

SÍNTESI I UTILITZACIÓ DE MOLÈCULES ANÀLOGUES EN ELS ÀCIDS NUCLEICS

ALFRED GINER-SOROLLA

Programa d'Immunofarmacologia, Departament de Farmacologia i Terapèutica, Facultat de Medicina, Universitat de Florida del Sud, Tampa, Florida, EUA.

I. Introducció

Les bases heterocícliques, purines i pirimidines, constitueixen l'estructura dels àcids nucleics i formen part de molècules biològiques fonamentals. Entre elles figuren el trifosfat d'adenosina (ATP), el factor essencial de l'energia dels sers vius; els monofosfats cíclics d'adenosina i guanosina, cAMP i cGMP, missatgers interns cel·lulars; l'adenosina com a «hormona local», reguladora cardíoc-vascular. Aquestes bases formen part de diversos coenzims involucrats en el cicle de Krebs, en fitohormones de creixement, d'antibiòtics i factor de transferència. Són, a més, constituents en certs organismes inferiors, espongiaris i fongs, amb funció per ara desconeguda. L'interès que hom vol destacar sobre aquest tipus de substàncies en aquest article és el fet que a mesura que s'anava elucidant la funció dels àcids nucleics en la divisió cel·lular, la transmissió de les característiques genètiques i la biosíntesi de proteïnes, s'iniciaren investigacions en el sentit d'utilitzar manipulacions de canvis estructurals en les molècules dels components bàsics. Amb la finalitat d'esbrinar si aquests canvis estructurals podrien furnir molècules amb acció antimetabòlica que poguessin interferir en forma selectiva en la divisió de la cèl·lula cancerosa i en la replicació de certs virus, hom va mamprendre en nombrosos centres l'exploració de les modificacions moleculars i llurs efectes en el creixement neoplàstic i víric.

II. Anàlegs de components d'àcids nucleics

1. *Activitat inhibidora del creixement neoplàstic*

La quimioteràpia experimental i clínica contra el càncer fou iniciada per Rhoads després de la Segona Guerra Mundial basant-se en uns composts sintètics, les mostasses nitrogenades, que actuaven com a agents alcoilants, i fou seguit pel descobriment de Bendich i Brown (1948) que tant components dels àcids nucleics, bases puríniques i pirimidíniques, així com derivats anàlegs, eren incorporats com a precursors de les bases de DNA quan

eren administrats a animals d'experimentació. Aquest descobriment, que fou possible per la disponibilitat de síntesis radioactives, va constituir el fonament racional per a l'ús d'anti-metabòlits en el tractament del càncer. En efecte, Burchenal comprovà que un dels primers anàlegs de purines, la 2,6-diaminopurina (2,6-DAP), emprats per Bendich i Brown en els estudis d'incorporació a àcids nucleics, exercia una acció inhibidora del creixement de leucèmies experimentals de ratolins.

Els efectes biològics d'aquest anàleg de guanina i la seva inversió per l'adenina indiquen que la 2,6-diaminopurina actuava interferint amb el metabolisme de purines en el DNA. Després d'aquestes investigacions pioneres, hom va trobar que un altre anàleg de la guanina, la 8-azaguanina, posseïa també activitat inhibidora del creixement neoplàstic en animals. Tots dos composts, la 8-azaguanina i la 2,6-DAP, eren així mateix inhibidors en un bon nombre de virus (Figura 1).

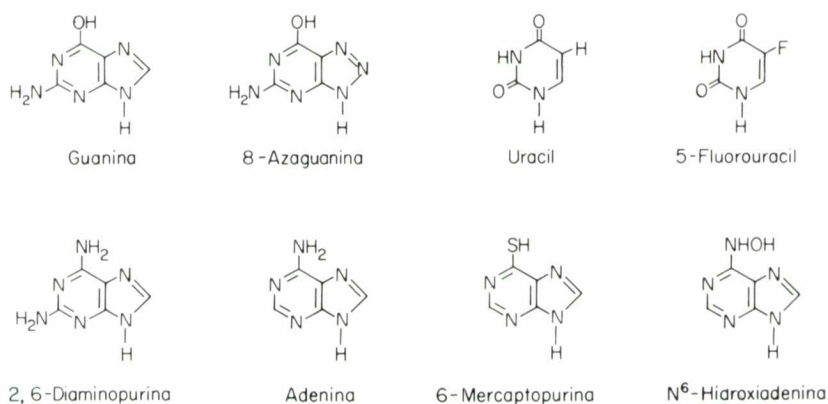


Figura 1. Alguns antimetabòlics de purines

Aquests estudis foren l'inici d'un esforç que continua avui dia en la síntesi i experimentació de quimioteràpics contra càncer, que del camp dels components d'àcids nucleics es va estendre a altres àrees de la química sintètica i de productes naturals. La primera utilització clínica d'un derivat anàleg de components dels àcids nucleics fou la 6-mercaptopurina, en la qual el grup amino o hidroxil, respectivament de l'adenina i hipoxantina, era substituït per un àtom de sofre. Aquest agent, sintetitzat per Hitchings i Elion (1952), ha estat objecte no tan sols d'estudis clínics iniciats per Burchenal, sinó que ha servit com a eina per determinar el metabolisme i biosíntesi dels àcids nucleics. Se'n varen derivar composts com ara la 2-tioguanina, també un potent fàrmac antileucèmic emprat clínicament. Poc després d'aquestes descobertes, Bendich, Russell i Fox (1954) i col·legues van sintetitzar un altre anàleg purínic, la 6-cloropurina, que si bé donava resultats experimentals i clínics semblants als de la 6-mercaptopurina, resultava tòxica.

A partir de la 6-cloropurina vàrem mamprendre per diverses manipulacions la síntesi d'una varietat de derivats purínics amb la finalitat de trobar nous agents que no tan sols actuessin contra el creixement neoplàstic, sinó que posseïssin un mecanisme d'acció diferent i així vam descobrir l'aparició del fenomen de resistència (Giner-Sorolla, Bemdich i Burchenal. 1972). Així obtinguérem, entre altres, un bon nombre d'anàlegs de l'adenina en

què el grup amino (NH_2), era substituït per l'hidroxiamino (NHOH), amb la qual s'esperava, per acció antimetabòlita i per la reactivitat d'aquest grup funcional, una activitat biològica.

El primer membre d'aquesta sèrie, la N_6 -hidroxiazenina, o 6-hidroxiaminopurina (6-HAP), inhibia el creixement de diversos tumors trasplantats en rosegadors. Hom trobà, però, una toxicitat deguda a la transformació enzimàtica d'aquest compost per la xantinaoxidasa, en la 2,8-dihidroxiazenina (2,8-DHA), per un procés de reducció inicial seguit d'oxidació de l'adenina resultant. Amb la finalitat d'evitar aquesta toxicitat que atribuïrem a la formació del metabòlit 2,6-DHA, summament insoluble i que es dipositava en els túbuls renals i els obstruïen, vàrem mamprendre l'obtenció d'un derivat ribòsid, N_6 -hidroxiazenosina, o 6-hidroxilaminopurina ribòsid (6-HAPR) amb la finalitat d'investigar l'efecte de la introducció del grup ribòsid en l'índex quimioteràpic de la 6-HAP. La major solubilitat dels metabòlits que podrien resultar del nuceòsid disminuiria la toxicitat que trobàvem amb la 6-HAP. L'agent 6-HAPR mostrava una ben marcada activitat antileucèmica en animals d'experimentació sense la toxicitat que es manifestava en la base original, i un mecanisme d'acció diferent del que mostraven els agents emprats en clínica, com ara la 6-mercaptapurina i la 2-tioguanina. En assaigs clínics, la 6-HAPR causava una hemòlisi, efecte tòxic que atribuïem a l'acció de l'adeninadesaminasa, i produïa hidroxilamina, que és tòxica, al mateix temps que posseeix activitat antitumoral i antivírica. Continuant la nostra recerca malgrat aquests resultats negatius, vàrem assajar entre altres un derivat doble oxidat de la 2,6-diaminopurina, el primer antimetabòlit emprat, com ha estat descrit. La 2,6-dihidroxiazenina resultant fou el compost antileucèmic de major activitat d'aquesta sèrie, encara que malhauradament també resultava hematotòxica.

En vista dels precedents assaigs vàrem dissenyar la síntesi de derivats arabinòsids en lloc de ribòsids i que es diferenciessin per la posició OH en C'2 a dalt («up») en lloc d'abaix (ribosa); la 6-arabinosil-adenina desenvolupada per la causa Upjohn era un agent dèbilment antineoplàstic, però posseïa activitat antivírica, en especial contra herpesvirus. La síntesi de la 9-arabinosil- N_6 -hidroxiazenina fou duta a terme en el nostre Laboratori; aquest era un potent agent antivíric, exclusivament, sense acció antineoplàstica, si bé posseïa toxicitat deguda a la hidròlisi per l'adenosinadesaminasa (Figura 2).

Vàrem intentar de vèncer aquest inconvenient amb la síntesi de derivats fluorats en la posició C-2, que teòricament haurien d'ésser resistents a la desaminació, sense èxit.

2. Propietats carcinògenes i mutàgenes

A més de les propietats tòxiques dels derivats d'adenina, també s'hi varen trobar efectes carcinògens i teratògens. Fou el 1973, en el Simposi Duran-Reynals sobre Virus i Càncer a Barcelona quan vàrem presentar aquest fenomen de la dualitat d'acció anticàncerosa i carcinògena dels antimetabòlits purínics (Giner-Sorolla, Burchenal, Teller, 1973). Aquesta dualitat d'acció s'ha trobat en la majoria dels agents quimioteràpics i antibiòtics, molts dels quals són potents carcinògens en animals d'experimentació. Aquest fenomen entra dins de la propietat d'inhibició de la síntesi de proteïnes per l'efecte antimetabòlit que bloca la síntesi dels àcids nucleics; així les proteïnes que constitueixen els anticossos són bloquejades en la seva producció per aquest efecte amb el resultat d'una immunodeficiència profunda que afavoreix el creixement neoplàstic, el qual, per altra banda, sol ser provocat per la natura summament reactiva dels agents anticancerosos. Com a exemple destacat cal citar els agents alquilants del tipus de la ciclofosfamida (Citoxan); s'ha determinat que

en supervivents al seu tractament de limfomes es troba al cap d'un cert temps l'aparició de carcinomes de la bufeta de l'orina en incidència superior a la de la població normal, cosa que indica l'efecte carcinogen de la ciclofosfamida. En efecte, aquest agent indueix específicament tumors malignes en la bufeta de l'orina d'animals d'experimentació.

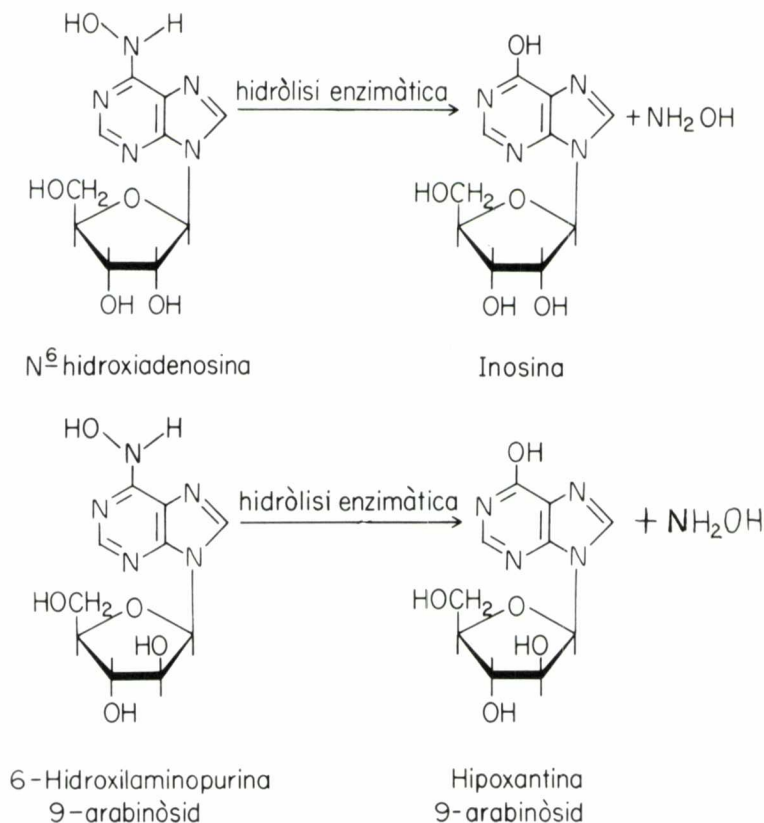


Figura 2. Inactivació de enzimàtica de nucleòsids

Aquesta dualitat d'acció és semblant a la que es coneix amb la radiació ionitzant, tant per tractament amb raigs X, com la provinent de radioisòtops i que es manifesta principalment en els agents alquilants; se l'anomena acció radiomimètica; és ben paradoxal aquest fenomen, que no crec que es trobi en cap altre sector de la terapèutica. Les esmentades recerques foren paral·leles a les que s'efectuaven a l'Sloan-Kettering, al laboratori de G. B. Brown, que cercava de trobar antimetabòlits similars als descrits per nosaltres, per oxidació de l'adenina; si bé aquests derivats, com ara el N1-òxid d'adenina posseïen una certa activitat inhibidora de neoplàsies experimentals, es trobà que diversos altres derivats eren carcinògens, com ara el N3-òxid d'adenina, que era un potent carcinogen, i el mateix succeïa amb el N3-hidroxixantina, amb una potència carcinògena similar a la que mostren els hidrocarburs policíclics aromàtics. (Sugiura, Teller, Parham, Brown, 1970).

Com a comprovació dels treballs de Brown vàrem sintetitzar diversos N-òxids per a estudiar aquesta dualitat d'acció: de tots els derivats, la doble oxidació de l'adenina, resultant en el 3-òxid N6-hidroxiadenina que tot posseint una acció antileucèmica en rosegadors superior a la 6-mercaptapurina, mostrava al mateix temps una intensa carcinogenitat (Giner-Sorolla, 1969) (Figura 3). Vàrem estendre l'oxidació a la purina base, cosa que donà com a resultat el 3-òxid de purina que es mostrà carcinogen en rates i donà com a majors llocs d'inducció de tumors, el fetge i pell. (Teller, Giner-Sorolla, Stöhrer et. al, 1978). Es demostrà així que amb una petita alteració per oxidació de la molècula de components d'àcids nucleics, al mateix temps que s'obtenen composts amb activitat inhibidora del creixement cancerós en animals, converteix aquests àcids en potents cancerigens. Donat aquest fenomen, Brown postulà la possibilitat que la formació d'òxids en les purines dels àcids nucleics els podrien fer actuar per deslligament metabòlic com a carcinògens d'origen endogen. Experiments emprant radiació gamma, sobre DNA i també sobre cèl·lules *in vitro*, per a determinar si es formaven aquests N-òxids, donaren resultat negatiu. Per altra banda, es troben diversos N-òxids en productes naturals com ara l'estreptozotocina, un antibiòtic emprat en diversos tipus de càncer i que és al mateix temps un carcinogen en animals de laboratori.

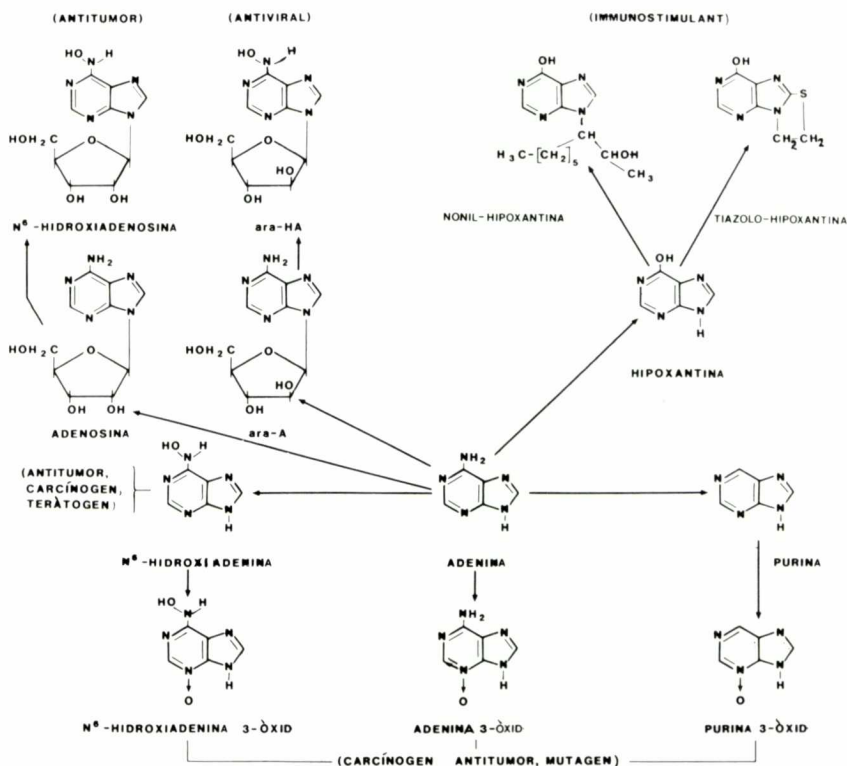


Figura 3. Propietats polivalents dels antimetabòlics purínics

Una descoberta fonamental en el que respecte a l'origen de la vida fou realitzada pel Dr. Joan Oró (1962), sobre la síntesi abiòtica de l'adenina, en què l'àcid cianhídric, reaccionant amb una solució d'hidròxid amònic a 80°, produeix una sèrie de productes intermediaris i una varietat de purines entre les quals figura l'adenina. Nosaltres vàrem repetir aquest experiment amb la finalitat d'investigar la mutagenicitat dels productes intermediaris. De les distintes fases en què es desenvolupà la reacció, vàrem aïllar d'una fracció una barreja complexa que vàrem sotmetre, amb la col·laboració del Dr. Rosenkraz, a l'anàlisi de mutagènesi utilitzant el mètode modificat d'Ames. Hom trobà una activitat mutàgena intensa, comparable als de major potència obtinguts per síntesi. Donat que la majoria dels mutàgens són carcinògens, vàrem inferir la possibilitat que fins i tot abans de la formació prebiològica de components d'àcids nucleics, es formarien productes carcinògens, anticipant per tant i lligat amb ella, l'origen del càncer i de la vida, en forma dels agents biogènics corresponents. D'aquí l'asserció de Dawe i altres que la cèl·lula cancerosa podria ésser originada abans de la normal i que el càncer seria com una reversió a l'estat original. Sabem avui dia que el càncer en vertebrats s'originà a partir de cèl·lules normals; ara bé, es troba també el fenomen invers de diferenciació de cèl·lules neoplàstiques en normals.

La mutagenicitat d'anàlegs d'adenina fou comprovada per diversos autors; essent com és coneguda l'estreta relació entre mutagenicitat i carcinogenicitat, no és d'estranyar que entre els composts que vàrem sintetitzar es trobés aquesta propietat. D'interès especial foren diversos derivats de la N-hidroxiadenina, en especial el 6-HAP i la N₂-hidroxiaminopurina, així com la 2-aminopurina. Cal detallar els efectes de la N₆-hidroxiadenina (6-HAP), sobre la qual s'ha investigat intensament el seu mecanisme d'acció com a agent mutagen. Així, J. Carl Barrett va determinar que la 6-HAP indueix canvis en les parelles de bases en cèl·lules procariotes i eucariotes. *In vitro* (cèl·lules d'embrió d'hamster), 6-HAP mostra una mutagenicitat i carcinogenicitat superior a 2-aminopurina, un agent mutagen clàssic. En comparació al benzopirè —un potent carcinogen i mutagen— és menys potent a induir transformació neoplàstica quan es compara amb igual potència mutàgena. D'aquí es desprèn, segons l'autor, que la transformació cel·lular i possiblement càncer ocorre predominantment com a resultat d'una mutació al nivell del cromosoma en lloc d'una mutació del gen. Per altra banda, McCartney, Rosenkrantz i col·legues (1985), investigant els efectes mutàgens de la 6-HAP en *Salmonella typhimurium* soca TA98, varen determinar que actuava no com a base anàloga que s'incorpora al DNA i causa així una mutació, sinó que ho fa per la capacitat de reaccionar directament amb el DNA cel·lular d'una forma similar a la que ocorre amb N-arilhidroxilamines, que són mutàgenes per reacció covalent amb el C-8 de la guanina del DNA.

Una alteració mínima mitjançant la intercalació d'un oxigen en l'amina de la posició C-6, l'amina substituent de la base principal dels àcids nucleics, l'adenina o la seva oxidació en els nitrògens nuclears, com s'ha indicat, originen carcinògens potents; el mateix succeeix amb un altre dels principals components, la guanina i el producte del metabolisme de les purines com és la xantina. Com que aquests N-òxids no es produeixen ni en condicions biològiques ni per intensa radiació ionitzant de components d'àcids nucleics, principalment purines, vàrem investigar altres possibles fonts de carcinògens d'origen endogen que podrien ésser formats per modificacions o bé ambientals o bé endògenes en condicions fisiològiques. Vàrem considerar a tal respecte com a possible alternativa les anomenades bases menors o hipermodificades que es troben tant en el RNA, especialment com a RNA de transferència, i en menor proporció en el DNA. Les més abundants són amines secundàries en forma de nucleòsids o bases, la 6-(metilamino)purina, o sia l'adenina metilada i la 2-(metilamino)hipoxantina, que és la guanina metilada en la posició C-2. Aquestes bases podrien ésser oxidades *in vivo*, com succeeix amb les amines aromàtiques substituïdes,

que són carcinògens potents per la seva conversió metabòlica en derivats N-hidroxi. Així vàrem sintetitzar la 6-(metilhidroxiamino)purina i el nucleòsid corresponent; els productes resultants posseïen activitat inhibidora en leucèmies experimentals igual que la N⁶-hidroxiadenosina, però al mateix temps induïen tumors malignes en rosegadors.

No vàrem investigar la possibilitat d'oxidació biològica, ja que vàrem considerar més plausible un altre tipus de modificació de les bases hipermodificades, com és la nitrosació que dona lloc a nitrosamines. Aquests composts són uns carcinògens summament potents que es troben en el fum del tabac, en aliments tractats amb nitrits, en diversos productes industrials i que es poden formar fàcilment en l'estómac per la interacció de nitrits presents en la saliva o en l'aigua contaminada, amb amines secundàries. A partir de la base hipermodificada ribòsid de 6-(metilamino)purina vàrem obtenir el corresponent ribòsid de 6-(metilnitrosamino)purina (MNAR), que fou així mateix inhibidor *in vitro* i *in vivo* del creixement de leucèmies experimentals i a més posseïa una intensa acció carcinògena en ratolins. De fet, la MNAR ha estat la primera nitrosamina descrita com a inductora de tumors malignes en l'aparell reproductor i càncer mamari en animals d'experimentació. (Anderson, Giner-Sorolla, Greenbaum et. al. 1979). Si aquesta troballa posseeix alguna rellevància pel que fa a la possible inducció o factor contribuent al carcinoma mamari humà, és una qüestió que roman per resoldre. Ja que les nitrosamines són no tan sols un dels principals components, com s'ha indicat, del fum del tabac, a part d'altres fonts, és una consideració que cal tenir en compte.

A part de la presència de les amines secundàries en els components menors dels àcids nucleics, existeixen en el regne vegetal com a factor de creixement adenines substituïdes; si bé la proporció de tant unes com altres amines secundàries és molt petita, la contínua ingestió d'aliments que les contenen, al costat de l'existència de nitrits en la saliva, tracte intestinal, altres aliments amb additius i en l'aigua, és plausible la formació de nitrosamines d'origen endogen. En aquest respecte cal assenyalar que la major incidència de càncer gàstric en pacients amb gastritis crònica per hipoclorhídria seria atribuïble a la formació de nitrosamines, ja que la baixa aciditat catalitza la reacció nitrosant.

3. Agents antivírics a partir de nucleòsids de purines i pirimidines

La similitud i connexió entre el metabolisme del cicle replicatiu dels virus i les cèl·lules normals van fer considerar que el tractament d'aquest tipus d'infeccions seria pràcticament impossible. Una concepció similar es formulà amb la terapèutica anticancerosa, que malgrat aquest obstacle ha anat desenvolupant un bon nombre de fàrmacs eficaços en certs tipus de neoplàsies. Semblava fins fa relativament poc que la barrera que s'oposava a l'atac per agents quimioteràpics de la infecció vírica era totalment infranquejable. Així, mentre sorgien potents antibiòtics per al tractament d'infeccions bacterianes i també fàrmacs antineoplàstics, fins als anys 70 no existien més que uns pocs agents antivírics, d'escassa eficàcia i ús limitat. Igual com va succeir amb la terapèutica antineoplàstica, els primers agents antivírics, i més encara, la majoria dels que són en ús corrent, són derivats de components d'àcids nucleics, principalment nucleòsids. L'interès que s'ha mostrat en anys recents en la investigació d'agents antivírics ha estat estimulat per l'aparició de l'epidèmia de la síndrome de la immunodeficiència adquirida. A part d'aquesta infecció, avui dia, més de la meitat de les malalties que afecten la població dels països industrialitzats són atribuïbles a infeccions víriques, mentre que les malalties d'etiologia bacteriana no passen el 15%. Fins ara, el tractament d'aquestes infeccions víriques es limitava a pal·liar els símptomes en lloc d'atacar el virus directament o indirecta.

Una estratègia racional per al tractament de les infeccions víriques consistiria en el desenvolupament d'agents que interactuïn específicament amb els processos de creixement víric i la seva proliferació, sense afectar els processos cel·lulars. Els virus constitueixen els agents patògens més refinats i desenvolupats dels mamífers; la majoria d'ells posseeixen una exquisida especificitat d'infectar determinades cèl·lules, com s'ha vist en el cas de la SIDA, i així mateix només n'ataquen un nombre molt limitat, sovint tan sols un d'hostes. Un agent antivíric ideal hauria de posseir en primer lloc prou potència per inhibir per complet la replicació del patògen; en cas contrari, hi ha la possibilitat de no tan sols prolongar la infecció, sinó donar ocasió a la formació de soques del virus resistents al tractament. Una altra condició consisteix a tenir propietats de difusió per a tots els òrgans afectats pel virus. Especialment per al cas de la infecció pel virus de la immunodeficiència adquirida (HIV) és la condició que l'agent no ha de suprimir la immunitat tant humoral com cel·lular del pacient, ja que s'espera que l'acció directa del fàrmac ha d'ésser ajudada per la capacitat de la resposta immunitària d'eliminar el virus. Finalment, l'agent antivíric hauria de posseir un mínim de toxicitat, fins i tot en tractament prolongat. Molts dels composts assajats com a antivírics han derivat de programes que eren orientats a obtenir agents antineoplàstics; el cas més recent ha estat l'ATZ (3-azidotimidina), i no tots ells compleixen els requisits indicats. El descobriment empíric per simple cribratge, a l'atzar, d'agents antivírics és poc probable que doni resultats; tanmateix hi ha excepcions. Més raonable és el disseny de fàrmacs amb capacitat d'inhibir específicament enzims vírics.

Existien abans dels anys 70 alguns composts amb activitat antivírica, per exemple tiosemicarbazones com les emprades contra la verola. En diversos laboratoris, inclòs el nostre a l'Sloan-Kettering, vàrem obtenir diverses tiosemicarbazones derivades de purines que posseïen intensa activitat inhibidora del creixement de leucèmia L1210, si bé resultaven tòxiques. (Giner-Sorolla, McCravey, J.L.Cook i Burchenal, 1973). Es curiós que les tiosemicarbazones posseeixen acció antituberculosa, i actuen o bé per interferència amb enzims (reductasa de ribonucleòtids), o per acció quelant, desproveint el microbi de metalls essencials per al seu desenvolupament. El primer agent antivíric que entrà en ús clínic, un derivat de components d'àcids nucleics, fou la 5-iodo-2'-desoxiuridina (idoxuridina), utilitzat per al tractament de la queratitis-herpes, i que fou el prototipus d'una sèrie de nucleòsids halogenats. Tot seguit es va trobar que d'una senzilla modificació de la molècula de l'adenosina que consistia en el canvi de la posició C'-2 de l'hidroxi, configuració «a dalt» en lloc «de baix», com es presenta naturalment i com s'ha mencionat, en resultava l'arabinosiladenina, que posseeix activitat contra el virus herpes.

Aquests composts, així com els derivats que s'han desenvolupat posteriorment a aquesta sèrie, actuen per fosforilació enzimàtica i són d'aquesta forma com nucleòsids trifosfats, incorporats a l'àcid nucleic (DNA) del virus o inhibint directament la DNA-polimerasa del virus de l'herpes simple. Altres derivats de components d'àcids nucleics han estat desenvolupats per Fox i col·legues (Watanabe, Reichmann, Hirota, Lopez i Fox, 1979) a l'Sloan-Kettering; entre ells figuren el FIAC (2'-fluoro-5-iodo-1-β-D-arabinosil-citosina), que inhibeix a molt baixa concentració el creixement de diversos virus DNA. També sintetitzaren anàlegs similars, com el FMAU (2'-fluoro-5-metil-arabinosiluracil), de més potència que el FIAC. Es tenien grans esperances que aquest nou tipus de composts fossin d'utilitat; assaigs clínics han mostrat, però, una toxicitat elevada. De més interès, i el primer agent antivíric que hom pot qualificar de vàlua en el tractament del virus herpes, ha estat el desenvolupat per Schaeffer a Burroughs Wellcome Laboratories, l'aciclovir, que és un derivat de guanosina (9-(2-hidroxi-etoximetil)-guanina). (Schaeffer, Beauchamp, Elion et. al. 1978).

Aquest agent és convertit en el monofosfat predominantment en les cèl·lules infectades pel virus i molt limitadament en les normals; successivament es fosforilitza fins al trifosfat que així inhibeix la polimerasa-DNA del virus herpes (HSV-1), sense afectar la polimerasa-DNA cel·lular; com a resultat, l'aciclovir és molt més tòxic (fins a 300 vegades) que el virus herpes en una cèl·lula infectada que a la cèl·lula mateix.

Fins ara l'única droga aprovada per la Food and Drug Administration (FDA) dels Estats Units per al tractament de la SIDA és el derivat pirimidínic, AZT (azidotimidina o zivudin) que fou sintetitzada el 1964 per Horwitz com a agent potencialment antineoplàstic sense resultat, i fou oblidada fins que es trobà en el cribratge que era activa contra el virus HIV. Si bé l'AZT pot retardar la infecció de la SIDA i millorar l'estat general del pacient, no posseeix suficient potència per a eradicar el virus; la seva toxicitat, que resulta intolerable en molts casos, i el seu cost elevat són inconvenients que fan que aquest únic remei pal·liatiu sigui fora de l'abast de la majoria dels afectats. En un estadi experimental es troba el derivat similar a l'AZT, la 2'3'-didesoxicitidina (DDC), desenvolupat per la Hofmann-LaRoche que sembla menys tòxic. Hi ha un nombre de derivats de components de DNA que no posseeixen grans avantatges sobre l'AZT, com la ribovirina, agent molt debatut i que sembla actuar en estats d'infeccions pre-SIDA. En l'actualitat, pel que fa al tractament de la SIDA (i hom pot dir el mateix d'altres infeccions víriques, inclosos l'herpes i el citomegalovirus), no ens trobem més que amb pal·liatius. Les perspectives per al tractament quimioteràpic de les infeccions víriques són prou tènues; pel present no hi ha cap agent prometedor per a ús clínic sols en estadi experimental tant com a inhibidors de virus com immunoestimulants. Més esperançador resulta el camp dels modificadors de la resposta biològica, com es discutirà en la comunicació corresponent a les conferències d'immunodeficiències.

4. Conjugats i derivats d'hipoxantina com a agents immunomoduladors

Un tipus de modificació que vàrem investigar per a la seva possible aplicació terapèutica fou la de conjugats de seroalbúmines amb purines. Els àcids nucleics i els seus components no són en general immunògens; no gensmenys es comporten com a haptens quan són absorbits sobre proteïnes carregades, tal com la seroalbúmina bovina metilada. Un altre mètode per a originar conjugats immunògens que donin lloc a anticossos antiàcids nucleics implica l'acoblament de constituents d'àcids nucleics a proteïnes o a polipèptids. Així, Butler i col·legues varen obtenir conjugats per la unió covalent de la 6-triclorometilpurina amb seroalbúmina bovina (BSA), que injectats a animals d'experimentació, induïren anticossos amb especificitat antipurina. En altres estudis fets per Lachman i Cohen, el conjugat purina-seroalbúmina humana (HSA) induïa la regressió del tumor ascític d'Ehrlich en ratolins. Vàrem estimar d'interès la determinació de les propietats terapèutiques que podrien resultar de la conjugació per unió covalent entre agents quimioteràpics i seroalbúmines. A tal efecte consideràvem que podria existir una acció sinèrgica que podria millorar la capacitat antineoplàstica de l'agent terapèutic o de la immunoglobulina, administrats separatament; i, a més, tractàvem de superar els greus inconvenients de la terapèutica citostàtica: la toxicitat, la carcinogenitat i l'aparició del fenomen de resistència. Aquesta millora es produiria, no tan sols pel fet de presentar-se l'agent quimioteràpic en una forma «amagada», unit com va a una proteïna, sinó també a causa de la menor dosi amb què seria incorporat al conjugat.

La síntesi de conjugats purina-albúmines es va aconseguir mitjançant aminoàcids o halogeno-àcids orgànics. Vàrem determinar que si bé s'obtenien conjugats de compostos antineoplàstics com ara la 6-mercaptapurina i la N₆-hidroxiadenina, i fins i tot N-òxids de

purines, l'eficiència d'acoblament, que arribava fins a 13 residus de purina per mol de proteïna, fou considerada massa reduïda per produir un efecte terapèutic. Aquests estudis, però, serviren com a estímul per a mamprendre el canvi d'orientació i de programació de la recerca en el sentit d'evitar la toxicitat, carcinogenitat i efectes teratògens que implica la terapèutica citostàtica i que són intrínsecs a la seva acció de blocament en la síntesi dels àcids nucleics i per tant, com s'ha indicat, en la producció d'anticossos conduents a una profunda immunosupressió. Es per aquesta raó que iniciarem amb la cooperació del Departament d'Immunofarmacologia amb el Dr. J.W. Hadden l'experimentació de l'estratègia «pro-hoste» tal com es detallarà en el capítol corresponent sobre immunodeficiències. Cal aquí, no gensmenys, assenyalar breument les manipulacions que varem realitzar de components d'àcids nucleics anàlegs per obtenir composts amb potencial immunostimulant.

Les propietats immunostimulants descrites per Renoux de derivats sofrats com ara el tiobenzimidazole, ens induïren a considerar la síntesi de derivats anàlegs en components d'àcids nucleics; així, prepararem una sèrie de derivats purina-tiazòlics; si bé posseïen, com en el cas de la 8-(4'-tiazolil)-6-mercaptapurina, una activitat immunostimulant, a causa de la reduïdíssima solubilitat d'aquest compost no s'aconseguien millors resultats. (Giner-Sorolla, Segarra i Brooks, 1978). La nostra atenció es dirigí envers la possibilitat de sintetitzar molècules amb major solubilitat, i resultaren una sèrie d'elles, que eren anàlegs d'un altre compost immunopotenciador, el levamisol, resultant en les dihidrotiazolo-purines, entre les quals es destaca per la seva activitat immunostimulant el derivat dihidrotiazolo-hipoxantina.

Si bé la hipoxantina és un producte del metabolisme dels àcids nucleics, no un constituent, tot i així la seva presència en molècules immunomoduladores com ara el factor de transferència, el pranobex i, com es veurà seguidament, en altres derivats obtinguts al nostre Laboratori, no posseeixen contrast amb l'adenina, les propietats tòxiques, ni forma per oxidació productes carcinògens, però en canvi els seus derivats exerceixen activitat immunomoduladora.

Una altra sèrie de derivats de la hipoxantina foren obtinguts per alquilació en la posició N-9 de la molècula (Giner-Sorolla i Hadden 1987), i en resultaren composts dels quals els més actius com a immunomoduladors eren els derivats 2-hidroxinonil i 2-hidroxidecil, així com els seus composts acilats. Sembla que la desaminació de l'adenina i l'adenosina per l'enzim adenosinadesaminasa que degrada les propietats terapèutiques de certs agents quimioteràpics (arabinosiladenina, arabinosilcitosina, N₆-hidroxiadenosina), constitueix una funció destoxificant; els productes resultants són innocus. Ara bé, en el cas que ens ocupa de la 9-(2-hidroxi-3-nonil)hipoxantina, considerat com el producte de desaminació de la corresponent adenina (EHNA), que és un inhibidor de l'adenosina desaminasa, aquest producte de desaminació també presenta propietats inhibidores de l'enzim, si bé aproximadament un 40% d'inferior potència. En aquesta molècula, però, Hadden i col·legues varen trobar una potent activitat immunostimulant que ha donat lloc a una sèrie de treballs encaminats a la possible aplicació clínica com a immunorestaurador tant en càncer com en infeccions víriques.

Punts conclusius

S'han exposat en forma resumida aspectes sobresortints del desenvolupament de composts quimioteràpics contra el càncer i virus derivats de components dels àcids nucleics. Als EUA, com és natural, hom troba les opinions contraposades sobre els resultats obtinguts en més de quatre decennis d'investigació intensiva. Per una banda els optimis-

tes, generalment provinents dels centres oficials (National Cancer Institute o American Cancer Society), canten amb to panegíric les excel·lències del meravellós progrés obtingut. Així pretenen, per exemple, que hem entrat en l'«era dels agents antivírics», com els anys 40 i 50 ho foren dels antibiòtics. En contra d'aquest parer s'aixequen les veus dels escèptics tot al·legant que malgrat la gran disbauxa de la tan trompetejada « guerra contra el càncer », en què des del seu començament fa més de 15 anys s'han anat invertint milers de milions, no s'han notat en forma apreciable avenços en la terapèutica, ja que en la incidència de mortalitat per càncer no hi ha major alteració global que fa un decenni i mig, segons manifesten diversos crítics del programa.

Es cert que s'ha procedit amb una manca de racionalitat pel que fa a la metodologia i atac al problema, tant de la terapèutica anticancerosa com antivírica. Hem d'afirmar, però, que si bé la recerca d'aquest tipus és molt costosa i àdhuc frustrant, ja que s'han sintetitzat milers i milers de noves substàncies, moltes d'elles derivades de components d'àcids nucleics, i se n'ha assajat mig milió d'origen natural o sintètic arreu del món, i la «droga meravellosa» o la «bala màgica», ha eludit aquests esforços, tot i així, doncs, cal reconèixer que s'han produït una quarantena d'agents d'utilització clínica, que, si bé només són eficaços en un reduït nombre de neoplàsies, sense ells la mortalitat per càncer seria més alta. Manquen naturalment agents que puguin actuar sobre els tipus de càncer de major incidència que no poden ésser subjectes al tractament quirúrgic o radioteràpic. Si el futur rau en el desenvolupament de fàrmacs quimioteràpics sobre bases més racionals o si hi ha una major esperança en el camp de la immunoteràpia o de l'enginyeria genètica, és qüestió que tan sols es respondrà amb el temps. Mentrestant, per un camí o per un altre, cal marxar endavant i no tan sols confiar, com es recomana sovint, en la passivitat de la prevenció, incerta i desagraïda com és, sinó en la recerca incessant de nous mètodes terapèutics.

Tampa, Florida

Març, 1988

V. Agraïment

L'autor desitja expressar sinceres gràcies al Professor Ricard Guerrero pel seu encoratjament i suggeriments en la preparació d'aquest manuscrit. Així mateix a la Dra. Anne Galy del nostre Laboratori d'Immunofarmacologia, per les seves crítiques i discussions.

IV. Bibliografia

1. ANDERSON LM, GINER-SOROLLA, A GREENBAUM JH, LAST K, BUDINGER JH. (1979). Induction of reproductive system tumors in mice by N_6 -(methylnitroso)-adenosine and a tumorigenic effect of its combined precursors. *Int. J. Cancer*. 24: 319-322.
2. BENDICH A, BROWN GB. (1948). 2, 6-Diaminopurine, a precursor of nucleic acid guanine. *J. Biol.Chem.* 176: 1471-2.
3. BENDICH A, RUSSELL JR, PJ, FOX JJ. (1954). The synthesis and properties of 6-chloropurine and purine. *J. Amer. Chem. Soc.* 76:
4. GINER-SOROLLA A, BURCHENAL JH, BENDICH A. (1972). Hydroxylaminopurines and related compounds: Synthesis, physicochemical properties and biological activity. En. *The Purines, Theory and Experiment*, Bergman ED i Pullman, B (eds) The Jerusalem Academy of Sciences, 478-503.

5. GINER-SOROLLA A, ZIMMERMAN I, BENDICH A. (1958). Synthesis of purine-6-carboxaldehyde and related derivatives. *J Amer Chem Soc.* 81: 2515-2521.
6. GINER-SOROLLA A, BURCHENAL JH, TELLER MN. (1973). The ambivalence of carcinostatic and carcinogenic activity in purine antimetabolites. *Proc. 2nd Duran-Reynalds Intl. Symposium on Viral Replication and Cancer, Abstract 27, Barcelona.*
7. GINER-SOROLLA A, LONGLEY-COOK J, MCCRAVEY M, BURCHENAL JH. (1973). Heterocyclic thiosemicarbazones and related derivatives: synthesis and screening data. *J. Med. Chem.* 17: 984-988.
8. GINER-SOROLLA A. (1969). The synthesis and properties of 6-hydroxylamino-purine-3-oxide and related derivatives. *J. Med. Chem.* 12: 717-719.
9. GINER-SOROLLA A, SEGARRA JT, BROOKS MH. (1978). Synthesis and screening of 8-(4'-thiazolyl) purines. *J. Med. Chem.* 21: 344-348.
10. GINER-SOROLLA A, HADDEN JW. (1987). The development of 9-substituted purines as immunomodulators. en *The role of pharmacology in pediatric oncology*, Poplack, Massimo i Cornaglia-Ferraris, eds. Nijhoff, Dordrecht, 275-284.
11. HITCHINGS GH, BURGI E, ELION GB. (1952). Studies on condensed pyrimidine systems: the synthesis of some 6-substituted purines. *J.Amer.Chem.Soc.* 74: 411-414.
12. McCARTNEY M, McCOY EC, ROSENKRANZ HS, GINER-SOROLLA A. (1985). Carcinogenic N-hydroxylaminopurine derivatives do not act as base analog mutagens in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.* 144: 231-237.
13. ORÓ J, KIMBALL AP. (1962). Synthesis of purines under possible primitive Earth conditions. *Arch. Biochem. Biophys.* 96: 293-313.
14. SCHAEFFER HJ, BEAUCHAMP L, DE MIRANDA P, ELION GB, BAUER DJ, COLLINS P. (1978). 9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature*, 272: 583-585.
15. SUGIURA K, TELLER MN, PARHAM JC, BROWN GB. (1970). A comparison of the oncogenicities of 3-hydroxyxanthine, guanine 3-oxide and some related compounds. *Cancer Res.* 30: 184-188.
16. TELLER MN, GINER-SOROLLA A, STOHRER G, BUDINGER JH, BROWN GB. (1978). Oncogenicity of purine 3-oxide and unsubstituted purine in rats. *Cancer Res.* 38: 2229-2232.
17. WATANABE KA, REICHMANN U, HIROTA K, LOPEZ C, FOX JJ. (1979). Synthesis and antiherpes activity of some 2'-fluoro-2'-deoxyarabino-furanosyl pyrimidine nucleosides. *J. Med. Chem.* 22: 21-24.