

La innovación farmacéutica. Comentarios sobre tres noticias

CARMEN AVENDAÑO

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Esta contribución es la continuación de una iniciativa de la Real Academia de Farmacia para contemplar y comentar el avance (I+D+i) del mundo de los fármacos y medicamentos. Esta iniciativa comenzó el año 2004 con la publicación de una monografía en la que participé como coeditora, a la vez que autora de un capítulo de carácter general. En él reflejé cómo veía el camino de la investigación y del desarrollo de fármacos desde distintas perspectivas (1). Con anterioridad, y dentro del ciclo de conferencias del Instituto de España «Anticipaciones Académicas del siglo XXI», había reflexionado sobre «El futuro de los medicamentos» (2). Tengo que advertir que contemplo la investigación farmacéutica con la visión parcial que supone mi trabajo profesional, por tanto, las noticias que a mí me parecen importantes no tienen por qué ser las de mayor interés general.

En esta ocasión he seleccionado algunos de los muchos acontecimientos que han sucedido a lo largo del curso 2004-2005 en relación con estos temas. Me voy a limitar a tres hechos que me han parecido relevantes. Por una parte, el déficit manifiesto de innovación y productividad en España. Por otra, la duda que puede plantearse, tras la retirada de rofecoxib, acerca del paradigma de que los fármacos de diseño de acción selectiva son los que poseen mínimos efectos secundarios. Las agencias gubernamentales que han de aprobar un nuevo medicamento tienen que analizar una información que suele contener una media de 50.000 páginas y, además, están sujetas a presiones desde las cada día más activas asociaciones de enfermos,

así como de economistas y de políticos. Una decisión negativa puede afectar al empleo de miles de trabajadores muy cualificados, mientras que la aprobación de un fármaco que acaba produciendo efectos secundarios adversos puede levantar un gran revuelo social y conducir al establecimiento de controles todavía más estrictos.

Finalmente, me ha parecido relevante como ejemplo de interacción para el desarrollo de nuevos fármacos entre la sociedad, la economía, la biotecnología y la química, la apertura de una nueva vía para la síntesis del antimalárico artemisinina y de sus derivados. La industria farmacéutica ha de satisfacer a los inversores que la sostienen y, en consecuencia, dirigirse a desarrollos que sean rentables. Tiene además un frente de batalla cada vez más amplio, que es la competencia del mercado de los genéricos. El abandono del abordaje de tratamientos de enfermedades del mundo no desarrollado, así como el alto precio de los nuevos medicamentos, están siendo también muy cuestionados.

1. LA INNOVACIÓN EN ESPAÑA: UN PROBLEMA DE INVERSIÓN, EDUCACIÓN Y CREATIVIDAD

La necesidad de mejorar la capacidad española para innovar científica y tecnológicamente es algo que nadie discute. La imitación conduce a mejorar la eficiencia, a reducir los precios y a incorporar tecnologías y modos de gestión, pero la innovación es imprescindible para el crecimiento de la empresa y su productividad. Los políticos han de facilitar más el desarrollo de proyectos y la creación de empresas, ayudando a éstas a encontrar financiación privada. La sociedad debe ser consciente de las ventajas de la tecnología, y la universidad y la empresa deben estrechar su relación.

Según el Banco de España, sólo el 32,6% de las empresas españolas (tres de cada diez) dedica recursos a la innovación, mientras que en la UE la media se encuentra en el 44,4%. Además, lo que se dedica a estas actividades muchas veces no se utiliza de la forma más eficiente.

Uno de los mayores expertos en políticas de innovación, Nathan Rosenberg, advertía recientemente a los políticos, empresarios y tra-

bajadores españoles lo siguiente: «Ustedes tendrán que cambiar de dirección. No podrán explotar nunca más la mano de obra barata, porque ya no lo es. Si no desarrollan nuevos productos, y los incorporan después a sus procesos industriales, van a tener problemas. Van a sufrir». Además de todo esto, es imprescindible el desarrollo de una educación superior de calidad: «Para que un país desarrolle tecnologías complejas, necesita tener gente con capacidades complejas».

1.1. Inversión

La estrategia de Lisboa marcó como objetivo elevar al 3% el porcentaje del PIB a la inversión en I+D, pero en España esta inversión se encuentra en torno al 1% del PIB. No puede sorprender a nadie que en una evaluación reciente de indicadores de competitividad, nuestro país ocupe el puesto 38 del ranking internacional. La cambiante política de precios de los medicamentos contribuye a que la investigación farmacéutica en España se contemple con especial preocupación.

1.2. Educación

Mientras que Estados Unidos invierte un 2,3% de su PIB en educación superior, la media de toda la UE ronda el 1,3%. El último informe académico de la Universidad Jiao Tong de Shanghai, que evalúa la actividad académica e investigadora a partir de un conjunto de indicadores basados en la investigación y la actividad académica de cada facultad, la mejor universidad española se encuentra en el puesto 170 dentro de las 500 mejores del mundo. Está más que claro que, tanto los políticos como los profesores, deben reconocer esta situación e intentar superarla.

1.3. Creatividad

La ciencia española ha progresado mucho en los últimos veinte años, ocupando el número 12 del ranking de naciones en cuanto a la producción de artículos científicos de alto impacto, con un 2% del

total mundial (3). Sin embargo, el sistema de investigación pública admite muchas mejoras, empezando por la optimización de los sistemas de convocatorias y selección de proyectos, que deberían tender ante todo a la más correcta asignación de recursos superando los conflictos de intereses. La situación es mucho más precaria en la industria. La de la industria farmacéutica, en especial, es preocupante actualmente al verse directamente afectada por los recortes en los precios de los medicamentos.

2. EL PARADIGMA DE LA SELECTIVIDAD DE ACCIÓN ¿SON LOS FÁRMACOS DE DISEÑO DE ACCIÓN SELECTIVA LOS QUE POSEEN MÍNIMOS EFECTOS SECUNDARIOS?

En los últimos tiempos se está ampliando el papel de la fase IV como medio para detectar efectos secundarios que hayan pasado inadvertidos en las fases I-III, especialmente en lo que se refiere a efectos de tratamientos a largo plazo y a las interacciones entre distintos fármacos. Esta filosofía tiene dos efectos opuestos. Por una parte, aumenta la seguridad de los medicamentos, pero por otra aumenta la inversión y el riesgo de su desarrollo y, por lo tanto, el coste final. Muchos de estos efectos podrían superarse con un mayor conocimiento previo, en el que la química también desempeña su papel.

2.1. El problema de los inhibidores de COX-2

El desarrollo de inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) inducible ha sido uno de los mayores avances en el tratamiento del dolor y la inflamación en procesos como la osteoartritis, sin que ocurra la erosión gástrica que originan los viejos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs o NSAIDs) (4, 5). Aspirina, indometacina, ibuprofeno y naproxeno, por ejemplo, inhiben dicha enzima, pero también inhiben la COX-1, otra isoenzima que cataliza la formación del citoprotector PGE₂ en la mucosa gástrica. La retirada en septiembre del 2004 del inhibidor de COX-2 rofecoxib (Vioxx® de Merck) ha supuesto un derrumbe del precio de las acciones de la compañía Merck, no sólo por la pérdida de ventas (sólo en Estados Unidos había 30 millones de consumidores), sino por las indemniza-

ciones previsibles y por la desconfianza que se ha generado hacia la empresa. Además, debido a la atribución del riesgo al propio mecanismo de acción de los inhibidores COX-2 selectivos, más que a un fármaco específico, todos los inhibidores COX-2 han pasado a ser sospechosos (6).

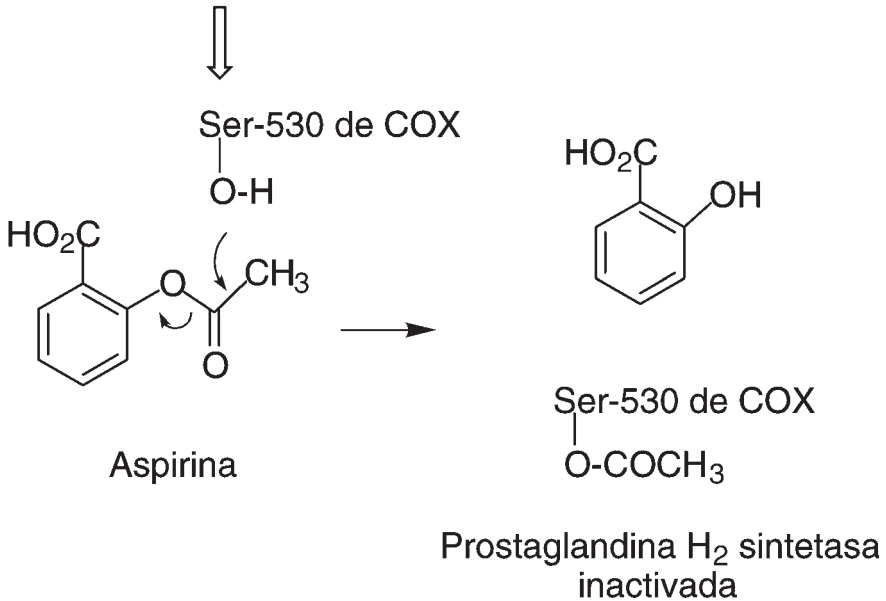
Estamos, por tanto, ante dos importantes cuestiones: 1) ¿La eterna búsqueda de la selectividad de acción en los fármacos puede no ser correcta? Recordemos que los inhibidores COX-2 fueron concebidos como «fármacos de diseño» dentro del grupo de antiinflamatorios no esteroideos, en un intento deliberado de superar la mayor limitación de los antiinflamatorios tradicionales, concretamente la irritación de estómago debida a la inhibición de la isoforma COX-1. 2) ¿Qué ocurre con los demás inhibidores COX-2 selectivos que no se han retirado? En este análisis he incluido a la aspirina y al paracetamol por sus especiales características.

2.2. Aspirina

La corteza y las hojas de sauce se utilizaron durante siglos para aliviar el dolor. Entre 1820 y 1830 se aisló su principio activo, la salicinina, un glucósido del alcohol salicílico que por su acidez en agua se denominó ácido salicílico. Este producto se aisló también en 1839 de las flores de ulmaria (*spiraea ulmaria*). Posteriormente se encontró que el salicilato de metilo (aceite de Wintergreen) tenía la misma actividad. El ácido salicílico se hizo accesible industrialmente a partir del alquitrán de hulla, pero por su mal sabor y la irritación de estómago que producía podía aplicársele la frase: «era peor el remedio que la enfermedad». En 1897 Felix Hoffman, que había diacetilado la morfina para producir en la industria alemana Bayer la heroína (considerada entonces no adictiva), sintetizó la aspirina por acetilación del grupo hidroxilo del ácido salicílico. Este compuesto había sido sintetizado previamente de forma más o menos pura, pero no se había reparado en su potencial médico. Los resultados que se obtuvieron en algunos ensayos clínicos motivaron que se introdujera en el mercado como analgésico en 1899 con el nombre de *aspirin* («a» por acetil, «spir» por la flor *spiraea*, siendo «in» un sufijo que se utilizaba frecuentemente para los fármacos). A partir

de entonces se utiliza junto con otros AINEs como antiinflamatorio en los procesos reumáticos (7). Su principal mecanismo de acción fue determinado por Sir John Vane en 1971 (que obtuvo el Premio Nobel de Fisiología y Medicina de 1982 y el título de Sir), al observar que inhibe la síntesis de prostaglandinas (8). La racionalización de este mecanismo, en función de la estructura, se confirmó en 1995 sobre la base de la estructura cristalina de la COX, también denominada prostaglandina H₂ sintetasa (Esquema 1) (9).

Prostaglandina H₂ sintetasa (COX)



ESQUEMA 1

2.3. AINEs

El principal efecto secundario de estos fármacos es su toxicidad gastrointestinal, debido a la erosión que producen en la mucosa, lo que supone un riesgo para la salud (10) y, además, un alto coste económico (11). Algunos antiinflamatorios «clásicos», como el me-

loxicam, tienen menores efectos gástricos, y esto se debe a su selectividad de acción ya que produce mayor inhibición de la isoforma COX-2 (Tabla 1).

TABLA 1. *Actividad inhibidora COX-2/COX-1 de AINEs «clásicos»*

| AINE | COX-2 CI ₅₀ µmol/l | COX-1 CI ₅₀ µmol/l | COX-2/COX-1 |
|--------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------|
| Meloxicam | 0,0019 | 0,0057 | 0,33 |
| Diclofenaco | 0,0019 | 0,000855 | 2,2 |
| Piroxicam | 0,175 | 0,00527 | 33 |
| Tenoxicam | 0,322 | 0,201 | 15 |
| Indometacina | 0,00636 | 0,00021 | 30 |
| Tenidap | 47,8 | 0,393 | 122 |

Como puede verse en la Figura 1, la COX-2 está implicada en la biosíntesis de prostaciclina, un agente dilatador del endotelio vascular que previene la trombosis y la proliferación de las células del músculo liso, mientras que la COX-1 es necesaria para la biosíntesis de tromboxano en las plaquetas, lo que produce efectos opuestos: agregación plaquetaria y proliferación de las células del músculo liso.

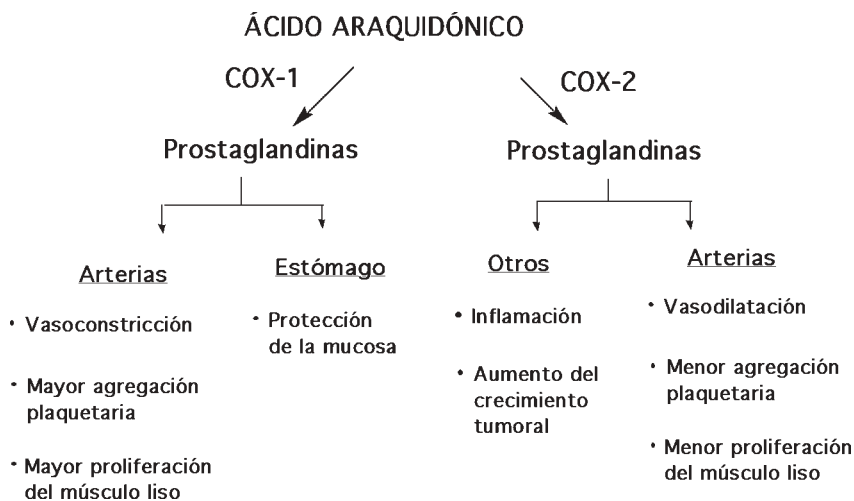


FIGURA 1. *Efectos de las isoenzimas COX-1 y COX-2.*

La aspirina se utiliza actualmente por inhibir COX-1 en la prevención y tratamiento de infartos de miocardio, pero los inhibidores selectivos COX-2 pueden tener un riesgo potencial, ya que al bloquear los efectos beneficiosos de la prostaciclina y mantenerse la producción de tromboxano pueden aumentar la presión sanguínea y el riesgo de trombosis.

La COX se consideró en un principio una enzima de expresión estable, por lo cual, la biosíntesis de prostaglandinas era dependiente sólo de la disponibilidad de su sustrato: el ácido araquidónico. Posteriormente se encontró que COX podía estimularse o inhibirse por varios compuestos químicos, y que en el tejido sinovial de animales y pacientes con artritis sus niveles estaban aumentados. En 1989 se descubrió que la IL-1 induce una mayor actividad COX en los fibroblastos (12), en 1990 que la actividad COX inducible (pero no la basal) es inhibida por esteroides (13), y en 1991 se clonó la COX inducible (14), observándose un 60% de identidad entre ambas pero importantes diferencias en varios aminoácidos. También se confirmó su inducción por citoquinas y factores de crecimiento como TNF, y su regulación por esteroides y otros factores (glucocorticoides e IL-4 la inhiben). La inducción de COX-2 produce fiebre, inflamación y dolor. También parece establecida su implicación en otros procesos como el cáncer (especialmente de colon) o el Alzheimer. Los primeros efectos se deben a que las prostaglandinas actúan sinérgicamente con varios mediadores de la inflamación, como son la bradiquinina y la histamina.

La hipótesis de trabajo al descubrir ambas isoenzimas fue: inhibir la COX basal, que tiene una acción homeostática, es perjudicial; mientras que inhibir la inducible es deseable (15, 16). Como era de esperar, desde un primer momento se observó que la toxicidad gastrointestinal de los inhibidores de COX es menor cuanto mayor es su selectividad hacia la isoforma COX-2 (Figura 2). En contraste con los AINEs tradicionales, los nuevos COXIBs («COX inhibitors») no tienen toxicidad gástrica por inhibir selectivamente la isoforma COX-2.

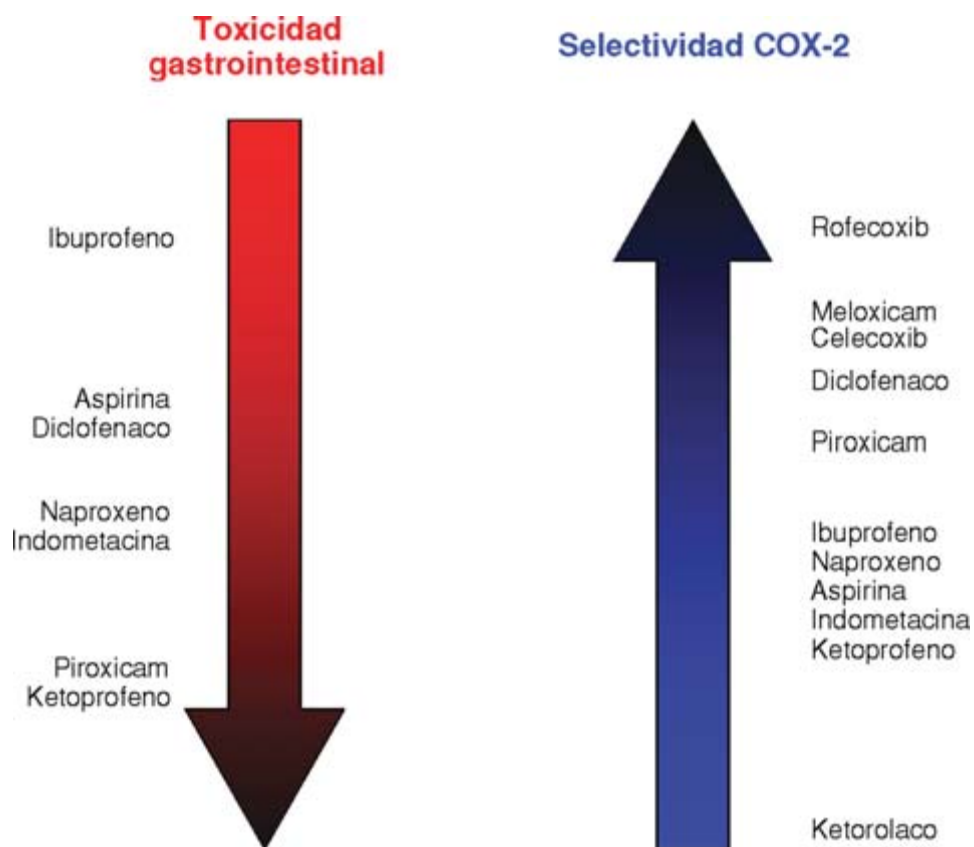
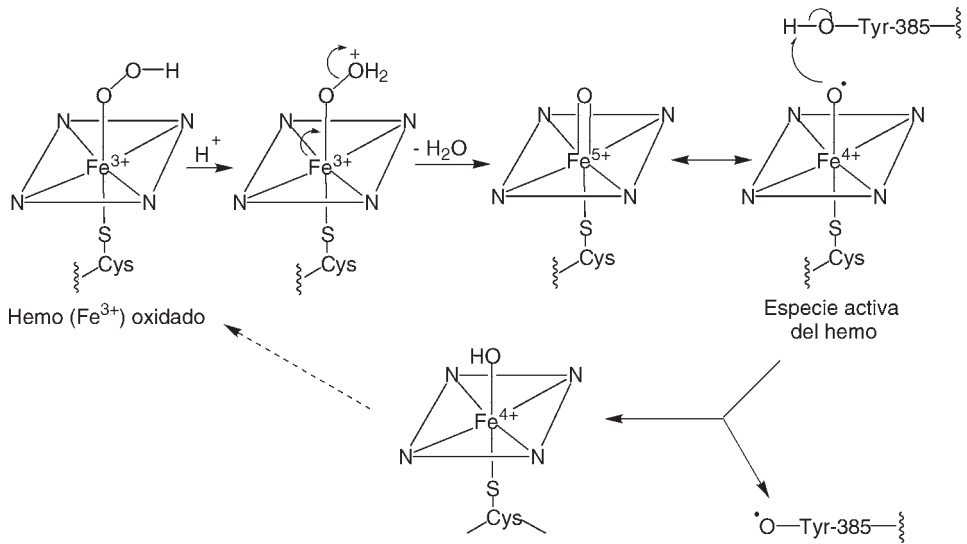


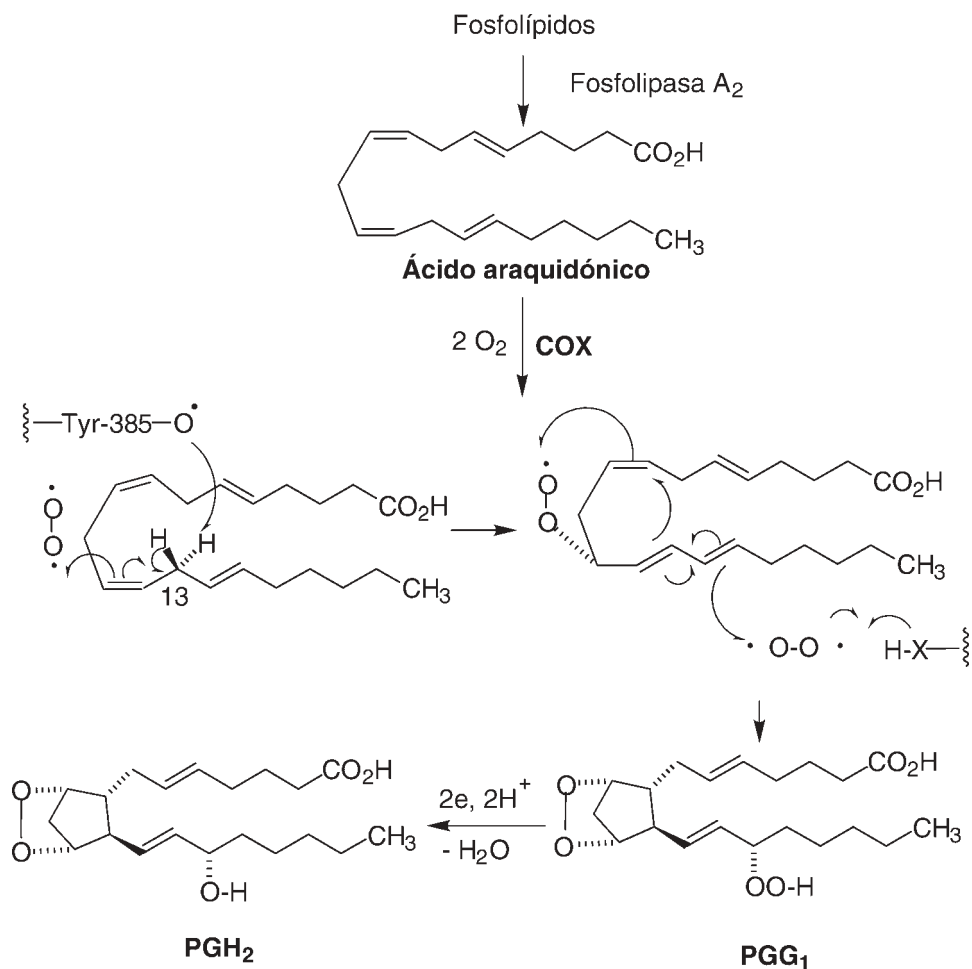
FIGURA 2. Los efectos gastrointestinales y la selectividad COX-2.

¿Cómo funciona la COX a nivel molecular? La prostaglandina H sintetasa es una enzima bifuncional, con actividad de ciclooxigenasa y de peroxidasa, que contiene un grupo hemo (una porfirina que contiene Fe^{3+} (17) y cataliza la conversión del ácido araquidónico (o su 5,6-dihidroderivado) en prostaglandina G (PGG_2 o PGG_1 si se trata del derivado dihidrogenado). El ácido araquidónico procede de la hidrólisis de los fosfolípidos constituyentes de las membranas biológicas. Las enzimas que poseen un grupo hemo como cofactor pueden abstraer un átomo de hidrógeno de un sustrato y generar un radical cuando aquel se encuentra en su forma reactiva de un radical oxigenado de Fe^{4+} (Esquema 2).



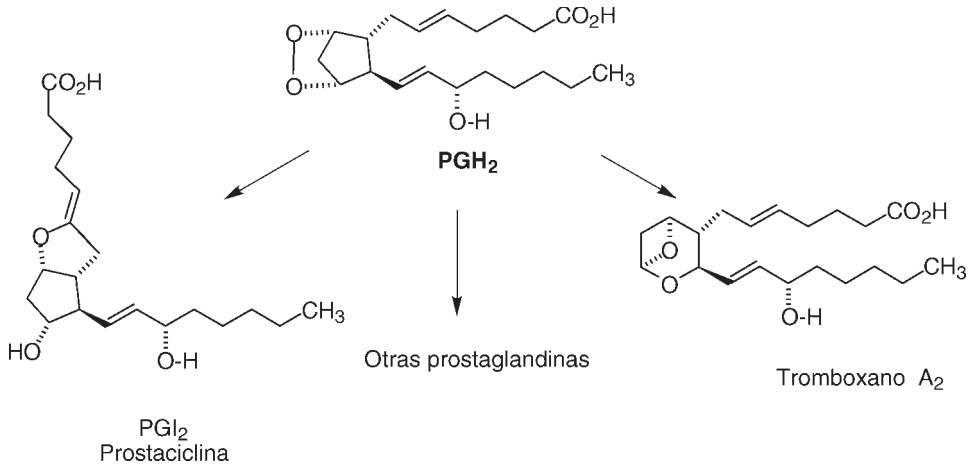
ESQUEMA 2

La especie radicalica oxigenada de Fe^{4+} abstrae primero un átomo de hidrógeno del residuo Tyr-385 de la enzima, este radical abstrae a continuación el átomo de hidrógeno *pro-S* del C-13 del sustrato (18), y el radical así formado, altamente estabilizado por resonancia, tiene una vida suficientemente alta como para iniciar una reacción con oxígeno triplete, seguida de ciclación y adición de otra molécula de oxígeno triplete. Así se forma la prostaglandina G_2 (PGG_2), un hidroperóxido que por la actividad peroxidásica de la enzima acepta dos electrones y dos protones para dar agua y PGH_2 (19). El radical de tirosina se regenera en cada ciclo de ciclooxigenasa y el ferri-oxo-hemo se reduce al estado férrico por reductores endógenos (Esquema 3) (20).



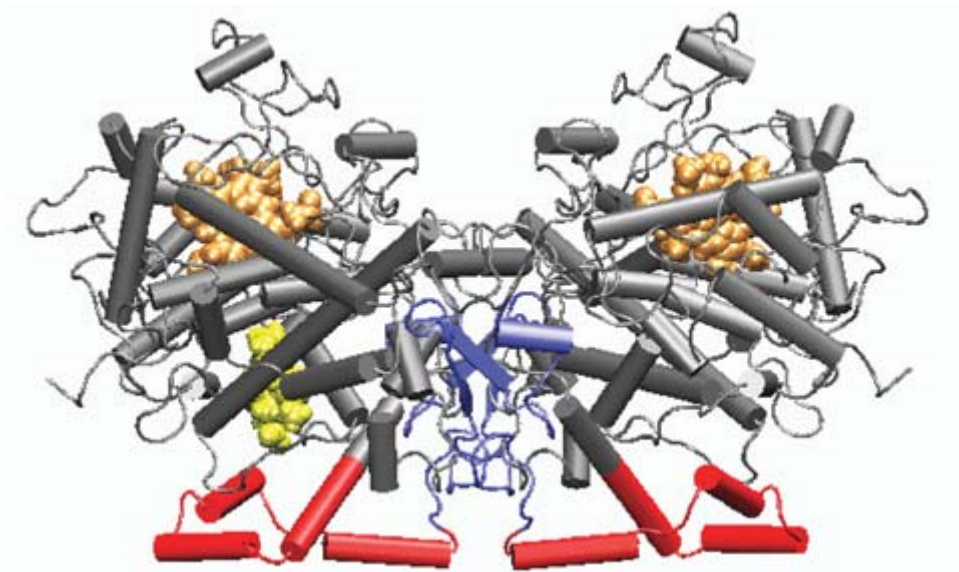
ESQUEMA 3

La PGH₂ se transforma en diversos productos como PGI₂ (prostaciclina) y tromboxano A₂ a través de reacciones catalizadas por otras prostaglandina sintetasas (Esquema 4).



ESQUEMA 4

La estructura primaria de COX-2 se estableció en 1988. Esta enzima está compuesta por 600 aminoácidos, de los cuales algunos son muy importantes para explicar la selectividad de los inhibidores (21).

FIGURA 3. Estructura terciaria del homodímero de prostaglandina H_2 sintetasa.

En 1994 se publicó la estructura secundaria a través de su estudio con Rayos X. Dicha estructura se caracteriza por una gran cantidad de hélices α y una cantidad muy pequeña de láminas β (22). En cuanto a la estructura terciaria, se trata de un homodímero que se une al sustrato según el modelo establecido por simulaciones de dinámica molecular que se indica en la Figura 3 (23, 24).

En la Figura 4 se esquematiza cómo la enzima COX, representada como monómero aunque es un dímero, se ancla a las membranas celulares introduciendo varios de sus aminoácidos hidrófobos entre las cadenas de ácidos grasos de éstas.

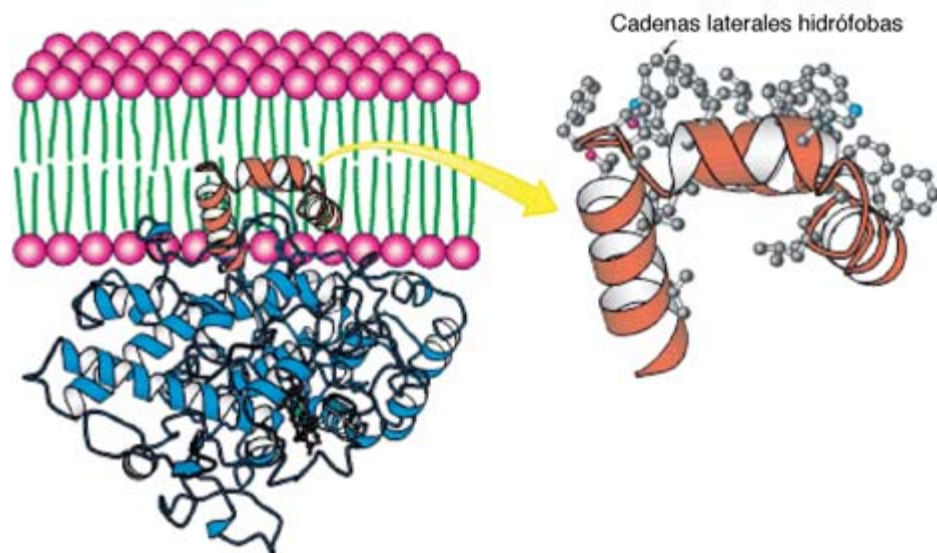


FIGURA 4. *La ciclooxigenasa unida a la membrana.*

Las analogías y diferencias entre las isoformas 1 y 2 se representan en la Figura 5. En el apartado (a) se indica cómo el ácido araquidónico penetra en el sitio activo de ambas, un canal largo y estrecho con gran número de aminoácidos hidrófobos que pueden interactuar con el sustrato. También se indica su transformación a PGH_2 , en la que la porción ciclopentánica se representa con un anillo. En el apartado (b) puede verse que la principal diferencia entre COX-1 y

COX-2 radica en el residuo 523, que es isoleucina en COX-1 y valina en COX-2. Debido al menor tamaño de la cadena de valina respecto a la de isoleucina, la COX-2 presenta un bolsillo en dicho lugar, lo que ha permitido diseñar inhibidores COX-2 selectivos introduciendo un sustituyente voluminoso que pueda acoplarse selectivamente a él y no al centro activo de COX-1. En el apartado (c) se representa cómo los antiinflamatorios no esteroideos se enlazan a ambas isoformas bloqueando la entrada del ácido araquidónico, mientras que en el apartado (d) se representa un inhibidor COX-2 selectivo enlazado al bolsillo mencionado anteriormente mientras que no puede enlazarse al sitio activo de COX-1 carente de dicho bolsillo.

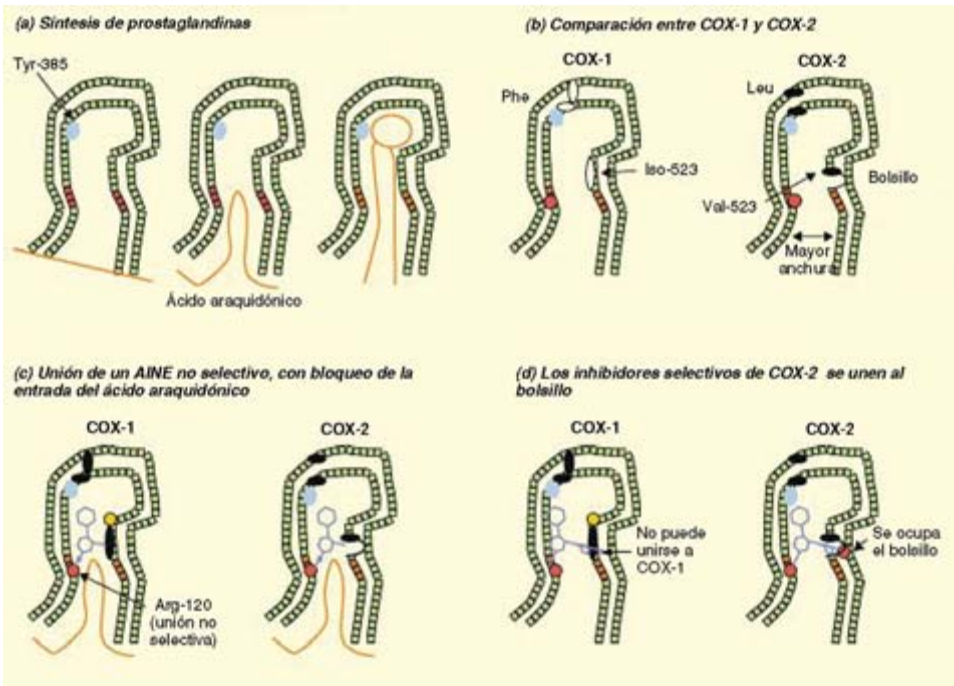


FIGURA 5. Comparación entre las dos isoformas de COX.

En el caso de la aspirina, la acetilación de la serina 530 evita que el ácido araquidónico se enlace adecuadamente al sitio activo de la COX-1, mientras que en la COX-2, dado que hay más hueco, tiene

lugar la abstracción de hidrógeno del ácido araquidónico, pero la ciclación de su radical y la formación del endoperóxido no ocurre, produciéndose ácido 15*R*-hidroxieicosatetraenoico en vez de PGH_2 .

Algunos inhibidores COX-2 selectivos se indican en la Figura 6. Celecoxib, por ejemplo, es 375 veces más selectivo para COX-2 que para COX-1, de tal forma que no inhibe COX-1 a las dosis terapéuticas.

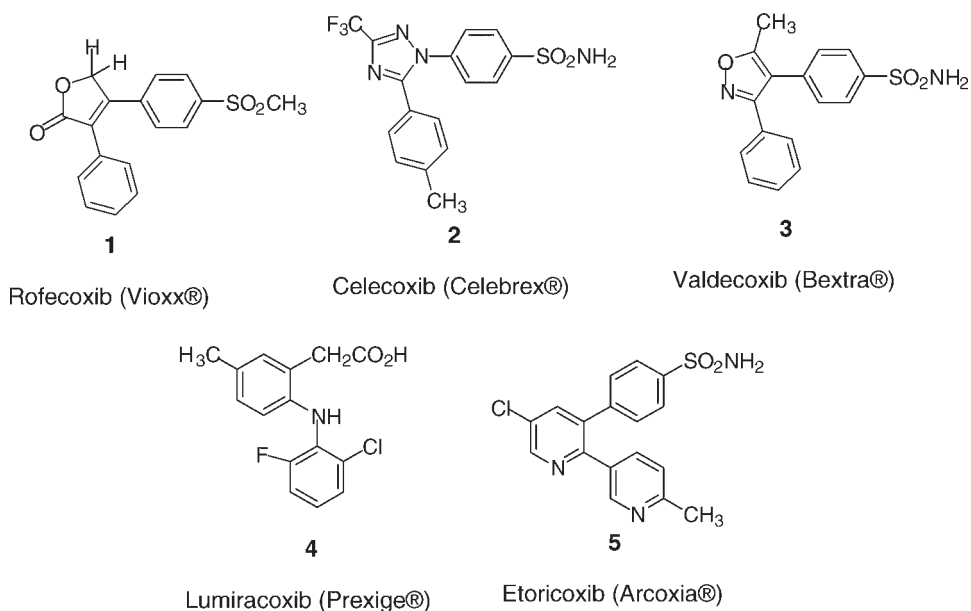


FIGURA 6. *Inhibidores COX-2 selectivos.*

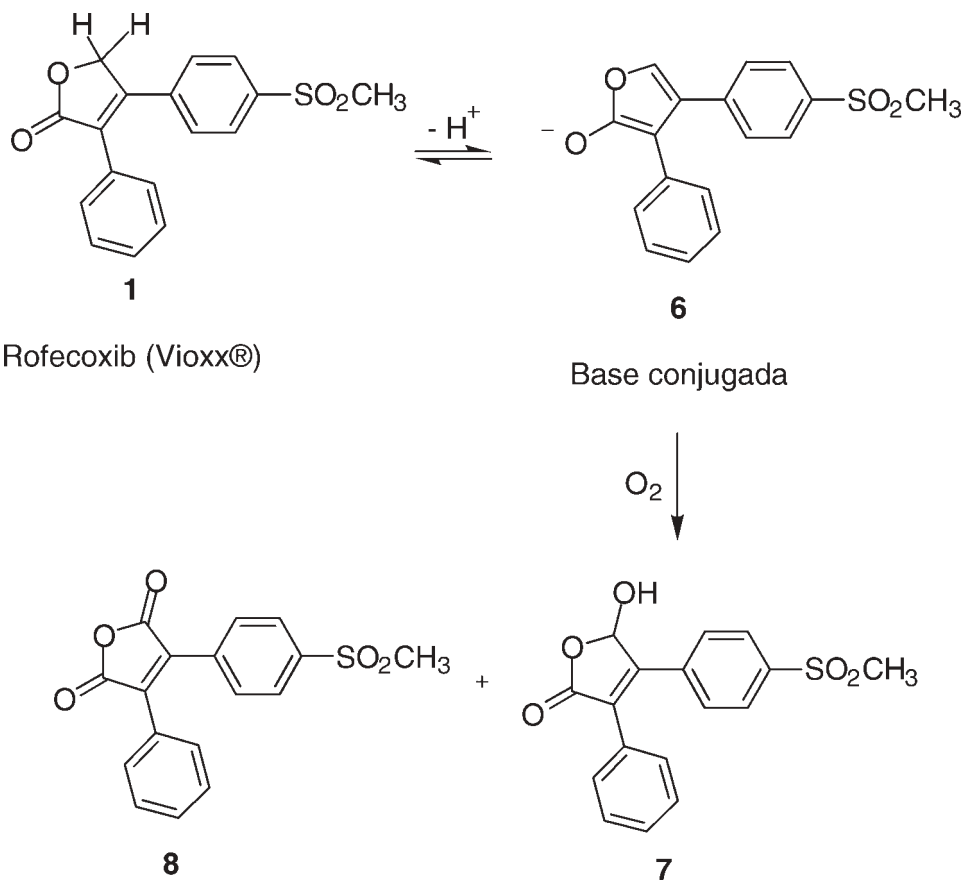
Como ya se ha comentado, el aumento de problemas cardiovasculares en pacientes que poseían este riesgo cuando eran tratados con rofecoxib (25) terminó con su retirada del mercado en septiembre de 2004. La FDA evaluó primeramente si los riesgos de enfermedad cardíaca coronaria se incrementaban con dosis estándar o altas, en comparación con otro fármaco de su misma familia, el celecoxib (Celebrex® de Pfizer), y con otros antiinflamatorios no esteroideos clásicos. Se estudiaron 1,4 millones de personas que habían tomado antiinflamatorios no esteroideos desde comienzos de 1999 hasta

septiembre de 2004, y se observó que 8.143 habían sufrido enfermedades cardíacas coronarias graves que culminaron en 1.508 casos de muerte súbita, siendo evidente que las que tomaron rofecoxib sufrieron en mayor número estos episodios.

2.4. Hipótesis de Corey

Los químicos decimos que «todo está en la estructura». Pues bien, aunque entre los inhibidores COX-2 selectivos pueden observarse claras analogías estructurales, existen diferencias suficientemente significativas como para hacer inaceptable la identidad que se les da en la bibliografía. Recientemente E. J. Corey, premio Nobel de Química de 1990 por sus brillantes trabajos en síntesis orgánica, ha establecido una hipótesis bastante convincente para señalar las diferencias entre rofecoxib y otros inhibidores de COX-2 selectivos (26). El rofecoxib posee un anillo de γ -lactona insaturada denominado butenolida, en el que los átomos de hidrógeno en posición γ respecto al grupo carbonilo son relativamente ácidos ($pK_a \approx 12$). Esta acidez se debe al efecto atrayente de electrones del grupo carbonilo, que se transmite a través del doble enlace conjugado, y a la aromaticidad del anión (Esquema 5). Como es habitual en muchos aniones orgánicos, la base conjugada de rofecoxib (**6**) es muy reactiva frente al oxígeno atmosférico. De hecho, cuando este anión se genera en el laboratorio por tratamiento con una base fuerte (*n*-BuLi en THF), el color intenso característico de la estructura **6**, altamente resonante, se transforma a los pocos minutos en una coloración marrón-amarillenta, incluso a 0° C. En esta transformación se obtiene una mezcla de productos de oxidación entre los que se encuentra una pequeña cantidad de la γ -hidroxibutanolida **7**, que es un metabolito de rofecoxib (27) y el derivado de anhídrido maleico **8** (28), que es el compuesto mayoritario.

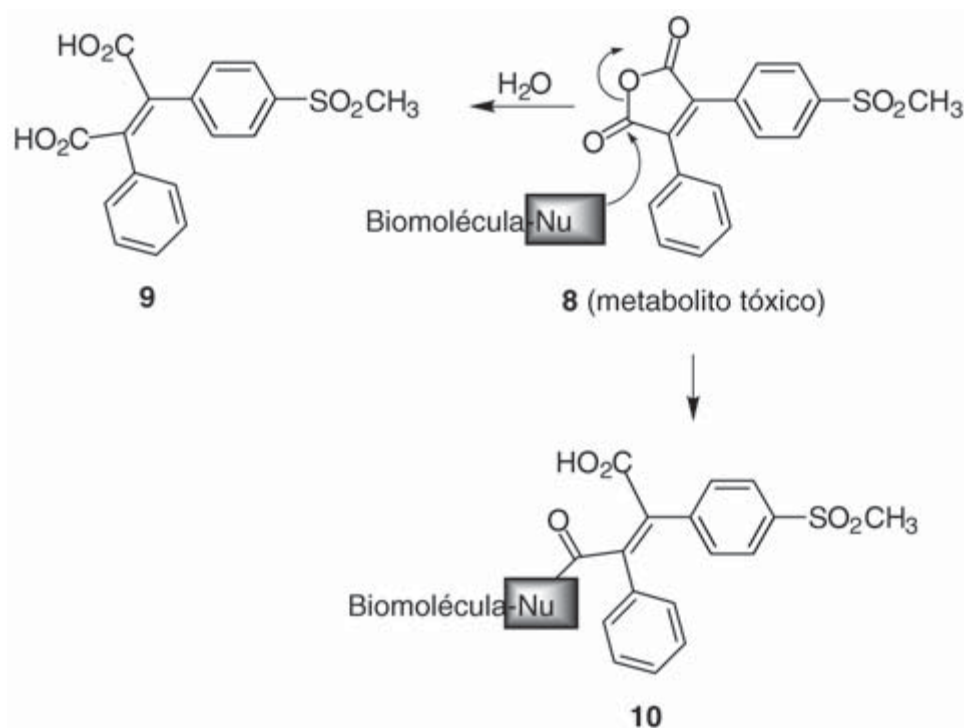
Rofecoxib se transforma también en los compuestos **7** y **8** cuando se agita al aire y a temperatura ambiente una solución en H₂O-THF a la que se ha añadido 1 equivalente de hidróxido de litio, sólo que en estas condiciones, el compuesto **7** se hidroliza para dar un derivado del ácido maleico (**9**). Por otra parte, el O₂ del aire oxida las soluciones de rofecoxib en acetato de etilo a temperatura ambiente, produciéndose hasta un 92% de la γ -hidroxibutanolida **7** en presen-



ESQUEMA 5. Oxidación de rofecoxib que origina metabolitos tóxicos.

cia de carbón vegetal (29). Dado que en condiciones fisiológicas rofecoxib está en equilibrio con pequeñas cantidades de su base conjugada, y ésta es tan fácilmente oxidable, puede darse una oxidación espontánea tanto en sangre como en los tejidos oxigenados y pueden producirse *in vivo* pequeñas cantidades del anhídrido maleico **8**. Éste puede hidrolizarse espontáneamente a ácido maleico (**9**), pero pequeñas cantidades pueden tener una vida media suficiente como para ser atacadas por grupos nucleófilos, en especial grupos amino de biomoléculas, para dar los aductos **10** (Esquema 6). Si esto es así, podría explicarse que este fármaco tuviera una toxicidad crónica acumulativa, que podría ser peligrosa después de varios

meses. De hecho, la toxicidad cardiovascular se observa a los 6-18 meses de tratamiento (30).



ESQUEMA 6. Posible toxicidad del metabolito de rofecoxib 8.

Dicen los farmacólogos que *in vivo, veritas*. Pues bien, los estudios en los que rofecoxib marcado con ¹⁴C se administró oralmente (125 mg) a individuos sanos, mostraron que el 71,5% de la radioactividad se recobraba en la orina y el 14,2% en las heces. Es posible por tanto, que el 14,3% restante que no se ha recuperado ni en orina ni en heces, permanezca en el organismo unido covalentemente a biomoléculas durante un período de tiempo más largo. Si esta teoría es cierta, supondría que los restantes miembros de la familia de inhibidores selectivos COX-2, incapaces de originar metabolitos electrófilos por oxidación, sólo tendrían el inconveniente relacionado con su propio mecanismo de acción selectiva, que puede hacerlos desaconsejables en pacientes con riesgo cardiovascular, pero que

podrían seguir utilizándose en un gran número de enfermos que padecen artritis y otras patologías (31).

La preocupación que genera entre algunos científicos la valoración de los riesgos asociados con los inhibidores COX-2 como un todo, se refleja en las palabras de Matt Breyer, catedrático de Medicina en la Universidad Vanderbilt: *In light of the Vioxx withdrawal and the public outcry, I expect there will be fewer dollars available to do the research that we need to do to find out how these- and other- drugs work.* De hecho, en diciembre de 2004 el NCI (National Cancer Institute de EE.UU.) abortó un ensayo para estudiar la eficacia de Celebrex para impedir el crecimiento de pólipos de colon que iba a estudiarse en 2.000 pacientes, y también se ha parado un ensayo en el que se iban a ensayar Celebrex y naproxeno en pacientes de Alzheimer.

Para muchos científicos debería ponerse en marcha inmediatamente un estudio en pacientes que han tomado Vioxx u otros inhibidores COX-2 durante largos períodos de tiempo, y comparar las secuencias genéticas de los que han sufrido accidentes trombóticos con las de aquéllos que no los han padecido, a fin de identificar los polimorfismos de un único nucleótido. Esta relación farmacoterapia-genómica daría las claves para decidir el futuro de este grupo de fármacos.

2.5. El problema del mecanismo de acción del paracetamol y una posible COX-3

El paracetamol se agrupa con los antiinflamatorios no esteroideos, a pesar de que su actividad antiinflamatoria es muy pequeña, porque es un analgésico y antipirético muy popular. En 1972 se demostró que inhibía la actividad COX en determinadas muestras biológicas, lo que sugería que había variantes de estas enzimas que poseían diferente sensibilidad hacia este fármaco, y que éste tenía una acción central (32). Sin embargo, no parecía que las dos isoformas COX conocidas fueran el lugar de acción del paracetamol, ya que ni COX-1 ni COX-2 son sensibles a concentraciones terapéuticas y, paradójicamente, ambas isoformas se activan con pequeñas cantidades de este fármaco. En el año 2002 se publicó un célebre tra-

bajo que proponía cuál era su diana y, posiblemente, la de las pirazolonas y otros compuestos relacionados. Según éste, se trata de una variante de la COX-1 que se denominó COX-3 (también citocromo C oxidasa polipéptido III) y que se expresa en regiones específicas del cerebro de perros, en particular, en el córtex cerebral (33). Esta isoforma está implicada en la síntesis de prostaglandinas, en el dolor y en la fiebre, pero no parece jugar un papel en la inflamación. Los mismos autores descubrieron otras dos variantes de COX-1 que no están implicadas en la biosíntesis de prostaglandinas: PCOX-1a y PCOX-1b («partial» COX). Sin embargo, este trabajo ha sido contestado en el sentido de que no debe llamarse a la primera isoforma COX-3, sino COX-1b, ya que se expresa por el gen de COX-1 (34), y todavía no se ha encontrado un tercer gen para COX. El entusiasmo que produjo esta hipótesis hace tres años se ha esfumado, y actualmente parece que esta isoforma, por su bajo nivel de expresión y por su cinética, tiene escasa relevancia clínica. Al parecer, la producción de prostaglandinas en las células del endotelio cerebral, que es un hecho crucial en la aparición de la fiebre, es muy sensible al paracetamol, lo que indica que la diana de este fármaco es COX-2 (35). Esta línea de investigación no ha hecho más que iniciarse.

3. ANTIMALÁRICOS. ¿UN PROBLEMA QUE PODRÍA EMPEZAR A SOLUCIONARSE?

La malaria es un gran problema para los países en vías de desarrollo, ya que origina entre 1 y 3 millones de muertes cada año y unos 300 a 500 millones de enfermos (36). Las formas más severas se dan entre los niños del África subsahariana y están producidas por *Plasmodium falciparum*. Los fármacos antimaláricos más utilizados por su bajo coste para este fin son la cloroquina (CQ) (37), un viejo fármaco derivado de la quinina que al acumularse en las vacuolas alimenticias de los trofozoitos intraeritrocíticos inhibe la polimerización a hemozoina del hemo (38, 39), y la asociación sulfadoxina-pirimetamina (SP, Fansidar® de Roche), que inhibe la biosíntesis de ácido fólico. Sin embargo, ambos tratamientos están fracasando por la aparición de resistencias, como puede apreciarse en la Figura 7 (40). Esta circunstancia hace preveer que la cifra de enfermos de malaria se duplicará en el año 2010.

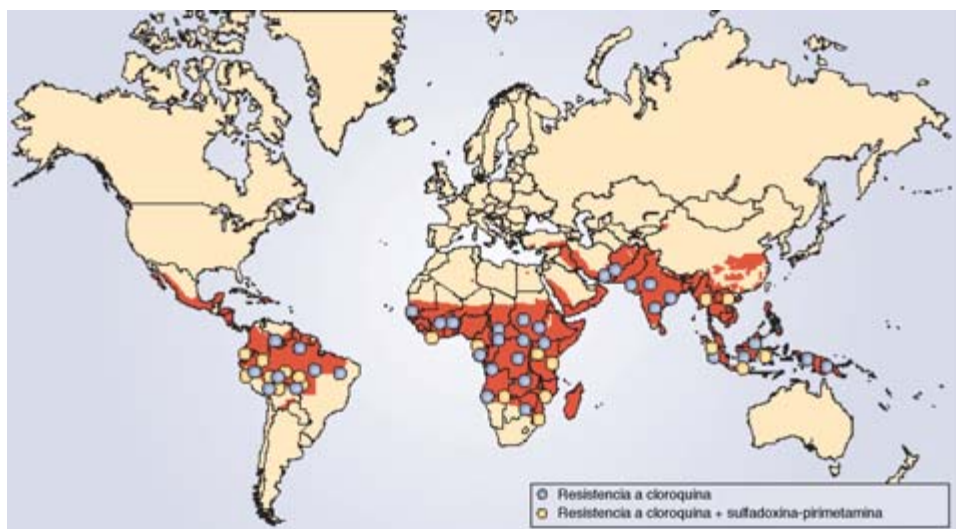


FIGURA 7. Distribución de la malaria y de zonas en las que el *Plasmodium falciparum* se ha hecho resistente a cloroquina y sulfadoxina-pirimetamina.

En el campo de las posibles vacunas se han hecho notables esfuerzos y en el año 2004 ha habido una noticia relevante acerca del éxito de una de ellas desarrollada en Mozambique con la colaboración económica de la Fundación Bill y Melinda Gates, la OMS y otras entidades, en una investigación que está dirigida por el Doctor Pedro Alonso, Investigador del Centro de Salud Internacional del Hospital Clínico de Barcelona. Sin embargo, hoy por hoy se requieren nuevos fármacos que puedan administrarse oralmente, tengan una toxicidad baja, eficacia inmediata, y sean muy baratos, ya que la mayor parte de los enfermos tiene que subsistir con unos 15 \$ al mes. Los primeros sustitutos que se propusieron para los fármacos anteriormente mencionados fueron la amodiaquina, en sustitución de la CQ, y el cloproguanilo-dapsona (41) o la atovaquona-proguanilo (Malarona® de GlaxoSmithKline) (42) como combinaciones antifolato. Sin embargo, dada la semejanza en los mecanismos de acción, las resistencias a estos fármacos no se hicieron esperar. Fue entonces cuando cobraron relevancia las artemisininas, entre las que se encuentran los derivados artemeter y artesunato (Fig. 8). Por su nuevo mecanismo de acción y su gran potencia, las artemisininas y, en general, los endoperóxidos antimaláricos no producen resisten-

cias tan fácilmente, y parecen la mejor alternativa para el tratamiento de la malaria (43, 44). Debido a que tienen una vida media muy corta (3-5 horas) han de combinarse para aumentar su eficacia con otros antimaláricos como amodiaquina, mefloquina o el derivado fenantrénico lumefantrina.

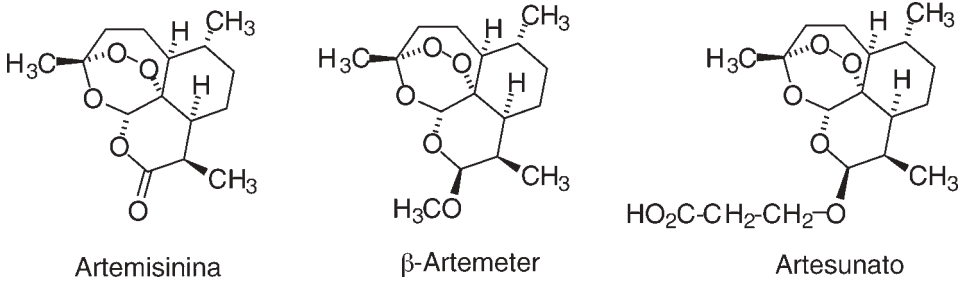
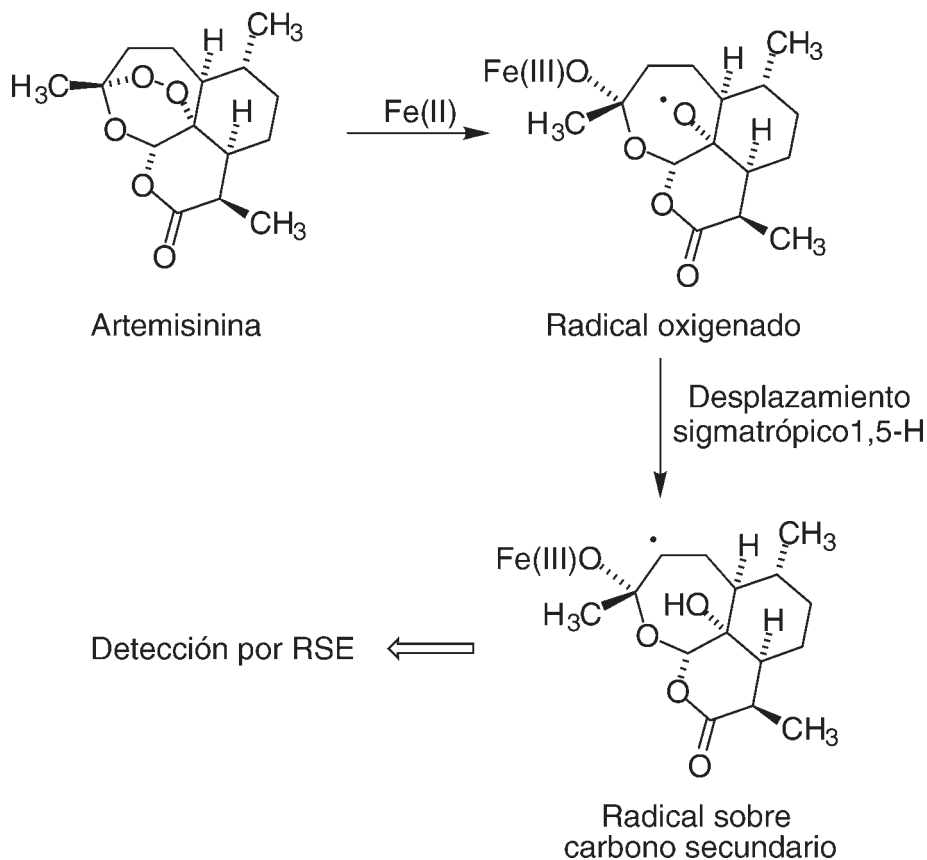


FIGURA 8. Estructuras de artemisinina y algunos de sus derivados.

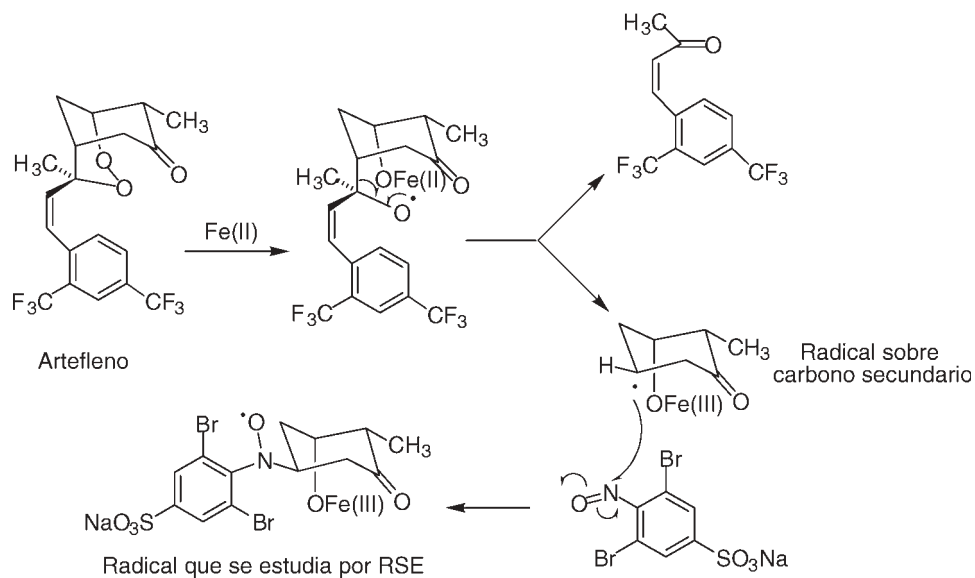
La artemisinina es un producto natural que se aísla de la planta *Artemisia annua* que pertenece a la familia *Asteraceae* y procede de China y Vietnam. Allí se denomina vulgarmente «qing hao», y su extracto se utilizaba como antimalárico y como antihelmíntico con anterioridad al año 168 antes de Cristo. En 1972, unos químicos chinos aislaron de sus hojas un compuesto cristalino al que denominaron «qinghaosu», que es el responsable de dicha acción. La artemisinina no es un heterociclo nitrogenado, como la mayoría de los antimaláricos, sino que es una lactona sesquiterpénica que posee un agrupamiento peróxido en un anillo de trioxano. Este agrupamiento parece indispensable para su actividad y es sorprendentemente estable, aunque el grupo lactona puede hidrolizarse fácilmente. Su mecanismo de acción parece deberse a su interacción con la ferriporfirina IX (hemo) en la vacuola alimenticia del parásito, que posee un pH ácido. Como consecuencia, se originan radicales libres que atacan las membranas celulares, rompiendo su estructura y produciendo la muerte celular. Su acción quimioterápica selectiva se debe a que las células del parásito poseen una alta concentración de Fe^{2+} (45). El grupo peróxido de la artemisinina se rompe por la acción de este catión que se oxida para dar un alcóxido de Fe^{3+} y un radical en el otro oxígeno. Este radical experimenta un rápido des-

plazamiento sigmatrópico 1,5-H y se transforma en un radical de carbono secundario, que puede detectarse por resonancia de espín electrónico, y es al que se atribuye la citotoxicidad (Esquema 7).



ESQUEMA 7

Para entender a fondo este proceso se han llevado a cabo reacciones biomiméticas catalizadas con Fe^{2+} y se han caracterizado los radicales de carbono secundario formados por espectroscopía RSE. Así el artefleno, otro análogo antimalárico desarrollado por Roche, se fragmenta para dar una metilcetona y un radical secundario que puede capturarse con un nitrosoderivado y estudiarse por RSE (Esquema 8) (46).



ESQUEMA 8

Los radicales producidos en la ruptura homolítica de la función endoperoxido de artemisinina y trioxanos relacionados pueden formar aductos covalentes por alquilación de cadenas laterales de proteínas y de determinados lugares de la protoporfirina IX (47).

Cuando la artemisinina se trata con borohidruro sódico se reduce quimiosselectivamente el grupo carbonilo de la lactona, para dar un lactol denominado dihidroartemisinina. El diastereoisómero β en forma de éter metílico se denomina β -artemeter (Artemam[®]) y su éter etílico arteéter. El primero tiene una actividad esquizotónica diez veces mayor que la artemisinina. El artesunato, que es el hemiéster de este lactol con el ácido succínico, es también muy activo. La estructura tridimensional de los derivados de β -artemeter se ha representado en la Figura 9.

El desarrollo del artesunato es fruto de una acción entre Glaxo-SmithKline y WHO-TDR (World Health Organization's Special Programme for Research and training in Tropical Diseases), mientras que artemeter se fabrica bajo los auspicios de la Fundación Novartis para el Desarrollo sostenible en conjunción con «Medicines for Ma-

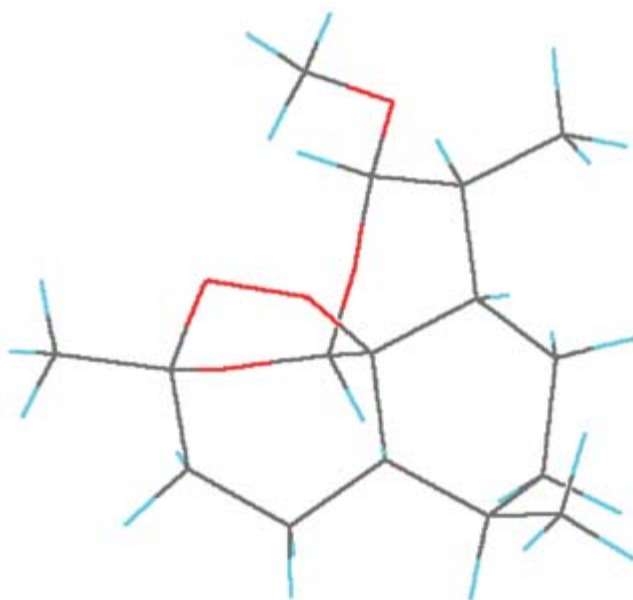


FIGURA 9. Estructura tridimensional de los derivados de β -artemeter.

laria Venture» y se administra con el nombre Riamet® en combinación con lumefantrina (también llamada benflumetol), un fármaco sintético de tipo aminoalcohol que es activo por vía oral y tiene una eliminación lenta (Fig. 10) (48).

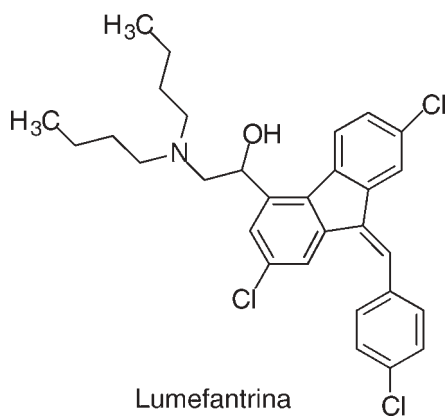
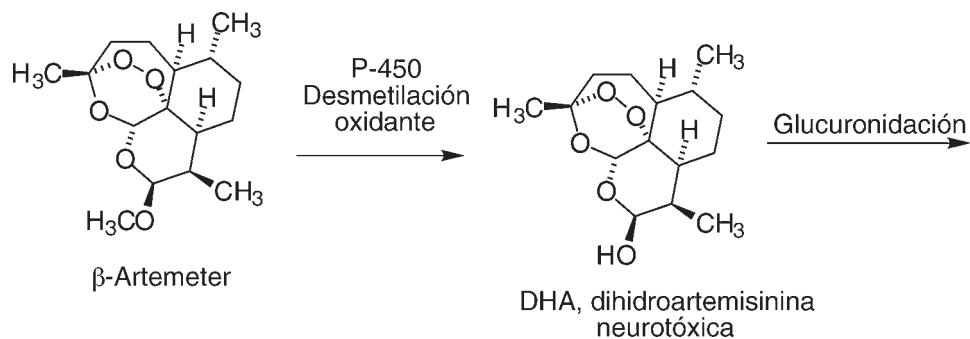


FIGURA 10

La biodisponibilidad de estos endoperóxidos es mala y su eliminación es muy rápida debido fundamentalmente a su estructura de acetal. El artemeter, por ejemplo, se metaboliza por desalquilación oxidante a DHA, un compuesto que se elimina rápidamente como glucurónido pero que, además, es neurotóxico (Esquema 9) (49).



ESQUEMA 9

Por eso, se han sintetizado análogos en los que el oxígeno acetálico exocíclico se ha sustituido por un grupo metileno. Así tenemos los carboderivados (50), como **11** (Fig. 11), en el que se ha introducido una cadena bencénica fluorada para aumentar la actividad. Otro modo de obviar el problema ha sido la síntesis de fenoxiderivados (51) como **12**, en los que no puede producirse dicha desalquilación oxidan-

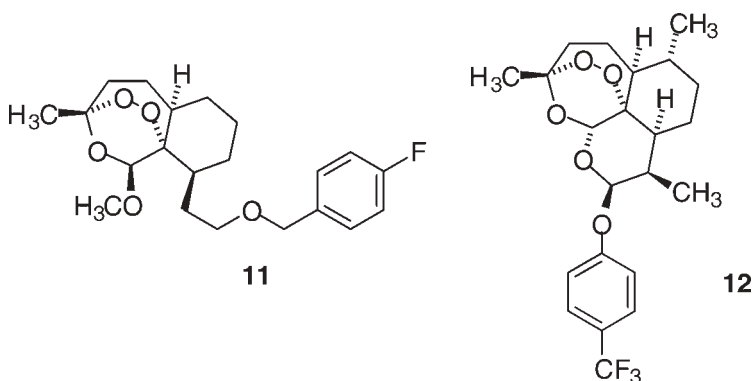


FIGURA 11. Derivados de DHA con mejor farmacocinética.

te y se conserva la actividad antimalárica. También se estudian las denominadas trioxaquininas, que son trioxanos enlazados a un grupo de 4-aminoquinolina a través de una cadena espaciadora.

Por otra parte, teniendo en cuenta que la cloroquina se acumula en la vacuola alimenticia del parásito por su carácter básico, se han diseñado derivados de artemisinina que contienen grupos amino (52). Este diseño se basa en los estudios sobre la cloroquina, la cual se encuentra a pH 7,4 en forma de monocatión (Fig. 12).

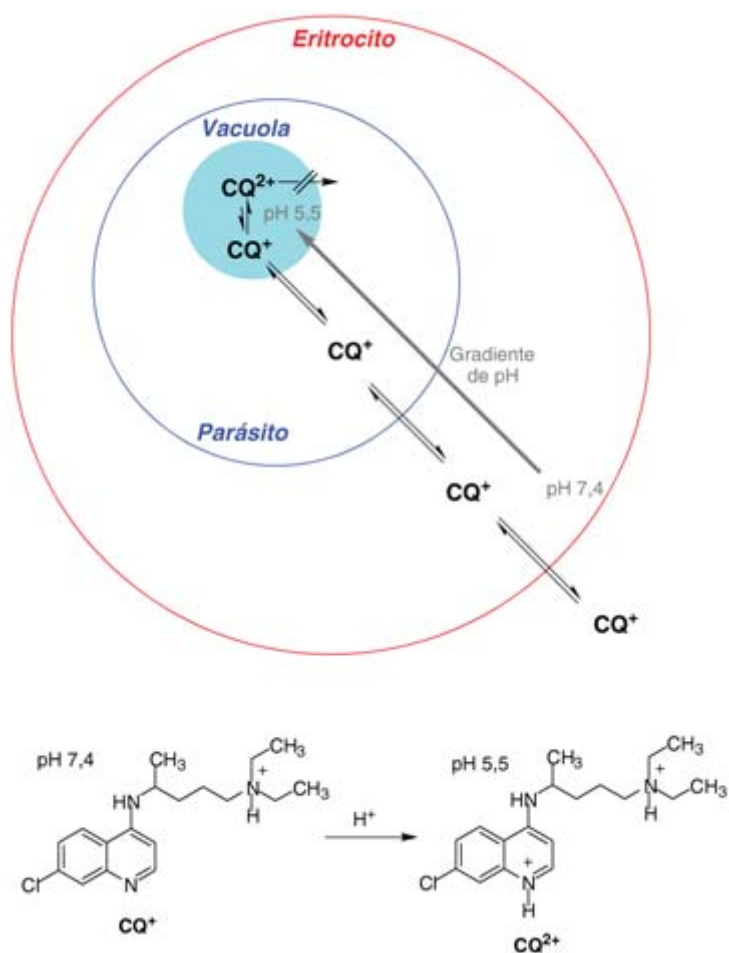
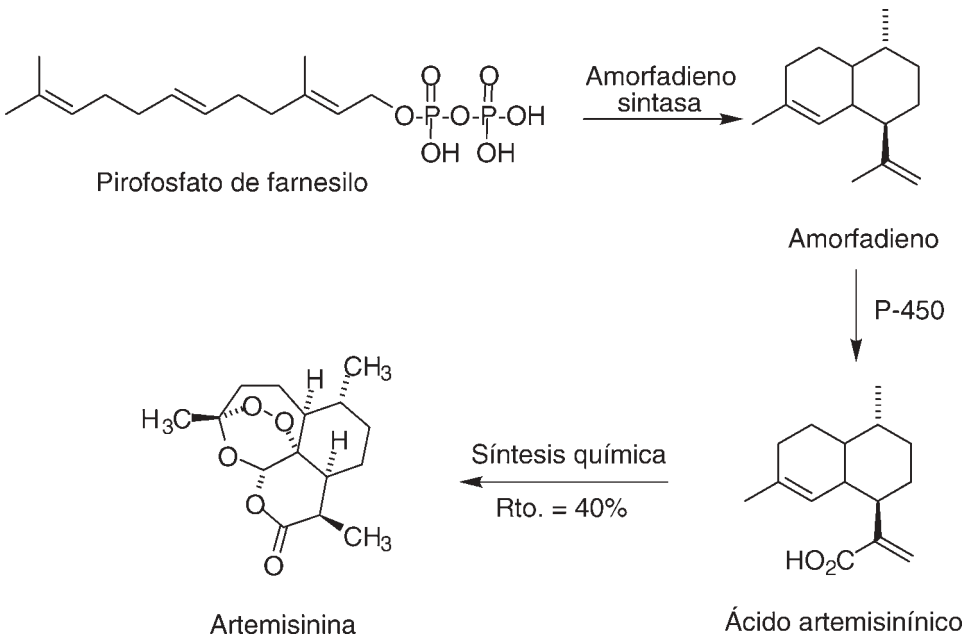


FIGURA 12. Derivados de artemisinina diseñados para su transporte selectivo.

Esta forma atraviesa las membranas biológicas y penetra en los glóbulos rojos y en la vacuola alimenticia ácida del parásito de la malaria. El pH ácido de ésta (5,5) transforma a la cloroquina en su forma diprotonada CQ^{2+} , que es ya impermeable al paso de la membrana, por lo que se acumula en dicho lugar.

Como el precio de las artemisininas es muy elevado, y la planta no ha podido cultivarse de forma productiva, la Fundación de Bill y Melinda Gates donó 42,6 millones de dólares a una compañía farmacéutica sin ánimo de lucro para desarrollar un microorganismo capaz de facilitar el acceso a este tipo de antimaláricos. Fruto de esta iniciativa ha sido la obtención en Berkeley, mediante técnicas de biotecnología, de una variedad de *Escherichia coli* que produce gran cantidad de amorfadieno, un terpeno que se obtiene en este microorganismo manipulado por un camino metabólico que se encuentra en levaduras, pero no en *Escherichia coli* nativa. El amorfadieno puede utilizarse en la semisíntesis de artemisinina, que se obtiene a partir de él con un rendimiento total del 40% (Esquema 10).



ESQUEMA 10

Actualmente se trabaja en esta línea, siempre con el fin de reducir los costes de este fármaco, intentando clonar los genes de la planta que intervienen en la biosíntesis de artemisinina e insertarlos en *E. Coli*.

Como conclusión, quisiera resaltar la importancia que tiene en la innovación la interrelación entre distintas áreas científicas y, una vez más, subrayar el papel de una visión química, que puede ser esencial o complementaria, en el entendimiento y en la propuesta de soluciones, dentro de la difícil tarea de la investigación de nuevos fármacos.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) «La innovación farmacéutica», en *Nuevos Avances en Medicamentos. Monografía XV de la Real Academia Nacional de Farmacia* (2004), 11.
- (2) «El futuro de los medicamentos», en *Anticipaciones Académicas del Siglo XXI*, Instituto de España, Ed. S. Del Campo (2003), 361.
- (3) KING, D. A. (2004): The scientific impact of nations. *Nature*, 430: 311.
- (4) VANE, J.; BOTTING, J., Eds. (1998): «Selective COX-2 Inhibitors; Pharmacology, Clinical Effects and Therapeutic Potential», Kluwer Academic.
- (5) MACREADY, N. (1999): COX-2 inhibitors gain more support for use in arthritis. *Lancet* 354: 1881.
- (6) a) TOPOL, E. J. (2004): Failing the public health-rofecoxib, Merck, and the FDA. *New Engl. J. Med.* 351: 1707. b) FITZ GERALD, G. A. (2004): Coxibs and cardiovascular disease. *New Engl. J. Med.* 351: 1709.
- (7) BAUM, C.; KENNEDY, D. L., FORBES, M. B. (1985): Utilization of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum.* 28: 686.
- (8) VANE, J. R. (1971): Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat. New Biol.* 231: 232.
- (9) LOLL, P. J.; PICOT, D.; GARAVITO, R. M. (1995): The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat. Struct. Biol.* 637: 2.
- (10) ARMSTRONG, C. P., BLOWER, A. L. (1987): Non-steroidal anti-inflammatory drugs and life threatening complications of peptic ulceration. *Gut.* 28: 527.
- (11) a) DE POUVOURVILLE, G. (1992): The economic consequences of NSAID-induced gastropathy: the French context. *Scand. J. Rheumatol.* 49: 53. b) BLOOM, B. S. (1989): Risk and cost of gastrointestinal side effects associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arch. Inter. Med.* 149: 1019.
- (12) RAZ, A.; WYCHE, A., NEEDLEMAN, P. (1989): Temporal and pharmacological division of fibroblast cyclooxygenase expression into transcriptional and translational phases. *Proc. National Acad. Sci. USA.* 86: 1657.

- (13) FU, J. Y.; MASFERRER, J. L.; SEIBERT, K.; RAZ, A.; NEEDLEMAN, P. (1990): The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J. Biol. Chem.* 265: 16737.
- (14) XIE, W.; CHIPMAN, J. G.; ROBERTSON, D. L.; ERIKSON, R. L., SIMMONS, D. L. (1991): Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. National Acad. Sci. USA.* 88: 2692.
- (15) CROFFORD L. J. (1997): COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J. Rheumatol.* 49: 15.
- (16) LIPSKY, P. E. (1999): The clinical potential of cyclooxygenase-2-specific inhibitors. *Am. J. Med.* 106: 51.
- (17) En el Esquema 1, las letras N representan al nitrógeno de los cuatro anillos de pirrol de la porfirina, y el quinto ligando del hierro es un resto de cisteína de la enzima.
- (18) MALKOWSKI, M. G.; GINELL, S. L.; SMITH, W. L., GARAVITO, R. M. (2000): The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. *Science* 289: 1933.
- (19) KIEFER, J. R.; PAWLITZ, J. L.; MORELAND, K. T.; STEGEMAN, R. A.; GIERSE, J. K.; HOOD, W. F.; GIERSE, J. K.; STEVENS, A. M., GOODWIN, D. C.; ROWLINSON, S. W.; MARNETT, L. J.; STALLINGS, W. C., KURUMBAIL, R. G. (2000): Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction. *Nature* 405: 97.
- (20) SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M., HLA, T. (2004): Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* 56: 387.
- (21) KURUMBAIL, R. G.; STEVENS, A. M.; GIERSE, J. K.; McDONALD, J. J.; STEGEMAN, R. A.; PAK, J. Y.; GILDEHAUS, D.; MIYASHIRO, J. M.; PENNING, T. D.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P. C., STALLINGS, W. C. (1996): Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 384: 644.
- (22) PICOT, D.; LOLL, P. J., GARAVITO, R. M. (1994): The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* 367: 243.
- (23) BHANDARKAR, M.; BUDESCU, G.; HUMPHREY, W. F.; IZAGUIRRE, J. A.; IZRAILEV, S.; KALÉ, L. V.; KOSZTIN, D.; MOLNAR, F.; PHILLIPS, J. C., SCHULTEN, K. (1999): *Proceedings of the SCS International Conference on Web-Based Modeling and Simulation.*
- (24) El dominio EGF es una secuencia formada por 30 o 40 residuos de aminoácidos que es muy semejante al «epidermal growth factor» (EGF). Parece que estas regiones están implicadas en las interacciones de un receptor y sus ligandos y en las interacciones proteína-proteína.
- (25) CHENG, Y.; AUSTIN, S. C.; ROCCA, B.; KOLLER, B. H.; COFFMAN, T. M.; GROSSER, T.; LAWSON, J. A., FITZGERALD, G. A. (2002): Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2. *Science* 296, 539.
- (26) REDDY, L. R., COREY, E. J. (2005): Facile air oxidation of the conjugate base of rofecoxib. *Tetrahedron Lett.*, 46, 927.
- (27) a) HALPIN, R. A.; PORRAS, A. G.; GEER, L. A.; DAVIS, M. R.; CUI, D.; DOSS, G. A.; WOOLF, E.; MUSSON, D.; MATTEWS, C.; MAZENKO, R.; SCHWARTZ, J. I.; LASSETER, K. C.; VYAS, K. P., BAILLIE, T. A. (2002): The disposition and metabolism of rofecoxib, a potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in human subjects. *Drug Metab. Dispos.* 30: 684. b) SLAUGHTER, D.; TAKENAGA, N.; LU, P.;

- ASSANG, C.; WALSH, D. J.; ARISON, B. H.; CUI, D.; HALPIN, R. A.; GEER, L. A.; VYAS, K. P., BAILLIE, T. A. (2003): Metabolism of rofecoxib *in vitro* using human liver subcellular fractions. *Drug Metab. Dispos.* 31: 1398.
- (28) Este producto puede acompañar a veces como impureza al rofecoxib comercial.
- (29) NICOLL-GRIFFITH, D. A.; YERGEY, J. A.; TRIMBLE, L. A.; SILVA, J. M.; LI, C.; CHAURET, N.; GAUTHIER, J. Y.; GRIMM, E.; LÉGER, S.; ROY, P.; THÉRIEN, M.; WANG, Z.; PRASIT, P.; ZAMBONI, R.; YOUNG, R. N.; BRIDEAU, C.; CHAN, C.-C.; MANCINI, J., RIENDEAU, D. (2000): Synthesis, characterization, and activity of metabolites derived from the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib (MK-0966, Vioxx). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10: 2683.
- (30) Se ha descrito que la cardiotoxicidad de Vioxx® sólo se observa tras un año de tratamiento.
- (31) SUBBARAMAIAH, K., DANNENBERG, A. J. (2003): Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol. Sci.* 24: 96.
- (32) FLOWER, R. J., VANE, J. R. (1972): Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature* 240: 410.
- (33) CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S., SIMMONS, D. L. (2002): COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 13926.
- (34) SCHWAB, J. M.; BEITER, T.; LINDER, J. U.; LAUFER, S.; SCHULZ, J. E.; MEYERMANN, R., SCHLUESENER, H. J. (2003): COX-3-a virtual pain target in humans? *The FASEB J.* 17: 2174.
- (35) GREENER, M. (2005): The COX-3 identity crisis. *The Scientist*, 03/28/S41/1.
- (36) GREENWOOD, B., MUTABINGWA, T. (2002): Malaria in 2002. *Nature* 415: 670.
- (37) WHITE, N. J. (1996): The treatment of malaria. *N. Engl. J. Med.* 335: 800.
- (38) La mayoría de los antimaláricos se dirigen contra la fase asexual eritrocítica del parásito. Éste degrada la hemoglobina en su vacuola alimenticia y produce el hemo, que es capaz de reaccionar con oxígeno molecular y generar especies tóxicas. Muchos antimaláricos impiden una importante vía para la detoxificación, como es la polimerización del hemo a hemozoína.
- (39) a) SLATER, A. F. (1993): Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol. Ther.* 57: 203. b) SULLIVAN, D. J.; GLUZMAN, I. Y.; RUSSELL, D. G., GOLDBERG, D. E. (1996): On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 11865.
- (40) PLOWE, C. V. (2003): Monitoring antimalarial drug resistance: making the most of the tools at hand. *J. Exp. Biol.* 206: 3745.
- (41) WINSTALEY, P. (2001): Modern chemotherapeutic options for malaria. *Lancet Infect. Dis.* 1: 242.
- (42) LOOARESUWAN, S.; CHULAY, J. D.; CANFIELD, C. J., HUTCHINSON, D. B. (1999): Malarone (atovaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. Malarone Clinical Trials Study Group. *Ann. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 533.

- (43) DHINGRA, V.; RAO, K. V., NARASU, M. L. (2000): Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. *Life Sci.* 66: 279.
- (44) ROBERT, A.; BENOIT-VICAL, F.; DECHY-CABARET, O., MEUNIER, B. (2001): Mechanism of action of artemisinin. *Pure Appl. Chem.* 73: 1173.
- (45) Debido a que en el cáncer de mama se encuentra una alta concentración de este catión, la artemisinina se está estudiando para esta posible aplicación.
- (46) O'NEILL, P. M.; BISHOP, L. P.; SEARLE, N. L.; MAGGS, J. L.; STORR, R. C., WARD, S. (2000): Biomimetic Fe(II)-mediated degradation of arteflene (Ro-42-1611). The first EPR spin-trapping evidence for the previously postulated secondary carbon-centered cyclohexyl radical. *J. Org. Chem.* 65: 1578-82.
- (47) ROBERT, A.; CAZELLES, J., MUNIER, B. (2001): Characterization of the Alkylation Product of Heme by the Antimalarial Drug Artemisinin. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40: 1954.
- (48) BASCO, L. K.; BICKII, J., RINGWALD, P. (1998): *In vitro* activity of lumefantrine (benflumetol) against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Yaounde, Cameroon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2347.
- (49) MAGGS, J. L.; BISHOP, L. P. D.; EDWARDS, G.; O'NEILL, P. M.; WARD, S. A.; WINSTANLEY, P. A., PARK, B. K. (2000): Biliary metabolites of beta-artemether in rats: biotransformations of an antimalarial endoperoxide. *Drug Met. Disp.* 28: 209.
- (50) O'NEILL, P. M.; SEARLE, N. L.; KAN, K. W.; STORR, R. C.; MAGGS, J. L.; WARD, S. A.; RAYNES, K., PARK, B. K. (1999): Novel, potent, semisynthetic antimalarial carbaanalogues of the first-generation 1,2,4-trioxane artemether. *J. Med. Chem.* 42: 5487.
- (51) O'NEILL, P. M.; MILLER, A.; WARD, S. A.; PARK, B. K.; SCHEINMANN, F., STACHULSKI, A. V. (1999): Application of the TMSOTf-AgClO₄ Activator System to the Synthesis of Novel, Potent, C-10 Phenoxy Derivatives of Dihydroartemisinin. *Tetrahedron Lett.* 40: 9129.
- (52) O'NEILL, P. M.; BISHOP, L.; HAWLEY, S. R.; STORR, R. C.; WARD, S. A.; PARK, B. K. (1996): Mechanism-based design of parasite-targeted artemisinin derivatives: synthesis and antimalarial activity of benzylamino and alkylamino ether analogues of artemisinin. *J. Med. Chem.* 39: 4511.