



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**DERIVADOS DEL PIRROL COMO AGENTES
ANTITUBERCULOSOS**

Autor: GLORIA TOBAJAS CURIEL

D.N.I.: 51123740F

Tutor: Mercedes Villacampa Sanz

Convocatoria: Junio 2015

I. RESUMEN

La tuberculosis, enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*, es una de las principales causas de muerte en el mundo, con unas cifras alarmantes. La coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la capacidad de latencia de la micobacteria son algunos de los factores que contribuyen a su difusión. Además, en los últimos años están apareciendo cepas resistentes a los fármacos tradicionales empleados en su tratamiento, como la isoniazida o la rifampicina, debido a los largos períodos de tratamiento necesarios, que, a su vez, ocasionan un incumplimiento del tratamiento por los pacientes. Esta situación hace necesaria la búsqueda de nuevos compuestos antituberculosos activos frente a las cepas resistentes a los agentes convencionales y que actúen mediante un mecanismo de acción novedoso.

Como resultado del esfuerzo por el desarrollo de nuevos fármacos, han surgido compuestos de estructuras novedosas con actividad antituberculosa que se encuentran en distintas etapas de investigación. Entre ellos destaca una serie de derivados del núcleo de pirrol que han mostrado actividad antituberculosa en diferentes estudios. En concreto, el compuesto BM-212 ha sido identificado como cabeza de serie por presentar unos valores de actividad muy prometedores. Su diana terapéutica es una proteína de transporte específica de la membrana micobacteriana, la proteína MmpL3.

Por otro lado, como trabajo experimental, dado el indiscutible protagonismo de la isoniazida en la terapia antituberculosa, se han sintetizado dos moléculas que presentan en la misma estructura el pirrol y la isoniazida, persiguiendo la obtención de un ligando multidiana. La estrategia sintética que se ha seguido para obtener ambas estructuras ha consistido en la reproducción de un protocolo multicomponente aplicado a la síntesis de Hatzsch de pirroles, seguido de la incorporación del fragmento de isoniazida al anillo de pirrol.

II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

II.1. EPIDEMIA TUBERCULOSA

En 1882, Robert Koch identificó a *Mycobacterium tuberculosis* como el agente responsable de la tuberculosis. La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada a nivel mundial por *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium africanum*, además de *Mycobacterium tuberculosis*. Su forma más característica es pulmonar, pero también

puede presentarse en forma extrapulmonar, afectando a cualquier órgano o tejido del cuerpo humano.

La enfermedad se transmite por el aire cuando pacientes enfermos de tuberculosis expulsan los bacilos en secreciones procedentes del tracto respiratorio, como, por ejemplo, al toser. En general, sólo un pequeño porcentaje de las personas infectadas por *Mycobacterium tuberculosis* desarrollan la enfermedad, y existen diferentes factores que favorecen su desarrollo; entre ellos, la infección por VIH supone un elevado riesgo de reactivación.

Cuando se produce la infección, existe una primera fase o tuberculosis primaria en la que los microorganismos son fagocitados por los macrófagos en los pulmones, donde sobreviven a los procesos antimicrobianos normales, produciendo una pequeña lesión en el pulmón. Es frecuente que, transcurridos unos meses, la lesión inicial sea controlada por la respuesta inmune; sin embargo, la bacteria puede quedar latente en esa pequeña lesión, pudiendo permanecer toda la vida sin que el paciente llegue a desarrollar la enfermedad. Si existen factores que favorezcan un descenso de la respuesta inmunitaria, las lesiones tuberculosas pueden formar cavernas tuberculosas, desde donde el microorganismo se disemina a nuevos focos de infección por todo el cuerpo; la formación de cavernas en el árbol bronquial es responsable de la salida de gran cantidad de bacterias con la tos.¹⁻³

En 1993, la OMS declaró la tuberculosis un problema mundial de salud pública. Es la segunda causa de mortalidad a nivel mundial, por detrás del VIH, y se estima que un tercio de la población mundial está infectada.

Además, en las últimas décadas se ha observado un sinergismo generalizado de *Mycobacterium tuberculosis* junto con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y esta asociación entre VIH y tuberculosis es responsable de un incremento significativo de morbimortalidad.

Según los últimos datos del Informe Mundial sobre la Tuberculosis de la OMS (2014), en 2013 se produjeron alrededor de 9 millones de casos nuevos de tuberculosis, y 1,5 millones de muertes. Además, se estima que alrededor de 1,1 millones (13%) de los 9 millones de casos nuevos son pacientes VIH positivos.²

Esta situación refleja las limitaciones en las estrategias de tratamiento actuales, y la limitada eficacia de los sistemas de salud públicos, especialmente en países en vías de desarrollo.

II.2. TERAPIA ANTITUBERCULOSA DISPONIBLE

Los objetivos de la terapia antituberculosa son la eliminación rápida de los bacilos y la prevención de las recaídas.

Los fármacos antituberculosos guardan entre sí muy poca relación en su estructura o en su mecanismo de acción, a lo que puede atribuirse la eficacia de la administración combinada. Atendiendo a su valor terapéutico, se dividen en dos grandes grupos:^{2, 4}

	Fármaco	Diana celular
Primera línea	Isoniazida	Síntesis de ác. micólicos de la pared celular
	Rifampicina	Síntesis de ARN (ARN-polimerasa)
	Etambutol	Síntesis de arabinogalactanos de pared celular
	Pirazinamida	Síntesis de ATP y generación de energía
	Estreptomina	Síntesis de proteínas (ribosoma 30S)
Segunda línea	Kanamicina, amikacina	Síntesis de proteínas (ribosoma 30S)
	Gatifloxacino, moxifloxacino	Síntesis de ADN (ADN-girasa)
	Capreomicina	Síntesis de proteínas (ribosoma 30S)
	Etionamida	Síntesis de ác. micólicos de la pared celular
	Ác. <i>p</i> -aminosalicílico	Metabolismo del ácido fólico
	Clicloserina	Síntesis de peptidoglicano de la pared celular
	Rifabutina, rifapentina	Síntesis de ARN (ARN-polimerasa)

Mycobacterium tuberculosis, por sus características singulares, como capacidad de latencia, tasa de crecimiento lento, complejidad de la cubierta celular y patogenia intracelular, y su capacidad para desarrollar resistencias frente a los antibióticos más fuertes, supone una gran amenaza para los tratamientos disponibles para combatir la enfermedad.⁵

En los últimos años se ha observado un incremento en la aparición de resistencias frente a los fármacos de primera línea isoniazida y rifampicina, con las llamadas cepas multirresistentes (MDR-TB), y de cepas extremadamente

multirresistentes (XDR-TB), que se definen como resistentes a isoniazida y rifampicina, más alguna fluoroquinolona y, al menos, uno de los fármacos de segunda línea.⁶

El tratamiento recomendado hoy en día para los casos de tuberculosis no resistente a fármacos consiste en la administración combinada de isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol durante 6 meses.² Sin embargo, aunque los resultados son altamente eficaces en condiciones de ensayo y cuando la adherencia de los pacientes es óptima, en condiciones reales los resultados están lejos de los ideales.

El primer problema que se presenta es que el tratamiento de la tuberculosis no resistente a fármacos tiene una larga duración, causando problemas en la adherencia de los pacientes. Cuando el tratamiento no se administra en condiciones óptimas, puede ser responsable de la aparición y cronificación de casos de tuberculosis resistente a fármacos.

En segundo lugar, los pacientes con tuberculosis multirresistente y extremadamente multirresistente necesitan una combinación de 8 a 10 fármacos antituberculosos de segunda línea, de menor efectividad, mayor toxicidad y mayor coste que los tratamientos estándar.

Un tercer problema es la co-infección de tuberculosis con VIH, que complica bastante la elección de un tratamiento adecuado por varias razones: en primer lugar, aumenta la cantidad de medicamentos que el paciente debe tomar, disminuyendo el cumplimiento terapéutico; en segundo lugar, las interacciones entre fármacos antituberculosos y antirretrovirales conducen a concentraciones subterapéuticas de antirretrovirales; y, por último, el solapamiento de los efectos adversos de ambos incrementa los problemas de seguridad. La principal interacción que se produce entre fármacos antituberculosos y antirretrovirales se explica por un aumento en la expresión del sistema CYP450, inducido por la rifampicina, que se traduce en un incremento del metabolismo y, por tanto, en una disminución de los niveles plasmáticos de algunos antirretrovirales, como los inhibidores de la proteasa.

En cuarto lugar, a pesar de la terapia antituberculosa disponible desde hace más de medio siglo, un tercio de la población asintomática es portadora de una forma latente de *Mycobacterium tuberculosis*, que presenta un elevado riesgo de reactivación a lo largo de la vida. La reactivación de la tuberculosis latente es el mayor factor de riesgo

para el desarrollo de la enfermedad, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, como aquellos co-infectados por el VIH.

De este modo, para lograr un control de la tuberculosis a nivel mundial, es necesario el desarrollo de nuevos fármacos antituberculosos más potentes que los fármacos existentes, con un buen perfil de seguridad, capaces de reducir la duración y simplificar el tratamiento, eficaces frente a cepas multirresistentes y extremadamente multirresistentes, compatibles con fármacos antirretrovirales, y que actúen en los distintos estados fisiológicos y replicativos de *Mycobacterium tuberculosis* para el tratamiento de la tuberculosis latente.^{6, 7}

II.3. NUEVOS FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS EN DESARROLLO

En febrero del año 2000, representantes de diversas entidades universitarias, industrias, organizaciones gubernamentales y no gubernamentales, y contribuyentes, se reunieron en Sudáfrica para analizar la situación de crisis a la que se enfrentaban los tratamientos antituberculosos disponibles y el desolador panorama en el que se encontraba el desarrollo de nuevos fármacos antituberculosos. Como resultado, se constituyó una Alianza Global para el Desarrollo de Fármacos Antituberculosos (Global Alliance for TB Drug Development), que contaba con el acuerdo de un gran número de colaboradores para desarrollar y autorizar nuevos y prometedores fármacos antituberculosos.

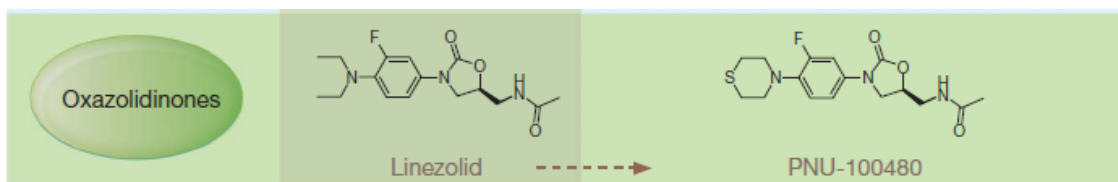
Después de varias décadas de práctica inactividad en el desarrollo de fármacos antituberculosos, el panorama está siendo revitalizado con nuevos compuestos en diversas etapas de investigación.

Las estrategias que han conducido al desarrollo de nuevos compuestos incluyen, por un lado, la modificación estructural de fármacos ya existentes, empleados en el tratamiento de infecciones bacterianas, para mejorar su actividad antimicobacteriana y sus propiedades farmacocinéticas (estrategia 1), y, por otro, el descubrimiento de nuevos fármacos con actividad antituberculosa (estrategia 2).⁷⁻⁹

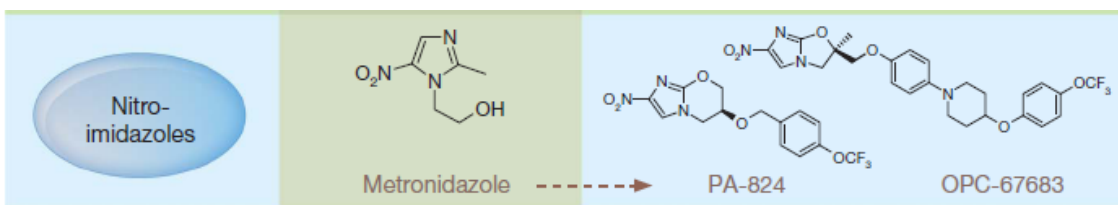
Estrategia 1

Muchas de las nuevas moléculas candidatas son moléculas rediseñadas a partir de antibióticos ya existentes para mejorar su actividad antimicobacteriana.

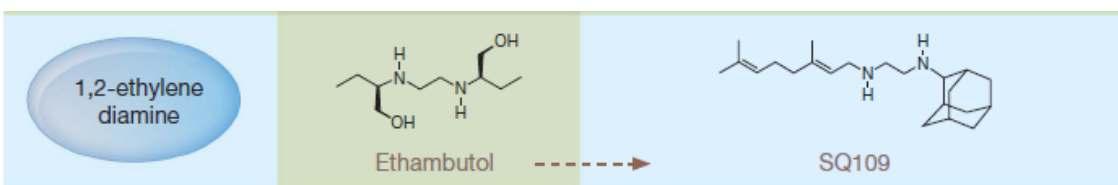
Un ejemplo son las oxazolidinonas, como el linezolid, un antibiótico desarrollado para las infecciones causadas por bacterias Gram positivas, que mostró actividad antituberculosa. La modificación de la estructura de las oxazolidinonas ha conducido a nuevas estructuras, como PNU-100480, que actúa por inhibición de la síntesis de proteínas mediante su unión a la subunidad ribosómica, impidiendo así la formación del complejo ribosómico.



Los nitroimidazoles, como el metronidazol, tradicionalmente empleado en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias anaerobias y parásitos, representan otra estructura sobre la cual se han llevado a cabo diferentes modificaciones para mejorar su actividad antimicobacteriana. Dos nuevas moléculas candidatas de este grupo son PA-824 y OPC-67683. Los nitroimidazoles presentan una particularidad relacionada con su mecanismo de acción, pues imitan los mecanismos de defensa naturales del hospedador mediante la producción de moléculas microbicidas, como óxido nítrico y otros intermediarios nitrogenados reactivos, que producen lesiones sobre múltiples dianas, incluyendo la cadena respiratoria.



También han surgido nuevas moléculas candidatas por modificación de la estructura de las 1,2-etilendiamidas, como el etambutol. Un ejemplo es la molécula SQ-109, que ha mostrado actividad antimicobacteriana resultado de la inhibición de la síntesis de la pared celular, aunque por un mecanismo diferente al etambutol.^{6, 7, 9}



Estrategia 2

El descubrimiento de nuevos fármacos a partir de las dianas disponibles ha tenido un éxito limitado en la terapia antimicrobiana en general; una molécula que inhiba específicamente una diana esencial puede fracasar al no poder ser formulada en un compuesto capaz de atravesar la pared celular, o al presentar problemas de asimilación por el organismo humano.⁶

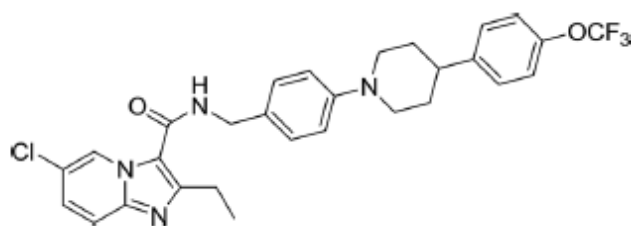
El principal progreso en el descubrimiento de nuevas moléculas activas frente a diferentes dianas celulares se ha logrado gracias un cambio de estrategia, sustituyendo la investigación de moléculas con actividad potencial frente a una diana concreta por la investigación de moléculas con actividad frente a cualquier diana celular.⁷ En este método, se examinan quimiotecas de compuestos para determinar su capacidad de inhibir el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*. De este modo, se pueden reconocer interacciones entre el fármaco y el conjunto de dianas potenciales de la célula bacteriana.

El éxito de esta nueva estrategia se debe en gran parte al conocimiento del genoma completo de *Mycobacterium tuberculosis*, tras su secuenciación en 1998, que ha permitido estudiar el patrón de expresión de un número de genes esenciales en unas condiciones de crecimiento determinadas, y establecer así las dianas potenciales de nuevos compuestos capaces de inhibir el crecimiento bacteriano por medio de la identificación de los genes mutados en cepas resistentes a estos compuestos.⁶⁻⁸

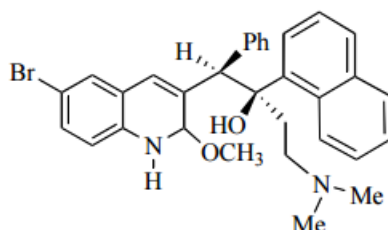
Como resultado, han sido identificadas nuevas dianas celulares, al mismo tiempo que han surgido moléculas candidatas como cabeza de serie de nuevas clases de compuestos.

i. Cadena respiratoria y síntesis de ATP.

En *Mycobacterium tuberculosis* opera una cadena respiratoria en la que una menaquinona es reducida por la NADH deshidrogenasa o succinato deshidrogenasa y oxidada por el complejo citocromo *bc1-aa3* oxidorreductasa. La subunidad *b* del citocromo *bc1-aa3* (QcrB) ha surgido recientemente como nueva diana celular tras el desarrollo de un inhibidor de QcrB, el compuesto Q-203, que ha mostrado actividad antituberculosa.



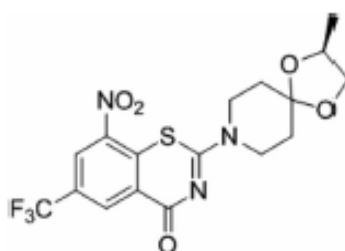
La síntesis de ATP ha sido aceptada como diana terapéutica debido al éxito de la diarilquinolina TMC-207 como inhibidor de la ATP sintasa de la micobacteria.⁶⁻⁹



ii. Enzima DprE1

DprE1 (decaprenilfosforil-beta-D-ribosa-2'-epimerasa) es una enzima implicada en la isomerización de la decaprenilfosforil-beta-D-ribosa en decaprenilfosforil-beta-D-arabinosa, un importante componente de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*.

La benzotiazina BTZ-043 ha surgido como molécula candidata por su potencial actividad antituberculosa como inhibidor de la enzima DprE1, que se traduce en una inhibición de la biosíntesis de arabinanos de la pared celular. El bloqueo de la biosíntesis de la pared celular resulta en lisis celular y muerte de la bacteria.⁶⁻⁸



iii. Proteínas MmpL

Mycobacterium tuberculosis expresa 12 proteínas MmpL (*mycobacterial membrane protein large*) que se encargan de transportar una gran variedad de compuestos aniónicos, catiónicos y neutros, incluyendo fármacos, metales pesados, ácidos grasos, etc., a través de la membrana celular.

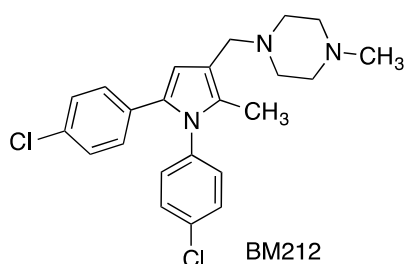
MmpL3 es la única proteína MmpL esencial para el crecimiento, y está implicada en el transporte de ácidos micólicos a la superficie celular a través de la membrana celular y en la resistencia de la micobacteria frente a otros fármacos.⁸

La proteína MmpL3 ha sido identificada como diana celular de diversos compuestos con diferentes estructuras. Entre ellos, el compuesto BM-212, con estructura derivada del núcleo de pirrol, ha sido identificado como cabeza de serie de una nueva clase de compuestos por su potencial actividad antituberculosa, y se ha identificado la proteína MmpL3 como diana celular de esta nueva clase de compuestos.

II.4. AGENTES ANTITUBERCULOSOS DERIVADOS DEL NÚCLEO DE PIRROL

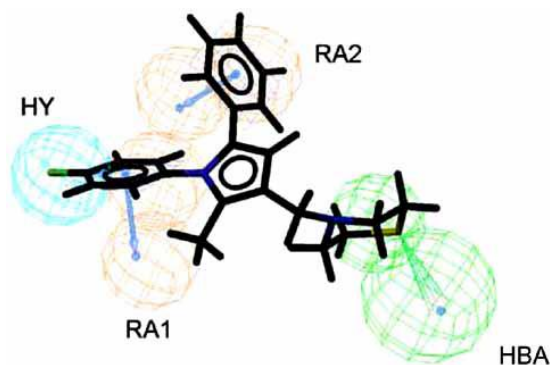
En el pasado, un gran número de derivados del núcleo de pirrol fueron sintetizados por el grupo de Porretta y Biava, en la Universidad de Roma, como análogos de pirrolnitrinas. Estos compuestos mostraron actividad antimicrobiana y antifúngica, y, de acuerdo con una de las estrategias empleadas en el descubrimiento de fármacos antituberculosos anteriormente descritas, fue estudiada su capacidad para inhibir el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*.

De entre todos los compuestos sintetizados, sólo algunos derivados de la estructura 1,5-diarilpirrol mostraron buena actividad antimicobacteriana. El compuesto que mostró mayor actividad, BM-212, se identificó como cabeza de serie de una nueva clase de compuestos y como uno de los futuros fármacos antituberculosos más prometedores. El único inconveniente que presentó fue su toxicidad, lo que promovió el desarrollo de nuevas estructuras con mayor actividad y menor toxicidad.

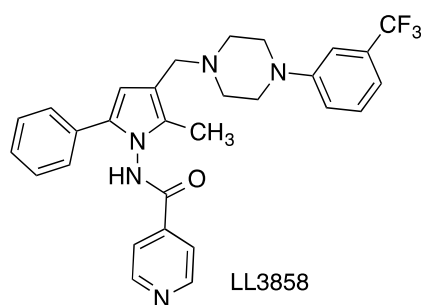


Se diseñó un programa para modificar de manera sistemática el compuesto BM-212, con los objetivos de definir y mejorar las características estructurales responsables de su actividad, sintetizar nuevos compuestos del mismo grupo con actividad antituberculosa, e identificar y caracterizar la diana celular de esta clase de compuestos.

En ausencia de información sobre la diana farmacológica de esta clase de compuestos, se llevó a cabo un estudio de modelos moleculares empleando un método informático que permitiera identificar las características estructurales responsables de la mayor parte de la actividad, así como su disposición en el espacio. Como resultado de este estudio, se construyó un modelo farmacóforo con cuatro características estructurales que consistían en dos grupos aromáticos, un grupo hidrofóbico y un grupo aceptor de hidrógeno.^{10, 11}



En base a este trabajo, se diseñaron diversos análogos del cabeza de serie BM-212.¹² En particular, Lupin Ltd. desarrolló una serie de compuestos con estructura de 1,5-diarilpirrol, de entre los cuales el compuesto LL3858 o sudoterb mostró unos valores de actividad muy prometedores, y se encuentra actualmente en investigación. La particularidad de este compuesto reside en que el sustituyente aromático de la posición 1 se trata de la estructura de la isoniazida, un fármaco de indiscutible protagonismo en la terapia antituberculosa.¹³



A raíz del descubrimiento de esta nueva clase de compuestos derivados del 1,5-diarilpirrol como agentes antituberculosos, se procedió a identificar la diana celular del cabeza de serie, BM-212, para determinar su mecanismo de acción.

Para ello, se evaluó la actividad de BM-212 frente a diferentes especies de micobacterias, y se aislaron y caracterizaron cepas de las diferentes especies que se mostraron resistentes a BM-212. Tras la secuenciación del genoma de estas cepas

resistentes, se descubrió que todas ellas presentaban mutaciones en el gen *MmpL3*, lo que condujo a la conclusión de que mutaciones en este gen eran responsables de la resistencia a BM-212. Estos datos, sumado a que se demostró que la resistencia a BM-212 no se debía a una mejora en los mecanismos de eflujo de fármacos de la micobacteria, supusieron evidencias suficientes para sugerir que la proteína MmpL3 es la diana celular de BM-212.

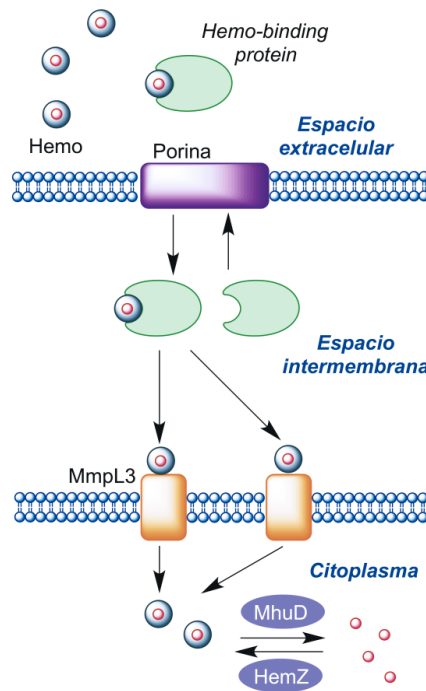
Más adelante, distintos estudios demostraron la implicación de la proteína MmpL3 en la captación de hierro en forma hemo.¹⁴

Mycobacterium tuberculosis, como la mayoría de los organismos vivos, necesita hierro para llevar a cabo sus funciones vitales. La captación de hierro es un reto para la bacteria porque en el hospedador el hierro se encuentra fijado a las proteínas encargadas de su transporte y almacenamiento de hierro y a las hemoproteínas, fundamentalmente la hemoglobina.

La hemoglobina es una proteína que contiene hierro en forma hemo. El grupo hemo se trata de un grupo prostético con un átomo de hierro en su interior, y constituye, por tanto, un importante reservorio de hierro para numerosas bacterias que han desarrollado diferentes vías o sistemas de captación de hierro más eficientes que los del propio hospedador.

Durante una infección por *Mycobacterium tuberculosis*, los eritrocitos son degradados en el interior de los macrófagos, liberando la hemoglobina de su interior, de modo que las micobacterias del interior de los macrófagos pueden acceder a ella. Las formas extracelulares de *Mycobacterium tuberculosis* pueden acceder a la hemoglobina circulante gracias a la producción de hemolisinas que facilitan su liberación de los glóbulos rojos.

Además, *Mycobacterium tuberculosis* secreta una proteína hemófora responsable de la captación del hierro de la hemoglobina, Rv0203. Esta proteína se secreta por un mecanismo desconocido, capta el hierro hemo del medio externo, y lo transporta a través de la membrana externa de la célula hasta el espacio intermembrana. Finalmente, en el exterior de la membrana citoplásmica, Rv0203 transfiere el hierro hemo a la proteína MmpL3, una proteína transmembrana encargada de transportarlo al interior de la célula.¹⁵



III. OBJETIVOS

El presente proyecto se trata de un trabajo teórico-experimental, cuyos objetivos se pueden resumir en dos:

1. Realizar una breve revisión bibliográfica que refleje la situación actual de la epidemia tuberculosa y las terapias antituberculosas disponibles, así como los últimos avances en el descubrimiento de dianas celulares y en el desarrollo de nuevos fármacos antituberculosos, especialmente aquellos con estructuras derivadas del núcleo de pirrol.
2. Reproducir un método de síntesis de pirroles orientado a la obtención de derivados de este tipo de estructuras que, además, incorporen la isoniazida como un fragmento de la molécula, persiguiendo la obtención de fármacos con actividad antituberculosa por un mecanismo multidiana.

IV. METODOLOGÍA

Por medio de la búsqueda en diferentes bases de datos informatizadas se han obtenido varios artículos bibliográficos que se han utilizado para la realización de la introducción de este trabajo. Las bases de datos que han servido para la localización de artículos que fuesen de utilidad en esta revisión bibliográfica son PubMed y SciFinder. También se han utilizado varios libros sobre microbiología y farmacología humanas.

La metodología experimental empleada para la obtención de los resultados de este trabajo ha consistido en reproducir la reacción de síntesis de Hantzsch de pirroles

mediante un método multicomponente que se lleva a cabo en condiciones mecanoquímicas, aplicado a la obtención de estructuras híbridas pirrol-isoniazida con potencial actividad antituberculosa por un mecanismo multidiana.

IV.1. ESTRATEGIA MULTICOMPONENTE APLICADA A LA SÍNTESIS DE HANTZSCH EN CONDICIONES MECANOQUÍMICAS

Las reacciones multicomponente se consideran una estrategia primordial en la búsqueda de procesos sintéticos más eficientes, tanto por su simplicidad experimental como por aspectos económicos, tales como el empleo de materiales de partida sencillos y asequibles, o el ahorro energético. Actualmente, además, son particularmente importantes en el contexto de desarrollo de procesos sintéticos medioambientalmente sostenibles, pues evitan la generación de residuos de disolventes contaminantes.

El término mecanoquímica hace referencia a reacciones producidas mediante energía mecánica, incluyendo la molienda y el molino de bolas, y constituye un campo emergente para la metodología sintética, especialmente interesante para el desarrollo de métodos sintéticos más limpios, pues las reacciones se llevan a cabo en estado sólido, evitando o minimizando el empleo de disolventes.

El pirrol se aisló por primera vez el 1857. Es uno de los anillos heterocíclicos más importantes, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y está presente en numerosos compuestos con actividad farmacológica. A pesar de la existencia de distintos métodos de síntesis que conducen a su estructura, como las reacciones clásicas de Knorr, Paal-Knorr y Hantzsch, su síntesis continúa siendo un reto por las dificultades en la regioselectividad que presentan estas reacciones, y por la pobre estabilidad química de numerosos derivados del núcleo de pirrol.

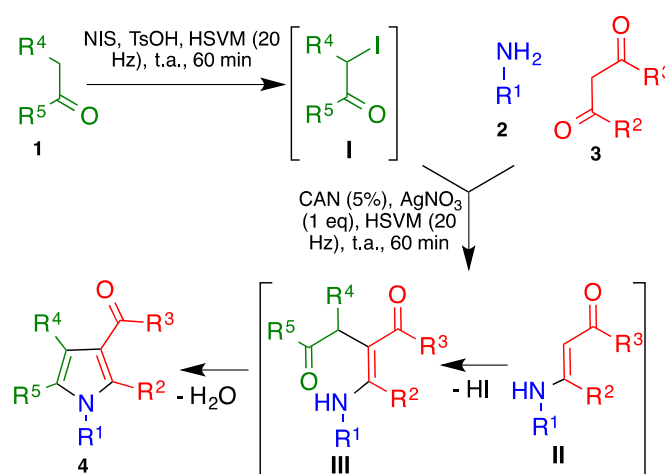
En el contexto de desarrollo de reacciones multicomponente, el grupo de Heterociclos de Interés Biológico (BioHet) de la Universidad Complutense de Madrid ha propuesto un protocolo multicomponente para llevar a cabo la reacción de síntesis de Hantzsch de pirroles. Además, este método se ha desarrollado en condiciones mecanoquímicas, empleando un molino de bolas vibratorio (*high-speed vibration milling*, HSVM).

El molino de bolas se trata de un molino vibratorio horizontal provisto de dos brazos donde se fija el recipiente que contiene la mezcla de reacción. El recipiente está recubierto del mismo material del que está hecha la bola de su interior, óxido de

circonio, que tiene la ventaja de ser inerte y no desprender partículas al medio de reacción.

Aunque el mecanismo de la síntesis de pirroles de Hantzsch no está completamente establecido, se acepta que la etapa inicial consiste en la formación de una enaminona, que después reacciona con una α -halocetona para dar lugar a un intermediario, que finalmente se cicla al producto final.

Como se muestra en la figura, el protocolo multicomponente que ha desarrollado este grupo se inicia con la reacción entre la cetona (**1**) y la N-iodosuccinimida, en presencia de ácido *p*-toluenosulfónico, para dar lugar a la α -yodocetona (**I**). Tras 60 minutos de reacción en el molino de bolas, operando a una frecuencia de 20 Hz, se añade una mezcla de reacción con la amina primaria (**2**), el compuesto β -dicarbonílico (**3**), nitrato de plata y nitrato cérico amónico, como catalizador de la reacción, y se mantiene la reacción una hora más en las mismas condiciones. Como producto final de la reacción se obtiene el pirrol (**4**) con la estructura deseada. Este método se puede adaptar para la preparación de pirroles con diferentes sustituyentes, tanto en el nitrógeno pirrólico, como en las posiciones 2, 3, 4 y 5 del anillo.¹⁶



IV.2. PREPARACIÓN DE HÍBRIDOS PIRROL-ISONIAZIDA

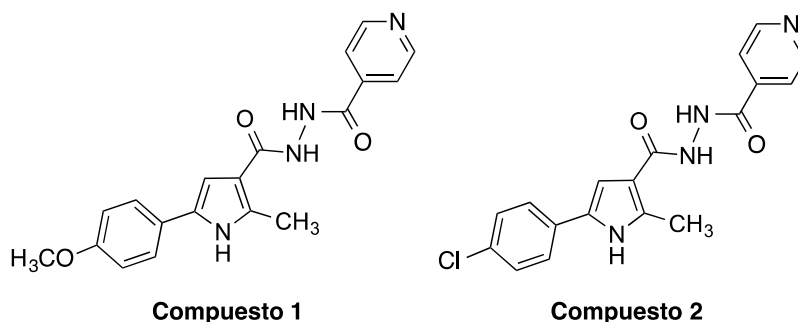
Dado que algunos de los compuestos sintetizados previamente por este grupo mostraban cierta similitud estructural con los compuestos BM-212 y LL-3858, se consideró la posibilidad de ensayar algunos de los más representativos frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Aunque la mayor parte de ellos resultaron inactivos, tres de los compuestos mostraron una actividad prometedora. El más activo de todos ellos se

diseño como análogo de BM-212, e incluía en su estructura anillos aromáticos en las posiciones 1 y 5 del anillo de pirrol, sustituidos a su vez por un átomo de cloro en *para*.

Partiendo de estas conclusiones, se prepararon nuevos derivados de pirrol que reunieran estas características e incorporaran, además, la isoniazida como un fragmento estructural de la molécula, persiguiendo la obtención de fármacos multidiana, es decir, un único ligando o entidad química capaz de reconocer múltiples dianas.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado de la reproducción de esta estrategia multicomponente basada en la síntesis de Hantzsch, seguido de la incorporación del fragmento de isoniazida en la posición 3 de las estructuras derivadas del anillo de pirrol obtenidas, se han sintetizado dos moléculas que presentan una estructura híbrida pirrol-isoniazida.

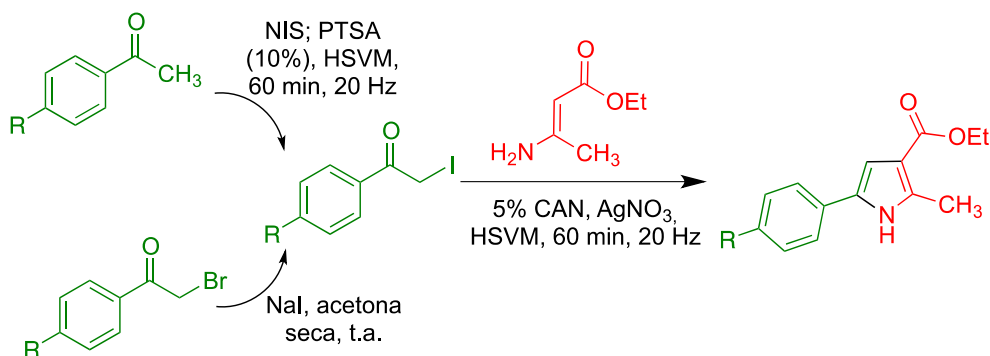


La síntesis de los dos pirroles de partida se realizó mediante una reacción multicomponente llevada a cabo en condiciones mecanoquímicas, empleando el molino de bolas, en ausencia de disolventes. El protocolo que condujo a estas dos estructuras fue muy similar en ambos casos, aunque con pequeñas diferencias en el mecanismo de yodación de las acetofenonas de partida.

En el caso del **compuesto 1**, para la yodación de la correspondiente acetofenona, se partió de *p*-metoxiacetofenona (1 eq) y N-yodosuccinimida (1 eq), en presencia de ácido *p*-toluenosulfónico (0,1 eq), empleando condiciones mecanoquímicas, durante 60 minutos a una frecuencia de 20 Hz.

En el caso del **compuesto 2**, se partió de una α -bromoacetofenona. Sobre una solución de este compuesto (1 eq) en acetona anhidra (20 mL), se adicionó una solución de yoduro sódico (1 eq) en el mismo disolvente (10 mL). Tras agitar durante unos minutos a temperatura ambiente, se observó la formación de un precipitado de bromuro

sódico, que fue eliminado por filtración. Eliminando el disolvente en condiciones de presión reducida, se obtuvo el compuesto deseado.

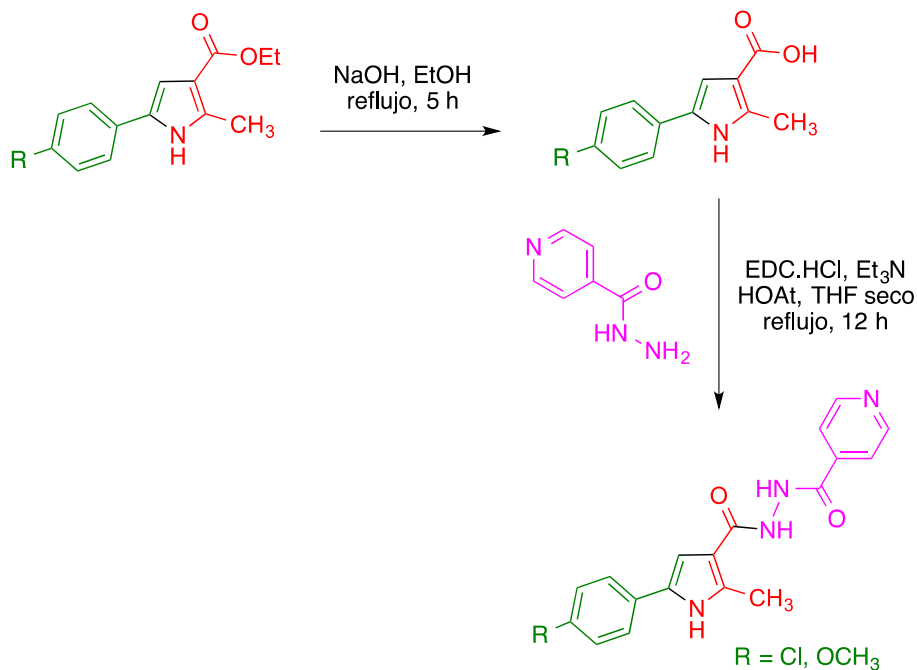


A continuación, para obtener la estructura del pirrol, se hicieron reaccionar en el molino de bolas, bajo las mismas condiciones anteriores, los haluros de fenacilo (1 eq) con etil-2-aminocrotonato (1,5 eq), que se trata una enaminona comercial que sustituye a la amina primaria y el compuesto β -dicarbonílico, nitrato cérico amónico (0,05 eq) y nitrato de plata (1 eq). Para extraer el producto de la reacción del molino de bolas se utilizó acetato de etilo, y el precipitado de yoduro de plata que se formó fue eliminado por filtración. La fase orgánica resultante se lavó con agua para eliminar posibles restos de sales de plata, y se secó con sulfato sódico anhidro. Tras eliminar el disolvente en condiciones de presión reducida, se obtuvo el producto final de la reacción, que fue purificado mediante una columna cromatográfica en sílica gel empleando una mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo como fase móvil.

Obtenida la estructura del pirrol de partida, para acoplar el fragmento de isoniazida en la posición 3 del anillo pirrólico, fue necesario, en primer lugar, hidrolizar la función éster de esta posición. La hidrólisis se llevó a cabo con hidróxido sódico 5M (10 eq) en etanol (3 mL), en condiciones de reflujo durante 5 horas. Finalizada la reacción, se procedió a acidificar el medio de reacción con ácido clorhídrico 1M, obteniéndose así un precipitado con el ácido correspondiente.

Por último, el fragmento de isoniazida se introdujo empleando metodología de síntesis de péptidos, utilizando reactivos de acoplamiento para la activación del grupo ácido, en concreto 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI.HCl) y 1-hidroxiazabenzotriazol (HOAt). Sobre una solución del pirrol correspondiente (0,5 eq) e isoniazida (1 eq) en THF anhidro (3 mL), se añadieron trietilamina (2 eq) y EDCI.HCl (1 eq) y HOAt (1 eq). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 12 horas y, finalizada la reacción, se eliminó el disolvente en condiciones de presión reducida.

Sobre producto sólido de la reacción se añadió cloroformo, formándose un precipitado con la hidrazida prevista, que fue recristalizado en etanol.



VI. CONCLUSIONES

1. Se ha realizado una revisión bibliográfica de la situación actual de la tuberculosis y de la terapia actualmente disponible para su tratamiento, así como de los nuevos fármacos que están siendo desarrollados y las nuevas dianas celulares que se han identificado hasta el momento.
2. En esta revisión destacan nuevos agentes antituberculosos con estructuras derivadas del núcleo de pirrol que han mostrado una actividad muy prometedora y que, además, presentan un mecanismo de acción novedoso ya que su diana es una proteína de la membrana de la micobacteria, MmpL3, esencial para el transporte de hierro al interior de la misma.
3. Se ha llevado a cabo la preparación de dos derivados de pirrol que incluyen en su estructura un fragmento de isoniazida con el objetivo de obtener compuestos con potencial actividad antituberculosa por un mecanismo multidiana (acción sobre dos dianas celulares diferentes).
4. Durante la realización del presente trabajo se han adquirido las habilidades y la destreza para el trabajo rutinario en síntesis, otras técnicas básicas de laboratorio (resonancia magnética nuclear, espectroscopía infrarroja), así como para el trabajo en equipo.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woolverton, C. J. Microbiología de Prescott, Harley y Klein. 7a ed. Madrid: McGraw-Hill; 2009.
2. WHO. Global Tuberculosis Report 2014.
3. Prats, G. Microbiología y Parasitología Médicas. 1ª ed. Madrid: Panamericana; 2012.
4. Mediavilla, A., García-Lobo, J. M., Flórez, J. Farmacología de las infecciones por micobacterias. En: Flórez J. Farmacología Humana. 6a ed. Barcelona: Elsevier; 2014. p. 20144-1054.
5. Singh, A., Budhraj, A., Shrivastava, A., Satyavana, A., Gupta, A., Gupta, M., Wadhwa, G., Sharma, S. K., Jain, C. J. Current Status of Anti-Tuberculosis Therapy: A Patent Analysis. *Recent. Pat. Anti-infec. Drug Discov.* 2014; 9: 25-40.
6. Koul, A., Arnoult, E., Lounis, N., Guillemont, J., Andries, K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature.* 2011; 469: 483-489.
7. Zumla, A. I., Gillespie, M. H., Hoelscher, M., Philips, P. P. J., Cole, S. T., Abubakar, I., McHugh, T. D., Schito, M., Maeurer, M., Nunn, A. J. New tuberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. *Lancet Infect. Dis.* 2014; 14: 327-340.
8. Mdluli, K., Kaneko, T., Upton, A. Tuberculosis drug discovery and emerging targets. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2014; 1323: 56-75.
9. Leibert, E., Rom, W. N. New drugs and regimens for treatment of TB. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2010; 8: 801-8013.
10. Biava, M., Porretta, G. C., Manetti, F. New Derivates of BM212: A Class of Antimycobacterial Compounds Based on the Pyrrole Ring as a Scaffold. *ChemMedChem.* 2007; 7: 65-78.
11. Biava, M., Porretta, G. C., Poce, G., Battilochio, C., Alfonso, S., de Logu, A., Manetti, F., Botta, M. Developing Pyrrole-Derived Antimycobacterial Agents: a Rational Lead Optimization Approach. *ChemMedChem.* 2011; 6: 593-599.
12. Pagadala, L. R., Mukkara, L. D., Singireddi, S., Singh, A., Thummaluru, V. R., Jagarlamudi, P. S., Guttala, R. S., Perumal, Y., Dharmajan, S., Upadhyayula, S. M., Ummanni, R., B., Basireddy, V. S. R., Ravirala, N. Design, synthesis and anti-

mycobacterial activity of 1,2,3,5-tetrasubstituted pyrrolyl-N-acetic acid derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 2014; 84: 118-126.

13. Spigelman, M. K. New Tuberculosis Therapeutics: A Growing Pipeline. *The J. Infec. Dis.* 2007; 196: 28-34.

14. La Rosa, V., Poce, G., Canseco, J. O., Buroni, S., Pasca, M. R., Biava, M., Raju, R. M., Porretta, G. C., Alfonso, S., Battilocchio, C., Javid, B., Sorrentino, F., Loerger, T. R., Sacchetti, J. C., Manetti, F., Botta, M., De Logu, A., Rubin, E. J., De Rossi, E. MmpL3 Is the Cellular Target of the Antitubercular Pyrrole Derivative BM212. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56: 324-331.

15. Fang, Z., Sampson, S. L., Warren, R. M., Gey van Pittius, N. C., Newton-Foot, M. Iron acquisition strategies in mycobacteria. *Tuberculosis.* 2015; 95: 123-130.

16. Estévez, V., Villacampa, M., Menéndez, J. C. Three-component access to pyrroles promoted by the CAN-silver nitrate system under high-speed vibration milling conditions: a generalization of the Hantzsch pyrrole synthesis. *ChemComm.* 2013; 49: 591-593.