

**DESCUBRIENDO NUEVAS SUSTANCIAS NATURALES (O DERIVADAS) DE
INTERÉS TERAPÉUTICO.**

Por

PIERRE POTIER.

Institut de Chimie des Substances Naturelles.

91190 - GIF-sur-YVETTE.

FRANCE.

INTRODUCCIÓN :

La investigación terapéutica ha progresado considerablemente en los últimos diez años. Los progresos se han centrado esencialmente en la comprensión del mecanismo de acción de los medicamentos.

Numerosos receptores de medicamentos han podido ser identificados ; en varios casos, se ha logrado reproducir esos receptores por técnicas, ya clásicas, de ingeniería genética : aislamiento del ARN mensajero correspondiente a la síntesis de receptores, paso al ADN complementario ; inserción y expresión de este ADN en células de colibacilo o de Levadura ; aislamiento de la proteína receptora, así producida.

La obtención al estado puro de estos receptores ha permitido emprender estudios finos sobre mecanismos bioquímicos íntimos que dan cuenta de la actividad bioquímica de ciertas sustancias : por ejemplo, receptores nicotínico y muscarínico de la acetilcolina ; receptor central de benzodiazepinas, etc.

A partir de estos datos y otros análogos en sus consecuencias, se ha podido, en casos aun demasiado aislados, confeccionar "a medida" moléculas activas (por ejemplo inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina ; inhibidores de la renina, etc.).

Tenemos pues la esperanza de que esta estrategia científica se acentue en el futuro, reduciendo así la parte aleatoria en el descubrimiento de nuevos medicamentos.

En espera de este periodo dorado de la investigación científica, desgraciadamente aun lejana, debemos (con modestia pero también con metodología) aprovechar la suerte, utilizar la intuición (la cual no es, al fin y al cabo, sino una forma aparentemente ilógica de utilizar nuestros conocimientos) para que progresen las investigaciones en este campo y ... en otros.

Es de esta forma como debemos seguir trabajando en el campo de las sustancias naturales. Estas nos son proporcionadas por plantas, microorganismos, animales terrestres o marinos, *constituyendo* cerca del 80% de las cabezas de serie farmacológicas. Pero en este campo, como en los demás, no se puede investigar sin metodología y es preciso saber "guiar lo aleatorio".

Entre las investigaciones que se persiguen, desde hace numerosos años en el Instituto de Química de Substancias Naturales del CNRS en Gif-sur-Yvette, escogeremos varios ejemplos para demostrar hasta qué punto las sustancias naturales siguen representando un objetivo de investigaciones muy fructuoso.

Estos ejemplos demostrarán, evidentemente, como la interacción entre la química y la biología, los químicos y los biólogos, es importante en este tipo de investigación.

I. INVESTIGACIÓN DE NUEVAS SUBSTANCIAS ANTITUMORALES : ESTRATEGÍA Y CONSECUENCIAS.

Las afecciones tumorales representan la segunda causa de mortalidad humana por enfermedad. En igualdad de circunstancias, esta estadística es válida para todo el planeta. Las causas de cánceres son múltiples pero cada vez mejor conocidas, así como los factores de riesgo. En cuanto a los mecanismos de iniciación del proceso canceroso propiamente dicho, los recientes descubrimientos sobre los oncógenos, protooncógenos, factores de crecimiento, hormonas, etc., junto a los de la biología molecular, permiten mejor delimitarlos. Estos descubrimientos deberían permitir en un plazo razonable, proponer métodos de tratamiento todavía más racionales que los actualmente en uso.

Sin embargo, en el estado actual de los conocimientos, la terapia de las enfermedades tumorales todavía recurre, separadamente o en conjunto, a la cirugía (reductora o erradicadora), a la radioterapia, a la quimioterapia y, aunque aun tímidamente, a la inmunoterapia la cual se puede considerar, con todo rigor, como parte de la quimioterapia en sentido amplio.

En el campo de la quimioterapia de los cánceres en sentido estricto, la mayoría de los productos esenciales se han descubierto hace mucho más de diez años ; ocurre en este campo lo que también se observa con los antibióticos y otros agentes anti-infecciosos : lo que ya está descubierto restringe considerablemente el campo de lo que queda por descubrir. Es una evidencia.

Se progresa pues más, en el campo de la quimioterapia anticancerosa, por una mejor utilización de los medicamentos disponibles (mono- o poli-quimioterapia). Por ejemplo : adriamicina 3 y derivados ; podofilotoxina 6 y derivados ; vinblastina 7, vincristina 8 y derivados ; bleomicina ; agentes alquilantes variados ; antimetabólitos, etc.

Pero también se progresa por medio del estudio del mecanismo de acción de dichos medicamentos. Tendremos la oportunidad, posteriormente, de presentar varios ejemplos de estas investigaciones cuyas consecuencias sobrepasan a menudo los puros horizontes medicales.

La quimioterapia constituye pues un componente importante en el tratamiento de la enfermedad tumoral y resulta a veces el único utilizable : en los casos de cánceres difusos, leucemias, enfermedad de Hodgkin, linfomas, etc. con o sin el uso conjunto de otro tratamiento, radioterapia por ejemplo.

Todo esto me ha llevado a desarrollar desde casi veinte años, en el Instituto de Química de Substancias Naturales del CNRS, en Gif-sur-Yvette, un programa de investigación de nuevas substancias antitumorales. Así hemos obtenido algunos éxitos dentro de dos clases de agentes antitumorales : la constituida por "venenos del huso mitótico" ; y la generalmente llamada "agentes intercalantes", del ADN se entiende.

El punto de partida de estas investigaciones ha sido, en todos los casos, substancias de origen natural, aisladas de

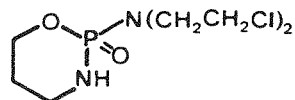
plantas terrestres pero también, recientemente, de organismos marinos.

Es útil recordar, en este instante, la clasificación, generalmente aceptada de las sustancias actualmente en uso en la quimioterapia de los cánceres.

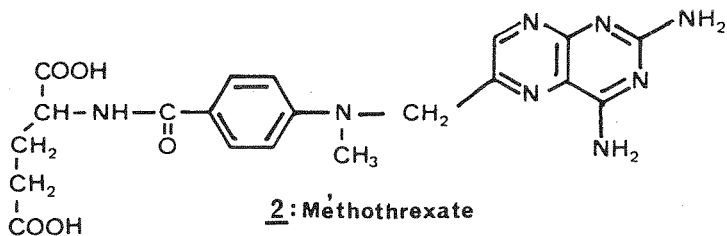
Los agentes alquilantes cuyas propiedades electrófilas particulares les permiten crear enlaces covalentes, sobre todo carbono-carbono, generalmente irreversibles, con ciertas dianas biológicas : proteínas, ácidos nucleicos, etc. De esta reactividad resultan desórdenes metabólicos o funcionales que traen como consecuencia la muerte de las células atacadas. Un ejemplo de este tipo de productos es el Endoxan o ciclofos~~fa~~midamida 1.

Los antimetabólitos que funcionan como "cebos" metabólicos y se insertan en un proceso bioquímico particular, fundamental para la vida celular y así causan una disfunción de la célula y su muerte. El metotrexato 2 que inhibe el sistema fólico (traslado de unidades monocarbonadas) es un ejemplo de estos agentes.

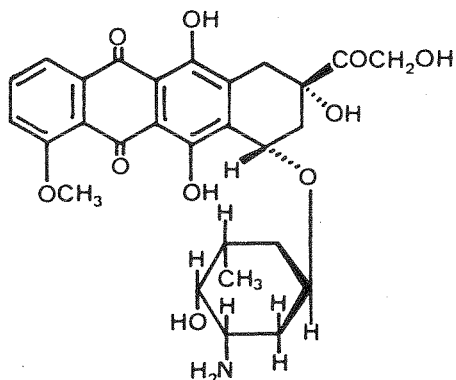
Los agentes "intercalantes", conocidos por incorporarse en las estructuras nucleicas (generalmente estructuras desoxiribonucleicas : ADN) y perturbar el funcionamiento de dichas estructuras : replicación, expresión, degradación, etc. La adriamicina 3 pertenece a esta categoría.



1: Endoxan [®]



2: Méthotrexate



3: Adriamycine

Los "venenos del huso" se oponen a la constitución del huso (o en casos mas raros a su desaparición) durante las varias fases de la división celular. La colchicina 4, aislada del Cólchico o el taxol 5, aislado del Tejo, representativos de esta categoría, son objeto de investigaciones en nuestro laboratorio, asi como otros productos del mismo grupo : vinblastina 7, podofilotoxina 6 y derivados ; hablaremos de ellos.

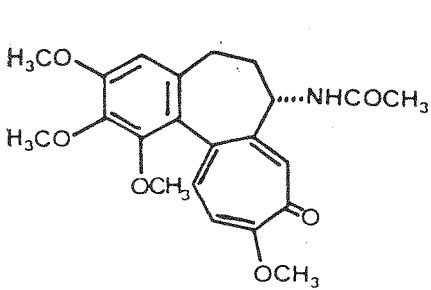
Aun existen otros numerosos productos utilizados en quimioterapia de los cánceres que no pertenecen a ninguna de las tres categorias precedentes, bien porque se conoce mal su mecanismo de acción, bien porque este mecanismo de acción es distinto de los ya citados.

Pueden, por ejemplo, actuar en distintos sistemas proteicos cuya función es importante para la vida celular : topoisomerasas ; girasas ; replicasas y, probablemente, factores de crecimiento.

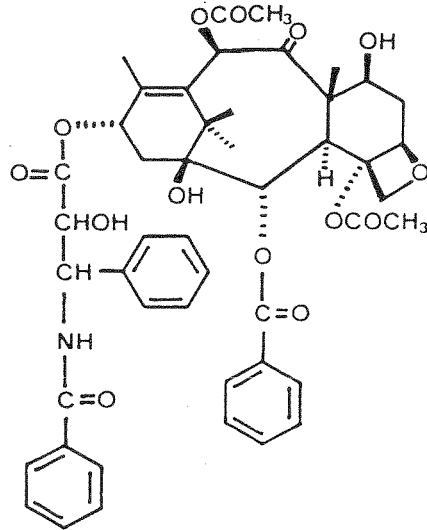
Nuestras investigaciones se han referido esencialmente a los "venenos del huso" y a los agentes llamados "intercalantes".

I.1. Nuevos venenos del huso :

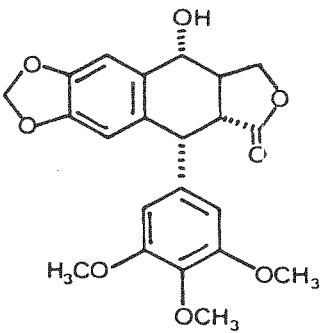
Sabemos que una de las figuras esenciales, que aparece durante la división celular, es el huso. Las diferentes fases de este importante acontecimiento en la vida de la célula, descritas desde hace tiempo, se fundamentan sobre observaciones microscópicas y se basan, en efecto, en la aparición, el desarrollo y



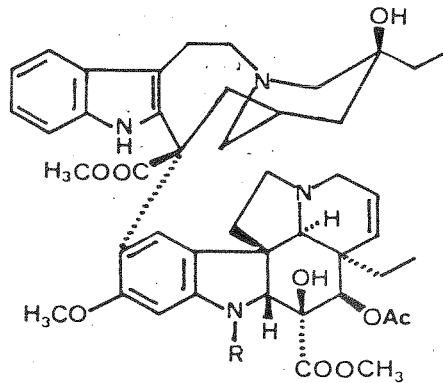
4 : Colchicine



5 : Taxol



6 : Podophyllotoxine



7 : R = CH₃ Vinblastine

8 : R = CHO Vincristine

la desaparición del huso. El huso tiene una función esencial en la repartición de los cromosomas a lo largo de la mitosis (o de la meiosis).

Ahora bien, ciertas sustancias de origen natural se conocen por perturbar la formación (o la desaparición) de este huso : la colchicina 4 previamente citada : pero también la podofilotoxina 6 y otros "ligandos" : la vinblastina 7, la vincristina 8, el taxol 5, etc.

Uno de los materiales biológicos esenciales en la constitución del huso es una proteína : la tubulina. La estructura de esta molécula ubicua (se encuentra, por lo menos, en todos los organismos eucariotas) no es aun completamente conocida ; no se ha conseguido, hasta ahora, obtenerla cristalizada para poder elucidar su estructura por medio de estudios radio-cristalográficos. Sin embargo, del estudio de secuencias primarias de ciertas tubulinas, establecidas por "clonaje" (2) se destaca una conservación importante de estas proteínas a lo largo de la Evolución (lo cual refleja su función "universal").

La tubulina constituye el objetivo principal, si no único, de los "venenos del huso" ; inhiben su polimerización, o menos frecuentemente, su despolimerización (como es el caso del taxol 5). Esta propiedad constituye el fundamento de la elaboración de un método de selección, simple y rápido, de los venenos del huso : consiste en medir, en condiciones bien especificadas, la inhibición de la polimerización (o de la despolimerización) de una preparación de tubulina (generalmente extraída de cerebro de

cerdo o de oveja), por cantidades crecientes de un inhibidor potencial. Hemos desarrollado este método en nuestro laboratorio. Usar este método acorta considerablemente el tiempo transcurrido en la espera de los resultados de las evaluaciones de actividad de los productos estudiados en animales cancerosos. Esta "prueba de la tubulina" tal como la practicamos, evidentemente no dispensa de precisar, después, el nivel de actividad de los productos que permite seleccionar ; pero esta selección temprana se ha revelado, hasta ahora, fiel. Teniendo en mano un método de cribado, hemos podido desarrollar nuestras investigaciones químicas. La síntesis biomimética de alcaloides del grupo de la vinblastina 7 ha sido llevada a cabo, por primera vez, en nuestro laboratorio (3). Recurre a una reacción química igualmente descubierta por nosotros : la reacción de Polonovski-Potier (4). Esta reacción consiste en substituir, en la reacción original de Polonovski, el anhídrido acético por el anhídrido trifluoroacético. Las consecuencias de esta simple modificación, sobre el curso de la reacción observada, son considerables y han dado lugar a numerosos estudios por nosotros, y luego por otros (4).

Los alcaloides "dímeros" del grupo de la vinblastina 7 son, estructuralmente, constituidos por dos subunidades ellas mismas derivadas de dos precursores biogénicos de estos alcaloides complejos : la catarantina 9 y la vindolina 10, presentes en la misma planta : *Catharanthus roseus* G. Don (vincapervinca de Madagascar) y otras especies vecinas, pertenecientes todas ellas, a la familia de las Apocináceas.

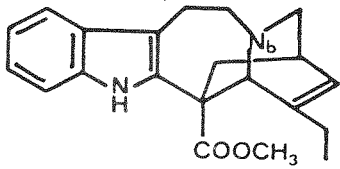
Cuando se trata el aminóxido de catarantina 11 con el anhídrido trifluoroacético, y se añade la vindolina 10, se obtiene, mayoritariamente, tras reducción in situ, la anhidrovinblastina 12, que posee la configuración 16'S indispensable para la actividad biológica (Cuadro I).

Es interesante notar que esta síntesis, realizada en Gif, desde 1974 (3), puso fin a una larga serie de esfuerzos infructuosos desarrollados en los Estados Unidos, en Canadá y en varios otros países con el mismo objetivo.

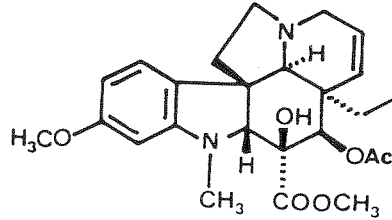
Estos esfuerzos se motivaban sobre todo por los precios alcanzados por estos medicamentos que siguen siendo, todavía, los más caros del mundo. (Los precios de venta actuales fluctúan alrededor de 250 millones de Ptas/kg para la vinblastina 7 (Velbé^R) o de 1700 millones de Ptas/kg para la vincristina 8 (Oncovin^R)).

Por otra parte, el hecho de poder obtener, por hemisíntesis, estos alcaloides complejos, también permitía proyectar la preparación de nuevos derivados, resultando de una modificación, previa a su "unión", de los dos precursores : catarantina 9 y vindolina 10.

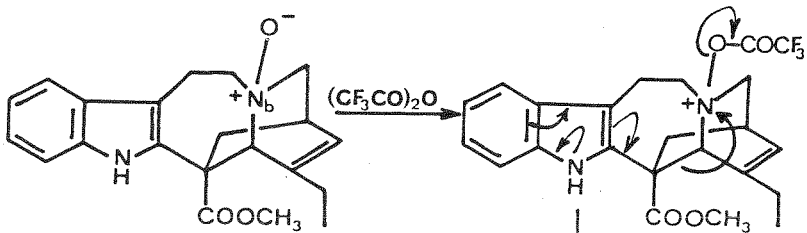
La obtención de estos nuevos productos, inaccesibles a partir de la misma vinblastina de origen natural, nos permitía esperar la ampliación del arsenal terapéutico y una mejor evaluación de las relaciones que existen entre la estructura de estos productos y su actividad terapéutica.



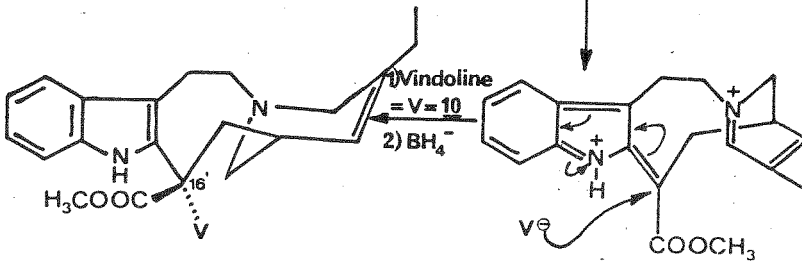
9 : Catharanthine



10 : Vindoline = V



11 : Catharanthine N_b-oxyde



12 : Anhydrovinblastine (16'S)

TABLEAU I

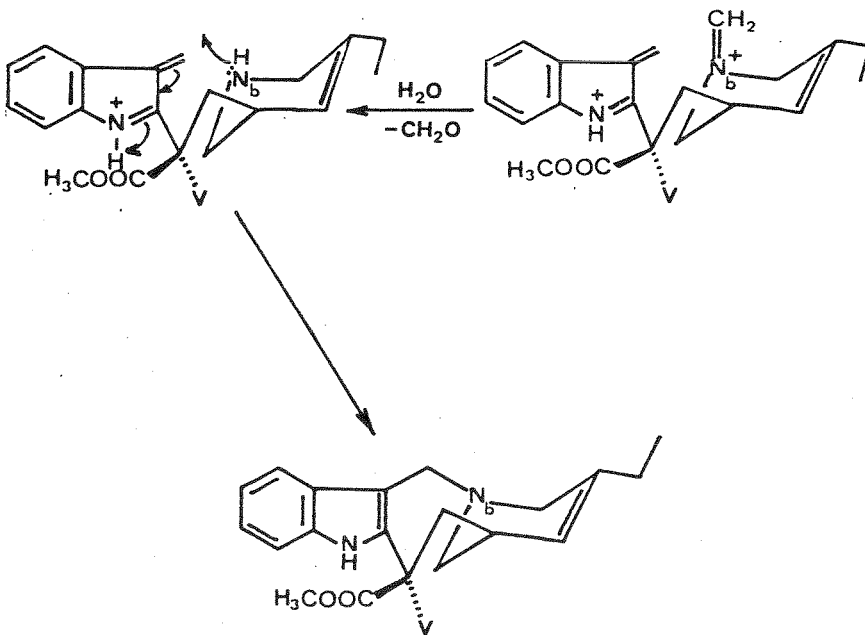
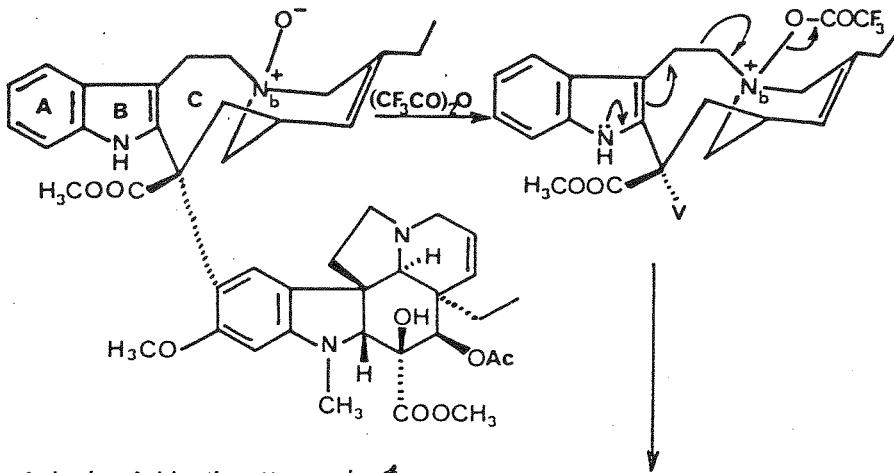
Cuadro I

La aplicación repetida de la reacción de Polonovski modificada a la anhidrovinblastina 12 previamente obtenida por esta misma reacción, conduce, con buenos rendimientos, a la nor-anhidrovinblastina, bautizada por nosotros NAVELBINA [®] 13 (Cuadro II) (6). La Navelbina inhibe, como la vinblastina pero en un grado superior, la polimerización de la tubulina. Ha llegado, actualmente, a la fase II de evaluación clínica y se espera que pronto enriquecerá nuestro arsenal terapéutico.

El desarrollo de este producto, en las fases preclínica y clínica, ha sido el objeto de una colaboración con G. MATHÉ, el malogrado Dr. MARAL, la Dra. P. RIBAUD y sus colaboradores del Instituto de Cancerología e Inmunogenética de Villejuif, que se extendió, luego, a varios otros centros franceses y también extranjeros, con el concurso de los Laboratorios Pierre Fabre, encargados de comercializar el producto (7). Los estudios de farmacología preclínica han sido, también, realizados en colaboración con el Laboratorio de Farmacología y Toxicología Fundamental del CNRS en Tolosa, primero bajo la dirección de Cl. PAOLETTI y después bajo la de J. CROS y sus colaboradores. A todos ellos expreso aquí mi agradecimiento.

Las diferencias de actividad terapéutica de la Navelbina, comparada a la vincristina o la vinblastina, ya observada a nivel su interacción con la tubulina, quizás se explique por la diferencia de estructura química que caracteriza estos productos:

- un ciclo de nueve elementos en la parte "superior" de las moléculas de tipo vinblastina y una secuencia :



13 : Nor - anhydrovinblastine = Navébine ^(R)

Cuadro II



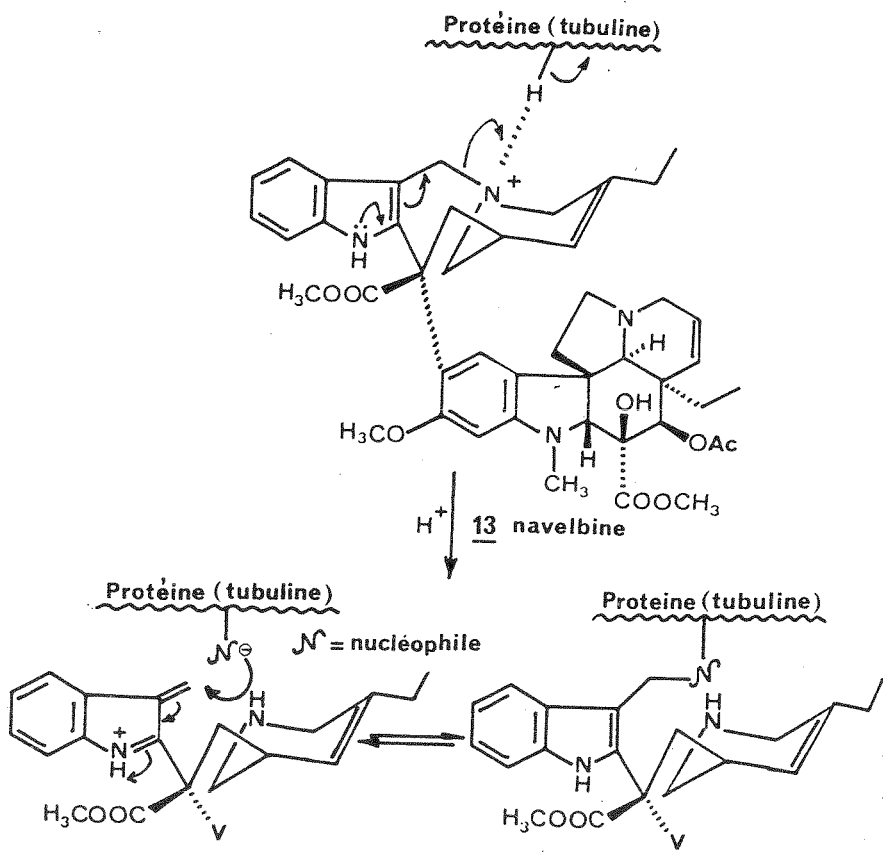
- un ciclo de ocho elementos, en el caso de la Navelbina (y sus derivados) y una secuencia :



Ahora bien, se conoce que, para todos los derivados de la vinblastina, el valor del pK de N'_b tiene una gran importancia : este átomo de nitrógeno debe poder protonarse (8). No obstante, es imposible, en el estado actual de nuestros conocimientos de la estructura de la tubulina (véase mas arriba), conocer la naturaleza precisa de las interacciones entre las moléculas de tipo vinblastina y la tubulina. Sin embargo, es muy probable que estas interacciones sean principalmente pero no exclusivamente, de tipo "hidrófobo" : por ejemplo, la interacción entre la estructura "pseudo-difenilmetano" formada por el conjunto de dos sistemas indólicos de las moléculas de tipo vinblastina y una o varias regiones hidrófobas de la tubulina.

Estas interacciones hidrófobas, energéticamente muy fuertes, se pueden acompañar de otros tipos de interacción : por ejemplo la del átomo de nitrógeno N'_b que es protonado por un aminoácido de la tubulina.

En este caso resultaría, con la Navelbina, una reacción análoga a la observada con los derivados de la gramina (Esquema 1). Podría entonces crearse un sistema electrófilo capaz de experimentar la adición de un grupo nucleófilo presente en la



Esquema I

tubulina y engendrando, así, un enlace covalente reversible. Este tipo de enlace se conoce por tener un papel considerable en numerosas reacciones bioquímicas pues constituye un bloqueo fundamental transitorio de varios puntos activos. Por otra parte, se puede ver, en este tipo de enlace, una solución general más interesante, desde muchos puntos de vista, que el método clásico de "inhibidores suicidas" que implica enlaces covalentes por definición irreversibles.

I.2. Nuevos agentes "intercalantes" : derivados piridocarbazólicos : elipticina 14a, olivacina 14b y derivados : estudio de su mecanismo de acción (10) :

La elipticina 14a es un alcaloide aislado hace aproximadamente treinta años a partir de varias Apocináceas pertenecientes, en particular, al género *Ochrosia* y a géneros vecinos. Muchísimos artículos han relatado las investigaciones realizadas en este campo, que han conducido, en Francia, a la utilización terapéutica del *Celiptium* [®] 15 (10). Los trabajos en nuestro Instituto, de N. DAT-XUONG, los de C. PAOLETTI, J.B. LE PECQ y sus colaboradores en Tolosa y en Villejuif, representan un excelente ejemplo de buena coordinación de esfuerzos entre varios laboratorios públicos de investigación fundamental con nuestros colegas industriales (en este caso, la SANOFI) para el desarrollo de un nuevo medicamento.

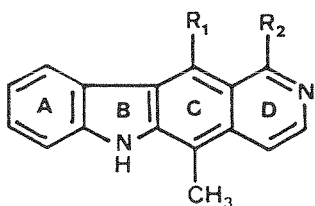
Lo mas interesante, después de determinar las condiciones de varias síntesis de derivados del tipo de la elipticina 14a (y de la elipticina misma, o de la olivacina 14b) era estudiar el

mecanismo de acción de estos productos y, después, de cuestionar eventualmente ciertas deducciones anteriores, casi dogmáticas.

El Celiptium[®] 15 y ciertos otros derivados de los pirido-carbazoles están clasificados entre los "agentes intercalantes" (Véase mas arriba). En efecto, numerosos experimentos realizados *in vitro* y algunos, mucho mas escasos, realizados *in vivo*, han revelado que este tipo de productos presentaban una incontestable afinidad hacia preparaciones clásicas de ácidos desoxiribonucleicos (ADN) obtenidos, por ejemplo, a partir de timo de ternera.

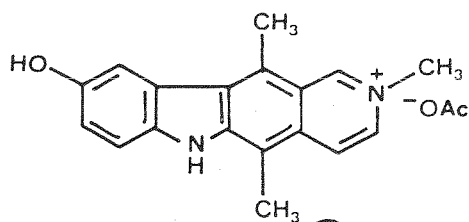
Los trabajos del equipo de Cl. PAOLETTI (Tolosa, Villejuif) (10) han permitido precisar que el Celiptium[®] 15 podía, bajo la influencia de varios oxidantes, en particular "biológicos" transformarse en una iminoquinona 16 susceptible de experimentar la adición nucleófila de grupos funcionales pertenecientes, en particular, a las estructuras del ADN. Nos hemos interesado en resolver un problema conexo, de consecuencias fundamentales importantes. En efecto, la diferencia eventual (pero no única) entre las estructuras de ADN y las estructuras de ARN reside en el hecho de que la molécula de D-ribosa, implicada en los ARN (ribonucleósidos y ribonucleótidos) está reemplazada, en las estructuras del ADN (desoxiribonucleósidos, desoxi-2-ribonucleósidos) por la D-desoxi-2-ribosa.

Ahora bien, la D-desoxi-2-ribosa no es un metabolito directo de la ribosa : resulta, en efecto, de la degradación de los desoxiribonucleósidos (o desoxiribonucleótidos) formados

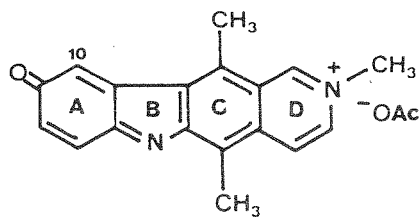


14a R₁ = CH₃; R₂ = H : ellipticine

14b R₁ = H ; R₂ = CH₃ : olivacine



15 cèliptium ^(R)



16 imminoquinone

ellos mismos, a partir de ribonucleótidos por reducción del hidróxilo en 2 de la D-ribosa. Esta reducción ocurre, *in vivo*, gracias a un sistema multienzimático, cuyo mecanismo de acción (y estructura) no se conoce aun perfectamente : la ribonucleotido-reductasa.

Esta serie de procesos bioquímicos representa a nuestro parecer, dicho sea de paso, una prueba simple pero excelente, en favor de la teoría de la aparición de estructuras de ARN previas a las estructuras de tipo ADN a lo largo de la Evolución. Las consecuencias de esto son, evidentemente, de primera importancia en biología y en bioquímica.

En efecto, hemos podido mostrar que el Celiptium 15, tratado con varios sistemas oxidantes (peroxidasas de rábano negro, óxido de manganesio MnO_2 , etc.) se convertía en una iminoquinona 16 que puede, después, reaccionar con ribonucleósidos A (Adenosina), G (Guanosina), C (Citidina), U (Uridina), con una preferencia muy marcada hacia A y menos hacia G (bases púricas) ; C y U reaccionan con mucha más pereza (bases pirimidínicas). Se trata pues, aquí, de una selectividad de reacción originada, sin duda, en un reconocimiento molecular fuerte entre los ciclos C/D del sistema piridocarbazólico y la adenina (o la guanina), y menos fuerte para las bases pirimidínicas.

Esta primera interacción de "presentación" de una molécula hacia otra puede dar lugar, si es posible, a una o varias reacciones químicas. En nuestro caso, la primera interacción de

presentación aporta las dos funciones hidróxilos en 2' y 3' de la ribosa encima de la posición 8 de la iminoquinona 16 para formar el acetal cíclico 17. Se trata, también aquí, de la formación de dos enlaces C-O reversibles que pueden, en efecto, romperse al bajar el pH del medio.

La selectividad de reacción observada entre moléculas de tipo piridocarbazol como la elipticina 14a y los nucleósidos púricos como la Adenosina A o, en menor grado, la Guanosina G, podría de nuevo encontrarse entre derivados de tipo elipticina y terminaciones poliadeniladas de ciertos ARN ("madurados") cuya función es tan importante para el cumplimiento de las fases esenciales de replicación, traducción, traslado, síntesis proteica, etc. Lo mismo se aplica para los "capping" 5' de los ARN, etc.

Los estudios de resonancia magnética nuclear que hemos realizado han permitido, en efecto, confirmar esta hipótesis ; demuestran un "amontonamiento" de los ciclos C y D del Celiptium 15 y de la parte adenina A de la adenosina (o guanina G de la guanosina).

A partir de estos primeros resultados, se puede, legítimamente, hacer una primera pregunta : No constituirían los ARN también (y sobre todo ?) una diana privilegia de los agentes antitumorales del grupo de la elipticina ? Por otra parte, esta pregunta se puede ampliar : Estos ARN no constituirían también una diana más frecuente que lo generalmente admitido para otros agentes antitumorales o para ciertos antibióticos ?

Finalmente, también hemos mostrado que estructuras como 16, o reducidas en los ciclos A, B, C (carbazoles), podían muy fácilmente reaccionar con aminoácidos para formar estructuras oxazolínicas (11).

Actualmente estamos examinando otras sustancias susceptibles, tras conveniente oxidación, de reaccionar con otras "dianas" celulares : esteróides, varios aminoácidos o péptidos, etc.

Los ejemplos que he escogido para exponerles, hasta ahora demuestran que los objetivos de búsqueda de nuevos medicamentos antitumorales que nos habíamos fijado han sido afortunadamente alcanzados ; pero además, nos han llevado a estudiar problemas conexos que pueden tener cierta importancia en biología y bioquímica fundamentales.

II. DONDE LAS INVESTIGACIONES SOBRE LOS RECEPTORES DE BENZODIAZEPINAS LLEVAN A INTERESARSE AL SISTEMA INMUNE, AL SISTEMA CARDIOVASCULAR Y ... A LA MEMORIA

El ejemplo, ahora bien conocido, del descubrimiento de receptores de la morfina en el sistema nervioso seguido, algunos años después, por la evidencia de "morfinas internas" encefalinas, endorfinas, etc. constituye uno de los mayores éxitos de la farmacología moderna (12,13). La morfina es un producto

natural aislado hace casi dos siglos del opio, usado desde hace milenios.

Las benzodiazepinas y, en particular, la primera de ellas en ser utilizada en terapéutica, el diazepam (Valium [®] 21) se conocen desde hace treinta años por sus propiedades sedativas, hipnóticas, ansiolíticas o miorelajantes. Son, al opuesto de la morfina y sus derivados de origen natural, substancias procedentes de la química orgánica de síntesis, cuyas propiedades farmacológicas se han descubierto por azar, como sigue siendo a menudo el caso, dicho sea de paso, para muchos nuevos medicamentos. Sepamos pues ser modestos !

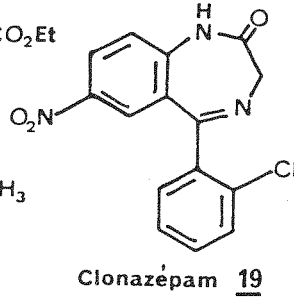
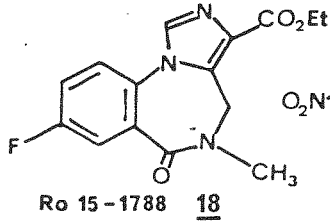
Una manera de pensar análoga a la que había permitido el descubrimiento de "receptores opiáceos" y de las "morfinas internas" fue aplicada por varios investigadores entre ellos BRAESTRUP, SQUIRES, etc. (14,15). Así fue como se pusieron en evidencia, en el sistema nervioso central de los Mamíferos, los receptores de las benzodiazepinas. El gran número de moléculas sintetizadas en esta serie química ha permitido, después, percatare rápidamente que no existía un solo tipo de receptores de benzodiazepinas si no por lo menos, dos grandes categorías (incluyendo, como a menudo, varias subclases) (Cuadro III) :

- Los receptores llamados "centrales", presentes en el cerebro, el cerebelo, etc.

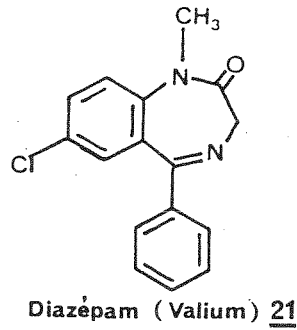
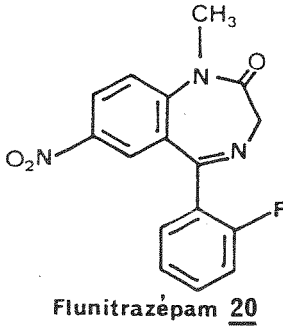
- Los receptores llamados "periféricos", presentes en el bazo, los riñones, etc.

MOLÉCULES

"Centrales"



"Mixtes"



"Périphériques"

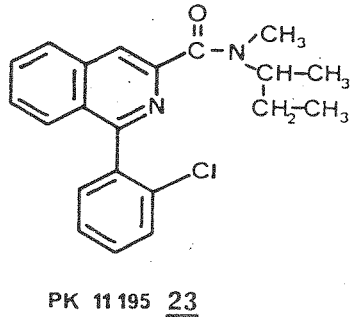
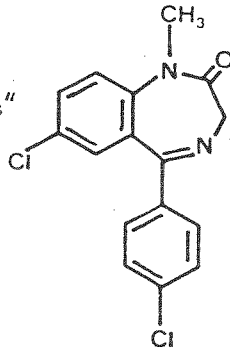
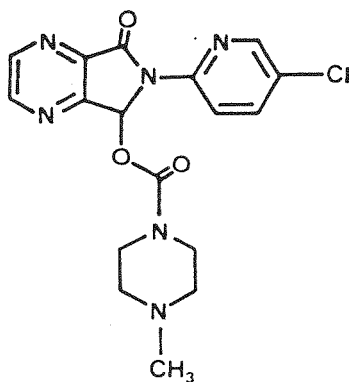
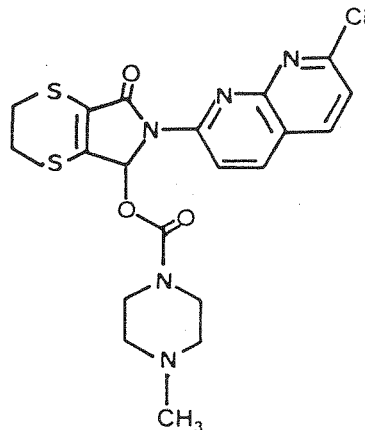


TABLEAU III : Spécificité de certaines molécules pour les différents types de récepteurs des benzodiazépines

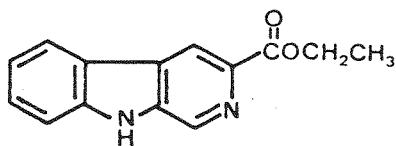
Cuadro III



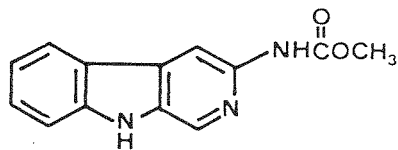
Zopiclone 24



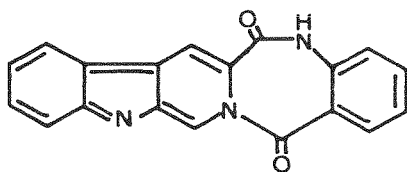
Suriclone 25



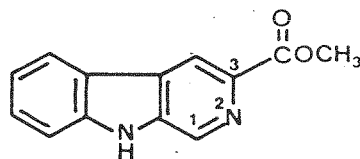
B-CCE 26



B-CMC 27



Hybride benzodiazépine
B-carboline 28



B-CCM 29

Cuadro III

Así, ciertas benzodiazepinas como el clonazepam 17 y el Ro 15-1788, 18, muestran afinidad hacia los receptores centrales exclusivamente ; otras, como el Ro 5-4864, 22, no se fijan mas que en puntos periféricos. Finalmente, otros, como el flunitrazepam 20, y el diazepam (Valium [®] 21) se fijan, a la vez, en puntos de fijación (o receptores) centrales y periféricos. Así se constituyen los tres grupos de ligandos : centrales, mixtos y periféricos.

Toda esta clase terapéutica, constituida por las benzodiazepinas (o moléculas asimiladas) es actualmente muy rica en substancias, que son producidas por toneladas en el mundo entero ; son objeto de millones de prescripciones médicas contribuyendo a tranquilizar pacientes ; pero también a menudo médicos !

La clase de las benzodiazepinas, en el sentido químico estricto, se ha ampliado, más recientemente, a moléculas que no pertenecen a esta clase química ; sin embargo se fijan, con afinidades a menudo excelentes, en los puntos de fijación (o receptores) de las benzodiazepinas. Es el caso de la Zopliclona 24, o de la Suriclona, 25, sintetizadas por los investigadores de Rhône-Poulenc. Un examen estructural más detenido de estas moléculas y su comparación con las moléculas benzodiazepínicas, ayudándose de las técnicas del grafismo molecular, permiten destacar analogías moleculares que no aparecen fácilmente a primera vista.

Los innumerables trabajos tratando del conjunto de los "benzodiazepínicos" han sido el objeto de varias revistas (16) (17).

BRAESTRUP, SQUIRES y colaboradores, después de haber descubierto los receptores de benzodiazepinas, han investigado si no existían ligandos endógenos de estos receptores, como se había demostrado en el caso de los compuestos morfínicos y de las endorfinas, encefalinas, etc. Así han podido aislar, a partir de grandes cantidades de urina humana, el éster etílico del ácido β -carbolino-3-carboxílico (β -CCE) 26 que se fija (10^{-9} M) sobre los receptores centrales de las benzodiazepinas. El origen artefactual de este compuesto fue rápidamente establecido : en efecto, los autores citados habían usado, para extraer la β -CCE, ácido clorhídrico y etanol ! Sin embargo, la β -CCE debe, sin duda, derivar de un precursor (peptídico ?) cuya naturaleza exacta sería, obviamente, importante de conocer

Una publicación reciente (27) describe el aislamiento, a partir de materia gris del cerebro de Buey, del β -CCB (éster butílico del ácido β -carbolino-3-carboxílico), potente inhibidor de la fijación de las benzodiazepinas en sus puntos específicos. El origen artefactual de este éster es descartado por estos autores : sin embargo, la duda existe, puesto que el procedimiento de extracción comprende una purificación por contracorriente, que hace uso de ácido acético y ... butanol !

El problema de los ligandos endógenos de los receptores benzodiazepínicos sigue intacto, aunque varios autores han

descrito recientemente el aislamiento de péptidos (DBI, nepentina, etc.) ligandose, con buena afinidad, a los receptores benzodiazepínicos. De la misma manera, otros varios metabolitos internos como las purinas (cafeína) (26), la nicotinamida, la melatonina, etc., demuestran una afinidad, generalmente baja hacia los puntos benzodiazepínicos. A pesar de esta baja afinidad, puede ser que participen, sin embargo, en la definición de la "línea de base" comportamental de cada individuo. Se conoce, a este respecto, la sensibilidad individual variable hacia la cafeína. Por otra parte, no se pueden excluir "efectos de sinergia" (entre benzodiazepinas y cafeína, por ejemplo).

En lo que respecta a la β -CCE, 26, se puede considerar como posible que resulte de la degradación de un péptido precursor interno, en el cual el triptófano constituiría el aminoácido N-terminal. Este triptófano podría experimentar, dentro del péptido del cual forma parte, una modificación química que resultaría de la acción de un sistema biológico de traslado de unidades monocarbonadas (sistema fólato-tetrahydrofólato o, menos verosímil, S-adenosilmetionina) (18). De ello resultaría, después de la ruptura del enlace peptídico, la liberación de un ácido tetrahydro-1,2,3,4,- β carbolino 3-carboxílico transformado durante la extracción (HCl, etanol) en β -CCE (Esquema II).

Se sabe que este tipo de reacción también ha sido considerado en el caso de la fenilalanina, de la tirosina o de la dopamina para dar cuenta de los efectos fisiológicos que se observan en caso de consumo excesivo de bebidas alcoholizadas (formación de acetaldehído, a partir del etanol y reacción con

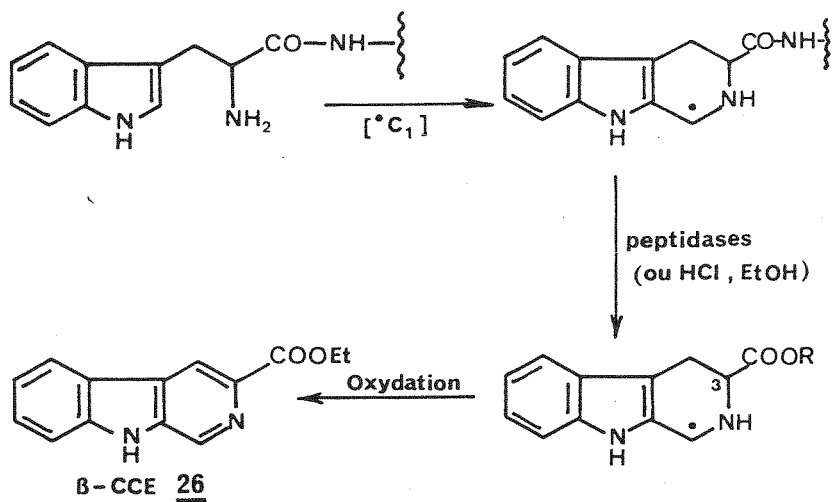


Schéma II

Esquema II

substratos derivados de la fenilalanina, por ejemplo, mas que del triptofano tal como esta descrito mas arriba).

De todas formas, nuestras investigaciones se han concentrado en la síntesis de numerosos derivados de β -carbolinas y la medida de su afinidad hacia los puntos de fijación centrales de las benzodiazepinas. Entre los resultados más notables que hemos obtenido, figura la preparación de 27 que se fija (7×10^{-9} M) sobre los receptores centrales (19) y constituye el primer anticonvulsivante no sedativo de esta serie de productos.

Este simple resultado estaba en contradicción con ciertas deducciones propuestas por otros autores, describiendo relaciones entre estructuras y actividad en esta serie química : parecía, en efecto, establecido el hecho de que la presencia de una función carboxílica juxtacíclica en posición 3 del sistema β -carbolina fuese necesaria para la fijación sobre los receptores benzodiazepínicos. También hemos sintetizado algunas moléculas, híbridos estructurales de benzodiazepinas y de β -carbolinas, tal como 28. Este tipo de producto efectivamente presenta una buena afinidad (10^{-3} M) para los receptores centrales de las benzodiazepinas.

Por otra parte, nuestros colegas neurofisiólogos de Gif han establecido que ciertos derivados β -carbolínicos demostraban propiedades ansiógenas (20) ; es el caso del β -CCM, 29 ; al contrario, numerosas benzodiazepinas son conocidas por sus propiedades ansiolíticas ; pero también se conocen algunas capaces de ejercer un efecto amnésico.

Estos datos nos han conducido a investigar si ciertos derivados β -carbolínicos no tendrían propiedades amnésicas (antagonistas o agonistas inversos) favoreciendo, así, memoria y aprendizaje.

En efecto, se conoce bien el hecho de que un estado de ligera ansiedad puede favorecer la memoria : se recuerda perfectamente un acontecimiento que nos ha marcado ; pero este acontecimiento no debe tampoco acompañarse de una emoción excesiva que provoca entonces el efecto contrario : es el fallo de la memoria, bien conocido. Algunos de nuestros maestros de escuela, de antaño, utilizaban en realidad, y sin conocer las razones, este modo empírico y generalmente eficaz que consiste en favorecer el aprendizaje de una lección, creando un estado de ligera ansiedad en el alumno recalcitrante !

Aquí se tocan evidentemente fenómenos muy complejos, pero cuan importantes y apasionantes, relacionados con la memoria, con su almacenamiento y con su "desalmacenamiento".

Ciertos trabajos han sido realizados por nuestros colegas del Laboratorio de Fisiología Nerviosa del CNRS : G. CHAPOUTHIER, J. ROSSIER y sus colaboradores.

Han demostrado que ciertas benzodiazepinas inhibían el aprendizaje y los procesos de memorización cuando, al contrario, ciertos derivados de β -carbolinas, tal como el β -CCM, 29, los favorecían.

Dejemos, por el momento, estas investigaciones apasionantes que se realizan en Gif, para emprender otro aspecto de nuestro trabajo que nos ha llevado a interesarnos a uno de los componentes del sistema inmune : los macrófagos.

Se conoce bien, y desde hace mucho tiempo, que el estado psíquico de un individuo repercute en su estado inmunitario : se lucha con tanto más éxito contra ciertas enfermedades cuando se tiene la moral alta.

Al contrario, el estado de un paciente se deteriora tanto más rápido cuanto más deficiente es su estado psíquico. Esto recubre, por lo menos en parte, fenómenos fisiológicos muy importantes que plantean, en particular, el amplio problema de la existencia de relaciones entre el sistema nervioso y el sistema inmune. No se ha llegado hasta a escribir : "El sistema inmune, nuestro cerebro móvil ?"

Si existen mediadores implicados en las relaciones entre estos dos sistemas, se puede lógicamente pensar primero en péptidos. De hecho, observaciones bastante numerosas corroboran esta hipótesis (22, 23, 24b).

En este campo hemos procedido de la manera siguiente : si un estado de ansiedad es desfavorable al establecimiento de ciertas de nuestras defensas inmunes, agentes ansiolíticos podrían, quizás, tener propiedades benéficas a este respecto. Así es como decidimos, inicialmente, comprobar si ciertas benzodiazepinas ansiolíticas podrían interactuar por medio de su

fijación en uno de los elementos del sistema inmune : el macrófago.

Los primeros resultados obtenidos, en nuestro Instituto por F. ZAVALA y J. HAUMONT en el laboratorio de M. LENFANT han mostrado (24a, 24b), que en efecto, ciertas benzodiazepinas "periféricas" (o moléculas farmacológicamente emparentadas), así como ciertas moléculas "mixtas" (Cuadro III) se fijan, con buena afinidad, en los macrófagos peritoneales de Ratón e incrementan la actividad de estos macrófagos. Al contrario, ninguna molécula de actividad "central" demostró actividad.

Estos resultados son importantes pues si se admite que las moléculas exógenas que se fijan en estos receptores de los macrófagos no hacen sino imitar la actividad de hipotéticos ligandos endógenos, aquí también tenemos sin duda que pensar en péptidos (o otras moléculas ?) que nos quedan por aislar.

Estudios realizados en otro laboratorio, en relación con nosotros, también demostraron (25) que ciertos ligandos de los puntos benzodiazepínicos periféricos también se fijan al nivel del músculo cardíaco. Esta observación puede dar cuenta, por lo menos parcialmente, de la actividad benéfica, conocida desde hace tiempo en medicina clínica, de ciertos productos (benzodiazepinas "mixtas", por ejemplo el Valium [®] 21) sobre las secuelas del infarto de miocardio, además de su efecto "tranquilizante".

Quizás convenga relacionar este tipo de acción con un efecto de estas moléculas en ciertos ionóforos cercanos de sus puntos de fijación ?

El hecho de que las moléculas de tipo benzodiazepínico (o farmacológicamente, si no químicamente, emparentadas) posean puntos de fijación tan diversos como los que hemos descrito, plantea un problema importante que no se puede, evidentemente, discutir aquí de manera detallada : el problema de la naturaleza química exacta de estos receptores o puntos de fijación.

Algunas reflexiones, razonablemente especulativas, pueden servir de conclusión a esta exposición ; tienen por tema ciertas estructuras biológicas de reconocimiento, puntos de fijación o receptores (*vide infra* : conclusiones).

DESCUBRIMIENTO DE UN PRINCIPIO ACTIVO DEL ARNICA :

Para bien demostrar, si fuese necesario, la importancia de la búsqueda de nuevas sustancias naturales de interés terapéutico, citaré los trabajos que hemos realizado muy recientemente sobre el Arnica : Arnica montana L. (Compuestas). El Arnica es una planta de altitud, conocida desde hace muchos siglos ; sus sumidades floridadas se usan por sus propiedades antiequimóticas y antiasmáticas. Las preparaciones tópicas que contienen Arnica son numerosas en todos los países de Europa ;

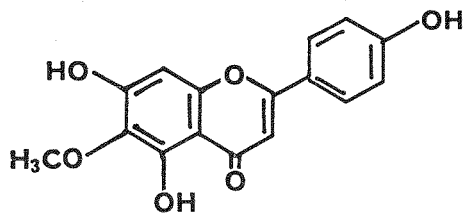
se utilizan en el tratamiento de los golpes y de las equimosis no sangrientas.

La tintura de Arnica, obtenida por lixiviación de las sumidades floridas del Arnica, es utilizada menos frecuentemente por via oral, en el tratamiento de las afecciones asmáticas. Finalmente, el Arnica es una planta comunmente utilizada en homeopatía.

La actividad farmacológica del Arnica es innegable ; así hemos podido, con J. BENVENISTE y B. BOURDILLAT, evidenciarlas usando varios modelos de inflamación. El uso de estas pruebas también nos ha permitido seguir los progresos de la purificación de la (o las) substancia(s) activa(s) a partir de extractos etanólicos de la planta.

Así fue como se aisló una flavona, la hispidulina 30, que reproduce lo esencial de las propiedades farmacológicas conocidas de la tintura de Arnica. Estas propiedades se ejercen esencialmente por medio de la inhibición de ciertas enzimas que participan en la cascada araquidónica : las lipoxigenasas.

Este descubrimiento da lugar, en nuestro laboratorio, al desarrollo de investigaciones originales y prometedoras. Pero no olvidemos que, una vez más, nos ha inspirado ampliamente la Naturaleza. Sepamos de nuevo escucharla para nuevos descubrimientos importantes !



Hispiduline 30

(*Arnica montana* , Composées)

Anti inflammatoire
Antiasthmatique

CONCLUSIONES :

La naturaleza química de las estructuras membranales, intracelulares u otras, que reconocen ligandos, endógenos o exógenos, es a menudo muy compleja (30). Puede tratarse, por ejemplo, de una sola entidad molecular constuida per un péptido (o una proteína) y conteniendo varios subdominios estructurales distintos (asegurando una continuidad entre el medio extracelular y la célula misma y atravesando la membrana ; por ejemplo, el receptor de la insulina). O bien, esta continuidad se realiza por medio de la asociación funcional de un péptido (o proteína) membranal captando las señales moleculares (ligandos) correspondientes desde el exterior de la célula y relevando este primer acontecimiento de reconocimiento molecular por medio de numerosos sistemas ya descritos : proteínas "catalíticas", quinasas, derivados fosforilados del inositol, etc. (28).

Pero, a menudo, las proteínas receptoras, o ligandos, pueden también formarse de varias subunidades distintas que se han agregado : es el caso, entre otros, del receptor colinérgico nicotínico. En este caso, la presencia de dichas subunidades es necesaria para que se manifieste un efecto fisiológico determinado.

Los estudios recientes, que tratan de modificaciones puntuales de aminoácidos de las secuencias protéicas de esos receptores complejos, o incluso de la supresión de una o varias subunidades que las constituyen, permiten darse cuenta de las estructuras mínimas ^{les} compatibles con la conservación, o la modificación, de los efectos fisiológicos observados.

Estas construcciones de tipo "mecano" pueden dar lugar a numerosas posibilidades de receptores (o puntos de fijación). El mismo tipo de situación se encuentra en un campo conceptualmente análogo : el de las enzimas o de sistemas multienzimáticos que realizan varias reacciones sucesivas sobre el mismo sustrato : la ribonucleótido-reductasa, por ejemplo.

Se debe pues considerar la posibilidad de ver, así, constituirse, según los territorios de un mismo órgano (incluso muy complejo, como lo es el cerebro) combinaciones de receptores (o puntos de enlace) confiriendo a dichos territorios características farmacológicas muy diferentes. Una de las subunidades estructurales que falte, y es la respuesta biológica la que falla. La causa de tal ausencia puede hallarse en la no-síntesis del ARN mensajero correspondiente, o en su no operatividad por razones diversas.

En otros casos aún, el receptor estructuralmente único, o las subunidades estructurales que lo componen, se encuentra(n) bloqueando(das), totalmente o en parte, por un ligando particular : un anticuerpo. Las enfermedades "autoinmunes" participan de este mecanismo. El resultado es que todo o parte del receptor se ha vuelto inoperante. Los anticuerpos pueden producirse por numerosas causas, incluidas las enfermedades infecciosas (29) debidas a microorganismos que poseen, ellos mismos, estructuras de enlace (o receptores) para ligandos endógenos del organismo que infestan ("convergencia molecular").

Los recientes estudios sobre el receptor nicotínico de la acetilcolina o el de la insulina permitirán sin duda, progresos

en el tratamiento de la miastenia grave o de la diabetes, respectivamente, para citar sólo estos dos ejemplos.

En el caso del estudio de las interacciones entre sistema nervioso y sistema inmune, hace falta, evidentemente, tener en cuenta estas reflexiones. Cuando las técnicas, cada día más eficaces, del "genio genético" habrán permitido, como ya lo han hecho, "clonar" receptores distintos de los que ya se han logrado, se podrán probablemente racionalizar observaciones farmacológicas que hoy todavía parecen heteróclitas.

"Máximos comunes divisores" estructurales aparecerán sin duda entre varios receptores y eso, de manera inesperada : estas observaciones permitirán una investigación más racional de nuevos medicamentos. También se podrán sin duda explicar algunas interacciones medicinales raras que se observan hoy día, sin poder explicarlas claramente.

En espera de ello, es preciso saber con modestia seguir acogiendo lo que la suerte nos traiga como resultados interesantes.

Los productos de origen natural constituyen, a este respeto, y eso, desde hace mucho tiempo y todavía por mucho tiempo, fuentes inestimables de investigaciones fructuosas.

Espero haberles convencido, así como espero que ustedes lo estarán también, de que la interacción entre la química y la biología, así como entre los químicos y los biólogos compatibles

entre ellos, vale la pena, no solamente de ser proseguida sino también de ser amplificada con tenacidad y determinación.

REFERENCIAS :

- (1) P. POTIER, *Actualités de Chimie Thérapeutique*, 13e série, 155-159 (1985).
- (2) P. VALENZUELA, M. QUIROGA, J. ZALDIVAR, W.J. RUTTER, M.W. KIRCHNER, D.W. CLEVELAND, *Nature*, 289, 650 (1981).
- (3) N. LANGLOIS, F. GUÉRITTE, Y. LANGLOIS and P. POTIER, *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 7017 (1976).
- (4) P. POTIER, *Rev. Latinoamer. Quim.*, 9, 47 (1978).
- (5) P. POTIER, *J. Nat. Prod.*, 43(1), 72 (1980).
- (6)
 - a. P. MANGENEY, R.Z. ANDRIAMIALISOA, N. LANGLOIS, Y. LANGLOIS et P. POTIER, *J. Org. Chem.*, 44, 3765 (1979).
 - b. P. MANGENEY, R.Z. ANDRIAMIALISOA, J.-Y. LALLEMAND, N. LANGLOIS, Y. LANGLOIS et P. POTIER, *Tetrahedron*, 35, 2175 (1979).
 - c. R.Z. ANDRIAMIALISOA, N. LANGLOIS, Y. LANGLOIS et P. POTIER, *Tetrahedron*, 36, 3053 (1980).
 - d. F. GUÉRITTE, A. POUILHÈS, P. MANGENEY, R.Z. ANDRIAMIALISOA, N. LANGLOIS, Y. LANGLOIS et P. POTIER, *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.*, 18, 419 (1983).
- (7) S. CROS et P. POTIER, Colloque de Marrakech, 16-20 Enero 1985, publicacion bajo prensa.

- (8) a. C.J. BARNETT, G.J. CULLINAN, K. GERZON, R.C. HOYING, W.E. JONES, W.M. NEWLON, G.A. POORE, R.L. ROBINSON, M.J. SWEENEY, G.C. TODD, *J. Med. Chem.*, 21(1), 88 (1978).
b. R.J. OWELLEN, D.W. DONIGIAN, C.A. HARTKE et F.O. HAINS, *Biochem. Pharmacol.*, 26, 1213 (1977).
- (9) P. POTIER, *Pure and Applied Chemistry*, 58, 737-744 (1986) y referencias citadas.
- (10) V.K. KANSAL et P. POTIER, *Tetrahedron*, 42, 2389-2408 (1986) y referencias citadas.
- (11) V.K. KANSAL, R. SUNDARAMOORTHY, B.C. DAS et P. POTIER, *Tetrahedron Letters*, 26, 4933 (1985).
- (12) J. HUGHES, T.W. SMITH, H.W. KOSTERLITZ, L.A. FOTHERGILL, B.A. MORGAN, H.R. MORRIS, *Nature*, 258, 577-579 (1975).
- (13) J. ROSSIER, G. CHAPOUTHIER, *La Recherche*, 13, 1296-1306 (1982).
- (14) C. BRAESTRUP, R.F. SQUIRES, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 3805-3809 (1977).
- (15) H. MOHLER, T. OKADA, *Science*, 198, 849-851 (1977).
- (16) W. HAEFELY, E. KYBURZ, M. GERECKE, H. MOHLER, *Adv. Drug Res.*, 14 (Testa B. Ed.) Academic Press, London, 1985, pp. 165-322.

- (17) J.-C. GAIGNAULT, L. NÉDELEC, *L'Actualité Chimique*, pp. 17-23 (Enero 1983).
- (18) H. BIERÄUGEL, R. PLEMP, H.C. HIEMSTRA, PANDIT, U.K., *Heterocycles*, 13, 221-224 (1979).
- (19) R.H. DODD, C. OUANNÈS, L. PRADO DE CARVALHO, A. VALIN, P. VENAULT, G. CHAPOUTHIER, J. ROSSIER, P. POTIER, *J. Med. Chem.*, 28, 824-828 (1985).
- (20) L. PRADO DE CARVALHO, G. GRECKSCH, G. CHAPOUTHIER, J. ROSSIER, *Nature*, 301, 64-66 (1983).
- (21) P. VENAULT, G. CHAPOUTHIER, L. PRADO DE CARVALHO, J. SIMIAND, M. MORRE, R.H. DODD, J. ROSSIER, *Nature*, 321, 864-866 (1986).
- (22) E.M. SMITH, M. PHAR, T.E. KRUGER, D.H. COPPENHAVER, J.E. BLALOCK, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 6010-6013 (1983).
- (23) J.E. BLALOCK, *Lymphokines*, Academic Press Inc., 9, pp. 1-13 (1984).
- (24) a. F. ZAVALA, J. HAUMONT, M. LENFANT, *Europ. J. Pharmacol.*, 106, 561-566 (1985).
b. M. LENFANT, F. ZAVALA, J. HAUMONT et P. POTIER, *Bull. Acad. Natl. Méd.*, 169, 1005-1011 (1985).

- (25) G. LE FUR, M.L. PERRIER, N. VAUCHER, F. IMBAULT, A. FLAMIER, J. BENAVIDES, A. UZAN, C. RENAULT, M.C. DUBROEUCQ, C. GUÉREMY, *Life Sci.*, 32, 1839-1847 (1983).
- (26) I. IZQUIERDO, *Trends in Pharm. Sc.*, 256 (1986) y referencias citadas.
- (27) C. PENA, J.H. MEDINA, M.L. NOVAS, A.C. PALADINI et E. DE ROBERTIS, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 4952 (1986).
- (28) H.R. BOURNE, *Nature*, 321, 814 (1986) y referencias citadas.
- (29) J. ROTH, D. LEROITH, E.S. COLLIER, N.R. WEAVER, A. WATKINSON, C.F. CLELAND et S.M. GLICK, *J. of Immun.*, 135, 8165 (1985) y referencias citadas.
- (30) J. BOCKAERT, *La Recherche*, 17, 892-900 (1986).
- (31) B. BOURDILLAT : "Isolement d'un principe actif de l'Arnica", Thèse de Doctorat ès-Sciences, Université de Paris-Orsay, Décembre 1986.
- (32) P. POTIER et al. : trabajos no publicados.