

Excmo. Sr. Director,  
Excmos. Sres. Académicos,  
Señoras y Señores.

En la sesión celebrada el pasado día 12 de febrero, por la Sección de Farmacotecnia de esta Real Academia de Farmacia, fuí propuesto para pronunciar el discurso inagural del curso 1988. Desde entonces, he vivido con una honda preocupación, al tener que enfrentarme con el problema que suponía responder al honroso encargo que me encomendaba la Academia. Tenía que seleccionar un tema adecuado al marco de esta Institución y, después de un análisis de la situación, me decidí por considerar uno, que permitiese apreciar los esfuerzos realizados anteriormente o, que se realizan en la actualidad, para poner a disposición del hombre los recursos terapéuticos necesarios para su vida normal, y que presento a Vdes. bajo el título **“Del complejo droga al fármaco estructuralmente específico”**.

En él no pretendo, por supuesto, presentar la historia completa del desarrollo de los compuestos con utilidad farmacológica. Sería una insensatedad por mi parte el pretender hacerlo, ya que en un campo en creciente y continuo desarrollo, como es el de la química de los fármacos, es de todo punto imposible reflejar, en el corto espacio de tiempo de que dispongo, todas las conquistas alcanzadas. Por ello, me voy a limitar a exponer algunos aspectos representativos del tema, con el fin de conocer, no sólo las metas más sobresalientes alcanzadas, sino también, al menos en parte, la metodología seguida para alcanzar tales objetivos, así como las motivaciones que condicionaron el desarrollo del trabajo.

## I. INTRODUCCION

Desde los albores de la Humanidad, el hombre siente la necesidad de disponer de algún recurso o método con el que pueda aliviar sus dolores y combatir la enfermedad. En un principio, fué obligado el uso de productos que la naturaleza ponía a su alcance. Así, empieza a utilizar diversas sustancias naturales procedentes de los tres reinos de la naturaleza y, cuya selección, hace de manera intuitiva. En este aspecto, destaca el reino vegetal, que es el que se mostró más propicio a tal fin. Al menos, las primeras noticias de que se dispone a cerca de el uso de productos naturales como remedios terapéuticos, se refieren a productos procedentes del reino vegetal.

Las noticias más antiguas que se tienen relativas al empleo de productos vegetales y minerales en terapéutica, se refieren a las antiguas civilizaciones de China, India, Sur América y las civilizaciones mediterráneas de la antigüedad. El emperador Shen Nung (2.735 a. C.) recopiló un libro acerca de productos vegetales y se dice que observó los efectos antifebriles del *ch'ang shang*, posteriormente identificado como la *Dichroa febrifuga* (1), con actividad antimalárica, así como el *Ma Huang*, como un estimulante y diaforético, ahora reconocida como la *Ephedra sinica* (2). El Papiro de Ebers, que se refiere aproximadamente a 1.500 años a. C., menciona el uso de la escila como un tónico cardíaco (3). La ipecacuana, obtenida de especies brasileñas de *Cephaelis*, fué usada como un antiemético (4), y el *Chenopodium Anthelminticum* fué prescrito bajo diferentes nombres por los médicos (físicos) hebreos, mejicanos y de la antigua Roma (5). El jugo de la adormidera, fué mencionado como un analgésico por Teofrasto en la tercera centuria antes de Cristo, y a partir de él, Philippus Paracelsus (1443-1541) compone el *Láudano*. y así, durante muchos años, el hombre ha venido utilizando tales productos naturales llamados "drogas", y ésta costumbre alcanza ya estadios muy avanzados en la historia de la Humanidad.

Un avance muy importante en relación a la utilización terapéutica de productos procedentes de la naturaleza, lo constituye el disponer de forma pura de los llamados principios activos de las drogas naturales que, a lo largo del siglo XIX, empiezan a ser aislados de sus fuentes naturales. Así, en 1805 F.W.A. Sertürner anunció el aislamiento de la morfina a partir del opio (6). En 1810, Gomes, al tratar un extracto alcohólico de la corteza de *cinchona*, con álcali, obtuvo un precipitado cristalino al que denominó "cinchonino", el cual fué identificado en 1820 por P.J. Pelletier y J.B. Caventou, de la Facultad de Farmacia en París, como una mezcla de quinina y cinchonina (7). A partir de estos descubrimientos, el aislamiento de "principios activos" de las drogas naturales, adquirió un notable incremento.

El aislamiento y purificación de la morfina, marca un hito en la búsqueda de remedios terapéuticos.

Desde estos momentos, se inició una nueva era en el uso de dichos remedios, y se pueden distinguir dos corrientes o tendencias en su utilización. Por un lado, los aferrados al viejo concepto de droga, quienes pretenden que la utilización de lo que más adelante se llamaría "complejo droga", era más conveniente que el empleo del principio activo al estado puro. Estos autores, defendían su postura con el argumento de que en la droga tal como la naturaleza la ofrecía, el principio activo manifestaba su acción "arropado" con la concurrencia de otras sustancias acompañantes. Todavía en la primera mitad del presente siglo, hemos tenido la oportunidad de conocer a más de un defensor de esta postura. La otra tendencia, correspondía a los defensores de la utilización del principio activo aislado y purificado.

Por otro lado, el desarrollo de la síntesis orgánica, que adquirió un decidido impulso, particularmente después de los trabajos de Wöhler en 1824, ofreció al hombre una amplia gama de compuestos orgánicos, muchos de los cuales presentaban *actividad biológica*. Este calificativo, pronto será cambiado por el de *actividad farmacológica*, reservándose el nombre de *fármaco* para el compuesto químico responsable de tal actividad.

De aquella primera época proceden algunos compuestos sintéticos que aún son empleados en la actualidad. Tal ocurre, por ejemplo, con el *fenobarbital* o luminal, sintetizado por Conrad y Guthzeit en 1882 y descrito como hipnótico por Fischer y Mehring en 1903 (8), así como el ácido acetilsalicílico introducido por Felix Hoffman en 1899, como analgésico y anti-térmico (9). Sin embargo, la mayoría de los fármacos utilizados actualmente en la práctica médica, han sido descubiertos en los últimos 30 años, aproximadamente.

Los avances de la ciencia, tanto en el campo de la Química como en el de las Ciencias Biológicas, inclinaron decididamente la atención hacia los remedios terapéuticos "químicamente definidos". En la actualidad tales productos, en su mayoría orgánicos, son obtenidos por extracción a partir de las drogas naturales, o bien son obtenidos por síntesis total o parcial, esto es por procesos semisintéticos, empleando productos naturales como materia prima, cuya estructura se modifica convenientemente.

No obstante, el estudio de los productos naturales, sigue siendo tarea fundamental para el químico orgánico interesado en la preparación de fármacos. A aquellos primeros logros, sucedieron otros muchos y, este proceso investigador se ha prolongado de forma continuada hasta nuestros días. De este modo se alcanza el descubrimiento de grupos tan importantes como los esteroides, nuevos alcaloides, las prostaglandinas, leucotrienos, etc., entre otros muchos.

Al conocimiento del grupo de sustancias naturales, contribuyó de manera principal, el desarrollo de nuevas técnicas de separación y purificación, así como, para el esclarecimiento de las correspondientes estructuras, fueron decisivos los avances alcanzados en las técnicas de medidas físicas, tales como las espectroscópicas, etc. Por otro lado, la aportación de nuevas ideas y conceptos, como los esquemas biogénicos, iniciados por Robinson fueron asimismo de capital importancia en los avances logrados en este sector.

La aparición de compuestos químicos útiles como fármacos, como consecuencia de las operaciones de la síntesis orgánica en la primera época, puede ser debida a diferentes tipos o modos de actuación: numerosos fármacos han surgido por observación casual otros, como consecuencia del screening generalizado, muchos por modificación molecular de fármacos conocidos y, muy pocos, por la síntesis planificada sobre bases racionales. En más de una ocasión factores puramente económicos orientaron la síntesis de compuestos que, casualmente, resultaron farmacológicamente activos. Recordemos a este respecto, la síntesis de la *fenacetina*, la cual surge cuando a Carl Duisberg, director de la fábrica de colorantes Friedrich Bayer and Cia (Alemania), se le plantea el problema de aprovechar, de alguna manera, una pequeña montaña de más de cincuenta toneladas de p-aminofenol, que se habían acumulado en el patio de la fábrica, y que se hacía necesario "transformar en algo que se pudiera vender". (10).

A la observación casual se debe por ejemplo, el descubrimiento de la *penicilina* (11) como antibacteriana, por Fleming en el año 1929, y que marca el comienzo de la era de los antibióticos, el del *disulfirán*, (12) para el tratamiento del alcoholismo crónico, el de la *meperidina* (13) o dolantina,

inicialmente programada como un fármaco antiespasmódico y que resultó con propiedades analgésicas, así como el del clordiazepóxido (Librium) primer miembro de los tranquilizantes del grupo de la benzodiazepina, obtenido por Sternbach y col. dentro de un programa de investigación, sobre sustitución nucleofílica de grupos clorometilo en N-óxidos de quinazolininas sustituidas (14).

En todo caso, en estos descubrimientos causales, ha sido decisiva la participación del hombre. En efecto, el descubrimiento de un nuevo medicamento se puede considerar, en principio, en términos de dos tipos de actividad investigadora:

Exploración = Aprovechamiento de materiales y hechos, y  
 Explotación = Valoración, mejoramiento y extensión de hechos.

A pesar de la gran ayuda que para el desarrollo de un nuevo medicamento, ofrecen las nuevas técnicas y métodos de trabajo de que se dispone, sigue siendo el hombre el sujeto capaz de valorar sucesos inesperados o casuales, y, de esta valoración, pueden derivar nuevas perspectivas útiles, para alcanzar la meta deseada.

### *Años fecundos de innovación y expansión.*

Los años del 1928 a 1962, han sido llamados la "edad de oro de las ciencias médicas", situándose alrededor de los años 1955-1960 el punto máximo en este proceso acelerante del desarrollo de fármacos. Ni siquiera la 2ª Guerra Mundial lo interrumpió y aunque el período no ha sido único, basta recordar la extraordinaria aportación hecha por Paul Ehrlich a quien se le puede considerar como el indisputado fundador de la metodología en investigación de fármacos; el citado período constituye ciertamente una etapa sin precedentes en la aparición de nuevos métodos de trabajo y nuevos fármacos. La Química Orgánica contribuye a este desarrollo aportando cientos de miles de nuevos compuestos, para su evaluación biológica. Las áreas de trabajo más activas correspondieron a los antimaláricos, agentes antituberculosos, sulfonamidas, antihistamínicos, antipsicóticos, analgésicos centrales, antidiabéticos orales y esteroides. Hacia el final de este período dorado, los agentes antiinflamatorios no esteroídicos, antidepresivos, agentes anti-ansiedad y los primeros fármacos anticáncer potentes, pasan a ser líderes en los esfuerzos investigadores. Pero al igual que en el campo de las artes, donde el romanticismo, impresionismo, cubismo y otras modas, suben y bajan, la investigación terapéutica ha cambiado su énfasis, explorando diferentes áreas en el curso del tiempo, retornando a un problema adormecido, cuando nuevos conocimientos han aconsejado una reconsideración de aquel. Así por ejemplo, después de muchos años de inmovilidad, el grupo de los antihistamínicos  $H_1$ , se ha visto enriquecido por la aparición en 1985, de la *terfenadina* (15) y en 1986, con el *astemizol* (16), compuestos ambos que al no atravesar la barrera hematoencefálica, no producen somnolencia, un efecto secundario típico de los antihistamínicos  $H_1$ .

Pero a partir de los comienzos de la década de los 60, se observó, a nivel mundial, un descenso en la introducción de nuevos fármacos, debido, en gran parte, a la constante subida de los "standars" que los nuevos fármacos debían cumplir.

En efecto, en 1959 surge el problema de la *ftalidomida* (17), compuesto que se mostró muy prometedor, como un fármaco sedante, particularmente útil en las madres gestantes. Fármaco sencillo, fácil de sintetizar y, por ello muy barato, irrumpió con fuerza en el campo terapéutico. La ftalidomida marcó un hito en el desarrollo de los fármacos de síntesis, pero no precisamente por su bondad. Por el contrario, los efectos teratogénicos que siguieron a su administración, se manifestaron en multitud de casos por la aparición de malformaciones en los nacidos de madres a las que, durante el embarazo, se les había administrado dicho compuesto. Esta circunstancia determinó un fuerte parón en la búsqueda y desarrollo de nuevos medicamentos. Era evidente, que no se podía correr tanto y, desde ese momento, se impusieron ciertas exigencias que hasta entonces no se consideraban necesarias. Desde entonces, el desarrollo de un nuevo fármaco exigirá más tiempo y más dinero, pues a los ensayos farmacológicos iniciales, había que sumar los correspondientes a una profunda investigación toxicológica.

Debemos recordar que, con anterioridad al problema de la ftalidomida, ya había sucedido un incidente con la utilización del llamado "elixir de sulfamida", suspensión de sulfanilamida en propilenglicol, lo que aconseja poner gran atención, en relación a los efectos tóxicos, no sólo de los principios activos, sino también de los coadyuvantes empleados en su formulación galénica.

Una consideración especial en relación al desarrollo de fármacos, merecen los antibióticos. Después del descubrimiento de la penicilina, se intensifican los trabajos en este campo, particularmente con el estudio de numerosísimas muestras de suelo. El período de 1940 a 1959, ha sido llamado "la era de oro del descubrimiento de los antibióticos", debido al gran número de compuestos descubiertos en dicho período, mucho de los cuales se mostraron adecuados para su uso terapéutico. Una fecha destacable en este período, corresponde al año 1949, cuando varios grupos de investigadores obtuvieron la dihidroestreptomicina (18). Este hecho marca el camino a destacados esfuerzos investigadores, orientados a la producción de mejores antibióticos, por modificación química de los productos obtenidos por fermentación.

## II. FARMACOS Y RESPUESTA BIOLÓGICA

### II.1 *Interacciones de los fármacos con biopolímeros.*

Todas las moléculas extrañas que entran en el organismo (xenobióticos), reaccionan en alguna extensión con, al menos, un constituyente del tejido vivo. Las consecuencias de esta interacción dependen, muy frecuentemente, de las características y funciones del constituyente tisular implica-

do en la interacción. Con la mayor frecuencia, la molécula de un fármaco interreaccionará con uno o más biopolímeros presentes en los fluidos extracelulares, en las membranas celulares o, en las propias células.

Los biopolímeros, desempeñan muchas e importantes funciones en el organismo. Constituyen el aparato regenerativo de la célula (ácidos nucleicos), transportan el oxígeno y el dióxido de carbono (hemoglobina), contraen las fibras musculares (actina, miosina), catalizan los mecanismos de control bioquímico (enzimas), etc. En resumen, funciones especializadas de los órganos y sistemas, son moduladas por biopolímeros. Se trata, por lo general, de macromoléculas de naturaleza protéica, lipídotrófica o glucídoprotéica, con las que se unen los fármacos.

El conjunto de fenómenos que ocurren desde el momento en que el fármaco es introducido en el organismo, hasta su interacción final con un tejido organizado o sitio específico de acción, en el cual el estímulo deseado se inicia o produce, es muy complejo. El organismo constituye un sistema multicompartimentado y el progreso del fármaco a su través, ofrece diversas posibilidades para su actuación y biotransformación.

Sobre la base de su actividad biológica, los fármacos se pueden dividir en dos grandes clases:

- a) Estructuralmente no específicos, y
- b) Estructuralmente específicos.

Los fármacos estructuralmente no específicos, son aquellos en los cuales la acción farmacológica no se encuentra directamente subordinada a la estructura química, excepto en la extensión en la que dicha estructura afecta a las propiedades fisicoquímicas. Se admite que dichos fármacos actúan por un proceso fisicoquímico por las siguientes razones: Su acción biológica está directamente relacionada a su *actividad termodinámica*, la cual es usualmente alta. Esto quiere decir que tales fármacos actúan en dosis relativamente grandes. Por otro lado, aunque varíen en su estructura química, acusan respuestas biológicas semejantes, de forma que ligeras modificaciones en dicha estructura, no se traducen en cambios profundos en la acción biológica.

Por el contrario, la acción biológica de los fármacos estructuralmente específicos depende, esencialmente, de su estructura química. Por lo tanto en este grupo de fármacos, juegan un papel decisivo en relación a su actuación, entre otros factores, la reactividad química, forma y tamaño, disposición estereoquímica de la molécula, naturaleza y distribución de grupos funcionales, distribución electrónica, efectos inductivos y de resonancia, etc. Diversas consideraciones sugieren que el efecto farmacológico producido por estos fármacos, es consecuencia de su acoplamiento a pequeñas áreas químicamente reactivas, en ciertos puntos del organismo, cuya topografía y grupos funcionales son complementarios a los de aquellos, cuya topografía y sitios activos, constituyen lo que se denomina "receptor".

Gran parte de los fármacos usados en terapéutica, son estructuralmente específicos y, hacia ellos, se orienta la mayor parte del esfuerzo del químico interesado en la búsqueda de nuevos medicamentos.

## II.2 Receptores farmacológicos.

Las diferencias indicadas para los dos tipos de fármacos antes citados se corresponden, lógicamente, con dos tipos distintos de mecanismos de acción: Los fármacos estructuralmente no específicos, se supone que actúan por alguno de los siguientes procesos: **a)** perturbación de la membrana celular, **b)** por interferencia con pequeñas moléculas o iones, **c)** por incorporación del fármaco en una macromolécula. etc.

Por el contrario, los estructuralmente específicos, actúan por un mecanismo que implica la formación de un complejo con un grupo receptor.

El concepto de receptor fué inicialmente introducido por Langley en 1905 (19) y desarrollado por Ehrlich a partir de 1909 al enunciar su famosa frase de que *los fármacos no actúan a menos que sean fijados (Corpora non agunt nisi fixata)* (20). Realmente, el concepto de receptor se remonta al año 1878 y fué formulado por Langley a los fisiólogos británicos que trabajaban sobre los efectos antagónicos de atropina y pilocarpina (21). Langley sugirió que *hay alguna sustancia receptora con la cual ambas, atropina y pilocarpina, son capaces de formar compuestos... de acuerdo con alguna ley en la cual su masa relativa y afinidad química para tales sustancias, son factores a tener en cuenta.*

A partir de 1930 el concepto de receptor aparece en forma más concreta: Clark en 1933 (22) y Gadum (23) en 1937, ofrecen una base cuantitativa para dicho concepto, al establecer que la intensidad de la acción de un fármaco estructuralmente específico, es proporcional al número de receptores ocupados (*Teoría de la ocupación*).

La hipótesis de la existencia de los receptores farmacológicos, se desarrolló a consecuencia de tres características observadas en la acción de algunos fármacos:

1.— **Potencia elevada** de algunos fármacos, los cuales actúan a concentraciones muy bajas, del orden de  $10^{-9}$  M e incluso de  $10^{-11}$  M (véase el concepto de *actividad termodinámica*).

2.— **Especificidad estereoquímica**. Sin duda alguna, la diferencia observada entre la actividad farmacológica de muchas parejas de isómeros espaciales, constituye la mejor evidencia para la existencia de los receptores farmacológicos.

3.— **Especificidad biológica**, que se refiere a la diferente actividad de un fármaco en distintos puntos del organismo, representada por un fármaco tal como la epinefrina, que presenta un marcado efecto sobre el músculo del corazón, pero muy poca acción sobre el músculo estriado.

### *Naturaleza del receptor*

Un receptor se configura como una zona activa definida en términos de afinidad química y complementariedad geométrica (o topográfica). Da-

tos experimentales indican que los receptores farmacológicos se encuentran localizados en macromoléculas, la mayor parte de las cuales presentan propiedades análogas a las de las proteínas. Su naturaleza es probablemente similar a la de los *sitios activos* o *sitios alostéricos* de los enzimas y, se aproximan en tamaño a la molécula capaz de formar con ellos un complejo. Sin embargo, mientras que para el químico el receptor es un componente químico estructural en un biopolímero, el biólogo lo considera en términos microanatómicos o funcionales.

La interacción de un fármaco estructuralmente específico con este tipo de receptor, sería similar a la interacción de un sustrato con el *sitio activo* de un enzima específico, o a la de un hapteno con su anticuerpo específico.

El concepto de receptor ha sufrido una continua evolución a lo largo de la presente centuria. La observación de que los efectos de neurotransmisores, fármacos y hormonas, varían con la concentración y estructura química, son estereoselectivos y, pueden ser farmacológicamente antagonizados, ha orientado hacia la existencia de distintos constituyentes celulares, que son capaces de reconocer diferencias sutiles en la composición química de los ligandos. A medida que ha avanzado el conocimiento en biología molecular, ha ido progresando asimismo el conocimiento de los receptores. No obstante, en general, los receptores son caracterizados típicamente en término de funcionamiento y no por sus propiedades estructurales, aunque en algunos casos se ha logrado el aislamiento, clonado y secuenciación (24), como es el caso del receptor colinérgico nicotínico, del que se tiene un completo conocimiento de su estructura primaria (25).

El tema del receptor farmacológico, ha pasado a constituir la piedra fundamental de la farmacología, pudiendo decirse que el objetivo central de la farmacología molecular y de la química de fármacos en los últimos 25-30 años se ha orientado a elucidar la estructura y función de los receptores de fármacos, esfuerzo que no ha disminuido (26).

Este proceso ha sido posible, gracias a que los avances de la metodología empleada en los estudios cuantitativos de enlace de compuestos, sobre preparaciones de membrana o sobre receptores aislados, ha llegado a ser cada vez más sofisticada y precisa. Compuestos isotópicamente marcados de muy alta actividad, han hecho posible el trabajo con concentraciones de ligandos fisiológicos inferiores al picomol ( $10^{-12}$ ). Esto, ha permitido el acceso experimental directo a los *sitios receptores* de enlace, lo que ha conducido al desarrollo de varios modelos de receptor, experimentando en los últimos 10-15 años, un progreso espectacular y explosivo, lo que hoy denominamos *receptorología* o ciencia del receptor. Tal actividad investigadora, ha situado el tema del receptor sobre nuevas y bien documentadas premisas, aunque lógicamente, queda mucho por hacer en este campo.

Desde un punto de vista bioquímico, los receptores son típicamente tratados como enzimas, en términos de funcionamiento y cinética (27). No obstante, a diferencia de los enzimas, el sustrato del receptor, el agonista, normalmente no es alterado como consecuencia de la secuencia de reacciones. Entonces, el resultado de una interacción receptor-ligando (RL) no es un subproducto del ligando, sino un cambio en el medio intracelular.



La teoría de la ocupación de Clark, antes citada, es la más estimada para explicar el mecanismo de acción del receptor y, su derivación práctica, la isoterma de saturación, es el método más ampliamente usado para la caracterización de receptores (28). Esta teoría de la ocupación, ha sido modificada por Ariens (29) y Stephenson (30) quienes dividen la interacción fármaco-receptor en dos etapas: a) combinación de fármaco con el receptor y b) producción del efecto, de lo cual se derivan los conceptos de *afinidad* y *actividad intrínseca*. Una alternativa a esta teoría, es la propuesta por Paton (31) que dice que, la actividad es proporcional no al número de receptores ocupados, sino a la frecuencia de la ocupación por unidad de tiempo.

Modelos más sofisticados de las interacciones fármaco-receptor son propuestos continuamente, en general atentos a explicar datos experimentales que se desvían de la cinética de acción de masas. Dos modelos que han resistido el paso del tiempo son: el *modelo concertado* (32) y el *modelo secuencial o del encaje inducido* (33). La solidez de estos modelos, reside en que explican interacciones cooperativas entre subunidades, componentes o prótomeros de un receptor oligomérico complejo. En efecto, el conocimiento que hoy se tiene del receptor, permite distinguir en ellos, subunidades muy bien diferenciadas. Así, en los receptores de membrana, muy abundantes en el sistema nervioso central, se distinguen unidades con función receptor que, corresponde al concepto clásico del receptor, y son las responsables de la fijación de los ligandos, lo que marca el comienzo de la cadena de eventos bioquímicos que terminan en la modificación de la actividad celular. Los sucesos posteriores a la fijación del ligando, se producen por la existencia de otras subunidades del receptor, responsable de la función efectora. Entre ambas unidades, receptora y efectora, existe la unidad reguladora o moduladora, que controla la velocidad de paso de la información a la unidad efectora y, como consecuencia, modula el efecto final.

El conocimiento de las interacciones fármaco-receptor a nivel molecular, puede ser una guía útil para el desarrollo de nuevos fármacos. El estudio de la forma de la molécula (conformación) y la reactividad, pueden prestar una valiosa ayuda en la formulación de modelos de los receptores de fármacos y del mecanismo de acción de los fármacos. En este sentido, la bien conocida técnica de la elaboración de mapas que expresan la topografía del receptor, puede ser aplicable, cuando la imagen tridimensional del receptor se toma como complementaria de la del fármaco que se une a aquel. No obstante, esta aproximación de la complementariedad geométrica tiene sus problemas, fundamentalmente relacionados con el hecho de que las moléculas de fármacos son con frecuencia flexibles y, su conformación puede variar bajo diferentes condiciones. Una aproximación para resolver este problema es la preparación de análogos conformacionales rígidos, que retienen la actividad biológica del fármaco. El análisis teórico conformacional puede, también ser útil para el enfoque de estos problemas. De esta manera se han propuesto numerosos modelos de receptores en los que se ha tratado de expresar dicha correspondencia. El primer modelo de receptor de fármacos fué propuesto por Becket y Casi, en 1954, para el receptor de analgesia (34) en consideración a las configuraciones estereoquímicas de la morfina, metadona y otros anal-

gésicos ópticamente activos. A este modelo de receptor se unen, posteriormente, propuestas para otros modelos de diversos grupos de fármacos, tales como anestésicos locales (35), inhibidores de mono-amino-oxidasa (36), tranquilizantes fenotiazínicos (37), bloqueantes colinérgicos (38), colinérgico nicotínico (39), colinérgico muscarínico (40), esteroides (41), adrenérgicos (42), histamínicos (43) y otros muchos.

Pero el encaje estérico, no es el único efecto que gobierna la interacción fármaco-receptor. La mayor parte de los fármacos, poseen cargas electrostáticas parciales o totales, que se relacionan complementariamente con otras cargas presentes en el receptor. Recientemente, se ha desarrollado la técnica de preparación de mapas que representan el contorno electrostático, visualizando el campo electrostático potencial alrededor de la molécula de un fármaco (44). A medida que los fármacos se aproximan al receptor, los campos electrostáticos son perturbados y la reactividad del fármaco aumenta. Índices de reactividad derivados teóricamente, pueden aportar un profundo conocimiento en este proceso (45).

No obstante sus limitaciones, un modelo de receptor, es un punto de partida útil para el diseño de nuevos fármacos y cuanto más detallado sea el conocimiento de dicho modelo, más útil será para propósitos de diseño. La modelación molecular asistida por computadora, puede aportar el conocimiento científico de las complejas relaciones tridimensionales entre los fármacos y los receptores. En este sentido, debe ser destacado el Sistema de modelado Merck (MMMS), que ha sido empleado satisfactoriamente para el diseño de nuevos candidatos a fármacos (46).

### III. DESARROLLO DE NUEVOS FARMACOS

La búsqueda de nuevas moléculas terapéuticamente activas, sigue siendo tarea fundamental para el investigador interesado en la química de los fármacos. Esta investigación ocupa a numerosísimas personas que provienen de muy diversos campos profesionales. El logro en la actualidad, de un nuevo remedio terapéutico químicamente definido, requiere normalmente la preparación y estudio de varios miles de compuestos químicos, cuantiosos recursos económicos y mucho tiempo.

La investigación actual de nuevos fármacos, no se reparte por igual en todos los grupos terapéuticos. El arsenal terapéutico, está, actualmente, bastante bien surtido para determinados tipos de fármacos, tales como antihistamínicos  $H_1$ , antiespasmódicos, agentes bloqueantes ganglionares, relajantes musculares y otros. Por esta razón, la búsqueda de nuevos fármacos dentro de estos grupos, atrae actualmente poco interés. Por el contrario, se hace un gran esfuerzo investigador en otros grupos terapéuticos tales como los agentes antiinfecciosos, antineoplásicos, cardiovasculares y, fármacos para el sistema nerviosa y endocrino.

El diseño de nuevos fármacos, uno de los objetivos fundamentales de la Química farmacéutica, al igual que ocurre en otros campos de la investiga-

ción es, en principio dependiente, tanto de la creatividad de los científicos como de la forma en la cual sus ideas acerca del tema, están actualizadas. Por ello, se consideran convenientes los procedimientos para el diseño de fármacos, que permitan al científico desarrollar sus propias ideas con la máxima libertad posible, pero que, al mismo tiempo, le permitan orientarlas específicamente, esto es, dirigirla al desarrollo de un nuevo fármaco con propiedades biológicas específicas. En resumen, buscar procedimientos de diseño poniendo especial énfasis en los elementos creativos y sistemáticos y en su interacción.

Se han publicado numerosísimos trabajos acerca de la materia del diseño de fármacos, pero se puede decir que, hasta el momento actual, no se ha encontrado una metodología definitiva que permita programar un fármaco ideal para una afección concreta. No obstante, se debe reconocer que se ha avanzado mucho en el desarrollo de la metodología de diseño y, son de esperar todavía más rápidos avances en el futuro. Permitánme que considere con algún detalle el desarrollo de algunos fármacos en función del tiempo y de las técnicas seguidas para ello.

### III. 1 *La variación molecular.*

Considerada por muchos autores como poco, o nada racional (al menos en sus primeros estadios), la variación molecular, sin embargo, al menos de momento, resulta de gran importancia para la obtención de nuevos fármacos. Podemos decir, sin temor a equivocarnos, que la mayor parte de los fármacos que se producen en la actualidad, surgen por esta vía. Realmente, es la actividad central en la química de fármacos y, constituye un aspecto básico en el proceso de análisis de las relaciones entre estructura química y actividad biológica.

La aplicación del método de la modificación molecular para la obtención de nuevos medicamentos, se funda en tomar como referencia o modelo, un compuesto químico de reconocida actividad biológica o farmacológica y, sintetizar y ensayar, "análogos estructurales", modificados de acuerdo con determinados criterios.

Los objetivos que se pueden alcanzar por la aplicación del método son fundamentalmente:

- a) Descubrimiento de los agrupamientos esenciales o críticos (grupos farmacofóricos) de un determinado compuesto, y
- b) Obtención de nuevos fármacos con propiedades más aceptables que las correspondientes al prototipo elegido.

En este último sentido, las ventajas del método se derivan, entre otras, de las siguientes modificaciones: a) modificaciones para mejorar la selectividad de acción; b) modificaciones para alterar convenientemente la absorción, distribución o eliminación; c) modificaciones para reducir el coste de un determinado producto; d) modificaciones orientadas a explotar los efectos laterales de fármacos conocidos, como base de búsqueda de nuevos fármacos.

### III.1.1 *La variación molecular en sus primeros momentos. Desarrollo de la cocaína.*

Las operaciones de variación molecular se hicieron, en un principio, y hasta hace unos treinta años aproximadamente, de forma intuitiva, arbitraria y circunstancial, basada en la experiencia del operador, capacidad de observación, suerte y mucho de un duro trabajo. Las posibilidades de encontrar así, un nuevo compuesto clínicamente útil, no fueron buenas. Se ha estimado que, en cualquier caso, era necesario sintetizar varios miles de compuestos para producir un fármaco útil. No obstante lo irracional del método, en algún caso se alcanzaron resultados importantes. Así por ejemplo, conocida la actividad anestésica local de la cocaína (47), y sus reacciones secundarias o laterales, se plantea el problema de la simplificación de la molécula, partiendo ya del previo conocimiento de lo innecesario del grupo carboxilato de metilo presente en ella, ya que la tropacocaína o benzoato de pseudo-tropina, es un poderoso anestésico local, incluso superior a la cocaína.

La primera idea de tipo sintético, orientada a la simplificación de la molécula de la cocaína, se programó para prescindir del ciclo de la pirrolidina y obtener derivados de hidroxipiperidinas. Así es como surgen las *eucainas* cuyo desarrollo por Harries en 1897 (48), confirma, en parte, la porción esencial de la cocaína, responsable de la acción anestésica local. No estaría de más, recordar que la síntesis de la eucaina, parte de un reactivo asequible en la época, la triacetonamina, lo que se traduce en que la eucaina es algo más que el producto de apertura del sistema de pirrolidina.

En 1897, Einhorn y Heinz, buscando análogos de cocaína en los que los grupos amino e hidroxilo estuvieran en un mismo núcleo bencénico (es decir derivados de aminofenoles) y tuvieran además el grupo metoxicarbonilo presente en la cocaína, preparan los *ortoformos* (49).

Fourneau, en Francia, sobre la base de la simplificación al máximo de la molécula de la cocaína, preparó una serie de ésteres benzoicos de alcaninas alifáticas, que se mostraron con propiedades anestésicas y menor toxicidad que las eucainas. Con el concurso de la síntesis de Grignard, una reacción asequible en la época, logra preparar Fourneau diversos aminoalcoholes alifáticos, que utiliza para la preparación de benzoatos. Como miembro más representativo de la serie, debe ser indicada la *estovina* (50).

Con objeto de superar ciertas circunstancias adversas de los ortoformos, debidas fundamentalmente a su débil carácter básico, se pensó en introducir en su molécula un radical de amina alifática. Esto, dió origen a la *nirvanina*, un compuesto preparado también por Einhorn, y que ya podía ser inyectado en forma de clorhidrato soluble en agua.

Inmediatamente después de que aparecieron los ortoformos, se pensó que el hidroxilo fenólico podría ser supérfluo y, que lo fundamental para la aparición del poder anestésico local, era un radical de ácido benzóico esterificado, y un grupo de amina inserto en el núcleo bencénico de aquel. El éxito de los ortoformos, hizo pensar que su acción anestésica, sería debida al grupo amínico en combinación con el éster benzoico o, dicho de otra manera, que la presencia del radical amino, no era indispensable en la fracción del alcohol, con tal de que se hallase en la fracción del ácido. Si dicha suposición era fundada, los ésteres simples de los ácidos aminobenzoicos,

deberían presentar acción anestésica local. Y en efecto, así resultó. Surge así la serie de la *anestésina*. (51).

Visto que los esteres benzoicos de amino alcoholes alifáticos presentan acción anestésica local y, que los esteres p-aminobenzoicos de alcoholes alifáticos también la presentan, Einhorn, el descubridor de los ortoformos, tuvo la idea de estudiar esteres p-aminobenzoicos de aminoalcoholes alifáticos, descubriendo así la *procaina* (novocaina) hacia 1905 (52). La procaina, que es el anestésico local que ha tenido más éxito entre la numerosa legión de sucedáneos de la cocaína, se puede considerar como la sustancia que reúne en su molécula a las de la anestésina y la del benzoato de p-dietilaminoetil, ambas activas como anestésicos locales.

Una vez alcanzada la estructura de la procaina, se establecen afortunadas generalizaciones, que permiten optimizar dicho compuesto, obteniéndose nuevos anestésicos más potentes y menos tóxicos que la procaina. Por otro lado, se propone un modelo de receptor que se acomoda a sus características estructurales (35) y, cuyas exigencias son a su vez, satisfechas por otros tipos de sustancias distintas a los esteres, tales como amidas, amidas invertidas, cetonas, esteres, uretanos, ureas y amidinas, lo que permite descubrir nuevos anestésicos locales, en otros grupos químicos distintos a los esteres.

Más racional parece ser, al menos en apariencia, la variación disyuntiva o simplificadora de la molécula de la morfina (6), e insisto en lo de aparente, porque en la realidad, la simplificación racional representada por la secuencia morfina→morfinano→benzomorfanó→meperidina→metadona, no se acomoda en el tiempo a dicho orden. De todos ellos fué la *meperidina* el primero en aparecer en el año 1938 (13) y su presencia en el grupo, no es el resultado de una búsqueda directa, sino la consecuencia de una circunstancia accidental: cuando la meperidina, sintetizada dentro de un programa orientado a la búsqueda de antiespasmódicos, fue sometida a un screening farmacológico inicial, el operador observó que, al serle administrada a la rata, producía la erección del rabo, lo que se conoce como síndrome de Straub, que era típico de los derivados morfínicos. Valorada su potencia analgésica se encontró menor que la de la morfina, pero aún muy estimable. He aquí un nuevo ejemplo de la acertada valoración y explotación de un hecho experimental, de lo que se derivaron interesantes consecuencias.

La estructura de la meperidina, con alguna ventaja sobre la morfina, fué sometida seguidamente a un amplio proceso de optimización, preparándose numerosos compuestos relacionados con su estructura, por el método de la variación molecular.

### III.2 Bases racionales para el diseño de nuevos fármacos.

A despecho de algunos grandes éxitos de los métodos clásicos de diseño de fármacos, su impredecibilidad y la tremenda cantidad de esfuerzo empleado y, en parte malgastado, han hecho sentir la necesidad de desarrollar métodos de trabajo más racionales, con mayor capacidad de predicción, en un esfuerzo para elevar el diseño de fármacos, de un arte a una ciencia.

No obstante, de momento, esto es más una esperanza que un logro alcanzado. Muy frecuentemente, nuestros mejores esfuerzos son frustrados por

la ignorancia o desconocimiento parcial o total de la biología o bioquímica subyacente a una enfermedad y, por ello, quedamos limitados a aquello que algunos autores llaman "tecnología parcial" o "tecnología a medias".

Es evidente pues, que en el estado actual del desarrollo de las ciencias, no puede, ni debe ser la casualidad, ni un proceder rutinario, el camino a seguir para el descubrimiento de nuevos fármacos. El hombre se encuentra con la posibilidad de aplicar métodos racionales de trabajo y, con su ayuda, la búsqueda de nuevos fármacos se hace en las mejores condiciones posibles.

Este proceder, exige el previo conocimiento de la influencia que sobre las propiedades de un determinado compuesto, ejercen los diferentes sustituyentes y, sobre esta base, en la aplicación de correlaciones previamente reconocidas, de la actividad biológica, con las características fisicoquímicas en el más amplio sentido, en la esperanza de que pueda ser pronosticado el éxito farmacológico de un compuesto todavía no sintetizado.

Analicemos esta nueva metodología de trabajo, a través de la variación estructural sistemática, búsqueda de prototipos, aprovechamiento de acciones laterales de fármacos conocidos y base fisicoquímica de diseño o modulación de la farmacocinética.

### III.2.1. *La variación molecular sistemática.*

Las clásicas modificaciones de la estructura de compuestos orgánicos, han sido desde los primeros tiempos el principal soporte de la síntesis de fármacos. Las modificaciones estructurales, expresadas en términos de la Química orgánica, son en realidad, solamente cambios para la modificación de las propiedades fisicoquímicas de una determinada estructura. No obstante, la Química farmacéutica piensa usualmente en términos de estructuras, pues ese es el lenguaje de la síntesis orgánica. En consecuencia, es conveniente tratar con tal aproximación.

La variación de sustituyentes, puede seguir diversas direcciones, pudiendo ser utilizada para aumentar o disminuir la polaridad, alterar el  $pK_a$  o, cambiar las propiedades electrónicas de la molécula. La exploración de series homólogas es una de las estrategias más frecuentemente usadas en esta dirección.

El efecto que sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas, se deriva del incremento de la longitud de una cadena alifática en compuestos alifáticos, ha sido estudiado para muchas series de compuestos. Uno de los primeros estudios de relaciones estructura-actividad (SAR), fué comunicado por Overton (53), en 1901, en el que se resumen las relaciones entre actividad anestésica local y lipofilidad. Los alcoholes alifáticos normales, muestran un aumento regular en su actividad antibacterial, a medida que se asciende en la serie homóloga, desde el alcohol metílico al actílico, según un trabajo de Schaffer (54).

Un importante factor en tales estudios de homologación de cadena, es el incremento en lipofilidad que acompaña al aumento en el número de grupos metileno. Hansch, ha documentado muchos ejemplos del aumento en actividad biológica, paralelamente al aumento en la cadena lateral, hasta

un máximo, después de lo cual, un nuevo incremento en la longitud de la cadena, se traduce en una disminución de la actividad (55). Esta relación parabólica entre lipofilidad y bioactividad, es un factor que debe ser tenido en cuenta en la consideración de las relaciones SAR.

Todavía se observan cambios más sensibles cuando se comparan compuestos de cadenas ramificadas con análogos de cadena recta. En una serie de 10-aminoalquilfenotiazinas, Gordon (56) compara las actividades antihistamínica y antipsicótica, en relación a dicha variación molecular, y observa que una cadena de dos átomos de carbono o de tres átomos ramificada, que sirve de separación entre los dos átomos de nitrógeno, conduce a compuestos en los que predomina la actividad antiespasmódica y antihistamínica (p.ej. en *prometazina* (57) y *dietazina* (58)); mientras que el alargamiento de la cadena a tres eslabones (p.ej. en *promazina* (59), se traduce en una gran disminución en las actividades antiespasmódica y antihistamínica, exaltándose grandemente las actividades sedantes y tranquilizantes.

Un ejemplo clásico del efecto de las cadenas alquílicas sobre la actividad biológica, se ve claramente en los compuestos *hexametonium* (60) y *decametonium* (61), el primero de los cuales, es un agente de bloqueo gangliónar, mientras que el segundo, actúa como bloqueante neuromuscular.

Así pues, para un fármaco que contiene una cadena de dos o tres átomos de carbono separando dos heteroátomos, es siempre aconsejable el considerar la preparación de análogos con cadenas recta y ramificada, pues se pueden observar sutiles diferencias en la actividad biológica.

La introducción de dobles enlaces, cambia la estereoquímica de una molécula y disminuye la flexibilidad de las cadenas carbonadas. Los isómeros Z y E, muestran, con frecuencia, propiedades muy diferentes.

El paso de una estructura cíclica a otra abierta (o viceversa), constituye uno de los más viejos recursos seguidos en las operaciones de modificación molecular.

No obstante, debemos hacer patente que tales transformaciones, no siempre conducen a compuestos con actividad biológica similar. Así por ejemplo, la comparación entre *anfetamina* (62) y *tranilcipromina* (63) ilustran como pueden cambiar profundamente la actividad biológica al cerrarse un anillo. La tranilcipromina es un potente inhibidor de la monoaminoxidasa, mientras que la anfetamina es un potente estimulante del SNC, con una actividad inhibitoria de la MAO, solamente de 1/5000 en relación a tranilcipromina.

El éxito clínico alcanzado con la tranilcipromina, estimuló la exploración del efecto del tamaño del anillo, sobre la actividad (64), encontrándose que se puede alcanzar una interesante disociación de propiedades biológicas. Como el mejor compuesto de la serie se encontró la *cipenamina*, (65) con anillo pentagonal, frente al ciclopropánico de la tranilcipromina, la cual se mostró como antidepresor sin destacada actividad anti MAO.

Las variaciones en la estructura de un ciclo, son permanentes en la síntesis de fármacos y, con frecuencia, empleadas como soporte para otros cambios estructurales o, simplemente, para propósitos de derechos de patentes.

No obstante, se observa con frecuencia que, cambios relativamente pe-

queños en la estructura ciclica, conducen a profundos cambios cualitativos. El ejemplo más destacable de ello, ocurre en la transición de los neurolépticos fenotiazínicos DA-bloqueantes, a las dibenzoazepinas antidepresivas, como la imipramina (66), basado en el reemplazamiento del grupo -S- por el grupo  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ , que se acompaña de un cambio radical en la geometría de la molécula.

Fundándose en un doble criterio químico y biológico relacionado con la estructura de los fármacos, Ariëns (67) distingue entre grupos *quimiofuncionales*, que son los que contribuyen al enlace de los fármacos con el receptor, y *grupos biofuncionales*, que serían los verdaderos responsables de la actividad biológica y, por ello, denominados grupos *farmacofóricos*. Esta diferenciación funcional es, a veces bastante clara, pero en otros muchos casos, no siempre es fácil asignar funciones específicas a determinados agrupamientos químicos.

No obstante, el grupo farmacofórico de un fármaco está, usualmente confinado a unos pocos grupos químicos o partes de la molécula total y, esta parte crítica de la molécula, puede ser afectada más o menos profundamente, por los cambios estructurales realizados en su entorno. Así por ejemplo, la introducción de sustituyentes voluminosos en la vecindad del farmacóforo de un fármaco agonista, se traduce con frecuencia, en la aparición de un antagonista. Esta correlación es destacable entre los neurotransmisores. Agentes anticolinérgicos, bloqueantes adrenérgicos y algunos antagonistas de serotonina, entre otros, muestran esta correlación.

La introducción de sustituyentes más o menos voluminosos, previene con frecuencia, el ataque enzimático sobre un fármaco, prolongando, en consecuencia, su vida útil. Esta técnica fué empleada para impartir resistencia a la  $\beta$ -lactamasa en las penicilinas semisintéticas, como en el caso de la *difenilcilina* (68). Sencillos grupos metilo son, con frecuencia, suficientes para prevenir el ataque enzimático y con él, la inactivación de un compuesto biológicamente activo. Dignos de destacar, a este respecto, son los gestágenos orales, *medrogestona* (69), *medroxiprogesterona* (70), *megestrol* (71). entre otros, en los que la presencia de un grupo metilo, en la posición 6 del sistema esteroídico, es suficiente para prevenir la inactivación por la acción de las reductasas intestinales.

### III.2.2 *La variación molecular racional. Búsqueda de prototipos.*

La aplicación racional del método de las variaciones moleculares, requiere como punto de partida el disponer de una estructura inicial de referencia, con una determinada actividad biológica. Estos compuestos de referencia, denominados corrientemente "*prototipos*" o "*compuestos cabeza de serie*", son una condición *sine qua non* en el diseño o programación de un nuevo fármaco, pues todavía no se ha alcanzado, al menos con carácter general, un nivel de sofisticación en el que un íntimo conocimiento de la estructura y mecanismo de actuación del receptor, permita diseñar un nuevo fármaco sin disponer de un modelo previo. Se conocen varios y bien ensayados métodos para descubrir tales líderes, distintos de aquellos de diseño *de novo*. Entre ellos podemos destacar:



### III.2.2.1 *Screening generalizado.*

La aplicación de ensayos farmacológicos a intermedios que surgen en diversas secuencias de reacción, puede conducirnos a valiosos prototipos. Así, dentro de un programa de estudio de derivados indólicos referibles al alcaloide gramina (3-dimetilaminometilindol), se preparó una isogramina con estructura de 2-dimetilaminometilindol, por ciclación de la N-dimetilaminoacetil-*o*-toluidina; el screening de este último compuesto permitió conocer su actividad como anestésico local y, sometido a un profundo estudio por Löfgren, condujo al conocimiento de los anestésicos locales del tipo *lidocaína* (72).

Debemos insistir, en que la aplicación del screening generalizado, a todo tipo de compuestos que se pueden ofrecer a la consideración del investigador, es de todo punto imposible por razones obvias. No obstante, el método resulta de interés cuando se limita a una determinada actividad biológica. En este caso, se hace necesario disponer en principio o, en todo caso desarrollar, un test biológico seguro, con cuya ayuda se detectará o determinará cuantitativamente tal actividad.

### III.2.2.2 *Los productos naturales como punto de partida.*

Las más antiguas materias primas para la variación molecular, fueron las sustancias naturales, biológicamente activas, tanto de origen vegetal o animal o bien producidas por microorganismos, tales como los antibióticos, muchas de las cuales no son aptas para su utilización terapéutica directa. En efecto, los líderes o prototipos más asequibles, se encontraron entre los productos del metabolismo intermediario, en donde existe un vasto reservorio de sustancias que pueden ser ventajosamente imitadas o modificadas, por variación molecular.

En adición a las modificaciones anteriormente indicadas de la cocaína y de la morfina, son dignas de mención, por su actualidad, las realizadas sobre las estructuras originales de algunas prostaglandinas y leucotrienos, antibióticos, diversos alcaloides, aminas biógenas, aminoácidos, nucleótidos, péptidos, etc.

La consideración de algunos ejemplos, nos permitirá apreciar la significación de ciertas moléculas naturales como puntos de referencia para el desarrollo de análogos sintéticos.

#### *La histamina como prototipo. Antihistaminicos H<sub>2</sub>.*

La histamina es un agente de actuación local que presenta acciones muy específicas. Ya Dale y Laidlaw en 1910, publicaron el primero de una serie de trabajos describiendo los efectos farmacológicos de la histamina (73), destacando, en particular, su potente acción estimulante del músculo liso y la disminución de la presión sanguínea. Los primeros estudios sobre la histamina, indican una similitud en algunos de sus efectos con los síntomas que aparecen durante la inflamación y con los síntomas característicos del shock producido por trauma o reacciones alérgicas y, pronto es aceptado, que la

histamina es un mediador de la inflamación y del shock y esto estimuló un programa de investigación por Bovet, en Paris, de búsqueda de sustancias capaces de contrarrestar estos insidiosos efectos. Los hallazgos fueron publicados en 1937 (74) y condujeron al desarrollo de los fármacos antihistamínicos en la década de los 40 y su introducción, para el tratamiento de situaciones alérgicas tales como, urticaria y fiebre del heno, (75). Fármacos como *pirilamina* (76), *tripelenamina* (77) y *difenhidramina* (78), resultaron muy selectivos en el bloqueo de ciertas acciones de la histamina. Análisis cuantitativo dosis-respuesta, deducidos de estudios sobre la presión sanguínea, (79) o sobre músculo liso aislado (80) permitieron deducir que el modo de acción correspondía a un antagonismo competitivo y, en 1947, Schild, (81), introduce los valores de  $pA_x$  para caracterizar dicho antagonismo.

No obstante, se conoció que diversas acciones de la histamina, no eran específicamente antagonizadas por los citados fármacos, como ocurría, por ejemplo, con el estímulo de la secreción gástrica (82) entre otras. Esto, condujo a Ash y Schild (83) en 1966 a postular dos distintos tipos de receptores,  $H_1$  y  $H_2$ , para explicar esta actuación dual y, ello también estimuló la investigación en relación al desarrollo de antagonistas, para el receptor  $H_2$ , relacionado con el estímulo de la secreción gástrica.

Una vez que el problema de obtener una antagonista competitivo fué sopesado en términos biológicos, se hizo necesario considerar cómo se podría resolver el problema químicamente. ¿Cómo se podría establecer un punto de partida cuando obviamente no se disponía de un prototipo?. El desarrollo de los antagonistas  $H_2$  surgió de la premisa de que *uno de los mejores caminos para producir un antagonista, es el de investigar compuestos que contengan algunos elementos estructurales de los agonistas naturales*. De esta forma, la modificación sistemática de la molécula de la histamina, permitió el anuncio en 1972 por Ganellin y colaboradores (84) del descubrimiento de un antagonista competitivo específico de los receptores  $H_2$ , la *burinamida*.

No obstante su especificidad, el hecho de no ser suficientemente activo por vía oral, no aconsejó su comercialización, prosiguiéndose las investigaciones en dicho sentido. La aplicación del isosterismo y ciertas consideraciones relacionadas con el tautomerismo del sistema del imidazol, del cual derivaba la burinamida, condujo al desarrollo de la *metiamida* (85,86), un nuevo antihistamínico  $H_2$  que alcanzó ensayos clínicos, pero que fué retirado a causa de la granulocitopenia que originaba. Estos efectos laterales, fueron atribuidos a la presencia en su molécula de un resto de tiourea. La sustitución de dicho grupo por otro de cianoguanidina, isoelectrónico con el de tiourea, condujo finalmente a la *cimetidina* (87,88).

El desarrollo de la cimetidina representa una valiosísima aportación al arsenal terapéutico, por dos razones. En primer lugar, constituyó la primera alternativa farmacológica a la cirugía, para los enfermos de úlcera gástrica, considerada como una de las afecciones con más impacto social y, en segundo lugar, pasó a ser un valioso prototipo para el desarrollo de nuevos fármacos antagonistas de los receptores  $H_2$ , tales como *ranitidina* (89) y otros, no necesariamente relacionados con el núcleo del imidazol.

Entre las nuevas adquisiciones en este campo, aparece la *famotidina* (90), el tercer antihistamínico H<sub>2</sub> comercializado, que ha resultado más potente que la cimétidina y la ranitidina. Administrada una o dos veces al día, es útil en el tratamiento de úlceras gástrica, duodenal y anastomóticas, hemorragia del tracto gastrointestinal superior, exofagitis por reflejo y síndrome de Zollinger-Ellison (91). Análogamente a la ranitidina, está desprovista de efectos antiandrogénicos.

Aunque continúa la investigación orientada a la búsqueda de antagonistas H<sub>2</sub>, una alternativa actual en el desarrollo de nuevos fármacos, para el tratamiento de la úlcera péptica, se orienta a la preparación de compuestos capaces de mantener el equilibrio (existente en el organismo sano), entre los factores agresivos (secreción ácida) y los factores defensivos, los cuales restablecen la integridad de la mucosa. En este sentido, hemos de destacar la reciente introducción en terapéutica de tres análogos sintéticos de prostaglandinas: *emprostil* (92) *misoprostol* (93) y *rosaprostol* (94), activos por vía oral y con acción antisecretora y citoprotectora.

#### *Los antibióticos como prototipos para el desarrollo de nuevos fármacos.*

El grupo de los antibióticos, al igual que ocurre con otros grupos de sustancias naturales, ofrece al químico farmacéutico una fuente permanente de inspiración, al poner a su alcance nuevos compuestos que, o bien se pueden manejar como prototipos o son estructuras modificables por procesos semisintéticos, para obtener derivados que compitan ventajosamente con los productos originales.

Actualmente, se estima que más de 50.000 antibióticos semisintéticos, han sido preparados en los pasados 40 años, después de que el grupo Beecham (Inglaterra) inició su programa de preparación de penicilinas semisintéticas.

Entre los años 1960 y 1970, surgen los primeros antibióticos de semisíntesis: penicilinas, cefalosporinas, rifamicinas, tetraciclinas y lincomicinas y, éste proceso de modificación estructural, no ha cesado en ningún momento. En la actualidad se admite que, aproximadamente, uno de cada 600 antibióticos semisintéticos preparados, es "satisfactorio" y encuentra un lugar en terapéutica.

En la imposibilidad de hacer un análisis exhaustivo del tema, considero a continuación un par de ejemplos que permiten apreciar la significación que corresponde a estas variaciones estructurales, en las moléculas iniciales de los antibióticos naturales, así como las ideas que motivaron tales trabajos.

#### *Antraciclinas antitumorales. Doxorubicina.*

Hace veinte años, nadie podría predecir que un miembro de la entonces bien conocida familia de pigmentos, del tipo antraciclina, llegaría a ser un importante agente terapéutico para el tratamiento del cáncer humano y, que su introducción en terapéutica, estimularía un renovado interés en la quimioterapia del cáncer, la cual cambió, desde un carácter de mero paliativo al de un más profundo tratamiento de la enfermedad.

En enero de 1962 Cassinelli y Orezi (95) aislaron de cultivos de *Streptomyces peucetius*, el antibiótico *daunomicina*, el cual se mostró más activo que otros antibióticos antitumorales, tales como *mitomicina C* y *actinomicina C* (96). Estos resultados estimularon la investigación de la estructura química de la daunomicina, con el objetivo de destacar diferencias estructurales, en comparación con otras antraciclinas conocidas, que pudieran ser consideradas responsables de la exaltación de las propiedades biológicas.

La daunomicina, actualmente conocida como *daunorubicina*, fué descrita como un poderoso inductor de remisión de la leucemia linfoblástica aguda. Con posterioridad a su descubrimiento, Cassinelli aisla en 1967, un nuevo antibiótico del grupo, la *doxorubicina* (adriamicina), que fué químicamente relacionada con daunorubicina y que se mostró más potente, con más amplio espectro antitumoral y, con mejor índice terapéutico que la daunorubicina (97).

La doxorubicina (adriamicina) no está exenta de serios efectos laterales tóxicos, de los que debe ser destacada su cardiotoxicidad, así como también, que su espectro de actividad no alcanza a diversos tipos de cáncer de importancia clínica. Por estas razones, se considera como un buen punto de partida, para el desarrollo de nuevos agentes que posean las siguientes características:

1. Una más baja toxicidad aguda, con una reducción potencial de sus efectos laterales, lo que permitiría aumentar la dosis para alcanzar mayor actividad antitumoral.
2. Actividad por vía oral.
3. Una baja cardiotoxicidad, lo que permitiría tratamientos más prolongados cuando fuera necesario.
4. Un más amplio espectro de actividad, lo que haría posible el tratamiento de tumores, sobre los cuales la doxorubicina se muestra poco activa o inactiva.

Algunas modificaciones estructurales de la doxorubicina, que han conducido a compuestos más aceptables, incluyen la esterificación del agrupamiento hidroximetilo, la epimerización en C<sub>4</sub>', así como la eliminación del grupo OH en dicha posición (98). Tanto el ester n-octanoico de la doxorubicina, como la 4'-desoxirubicina, no presentan cardiotoxicidad. A su vez, la 4'-epidoxorubicina comercializada en 1984 con el nombre de *epirubicina* (99), es también menos tóxica y presenta mejor índice terapéutico que su progenitor la doxorubicina. En la actualidad, están en desarrollo diversos programas de investigación relacionados con las estructuras de las antraciclinas, tanto de tipo semisintético como de síntesis total, con vistas a alcanzar los objetivos antes citados.

El desarrollo de las antraciclinas antitumorales, representa una importante contribución de la química farmacéutica, a la química de los productos naturales y, al campo de la medicina.

### *Antibióticos $\beta$ -lactámicos.*

Sin duda alguna, los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, pioneros en los procesos de semisíntesis dentro de los antibióticos, siguen acaparando la atención de los investigadores, con vistas a obtener antibióticos de amplio espectro, máxima resistencia a la inactivación, fácilmente absorbibles por vía oral y, también más baratos. Diversos representantes de este grupo, pertenecen a los más potentes y valiosos agentes usados en la quimioterapia antibacterial. El desarrollo del grupo expresa, a lo largo del tiempo, cómo una idea enlazada a un abundante trabajo sintético, orientado por la consideración de la actividad biológica, propiedades fisicoquímicas y biotransformaciones de los compuestos ensayados, puede alcanzar su objetivo cuando el experimentador confía en su capacidad y trabaja sin prejuicios.

Los primeros compuestos descubiertos y empleados en terapéutica, lo fueron, como es bien sabido, las penicilinas que irrumpen en el campo terapéutico en los años 40, con la introducción de las penicilinas biosintéticas *bencilpenicilina* (penicilina G) (100) y *fenoximetilpenicilina* (penicilina V) (101), ambas derivadas del ácido 6-aminopenicilánico.

A pesar de la innegable eficacia mostrada por la bencilpenicilina, este compuesto presenta algunos inconvenientes en su administración: *a*) escasa o nula actividad cuando se administra por vía oral; *b*) escasa o ausencia de acción sobre gérmenes gramnegativos, es decir espectro antibacterial reducido; *c*) aumento de resistencia al antibiótico por parte de gérmenes productores de enzima penicilinasas y *d*) excesiva hidrofilia.

Por el contrario, la fenoximetilpenicilina, es bien absorbida por vía oral, y se muestra resistente a la acidez gástrica.

Tales circunstancias, determinan la búsqueda de nuevos compuestos sin los inconvenientes indicados. Se inicia así, un intenso trabajo sintético, que todavía permanece en el campo de la química de fármacos como uno de los más altamente competitivos.

Un momento importante para el desarrollo de las penicilinas semisintéticas, se alcanzó cuando se dispuso del ácido 6-aminopenicilánico (102). Ello permitió operar libremente en el diseño de cadenas laterales para ser, posteriormente, unidas a dicho ácido. Así surgen las primeras penicilinas semisintéticas ácido-resistentes (feneticilina, propicilina, fenbencilina) y penicilinasas-resistentes (metecilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, etc.), ambas clases con un espectro antibacterial análogo al de la penicilina G y, posteriormente, las penicilinas semisintéticas de amplio espectro, entre las que surge como compuesto más representativo, *la ampicilina*, que pasa a ser una de las más importantes penicilinas semi-sintéticas (103).

Uno de los problemas relacionados con el uso clínico de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, tanto en penicilinas como en cefalosporinas, es su insatisfactoria absorción desde el tracto gastrointestinal. Por ello, ha sido un desafío para el químico farmacéutico, obtener compuestos que fuesen bien absorbidos al ser administrados oralmente. Uno de los caminos que ha permitido resolver el problema, se basa en adoptar el concepto de pro-fármaco, es decir, sintetizar derivados que sean mejor y más seguramente absorbidos que

sus progenitores, los cuales, después de la absorción son transformados en el compuesto original.

Los dos agrupamientos libres en la molécula de la ampicilina, el grupo amino y el grupo carboxílico, son susceptibles de derivación. Productos de condensación con compuestos carbonílicos, conducen a los profármacos *metampicilina* y *hetacilina*, entre otros, los cuales son completamente hidrolizados a ampicilina *in vivo*; no obstante, sus propiedades de absorción no son mejores que las de la ampicilina. En contraste, los ésteres de la ampicilina ofrecen mejores perspectivas para obtener compuestos con buena absorción y, en algún caso, fácilmente hidrolizables una vez absorbidos. Entre tales compuestos, figure la *pivampicilina*, desarrollada por el grupo Godtfresen (104), basándose en un trabajo previo de Jansen y Russel (105). El desarrollo de la pivampicilina es ejemplo de un importante esfuerzo en el campo sintético, que se hizo necesario para la producción en gran escala, por un camino que soslayase las posibles interferencias con otras rutas protegidas por patentes.

La pivampicilina no resultó totalmente satisfactoria. La experiencia clínica indicó que, tanto ella como otros ésteres análogos, por ejemplo la *ftalampicilina* (106), producen alteraciones en el tracto gastrointestinal superior, con más frecuencia que la propia ampicilina, posiblemente debido a un efecto irritante sobre la mucosa intestinal. Por ello, se consideró de interés investigar nuevos tipos de ésteres de ampicilina, en orden a encontrar compuestos que fuesen bien absorbidos y, al mismo tiempo, bien tolerados. Surge así la *bacampicilina*, compuesto con buena absorción y menos efectos secundarios que la ampicilina y los ésteres citados.

Una tercera vía seguida para mejorar la absorción de la ampicilina por vía oral, lo constituye la introducción de un agrupamiento hidroxílico en la posición para del resto bencénico. La *amoxicilina* resultante (107), muestra una absorción oral un poco mejor que la correspondiente a la ampicilina.

La necesidad de disponer de compuestos de más amplio espectro, activos frente a *Pseudomonas* y *Proteus*, motivó el desarrollo de otro modelo estructural de penicilinas semisintéticas. Surge así, la *carbenicilina* (108) y otros compuestos con ella relacionados (p.ej. la ticarcilina (109)), que contienen un agrupamiento carboxílico en la posición  $\alpha$  del resto fenilacético.

En 1945, el Prof. Guiseppe Brotzu (110), inicia una investigación sobre la flora microbiana del agua del mar, próxima a la salida de un colector de agua residual, en Cagliari (Sicilia), suponiendo que el proceso de autodepuración del agua podría ser debido, en parte, a antagonismo bacteriano. Brotzu aisla un moho productor de antibióticos que identifica como una cepa de *Cephalosporium*. De los cultivos de dicho moho, aisla dos sustancias que denomina Cefalosporina N y Cefalosporina C. Los estudios estructurales realizados sobre estos productos, permitieron deducir una estrecha analogía entre la cefalosporina N y las penicilinas, identificándose, finalmente, como una penicilina con resto de ácido D- $\alpha$ -aminoadípico en la cadena lateral, muy sensible a los ácidos. Por el contrario, la cefalosporina C resultó estable a los ácidos y aunque sólo mostró una décima parte de la actividad biológica intrínseca de la penicilina N, contra cepas de bacterias penicilina-sensibles, presentaba destacables propiedades biológicas, fundamentalmente, mínima to-

xicidad y aparecía estable a la acción de la penicilinas, de lo que se deducía, en consecuencia, un espectro antibacterial más amplio. La creciente incidencia de infecciones hospitalarias por *Staphylococcus*, debidas a la acción de penicilinasas, fomentó el rápido desarrollo de este nuevo antibiótico  $\beta$ -lactámico.

No obstante, la baja actividad de la Cefalosporina C, no permitió considerarla clínicamente útil. Esta circunstancia hizo pensar en la posible potenciación de la actividad, cambiando el resto del ácido  $\alpha$ -aminoadípico por otros restos acilos, como ya se había hecho en el caso de la penicilina.

El primer problema que se planteó aquí, fué el hecho de que los cultivos de *cephalosporium*, a diferencia de lo que ocurría con los de *Penicillum*, no obedecen a la presencia de precursores, que fueran capaces de modificar la cadena lateral, para obtener así cefalosporinas biosintéticas, las cuales, posiblemente, presentarían una mayor actividad biológica. No quedaba más remedio que recurrir a la solución química.

La primera secuencia sintética útil para la obtención del ácido 7-aminocefalosporánico, fué propuesta por Morin y col. (111), y permitió la obtención del 7-ACA con rendimientos del 50 % aproximadamente. Rendimientos superiores al 80 % fueron alcanzados por el método propuesto por Fechtig y col. (112). Quedaba así abierta la ruta hacia las cefalosporinas semisintéticas. Por otra parte, hemos de recordar que el método de Fechtig, resultó también adecuado para la obtención del ácido 6-aminopenicilánico, como alternativa a la ruta biológica.

La asequibilidad del ácido 7-aminocefalosporánico en grandes cantidades, permitió a Chauvette y col. (113), la preparación de muchas cefalosporinas semisintéticas. De ellas, la *cefalotina*, fué seleccionada para estudios clínicos. Este compuesto se mostró resistente a la penicilinasas y, compartió con la penicilina una baja incidencia de efectos laterales en seres humanos. El nuevo antibiótico, estable a los ácidos, presentó un espectro antibacterial más amplio que el de la penicilina. No obstante, la cefalotina presentaba una mala absorción cuando se administraba por vía oral y, además la administración por vía parenteral, era dolorosa. Esto limitó su uso a la vía i.v. estimulándose así la búsqueda de nuevos compuestos activos y de más fácil administración.

Posteriormente, Abraham y Newton (114) logran la sustitución del grupo acetoxi enlazado al metileno en C<sub>3</sub>, por un resto de piridina, obteniendo potentes antibióticos. A partir de la cefalotina se forma así la *cefaloridina*, la segunda cefalosporina comercializada, con propiedades antibióticas superiores a la cefalotina y administrable por vía intramuscular. Nuevos desarrollos en la serie, realizados por Kariyone y col. (115), abren camino a nuevos antibióticos portadores de sustituyentes heterocíclicos, tales como la *cefazolina*, también con mayor potencia que la cefalotina (116). Según Strominger (117), quién sugirió que los antibióticos  $\beta$ -lactámicos actuaban como agentes acilantes frente a las transpeptidasas, la mayor potencia antibiótica de las cefalosporinas con sustituyentes heterociclo-tio-metil, se debía a su mayor capacidad como grupo saliente, en comparación con el agrupamiento acetoxi.

Este continuado esfuerzo para modificar el grupo acetoxi de la molécula de las cefalosporinas, se traduce en el desarrollo de la *cefalexina* o desacetoxicefaloglicina (118). La *cefaloglicina*, un compuesto de la primera serie de cefalosporinas, había sido obtenida por Spencer y col. en 1966 (119). Aunque la cefalexina resultó menos activa que la cefaloglicina, en contraste con ella, es completamente absorbida por vía oral y causa muy pocos efectos laterales.

La aceptación clínica de la cefalexina, plantea la necesidad de encontrar un método económico para su preparación. Aquí, una vez más, la valoración y explotación de un hecho observado, ofrecen la base para resolver el problema. Morin y col. (120), postulan que la concurrencia de penicilinas y cefalosporinas en el proceso de fermentación, era consecuencia de la bioconversión de una penicilina en una cefalosporina (\*). Dichos autores investigan una reacción ácido-catalizada semejante a la reacción de Pummerer, sobre el sulfóxido de penicilina y dejan abierto el camino a la transformación química del sistema de la penicilina en el de la cefalosporina. Variantes de estas reacciones, investigadas por Chauvette y col. (122), han conducido a rendimientos casi cuantitativos. Hoy en día, la cefalexina es producida a partir de penicilinas naturales.

Permítanme que alcanzado este punto, haga un alto en el desarrollo de las cefalosporinas y vuelva de nuevo a las penicilinas.

Es sabido que la acumulación de conocimientos, tiende a generar "doctrinas". Estas, lógicamente, pueden ser útiles, pero también pueden ser un freno para alcanzar un nuevo progreso. Hasta 1969, la "doctrina" existente, determinaba que los antibióticos  $\beta$ -lactámicos estaban todos contruidos como acilderivados de los ácidos 6-APA y 7-ACA, en este último caso, como tal o, modificado.

A partir de 1969, F.J. Lund, (123) al considerar que la obtención de nuevas penicilinas de interés, por modificación de la cadena lateral ácida, no parecía conducir al éxito, orienta la investigación sobre nuevas penicilinas, por otros derroteros, los cuales, en definitiva, le sitúan ante un nuevo compuesto, el pivaloiloximetil éster del ácido 6  $\beta$ -dimetilaminometilnaminopenicilánico, compuesto líder, que le conduce, a través de un proceso de optimización, a un nuevo antibiótico de interés clínico: el profármaco *pivmecillinan*, el cual, al ser administrado por vía oral, es convertido después de la absorción, en el agente verdaderamente antimicrobial: el *mecillinan*. El nuevo compuesto, es terapéuticamente eficaz para el tratamiento de infecciones del tracto urinario, causadas por bacterias gram-negativas (excepto *Pseudomonas*). Comparado con penicilinas y cefalosporinas, el *mecillinan* muestra un espectro antibacterial y un modo de acción (124), no usuales. Estas diferencias, son atribuidas a su estructura química, la cual es distinta a la de todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos conocidos hasta ese

---

(\*)Recientemente Yoshida y col. (121), han mostrado que la penicilina N es convertida en desacetoxicefalosporina C por el hongo *Cephalosporium*.



momento. Además, el nuevo compuesto, presenta sinergismo con penicilinas y cefalosporinas (125). Este logro, hace desaparecer el mito de la estructura amidica, como condición imprescindible para la actividad de los antibioticos  $\beta$ -lactámicos.

Del máximo interés en el desarrollo de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, es el descubrimiento de las *cefamicinas*. Durante el screening en busca de antibióticos  $\beta$ -lactámicos estables a las  $\beta$ -lactamasas, se encontró una cepa de *Streptomyces lactamdurans* (126), productora de compuestos con grupo 7  $\alpha$ -metoxi, y un grupo carbamoilo sobre el grupo metilénico en C<sub>3</sub>, y cuyas propiedades electrónicas y estéricas protegían al antibiótico del ataque enzimático. El compuesto fundamental del que derivan las cefamicinas, es el ácido 7-aminocefamicínico. Uno de tales compuestos es la *cefamicina C*, compuesto sin valor comercial, pero cuya cadena lateral ácida, puede ser convenientemente modificada para obtener derivados más activos.

El ácido 7-aminocefamicínico, puede ser obtenido a partir de la cefamicina C, por variados caminos. Su acilación por los métodos usuales, conduce a las cefamicinas semisintéticas, entre las que aparece, en primer lugar, la *cefotixina*, con espectro antibacterial más amplio que el de las cefalosporinas y excelente resistencia a la degradación bacterial (127) y, aunque menos activa que cefalotina y cefaloridina contra bacterias gran positivas, es efectiva contra ciertas bacterias gran negativas, resistentes a dichos antibióticos.

La actividad investigadora en el campo de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, no ha decaído en ningún momento y, por ello, el número de compuestos desarrollados en los últimos años es grande, particularmente, en el grupo de cefalosporinas y cefamicinas. Entre los compuestos más importantes que han enriquecido el arsenal terapéutico, deben ser destacados, por su más amplio espectro y menor toxicidad, entre otros, *ceforanida* (128), *cefotetan* (129) y *cefonicida* (130), representantes de la llamada segunda generación de cefalosporinas, y *cefoperazona* (131), *cefbuperazona* (132) y *cefpiramida* (133), de la tercera generación, siendo de destacar en todas ellas su resistencia a las  $\beta$ -lactamasas.

Cabría preguntar: ¿por qué tantos antibióticos  $\beta$ -lactámicos? y ¿por qué es tan intensa la actividad investigadora en este campo?. Sin duda alguna, la constentación la encontraremos en la consideración de ciertas circunstancias biológicas. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, como es bien sabido, bloquean la síntesis de la pared celular al inhibir a las transpeptidasas encargadas de formar la estructura tridimensional del peptidoglicano. Esta inhibición de las transpeptidasas, tiene un efecto letal, pues el péptidoglicano, sin los puentes interpeptídicos, es fácilmente degradable por enzimas diversos y se lisa facilmente.

Los antibióticos que bloquean la síntesis de la pared celular, son los más específicos y más selectivos de todos los conocidos actualmente. No parece por ello, que la mejor solución en el aprovechamiento de los antibióticos, sea el concentrar grandes esfuerzos investigadores, en el desarrollo de agentes que actúen por otros mecanismos, tales como la inhibición de la síntesis de proteínas a nivel del ribosoma bacteriano (como cloranfenicol y aminoglicosidos), porque presentan cierta toxicidad en la mayor parte de los casos.

Por otro lado, recordemos que los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, además de reaccionar con las transpeptidasas, con bloqueo de la transpeptidación, reaccionan también con D,D-carboxipeptidasas, endopeptidasas y  $\beta$ -lactamasas, que son enzimas de degradación.

Las razones pues, que justifican la abundancia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos y, el creciente interés que todavía se mantiene en este sector, se explica por: a) la diversidad de transpeptidasas existente, ya que estas enzimas son diferentes en sus propiedades en las distintas bacterias, por lo que es prácticamente imposible disponer de un  $\beta$ -lactámico que actúe sobre todas ellas; b) porque en lo posible, los antibióticos  $\beta$ -lactámicos deben ser lactamasa-resistentes y c) porque también en lo posible, deben ser inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas.

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos han sido los antibióticos del pasado, (destacando aquí el que han sido los primeros en ser utilizados), lo son del presente y, sin duda, lo serán también del futuro.

#### *Antibióticos $\beta$ -lactámicos "no clásicos".*

En 1976 con el descubrimiento de las *nocardicinas* A y B, aisladas a partir de cultivos de *Nocardia uniformis*, (134), se abre un nuevo grupo de antibióticos  $\beta$ -lactámicos que, por sus diferencias estructurales con los anteriormente mencionados, reciben el calificativo de "no clásicos".

Las nocardicinas han sido identificadas como amidas del llamado ácido 3-aminocardicínico (3-ANA), por analogía con la nomenclatura de los ácidos aminopenicilánico y aminocefalosporánico. En ellas, está presente la secuencia -C-CO-HN-C-CO-N-C-COO- que Hou y Poole han destacado en los antibióticos  $\beta$ -lactámicos clásicos.

Asimismo, también en 1976, los científicos de la Merck (USA), aíslan de cultivos del *Streptomyces cattleya*, un nuevo y potente antibiótico  $\beta$ -lactámico, la *tienamicina*, cuya estructura deriva del sistema de 1-carbapenamo (135); es un compuesto poco estable y de difícil manejo. Por el contrario, su iminoformil derivado, conocido como *imipenem*, es químicamente estable, con un espectro antibacterial más amplio y de mayor potencia, que la mayor parte de las cefalosporinas de la tercera generación. Su combinación con *cilastatina*, un inhibidor de la dehidropeptidasa I, hace aumentar los niveles plasmáticos y urinarios del antibiótico (136).

A su vez Howarth, en 1976, anuncia el descubrimiento del ácido clavulánico, aislado de cultivos de *Streptomyces clavuligerus*, con estructura de 1-oxapenamo (137). El ácido clavulánico, aunque es una  $\beta$ -lactama, muestra solamente una débil actividad antibacterial. Por el contrario, es un potente inhibidor de varios tipos de  $\beta$ -lactamasas procedentes de bacterias gram-positivas y gram-negativas (138), mostrando un marcado sinergismo contra la actividad de muchas bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas, cuando se asocia con amoxicilina, ampicilina, etc.

El conocimiento de estos antibióticos  $\beta$ -lactámicos "no clásicos", impulsa el desarrollo de una nueva línea de investigación sobre productos no relacionados con los ácidos 6-APA y 7-ACA. Entre los derivados semisintéticos, así obtenidos, merece una mención especial el llamado *moxolactam*, una

oxacetalosporina que se puede considerar como ejemplo de una estructura deducida por variación conjuntiva, ya que trata de asociar en su molécula grupos funcionales "activos", presentes en diversos antibióticos  $\beta$ -lactámicos: el grupo p-hidroxifenilo de la amoxicilina, el  $\alpha$ -carboxilo de la carbenicilina, el metoxilo en 7 de la cefoxitina, el grupo tio-tetrazol de cefamandol, así como un oxígeno cíclico (139). Su resistencia a las  $\beta$ -lactamasas es grande, ya que tanto el grupo carboxílico como el 7-metoxilo, le confieren una protección total frente al ataque de los citados enzimas.

Recientemente, han sido conocidas  $\beta$ -lactamas monocíclicas producidas por bacterias, principalmente cepas de *Agrobacterium* (140) y *Pseudomonas* (141). Los investigadores del grupo Squibb, han sugerido la adopción para estos compuestos, del nombre de *monobactamas*, basado en el núcleo del ácido 3-aminomonobactámico (142). En general, estos compuestos, que poseen un resto de ácido 2-oxoazetidona-1-sulfónico, son de escasa potencia antibacterial, aunque dicha potencia puede ser elevada por modificación estructural, como ocurre en el *aztreonan* (143), compuesto sintético en el que la incorporación de un agrupamiento de oxima, le confiere resistencia a casi todas las  $\beta$ -lactamasas y, en muchos casos, esta  $\beta$ -lactama se comporta como un sustrato inhibidor (144).

El descubrimiento de actividad antibiótica en estos nuevos derivados  $\beta$ -lactámicos monocíclicos, ofrece una base para afirmar que la única característica estructural esencial para la actividad de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos es, presumiblemente, la presencia del sistema de azetidona, invalidándose la suposición anterior de la necesidad del sistema bicíclico.

### III.2.2.3 Exploración y explotación de los efectos laterales de fármacos conocidos.

Otro método o camino de búsqueda de nuevos prototipos y nuevos fármacos, se funda en la exploración y explotación de los efectos farmacológicos laterales de fármacos conocidos, en los intentos para potenciar la actividad biológica observada o, en el deseo de alcanzar una disociación de acciones. En este último sentido, ejemplos representativos los constituyen, entre otros muchos, la *testoterona* (145), a cuya acción principal androgénica se une la anabolizante. La variación molecular en este caso, ha conducido al desarrollo de anabolizantes desprovistos de actividad androgénica. A su vez, la *iproniazida* (1-isonicotinil-2-isopropilhidrazina), tuberculostático en el que Zeller u colaboradores (146), encontraron que eran capaz de inhibir la monoaminoxidasa. A partir de 1957, Kline y colaboradores, emplearon este compuesto para el tratamiento de pacientes afectados de depresión, comenzando así la era de los *antidepresivos tipo IMAO*.

Sin duda alguna dentro del contexto que consideramos corresponde al grupo de las sulfamidas un lugar muy importante. Estos compuestos fueron introducidos como antibacteriales en 1935, pero esta acción principal, aparecía acompañada de otras secundarias o laterales cuya explotación ha conducido al desarrollo de nuevos fármacos pertenecientes a diversos grupos farmacológicos, tales como diuréticos, antidiabéticos, antitiroideos, antimaláricos y uricosúricos.

### *Sulfonamidas diuréticas.*

La aparición de acidosis clínica y de orina alcalina después de la administración de *sulfanilamida* (147), la inhibición de la actividad de la anhidrasa carbónica (148), conjuntamente con la demostración de su alta concentración en el riñón (149), estableció la relación causal entre la inhibición enzimática y los cambios fisiológicos observados, sugiriendo que las sulfonamidas podían ser diuréticos potenciales. Esta acción fué demostrada por Schwartz (150) y, la causa de la inhibición era la estrecha analogía estructural que existía entre el grupo sulfonamida libre y el ácido carbónico ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ) a nivel del "sitio" activo del enzima. Posteriores modificaciones de la molécula de la sulfamida, condujeron a la preparación de otras sulfonamidas más activas y menos tóxicas que el prototipo, tales como la *acetazolamida* (151), 300 veces más potentes como diurético que la sulfanilamida. Estos compuestos, fueron los primeros diuréticos no mercuriales conocidos, iniciándose así la nueva era de los modernos *diuréticos*. La acetazolamida, no obstante, no fue considerada el diurético ideal y motivó nuevas investigaciones que condujeron al descubrimiento de nuevos productos activos como diuréticos, (aunque ya no siempre activos como inhibidores de la anhidrasa carbónica), surgiendo así el nuevo grupo de diuréticos de los que es ejemplo, la *clorotiazida* (152) y, en relación con ella, el potente salurético *furosemida* (153). El interés de las modificaciones moleculares realizadas en esta serie, no sólo reside en el aumento del poder terapéutico que se observó en los nuevos compuestos sintetizados, sino también en el hecho de haberse logrado una total separación entre el efecto inhibitor de la anhidrasa carbónica renal y la excreción de electrolitos.

### *Sulfonamidas hipoglucemiantes.*

Las sulfonamidas hipoglucemiantes tienen su origen en una observación casual. En pacientes con fiebre tifoidea, bajo tratamiento con isopropiltiadiazol (derivado de la sulfanilamida), observó Janbon (154) debilitamiento general y desvanecimientos. La investigación reveló en los pacientes tratados con dicho compuesto, la existencia de diversos grados de hipoglucemia que, Loubatieres (155) demostró que era debido al estímulo del páncreas para segregar insulina.

Los estudios de correlación estructura-actividad, llevaron a la conclusión de que el efecto observado, estaba relacionado con la presencia en la molécula del fármaco, de un agrupamiento semejante a la urea, deduciéndose así que la estructura fundamental para alcanzar actividad como hipoglucemiante, era  $\text{Ar-SO}_2\text{-HN-CO-NH-R}$ . La investigación culmina con la introducción en la práctica clínica en 1955 de la *carbutamida*, (156) a la que siguen, entre otras la *tolbutamida* (157), *cloropropamida* (158) y *acetohexamida* (159), habriéndose así un nuevo capítulo en el tratamiento de la diabetes y, que tanto ha contribuído a suavizar el tratamiento antidiabético en numerosos pacientes.

#### III.2.2.4 Variaciones para potenciar la actividad biológica observada. *Las butirofenas neurolépticas.*

En 1954 Hansen y col. (160) iniciaron el estudio del grupo de la 4-fenilpiperidina con el objetivo de aumentar la potencia analgésica de la meperidina o petidina. Contrariamente a lo que se consideraba en aquel tiempo, que un pequeño grupo alquilo sobre el átomo de nitrógeno terciario era óptimo para la actividad analgésica (161), en 1956 fué sintetizado el derivado (R951) de la normeperidina, con resto de propiofenona, demostrándose que era cien veces más potente como analgésico que la meperidina (162, 163, 164). La nueva modificación estructural de R951, conduce al compuesto R1187, en el que se encontró una acción mixta, con propiedades semejantes a la morfina y la clorpromazina (fármaco este último neuroléptico). El compuesto R1187 no alcanzó la categoría de fármaco, pero constituyó una piedra angular en el desarrollo de neurolépticos útiles. La sustitución del grupo carboxilato del resto de meperidina por un grupo hidróxilo, conduce a una exaltación de la actividad semejante a la clorpromazina con un concomitante descenso de la actividad de tipo morfínico. Así se deriva el compuesto R1472, con resto de butirofenona, cuya optimización, a través de la preparación de varios centenares de cetonas análogas, condujo, finalmente, al compuesto R1625, ahora conocido como *haloperidol* (165), el cual resultó ser más potente y con actividad neuroléptica superior a la de clorpromacina.

El advenimiento del aloperidol y compuestos análogos, inició una época de máxima actividad en el campo de los antipsicóticos, apareciendo otros compuestos del grupo tales como *meperona*, *azaperona*, (166) *fluanisona* (167), *trifluoperidol* (168) y *pipanperona* (169), compuestos corrientemente empleados en medicina humana y veterinaria. A estos compuestos, siguieron otros muchos, culminándose la serie con la aparición de la *pimozida* "prototipo de una nueva serie de fármacos neurolépticos de larga duración" adecuado para el tratamiento oral de pacientes psicóticos, con una sola dosis diaria de 2,4 mg. (170).

#### III.2.3. *El isosterismo en la variación molecular.*

Uno de los recursos que se han mostrado más rentables en la aplicación del método de las variaciones moleculares, ha sido el del isosterismo.

El concepto de isosterismo, ha evolucionado y cambiado significativamente a lo largo de los años transcurridos desde su introducción por Langmuir en 1919 (171).

Buscando una correlación que explicase la similitud en las propiedades físicas de moléculas no isómeras, Langmuir definió los *isósteros* como moléculas o iones que contiene el mismo número de átomos y electrones de valencia, los cuales por ser isoelectrónicos, es decir con la misma carga neta, poseen propiedades físicas similares.

En 1925 Grimm (172) amplía el concepto de isosterismo al enunciar su "ley del desplazamiento de hidruro". En el concepto de Grimm, los grupos

que se comparan tienen el mismo número de electrones, pero diferente número de átomos.

El conocimiento de que los electrones situados en el orbital más externo intervienen en la mayor parte de las reacciones químicas, lleva a Erlenneyer, en 1948 (173) a redefinir a los isómeros como "átomos, iones o moléculas en los que las capas periféricas de electrones se pueden considerar que son idénticas".

Actualmente, otros grupos de átomos, los cuales imparten propiedades físicas o químicas similares a una molécula, debido a similitud en tamaño, electronegatividad o estereoquímica, son referidos con frecuencia bajo el término general de isómeros. El antiguo conocimiento de que benceno y tiofeno eran iguales en muchas de sus propiedades, condujo al término de "equivalentes de anillo" para el grupo vinileno (-CH=CH-) y el azufre bivalente (-S-) (174). De esta manera, el grupo vinileno en un anillo aromático se puede reemplazar por otros átomos isostéricos con el azufre, tales como oxígeno (en furano) o NH (en pirrólo).

El progresivo y más profundo conocimiento acerca de la estructura de las moléculas ha aconsejado poner menos énfasis en el número total de electrones, fijando más la atención en otros aspectos de las moléculas. Por esta razón una definición menos rigurosa de isómeros, relaciona aquellos grupos que poseen configuraciones estéricas y electrónicas similares, al margen del número de electrones implicados (175). Ejemplos de tales pares isostéricos son los grupos carboxilato y sulfonamido, los grupos cetona y sulfona, así como el cloro y el grupo trifluorometilo.

A causa de la frecuente aplicación del concepto de isosterismo en estudios relativos a la acción sobre sistemas biológicos de compuestos estructuralmente relacionados, Friedman introduce en 1950, (176) el término de *bioisómeros* para definir a compuestos que tienen el mismo tipo de actividad biológica. La actividad antagónica encontrada en algunas estructuras análogas, se incluyen también en esta definición.

El término "isosterismo no clásico" es usado indistintamente con el de bioisosterismo, particularmente en relación con los isómeros que no contienen el mismo número de átomos, pero que se muestran similares en algún tipo de parámetros de importancia en la serie que se considera. Así por ejemplo, los dos siguientes compuestos, estimulantes  $\beta$ -adrenérgicos, 1-(*m*-hidroxifenil)-2-metilaminoetanol ( $pK_a=9,6$ ) y 1-(*m*-metilsulfonamido)-2-metilaminoetanol ( $pK_a=9,1$ ), tienen actividad biológica similar y presentan valores de  $pK_a$  comparables, lo que da pie para considerar que el agrupamiento  $CH_3-SO_2NH-$  es bioisostérico del grupo -OH.

Aunque no parece posible conseguir el isosterismo puro (177), los principios del isosterismo y bioisosterismo han sido ampliamente empleados para modificar la estructura de compuestos con actividad biológica. Este tipo de sustitución origina no solamente compuestos cuya acción es idéntica a aquella del compuesto tomado como modelo, sino que también puede ser antagónica.

El concepto de bioisosterismo ha sido analizado en numerosas revisiones como las de Schatz (178), Burger (179), Foye (180), Korolkovas (181),

Ariens (182) y Hansch (183). Posteriormente Thornber (184), en una amplia revisión del tema sugiere nuevas técnicas para la explotación del concepto del bioisosterismo, en la modificación molecular, expresando su argumentación en la forma matemática usada por Hansch (185) e incluyendo numerosos ejemplos de aplicación. Finalmente, Lipinski, en una reciente revisión del tema (186), destaca que la principal tendencia actual en el área del bioisosterismo, reside en el creciente interés en los compuestos que contienen subunidades o grupos "isósteros no clásicos", los cuales no contienen el mismo número de átomos, pero que resultan similares a un parámetro principal. Como destacó anteriormente Thornber (184), los efectos similares en dos grupos funcionales, no implica, necesariamente, el solapado de átomo sobre átomo. Lipinski incluye en su revisión numerosos ejemplos de relaciones bioisostéricas, agrupadas por clases funcionales.

El bioisosterismo es parte del espectro de las relaciones cuantitativas estructura actividad (QSAR), de acuerdo con Hansch (187) y Martin (188). El concepto puede ser de la máxima utilidad al químico farmacéutico en las primeras etapas de la búsqueda de prototipos, cuando faltan suficientes datos para permitir un análisis cuantitativo, o hacia la conclusión de la síntesis en una serie, cuando se desea el tránsito a una nueva serie (188). En teoría, el bioisosterismo ayuda a computar la búsqueda de subestructuras, especialmente como un medio para desarrollar nuevos prototipos o nuevas series (184). Diversos compuestos de interés terapéutico han sido desarrollados por aplicación de los principios del isosterismo.

### III.3 *Modulación de la farmacocinética.*

El eficaz aprovechamiento del método de las variaciones moleculares, para propósitos de programación o diseño de nuevos compuestos farmacológicamente activos, requiere el previo conocimiento de las propiedades fisicoquímicas, así como de los factores electrónicos y estéricos de la molécula orgánica.

La respuesta biológica a un fármaco, es una consecuencia de su interacción con el organismo vivo, provocando algún cambio en el proceso biológico del mismo. Puesto que las propiedades fisicoquímicas, están en relación, con el proceso por el cual los fármacos llegan y son concentrados en sus puntos de acción es importante conocer la extensión en la cual una determinada propiedad se correlaciona con la actividad biológica observada. La posible importancia de propiedades como solubilidad, coeficientes de reparto, grado de disociación al pH de los fluidos del organismo, etc., han merecido la atención del químico interesado en la búsqueda de nuevos fármacos.

En efecto, es en la consideración de las variaciones de las propiedades fisicoquímicas de una serie de compuestos orgánicos, donde se encuentra, sin duda una base sólida y racional para el diseño de nuevos fármacos, por optimización de un compuesto prototipo. Para tales propósitos, se pueden emplear diferentes parámetros, pero los empleados corrientemente, son los parámetros electrónicos, estéricos y los relacionados con la solubilidad.

*Solubilidad* Los parámetros de solubilidad, llamados también *hidrofó-*

*bicos o lipofílicos*, miden el grado de atracción de los fármacos por las regiones lipídicas o hidrofóbicas de las macromoléculas y, están relacionados, por una parte, con el transporte desde la exobiofase al compartimento del receptor y, por otra, con la posibilidad de atracción con las regiones hidrofóbicas del receptor. La correlación entre solubilidad y actividad biológica, se conoce en muchas series de compuestos orgánicos, y el conocimiento de la naturaleza hidrofílica (grupos polares) o lipofílica (grupos no polares) de los diversos agrupamientos químicos, permiten orientar la variación molecular, en el sentido que se estime conveniente. Los datos de solubilidad se encuentran recogidos en diversas tablas y publicaciones.

*Carácter isolipofílico.* El desarrollo, desde 1963, de un gran banco de datos de coeficientes de partición determinados experimentalmente, ha sido descrito por Hansch y col (189). Hansch, había encontrado numerosas series de compuestos para los que se puede derivar una relación lineal entre la actividad biológica y su coeficiente de partición en el sistema n-octanol/agua. El hallazgo de que los coeficientes de partición pueden ser calculados por asignación de constantes de grupo o fragmentos, ha permitido la rápida expansión en este campo, pudiendo agruparse conjuntamente fragmentos estructurales, que aportan contribuciones equivalentes al coeficiente de partición. Tales grupos, pueden ser llamados "isolipofílicos" y pueden ser intercambiados en un proceso de variación molecular.

El coeficiente de reparto es el parámetro fisicoquímico más utilizado en los estudios de relaciones estructura química-actividad biológica (190).

*Carácter isoelectrónico.* El desarrollo de la teoría electrónica, permite explicar los diferentes efectos de los grupos electrón-donantes y electrón-aceptantes y, su conocimiento es de gran valor en los estudios de relaciones estructura-actividad. A finales de la década de los 30, Hammett, introdujo el concepto de constante "sigma" para los sustituyentes unidos al anillo aromático (191), y, al igual que ocurre con los coeficientes de partición, se han podido preparar tablas de valores de determinados grupos, pudiendo establecerse igualmente relaciones de equivalencia, que han conducido al establecimiento del carácter "isoelectrónico". Análogas constantes de sustituyentes para compuestos no aromáticos, han sido estudiadas por Taft (192). Ambos índices electrónicos, son ampliamente usados en los estudios de relaciones cuantitativas, estructura-actividad (QSAR).

Sobre la base de la modulación farmacocinética, han sido modificados diversos fármacos con el objetivo de alcanzar, por ejemplo, una localización determinada. Así, la molécula lipofílica del sulfatiazol, capaz de atravesar la barrera intestinal, se transforma en un compuesto más hidrofílico (p. ej. sucinil-sulfatiazol o ftalil-sulfatiazol), que al mantenerse al nivel del tracto intestinal, actúa en el mismo, ejerciendo allí su actividad antibacteriana. La administración de un fármaco de suplencia como es la dopamina, fármaco que no atraviesa la barrera hematoencefálica, se resuelve empleando la L-dopa, la cual sí que atraviesa dicha barrera, siendo después, descarboxilada por la aromático aminoácido descarboxilasa, originando dopamina que queda dispuesta ya, para su actuación como neurotransmisor. Los antihistamínicos H<sub>1</sub> terfenadina y astemizol, antes citados, no producen somnolencia, un efec-



to secundario típico de los antihistamínicos  $H_1$ , al no atravesar la barrera hematoencefálica.

Un destacado ejemplo de, cómo una propiedad fisicoquímica (obviamente consecuencia de la estructura), tal como los valores de  $pK_a$ , resulta fundamental para que se alcance una determinada acción biológica, lo constituye el grupo de los fármacos antiinflamatorios no esteroídicos, un sector de la investigación de fármacos, en el que todavía se centra un intenso esfuerzo investigador. En relación con él, se considera a continuación el desarrollo del *piroxicám*.

### *Desarrollo del piroxicám.*

Cuando el *piroxicám* empieza a ser asequible a la profesión médica en Europa, en 1979, representó la culminación de más de 15 años de investigación (193). Las propiedades del *piroxicám* representan, no sólo cualidades deseables, alabadas después de su evaluación farmacológica y clínica, sino también el diseño racional de un compuesto considerado con alta probabilidad de poseer cualidades idealmente adecuadas para el tratamiento de la inflamación crónica. El *piroxicám*, representa el primer miembro clínicamente útil de una nueva clase de benzotiadiazinas-carboxamidas, conocidas como "oxicáms", en creciente desarrollo (194).

Es motivo de considerable satisfacción, ver en el *piroxicám* una ordenada progresión, desde una idea desarrollada a través de la síntesis química y relaciones de estructura-actividad, en varias clases de compuestos químicos, para llegar finalmente a un candidato clínico con los atributos que se consideraban deseables al comienzo del programa: la combinación de la alta potencia y larga vida media, lo que permite el mantenimiento de niveles plasmáticos terapéuticos a través de una simple dosis diaria. En su desarrollo, se combina la consideración de propiedades fisicoquímicas, isosterismo y estudios metabólicos.

En los comienzos de la década de los sesenta, cuando se inicia su programa de desarrollo, se manejaban en la clínica tres fármacos antiinflamatorios no esteroídicos, ampliamente usados para el tratamiento de enfermedades de las articulaciones y músculo esquelético, en humanos: la *aspirina* (9), la *fenilbutazona* (195) y la *indometazina* (196). A estos compuestos, pronto se añadió el *ibufenac* (197) prontamente retirado y eventualmente reemplazado por el *ibuprofen* (198), primer ejemplo de lo que seguidamente iba a ser una serie en creciente desarrollo, los ácidos arilalcanoicos. En general, estos compuestos son de baja o, moderada, potencia en el hombre y los animales, con una vida media corta, además de la necesidad de una administración diaria en dosis repetidas; las concentraciones plasmáticas de estos compuestos se sitúan por debajo de las dosis eficaces y, ocasionalmente, alcanzan niveles asociados con la toxicidad. Tales características, obviamente, resultan indeseables para el tratamiento de una enfermedad crónica, como es la artritis reumatoidea.

Por consideración de los fármacos existentes, fueron disociadas o discernidas importantes propiedades fisicoquímicas asociadas con la actividad antiinflamatoria. Estructuralmente consideradas, las moléculas de tales compuestos parecían capaces de asumir una forma plana, la cual fue considerada

adecuada par alcanzar un encaje apropiado sobre el "sitio" receptor de un enzima (desconocido en aquel tiempo). Su acidez era tal que, a pH fisiológico, las moléculas aparecían largamente ionizadas.

Buscando compuestos potencialmente activos, con adecuada acidez, en grupos distintos a los ácidos carboxílicos Wisemann y col., centran su atención en las  $\beta$ -dicetonas, iniciando el programa con el estudio de aril indandionas, en un intento de separar las actividades antiinflamatoria y anticoagulante, alcanzando compuestos prometedores, aunque no definitivos. La posterior sustitución de uno de los grupos carbonilo, por un grupo  $\text{SO}_2$ , conduce a derivados del sistema del benzo (b) tiofeno, en los que la separación de acciones es más manifiesta. No obstante, la vida corta, así como la existencia de reacciones adversas, sugieren la modificación de la estructura inicial, preparándose una serie de dioxo-isoquinolinas con agrupamiento de carboxanilida, entre las que aparece un compuesto, el *tesicán*, que marca la primera etapa satisfactoria en la investigación de un agente antiinflamatorio no esteroídico con alta potencia y larga vida media. No obstante, la potencia alcanzada no se considera aún suficiente como para satisfacer la aspiración inicial del programa.

La nueva sustitución de uno de los carbonilos en el *tesicán*, por el agrupamiento  $\text{SO}_2$ , conduce a derivados de benzotiazina 1,1-dióxido, con grupo carboxamida en posición 3, serie en la que los estudios de relaciones estructura-actividad, seleccionan al piroxicám como un compuesto que cumple las aspiraciones originales del programa.

#### IV LAS RELACIONES CUANTITATIVAS ESTRUCTURA-ACTIVIDAD (QSAR) EN EL DISEÑO DE FARMACOS.

El método tradicional de búsqueda de nuevos compuestos medicinales, ha sido a veces descrito como "ruleta química". Como hemos visto, se elige una estructura química biológicamente activa, y se procede a su posible optimización por variaciones estructurales basadas en el isosterismo y la intuición del investigador, hasta alcanzar un compuesto, más activo y, menos tóxico, que el prototipo elegido. A medida que aumenta el número de compuestos sintetizados, se hace posible la construcción de un mapa del probable "sitio" receptor, y la selección de los nuevos compuestos a sintetizar se hace más racional. De esta forma, también, se va penetrando en el conocimiento de las llamadas relaciones entre la estructura química y la actividad biológica, conocida con las siglas SAR.

Hasta, aproximadamente, la mitad de la presente centuria, la mayor parte de estos estudios de correlación, fueron de carácter empírico y cualitativos, pero los trabajos más recientes sobre el tema, muestran un enorme esfuerzo para alcanzar correlaciones cuantitativas y con capacidad de predicción. En paralelo al creciente interés en el estudio y conocimiento de las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR), se ha producido un notable avance en las técnicas de trabajo, que han permitido precisar los factores fisicoquímicos asociados, con un particular mecanismo biológico. El

último propósito es obvio: predecir la actividad biológica de una molécula, previamente a su evaluación e, incluso, a su síntesis, con objeto de reducir el costo, tanto del trabajo sintético como del screening biológico. Por otro lado, se confía en que la aplicación de los estudios QSAR, permitirá elucidar los mecanismos implicados en la interacción de una determinada molécula con un sistema biológico.

Alrededor de 1865-1870, Crum-Brown y Fraser, publicaron lo que se puede considerar como el primer estudio de las relaciones estructura-actividad en moléculas de interés farmacológico (199). Dichos autores, mostraron que la modificación química gradual en la estructura molecular de una serie de compuestos, producían algunas diferencias importantes en sus acciones. Sobre la base de sus observaciones, dichos autores postulan que la "acción fisiológica de una molécula dada, es función de su constitución química".

Richet, en 1893, al estudiar las toxicidades de una diversidad de alcoholes, éteres, aldehidos y cetonas, concluyó que su grado de actividad, estaba relacionado inversamente con su solubilidad en agua (200). Este postulado, conocido como "regla de Richet", fué la primera evidencia experimental publicada de la teoría de Crum-Brown y Fraser. Meyer y Overton aplican el trabajo de Richet a otras series de compuestos orgánicos líquidos (201-204). Estudiando la solubilidad en lípidos de congéneres que poseían actividad narcótica, observaron que la mayor parte de los compuestos extraños al organismo, penetran las células de los tejidos cuyas membranas son de naturaleza lipídica, destacando que el paso a través de estas barreras y la actividad narcótica resultante, discurrían paralelamente con su distribución en un sistema aceite-agua. Estos resultados, fueron teorizados para simular la situación *in vivo* de la distribución de un fármaco, entre una exobiofase acuosa y un "sitio" receptor lipofílico, y representa la primera correlación publicada entre los coeficientes de partición y la actividad biológica.

En 1904, Traube (205), realiza nuevas investigaciones acerca de las relaciones entre otras propiedades fisicoquímicas de los compuestos orgánicos y la respuesta biológica obtenida. En estudios sobre diversos agentes narcóticos, Traube observó una relación lineal entre la tensión superficial de los compuestos y su actividad narcótica. Aproximadamente, al mismo tiempo, Fühner (206-208) estudió la correlación cuantitativa entre la acción narcótica de un grupo diverso de moléculas, con el número de átomos de carbono presentes en el compuesto. En 1917 Moore (209,210), introduce otros parámetros fisicoquímicos en estudios de relaciones estructura-actividad, observando que la toxicidad para los insectos, de los vapores de un compuesto orgánico, se correlacionaba, directamente, con su volatilidad o punto de ebullición (209-212).

Una segunda etapa en los estudios cuantitativos de relaciones estructura-actividad (QSAR), fué hecha por Ferguson en 1939 (213), al demostrar una interrelación entre muchos de los primeros trabajos realizados sobre esta cuestión. Valiéndose de expresiones matemáticas, fué capaz de calcular las concentraciones tóxicas de una serie de compuestos, a partir de la solubilidad y la presión de vapor.

Quizá una de las contribuciones más importantes para el desarrollo de

los modelos QSAR, fué publicada en 1956 por Bruice, Kharasch y Winzler (214). Su modelo matemático empírico, fué aplicado a la correlación de actividades de tipo tiroxina, de una serie de congéneres, obteniendo una excelente correlación entre la actividad biológica observada y la calculada.

Contribución importante al tema que nos ocupa, es el desarrollo de un modelo QSAR, por Free y Wilson, en 1964 (215), ejemplo de lo que se considera como un modelo de "de novo". Los autores, definen la respuesta biológica, como la suma de las contribuciones parciales a la actividad de los grupos sustituyentes, más la actividad media total atribuible a la estructura fundamental. El principal proposito de este tratamiento, es el ordenar las actividades biológicas de los grupos sustituyentes, expresivos de las posibles relaciones estructura-actividad, y el predecir los compuestos de la serie no ensayados, y, posiblemente, no sintetizados, a los que correspondería la mayor potencia. Tales compuestos serían utilizados para nuevas investigaciones.

Otra aproximación a los modelos matemáticos QSAR, lo constituye el modelo LFER, conocido como extratermodinámico (216). Tomando como base la ecuación de Hammett (217, 218) para la velocidad de hidrólisis de derivados del ácido benzoico, varios investigadores han aplicado una ecuación Hammett LFER a diversos sistemas biológicos, con limitado éxito (219, 220, 227). Sobre la base de estas aplicaciones, Hansen propuso en 1962, "una ecuación biológica de Hammett" (228).

En adición a estos ensayos de desarrollo de modelos QSAR, también ha sido aplicada al estudio de compuestos químicos de interés biológico (229, 230, 231), una aproximación teórica de química cuántica. Desde 1950, Pullmans y col. han hecho la mayor contribución en la aplicación de la química cuántica al fenómeno biológico. Su trabajo sobre el posible mecanismo de la carcinogénesis química, en términos de propiedades de mecánica cuántica, así como calculos sobre los constituyentes de los ácidos nucleicos, han aportado muchos de los fundamentos sobre los que se asienta el creciente interés en biología cuántica (231, 234). En 1965, Neely, dió a conocer la utilidad de la teoría de los orbitales moleculares en los estudios de correlación con la actividad biológica (235). Este autor, ilustró el uso de los cálculos de química cuantica, como ayuda en la correlación de la estructura submolecular de determinados organofosforados y carbamatos, con su potencia inhibidora para la colinesterasa (235). Kier, también ha sido pionero en la utilización de estas técnicas, para postular la naturaleza de varios receptores biológicos. Mediante cálculos de mecánica cuántica, ha predicho las conformaciones preferidas de moléculas aisladas de interés biológico, relacionando la conformación de más baja energía, a la naturaleza de los receptores, correspondientes (236-242).

Estos métodos, han sido usados en la aproximación fisicoquímica al diseño de fármacos. Aplicando el modelo matemático de Free y Wilson (215) Beasley y Purcell, han dado el primer ejemplo de una predicción satisfactoria de la actividad de un compuesto, tres años antes de su síntesis (243), al informar, en 1965, de la potencia inhibitoria calculada para la butirilcolinesterasa, del hidrobromuro de 1-decil-3-(N-etil-N-metil-carbamoil) piperidina (244). Cuando este compuesto se sintetizó, tres años más tarde, y se evaluó

bioquímicamente, se encontró que los valores de la respuesta, observados y calculados, concordaban dentro de los límites del error experimental (243).

La combinación de cálculos de mecánica cuántica con el modelo LFER, ofrecen una visión más amplia en los estudios de la actividad de fármacos. Diversos índices obtenidos a partir de cálculos de mecánica cuántica, han sido utilizados en estas correlaciones (245, 246, 247-249). Así, Neely y col., han obtenido excelentes correlaciones entre la energía del orbital molecular más alto ocupado (HOMO), con la potencia analgésica, en una serie de imidazolininas (250). Wohl ha combinado varios parámetros mecánico-cuánticos en un estudio LFER, en relación con la potencia biológica y estructuras electrónicas, de varios derivados de benzotiadiazina. La correlación cuantitativa que obtuvo, le condujo a ciertas postulaciones relativas a los centros de las moléculas, supuestos más responsables de la respuesta biológica, de acuerdo con sus propiedades electrónicas (248, 249).

Un área adicional, de creciente interés en la aproximación fisicoquímica al diseño de fármacos, corresponde al empleo de métodos instrumentales, en particular la resonancia magnética nuclear. Iniciada por Jardetzky y col., (251, 252), el uso de la RMN en estudios de interacciones fármaco-receptor a nivel molecular, se muestra prometedor. La resonancia magnética nuclear ha sido aplicada, satisfactoriamente, al estudio de interacciones enzima-sustrato (253, 254), interacciones enzima-coenzima (255) e, interacciones enzima-inhibidor (254, 256).

En los últimos años, se han publicado numerosos trabajos relacionados con esta aproximación fisicoquímica, para el diseño de análogos de síntesis con actividad farmacológica, cuya reseña se sale ya de los límites de este discurso.

Aunque el progreso en el desarrollo de métodos QSAR es todavía lento y no ha resuelto definitivamente el problema del diseño de fármacos, es, sin embargo, un camino prometedor por el gran potencial que encierra.

## V LA ESTEREOQUIMICA Y SU PROYECCION EN TERAPEUTICA

Como es bien sabido, nuestro entorno biológico es un mundo disimétrico. La actividad óptica es considerada esencial para la formación de las cadenas plegadas de las proteínas y la vida, probablemente, no sería posible sin la existencia de las moléculas disimétricas, las cuales son legión entre los compuestos naturales.

La idea de que la especificidad estereoquímica es un factor clave en la acción biológica, tiene sus orígenes en las observaciones de Biot (1815) y Pasteur (1848). Fue Biot, el que primero observó que algunas sustancias orgánicas, eran capaces de desplazar el plano de la luz polarizada, pero es sin duda a Pasteur, al que se debe el comienzo del estudio del estereoisomerismo en su relación a la actividad biológica.

Entre 1920 y 1940, farmacólogos como Cushny (257) y Easson y

Stedman (258), comienzan a especular acerca de las causas de las diferencias de actividad entre los estereoisómeros. La apreciación por Cushny, de la incidencia de los factores estereoquímicos en las reacciones biológicas, ofrece la base del actual conocimiento acerca de su importancia. Cushny fué también el primero en propugnar el exámen biológico de las moléculas enantiomórficas, para descubrir lo que él llama "la configuración de los tejidos". Algunos años más tarde, Pauling (1956), llega a la conclusión general de que "la complementariedad en la estructura molecular, de alguna manera, es responsable de la especificidad biológica en general". La idea de la complementariedad estereoquímica en la estructura de las moléculas reaccionantes, simplemente, una extensión y refinamiento del concepto de "encaje molecular" entre fármaco y receptor, al que hemos hecho referencia anteriormente.

Los requisitos estructurales para la actividad biológica, se asocian, con frecuencia, con la existencia de uno o más centros quirales en un fármaco. Pero aunque la quiralidad no es un requisito fundamental para la actividad biológica, la presencia de un centro quiral en fármacos o agentes bioactivos en general, se traduce en importantes diferencias entre los enantiómeros, tanto en su actividad como en su transformación metabólica y, en su farmacocinética, por lo que, desde un punto de vista biológico, los enantiómeros se deben considerar como sustancias diferentes.

### *Fármacos quirales.*

De los diversos tipos de fármacos estereoisoméricos, los fármacos quirales son, sin duda, los más importantes.

Normalmente, en la síntesis orgánica, los fármacos quirales se obtienen en forma de mezclas de ambos enantiómeros, en proporción del 1:1, es decir, como racematos y, como tales mezclas racémicas, son con frecuencia comercializadas, fundamentalmente por razones económicas. Los profesionales que utilizan estas sustancias, aplican, sin saberlo, mezclas de compuestos (los estereoisómeros), en la suposición de que se trata de un solo compuesto.

Debido a la estereoselectividad de acción, solo uno de los compuestos de la mezcla o racemato, es verdaderamente activo. Hace aproximadamente diez años (259), fueron introducidos los términos "eutómero" para designar el compuesto más activo, desde el punto de vista biológico, y el de "distómero" para el menos activo o, inactivo. La relación de potencias, se denomina *relación eudísmica* (ER) y su logaritmo, el *índice eudísmico* (EI), es proporcional a la diferencia en sus energías de enlace. La comparación del índice eudísmico frente a la afinidad del eutómero, permite deducir el llamado *cociente de afinidad eudísmica* (EAQ), el cual, representa el incremento en la discriminación quiral por unidad de incremento en la afinidad y, como tal, puede ser tomado como una medida cuantitativa de la estereoselectividad exhibida por un determinado receptor hacia una serie de ligandos estereoisoméricos. Su integración en los estudios cuantitativos de relaciones estructura-actividad (QSAR), amplía el espectro de estas relaciones a las "relaciones cuantitativas estero-estructura-actividad" (QSSAR).

*Isómeros de lastre.*

El isómero inactivo de una mezcla de enantiómeros, se debe de considerar como una impureza o "isómero de lastre", el cual no contribuye a la acción biológica deseada. Sin embargo, puede contribuir, potencialmente, a los efectos indeseables, efectos colaterales y, a la toxicidad, por lo que el olvido de la presencia del isómero inactivo, constituye un riesgo potencial. Su presencia en los fármacos comerciales implica una polución química, del medio interno del hombre y de los animales, y esta situación, debe ser conocida y valorada. Teniendo en cuenta la preocupación existente, y por otro lado justificadísima, acerca de la polución química, es un asunto preocupante esta notable discrepancia que existe entre, por una parte, el elevado grado de pureza exigido para los productos farmacéuticos y, por otra parte, la aceptación de la presencia de impurezas del orden del 50 % en los racematos empleados directamente en las formulaciones farmacéuticas. Como mínimo, se podría exigir que tales impurezas no fuesen nocivas.

El hecho de que solamente uno de los enantiómeros es responsable de la acción biológica deseada y que pretendemos aprovechar, no ofrece ninguna garantía para que el compuesto inactivo en el mismo sentido, es decir el distómero, no sea activo de otra manera diferente. Existe una abrumadora abundancia de pruebas, que demuestran que los distintos isómeros no sólo difieren en su actividad, sino que también se metabolizan y distribuyen a menudo, a través de distintas vías y a diferentes velocidades (260) y de que el transporte, unión a proteínas, almacenamiento en gránulos, etc., son procesos estereoselectivos (261). Ariëns (262), insiste en que las implicaciones que presenta la estereoquímica en farmacocinética, tienen consecuencias para la monitorización terapéutica en pacientes que se tratan con fármacos racémicos, e insiste, en que las conclusiones que se basan en la relación existente entre el regimen de dosificación y la concentración sistémica de lo que se considera, erróneamente, como "agente activo en terapéutica", y en la relación posterior con la respuesta terapéutica, son engañosas.

Por ello sorprende que en muchos países, la autoridades responsables del registro de fármacos, aceptan impurezas de un 50 %, y hasta superiores, tratándose de isómeros inactivos. Por el contrario, nunca aceptarían la presencia de un subproducto del fármaco en una proporción de 50 %, incluso en el caso de que se considerase seguro. Las autoridades van, todavía, más lejos: exigen datos farmacocinéticos sobre los fármacos racémicos que autorizan, lo que puede considerarse como un despilfarro de tiempo y dinero, así como una muestra de incompetencia. En aquellos casos en que los racematos sean reemplazados en el futuro, por productos puros, (los enantiómeros activos o, eutómeros), la petición de repetir completamente la investigación preclínica y clínica, podría poner de manifiesto una falta de conocimiento acerca de las implicaciones estereoquímicas en el desarrollo de fármacos y en su aplicación.

Así pues, parece llegado el momento de considerar la comercialización de fármacos quirales, verdaderamente puros. A este respecto, se están desarrollando rápidamente técnicas de separación de isómeros y de síntesis este-

reespecíficas (263), lo que, sin duda, situará el problema en sus verdaderos límites.

## VI LA BIOQUIMICA EN EL CAMPO DE LOS FARMACOS

La demostración en 1940 por Wood y Fildes (264) del antagonismo metabólico, marca la entrada de la Bioquímica en el campo de los fármacos. La química de los fármacos, ha experimentado muchos cambios desde los antiguos tiempos de los "herboristas", pero ninguno ha sido tan significativo y fructífero, como el relativo a la elucidación del mecanismo molecular de la acción de los fármacos a nivel bioquímico, el cual ha experimentado un rápido desarrollo en los últimos años. Solo el total conocimiento de tales mecanismos, nos puede llevar a una madura, exacta y, predictiva ciencia de la farmacología molecular y, en consecuencia, a un racional diseño de nuevos fármacos.

Como dice Jack R. Cooper, "un entendimiento fundamental del mecanismo de acción de los fármacos, sólo puede hacerse desde una aproximación bioquímica o biofísica" (265). Sin duda alguna, estas serán también las dos aproximaciones más importantes en el proceso de desarrollo de nuevos fármacos.

El desarrollo de la bioquímica, ha influenciado notablemente a la Fisiología y a la Patología, lo que ha permitido el establecimiento de etiologías específicas, relacionadas, en su mayor parte, a deficiencias orgánicas en la producción, liberación, metabolismo o eliminación de sustancias endógenas, tales como hormonas, enzimas, neurotransmisores, etc. Esto ha permitido el desarrollo de fármacos de suplencia, adecuados para la restauración de las funciones orgánicas afectadas.

La consideración de los aspectos bioquímicos relacionados con el fármaco y, en particular, con el desarrollo de nuevos fármacos, nos pone en inmediato contacto con dos aspectos fundamentales: por una parte, con el metabolismo de "xenobióticos", en general, y de los fármacos en particular y, por otra, con la interferencia que puedan producir los fármacos con constituyentes fundamentales del organismo, tales como ácidos nucleídos, proteínas, etc.

### VI.1 *El metabolismo de los fármacos como base de diseño.*

Pocas sustancias orgánicas escapan a la acción catalítica de los sistemas enzimáticos de los mamíferos. Aunque, en un principio, se consideró que la actividad farmacológica y la toxicidad de los fármacos, y de otros compuestos extraños al organismo, dependía directamente del compuesto administrado, pronto se reconoció que los tejidos estaban expuestos, no solamente a la sustancia administrada, sino también, a una amplia gama de metabolitos derivados de aquellos. En muchos casos, el metabolismo de un xenobiótico conduce, directamente, a productos polares que son fácilmente excretados. En adición a este aspecto, es hoy sobradamente conocido el hecho de que los fármacos son, con frecuencia, biotransformados en meta-



bolitos que contribuyen a, o, son responsables, de los efectos biológicos observados, adscritos al agente administrado. Muchos fármacos son metabolizados a especies químicas reactivas, que resultan altamente tóxicas para el organismo en el cual son generados.

En una primera etapa, los estudios del metabolismo de los fármacos, fueron realizados en el siglo XIX por los bioquímicos, quienes estaban interesados, principalmente, en el aislamiento de metabolitos urinarios, a continuación de la administración de, a veces, dosis heroicas de la sustancia medicamentosa. El metabolismo del ácido benzoico al ácido hipúrico, el primer metabolito de un fármaco en mamíferos, caracterizado de forma inambigua, fué bien establecida antes del final de la primera mitad del siglo XIX, habiendo sido Keller, quien trabajaba en el laboratorio de Wöhler, el primero en demostrar la transformación "in vivo" al ácido hipúrico, después de la ingestión de ácido benzoico (266). Muchos de los procesos metabólicos de tipo oxidativo, reductivo o conjugativo, en mamíferos, tales como la hidroxilación "in vivo" del benceno y la oxidación del tolueno a ácido benzoico, han sido descritos en forma limitada, antes del comienzo del siglo XX (267). En 1900, eran conocidas ya la mayor parte de las rutas a través de las cuales los compuestos químicos sufren la biotransformación. No obstante, es en la segunda mitad de la presente centuria, con la disponibilidad de los radioisótopos y, una más sofisticada metodología, lo que hace posible la detección y aislamiento de pequeñas cantidades de materiales en los medios biológicos complejos, cuando se produce una casi explosiva actividad en este campo. Los esfuerzos investigadores, van revelando, lentamente, los detalles complejos de los mecanismos bioquímicos, asociados con los cambios moleculares que los compuestos extraños experimentan en el organismo.

#### *Desarrollo de nuevos fármacos basado en el conocimiento del metabolismo de los medicamentos.*

Así pues, una de las posibilidades más interesantes en el estudio del metabolismo de los fármacos, es el demostrar la conversión de un fármaco en un metabolito farmacológicamente activo. Tales metabolitos presentan, a veces, la misma acción que su progenitor, pero mayor actividad; otras veces, manifiestan acciones distintas o, sólo, exhiben parte de las acciones correspondientes al fármaco de partida, etc. En todo caso, el conocimiento de estos hechos puede, a veces, ser aprovechado para la preparación de un nuevo fármaco, que no es sino un metabolito que se ha mostrado activo, teniendo en cuenta siempre, que para que dicho compuesto ejerza sus efectos, su velocidad de formación debe ser suficientemente más grande, que la velocidad de su nueva transformación, de manera que pueda ser alcanzado un nivel efectivo en plasma.

Se conocen muchos ejemplos de fármacos que dan origen a metabolitos activos. En algunos casos, se trata de transformaciones simples, como es un sencillo proceso de hidroxilación o reducción, pero en otras, se trata de transformaciones más profundas, que conducen a estructuras bastante diferentes de la de partida. En tales casos, el químico de fármacos, se encuentra

con una nueva estructura de referencia, la cual puede ser considerada como prototipo o cabeza de serie. En este contexto se encuentran la *sulfamida* (268), el *cicloguanilo* (269) y el *demoxepan* (270), entre otros muchos, cuyo conocimiento como metabolitos activos, orientó la investigación dentro del grupo, hacia nuevas estructuras que, en muchos casos, resultaron más convenientes que sus progenitoras. En algunos casos, los metabolitos originados, presentan una disociación de acción cuyo conocimiento es de interés para la obtención de compuestos de actividad más específica, tal como ocurre con la *zoxazolamina* (271), con acción relajante muscular y uricosúrica y que, en el hombre, originó un metabolito, el 5-cloro-2-hidroxibenzoxazol, el cual retiene solamente la actividad músculo-relajante (272).

Varias aproximaciones, pueden ser empleadas por el químico farmacéutico, para utilizar la información derivada del conocimiento del metabolismo de los medicamentos. Las rutas del metabolismo de los fármacos son, en la actualidad, bastante bien conocidas, de manera que se puedan hacer predicciones razonables relativas a posibles metabolitos de nuevos compuestos. El químico, puede encontrar esta situación provechosa para preparar metabolitos potenciales de fármacos activos, sin esperar a conocer el resultado del estudio del metabolismo. Así por ejemplo, el conocimiento de que el esquistomicida *lucantona* (273) es metabolizado al hidroximetil análogo, que es el metabolito activo, impulsó a los químicos a preparar hidroximetil análogos de otros agentes esquistomicidas, comprobándose que los nuevos compuestos resultaban más activos que sus progenitores.

De una manera similar, los químicos consideran que la preparación de aminas secundarias correspondientes a aminas terciarias activas, así como formas oxidadas de tioéteres activos (sulfóxidos o sulfonas), ácidos correspondientes a alcoholes primarios activos, etc., pueden ser caminos adecuados para la preparación de nuevos fármacos.

## VI.2 Bioactivación y biodesactivación de fármacos. Profármacos y fármacos blandos.

Un interesante aspecto relacionado con ciertos fármacos, lo constituyen los procesos de bioactivación de compuestos farmacológicamente inactivos, o poco activos, y que son activados en el organismo por la acción de enzimas. Estos compuestos, algunos de los cuales son conocidos desde hace mucho tiempo, han recibido diversas denominaciones, tales como *profármacos* (por Albert), *fármacos en forma latente* (por Harper) o, *derivados biorreversibles* (por Sinkula), y constituyen una forma de administración de fármacos, orientada a alcanzar diversos objetivos como: *a*) superar problemas de absorción, *b*) modificar la duración de la acción, *c*) reducción de la toxicidad y efectos laterales, *d*) regulación del transporte del fármaco, *e*) alcanzar una localización preferente, etc.

En relación a estos dos últimos puntos, hemos de recordar que los diseñadores de fármacos, han prestado atención durante muchos años, a la utilización de subunidades estructurales, con el fin de alcanzar un transporte selectivo y una localización preferente de fármacos, habiéndose obtenido en estos aspectos, algunos éxitos. La idea es unir un fármaco, por ejemplo un

agente antitumoral, a un producto natural que se acumularía selectivamente en un órgano específico, actuando como “un caballo de Troya” para el fármaco. La unión de agentes alquilantes a estrógenos, ha sido experimentada en el tratamiento del cáncer de ovario, y diversos aminoácidos han sido usados como conductores de fármacos.

Una reciente, e ingeniosa aplicación del concepto de transporte, es la utilización de anticuerpos como conductores (274). De acuerdo con esta idea, agentes antitumorales como adriamicina y metotrexato, han sido enlazados covalentemente a los anticuerpos de leucemia y melanoma. La preparación de anticuerpos en gran escala es, sin duda, la mayor dificultad que existe para el desarrollo de esta técnica; no obstante, los nuevos anticuerpos monoclonales, permiten considerarla prometedora.

No es fácil precisar cual ha sido el primer compuesto químico empleado actualmente en terapéutica, o que haya sido empleado con anterioridad para tal fin, que se pueda considerar como el primer compuesto biorreversible preparado como tal. Compuestos tan antiguos en el campo terapéutico como la *metenamina* (urotropina) (275) o el ácido acetil salicílico (aspirina), se pueden considerar como tales. La formación de derivados biorreversibles, ofrece una estimable base para el diseño o programación de fármacos.

El diseño de *fármacos blandos*, es un nuevo concepto introducido por Bodor (276), y es opuesto al diseño de profármacos. Mientras un profármaco es inactivo y debe ser activado enzimáticamente, el fármaco blando es activo y debe ser desactivado enzimáticamente, en una vía predecible y controlable. La técnica implica el diseño de un proceso sencillo, de una etapa, que no permita la presencia de metabolitos, que puedan causar daño al DNA. La característica fundamental de un fármaco blando es su condición de predecible y controlable en su transformación. Sustancias endógenas como los neurotransmisores y las hormonas, son fármacos blandos naturales, pues disponen de rápidas y eficientes vías de actuación y transformación o eliminación, sin producir intermedios reactivos.

### VI.3 *Los enzimas como objetivos para el diseño de fármacos.*

Pero donde, sin duda alguna, el enfoque bioquímico del problema se hace más patente, es en relación a los enzimas y su consideración como objetivos para el diseño de fármacos.

Los enzimas, constituyen la clase de moléculas proteicas más numerosas y especializada. Gran parte de la historia de la bioquímica, es la historia de la investigación enzimática. En la actualidad, la significación de los enzimas en los estudios orientados al diseño y desarrollo de nuevos fármacos es enorme, aunque, en este aspecto, su significación es más bien reciente, pues, como indicamos anteriormente, su entrada en el tema arranca de la demostración en 1940 por Wood y Fildes del antagonismo metabólico.

Los seres vivos, contienen varios millares de diferentes enzimas, cada uno de los cuales cataliza una reacción de un simple sustrato o grupos de sustratos. Un conjunto de enzimas, está implicado en un proceso metabólico, catalizando cada uno de ellos, una etapa en dicha secuencia. Estas acciones

están integradas y controladas de varias maneras, para producir un comportamiento coherente, gobernado por los requerimientos de la célula.

Se tiene evidencia de que diversos fármacos, en uso clínico actual, ejercen su acción en el organismo inhibiendo un determinado enzima, el cual, está normalmente presente en el organismo del mamífero o, bien, ha sido introducido por una invasión parasitaria y está presente en el parásito. El término antimetabólito, es también ampliamente usado para describir un inhibidor enzimático, poniendo de relieve el sustrato (metabolito), cuyo metabolismo es interrumpido. Muchos de los fármacos relacionados con la actividad de los enzimas, no fueron introducidos en terapéutica sobre una base racional de diseño como inhibidores de enzimas o antimetabolitos, sino que fué conocido, posteriormente, que ejercían su acción de dicha forma. No obstante, el conocimiento de estos hechos, fué un valioso soporte para el posterior desarrollo de compuestos biológicamente activos, cuyo mecanismo de acción se corresponde con una actividad inhibitoria.

Inhibidores específicos de reacciones enzimáticas, son ampliamente usados en las ciencias farmacéuticas, médicas y bioquímicas. Para el enzimólogo, representan herramientas de trabajo con cuya ayuda pueden esclarecer, el mecanismo de enlace de ligandos, catálisis enzimática y otros aspectos de la química de los enzimas. Para el biólogo celular, los inhibidores de enzimas le permiten abreviar y estudiar las funciones intracelulares y procesos relacionados. Las manifestaciones de ciertas enfermedades hereditarias son, con frecuencia, el resultado de la falta o, bien, de la incompetencia de un simple enzima. En investigación médica, tales enfermedades pueden ser mimetizadas en cultivos celulares, por el uso de inhibidores específicos, aportando de esta manera sistemas que son asequibles para los estudios bioquímicos.

De la mayor importancia para el químico farmacéutico, es el papel crucial jugado por inhibidores específicos de reacciones enzimáticas, en el tratamiento de gran número de enfermedades. El diseño racional en este campo, de agentes terapéuticos efectivos, requiere, primero, la identificación de un *enzima objetivo* que, si es inhibido, producirá el deseado efecto terapéutico sin causar toxicidad al hésped.

Algunas importantes enfermedades que son tratadas por inhibidores enzimáticos específicos, ilustran su utilidad como fármacos. Por ejemplo, los síntomas y signos de una enfermedad, pueden resultar de una anormal alta concentración de un producto de una reacción enzimática normal. Si el sustrato de la reacción enzimática es menos nocivo que el producto, la inhibición de la reacción puede ser de beneficio terapéutico. Por ejemplo, la gota es causada por superproducción de purinas y/o reducción en la excreción de ácido úrico, conduciendo a una concentración de urato, anormalmente alta, en los fluidos extracelulares. La relativa insolubilidad del urato sódico, puede llevar a su deposición en el fluido sinobial, articulaciones, etc. El ácido úrico, un metabolito no esencial, es el producto final del metabolismo de las purinas, formando, principalmente, por la conversión del sustrato xantina por la acción de la xantina oxidasa; dicho enzima, también convierte la hipoxantina en xantina. El *alopurinol* (277), es un inhibidor efectivo de la xantina oxidasa y su administración se traduce en un descenso en la producción

de ácido úrico con aumento, simultáneo, de hipoxantina y xantina. Como estas dos sustancias son muchos más solubles que el ácido úrico y más rápidamente excretadas, resulta así un descenso en las manifestaciones clínicas de la enfermedad. El alopurinol representa sólo uno de los muchos ejemplos de fármacos clínicamente útiles, que actúan por inhibición de un enzima normal de organismo, para alcanzar una alteración del metabolismo, que es beneficiosa.

Un segundo grupo de enfermedades que responden a fármacos, cuyo diseño se basa en la inhibición enzimática, comprende aquellas causadas por agentes microbiales. Aquí nos encaramos con el problema de la toxicidad selectiva; el inhibidor debe ser tóxico al organismo microbial, pero no al huésped. Cuando el microorganismo requiere un enzima para su supervivencia que no está presente en el huésped, tenemos una situación ideal para alcanzar esta selectividad. La explotación de tan absoluta diferencia *cualitativa* en el contenido de enzimas de las células, es bien expresada por el uso de las sulfamidas y penicilinas. Las bacterias susceptibles a las sulfamidas, son incapaces de utilizar ácido fólico exógeno como fuente de los requeridos folato-coenzimas y, ellas, poseen enzimas esenciales, que sintetizan los precursores de los necesarios cofactores del ácido fólico. Las sulfamidas son potentes inhibidores de uno de estos enzimas bacteriales, y como los humanos no poseen este enzima (los humanos requieren ácido fólico de la dieta), los fármacos muestran, remarcablemente, toxicidad selectiva hacia las bacterias susceptibles. De igual manera, las penicilinas son inhibidores específicos de un enzima implicado en la biosíntesis de la pared celular de la bacteria, el cual no está presente en las células de los mamíferos.

Otra aproximación que ha rendido útiles fármacos antimicrobiales, ha sido la explotación de sutiles diferencias de especies en sustrato-enzimas idénticos, presentes en ambos, célula invasora y célula huésped. Un excelente ejemplo de inhibidor que actúa de esta forma es el *trimetoprim* (278). Este fármaco, es un potente inhibidor de la dihidrofolato reductasa bacterial, un enzima esencial para la síntesis de precursores del DNA en todas las células. A causa de ciertas diferencias en la estructura de los enzimas, bacterial y, de mamíferos, el inhibidor se enlaza relativamente más débilmente a la dihidrofolato reductasa de mamíferos, resultando así toxicidad selectiva para los microorganismos susceptibles.

Un tercer tipo de enfermedades, proceden de células que son derivadas del huésped, principalmente, células neoplásicas. Aquí nos enfrentamos con el difícil problema, de diseñar inhibidores enzimáticos, capaces de diferenciar entre células tumorales y normales, aunque tales diferencias pueden aparecer a medida que se incrementa nuestro conocimiento de la biología celular básica y la bioquímica de las células neoplásicas y normales. Mientras tanto, hay un número de agentes anticáncer, clínicamente efectivo, que demuestran claramente la existencia de diferencias explotables entre estos tipos de células. Estas diferencias pueden existir, porque las células tumorales, con frecuencia, crecen a una velocidad diferente de la de las células normales y/o porque determinados enzimas en los dos tipos de células, se pueden producir desigualmente.

Después de que ha sido identificado el enzima objetivo, el químico farmacéutico puede elegir, a partir de una diversidad de aproximaciones asequibles, hasta encontrar un inhibidor eficaz.

Aunque, como decíamos anteriormente, muchos inhibidores enzimáticos han sido identificados casualmente a lo largo de un programa de screening, se debe destacar que, durante las dos últimas décadas, ha tomado un gran impulso la aproximación al *diseño racional* de inhibidores de enzimas, habiéndose preparado sobre estas bases, numerosos e importantes fármacos.

Para el químico orgánico, motivado por el conocimiento de los mecanismos de reacción, los enzimas ofrecen algunas ventajas sobre los receptores de fármacos, pues nuestro conocimiento de la organización y mecanismos del receptor, se encuentra retrasado en alto grado, en comparación con la detallada información asequible para muchas reacciones catalizadas por enzimas. Datos estructurales detallados de rayos X, no son asequibles para los receptores; solamente podemos especular acerca de su geometría, sobre la base de nuestro conocimiento de la estructura tridimensional de las moléculas que se unen a ellos. Por el contrario, los enzimas han sido, frecuentemente, purificados y caracterizados, siendo en muchas ocasiones, asequibles a partir de estudios de rayos X, detalles de su estructura fina. El conocimiento del mecanismo enzimático, conforme a las reglas básicas de la química orgánica, así como el conocimiento de la reacción no enzimática es, con frecuencia, un punto de partida importante para el diseño de inhibidores de enzimas.

#### *Características requeridas en los inhibidores potenciales.*

El concepto básico del uso de un inhibidor enzimático o antimetabólico, como fármaco, requiere en la práctica, que el inhibidor tenga varias características aceptables, antes de que pueda ser considerado como un candidato adecuado para su empleo en la clínica.

En primer lugar, debe tener una semejanza estructural con el sustrato normal o metabolito, de forma que se pueda fijar y enlazar al enzima de una manera similar a como lo hace el sustrato normal. Esta similitud estructural, debe ser reflejada no solamente en dimensiones moleculares, sino también en distribución electrónica, pues la mayor parte de los "sitios" activos de los enzimas son altamente polares. Un método efectivo para obtener un antimetabolito, es sustituir un grupo electrón atrayente (o repelente), por otro. A veces la sustitución de átomos, o grupos atómicos con radios de van der Waals similares, ha conducido a estimables antagonistas, de lo que es excelente ejemplo la pareja uracilo y *5-fluorouracilo* (279).

En segundo lugar, el inhibidor debe de alcanzar su "sitio" de acción, el enzimas objetivo, y persistir allí. Los factores implicados aquí, son las velocidades de escrección y metabolismo, así como la posesión de la correcta relación hidrofilia/lipofilia, para el transporte al enzima.

En tercer lugar, su acción debe se restringida al enzima objetivo, de forma que se muestre una especificidad de acción. La acción del inhibidor sobre otros enzimas o la reacción directa con constituyentes celulares, esenciales para el buen funcionamiento de la célula, podría ser seguida por desequili-

brios celulares, los cuales se manifiestan, clinicamente, por nocivos efectos laterales.

El diseño de un inhibidor enzimático, con especificidad absoluta para un dado enzima objetivo, fué en otro tiempo considerado inasequible y, en consecuencia, la aspiración fué limitar el espectro de los otros objetivos inhibidores y su potencia relativa hacia ellos. Pero, recientemente, con la introducción de los inhibidores tipo sustrato suicida, el desarrollo de agentes más específicos es muy prometedor.

La consideración de algunos ejemplos, nos permitirá apreciar la significación que esta nueva metodología, tiene en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

### VI.3.1 *Antimetabolitos.*

Un antimetabolito se puede definir como un compuesto que interfiere con la formación o, utilización, de un metabolito celular normal. Esta interferencia, se puede producir por inhibición de un enzima o sistema enzimático encargado de una función fisiológica esencial, o bien, por incorporación del antimetabolito en la construcción de una macromolécula tal como una proteína o un ácido nucléido, originándose así un falso biopolímero. Los antimetabolitos, deben su acción al hecho de ser estructuralmente similares a los metabolitos celulares normales.

El descubrimiento del fenómeno de los antimetabolitos, causó una verdadera revolución en farmacología (280) porque, no sólo hicieron posible la curación de enfermedades que eran consideradas incurables, sino que también aportaron una nueva y eficiente ruta en el diseño de fármacos. En nuestros días la estrategia de la quimioterapia (281) consiste principalmente, a través de estudios relacionados con la bioquímica comparativa (282), en la exploración de las diferencias del metabolismo entre los parásitos y los hospedadores, con el propósito de preparar antimetabolitos eficientes (283).

Diversos autores han observado, en la última centuria, que una reacción enzimática es inhibida por la adición de compuestos que son estructuralmente similares a los sustratos. Ehrlich el fundador de la moderna quimioterapia, fué uno de los primeros que desarrolló la teoría de los antimetabolitos, al principio de la presente centuria, cuando lo aplicó a la investigación de fármacos antibacteriales y antiprotozoales. No obstante, el concepto de antagonismo metabólico, ha recibido gran impulso después de que Woods y Fildes sugirieron que la sulfanilamida y sus derivados actúan inhibiendo la utilización del ácido p-aminobenzoico por la célula bacterial.

Muchos compuestos, han sido sintetizados con el propósito de obtener antimetabolitos. Entre ellos, figuran antagonistas de aminoácidos, vitaminas, bases púricas y pirimídicas, etc. No obstante, sólo unos pocos de ellos han probado su utilidad terapéutica.

En relación a la base de diseño, se puede decir que la mayor parte de los metabolitos sintetizados, han resultado como consecuencia de cambios biosintéticos, u otras pequeñas modificaciones, en la estructura de un metabolito natural.

Esencialmente, todos los tipos de antimetabolitos conocidos, han sido investigados por su actividad anticancerosa y, en este sentido, debemos destacar que los mayores éxitos alcanzados en el desarrollo de antimetabolitos con actividad útil anticáncer, se encuentran entre los análogos de metabolitos implicados en la biosíntesis de los ácidos nucléidos y los cofactores que contienen purinas y pirimidinas.

A continuación se consideran algunos ejemplos de antimetabolitos empleados como fármacos.

### VI.3.1.1 *Sulfonamidas antibacteriales.*

El descubrimiento de este grupo de fármacos, tuvo un dramático impacto en la quimioterapéutica, ya que hizo posible, el ataque directo a la infección microbiana.

Con anterioridad a la década 1930-1940, existía un escepticismo generalizado, en relación a la posibilidad de tratar satisfactoriamente las enfermedades infecciosas, con sustancias orgánicas de síntesis introducidas en el torrente circulatorio. Esta actitud cambió en 1935, cuando Domagk describió el tratamiento de las infecciones estreptocócicas con el compuesto denominado *prontosil* (284), un compuesto que había sido sintetizado como un colorante rojo para la tinción de la lana y seda. Posteriormente, un grupo de químicos del Instituto Pasteur de París, del grupo de Ernest Fourneau, inició un extenso programa de modificación estructural (285), preparando una serie de colorantes azoicos y, comprobando finalmente, que dicha estructura no era esencial para la actividad antibacterial, ya que dicha actividad, correspondía a la molécula de sulfanilamida, la cual fué detectada en la orina en forma de su N<sup>4</sup>-acetilderivado y, que se había originado por ruptura enzimática del grupo azo.

Este descubrimiento estimuló la investigación de otros muchos derivados de la sulfanilamida, con mejores efectos terapéuticos. No obstante, debido a la lenta valoración de estos descubrimientos, hubo que esperar hasta 1937, para la aparición de la sulfapiridina, comercializada para el tratamiento de las infecciones pneumocócicas. Otros derivados heterocíclicos de las sulfamidas, fueron seguidamente preparados, con objeto de reducir los efectos laterales, de manera que ya, en 1948, se habían preparado más de 5.000 sulfamidas y ensayado biológicamente.

Desde la introducción de las sulfamidas en 1935, algunas de las enfermedades más letales, como neumonía, meningitis, disentería bacilar, cistitis, gonorrea y tracoma, han llegado a ser curables. Aunque muchas de estas situaciones, son actualmente mejor controladas con antibióticos, las sulfamidas todavía retienen un importante papel en el tratamiento de infecciones sistémicas, o bien de enfermedades localizadas en el intestino, o tracto genito-urinario.

Las teorías relativas al modo de acción de las sulfamidas, fueron desarrolladas a partir de 1940, llegándose al conocimiento de que dichos compuestos interferían con la utilización de un sustrato normal (metabolito), por un enzima presente en la célula bacterial. Este sustrato, fué identificado



como el ácido p-aminobenzoico, demostrándose, sobre la base de estudios cuantitativos, que las sulfamidas se comportaban como típicos inhibidores competitivos de aquel. Posteriormente, se vió que las sulfamidas competían con el ácido p-aminobenzoico por un "sitio" activo en el enzima dihidrofolato sintetasa, el cual utiliza el metabolito normal para sintetizar el ácido dihidrofólico. La sulfanilamida, pasa a ocupar el lugar del ácido p-aminobenzoico, originando un sulfonamido análogo del ácido dihidrofólico. La actividad selectiva de las sulfamidas, se encuentra en el hecho de que los mamíferos, a diferencia de las bacterias susceptibles, no necesitan sintetizar el ácido hidrofólico, ya que lo ingieren con la dieta.

La importancia del modo de acción de las sulfamidas, es que conducen a la depleción, no solamente del ácido dihidrofólico, sino también del ácido 5,6,7,8-tetrahidrofólico formado en la reducción enzimática del primero por la acción de la dihidrofolato reductasa (hidrogenasa). Derivados del ácido tetrahidrofólico (los ácidos folínicos), desempeñan un papel clave como coenzimas, en la producción celular de purinas y pirimidinas, necesarias para la síntesis del DNA nuclear.

Después del descubrimiento de los antibióticos, las sulfamidas descendieron mucho en su utilización, pero aún resultan de interés terapéutico en casos determinados.

#### VI.3.1.2 Antagonistas del ácido fólico en la quimioterapia del cáncer.

Debido al alto reciclado del DNA, en las células cancerosas en rápida división, se pensó que la interferencia en la biosíntesis del ácido tetrahidrofólico, produciría resultados beneficiosos en el tratamiento de tumores malignos. En consecuencia, fueron preparados análogos del ácido fólico, para competir con el sustrato normal, el ácido dihidrofólico, por el "sitio" activo del enzima dihidrofolato reductasa. Esto a su vez, inhibiría la producción de nucleótidos de purina y pirimidina, necesarios para la síntesis del DNA.

Después de diversas modificaciones, Seeger y col., alcanzan el primer antimetabolito activo, la aminopterina, que fué sustituida, posteriormente, por su N-metil derivado, el *metotrexato*, más selectivo y menos tóxico (286).

Se ha comprobado que el metotrexato, se enlaza con una fuerza diez mil veces superior que el sustrato normal, a la dihidrofolato reductasa. Esta circunstancia, se ha relacionado con su más alta basicidad, como consecuencia de la sustitución del grupo OH en C<sub>4</sub>, por un grupo amino. El exámen del complejo dihidrofolato reductasa-metotrexato, por difracción de rayos X, revela que el anillo pirimidínico se sitúa en una cavidad lipofílica donde el grupo N<sub>1</sub> protonado, se enlaza iónicamente a un grupo carboxílico yustapuesto.

El metotrexato, produce una remarcable remisión de los síntomas en la leucemia linfoblástica, aunque las células desarrollan, eventualmente, resistencia, incrementando la producción de dihidrofolato reductasa. El coriocarcinoma es rápida y completamente curado con el metotrexato, habiéndose obtenido, así mismo, buenos resultados en el tratamiento del linfoma de Burkitt.

### VI.3.1.3 Análogos del ácido fólico en la quimioterapia bacterial (y protozoal).

El desarrollo de un programa de investigación de inhibidores de la hidrofolato reductasa como antimaláricos potenciales, reveló que, ni la aminopterina ni el metotrexato, eran tóxicos para los protozoos, pues, a semejanza del ácido fólico, no son fácilmente absorbidos por los microorganismos. En orden a facilitar la absorción, se realizó un sustancial recorte de la molécula de aminopterina, conduciendo a un núcleo de diaminopteridina, el cual fué entonces sustituido con grupos lipofílicos alquilo o fenilo. Así se preparó la 2,4-diamino-6,7-difenilpteridina, que exhibió actividad antimalarial, comparable a la de la quinina. Nuevas modificaciones del núcleo de la pteridina, omitiendo el nitrógeno de la posición 5 y, reteniendo el grupo alquílico lipofílico, conducen a análogos con mayor poder de penetración. La continua simplificación de tales moléculas, reveló que sencillas 2,4-diaminopiridinas, poseían considerable actividad antifolato en microorganismos. Estas investigaciones, han conducido al antimalárico de alta potencia, *pirimetamina* (287). La selectividad hacia la hidrofolato reductasa malarial, es ayudada por la alta lipofilia conferida por los grupos clorofenilo y etilo, presentes en su molécula. Esto facilita la penetración en la membrana lipídica de las células rojas infectadas con las formas eritrocíticas del parásito. La selectividad de acción es, también, el resultado de una mayor sensibilidad hacia el fármaco, mostrada por el enzima del parásito, en comparación con el del huesped. El enzima plasmodial, tiene un peso molecular diez veces mayor que el enzima del mamífero.

En un programa de investigación orientado a la preparación de 2,4-diaminopirimidinas antibacteriales, fué sintetizado un grupo de 5-benzil derivados. Cuando en tales compuestos, la lipofilia fué ligeramente reducida por introducción de grupos metoxilo sobre el núcleo aromático, se alcanzó una actividad óptima. De esta forma surge el *trimetropim*, descrito por Roth y col. en 1962 (288), como un sencillo y lejano "análogo del ácido fólico", con un grupo lipofílico relativamente pequeño, el cual es absorbible por las bacterias. Unos diez años más tarde de este descubrimiento, se observó que, cuando el trimetropim se administraba conjuntamente con una sulfamida (sulfametoxazol), con propiedades farmacocinéticas similares, resultaba una acción antibacterial considerablemente exaltada, lo cual se debía al efecto sinérgico basado en la "inhibición secuencial" de los dos enzimas (dihidrofolato sintetasa y dihidrofolato reductasa) implicados en el proceso biosintético que conduce al ácido tetrahidrofólico.

El mismo principio de sinergismo, ha sido empleado en el tratamiento de la malaria, en el cual, la pirimetamina se asocia con una sulfamida de vida larga, que actúa en fase con el inhibidor de la dihidrofolato, de duración relativamente larga. Tales asociaciones, se han mostrado activas en caso de resistencia a la quinina y a la cloroquina.

### VI.3.1.4. Análogos de purina y pirimidina en la quimioterapia del cáncer y viral.

Los análogos de la purina y la pirimidina, inhiben un campo más amplio en la síntesis de los ácidos nucleídos, que los inhibidores de la dihidrofolato reductasa antes citados.

Los análogos de la purina, fueron desarrollados por Hitchings y colaboradores (289), a partir de 1942, en una tentativa, racional, de descubrir inhibidores selectivos de la biosíntesis de los ácidos nucleídos, estimulados y guafados por la recién enunciada teoría de los antimetabolitos.

Una preparación de análogos isostéricos, de la hipoxantina, condujo a la introducción de la mercaptopurina, a la que, posteriormente, se unen otras purinas no naturales tales como la tioguanina y la azatioprina.

La 6-mercaptopurina (290), está bien establecida en el tratamiento de leucemias agudas en la infancia, especialmente en la leucemia mielocítica crónica. La base libre, es convertida *in vivo*, al ribonucleótido, a consecuencia de la reacción de la base con 5-fosforibosilpirofosfato, catalizada por el enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa. Aunque el ribonucleótido (MPRP) inhibe varias secuencias enzimáticas en la biosíntesis de nucleótidos de purina, incluyendo la conversión del inosina-5'-fosfato a adenosina-5'-fosfato, la principal inhibición, parece que tiene lugar, en una etapa temprana, cuando el 5-fosforibosilpirofosfato, es convertido en la fosforibosilamina por la acción de la fosforibosilpirofosfato amidotransferasa. Con frecuencia, la mercaptopurina es administrada asociada al alopurinol, el cual inhibe la degradación por la acción de la xantina oxidasa, de la mercaptopurina al ácido tiourico, el cual puede causar daño renal.

La 6-tioguanina (291), usada en el tratamiento de la leucemia mieloblástica, sigue un metabolismo similar al de la mercaptopurina, siendo transformada en el 9-(1'-ribosil-5'-fosfato), en el neoplasma.

Por otro lado, algunas antipurinas antineoplásicas, encontraron aplicación como inmunosupresores, y son empleadas en transplantes de órganos. La primera en manifestar tal actividad fué la mercaptopurina, la cual, debido a su alta velocidad de eliminación, ha llevado a su conversión en el S-(1-metil-4-nitroimidazol-5-il) derivado, la azatioprina (imuran) (292), que presenta un efecto más sostenido. Las propiedades electrón-atrayentes del grupo nitro, hacen al enlace C-S sensible a una progresiva disociación enzimática *in vivo* (293).

A su vez, los análogos de la pirimidina, resultaron de un planteamiento racional de diseño de fármacos por Heidelberger y colaboradores, iniciado en 1957, después de la observación hecha por Rutman y col. en 1954, de que en la síntesis del ácido nucleico, un hepatoma de rata, incorporaba uracilo, en mucha mayor cantidad que las células hepáticas normales. Sabiendo que por la acción catalítica de la timidilato sintetasa, el uracilo del ácido desoxiurídico era convertido en timina del ácido timidílico y que, el fluoroacetato era un potente veneno metabólico, dichos autores pensaron que la sustitución del átomo de hidrogeno de la posición 5 del uracilo, o de la desoxiuridina, por el estable átomo de flúor, podría alterar drásticamente la biosín-

tesis del DNA. Las esperanzas puestas en esta sustitución isostérica, se vieron satisfechas.

De las varias halogenopirimidinas investigadas, solamente los fluoroderivados tienen actividad anticáncer apreciable. El 5-fluorouracilo, es altamente selectivo en el tratamiento del cáncer de piel y paliativo para el tratamiento de varios tumores sólidos, por ejemplo en el tracto gastrointestinal, páncreas, mama, etc., para los cuales la cirugía o la irradiación no siempre son posibles.

El 5-fluorouracilo es inicialmente bioconvertido al 2'-desoxiribonucleótido y al, ácido 5-fluoro-2'-desoxiuridílico el cual, es un potente inhibidor competitivo de la timidilato sintetasa (294). Este es el enzima que efectúa la transferencia de un grupo metilo desde el coenzima, ácido metileno-tetra-hidrofólico, al ácido desoxiuridílico, originando el ácido timidílico que es, subsiguientemente, incorporado en el DNA. Dicho inhibidor, ha mostrado tener una afinidad para el enzima, de varios miles de veces mayor que el del sustrato natural. Este remarcable efecto inhibidor es asociado con la electronegatividad del átomo de flúor, (cuya radio de van de Waals es comparable al del átomo de hidrógeno), lo cual afecta a la distribución electrónica, confiriéndole al derivado del 5-fluorouracilo una fuerza ácida treinta veces mayor que la del uracilo. Estas características capacitan al FUDRP, para fijarse al "sitio activo" del enzima, de manera muy eficaz. Nuevos estudios han sugerido que el FUDRP forma un enlace covalente con el "sitio activo" del enzima, a través de un grupo -SH (295). El mayor tamaño y la menor electronegatividad de otros halógenos, confieren mucha menos actividad a moléculas análogas.

Dada su situación clave para la síntesis del DNA, la timidilato sintetasa ha atraído la atención como un objetivo para el diseño de inhibidores enzimáticos con utilidad quimioterápica potencial. Además de los anteriormente citados, el ácido, 5-trifluorometil-2-desoxiuridílico, formado *in vivo* a partir del 5-trifluorometiluracilo, se ha mostrado, así mismo, como un inhibidor irreversible del citado enzima (296). Su mecanismo de acción, de acuerdo con la sugerencia de Santi y Sakais (297), implica un ataque nucleofílico inicial a la posición 6 del compuesto.

Recientemente, se han descrito nuevos inhibidores para este enzima; entre ellos, deben ser destacados los siguientes: 5-nitro-2'-desoxiuridilato (298), 5-etinil-2'-desoxiuridilato (299) y *trans*-5-(3,3,3-trifluoro-1-propenil)-2'-desoxiuridilato (300).

La 6-azauridina (301), otro antagonista en la síntesis de pirimidinas, es pobremente absorbida después de su administración oral, permaneciendo durante mucho tiempo en el intestino. Su conversión al triacetato, incrementa las propiedades lipofílicas, por lo que se aumenta la absorción, siguiéndose la desacetilación en el torrente circulatorio.

Otros nucleósidos de 2'-desoxipirimidina halogenados, han encontrado uso como agentes antivirales. Así, la 5-iodo-2'-desoxiuridina, *idoxuridina* (302), es convertida por las células en las formas de mono-, di- y trifosfato, las cuales compiten con los fosfatos de timidina, por enzimas, tales, como timidina kinasa y timidilato kinasa, implicados en la ulterior utilización de

timidina. No obstante, la actividad antiviral, es mediada principalmente por su incorporación en el DNA viral en lugar de la timidina.

Clinicamente, la IdU (idoxuridina) ha dado resultados satisfactorios en la cura de infecciones virales de los ojos, queratitis herpética, producida por el herpes simple. Esta fué, hasta este momento, una seria enfermedad, dolorosa, duradera y sin remedio efectivo. La selectividad del fármaco, depende de la barrera impuesta por la conjuntiva, la cual previene la difusión a otras partes del ojo. La idoxuridina es también empleada en el tratamiento del herpes zoster, aplicandose en forma de solución en dimetilsulfóxido a dichas lesiones.

Marcadamente menos tóxico, es su análogo 5-iodo-5'-amino-2',5'-dideoxiuridina, cuyo 5'-N-fosfato, es incorporado solamente en el DNA viral.

La sustitución de grupos con radios de van der Waals comparables, ha conducido a la preparación del análogo de timidina 5-trifluorometilo, cuya actividad antiviral, en este caso, procede por vía de fosforilación por la timidina kinasa, al 5'-fosfato, un potente inhibidor de la timidilato sintetasa.

Un antimetabolito de la pirimidina más selectivo, el arabinosido de citosina (1  $\beta$ -D-arabinofuranosilcitosina, *citarabina*, *Ara-C*), (303) es usado para el tratamiento de la infección herpética generalizada. Este nucleósido es convertido en 5'-fosfato, por la desoxicitidina kinasa, seguida por conversión al trifosfato, el cual inhibe a los enzimas DNA y RNA polimerasas. El arabinósido de citosina, es también uno de los agentes simples asequibles más efectivos para el tratamiento de la leucemia mieloblástica aguda, alcanzandose relaciones de remisión, alrededor del 25% cuando se emplea como agente único. Cuando se combina con tioguanina o con el antibiótico citotóxico daunorubicina, las relaciones de remisión se elevan al 50%. Combinaciones, incluyendo vincristina, conducen a remisiones aún más altas.

Una desventaja del arabinósido de citosina, se deriva de su rápida desaminación hepática por la citosina desaminasa, lo que conduce al derivado inactivo de uracilo. Esta corta actividad en el plasma, se contraresta con métodos de administración de infusión continua. La rápida desaminación, ha conducido a una investigación de inhibidores de pirimidina nucleósido desaminasa, para su administración simultánea. El arabinósido de 5'-fluoro-2,5'-anhidrocitosina -un nuevo ciclónucleósido- es hidrolizado lentamente *in vivo*, a Ara-C. Este compuesto, tiene una significativa actividad antitumoral en el adenocarcinoma del estómago y páncreas.

Una relativamente, nueva entrada en la escena de los agentes antivirales, es el azol nucleósido *ribavirina* (304), (*virazol*) ó  $\beta$ -D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida, el cual es activo contra la hepatitis tipo A, influenza A y B, sarampión e infecciones cutáneas causadas por virus de herpes. Existe alguna evidencia que indica que la ribavirina inhibe la conversión de la inosina-5'-fosfato en la xantosina-5'-fosfato, en la ruta biosintética a los ácidos nucleídos.

Es ampliamente aceptado, que muchos cánceres pueden ser viralmente inducidos. Esto, ha sugerido que un adecuado agente antiviral, puede prevenir la reinducción de un cáncer previamente controlado por otros medios químicos. Atención se ha prestado a la cura de tumores animales inhibien-

do la transcriptasa reversa de los virus de DNA, empleado arabinósidos de citosina y virazol, en adición a otros fármacos anticáncer.

En el grupo de los arabinósidos de purinas, debemos recordar a la *vidarabina* (adenina arabinósido, Ara-A, Vira-A) (305), con destacada actividad antiviral y útil en el tratamiento de la varicela y el herpes-zóster, en pacientes inmunodeprimidos. La vidarabina actúa, previa transformación en su trifosfato, sobre el enzima ADN-polimerasa viral, impidiendo la síntesis del ADN. A diferencia de otros antivirales con idéntico mecanismo de acción, presenta cierta selectividad sobre la ADN-polimerasa viral, frente a la celular humana.

En un proceso de simplificación molecular, que afecta a los restos azucarados de nucleósidos, han sido desarrollados el *torafur* (5-fluoro-1-(tetrahidro-2-furil) uracilo) y el *aciclovir* (9-(2-hidroxi-etoxi)metilguanina), el primero de los cuales ha sido empleado como antineoplásico y el segundo, como antiviral.

El torafur (306), con mejor índice terapéutico que el 5-fluorouracilo, fue aprobado para su uso en el tratamiento de tumores malignos del tracto gastrointestinal y otros tejidos. El mecanismo de su acción, se basa en su hidrólisis gradual en el hígado, formando 5-fluorouracilo, de donde se deduce su efecto prolongado (307).

A su vez, el *aciclovir* (308) ha resultado ser el mejor agente antiviral comercializado hasta la fecha, pues combina una eficacia, relativamente alta, con un grado de seguridad muy aceptable. Es muy eficaz frente a infecciones inducidas por el virus Herpes simplex. Al igual que la vidarabina, actúa bloqueando la ADN-polimerasa, previa activación, por formación de aciclovir-trifosfato por la acción de una timidin-quinasa viral, lo que le hace altamente específico hacia las células infectadas.

Sin duda alguna, la adquisición más importante en el grupo de los agentes antivirales, corresponde a la *zidovudina* (retrovir), compuesto activo frente al virus del sida referido como HIV, de la familia de los retrovirus, que infecta y, destruye, células especializadas del sistema inmune, conduciendo a una profunda depresión de la inmunidad natural; de aquí su nombre de "síndrome de inmuno deficiencia adquirida".

La Burroughs Wellcome en USA, inicia en junio de 1984, dentro de un continuo esfuerzo investigador en el campo de los antivirales, el estudio de compuestos que puedan presentar actividad frente al virus HIV. Así surge la zidovudina como el primer compuesto que muestra, en ensayos clínicos, actividad sobre la progresión de la infección por el virus HIV. Dicho compuesto es la 3'-ázido-3'-desoxitimidina, un análogo del nucleósido timidina, presente en el DNA (309). La zidovudina, es fosforilada por la timidilato quinasa al éster trifosfórico, el cual actúa como un potente y selectivo inhibidor de la replicación del virus, al comportarse como una falsa timidina, llegando a ser incorporado en el DNA transcripto, determinándose así la terminación prematura de la síntesis del DNA viral (310).

Aunque el empleo de la zidovudina no está exento de reacciones adversas, representa, sin duda, un destacable avance en la quimioterapia. Por otra parte, su aparición en el mercado farmacéutico como fruto de un acelerado e intenso proceso investigador, orientado a la solución de uno de los mayores

y más apremiantes problemas que hoy tiene planteada la Sociedad, nos devuelve la confianza en el investigador cuya actuación, al igual que ha ocurrido en otras ocasiones, no conoce más límites que las propias fronteras de la naturaleza y su imaginación y voluntad. Una vez más, recordemos el proverbio oriental que nos dice que “la diferencia entre lo posible y lo imposible es la medida de la voluntad del hombre”. La aparición de la zidovudina nos da esa medida.

### VI.3.2 Inhibidores de la acetilcolinesterasa. Desarrollo del PAM.

La acetilcolina, es el neurotransmisor liberado en las terminaciones nerviosas del sistema parasimpático y motor y al que sigue un impulso nervioso. Después de una respuesta por el tejido, la acetilcolina es transformada, por hidrólisis en productos inertes, por la acetilcolinesterasa. Los inhibidores de la acetilcolinesterasa, permiten un aumento de la acetilcolina en la terminación del nervio, de forma que se produce un efecto más prolongado, lo cual es útil en el tratamiento de la miastenia gravis, una enfermedad asociada con la fatiga del músculo, así como en el tratamiento del glaucoma, donde el estímulo del cuerpo ciliar, mejora el drenaje a partir del ojo y decrece la presión intraocular.

Los inhibidores de acetilcolinesterasa se incluyen en dos grupos: los carbamatos inhibidores “reversibles”, como *eserina* (fisostigmina) (311), *neostigmina* (312) y *bencilpirinium*, y los inhibidores “irreversibles organofosforados”, tales como, *diflos* (313), y *ecotiopato* (314). Los carbamatos, contienen una carga positiva y son enlazados al “sitio” aniónico (ión carboxilato) del enzima y, correctamente situados, para formar un carbamil enzima con el grupo hidróxilo de serina en el “sitio” esterático. El carbamil enzima es sólo ligeramente desdoblado y, en presencia de exceso de inhibidor, el enzima es parcialmente fijado, en esta forma, de manera que su actividad hacia el sustrato acetilcolina es disminuida. La dilución o separación del exceso del inhibidor, condujo a un desplazamiento de la situación hacia un aumento de la actividad enzimática. Esta observación, originalmente, dió la impresión de que los carbamatos eran inhibidores reversibles competitivos del enzima.

Los compuestos organofosforados, reaccionan con el enzima para formar un fosforil enzima estable y el enzima es inhibido irreversiblemente.

Dichos compuestos, tienen una acción de larga duración en el organismo, después de la administración de una simple dosis del fármaco, y la actividad del enzima solamente retorna, después de la síntesis de nuevo enzima. Debido el riesgo de sobredosis y, también, a su dificultad de manejo, estos compuestos son de poco uso, excepto para el tratamiento del glaucoma, donde los otros carbamatos, menos tóxicos, no han resultado satisfactorios para una particular terapia.

Compuestos organofosforados volátiles, como *sarin* (315) y *tabun*(316), han sido preparados para ser utilizados como “gas nervioso” en la guerra química, y otros compuestos del grupo, menos volátiles, han sido usados como insecticidas. La inhibición del enzima en los mamíferos o insectos, conduce a un aumento de la acetilcolina, cuya acumulación es fatal.

Ha sido realizada una extensa labor investigadora en la búsqueda de antidotos para tales "gases nerviosos", que pudieran ser distribuidos a la población en caso de guerra. Uno de estos descubrimientos, la piridina-2-aldoxima (*pralidoxima*), ha sido empleada satisfactoriamente, conjuntamente con atropina, para bloquear la acción de la acetilcolina sobre los receptores, en el tratamiento de intoxicaciones accidentales producidas por insecticidas del tipo organofosfatos.

El desarrollo de la pralidoxima, representa un caso, si nó único, sí poco frecuente, en el campo de los fármacos. En efecto, pocos fármacos han sido diseñados *de novo*, por aplicación de conceptos puramente teóricos. Este logro, aportado por los trabajos de Wilson y colaboradores (317), se derivó del conocimiento de que dichos órgano-fosfatos, bloquean la actividad esterásica normal de la acetilcolinesterasa, por formación de un enlace éster fuerte, no fácilmente hidrolizable. De esta forma, el "sitio" esterático del enzima, es inasequible para el desempeño de su función: la hidrólisis de la acetilcolina.

Wilson comprobó que la acetilcolinesterasa inhibida por fosfatos orgánicos, puede reactivarse por reacción con derivados de la hidroxilamina, ya que este compuesto libera el grupo fosforilo que está unido a los restos de serina en el enzima inhibido y, luego, lo reactiva. El reto era hacer esta reacción terapéuticamente útil. La hidroxilamina no podía utilizarse *in vivo*, porque es tóxica a las altas concentraciones requeridas para reactivar a la acetilcolinesterasa inhibida. El plan a seguir, era investigar un compuesto que mantuviese la reactividad química de la hidroxilamina, pero que presentase especificidad y alta afinidad por la acetilcolinesterasa. Sabiendo que el enzima contenía un lugar aniónico apto para recibir a la parte positivamente cargada de la acetilcolina, parecía adecuado sintetizar un derivado de la hidroxilamina que contuviese un grupo de amonio cuaternario. La doble posibilidad que se ofrecía, de situar dicho agrupamiento catiónico, sobre el oxígeno o sobre el nitrógeno de la hidroxilamina, se resolvió al ensayar dos derivados sencillos de la hidroxilamina: el O-metilderivado y el N-metilderivado, comprobándose que, mientras el primero era inactivo como reactivador, la N-metilhidroxilamina era activa. El grupo hidróxilo de la hidroxilamina, no podía estar sustituido ya que es, precisamente, el encargado de atacar al átomo de fósforo del enzima inhibido.

El objetivo inmediato a alcanzar, era el situar el grupo de amonio cuaternario, a una distancia apropiada en relación al oxígeno nucleofílico. Además, la orientación de ambos grupos, tenía que ser complementaria a la del lugar aniónico y al átomo de fósforo en el enzima inhibido.

Después de ensayar numerosos compuestos que contenían un grupo de amonio cuaternario y un resto de hidroxilamina, se seleccionó como el más efectivo, el metil ioduro de la 2-piridinaldoxima (PAM). Este compuesto tiene una geometría definida, a causa del doble enlace de la oxina, que tiende a fijar el átomo de oxígeno en el plano del anillo.

La actividad tan notable de PAM, surge de la posición óptima del grupo de amonio cuaternario, en relación al átomo de oxígeno nucleofílico.

El PAM, no activa a la acetilcolinesterasa inhibida por los organofosfatos, de la misma manera que lo hace la hidroxilamina. Sin embargo,  $10^{-6}$  M



de PAM, resulta tan efectivo como 1 M. de hidroxilamina. Este aumento de potencia de un millón de veces, hace al PAM terapéuticamente útil en el tratamiento del envenenamiento por fosfatos orgánicos.

El desarrollo del PAM por Wilson y colaboradores, marca un hito en el diseño racional de un fármaco sobre bases puramente teóricas.

No obstante, debemos de recalcar que este tipo de trabajos son más bien la excepción que la regla. El desarrollo de fármacos sobre bases puramente teóricas, ha sido durante mucho tiempo y, todavía lo sigue siendo en la actualidad, más una aspiración, que un logro alcanzado.

### VI.3.3 *Inhibidores del enzima de conversión de la angiotensina. Desarrollo del captopril.*

El comienzo de la década de 1980, será recordado como una fecha en la que el tratamiento de la hipertensión, una de las más corrientes aflicciones del hombre actual, experimenta un cambio espectacular. En 1980 y 1981 el primer agente antihipertensivo diseñado para interreccionar específicamente con uno de los sistemas fisiológicos implicados en el control de la presión sanguínea, se hace realidad a través del mundo. Este nuevo fármaco, el captopril (318) es el primer inhibidor activo, por vía oral, del enzima de conversión de la angiotensina, que aparece en el marcado farmacéutico. Su desarrollo es destacable por dos importantes aspectos: por un lado, se trata de un nuevo fármaco potente, específico, oralmente activo y con limitadas reacciones secundarias; por otro, por la metodología empleada en su desarrollo, la cual podría ser calificada como diseño de fármacos por el método de encaje al receptor (319).

Como es bien conocido, el sistema renina-angiotensina está íntimamente relacionado con los valores de la presión sanguínea y su control es, por ello, de importancia capital. El enzima de conversión de angiotensina (CE) (la peptidildipeptido-carboxi-hidrolasa), convierte el decapeptido inactivo Angiotensina I (AI) al octapeptido vasoconstrictor Angiotensina II, y es, por ello un componente enzimático clave del sistema renina-angiotensina, el cual ayuda a mantener la presión sanguínea. Estudios sobre péptidos, aislados de veneno de serpiente, mostraron que el pentapeptido Glu-Lys-Trp-Ala-Pro, era un inhibidor del enzima, presentando una corta acción antihipertensiva. Sobre este modelo, fueron seguidamente sintetizados numerosos análogos, de los cuales, el nonapéptido Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro, conocido como *teprótido* (320), resultó un compuesto efectivo para el tratamiento de ciertas formas de hipertensión, aunque tiene la desventaja de no ser activo, por vía oral, y poco útil para la terapia de largo tiempo.

Por aquellas fechas, se conocía muy poco en relación a la estructura del "sitio" activo del enzima y la forma en la que el sustrato natural era enlazado al mismo, por lo que se carecía de suficiente información, para el diseño de inhibidores más estables y eficaces. La observación de que el enzima de conversión era una metaloproteína con zinc y, el hecho de que su especificidad para el sustrato recordaba a la de la carboxipeptidasa A, otra metaloproteína con zinc, condujo a la suposición de que los "sitios" activos de

los dos enzimas, presentaban alguna similaridad aunque, obviamente también existían diferencias.

La estructura de la carboxipeptidasa A ha sido determinada por cristalografía de rayos X, así como también su enlace a un sustrato modelo (321) y a inhibidores (322) y, esta información estructural, combinada con estudios mecánicos, ha permitido deducir una clara y perfecta representación de los "sitios activos" de dicho enzima. El reconocimiento de similitudes mecánicas entre el enzima de conversión de la angiotensina y la carboxipeptidasa A, fué un factor clave en el desarrollo de un modelo hipotético para el enzima de conversión (ACE), lo cual permitió el diseño de los primeros inhibidores no peptídicos, del tipo de mercaptoacil aminoácidos, de los que el *captopril* es el primer ejemplo (323).

Cuando se considera el alto grado de interacción del *captopril* con el hipotético "sitio activo" del enzima de conversión de angiotensina, queda claro que el alto grado del enlace alcanzado es la consecuencia del efecto cooperativo de diversas interacciones.

Sobre la base de estudios cinéticos y de diálisis (324), se deduce que el *captopril* es un inhibidor competitivo reversible del enzima de conversión. El hecho de que aquel compuesto haya sido diseñado para fijarse al "sitio activo" del enzima, permite clasificarlo como un inhibidor reversible dirigido al "sitio activo", con una alta selectividad, como lo demuestra el hecho de que el *captopril* no es inhibidor de otras peptidasas, incluidas aquellas que contienen zinc, como, por ejemplo las carboxipeptidasas A y B (325).

Los estudios que condujeron al desarrollo del *captopril*, son ejemplo de una nueva aproximación en la investigación de nuevos agentes terapéuticos: el diseño *ab initio* de fármacos.

Esta aproximación *ab initio* al diseño de fármacos, solamente se puede aplicar a receptores cuyas características moleculares son conocidas, o pueden ser hipotetizadas, sobre la base del conocimiento acumulado para estructuras biológicas similares. Actualmente, el único tipo de receptores para los cuales tal conocimiento es asequible, y aún en este caso sobre una base limitada, son los "sitios activos" de los enzimas. No obstante, como numerosos e importantes procesos biológicos son controlados por enzimas, esta básica aproximación, ofrece un gran potencial para el desarrollo de moléculas completamente nuevas, como agentes terapéuticos "hechos a la medida".

El modelo utilizado en el desarrollo del *captopril* ha sido mejorado y extendido, a través de estudios de relaciones estructura-actividad, a clases conocidas de inhibidores, así como a la síntesis de nuevas clases de inhibidores enzimáticos. Como resultado de estos estudios, es ahora posible disponer de un detallado modelo para el "sitio activo" del ACE y, en consecuencia, disponer también de modelos de ligandos más adecuados para el encaje al receptor. Surge así el *maleato de enalapril* (326), con una vida media efectiva, mayor que la del *captopril*; esto permite su utilización en terapéutica con una o dos dosis diarias solamente. Su incidencia en relación a efectos laterales, parece ser menor que la del *captopril*.

Actualmente se están estudiando otros inhibidores del enzima de conversión, sobre la base de la optimización de las dos primeras estructuras indicadas.

#### VI.4 *Aproximaciones racionales actuales al diseño de inhibidores de enzimas.*

La investigación actual al diseño racional de inhibidores de enzimas, se centra principalmente, en tres áreas: 1) análogos del estado de transición, como inhibidores reversibles, 2) inhibidores irreversibles dirigidos al "sitio activo" del enzima y 3) inhibidores  $K_{cat}$  o inactivadores suicidas.

##### VI.4.1 *Análogos del estado de transición como inhibidores enzimáticos reversibles.*

Una reacción orgánica entre dos tipos de moléculas, se considera que procede a través de un complejo activado de alta energía, conocido como el estado de transición, el cual se forma por colisión de moléculas con mayor energía cinética que la mayoría de las presentes en la reacción. La energía requerida para la formación del estado de transición, es la energía de activación para dicha reacción y es la barrera que se opone a que la reacción ocurra espontáneamente. El estado de transición puede disociarse para originar, o bien los componentes a partir de los cuales se formó, o bien los productos finales de la reacción.

El concepto químico orgánico del mecanismo de reacción, sería lógicamente aplicable a las reacciones enzimáticas, aunque el problema, en este último caso, resulta más complejo, debido a que la gran molécula del enzima aporta un especial entorno a la reacción.

No obstante, es teóricamente aceptable (327, 328) que los "sitios activos" de los enzimas, están contruidos de tal forma, que puedan exhibir la máxima afinidad para una forma alterada del sustrato que está presente en el estado de transición. Si fuese posible diseñar sustratos modificados, cuya estructura recordarse a la del estado de transición, la afinidad del sustrato, para el enzima sería mucho mayor. Además, como la estructura correspondiente a un estado de transición, sería única para una particular reacción enzimática, los análogos así diseñados, serían altamente específicos para un determinado enzima.

El diseño de un análogo al estado de transición para un enzima específico, requiere el previo conocimiento del mecanismo de la reacción enzimática. Afortunadamente, las principales características estructurales de los estados de transición, para la mayoría de las reacciones enzimáticas son, o bien conocidos o se pueden predecir con suficiente confianza. En la actualidad, el diseño de este tipo de inhibidores, es una proposición realista y ha sido alcanzada satisfactoriamente en muchos casos.

Los ejemplos más destacados de análogos del estado de transición, como inhibidores enzimáticos, han sido encontrados en la serie de las pirimidinas, por ejemplo en la conversión de la citidina en uridina, catalizada por la citidina desaminasa, un enzima crucial en el metabolismo de nucleósidos de pirimidina. Chen y Wolfenden (329) sugirieron que el mecanismo de actuación de este enzima, procede por vía del ataque nucleofílico del agua a la posición 4 del heterociclo, para originar un intermedio, el cual recuerda la es-

estructura del estado de transición. Si el "sitio activo" del enzima es más complementario a la estructura del estado de transición que a la del sustrato, se puede anticipar, que los análogos de dicho intermedio serán potentes inhibidores de la citidina desaminasa. En efecto, la tetrahidrouridina se une a la citidina desaminasa, algunos miles de veces, más fuertemente que el sustrato citidina y, unas diez mil veces, más sólidamente que el producto uridina. La tetrahidrouridina resulta así un inhibidor efectivo de la citidina desaminasa.

Actualmente, la tetrahidrouridina está siendo evaluada en combinación con arabinosil-citidina (AraC) para el tratamiento de ciertas neoplasias. La citidina desaminasa, cataliza el metabolismo del AraC generando 1- $\beta$ -arabinofuranosil uracilo (AraU) inactivo y, se tiene la esperanza, de que la coadministración con tetrahidrouridina, inhibirá suficientemente a la citidina desaminasa, prolongándose así la vida media intracelular del AraC, con lo que incrementará su eficacia terapéutica.

Una situación similar, existe para la adenosina desaminasa, enzima que convierte a la adenosina en inosina, siendo también capaz de desplazar otros grupos o átomos de la posición 6 de los ribonucleótidos de purina, a través de un estado de transición mimetizado en la 1,6-dihidro-6-hidroxi-metil-purina, que ha resultado un potente inhibidor del citado enzima.

La adenosina desaminasa es, asimismo, inhibida por el antibiótico conformicina (330, 331) y su 2'-desoxianálogo.

Otro ejemplo de "diseño racional" de un análogo del estado de transición, se relaciona con una de las etapas iniciales en la biosíntesis *de novo* de pirimidinas, afectando a la aspartato transcarbamilasa, enzima que cataliza la reacción del carbamil fosfato y ácido aspártico, para originar N-carbamil-aspartato. Stark y col. (332) suponen que el estado de transición para esta reacción, es mimetizado por su análogo N-fosfonoacetil-L-aspartato (PALA). La comparación de la estructura del hipotético estado de transición con la estructura del PALA, revela que muchas de las características estructurales de aquel, son retenidas en el análogo. El átomo de oxígeno del hipotético estado de transición, es reemplazado por un grupo metilénico estable en el análogo, el cual, a su vez, no contiene el agrupamiento  $\text{NH}_2$  libre. El PALA presenta una mayor afinidad para el enzima que su sustrato normal y, dada la significación del citado enzima en la biosíntesis *de novo* de pirimidinas, está en la actualidad sometido a extensos estudios, ensayándose como un agente anticanceroso.

#### VI.4.2 Inhibidores irreversibles dirigidos al sitio activo del enzima.

Este tipo de inhibidores, pueden ser definidos como portadores de una subunidad que les permite el enlace reversible con el enzima, de manera que, el complejo inicialmente formado, deja situados convenientemente, un grupo funcional intrínsecamente reactivo, frente a un grupo nucleofílico del enzima, con el que a través de una reacción unimolecular, forma un enlace covalente. Los compuestos de este grupo, son diseñados para exhibir alta especificidad hacia un enzima objetivo determinado, pues deberán ser modelados estructuralmente, sobre el sustrato específico del enzima considerado.

Los principios fundamentales de este tipo de inhibición, se pueden ilustrar por las reacciones de algunas halometilcetonas con proteasas-serina, que son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis, o bien, de amidas, o de ésteres de aminoácidos, péptidos o polipeptidos. En general se acepta que el mecanismo de acción de todos estos enzimas, implica la participación de residuos de serina y de histidina, de las proteínas.

Ejemplos clásicos de inhibidores de esta clase, son el TPCK o L-1-p-toluenosulfonilamino-2-feniletíl clorometil cetona, preparado por Schoellman y Shaw en 1963 (333), y el TLCK o 1-cloro-3-p-toluenosulfonilamido-7-amino-2-heptanona, hidrocloreuro, inhibidores, respectivamente, de quimotripsina y tripsina (334).

#### VI.4.3 *Inhibidores irreversibles de tipo $K_{cat}$ o inactivadores suicidas.*

Dentro del área de los inhibidores enzimáticos, el grupo de los llamados "inhibidores suicidas", es el que más atención ha merecido en los últimos tiempos. Los inhibidores de este tipo difieren, de los agentes dirigidos al "sitio activo". en que contienen grupos funcionales *intrínsecamente no reactivos*, los cuales deberán ser convertidos en formas reactivas por el propio enzima objetivo, de manera que el enzima va siendo inactivado por su propio mecanismo de acción. Tales inhibidores, se enlazan fuertemente, (generalmente por formación de un enlace covalente) al enzima, y no pueden ser eliminados fácilmente. Por esta razón, el enzima es inhibido permanentemente y sólo puede ser regenerado lentamente por una nueva biosíntesis (335). Como consecuencia de su mecanismo de acción, resultan extremadamente específicos, ya que solo inactivarán a aquellos enzimas para los que puedan servir como sustrato.

El trabajo inicial sobre el mecanismo de este tipo de inhibidores, realizado por Helmkamp y col. (336), ha demostrado que un enzima crítico en la biosíntesis bacterial de ácidos grasos insaturados, la  $\beta$ -hidroxidecanoil-tiolester dehidrasa, resultó inactivada cuando el enzima catalizó su propia destrucción al procesar un sustrato acetilénico análogo, la 3-decnil-S-panteteína.

Muchos inhibidores, han sido diseñados seguidamente, con una gran diversidad de grupos funcionales latentes, que tienen como objetivo la inhibición de varios enzimas de significación terapéutica. Estos enzimas objetivo, incluyen las penicilinasas y alanina racemasa, en diseño antibacterial, GABA transaminasa para candidatos antiepilépticos, ornitina descarboxilasa, por sus efectos antitumorales y antiparasitarios,  $\Delta^5$ -lipoxigenasa y prostaglandina ciclooxygenasa, para el bloqueo de la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos y aromatasas para el control de la interconversión de hormonas androgénicas y estrogénicas, etc. Por otra parte, este tipo de compuesto ha sido de gran utilidad en estudios de los mecanismos de acción de los enzimas, y un buen número de inhibidores irreversibles naturales, funcionan como sustratos suicidas (337).

Interesantes revisiones sobre el tema, han sido realizadas por Rando (338), Abeles y Maycock (339), Walsh (340), Jung (341), Metcalf (342).

El diseño satisfactorio de un inhibidor suicida, requiere algún conocimiento del mecanismo de acción del enzima objetivo, un sustrato adecuado para la introducción de un agrupamiento reactivo latente, y un complaciente

enzima objetivo que realizará las necesarias conversiones de ambos, para generar un producto que se una al "sitio activo" del enzima, inactivándolo. La mayor parte de los objetivos satisfactorios para los inhibidores suicidas, han sido enzimas capaces de generar a partir del sustrato, un carbanión intermedio, adyacente al átomo de carbono al cual se enlaza. Compuestos capaces de formar derivados insaturados (como alenos o acetilenos) o compuestos carbonílico  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados, son candidatos primarios para el diseño de inhibidores suicidas.

La consideración de algunos ejemplos, nos dará idea precisa de la importancia que corresponde a este tipo de compuestos.

#### VI.4.3.1. *Inhibidores de la aromático aminoácido descarboxilasa.*

Este enzima, el cual es responsable de la conversión de dopa en dopamina, es motivo de inactivación por *benserazida* (343) y *carbidopa* (344), dos potentes inhibidores de la descarboxilación periférica, que actúan, probablemente, por formoción de hidrazonas con el enzima enlazado al fosfato de piridoxal. Ambos compuestos incrementan la cantidad de dopamina en el cerebro, después de la administración periférica de L-dopa (345). Combinaciones de dopa y carbidopa o dopa y benserazida, son usadas clínicamente en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (346). Recientemente, ha sido descrita por dos grupos independientes (347, 348), la síntesis de  $\alpha$ -vinil dopa y  $\alpha$ -etil dopa, dos inactivadores suicidas potenciales de la dopa descarboxilasa.

Este, enzima es también motivo de inactivación por la  $\alpha$ -difluorometil dopa (349) y  $\alpha$ -monofluorometil dopa (350, 351), presentando el primer compuesto, una acción periférica selectiva, incrementando en consecuencia, los niveles centrales de dopamina y noradrenalina (349). En contraste a ella, la  $\alpha$ -monofluorometil dopa, un inactivador más potente y menos selectivo, inhibe ambas actividades, central y periférica, por lo que disminuye los niveles centrales de catecolaminas, y presenta propiedades antihipertensivas (350, 351).

El desarrollo de este tipo de inhibidores, marcó un momento crucial en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, pues ha permitido disminuir, drásticamente, la dosis de levo-dopa necesaria para alcanzar efecto terapéutico.

#### VI.4.3.2 *Inhibidores de la GABA aminotransferasa.*

Recientemente, se ha puesto mucho interés en el diseño de inhibidores de este enzima piridoxal-fosfato dependiente, el cual gobierna los niveles del neurotransmisor inhibitorio ácido  $\gamma$ -aminobutírico en el cerebro. Los inhibidores del enzima, permiten un aumento de la concentración de GABA y podrán ser usados como fármacos anticonvulsivantes para el tratamiento de la epilepsia y otros desordenes neurológicos.

Los primeros inhibidores asequibles para este enzima, fueron compuestos tales como el ácido aminooxicético (352), ácido hidrazino propiónico

(353), y la  $\gamma$ -glutamilhidrazona (354). Posteriormente, se han descrito otros cuatro inhibidores irreversibles: el etanolamina-O-sulfato (355), ácido 4-amino-5-hexinoico (356), ácido 4-amino-5-hexenoico (357) y el ácido 5-amino-1,3-ciclohexadienil carboxílico (358). Todos estos compuestos, producen marcada elevación en los niveles cerebrales de GABA y poseen acción anticolvulsivante (359). Además, el ácido 4-amino-5-hexinoico inhibe, irreversiblemente, la glutamato descarboxilasa, bacterial y de mamíferos.

Recientemente, se han descrito varios inactivadores de este tipo (360) como el  $\gamma$ -etnil GABA y  $\gamma$ -vinil GABA. El vinil GABA incrementa los niveles de GABA en el fluido cerebroespinal humano, en función de la dosis (361), estando sometido actualmente a investigación clínica. Asimismo, Silverman y Levy (362) han descrito la inactivación de la GABA aminotransferasa por el ácido 4-amino-5-fluoropentanoico (4-fluorometil-GABA), capaz de generar un agente alquilante reactivo.

#### VI.4.3.3 *Inhibidores de la ornitina descarboxilasa.*

De este enzima, que se considera como limitante de la velocidad en la biosíntesis de poliaminas, se conoce que es inactivado *in vitro* por la  $\alpha$ -difluorometilornitina (363). Se ha comprobado, recientemente, que este compuesto tiene actividad antigestacional (364), antitripanosomal (365), anticoccidial (366) y antitumoral (367) *in vivo*, subrayándose así los efectos antiproliferativos de la deplección de poliaminas. La  $\alpha$ -monofluorometilornitina (368) y la  $\alpha$ -etnilornitina (369), presentan la misma actividad inhibitoria del enzima *in vitro*, similar a la de la  $\alpha$ -difluorometilornitina. Se considera que la etnilornitina actúa, vía una descarboxilación catalizada por el enzima, con formación de un aleno conjugado que, actuando como un aceptor de Michael, puede atrapar un residuo nucleofílico en el "sitio activo" del enzima.

#### VI.4.3.4 *Inhibidores de la histidina descarboxilasa.*

Este enzima, que cataliza la conversión de histidina a histamina, es inactivado irreversiblemente por la  $\alpha$ -monoclorometilhistidina (370) y la  $\alpha$ -monofluorometilhistidina (371). Ambos compuestos son efectivos *in vivo*, y, el primero, ha sido presentado como inhibidor de la secreción gástrica (370). El segundo compuesto, es un inhibidor más potente, y su efecto es mucho más duradero (372), debido, probablemente, a la inestabilidad del clorometil derivado.

#### VI.4.3.5 *Inhibidores de la monoamino oxidasa.*

El diseño de inhibidores para este enzima, es, probablemente, uno de los campos en el que los químicos farmacéuticos se han mostrado más activos en las últimas décadas. Algunos de los compuestos preparados, son utilizados para el tratamiento de la depresión profunda y la hipertensión. Desde

el punto de vista mecanístico, y de aplicación, los compuestos más interesantes son los derivados de la propargilina: la *pargilina* (373), *clorgilina* y *deprenilo* (374), los cuales inhiben irreversiblemente a enzimas flavina-dependientes. Profundas investigaciones en el grupo, incluyendo la caracterización del aducto de flavina, han permitido a Abeles y col., sugerir un mecanismo de reacción para la inhibición de la MAO mitocondrial por los derivados de la propargilamina (375). Debe ser destacada la acción selectiva del deprenilo sobre la monoaminoxidasa  $\beta$ , enzima que degrada a la dopamina. Esta circunstancia, hace del deprenilo, un fármaco complementario en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

La inactivación suicida de la monoaminoxidasa por la tranilcipromina, ha sido estudiada por Paech y col. (376).

#### VI.4.3.6 *Inhibidores de la testosterona $\alpha$ -reductasa.*

Los andrógenos se originan primariamente por la acción de tres glándulas: los testículos, la corteza suprarrenal y el ovario. El andrógeno primario procedente de los testículos es la testosterona, mientras que la dehidroepiandrosterona y, su éster sulfato y la androstenediona, ambos con débil potencia androgénica, son los esteroides primarios secretados por la corteza suprarrenal y el ovario. Cada glándula parece secretar sus productos con una variación circadiana, correspondiendo, en algún grado, con las secreciones de proteínas estimulantes procedentes de la pituitaria. En consecuencia, el nivel androgénico en un individuo, es dependiente de un equilibrio de varios procesos interrelacionados, estimulatorios e inhibitorios. La respuesta final de un órgano a los andrógenos, es mediada a través del receptor androgénico (RA), el cual actúa en la célula a nivel nuclear, para modular la síntesis del RNA (377). El receptor nuclear RA, se ha mostrado que está asociado solamente con dos andrógenos naturales: testosterona, T, y dihidrotestosterona, DHT. Este último compuesto, se enlaza más ávidamente al receptor (RA) que la testosterona y, en ciertos tejidos, como la próstata de rata, la dihidrotestosterona es el único andrógeno presente en los productos aislados del núcleo. La dihidrotestosterona es, formada irreversiblemente, a partir de la testosterona, por el enzima enlazado a la membrana  $5\alpha$ -reductasa. Deficiencias genéticas en los enzimas sintetizadores de andrógenos o en el receptor androgénico, se traducen en el desarrollo de fetos masculinos con características femeninas. De manera semejante, los fetos femeninos son virilizados por exposición al andrógeno. La actividad androgénica en exceso, está, implicada en la pubertad precoz, hipersexualidad masculina, seborrea, acné e hirsutismo. El tamaño de la próstata y su mantenimiento, son andrógenos dependientes, sugiriendo que la interferencia con esta hormona podría ser un tratamiento para la hiperplasia prostática benigna y el carcinoma prostático. El control de la fertilidad masculina, sería posible si fuese bloqueada la espermatogénesis estimulada por la testosterona. Los tratamientos que interfieren con la acción androgénica, incluyen la administración de agentes que bloquean los mecanismos reguladores, el receptor androgénico o las etapas biosintéticas clave en la formación de testosterona o de su dihidroderivado.



El estudio de antagonistas androgénicos, tiene una antigüedad de unos veinte años y, solamente en época reciente, ha sido extensamente investigado el uso clínico de estos agentes. De aquí el interés manifestado en el control de la biosíntesis de la testosterona y de la 5  $\alpha$ -dihidrotestosterona.

Entre los inhibidores más efectivos de la testosterona 5- $\alpha$ -reducta, figuran los 4-azaesteroides (378). La actividad óptima *in vitro*, se ha encontrado en las 4-metil-3-oxo-4-aza-5- $\alpha$ -androstano sustituidos en la posición 17 $\beta$  por un grupo semipolar. Estudios clínicos en relación a este tipo de compuestos, permitirán, en fecha próxima, disponer de fármacos útiles para el control de los esteroides androgénicos.

#### VI.4.3.7 Inhibidores de la biosíntesis de esteroides.

Un particular interés corresponde a los inhibidores específicos de la biosíntesis del ergosterol, principal componente esteroídico de las membranas fúngicas, lo que se traduce en un drástico aumento de la permeabilidad de la membrana. Esto permite la salida de componentes esenciales para la actividad celular del hongo. Entre tales compuestos, figura el grupo de los azoles, una amplia clase de agentes antimicóticos y fungicidas de los que el *clotrimazol* (379) representa la primera conquista en el desarrollo del grupo, y al que también pertenece el *ketoconazol* (380), un compuesto oralmente activo y con un amplio espectro antifungal. Por su actividad oral, se puede emplear en el tratamiento de micosis sistémicas de cualquier origen, excepción hecha de las provocadas por hongos del género *Aspergillus*. Se dispone así de una alternativa oral a los antifúngicos sistémicos tradicionales, como la anfoterina B. No obstante, su uso viene limitado por su hepatotoxicidad.

Desde los trabajos iniciales de Büchel y colaboradores (381) se han venido realizando por todo el mundo, numerosos programas de investigación y desarrollo de nuevos azoles, lo que ha conducido a la obtención de compuestos útiles para el tratamiento de micosis humanas, para la protección de plantas y para su uso en cosmética.

Permítanme, en relación con este tema, una alusión a la idea primaria elegida para el desarrollo del programa de investigación. Este trabajo tuvo su origen en la hipótesis de que los compuestos que son capaces de formar iones carbenium reactivos *in vivo* presentan actividad biológica (382). Se acepta que estos intermedios activos, capaces de experimentar ataque nucleofílico, podrían interferir algún proceso de interés biológico, como ocurre con algunos derivados de tropilium. Esta ha sido la razón para seleccionar los N-tritil azoles como estructuras básicas, consideradas por Büchel como potencialmente capaces de generar tales iones. La realidad, es que los azoles antifúngicos se consideran como sustratos suicidas, inhibidores del enzima que cataliza la transformación del 2,4-metilendihidrolanosterol al desmetil-esterol, en la secuencia biosintética que conduce al ergosterol (383).

Otros inhibidores de la biosíntesis de esteroides, no relacionados estructuralmente a los azoles, son también antifúngicos. Así el clorhidrato de naftidina (384), que actúa por inhibición de la escualeno epoxidasa, es el prototipo de una significativamente mejorada serie de agentes antifúngicos. El clorhidrato de naftidina, muestra buena actividad contra especies de *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporun*, *Aspergillus* y *Candida*.

Los efectos citotóxicos de varios esteroides hidroxilados, frente a las células de hepatoma de rata, se ha comprobado que son parcialmente debidos a la inhibición de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA reductasa (385), enzima que cataliza una de las primeras etapas en la biosíntesis del colesterol. Estos esteroides, han sido obtenidos a partir de drogas usadas en medicina popular en China, para el tratamiento del cáncer. La acción hipocolesterolémica del clofibrato, ha sido atribuída a la inhibición de la síntesis del ácido mevalónico en una etapa inespecífica (386), mientras que la citrinina, otro agente hipocolesterolémico, inhibe a la hidroximetilglutaril CoA reductasa, de forma irreversible en función del tiempo (387).

Se conocen numerosos inhibidores de hormonas esteroideas. Recientemente, han sido descritos algunos derivados acetilénicos o alénicos de tipo 3- $\alpha$ -5,10-secoesteroides, (388, 389) como inhibidores irreversibles para la  $\Delta^3$ -3-cetoesteroide isomerasa bacteriana y para la  $\Delta^4$ -3-cetoesteroide reductasa.

#### V1.4.3.8 Inhibidores de $\beta$ -lactamasas.

Las  $\beta$ -lactamasas, son enzimas bacteriales que catalizan la hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico, originando productos antibióticamente inactivos. Estas enzimas, juegan un importante papel, en la resistencia de algunos agentes patógenos a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. El interés clínico de tales inhibidores es por ello muy grande, teniendo en cuenta que son muchos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos empleados en terapéutica.

Aunque la inhibición de las  $\beta$ -lactamasas, ha sido motivo de estudio desde hace bastantes años, solamente en los últimos cinco o seis años, se han encontrado compuestos efectivos como inhibidores.

La dificultad para el estudio del tema, parte del hecho de la existencia de diversas  $\beta$ -lactamasas. Por otro lado, ha sido usualmente considerado que, solamente las  $\beta$ -lactamas, eran los sustratos para las  $\beta$ -lactamasas. El reciente hallazgo de que ciertos ésteres del ácido piniciloico son sustratos para ciertas  $\beta$ -lactamasas (390), puede conducir la investigación por nuevos caminos.

El descubrimiento del ácido clavulánico (137) como un sustrato suicida para las  $\beta$ -lactamasas, condujo a una verdadera explosión en el desarrollo de inactivadores, naturales y sintéticos. En los pasados seis años, han aparecido numerosos trabajos sobre sustratos suicidas para  $\beta$ -lactamasas bacteriales. La mayor parte de las estructuras consideradas, son de tipo sulfonas o carbapenemos. El compuesto de Pfizer, ácido penicilánico sulfona (conocido como *sulbactam*) (391), se ve como una promesa clínica. Este compuesto, muestra un buen sinergismo con una penicilina estándar (p.ej. ampicilina, amoxicilina, azlocilina) (392), contra bacterias penicilina resistentes. El mismo grupo Pfizer, ha indicado una combinación de tipo profármaco llamada "*sultamacilina*", la cual combina el *sulbactam* y la amoxicilina por un lábil enlace con formaldehído, en un intento para administrar, simultáneamente, el antibiótico y el inhibidor, con idéntico punto farmacocinético de entrada (393). La combinación de clavulanato (inhibidor) y diversas  $\beta$ -lactamas, como *amo-*

*xicilina* (394) y *ticarcilina*, han sido comercializadas últimamente, así como la asociación de *subactama* y la cefalosporina *cefoperazona*.

Otros muchos ejemplos, podrían ser citados dentro del contexto que nos ocupa: ácido glutámico descarboxilasa, alanina racemasa, cistationina  $\gamma$ -sintetasa y metionina  $\gamma$ -liasa, ácido aminolevulínico sintetasa, dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, ribonucleótido reductasa, aromatasas, 3  $\alpha$ -hidroxiesteróide deshidrogenasa,  $\Delta^5$ -3-cetoesteroide isomerasa, aldeido deshidrogenasa, etc., son ejemplos conocidos como objetivos de inhibidores enzimáticos, que ponen de manifiesto el interés creciente en este campo de investigación (395).

## VII. CONCLUSION

A lo largo de esta disertación, hemos podido comprobar que el problema del diseño y obtención de nuevos fármacos, es complejo y todavía no se dispone de una metodología única adecuada al fin propuesto. Sin duda alguna, el camino más realista que se nos ofrece para obtener nuevos y mejores fármacos, es la variación estructural, racional, de algo ya existente, en la esperanza de alcanzar algún compuesto con mejores propiedades que el prototipo de partida. Asimismo, insistimos en que el conocimiento del mecanismo bioquímico de una enfermedad, constituye una de las aproximaciones más sensatas de que disponemos para el desarrollo de nuevos fármacos. Por otro lado, los estudios estructurales sobre proteínas, realizados con rayos X, tanto directamente como los de complejos proteína-ligando formados por unión de proteínas a diversos fármacos, ofrecen un camino que permite formular una hipótesis de trabajo acerca de la estructura tridimensional de los receptores. De esta manera se podrá disponer de una base para el diseño de nuevos fármacos, que ya empieza a dar sus frutos.

Por su transcendencia, la obtención de nuevos fármacos, es una de las tareas más nobles a las que el químico, fundamentalmente el químico orgánico, puede dedicarse. No obstante, y por aquello de que "lo que sirve para sanar también puede servir para matar", es ésta una actividad en la que el investigador deberá de actuar con mucha cautela, para que sus descubrimientos no sean empleados, como algunas veces ha sucedido en la degradación del ser humano.

Confiamos pues en que el hombre, haga un buen uso de los remedios terapéuticos y se aproveche de ellos para mejorar su salud. De esta forma podrá disfrutar de una mente sana y también lograr el equilibrio espiritual imprescindible para alcanzar un más elevado estado de conciencia que le permita acercarse hacia la meta para la que fué creado: "el conocimiento de la Verdad".

## BIBLIOGRAFIA

- (1) OPENSHAW H. T. (1953) en "The Alkaloids", Vol. 3, R. H. T. Manske y H. L. Holmes, Eds., Academic Press, New York, pag. 101.
- (2) NAGAI N. (1887) *Pharm. Ztg.* 32, 700.
- (3) Trabajo de WITHERING W. Reproducido en (1937) *Med. Class.*, 2, 305.
- (4) DOCKER E. S. (1958) *Lancet*, 113, 2, 169.
- (5) STANDEN O. D. En *Experimental Chemotherapy*. (1963) Vol. 1, R. J. Schnitzer y F. Hawkings, Eds., Academic Press, New York, pag. 859.
- (6) SERTURNER F. W. A. (1805) *J. Pharm.*, 13, 234.
- (7) PELLETIER J. y CAVENTOU E. (1820) *Ann. Chem. Phys.* 15, 291, 337.
- (8) IM-7109 (\*).
- (9) DRESER H. (1899) *Arch. Gen. Physiol.*, 76, 396; *Ther Monatsh.*, 17, 131 (1903); IM-863.
- (10) SILVERMAN M. (1947) en "Drogas Mágicas", Ed. Sudamericana, Buenos Aires, pag. 214; IM-7064.
- (11) IM-1150.
- (12) IM-3382.
- (13) EISLEB O. y SCHAUMAN O. (1938) *Deutsche Med. Wchuschr.*, 65, 967; IM-5674.
- (14) ARCHER y STEMBACH (1968) *Chem. Rev.*, 68, 747; IM-2040.
- (15) IM-8990.
- (16) HILLIER K. (1982) *Drugs Fut.*, 7, 10; IM-A1 (apéndice).
- (17) KUNZ y col. (1956) *Arzneimittel Forsch.*, 6, 426.
- (18) PECK y col. (1946) *J. Am. Chem. Soc.*, 68, 1390; IM-3161.
- (19) LANGLEY J. N. (1905) *J. Physiol.*, 33, 374.
- (20) EHRLICH P. (1909) *Ber.*, 42, 17.
- (21) LANGLEY J. N. (1878) *J. Physiol.*, 1, 339.
- (22) CLARK A. J. (1933) "The Mode of Action of Drugs on Cell", Williams and Wilkins, Baltimore.
- (23) GADUM J. H. (1937) *J. Physiol.*, 89, 7P.
- (24) LINDSTROM J. (1985) en "Neurotransmitter Receptor Binding", H. I. Yamamura, S. J. Enna y M. J. Kuhar, Eds., Raven Press, New York, pag. 123; J. Douglss, O. Civelli y E. Herbert, *Ann Rev. Biochem.*, 53, 665 (1984).
- (25) MISHINA M., KUROSAKI T., TOBIMATSU T., MOIMOTO Y., NODA M., YAMAMOTO T., TERAOKA M., LINDSTROM J., TAKAHASHI T., KUNO M. y NUMA S. (1984) *Nature*, 307, 604.
- (26) WILLIAMS M. y ENNA S. J. (1986) "The Receptor: From Concept to Funtion", *Ann. Rep. Med. Chem.* 21, 211.
- (27) DIXON M. y WEBB E. C. (1979) "The Enzymes", 3<sup>a</sup> Ed. Academic Press, New York
- (28) CLARK A. J. (1926) *J. Physiol. (Lond.)*, 61, 530.
- (29) ARIENS E. J. y SIMONIS A. M. (1964) *J. Pharm. Pharmacol.* 16, 137, 289.
- (30) STEPHENSON R. P. (1956) *Brit. J. Pharmacol.*, 11, 379.
- (31) PATOM W. D. M. (1961) *Proc. Roy. Soc. London (Ser. B)* 154, 21.

(\*). Las referencias de este tipo, corresponden al número de entrada con el que el compuesto referenciado aparece en "The Merck Index" 10<sup>a</sup> edición. Merck & Co., Inc. Rahway, N. J., U. S. A. 1983.

- (32) MONOD J., WYMAN J. y CHANGEUX J-P. (1965) *J. Mol. Biol.*, 12, 88.
- (33) KOSHLAND D. E., NEMETHY G. y FILMER D., (1966) *Biochemistry*, 5, 365.
- (34) BECKETT A. H. y CASY A. F. (1954) *J. Pharm. Pharmacol.* 6, 986; A. H. BECKETT. (1959) *Progr. Drug. Res.* 1, 455; (1962) A. H. BECKETT y A. F. CASY. *Progr. Med. Chem.* 2, 43; A. H. BECKETT y A. F. CASY. (1965) *Pr. Med. Chem.* 4, 171.
- (35) BUCHI J. y PERLIA X. (1960) *Arzneimittel-forsch.* 10.1; J. BBUCHI y X. PERLA (1963) *Farmaco (Pavia) Ed. Sci.* 18, 197.; J. BUCHI, K. MULLER, PERLIA y M. A. PREISWERK (1966) *Arzneimittelforsch.* 16, 1263.
- (36) BELLEAU B. y MORAN . (1962) *J. Med. Pharm. Chem.* 5, 215.
- (37) GORDON M., COOK L., TEDESCHI D. H. y TEDESCHI R. E. (1963) *Arzneimittel forsch.* 13, 318.
- (38) ROSSUM J. M. (1962) *Int. J. Neuropharmacol.*, 1, 97, 403; A. GOLDSTEIN, L. ARONOW y S. M. KALMAN, (1968) "Principles of Drug Action", Hasper y Row, Ed. New York.
- (39) WASER P. G. (1963) *Actualites Pharmacol.*, 16, 169; *Ibid.*, II *Farmaco (Pavia), Ed. Sci.*, 23, 513 (1968).
- (40) BEBBINGTON A. y BRIMBLECOMBE R. W. (1965) *Advan. Drug. Research*, 2, 143.
- (41) WOLFF M. E., HO W. KWOK R. (1964) *J. Med. Chem.* 7, 577.
- (42) TRIGGLE D. J. (1965) *Advan. Drug Res.* 2, 173.
- (43) ROCHA e SILVA M. (1966) Histamine and antihistaminics. *Handbuch der experimentellen pharmacologie.* Vol 18/1 Springer
- (44) WEINSTEIN H., OSMAN R., EDWARDS W. D., GREEN J. P. (1978) *Int. J. Quantum Chem. Quantum Biol. Symp.*, 5, 449.
- (45) RICHARDS W. G. (1977) *Quantum Pharmacology*, Butterworths, London, pag. 117.
- (46) GUND P., ANDOSE J. D., RHODES J. B. y SMITH G. M. (1980) "Three-Dimensional Molecular Modeling and Drug Design", *Science*, 208, 1425.
- (47) IM-2411.
- (48) HARRIES C. (1897) *Ann. Chem.*, 296, 328.
- (49) EINHORN A. (1900) *Ann. Chem.*, 311, 26; EINHORN, A. y PFYL, B. (1900) *Ibid*, 311, 34; IM-6757.
- (50) FOURNEAU E. (1903) Pat. alem. 169746, 169787; *Compt. Rend.*, 138, 766 (1904).
- (51) SALKOWSKI H. (1895) *Chem. Ber.*, 28, 1917; RITSER E. *Pat. alem.* 147790 (1903).
- (52) EINHORN A. y col. (1900) *Ann. Chem.*, 371, 125, 131, 142, 162; IM-7661.
- (53) OVERTON E. (1901) *Studien über die Narkose*, Fischer, Jena.
- (54) SCHAFFER J. M. y TILLEY F. W. (1926) *J. Bacs.*, 12, 303; *Ibid.* 14, 259 (1927).
- (55) HANSCH C. H. (1969) *Acc. Chem. Res.*, 2, 232.
- (56) GORDON M. GRAIG P. N. y ZIRKLE C. L. (1964) "Molecular Modification in Drug Design", *Advances in Chemistry Series n° 45*, Amer. Chem. Soc. Washington, D. C.
- (57) IM-7691.
- (58) IM-3088.
- (59) IM-7688.
- (60) IM-4582.
- (61) IM-2831.
- (62) IM-606.
- (63) IM-9395.
- (64) MCGRATH W. R. y KUHN W. L. (1968) *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 172, 405.
- (65) RATHKE M. W., INONE N., VARMA K. R. y BROWN H. C. (1966) *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 2870.
- (66) IM-4817.

- (67) ARIENS E. J. (1971) "A General Introduction" en *Drug Design*, Vol. 1, E. J. Ariens, Ed. Academic Press, New York, pp 1-270.
- (68) IM-3322.
- (69) IM-5613.
- (70) IM-5614.
- (71) IM-5623.
- (72) ERDTMAN H. y LOFGREN N. (1937) *Svensk Kem.*, 49, 163; IM-5310.
- (73) DALE H. H. y LAIDLAW P. P. (1910) *J. Physiol. Lond.*, 41, 318.
- (74) BOVET O. y STAUB A. M. (1937) *C. R. Soc. Biol. (París)*, 124, 547.
- (75) LOEW E. R. (1947) *Physiol. Rev.*, 27, 542.
- (76) IM-7883.
- (77) IM-9542.
- (78) IM-3320.
- (79) WELLS, J. A., MORRIS, H. C., BULL H. B. y DRAGSTEDT, C. A. (1945) *Dragstedt, J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 85, 122.
- (80) HALPERN B. N. y MAURIC G. (1946) *C. R. Soc. Biol. (París)* 140, 440.
- (81) SCHILD H. O. (1947) *Br. J. Pharmacol.*, 2, 189.
- (82) ROVERTSON C. y GROSSMAN M. I. (1952) *Arch. Int. Pharmacol.*, 90, 223.
- (83) ASH A. S. F. y SCHILD H. O., (1966) *Br. J. Pharmacol. Chemothera*, 27, 427.
- (84) BLACK J. W., DUNCAN W. A. M., DURANT G. J., GANELLIN C. R. y PARSONS M. E. (1972) *Nature (London)*, 236, 385.
- (85) BLACK J. W., DURANT G. J., EMMETT J. C. y GANELLIN C. R. (1974) *Nature (London)* 248, 65.
- (86) BLACK J. W., DUNCAN W. A., EMMETT J. C., GANELLIN C. R., HESSELBO T., PARSONS M. E. y WYLLIE J. H. (1973) *Agents. Actions*, 3, 133.
- (87) DURANT G. J., EMMETT J. C., GANELLIN C. R., MILES P. D., PRAIN H. D., PARSONS M. E. y WHITE G. R. (1977) *J. Med. Chem.* 20, 901; IM-2254.
- (88) BRIMBLECOMBE R. W., DUNCAN W. A. M., DURANT G. J. EMMETT J. C., GANELLIN C. R. y PARSONS M. E. (1975) *J. Int. Med. Res.*, 3, 86.
- (89) IM-8019.
- (90) HILLIER K. (1983) *Drugs Fut.*, 8, 14; J. R. Prous, ed., *Annu. Drug Data Rep.*, 7, 784 (1985).
- (91) HOWARD M. M., COLLEN M. J., CHERNER J. A., MCARTHUR K. E., MATON P. N., GARDNER J. D. y JENSEN R. T. (1984) *Gastroenterol.*, 86, 1117.
- (92) GARAY G. L. y MUCHOWSKI J. M. (1985) *Ann. Rept. Med. Chem.*, 20, 93; J. R. Prous, ed., *Annu. Drug Data Rep.* 4, 175 (1982).
- (93) GARAY G. L. y MUCHOWSKI J. M. (1985) *Ann. Rept. Med. Chem.*, 20, 93; E. Z. DAJANI, D. R. DRISKILL, G. R. BIANCHI, E. L. PHILLIPS, E. M. WOOD, D. G. COLTON, P. W. COLLINS y R. RAPPO, (1983) *Drug Der. Res.* 3, 339; Prous J. R., ed., (1979/1980) *Annu. Drug Data Rep.* 2, 201.
- (94) GUSLANDI M., FOSCHI D., FERRANTE F. y ROVATI V. (1984) *Curr. Ther. Res.*, 35, 643; Prous J. R., (1984) ed., *Annu. Drug Data Rep.*, 6, 212.
- (95) CASSINELLI G. y OREZZI P. (1963) *Glom. Microbiol.* 11, 167; IM-2815.
- (96) DI MARCO A. (1967) *Path. Biol.*, 15, 897; IM-6074, 1517.
- (97) DI MARCO A., GAETANI M. y SCARFINATO B. M. (1969) *Cancer Chemother. Rep.*, 53, 33; IM-3435.
- (98) SUARATO A., PENCO S., VIGEVANI A. y ARCAMONE F. *Carbohydr. Res.*
- (99) PROUS J. R. (1984) Ed., *Annu. Drug Data Rep.*, 6, 196.

- (100) IM-1150 y 6952.
- (101) IM-6957.
- (102) BATCHELOR F. R., DOYLE F. P., NAYLER J. H. C. y ROLINSON G. N. (1948) *Nature*, 175, 793.
- (103) DOYLE F. P., FOSKER G. R., NAYLER J. H. C. y SMITH H. (1962) *J. Chem. Soc.*, 1440; IM-612.
- (104) GODTFREDSSEN W. O. (1983) en "Chronicles of Drug Discovery", Vol. 2, J. S. Bindra y D. Lednicer Eds., John Wiley & Sons, New York, pag. 133.
- (105) JANSEN A. B. A. y RUSSELL T. J. (1965) *J. Chem. Soc.* 2127.
- (106) ISAKA y col (1976) *Chem. and Pharm. Bull.*, 24, 102; J. P. CLAYTON y col. (1976) *J. Med. Chem.*, 19, 1385.
- (107) NAYLER J. H. C. y SMITH H. (1964) *Pat. Brit.*, 981.178; A. A. W. LONG, J. H. C. NAYLER, H. SMITH, T. TAYLOR y N. WARD (1971) *J. Chem. Soc., Ser. C*, 1920.
- (108) BUTLER y col. (1970) *J. Infec. Dis.*, 122, *Suppl.*, 81; IM-1773.
- (109) BRAIN E. G. y NAYLER J. H. (1964) *U. S. Pat.* 3.282.926; IM-9271.
- (110) BROTZU G. (1948) *Lavori del L'Instituto D'Igiene di Cagliari*.
- (111) MORIN R. B., JACKSON B. G., FLYNN E. H. y ROESKE R. W. (1962) *J. Am. Chem. Soc.* 84, 3400; R. B. MORIN., B. G. JACKSON, E. H. FLYNN., R. W. ROESK y L. ANDREWS (1969) *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 1396.
- (112) FECHTIG B., PETER H., BICKEL H. y VISCHER E. (1968) *Helv. Chim. Acta*, 51, 1108.
- (113) CHAUVETTE R. R. y col. (1962) *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 3401.
- (114) ABRAHAM E. P., NEWTON G. G. F y HALE C. W. (1961) *Biochem. J.*, 79, 403.
- (115) KARIYONE K., HARADA H., KURITA M. y TAKANO T. (1970) *J. antibiot.*, 23, 131.
- (116) FINLAND M., KAYE D. y TURCK M. (1973) Eds., *J. Infect. Dis.*, 128 S312-S424.
- (117) ATROMINGER J. L. (1969) en "Inhibitors: Tools in Cell Research". Bucher T. y Sies H., Eds., Springer-Verlag, pag. 187-207.
- (118) RYAN C. W., SIMON R. L. y VAN HEYNINGEN E. M. (1969) *J. Med. Chem.*, 12, 310; IM-1936.
- (119) SPENCER J. L. y col. (1966) *J. Med. Chem.*, 9, 746.
- (120) MORIN R. B., JACKSON B. G., MUELLER R. A., LAVAGNINO E. R., SCANLON W. B. y ANDREWS S. L. (1969) *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 1401.
- (121) YOSHIDA M., KONOMI T., KOHSAKA M., BALDWIN E. J., HERCHEN, S., SINGH P., HUNT N. A. y DEMAIN A. L. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75. 6253.
- (122) CHAUVETTE R. R. y col. (1971) *J. Org. Chem.*, 36, 1259.
- (123) LUND F. J. (1983) en "Chronicles of Drug Discovery" Vol. 2, J. S. Bindra y D. Lednicer, Eds., John Wiley & Sons, New York, pag. 149.
- (124) LUND F. y TYBRING L. (1972) *Nature New Biol.*, 236, 135.
- (125) TYBRING L. y MELCHIOR N. H. (1975) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 8, 271; GRUMBERG, E., CLEELAND, R., BESKID, G. y DELORENZO, W. F., (1976) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 9, 589.
- (126) NAGARAJAN R. C. y col. (1974) "Antimicrob. Agents Chemother", 6, 320.
- (127) CAMA L. D., LEANZA W. J., BEATTIE T. R. y CHRISTENSEN B. G. (1972) *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 1408; S. KARADY y col. (1972) *ibid.*, 94, 1410.
- (128) *Annu. Rep. Med. Chem.*, 20, 317 (1985); MI-1906.
- (129) *Annu. Rep. Med. Chem.*, 20, 317 (1985); IM-1908.
- (130) *Annu. Rep. Med. Chem.*, 20, 316 (1985); IM-1904.
- (131) SAIKAWA y col. (1976) *Pat. Belg.* 837.682; IM-1905.

- (132) *Annu. Rep. Med. Chem.*, 21, 325 (1986); IM-A4.
- (133) *Annu. Rep. Med. Chem.*, 21, 325 (1986).
- (134) AOKI H. y col. (1976) *J. Antibiotics*, 24, 492; M. HASIMOTO y col., (1976) *J. Antibiotics*, 24, 890.
- (135) ALBERS-SCHOMBERG G. y col. (1978) *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 6491.
- (136) SHEEHEN G. J. y RONALD A. R. (1985) *Curr. The. Res.*, 37, 1141; J. R. Prous, ed. (1985) *Annu. Drug Data Rep.*, 7, 799.
- (137) HOWARTH T. T., BROWN A. G. y KING T. J. (1976) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 266; IM-2311.
- (138) READING C. y COLE M. (1977) *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 11, 852.
- (139) NARISADA M. y NAGATA W. (1977) *Pat. alem.* 2.713.370; M. NARISADA y col., (1979) *J. Med. Chem.*, 22, 757; IM-6143.
- (140) SCOTT WELLS J., TREJO W. H., PRINCIPE P. A., BUSH K., GEORGOPAPADAKOU N., DONNER D. P. y SYKES R. B. (1982) *J. Antibiotics*, 35, 295.
- (141) IMADA A., KITANO K., KINTABA, K., MUROI M. y ASAI M. (1981) *Nature*, 289, 590.
- (142) SYKES R. B. y col., (1981) *Nature*, 291, 489.
- (143) *Ann. Rep. Med. Chem.*, 20, 315 (1985).
- (144) SYKES R. B., BUSH K., BONNER D. P. y GEORGOPAPADAKOU N. H. (1982) *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 21, 85.
- (145) IM-9000.
- (146) ZELLER P., PLETSCHER A., GEY K. F., GUTMANN H., HEGEDUS B. y STRAUB O. (1959) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 80, 555; IM-4933.
- (147) SOUTHWORTH H. (1937) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 36, 58; IM-8798.
- (148) MANN T. y KEILIN D. (1940) *Nature*, 146, 164.
- (149) DAVENPORT H. W. y WILHELMI A. E. (1941) *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* 48, 53.
- (150) SCHWARTZ W. B. (1949) *New Wngl. J. Med.*, 240, 173.
- (151) IM-45.
- (152) BEYER K. H. y BAER J. E. (1961) *Pharmacol. Rev.*, 13, 517; IM-2143.
- (153) FEIT P. W., NIELSON O. B. T. y BRUUN H. (1972) *J. Med. Chem.*, 15, 437; IM-4186.
- (154) JANBON M., CHAPTAL J., VEDEL A. y SCHAAP J. (1942) *Montpellier Med.*, 21-21, 441.
- (155) LOUBATIERES A. (1957-1958) *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 71, 4.
- (156) FRANKE H. y FUCHS J. (1955) *Deut. Med. Wochenschr.* 1449; IM-1816.
- (157) IM-9337.
- (158) IM-2164.
- (159) IM-53.
- (160) JANSSEN P. A. J. y TOLLENAERE J. P. (1983) en "Chronicles of Drug Discovery" Vol. 2, J. S. Bindra y D. Lednicer, Eds., John Wiley & Sons, New York, pag. 33.
- (161) BRAENDEN O. J., EDDY N. B. y HALBACH H. (1955), *Bull. W. O.*, 13, 937.
- (162) JANSSEN P. A. J., JAGENEAU A. H., VAN PROOSDY-HARTZEMA E. G. y DE JONGH D. K. (1958) *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.*, 7, 373.
- (163) JANSEN P. A. J., JAGENEAU A. H. M., DEMOEN P. J. A., VAN de WESTERINGH C., RAEYMAEKERS A. H. M., WOUTERS M. S. J., SANCZUK S., HERMANS B. K. F. y LOOMANS J. L. M. (1959) *J. Med. Pharm. Med.*, 1, 105.
- (164) JANSEN P. A. J., JAGENEAU A. H. M., DEMOEN P. J. A., VAN de WESTERINGH C., DE CANNIERE J. H. M., RAEYMAEKERS A. H. M., WOUTERS M. S. J., SANCZUK S. y HERMANS B. K. F. (1959) *J. Med. Pharm. Med.*, 1, 309.
- (165) IM-4480.
- (166) IM-903.



- (167) IM-4027.  
(168) IM-9491.  
(169) IM-7327.  
(170) JANSEN P. A. J., NIEMEGERES C. J. E., SCHELLEKENS K. H. L., DESSE A., LE-  
NAERTS F. M., PINCHARD A., SCHAPER W. K., A. VAN NUETEN, J. M. y VER-  
BRUGGEN F. J. (1968) *Arzneim.-Forsch.*, 18, 261; IM-7310.  
(171) LANGMUIR I. (1919) *J. Am. Chem. Soc.*, 41, 868 y 1543.  
(172) GRIMM H. G. (1925) *Z. Elektrochem.*, 31,474; (1928) *ibid.*, 34, 430.  
(173) ERLNMEYER H. (1948) *Bul. Soc. Chem. Biol.*, 30, 792.  
(174) HINSBERG O. (1916) *J. Prakt. Chem.*, 93, 302.  
(175) BORET D. (1959) "Isosterism and Competitive Phenomena in Drugs", *Science*, 129, 1255.  
(176) FRIEDMAN H. L. (1951) "Symposium on Chemical-Biological Correlation", National Re-  
search Council Pub. n<sup>o</sup> 206, Washington D. C. pag. 295.  
(177) ARIENS E. J. (1964) ed. "Molecular Pharmacology", Vol. 1 Academic New York.  
(178) SCHATZ V. B. (1960) en "Medicinal Chemistry" 2<sup>a</sup> ed., ed. A. Burger, Wiley-Interscience,  
New York.  
(179) BURGER A. (1970) en "Medicinal Chemistry" 3<sup>a</sup> ed., ed. A. Burger, Wiley-Interscience,  
New York.  
(180) FOYE W. O. (1970) "Principles of Medicinal Chemistry", Lea y Febiger, Philadelphia.  
(181) KOROLKOVAS A. (1970) "Essentials of Molecular Pharmacology: Background for Drug  
Design", Wiley.  
(182) ARIENS E. J. (1971) en "Drug Design", ed. E. J. Ariens, Academic Press, New York, Vol. 1  
(183) HANSCH C. (1974) *Intra-Science Chem. Rep.*, 8, 17.  
(184) THORNER C. W. (1979) *Chem. Soc. Rev.* 8, (4), 563.  
(185) HANSCH C. (1969) *Accounts. Chem. Res.*, 2, 232.  
(186) LIPINSKI C.A. (1986) *Ann. Rep. in. Med. Chem.*, 21, 283.  
(187) HANSCH C. (1981) *Drug Development Res.*, 1, 267.  
(188) MARTIN Y. C. (1981) *J. Med. Chem.* 24, 229.  
(189) LEO A., HANSCH C. y ELKINS D. (1971) *Chem. Rev.*, 71, 525.  
(190) HANSCH C. y LEO A. (1979) "Substituent Constants For Correlation Analysis in Chemistry  
and Biology", John Wiley & Sons, New York.  
(191) JAFFE H. H. (1953) *Chem. Rev.*, 53, 191.  
(192) TAFT R. W. (1956) en "Steric Effects in Organic Chemistry", M. S. Newman, Ed., John Wiley  
& Sons, New York par. 559-675.  
(193) WISEMAN E. H. y LOMBARDINO J. G. (1982) "Chronicles of Drug Discovery", Vol. 1, J. S.  
Bindra y D. Lednicer, Eds., John Wiley & Sons, New York pag. 173; IM-7378.  
(194) WISEMAN E. H. y LOMBARDINO J. G. (1981) *European J. Rheumatol. Inflamm.*,  
4, 280.  
(195) IM-7157.  
(196) IM-4852.  
(197) IM-4796.  
(198) IM-4797.  
(199) CRUM-BROWN A. y FRASER T. (1969) *Trans. Roy. Soc. Edinburgh*, 25, 151.  
(200) RICHET M. C. (1893) *C. R. Soc. Biol.*, 45, 775.  
(201) MEYER H. (1899) *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 42, 109.  
(202) OVERTON E. (1897) *Z. Physikol. Chem.*, 22, 189.  
(203) OVERTON E. (1899) *Vierteljahresschr. Naturforsch. Ges. Zuerich.*, 44, 88.

- (204) OVERTON E. (1901) Studien über die Narkose, Fischer, Jena, pag. 45.
- (205) TRAUBE J. (1904) *Arch. Ges. Physiol.* 105, 541
- (206) FUHNER H. (1904) *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 51, 1
- (207) FUHNER H. (1904) *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 52, 69.
- (208) FUHNER H. y WEUBAUER E. (1907) *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 56, 333.
- (209) MOORE W. (1917) *J. Agr. Res.*, 9, 371.
- (210) MOORE W. (1917) *J. Agr. Res.*, 10, 365.
- (211) MOORE W. y GRAHAM S. A. (1918) *J. Agr. Res.*, 13, 523.
- (212) MOORE W. (1919) *Science*, 49, 572.
- (213) FERGUSON J. (1939) *Proc. Roy. Soc., Ser. B*, 127, 387.
- (214) BRUCE T. C., KHARASCH N. y WINZLER R. J. (1956) *Arch. Biochem. Biophys.*, 62, 305.
- (215) FREE S. M. y WILSON J. W. (1964) *J. Med. Chem.*, 7, 395.
- (216) HANSCH C. (1971) en "Drug Design" Vol. 1, E. Ariëns, Ed. Academic Press, New York, pag. 271-342.
- (217) HAMMETT L. P. (1935) *Chem. Rev.*, 17, 125.
- (218) HAMMETT L. P. (1940) *Physical Organic Chemistry*, 1<sup>a</sup> ed., McGraw-Hill, New York, pag. 184-199.
- (219) ALDRIDGE W. N. y DAVISON A. N. (1952) *Biochem. J.*, 51, 62.
- (220) BENDER M. L. y NAKAMURA K. (1962) *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 2577.
- (221) BLOMQUIST C. H. (1966) *Acta Chem. Scand.*, 20, 1747.
- (222) NATH R. L. y GHOSH N. K. (1963) *Enzymologia*, 26, 297.
- (223) NEIMS A. H., DELUCA D. C. y HERRERMAN L. (1966) *Biochemistry*, 5, 203.
- (224) OMEROD W. E. (1953) *Biochem. J.*, 54, 701.
- (225) O'SULLIVAN D. G. y SADLER P. W. (1957) *Arch. Biochem. Biophys.*, 66, 243.
- (226) SAGER W. F. y PARKS P. C. (1964) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 52, 408.
- (227) SEYDEL J. K. (1966) *Mol. Pharmacol.*, 2, 259.
- (228) HANSEN O. R. (1962) *Acta Chem. Scand.*, 16, 1593.
- (229) KIER L. B. (1970) Ed. "Molecular Orbital Studies in Chemical Pharmacology", Springer-Verlag, New York.
- (230) NEELY W. B. (1967) *Mol. Pharmacol.*, 3, 108.
- (231) PULLMAN A. y PULLMAN B. (1969) en "Physico-chemical Mechanisms of Carcinogenesis", Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry, I, The Israel Academy of Sciences and Humanities, pag. 9.
- (232) PULLMAN B. (1964) en "Electronic Aspects of Biochemistry", B. Pullman Ed., Academic Press, New York, pag. 559.
- (233) PULLMAN B. y PULLMAN A. (1963) "Quantum Biochemistry", Inter-Science Publishers, New York.
- (234) PULLMAN B., PULLMAN A., UMANS P. y MAIGRET B. (1969) en "Physico-Chemical Mechanisms of Carcinogenesis", The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry, I, The Israel Academy of Sciences and Humanities, pag. 325.
- (235) NEELY W. B. (1965) *Mol. Pharmacol.*, 1, 137.
- (236) KIER L. B. (1968) *J. Med. Chem.*, 11, 441.
- (237) KIER L. B. (1968) *J. Med. Chem.*, 11, 915.
- (238) KIER L. B. (1968) *J. Pharm. Sci.*, 57, 1188.
- (239) KIER L. B. (1968) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 164, 75.
- (240) KIER L. B. (1969) *J. Pharm. Pharmacol.*, 21, 93.
- (241) KIER L. B. (1970) *J. Pharm. Sci.*, 59, 112.

- (242) KIER L. B. (1970) en "Fundamental Concepts in Drug-Receptor Interactions", J. F. Danielli J. F. Moran y D. J. Triggle, Eds., Academic Press, New York, pag. 15.
- (243) BEASLEY J. G. y PURCELL W. P. (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, 178, 175.
- (244) PURCELL W. P. (1965) *Biochim. Biophys. Acta*, 105, 201.
- (245) BAN T. y FUJITA T. (1969) *J. Med. Chem.*, 12, 353.
- (246) PUECELL W. P. y CLAYTON J. M. (1969) *Ann. Rept. Med. Chem.*, 13, 314.
- (247) MARTIN Y. C. (1970) *J. Med. Chem.*, 13, 145.
- (248) WOHL A. (1970) *Mol. Pharmacol.*, 6, 189.
- (249) WOHL A. (1970) *Mol. Pharmacol.*, 6, 195.
- (250) NEELY W. B., WHITE H. C. y RUDZIK A. (1968) *J. Pharm. Sci.*, 57, 1176.
- (251) JARDEZKY O. (1964) *Adv. Chem. Phys.*, 7, 499.
- (252) JARDEZKY O. (1967) *Naturwissenschaften*, 54, 149.
- (253) KATO G. (1969) *Mol. Pharmacol.*, 5, 148.
- (254) SCHMIDT P. G., STARK G. R. y BALDESCHWIELER J. D. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 1860
- (255) HOLLIS D. P. (1967) *Biochemistry*, 6, 2080.
- (256) RAFTERY M. A., DAHLQUIST F. W., PARSONS S. M. y WOLCOTT R. G. (1969) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 62, 44.
- (257) CUSHNY A. R. (1926) "Biological Relations of Optically Isomeric Substances". Balliere Indal y Cox., Eds. Londres.
- (258) EASON L. H. y STEDMAN E. (1933) *Biochem. J.*, 27, 1257.
- (259) LEHMANN P. A., RODRIGUES DE MIRANDA J. F. y ARIENS E. J. (1976) en *Progress in Drug Research* (E. Jucker, ed.), Vol. 20, pag. 101-128, 126-142.
- (260) VERMEULEN M. y BREIMER R. (1983) *Stereochemistry and biological activity of drugs*, E. Ariens, W. Soudijn, P. Timmermans., Blackwell Scientific Publications. Oxford, pag. 33.
- (261) VAN GINNEKEN C., RODRIGUES DE MIRANDA J. y BELD A. (1983) "Stereochemistry and Biological Activiti of Drugs", E. Ariens, W. Soudijn, P. Timmermans. Blackwel Scientific Publications. Oxford, pag. 55.
- (262) ARIENS E. J. (1986) *Arch. de Farmacol. y Toxicol.* 12, 3.
- (263) BARTMANN W. y WINTERFELD E. (1979) "Stereo selective Synthesis of Natural Products", *Excerpta Medica Amsterdam*, 3; H. KAGAN y J. RIAUD, "Topics in Stereochemistry", E. ELIEL, ALINGER, WILEY, New York, 10, 175 (1979); H. WINJNBERG, *Chem. Eng. News.*, 58, 24 (1980); S. WILEN, *Enantiomers, Racemates and Resolution*, Wiley, New Yor (1981); J. MORRISON. *Asymetric Synthesis*, Vol. 1, 2 y 3. Academic Press. New York (1983-1984).
- (264) WOOD D. D. y FILDES P. (1940) *Chem. Ind. (London)*, 59, 133.
- (265) KOROLKOVAS A. (1970) en "Essentials of Molecular Pharmacology. Blackground for Drug Design". Wiley, New York, pag. 289.
- (266) KELLER W. (1842) *Ann. Chem. Liebigs*, 43, 108.
- (267) SCHULTZEN O. y NAUNYN B. (1867) *Anal. Anat. Physiol.*, 349.
- (268) IM-8798.
- (269) IM-2715.
- (270) STERNBACH L. H. y REESER E. (1961) *J. Org. Chem.*, 26, 4936.
- (271) IM-9998.
- (272) CONNEY A. H. y BURNS J. J. (1960) *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 128, 340; A. H. CONNEY, N. TROUSOF y J. J. BURNS, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 128, 333 (1960).
- (273) IM-5405.
- (274) KADIN S. B. y OTTERNESS J. G. (1980) *Antibodies as Drug Carriers and Toxicity reversal Agents. Annu. Rep. Med. Chem.* 15, 233-244 (1980).

- (275) IM-5828.
- (276) BODOR N. (1982) "Soft Drugs: Strategies for design of safer drugs". En "Strategy in Drug Design,, J. A. Kerverling Buisman, Ed. Elsevier, Amsterdam, pag. 137-164.
- (277) IM-273.
- (278) IM-9516.
- (279) IM-4088.
- (280) WOOLEY D. W. (1946) *Advan. Enzymol.*, 6, 129; D. W. WOOLEY, *Progr. Drug Res.*, 2, 613 (1960).
- (281) 8<sup>o</sup> Symposium de la Society for General Microbiology, "The Strategy of Chemotherapy", University Press, Cambridge, (1958); R. KNOX, "Strategy and Tactics in Antibacterial Chemotherapy", en R. J. Schnitzer y F. Hawking, Eds. *Experimental Chemotherapy*, Vol. 2, Academy, New York (1964), pag. 79-112.
- (282) GOODWIN L. G. y NIMMO-SMITH R. H. (1962) Eds., *Drugs, Parasites and Hosts*, Little, Brown, Boston; T. E. MANSOUR, *Advan. Pharmacol.*, 3, 129 (1964); T. von BRAND, *Biochemistry of Parasites*, Academic, New York (1966); M. Florkin y B. T. Scher, Eds., *Chemical Zoology*, 4 Vols., Academic, New York (1967-1969).
- (283) HOCHSTER R. M. y QUASTEL J. H. (1963) eds., *Metabolic Inhibitors—A Comprehensive Treatise*, 2 Vols., Academic, New York.
- (284) DOMAGK, G. (1935) *Deut. Med. Wochschr.*, 61 250; IM-8795.
- (285) TREFOUËL J., TREFOUËL J. MME, NITTI F. y BOVET D. (1935) *Comp. Rend. Soc. Biol.* 120, 756.
- (286) SEEGER D. R., COSULICH D. B., SMITH J. M. Jr. y HULTQUIST M. E. (1949) *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 1753; IM-5861.
- (287) HITCHINGS G. H. (1962) *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 46, 467; IM-7884.
- (288) ROTH B., FALGO E. A., HITCHINGS G. H. y BUSHBY S. (1962) *J. Med. Pharm. Chem.* 5, 1103; IM-9516.
- (289) ELION G. B. y HITCHINGS G. H. (1965) en *Advances in Chemotherapy*, Vol. 2, A. Goldin, F. Hawking y T. J. Schnitzer, Ed., Academic Press, New York, pag. 91.
- (290) IM-5702.
- (291) IM-9177.
- (292) IM-907.
- (293) Para una descripción completa: WILSON W. P. y BENEZRA S. A. (1981) en "Analytical Profiles of Drug Substances", Vol. 10, K. Florey, Ed., Academic Press, New York, pag. 29-53.
- (294) HEIDELBERGER C. (1973) en *Cancer Medicine*, J. F. Holland y E. Frei, III, Eds., Lea & Febiger, Philadelphia, pag. 768; C. HEIDELBERG, en *Antineoplastic and Immunosuppressive Agents*, Part. 2, A. C. Sartorelli y D. G. Johns, Eds., Springer-Verlag, Heidelberg, p. 193.
- (295) DANENBERG P. V. y HEIDELBERGER C. (1976) *Biochemistry*, 15, 1331.
- (296) REYES P. y HEIDELBERGER C. (1965) *Mol. Pharmacol.*, 1, 14.
- (297) SANTI D. V. y SAKAI T. T. (1971) *Biochemistry*, 10, 3598.
- (298) MATSUDA A. WATAYA Y. y SANTI D. V. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84, 654; M. MERTES, C. T. C. CHANG, E. DE CLERQ, G. F. HUANG y P. F. TORENCE, *08Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84, 1054 (1978).
- (299) BOBEK M. y BLOCH A. (1978) en "Chemistry and Biology of Nucleosides and Nucleotides", R. E. Harmon, R. K. Robins y L. B. Townsend, Ed., Academic Press, New York, pag. 135; T. I. KALMAN y J. C. YALOWCH, en "Drug Action and Design: Mechanism-Based Enzyme Inhibitors", T. I. Kalman, Ed., Elsevier/North Holland (1979) pag. 75.

- (300) WATAYA Y., MATSUDA A., SANTI D. V., BERGSTROM D. R. y RUTH J. L. (1979) *J. Med. Chem.*, 22, 339.
- (301) IM-909.
- (302) IM-4804.
- (303) IM-2778.
- (304) IM-8097.
- (305) IM-9779.
- (306) IM-8963.
- (307) HILLER S. A., ZHUK R. A. y YU LIDAK M. (1967) *Dokl. Acad. Nauk USSR*, 176, 332; S. A. HILLER, R. A. ZHUK, M. YU LIDAK y A. A. ZIDERMANE, British Patent. 1168.391 (1969).
- (308) SCHAEFFER H. J. (1974) *Pat. Germ.* 2.539.963; H. J. SCHAEFFER y col. *Nature*, 272, 583 (1978); IM-140.
- (309) FURMAN P. A. y col. (1985) Abstract. 440, 25th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Minnesota, Octubre 1985; H. MITSUYA y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 7069-7100. (1985).
- (310) FURMAN P. A. y col., (1986) International Conference on AIDS, París, Junio.
- (312) IM-6311.
- (313) IM-5012.
- (314) IM-3481.
- (315) IM-8222.
- (316) IM-8904.
- (317) WILSON I. B. y GINSBURG S. (1955) *Biochem. Biophys. Acta*, 18, 168; *ibid*, *Biochem. Pharmacol.*, 1, 200 (1958); IM-7601.
- (318) HEEL R. C., BROGDEN R. N., SPEIGHT T. M. AVERY G. S., (1980) *Drug*, 20, 409; IM-1747.
- (319) GOODFORD P. J. (1984) "Drug Design by the Method of Receptor Fit", *J. Med. Chem.* 27, 557.
- (320) Para una revisión véase ONDETI M. A. y CUSHMAN D. W. (1981) en "Biochemical Regulation of Blood Pressure", R. E. Soffer, Ed., Wiley, New York, pag. 165.
- (321) HARTSUK J. A. y LIPSCOMB W. N. (1971) en "The Enzymes", P. D. Boyer, Ed., Academic Press, New York, Vol. 3 pag. 1; W. N. LIPSCOMB, *Tetrahedron*, 30, 1725 (1974).
- (322) KESTER W. R. y MATTHEWS B. W. (1977) *Biochemistry*, 16, 2506; L. H. WEAVER, W. R. KESTER y B. W. MATTHEWS, *J. Mol. Biol.*, 114, 119 (1977).
- (323) PETRILLO E. W. Jr. y ONDETTI M. A. (1982) *Med. Res. Rev.*, 2, 1.
- (324) CUSHMAN D. W., CHEUNG H. S., SABO E. F. y ONDETTI M. A. (1977) *Biochemistry*, 16, 5484.
- (325) ONDETTI M. A., CONDON M. A., REID J., SABO E. F., CHEUNG H. S. y CUSHMAN D. W. (1979) *Biochemistry*, 18, 1427.
- (326) VLASES P. H., LARIJANI G. E., CONNER D. P. y FERGUSON R. K. (1985) *Clin. Pharm.* 4, 27; J. R. PROUS, ed., *Annu. Drug Data Rep.*, 6, 311 (1984); R. S. PERY, *Drugs Today*, 21, 31 (1984).
- (327) JENCKS W. P. (1966) en *Current Aspects of Biochemical Energetics*, N. O. Kaplan y E. P. Kennedy, Ed. Academic Press, New York, pag. 273.
- (328) WOLFENDER R. (1969) *Nature (Londres)* 223, 704.
- (329) COHEN R. M. y WOLFENDER R. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 7561.

- (330) SCHWART P. M., SHIPMAN C. Jr. y DRACH J. C. (1976) *Antimicrob. Agents Chemother.* 10, 64.
- (331) BORONDY P. E., CHANG T., MASCHEWSKE E. y GLAZCO A. J. (1977) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 284, 9.
- (332) COLLINS K. D. y STARK G. A. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 6599.
- (333) SCHOELLMAN G. y SHAW F. (1963) *Biochemistry*, 2, 252.
- (334) SHAW E. y GLOVER G. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.*, 139, 298.
- (335) a) RANDO R. R., (1974) *Science*, 185, 320; b) C. WALSH, *Horizons Biochem. Biophys.*, 3, 36 (1977); c) T. I. KALMAN, Ed. "Drug Action and Design: Mechanism-Based Enzyme Inhibitors", Elsevier, Amsterdam (1979).
- (336) HELMKAMP G., RANDO R., BROK D. y BLOCH K. (1968) *J. Biol. Chem.*, 243, 3229-31.
- (337) RANDO R. R. (1975) *Acc. Chem. Res.*, 8, 281.
- (338) 335 a).
- (339) ABELES R. H. y MAYCOCK A. L. (1976) *Acc. Chem. Res.*, 9, 312.
- (340) 335 b).
- (341) JUNG M. J. (1978) *Ann. Rep. Med. Chem.*, 13, 249.
- (342) METCALF B. W. (1981) *Ann. Rep. Med. Chem.*, 16, 289.
- (343) IM-1048.
- (344) IM-1778.
- (345) BARTOLINI G. y PLETSCHER A. (1975) *Pharmacol. Ther.*, 1, (3) 407.
- (346) MARSDEN C. D., PARKES J. D. y REES J. E. (1973) *Lancet*, 7844; R. M. PINDER, R. N. BROGDEN, P. R. SAWYER, T. M. SPEIGHT y G. S. AVERY, *Drugs*, 11, 329 (1976).
- (347) TAUB D. y PATCHETT A. A. (1977) *Tetrahedron Lett.*, 2745.
- (348) METCALF B. W. y JUNG K. (1977) *Tetrahedron Lett.*, 3689.
- (349) PALFREYMAN H. G., DAUZIN C., BEY P., JUNG M. J., RIBEREAM-GAYON G., AUBRY M., VEVERT J. P. y SJOERDSMA A. (1978) *J. Neurochem.*, 31, 927.
- (350) JUNG M. L. y col. (1979) *Life Sci.*, 24, 1037.
- (351) MAYCOCK A. L., ASTER S. D. y PATCHETT A. A. (1980) *Biochemistry*, 19, 709.
- (352) WALLACH D. P. (1961) *Biochem. Pharmacol.*, 5, 323.
- (353) VAN GELDER N. M. (1968) *J. Neurochem.*, 15, 747.
- (354) TAPIA R., PASANTES H., ORTEGA B. G. y MASSIEN C. H. (1966) *Biochem. Pharmacol.*, 15, 1831.
- (355) FOWLER L. J. y JOHN R. A. (1972) *Biochem. J.* 130, 569; L. J. FOWLER, *J. Neurochem.*, 21, 437 (1973).
- (356) METCALF B. W., CASARA P., (1975) *Tetrahedron Lett.*, 3337; M. J. JUNG, B. LIPPERT, B. W. METCALF, P. J. SCHECHTER, P. BOHLEN y A. SJOERDSMA, *J. Neurochem.*, 28, 717 (1977).
- (357) LIPPERT B., METCALF B. W., JUNG M. J. y CASARA P. (1977) *Eur. J. Biochem.*, 74, 441; M. J. JUNG, B. LIPPERT, B. W. METCALF, P. BOHLEN y P. J. SCHECHTER, *J. Neurochem.*, 29, 797 (1977).
- (358) KOBAYASHI K., MIYAZAWA S., TERAMARA A., MISHIMA H., KURIMARA, H (1976) *Tetrahedron Lett.*, 537; R. R. RANDO y F. W. BANGERTER, *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 6762 (1976).
- (359) ANLEZARK G., HORTON R. W., MELDRUM B. S. y SAWAYA M. C. B. (1976) *Biochem. Pharmacol.*, 25, 413; P. J. SCHECHTER, Y. TRAIER, M. J. JUNG y A. SJOERDSMA, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 201, 606 (1977); P. J. SCHECHTER, Y. TRANIER, M. J. JUNG y P. BOHLEN, *Eur. J. Pharmacol.*, 45, 319 (1977); Y. MATSUI y T. DEGUCHI, *Life Sci.* 20, 1291 (1977).
- (360) METCALF B. W. (1979) *Biochem. Pharmacol.*, 28, 1705.

- (361) GROVE J., TELL G., SCHECHTER P. S., KOCH-WESER J., WATER J. M., MARESCAUX C. y RUMBACH L. (1980) *Lancet*, 647.
- (362) SILVERMAN R. B. y LEVY M. A. (1980) *Biochem. Biophysic. Res. Commun.*, 95, 250.
- (363) METCALF B. W., BEY P., DANZIN C., JUNG M. J., CASARA P. y VEVEST J. P. (1978) *J. Amer. Chem. Soc.*, 100, 2551.
- (364) FOZARD J. R., PACT M. L., PRAKASH N. J., GROVE J., SCHECHTER P. J., SJOERDSMAN A. y KOCH-WESER J. (1980) *Science*, 208, 505.
- (365) BACCHI C. J., NATHAN H. C., HUTNER S. H., MCCANN P. P. y SJOERDSMA A. (1980) *Science*, 210, 332.
- (366) HANSON W. L., MCCANN P. P., BRADFORD M. M., CHAPMAN W. L. y SJOERDSMA A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, en prensa.
- (367) PRAKASH N. J., SCHECHTER P. J., MAMONT P. S., GROVE J., KOCH-WESER J. y SJOERDSMA A. (1980) *Life Sci*, 26, 181.
- (368) KOLLONITSCH J., PATCHETT A. A., MARBURG S., MAYCOCK A. L., PERKINS L. M., DOLDOURAS G. A., DUGGAN D. E. y ASTER S. D. (1978) *Nature* 274, 906.
- (369) DANZIN C., CASARA P., CLAVERIE N. y METCALF B. W. (1981) *J. Med. Chem.* 24, 16.
- (370) LIPPERT B., BEY P., VAN DORSSELAER V., VEVERT J. P., DANZIN C., RIBEREAU-GAYON G. y JUNG M. L. (1979) *Agents Actions*, 9, 38.
- (371) KOLLONITSCH J., PATCHETT A. A., MARBURG S., MAYCOCK A. L., PERKINS L. M., DOLDOURAS G. A., DUGGAN D. E. y ASTER S. D. (1978) *Aster Nature*, 274, 906.
- (372) GARBARG M., BARBIB G., RODERGAS E. y SCHWARTZ J. C. (1980) *J. Neurochem.*, 35, 1045.
- (373) IM-6902.
- (374) IM-2876.
- (375) SILVERMAN R. B. y HOFFMAN S. J. (1980) *J. Am. Chem. Soc.* 102, 884.
- (376) PAECH C., SALACH J. I. y SINGER T. P. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 2700; IM-9395.
- (377) LIAO S. y HUIPAKKA R. A. (1984) en "Biochemistry of Steroid Hormones" 2<sup>a</sup> Ed., H. L. J. Eds., Blackwell Scientific Publications, Oxford, Cap. 17.
- (378) RASMUSSEN G. H., REYNOLDS G. F., UTNE T., JOBSON, R. B. PRIMKA R. L., BERMAN C. y BROOKS J. R. (1984) *J. Med. Chem.*, 27, 1690.
- (379) IM-2374.
- (380) IM-5139.
- (381) PLEMPPEL M., BARTMANN K., BUCHEL K. H. y REGEL E. (1969) *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 94, 1356; K. H. BUCHEL, W. DRABER, E. REGEL y M. PLEMPPEL, *Drugs Made Ger.*, 15, 79-94 (1972); K. H. BUCHEL, M. PLEMPPEL y K. BARTMANN, *Ther. Ber.*, 39, 39-48 (1973).
- (382) BUCHEL K. H. y CONTE A. (1966) *Z. Naturforsch. B.*, 21, 1110; *Chem. Abstr.*, 66, 65261t (1967).
- (383) MARRIOT M. S. (1980) *J. Gen. Microbiol.*, 117, 253.
- (384) GRAVESTOCK M. B. y RYLEY J. F. (1984) *Ann. Rep. Med. Chem.*, 19, 130.
- (385) ZANDER M., KOCH P., LUU BANG, OURISSON G. y BECK J. P. (1977) *J. Chem. Res.*, (M) 2572.
- (386) KRISHNAIAH K. V. y RAMASARMA T. (1970) *Biochem.*, 116, 321.
- (387) TANZAWA K. KURODA M., ENDO A. (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, 488, 97.
- (388) BATZOLD F. H. y ROBINSON C. H. (1975) *J. Amer. Chem. Soc.*, 97, 2576.
- (389) COVEY D. F. y ROBINSON C. H. (1976) *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 5038.
- (390) KNOTT-HUNZIKER V., PETURSSON S., WALEY S. G., JAURIN B. y GRUNDSTROM T. G. (1982) *Biochem. J.*, 207, 315.

- (391) ENGLISH A. R., RETSMA J. A., GIRARD A. E., LYNCH J. E., BARTH W. E. (1978) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 14, 414-19.
- (392) CALDERWOOD S. B., GARDELLA A., PHILIPPON A. M., JACOBY G. A., MOELLERING R. C. (1982) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 22, 266-71.
- (393) HARTLEY S., WISE R. (1982) *J. Antimicrob. Chemother.*, 10, 49-55.
- (394) BALL A., MEHTOR S., WATSON A. (1982) *J. Antimicrob. Chemother.*, 10, 67-73.
- (395) METCALF B. (1981) "Recent Progress in the Design of Suicide Enzyme Inhibitors", *Ann. Rep. Med. Chem.*, 16, 289; C. T. WALS. "Suicide substrate mechanism-based enzyme inactivators: recent developments", *Ann. Rev. Biochem.*, 53, 493 (1984).