unamuno

El éxito es la habilidad de ir de fracaso a fracaso sin perder el entusiasmo. Winston Churchill

Nada que se consiga sin pena y sin trabajo es verdaderamente valioso. Joseph Addison

La vida es muy peligrosa. No por las personas que hacen el mal, sino por las que se sientan a ver lo que pasa. Albert Einstein

El grado sumo del saber es contemplar el porqué. Sócrates

Quien no añade nada a sus conocimientos los disminuye. Talmud

El tiempo es muy lento para los que esperan, muy rápido para los que tienen miedo, muy largo para los que se lamentan, muy corto para los que festejan. Pero, para los que aman, el tiempo es eternidad. William Shakespeare

Pobre no es el que tiene poco sino el que mucho desea. Lucio Anneo Séneca

Se le paga mal a un maestro si se le permanece siempre discípulo. Friedrich Nietzsche

En ciencia, es más valiosa una pregunta que una respuesta. Anónimo

La inteligencia es casi inútil a aquel que no tiene más que eso. Alexis Carrel

Iré a cualquier parte, siempre que sea hacia adelante. Livingstone

Todo aquello que puedas o sueñes hacer, comiénzalo. La audacia contiene en si misma genio, poder y magia. Goethe

El fracaso es sólo la oportunidad de comenzar de nuevo de forma más inteligente. Henry Ford

Un experto es alguien que te explica algo sencillo de forma confusa de tal manera que te hace pensar que la confusión sea culpa tuya. William Castle

Cuando se cierran los caminos, el hombre, de buena o mala voluntad, se ve obligado a seguir hasta el final. Feddor Dostoievski

Todas nuestras aventuras transcurren en un matraz. Julio Cardoso

El futuro es hacia adelante... la ciencia marca la pauta. Discovery Channel

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	1
2. Marco Teórico	
2.1 Hematopoyesis	2
2.2 Leucemia	5
2.3 Quimioterapia de enfermedades neoplásicas	6
2.4 Fuentes de obtención de fármacos	9
2.5 Capsaicina y capsaicinoides	11
2.6 Desarrollo de nuevas fenilacetilricinoleilamidas que incorporan el fragmento (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano	15
2.7 Catálisis enzimática en síntesis orgánica	20
3. Planteamiento del problema	25
4. Objetivos	26
5. Hipótesis	27
6. Materiales y métodos	
6.1 Parte química	28
6.1.1 Materiales, instrumentos y métodos generales	28
6.1.2 Preparación de los compuestos 13 – 19	29
6.1.3 Ricinoleato de metilo (24)	29
6.1.4 Fenilacetilricinoleato de metilo (25)	30
6.1.5 Ácido fenilacetilricinoleico (23)	31
6.1.6 Método general para la amidación del ácido fenilacetilricinoleico	31
6.1.7 Fenilacetato de (1 <i>R</i> ,3 <i>Z</i>)-1-hexil-12-[(1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-bencil-2,5- diazabicyclo [2.2.1]heptan]-12-oxo-dodecenilo (11)	32

6.1.8 Fenilacetato de (1 <i>R</i> ,3 <i>Z</i>)-1-hexil-12-[(1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-hidroxi-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan]-12-oxo-dodecenilo (10)	32
6.2 Parte biológica	34
6.2.1 Líneas celulares	34
6.2.2 Cultivo celular	35
6.2.3 Ensayos de proliferación celular	35
6.2.4 Cultivo de células mononucleadas de médula ósea normal de ratón	36
7. Resultados y discusión	
7.1 Síntesis de los compuestos precursores derivados del (1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2,5-diazabicyclo[2.2.1] heptano	37
7.2 Síntesis químico-enzimática y caracterización de ácido fenilacetilricinoleico y sus precursores	41
7.3 Síntesis y caracterización de fenilacetilricinoleilamidas diazabicyclicas	54
7.4 Evaluación biológica del efecto en la proliferación de líneas leucémicas y células mononucleadas de médula ósea normal de ratón	60
8. Conclusiones	68
9. Perspectivas	69
10. Referencias bibliográficas	70
Apéndice I. Espectros selectos de RMN de ¹ H y ¹³ C	84
Apéndice II. Ecuaciones de regresión lineal	101
Apéndice III. Artículos publicados y congresos derivados	104

Lista de abreviaturas

AcOEt	Acetato de etilo
CaLB	del inglés, <i>Candida antarctica</i> lipase B
<i>c</i>	Concentración
CB	Canabinoide (s)
CCF	Cromatografía en capa fina
CC	Cromatografía en columna
CMN-MO	Células MonoNucleadas de Médula Ósea normal de ratón
COSY	Del inglés: Homonuclear correlation Spectroscopy
CPH	Célula Progenitora Hematopoyética
CTH	Célula Tronco Hematopoyética
DMSO d6	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
δ	Desplazamiento químico en ppm
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DMAP	Dimetilaminopiridina
EM	Espectroscopía de masas
FAR	FenilAcetilRinvanil
HETCOR	Del inglés, <i>HETeronuclear CORrelated spectroscopy</i>
HPLC	Del inglés, <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
IC ₅₀	Concentración necesaria para inhibir el 50 % de proliferación celular
IE	Impacto electrónico
IR	Espectroscopía de infrarojo
IUPAC	Del inglés, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
m/z	Relación masa/carga
[M+H] ⁺	Masa molecular más hidrógeno
Pf	Punto de fusión

ppm	Partes por millón
RMN ^1H	Resonancia magnética nuclear de ^1H
RMN ^{13}C	Resonancia magnética nuclear de ^{13}C
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
$[\alpha]_{20}^{\text{D}}$	Rotación específica a 20 °C
TRPV1	Del inglés, <i>Transient Receptor Potential Vainilloid subfamily 1</i>

1. INTRODUCCIÓN

A pesar del avance en el conocimiento del cáncer a nivel celular, molecular, bioquímico y fisiológico, así como del uso de este conocimiento en el diagnóstico y la implementación de terapias, en los últimos años, este padecimiento es ya la primera causa de muerte a nivel mundial, con incremento de nuevos casos clínicos a nivel mundial. Por lo anterior, sigue vigente la necesidad de encontrar nuevas alternativas de tratamiento, incluyendo nuevos medicamentos.

En la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer, la capsaicina ha mostrado la capacidad de inhibir la proliferación e inducir apoptosis en diversos tipos de líneas celulares de cáncer, incluyendo leucemias. Se ha descrito derivados sintéticos del ácido ricinoleico análogos de capsaicina como el rinvanil y fenilacetilrinvanil, con alta afinidad para unirse a los receptores vainilloides y que tienen actividad biológica similar a la capsaicina como antineoplásicos.

En este trabajo se realizó la síntesis químico-enzimática y evaluación biológica de nuevos compuestos derivados del ácido ricinoleico fenilacetilado en su único grupo hidroxilo. Dichos compuestos incorporan el sistema (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano; una diamina quiral con equilibrio conformacional restringido. Estas nuevas amidas fueron evaluadas en líneas celulares leucémicas de ratón P388, J774, WEHI-3 y de leucemia humana K562 así como en cultivos de células mononucleadas de médula ósea normal de ratón.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis es el proceso fisiológico de producción de células sanguíneas funcionales (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) y ocurre bajo condiciones muy específicas en la médula ósea. Las primeras señales de hematopoyesis en el ser humano aparecen hacia la segunda semana de vida fetal en la pared del saco vitelino, donde aparecen en el mesenquima pequeñas agrupaciones denominadas islotes sanguíneos. La hematopoyesis fetal varía paulatinamente su localización hasta ubicarse en el hígado, que es el sitio principal de hematopoyesis hacia el tercer mes de vida fetal. Cabe mencionar, que tanto en la fase del saco vitelino como en la hepática se forman casi con exclusividad eritrocitos, pero en el hígado empiezan a aparecer algunos granulocitos y megacariocitos. Hacia el quinto mes de vida fetal, disminuye la hematopoyesis en el hígado y bazo, que se detiene casi totalmente hasta antes del nacimiento. La médula ósea pasa a ser el órgano hematopoyético central en los últimos meses de vida fetal y durante toda la vida posnatal [1]. Todas las células sanguíneas se originan a partir de una célula tronco hematopoyética (CTH), la cual, se define como una célula capaz de dar origen a cualquiera de las células sanguíneas y posee a su vez, capacidad de autorenovación [2].

Las células tronco hematopoyéticas representan solo una porción muy pequeña del total de células nucleadas en la médula ósea (aproximadamente una de cada cien mil) y en condiciones normales solo del 5 al 10 % están en ciclo, dado que el resto permanecen en estado de latencia, en la fase G_0 del ciclo celular. De cualquier forma, esta cantidad de CTH activas es suficiente para mantener un estado de equilibrio; en donde el número de células sanguíneas maduras que muere (por senescencia ó por realizar alguna función específica) es remplazado por una cantidad igual [3]. Para su estudio, la hematopoyesis se ha dividida jerárquicamente en cuatro compartimentos celulares, en donde las células más primitivas son las CTH, las cuales dan origen al segundo compartimento

celular, las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), las cuales han perdido la capacidad de autorenovación pero conservan su potencial proliferativo y se estima que, en condiciones normales, ocupan entre el 0.5 al 5 % del total de células en la médula ósea. El tercer compartimento celular está constituido por las células precursoras hematopoyéticas, las cuales ya pueden ser reconocidas morfológicamente, a diferencia de las CTH y CPH que no pueden ser reconocidas por su morfología; éstas ocupan más del 90 % de la población celular en la médula ósea. Por último, las células precursoras dan origen al cuarto compartimento, las células sanguíneas maduras circulantes (Figura 2) [4,5].

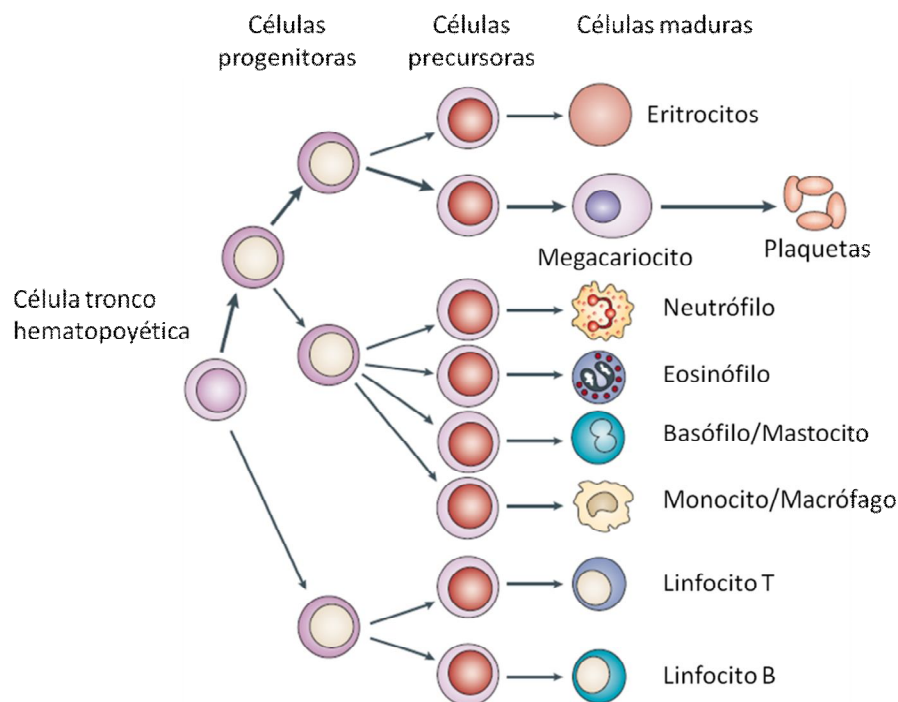


Figura 2. Esquema general de la hematopoyesis (Adaptado de la referencia [6])

Las células sanguíneas se desarrollan dentro de un ambiente constituido por diversos tipos celulares y proteínas extracelulares que en su conjunto forman el microambiente hematopoyético. Las células que constituyen este ambiente son conocidas como células del estroma medular y entre ellas se encuentran principalmente fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, osteoblastos y adipocitos. Su función principal es proveer el microambiente propicio para regular

la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. Las células del estroma medular secretan proteínas estructurales como colágeno, fibronectina, laminina y proteoglicanos que constituyen la matriz extracelular, así como las proteínas que regulan la fisiología de las células hematopoyéticas y sus precursores; las llamadas citocinas [5]. Sin embargo, la regulación de la hematopoyesis puede presentar alteraciones en sus diferentes fases y así modificar la función normal de las poblaciones de células hematopoyéticas. Alteraciones como mutaciones, traslocaciones o inversiones de los genes que regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia celular en las células hematopoyéticas pueden terminar en enfermedades hematológicas como las leucemias.

2.2 LEUCEMIA

La leucemia se caracteriza por un incremento excesivo en el número de células progenitoras hematopoyéticas de una estirpe celular determinada presentes en médula ósea, como resultado de una proliferación descontrolada en ausencia de diferenciación de clonas derivadas de la transformación maligna de las células progenitoras en cuestión . Las células leucémicas al no diferenciarse completamente no funcionan adecuadamente como resultado de alteraciones en el mecanismos que controlan la proliferación y/o diferenciación, hecho que les confiere ventajas de crecimiento sobre las células que participan en la hematopoyesis normal, por lo que, la acumulación de una estirpe celular transformada, usualmente se acompaña de la disminución del tejido hematopoyético normal de médula ósea y posteriormente una invasión de sangre periférica y otros tejidos [7,8]. Dependiendo de la naturaleza de las alteraciones genéticas que se presenten, la clona leucémica seguirá un cierto patrón de comportamiento biológico y éste, a su vez, determinará las características clínicas de la enfermedad [9].

2.3 QUIMIOTERAPIA DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

El primer tratamiento efectivo de quimioterapia para curar la leucemia fue utilizado por Lissauer en 1865, usando solución de Fowler (solución hidroalcohólica de arsenito de potasio al 1 %) que se utilizó hasta 1940. En 1931 se reportó la regresión de tumores cutáneos inducidos químicamente en ratones, utilizando mostazas de azufre, que a su vez sirvió para tratar efectivamente a 12 pacientes por vía tópica e intratumoral, sin embargo, este trabajo no causó un impacto significativo debido a los letales efectos tóxicos de estos compuestos [10].

A finales de la segunda guerra mundial se demostró que pacientes con tumores del sistema linfático lograron un alto porcentaje de remisión de la enfermedad después de ser tratados con agentes alquilantes. Estos resultados fueron publicados por Gilman y Philips después de la guerra en 1946 [11]. Algunos años después, en 1948, se descubrió el efecto antitumoral de los antimetabolitos en leucemia [12]. Durante la década de los sesentas fueron desarrollados antibióticos antitumorales, los compuestos de platino y algunos alcaloides, muchos de los cuales siguen aun en uso clínico y marcaron el inicio de la quimioterapia moderna contra el cáncer [13].

Los agentes quimioterapéuticos antitumorales en general se clasifican de la siguiente manera [14-17]:

- i. Agentes alquilantes: este tipo de compuestos actúan reaccionando covalentemente con nucleófilos celulares; de especial interés son las bases nitrogenadas. En esta categoría se encuentran las beta-cloroamidas, ciclofosfamidias, mitomicina C, alquilsulfonatos, nitrosoureas y derivados de hidracina y triazina.
- ii. Cisplatino y análogos: forman aductos mono o bifuncionales preferencialmente con el N-7 en guanina y adenina en el ADN, de esta forma no se permite la replicación del material genético.

- iii. Antimetabolitos: Intervienen en el catabolismo del material genético. En esta categoría se encuentran los antifolatos (metotrexato, tomudex), 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina y la citarabina.
- iv. Agentes que interaccionan con la topoisomerasa: agentes planos que se intercalan en la cadena de ADN y al interaccionar con la topoisomerasa se estabiliza el complejo fármaco-enzima-ADN, lo que ocasiona la ruptura del ADN. En este rubro se encuentran las epipodofilotoxinas, camptotecina, antraciclina, entre otros.
- v. Agentes que afectan la estabilidad de los microtúbulos: los microtúbulos forman el huso mitótico que separa los cromosomas durante la mitosis; estos fármacos inhiben o estabilizan la polimerización de la tubulina, lo que trae como consecuencia que la célula sea detenida en la fase M del ciclo celular.
- vi. Misceláneos: aquí se incluyen fármacos de diferentes mecanismos de acción como la bleomicina, L-asparaginasa, homoharringtonina, geldanomicina y amifostina.

Es importante mencionar que los fármacos de estas seis categorías no poseen especificidad entre células tumorales y células normales, y no todos los tipos de cáncer responden a estos compuestos. Una de las desventajas observadas es que a la mayoría de los fármacos actuales les falta selectividad y causan usualmente toxicidad severa, incluso en algunas ocasiones un solo fármaco no puede inhibir el crecimiento de todas las células tumorales por lo que para aumentar su efectividad es necesaria la combinación de los diferentes grupos de fármacos [13].

En los últimos años, los conocimientos sobre la biología del cáncer han conducido al descubrimiento de fármacos con nuevos blancos moleculares. Uno de estos medicamentos, el ácido retinoico todo *trans*, produce diferenciación y ha servido para favorecer la remisión en leucemia promielocítica aguda, incluso cuando la quimioterapia estándar no da resultado [18].

El haber logrado caracterizar antígenos y oncogenes únicos ha brindado nuevas oportunidades terapéuticas. En este contexto, la translocación BCR-ABL en la leucemia mieloide crónica (LMC), codifica una tirosina-cinasa esencial para la proliferación y supervivencia de las células leucémicas. La inhibición de esta actividad cinasa mediante Imatinib, nuevo medicamento dirigido molecularmente, se ha constituido en tratamiento estándar para la LMC. Sin embargo, el desarrollo de resistencia a Imatinib por parte de las células malignas, hace necesario tratar al paciente con inhibidores de segunda generación como Dasatinib o Nilotinib **[18, 19]**.

A pesar de los avances en el desarrollo de fármacos y de novedosos tratamiento contra del cáncer, el porcentaje de muertes debido a neoplasias malignas en México ha ido en aumento **[20,21]**. A su vez, estadísticas de la Organización Mundial de la Salud ubican al cáncer como la primera causa de muerte a nivel mundial y estiman que en 2008, 7.6 millones de personas fallecieron por algún tipo de cáncer, a su vez, se pronostica que en los próximos 10 años fallecerán 84 millones de personas por cáncer, de las cuales el 70 % serán en países del tercer mundo y en vías de desarrollo **[22]**.

Por lo anterior, a nivel nacional e internacional, sigue vigente la necesidad de desarrollar nuevas alternativas de tratamiento, incluyendo la generación de fármacos antineoplásicos más seguros y eficaces.

2.4 FUENTES DE OBTENCIÓN DE FÁRMACOS

Según la definición de la IUPAC (del inglés, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) en 1972, la química medicinal abarca el descubrimiento, síntesis, identificación e interpretación del modo de acción de compuestos biológicamente activos en general. Este proceso involucra básicamente tres etapas; (1) *descubrimiento*: la identificación de nuevas sustancias activas denominadas compuestos líder o guías y pueden ser de origen sintético, biotecnológico o natural. (2) *optimización*: consiste en la modificación sintética de la estructura líder para mejorar potencia o selectividad y disminuir toxicidad. (3) *desarrollo*: es el diseño de la ruta sintética para la producción en gran escala así como el desarrollo de formulaciones para mejorar características como absorción, solubilidad en agua, liberación prolongada, sabor, eliminar irritación o para eliminar irritación o dolor en el caso de inyectables.

Las fuentes para la obtención de fármacos anticancerígenos son diversas: fármacos sintéticos, péptidos mayores de 45 aminoácidos, vacunas, productos naturales provenientes de plantas, protozoarios, bacterias, hongos y otros organismos ya sean terrestres o acuáticos. En este contexto, los productos naturales han sido una rica fuente de agentes de gran valor para la medicina, en la actualidad más de la mitad de los medicamentos son productos naturales o están relacionados con ellos y en el caso del cáncer, esta proporción supera el 60 % [23].

Lo anterior ha causado un gran impacto e interés en las compañías farmacéuticas e instituciones donde se desarrollan nuevos medicamentos. Aunque la mayoría de la veces los productos naturales no resultan lo suficientemente eficaces en términos terapéuticos, son sometidos a numerosas modificaciones químicas y muchas veces se llega a estructuras totalmente nuevas que van perdiendo relación estructural con las moléculas guías y que van aumentando significativamente su actividad benéfica. La Figura 3 señala las fuentes de obtención de todos los fármacos anticancerígenos disponibles en la actualidad y

se observa que la gran cantidad de entidades químicas han sido desarrolladas a partir de productos naturales y sus modificaciones sintéticas [24].

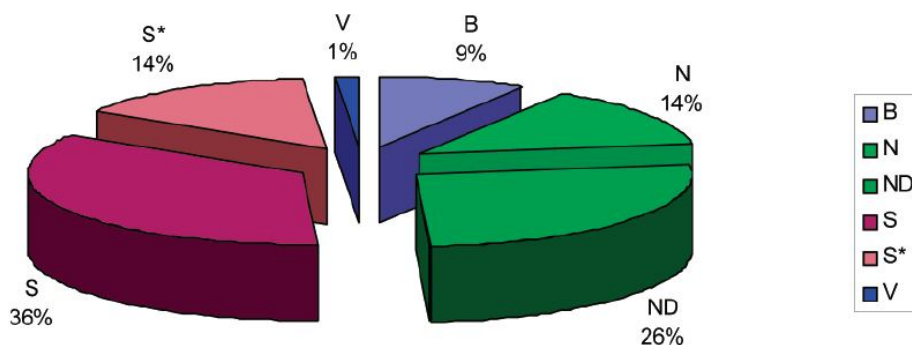


Figura 3. Fuentes de obtención de fármacos anticancerígenos actualmente disponibles desarrollados de 1940 al 2002. B: péptidos > 45 aa, N: productos naturales, ND: derivados de productos naturales, S: productos sintéticos, S*: productos sintéticos análogos de productos naturales, V: vacunas. (Adaptado de la referencia [24]).

2.5 CAPSAICINA Y CAPSAICINOIDES

La capsaicina ((*E*)-*N*-[(4-hidroxi-3-metoxifenil)metil]-8-metil-6-nonenamida (Figura 4), es un compuesto orgánico de origen natural y componente mayoritario de los capsaicinoides, grupo de compuestos que le confieren el efecto de pungencia al fruto de chile (*capsicum spp*). La pungencia, también conocida como ardor, es la sensación que produce el calor intenso ($\geq 43^{\circ}\text{C}$) y cabe mencionar que si bien la capsaicina produce pungencia, no produce ni edema ni daño tisular. El estudio de la capsaicina es impactante, pues en la base de datos SciFinder existen más de 16 000 referencias y sus aplicaciones van desde farmacológicas y gastronómicas hasta la repelencia de tiburones.

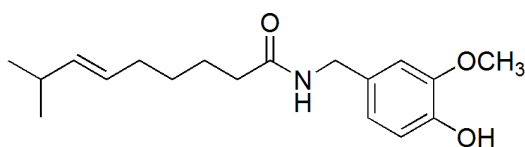


Figura 4. Estructura química de la capsaicina (1).

El principal efecto fisiológico a nivel molecular de la capsaicina es como agonista de los receptores TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid subfamily 1*) los cuales son canales catiónicos no selectivos activados por calor y protones y son fuertemente expresados en neuronas sensoriales [25]. La activación de estos receptores ocasiona la liberación endógena de diversos mediadores químicos proinflamatorios como prostaglandinas, bradicinina y ATP, esto a su vez resulta en la liberación de diversos neurotransmisores, induciendo dolor e inflamación neurogénica por lo que estos receptores juegan un papel importante en estados de dolor neuropático (ocasionado por daño en el tejido nervioso), inflamación intestinal entre otros [26-29].

Uno de los muchos neurotransmisores involucrados en los impulsos del dolor es el péptido conocido como sustancia P [30, 31]; en la actualidad se sabe que el

principal mecanismo por el cual la capsaicina ejerce un efecto analgésico y antiinflamatorio después de un tratamiento prolongado es debido a la depleción de la sustancia P en las neuronas sensoriales ocasionando desensibilización [32]. Además existen informes que demuestran la capacidad de la capsaicina de inactivar neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal de la médula espinal y de los ganglios trigeminales, encargadas de transmitir el dolor [33-36]. Lo anterior ha dado lugar a numerosas investigaciones sobre el papel de la capsaicina y su interacción con los receptores TRPV1 en el tratamiento de una gran variedad de patologías que cursan con hiperalgesia como artritis reumatoide [37,38], dolor neuropático crónico [39], neuropatía diabética [40,41] y otras neuralgias [42-45].

En este contexto, se han sintetizado y evaluado otros compuestos vainilloides como son el olvanil [46] y el capsiato (Figura 5) [47], que tienen la capacidad de estimular los receptores TRPV1 pero sin el efecto de pungencia. Se ha demostrado que además de la percepción del dolor, los receptores TRPV1 regulan la frecuencia e intensidad de las contracciones de la vejiga, ya que están ampliamente expresados en el tracto urinario, por lo que este tipo de compuestos ha encontrado aplicación también en el tratamiento de la incontinencia urinaria [48].

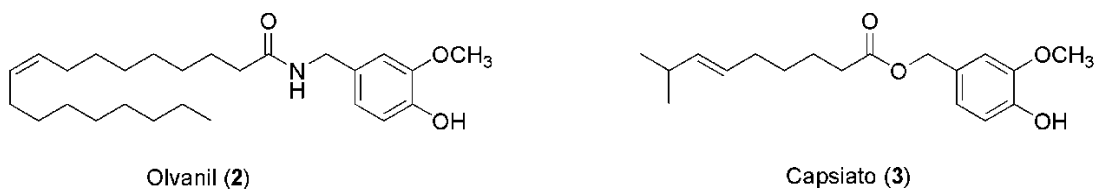


Figura 5. Estructuras químicas del olvanil (2) y el capsiato (3), análogos capsaicinoides no pungentes.

En la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer, la capsaicina ha mostrado la capacidad de inhibir la proliferación de diversos tipos de líneas celulares de cáncer como HepG2 (hepatoma humano) [49], AGS (cáncer gástrico)[50], PC-3 (cáncer de próstata) [51], MCF-7 (cáncer de mama) [52], U373, U87, FC1 y FLS (gliomas) [53], NB4, UF-1, Kasumi-1, HL-60, K562, KU812 y U937 (leucemia) [54], HT-29 (cáncer de colon) [55], entre otras [56,57] y que este efecto es debido a la inhibición de la respiración mitocondrial y a la inducción de apoptosis [58]. Además existen evidencias de que la capsaicina tiene cierta selectividad por células tumorales, al inhibir su proliferación sin afectar el crecimiento de células normales [59,60]. También existen informes de la capacidad quimioprotectora de la capsaicina contra algunos agentes carcinogénicos y mutagénicos [61,62], así como la capacidad de inducir diferenciación terminal en células de glioblastoma humano A172 [63]. Estas investigaciones avalan el fuerte potencial antitumoral de la capsaicina.

Sin embargo, la obtención de capsaicina a partir de fuentes naturales, ha resultado en métodos costosos e ineficientes por su bajo contenido en frutos del género *Capsicum spp.* y a la presencia de otros compuestos con polaridad similar. En general debido a su alta pungencia y por tanto difícil manejo, se complica tanto su obtención por métodos sintéticos como su uso; lo anterior, constituye una gran desventaja cuando se piensa posicionar a la capsaicina como un posible agente quimioterapéutico [64].

Recientemente, Appendino y col. reportaron la síntesis y evaluación biológica del rinvanil y fenilacetilrinvanil (FAR (5), Figura 6), este último es el agonista de los receptores TRPV1 más potente que ha sido sintetizado y que carece de acción pungente [65,66], de hecho es casi 1000 veces más potente que la capsaicina en términos de afinidad por el receptor TRPV1 [27].

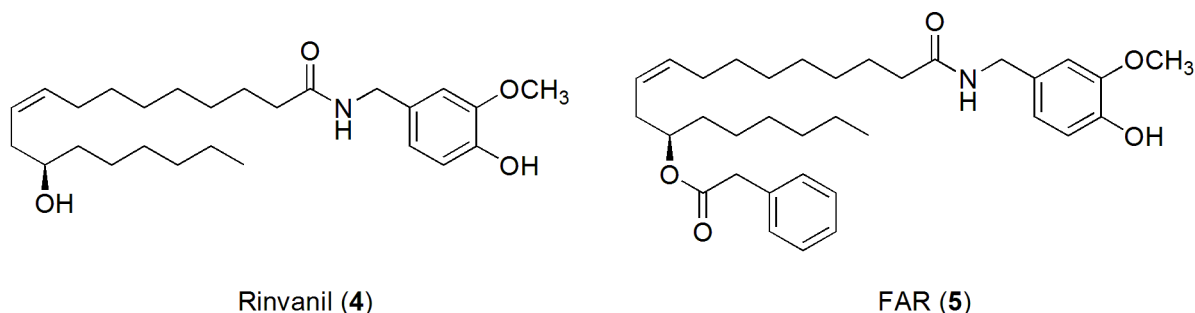


Figura 6. Estructuras químicas del rinvanil (4) y FAR (5).

Sin embargo, a pesar de la relación estructural y de efectos fisiológicos del rinvanil y FAR con la capsaicina, no se han reportado sus propiedades antitumorales, por lo que en nuestro grupo de investigación se determinó su actividad citotóxica en líneas leucémicas de ratón y células de médula ósea normal de ratón y se comparó en los mismos parámetros con la capsaicina (Tabla 1). Los resultados mostraron que comparado con rinvanil y capsaicina, el FAR (5) es más potente en la inhibición de la proliferación de células leucémicas y mostró ser menos tóxico para las células normales, lo que constituye un ejemplo de que las modificaciones estructurales juegan un papel importante en la modulación de la actividad biológica.

Tabla 1. Valores de IC₅₀ (µg/mL) para las diferentes líneas leucémicas y células mononucleadas de médula ósea normal de ratón.

Compuesto	IC ₅₀ (µg/mL) ^a			
	P388	J774	WEHI-3	Médula ósea
Capsaicina (1)	72.1 ± 1.8	32.5 ± 1.7	47.7 ± 2.5	53.5 ± 3.1
Rinvanil (4)	49.2 ± 2.2	10.2 ± 3.0	31.2 ± 3.6	72.6 ± 2.4
FAR (5)	9.0 ± 2.0	8.0 ± 3.7	10.4 ± 3.1	40.7 ± 2.4

^a IC₅₀: concentración requerida para disminuir en un 50 % la proliferación celular.

2.6 DESARROLLO DE NUEVAS AMIDAS DEL ÁCIDO FENILACETILRICINOLEICO QUE INCORPORAN EL SISTEMA (1S,4S)-2,5-DIAZABICICLO[2.2.1]HEPTANO

Los endocannabinoides son un grupo de compuestos que a través de la estimulación de los receptores cannabinoides tipo 1 (CB1) y tipo 2 (CB2) modulan la transmisión sináptica en el cerebro y en los tejidos periféricos respectivamente; sus funciones fisiológicas son numerosas y van desde la modulación de la temperatura corporal, la percepción del dolor, la conducta y hasta se ha sugerido que estos receptores participan en la respuesta inmunológica, ya que se ven involucrados en la diferenciación y migración esplénica de los linfocitos B. Actualmente, el principal uso terapéutico de los compuestos capaces de estimular estos receptores se utilizan como potentes y efectivos agentes antieméticos y para tratar la falta de apetito inducida por fármacos antineoplásicos y también han demostrado su eficacia en el tratamiento de varias enfermedades como glaucoma, esclerosis múltiple, daño cerebral, desordenes cardiovasculares e inflamación crónica [67,68].

La estructura química básica de los agonistas endógenos de los receptores CB1 y CB2 apunta siempre en la misma dirección, etanolamidas de ácidos grasos y su actividad biológica ha sido ampliamente estudiada, principalmente como agentes antiinflamatorios y analgésicos y más recientemente como agentes antitumorales [69-71].

Un ejemplo importante de agonistas endógenos cannabinoides es la *N*-araquidonil-etanolamina (anandamida, **6**) y el 2-araquidonil-glicerol (2-AG, **7**) (Figura 7), los cuales son capaces de inhibir la proliferación de líneas celulares provenientes de cáncer de próstata, mama y colon [72-74], y en el caso de la anandamida se encontró que puede inhibir la activación de NF-κB (del inglés: Nuclear Factor-κB) en las líneas A549 y 5.1 (clona derivada de la línea celular Jurkat) [75].

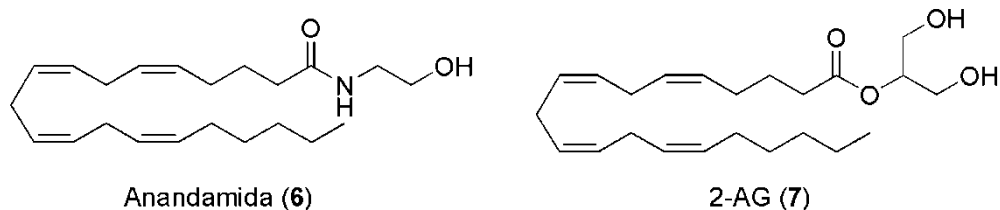


Figura 7. Estructura química de compuestos endocannabinoides con actividad antitumoral. La estructura básica consiste en una cadena poliinsaturada (ácido araquidónico) formando una amida con etanolamina en el caso de la anandamida (6) y en el caso del 2-AG (7), formando un éster con el hidroxilo-2 del glicerol.

Por otro lado, la cadena del ácido fenilacetilricinoléico, de donde deriva el FAR (5), ha sido ya modificada químicamente introduciendo varios tipos de sustituyentes en el nitrógeno de la amida y han sido evaluadas en la afinidad por los receptores CB1 y CB2 encontrando que el compuesto que posee mayor actividad biológica es la amida que contiene un grupo hidroxietilo, el cual se muestran en la Figura 8 [76].

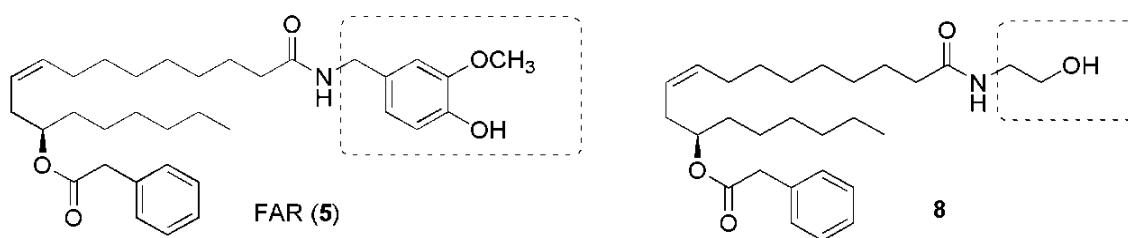


Figura 8. Modificación química realizada al FAR por Appendino y colaboradores [76]. El remplazo de la cadena de vainillilamida por etanolamida aumento significativamente la afinidad por los receptores cannabinoides.

Se sabe que con la introducción de fragmentos quirales en las moléculas, se puede modular la actividad biológica de muchos fármacos, debido a que se incrementan las interacciones fármaco-receptor más estables, lo que traerá como consecuencia un aumento de la eficacia terapéutica y una disminución de la toxicidad, en este caso el compuesto quiral enantioméricamente puro efectivo se le denomina eutómero y al otro enantiómero cuya actividad terapéutica es casi nula o responsable de los efectos tóxicos se le denomina distómero [77]. Además, también es conocido que las restricciones conformacionales de las moléculas pueden mejorar las propiedades farmacológicas, puesto que al disminuir el número de conformeros se mejoran en términos de estabilidad, las interacciones con los receptores blancos y también se mejoran las propiedades farmacocinéticas [78,79].

En este contexto, con el fin de mejorar las cualidades antitumorales de este tipo de compuestos nosotros proponemos la introducción del sistema (1*S*,4*S*)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano por que presenta las dos propiedades antes mencionadas, una estructura rígida, dos centros estereogénicos y que además conserva la relación de dos átomos de carbono entre el nitrógeno de la amida y el heteroátomo que en el caso de la anandamida (**6**) y otros compuestos relacionados (p.ej. **8**) es oxígeno; en nuestro caso es nitrógeno (Figura 9).

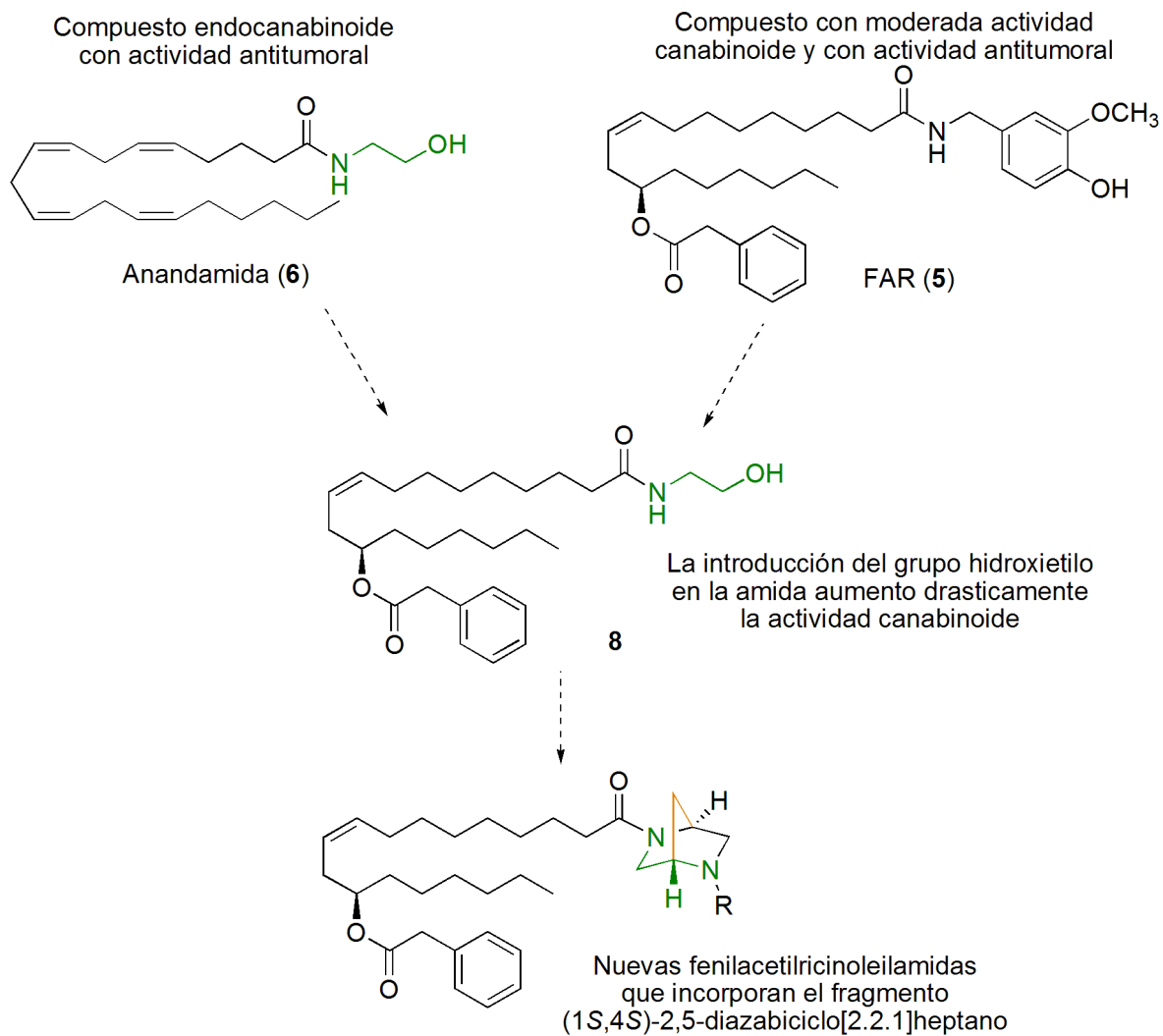


Figura 9. Desarrollo de nuevas fenilacetilricinoleilamidas que incorporan el sistema (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano. En verde se muestra que conserva la relación con respecto a **6** y **8** de dos átomos de carbono entre el átomo de nitrógeno de la amida y el heteroátomo. En amarillo se muestra el puente de metileno que a su vez le confiere quiralidad y rigidez molecular.

Los sustituyentes en el nitrógeno-2 serán variados por sustituyentes estéricamente diferentes (grupos: metilo, hidroxietilo y bencilo), lo cual a su vez permitirá establecer los primeros indicios de la relación estructura actividad en este tipo de nuevos compuestos. En la Figura 10 se muestra la estructura química de estas nuevas amidas que serán denominadas provisionalmente amida 5*N*-Metilada (**9**), amida 5*N*-hidroxietilada (**10**), amida 5*N*-Bencilada (**11**).

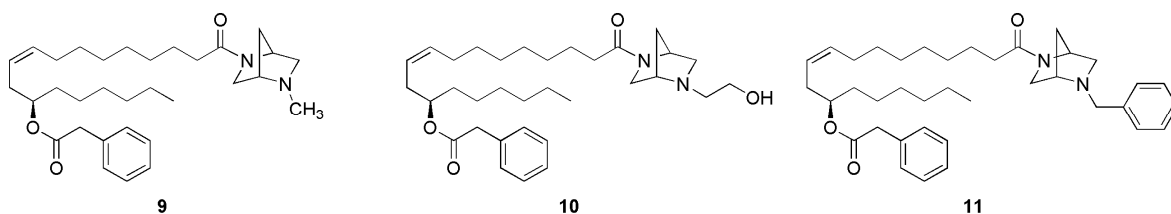


Figura 10. Compuestos propuestos para ser evaluados biológicamente en la proliferación de líneas leucémicas y cultivos de células normales.

2.7 CATALISIS ENZIMÁTICA EN SÍNTESIS ORGÁNICA

Las enzimas son proteínas que catalizan diversas reacciones químicas en los organismos vivos. Un catalizador es una sustancia que disminuye la energía de activación de una reacción y por consiguiente aumenta la velocidad de reacción, sin consumirse y sin sufrir modificación alguna en el transcurso de ésta. La energía de activación es la cantidad de energía que se necesita para llevar las moléculas de una reacción química a un estado reactivo, representando una barrera energética que tiene que ser sobrepasada para que la reacción tenga lugar. Las enzimas pueden incrementar de 10^8 a 10^{20} veces la velocidad a la que una reacción ocurriría de modo espontáneo y son muy específicas en las reacciones que catalizan; así también son específicas en el tipo de sustratos con los que interacciona. Esto se relaciona con la estructura tridimensional de la enzima [80].

Para catalizar una reacción, el sustrato debe unirse a la enzima de manera adecuada para que pueda interaccionar con los grupos catalíticos del sitio activo. A la unión del sustrato con el sitio activo se le llama complejo enzima-sustrato. El resultado final de la formación del complejo enzima-sustrato es la disminución de la energía de activación necesaria para poner en marcha la reacción de conversión del sustrato en producto y la regeneración de la enzima (Figura 11) [81].

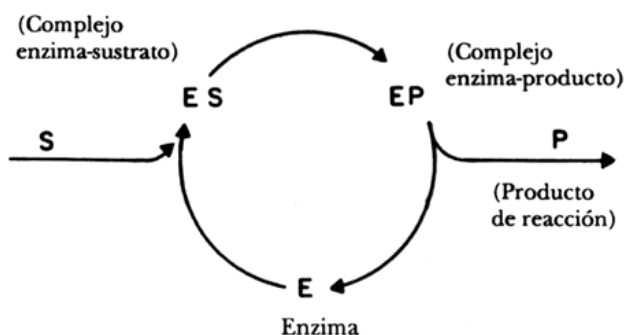


Figura 11. Ciclo catalítico de las enzimas (Tomado de la referencia [80]).

Entre las diversas metodologías que los químicos han desarrollado para realizar procesos cada vez más limpios (con menos productos laterales) y menos contaminantes del ambiente está la biocatálisis ó catálisis biológica, en la cual se utilizan enzimas puras, parcialmente purificadas o microorganismos como catalizadores (biocatalizadores) para convertir un sustrato en producto. De esta forma, se han podido emplear enzimas para catalizar muchos tipos de reacciones orgánicas y biotransformaciones, por lo que las enzimas han encontrado extensa aplicación en la industria alimentaria, farmoquímica y química fina, entre otras.

Durante los últimos años, el empleo de las enzimas en síntesis orgánica se ha convertido en una importante alternativa a los métodos químicos convencionales, por lo que muchos tipos de enzimas han sido aisladas (generalmente de microorganismos y plantas), caracterizadas y comercializadas. Esto es, sin duda, por las ventajas que ofrece su uso, ya que las enzimas reconocen el sustrato de manera quimio-, regio- y estereoespecífica. Hasta hace algunos años se pensaba que las enzimas solamente podían ser utilizadas en soluciones acuosas, pero en 1985 Klivanov y Zaks demostraron que algunas hidrolasas pueden ser más estables y activas en disolventes orgánicos y que en éstos pueden catalizar nuevos procesos **[82]**.

Las lipasas (triacilglicerol-acilhidrolasas EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis y la síntesis de ésteres formados por el glicerol y ácidos grasos de cadena larga. Además estas enzimas pueden catalizar otras reacciones orgánicas y son adecuadas para la resolución cinética de alcoholes, ácidos carboxílicos y ésteres tanto en agua como en disolventes orgánicos **[83-85]**, esto se debe a la capacidad de reconocer enantioselectivamente a ciertos sustratos, lo cual está relacionado con la estructura tridimensional de la enzima. Cabe mencionar que no todas las lipasas tiene el mismo grado de estereo- y quimioselectividad, aunque, en general estas propiedades dependen del origen de la lipasa, las propiedades químicas del sustrato, su estructura y las condiciones experimentales de reacción **[86]**.

Una de las lipasas más utilizadas en síntesis orgánica es la lipasa B de *Candida antarctica* (CaLB, del inglés *Candida antarctica* lipase B), la cual puede catalizar una amplia gama de reacciones (Figura 12) y debido a ello, se le ha encontrado un gran número de aplicaciones [87].

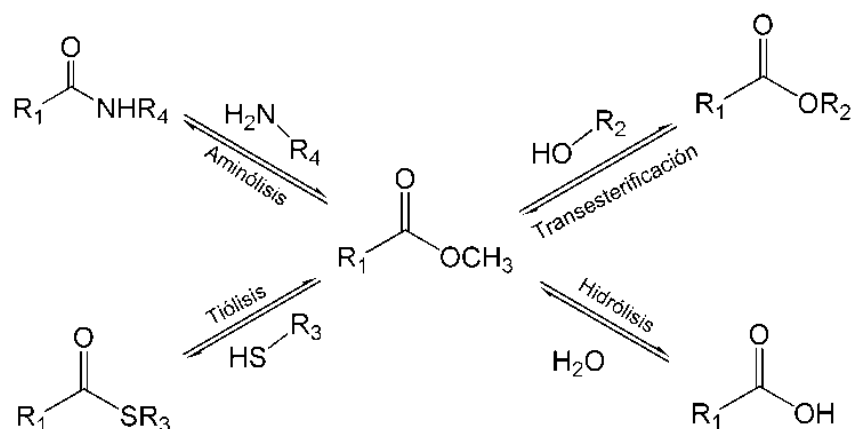


Figura 12. Reacciones catalizadas por la CaLB.

Las propiedades estructurales de la CaLB fueron elucidadas en 1994 por Uppenber y col. (Figura 7) [88-90]. La CaLB consta de 317 aminoácidos y tiene un peso molecular de 33 KDa, estructuralmente es una proteína globular que pertenece a la superfamilia de las α/β -hidrolasa plegadas [91] y consta de siete laminas β centrales unidas por α -hélices (Figura 13).

El sitio activo de la CaLB contiene una triada catalítica compuesta por la Ser105, His224 y Asp187 (triada catalítica es común a todas las serinas-hidrolasas variando solo en la numeración de los aminoácidos) y tiene un límite operacional de hasta 60 – 80 °C en su forma inmovilizada Novozym® 435 y puede trabajar eficazmente en disolventes orgánicos, ya que muestra elevada resistencia a la desnaturalización por los mismos [92]. Asimismo la CaLB muestra una alta enantioselectividad sobre una amplia gama de sustratos, lo que la convierte en una buena herramienta en síntesis asimétrica [93,94]. Las preferencias enantioméricas de la CaLB en reacciones de acilación de alcoholes secundarios quirales han sido anteriormente estudiadas [95,96], y se ha logrado predecir su

actividad con base en lo propuesto por Kazlauskas y col. [97], mostrando que el efecto estérico del sustrato es un factor decisivo sobre la enantioselectividad y tiene preferencia sobre el enantiómero (*R*).

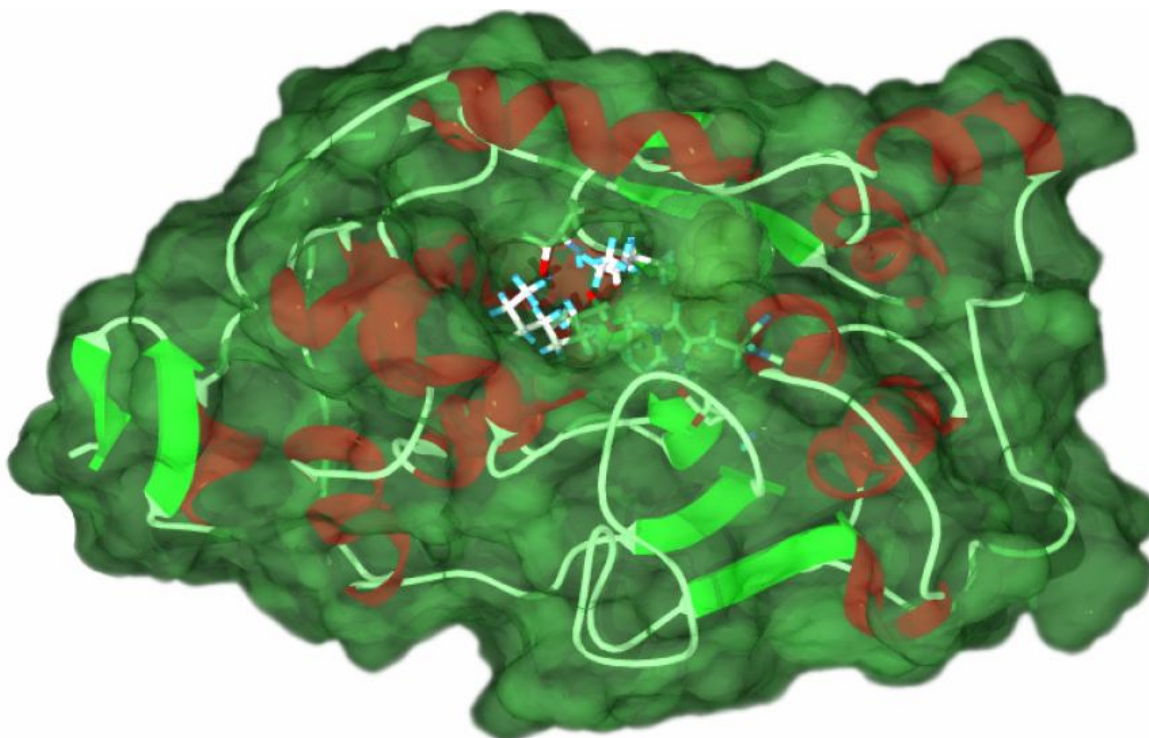


Figura 13. Estructura molecular de la lipasa B de *Candida antarctica*. Las α -hélices se muestran en rojo, las laminas β de color verde claro y la superficie de la enzima de color verde oscuro. Una parte del sustrato es visible en la estrecha entrada al sitio activo y el resto de la cadena está enterrada en el sitio activo (Tomado de la referencia [88]).

El mecanismo de reacción de la CaLB puede describirse mediante un sistema ping-pong bi bi como se muestra en la Figura 14 [98].

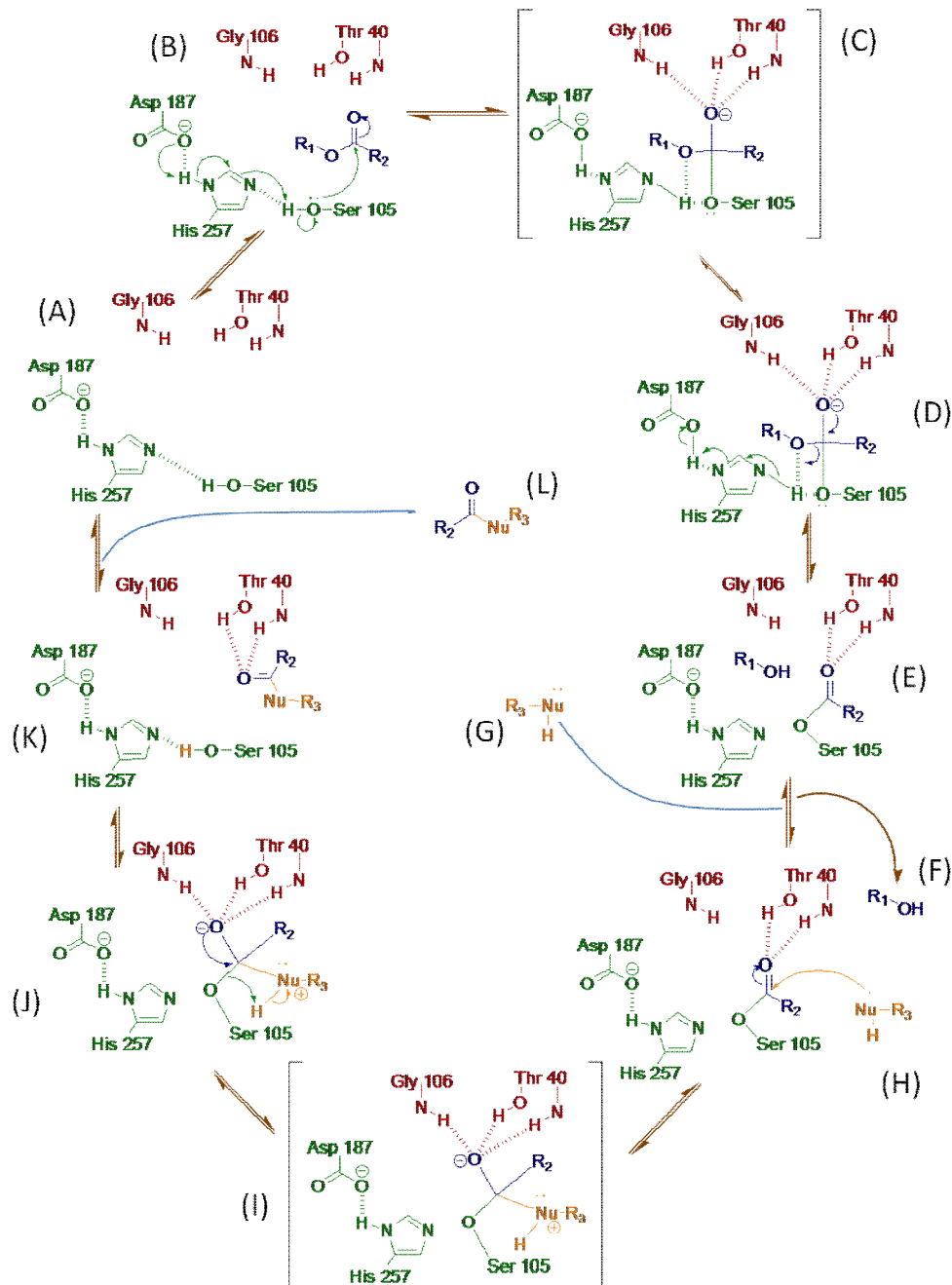


Figura 14. Mecanismo de reacción de la CaLB. (A) Sitio activo de la enzima libre. (B) Ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de la serina-105 ubicada en el sitio activo al sustrato. (C) Formación del primer intermediario tetraédrico estabilizado por formación de puentes de hidrógeno con los hidrógenos residuales de los grupos amidas e hidroxilo de la glicina 106 y triptófano 40. (D) Eliminación del grupo saliente del sustrato promovida por el oxianión del mismo sustrato. (E) Complejo acil-enzima (enzima-sustrato). (F) Salida del subproducto de reacción que puede ser alcohol (transesterificación) o agua (hidrólisis). (G) Nucleófilo externo que puede ser un alcohol primario, agua o amina primaria. (H) Ataque del nucleófilo externo al complejo acil-enzima. (I) Formación del segundo intermediario tetraédrico. (J) y (K) Rearreglo intramolecular del intermediario tetraédrico que trae como consecuencia la generación del producto y la regeneración de la enzima. (L) Producto.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

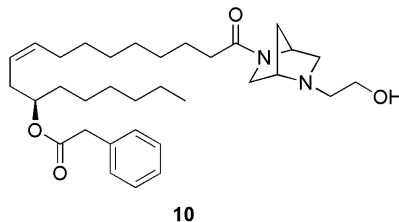
El cáncer es un problema prioritario de salud pública en México y el Mundo. Los tumores malignos exigen cada vez mayores recursos hospitalarios, mejores tecnologías de diagnóstico y tratamientos cada vez más costosos. La quimioterapia ocupa un lugar importante en el tratamiento del cáncer, sin embargo muchos tumores son difíciles de controlar, además de que los fármacos empleados en la actualidad presentan gran toxicidad por falta de selectividad y resistencia después de la estabilización o regresión inicial. Por lo que es necesaria la búsqueda de nuevos agentes antineoplásicos con mayor margen terapéutico y eficacia.

Se conoce que la capsaicina (**1**) y otros compuestos agonistas de los receptores TRPV1 como el rinvanil (**4**) y el FAR (**5**) (una amida derivada del ácido fenilacetilricinoleico) tienen actividad antiproliferativa en líneas celulares leucémicas de ratón y que el FAR (**5**) es más potente en términos de inhibición de la proliferación. En este trabajo se plantea sintetizar una serie de cuatro compuestos en donde se reemplaza la cadena de vainillilamida presente en el FAR por el sistema (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano, el cual, es un fragmento químico con equilibrio conformacional restringido y con dos centros estereogénicos. A su vez la actividad antiproliferativa en líneas leucemias será estudiada así como en células normales.

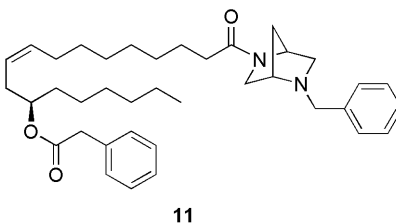
4. OBJETIVOS

1. Sintetizar químico-enzimáticamente a partir del aceite de ricino y la *trans*-4-hidroxi-(*S*)-prolina los siguientes compuestos:

- Fenilacetato de (1*R*,3*Z*)-1-hexil-12-[(1*S*,4*S*)-2-hidroxiethyl-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan]-12-oxo-dodecenilo (**10**)



- Fenilacetato de (1*R*,3*Z*)-1-hexil-12-[(1*S*,4*S*)-2-bencil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan]-12-oxo-dodecenilo (**11**)



2. Caracterizar por espectroscopia de RMN de ^1H y ^{13}C , los compuestos nuevos sintetizados (**10** y **11**) y sus intermediarios.

4. Evaluar el efecto de los compuestos **9-11** sobre la proliferación de líneas celulares de leucemia de ratón P388, J774, WEHI-3 y de leucemia humana K562.

5. Evaluar el efecto de los compuestos **9-11** sobre la proliferación de células mononucleadas provenientes de médula ósea normal de ratón.

5. HIPOTESIS

La introducción del sistema (1*S*,4*S*)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano en remplazo de la cadena de vainillilamida en el fenilacetilrivanil, aumentará el efecto antiproliferativo en líneas leucémicas con respecto al FAR, debido a sus propiedades intrínsecas de quiralidad y equilibrio conformacional restringido.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Parte química

6.1.1 Materiales, instrumentos y métodos generales

Reactivos químicos: los reactivos y las materias primas empleados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Se empleó lipasa B de *Candida antarctica* en su forma inmovilizada Novozym® 435, donada por la empresa Novozymes México. Para las reacciones enzimáticas se empleó una incubadora con agitación orbital Shaker Bath. El fenilacetato de (1*R*,3*Z*)-1-hexil-12-[(1*S*,4*S*)-2-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan]-12-oxo-dodecenilo (**10**) fue proporcionado por el equipo de trabajo del Dr. Ignacio Regla. **Cromatografía:** el curso de las reacciones fue monitoreado por cromatografía en capa fina (CCF), empleando como fase estacionaria gel de sílice (cromatofolios ALUGRAM® SIL-G/UV254 Macherey-Nagel) y como reveladores radiación ultravioleta 254/366 nm y vapores de yodo. Para las columnas de cromatografía, se empleó como fase estacionaria gel de sílice de malla 70 – 230 (0.063 – 0.2 mm). **Espectroscopia y polarimetría:** todos los productos se caracterizaron por espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C realizada en un equipo JEOL Eclipse a 300 y 400 MHz, empleando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna; como disolventes se emplearon CDCl_3 y $\text{DMSO}-d_6$; los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) a partir del TMS y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Para indicar la multiplicidad de las señales en RMN se utilizaron las abreviaturas simple (s), doble (d), triple (t), cuarteto (c), quintuple (q), múltiple (m) y señal ancha (b) del inglés broad, las señales complejas se indican utilizando dos o más de estas abreviaturas. Los espectros infrarrojos se realizaron en un espectrómetro de infrarrojo Bruker mod. Tensor 27. Las rotaciones ópticas se determinaron en un polarímetro Perkin-Elmer modelo 341, utilizando una celda de 1 dm de longitud. Para la medición se utilizó la línea-D del sodio (589 nm), a la temperatura del compartimiento de muestra del aparato (20°C). Las rotaciones específicas se reportan junto con el disolvente empleado, así como la

concentración de la muestra en % p/v. **Análisis por HPLC:** para los análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se utilizó un equipo de HPLC Waters system equipado con una columna C18 4.6-250 mm, 5 mm (Milford, MA, USA).

6.1.2 Preparación de los compuestos 13 - 19

Aunque en este trabajo se sintetizaron los compuestos **13 – 19**, la metodología se realizó tal cual fue descrita por Regla, Juaristi y colaboradores [99].

6.1.3 Ricinoleato de metilo (24)

Se disolvieron 15 g de aceite de ricino en 115 mL de MeOH, se adicionaron 43 mg (0.28 %) de hidróxido de potasio sólido y se calentó a reflujo durante 1 h, verificando el término de la reacción por CCF (hexano:AcOEt 85:15). Se adicionaron 60 μ L de ácido acético y se concentró en el rotavapor a presión reducida hasta sequedad. El residuo se disolvió en 30 mL de hexano y se lavó con agua (2 x 20 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró en el rotavapor a presión reducida para dar 15.27 g de la mezcla de ésteres metílicos, la cual se purificó por cromatografía en columna empacada con 300 g de gel de sílice, empleando como fase móvil hexano:AcOEt 95:5, hasta eliminar los ésteres menos polares. Se cambió la fase móvil por hexano:AcOEt 90:10 y se concentraron las fracciones que mostraron el producto puro para dar 12.5 g de ricinoleato de metilo (**24**) con un rendimiento del 95 %. **RMN ^1H** (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 0.88 (t, $J=6.8$ Hz, 3H), 1.29 – 1.33 (m, 16H), 1.45 - 1.50 (m, 2H), 1.617 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.04 (c, $J=6.4$ Hz, 2H), 2.21 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 2.304 (t, $J=7.6$ Hz, 2H), 3.611 (q, $J=5.6$ Hz, 1H), 3.667 (s, 3H), 5.374 – 5.438 (m, 1H), 5.522 – 5.589 (m, 1H). **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 14.365, 22.873, 25.149, 25.969, 27.609, 29.316, 39.362, 29.605, 29.810, 32.079, 34.295, 35.570, 37.058, 51.675, 71.644, 125.341, 133.379, 174.371. **IR** ν_{max} (película) cm^{-1} : 3435, 2928, 2856, 1742, 1439, 1173, 859, 725. **$[\alpha]_{20}^{\text{D}}$** = + 7.4 (c 1, MeOH), + 3.33 (c 1.5, CHCl_3).

6.1.4 Fenilacetilricinoleato de metilo (25)

En un matraz balón de tres bocas provisto con trampa de humedad, termómetro y agitación magnética se disolvieron 13.5 g (43 mmol) de ricinoleato de metilo (**24**) y 11.66 g (85.7 mmol, 2 eq. mol) de ácido fenilacético en 150 mL de cloruro de metileno. Se enfrió a 0 °C en un baño de hielo-sal, se agregaron 17.6 g (85.7 mmol, 2 eq. mol) de dicitclohexilcarbodiimida de una sola vez y se dejó agitando durante 10 min. Se adicionaron 6.36 g (30 mmol) de dimetilaminopiridina y se dejó agitar por 15 min más. Se retiró el matraz del baño de hielo-sal y se dejó agitando a temperatura ambiente durante 2 h verificando el término de la reacción por CCF (hexano:AcOEt 85:15). Se filtró al vacío sobre celita y se concentró en el rotavapor a presión reducida. Al residuo se le adicionaron 50 mL de hexano:AcOEt 9:1 y el precipitado se filtró al vacío sobre celita, lavando con 100 mL de la misma mezcla, se desecó con sulfato de sodio anhidro y se concentró en el rotavapor para obtener 24.68 g del producto crudo, el cual se purificó mediante una columna de cromatografía empacada con 320 g de gel de sílice, empleando como fase móvil hexano:AcOEt 85:15. Se concentraron las fracciones que mostraron el producto puro para dar 16.37 g de fenilacetilricinoleato de metilo (**25**) con un rendimiento del 88.5 %. $[\alpha]_{20}^D = + 29.6$ (c 1, MeOH). **RMN ¹H** (CDCl₃, 300 MHz) δ: 0.86 (t, *J*=6.0 Hz, 3H), 1.21 – 1.29 (m, 16H), 1.50 – 1.54 (m, 2H), 1.61 (q, *J*=7.2 Hz, 2H), 1.95 (c, *J*=6.6 Hz, 2H), 2.21 – 2.32 (m, 4H), 3.58 (s, 2H), 3.65 (s, 3H), 4.87 (q, *J*= 6.6 Hz, 1H), 5.22 – 5.32 (m, 1H), 5.39 – 5.48 (m, 1H), 7.21 – 7.33 (m, 5H). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 75 MHz) δ: 14.0, 22.4, 25.1, 27.2, 29.0, 29.1, 29.4, 31.6, 31.8, 33.5, 34.0, 41.7, 51.3, 74.4, 124.1, 126.8, 128.4, 129.1, 132.5, 134.3, 171.2, 174.2. **IR** ν_{\max} (película) cm⁻¹: 2929, 2856, 1737, 1459, 1437, 1253, 1164, 1023, 722, 700. **HRMS (FAB+)**: Calculado para C₂₇H₄₃O₄ (M+H)⁺: 431.3161 Encontrado: 431.3151.

6.1.5 Ácido fenilacetilricinoleico (23)

En un frasco con tapa hermética de 1000 ml, se cargaron 7 g (16.25 mmol) de fenilacetilricinoleato de metilo (**25**), se adicionaron 360 ml de acetona, 240 ml de buffer de fosfatos 100 mM pH 7.5 y 120 mL de agua destilada, se tomaron 200 μ L como blanco de reacción y se adicionaron 3.5 g de Novozym® 450, se incubó con agitación orbitalica por 60 min a 37 °C a 220 rpm, verificando la reacción por CCF (Hexano:AcOEt 9:1) revelando con vapores de yodo. Se concentró hasta eliminar la acetona, y se extrajo con AcOEt (3x50 ml), se desecó con Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida, obteniendo 6.7 g del producto puro 23 como un aceite incoloro con un rendimiento del 99 %. **RMN ¹H** (200 MHz, CDCl₃) δ : 0.86 (t, J = 6.2, 3H), 1.2–1.35 (m, 16H), 1.49 (m, 2H), 1.59–1.66 (m, 2H), 1.96–1.99 (m, 2H), 2.24–2.27 (m, 2H), 2.34 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 3.59 (s, 2H), 4.87 (q, J = 6.2 Hz, 1H), 5.21–5.33 (m, 1H), 5.37–5.50 (m, 1H), 7.23–7.32 (m, 6H), 9.44 (br s, 1H). **RMN ¹³C** (50 MHz, CDCl₃) δ : 14.0, 22.4, 24.6, 25.1, 27.2, 28.9, 29.0, 29.1, 29.4, 31.6, 31.8, 33.5, 33.9, 41.7, 74.4, 124.1, 126.9, 128.4, 129.1, 132.5, 134.2, 171.3, 179.9.

6.1.6 Método general para la amidación de ácido fenilacetilricinoleico (MG)

En un matraz bola de 50 mL provisto de agitación magnética, se disolvió la cantidad de ácido fenilacetilricinoléico (**23**) en CH₂Cl₂ y se adicionó 1 equivalente de trietilamina. Se enfrió la mezcla en un baño de hielo/sal hasta 0 °C y se adicionó 1 equivalente de cloruro de pivaloilo. Se dejó agitando durante 15 min a 0 °C verificando el término de la reacción por CCF (20 μ L de mezcla de reacción en 50 μ L de metanol, Hex:AcOEt 9:1); se adicionó 1 equivalente del (1S,4S)-2-alkil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano correspondiente y se dejó agitando a 0 °C durante 15 min. Al cabo de este tiempo se retiró el matraz del baño de hielo y se agitó 10 min a temperatura ambiente, verificando el término de la reacción por CCF (20 μ L de mezcla de reacción en 50 μ L de metanol, materia prima: Hex:AcOEt 9:1, producto: CHCl₃:MeOH:NH₄OH 9:1:0.5). La fase orgánica se lavó con agua, se desecó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad a presión reducida

en el rotavapor. El producto fue purificado mediante cromatografía en columna, empleando 20 partes de gel de sílice flash como fase estacionaria y diferentes mezclas de Hex:AcOEt y CH₂Cl₂:MeOH como fases móviles.

6.1.7 Fenilacetato de (1*R*,3*Z*)-1-hexil-12-[(1*S*,4*S*)-2-bencil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan]-12-oxo-dodecenilo (11)

De acuerdo al procedimiento general (MG), se emplearon 3 g (7.2 mmol) de ácido fenilacetilricinoleico (**23**), 25 mL de cloruro de metileno, 1 mL (728 mg, 7.2 mmol, 1 equiv) de trietilamina, 886 µL (868 mg, 7.2 mmol, 1 equiv) de cloruro de pivaloilo, 1.35 g (7.2 mmol) de dibromhidrato (1*S*,4*S*)-2-bencil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano (**17**) previamente liberado. La fase empleada para la purificación por cromatografía en columna fue CH₂Cl₂:MeOH 95:5. Se obtuvieron 1.8 g del producto puro (**11**) como un aceite ligeramente amarillo con un rendimiento del 53 %. $[\alpha]_D^{20} = -12.5$ (c 1, CHCl₃). **RMN ¹H** (CDCl₃, 300 MHz) δ: 0.90 (t, *J*= 7.2 Hz, 3H), 1.22 – 1.35 (m, 16H), 1.50 (c, *J*= 12.9 Hz, 2H), 1.63 (q, *J*= 9.9 Hz, 2H), 1.71 – 1.86 (dd, *J*₁= 10.2 Hz, *J*₂= 4.1 Hz, 2H), 1.94 – 1.99 (m, 2H), 2.14 – 2.20 (m, 2H), 2.24 – 2.30 (m, 2H), 2.50 (dd, *J*₁=9.6 Hz, *J*₂=1.5 Hz, 1H), 2.82-2.86 (m, 1H), 3.01 (dd, *J*₁=9.6 Hz, *J*₂=1.5 Hz, 1H), 3.22- 3.28 (m, 1H), 3.58 (s, 2H), 3.71 - 3.74 (s_{endo,exo}, 2H), 4.24 (s, 1H), 4.76 (s, 1H), 4.87 (q, *J*= 12.3 Hz, 1H), 5.22-5.31 (m, 1H), 5.38-5.48 (m, 1H), 7.23 – 7.32 (m, 10 H). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 75 MHz) δ: 13.98, 22.45, 24.88, 25.13, 25.19, 27.26, 29.00, 29.11, 29.14, 29.28, 29.33, 29.40, 29.49, 31.62, 31.88, 33.52, 33.94, 34.35, 34.68, 36.54, 41.72, 48.89, 51.10, 56.02, 57.71, 58.73, 59.87, 59.94, 60.10, 60.77, 74.43, 124.11, 126.88, 126.99, 127.02, 128.31, 128.36, 128.40, 129.17, 132.57, 134.32, 139.14, 139.17.

6.1.8 Fenilacetato de (1*R*,3*Z*)-1-hexil-12-[(1*S*,4*S*)-2-hidroxietil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan]-12-oxo-dodecenilo (10)

De acuerdo al procedimiento general (MG), se emplearon 0.833 g (2 mmol) de ácido fenilacetilricinoleico (**23**), 10 mL de cloruro de metileno, 0.278 mL (0.202 g, 2 mmol, 1 equiv) de trietilamina, 0.246 mL (0.24 g, 2 mmol, 1 equiv) de cloruro de pivaloilo, 0.43 g (2 mmol, 1 equiv) de diclorhidrato de (1*S*,4*S*)-2-hidroxietil-2,5-

diazabicyclo[2.2.1]heptano (**19**) previamente liberado. La fase empleada para la purificación por cromatografía en columna fue CH₂Cl₂:MeOH 95:5. Se obtuvieron 0.5 g del producto puro **10** como un aceite ligeramente amarillo con un rendimiento del 51 %. $[\alpha]_{20}^D = -8.4$ (c 1, CHCl₃). **RMN ¹H** (CDCl₃, 200 MHz) δ : 0.86 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.18 – 1.30 (m, 16H), 1.49 – 1.52 (m, 2H), 1.56 – 1.65 (m, 2H), 1.70 – 1.85 (m, 2H), 1.92 – 1.99 (m, 2H), 2.15 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H), 2.21 – 2.30 (m, 2H), 2.54 (dd, $J_1 = 9.6$ Hz, $J_2 = 1$ Hz, 1H), 2.69 – 2.77 (m, 1H), 2.87 – 2.89 (m, 1H), 2.93 – 2.95 (m, 1H), 3.03 (dd, $J_1 = 9.6$, $J_2 = 2.2$, 1H), 3.30 – 3.36 (m, 1H), 3.53 – 3.61 (m, 2H), 3.58 (s, 2H), 4.27 (br, 1H), 4.69 – 4.78 (m, 1H), 4.87 (q, $J = 12.4$ Hz, 1H), 5.20 – 5.33 (m, 1H), 5.37 – 5.50 (m, 1H), 7.23 – 7.32 (m, 5H). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 50 MHz) δ : 13.94, 22.37, 24.73, 25.05, 27.15, 28.91, 29.02, 29.20, 29.28, 29.38, 31.54, 31.77, 33.41, 33.83, 34.56, 34.82, 36.35, 36.68, 41.60, 49.05, 50.22, 50.73, 53.34, 60.84, 62.02, 124.00, 126.81, 128.32, 129.08, 132.48, 134.18, 170.55, 170.94, 171.20.

6.2 PARTE BIOLÓGICA

6.2.1 Líneas celulares

Las líneas celulares leucémicas de ratón P388, J774, WEHI-3 y de leucemia humana K562 fueron obtenidas de *American Culture Type Collection* (ATCC). A continuación se describen en breve las características generales de las líneas que serán empleadas en la evaluación de los compuestos objetivo.

La línea celular de leucemia P388 fue generada en 1957 por Dawe y Potter mediante la inducción de metilcolantreno a un neoplasma linfoide proveniente de ratones DBA/2. Estas células de morfología promonoblástica expresan características típicas de macrófagos como la capacidad de adhesión, fagocitosis, presencia de vesículas lisosomales en el citoplasma y expresión de receptores Fc, evidenciada por la formación de rosetas [100]. De manera característica secretan interleucina 1 (IL-1) al medio tras ser estimuladas con lipopolisacárido (LPS) y formar tumores al ser inoculadas en ratones sanos [101].

La línea celular leucémica J774 de morfología blástica proviene de un sarcoma (tumor) macrófago generado en 1968 en una hembra de ratón BALB/c mediante la inducción de plasmocitoma, son inhibidas en presencia de LPS y sulfato dextrán. Expresa grandes cantidades de lisozima, óxido nítrico sintetasa, receptores FcR y para complemento, sintetiza IL-1 e inducen tumores sólidos en ratones sanos [102].

La línea celular de leucemia WEHI-3, fue originalmente establecida a partir del cultivo sucesivo de un sarcoma mielóide de ratones BALB/c [103]. Estas células expresan marcadores mieloides como CD11b, CD32 (FcγRII), Thy-1, Mac-3, F4/80. Son positivas para esterasa, lisozima, 5'-nucleotidasa pero negativas para peroxidasa y aminopeptidasa [104]. Expresan de manera constitutiva IL-3, cuerpos de Auer y de manera característica inducen leucemia cuando son inoculadas en ratones BALB/c [105,106].

Las células K562 son una línea celular eritroblástica humana con morfología linfoblastoide, considerada como una leucemia mieloide crónica en crisis blástica y son células que crecen en suspensión [107]. Expresan el cromosoma filadelfia, el cual se debe a la translocación BCR-ABL [108].

6.2.2 Cultivo celular

Todas las líneas celulares leucémicas fueron cultivadas en medio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco BRL, USA) suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (SFB, Gibco BRL, USA) previamente inactivado por calor y mantenidas a 37 °C con 5% de CO₂ y humedad saturante.

6.2.3 Ensayos de proliferación

Para los ensayos de proliferación las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (Corning, USA) en presencia o ausencia de los compuestos **9**, **10** y **11** e incubados por 72 (líneas leucémicas de ratón) ó 48 horas (línea K562) en las condiciones antes mencionadas. Transcurrido el periodo de incubación, la proliferación fue evaluada mediante ensayo con sulforhodamina B (SRB, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) [109]. Brevemente, concluido el tiempo de incubación, las células fueron fijadas por adición de 50 µL/pozo de ácido tricloroacético (TCA, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) frío y la placa fue incubada a 4°C por una hora. Se realizaron varios lavados para eliminar el TCA y la placa se dejó secar a temperatura ambiente. A continuación, se adicionaron 100 µL/pozo de SRB al 0.4% diluido en ácido acético al 1 % permaneciendo en tinción por 20 minutos. Concluido este tiempo se realizaron varios lavados con ácido acético al 1% y la placa se dejó secar a temperatura ambiente. El colorante se solubilizó con 50 µL/pozo de Tris base 10 mM (pH 10.4) y la placa fue leída en un espectrofotómetro (TECAN A-5082 Spectra, Austria) a 570 nm.

6.2.4 Cultivo de células mononucleadas de médula ósea normal de ratón

Se utilizaron ratones hembras de 2 a 3 meses de edad, sanos, de la cepa CD1, que se sacrificaron por dislocación cervical. Se obtuvieron los fémures y se arrastraron las células totales de médula ósea, haciendo fluir IMDM (Gibco BRL, USA) suplementado con 10% de SFB (Gibco, USA). Posteriormente se separaron las células mononucleadas (CMN) mediante un gradiente de densidad (ficoll 1.077 g/ml) (Sigma, St Louis, M). Las células se cultivaron en IMDM suplementado con 15% de SFB (Gibco BRL, USA), 5% de suero equino e Interleucina 3 recombinante de ratón (rmlL-3), a una densidad de 100,000 cel/mL en placas de 96 pozos (Corning NY, USA), expuestas a diferentes tratamientos e incubadas por 120 h.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Síntesis de los compuestos precursores derivados del (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano

La obtención de los compuestos (1S,4S)-2-Bencil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano (**17**) y (1S,4S)-2-hidroxietil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano (**19**) se realizó reproduciendo la metodología descrita por Regla, Juaristi y colaboradores [99]. Esta etapa involucró la obtención del (1S,4S)-2-bencil-2,5-diazabicyclo(2.2.1)heptano (**17**) como dibromhidrato a partir de la *trans*-(4)-hidroxi-(S)-prolina (Figura 15).

Para la obtención de la (2S,4R)-1,4-bis(tosil)-2-tosil-pirrolidina **14**, se partió de la *trans*-4-hidroxi-(S)-prolina (**12**). Conforme a lo descrito, se llevó a cabo la *N*-tosilación de **12** empleando 1 equivalente de cloruro de *p*-toluensulfonilo y carbonato de sodio en agua, lo que produjo un 95 % de rendimiento de **13** sin observarse producto de *O*-tosilación. Posteriormente se procedió a reducir el grupo carboxílico en **13** al alcohol primario correspondiente con diborano generado *in situ* a partir de NaBH₄ y BF₃Et₂O en THF para obtener el diol **14** en un 85 % de rendimiento. A continuación se llevó a cabo la doble *O*-tosilación con 2 equivalentes de cloruro de *p*-toluensulfonilo en presencia de Et₃N para obtener el tritosilato **15** en un 83 % de rendimiento. El siguiente paso consistió en la ciclización de **15**, tratándolo con exceso de bencilamina para producir el compuesto diazabicyclico **16** con un rendimiento del 96 %. Finalmente, el (1S,4S)-2-bencil-2,5-diazabicyclo(2.2.1)heptano **17** se obtuvo por la hidrólisis del grupo tosilo en **16** empleando HBr al 48 % y reflujo, observando reacción completa al cabo de 30 min con 97 % de rendimiento de **17** como dibromhidrato.

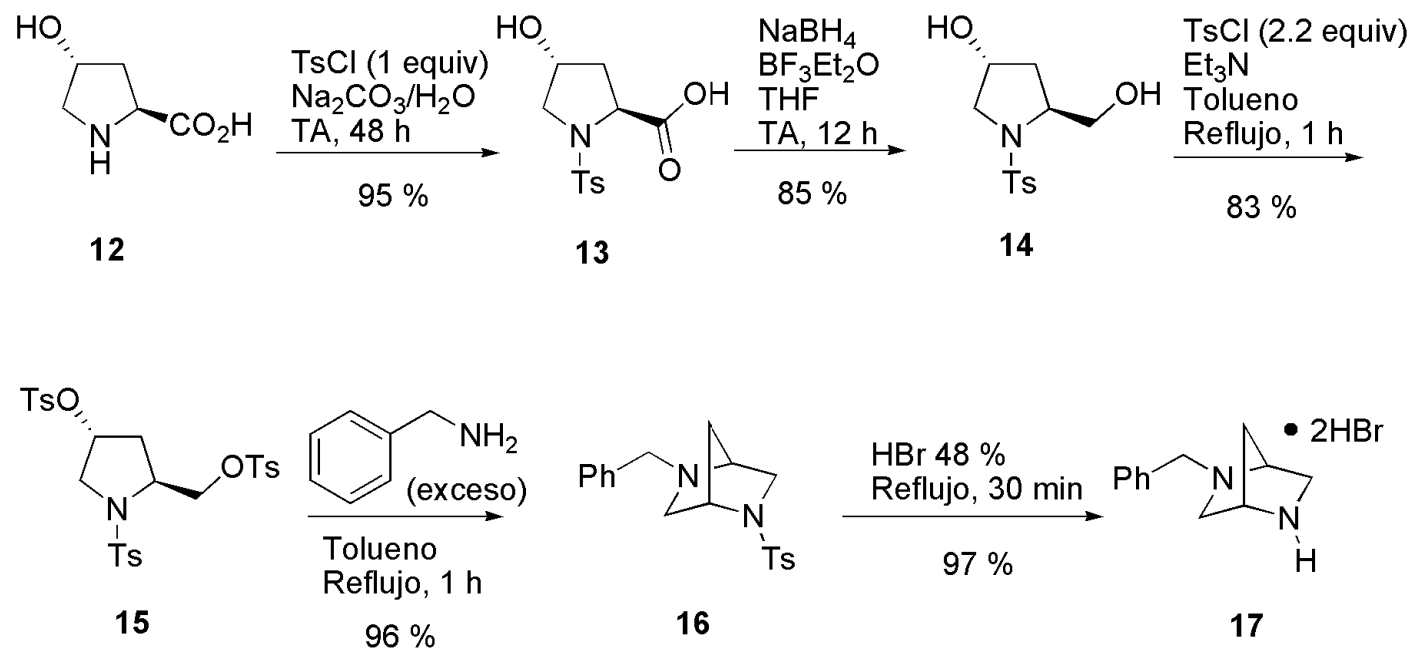


Figura 15. Síntesis química de (1*S*,4*S*)-2-Bencil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano-2HBr (17) a partir de la *trans*-4-hidroxi-(*S*)prolina (12) [99].

Para lograr obtener la diamina 2*N*-hidroxietilsustituida **19** (Figura 16) el compuesto 2*N*-bencilado **17** (previamente liberado con MeONa/MeOH y concentrado a sequedad), fue tratado con 2-bromoetanol en condiciones básicas (K₂CO₃/Tolueno), lo que produjo después de 96 h de reacción a temperatura ambiente 90 % de rendimiento de **18**. El proceso de purificación para el compuesto **18** fue optimizado con respecto al método reportado en la literatura, ya que en lugar de separarlo por cromatografía en columna, en nuestro método al cabo de la reacción, la mezcla fue concentrada a sequedad en el rotavapor a presión reducida y el residuo (crudo de reacción) se disolvió en AcOEt en donde se burbujeó cloruro de hidrógeno logrando precipitar el producto como diclohidrato, el cual se enfrió a 4 °C por 2 a 3 h y se filtró al vacío para obtener **18**. A continuación se llevó a cabo la hidrogenólisis del grupo bencilo en **18** empleando Pd(OH)₂ como catalizador en MeOH lo que produjo 95 % de rendimiento de (1*S*,4*S*)-2-hidroxietil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano·2HCl (**19**).

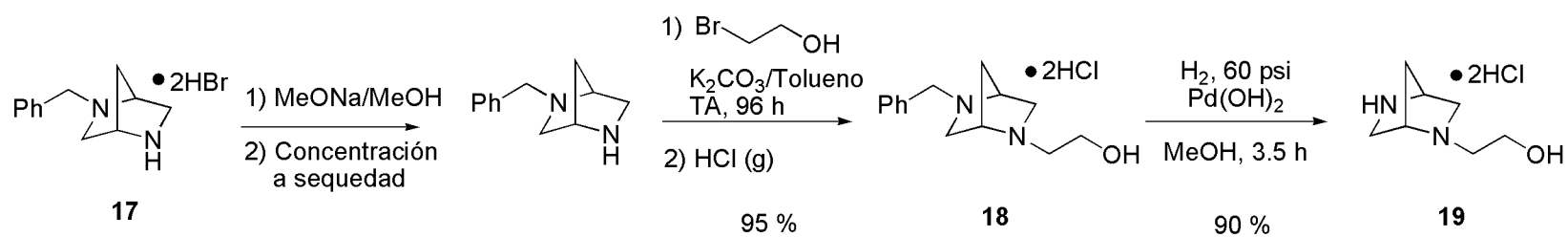


Figura 16. Síntesis de (1S,4S)-2-hidroxietyl-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano-2HCl (**19**) [99].

7.2 Síntesis químico-enzimática y caracterización de ácido fenilacetilricinoleico y sus precursores

El precursor clave para la preparación de los compuestos objetivo de este trabajo, es el ácido fenilacetilricinoleico (**23**). Previamente este compuesto ya había sido preparado en 2005 por Appendino y colaboradores [65], a partir de ácido ricinoleico puro. En el proceso descrito por Appendino y col. (Figura 17) realizan en un primer paso la protección del grupo carboxilo en el ácido ricinoleico, con tricloroetanol, DCC y DMAP para poder llevar a cabo la fenilacetilación del grupo hidroxilo en la posición 12 con ácido fenilacético, DCC y DMAP con posterior desprotección empleando Zn en una mezcla de AcOH y MeOH.

Sin embargo, partir de ácido ricinoleico puro para obtener ácido fenilacetilricinoleico, era una estrategia no conveniente en nuestro grupo de investigación, debido a su elevado costo (1 g = \$ 3169.00; <http://www.sigmaaldrich.com/mexico.html>) y otros inconvenientes como el empleo de grupos protectores, purificación por CC de cada intermedio y la generación innecesaria de residuos tóxicos.

Por otro lado, sabiendo que el aceite de ricino es de producción nacional y de mucho más bajo costo (1 Kg = \$ 35.00) y que contiene entre 85 y 90 % de cadenas de ácido ricinoleico, se decidió explorar esta opción y plantear la estrategia sintética adecuada.

La ruta sintética para la obtención del ácido fenilacetilricinoleico desarrollada por nuestro grupo de investigación se muestra en la Figura 18.

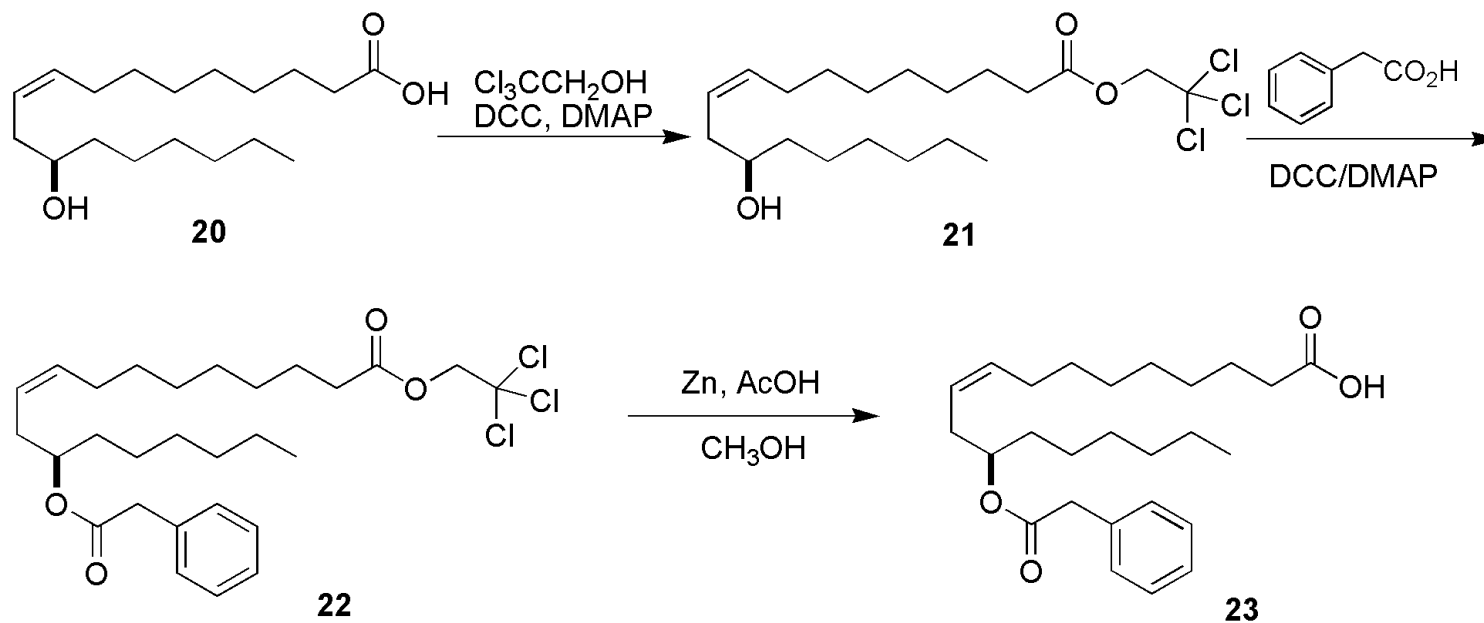


Figura 17. Ruta sintética descrita por Appendino y col., en la cual parten de ácido ricinoleico puro, realizando la protección del ácido carboxílico con tricloroetanol para realizar la fenilacetilación del grupo 12-hidroxilo con condiciones convencionales (DCC/DMAP) y finalmente la desprotección con Zn en AcOH/MeOH (Adaptado de la referencia [65]).

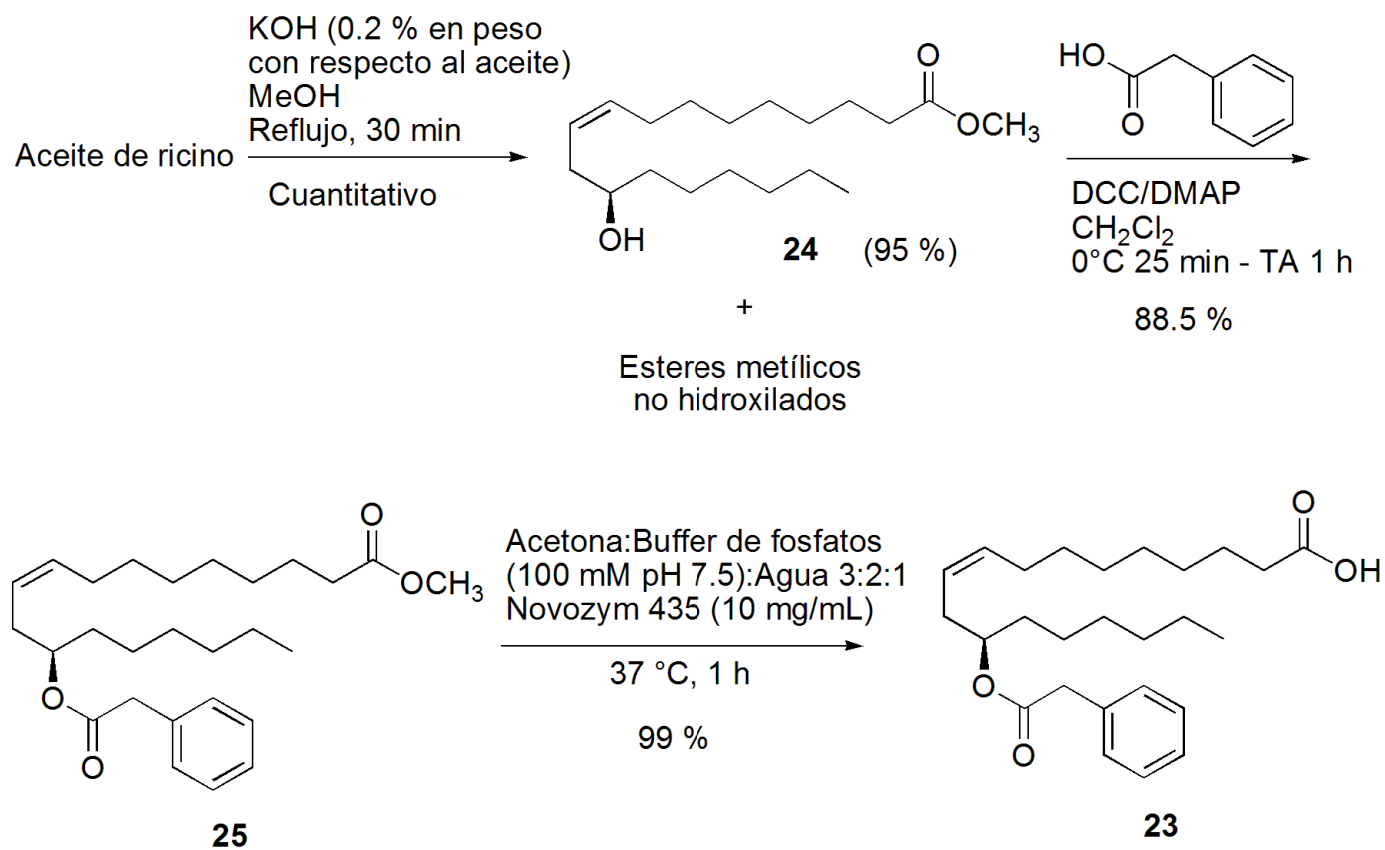


Figura 18. Síntesis químico-enzimática de ácido fenilacilricinoico desarrollada por nuestro grupo de investigación [111,112].

El primer paso consistió en la transesterificación del aceite de ricino empleando catálisis básica (0.2 % de KOH en peso con respecto al aceite de ricino) en metanol para producir cuantitativamente, después de una hora de reacción a temperatura de reflujo una mezcla de ésteres metílicos en donde el único componente hidroxilado es el ricinoleato de metilo (**24**), el cual, fue separado muy eficientemente por cromatografía en columna, empleando como fase móvil mezcla de Hexano:AcOEt 95:5→90:10 con un rendimiento cuantitativo de **24**.

Este método compite favorablemente con el método descrito en la literatura por Borsotti y col. [110] para la obtención de **24**, a pesar de que parten también de aceite de ricino. El grupo de Borsotti realiza primero la saponificación del aceite de ricino con 20 % de KOH (en peso con respecto al aceite), después acidifican el medio para obtener ácido ricinoleico con 75 % de rendimiento; a continuación llevan a cabo la esterificación burbujeando cloruro de hidrógeno en metanol, para obtener finalmente ricinoleato de metilo con un rendimiento global de 70 % a partir de aceite de ricino, comparado con nuestro método en donde se emplea un solo paso de síntesis, una cantidad catalítica de KOH (0.2%), condiciones suaves y con rendimiento del 95 %. Esto es importante debido a que este compuesto es un precursor de varios tipos de compuestos de interés medicinal [65,66,76].

Con la finalidad de determinar el contenido de ricinoleato de metilo (**24**) en el crudo de la reacción, se realizó un análisis por HPLC de **24**, tanto del purificado por cromatografía en columna (que fue utilizado como referencia) como del crudo de reacción proveniente de un lote diferente. El tiempo de retención para el ricinoleato de metilo purificado por cromatografía en columna fue de 6.450 min y reveló una pureza del 98.95 % (Figura 19 y Tabla 1). El contenido de ricinoleato de metilo en el crudo de reacción fue de 93.97 % (Figura 20 y Tabla 2) con el mismo tiempo de retención. Los datos anteriores nos permitieron realizar el cálculo estequiométrico adecuado para el siguiente paso de síntesis, la fenilacetilación del grupo hidroxilo, que se puede realizar con el crudo de reacción debido a que el compuesto **24** es el único componente hidroxilado en este sistema.

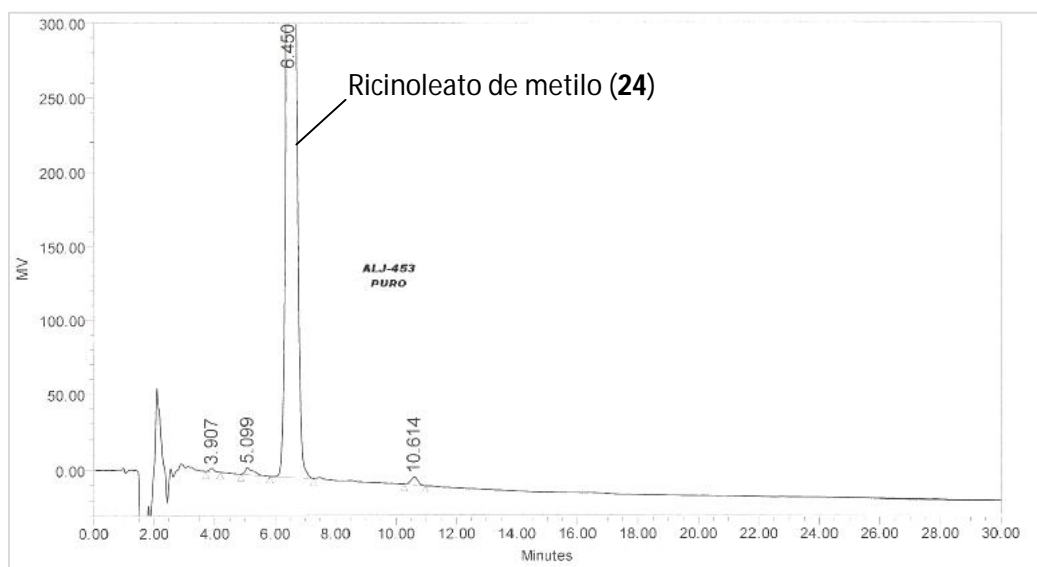


Figura 19. Cromatograma de HPLC para el ricinoleato de metilo (**24**) purificado por cromatografía en columna.

Tabla 2. Datos del análisis por HPLC de ricinoleato de metilo (**24**) crudo.

Análisis por HPLC de ricinoleato de metilo (24) puro ^a			
Componente	TR (min) ^b	Área	% Área
1	3.907	24284	0.13
2	5.099	88641	0.46
3 (24)	6.450	18949362	98.95
4	10.614	87193	0.46

^a Flujo, 1.5 mL/min. Fase móvil, AcCN:H₂O 85:15. Detector, índice de refracción. Temperatura, 35 °C. Columna, Symmetry C-18 4.6 x 250 mm 5 µm. Volumen inyectado, 20 µL. Concentración, 0.1 g/5 mL AcCN. Tiempo de corrimiento 30 min.

^b Tiempo de retención.

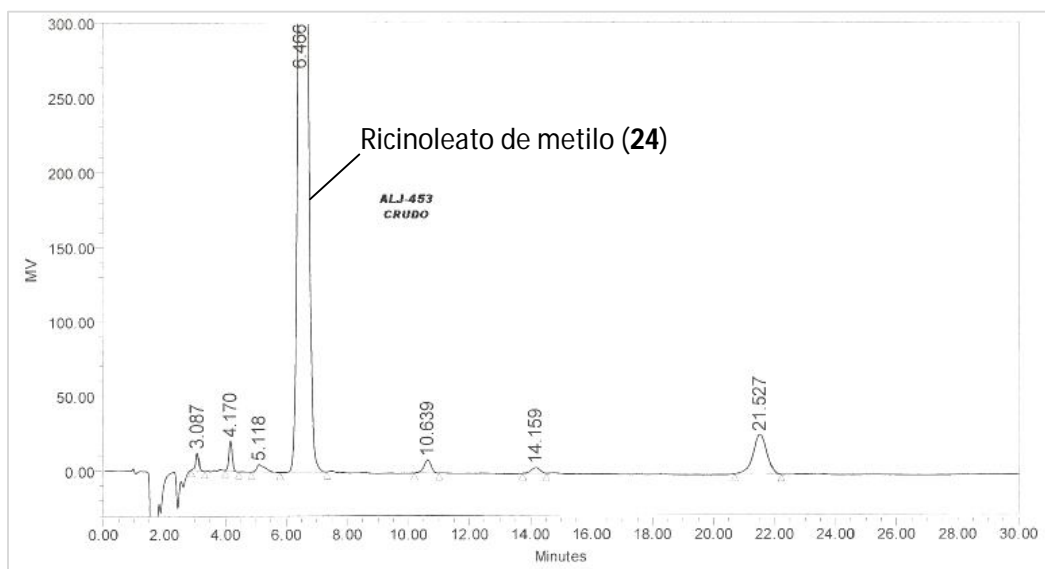


Figura 20. Cromatograma de HPLC para el crudo de la reacción de transesterificación del aceite de ricino, que muestra un contenido del 93 % de **24**.

Tabla 3. Datos del análisis por HPLC de ricinoleato de metilo crudo.

Análisis por HPLC de Ricinoleato de Metilo (24) crudo ^a			
Componente	TR (min) ^b	Área	% Área
1	3.087	82346	0.41
2	4.170	151561	0.76
3	5.118	103451	0.52
4 (24)	6.466	18667638	93.97
5	10.639	145167	0.72
6	14.159	81161	0.40
7	21.527	826966	4.12

^a Flujo, 1.5 mL/min. Fase móvil, AcCN:H₂O 85:15. Detector, índice de refracción. Temperatura, 35 °C. Columna, Symmetry C-18 4.6 x 250 mm 5 µm. Volumen inyectado, 20 µL. Concentración, 0.1 g/5 mL AcCN. Tiempo de corrimiento 30 min.

^b Tiempo de retención.

Debido a que los compuestos objetivo de este trabajo tienen en común el esqueleto de ricinoleilo, decidimos asignar inequívocamente las señales del espectro de RMN de ^1H de **24** mediante los experimentos HETCOR y COSY (Apéndice 1). En la Figura 21 y en la Tabla 4 se muestra la asignación del espectro de RMN ^1H para **24**.

El siguiente paso fue la fenilacetilación del ricinoleato de metilo (**24**) la cual se realizó empleando una mezcla de DCC/DMAP en cloruro de metileno a 0 °C durante 25 min y al cabo de este tiempo la mezcla se dejó llegar a temperatura ambiente, manteniendo la agitación y verificando el término de la reacción por CCF al cabo de 1 h para obtener después de purificar el producto por CC, 88.5 % de rendimiento de **25**. En la Figura 22 se muestra el espectro y en la Tabla 5 los datos de RMN ^1H para el fenilacetilricinoleato de metilo (**25**). Los espectros de RMN de ^{13}C y de IR se anexan en el apéndice 1. La tecnología desarrollada para la síntesis de **25** a partir del aceite de ricino fue publicada por nuestro grupo de investigación en 2008 en la revista *Synlett* [111].

El último paso de síntesis para la obtención de ácido fenilacetilricinoleico consistió en la hidrólisis regioselectiva catalizada con Lipasa B de *Candida antarctica* en su forma inmovilizada Novozym 435®. La reacción procedió en una mezcla de acetona:buffer de fosfatos 100 mM pH 7.5:Agua 3:2:1 empleando 10 mg/mL de enzima e incubando durante 1 h a 37 °C obteniendo un rendimiento prácticamente cuantitativo (99 %) de ácido fenilacetilricinoleico (**23**) sin requerir mayor purificación. En la Figura 23 y en la Tabla 6 se muestra la asignación del espectro de RMN ^1H para **23**. Esta metodología enzimática fue publicada recientemente por nuestro grupo de investigación en la revista *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [112].

Compuesto 24

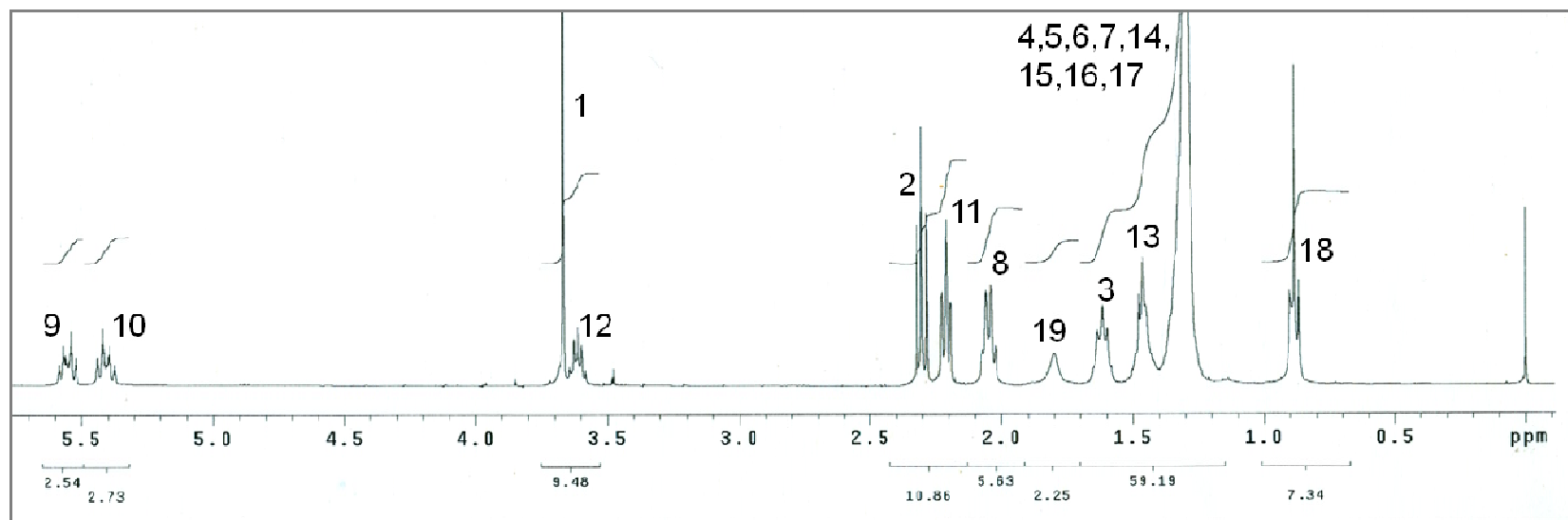
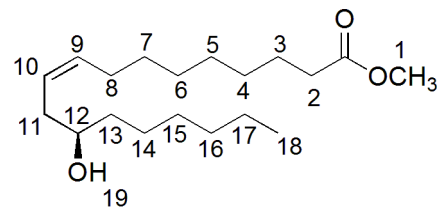


Figura 21. Asignación de las señales en el espectro de RMN de ¹H para el ricinoleato de metilo (24).

Tabla 4. Datos espectroscópicos observados en RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) para **24**.

Posición	δ (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento en Hertz (J)	Integración
1	3.67	s	-	3H
2	2.30	t	7.6	2H
3	1.62	q	7.2	2H
4,5,6,7,14, 15,16,17	1.29-1.33	m	-	16H
8	2.04	c	6.4	2H
9	5.52-5.59	m	-	1H
10	5.37-5.44	m	-	1H
11	2.21	t	6.4	2H
12	3.61	q	5.6	1H
13	1.45-1.50	m	-	2H
18	0.89	t	6.8	3H
19	1.8	bs	-	1H

Compuesto 25

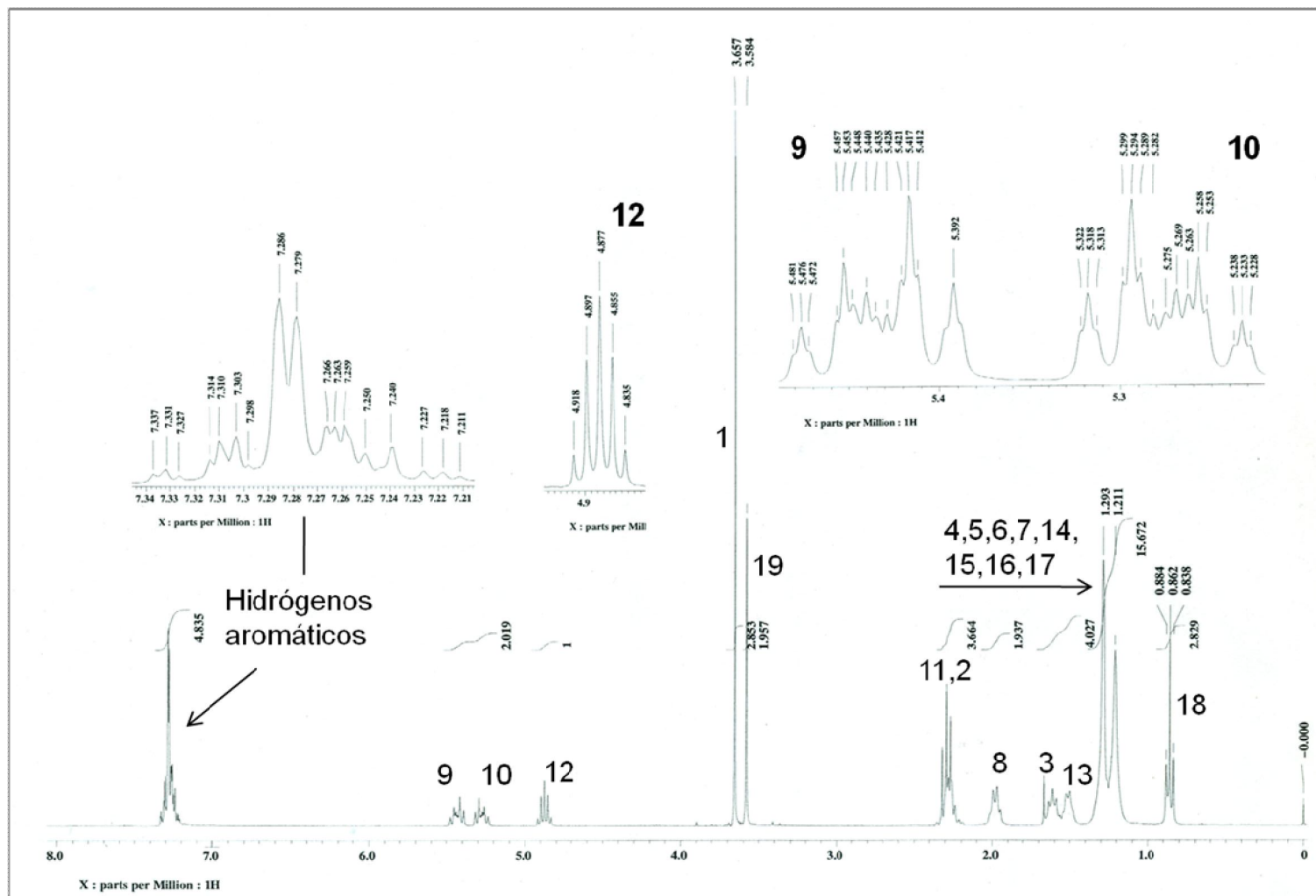
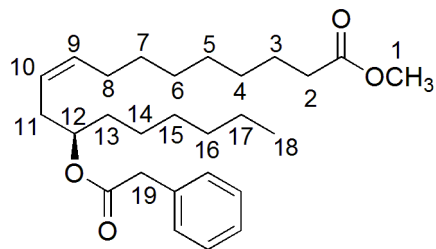


Figura 22. Asignación de las señales en el espectro de RMN de ^1H para 25.

Tabla 5. Datos espectroscópicos observados en RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) para **25**.

Posición	δ (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento en Hertz (J)	Integración
1	3.65	s	-	3H
2,11	2.21-2.32	m	-	4H
3	1.61	q	7.2	2H
4,5,6,7,14, 15,16,17	1.21-1.29	m	-	16H
8	1.95	c	6.6	2H
9	5.39-5.48	m	-	1H
10	5.22-5.32	m	-	1H
12	4.87	q	6.6	1H
13	1.50-1.54	m	-	2H
18	0.86	t	6.0	3H
19	3.58	s	-	2H
Aromáticos	7.21-7.33	m	-	5H

Compuesto 23

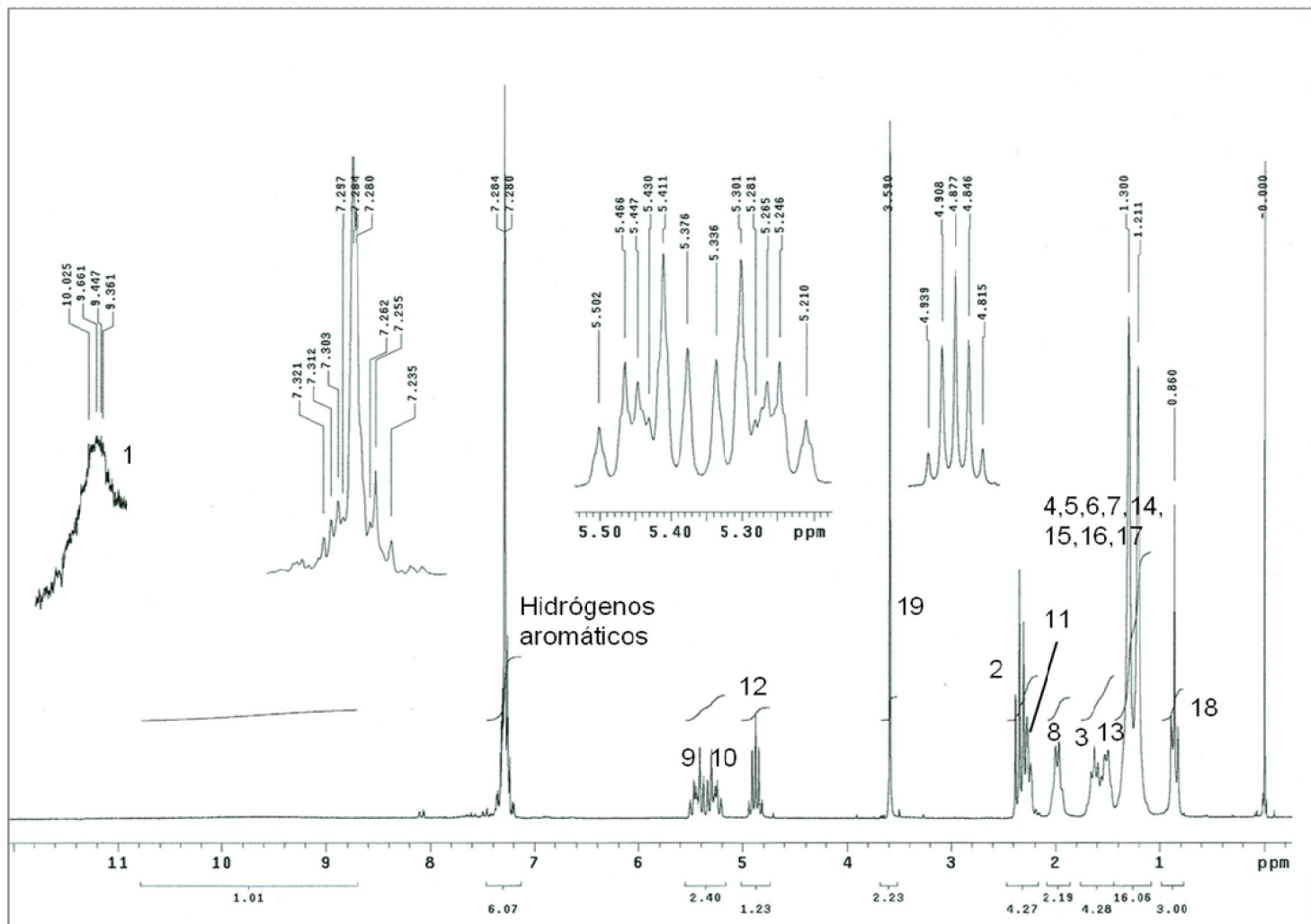
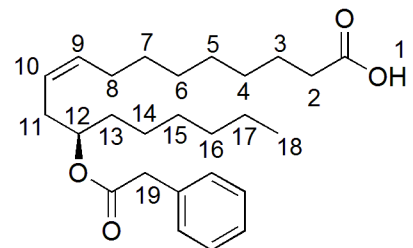


Figura 23. Asignación de las señales en el espectro de RMN de ^1H para 23.

Tabla 6. Datos espectroscópicos observados en el espectro de RMN de ^1H para **23**.

Posición	δ (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento en Hertz (J)	Integración
1	9.44	bs	-	1H
2	2.34	t	7.4	2H
3	1.59-1.56	m	-	2H
4,5,6,7,14, 15,16,17	1.20-1.35	m	-	16H
8	1.96-1.99	m	-	2H
9	5.37-5.50	m	-	1H
10	5.21-5.33	m	-	1H
11	2.24-2.27	m	-	2H
12	4.87	q	6.2	1H
13	1.49	m	-	2H
18	0.86	t	6.2	3H
19	3.59	s	-	2H
Aromáticos	7.23-7.32	m	-	5H

7.3 Síntesis de fenilacetilricinoleilamidas que incorporan el fragmento (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano

Las amidas diazabíciclicas objetivo **10** y **11** fueron sintetizadas haciendo reaccionar el ácido fenilacetilricinoleico (**23**) con cloruro de pivaloilo en CH₂Cl₂ suplementado con 1 equivalente de Et₃N para formar el anhídrido mixto correspondiente, el cual, una vez observado el término de la reacción por CCF, se hizo reaccionar con la diamina quiral correspondiente **17** ó **19** (Figura 24) obteniendo rendimientos de 53 y 51 % respectivamente.

De igual forma se realizó la caracterización espectroscópica de **10** y **11** por RMN de ¹H la cual se muestra a detalle en las Figuras 25 y 26, así como sus datos espectroscópicos en las Tablas 7 y 8.

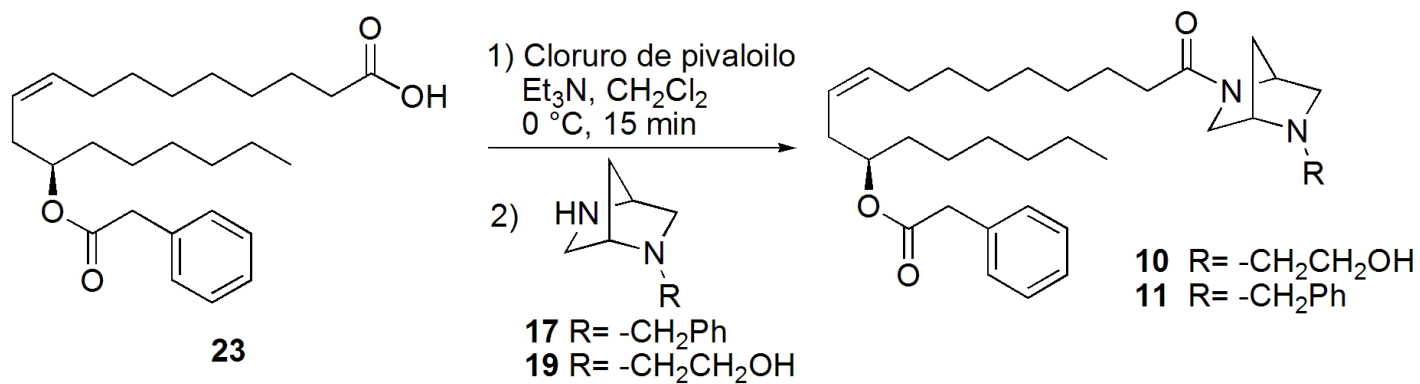


Figura 24. Reacción de amidación vía anhídrido mixto para la síntesis de las amidas **10** y **11**.

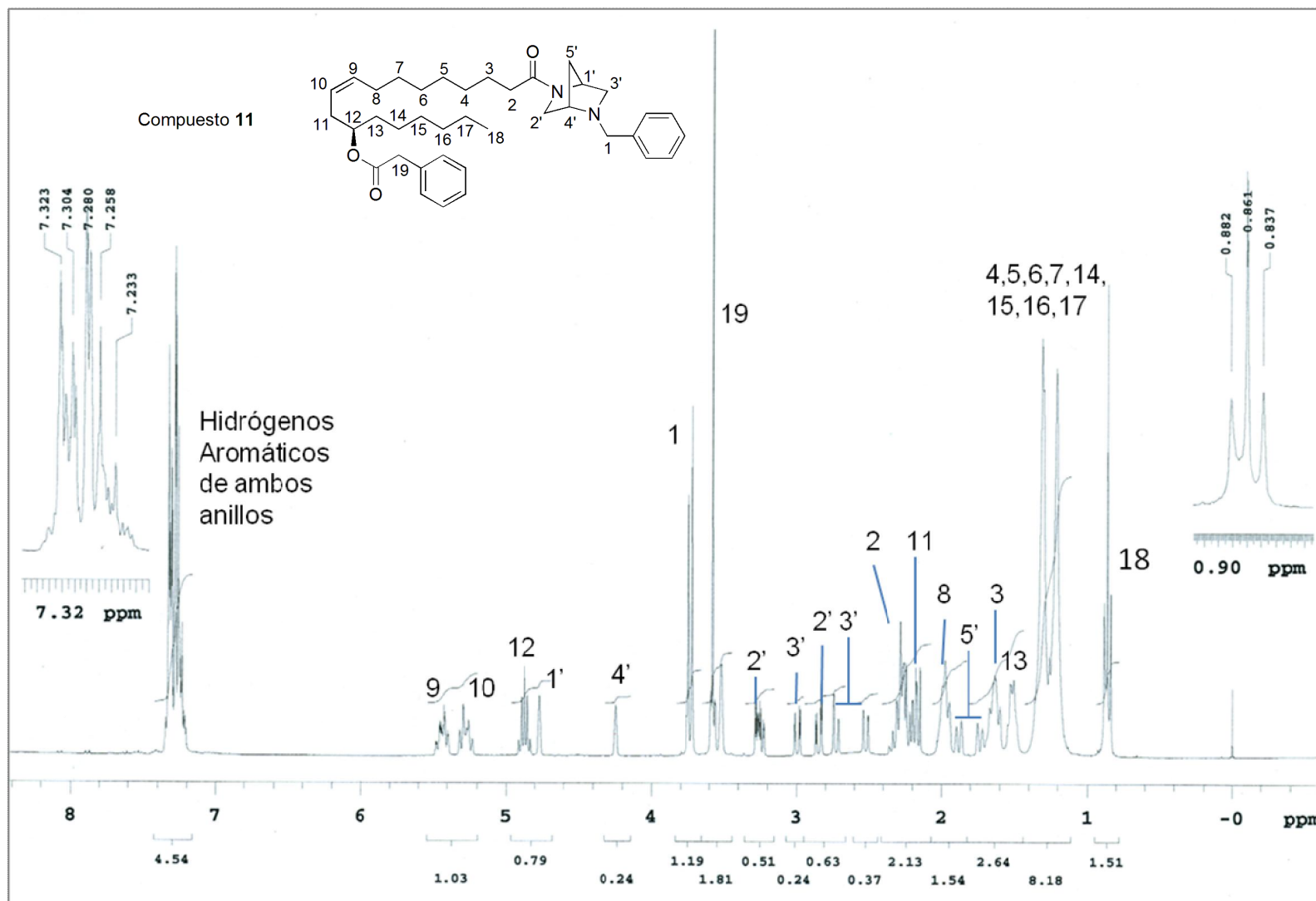


Figura 25. Asignación de las señales en el espectro de RMN de ¹H para 11.

Tabla 7. Datos espectroscópicos observados en el espectro de RMN de ^1H para **11**.

Posición	δ (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento en Hertz (J)	Integración
1	3.71, 3.74	Sendo, exo	-	2H
2	2.24-2.30	m	-	2H
3	1.603	q	9.9	2H
4,5,6,7,14, 15,16,17	1.22-1.35	m	-	16H
8	1.94-1.99	m	-	2H
9	5.38-5.48	m	-	1H
10	5.22-5.31	m	-	1H
11	2.14-2.20	m	-	2H
12	4.87	q	12.3	1H
13	1.50	c	12.9	2H
18	0.9	t	7.2	3H
19	3.58	s	-	2H
1'	4.76	s	-	1H
2'	2.82 – 2.86	m	-	1H
	3.22 – 3.28	m	-	1H
3'	2.50	dd	$J_1=9.6, J_2=1.5$	1H
	3.01	dd	$J_1=9.6, J_2=1.5$	1H
4'	4.24	s	-	1H
5'	1.71 – 1.86	dd	$J_1=10.2, J_2= 4.1$	2H
Aromáticos	7.23-7.32	m	-	10H

Tabla 8. Datos espectroscópicos observados en el espectro de RMN de ^1H para **10**.

Posición	δ (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento en Hertz (J)	Integración
1	3.53 – 3.61	m	-	2H
2	2.21 – 2.30	m	-	2H
3	1.56 – 1.65	m	-	2H
4,5,6,7,14, 15,16,17	1.18 – 1.30	m	-	16H
8	1.92 – 1.99	m	-	2H
9	5.37 – 5.50	m	-	1H
10	5.20 – 5.33	m	-	1H
11	2.15	t	8.2	2H
12	4.87	q	12.4	1H
13	1.49 – 1.52	m	-	2H
18	0.86	t	6.8	3H
19	3.58	s	-	2H
1'	4.69 – 4.78	m	-	1H
2'	2.87 – 2.89	M	-	1H
	2.93 – 2.95	m	-	1H
3'	3.54	dd	J_1 9.6, J_2 1.0	1H
	3.03	dd	J_1 9.6, J_2 2.2	1H
4'	4.27	br	-	1H
5'	2.69 – 2.77	m	-	1H
	3.30 – 3.36	m	-	1H
6'	1.70 – 1.85	m	-	2H
Aromáticos	7.23 – 7.32	m	-	5H

7.4 Evaluación biológica del efecto en la proliferación de líneas leucémicas y células mononucleadas de médula ósea normal de ratón

Con las finalidad de determinar el efecto de los compuestos **9** – **11** en la proliferación de las líneas leucémicas de ratón P388, J774, WEHI-3, de leucemia humana K562 y de células provenientes de médula ósea normal de ratón (CMN-MO), todas y de corroborar el efecto biológico del FAR (**5**) en los parámetros anteriores; todas fueron cultivadas en placas de 96 pozos con densidades celulares (cel/mL) de 3×10^4 (P388), 5×10^3 (J774), 1.3×10^4 (WEHI-3), 3×10^4 (K562), 3×10^4 (CMN-MO) y tratadas con concentraciones crecientes de los compuestos evaluados (0, 0.75, 1.5, 3, 6, 12 y 25 $\mu\text{g/mL}$). La proliferación celular fue determinada por ensayo con sulforhodamina B (SRB) después de 72 h de incubación para las líneas leucémicas de ratón (P388, J774 y WEHI-3), 48 h para la línea de leucemia humana K562 y 120 h para CMN-MO.

Las curvas dosis-respuesta muestran que todos los compuestos inhiben la proliferación de todas las líneas leucémicas (Figura 27) y de CMN-MO (Figura 28) en forma dosis-dependiente. Una vez obtenidas las curvas de proliferación, se procedió a calcular la concentración necesaria para inhibir la proliferación celular en un 50 % (IC_{50}) mediante un análisis de regresión lineal (Apéndice 2); estas determinaciones se muestran en la Tabla 9 y gráficamente en la Figura 29. Los resultados revelan que la médula ósea es menos sensible (en diferente grado) al afecto citotóxico de los compuestos evaluados, lo que sugiere cierto grado de citotoxicidad selectiva hacia las células leucémicas.

Las líneas celulares P388, J774 y WEHI-3 resultaron ser más sensible al efecto de citotóxico de los compuestos evaluados ya que se obtuvieron valores de IC_{50} en el orden de 1 a 10 $\mu\text{g/mL}$. La línea celular K562 fue particularmente resistente, ya que se obtuvieron valores de IC_{50} de 27.5 y 29 $\mu\text{g/mL}$ al ser tratadas con la amida 5*N*-Bencilada (**11**) y FAR (**5**) respectivamente; siendo los compuestos **9** y **10** los más activos para esta línea celular con valores de IC_{50} de 3.8 y 16.2 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

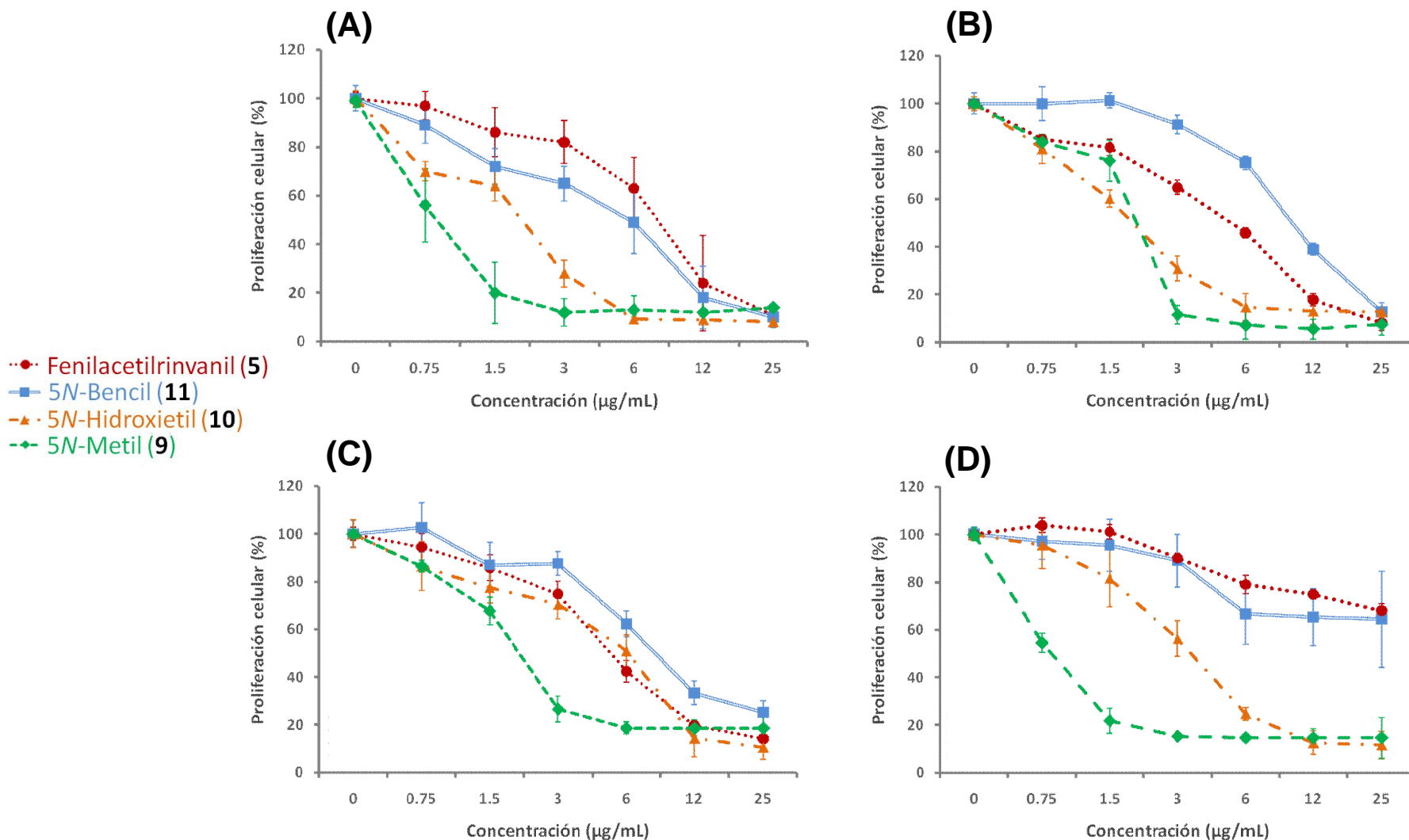


Figura 27. Efecto antiproliferativo de 9 – 10 y FAR (5) en líneas leucémicas (A) P388, (B) J774, (C) WEHI-3 y (D) K562. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos con densidades celulares de 3×10^4 , 5×10^3 , 1.3×10^4 y 1×10^5 cel/mL respectivamente y tratadas con concentraciones crecientes de los compuestos evaluados (0, 0.75, 1.5, 3, 6, 12 y 15 µg/mL). La proliferación celular fue determinada por ensayo con SRB, después de 72 horas de incubación para las líneas leucémicas P388, J774, WEHI-3 y 48 h para la línea K562. Los resultados se muestran como el promedio \pm DE de tres experimentos independientes con tres repeticiones.

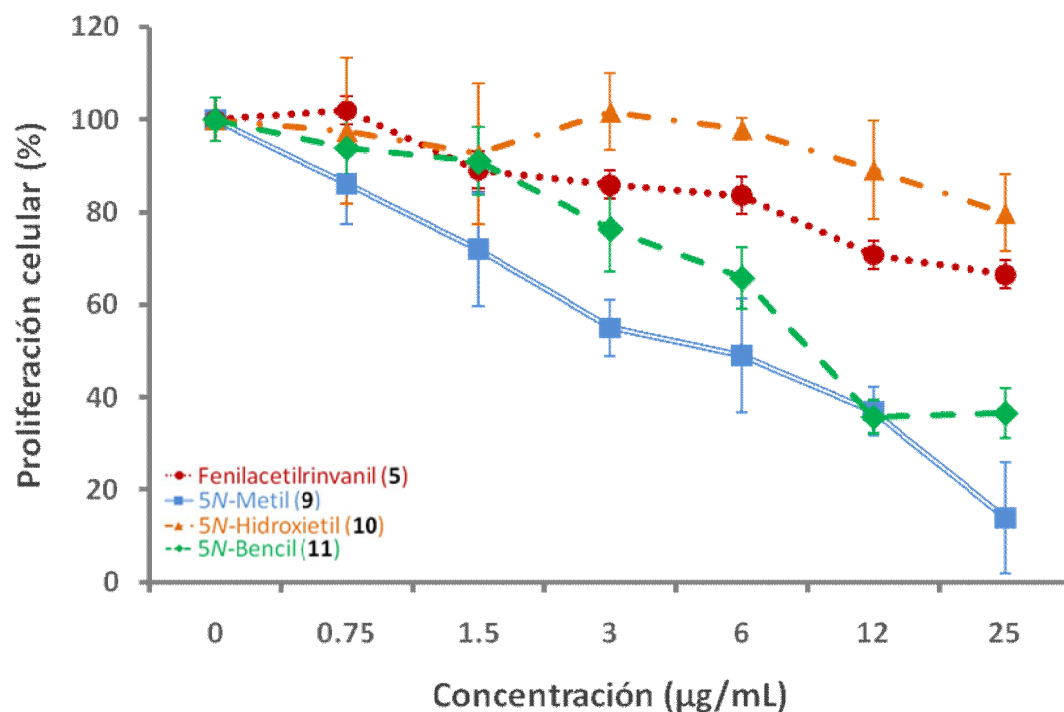


Figura 28. Efecto antiproliferativo de **5**, **9** – **11** en células mononucleadas médula ósea normal de ratón (CMN-MO). Se obtuvieron los fémures de ratones sanos de la cepa CD1 y se arrastraron las células totales de médula ósea, haciendo fluir IMDM suplementado con 10% de SFB. Se obtuvieron las células mononucleadas (CMN-MO) mediante un gradiente de densidad (ficoll 1.077 g/ml) y se cultivaron a una densidad de 100,000 cel/mL en placas de 96 pozos en medio de cultivo IMDM suplementado con 15% de SFB, 5% de suero equino e IL-3 recombinante de ratón. Después de ser expuestas a diferentes concentraciones de los compuestos **5**, **9** – **11**, la proliferación fue evaluada mediante ensayo con SRB. Los resultados se muestran como el promedio \pm DE de tres experimentos independientes con tres repeticiones.

Tabla 9. Valores de IC₅₀ (µg/mL) para las diferentes líneas leucémicas y células mononucleadas de médula ósea normal de ratón.

Células	IC ₅₀ (µg/mL) ^a			
	FAR (5)	5 <i>N</i> -Bencil (11)	5 <i>N</i> -Hidroxietil (10)	5 <i>N</i> -Metil (9)
P388	9.0	5.8	1.9	0.9
J774	8.0	6.5	2.2	2.0
WEHI-3	10.4	9.2	6.3	2.2
K562	29.0	27.5	16.2	3.8
Médula ósea	40.7	39.4	73.5	9.4

^aConcentración necesaria para inhibir la proliferación celular en un 50 %.

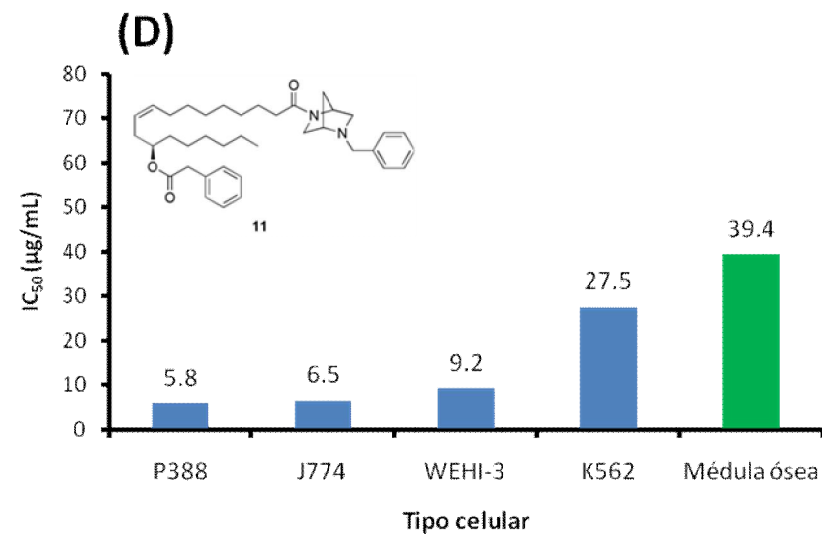
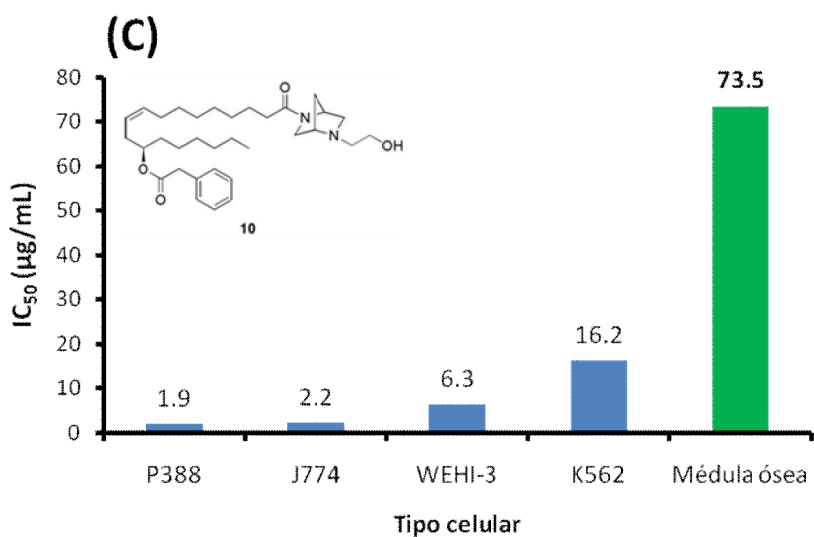
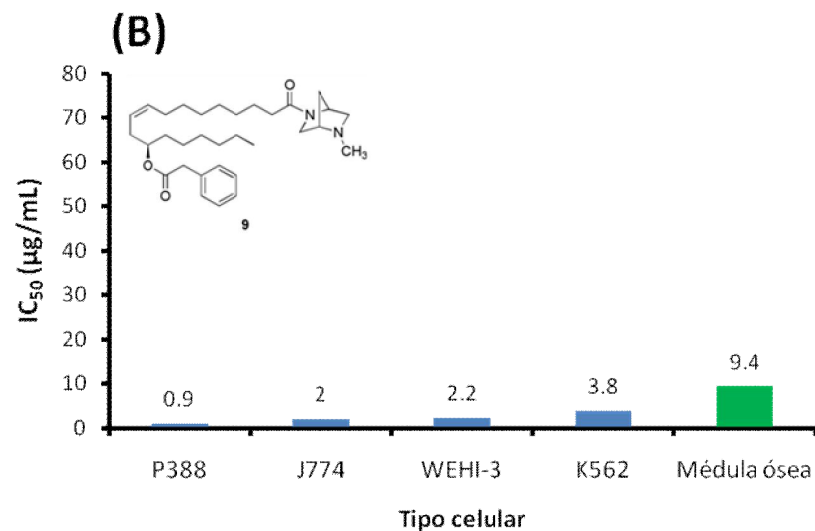
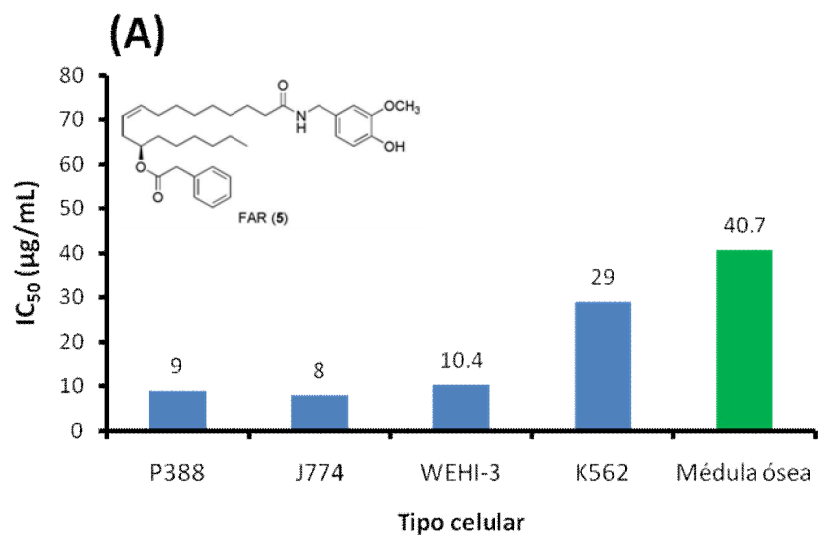


Figura 29. Gráficas que muestran los valores de IC₅₀ (µg/mL) en cada línea leucémica (barras azules) y en cultivo de células de médula ósea (barras verdes). (A) FAR (5), (B) 5N-Metil (9), (C) 5N-Hidroxietil (10), (D) 5N-Bencil (11).

Al comparar las IC_{50} obtenidas para la línea leucémica más resistente (K562) contra las IC_{50} de la médula ósea (Tabla 9), se observa que para el caso del FAR (**5**) y la amida 5*N*-Bencilada (**11**), solo existe una diferencia de 1.3 veces entre la IC_{50} de la línea K562 con respecto a la IC_{50} de las células de médula ósea.

La amida 5*N*-Metilada (**9**) mostró mayor selectividad con respecto a **5** y **11** debido a que su valor de IC_{50} para la médula ósea (9.4 $\mu\text{g/mL}$) se aleja 2.4 veces más del valor de IC_{50} obtenida para la línea K562 (3.8 $\mu\text{g/mL}$). Sorprendentemente, el compuesto 5*N*-hidroxietilado (**10**) resultó ser altamente selectivo hacia las líneas leucémicas, siendo menos nocivo para las células de médula ósea, ya que la IC_{50} de **10** en médula ósea (73.5 $\mu\text{g/mL}$) se aleja 4.5 veces de la IC_{50} obtenida para la línea K562 (16.2 $\mu\text{g/mL}$).

Lo anterior resulta relevante debido a que la gran mayoría de los fármacos antineoplásicos utilizados en la actualidad carecen de selectividad y terminan por causar en los pacientes graves efectos colaterales como inmunosupresión, anemia severa, vómito, falta de apetito, daño a diversos órganos y tejidos, y en muchos casos estos daños son permanentes ó irreversibles [**113,114**].

Un objetivo primordial de la química medicinal es el estudio de las relaciones entre la estructura y la actividad de los compuestos bioactivos. Para cumplir este objetivo, se variaron los sustituyentes en *N*-5 del anillo diazabicclico. El compuesto que presentó mayor efecto antiproliferativo fue la amida 5*N*-metilada (**9**), que presentó IC_{50} en líneas leucemias en el orden de 1 a 4 $\mu\text{g/mL}$, seguida de la amida 5*N*-hidroxietilada (**10**), que mantuvo buena actividad incluso con la línea celular K562. Las amida 5*N*-bencilada (**11**) resultó ser la menos activa de las amidas diazabicclicas con valores de IC_{50} en el orden de 6 a 28 $\mu\text{g/mL}$, pero sí mostró ser más activa que el FAR (**5**), por lo que nuestra hipótesis fue comprobada.

Comparando la actividad citotóxica de los compuesto **9**, **10** y **11** en líneas leucémicas, se observa claramente que el efecto estérico en *N*-5 del anillo de diazabicyclo es un factor decisivo para modular la actividad biológica antiproliferativa (Figura 30), siendo el compuesto con el sustituyente estéricamente más pequeño (grupo metilo) el más activo frente a las líneas leucémicas.

La actividad antiproliferativa de compuestos canabinoides estructuralmente relacionados como la anandamida (**6**) o el 2-AG (**7**) ha sido estudiada con profundidad principalmente por los grupos de DiMarzo [72-75,115] y Velasco [116]. Hoy se sabe los canabinoides ejercen su efecto antineoplásico modulando rutas claves de señalización celular, lo que da lugar a la inducción de apoptosis en células neoplásicas [117,118] y a la inhibición de la angiogénesis del tumor [119-122]. Lo anterior resulta relevante ya que indica una posible estrategia para indagar en el mecanismo de acción de los compuestos estudiados en este trabajo, ya que se ha demostrado que la amida 5*N*-Metilada **9** posee actividad agonista de los receptores CB1 [112]; por lo que muy probablemente los compuesto **10** y **11** también posean esta propiedad biológica debido su relación estructural con **9**, aunque estas determinaciones aun están en proceso.

Es de destacar que parece ser que los compuestos con actividad canabinoide son agentes antineoplásicos selectivos ya que pueden eliminar a las células tumorales sin afectar la viabilidad de las células normales e incluso estas últimas mejoran tras la administración del canabinoide (células de glioma de rata comparadas con células cerebrales normales) [113], lo que sugiere que los receptores canabinoides regulan los mecanismos de supervivencia y muerte celular de manera diferente según sea la célula neoplásica o normal [116]. Hecho anterior, es observado en este trabajo debido a que las células de médula ósea son menos sensibles al efecto citotóxico de los compuestos **9** y **11**, y casi insensible al efecto citotóxico del compuesto **10**.

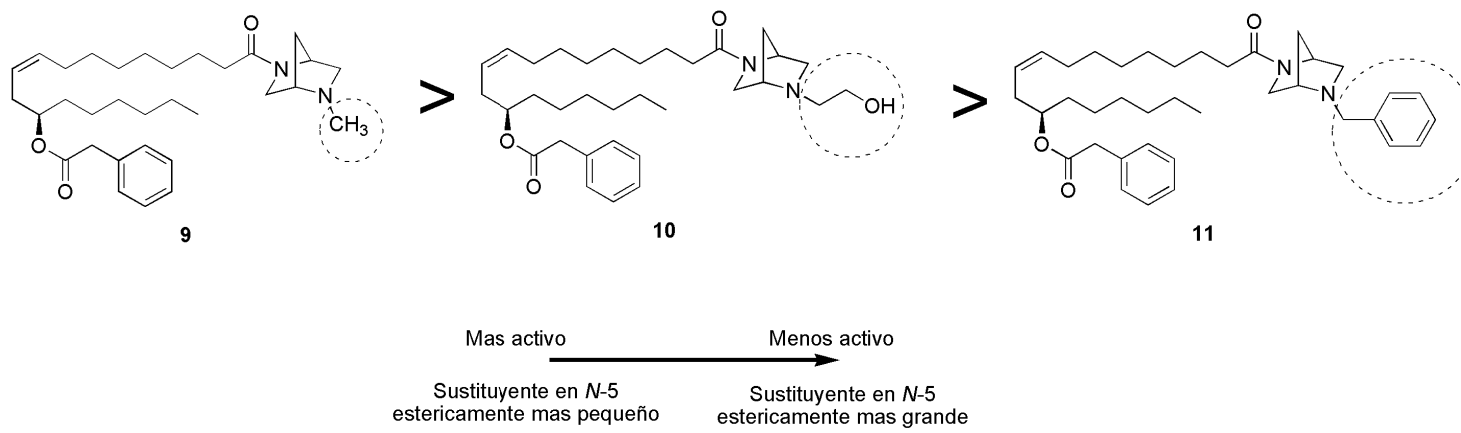


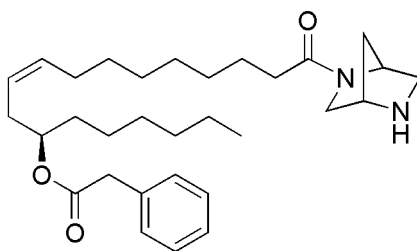
Figura 30. Relación estructura-actividad de los nuevos compuestos **9 -10**.

8.0 CONCLUSIONES

- ❖ Se desarrolló un proceso eficiente de síntesis química para la obtención de ricinoleato de metilo (**24**), el cual compite favorablemente con el descrito en la literatura [**110**], y que además parte de aceite de ricino de producción nacional el cual es un producto sumamente económico.
- ❖ Se realizó eficientemente la síntesis enzimática del ácido fenilacetilricinoleico (**23**), mediante un método original que compite favorablemente con el descrito en la literatura [**65**] debido a que no genera subproductos tóxicos innecesarios y no requiere de grupos protectores.
- ❖ Se realizó la síntesis químico-enzimática de dos nuevos compuestos: Fenilacetato de (1*R*,3*Z*)-1-hexil-12-[(1*S*,4*S*)-2-hidroxiethyl-2,5-diazabicyclo [2.2.1]heptan]-12-oxo-dodecenilo (**10**) y Fenilacetato de (1*R*,3*Z*)-1-hexil-12-[(1*S*,4*S*)-2-bencil-2,5-diazabicyclo[2.2.1] heptan]-12-oxo-dodecenilo (**11**), los cuales fueron caracterizados por espectroscopia de RMN de ¹H y ¹³C.
- ❖ Los compuestos **5**, **9** – **11** inhiben la proliferación de líneas leucémicas de ratón P388, J774, WEHI-3, de humana K562 y de células mononucleadas de médula ósea normal de ratón en forma dosis-dependiente.
- ❖ Las células mononucleadas de médula ósea normal de ratón mostraron ser menos sensibles al efecto citotóxico de los compuestos evaluados, siendo el menos nocivo el compuesto 5*N*-hidroxiethylado **10**, el cual mostró prácticamente nula toxicidad para las células de médula ósea.
- ❖ Para los compuestos diazabicyclo se observó que su potencial antiproliferativo sobre líneas leucémicas depende del efecto estérico conferido por el grupo en *N*-5; dicho potencial antiproliferativo se incrementa mientras el sustituyente es estéricamente más pequeño.

9. PERSPECTIVAS

- ❖ Se propone realizar la síntesis y evaluación biológica de una cuarta amida diazabíciclica con la amina libre en *N*-5, bajo la hipótesis de que tendrá mayor potencial inhibitorio de la proliferación de líneas leucémicas.



- ❖ Extender los ensayos de proliferación en líneas de tumores sólidos como cáncer cérvico-uterino, de mama, próstata y pulmón, para determinar el espectro de actividad de los compuestos.
- ❖ Se propone investigar si los compuestos **9-11** inducen a las células leucémicas a una muerte por apoptosis.
- ❖ Sería interesante evaluar el compuesto **10** en el índice mitótico *in vivo* en ratones para corroborar su baja toxicidad.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Zon LI. Developmental biology of hematopoiesis. *Blood*. 1995; 86: 2876-2891.
- [2] Pina C, Enver T. Differential contributions of haematopoietic stem cells to foetal and adult haematopoiesis: insights from functional analysis of transcriptional regulators. *Oncogene*. 2007; 26: 6750-6765.
- [3] Genesser F. Atlas de Histología: sobre bases moleculares. 3ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2000.
- [4] Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos JJ, Flores-Guzmán P, Chávez-González A. Hematopoyesis. *Cancerología*. 2007; 2: 95-107.
- [5] Zambrano-Ramírez IR, Santiago-Osorio E, Weiss-Steider B, Cáceres-Cortés JR. Biología de las células totipotenciales hematopoyéticas. *Rev Invest Clin*. 1999; 51: 53-68.
- [6] Hitzler JK, Zipursky A. Origins of leukaemia in children with down syndrome. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5: 11-20.
- [7] Jordan T. Unique molecular and cellular features of acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia*. 2002; 16: 559.
- [8] Cousar J. The hemtopoietic-lymphoid neoplasms: principles of diagnosis. In: Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G, editores. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10ª ed. Lugar: Lippincott Williams & Wilkins USA; 1999. p.1993-1997.
- [9] Montecinos J, Mayani H. Nuevos conceptos en la biología de la leucemia mieloide aguda. *Gac Méd Méx*. 2002; 138: 67.
- [10] Papac RJ. Origins of cancer therapy. *Yale J Biol Med*. 2001; 74: 391-398.
- [11] Gilman A, Philips FS. The biological actions and therapeutic applications of the B-chloroethyl amines and sulfides. *Science*. 1946; 103: 409-436.
- [12] Farber S, Diamond LK. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid

- (aminopterin). *N Engl J Med*. 1948; 238: 787-793.
- [13] Chabner BA, Roberts Jr TG. Chemotherapy and the war of the cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5: 65-72.
- [14] DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer, principles and practice of oncology*. 7^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
- [15] Kaye SB. New antimetabolites in cancer chemotherapy and their clinical impact. *Br J Cancer*. 1998; 78 Suppl 3: 1-7.
- [16] Hurley LH. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 188-200.
- [17] Vega-Ávila E, Velasco-Lezama R, Jiménez-Estrada M. Las plantas como fuentes de compuestos antineoplásicos, revisión. *Bioquímica*. 2006; 31: 97-111.
- [18] Chabner BA, Amrein PC, Druker BJ, Michaelson MD, Mitsiades CS, Goss PE, Ryan DP, Ramachandra S, Richardson PG, Supko JG, Wilson WH. Quimioterapia de enfermedades neoplásicas. En: Bruton LL, Lazo JS, Parker KL, editores. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 11^a ed. México DF: McGraw-Hill Interamericana; 2007. p. 1315-1403.
- [19] Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, Matter A. Glivec (STI571, Imatinib) a rationally developed targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov*. 2002; 1: 493-502.
- [20] Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. *Epidemiología*. 2009; 26: 1-3.
- [21] INEGI, Serie estadísticas vitales. Datos nacionales, 4 de febrero de 2010. Recurso en Línea: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/español/prensa/default.asp?c=269&e>, accesado el 28 de marzo de 2010.
- [22] World Health Organization. *World health statistics 2007*. Switzerland: WHO Press; 2007.
- [23] Gordaliza M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin Transl*

- Oncol. 2007; 9: 767-776.
- [24] Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as source of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod.* 2003; 66: 1022-1037.
- [25] Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997; 389: 816-824.
- [26] Walker KM, Urban L, Medhurst SJ, Patel S, Panesar M, Fox AJ, McIntyre P. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 304: 56-62.
- [27] Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature.* 2004; 430: 748–754.
- [28] Yiangou Y, Facer P, Dyer NHC, Chan CLH, Knowles C, Williams NS, Anand P. Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. *Lancet.* 2001; 357: 1338-1339.
- [29] Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6: 357-372.
- [30] Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol.* 1999; 57: 1-164.
- [31] Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev.* 1999; 51: 159-211.
- [32] Winter J, Bevan S, Campbell EA. Capsaicin and pain mechanisms. *Br J Anaesth.* 1995; 75: 157-168.
- [33] Jancsó G, Kiraly E, Jancsó-Gábor A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurons. *Nature.* 1977; 270: 741-743.

- [34] Nagy JI, van der Kooy D. Effects of neonatal capsaicin treatment on nociceptive thresholds in the rat. *J Neurosci*. 1983; 3: 1145-1150.
- [35] Nagy JI, Hunt SP, Iversen LL, Emson PC. Biochemical and anatomical observations of the degeneration of peptide-containing primary afferent neurons after neonatal capsaicin. *Neuroscience*. 1981; 6: 1923–1934.
- [36] Chard PS, Bleakman D, Savidge JR, Miller RJ. *Neuroscience*. 1995; 65: 1099-1108.
- [37] McCarthy GM, McCarthy DJ. Effect of topical capsaicin in the therapy of painful osteoarthritis of the hands. *J Rheumatol*. 1992; 19: 604-607.
- [38] Matucci-Cerinic M, McCarthy G, Lombardi A, Pignone A, Partsch G. Neurogenic influences in arthritis. *J Rheumatol*. 1995; 22: 1447-1449.
- [39] Sindrup SH, Jensen TS. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain*. 1999; 83: 389-400.
- [40] Ross DR, Varipapa RJ. Treatment of painful diabetic neuropathy with topical capsaicin. *N Engl J Med*. 1989; 321: 474-475.
- [41] Chad DA, Aronin N, Lundstrom R, McKeon P, Ross D, Molitch M, Shipper HM, Stall G, Dyess E, Tarsy D. Does capsaicin relieve the pain of diabetic neuropathy?. *Pain*. 1990; 42: 387-388.
- [42] Low PA, Low PA, Opfer-Gehrking TL, Dyck PJ, Litchy WJ, O'Brien PC. Double-blind, placebo-controlled study of the application of capsaicin cream in chronic distal painful polyneuropathy. *Pain*. 1995; 62:163-168.
- [43] Peikert A, Hentrich M, Ochs G. Topical 0.025% capsaicin in chronic post-herpetic neuralgia: efficacy, predictors of response and long-term course. *J Neurol*. 1991; 238: 452-456.
- [44] Carpenter SE, Lynn B. Vascular and sensory responses of human skin to mild injury after topical treatment with capsaicin. *Br J Pharmacol*. 1981; 73: 755-758.

- [45] Hawk RJ, Millikan LE. Treatment of oral postherpetic neuralgia with topical capsaicin. *Int J Dermatol*. 1988; 27: 336.
- [46] Brand L, Berman E, Schwen R, Loomans M, Janusz J, Bohne R, Maddin C, Gardne J, Lahann T, Farmer R, Jones L, Chiabrande C, Fannelli R. NE-19550: a novel, orally active antiinflammatory analgesic. *Drug Exp Clin Res*. 1987; 13: 259-265.
- [47] Iida T, Moriyama T, Kobata K, Morita A, Murayama N, Hashizume S, Fushiki T, Yazawa S, Watanabe T, Tominaga M. TRPV1 activation and induction of nociceptive response by a non-pungent capsaicin-like compound, capsaita. *Neuropharmacology*. 2003; 44: 958-967.
- [48] Andersson KE. New pharmacologic targets for the treatment of the overactive bladder: an update. *Urology*. 2004; 63 Suppl 1: 32-41.
- [49] Shang-Pang H, Jung-Chou C, Chih-Chung W, Chi-Tsai C, Nou-Ying T, Yung-Tsuan H, Chyi L, Jink-Pin L, Jing-Gung C, Jaung-Geng L. Capsaicin-induced apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Anticancer Res*. 2009; 29: 165-174.
- [50] Chow J, Norng M, Zhang J, Chai J. TRPV6 mediates capsaicin-induced apoptosis in gastric cancer cells-mechanisms behind a possible new "hot" cancer treatment. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1773: 565-576.
- [51] Sánchez AM, Malagarie-Cazenave S, Olea N, Vara D, Chiloeches A, Díaz-Laviada I. Apoptosis induced by capsaicin in prostate PC-3 cells involves ceramide accumulation, neutral sphingomyelinase, and JNK activation. *Apoptosis*. 2007; 12: 2013–2024
- [52] Chu-Chung C, Yao-Chung W, Yu-Fen W, Ming-Jen C, Shou-Jen K, Dar-Ren C. Capsaicin-induced apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through caspase independent pathway. *Oncol Rep*. 2009; 21: 665-671
- [53] Amantini C, Mosca M, Nabissi M, Lucciarini R, Caprodossi S, Arcella A, Giangaspero F, Santoni G. Capsaicin-induced apoptosis of glioma cells is

- mediated by TRPV1 vanilloid receptor and requires p38 MAPK activation. *J Neurochem.* 2007; 102: 977-990.
- [54] Ito K, Nakazato T, Yamato K, Miyakawa Y, Yamada T, Hozumi N, Segawa K, Ikeda Y, Kizaki M. Induction of apoptosis in leukemic cells by homovainillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Res.* 2004; 64: 1071-1078.
- [55] Kim YM, Hwang JT, Kwak DG, Lee YK, Park OJ. Involvement of AMPK signaling cascade in capsaicin-induced apoptosis of HT-29 colon cancer cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1095: 496-503.
- [56] Jung MY, Kang HJ, Moon A. Capsaicin-induced apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells involves Bcl-2 downregulation and caspase-3 activation. *Cancer Lett.* 2001; 165: 139-145.
- [57] Baek YM, Hwang HJ, Kim SW, Hwang HS, Lee SH, Kim JA, Yun JW. A comparative proteomic analysis for capsaicin-induced apoptosis between human hepatocarcinoma (HepG2) and human neuroblastoma (SK-N-SH) cells. *Proteomics.* 2008; 8: 4748-4767.
- [58] Hail N, Lotan R. Examining the role of mitochondrial respiration in vanilloid-induced apoptosis. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94: 1281-1292.
- [59] Morré DJ, Chueh PJ, Morré DM. Capsaicin inhibits preferentially the NADH oxidase and growth of transformed cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 1831-1835.
- [60] Morré DJ, Sun E, Geilen C, Wu LY, de Cabo R, Krasagakis K, Orfanos CE, Morré DM. Capsaicin inhibits plasma membrane NADH oxidase and growth of human and mouse melanoma lines. *Eur J Cancer.* 1996; 32: 1995-2003.
- [61] Surh YJ, Lee E, Lee JM. Chemoprotective properties of some pungent ingredients present in red pepper and ginger. *Mutation Res.* 1998; 402: 259-267.

- [62] Surh YJ, Lee RC, Park KK, Mayne ST, Liem A, Miller JA. Chemoprotective effects of capsaicin and diallyl sulfide against mutagenesis or tumorigenesis by vinyl carbamate and *N*-nitrosodimethylamine. *Carcinogenesis*. 1995; 16: 2467-2471.
- [63] Gil YG, Kang MK. Capsaicin induces apoptosis and terminal differentiation in human glioma A172 cells. *Life Sci*. 2008; 82: 997-1003.
- [64] Appendino G. Capsaicin and capsaicinoids. In: Fattorusso E, Tagliatella-Scafati O, editors. *Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology*. Weinheim: Wiley-VHC; 2008. pp. 73-109.
- [65] Appendino G, De Petrocellis L, Trevisani M, Minassi A, Daddario N, Moriello AS, Gazzieri D, Ligresti A, Campi B, Fontana G, Pinna C, Geppetti P, Di Marzo V. Development of the first ultra-potent "capsaicinoid" agonist at transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels and its therapeutic potential. *J Pharm Exp Ther*. 2005; 312: 561-570.
- [66] Appendino G, Minassi A, Morello AS, De Petrocellis L, Di Marzo V. *N*-Acylvanillamides: development of an expeditious synthesis and discovery of new acyl templates for powerful activation of the vanilloid receptor. *J Med Chem*. 2002; 45: 3739-3745.
- [67] Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, le Fur G, Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*. 1995; 232: 54-61.
- [68] Carayon P, Marchand J, Dussossoy D, Derocq JM, Jbilo O, Bord A, Bouaboula M, Galiegue S, Mondiere P, Penarier G, Fur GL, Defrance T, Casellas P. Modulation and functional involvement of CB2 peripheral cannabinoid receptors during b-cell differentiation. *Blood*. 1998; 92: 3605-3615.

- [69] Svizenska I, Dubovy P, Sulcova A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures - A short review. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008; 90: 501-511.
- [70] Bifulco M, Laezza C, Pisanti S, Gazerro P. Cannabinoids and cancer: pros and cons of an antitumor strategy. *Br J Pharmacol.* 2006; 148: 123-135.
- [71] Freimuth N, Ramer R, Hinz B. Antitumorigenic effects of cannabinoids beyond apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010; 332: 336-344.
- [72] De Petrocellis L, Melck D, Palmisano A, Bisogno T, Laezza C, Bifulco M, Di Marzo V. The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 8375–8380.
- [73] Ligresti A, Bisogno T, Matias I, De Petrollis L, Cascio MG, Cosenza V, D'Argenio G, Scaglione G, Bifulco M, Sorrentini I, Di Marzo V. Possible endocannabinoid control of the colorectal cancer growth. *Gastroenterology.* 2003; 125: 677-687.
- [74] Melck D, De Petrocellis L, Orlando P, Bisogno T, Laezza C, Bifulco M, Di Marzo V. Suppression of nerve growth factor Trk receptors and prolactin receptors by endocannabinoids leads to inhibition of human breast and prostate cancer cell proliferation. *Endocrinology.* 2000; 141: 118–126.
- [75] Sancho R, Calzado MA, DiMarzo V, Appendino G, Muñoz E. Anandamide inhibits nuclear factor- κ B activation through a cannabinoid receptor-independent pathway. *Mol Pharmacol.* 2003; 63: 429-438.
- [76] Appendino G, Cascio MG, Moriello AS, Minassi A, Thomas A, Ross R, Pertwee R, De Petrollis L, Di Marzo V. First "hybrid" ligands of vanilloid TRPV1 and cannabinoid CB₂ receptors and non-polyunsaturated fatty acid-derived CB₂-selective ligands. *FEBS Lett.* 2006; 580: 568-674.
- [77] Agranat I, Caner H, Caldwell J. Putting chirality to work: the strategy of chiral switches. *Nat Rev Drug Discov.* 2002; 1: 753-768.

- [78] Filosa R, Peduto A, de Caprariis P, Saturnino C, Festa M, Petrella A, Pau A, Pinna GA, La Colla P, Busonera B, Loddo R. Synthesis and antiproliferative properties of N_{3/8}-disubstituted 3,8-diazabicyclo[3.2.1]octane analogues of 3,8-bis[2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)pyridin-4-yl]methyl-piperazine. *Eur J Med Chem.* 2007;42: 293-306.
- [79] Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem.* 2002; 45: 2615-2623.
- [80] Madigan M, John M, Jack P. *Biología de los microorganismos.* 5^a ed. Madrid: Prentice-Hall; 2003.
- [81] Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. *Biochemistry.* 3^a ed. Corvallis, OR: Prentice-Hall; 1999.
- [82] Zaks A, Klivanov AM. Enzyme-Catalyzed Processes in Organic Solvents. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; 82: 3192-3196.
- [83] Gallardo-Rivera R, Rojas-Cruz A, Valerio-Alfaro G. Efecto del grupo protector en la especificidad de sustrato de la lipasa de *Candida antarctica* en la aminólisis de amino ésteres en disolvente orgánico. *Rev Soc Quím Méx.* 2004; 48: 300-304.
- [84] Torres-Gavilán A, Escalante J, Regla I, López-Munguía A, Castillo E. Easy-on Easy-off resolution of chiral 1-phenylethylamine catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B. *Tetrahedron: Asymmetry.* 2007; 18: 2621-2624.
- [85] Regla I, Luviano-Jardón A, Demare P, Hong E, Torres-Gavilán A, López-Munguía A, Castillo E. Chemoenzymatic synthesis of the potential antihypertensive agent (2*R*,2'*S*)- β -hydroxyhomometoprolol. *Tetrahedron: Asymmetry.* 2008; 19: 2439-2442.
- [86] Muralidhar, R.V.; Chirumamilla, R.R.; Marchant, R.; Ramachandran, V.N.; Ward, O.P.; Nigam, P. Understanding lipase stereoselectivity. *World J Microbiol Biotechnol.* 2002, 18, 81-97.

- [87] Anderson EM, Larsson KM, Kirk O. One biocatalyst—many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatal Biotransform.* 1998; 16: 181-204.
- [88] Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones TA. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure.* 1994; 2: 293-308.
- [89] Uppenberg J, Patkar S, Bergfors T, Jones TA. Crystalization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *J Mol Biol.* 1994; 235: 790-792.
- [90] Uppenberg J, Ohrner N, Norin M, Hult K, Kleywegt GJ, Patkar S, Waagen V, Anthomen T, Jones TA. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry.* 1995; 34: 16832–16835.
- [91] Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J, Sussman JL, Verschueren KHG, Goldman A. The α/β hydrolase fold. *Protein Eng.* 1992; 5: 197-211.
- [92] Salis A, Svensson I, Monduzzi M, Solinas V, Adlercreutz P. The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adapted for organic media than the typical lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *BBA-Proteins Proteom.* 2003; 1646: 145-151.
- [93] Orrenius C, Haefner F, Rotticci D, Ohrner N, Norin T, Hult K. Chiral recognition of alcohol enantiomers in acyl transfer reactions catalysed by *Candida antarctica* lipase B. *Biocatal Biotrans.* 1998; 16: 1-15.
- [94] Schmid RD, Verger R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew Chem Int Ed.* 1998; 37: 1608-1633.
- [95] Orrenius C, Norin T, Hult K, Carrea G. Lipase as chiral catalysts. *Tetrahedron: Asymmetry.* 1995; 6: 3023-3030.

- [96] Orrenius C, Ohrner N, Rotticci D, Mattson A, Hult K, Norin T. *Candida antarctica* lipase B catalyzed kinetic resolutions: substrate structure requirements for the preparation of enantiomerically enriched secondary alcohols. *Tetrahedron: Asymmetry*. 1995; 6: 1217-1220.
- [97] Kazlauskas RJ, Weissfloch ANE, Rappaport AT, Cuccia LA. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. *J Org Chem*. 1991; 56: 2656-2665
- [98] Lutz S. Engineering lipase B from *Candida antarctica*. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2004; 15: 2743-2748.
- [99] Melgar-Fernández R, González-Olvera R, Olivares-Romero JL, González-López V, Romero-Ponce L, Ramírez-Zárate MR, Demare P, Regla I, Juaristi E. Synthesis of novel derivatives of (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane and their evaluation as potential ligands in asymmetric catalysis. *Eur J Org Chem*. 2008: 655-672.
- [100] Koren H, Handwerger B, Wunderlich J. Identification of macrophage-like characteristics in a cultured murine tumor line. *J Immunol*. 1975; 114: 894-897.
- [101] Hirose A, Ikejima T, Gill DM. Established macrophagelike cell lines synthesize interleukin-1 in response to toxic shock syndrome toxin. *Infect Immun*. 1985; 50: 765-770.
- [102] Ralph P, Moore MA, Nilsson K. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med*. 1976; 143: 1528-1533.
- [103] Warner N, Moore M, Metcalf D. A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB-c mice: cytology, karyotype, and muramidase content. *J Natl Cancer Inst*. 1969; 43: 963-982.

- [104] van Furth R, van Schadewijk-Nieuwstad M, Elzenga-Claasen I, Cornelisse C, Nibbering P. Morphological, cytochemical, functional, and proliferative characteristics of four murine macrophage-like cell lines. *Cell Immunol.* 1985; 90: 339-359.
- [105] Sharabani H, Izumchenko E, Wang Q, Kreinin R, Steiner M, Barvish Z, Kafka M, Sharoni Y, Levy J, Uskokovic M, Studzinski GP, Danilenko M. Cooperative antitumor effects of vitamin D₃ derivatives and rosemary preparations in a mouse model of myeloid leukemia. *Int J Cancer.* 2006; 118: 3012-3021.
- [106] Zhou JY, Norman AW, Chen DL, Sun G, Uskokovic M, Koeffler HP. 1,25-Dihydroxy-16-ene-23-yne-vitamin D₃ prolongs survival time of leukemic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 3929-3932.
- [107] Koeffler HP, Golde DW. Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood.* 1980; 56: 344-350.
- [108] Wu SQ, Voelkerding KV, Sabatini L, Chen XR, Huang J, Meisner LF. Extensive amplification of bcr/abl fusion genes clustered on three marker chromosomes in human leukemic cell line K-562. *Leukemia.* 1995; 9: 858-862.
- [109] Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc.* 2006; 1: 1112-1116.
- [110] Borsotti G, Guglielmetti G, Spera S, Battistel E. Synthesis of phosphatidylcholines containing ricinoleic acid. *Tetrahedron.* 2001; 57: 10219-10227.
- [111] Castillo E, Regla I, Demare P, Luviano-Jardón A, López-Munguía A. Efficient chemoenzymatic synthesis of phenylacetylvanillin: an ultrapotent capsaicinoid. *Synlett.* 2008: 2869-2873.
- [112] López-Ortiz M, Herrera-Solís A, Luviano-Jardón A, Reyes-Prieto N, Castillo I, Monsalvo I, Demare P, Méndez-Díaz M, Regla I, Prospéro-García O. Chemoenzymatic synthesis and cannabinoid activity of a new diazabicyclic

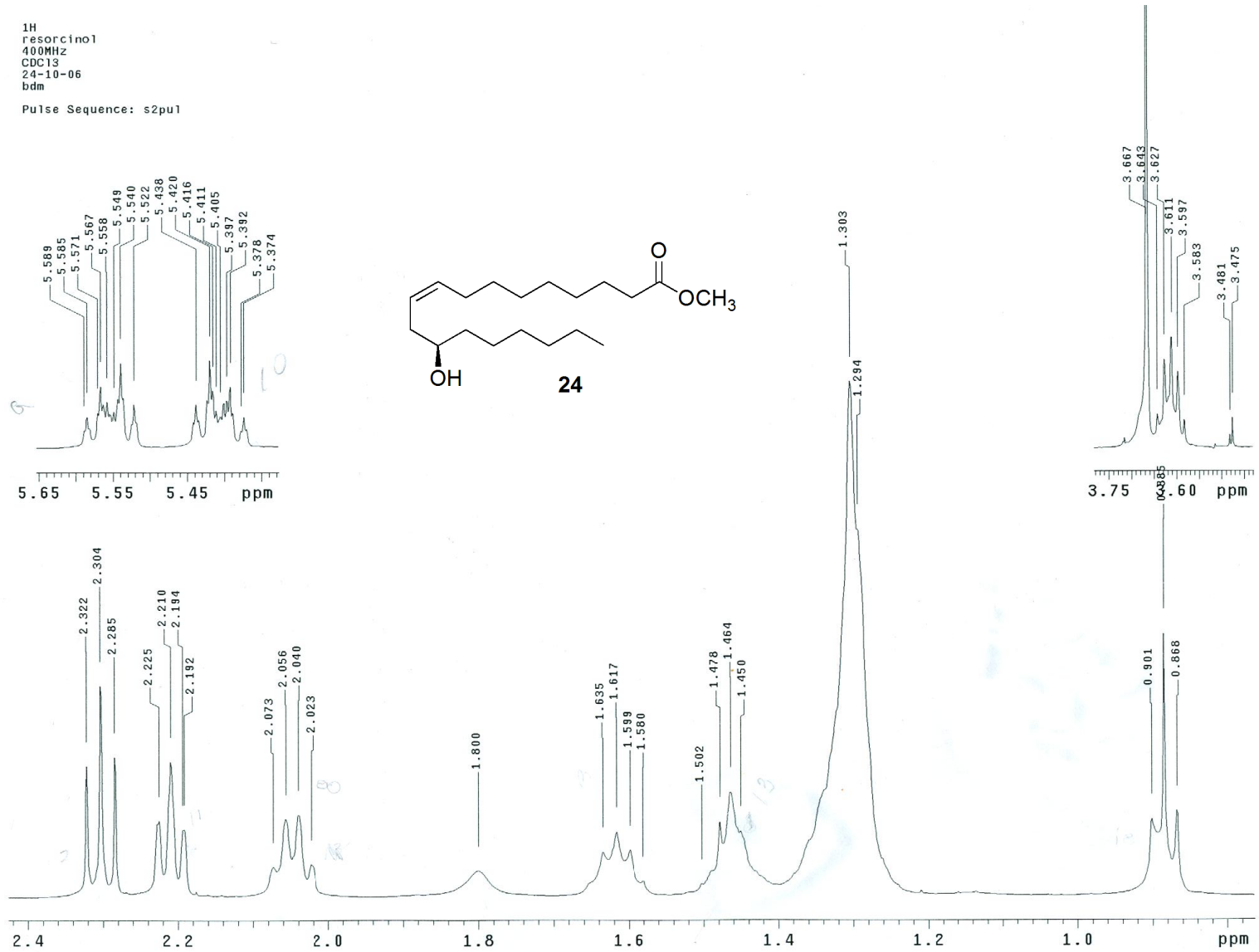
- amide of phenylacetylricinoleic acid. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010; 20: 3231-3234.
- [113] Griffin AM, Butow PN, Coates AS, Childs AM, Ellis PM, Dunn SM, Tattersall MHN. On the receiving end V: Patient perceptions of the side effects of cancer chemotherapy in 1993. *Ann Oncol*. 1996; 7: 189-195.
- [114] Carey MP, Burish TG. Etiology and treatment of the psychological side effects associated with cancer chemotherapy: a critical review and discussion. *Psychol Bull*. 1988; 104: 307-325.
- [115] Bifulco M, DiMarzo V. Targeting the endocannabinoid system in cancer therapy: a call for further research. *Nat Med*. 2002; 8: 547-550
- [116] Guzmán M. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 745-755.
- [117] Carracedo A, Lorente M, Egia A, Blázquez C, García S, Giroux V, Malicet C, Villuendas R, Gironella M, González-Feria L, Piris MA, Iovanna JL, Guzmán M, Velasco G. The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Cell*. 2006; 9: 301-12.
- [118] Galve-Roperh I, Sánchez C, Cortés ML, Gómez del Pulgar T, Izquierdo M, Guzmán M. Antitumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med*. 2000; 6: 313-319.
- [119] Blázquez C, Casanova ML, Planas A, Gómez del Pulgar T, Villanueva C, Fernández-Aceñero MJ, Aragonés J, Huffman JW, Jorcano JL, Guzmán M. Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids. *FASEB J*. 2003; 17: 529-531.
- [120] Blázquez C, González-Feria L, Álvarez L, Haro A, Casanova ML, Guzmán M. Cannabinoids inhibit the vascular endothelial growth factor pathway in gliomas. *Cancer Res*. 2004; 64: 5617-5623.
- [121] Casanova L, Blázquez C, Fernández-Aceñero MJ, Villanueva C, Huffman J,

- Jorcano JL, Guzmán, M. Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest.* 2003; 111: 43-50.
- [122] Portella G, Laezza C, Laccetti P, De Petrocellis L, Di Marzo V, Bifulco M. Inhibitory effects of cannabinoid CB1 receptor stimulation on tumor growth and metastatic spreading: actions on signals involved in angiogenesis and metastasis. *FASEB J.* 2003; 17: 1771-1773.
- [123] Sánchez C, de Ceballos ML, Gómez del Pulgar T, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, Galve-Roperh I, Huffman JW, Ramon y Cajal S, Guzmán M. Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB2 cannabinoid receptor. *Cancer Res.* 2001; 61: 5784-5789.

APENDICE I

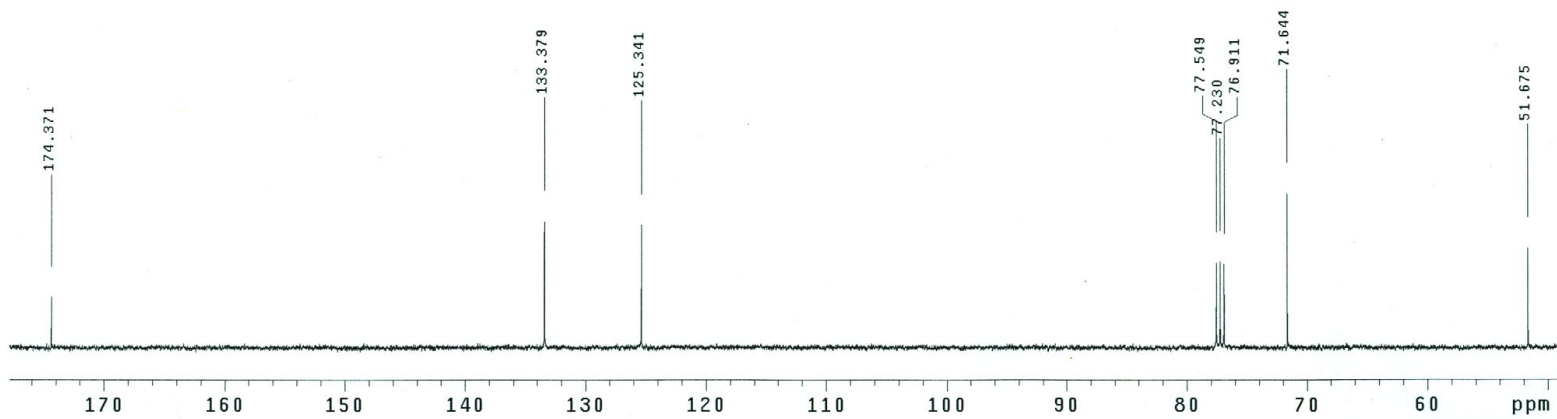
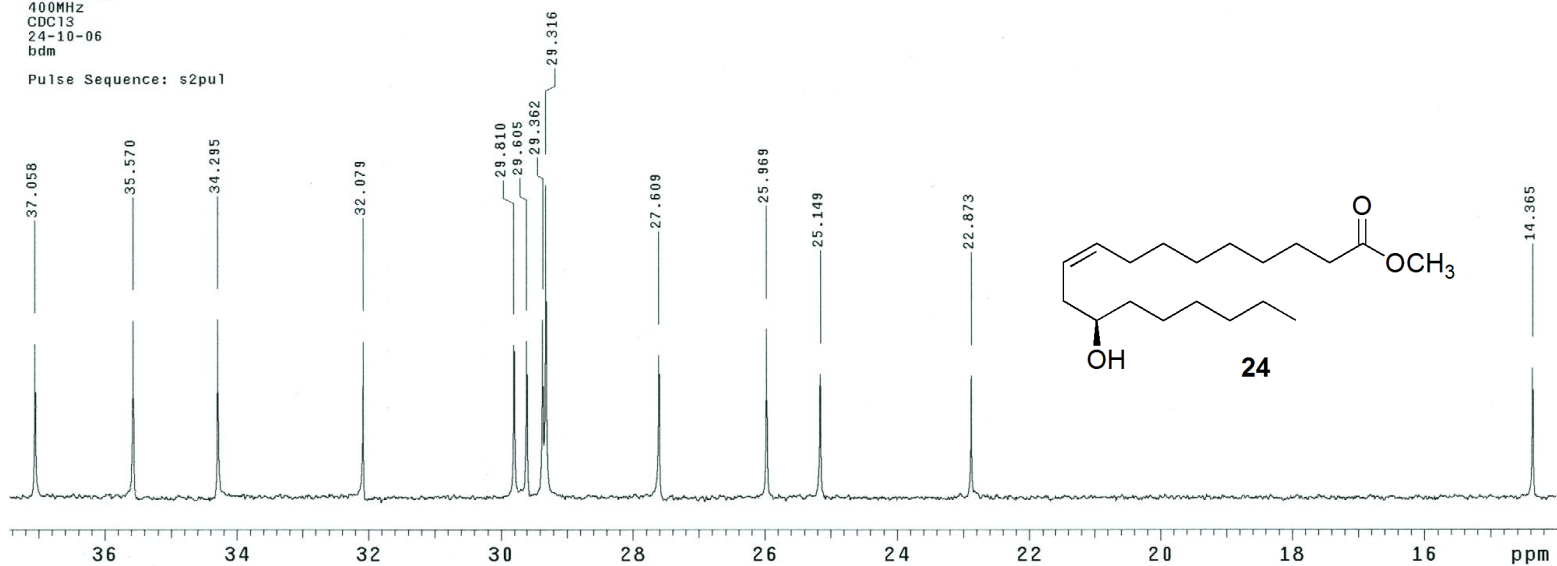
ESPECTROS SELECTOS DE IR y RMN ^1H , ^{13}C

1H
resorcino1
400MHz
CDC13
24-10-06
bdm
Pulse Sequence: s2pu1



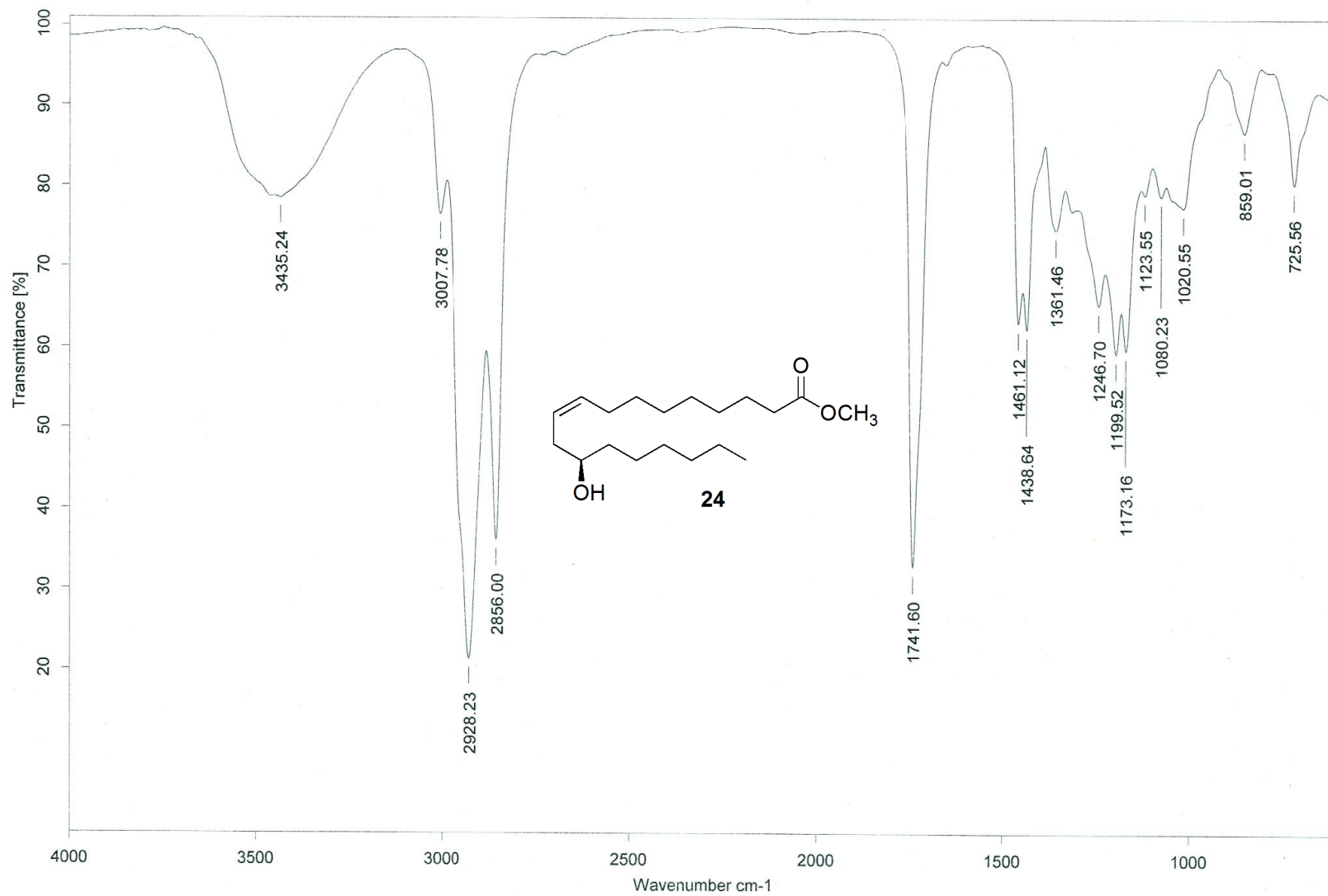
Espectro 1. Espectro de RMN ^1H para el ricinoleato de metilo (**24**)

13C
resorcino1
400MHz
CDC13
24-10-06
bdm
Pulse Sequence: s2pu1

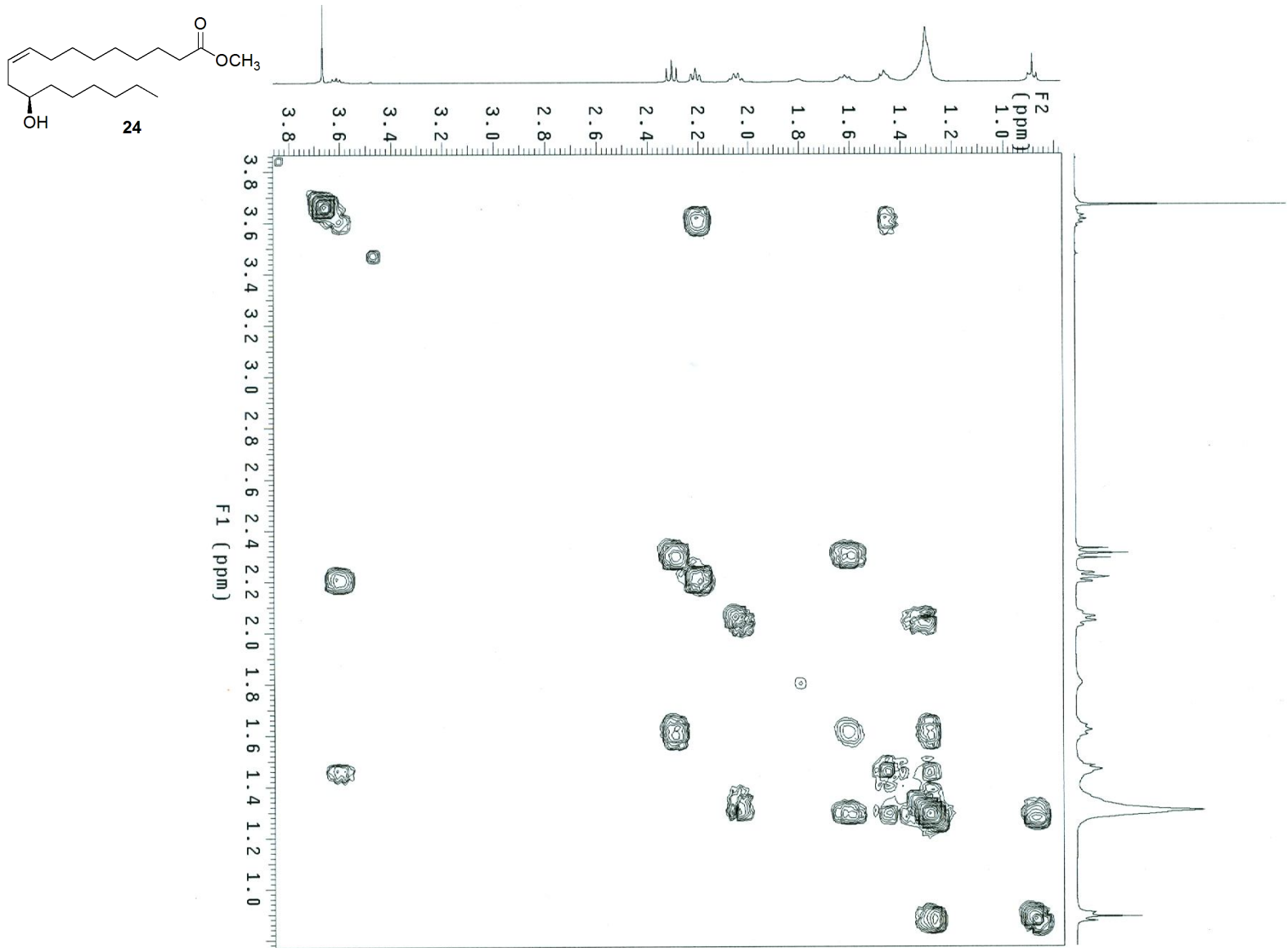


98

Espectro 2. Espectro de RMN ¹³C para el ricinoleato de metilo (24)



Espectro 3. Espectro de IR para el ricinoleato de metilo (**24**)

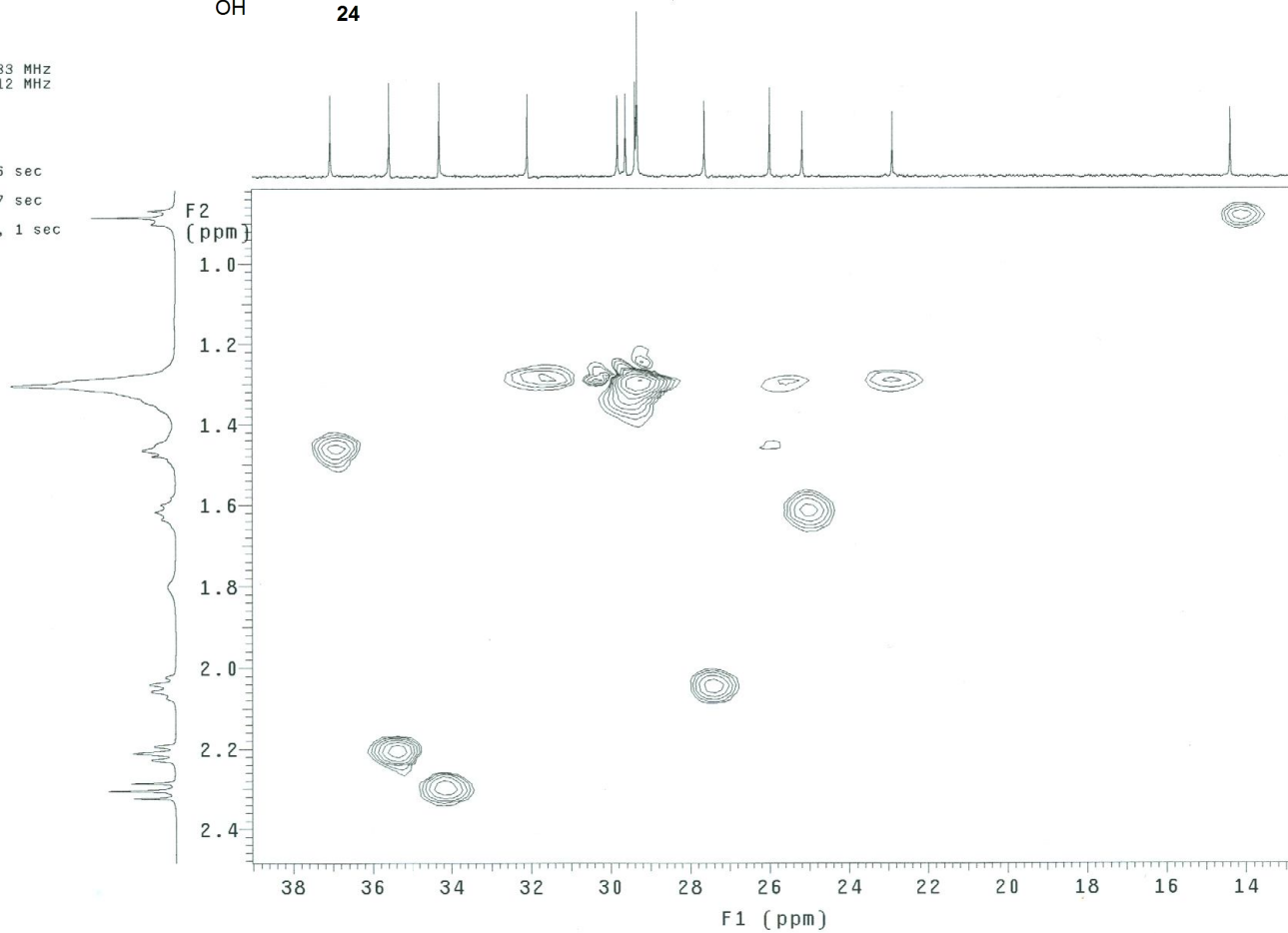
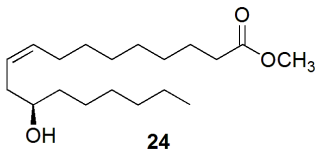


Espectro 3.1. Espectro COSY para el ricinoleato de metilo (24)

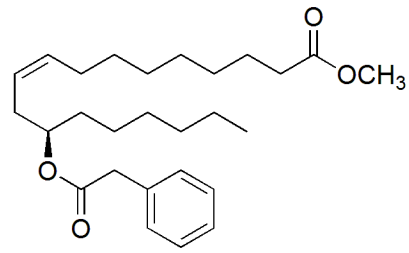
QC
e
sec
c
z

853633 MHz
336312 MHz
ion

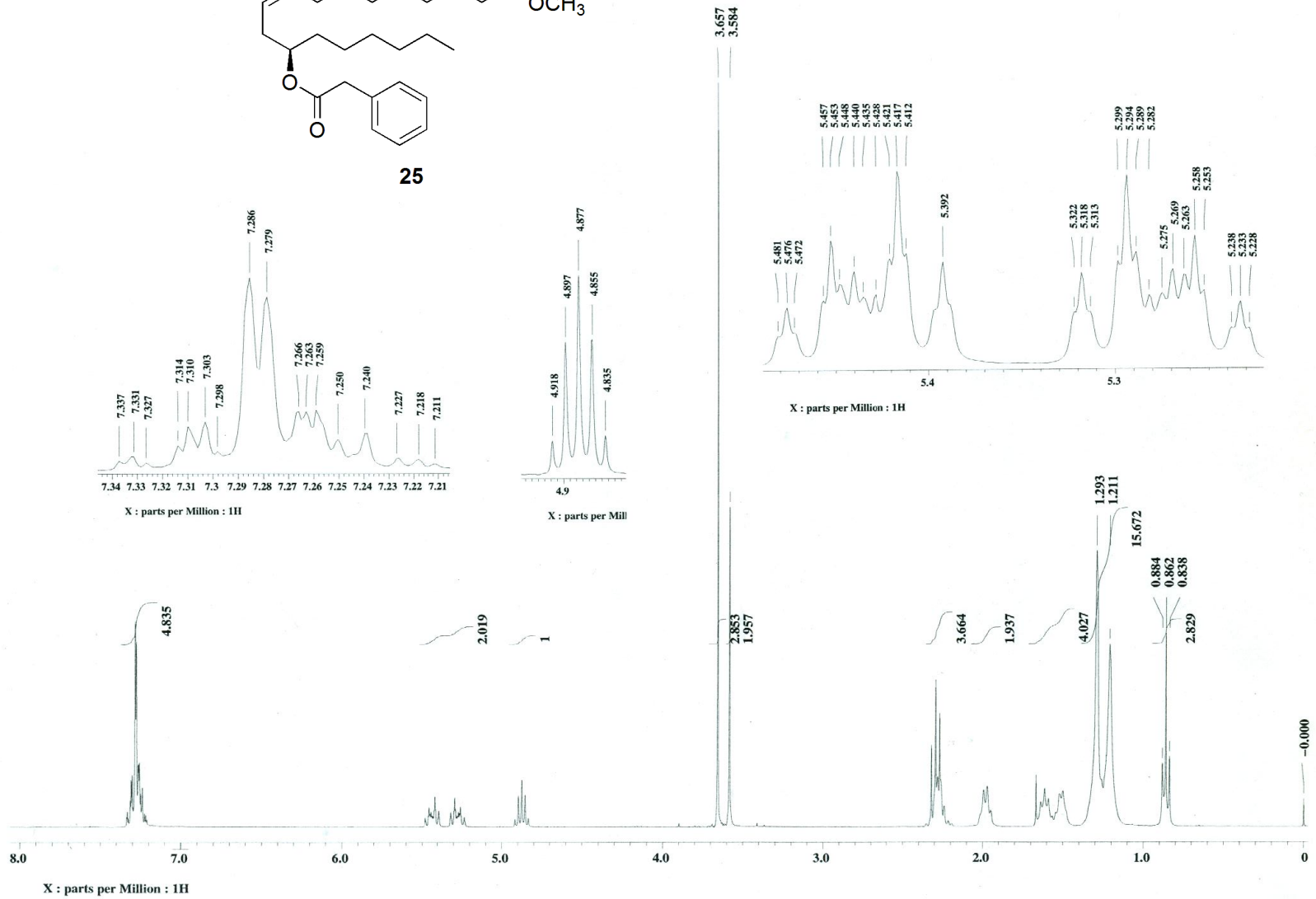
0.076 sec
0.007 sec
min, 1 sec



Espectro 3.2. Espectro COSY para el ricinoleato de metilo (**24**)



25



Espectro 4. Espectro de RMN ¹H para el fenilacetilricinoleato de metilo (25)

UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, apg

SEC. TEC. / Dr. Ignacio Regla

Clave: ALJ-85

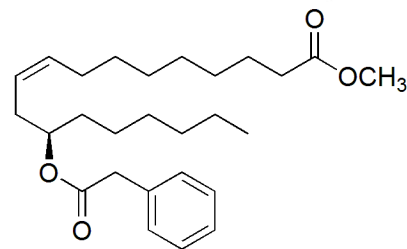
Disolvente: CDCl₃

Carbono-13

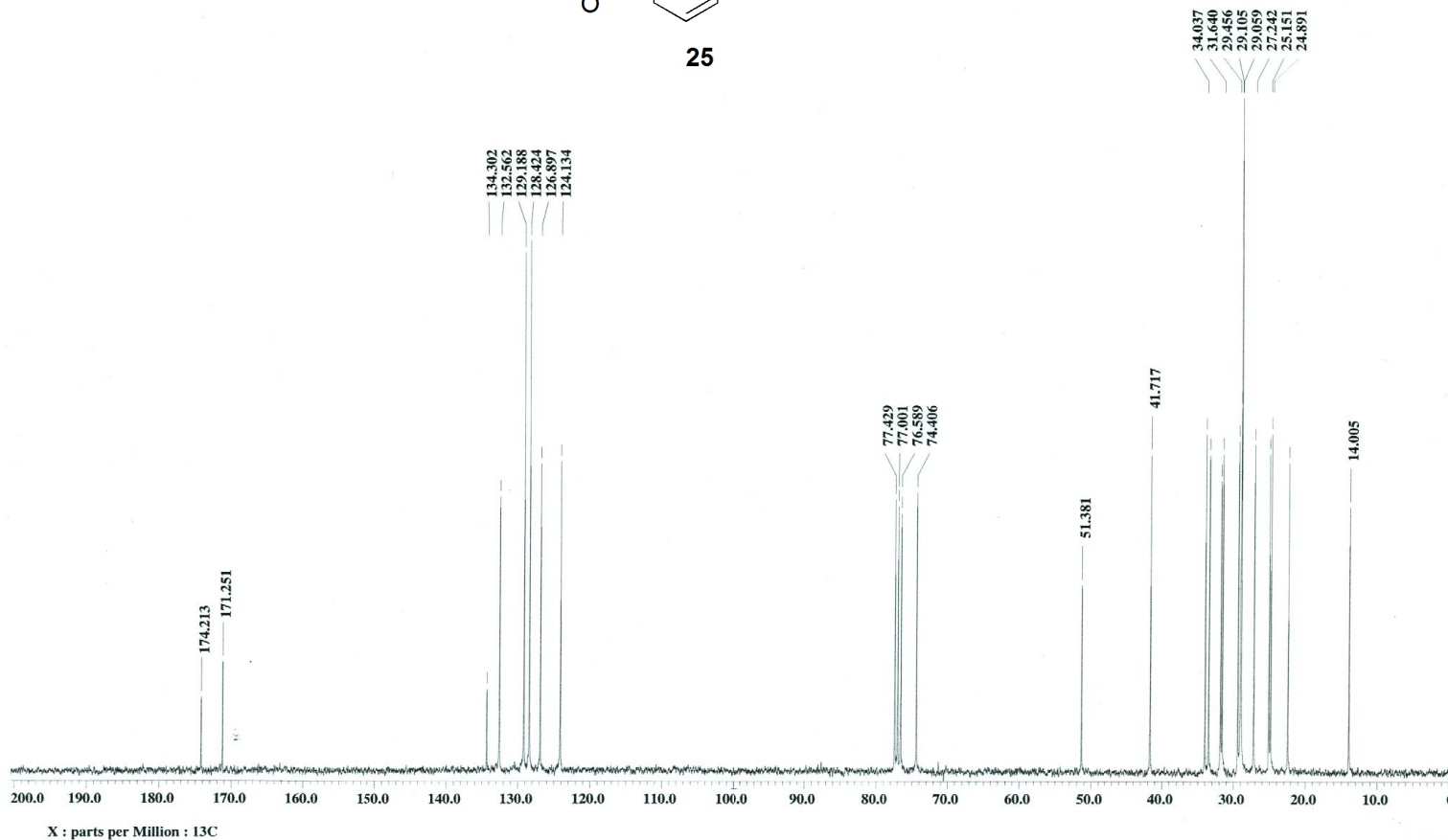
Eclipse 300 MHz Jeol (E)

7-V-2007

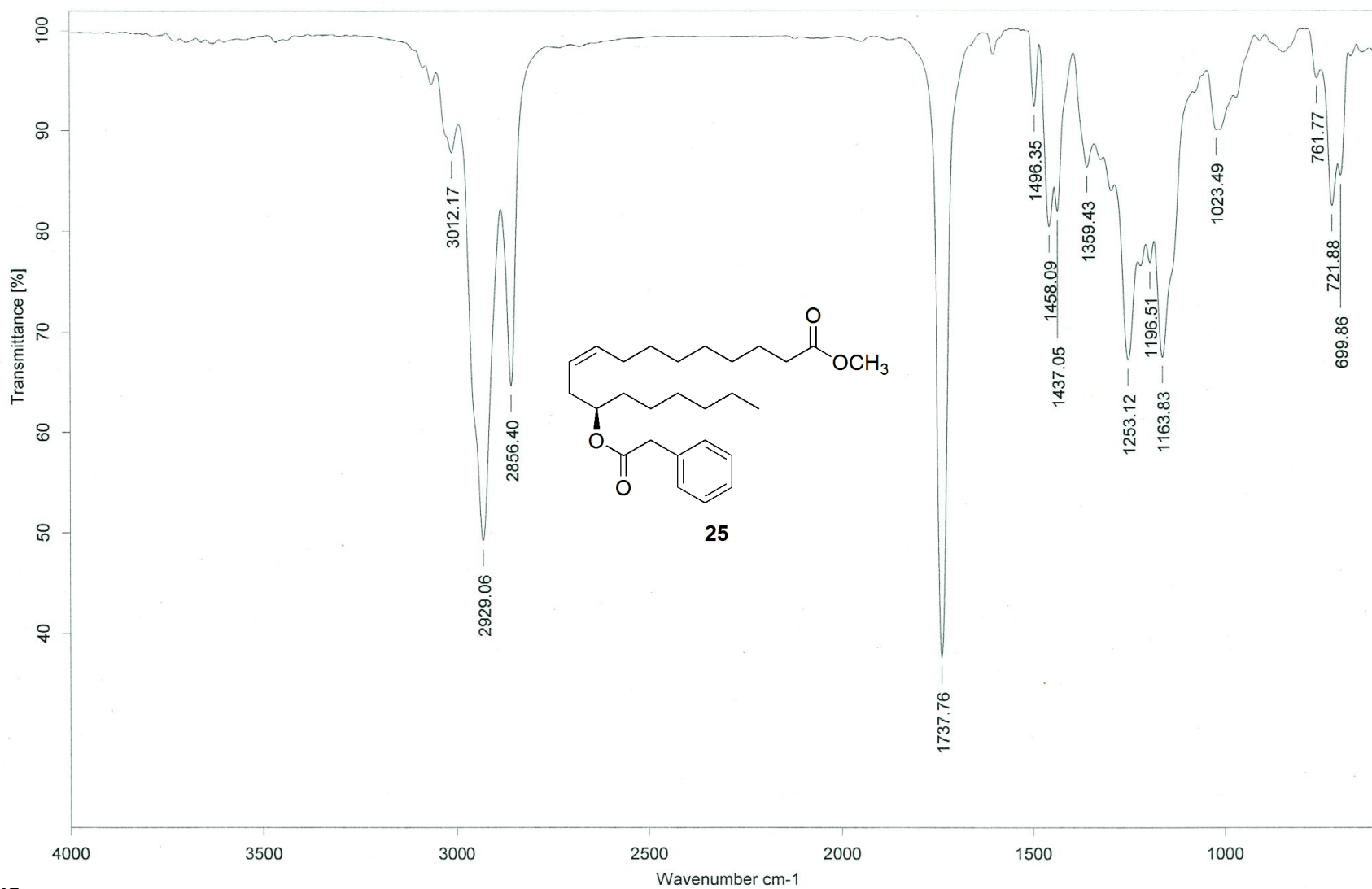
No. Reg. STA-274



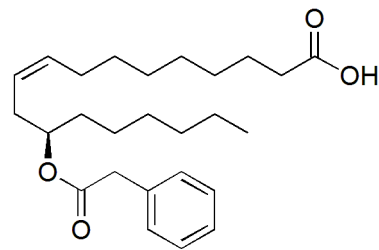
25



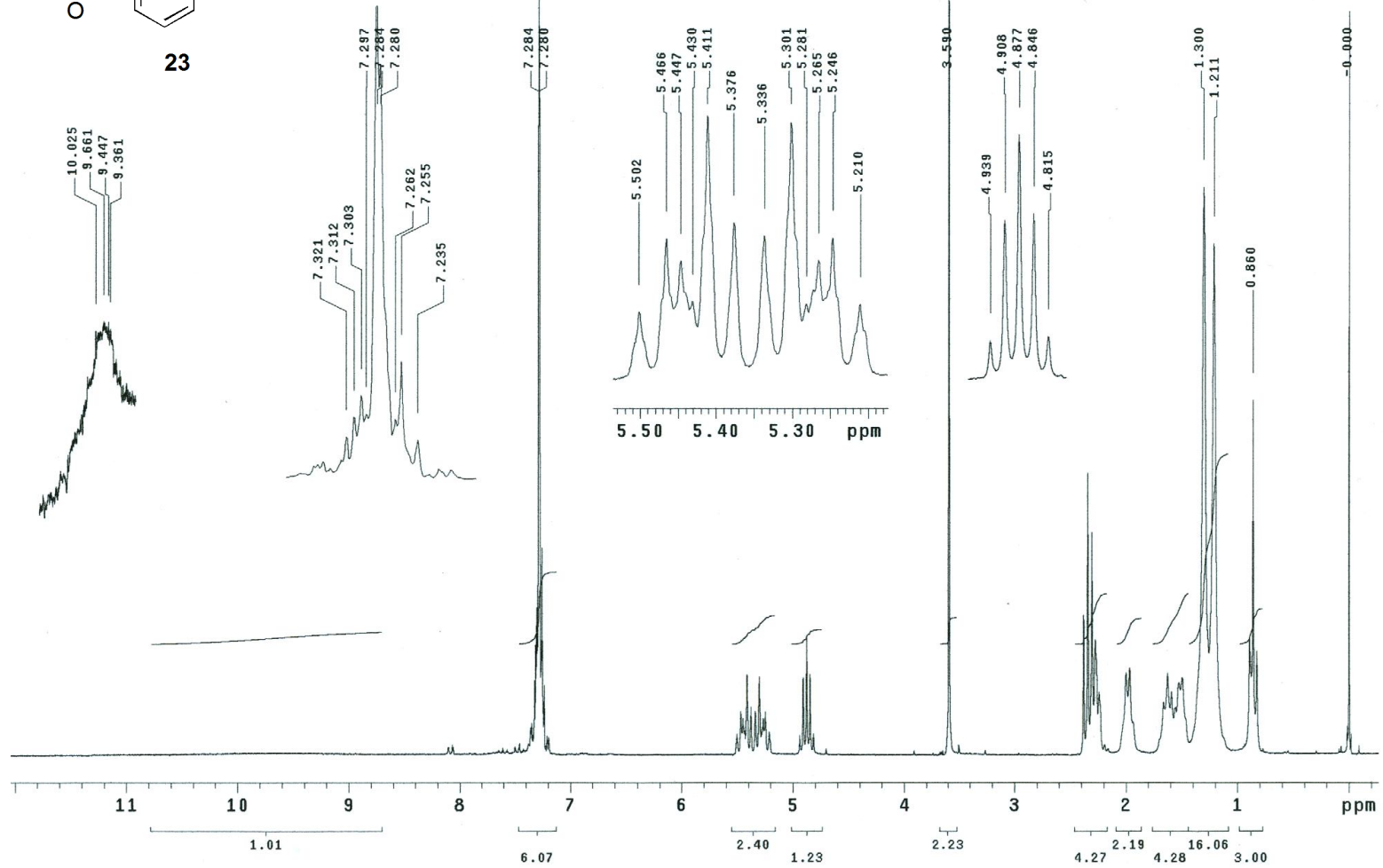
Espectro 5. Espectro de RMN ¹³C para el fenilacetilricinoleato de metilo (25)



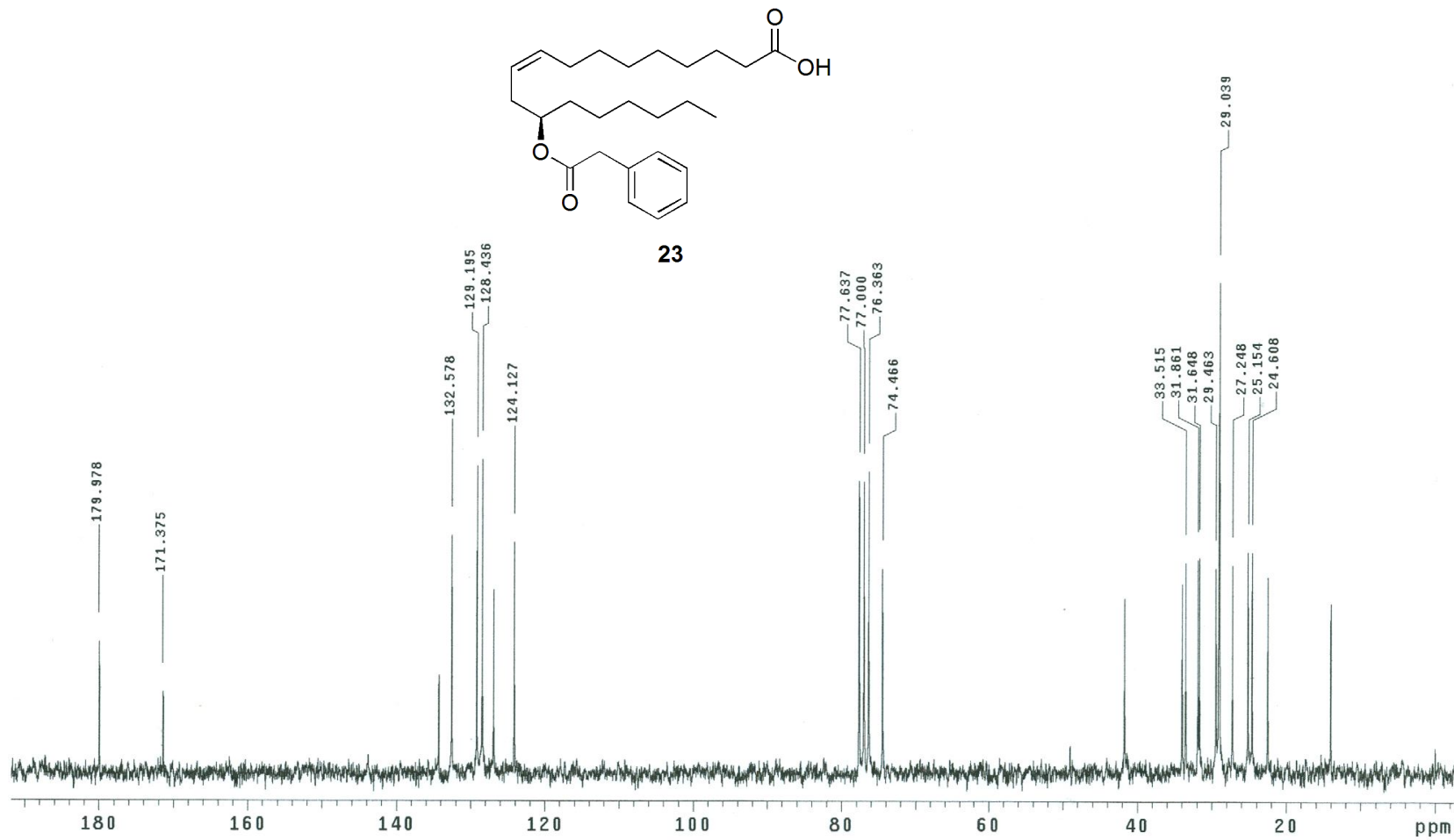
Espectro 6. Espectro de IR para el fenilacetilricinoleato de metilo (**25**)



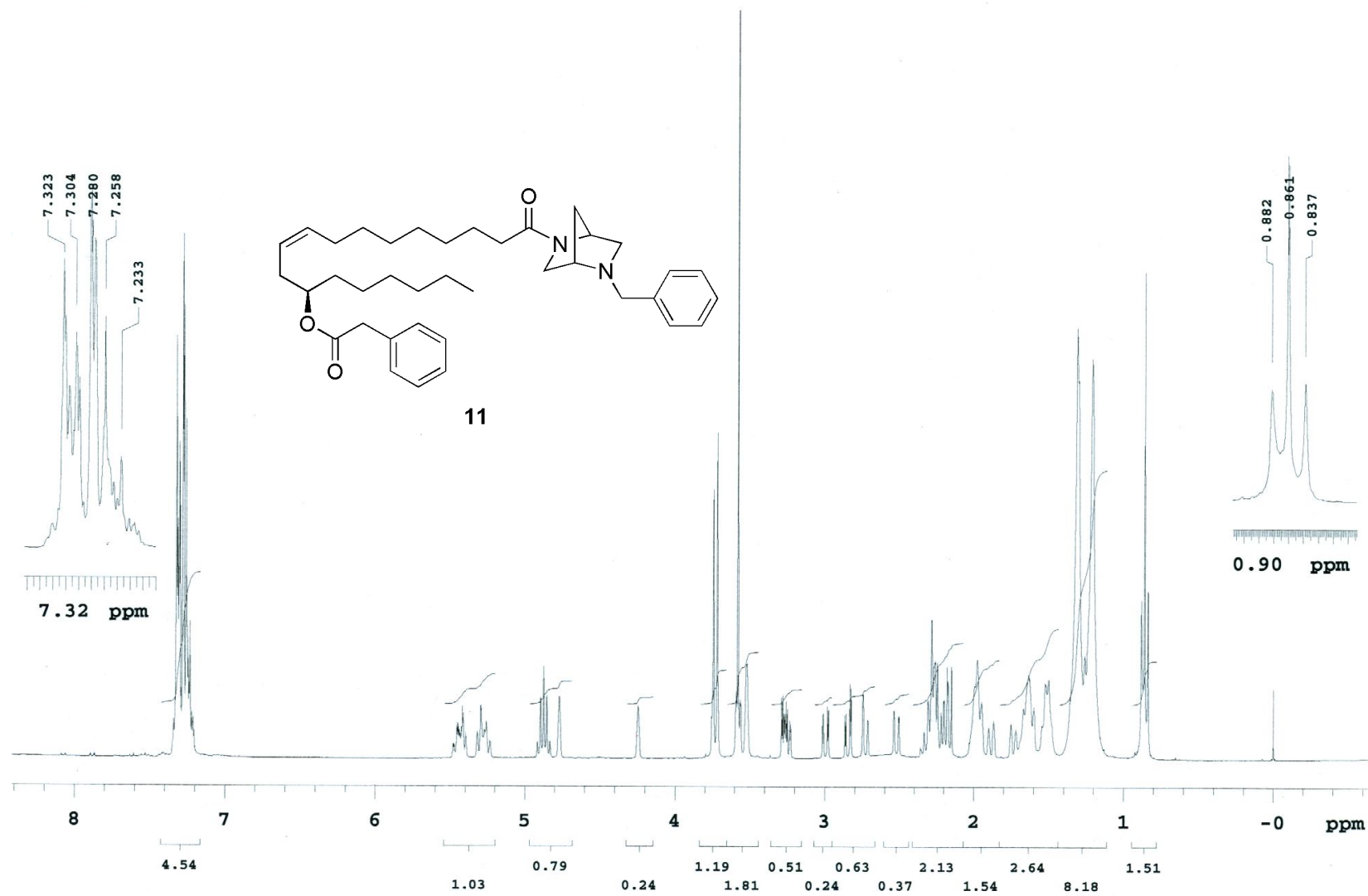
23



Espectro 7. Espectro de RMN ¹H para el ácido fenilacetilrícinolico (23)

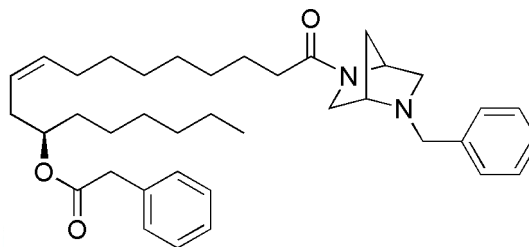


Espectro 8. Espectro de RMN ¹³C para el ácido fenilacetilricinico (**23**)

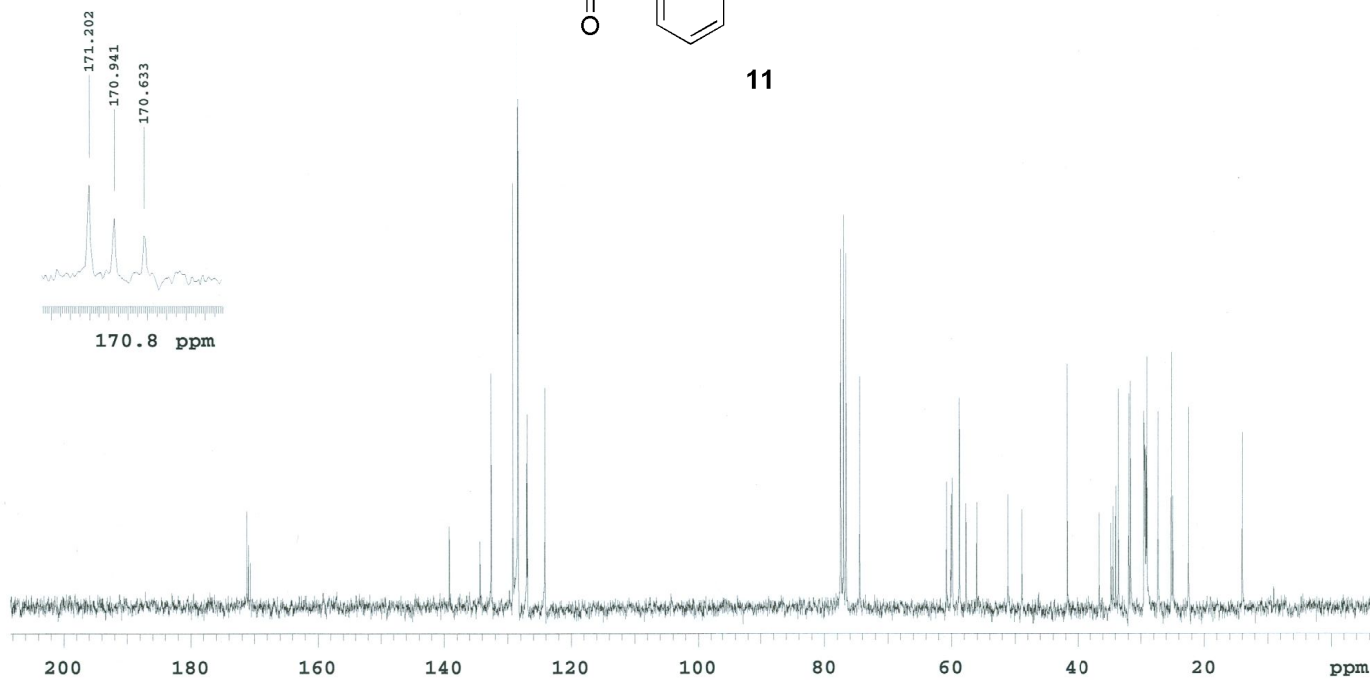


Espectro 9. Espectro de RMN ^1H para la amida **11**.

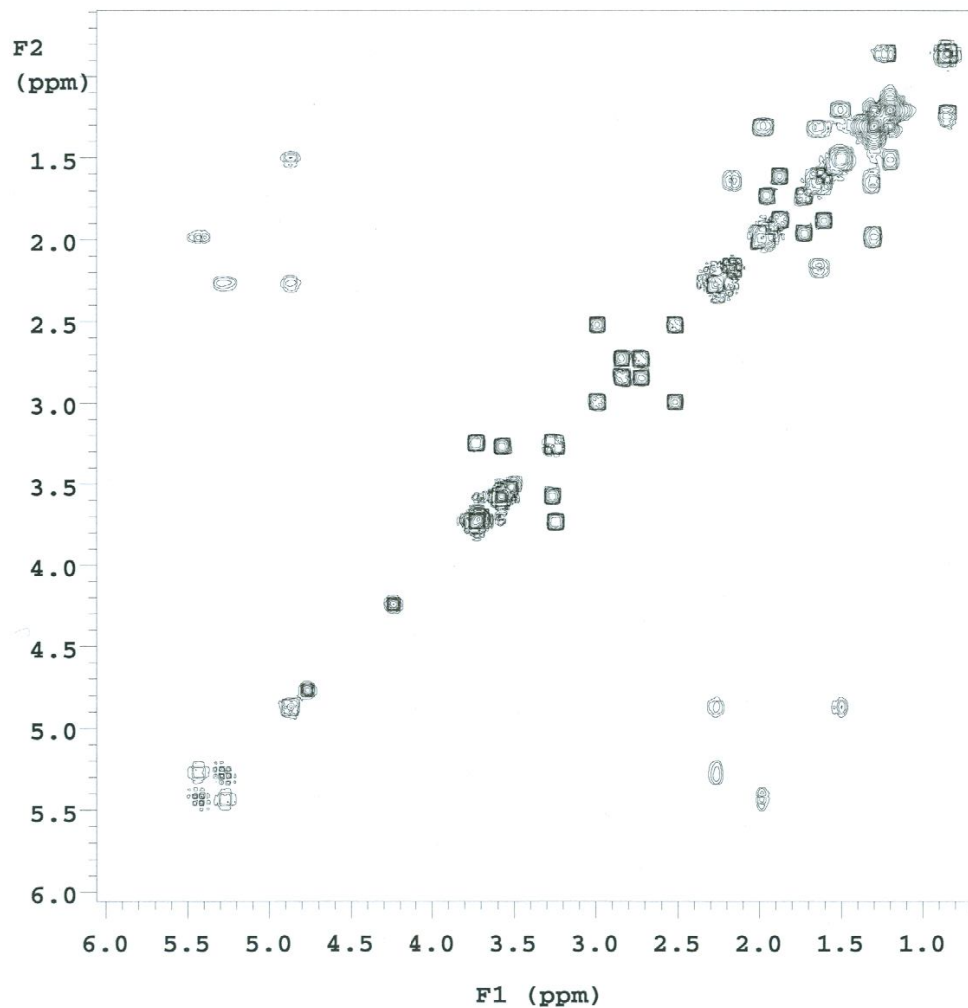
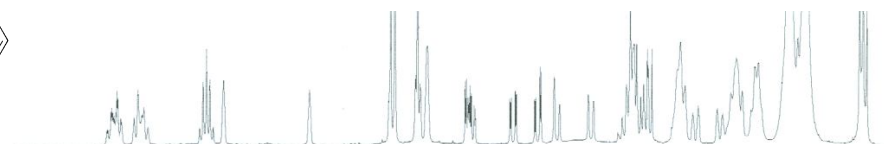
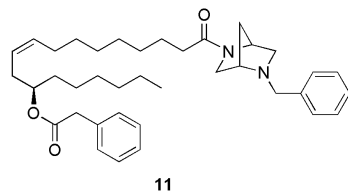
U.N.A.M. Instituto de Química ICH
Dr. I. Regla
Clave:1MM-62
Disolvente:CDCl3
Experimento 13C
Varian Unity 75 MHz (D)
No. de Registro 3183
08-10-08



11

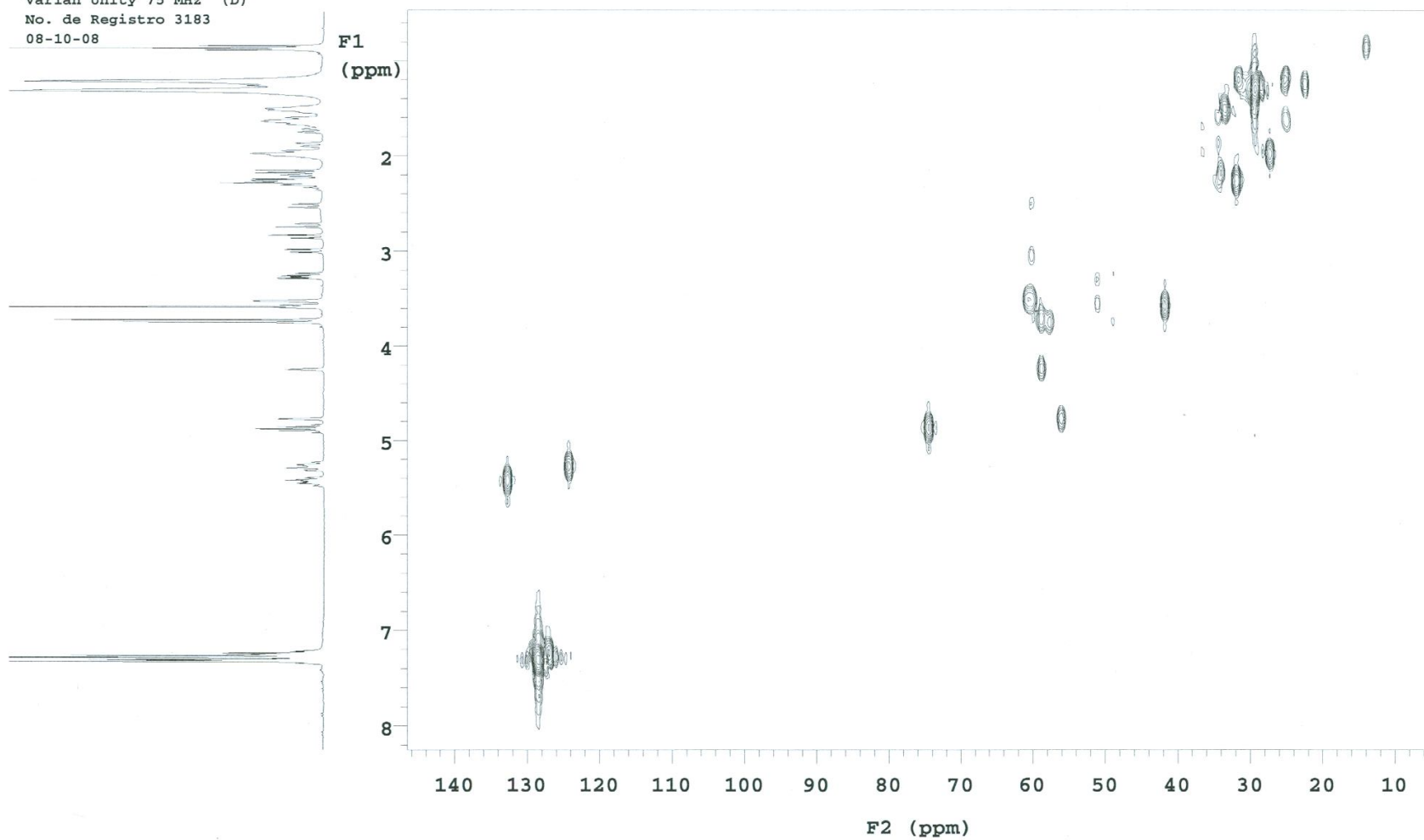
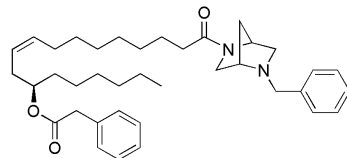


U.N.A.M. Instituto de Química ICH
Dr. I. Regla
Clave:1MM-62
Disolvente:CDCl3
Experimento COSY
Varian Unity 300 MHz (D)
No. de Registro 3183
08-10-08

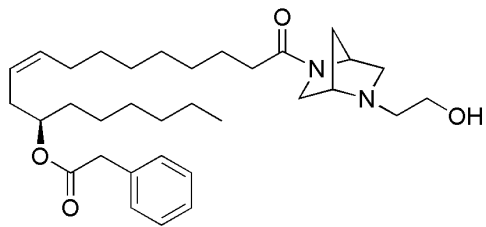


Espectro 11. Experimento de RMN COSY para la amida 11.

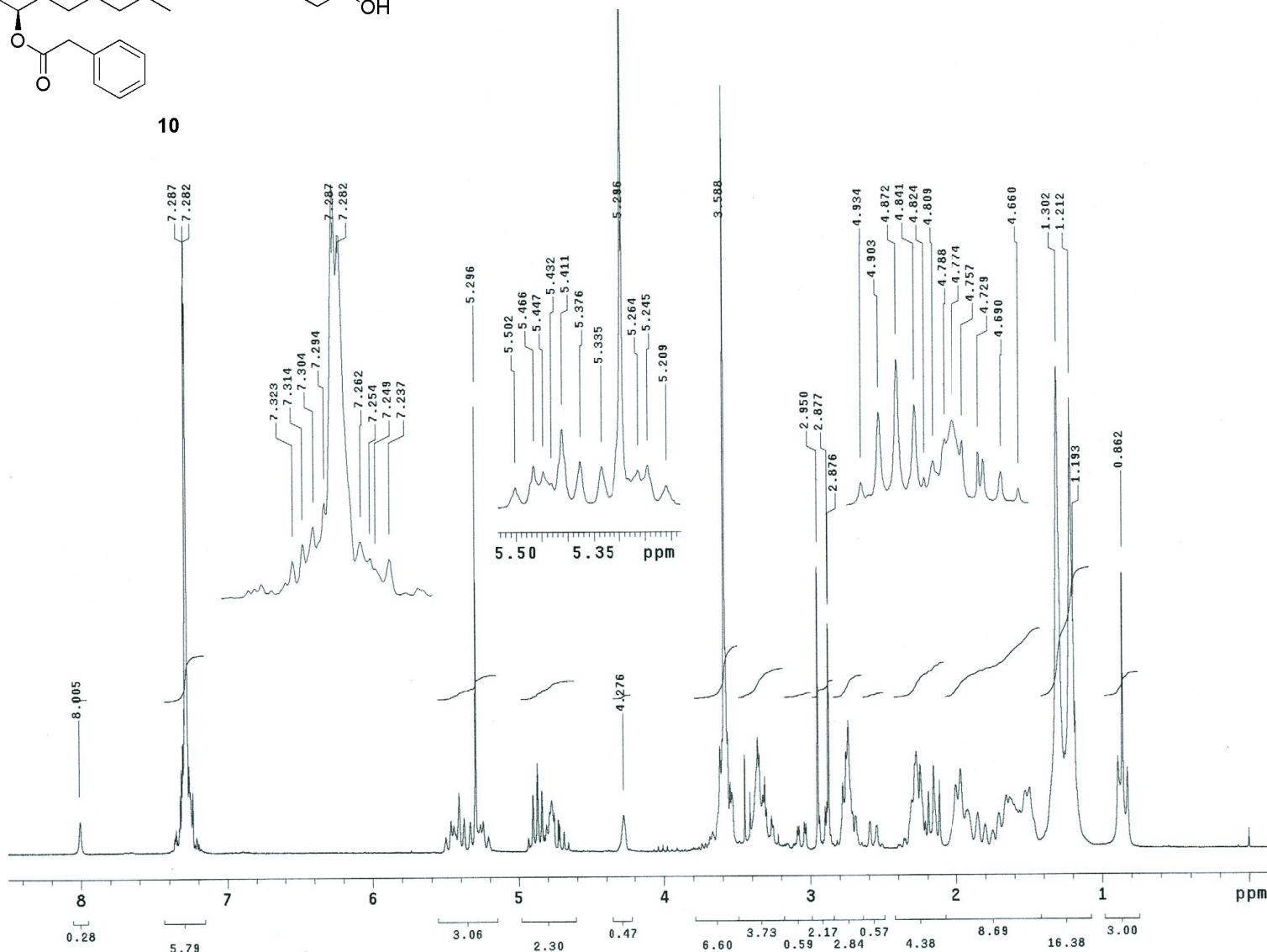
U.N.A.M. Instituto de Química ICH
Dr. I. Regla
Clave: IMM-62
Disolvente: CDCl₃
Experimento HETCOR
Varian Unity 75 MHz (D)
No. de Registro 3183
08-10-08



Espectro 12. Experimento de RMN HETCOR para la amida 11.

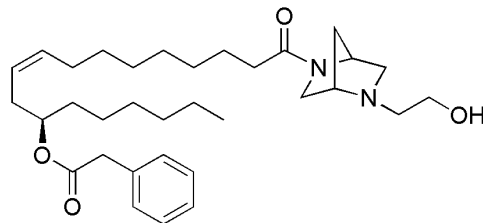


10

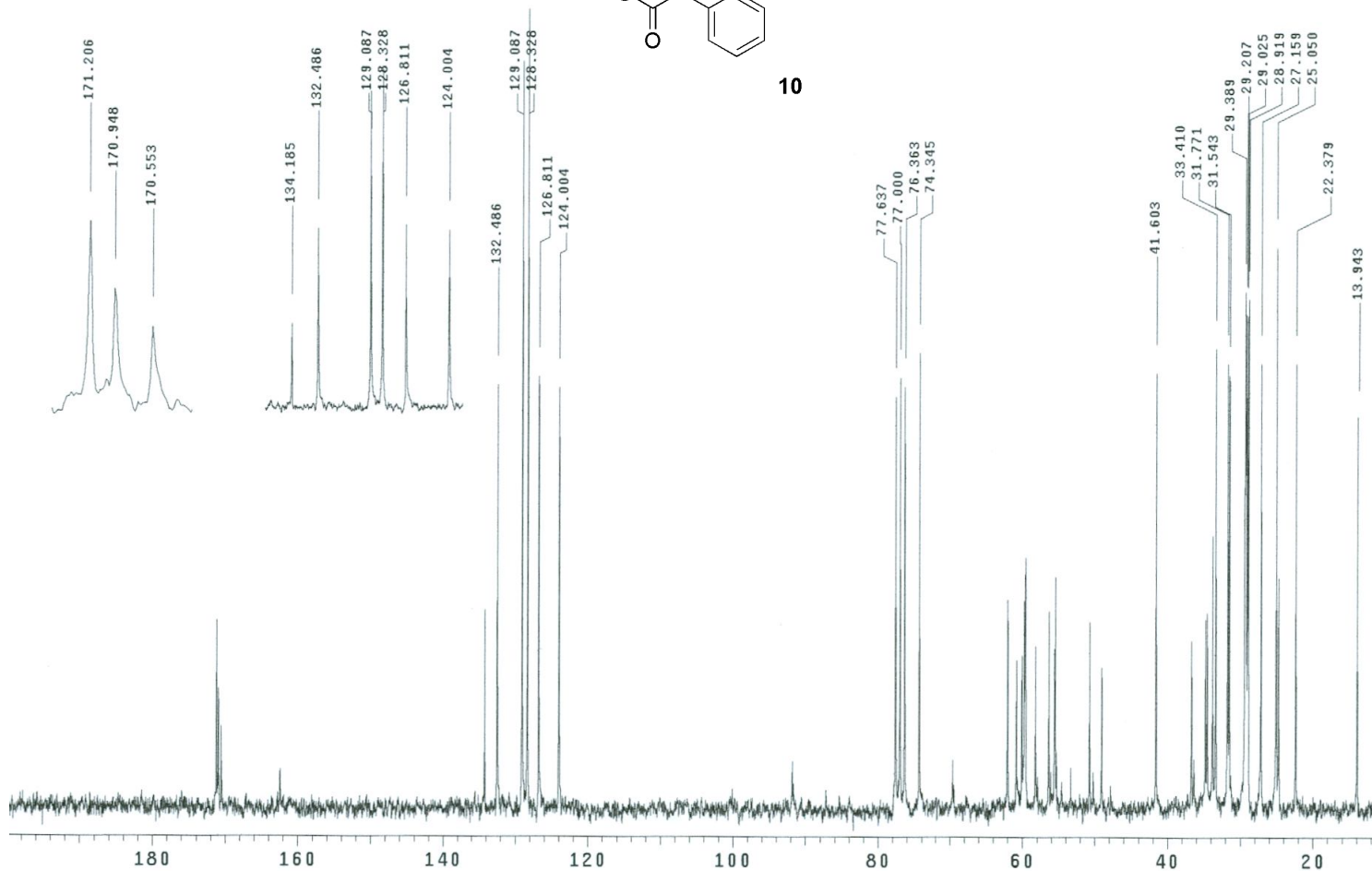


Espectro 13. Espectro de RMN ¹H para la amida 10

UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, apg
Dr. Ignacio Regla
Clave: JSC-40
Disolvente: CDC13
Carbono-13
Gemini-200 MHz Varian (B)
21-10-09
No. Reg. 2202



10



Espectro 14. Espectro de RMN ^{13}C para la amida 10

APENDICE II. Ecuaciones obtenidas del análisis de regresión lineal

P388	
Compuesto 9	$y = -57.224x + 105.17$ $R^2 = 0.9614$
Compuesto 10	$y = -23.087x + 95.367$ $R^2 = 0.9789$
Compuesto 11	$y = -6.7824x + 89.86$ $R^2 = 0.9565$
Compuesto 5	$y = -7.1663x + 100.96$ $R^2 = 0.9904$

J774	
Compuesto 9	$y = -28.205x + 106.45$ $R^2 = 0.9396$
Compuesto 10	$y = -22.121x + 98.26$ $R^2 = 0.9931$
Compuesto 11	$y = -6.2479x + 91.061$ $R^2 = 0.9582$
Compuesto 5	$y = -5.6092x + 109.36$ $R^2 = 0.9991$

WEHI-3	
Compuesto 9	$y = -6.3978x + 92.457$ $R^2 = 0.9799$
Compuesto 10	$y = -23.857x + 102.82$ $R^2 = 0.9932$
Compuesto 11	$y = -5.6198x + 101.79$ $R^2 = 0.9673$
Compuesto 5	$y = -6.63x + 96.295$ $R^2 = 0.9566$

K562	
Compuesto 9	$y = -12.509x + 97.895$ $R^2 = 0.9914$
Compuesto 10	$y = -3.1918x + 101.98$ $R^2 = 0.9818$
Compuesto 11	$y = -0.352x + 98.06$ $R^2 = 0.7907$
Compuesto 5	$y = -0.318x + 93.812$ $R^2 = 0.6597$

Médula ósea	
Compuesto 9	$y = -4.7953x + 95.363$ $R^2 = 0.9837$
Compuesto 10	$y = -1.3479x + 106.09$ $R^2 = 0.9988$
Compuesto 11	$y = -0.981x + 88.668$ $R^2 = 0.8922$
Compuesto 5	$y = -0.6366x + 72.962$ $R^2 = 0.8637$

Apéndice III

Artículos publicados y congresos derivados

Efficient Chemoenzymatic Synthesis of Phenylacetylirinvanil: An Ultrapotent Capsaicinoid

Edmundo Castillo,^{*a} Ignacio Regla,^{*b} Patricia Demare,^b Axel Luviano-Jardón,^b Agustín López-Munguía^a

^a Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, Mexico

Fax +52(73)172388; E-mail: edmundo@ibt.unam.mx

^b Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM, Batalla del 5 de Mayo esq. Fuerte de Loreto, Ejercito de Oriente, 09230 México, D.F., México

E-mail: regla@unam.mx

Received 27 April 2008

Abstract: The straightforward synthesis of phenylacetylirinvanil (PhAR), an ultrapotent capsaicinoid is described. The process starts with the quantitative synthesis of methyl ricinoleate (MeRic) by castor oil methanolysis. Afterwards, two alternative routes are possible: a) chemoselective vanillylamine aminolysis of MeRic catalyzed by *Candida antarctica* lipase-B (CaLB) to yield rinvanil, which after reaction with phenylacetic acid and DCC–DMAP followed by a regioselectively pyrrolidine deacylation results in PhAR with a 51% global yield, b) methyl 12-phenylacetylricinoleate synthesis by reaction of MeRic with phenylacetic acid and DCC–DMAP, followed by a chemoselective vanillylamine aminolysis catalyzed by CaLB to obtain PhAR with a 70% global yield.

Key words: chemoselective synthesis, solvent effects, enzymes, *Candida antarctica* B, ultrapotent capsaicinoid

Transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) is a vanilloid receptor highly expressed in sensory neurons.¹ This protein acts as a rapid and direct detector of potentially harmful thermal and chemical stimuli, which are perceived as painful. Activation of this receptor, potentiated by endogenous pronociceptive mediators such as prostaglandins, bradykinin, and ATP, results in a release of neurotransmitters from peripheral and central nerve terminals, inducing pain and neurogenic inflammation, thus playing an important role in neuropathic pain, intestinal inflammation, and other disorders.^{2,3}

Capsaicin (*E*)-*N*-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]-8-methyl-6-nonenamide (**1**, Figure 1) is a compound found in the fruit of plants of the *Capsicum* genus and is responsible for the pungency of chilli peppers. Due to its exogenous effect as agonist of TRPV1 channels, capsaicin has been widely used to study pain mechanisms and to evaluate the analgesic efficacy of various drugs. While initial exposure to capsaicin results in pain and hyperalgesia, repeated or prolonged treatment with capsaicin can desensitize nociceptive neurons, leading to a progressive decrease in subsequent responses to capsaicin or to other stimuli.⁴ In spite of its pungency, this functional desensitization is the basis of the topical analgesic and anti-inflammatory effect of capsaicin. The discovery of new

analogues that could bind the TRPV1 receptor with high specificity but with reduced pungency would lead to more effective drugs for the treatment of health disorders such as inflammatory hyperalgesia, bladder hyperactivity, emesis, cancer growth, neuronal excitotoxicity, pain, and dysmotility.⁵ In fact, it has been shown that analogues of capsaicin, which do not irritate the skin, such as capsiate (**2**) and olvanil (**3**) (Figure 1), strongly activate TRPV1 *in vitro* and have *in vivo* antihyperalgesic effects.^{6,7}

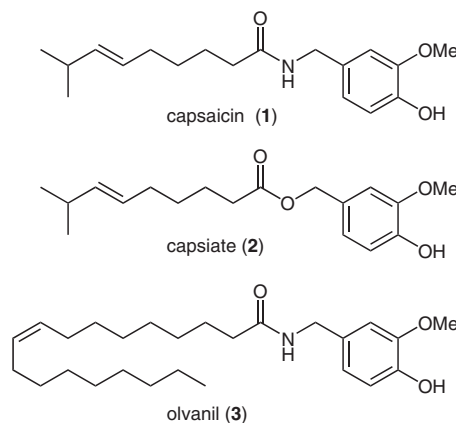


Figure 1 Chemical structures of capsaicinoids TRPV1 agonists

Recently, the synthesis of phenylacetylirinvanil (**4**, PhAR, IDN 5890, Figure 2), an ultrapotent TRPV1 agonist with moderate affinity for human cannabinoid CB₂ receptors, has been described.⁵ In terms of its affinity for the receptor, PhAR was found similar to resiniferatoxin (**5**) (Figure 2), a natural product isolated from certain succulent African euphorbias, about 1000 times more potent as a TRPV1 agonist than capsaicin,⁸ that has been successfully applied in the treatment of urinary incontinence.⁹ It is interesting to observe that the high affinity of PhAR results from the simple phenylacetylation of 12-hydroxyl group in rinvanil (**6**) (Scheme 1).

Appendino et al. (2005) have proposed two strategies for the chemical synthesis of PhAR: starting from expensive pure ricinoleic acid, the protection of the carboxyl group with trichloroethanol (DCC–DMAP), followed by acylation with phenylacetic acid–DCC–DMAP at 12-hydroxy position of trichloroethyl ester, deprotection of trichloro-

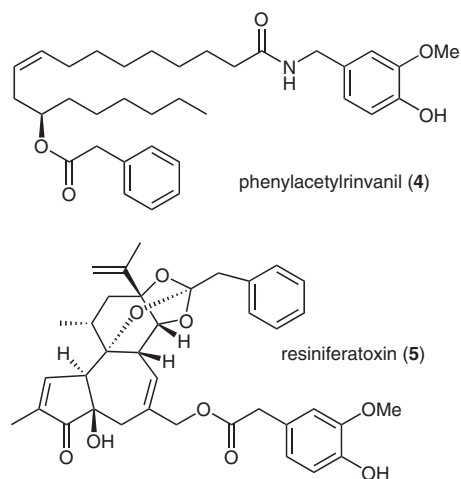
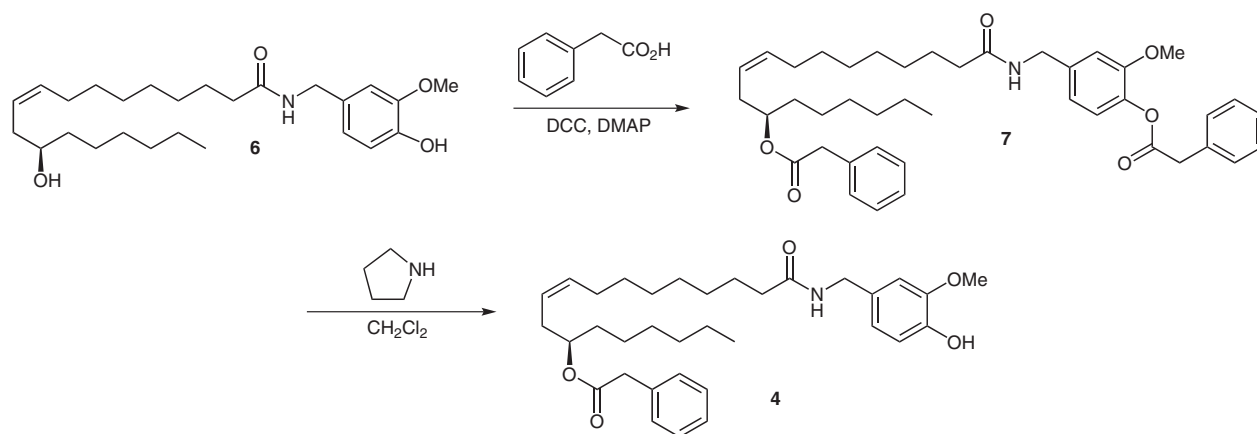


Figure 2 Chemical structures of resiniferatoxin and phenylacetyl-rinvanil

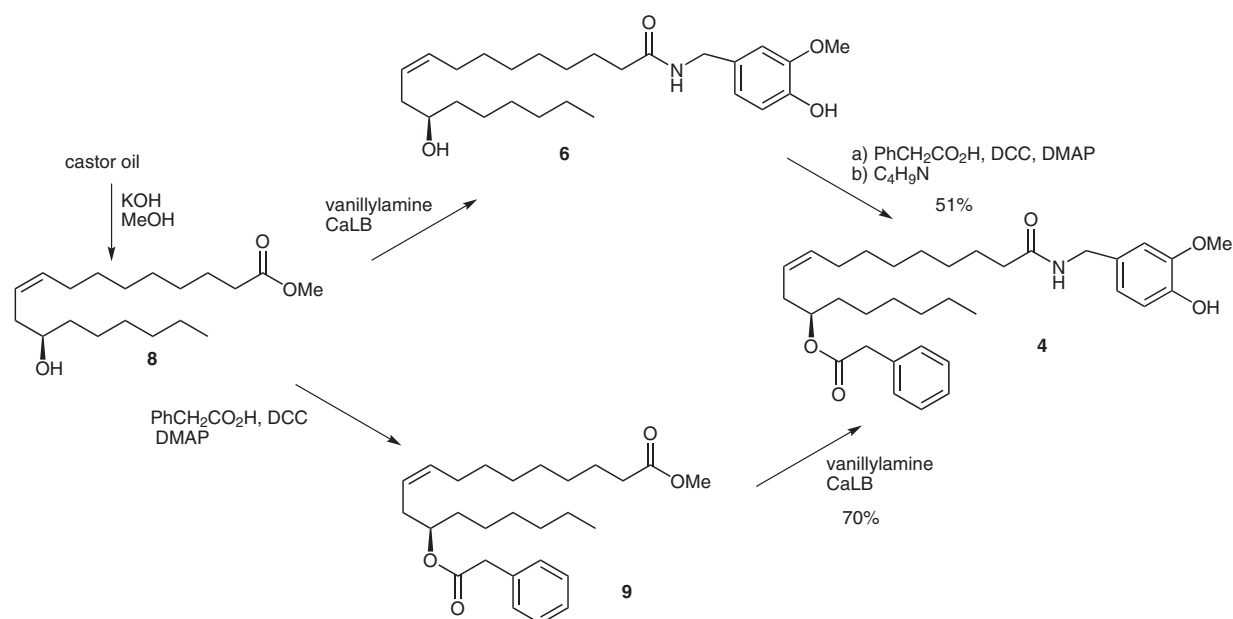
ethyl ester, and amide formation with vanillylamine using a cyclic anhydride protocol, to obtain PhAR with a global yield of 18.5%.⁵ Their alternative proposal (Scheme 1) consists in the esterification of rinvanil (6) with phenylacetic acid using DCC–DMAP in toluene, to obtain 7, the 4',12-diester of rinvanil, which can be regioselectively hydrolyzed (pyrrolidine, CH_2Cl_2) to give PhAR (4).¹⁰

In the present work, a chemoenzymatic strategy for the synthesis of PhAR from commercially available castor oil is described (Scheme 2). This regio- and chemoselective strategy not only allows higher global PhAR yields but also results in a more economical process as it involves the use of castor oil as a not expensive source of ricinoleoyl moiety in the form of easily purified methyl ester, therefore, avoiding the difficult task of ricinoleic acid purification (Scheme 2).

Indeed, the production of methyl ricinoleate (8), the first step of PhAR synthesis, was actually explored from a medium containing castor oil (20 g) in MeOH (155 mL) by



Scheme 1 Chemical synthesis of PhAR from rinvanil (6)⁵



Scheme 2 Alternative syntheses of PhAR from castor oil using a chemoenzymatic approach

two alternative catalytic methods of alcoholysis: an enzymatic reaction with 10 mg/mL of *Candida antarctica* lipase B (CaLB) and a chemically catalyzed reaction with KOH (Scheme 2). Although an 80% yield was obtained through the CaLB reaction after 24 hours of reaction, only 30 minutes under reflux was required with the KOH reaction to obtain a quantitative mixture of methyl esters, which, after column chromatography, resulted in a 85% yield of **8** (16.67 g), equivalent to 95% yield of methyl ricinoleate on the basis of available ricinoleic acid on castor oil (87%). The KOH-catalyzed alcoholysis was therefore the best option. Furthermore, while optimizing the required amount of KOH for the reaction, it was possible to reduce it to 0.28% w/v retaining the same yield and productivity. This is, to our knowledge, the lowest KOH concentration reported for the preparation of fatty acid methyl esters.¹¹

The complexity of synthesis of vanillylamides relies on the low chemoselectivity of the acylation process, due to the presence of both an amino and a phenolic hydroxyl group on the vanillylamine molecule. For instance, equimolar amounts of vanillylamine and oleic acid in the presence of DCC and DMAP result in a mixture of the amide (olvanil) and the ester (*O*-oleylolvanil), as well as unreacted vanillylamine.¹² Therefore, protection of the phenolic group of vanillylamine is required when the acid is activated as a hydroxysuccinimide derivative or as a mixed anhydride¹³ and although Schotten–Baumann conditions are usually selective, acid chlorides are needed for this strategy. An interesting alternative proposed for the synthesis of PhAR that does not require the phenolic protection of vanillylamine is the use of propylphosphoric anhydride; however, this process results in a low PhAR yield (35%).¹² In order to overcome these limitations, we developed two chemoenzymatic approaches taking advantage of the high regio- and chemoselectivity of the lipase-catalyzed aminolysis. The first approach consists in the chemoselective enzymatic amidation of **8** (2 g, 6.4 mmol) with CaLB (9 mg/mL) and vanillylamine (1.21 g, 6.4 mmol) at 37 °C, to obtain rinvanil (**6**, 1.94 g, 70% yield) (Scheme 2). The enzymatic amidation proceeds with high regio- and chemoselective specificity as the amide **6** is the only product observed in the synthesis. In the next step, **6** (0.330 g, 0.76 mmol) is acylated with 2.2 equivalents of phenylacetic acid–DCC–DMAP to produce 12,4'-diphenylacetyl rinvanil (**7**, 0.390 g, 76.5% yield). Finally, the phenolic group of **7** (0.360 g, 0.5 mmol) is deacylated with pyrrolidine and CH₂Cl₂ (186 mL, 2.29 mmol) to produce PhAR (**4**, 0.285 g, 96.28% yield) with a global yield of 51% from **8** (Scheme 2).

In our second approach, the synthesis is now started with the phenylacetylation of **8** (13.5 g, 43 mmol) with phenylacetic acid–DCC–DMAP (11.66 g, 85.7 mmol) to yield methyl 12-phenylacetylricinoleate (**9**, 16.37 g, 88% yield), followed by the enzymatic amidation of **9** (2 g, 4.6 mmol) with vanillylamine (0.190 g, 1 mmol) by CaLB (35 mg/mL) to produce PhAR (**4**, 434 mg, 79% yield) with a global yield of 70% from **8** (Scheme 2). In this simplified

approach, the acid function in the ricinoleic acid is protected as a methyl ester, allowing in a first step a straight and efficient esterification with phenylacetic acid at the 12-hydroxy position; subsequently, the chemoselective lipase-catalyzed amidation of the methylated carboxyl group of **9** is highly favored by the specificity of CaLB and the higher nucleophilicity of primary amino group than that of phenol of vanillylamine. Actually, we have previously demonstrated that the acylation of phenolic group of vanillylamine does not take place at all in this kind of reactions.¹⁴ Finally, it is also important to underline that based on thermodynamic assumptions, the use of a polar solvent such as dry 2-methyl-2-butanol and an excess of diester **9** favors a high yield of amide synthesis.¹⁵ The spare diester was easily recovered during PhAR purification. To the best of our knowledge, this is the first example of a chemo- and regioselective enzymatic aminolysis of hydroxylated fatty acid diesters.

In summary, the chemoenzymatic strategy here described results in a valuable alternative for the synthesis of the ultrapotent capsaicinoid phenylacetylirinvanil (**4**), allowing to envisage a general method for the synthesis of these valuable compounds. Indeed, in contrast to chemical methods, the chemo- and regioselective properties of lipase-catalyzed reactions allowed higher yields of **4**, confirming the high potential of enzymatic processes to impact traditional chemical synthetic routes. In addition, the use of castor oil, a renewable and widely available source of ricinoleoyl moiety, renders this process feasible for large-scale application of PhAR synthesis and its derivatives.

Typical Procedure of the Chemical Aminolysis for the Synthesis of 12-Phenylacetylirinvanil (**4**)¹⁷

To a solution of 12,4'-diphenylacetylirinvanil (**7**, 360 mg, 0.5 mmol) in CH₂Cl₂ (25 mL), pyrrolidine (186 mL, 2.29 mmol, 5 mol equiv) was added. The reaction mixture was stirred at r.t. for 6 h (TLC, hexane–EtOAc, 6:4); 2 N H₂SO₄ (2.29 mL) was added, the organic layer separated, and the aqueous layer (pH = 4–5) extracted (2 × 5 mL) with CH₂Cl₂. The organic extract was washed with H₂O (2 × 5 mL) and brine (5 mL), dried with Na₂SO₄, and concentrated to dryness to yield 550 mg of raw product, purified by column chromatography (70–230 mesh; 9 g silica gel; hexane–EtOAc, 7:3) to yield 285 mg (96.28%) of pure **4**. Due to the recognized ultrapotent activity of this compound in case of skin contact (very irritant), it is highly recommended the use of splash goggles and gloves when handling this material.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 0.86 (t, *J* = 7.2 Hz, 3 H), 1.19–1.32 (m, 16 H), 1.46–1.54 (m, 2 H), 1.63 (q, *J* = 7.2 Hz, 2 H), 1.94 (c, *J* = 6.3 Hz, 2 H), 2.18 (t, *J* = 7.8 Hz, 2 H), 2.23–2.32 (m, 2 H), 3.57 (s, 2 H), 3.84 (s, 3 H), 4.32 (d, *J* = 5.4 Hz, 2 H), 4.86 (q, *J* = 6.6 Hz, 1 H), 5.22–5.31 (m, 1 H), 5.38–5.47 (m, 1 H), 5.83 (br t, *J* = 4.5 Hz, 1 H), 6.73 (dd, *J*₁ = 7.8 Hz, *J*₂ = 2.1 Hz, 1 H), 6.78 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 6.86 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 7.20–7.33 (m, 5 H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 14.0, 22.4, 25.1, 25.6, 27.2, 29.01, 29.04, 29.13, 29.16, 29.4, 31.6, 31.8, 33.4, 36.7, 41.7, 43.4, 55.8, 74.5, 110.6, 114.3, 120.7, 124.0, 126.9, 127.0, 128.4, 128.5, 129.1, 129.2, 130.2, 132.5, 145.0, 146.6, 171.3, 173.0. MS (EI): *m/z* (%) = 551 (30) [M⁺], 415 (41), 277 (13), 152 (64), 137 (100), 91 (22). IR (film): ν_{max} = 3362, 3306, 2928, 2856, 1729, 1646, 1517, 1274,

1034, 721, 700 cm^{-1} . $[\text{a}]_{\text{D}}^{20} +15.2$ (c 1, MeOH); lit.⁵ $[\text{a}]_{\text{D}}^{20} +35.6$ (c 1.1, MeOH).

Typical Procedure of the Enzymatic Aminolysis for the Preparation of 12-Phenylacetylricinivanil (4)

Vanillylamine-HCl (190 mg, 1 mmol) was suspended in dry 2-methyl-2-butanol (20 mL) containing 4 Å MS (500 mg) and Et_3N (840 mL). The mixture was agitated 30 min at 30 °C and 250 rpm. Then, methyl 12-phenylacetylricinoleate (2 g, 4.6 mmol) and CaLB (750 mg) was added, and the mixture was incubated at 30 °C. The reaction was monitored by TLC (hexane–EtOAc, 1:1; ninhydrine as visualizing reagent). Filtration over Celite and vacuum concentration afforded 434 mg of **4** (78.7% yield based on the vanillylamine-HCl) and 1.55 g of pure methyl 12-phenylacetylricinoleate after silica gel chromatography.

$[\text{a}]_{\text{D}}^{20} +15.2$ (c 1, MeOH); Lit.⁵ $[\text{a}]_{\text{D}}^{20} +35.6$ (c 1.1, MeOH). IR (film): 3362, 3306, 2928, 2856, 1729, 1646, 1517, 1274, 1034, 721, 700 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 0.86 (t, 3 H, J = 7.2 Hz), 1.19–1.32 (m, 16 H), 1.46–1.54 (m, 2 H), 1.63 (q, 2 H, J = 7.2 Hz), 1.94 (c, 2 H, J = 6.3 Hz), 2.18 (t, J = 7.8 Hz, 2 H), 2.23–2.32 (m, 2 H), 3.57 (s, 2 H), 3.84 (s, 3 H), 4.32 (d, J = 5.4 Hz, 2 H), 4.86 (q, J = 6.6 Hz, 1 H), 5.22–5.31 (m, 1 H), 5.38–5.47 (m, 1 H), 5.83 (br t, J = 4.5 Hz, 1 H), 6.73 (dd, J_1 = 7.8 Hz, J_2 = 2.1 Hz, 1 H), 6.78 (d, J = 1.8 Hz, 1 H), 6.86 (d, J = 8.1 Hz, 1 H), 7.20–7.33 (m, 5 H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.0, 22.4, 25.1, 25.6, 27.2, 29.01, 29.04, 29.13, 29.16, 29.4, 31.6, 31.8, 33.4, 36.7, 41.7, 43.4, 55.8, 74.5, 110.6, 114.3, 120.7, 124.0, 126.9, 127.0, 128.4, 128.5, 129.1, 129.2, 130.2, 132.5, 145.0, 146.6, 171.3, 173.0. MS (EI): m/z (%) = 551 (30) $[\text{M}^+]$, 415 (41), 277 (13), 152 (64), 137 (100), 91 (22).

Rinvanil (6)

To a suspension of vanillylamine-HCl (1.21 g, 6.4 mmol) in 2-methyl-2-butanol (130 mL), Et_3N (6 mL, 42.7 mmol, 6.67 mol equiv) was added. The mixture was incubated for 30 min at 37 °C and 250 rpm, and reaction started by addition of MS (1.2 g), methyl ricinoleate (2 g, 6.4 mmol), and CaLB (1.2 g). The reaction was monitored by TLC (hexane–EtOAc, 85:15). Thereafter, enzyme and MS were filtered over Celite, a mixture of hexane and EtOAc (1:1, 15 mL) added, and the solid formed was filtered over Celite. The filtrate was concentrated under vacuum yielding 3.1 g of raw product, which after column chromatography (45 g silica gel; 70–230 mesh; hexane–EtOAc, 7:3) afforded 1.94 g of pure **6** (70.2% yield).

$[\text{a}]_{\text{D}}^{20} +2.9$ (c 1, MeOH). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 3 H), 1.25–1.35 (m, 16 H), 1.44–1.49 (m, 2 H), 1.63 (q, J = 6.0 Hz, 2 H), 1.99 (c, J = 6.6 Hz, 2 H), 2.16–2.22 (m, 4 H), 3.56 (q, J = 5.4 Hz, 1 H), 3.85 (s, 3 H), 4.32 (d, J = 5.7 Hz, 2 H), 5.34–5.43 (m, 1 H), 5.49–5.58 (m, 1 H), 5.91 (br t, J = 5.1 Hz, 1 H), 6.72 (dd, J_1 = 7.8 Hz, J_2 = 1.8 Hz, 1 H), 6.79 (d, J = 2.1 Hz, 1 H), 6.83 (d, J = 8.1 Hz, 1 H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.0, 22.5, 25.6, 27.2, 28.9, 29.01, 29.8, 29.1, 29.2, 29.4, 31.7, 35.2, 36.6, 36.7, 43.4, 55.8, 71.4, 110.7, 114.4, 120.6, 125.2, 130.2, 133.1, 145.0, 146.7, 173.0.

12,4'-Diphenylacetylricinivanil (7)

In a three-necked flask rinvanil (**6**, 330 mg, 0.76 mmol) and phenylacetic acid (227 mg, 1.67 mmol, 2.2 mol equiv) were dissolved in CH_2Cl_2 (5 mL). The solution was cooled to 0 °C and then added DCC (312 mg, 1.52 mmol, 2 mol equiv) and DMAP (92 mg, 0.76 mmol). After stirring for 20 min at 0 °C and 2 h at r.t. (TLC; hexane–EtOAc, 1:1), the reaction mixture was filtered over Celite and washed with CH_2Cl_2 . The amount of 550 mg of concentrated raw product yielded 390 mg of **7** (76.5% yield, yellow oil) after column chromatography (hexane–EtOAc, 7:3).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 0.86 (t, J = 7.1 Hz, 3 H), 1.21–1.28 (m, 16 H), 1.50–1.52 (m, 2 H), 1.63 (q, J = 6.2 Hz, 2 H), 1.96 (c, J = 7.4 Hz, 2 H), 2.16 (t, J = 7.7 Hz, 2 H), 2.21–2.35 (m, 2 H),

3.57 (s, 2 H), 3.71 (s, 3 H), 3.87 (s, 2 H), 4.34 (d, J = 5.8 Hz, 2 H), 4.86 (q, J = 6.0 Hz, 1 H), 5.24–5.32 (m, 1 H), 5.40–5.49 (m, 1 H), 5.93 (br t, J = 4.2 Hz, 1 H), 6.76 (dd, J_1 = 7.9 Hz, J_2 = 1.9 Hz, 1 H), 6.84 (d, J = 1.7 Hz, 1 H), 6.91 (d, J = 7.9 Hz, 1 H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.1, 22.6, 25.2, 25.8, 27.3, 29.1, 29.2, 29.3, 29.4, 29.6, 31.7, 32.0, 33.6, 36.7, 41.0, 41.85, 43.4, 55.9, 74.6, 112.2, 120.0, 122.7, 124.2, 127.0, 127.3, 128.5, 128.6, 129.3, 129.4, 132.7, 133.6, 134.4, 137.6, 139.2, 151.2, 169.7, 171.4, 173.1.

Methyl ricinoleate (8)

Castor oil (20 g) was dissolved in MeOH (155 mL) and heated under reflux for 30 min in the presence of solid KOH (58 mg, 0.28%). At the end of the reaction (TLC, hexane–EtOAc, 85:15) AcOH (80 mL) was added, and the mixture was evaporated to dryness under reduced pressure. The residue was redissolved in hexane (30 mL) and washed with H_2O (2×25 mL) and with sat. NaCl solution (1×25 mL). The organic phase was dried with anhyd Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure, hence, 20.3 g of crude product afforded 16.67 g of **8** (85% yield) after column chromatography (400 g silica gel, hexane–EtOAc, 9.5:5 to 9:1 gradient). Purity of **8** (99% pure) was established by HPLC in a Waters HPLC system equipped with a Waters Symmetry C18 4.6×250 mm, 5 mm column (Milford, MA, USA) eluted with 1.5 mL/min of 85:15 MeCN– H_2O and using a refractive index detector at 35 °C; t_{R} = 6.45 min.

$[\text{a}]_{\text{D}}^{20} +7.4$ (c 1, MeOH), +3.33 (c 1.5, CHCl_3); Lit.¹⁶ $[\text{a}]_{\text{D}}^{20} +3.4$ (c 1.5, CHCl_3). IR (film): 3435, 2928, 2856, 1742, 1439, 1173, 859, 725 cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.89 (t, J = 6.8 Hz, 3 H), 1.29–1.33 (m, 16 H), 1.45–1.50 (m, 2 H), 1.62 (q, J = 7.2 Hz, 2 H), 2.04 (c, J = 6.4 Hz, 2 H), 2.21 (t, J = 6.4 Hz, 2 H), 2.30 (t, J = 7.6 Hz, 2 H), 3.61 (q, J = 5.6 Hz, 1 H), 3.67 (s, 3 H), 5.37–5.44 (m, 1 H), 5.52–5.59 (m, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 14.365, 22.873, 25.149, 25.969, 27.609, 29.316, 39.362, 29.605, 29.810, 32.079, 34.295, 35.570, 37.058, 51.675, 71.644, 125.341, 133.379, 174.371.

Methyl 12-Phenylacetylricinoleate (9)

In a three-necked round-bottom flask **8** (13.5 g, 43 mmol) and phenylacetic acid (11.66 g, 85.7 mmol) were suspended in CH_2Cl_2 (150 mL). The reaction mixture was cooled to 0 °C in an ice bath and DCC (17.6 g, 85.6 mmol) was added. Stirring was continued for 10 min, DMAP (6.3 g, 30 mmol) was added and stirred for an additional 15 min at 0 °C. Thereafter, stirring was continued for 1 h at r.t. The reaction mixture was then refluxed until the reaction was complete (TLC, hexane–EtOAc, 85:15), filtered over Celite and concentrated in a rotatory evaporator. The residue was suspended in hexane–EtOAc (9:1, 50 mL), vacuum filtered over Celite, and washed with hexane–EtOAc (9:1, 100 mL); it was then dried over anhyd Na_2SO_4 and concentrated in rotatory evaporator (24.68 g of a crude product). After column chromatography 16.37 g of **9** were obtained (88.5% yield).

$[\text{a}]_{\text{D}}^{20} +29.6$ (c 1, MeOH). IR (film): 2929, 2856, 1737, 1459, 1437, 1253, 1164, 1023, 722, 700 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 0.86 (t, J = 6.0 Hz, 3 H), 1.21–1.29 (m, 16 H), 1.50–1.54 (m, 2 H), 1.61 (q, J = 7.2 Hz, 2 H), 1.95 (c, J = 6.6 Hz, 2 H), 2.21–2.32 (m, 4 H), 3.58 (s, 2 H), 3.65 (s, 3 H), 4.87 (q, J = 6.6 Hz, 1 H), 5.22–5.32 (m, 1 H), 5.39–5.48 (m, 1 H), 7.21–7.33 (m, 5 H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.0, 22.4, 25.1, 27.2, 29.0, 29.1, 29.4, 31.6, 31.8, 33.5, 34.0, 41.7, 51.3, 74.4, 124.1, 126.8, 128.4, 129.1, 132.5, 134.3, 171.2, 174.2. HRMS–FAB⁺: m/z calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 431.3161; found: 431.3151.

Acknowledgment

The authors acknowledge DGAPA-UNAM for Ignacio Regla sabatinal fellowship at IBT-UNAM and for grant PAPIIT-IN226706-3. Authors are also grateful to Ma de los Angeles Peña, Javier Pérez-

Flores J., and Rocío Patiño-Maya from Instituto de Química, UNAM for spectroscopic analysis, to Fernando González and Miguel Angel Xolocotzi for analytical support, and to Novozymes-México for the generous gift of CaLB.

References and Notes

- (1) Caterina, M. J.; Schumacher, M. A.; Tominaga, M.; Rosen, T. A.; Levine, J. D.; Julius, D. *Nature (London)* **1997**, *389*, 816.
- (2) (a) Walker, K. M.; Urban, L.; Medhurst, S. J.; Patel, S.; Panesar, M.; Fox, A. J.; McIntyre, P. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* **2003**, *304*, 56. (b) Voets, T.; Droogmans, G.; Wissenbach, U.; Janssens, A.; Flockerzi, V.; Nilius, B. *Nature (London)* **2004**, *430*, 748.
- (3) Yiangou, Y.; Facer, P.; Dyer, N. H. C.; Chan, C. L. H.; Knowles, C.; Williams, N. S.; Anand, P. *Lancet* **2001**, *357*, 1338.
- (4) Winter, J.; Bevan, S.; Campbell, E. A. *Br. J. Anaesth.* **1995**, *75*, 157.
- (5) (a) Appendino, G.; De Petrocellis, L.; Trevisani, M.; Minassi, A.; Daddario, N.; Moriello, A. S.; Gazzieri, D.; Ligresti, A.; Campi, B.; Fontana, G.; Pinna, C.; Geppetti, P.; Di Marzo, V. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *312*, 561. (b) Appendino, G.; Cascio, M. G.; Bacchiega, S.; Moriello, A. S.; Minassi, A.; Thomas, A.; Ross, R.; Pertwee, R.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 568.
- (6) Iida, T.; Moriyama, T.; Kobata, K.; Morita, A.; Murayama, N.; Hashizume, S.; Fushiki, T.; Yazawa, S.; Watanabe, T.; Tominaga, M. *Neuropharmacology* **2003**, *44*, 958.
- (7) Brand, L.; Berman, E.; Schwen, R.; Loomans, M.; Janusz, J.; Bohne, R.; Maddin, C.; Gardne, J.; Lahann, T.; Farmer, R.; Jones, L.; Chiabrando, C.; Fannelli, R. *Drug Exp. Clin. Res.* **1987**, *13*, 259.
- (8) Voets, T.; Droogmans, G.; Wissenbach, U.; Janssens, A.; Flockerzi, V.; Nilius, B. *Nature (London)* **2004**, *430*, 748.
- (9) Andersson, K. E. *Urology* **2004**, *63*, 32.
- (10) Morazzoni, P.; Riva, A.; Fontana, G.; Appendino, G.; Di Marzo, V. WO 2006010445, **2006**.
- (11) Dorado, M. P.; Ballesteros, E.; Mittelbach, M.; López, F. J. *Energy Fuels* **2004**, *18*, 1457.
- (12) Appendino, G.; Minassi, A. N. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3739.
- (13) Walpole, C. S.; Wrigglesworth, R.; Bevan, S.; Campbell, E. A.; Dray, A.; James, I. F.; Masdin, K. J.; Perkins, M. N.; Winter, J. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2381.
- (14) Reyes-Duarte, D.; Castillo, E.; Martínez, R.; López-Munguía, A. *Biotechnol. Lett.* **2002**, *24*, 2057.
- (15) (a) Castillo, E.; López-González, I.; de Regil-Hernández, R.; Reyes-Duarte, D.; Sánchez-Herrera, D.; López-Munguía, A.; Darszon, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *356*, 424. (b) Torres-Gavilán, A.; Escalante, J.; Regla, I.; López-Munguía, A.; Castillo, E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *2621*.
- (16) Borsotti, G.; Guglielmetti, G.; Speras, S.; Battistel, E. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 10219.
- (17) ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy was carried out on a JEOL Eclipse instrument at 300 and 400 MHz (^1H NMR operating frequency), with TMS as an internal standard and CDCl_3 as solvent. The IR spectra were carried out on a Bruker spectrophotometer Tensor 27. The $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ values were determined on a 341 Perkin Elmer polarimeter, at 1 dm cell length. HRMS was determined on a JEOL JMS-SX102A instrument. Silica gel chromatography: 70–230 mesh. Multiplicity keys: s = singlet, d = doublet, t = triplet, c = quartet, q = quintet, m = multiplet, br = broad, dd = doublet of doublets.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl



Chemoenzymatic synthesis and cannabinoid activity of a new diazabicyclic amide of phenylacetylrincinoic acid

Manuel López-Ortíz^a, Andrea Herrera-Solís^b, Axel Luviano-Jardón^a, Nidia Reyes-Prieto^b, Ivan Castillo^c, Ivan Monsalvo^a, Patricia Demare^a, Mónica Méndez-Díaz^b, Ignacio Regla^{a,c,*}, Oscar Prospéro-García^{b,*}

^aFacultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Batalla del 5 de Mayo y Fuerte de Loreto, Iztapalapa 09230, Mexico, D.F., Mexico

^bLaboratorio de Canabinoides, Grupo de Neurociencias, Facultad de Medicina, UNAM, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico, D.F., Mexico

^cInstituto de Química, UNAM, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 March 2010

Revised 14 April 2010

Accepted 16 April 2010

Available online 21 April 2010

Keywords:

Cannabinoids

Core temperature

Pain regulation

Sleep-waking cycle

ABSTRACT

Endocannabinoids (eCBs) are endogenous neuromodulators of synaptic transmission. Their dysfunction may cause debilitating disorders of diverse clinical manifestation. For example, drug addiction, lack of sex desire, eating disorders, such as anorexia or bulimia and dyssomnias. eCBs also participate in the regulation of core temperature and pain perception. In this context, it is important to recognize the utility of cannabinoid receptor 1 (CB1R) agonists, natural as Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) or synthetic as Nabilone as useful drugs to alleviate this kind of patients' suffering. Therefore, we have developed a new drug, (*R,Z*)-18-((1*S*,4*S*)-5-methyl-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan-2-yl)-18-oxooctadec-9-en-7-yl phenylacetate (PhAR-DBH-Me), that appears to bind and activate the CB1R. This diazabicyclic amide was synthesized from phenylacetylrincinoic acid and (1*S*,4*S*)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane. To test its cannabinergic properties we evaluated its effects on core temperature, pain perception, and the sleep-waking cycle of rats. Results indicate that 20 and 40 mg/kg of PhAR-DBH-Me readily reduced core temperature and increased pain perception threshold. In addition, 20 mg/kg increased REM sleep in otherwise normal rats. All these effects were prevented or attenuated by AM251, a CB1R antagonist. Place preference conditioning studies indicated that this molecule does not produce rewarding effects. These results strongly support that PhAR-DBH-Me possesses cannabinoid activity without the reinforcement effects.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Endocannabinoids (eCBs) are molecules synthesized by neurons of all mammals and insects known.¹ eCBs modulate the synaptic transmission participating in the generation of several types of behavior.² Therefore, their dysfunction may cause debilitating disorders of diverse clinical manifestation. For example, drug addiction,³ lack of sex desire and eating disorders,⁴ such as anorexia or bulimia⁵ and dyssomnias.⁶ Additionally, the activation of the cannabinoid receptor 1 (CB1R) modulates pain perception and core temperature.⁷ Mounting evidence indicates that in schizophrenia eCBs may be dysfunctional.⁸

Marijuana derivatives, such as Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC, Fig. 1) commercially available as Dronabinol[®] or THC plus cannabidiol (Sativex[®]) and several synthetic compounds as Nabilone (Cesamet[®]), among others, produce several therapeutic effects.^{9,10}

For example, they are appetite stimulants in patients suffering from wearing-off caused by acquired immunodeficiency syndrome

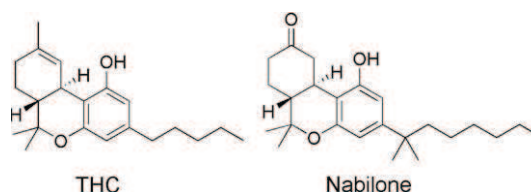
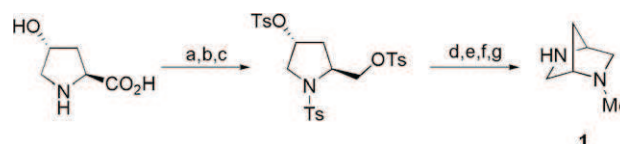


Figure 1. Chemical structures of THC and Nabilone.



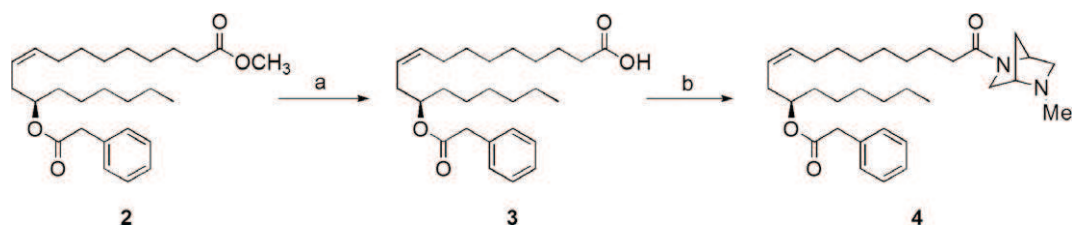
Scheme 1. Chemical synthesis of (1*S*,4*S*)-2-methyl-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane (1) from *trans*-4-hydroxy-(*S*)-proline. Reagents and conditions: (a) TsCl, Na₂CO₃, H₂O, 94%; (b) NaBH₄, BF₃·Et₂O, THF, 85%; (c) TsCl, C₅H₅N, toluene, 20 h, 83%; (d) PhCH₂NH₂, toluene, reflux, 96%; (e) HBr 40%, 96%; (f) HCO₂H, HCOH, MeOH, reflux, 73%; (g) H₂, Pd/C, MeOH 80%.

* Corresponding authors. Tel.: +52 55 5623 0795 (I.R.); +52 55 5623 2509 (O.P.-G.).

E-mail addresses: regla@unam.mx (I. Regla), opg@unam.mx (O. Prospéro-García).

or chemotherapy. Cannabinoids can also be used as antiemetic drugs in patients under chemotherapy.¹¹ Pain is another indication for this class of compounds.^{9,12} There is information indicating its successful use to control glaucoma.¹³ Likewise, there is mounting experimental evidence indicating that cannabinoids may be useful to control epilepsy,¹⁴ anxiety,¹⁵ and insomnia.⁶ Despite these

advances, the toxic or lethal effects caused by cannabinoids have not been discussed thus far.¹⁶ In addition, blocking of the CB1R receptor by drugs such as SR141716a, may induce side effects that compromise patients' health or life, as has been suggested by the experience gained with the use of SR141716a for food intake control in obese patients.¹⁷ Therefore, it is important to recognize the



Scheme 2. Chemoenzymatic synthesis of compound 4. Reagents and conditions: (a) Novozym 435, water/acetone 6:4, phosphate buffer 100 mM pH 7.5, 37 °C, 1 h, quantitative yield; (b) (1) PvCl, CH₂Cl₂; (2) diamine 1, 80%.

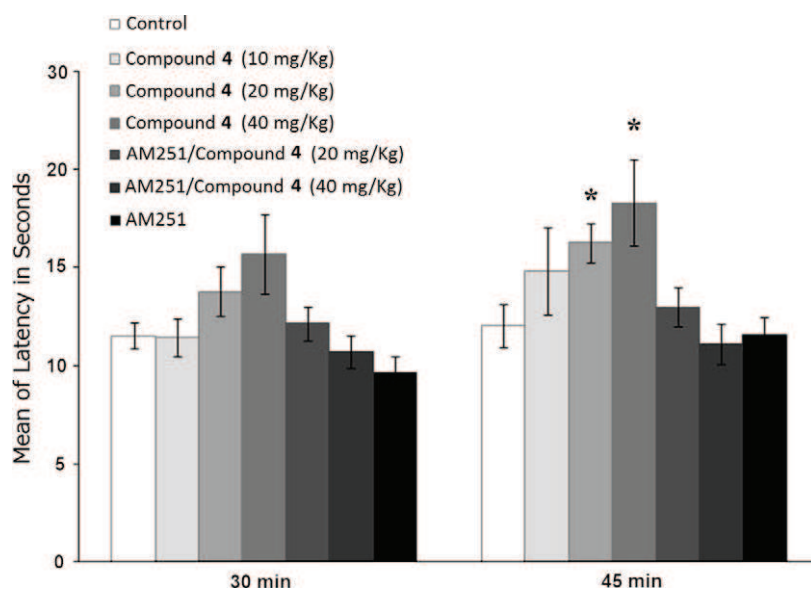


Figure 2. This figure depicts the effect of compound 4 at three doses on pain perception as evaluated with the hot-plate paradigm. Such an effect has been blocked by AM251. $p < 0.05$, compared to control.

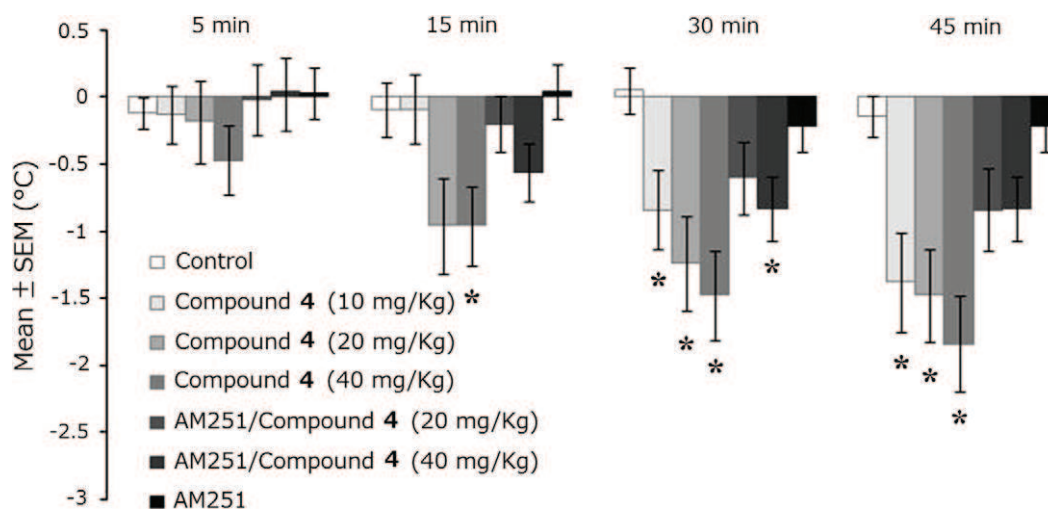


Figure 3. This figure illustrates the effect of three doses of compound 4 on the core temperature. There is a reduction of about 1 °C in 15 min after the ip injection. This effect remains for 30 more minutes, and is hampered by AM251. $p < 0.05$ compared to control.

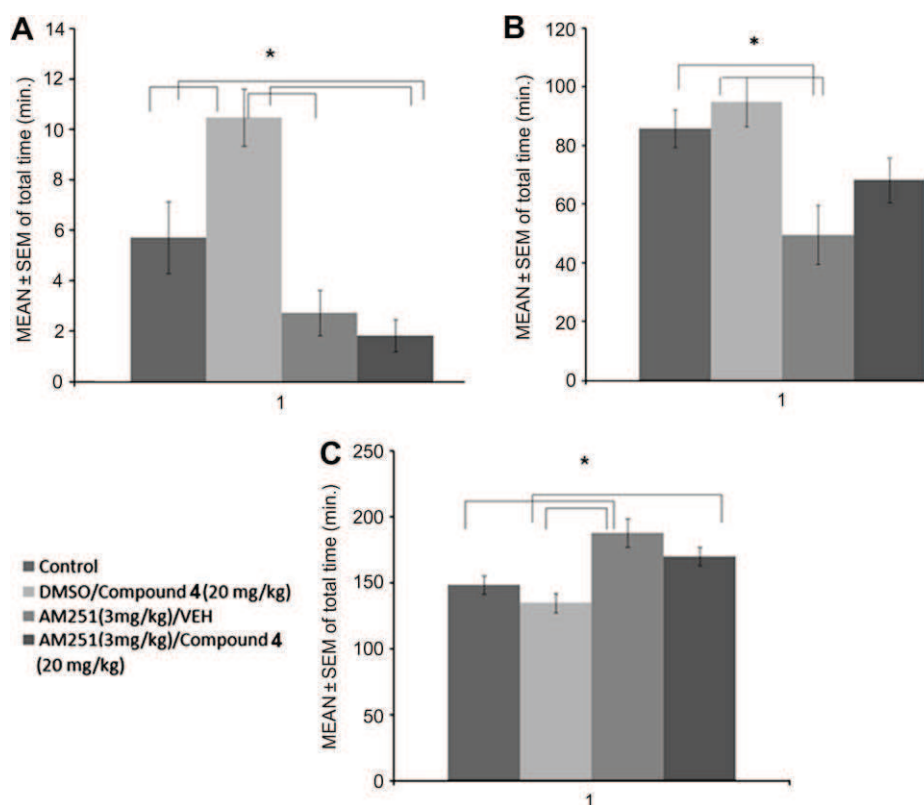


Figure 4. These graphs illustrate the effect of compound **4** on the sleep-waking cycle of rats during 4 h. In A the effect on REM sleep is depicted. Likewise for NonREM sleep in B and for waking in C. Observe the important REM sleep inducing effect caused by compound **6** compared to control. This effect is blocked with AM251, a selective CB1 antagonist. $p < 0.05$.

therapeutic potential of cannabinoids and develop new drugs with reduced side effects, and with potential clinical applications in the treatment of several diseases.

We have recently synthesized a new diazabicyclic amide derivative of phenylacetylricinoleic acid (*R,Z*)-18-((1*S,4S*)-5-methyl-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan-2-yl)-18-oxooctadec-9-en-7-yl phenylacetate (PhAR-DBH-Me, **4**), and tested its effects on some physiological variables, revealing that it possesses cannabinoid activity and that such an effect is mediated by the CB1R. This new compound **4** has been prepared starting from *trans*-4-hydroxy-(*S*)-proline and castor oil, both compounds acting as natural sources of chirality. In the first step, (1*S,4S*)-2-methyl-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane (**1**) was synthesized according to the procedure recently described by Regla, Juaristi and co-workers (Scheme 1).¹⁸

The synthetic strategy for the preparation of **4** is outlined in Scheme 2. The preparation of methyl 12-phenylacetylricinoleate (**2**) took place with the recently reported conditions.¹⁹ A key step in the synthetic methodology was the development of a new strategy for the regioselective chemoenzymatic hydrolysis of **4** to obtain 12-phenylacetylricinoleic acid (**3**), a described precursor for the synthesis of 12-acyl substituted ricinoleylamides.^{20,21} Compound **4** was obtained in 70% yield by the mixed anhydride method. Thus, treatment of **3** with pivaloyl chloride in a mixture of Et₃N and dichloromethane at 0 °C for 15 minutes to produce the corresponding mixed anhydride was followed by reaction with diamine **1**.²²

Our physiological and behavioral²² results indicate that three doses of PhAR-DBH-Me (**4**) reduced core temperature by about 1.5–2.0 °C; such doses also increased rats' latency to exhibit signs of discomfort in the hot-plate test. Moreover, AM251 successfully blocked these effects; however, AM251 did not cause any effect by itself at the dose levels tested. These results suggest that PhAR-DBH-Me (**4**) is a CB1R agonist (see Figs. 2 and 3).

Regarding the sleep-waking cycle, results indicate that 20 mg/kg of **4** increased REM (rapid eye movement) sleep total time during 4 h, with a simultaneous tendency to increase NREMS total time. A tendency to reduce waking-up was also documented. These changes in REM sleep were blocked by AM251 (see Fig. 4). These PhAR-DBH-Me-induced changes have been observed with agonists and antagonists of the CB1R receptor.

Finally, PhAR-DBH-Me (**4**) was tested at the dose of 20 mg/kg to evaluate its capacity to induce addiction. A conditioned place preference paradigm was utilized to determine if **4** is capable of inducing signs of dependence. Data indicated that **4** failed to induce signs of dependence (see Fig. 5).

In conclusion, PhAR-DBH-Me (**4**) is able to induce effects similar to those observed with well-known cannabinoids. Moreover, such effects are prevented by the administration of the CB1R antagonist

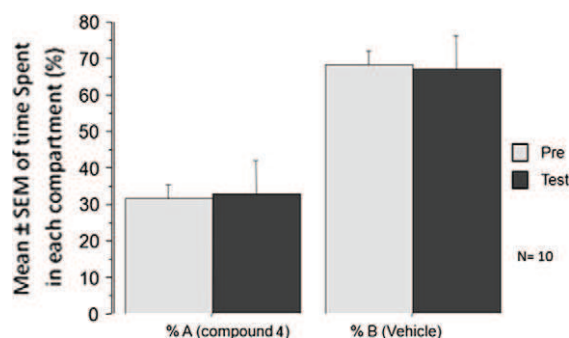


Figure 5. This figure illustrates the absence of rewarding effect of compound **4**. As it can be seen, compound **4** does not modify the time spent in the compartment A (associated to the administration of this drug).

AM251. Further experiments will clarify if this drug induces adverse side effects.

Acknowledgements

This work was partially supported by Grant 24768 from CONA-CyT and DGAPA UNAM PAPIIT IN211509. I.R. thanks the Instituto de Química for the fellowship 'Cátedra Especial Jesús Romo Armoría', granted by the Instituto de Química-UNAM. Authors are also grateful to Q. Ma de los Angeles Peña, Q. Elizabeth Huerta, and QFB. Rocío Patiño-Maya from Instituto de Química, UNAM for spectroscopic analysis, and to Novozymes-México for the generous gift of CalB.

References and notes

- McParland, J. M.; Norriss, R. W.; Kilpatrick, C. W. *Gene* **2007**, *397*, 126.
- Heifets, B. D.; Castillo, P. E. *Annu. Rev. Physiol.* **2009**, *71*, 283.
- Onaivi, E. S. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2008**, *1139*, 412.
- Martínez-González, D.; Bonilla-Jaime, H.; Morales-Otal, A.; Henriksen, S. J.; Velázquez-Moctezuma, J.; Prospéro-García, O. *Neurosci. Lett.* **2004**, *364*, 1.
- Monteleone, P.; Bifulco, M.; Di Filippo, C.; Gazerro, P.; Canestrelli, B.; Monteleone, F.; Proto, M. C.; Di Genio, M.; Grimaldi, C.; Maj, M. *Genes Brain Behav.* **2009**, *8*, 728.
- Prospéro-García, O.; Herrera-Solis, A.; Prospéro-García, A.; Di Marzo, V. In *Sleep Disorders: Diagnosis and Therapeutics*; Pandi-Perumal, S. R., Verster, J. C., Monti, J. M., Lader, M., Langer, S. Z., Eds.; Informa Healthcare: United Kingdom, 2008; pp 259–267.
- . *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2009**, *8*, 403.
- Fernández-Espejo, E.; Viveros, M. P.; Núñez, L.; Ellenbroek, B. A.; Rodríguez de Fonseca, F. *Psychopharmacology* **2009**, *206*, 531.
- Pertwee, R. G. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *156*, 397.
- Ware, M. A.; Fitzcharlles, M. A.; Joseph, L.; Shir, Y. *Anesth. Analg.* **2010**, *110*, 604.
- Machado-Rocha, F. C.; Stéfano, S. C.; De Cássia-Haiek, R.; Rosa-Oliveira, L. M.; Da Silveira, D. X. *Eur. J. Cancer Care* **2008**, *17*, 431.
- Rahn, E. J.; Hohman, A. G. *Neurotherapeutics* **2009**, *6*, 713.
- Nucci, C.; Bari, M.; Spanò, A.; Corasaniti, M.; Bagetta, G.; Maccarrone, M.; Morrone, L. A. *Prog. Brain Res.* **2008**, *173*, 451.
- Smith, P. F. *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2005**, *6*, 680.
- Chhatwal, J. P.; Ressler, K. J. *CNS Spectr.* **2007**, *12*, 211.
- Beaulieu, P. *Pain Res. Manag.* **2005**, *10*, 23A.
- Christensen, R.; Kristensen, P. K.; Bartels, E. M.; Bliddal, H.; Astrup, A. *Lancet* **2007**, *370*, 1706.
- Melgar, R.; González, R.; Olivares, J. L.; González, V.; Romero, L.; Ramírez, M.; Demare, P.; Regla, I.; Juaristi, E. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 655.
- Castillo, E.; Regla, I.; Demare, P.; Luviano-Jardón, A.; López-Munguía, A. *Synlett* **2008**, 2869.
- Appendino, G.; Cascio, M. G.; Bacchiega, S.; Moriello, A. S.; Minassi, A.; Thomas, A.; Ross, R.; Pertwee, R.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 568.
- Appendino, G.; De Petrocellis, L.; Trevisani, M.; Minassi, A.; Daddario, N.; Moriello, A. S.; Gazzieri, D.; Ligresti, A.; Campi, B.; Fontana, G.; Pinna, C.; Geppetti, P.; Di Marzo, V. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *312*, 561.
- General*: ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy was carried out on a JEOL Eclipse instrument at 200 and 300 MHz, with TMS as an internal standard and CDCl_3 as solvent. The IR spectra were carried out on a Bruker spectrophotometer Tensor 27. The $[\alpha]_D^{20}$ values were determined on a 341 Perkin-Elmer polarimeter, at 1 dm cell length. HRMS was determined on a JEOL JMS-SX102A instrument. Silica gel chromatography: 70–230 mesh. Multiplicity keys: s = singlet, d = doublet, t = triplet, c = quartet, q = quintet, m = multiplet, br = broad, dd = doublet of doublets. *Typical procedure for the enzymatic hydrolysis for the preparation of phenylacetylinoleic acid (3)*. To a solution of methyl 12-phenylacetylinoleate (7 g, 16.25 mmol) in acetone (360 mL), were added water (120 mL), phosphate buffer 100 mM pH 7.5 (240 mL) and Novozym 435 (3.6 g (10 mg/mL). The reaction mixture was incubated for 1 h at 37 °C and 250 rpm, monitoring the reaction by TLC (hexane/EtOAc 9:1). The mixture was filtered through Celite and concentrated under reduced pressure in order to remove acetone. The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 × 50 mL), the organic layer was dried with anhydrous Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure to yield 6.7 g of pure **3** as a colorless oil in 99% yield. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 0.86 (t, J = 6.2, 3H), 1.2–1.35 (m, 16H), 1.49 (m, 2H), 1.59–1.66 (m, 2H), 1.96–1.99 (m, 2H), 2.24–2.27 (m, 2H), 2.34 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 3.59 (s, 2H), 4.87 (q, J = 6.2 Hz, 1H), 5.21–5.33 (m, 1H), 5.37–5.50 (m, 1H), 7.23–7.32 (m, 6H), 9.44 (br s, 1H). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ = 14.0, 22.4, 24.6, 25.1, 27.2, 28.9, 29.0, 29.1, 29.4, 31.6, 31.8, 33.5, 33.9, 41.7, 74.4, 124.1, 126.9, 128.4, 129.1, 132.5, 134.2, 171.3, 179.9. (R,Z)-18-((1S,4S)-5-methyl-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan-2-yl)-18-oxooctadec-9-en-7-yl phenylacetate (**4**, PhAR-DBH-Me): In a three-necked round-bottom flask, 2 g, (4.8 mmol) of **3** and 667 μL (4.8 mmol) of Et_3N were dissolved in CH_2Cl_2 (25 mL). The reaction mixture was cooled to 0 °C in an ice bath and pivaloyl chloride (591 μL , 4.8 mmol) was added and stirred at the same temperature for 15 min. Afterwards, (1S,4S)-2-methyl-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane (537 mg, 4.8 mmol) was added and stirring continued for 15 min at 0 °C. The organic layer was washed with water (3 × 10 mL), dried with anhydrous Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure to obtain a liquid, which after chromatographic purification ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) afforded 1.76 g (74%) of PhAR-DBH-Me (**4**) as a colorless oil. ^1H NMR (300 MHz, $\text{C}_2\text{D}_2\text{Cl}_4$) –130 °C: δ = 0.90 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.28–1.35 (m, 16 H), 1.58–1.66 (m, 4 H), 1.77 (d, J = 10.5, 1H), 2.02 (c, J = 6.9, 2H), 2.11–2.24 (m, 2H), 2.19 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 2.57 (s, 3H), 2.91–3.03 (m, 2H), 3.31 (d, J = 10.8 Hz, 2H), 3.58 (s, 2H), 3.71 (br s, 2H), 3.82 (d, J = 12, 2H), 4.88 (q, J = 6.6 Hz, 1H), 5.31–5.34 (m, 1H), 5.44–5.48 (m, 1H), 7.26–7.29 (m, 5H). $[\alpha]_D^{20}$ = –4.2 (c 1, MeOH). IR ν_{max} (film) cm^{-1} : 3441, 3062, 2928, 2855, 1731, 1644, 1430, 1255, 1161, 1028, 763, 723. MS (EI) m/z (%) = 511 (100) [M^+], 375 (64), 113 (18), 82 (55), 68 (9). HRMS-FAB $^+$: m/z calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 511.3900; found: 511.3888. *Experimental methods for the physiological and behavioral evaluations*: *Subjects*: Adult Wistar rats, weighting 250–350 g were used in this study. All animals were housed individually in Plexiglas cages. They were maintained at an ambient temperature of 22 ± 1 °C and a controlled 12:12 h light–dark cycle (08:00 am–08:00 pm; lights off at 08:00 am) throughout the study. Food and water were available ad libitum. Animals were treated according to the Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-199), the Guide for Care and Use of Laboratory Animals established by the National Institutes of Health, and the European Community Council Directive 86/609/EEC. Additionally, our protocol was approved by the Research and Ethics Committee of the Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Every effort was made to minimize the number of animals used and their potential suffering. *Effects on core temperature and pain perception*: Seventy rats were used in this part of the study. They were randomly assigned to seven groups to determine a PhAR-DBH-Me (**4**) dose–response curve (0, 10, 20 and 40 mg/kg ip). Two additional groups ($n = 10$, each group) received 20 or 40 mg/kg of PhAR-DBH-Me (**4**) 15 min after the administration of AM251 (3 mg/kg, ip), a selective CB1 receptor (CB1R) antagonist to block the effect. One last group was included to test the effect of the AM251 alone. Core temperature was measured by using a rectal probe and pain perception by using the hot plate method. *Sleep-waking cycle recordings*: (a) *Surgery*: Rats ($n = 6$ per group) were stereotaxically implanted under anesthesia (cocktail: 66 mg/kg ketamine, 0.26 mg/kg xylazine, and 1.3 mg/kg acepromazine) with two electrodes inserted into the hippocampus ($P = 4.0$, $L = 2.5$, $V = 2.5$) according to the Paxinos and Watson atlas²³ for electroencephalographic (EEG) recordings. Two additional screw electrodes were implanted into the frontal bones for grounding the animal. Two twisted wire electrodes were placed into the neck musculature for electromyographic (EMG) recordings. (b) *Sleep recordings*: After surgery, animals were monitored and provided with the proper veterinary aid to speed their recovery up. They were allowed to recover for 10 days. Upon the completion of this period, rats were habituated to the recording conditions for 24 h. Once the habituation period was completed, rats were divided into different experimental groups. Vehicle group (control) was administered with two ip injections. First injection was DMSO (1 ml/kg), the vehicle for AM251 and 15 min later vegetal oil (1 ml/kg), the vehicle for PhAR-DBH-Me (**4**). PhAR-DBH-Me group was injected with DMSO and 15 min later with PhAR-DBH-Me (**4**). Group AM251, was injected with this drug and 15 min later injected with vegetal oil. Finally, the AM251 + PhAR-DBH-Me group, was injected with these two drugs 15 min apart and in this sequence. All injections were performed at the beginning of the dark phase of the light–dark cycle. Immediately after the second administration, the sleep-waking cycle was recorded for 12 h. The EEG and EMG signals were amplified with a Grass Model 7 polygraph, Amplifier Model 7P511, in a frequency range of 1–30 Hz, and 30–100 Hz, respectively. Signals were acquired and analyzed with the ICELUS[®] software. *Data analysis*: Polygraphic recordings were analyzed every 12 s and classified according to the following vigilance stages: wakefulness (W), slow wave sleep (SWS), and rapid eye movement sleep (REMS). Electrophysiological criteria were used to define these stages of vigilance as follows: W was characterized by the EEG expressing mixed low fast voltage and theta activity, as well as high muscle activity. In SWS, the EEG showed delta waves and decreased EMG amplitude. Finally, in REMS the EEG expressed theta activity without EMG activity (postural atonia). The time spent in W, SWS, and REMS per hour was calculated during 12 h period. SWS and REM sleep latency was also calculated by measuring the time elapsed from the start of the sleep recording to the first SWS bout. REMS latency was considered from the first SWS bout to the first REMS bout. Frequency and average duration of REMS bouts were also calculated. *Statistics*: Results of REMS, SWS, and W were compared by a mixed analysis of variance (ANOVA) with a Greenhouse-Geisser correction, and subsidiary ANOVAs to detect changes per hour with an LSD post hoc test used only for specific comparison when indicated by mixed ANOVA. Sleep latencies and average duration of REMS episodes were analyzed with one way ANOVA and post hoc LSD. Finally, frequency of REMS was analyzed with Kruskal–Wallis test with post hoc U-Mann-Whitney and Bonferroni correction.
- Paxinos, G.; Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Second ed.; Academic Press: San Diego, 1986.

Resumen enviado

Congreso Internacional de Farmacología México 2011

“Bases Farmacológicas de la Terapéutica”

Reunión conjunta del XXXIV Congreso Nacional de Farmacología y el 54th Annual Meeting of the Western Pharmacology Society.

Del 16 al 20 de mayo de 2011, Palacio de la Antigua Escuela de Medicina, Centro Histórico, México DF.

Synthesis, antineoplastic activity and structure-activity relationships of novel 5*N*-substituted diazabicyclic amides of phenylacetylricinoleic acid

Axel Luviano,¹ Itzen Aguiñiga,¹ Reynaldo Tiburcio,¹ Patricia Demare,¹ Manuel López,¹ Ivan Monsalvo,¹ Edelmiro Santiago^{1*} and Ignacio Regla^{1*}

¹ *Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Batalla del 5 de mayo y Fuerte de Loreto, Ejercito de Oriente, Iztapalapa, México DF, 09230. *edelmiro@servidor.unam.mx, regla@unam.mx*

Cancer is a major problem of public health. In the search for new antitumoral drugs, a series of three new diazabicyclic amides derived from phenylacetylricinoleic acid were synthesized from castor oil and *trans*-4-hydroxy-(*S*)-proline using a chemoenzymatic method. These compounds were provisionally named PhAR-DBH-Me, PhAR-DBH-Bn and PhAR-DBH-EtOH. The antineoplastic properties of these compounds were evaluated in mouse leukemic cell lines P388, J774, WEHI-3, human leukemic cell line K562 and mouse normal bone marrow cells. The synthetic procedure involved base-catalyzed methanolysis of castor oil to afford methyl ricinoleate, phenylacetylation and regioselective enzymatic hydrolysis of the methyl ester to yield phenylacetylricinoleic acid (1,2). (1*S*,4*S*)-2-methyl-, (1*S*,4*S*)-2-hydroxyethyl- and (1*S*,4*S*)-2-benzyl-2,5-diazabicyclo[2.2.1] heptanes were synthesized according to the literature (3). Finally, diazabicyclic amides PhAR-DBH-Me, PhAR-DBH-EtOH and PhAR-DBH-Bn were synthesized by reaction of phenylacetylricinoleic acid with (1*S*,4*S*)-2-alkyl-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptanes by the mixed anhydride method. The sulforhodamine B assay for cytotoxicity screening showed significantly high cytotoxic effects of PhAR-DBH-Me and PhAR-DBH-EtOH on leukemic cells and low toxicity toward mouse bone marrow cells. This remarkably selective cytotoxic effect highlights the antineoplastic potential of both new compounds. General aspects of structure-activity relationships are discussed. (1) Castillo E, et al. *Synlett* **2008**, 2869-2873. (2) López-Ortiz M, et al. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, 20, 3231-3234. (3) Regla I, et al. *Eur J Org Chem* **2008**, 655-672. This work was supported by projects CONACYT - 101855 and PAPIIT - IN225610 .

México D.F. a 3 de marzo de 2011

Estimados: Luviano A, Aguiñiga I, Tiburcio R, Demare P, López M, Monsalvo I, Santiago E, Regla I

A nombre del Comité Organizador del Congreso Internacional de Farmacología México 2011, le informamos que su trabajo titulado: Synthesis, antineoplastic activity and structure-activity relationships of novel 5N-sustituted diazabicyclic amides of phenylacetylricinoleic acid

Ha sido aceptado para presentación como cartel y está inscrito en el concurso de carteles.

Los carteles **en inglés** con formato vertical de 90 cm de ancho por 120 cm de alto se podrán colocar desde el martes 17 de Mayo a las 07:30 h am.

La evaluación de los carteles se realizará los días martes 17, miércoles 18 y jueves 19 de Mayo, de las 18:30 a 20:00 horas, por lo que Usted como autor inscrito en el concurso deberá estar presente. En el portal de AMEFAR (www.amefar.org.mx) se colocará el programa para que Usted ubique el número de cartel que le será asignado.

Le recordamos también que los tres finalistas de cada categoría del concurso tendrán una **presentación oral de 10 minutos en inglés** el día viernes 20 de mayo de las 16:20 a las 18:35 horas. No habrá preguntas. Con éstas presentaciones se decidirá sobre el primero, segundo y tercer lugares.

El dictamen del jurado calificador será inapelable.

Agradecemos su entusiasta participación y esperamos su llegada.

Atentamente

Dra. María Dolores Ramírez González
Presidenta de AMEFAR

Dr. Laurence L. Brunton
Presidente de WPS





FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE SOCIEDADES CIENTÍFICAS
INTERNATIONAL FEDERATION OF SCIENTIFIC SOCIETIES
FÉDÉRATION INTERNATIONALE DE SOCIÉTÉS SCIENTIFIQUES

(Fondée a Paris le 18 Février 1947 et déclarée sous le n° 10.022)

Fundado en Caracas el Bureau Centralizador Mundial bajo el N° 1.046, el 17 de agosto de 1988

COMITÉ ORGANIZADOR DEL 6° CONGRESO MUNDIAL DE JUVENTUDES CIENTÍFICAS

“Unir la Ciencia al Humanismo constituye cada vez más uno de los factores principales de Tolerancia, Verdad y Paz que América y el mundo necesitan: FISS, Central Científica.”

No. Of.: FFMX6CM-025

México, D.F., 17 de septiembre de 2009.

Axel Luviano Jardón
PRESENTE

Referencia: Confirmación para participar en el 6° Congreso Mundial de Juventudes Científicas.

Estimado Axel Luviano:

Haciéndole llegar un entrañable saludo en nombre del Comité Científico del 6° Congreso Mundial de Juventudes Científicas, nos dirigimos a usted con el fin de detallarle los datos concernientes a su intervención en este evento.

Fecha y hora: Jueves 15 de octubre, 15:00 a 17:00 hrs.

Lugar: Auditorio *Fernando Ocaranza*

Simposio: *AVANCES EN EL DESARROLLO DE FÁRMACOS PARA EL TRATAMIENTO DE NEOPLASIAS MALIGNAS*

Área Temática: Ciencia, tecnología, ambiente y sociedad

El espacio que ocupará cuenta con PC y cañón, le pedimos que su presentación la traiga en CD, o bien, memoria USB. En caso que usted tenga algún requerimiento en particular, le instamos a que nos lo haga saber antes del sábado 26 de septiembre.

Sea tan amable de verificar que ya nos ha enviado lo siguiente:

- Resumen (Apegado a la guía de envío)
- Trabajo in extenso (Apegado a la guía de envío)
- Curriculum Vitae a manera de ensayo
- Fotografía (10 cm de base por 15 cm de alto, 300 dpi [puntos por pulgada] de resolución, en formato jpg o tiff).

Le solicitamos que antes del sábado 26 de septiembre nos haga llegar lo faltante.

Pedimos prestar atención a las indicaciones referentes a la remisión de estos cuatro requisitos, éstas pueden ser consultadas en nuestro portal en la red www.fissnet.org.

Atentamente,

Salomón Shamosh
Comité Científico
6° Congreso Mundial de Juventudes Científicas

Fundación FISS-Central Científica
Delegación Mexicana
Elefante 118 Interior 802 Col. del Valle, Delegación Benito Juárez, México D.F.
Teléfono: 55343860; Fax: 56592060; correos electrónicos: 6congreso@fissnet.org,
Celular: 044 55 22521728, 04455 55082072

C.c. Ramón Seiffe. Presidente Mundial de la Fundación FISS.
C.c. Sergio A. Sánchez O. Coordinador General del 6° Congreso Mundial de Juventudes Científicas.
C.c. Salomón Shamosh. Comité Científico del 6° Congreso Mundial de Juventudes Científicas.
C.c. Archivo.

www.fissnet.org

Bureau centralizador Mundial, Caracas Venezuela, rectoria@compuserve.com, / fundfiss@codetel.net.do
México, Tel. (55) 343860, 6congreso@fissnet.org



FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE SOCIEDADES CIENTÍFICAS
INTERNATIONAL FEDERATION OF SCIENTIFIC SOCIETIES
FÉDÉRATION INTERNATIONALE DE SOCIÉTÉS SCIENTIFIQUES

(Fondée a Paris le 18 Février 1947 et déclarée sous le n° 10.022)
Fundado en Caracas el Bureau Centralizador Mundial bajo el N° 1.046, el 17 de agosto de 1988

COMITÉ ORGANIZADOR DEL 6° CONGRESO MUNDIAL DE JUVENTUDES CIENTÍFICAS

“Unir la Ciencia al Humanismo constituye cada vez más uno de los factores principales de Tolerancia, Verdad y Paz que América y el mundo necesitan: FISS, Central Científica.”

**La Fundación FISS
Federación Internacional de Sociedades Científicas**

Otorga la presente

CONSTANCIA

A: Christian Axel Luviano Jardón

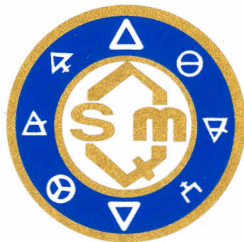
Por su participación con el trabajo titulado:

“Avances en el desarrollo de farmacos para el tratamiento de Neoplasias malignas”

Presentado en el 6° Congreso Mundial de Juventudes Científicas, realizado en la Universidad Nacional Autónoma de México del 13 al 17 de octubre del 2009.

Mtro. Salomón Shamosh Halabe
Coordinador del Comité Científico

Dr. Ramón Seiffe P.
Presidente Mundial de la FISS



SOCIEDAD QUÍMICA DE MÉXICO, A.C.

EXTIENDE LA PRESENTE

Constancia

A LOS AUTORES: **EST. AXEL LUVIANO-JARDÓN**, BIÓL. MIRIAM DÍAZ, M. EN C. EDGAR LEDESMA, M. EN C. YOLANDA CÓRDOVA, EST. RODRIGO SÁNCHEZ, EST. REYNALDO TIBURCIO, BIOL. ITZEN AGUIÑIGA, DR. BENNY WEISS, M. EN C. PATRICIA DEMARE, EST. IVÁN MONSALVO-MONTIEL, DR. IGNACIO REGLA Y DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

DEL TRABAJO INTITULADO: **SÍNTESIS QUÍMICO-ENZIMÁTICA Y ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA DE ANÁLOGOS CAPSAICINOIDES EN LÍNEAS CELULARES DE LEUCEMIA J774, P388 Y WEHI-3 DE RATÓN**

QUE PRESENTARON EN EL MARCO DE LAS ACTIVIDADES CIENTÍFICAS DEL
44° CONGRESO MEXICANO DE QUÍMICA
28° CONGRESO NACIONAL DE EDUCACIÓN QUÍMICA
CELEBRADOS EN PUEBLA, PUE. DEL 26 AL 30 DE SEPTIEMBRE 2009

DR. EUSEBIO JURISTI COSÍO
PRESIDENTE NACIONAL - SQM

DRA. CECILIA ANAYA BERRIOS
PRESIDENTA DE CONGRESOS

PRESIDENTE DE SESIÓN



SOCIEDAD QUÍMICA DE MÉXICO, A. C.

Extiende el presente

Reconocimiento

a

DR. IGNACIO REGLA, M. EN C. PATRICIA DEMARE, EST. AXEL LUVIANO-JARDÓN,
DR. EDMUNDO CASTILLO, DR. AGUSTIN LÓPEZ-MUNGUÍA Y EST. VIRIDIANA PEREZ

por haber obtenido el

PRIMER LUGAR

en la categoría del primero al séptimo semestre en el

CONCURSO NACIONAL DE CARTELES ESTUDIANTILES (NIVEL LICENCIATURA)

realizado en el marco de actividades científicas del

**42° CONGRESO MEXICANO DE QUÍMICA
26° CONGRESO NACIONAL DE EDUCACIÓN QUÍMICA**

con el trabajo intitulado:

SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DEL 12-FENILACETILRINVANIL

México, D.F., 22 - 26 de septiembre del 2007.

Dr. Guillermo Delgado Lamas
Presidente Nacional