

Excmo. Sr. Presidente,

Excmos. Sres. Académicos,

Señoras y Señores:

Quiero que mis primeras palabras sirvan para expresar mi más profunda gratitud a todos los miembros de esta Real Academia de Farmacia, que tan magnánimos han sido al elegirme para ocupar la vacante que dejó al fallecer el que fue su primer Presidente y Secretario Perpetuo, Excmo. Sr. D. Toribio Zúñiga y Sánchez-Cerrudo.

Trabajador incansable, dotado de una gran vocación e impulsado por una indómita voluntad, el Dr. Zúñiga participó muy activamente en los principales logros de esta Corporación. desde su creación a partir del antiguo Real Colegio de Farmacéuticos. del que también fue Presidente. A él se debe la campaña para que la Academia estableciera relaciones con los medios culturales y científicos de otros países, y durante el período de su Secretaría tiene lugar uno de los acontecimientos más importantes: la inclusión de la Academia en el Instituto de España, por la que tanto había trabajado. Fue Director hasta su muerte de los Anales, que supo llevar con mano firme y maestra, contribuyendo con su esfuerzo a la difusión de las ciencias farmacéuticas. Ocupó multitud de cargos, cuya relación ordenada sería difícil, cumpliendo en todos con gran brillantez y entusiasmo. Por ello, pudo decirse de él que lo dio todo a la Farmacia. Así lo reconoció la Academia al concederle, a título póstumo, la Medalla Carracido, que premia servicios excepcionales a la Farmacia y cuya concesión requiere el acuerdo unánime de sus miembros.

Por ello, junto a la alegría y satisfacción que me produce el honor que se me ha concedido, siento una gran preocupación. Al disponerme a ocupar la vacante que dejó en esta Academia tan ilustre farmacéutico, lo hago con temor, consciente de mi insignificante valer, pero con la promesa de honrar su Medalla, con la ayuda de Dios, tra-

bajando con entusiasmo en las tareas de esta Corporación, que tienen, como objetivo fundamental el adelanto de las Ciencias Farmacéuticas, y con agradecimiento a todos sus miembros, por la inmerecida distinción de que me han hecho objeto, y muy especialmente a mi querido maestro, el Profesor D. Manuel Lora-Tamayo que, a las enseñanzas y pruebas de amistad y comprensión que me ha dado desde que inicié bajo su dirección mi tesis doctoral, ha querido añadir ahora la amabilidad de contestar al discurso que he de someter a la consideración de todos ustedes.

Permitidme antes un nuevo agradecimiento y recuerdo. Dos personas, mis padres, con su abnegación y sacrificio, en momentos que hubieran hecho desistir a otros, y con su ejemplo, hicieron posible para mí una formación que nunca podré agradecer suficientemente. ¡Descansen en paz!

LA VARIACIÓN ESTRUCTURAL EN LA SELECCION DE NUEVOS FARMACOS

Panorámica general

No es exagerado calificar de espectacular el incremento que ha experimentado la investigación y desarrollo de nuevos fármacos durante los últimos cuarenta años. En 1920, los recursos terapéuticos de que disponía el médico, con algunas pocas excepciones, se preparaban todavía a partir de sustancias naturales, tales como el opio, la quinina o la digitalina. En esta época, ha escrito Sir Derrick Dunlop (1), «con la excepción de la quinina o del Salvarsan, todos estos remedios eran sintomáticos, y la idea de que pudieran curar se consideraba todavía revolucionaria». Y añade, «resulta difícil imaginar lo que debía representar el ejercicio de la Medicina antes de conocerse la insulina, la vitamina B-12, las sulfamidas, los antibióticos, los modernos anticonvulsivantes y anticoagulantes, los diuréticos e hipotensores, los medicamentos psicótrpos, los específicos de enfermedades tropicales, los corticosteroides y otras hormonas».

La verdadera revolución terapéutica se inicia hacia los años treinta, combinando de tal forma esta situación que hoy se habla incluso de «demasiados fármacos». La mayoría de los centenares de miles de fármacos de que dispone el médico en nuestros días, en sus diversas formulaciones, son el resultado de este período, que se inicia en] 934- con el descubrimiento del Prontosil rubrum por Domagk (2) y las brillantes investigaciones de Fournau, Bovet, Nitti y los Tréfouëls (3), que habrían de proporcionar a la Química Médica su verdadera medida como disciplina en el sentido actualmente aceptado de modo universal. Tan denso ha sido este período en ideas y logros que, en opinión de un autor alemán, el 50 por 100 de los medicamentos prescritos en Alemania en 1960 tenía menos de diez años, y el 90 por 100 menos de veinte.

Varios son los factores que han contribuido a esta situación, pero todos ellos son el resultado del gran avance experimentado por la Química Orgánica y la Bioquímica y, sobre todo, de una inteligente y difícil integración de puntos de vista e ideas procedentes de diversas disciplinas -Química Orgánica, Inorgánica y Farmacéutica: Bioquímica y Enzimología; Farmacología y Fisiología: Anatomía y Patología; Microbiología, etc.-. colaborando en el logro de un objetivo común: El fármaco. Ello marca una de las principales características de la investigación actual en Química Médica y pone de relieve su principal dificultad: La necesidad de un trabajo en equipo, y la que sus cultivadores tienen de ser capaces de comprender el lenguaje utilizado por los especialistas de las diversas ciencias que la integran.

Discutir cuál de estas disciplinas es más importante resultaría tan pueril como discutir qué pata de un trípode es la más importante. La Química, y especialmente la Orgánica, que se inicia en el siglo XIX como ciencia destinada a jugar un papel decisivo en la comprensión de los procesos vivos y su control, constituye uno de sus ingredientes. El desarrollo de la teoría estructural de los compuestos orgánicos y el de métodos de síntesis que permiten la alteración estructural de moléculas y la preparación de otras nuevas proporcionaron buenas oportunidades de llegar a productos químicos con potencialidad terapéutica. En cierto modo, estos desarrollos marcaron el fin de una era caracterizada por el empleo de remedios naturales. Surgen los primeros productos de síntesis (salicilatos, acetanilida, hidrato de cloral, éter, cloroformo, etc.), se desarrolla el aislamiento, purificación y estudio estructural de los principios activos contenidos en los remedios naturales y, lo que es más importante, se adquiere una conciencia clara del enorme interés que ofrece la modificación molecular en términos de respuesta farmacológica.

La segunda mitad del siglo XIX se caracteriza también por la génesis de un enfoque experimental de los problemas de la Medicina, con los nombres de Bernard, Pasteur, Koch, Lister y Ehrlich, rompiendo las cadenas que la unían a las doctrinas vitalistas. Ehrlich establece un «modus operandi» en Quimioterapia que, pese al enorme trabajo realizado desde entonces, ha sufrido muy pocas modificaciones. Sus teorías de la cadena lateral y del receptor celular, enunciadas cuando los conocimientos de la bioquímica de la célula eran insig-

nificantes, el énfasis que marca sobre el índice terapéutico e, incluso, la posibilidad de aprovechar una activación metabólica de fármacos, -que demostró en el caso del Atoxil, son ideas demostrativas de una mentalidad genial.

Desde 1900, la Fisiología inicia su contribución a la Química Médica con personalidades tan notables como Sir Henry Dale, Alfred Newton Richards, Archibald Hill y Otto Loewi. El descubrimiento, en la primera mitad del siglo XX, de diversas sustancias endógenas que juegan un importante papel en mecanismos de regulación y función, y el reconocimiento de la mayor parte de las enfermedades debidas a deficiencias vitamínicas, cuentan entre sus principales contribuciones.

La Bioquímica, por su parte, contribuyó grandemente a la comprensión de los procesos vitales, encuadrando con un nuevo enfoque las situaciones fisiológicas normales y anormales, y proporcionando nuevas bases para una selección, más racional, de fármacos.

El espectacular desarrollo que comentamos se debe también, en gran parte, al empleo de modernas técnicas instrumentales procedentes de la Física y Químico-Física. Así, la estructura de la penicilina pudo esclarecerse cuatro años tan solo después de que fuera cristalizada, en marcado contraste con los ciento cincuenta años que requirió la morfina. En la actualidad, y gracias a estas técnicas -espectroscopías ultravioleta, visible, infrarroja y de resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas, difracción de rayos X, etc.- se descubren y estudian más de diez antibióticos por año. El empleo de las cromatografías sobre papel y capa fina, de cambio de ión, de distribución en contracorriente, etc., ha simplificado de modo muy notable las tareas de aislamiento y purificación.

En resumen, el aspecto más importante de la investigación actual de nuevos fármacos es su complejidad y magnitud. El descubrimiento y desarrollo de un nuevo fármaco supone la participación de personas que cultivan disciplinas diferentes, en una simbiosis que, muchas veces, contribuye al desarrollo de estas mismas disciplinas. Así, con frecuencia, el descubrimiento de la utilidad médica de un compuesto ha servido de estímulo a la búsqueda de nuevas reacciones y de mejoras en métodos preparativos de sustancias similares, y casi siempre ha conducido a desarrollos puramente teóricos. sin conexión directa

con una aplicación médica. Del mismo modo, la necesidad de mejorar y revisar los métodos farmacológicos y aun de idear otros nuevos que encajasen en las peculiaridades de los nuevos fármacos ha contribuido al esclarecimiento de los mecanismos biológicos. Otras veces, la necesidad de equipos no convencionales en la fabricación de un fármaco ha servido, de un modo indirecto, para resolver problemas planteados a la Ingeniería por otros procesos industriales.

La variación estructural como método de trabajo

Resulta útil, y ello ayuda a la comprensión de lo que sigue, examinar la génesis de las innovaciones farmacéuticas cuya eclosión comentamos.

Pensar que el desarrollo de un nuevo fármaco es el resultado exclusivo de observaciones casuales es, probablemente, tan erróneo, sobre todo a la luz de nuestros actuales conocimientos, como aceptar el punto de vista opuesto, que atribuye a la selección estructural de sustancias biológicamente activas una base enteramente racional. «En el descubrimiento de sustancias tales como el Prontosil, la Sulfapuridina o la Penicilina -se ha escrito (4)- intervinieron simultáneamente la preparación inteligente del trabajo y aquella parte de suerte que merece cualquier investigador atento, X o es raro, sin embargo, que estos descubrimientos brillantes se realicen por azar, en el ejercicio de una actividad monótona y sin gloria»,

Si se nos permite una analogía, la diferencia entre los modelos de automóviles de 1950 y 1951 puede ser muy pequeña: y lo mismo ocurrirá entre los modelos de 1969 y 1970. Pero, si se comparan los modelos de 1950 y 1970, la suma de perfeccionamientos marginales constituye un progreso muy significativo.

Esto mismo es lo que ocurre en la Química Médica. Los cultivadores de este campo de investigación podrán realizar, aparentemente, progresos mínimos; o, si se quiere, aprovechar exhaustivamente resultados casuales, cuya brillantez no debería quedar oscurecida por la participación del azar. Pero la resultante, que ha influido de modo tan notable en el ejercicio de la Medicina, elevando considerablemente su arsenal terapéutico, es francamente positiva. Ninguna frase podría, seguramente, expresar mejor la madurez de este sector de-

la investigación que la que aparece en el informe de 1962 del Comité de Salud Pública de la Academia de Medicina de Nueva York (5): «Al principio. la industria farmacéutica fabricaba lo que el médico prescribía: ahora, el médico receta lo que esta industria fabrica».

Entiendo que a ello han contribuido, en forma decisiva, direcciones de la Química Médica. a las que no he de referirme. tales como las que, relacionadas con la Química. se ocupan de la purificación y normalización de sustancias naturales. de la fabricación a escala industrial de un producto activo descubierto en el laboratorio. o de la síntesis de compuestos de origen natural. tratando de eliminar dificultades de aprovisionamiento o una dependencia con el origen. O aquéllas que tratan de su perfeccionamiento farmacéutico en el sentido de modificar su absorción. facilitar su administración o disminuir su intolerancia, mediante una adecuada formulación galénica, indispensable siempre.

Me gustaría, más bien, limitarme en esta exposición a aspectos parciales de una de las dos grandes avenidas que han conducido en el pasado al descubrimiento de nuevas moléculas biológicamente activas: La variación estructural. La otra gran avenida, que supone la elaboración de una hipótesis biológica relativa a la naturaleza de una enfermedad o de un proceso fisiológico fundamental, y la preparación de moléculas específicamente diseñadas para que modifiquen en forma benéfica tal situación. no siempre puede seguirse con facilidad. por lo precario de nuestros conocimientos en muchos campos, pero no es independiente de aquélla y son frecuentes sus solapamientos y colaboraciones.

La técnica de «modificación o variación estructural» a que voy a referirme, tal como se aplica a la selección y desarrollo de nuevos fármacos, es análoga a las que se emplean en otras ciencias y aún en el arte. La multiplicidad de formas en los reinos vegetal y animal, con su proyección hacia mejores alimentos, mayor adaptación al trabajo o simple apreciación estética, son el resultado de procesos de variación y selección provocados, consciente o inconscientemente, por el hombre o la naturaleza. El músico, en la creación de temas sinfónicos, el pintor, el arquitecto o el urbanista, por citar algún ejemplo, hacen uso también de técnicas de variación y selección que ofrecen, al menos en su metodología, un denominador común con las de varia-

ción estructural y elección farmacológica de la Química Médica.

Por ello, degradar esta técnica considerándola como mera «manipulación» que permite llegar a productos análogos a los ya existentes, supone, además de un desconocimiento completo de realidades dentro de la moderna investigación terapéutica, la negación de un método de trabajo inspirado en el más universal de los recursos creativos.

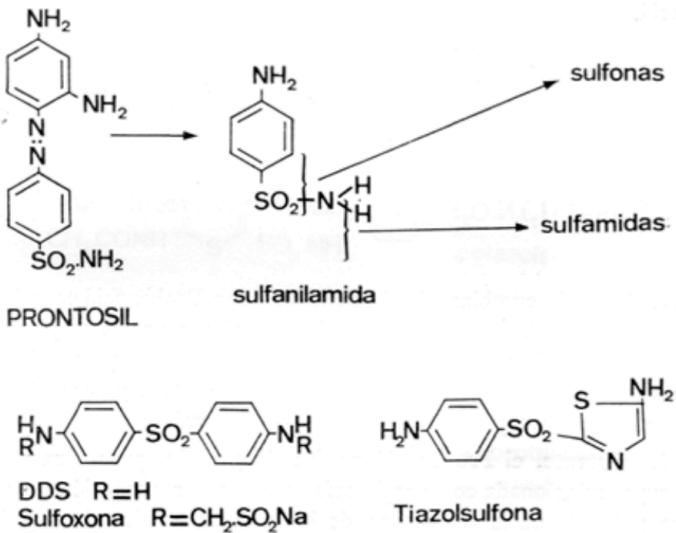
Los resultados de su aplicación son, por otra parte, fácilmente demostrables. De acuerdo con Schueler (6), en la selección de nuevos fármacos, «la importancia de la modificación molecular se traduce en el hecho concreto de haber conducido, en los últimos veinticinco años, a mayor número y a más potentes fármacos, en las diversas parcelas de la terapéutica, que los que se han descrito en toda su historia previa».

Y, respecto a lo que, a veces y de modo simplista, al enjuiciar la utilidad de este método de trabajo, se ha calificado de innecesaria multiplicidad de compuestos con idéntica actividad terapéutica, una somera consideración de resultados demuestra ampliamente la gratuidad de tales opiniones, sin que sea preciso hacer hincapié en el gran avance que el método ha provocado hacia un mejor conocimiento de las relaciones entre estructura y actividad, motor de nuevas hipótesis.

Ningún ejemplo mejor que el de las sulfamidas puede servir para ilustrar este aserto. Con el descubrimiento de la actividad del Prontosil rubrum por Domagk (2) y las brillantes investigaciones del grupo del Instituto Pasteur de París (3), que reconoce en la sulfanilamida -un metabolito de aquél- al verdadero responsable de tales acciones, "e inicia una nueva etapa en la Quimioterapia. La variación estructural de este prototipo que, por conocido, no pudo gozar de protección de patentes, conduce pronto a millares de nuevos compuestos (7), portadores todos del agrupamiento funcional de las sulfamidas. No es mi intención comentar, por ser sobradamente conocido de todos, el hecho de que muchos de estos compuestos resultaron ser agentes antimicrobianos cuantitativamente diferentes a la sulfanilamida de origen en lo que respecta a especificidad, índice terapéutico o duración de acción. Permitidme, sin embargo, que haga una breve enumeración

de otros descubrimientos que estas variaciones estructurales nos han proporcionado en otras áreas de la terapéutica:

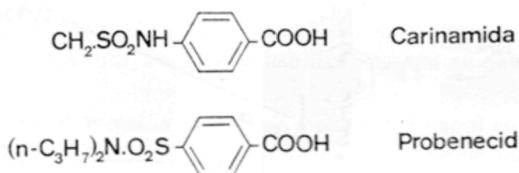
1. A partir de 1937, se distinguen dos tendencias en la variación estructural de la sulfanilamida: La que supone una sustitución en el nitrógeno sulfamídico, que conduciría a las sulfamidas, y otra que aprovecha la porción de p-amino-bencenosulfonilo de aquélla, que conduciría al grupo de las sulfonas, con la 4,4'-diamino-difenil sulfona (DDS) como representante más típico.



Este compuesto, que supuso inicialmente el primer avance importante en el tratamiento de la tuberculosis (8) hasta su desplazamiento por la estreptomina, encontró en 1943 su verdadera utilidad como antileprótico (9) y sirvió para demostrar que la enfermedad de Hansen, considerada durante siglos como incurable, podía tratarse mediante agentes antibacterianos específicos. Pese al descubrimiento de otros compuestos afines y posiblemente mejor tolerados (Sulfoxona sódica (10), Tiazolsulfona (11), etc.), el empleo de la DDS es todavía muy amplio, pues su bajo costo la hace ideal para el tratamiento de

la lepra en aquellas regiones en las que el precio del fármaco es un factor limitativo.

2. La disminución de la excreción renal de penicilina que provocan ciertas sulfamidas fue el motor de nuevas variaciones estructurales, inicialmente dirigidas hacia un mejor aprovechamiento de este antibiótico, difícilmente asequible y caro en aquellos momentos. El primer compuesto de interés en tal sentido, el sulfamil derivado del ácido p-aminobenzoico, es desplazado pronto por otra sulfonamida, la Carinamida, y ésta por una modificación estructural suya, el Probenecid.



De hecho, la combinación de Penicilina con Probenecid constituyó, durante mucho tiempo, una de las formulaciones orales más empleadas en el tratamiento de infecciones, hasta que el costo y asequibilidad de las penicilinas dejaron de constituir un problema y fueron apareciendo las nuevas penicilinas activas por vía oral.

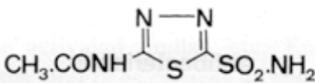
No obstante, el Probenecid no fue desplazado, pues otra propiedad suya, relacionada con una interferencia en la reabsorción del ácido úrico a través de la membrana de las túbulas renales, le permitiría conservar un puesto importante en el arsenal terapéutico del médico e irrumpir, con el carácter de primer compuesto útil de síntesis (12), en una nueva área: la del control de una enfermedad de la vejez, la gota.

3. Otro efecto secundario de la terapia por sulfamidas, reconocido en los momentos iniciales de su empleo como agentes antiinfecciosos, fue la pérdida de sodio en los enfermos (13). Ello condujo pronto al descubrimiento de que la sulfanilamida y otras sulfamidas no sustituidas en el nitrógeno inhiben la enzima anhidrasa carbónica (14), e hizo previsible su lógica proyección en el campo de los

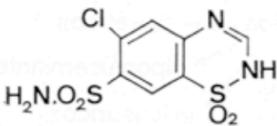
diuréticos, siempre que esta actividad pudiera ser exaltada mediante adecuadas modificaciones estructurales.

Con la Acetazolamida (15), un potente inhibidor de la anhidrasa carbónica, que retiene en su estructura muchas de las características de las sulfonamidas, y que es capaz de incrementar la excreción de sodio y la diuresis, se abre una nueva vía de investigación que conduciría pronto al descubrimiento de las clorotiazidas y compuestos afines (16) que, en opinión de muchos, suponen el avance más importante, en los últimos años, dentro de las enfermedades cardiovasculares.

Por otra parte, la presencia de la anhidrasa carbónica, como enzima funcionalmente importante, en el ojo y en el sistema nervioso central (17), condujo también al empleo de estos inhibidores en el tratamiento del glaucoma y de la epilepsia.



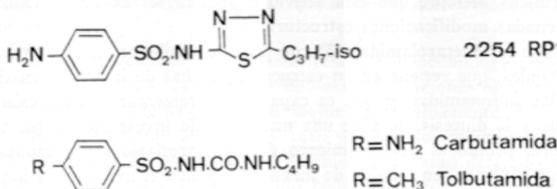
Acetazolamida



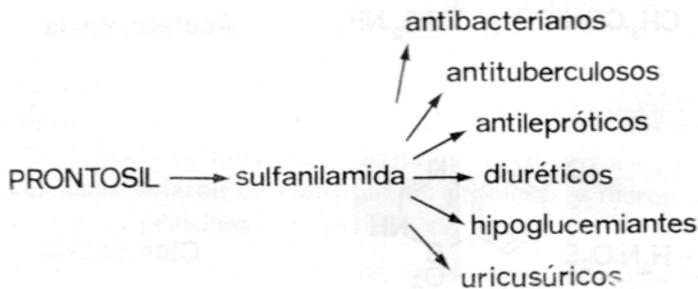
Clorotiazida

4. En 1942, un informe de Janbon (18) pone de manifiesto la hipoglucemia que producen, como reacción secundaria, algunas sulfamidas y, especialmente, la «2254 RP» -un isopropiltiadiazol-derivado de la sulfanilamida- que estaba siendo probada, en Francia, en casos de fiebre tifoidea. El descubrimiento accidental de este efecto, poco deseable en un agente antimicrobiano, impidió la comercialización de la nueva sulfamida, pero dejó entrever la posibilidad de llegar, por nuevas variaciones estructurales, a un sustitutivo de la insulina.

Tal meta se alcanza, en efecto, en 1955, con la Carbutamida (19), pronto sustituida por la Tolbutamida (20).



Resumiendo, ¿quién hubiera podido prever, sin aplicar este método de variaciones estructurales a un colorante, el impacto que habría de producirse en la práctica de la Medicina, cambiando drásticamente modalidades de tratamiento e irrumpiendo en áreas tan alejadas como la infección bacteriana, la tuberculosis, la lepra, la hipertensión, el glaucoma, la diabetes o la gota?



La aplicación del método de las variaciones estructurales exige, como paso previo, el conocimiento de la actividad biológica de un determinado compuesto o grupo de compuestos, y este conocimiento puede tener orígenes muy diversos.

Puede, por ejemplo, proceder del campo de los productos naturales. Los extractos de plantas, conocidos y utilizados empíricamente por el hombre en el alivio y cura de algunas de sus dolencias, presentaron los inconvenientes propios de un material poco uniforme, fácilmente adulterable y de dosificación incierta: la mayoría de ellos, además, contenían un número variable de sustancias con actividades biológicas diferentes y, en muchas ocasiones, opuestas, capaces de

provocar la aparición de reacciones secundarias poco deseables. El aislamiento de estos principios activos y su purificación contribuyeron, indudablemente, a eliminar muchas de tales dificultades., pero sin resolver la limitación que suponía la dependencia con la planta. De aquí que el químico intentase, en el tubo de ensayo, la síntesis de estos compuestos activos. No siempre. sin embargo, sus conocimientos fueron suficientes para alcanzar tan ambiciosa meta y, como sucedáneo lógico, surge el estudio de compuestos afines, más sencillos y muchas veces procedentes de estudios degradativos, tratando de descubrir las porciones mínimas, en la estructura del prototipo, responsables de la actividad biológica. De esta forma, la adrenalina condujo a la síntesis de compuestos simpatomiméticos y, más recientemente, a la de bloqueantes de receptores adrenérgicos: la cocaína a una serie de valiosos anestésicos locales: de la heteroauxina surgieron el ácido alfa-naftilacético y los ácidos fenoxiacéticos sustituidos (herbicidas); de los estrógenos y otras hormonas esteroideas, compuestos sintéticos de actividad similar, etc. En todos estos casos, para llegar a productos sintéticos capaces de sustituir al natural, se siguió el mismo método: variación estructural sistemática y observación de los efectos que tales cambios producen en la actividad biológica.

Pero un programa de este tipo puede surgir también como consecuencia de una observación de laboratorio inesperada. En el estado actual de nuestros conocimientos, y en vista de la atención creciente que viene dedicándose a los nuevos compuestos orgánicos que hace asequibles la industria, debe continuar la oportunidad de este tipo de descubrimientos accidentales, pero buscados. Unas veces, como en el caso del colorante Prontosil o del insecticida Hexaclorociclohexano, el descubrimiento podrá ser en sí mismo de naturaleza sorprendente y de valor inmediato. En la mayoría de los casos, sin embargo, se tratará de una sustancia de valor práctico limitado, pero susceptible de ser transformada en algo de importancia grande variando detalles de su estructura.

Es también muy frecuente que estas observaciones casuales procedan de la clínica. No es mi deseo llevarles a la conclusión de que este tipo de observaciones vaya a constituir, en el futuro, la más importante vía hacia prototipos de interés, pero nadie podría negar el primordial papel que han desempeñado en las nuevas aperturas de la

terapéutica, durante los pasados años. El efecto antiinflamatorio de la cortisona (21), la acción diurética de los mercuriales (22) o las propiedades tranquilizantes de la Rauwolfia (23) se detectaron en humanos. La estimulación central que producen la Isoniazida e Iproniazida (24), observada por primera vez en pacientes tuberculosos, inspiró la estructura de varias hidrazinas con actividad analéptica y la de un incalculable número de inhibidores de monoamino oxidasa. También el efecto antinarcoléptico de la Anfetamina fue el resultado de observaciones en humanos (23), del mismo modo que las propiedades anoréxicas de este compuesto el de inteligentes observaciones en pacientes narcolépticos (26). Y esta enumeración no debe considerarse sino meramente ilustrativa.

Modalidad es de variación estructural

No existen normas generales que sirvan de inspiración al químico médico para un planeamiento racional de variaciones estructurales a partir de un prototipo, sobre todo si se desconoce el mecanismo de su acción biológica.

El perfil de actividad de un fármaco es la resultante de diverso componentes parciales, relacionados con su capacidad para llegar al lugar de la acción, unirse o reaccionar en él con los llamados receptores celulares y, finalmente, abandonarlos como talo transformado. Por ello, si no se conoce o se prevé la contribución de cada uno de los detalles estructurales del prototipo a esta serie de componentes parciales de la actividad biológica, no es posible un diseño racional de variaciones y éstas habrán de hacerse de una forma semiempírica, basándose en resultados previos de campos afines.

La variación estructural de una molécula conduce, lógicamente, a cambios en sus propiedades fisicoquímicas, que el químico puede prever, al menos en líneas generales. Si, además, es capaz de interpretarlos, aunque sea «a posteriori», en términos de una contribución a los mencionados procesos parciales de la actividad, haciendo valer tipos y disposición de grupos enlazantes o reactivos, propiedades iónicas, características lipófilas o hidrófilas, estabilidad o factores esté-

ricos, podrá pronto delimitar los fragmentos estructurales del prototipo responsables de su actividad y contribuir al esclarecimiento del mecanismo de su acción a nivel molecular.

Nuestros conocimientos acerca de las relaciones entre la estructura y la actividad biológica no han alcanzado aún aquel nivel que podría permitirnos predecir con seguridad las variaciones estructurales más interesantes en cada caso, soslayando así la ardua tarea de síntesis de largas series de compuestos. En tal sentido, la situación de la Química Médica es similar a la que atravesó la Química Orgánica hace unos treinta años.

Pero, si no puede hablarse de reglas con validez general, si son netamente diferenciables tres modalidades dentro de la variación estructural de prototipos, a cuya consideración deseo dedicar esta última parte de mi discurso. Permitidme que, como homenaje a mis colaboradores, las ilustre con trabajos de nuestro laboratorio.

Variación estructural disyuntiva.

La finalidad principal que se persigue en la variación disyuntiva es, desde el punto de vista farmacológico, el conocimiento de la porción mínima de la molécula responsable de la actividad. Sin embargo, desde un punto de vista práctico, existen otros varios aspectos de considerable importancia y a los que es preciso dedicar una atención muy particular.

El conocimiento de la porción estructural mínima de la molécula responsable de una cierta actividad biológica es de interés por varias razones. En primer lugar, desprovisto el prototipo de los «adornos» con que había sido dotado por la naturaleza o por el químico, la molécula más simple obtenida ha de poseer una mayor especificidad en su acción. Por otra parte, cuanto más sencilla sea esta estructura mínima tanto más fácil resultará alcanzar un conocimiento acerca de su modo de acción, capaz de permitir, incluso, el planteamiento de una línea de investigación posterior. Desde un punto de vista práctico, este nuevo compuesto, mucho más simple que el prototipo de

que deriva, será asequible a través de un proceso de síntesis más sencillo, con la consiguiente proyección en el precio.

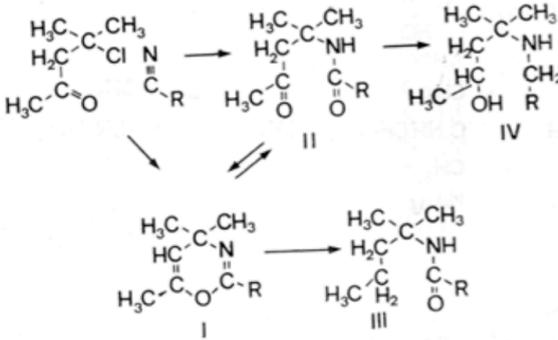
El campo de los productos naturales contiene gran número de ejemplos de utilización feliz de este recurso disyuntivo de variaciones estructurales -anestésicos a partir de cocaína, analgésicos desde la compleja estructura de la morfina, o toda una serie de antiespasmódicos, antidiarreicos, midriáticos y de fármacos con acción central, inspirados en las estructuras de la atropina y escopolamina, por citar sólo algunos de los logros-. Pero, para ilustrar esta modalidad disyuntiva, voy a utilizar, sin otra razón que la antes expuesta, un ejemplo vivido en nuestro laboratorio, en el marco de una de sus direcciones de trabajo tradicionales: el empleo de las sales de nitrilo en la síntesis de sistemas heterocíclicos nitrogenados (27).

Con Lora-Tamayo, García Muñoz y Leipprand (28), habíamos demostrado que este principio de heterociclación, basado en la electrofilia de las sales de nitrilo, hacía asequibles con buenos rendimientos derivados de 4H-1,3-oxazina (1), prácticamente desconocidos en la bibliografía científica previa. Esta circunstancia aumentaba el interés de una exploración farmacológica de su potencialidad que se amplió pronto (29) a algunos productos afines que resultaron de su hidrólisis (II) II obtenidos por reducción (III y IV) durante el estudio de su comportamiento químico (30).

El examen preliminar de sus acciones sobre ileon aislado de cobaya reveló que ninguno de ellos ejerce efectos directos sobre la preparación, ni modifica las respuestas inducidas en ella por histamina, acetilcolina o serotonina a concentraciones de hasta 10 µg /ml en el baño. Pero casi todos, en mayor o menor grado y especificidad, contrarrestan las inducidas por una dosis estimulante de nicotina.

Sus efectos cardiovasculares, por otra parte, permitieron su ordenación en tres categorías: 1) Compuestos sin efectos notables, con casi todos los que poseen una estructura 4H-1,3-oxazínica (I); 2) Los que inducen hipotensión gradual y sostenida a dosis comprendidas entre 20 y 40 mg/kg, con muchos de los compuestos de naturaleza amido-cetónica; y 3) Los que inducen un efecto hipotensor sostenido

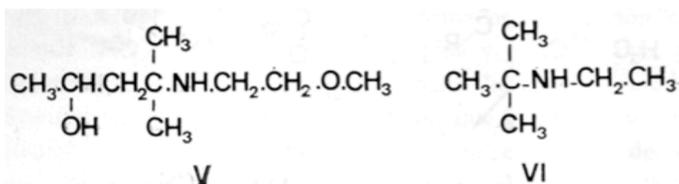
y de instauración rápida, con gran parte de las amidas (III) y aminoalcoholes (IV).



Dentro de este último grupo, el 4-(β-metoxietilamino)-4-metilpentanol-2 (V) fue el compuesto que ofreció mayor interés y el que se seleccionó como prototipo sobre el que ensayar nuevas variaciones. A dosis muy inferiores a la tóxica induce una hipotensión rápida y sostenida en el gato espinalizado, que recuerda a la de reserpina, aunque sin las acciones tóxicas del alcaloide (31). Este paralelismo es tanto más notable si se considera que el compuesto presenta el llamado «fenómeno reserpínico» no observado hasta ahora más que en reserpina y alcaloides afines. No se comporta como simpaticornimético cuando se administra al gato, sino que a dosis elevadas, por vía oral, relaja la membrana nictitante. Todo ello, unido a un carácter antinicotínico selectivo, sugería una actividad gangliopléjica, que fue confirmada en otros ensayos.

No voy a referir con detalle el camino que condujo al establecimiento de los requisitos estructurales mínimos para la actividad encontrada (32), pues, prescindiendo del trabajo que supuso la preparación de los diversos compuestos, es fácilmente imaginable. Se suprimió, en sucesivas aproximaciones, la función etérea; luego

también la alcohólica; se cambió la posición del átomo de carbono tetrasustituido y se acortó la cadena. Es decir, se llevó a cabo una sistemática simplificación, siguiendo siempre la vía en que se mantenía la actividad. El resultado último condujo a etil *terc*-butil amina (VI).

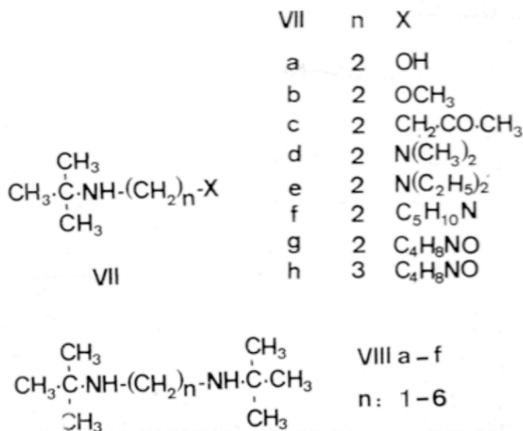


Variación estructural conjuntiva

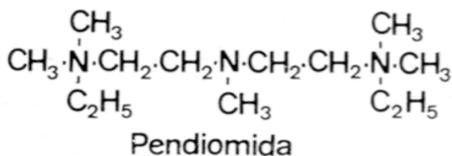
El método de las variaciones estructurales no queda limitado a: este aspecto disyuntivo de simplificación estructural. Un interés análogo posee el criterio de conjunción, basado en incluir en una molécula orgánica diferentes agrupamientos estructurales de reconocido valor en el campo considerado. Y, dentro de esta dirección, las posibilidades son muy numerosas y variadas. La inclusión de determinados grupos funcionales puede estar inspirada no sólo en su reconocido valor terapéutico, sino también en la necesidad de modificar algunas de las características del prototipo, tales como su solubilidad, estabilidad, velocidad de excreción o la duración de su acción, o bien puede estar basada en el deseo de dirigir específicamente el producto a un determinado lugar de acción.

Así, en el campo de los gangliopléjicos antes considerado, un criterio de variación conjuntiva a partir de la fracción estructural mínima establecida nos llevó a considerar dos nuevas series de compuestos: la primera, de estructura general (VII), venía a ser una variante refinada del prototipo, con la inclusión de un fragmento terapogénico común a muchas drogas que actúan sobre el sistema nervioso central o periférico. La otra, con la estructura general (VIII), resultaba de duplicar en una misma molécula, aunque con una

separación progresivamente creciente, dicho fragmento estructural mínimo.

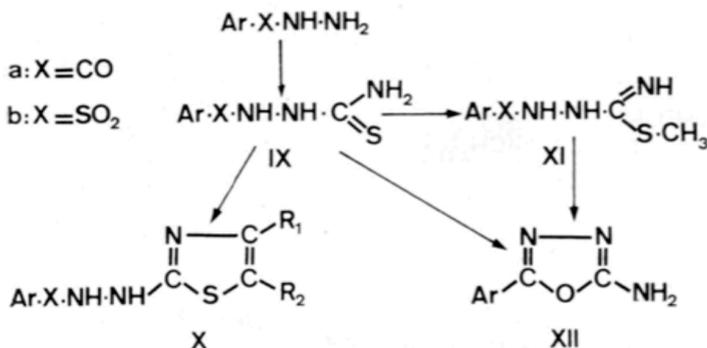


No es éste el momento de referir ampliamente el resultado de los ensayos farmacológicos, pues ha sido descrito en otro lugar (32), Bástenos decir que todos los compuestos conservaron, en mayor o menor grado, la actividad, exaltándose en varios de ellos de modo notable. Así ocurrió, por ejemplo, con la N,N'-di-*terc*-butil-trimetilendiamina (VIII c), tres veces más activa y tres veces menos tóxica que la Pendiomida (33), con la que guarda una neta relación estructural.



Un criterio conjuntivo de reunir en una misma molécula diversos agrupamientos funcionales de reconocida eficacia en la quimioterapia de la tuberculosis ha sido también considerado por nosotros (34) al preparar varias 1-aroil-tiosemicarbazidas (IX a), 1-aroil-2-(2-tiazolil)-

hidrazinas (X a), 1-arilo-S-metil-isotiosemicarbazidas (XI a) y 2-amino-5-aril-1, 3, 4-oxadiazoles (XII a), junto con sus isómeros sulfónicos (IX b-XII b), dentro de un programa más amplio patrocinado por la Dirección General de Sanidad.

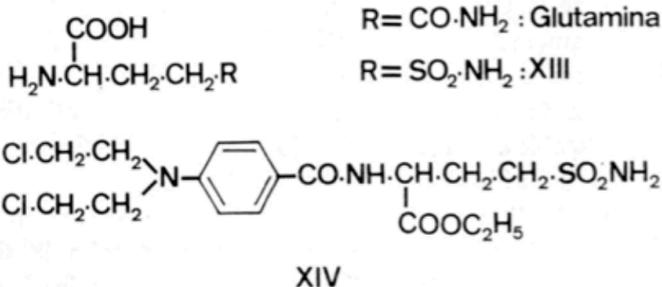


Todos ellos reunían, con un grado mayor o menor de enmascaramiento, junto a los fragmentos de hidrazida y de tiosemicarbazida, de significación tan especial en la quimioterapia del bacilo de Koch, los de tiourea o isotiourea, presentes en gran número de compuesto antituberculosos, y el anillo de tiazol que forma parte de algunos compuestos quimioterapéuticos de probada eficacia (sulfatiazol, penicilina, ácido actiazínico, etc.).

Muchos de los productos así obtenidos resultaron activos *in vitro* frente a una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a estreptomycin, de acuerdo con los ensayos que se realizaron en el actual Instituto de Fermentaciones Industriales de nuestro Patronato (35). Varios de ellos se mostraron activos también frente a diversos microorganismos patógenos (*S. aureus*, *K. p. pneumoniae*, etc.) y no patógenos, y algunos incluso eran capaces de actuar como factores de crecimiento de levaduras. Aunque estos resultados han de ser contrastados aún en animales, ofrecen en sí mismos un panorama prometedor.

Quisiera referirme, pese a no disponer aún de datos biológicos, a la 3- /p - N,N-bis-(2-cloroetil)- amino- / benzamido- 3- etoxicarbonil - pro - pansulfonamida (XIV), pues ilustra una nueva posibilidad en la va-

riación estructural conjuntiva : la colocación de la porción mínima activa sobre una molécula conductora que asegure su llegada al lugar de la acción (36). En la selección de este compuesto (37), que es el representante más sencillo dentro de una serie de posibles agentes anticancerosos, se tuvieron en cuenta ciertas propiedades de la 3-amino-3-carboxi-propansulfonamida (XIII), de interés en una molécula conductora. Para este análogo sulfónico de la Glutamina, obtenido en nuestro Laboratorio (38), Scholefield (39) había demostrado su capacidad para inhibir el transporte de aminoácidos en células de tumor ascítico de Ehrlich; Baker (40) menciona el hecho de que, al menos frente al colifago T₂ de *E. coli*, es un inhibidor competitivo de la glutamina; por nuestra parte, con la colaboración del Instituto de Biología celular (41), pudimos poner de manifiesto que es capaz de elevar en un 10 por 100 el tiempo de supervivencia de ratones portadores de un tumor ascítico de Ehrlich de carácter hipertriploide. Todo ello indicaba, en cierto modo, que la 3-amino-3-carboxipropansulfonamida, seleccionada como molécula conductora, era capaz de llegar hasta los mismos centros catalíticos de alguna enzima que normalmente aprovecha el sustrato natural glutamina, y ocuparlos competitivamente.



Por todo ello, se pensó que la colocación de un agrupamiento citotóxico de mostaza nitrogenada sobre este vehículo debería conducirnos a un compuesto (XIV) capaz de actuar como antagonista competitivo irreversible de la glutamina, en el sentido postulado por Baker (39), que podría unirse competitivamente a los centros catalíticos de la enzima, a través de su porción sustrato fraudulento, y

alquilar irreversiblemente algún grupo adyacente de la misma enzima; a través de su porción de mostaza. De producirse esta situación, dada la significación de la glutamina en la biosíntesis *de novo* de bases púricas, el compuesto puede ofrecer la actividad anticancerosa perseguida.

Variación estructural bioisófera

La aplicación de un principio de equivalencia, conocido inicialmente con el nombre de isosterismo, es la base de un nuevo tipo de variaciones. Su evolución, dentro de la Química Inorgánica, en la que tiene lugar su nacimiento cuando Langmuir (42) trata de explicar el sorprendente parecido entre algunas moléculas, como las de nitrógeno y monóxido de carbono o como las de subóxido de nitrógeno y anhídrido carbónico, siguió un curso paralelo al de elaboración del Sistema Periódico, alcanzando con Erlenmeyer (43) su plenitud. El concepto de isoterismo, como explicación del parecido comportamiento fisicoquímico de ciertas moléculas, iones o grupos funcionales, se adscribe, en los sectores de las Químicas Inorgánica y Orgánica, a un carácter isoelectrónico; en otras palabras, a la existencia de un número igual de electrones periféricos con disposición parecida.

El interés de la Química Médica por el concepto habría de producirse inmediatamente. Se comprueba pronto la posibilidad de sustitución de átomos o grupos isoelectrónicos sin pérdida de la actividad o con inversión de la misma, aunque con cambios cuantitativos, muchas veces deseables. Surge así un bioisosterismo clásico ampliamente empleado y de utilidad muy documentada (44).

Al amparo de él, y dentro de un programa más amplio, nuestra Sección de Quimioterapia Anticancerosa lleva a cabo la síntesis y estudio de gran número de análogos fraudulentos de las bases púricas y pirimidínicas naturales y sus correspondientes nucleósidos (45), referibles, casi siempre, a éstos por una o varias sustituciones bioisóteras del nitrógeno, por el grupo $-\text{CH} =$ en uno o en los dos anillos.

Pero este concepto clásico del isosterismo, adscrito a una isoelectronicidad, ha ido ampliándose en Química Médica, haciéndose quizás cada vez más difuso, al tratar de acomodarlo a nuestros cono-

cimientos sobre el modo de acción de los fármacos, y de explotar ciertas analogías descubiertas en los dominios de la vitaminología, la bacteriología y la nutrición. Ya Friedmann (46), en 1951, denomina a este concepto amplio del isosterismo con el nombre de bioisosterismo, aplicándolo a los derivados que presentan el mismo tipo de actividad biológica o una actividad antagónica, sean o no isoelectrónicos. Con ello, al considerar la actividad biológica como criterio de analogía estructural, se admite implícitamente que las relaciones estructura-actividad se imponen por sí mismas y constituyen una evidencia.

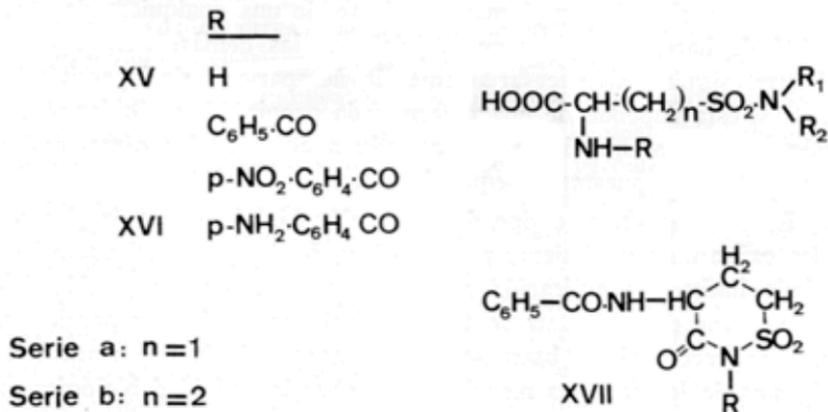
Aunque con participación muy variable, según los casos, la interacción entre un fármaco y el correspondiente receptor celular - fundamento de su acción- exige una adecuada disposición estereoespacial del conjunto de grupos que integran su área activa, y determinadas características reactivas, de distribución de cargas y de tamaño de los mismos. No es posible, por tanto, alcanzar una bioequivalencia completa; cualquier modificación estructural, por pequeña que sea, lleva implícita la alteración de alguna de las características mencionadas, y el mantenimiento de una cualquiera de ellas habrá de hacerse siempre en perjuicio de las demás. Pero ello no siempre significará, necesariamente, la desaparición de la actividad. pues si ésta depende de una determinada propiedad, cualquier variación estructural que la mantenga, aún a costa de las otras, podrá conducir a compuestos bioequivalentes.

Evidentemente, este tipo de sustitución bioisómera no isoelectrónica exige un conocimiento previo del modo de acción del prototipo, y ello limita una aplicación segura. Pero, como contrapartida, los compuestos que resultan de tales variaciones pueden proporcionar, muchas veces, pistas bastante seguras acerca de la importancia de algunos de los factores mencionados sobre la actividad biológica, y una experiencia aplicable a otros campos.

Esta experiencia, procedente casi siempre de áreas muy distantes, ha ido perfilando situaciones de equivalencia entre grupos no isoelectrónicos, pero en los que pueden reconocerse una identidad de tamaño o forma, una similar distribución de cargas, una analogía en la disposición de sus electrones o una reactividad parecida, entre otras características determinantes de su unión a receptores. Es típica, por

ejemplo, la bioequivalencia entre el grupo carboxílico y el de las sulfonamidas, de similar forma y tamaño (47), reconocida cuando se demuestra (48) que el modo de acción de la sulfanilamida y productos afines (sulfamidas) está relacionado con un antagonismo entre ellos y el ácido p-aminobenzoico, que provoca el bloqueo de la biosíntesis de la coenzima A en ciertas bacterias.

Hemos hecho uso de esta equivalencia, en nuestro laboratorio, tomando como prototipos la glutamina y el ácido aspártico. Ambos participan en diversas etapas de la biosíntesis *de novo* de los nucleóidos que forman parte de los ácidos nucleicos, por lo que de su antagonismo cabe esperar efectos sobre el desarrollo y división celulares. Se han obtenido, hasta el momento, varios centenares de compuestos (49), basados siempre en la sustitución del grupo carboxiarnidico o carboxilo de los prototipos por el de sulfonamida más o menos sustituido (XVa y XVb); en ciertos casos (XVIa y XVIb) los compuestos mimetizan una región más amplia del ácido pteroilglutámico; también han merecido nuestra atención ciertas estructuras afines (XVII).

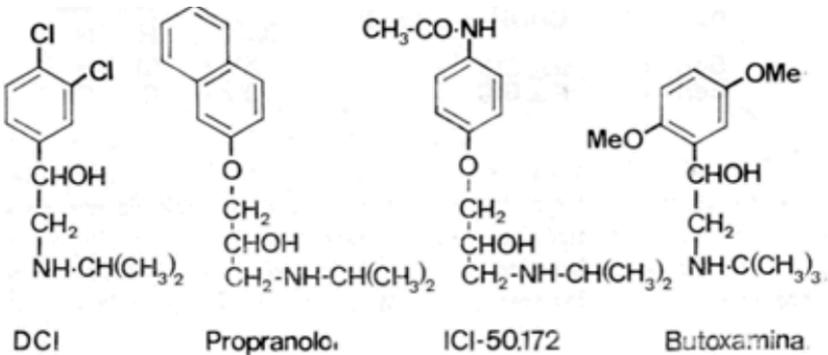


Aunque la calidad de la hipótesis que sirvió de base a los trabajos; ha de contrastarse aún en animales portadores de tumores, es de interés señalar que un sistema de selección preliminar *in vitro*, con bacterias (50), ha conducido ya a resultados prometedores, y que algunos de los términos de estas series se muestran activos frente a ciertos virus (51).

Me gustaría referirme, para terminar, a otra experiencia de sustitución bioisómera extraída de nuestros trabajos. Durante los últimos años, en diversos laboratorios, se han desarrollado compuestos capaces de antagonizar los efectos de las catecolaminas sobre los receptores beta-adrenérgicos. El de mayor difusión clínica hasta ahora - el Propranolol- se ha mostrado útil en el tratamiento de diversas arritmias cardíacas, tales como las ventriculares que ocurren durante la anestesia por hidrocarburos o las inducidas por digitálicos, en el tratamiento de la cardiopatía obstructiva hipertrófica y en él otras disfunciones miocárdicas (52). Pero, probablemente, su aplicación más importante sea el tratamiento de la angina de pecho (53). Su utilidad en tal sentido se atribuye a que reduce la demanda de oxígeno del miocardio como resultado del descenso que provoca en la presión arterial, en la contractilidad miocárdica y en el ritmo cardíaco, tanto en ejercicio como en reposo.

Desafortunadamente, el Propranolol reduce también el flujo sanguíneo miocárdico -probablemente al bloquear los receptores beta vasculares cardíacos-, aumenta la resistencia vascular del miocardio al flujo, e invierte la vasodilatación coronaria inducida por las catecolaminas (54.).

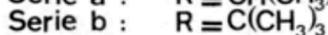
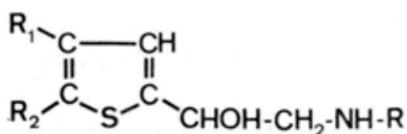
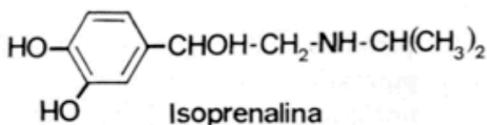
La investigación ha permitido llegar ya a tres tipos de compuestos bloqueantes de receptores beta-adrenérgicos; los que bloquean, selectivamente, los receptores miocárdicos (beta.), pero no los vasculares (beta.), con el ICI-50.172 como representante más típico; los que bloquean selectivamente los receptores vasculares, pero no los miocárdicos, como la Butoxamina; y los que bloquean por igual ambos tipos de receptor, como el Propranolol mencionado



En teoría, al menos, los bloqueantes beta-adrenérgicos más adecuados para el tratamiento de la angina de pecho serían los del primer grupo, capaces de disminuir el consumo cardíaco de oxígeno sin bloquear los efectos vasodilatadores de los transmisores simpático y sin producir la broncoconstricción típica del Propranolol, que dificulta su utilización en pacientes susceptibles de ataques de asma.

Existe aún otro aspecto en relación con el empleo clínico de estos bloqueantes: el peligro que ofrecen de reducir el impulso simpático cardíaco hasta el extremo de precipitar un fallo del corazón, especialmente en enfermos con una contractilidad cardíaca inicial pobre. En este sentido, se estima que un compuesto que poseyera una moderada actividad agonista parcial de los receptores beta ofrecería ventajas notables.

Planteadas así la problemática actual de este sector, dirigimos nuestra atención hacia variaciones estructurales de la Isoprenalina que condujeran a la selectividad deseada. Con este objetivo, hemos desarrollado una serie de compuestos que difieren del prototipo en la sustitución del anillo bencénico por el de tiofeno (55).



	$\frac{R_2}{\text{---}}$	$\frac{R_1}{\text{---}}$
XVIII :	H	H
XIX :	Cl	H
XX :	Cl	Cl

Estos dos sistemas no son isoelectrónicos, pero poseen propiedades físicas y químicas muy similares como consecuencia de una análoga estructura electrónica. Ambos poseen un sistema de electrones que, en el caso del benceno proceden de la deslocalización de los electrones que forman los tres dobles enlaces en las fórmulas de Kekulé

y, en el caso del tiofeso de la conjugación de los electrones de los dobles enlaces y el doblete electrónico suministrado por el heteroátomo. Ello se traduce en campos eléctricos similares. parecidas propiedades geométricas y pesos moleculares del mismo orden de magnitud. Las pequeñas diferencias que existen entre ambos sistema pueden ofrecer cierto interés. Así, la menor energía de resonancia del tiofeno y la presencia del heteroátomo permiten prever una más fácil destoxificación y degradación en el organismo para el compuesto tiofénico con respecto al análogo bencénico idénticamente sustituido. Por otra parte, el sistema del tiofeno posee un momento dipolar con carga positiva sobre el átomo de azufre.

Además de este cambio, los compuestos seleccionados poseían un número variable de átomos de cloro en lugar de los hidroxilos de la Isoprenalina, pero mantenían el resto de la estructura del prototipo que responde a un conocido esquema del receptor celular. Por razones obvias, se consideraron otras sustituciones sobre el átomo de nitrógeno amínico.

Los ensayos farmacológicos preliminares (56). sobre presión arterial y ritmo cardíaco en la rata anestesiada, permitieron ver que, comparados con dosis iguales de Propranolol, estos productos bloquean más eficazmente los efectos cronotrópicos que los vasodilatadores de la Isoprenalina. Su actividad agonista parcial resultó superior en los derivados clorados, y con ninguno de ellos se observó una depresión miocárdica comparable a la producida por Propranolol.

En estudios ulteriores sobre gato anestesiado, pudo comprobarse que la máxima potencia como bloqueantes beta corresponde a los compuestos 4,5-diclorados (XXa y XXb), siendo de ellos más selectivo el derivado isopropílico.

Es de interés destacar que ambos muestran una acción estimulante cardíaca a dosis baja, que se transforma en ligerísima acción depresora al elevar la dosis, en contraste a la siempre depresora que induce el Propranolol aun a dosis bajas.

El carácter de antagonistas competitivos de estos productos frente a las acciones cronotrópicas positivas de la Adrenalina se pudo poner de manifiesto también, dentro de cierto intervalo de dosis, mediante preparaciones de aurícula derecha de cobaya latiendo espontáneamente.

Dista aún bastante de estar completo el estudio de todos los productos, pero debe indicarse que todos muestran, en mayor o menor grado, clara actividad antiarrítmica del tipo quinidina, que hemos puesto de manifiesto estudiando el aumento del período refractario efectivo y las arritmias ventriculares inducidas por Ouabaina en cobayas. Las dosis empleadas y el orden de potencia antiarrítmica encontrado no guardan relación con la potencia beta-bloqueante. tal como corresponde a un distinto mecanismo de acción.

* * *

He tratado de presentar la situación actual de este método de selección estructural de nuevos fármacos. Todavía carece de aquella seguridad de predicción, capaz de obviar la tediosa labor de preparación de series de compuestos, pero ha sobrepasado ya, en muchas áreas, la situación que expuso Benda -un discípulo de Ehrlich- al decir que equivale a arrojar monedas hacia una copa con la esperanza de que alguna caiga dentro.

De imprecisión en imprecisión, guiado muchas veces por el ingenio de sus cultivadores, el método de las variaciones estructurales ha contribuido muy poderosamente a una mejor comprensión de las relaciones estructura-actividad y ha proporcionado a la Medicina sus mejores armas.

Y es que, una piedra lanzada en aguas tranquilas produce un círculo, que a su vez origina un segundo, un tercero, un cuarto ... Y así siguen siempre aumentando los círculos, hasta que el último alcanza la orilla. Cada uno de estos círculos es consecuencia del anterior.

El juego de la causa y el efecto, al igual que el juego de la investigación, es progresivo e inexorable.

He dicho.

BIBLIOGRAFIA

- (1) SIR DERRICK DUMLOP: The assesment of the safete of drugs and the role of Government in theri control. « J. Clin. Pharmacology ». 184 (1967).
- (2) G. DOGMACK: «Deutch Med. Wochschr. » 61, 250, (1935).
- (3) E. FOURNEAU., J. TRÉFOUËL , F. NITTI y D. BOVET: «Compt. Rend. Soc. Biol.» 122, 652 (1936)
- (4) J. C. HAMBURY: *The role of the Pharmaceutical Sciences in Medicine*. «Pharm. J.» , 189, 244 (1962).
- (5) New York Academy of Medicine, Committe on Public Health. «Bull N. Y. Acad. Med. » 38, 415 (1962).
- (6) F.W. SHUELER: *Perspectives in Drug therapy*, en *Molecular modification in Drug Desing*. «Advances in Chemistry Series» núm. 45, pág. 221 (1964). Edit. Por American Chemical Society, Washington, D. C.
- (7) TH. STRULLER: Progress in Sulfonamide Research, en «Progress in Drug Research» vol. 12, pág. 389 (1968). Birkhäuser Verlag, Basilea.
- (8) N. RIST: «Compt. Redn. Soc. Biol.», 130, 972, 976 (1939); N. RIST, F. BLOC y H. HAMON: «Ann. Inst. Pasteur», 64, 203 (1940); W.H. FELDMANN, H. C. HINSHAW y H. E. MOSES: « Proc. Staff Meetings Mayo Clinic», 15, 695 (1940).
- (9) G. H. FAGET, R. C. POGGE, F. A. JOHANSEN, J. F. DINAN, B.M. PREJEAN y C.G. ECCLES: «Public Health Repts. (U.S)» 58, 1729 (1943).
- (10) G. W. RAIZTS, L. W. CLEMENCE y M. FREIFELDERH «J. Amer. Pharm. Assoc.», 33, 42 (1944); R. W. RAIZTS, , L. W. CLEMENCE y M. FREIFELDERH : Pat. US., 2.256.575.
- (11) L. L. BAMBAS: «J. Amer. Chem. Soc.». 67, 668 (1945).
- (12) L. R. PASCALE, R. A. DUBIn y W. S. HOFFMAN: «J. Amer. Med. Asocc.» 149, 1188 (1952).
- (13) H. SOUTHWORTH: «Proc. Soc. Exptl. Biol. .Med.» 36, 58 (1937).
- (14) T. MAN v D. KEILIN: «Nature». 146, 164 (1940); H. A. KREBS: «Biochem. J.» 43, 525 (1948).
- (15) W. H. MILLER, A. M. DESSERT y R. O. ROBLIN: «Amer. Chem. Soc.», 72. 4893 (1950); R. O. ROBLIN y J. W. CLAPP: «J. Amer. Chem. Soc», 72, 4890 (1950).
- (16) H. HELLER y M. GINSBURG : Diuretic Drug, en «Progress in Medicinal Chemistry». vol. 1, pág. 132 . Butterworths. Londres. 1961.
- (17) J. R. CUMMINGS. E. TABACHNICK y M. SEELEG: En «Edema» (J.H. Moyer y M. Fuchs, eds.), pág. 232 Saunders Co. Philadelphia. 1960.
- (18) M. JAMBON, J. CHAPTAL, A. VEDAL y J. SCHAAP: «Montpellier Med.», 21-22, 441 (1942)
- (19) FRANKE y FUCHS. «Dtsch. Med. Wochschr.», 80. 1449 (1955); ACHELIS y HARDEBECK: «Dtsch. Med. Wochschr.». 80. 1455 (1955); BERTRAM, BENFELDT y OTTO: «Dtsch. Med. Wochschr.». 80. 1452 (1955).
- (20) H. EHRHART: «Naturwiss.», 43, 93 (1956).

- (21) P. S. HENCH, E. C. KENDALL, C. H. SLOCUMB y F. F. POLLEY: «Procc. Staff Meetings Mayo Clinic», 24, 181 (1949).
- (22) P. SAXL y R. HEILIG: «Wien Klin. Wochschr.», 33, 943 (1920); A. VOGL: «Med. Rec.», 163, 189 (1950).
- (23) L. S. GOODMAN y A. GILMAN: Pharmacological Basis of Therapeutics, 2ª ed., pág. 754. MacMilan, New York, 1955.
- (24) R. H. REILLY: «J. Amer. Med. Asoc.», 152, 1317 (1953).
- (25) M. PRINZMETAL y W. BLOOMBERG: «J. Amer. Med. Asoc.», 105, 2051 (1935).
- (26) E. DAVIDOFF y E. C. REIFENSTEIN: «J. Amer. Med. Asoc.», 108, 1170 (1937).
- (27) F. JOHNSON y R. MADROÑERO: Heterocyclic Syntheses involving Nitrilium Salts and Nitriles under Acidic Conditions, en «Advances in Heterocyclic Chemistry» (A. R. Katritzky, ed.), vol. 6, cap. 3, Academic Press, New York (1966).
- (28) M. LORA-TAMAYO, R. MADROÑERO, G. GARCÍA MUÑOZ y H. LEIPPRAND: «Chem. Ber.», 97, 2234 (1964).
- (29) F. GARCÍA-VALDECASAS, E. CUENCA, M. LORA-TAMAYO y R. MADROÑERO: Observaciones no publicadas.
- (30) M. LORA-TAMAYO, R. MADROÑERO y H. LEIPPRAND: «Chem. Ber.», 97, 2244 (1964).
- (31) F. GARCÍA-VALDECASAS y E. CUENCA: Observaciones no publicadas.
- (32) R. MADROÑERO: «Anales R. Acad. Farm.», 34, 173 (1968).
- (33) M. MONTAVON (F. Hoffmann-La Roche, Basilea): Comunicación personal.
- (34) M. LORA-TAMAYO, R. MADROÑERO y G. ALONSO: «Bull. Soc. Chem. France», 1020 (1962); M. LORA-TAMAYO, R. MADROÑERO y G. ALONSO: «Bull. Soc. Chem. France», 1024 (1962); M. LORA-TAMAYO, R. MADROÑERO y C. SUNKEL: «Bull. Soc. Chem. France», 248 (1964); M. LORA-TAMAYO, R. MADROÑERO y C. SUNKEL: «Bull. Soc. Chem. France», 251 (1964); M. LORA-TAMAYO, R. MADROÑERO G. ALONSO y C. SUNKEL: «Bull. Soc. Chem. France», 255 (1964); M. LORA-TAMAYO, R. MADROÑERO y G. ALONSO: «Bull. Soc. Chem. France», 259 (1964).
- (35) J. GARRIDO, B. IÑIGO y C. LLAGUNO: Instituto de Fermentaciones Industriales, Madrid.
- (36) H. R. ING: «Trans. Faraday Soc.», 39, 372 (1943); J. F. DANIELLY: «Nature», 170, 863 (1952); J. F. DANIELLY: Leukaemia Research. Ciba Foundation Symposium. Churchill, Londres, 1954, pág. 263.
- (37) M. LORA-TAMAYO, R. MADROÑERO y J. IGLESIAS: «Anal. Real. Soc. Esp. Fís. y Quím.», 62B, 1385 (1966).
- (38) M. LORA-TAMAYO, R. MADROÑERO, J. DEL RIO y G. GARCIA MUÑOZ: «Anal. Real. Soc. Esp. Fís. y Quím.», 62B, 173 (1966).
- (39) P. G. SCHOLEFIELD: «Canad. J. Biochem. Physiol.», 39, 1717 (1966).
- (40) B. R. BAKER, C. W. MOSHER, R. M. SILVERSTEIN y O. P. CREWS: «J. Org. Chem.», 23, 1257 (1958).
- (41) G. GIMÉNEZ-MARTÍN y J. F. LÓPEZ SÁEZ: (Instituto de Biología Molecular. Madrid). Comunicación privada.
- (42) I. LANGMUIR: «J. Amer. Chem. Soc.», 41, 1543 (1919).

- (43) H. ERLLENMEYER y M. LEO: «Helv. Chim. Acta.», 15, 1171 (1932).
- (44) V. BOGERT SCHATZ: *Isoterism and Bio-isoterim as Guides to Structural Variations*, en «Medicinal Chemistry» (A. Burger, Ed), cap. 8, pág. 72. Interscience Publs., Nueva York, 1960.
- (45) M. FUERTES, G. GARCÍA MUÑOZ, M. LORA-TAMAYO, R. MADROÑERO y M. STUD: «Tetrahedron Letters» 38, 4089 (1968); G. GARCÍA MUÑOZ, J. IGLESIAS, M. LORA-TAMAYO y R. MADROÑERO: «J. Heterocyclic Chem», 5, 699 (1969); G. GARCÍA MUÑOZ, R. MADROÑERO, M. RICO y M. C. SALDAÑA: «J. Heterocyclic Chem.», 6, 921 (1969); G. GARCÍA MUÑOZ, J. IGLESIAS, R. MADROÑERO y M. C. SALDAÑA: «Anal. Real. Soc. Esp. Fís. y Quím.» 66B, 383 (1970); M. FUERTES, G. GARCÍA MUÑOZ, R. MADROÑERO y M. STUD: «Tetrahedron», 26, 4823 (1970).
- (46) H. L. PRIEDMAN: *Influecne of Isoteric Replacement upon Biological Activity*. Symposium on Chemical-Biological Correlation. Natl. Acad. Sci-Natl. Resaearch Council. Pub. Núm. 206, Washington D. C., 1951, pág. 295.
- (47) P. H. BELL y R. O. ROBLIN: «J. AMER. Chem. Soc.», 64, 2905 (1942).
- (48) D. WOODS: «Brit. J. Exptl. Pathol.», 21, 74 (1940).
- (49) M. LORA-TAMAYO, R. MADROÑERO, J. DEL RIO y G. ALONSO: «Anal. Real. Soc. Esp. Fís. y Quím.», 62B, 187 (1966); M. LORA-TAMAYO, R. MADROÑERO, J. IGLESIAS: «Anal. Real. Soc. Esp. Fís. y Quím.», 62B, 1037 (1966); M. LORA-TAMAYO, R. MADROÑERO y C. OCHOA: «Anal. Real. Soc. Esp. Fís. y Quím.», 64B, 591 (1968).
- (50) J. DEL RIO: Tesis doctoral Universidad de Madrid; C. OCHOA: Tesis doctoral Universidad de Madrid.
- (51) A. GARCÍA GANCEDO: (Instituto «Jaim Ferrán»). Comunicación personal.
- (52) D. C. HARRISON, E. BRAUNWALD, G. GLICK, D. T. MASON, C. A. CHIDSEY y J. ROSS: «Circulation», 29, 84 (1963); J. COHEN, H. EFFAT, J. F. GOODWIN, C. M. OAKLEY y R. R. STEINER: «BRIT. HEART. J.» 26, 16 (1964); B. R. LUCHESSI, L. S. WHITSITT y N. L. BROWN: «Can. J. Physiol. Pharmacol.», 44, 543 (1966).
- (53) S. E. EPSTEIN y E. BRAUNWALD: «Med. Clinics N. Amer.», 52, 1031 (1968); R. RABKIN, D. P. STABLES, N. W. LEWIN y M. M. SUZMAN: «Amer. Jfl. Cardiol.», 18, 370 (1966).
- (54) P. G. GAAL, A. A. KATTUS, A. KOLIN y G. ROSS: «Brit. J. Pharmacol. Chemother.», 26, 713 (1966); J. R. PARRAT: «Cardiovasc. Res.», 3, 306 (1969).
- (55) R. MADROÑERO, C. CORRAL, M. S. LOMAS, J. DEL RIO y C. MARTÍNEZ ROLDÁL: Pat. espñ. 381.478 (1970).
- (56) Los resultados preliminares se presentaron en la Reunión de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas, celebrada en Santiago de Compostela (1970).