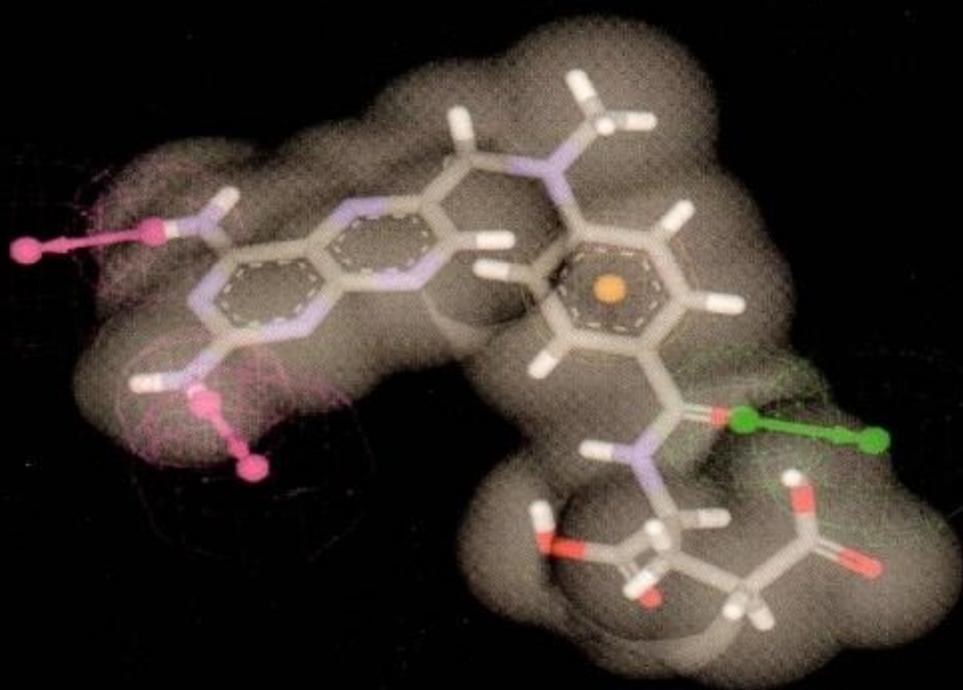


CARMEN AVENDAÑO LÓPEZ

# EL PODER DE LA QUÍMICA

Cómo se transforma la información  
a nivel molecular en fármacos  
innovadores



INSTITUTO DE ESPAÑA

## Prólogo

El científico vive recluido en un mundo particular del que apenas sale para opinar de otro tema que no sea el suyo. Hablar de diversos temas con carácter general suele quedar reservado a los profesores o a los divulgadores, los cuales son poco considerados por sus propios colegas. Sin embargo, la divulgación de la ciencia y de los resultados de la investigación no debe estar circunscrita a las enseñanzas universitarias, y así lo entiende el Instituto de España al programar diversos cursos dentro de sus actividades. En éste, se ha pretendido resaltar el papel de la química en el complejo proceso de investigación y desarrollo de fármacos innovadores.

La divulgación de la química no es una tarea fácil, especialmente por el necesario empleo de un lenguaje basado en estructuras. Pero si hay un campo de aplicación de esta ciencia que merece la pena ser divulgado, es su aportación al entendimiento a nivel molecular de los procesos básicos de la vida y de la enfermedad, así como de la actuación de los fármacos y de las distintas aproximaciones que se utilizan en su diseño y desarrollo. En este curso se han seleccionado algunos ejemplos como pretexto para insistir en estas ideas.

Madrid, diciembre de 2002

CARMEN AVENDAÑO LÓPEZ

# El Poder de la Química

## 1. LA QUÍMICA DE LOS FÁRMACOS Y LA QUÍMICA DE LA VIDA

La magnitud de las contribuciones de la química al bienestar de la sociedad se refleja en el lema que utiliza la empresa norteamericana Du Pont: «Una mejor calidad de vida gracias a la química». Una de estas contribuciones son los **fármacos**.

El ser humano es en gran parte química, ya que es el resultado de las interacciones entre moléculas y átomos. La nutrición, el metabolismo, la transmisión entre las neuronas, la enfermedad y el envejecimiento, son química. Incluso nuestros estados de ánimo son química. Los procesos de interacción de los fármacos con biomoléculas, que tienen como resultado su actividad terapéutica, también son químicos. Lo que ocurre es que todavía desconocemos una gran parte de la **química de la vida**.

Paradójicamente, la vida y la química se utilizan con frecuencia como ideas contrapuestas, teniendo la química un sentido peyorativo. Se habla de lo «natural» frente a lo «químico». «Esto tiene química» equivale a decir que contiene algo artificial y, en consecuencia, nocivo. Últimamente se ha creado la conciencia de que lo «natural» puede alterarse como consecuencia de la implantación y el desarrollo creciente de la Biotecnología, y a veces nos alarman las consecuencias que tiene para la salud

y el medio ambiente la sobreexplotación de los recursos naturales en aras del beneficio económico. Es indudable que el ciudadano está necesitado de una información precisa y veraz, al mismo tiempo que asimilable.

Un fármaco es una molécula que produce un determinado efecto biológico. También puede denominarse «principio activo». La transformación de un fármaco en **medicamento** requiere que éste supere numerosos ensayos preclínicos y que, presentado en una forma farmacéutica: comprimido, inyectable, aerosol, etc., demuestre su seguridad y eficacia en una serie de ensayos clínicos. Son las autoridades sanitarias las que toman la decisión final de incorporarlo o no al arsenal terapéutico.

Los fármacos deberían originarse en un **trasvase de conocimientos desde la biología a la química**. La Biología Molecular, la Genómica y la Proteómica están originando una enorme cantidad de información en los últimos años que resulta especialmente relevante para entender las enfermedades a nivel molecular y discriminar a qué biomoléculas deben dirigirse los fármacos para que resulten selectivos y eficaces. A estas biomoléculas se les llama **dianas farmacológicas**.

Cuando se conoce cuál es la diana a la que debe dirigirse un fármaco, la química debe diseñarlo y crearlo, terminando el proceso con la vuelta de nuevo a la vida para ensayar si el objeto creado cumple los objetivos para los que se diseñó y desarrolló. La biología, en su sentido más amplio, debe señalar cuál es el problema a resolver a nivel molecular y la química debe utilizarse como una herramienta capaz de incorporar al sistema la pieza que faltaba o de impedir que se produzcan determinados acontecimientos.

Aunque existen cada vez más fármacos originados por procedimientos biotecnológicos, al margen de la química, hoy siguen comercializándose muchos fármacos innovadores que se han producido gracias a la química. El desarrollo de la Química ha sido menos espectacular que el de la Biología y por eso los propios químicos la califican de «herramienta». Este curso pretende **darle valor a la Química dentro de la investigación y desarrollo de nuevos fármacos**.

Pasaremos muy brevemente por la historia de la química, a fin de conocer cómo han surgido los fármacos dentro de los productos manufacturados [1][2].

## 2. LA QUÍMICA APLICADA A LOS PRODUCTOS MANUFACTURADOS

Sólo los químicos suelen reconocer que gran parte de los objetos que hoy nos rodean o sus componentes son materiales producidos por la química, muchos de los cuales están formados por moléculas orgánicas.

Sorprendentemente, la química era muy popular cuando en el siglo XVIII estaba lejos de ser una ciencia, pero se percibían los beneficios que podía proporcionar a la medicina y a la tecnología. Los estudiantes acudían en masa a las clases que se impartían en ciudades como Glasgow, Edimburgo o París, por citar algunos ejemplos.

William Cullen, un profesor de Edimburgo, decía a sus alumnos en 1766: «La química es el arte de separar los cuerpos mixtos en sus partes constitutivas y de combinar distintos cuerpos, o partes de cuerpos, en nuevos mixtos con vistas a satisfacer los propósitos tanto de la filosofía, mediante la explicación de la composición y propiedades de los cuerpos, como de las artes aplicadas»... «Siempre que un oficio requiera una materia dotada de ciertas propiedades físicas específicas, es la filosofía química la que nos informa de los cuerpos naturales que poseen esas propiedades o las induce en cuerpos que no las poseían previamente, o produce nuevos cuerpos dotados de las propiedades que se necesitan».

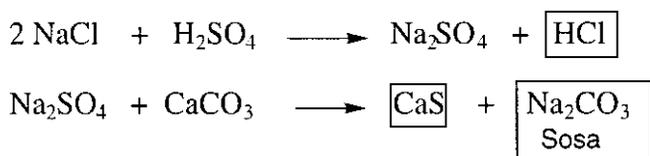
Estas palabras son válidas después de casi tres siglos para aplicarlas al diseño y producción de fármacos, pudiendo afirmarse que *debemos tratar de pensar químicamente sobre los fármacos y su actividad terapéutica*.

Volviendo al siglo XVIII, la popularidad de que gozaba la química puede entenderse teniendo en cuenta que antes de que Lavoisier estableciera sus cimientos como ciencia en las décadas de 1770 y 1780, ya

estaba revolucionando la tecnología proporcionando beneficios a la agricultura, la minería y la industria textil.

La principal industria química hasta bien avanzado el siglo XIX fue la industria de los «álcalis» o de la «sosa» (carbonato sódico). Ésta era una materia prima indispensable para la fabricación del vidrio, el papel y el jabón, así como en las operaciones de blanqueado y teñido de tejidos. Se producía a partir de las sales alcalinas contenidas en las **cenizas de la barrilla** (*Halogen sativus*), una planta quenopodiácea de tallo lampiño y hojas crasas y blanquecinas que crece en terrenos salitrosos de la región mediterránea y Asia central. Durante el siglo XVIII España abasteció a Europa de este producto, siendo especialmente apreciada la «barrilla de Alicante».

Al descubrirse que la sosa compartía la misma base (hoy diríamos catión) que la sal común (cloruro sódico), acabó por transformarse ésta mediante un tratamiento con ácido sulfúrico (que se obtenía a su vez por ignición de azufre y nitrato potásico y posterior disolución en agua de los vapores así producidos) en sal de Glauber (sulfato sódico), y esta nueva sal se sometía finalmente a un proceso de carbonatación para dar sosa.

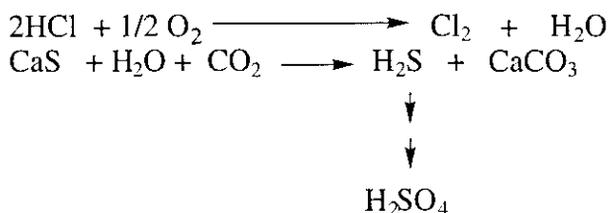


Así como el consumo de jabón medía el grado de civilización de una nación, la cantidad de ácido sulfúrico que se fabricaba en ella indicaba su prosperidad comercial. Pero la **prosperidad tenía un precio elevado** ya que la baja productividad del procedimiento que hemos comentado suponía un gran despilfarro de materiales y de trabajo. La industria de la sosa implicaba además **penosas condiciones de trabajo**, como nos describen las estremecedoras novelas de Dickens y Zola, y provocaba un fuerte **impacto en el medio ambiente**, siendo especialmente temible la lluvia de ácido clorhídrico que caía sobre los terrenos de cultivo y el sulfuro

cálcico, que era el otro residuo del proceso de la obtención de sosa, porque con la lluvia se transformaba en ácido sulfhídrico.

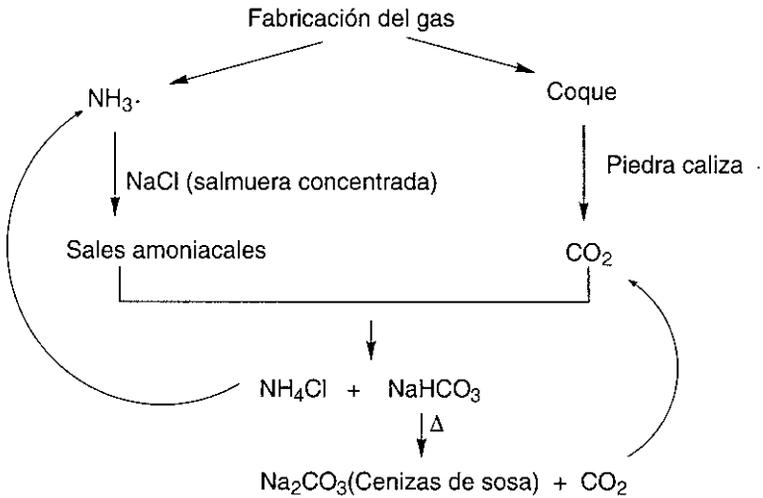
En 1866 se desarrolló la transformación del cloruro de hidrógeno en  $\text{Cl}_2$ , antes de que aquél pasara a la atmósfera. El cloro así producido se utilizaba como agente blanqueador.

En 1882 se puso en marcha un proceso para descomponer el sulfuro cálcico en carbonato cálcico y ácido sulfhídrico, el cual se reciclaba a través de su oxidación a ácido sulfúrico. De esta forma se resolvió en gran medida el impacto de la industria de la sosa sobre el medio ambiente.



Con la «tarta de sosa» ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) se fabricaba el vidrio; la mezcla de  $\text{Cl}_2$  más cal viva ( $\text{CaO}$ ) constituía los polvos de blanquear para la industria del algodón; de las «cenizas de sosa» ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) se obtenía el bicarbonato sódico utilizado en medicina y en panadería, y de las «cenizas de sosa» más la «cal apagada» [ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ] se obtenía la «sosa cáustica» que se usaba en la fabricación del papel y el jabón.

Fue la búsqueda de nuevos y mejores métodos para producir sosa la que motivó que surgiera la **ingeniería química**, pues era necesario trasladar los nuevos procedimientos de laboratorio a la fabricación en gran escala. Por ejemplo, a pesar de que la posibilidad de obtener sosa a partir de las sales de amonio se conocía desde 1810, sólo cuando se encontraron hornos y procesos adecuados para la eliminación y recuperación de los residuos de dichos procesos se pudieron aplicar a las nuevas fábricas. Uno éstos fue el método Solvay, que utilizaba como materia prima el amoniaco y el coque procedentes de la fabricación del gas del alumbrado:



### 3. LA INDUSTRIA DE LOS COLORANTES

Debe decirse que aunque en el siglo XVII los alquimistas empezaron a ser relegados debido al progreso y difusión de las ciencias, todavía hicieron descubrimientos importantes, particularmente en el ámbito de los colorantes y mordientes. Los nuevos químicos que les sucedieron siguieron interesados en la búsqueda de nuevos colorantes a partir de distintos minerales durante todo el siglo XVIII, como prueba la publicación de Berthollet titulada «Elementos del arte de la tintura» [3].

En 1850 se importaban de sus lugares de origen grandes cantidades de drogas y de alcaloides (opio, morfina, quinina y cocaína, por ejemplo), pero era impensable su síntesis porque no se conocía su estructura química. De igual manera, todos los colorantes naturales, cuya estructura tampoco se conocía, se obtenían de **fuentes naturales**. Dado que el color de los vestidos se consideraba un síntoma de distinción, su industria y comercio eran un enorme negocio tras la entrada de la clase media en la sociedad de consumo.

En el siglo XIX la industria del gas del alumbrado producía una gran cantidad de alquitrán de hulla. Este residuo encontró su primera

aplicación en la conservación de las traviesas de madera del ferrocarril para evitar que éstas se pudrieran con la lluvia. Hay que señalar que antes de esta aplicación del alquitán, la fiebre del ferrocarril había ocasionado en América la tala de grandes bosques, lo que constituye un ejemplo de cómo una industria química puede favorecer la conservación del hábitat natural.

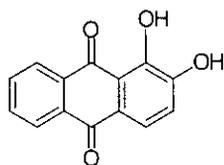
**Hofmann** (1818-92) acometió el estudio químico del alquitrán de hulla y de sus derivados aislando en 1843 un compuesto al que se denominó **anilina**. Después también se aislaron del alquitrán de hulla el **fenol**, el **benceno** y sus **análogos**. Estos últimos encontraron una aplicación inmediata como **disolventes**, pero el fenol demostró tener **propiedades desinfectantes**, por lo que se utilizó en la higiene de las alcantarillas, se incorporó a los jabones, y en 1867 **Lister** lo empleó por primera vez como desinfectante quirúrgico. Desde entonces, el fallecimientos de miles de mujeres por fiebres puerperales disminuyó de forma drástica.

La palabra anilina deriva de **añil**, un colorante azul que se extraía tradicionalmente de dos plantas: el glasto (*Isatis tinctoria*) y el índigo (*Indigofera tinctoria*). La relación de la anilina con los colorantes surgió cuando **Perkin** (1838-1907) intentó en 1856 sintetizar quinina (el principio antimalárico de la corteza de quina) a partir de un derivado de anilina. En esta experiencia obtuvo, en vez de quinina, un precipitado negro que tiñó de violeta el paño que utilizaba para la limpieza de la mesa de laboratorio. Aunque tenía sólo 18 años, fue suficientemente perspicaz como para solicitar y empezar a explotar la patente de este colorante orgánico, al que denominó **malveína**. A partir de este momento, muchos químicos sometieron la anilina a todo tipo de reactivos y se confirmó que los colorantes sintéticos podían tener un gran mercado.

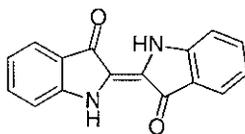
Las patentes acerca de la síntesis de colorantes se sucedieron a ritmo creciente conforme se explotaban las reacciones orgánicas que empezaban a conocerse, aunque se careciera de una base racional para su interpretación. Esta racionalización fue posible con el **desarrollo de la Química Orgánica Estructural** que surgió con **Kekulé** (1829-1896), un químico alemán cuyo interés por la arquitectura le motivó a formular es-

estructuras para las cadenas hidrocarbonadas y, especialmente, para el benceno, cuya estructura propuso en 1865.

En 1869 Caro y Perkin presentaron sendas patentes sobre la síntesis de **alizarina**, un colorante que se extraía hasta entonces de la rubia (*Rubia tinctorium*).

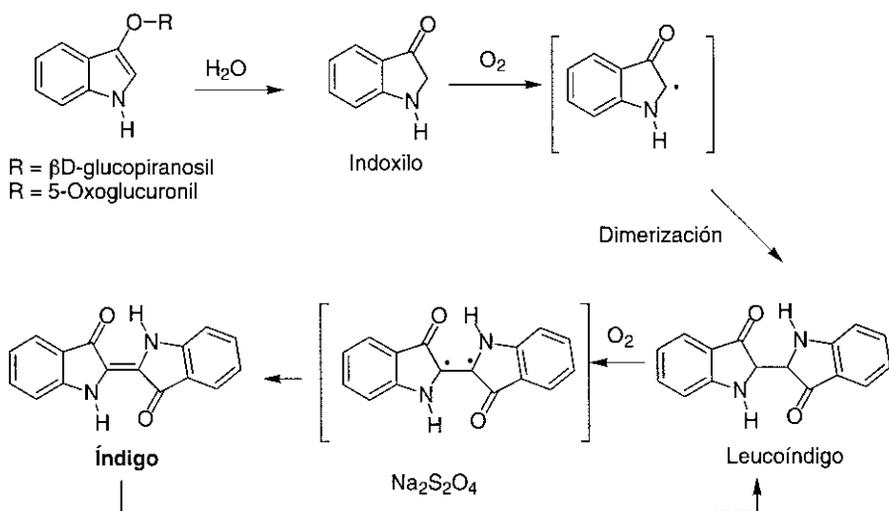


Alizarina



Índigo

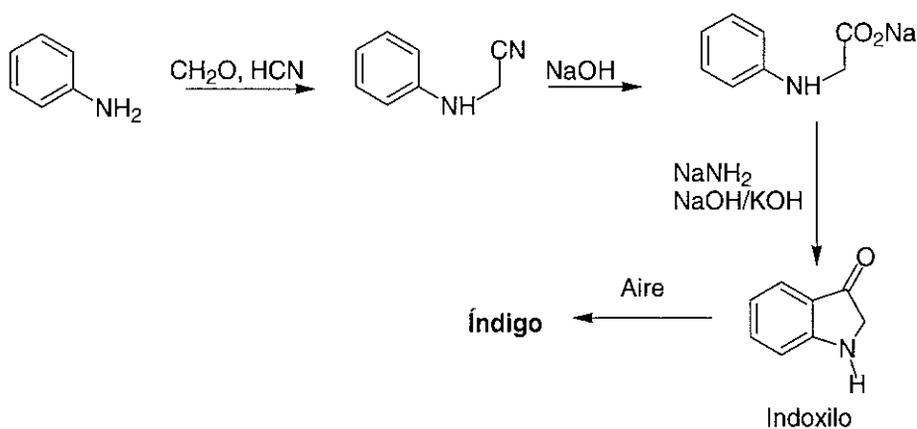
Como tantas veces ocurre con los avances técnicos, el éxito de la síntesis industrial de la alizarina fue un desastre para los agricultores que se dedicaban al cultivo de esta planta. Después de la alizarina le llegó el turno al índigo. El color de este compuesto se debe a la presencia en su estructura de una doble función de lactama viníloga [4].



En realidad, el índigo no se encuentra como tal en las plantas, sino en forma de derivados O-sustituidos del indoxilo. La hidrólisis de éstos

produce indoxilo, el cual se oxida al aire a través de radicales libres para dimerizarse a leucoíndigo y, finalmente, oxidarse a índigo. Hay que tener en cuenta que el radical indoxilo es relativamente estable por ser de tipo captodativo, ya que posee en  $\alpha$  un grupo carbonilo aceptor de electrones y un grupo amino donador de electrones.

Baeyer demostró en 1870, que el índigo podía sintetizarse partiendo de distintos compuestos, y vendió los derechos de su proceso a la empresa alemana BASF («Badische Anilin und Soda Fabrik»). Aunque su procedimiento no pudo aplicarse a gran escala, pronto se encontró otro método más simple que utilizaba el ácido antranílico como materia prima para la fabricación del índigo. El comienzo de su síntesis industrial en 1890 supuso el inicio de la decadencia del índigo natural, que finalmente terminó arruinando las explotaciones inglesas de la India. De los muchos métodos de síntesis comerciales de este colorante resulta muy eficaz el que parte de anilina, formaldehído y ácido cianhídrico [5].

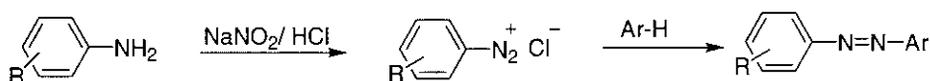


En la misma época también se crearon en Inglaterra algunas fábricas para la producción de colorantes y de sustancias químicas refinadas que se empleaban en diferentes industrias, como el pirogalol y el colodión, que se utilizaron en los inicios de la fotografía o encontraron utilidad farmacéutica.

En 1878 Roussin obtuvo el primer colorante azoico capaz de teñir la lana en color rojo, pero fue Hofmann quien descubrió su estructura, pu-

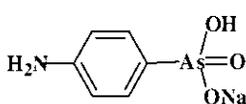
blicó su modo de fabricación, e hizo posible que las fábricas alemanas lanzaran al mercado colorantes rojos a tan buen precio que echaron por tierra a otra costosa materia prima: la cochinilla, un parásito del que se extraía la «grana» desde varios siglos antes de Jesucristo.

Los colorantes azoicos se obtienen por nitrosación de anilinas a sales de diazonio y posterior copulación de éstas con arenos ricos en electrones como se esquematiza a continuación.

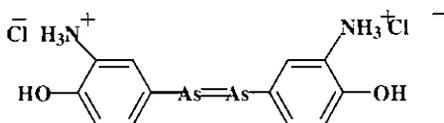


#### 4. EL NACIMIENTO DE LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA. LAS SULFAMIDAS

Paul Ehrlich y Sacachiro Hata alrededor de 1910 desarrollaron un antisifilítico que no fue desplazado hasta los años 40 por la penicilina: la arsfenamina (Salvarsán®) tras sintetizar alrededor de 600 arsenicales relacionados estructuralmente con un prototipo más tóxico: el atoxilo.



Atoxilo

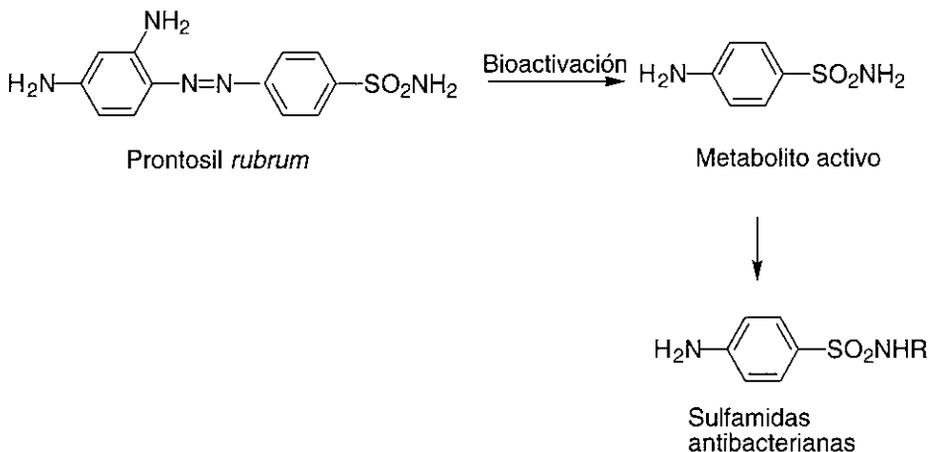


Arsfenamina

La producción de colorantes en Alemania al comienzo de la Primera Guerra Mundial era tan potente que representaba el 88% del mercado mundial. También en Alemania puede localizarse el nacimiento de la industria farmacéutica, ya que los magníficos resultados comerciales obtenidos con la síntesis industrial de aquéllos motivaron a los discípulos que Hofmann tenía en este país a emprender una investigación química ininterrumpida que, finalmente, originó la industria farmacéutica como lógica consecuencia de una diversificación dirigida hacia la búsqueda de compuestos aplicables en terapéutica.

En la década de 1920, la empresa farmacéutica alemana I.G. Farben contrató a **Domagk** (1895-1964) para estudiar sistemáticamente los efectos beneficiosos que pudieran producir los miles de colorantes que sus químicos estaban sintetizando en el laboratorio. La consecuencia de este trabajo fue la patente del **prontosil rubrum** en 1932. Éste era un colorante rojo que teñía las células y eliminaba las infecciones causadas por estafilococos y estreptococos en animales de experimentación, pero que no mostraba actividad antibacteriana *in vitro*. Fue también Domagk quien, junto a otros investigadores de Hoffman La Roche, Squibb y Bayer, desarrolló la **isoniazida**, un fármaco que revolucionó la quimioterapia antituberculosa en los años 50, como se verá más adelante.

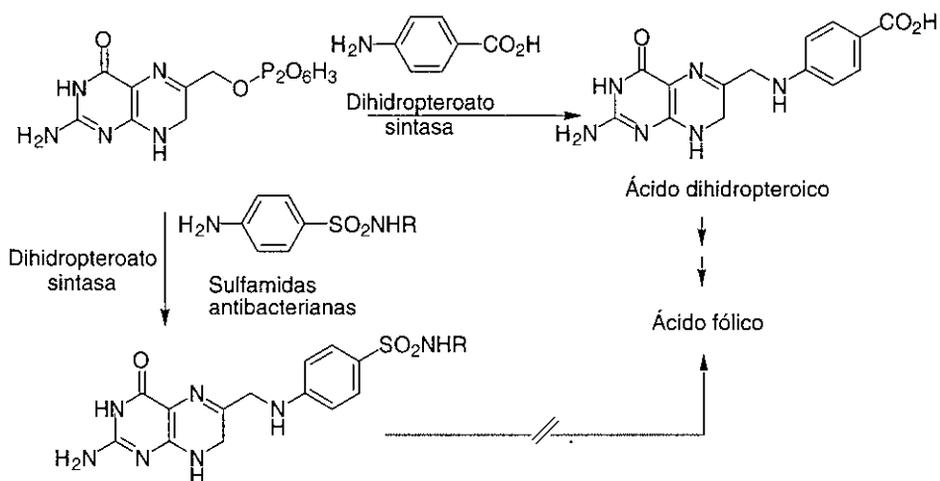
El equipo de **Fourneau** (1872-1949), que trabajaba en un laboratorio del Instituto Pasteur de París en estrecha colaboración con la industria farmacéutica, confirmó los resultados de Domagk, al mismo tiempo que sintetizó y ensayó otros análogos del prontosil, llegando a la conclusión en 1937 de que éste se descomponía en los organismos vivos para dar **sulfanilamida**, que era el agente bactericida. A los compuestos que necesitan bioactivarse para mostrar su actividad se les llama **profármacos**.



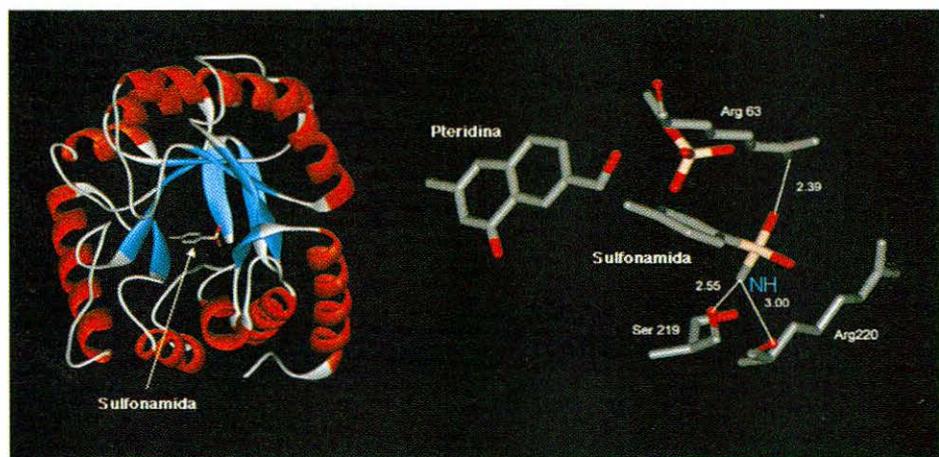
La empresa **Rhône-Poulenc** pudo explotar estos trabajos porque la sulfanilamida, que se comercializó como **prontosil album** ya que carecía de color, se había sintetizado mucho antes y no estaba protegida por la

patente de I.G. Farben. Y es que las **patentes** son estrictamente necesarias en la industria farmacéutica para proteger la innovación.

A la sulfanilamida le siguió la síntesis de una gran cantidad de análogos que se emplearon con éxito como **quimioterápicos antibacterianos**. Pero, ¿por qué las sulfamidas tenían esta actividad? Su mecanismo de acción a nivel molecular se descubrió pronto, ya que en 1940 Wood y Fields demostraron que poseían un efecto **inhibidor de la enzima dihidropteroato sintasa** debido a su analogía con el ácido *p*-aminobenzoico (PABA), que es el sustrato de esta enzima



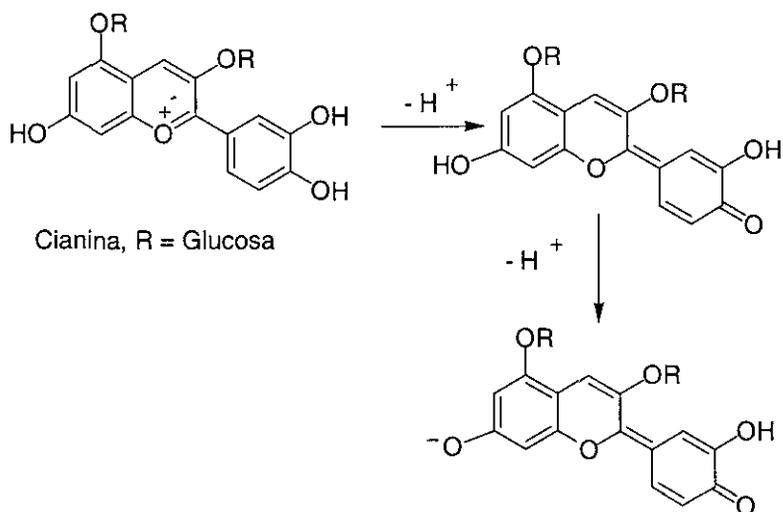
La consecuencia de esta inhibición es que las bacterias, que al contrario que el hombre no son capaces de absorber el ácido fólico de la dieta, no pueden biosintetizarlo a partir del ácido dihidropteroico. En la siguiente figura está modelado un complejo formado por la enzima dihidropteroato sintasa, el sustrato derivado de pteridina y una sulfamida, indicando qué aminoácidos de la enzima interaccionan con ésta.



## 5. ECLOSIÓN DE LA SÍNTESIS DE PRODUCTOS NATURALES

En la década de 1930, la **Química Orgánica** se dedicaba fundamentalmente a establecer las estructuras de los productos naturales mediante su síntesis, a la vez que avanzaban los conocimientos acerca de la **reactividad** de las sustancias conocidas. En este sentido, **Crafts y Friedel** habían descubierto en 1877 una reacción que adquiriría una gran relevancia industrial en 1958, tras el nacimiento de la industria petroquímica, ya que permitía alquilar y acilar compuestos aromáticos.

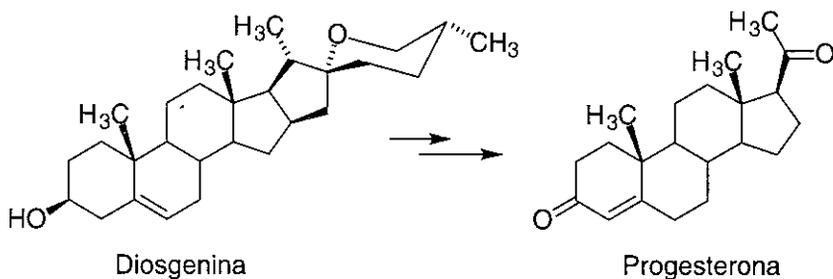
Las tareas de **síntesis de compuestos naturales** para establecer su estructura eran muy tediosas y laboriosas, pero tenían un gran prestigio y eran recompensadas con frecuencia con un Premio Nobel. Entre ellos se encontraba Sir Robert **Robinson** (1886-1975), que fue uno de los químicos más influyentes de su época y mantuvo el interés por la química de los colorantes y de los alcaloides a partir de sus trabajos con Perkin. Él fue quien determinó la estructura de los alcaloides estricnina y brucina, así como la de diversos colorantes aislados de flores como las antocianinas, cuyo color varía en función del pH del medio [6].



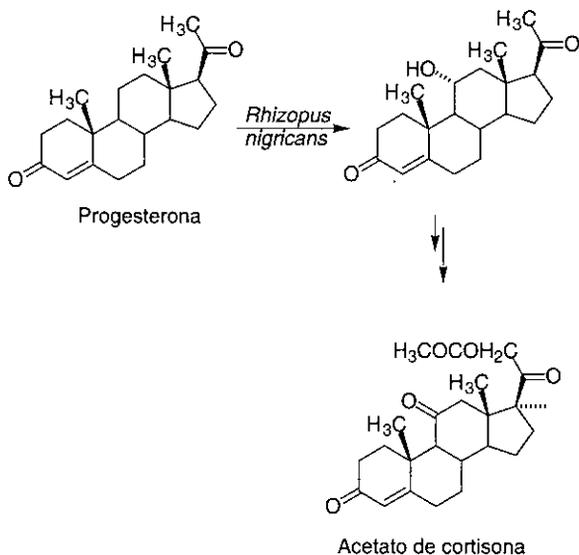
Robinson y otros químicos no menos importantes, como Simonsen, Haworth, Willstätter, Wieland, Kuhn, Diels y Alder, entre otros, tuvieron que resolver problemas químicos y estereoquímicos muy importantes para averiguar cuál era la estructura de moléculas tan complejas como la clorofila, las vitaminas o las hormonas que, además, eran **compuestos con gran interés biológico**. Dentro de las hormonas, fueron especialmente interesantes los esteroides, ya que se encuentran en la naturaleza en muy pequeñas cantidades.

## 6. DE LA DIOSGENINA A LA PROGESTERONA Y A LOS ANTICONCEPTIVOS

**Marcker** proyectó la síntesis de esteroides de interés biológico a partir de estructuras semejantes que habían sido aisladas del reino vegetal como es el caso de la **diosgenina**. Sin embargo, su proyecto no interesó a la industria norteamericana por lo que se desplazó a Méjico y allí fundó la Syntex Company. Sus trabajos permitieron reducir el precio de la progesterona a la mitad y pusieron los cimientos para el desarrollo posterior de los **anticonceptivos**.



Djerassi siguió la iniciativa de Marcker, y en 1951 consiguió preparar **cortisona** a partir de sustancias extraídas de otras dos plantas mejicanas: el ñame y el sisal. Desafortunadamente, su método fracasó a nivel comercial porque, simultáneamente, la compañía **Upjohn** había descubierto otro proceso más barato para la oxidación regioselectiva de la posición C-11 de los esteroides. En este caso, se observó que un cultivo de *Rhizopus arrhizus* que se había aislado del aire en la sede de la compañía en Kalamazoo (Michigan) era capaz de catalizar la reacción de oxidación citada con un rendimiento del 50%. Todavía fueron mejores los resultados obtenidos con *Rhizopus nigricans* [7]. Este es un ejemplo de cómo puede utilizarse microorganismos (o sus enzimas) en la síntesis de fármacos.

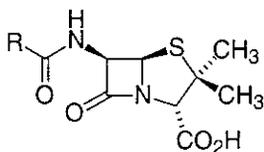


Djerassi sintetizó también la **noretindrona**, un anticonceptivo más potente que la progesterona, y resolvió muchos problemas acerca de la estereoquímica de los esteroides utilizando la dispersión óptica rotatoria y el dicroísmo circular.

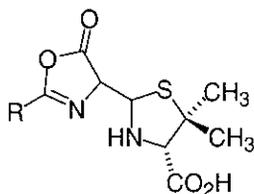
## 7. LA PENICILINA Y LA BIOTECNOLOGÍA

La utilización de microorganismos en la síntesis orgánica fue el comienzo del protagonismo creciente de la **Biotecnología** como método de búsqueda y fabricación de nuevos fármacos. Actualmente, se obtienen por métodos biotecnológicos un buen número de fármacos, algunos de ellos totalmente innovadores, y las empresas biotecnológicas, generalmente de pequeño tamaño, cotizan al alza en todos los mercados bursátiles. El origen de esta aplicación de la Biotecnología podríamos fijarlo en la producción industrial de **penicilina**.

Es sabido que **Fleming** descubrió las propiedades de este antibiótico en 1928, siendo Florey y Chain los que la estudiaron más profundamente en 1939. Aunque ya era un fármaco muy importante en la Segunda Guerra Mundial, fue imposible encontrar un método de síntesis a escala industrial durante este periodo a pesar del esfuerzo conjunto de siete universidades (entre ellas Oxford, donde se encontraba Robinson) y siete compañías farmacéuticas. Gran parte de las dificultades encontradas en su síntesis total pudieron haberse producido por la terquedad de Robinson y otros químicos, que no admitieron en principio la estructura de  $\beta$ -lactama de esta molécula y propusieron una estructura incorrecta de oxazolona-tiazolidina.



Penicilinas,  
estructura general



Estructura propuesta  
previamente

Aunque en 1957 Sheehan obtuvo la penicilina por síntesis total, su preparación a escala industrial se resolvió desde 1944, año en que ya se producían cantidades aceptables, por fermentación y, posteriormente, por el desarrollo de métodos semisintéticos. Hoy día se utilizan bastantes antibióticos  $\beta$ -lactámicos que se obtienen por síntesis total [8].

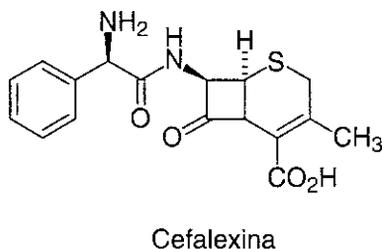
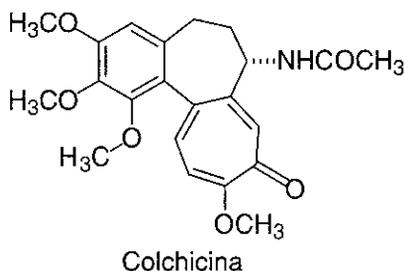
## 8. RELACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA Y LA FUNCIÓN DE LAS MOLÉCULAS EN LOS SERES VIVOS

Con la aparición de los espectrómetros de masas y de la espectroscopía RMN en los años 1960, ya no era necesaria la síntesis total de los compuestos naturales para determinar su estructura. Es entonces cuando los químicos se plantean de forma definitiva la utilidad biológica de las moléculas

En 1974 Todd, un químico contemporáneo también de Robinson, se expresaba de esta forma: «Si se simplifica el trabajo estructural, tal y como los químicos lo están haciendo ahora, la estructura deja de ser para mí un fin y empiezo a interesarme cada vez más por la función. Esto me lleva a parcelas en las que quedan muchas cosas por plantearse, y a las que los químicos orgánicos no han prestado mucha atención hasta este momento».

En estas frases queda patente el paso de los químicos orgánicos hacia el estudio de la **relación entre la estructura y función de las moléculas en los seres vivos**. Sin embargo, el desarrollo de los métodos sintéticos siguió imparable. La Química Orgánica se convirtió en un juego. Sobre el papel podían planificarse y diseñar moléculas para luego comprobarse en el laboratorio. En uno de estos «juegos» se descubrió la posibilidad de preparar **receptores sintéticos** que eran modelos de los lugares de interacción de los receptores naturales con sus ligandos, lo que sería de gran transcendencia en el diseño racional de fármacos. Uno de los pioneros de la síntesis de receptores sintéticos fue Cram, profesor de UCLA (Universidad de Los Angeles) y Premio Nobel de 1987.

Cram y Woodward, posiblemente el más extraordinario de los químicos de su generación y también laureado con el Nobel de 1965, fueron verdaderos artistas de la química sintética. Este último, además de participar en la síntesis de muchos compuestos naturales, con la colchicina, la vitamina B<sub>12</sub> o las cefalosporinas, explotó la teoría de los orbitales moleculares para racionalizar los mecanismos de las reacciones orgánicas y desarrolló métodos estereoselectivos para evitar la separación de mezclas racémicas.



A estos métodos se incorporó la investigación virtual, con el desarrollo de la química computacional, los métodos de síntesis con reactivos soportados en fase sólida, y los métodos de síntesis combinatoria que han supuesto una mucha mayor eficacia y rapidez.

Es importante insistir en que sin síntesis no hay más compuestos que los que pueden aislarse de la naturaleza u obtenerse por Biotecnología y podríamos concluir esta breve historia con la frase de **Berthelot** (1827-1907): «La química crea su propio objeto».

Impresiona pensar en que hace menos de 200 años que **Wohler** (1800-82) demostró por primera vez (1828) que los compuestos de la vida podían ser sintetizados en un laboratorio, ya que la urea extraída de orina de perro tenía exactamente la misma composición que el cianato de amonio procedente de la reacción entre cianato de plomo y amoníaco acuoso.



Sólo a partir de ese momento se supo que los elementos simples de carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno, fundamentalmente, podían combinarse en miles de formas distintas para producir millones de compuestos diferentes.

La sofisticación a que ha llegado esta actividad permite la obtención de un número prácticamente infinito de compuestos, sin embargo, la capacidad de la química sintética no es suficiente por sí sola, ya que una inmensa mayoría de los compuestos que pueden prepararse carecen de interés. Vamos a tratar de ver algunos ejemplos de cómo pueden planificarse y elaborarse de la forma más racional posible estructuras que interfieran con los procesos biológicos y posean, por tanto, interés terapéutico.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Brock, W.H.; «Historia de la Química», Alianza Editorial, 1998. Capítulo 8.
2. «An Interview with Lord Todd», *Chemistry in Britain*, 1974, 10, 211.
3. Delamare, F.; Guineau, B. «Les Matériaux de la Couleur», Ed. Gallimard, 1999.
4. Griffiths, J., «Colour and Constitution of Organic Molecules», Academic press, 1976, pg 195.
5. Acheson, R.M.; «An Introduction to the Chemistry of Heterocyclic Compounds», John Wiley & Sons, 1976, pág. 210-211.
6. Para una revisión de antocianinas ver: Iacobucci, G.A.; Sweeny, J.G., *Tetrahedron*, 1983, 39, 3005.
7. «Introducción a la Química Farmacéutica», C. Avendaño (ed), McGraw-Hill Interamericana, 2001, Capítulos 17 y 25.
8. «Introducción a la Química Farmacéutica», C. Avendaño (ed), McGraw-Hill Interamericana, 2001, Capítulos 10 y 24.

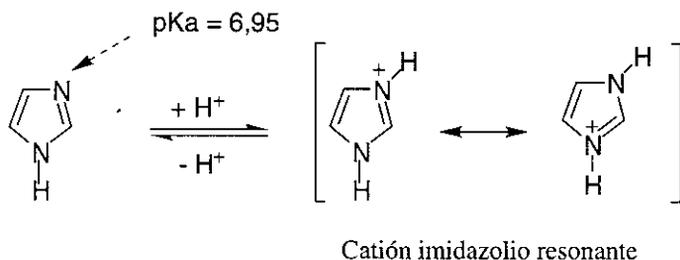
# Diseño Racional de Fármacos

## 1. LOS HETEROCICLOS Y LA VIDA

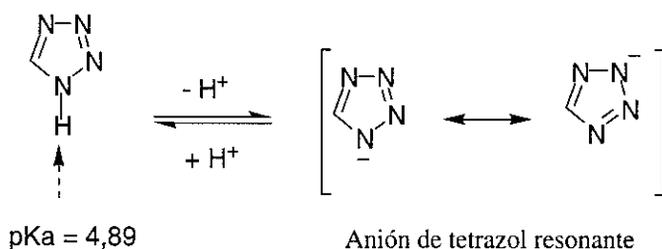
Como ya hemos dicho en el capítulo anterior, los **procesos biológicos son por su naturaleza, químicos** y en ellos participan diferentes compuestos orgánicos muchos de los cuales son **compuestos heterocíclicos**, es decir, compuestos cíclicos en los que uno o más átomos de carbono se han reemplazado por heteroátomos, de los que el más frecuente es el átomo de nitrógeno. ¿Por qué es así, siendo enormemente variada la estructura de los compuestos orgánicos? La respuesta es que los heterociclos poseen algunas propiedades, como las que se comentan a continuación de forma somera, que tienen relevancia biológica [1].

### 1.1. Acidez y basicidad en los compuestos heterocíclicos

El **imidazol**, que se encuentra formando parte de la estructura del aminoácido histidina componente de las proteínas, es uno de los «grupos básicos» más importantes de los sistemas biológicos. Aunque tiene propiedades anfóteras porque posee un grupo NH «ácido», el átomo de nitrógeno básico tiene un valor de  $pK_a = 6,95$  y permite su utilización por los organismos vivos para **transportar y transferir protones**.

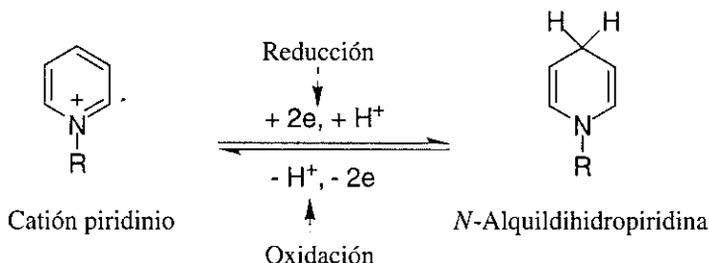


Ciertos heterociclos, aunque no se encuentren en la naturaleza poseen un carácter ácido semejante al de los ácidos carboxílicos. Así, el **te-trazol** tiene un pKa de 4,89, casi igual al del ácido acético (4,76) y por eso este anillo puede sustituir al grupo carboxilo y utilizarse en el diseño de fármacos para producir estructuras cuyas formas ionizadas son más lipófilas que las que poseen los análogos con un grupo carboxilato. Podemos decir que los grupos carboxilo y triazol son **bioisósteros**, esto es, tienen una actuación biológica semejante.

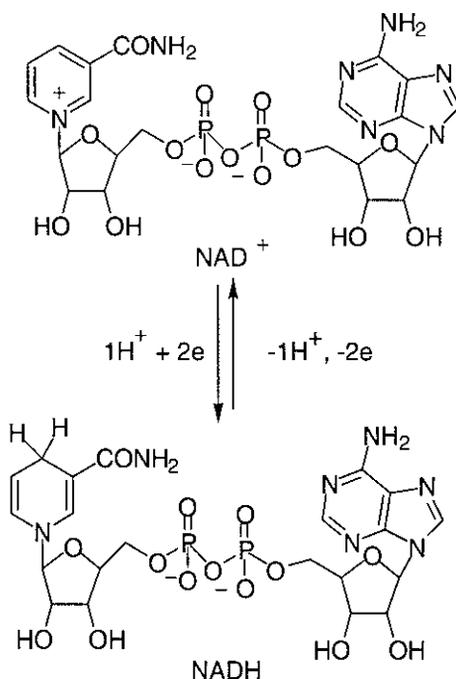


## 1.2. Oxidación y reducción en los compuestos heterocíclicos

En los **heterociclos aromáticos** que poseen átomos de nitrógeno de tipo piridina, los agrupamientos C=N se comportan como atractores de electrones ( $\pi$ -deficientes) ya que el átomo de nitrógeno es más electrón-atrayente que el carbono. Por ello se reducen con facilidad, especialmente si están cargados positivamente como ocurre en el catión piridinio. Esta circunstancia permite que compuestos complejos que contengan esta estructura participen en reacciones de **transferencia de electrones**.



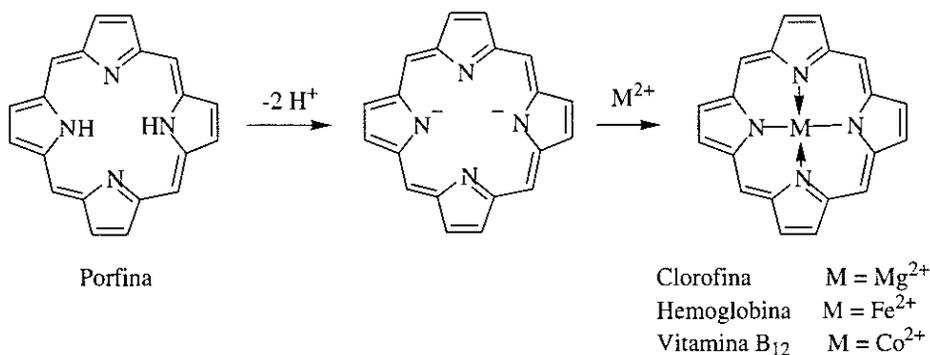
El m1s importante es el cofactor  $\text{NAD}^+$ .



### 1.3. Coordinaci3n con metales en los compuestos heteroc3clicos

El par de electrones no compartido de un 1tomo de nitr3geno piridinico es capaz de coordinarse y formar complejos con metales. Los complejos permiten la solubilizaci3n y transporte de ciertos metales y que 1stos existan en estados de valencia no habituales, pero de gran significaci3n biol3gica como ocurre con las especies de  $\text{Fe}^{4+}$ .

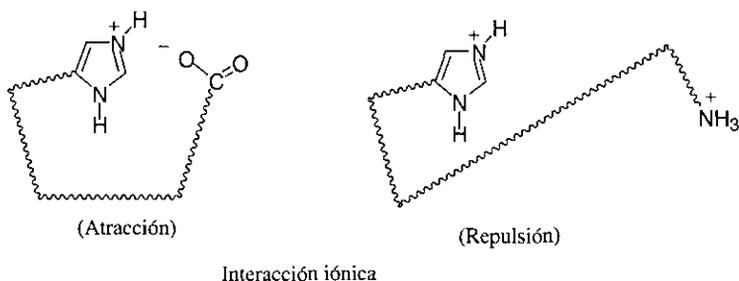
Estos complejos pueden ser lineales ( $\text{Ag}^+$ ), tetraédricos ( $\text{AlCl}_3$ ) o plano cuadrado ( $\text{Cu}_2\text{Cl}$ ). Así, cuatro anillos de pirrol, dos de ellos oxidados con un átomo de tipo piridina y enlazados como se indica, forman la estructura de la porfina, que es un macrociclo natural. Cuando los grupos NH de los dos anillos de pirrol se ionizan, se forma un dianión simétrico con los cuatro pares de electrones dirigidos al interior del macrociclo. En esta cavidad pueden situarse ciertos metales formando complejos coloreados muy estables. Así ocurre en la clorofila ( $\text{Mg}^{2+}$ ), la hemoglobina ( $\text{Fe}^{2+}$ ) o la vitamina B<sub>12</sub> ( $\text{Co}^{2+}$ ).



#### 1.4. Formación de enlaces de hidrógeno entre compuestos heterocíclicos y otras interacciones moleculares

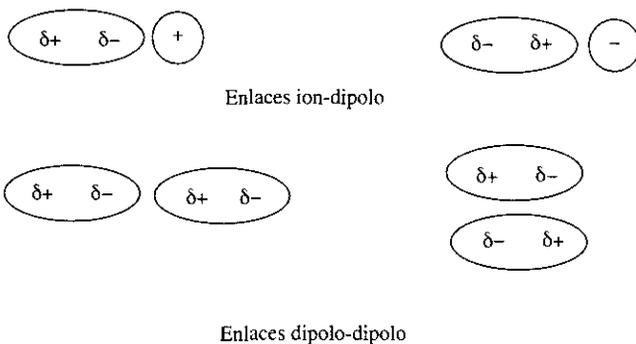
El enlace de hidrógeno entre distintas moléculas es esencial para la vida, teniendo especial relevancia en el código genético y en las mutaciones del ADN. Desde el punto de vista biológico, la formación de enlaces covalentes entre moléculas no es tan interesante como la formación de enlaces más débiles, ya que la energía de los enlaces covalentes, entre 60 y 100 kcal/mol, hace que sean difíciles de romper. Cuando se precisa que una misma molécula sea capaz de regenerarse y reaccionar miles de veces, como es el caso de las enzimas al actuar como catalizadores de las reacciones biológicas o el de un receptor que interacciona con un ligando, es necesario que estas interacciones intermoleculares sean reversibles.

Dado el pKa básico del imidazol, ya comentado anteriormente, un 50% de los restos de histidina (His) que forman parte de muchas enzimas o receptores, se encuentran protonados a pH fisiológico, permitiendo **interacciones iónicas** con grupos cargados negativamente de sus correspondientes ligandos. Al mismo tiempo, si estas cargas positivas se sitúan próximas a un resto carboxilato de ácido aspártico (Asp) o glutámico (Glu) de la misma cadena, se produce la atracción de ambos grupos y se formará el correspondiente pliegue, mientras que si por el contrario se encuentran con otra carga positiva, como un grupo  $\text{NH}_3^+$  de un resto de lisina protonada, habrá una interacción repulsiva.

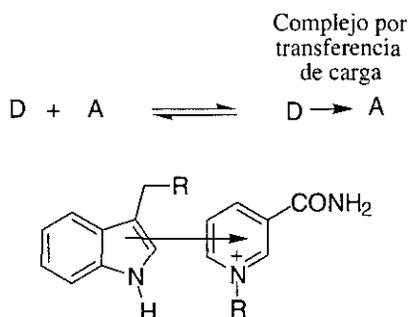


Así, los enlaces iónicos pueden colaborar a la formación de complejos ligando-receptor o sustrato-enzima y, al mismo tiempo, están implicados en la estructura terciaria de las proteínas.

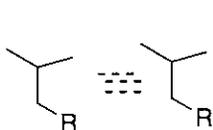
Los heterociclos son también en su mayor parte estructuras dipolares que pueden interactuar con dipolos (enlace dipolo-dipolo) o con cargas de signo opuesto (enlace ión-dipolo) de otras moléculas.



Algunos heterociclos, como el indol del triptófano y las bases púricas del ADN, poseen un orbital molecular HOMO de gran energía por lo que pueden transferir carga a una molécula aceptora que posee un orbital molecular LUMO de baja energía. Aquellos compuestos se llaman heterociclos donadores (D). Por el contrario, otros heterociclos como son los sistemas de piridinio o de flavina, pertenecen a la categoría de aceptores electrónicos (A) ya que tienen una gran deficiencia de carga (orbitales LUMO de baja energía). Estas **interacciones** son de **atracción** y se denominan de **transferencia de carga**, siendo responsables de que estos anillos se orienten en capas superpuestas para que haya el máximo solapamiento entre los orbitales  $\pi$ .

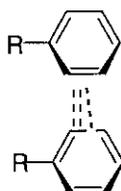


Sin embargo, para que dos anillos aromáticos o dos cadenas hidrocarbonadas se atraigan no es necesario que se transfieran electrones ya que estas porciones estructurales, al ser hidrófobas, tienden a estar próximas entre sí. Este **enlace** se denomina **hidrófobo** y es responsable de buena parte de los procesos de interacción entre las moléculas.



Enlace hidrófobo entre  
dos cadenas de leucina

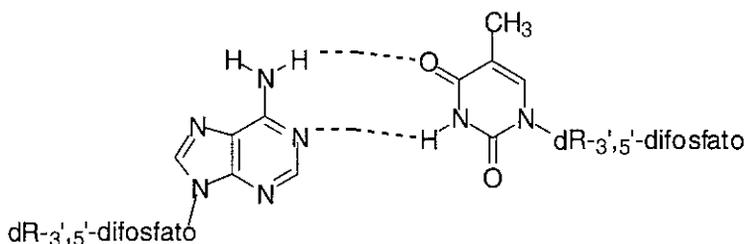
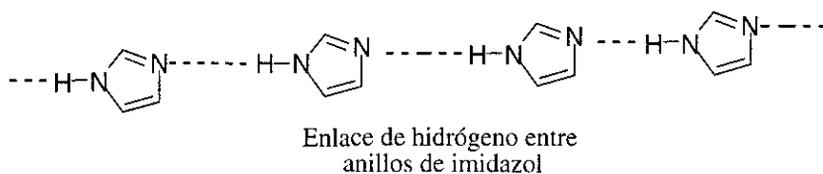
$$E_e = 1,5 \text{ kcal/mol}$$



Enlace hidrófobo entre  
dos cadenas de fenilalanina

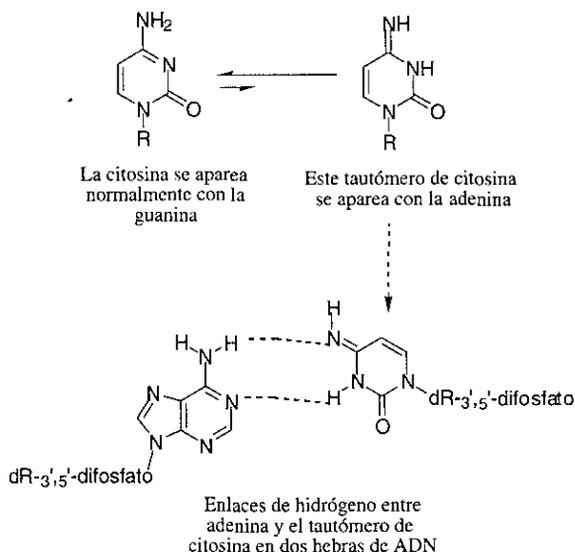
$$E_e = 1,5 \text{ kcal/mol}$$

Por último, la mayor parte de los heterociclos pueden actuar como donadores (D) o aceptores (A) de hidrógeno, siendo los **enlaces de hidrógeno** entre las bases púricas y pirimidínicas los que determinan los procesos de replicación y de transcripción del ADN.

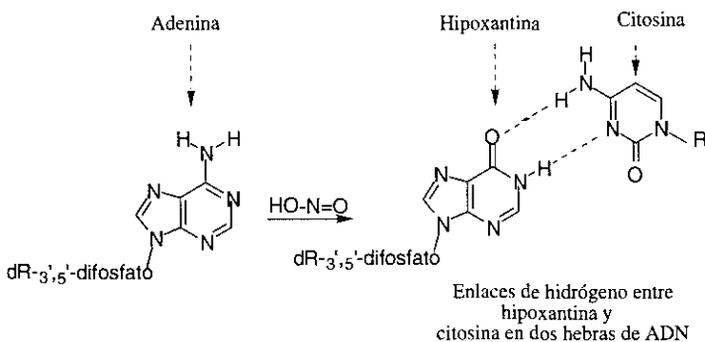


En el proceso de transcripción, una hebra de ADN transfiere su información al formar  $\text{ARN}_m$  mediante el establecimiento de enlaces de hidrógeno de bases complementarias. Estos enlaces hacen que se incorpore un determinado aminoácido a una proteína. Dado que hay 20 aminoácidos y 4 bases diferentes en los  $\text{ARN}_m$  [uracilo (U), citosina (C), adenina (A) y guanina (G)], cada aminoácido está codificado por una secuencia de tres bases consecutivas que se denomina **codón** (UUU y UUC para fenilalanina, GGU, GGC, GGA u GGG para glicina, etc.). Existen  $4^3 = 64$  codones.

Desgraciadamente los **ácidos nucleicos son los componentes más frágiles del organismo** y sus hebras, quizás por su gran longitud, pueden romperse mecánica y químicamente. Los cambios que se producen en la secuencia de las bases heterocíclicas se denominan mutaciones. Muchas **mutaciones espontáneas** pueden depender de equilibrios de **tautomería** de los heterociclos, como se indica en la figura siguiente.



Lo mismo ocurre con el tautómero minoritario de la guanina (forma 4-hidroxi), que puede aparearse con la timina en vez de con la citosina, que es la base complementaria de la forma tautómera normal (4-oxo). Otras mutaciones se producen por factores ambientales, especialmente por las radiaciones penetrantes o por determinados compuestos químicos. Los nitritos por ejemplo, que se adicionan con frecuencia a los productos cárnicos para que tengan la apariencia de frescos, son potencialmente peligrosos porque originan ácido nitroso y éste es capaz de convertir la adenina en hipoxantina a través de la *N*-nitrosación seguida de hidrólisis. De esta forma se altera el apareamiento normal de aquélla con la timina en el ADN.



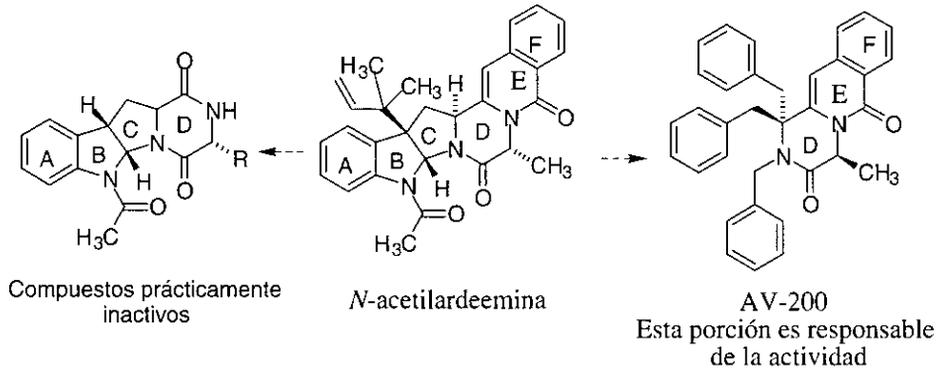
## 2. DISEÑO DE FÁRMACOS POR MANIPULACIÓN MOLECULAR DE UN PROTOTIPO. GRUPOS BIOISÓSTEROS

Descubrir y desarrollar un fármaco implica encontrar un compuesto con una actividad biológica útil que sea muy potente y a la vez muy selectivo, biodisponible, asequible para poder fabricarlo u obtenerlo a gran escala y que no sea tóxico. Este largo proceso ha de incluir la correspondiente patente y ha de conseguir la comercialización del producto en forma de medicamento lo más rápidamente posible.

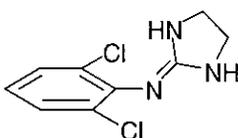
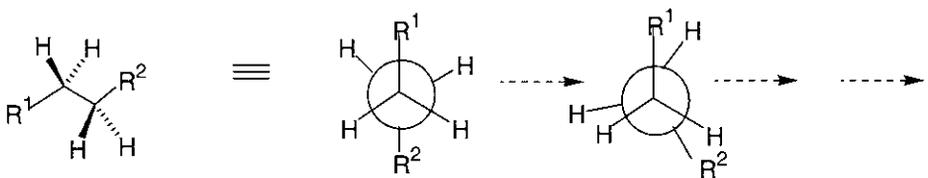
Esta meta es difícil, por lo que se ha ido alcanzando a través de diversas metodologías, fundamentalmente mediante la manipulación por vía química de la estructura de un **compuesto prototipo** o «**cabeza de serie**». A su vez, el hallazgo de un prototipo se ha producido a través de conocimientos derivados del uso ancestral en la medicina de las distintas civilizaciones de ciertas plantas o extractos, por cribado al azar de productos de síntesis o extraídos de fuentes naturales (fundamentalmente plantas y microorganismos), y por observación de efectos secundarios en fármacos que se desarrollaron para otros propósitos. Actualmente un prototipo puede diseñarse de forma más racional y dirigida como veremos más adelante, con la ayuda de métodos computacionales.

La manipulación de una molécula «cabeza de serie» puede realizarse por simplificación de su estructura, sobre todo si se trata de un compuesto de origen natural complejo, a fin de encontrar el «**grupo farmacóforo**», que es la mínima porción estructural que retiene la actividad biológica. Esta metodología se ha aplicado recientemente en nuestro grupo en la manipulación de la *N*-acetilardeemina, un reversor MDR (*multidrug resistance*) de origen natural que potencia la actividad de vinblastina, doxorubicina y paclitaxel en células de tumores humanos que se han hecho resistentes por inhibición de la glicoproteína P-170 (una proteína de membrana que actúa como transportadora de estos antitumorales). Los análogos tetracíclicos en los que se han mantenido los anillos A-D son prácticamente inactivos, mientras que la actividad radica en la porción

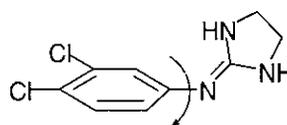
que contiene los anillos D-F, siendo mayor conforme aumenta la lipofilia (ver el compuesto AV-200) [2].



Otro modo de manipular la estructura de un «cabeza de serie» es **limitar su libertad de conformación** alrededor de determinados enlaces sencillos, como puede observarse en el hipotensor clonidina, con rotación restringida por impedimento estérico, y su isómero con libre rotación alrededor del enlace nitrógeno-fenilo, mucho menos activo. Estos hechos pueden interpretarse fácilmente teniendo en cuenta que la restricción conformacional fija la geometría óptima y disminuye las posibles interacciones con otras dianas.

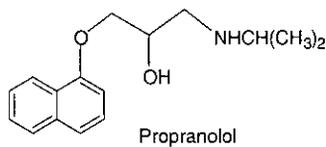


Clonidina  
DE<sub>50</sub> 0,01 mg/Kg



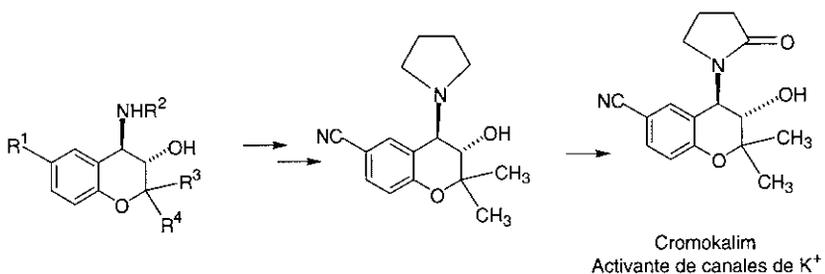
DE<sub>50</sub> 3,00 mg/Kg

Otras veces, la libre rotación se restringe transformando cadenas abiertas en ciclos. Al actuar así, es relativamente frecuente encontrar compuestos que interactúan con otra diana farmacológica, por lo que pueden tener los mismos o distintos efectos farmacológicos. Este es el caso de los antihipertensivos análogos de cromokalim, que actúan activando canales de potasio pero que surgieron a partir de los  $\beta$ -bloqueantes como el propranolol, perteneciente al grupo de las «ariloxipropanolaminas» antagonistas de los receptores adrenérgicos  $\beta$ .

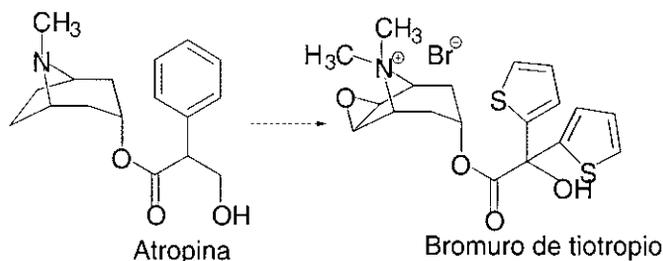


Como se dudaba de que la acción antihipertensiva de estos fármacos fuese debida a este antagonismo de los receptores  $\beta$ , se sintetizaron análogos rígidos de propranolol con estructura de 4-amino-3-hidroxicromano para que por su diferente geometría no pudieran enlazarse a estos receptores. Se encontró así un derivado de pirrolidina inactivo *in vitro* pero activo *in vivo*, que se supuso un profármaco. Su análogo oxigenado en la posición  $\alpha$  al átomo de nitrógeno del anillo de pirrolidina, que con mucha probabilidad sería el metabolito deseado, fue activo y se denominó cromokalim.

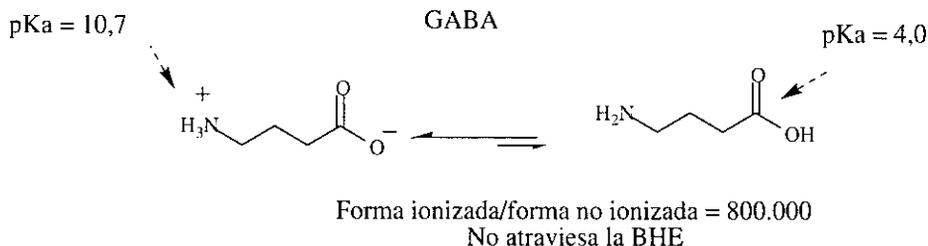
Tanto este fármaco como los análogos que se desarrollaron posteriormente son agentes hiperpolarizantes porque activan canales de potasio. De esta forma relajan el músculo liso y se utilizan, además de cómo antihipertensivos, como broncodilatadores y cardioprotectores [3].



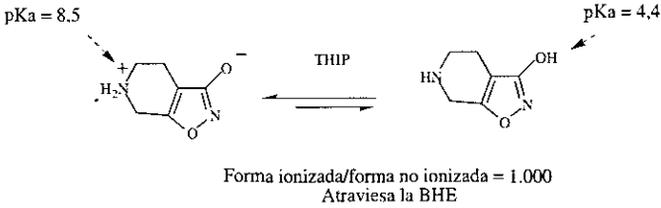
La manipulación de un «cabeza de serie» puede perseguir también **optimizar su farmacocinética**, esto es, mejorar su absorción, distribución, metabolismo y eliminación (perfil ADME). Así se han desarrollado las sales de amonio cuaternario derivadas de atropina o escopolamina, que dejaron de usarse como broncodilatadores por sus efectos centrales indeseables. Muchos análogos cuaternizados, como el bromuro de tiotropio, siguen siendo antagonistas colinérgicos no selectivos pero, en contraposición a aquellos alcaloides naturales, son útiles como broncodilatadores por inhalación ya que por su polaridad no atraviesan la barrera hematoencefálica [4].



Puede por el contrario manipularse una estructura, como la del neurotransmisor GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) que no atraviesa la barrera hematoencefálica, sintetizando análogos en los que la diferencia de sus dos valores de pKa sea más pequeña a fin de que exista en una menor proporción como forma ionizada, lo que da lugar a un compuesto menos polar que puede alcanzar su diana farmacológica a nivel central.



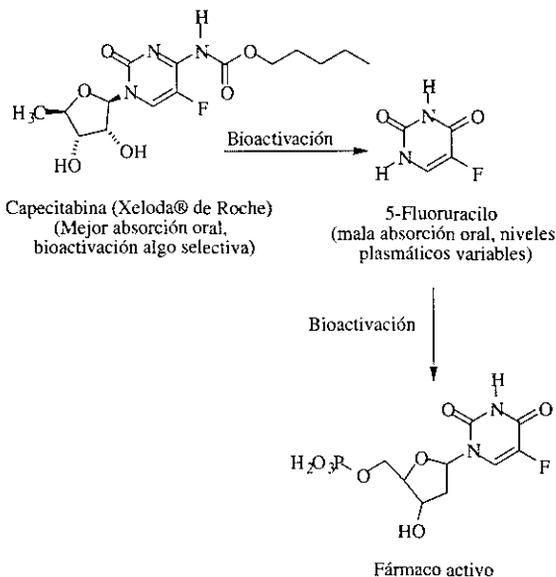
Esto se ha conseguido, por ejemplo, en el 3-hidroxi-4,5,6,7-tetrahidropirido[4,3-*d*]isoxazol (THIP).



Alternativamente pueden diseñarse **profármacos**, esto es, compuestos inactivos pero con una buena farmacocinética que se bioactivan en el interior del organismo, a ser posible, en el lugar de acción.

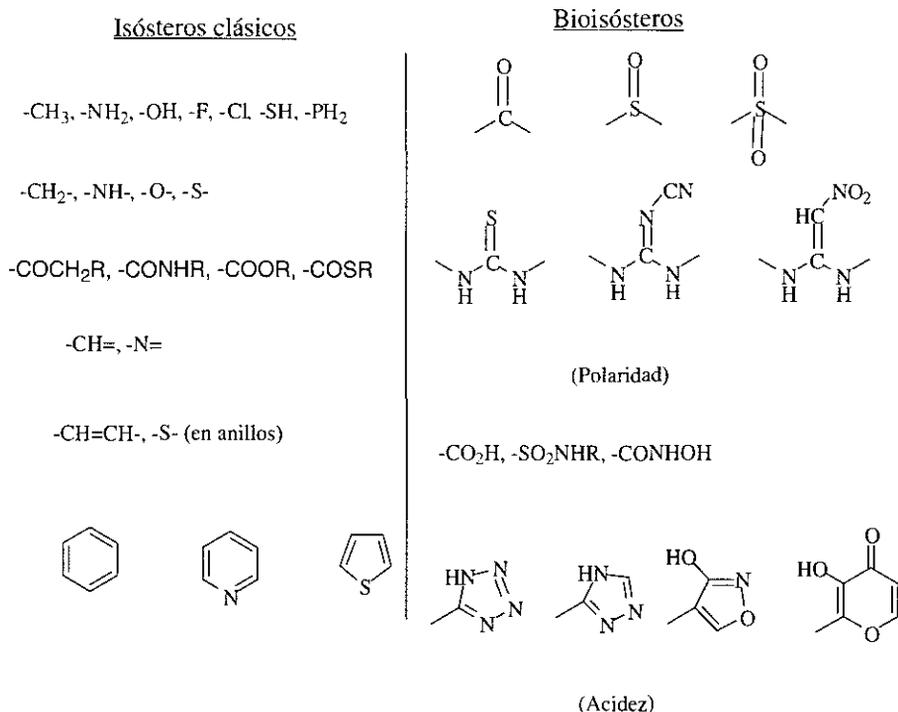
Como ejemplo podemos citar a la **capecitabina**, recientemente comercializada por Roche con el nombre de **Xeloda®**. Éste es un profármaco activo por vía oral del 5-fluoruracilo (5-FU), un clásico antitumoral utilizado desde 1957 que tiene como principales limitaciones si se deja aparte su falta de selectividad de acción, una baja absorción oral y una gran variabilidad en sus niveles en sangre según los individuos. Incluso en un mismo sujeto, dichos niveles pueden variar cuando se administra por infusión continua.

La capecitabina, en cambio, además de permitir la administración oral, se bioactiva de forma bastante selectiva en el tejido tumoral [5].



La forma más frecuente de manipular un prototipo es sustituir determinados agrupamientos por otros que se denominan **isósteros** o **bioisósteros**, porque se asemejan en sus propiedades físicas y químicas o biológicas. No puede decirse en justicia que los compuestos que así surgen sean el resultado de un «diseño irracional».

Son isósteros los agrupamientos  $\text{CH}_2$ ,  $\text{NH}$ ,  $\text{O}$  y  $\text{S}$ . También lo son los anillos de benceno y furano. Los grupos  $\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{SO}_2\text{NHR}$ , 1,2,3,4-tetrazol, 1,2,4-triazol, 3-hidroxiisoxazol y 3-hidroxi- $\gamma$ -pirona son intercambiables si se actúa por criterios de acidez; mientras que los grupos carbonilo, sulfóxido y sulfona así como los agrupamientos de tiourea, cianoguanidina y amina de nitrocetena, pueden intercambiarse entre sí si se actúa por criterios de polaridad. Éstos son sólo algunos ejemplos de grupos isósteros.



Una de las sustituciones bioisósteras más desarrollada es la incorporación de átomos de flúor en lugar de átomos de hidrógeno, como ocurre

en el 5-fluoruracilo respecto al uracilo. La **sustitución H-F** puede resultar tan interesante en la búsqueda de ligandos de interés biológico que se ha acuñado el nombre de **flustratos** («fluorine-containing-substrates») para los compuestos fluorados análogos al sustrato de una determinada enzima.

El enlace C-F es el más fuerte de aquéllos en los que está implicado el carbono por lo que, aunque es muy polar, es estable en la mayoría de las condiciones experimentales. Además, debido a que los electrones del flúor tienen muy baja polarizabilidad, los compuestos fluorados son más volátiles y lipófilos que los hidrogenados.

Por otra parte, la sustitución por flúor produce efectos enormes en los grupos funcionales próximos. Así, el pKa del etanol es 16, mientras que el pKa del trifluoroetanol es 12,4. Esto significa que el anión de este último es 21 kJ/mol más estable que el anión etóxido.

La introducción de F como sustituyente en un anillo aromático produce en general cambios pequeños en sus propiedades, pero en este caso el metabolismo oxidativo está inhibido por el carácter electrón-atrayente del flúor, por lo que estos fármacos pueden administrarse en menores dosis. Algunas de las propiedades de los enlaces C-H y C-F se comparan a continuación:

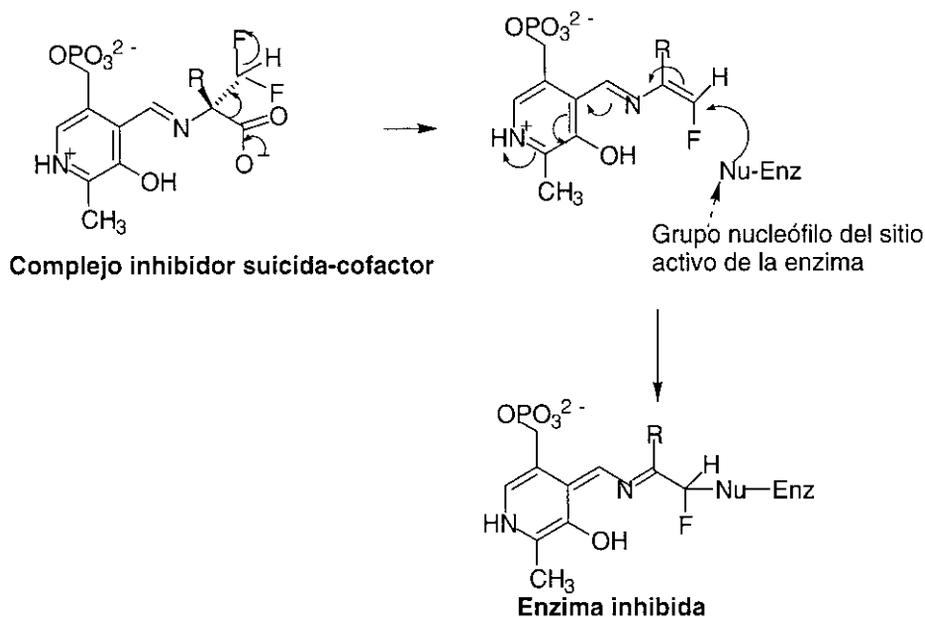
Energía de enlace (kJ/mol):	C-H : 416	C-F : 485
Longitud de enlace (Å)	C-H : 1,09	C-F: 1,38
Radio de van der Waals (Å)	CH <sub>3</sub> : 2,0	CF <sub>3</sub> : 2,7
Volumen de van der Waals (Å <sup>3</sup> )	CH <sub>3</sub> : 16,8	CF <sub>3</sub> : 42,3
Electronegatividad (según Pauling)	H : 2,1	F : 4,0
Polarizabilidad para CH <sub>3</sub> X (10 <sup>-24</sup> cm <sup>3</sup> ):	X = H: 2,59	X = F: 2,97 (X = Cl: 4,72)

Finalmente, las propiedades magnéticas del flúor, en especial su sensibilidad relativa, facilitan la investigación de los procesos en los que intervienen moléculas fluoradas por RMN:

$$^1\text{H} \text{ (espín } 1/2\text{): } 1,00 \quad ^{19}\text{F} \text{ (espín } 1/2\text{): } 0,83 \quad ^{13}\text{C} \text{ (espín } 1/2\text{): } 0,016$$

Muchos fármacos que actúan como **inhibidores enzimáticos competitivos** o **suicidas** son compuestos fluorados. Por ejemplo, la **sustitución de un enlace peptídico por un agrupamiento  $\alpha$ -difluorocetona** (hidratada en solución acuosa) en un péptido, mimetiza el intermedio tetraédrico del estado de transición correspondiente a la hidrólisis del péptido catalizada por proteasas de serina, y produce inhibidores competitivos de estas proteasas como veremos en el capítulo siguiente.

Por otra parte, un  **$\alpha$ -difluorometilaminoácido** produce en el sitio activo de **enzimas dependientes de fosfato de piridoxal**, como son las descarboxilasas de aminoácidos, un intermedio aceptor de Michael que inhibe irreversiblemente a la enzima al adicionarse uno de sus grupos nucleófilos (Nu).



Como ejemplo de desarrollo de un fármaco novedoso a partir de un «cabeza de serie» comentaremos el caso del fármaco antiúlceras omeprazol (Losec®) y del antitumoral imatinib (Glivec®).

### 3. DESARROLLO DEL OMEPRAZOL Y SUS ANÁLOGOS

En la unidad de investigación Hässle de la compañía Astra (hoy AstraZeneca), Ylva Örtengren describió el 4 de enero de 1979 la síntesis del compuesto H 168/68. En este código, H significaba Hässle, 168 era el número del cuaderno del laboratorio, y 68 era la página de dicho cuaderno [6]. Este compuesto era el fruto de un programa de investigación dirigido a la búsqueda de un inhibidor selectivo de la secreción ácida del estómago que había empezado 12 años antes y que conocemos con el nombre de omeprazol (Losec®). Su importancia reside en que, siendo el **primer fármaco antiúlceras péptica que actúa por un mecanismo nuevo**: la inhibición de la bomba de protones ( $\text{ATPasa H}^+/\text{K}^+$ ), ha sido el que más se ha vendido hasta el momento.

En 1824 Prout demostró que el ácido que se producía en el estómago era el **ácido clorhídrico** y Golgi propuso a finales del XIX que este ácido se originaba en las células parietales de las glándulas gástricas. Desde que en 1910 Schwarz estableciera el principio: «**no ácido, no úlcera**», se empezaron a utilizar antiácidos para neutralizar al clorhídrico, siendo éste el único tratamiento, dejando aparte la cirugía, hasta que en los años 70 se introdujo la primera terapia eficaz: los **antagonistas del receptor de histamina  $\text{H}_2$** , de los que fue pionera la **cimetidina**.

A pesar del éxito de estos fármacos, la disminución de la acidez gástrica fue mucho más eficaz con la **incorporación en 1988 de los inhibidores de la bomba de protones**, de los que el omeprazol fue el primer representante, de tal forma que la cirugía gástrica que se aplicaba en ciertos casos ha pasado a ser historia.

Hoy se sabe que la acidez gástrica tiene un papel importante en muchas enfermedades gastrointestinales además de la úlcera péptica, por lo

que el omeprazol y sus análogos se utilizan frecuentemente, por ejemplo en la prevención de los efectos secundarios que producen los antiinflamatorios no esteroides (AINES) que actúan inhibiendo la enzima ciclooxigenasa (COX).

El desarrollo de este importante fármaco revela muchos de los aspectos que, por ser poco «lucidos» no suelen comentarse cuando se habla del «diseño» de fármacos como una actividad intelectual en la que la ciencia y la tecnología actúan con una total eficacia. La historia del omeprazol demuestra lo lejos que puede estar un cabeza de serie del fármaco que finalmente se comercializa, la ignorancia que muchas veces se tiene acerca de los mecanismos moleculares que intervienen en el proceso biológico que se valora, la importancia de la relación entre las propiedades inherentes a una estructura química con las propiedades biológicas que muestra (incluida la diferente actividad entre enantiómeros) y, muy fundamentalmente, la importancia de disponer de buenos modelos farmacológicos y de no olvidar la variabilidad entre especies e incluso individuos.

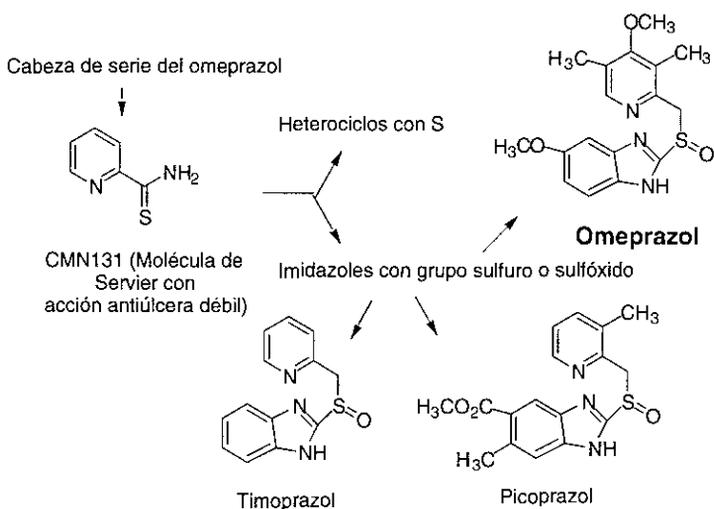
Cuando en 1967 se inició en Astra la búsqueda de un nuevo fármaco antiácido, se conocía que el anestésico y antiarrítmico lidocaína disminuía la secreción ácida en la experimentación con perros, y se suponía que este fármaco inhibía la liberación de **gastrina**, una hormona que estimula la secreción ácida en el estómago. Sin embargo, cuando tras la síntesis de varios compuestos se llegó a uno que inhibía este proceso, no fue activo en humanos y se intentó desarrollar otras ideas.

Entre tanto, los laboratorios farmacéuticos Searle y Servier tratando de bloquear el receptor de gastrina utilizaron la porción C-terminal de este péptido como prototipo. **Servier** llegó así al **compuesto CMN 131**, que mostró algún efecto pero que era demasiado tóxico para ser desarrollado. Éste fue el cabeza de serie utilizado por Astra, en el que en primer lugar se pensó sustituir la función tioamida a la que se atribuía la toxicidad.

A los dos años de iniciar la manipulación molecular de CMN 131, Astra disponía de compuestos más activos como inhibidores de la secreción ácida, así como de un modelo animal que se había desarrollado en un hospital de Göteborg y era mucho más predictivo que el modelo de

rata que se utilizaba hasta ese momento. Este modelo, que fue fundamental para el estudio farmacológico, era un perro en el que, mediante un tubo desde el estómago a la piel (fístula gástrica), era posible analizar el ácido segregado. El grupo utilizaba además la pared gástrica de cobaya como un modelo *in vitro* de secreción ácida que podía estimularse por histamina a través de los receptores  $H_2$  o por AMPc.

El cabeza de serie CMN 131 se derivó a compuestos de tipo sulfuro y sulfóxido (en vez de tioamida) que incorporaban diversos heterociclos, entre los que se encontraba el imidazol y el bencimidazol. Entre los años 1973 y 1974 se disponía de un sulfuro y un sulfóxido que eran bastante activos, pero demostraron cierta toxicidad tiroidea. Además, el compuesto con grupo sulfuro no podía desarrollarse porque estaba incluido en una patente húngara como antituberculoso. Sin embargo el sulfóxido (H83/69) denominado **timoprazol**, aunque tóxico, demostró tener una serie de características muy interesantes ya que, mientras que en el modelo *in vitro* el antagonista  $H_2$  cimetidina bloqueaba la respuesta inducida por histamina pero no la inducida por AMPc, el timoprazol bloqueaba ambos estímulos, lo que indicaba un mecanismo de acción nuevo. Por esta razón se siguieron sintetizando análogos de timoprazol que fuesen menos tóxicos. En 1976 se identificó un nuevo candidato para su desarrollo que no era tiorotóxico y, además, era más potente: el compuesto H149/94 o **picoprazol**.



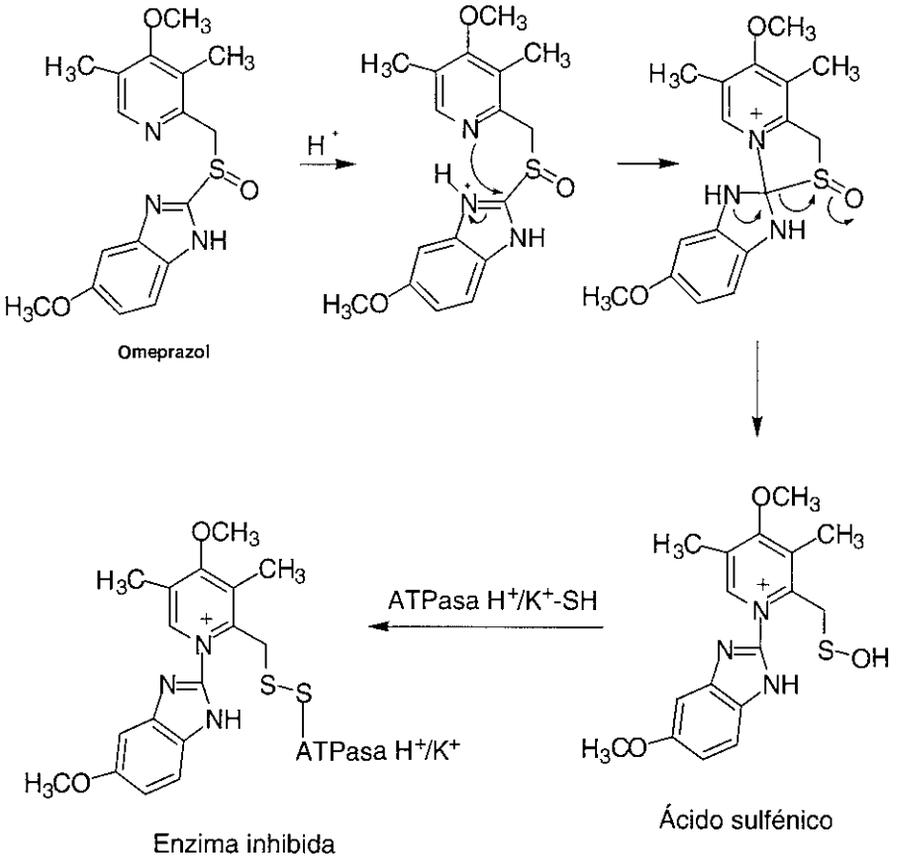
Los estudios farmacológicos revelaron que picoprazol actuaba inhibiendo de forma específica la ATPasa  $H^+/K^+$  tras el paso del intestino a la sangre [7-9]. Desgraciadamente, producía vasculitis, reacciones inflamatorias en las vasos sanguíneos de los animales de experimentación, por lo que se paralizó varios años su desarrollo. Los toxicólogos se dieron cuenta finalmente de que todos los perros utilizados en los ensayos con picoprazol eran descendientes de un mismo individuo que tenía un problema hereditario, de forma que cuando se utilizó otra estirpe, dejaron de aparecer los problemas de vasculitis. En consecuencia, se podía ya ensayar en humanos, pero había transcurrido tanto tiempo, era el año 1979, que la empresa ya tenía otros candidatos nuevos, entre los que estaba el compuesto H168/68 (omeprazol).

Éste fue el elegido para su desarrollo y terminó registrándose en Suecia en 1988 para el tratamiento de la úlcera duodenal y la esofagitis de reflujo. Su potencial terapéutico se amplió durante los años 90 superando a los antagonistas  $H_2$  en el tratamiento de estos problemas.

El omeprazol es un compuesto lipófilo que tiene un carácter básico débil ( $pK_a = 4.0$ ). Debido a estas propiedades, atraviesa las membranas celulares y se concentra en forma protonada en determinados compartimentos como los canalículos secretores de la célula parietal. A pH 1-3 es inestable, tiene una vida media de 2 minutos, pero a pH 7 es mucho más estable y posee una vida media de 20 horas [10,11]. En realidad, el omeprazol es un profármaco que se bioactiva en medio ácido, lo que supone una reorganización de su estructura y la transformación del grupo sulfóxido en la función ácido sulfénico. Ésta es una especie tiófila que se une covalentemente, formando un enlace disulfuro, con un grupo SH de un residuo de cisteína presente en el centro activo de la ATPasa  $H^+/K^+$ , según se indica en la figura.

Este complejo tiene una vida media que se calcula en unas 24 horas, hasta que se disocia probablemente por el glutatión, liberándose omeprazol y reactivándose la enzima. Aquél puede oxidarse a sulfona, que ya es un metabolito inactivo. La reactivación de la secreción ácida puede de-

berse, además de a la retroreacción citada en la que participa el glutatión, a la síntesis *de novo* de la ATPasa  $H^+/K^+$  [12].



La vida de una patente requiere que un fármaco importante para una empresa, como el omeprazol, disponga de sucesores que puedan comercializarse cuando expire la patente de aquél. Parece claro en este caso que, si el mecanismo molecular propuesto para explicar la actividad del omeprazol es el correcto, tendría que mantenerse la porción estructural de 2-(2-piridilmetilsulfinil)bencimidazol. También es importante que los compuestos tengan una vida media adecuada y no se metabolicen rápidamente en el hígado. A esta tarea se dedicaron entre 1989 y 1994 varios científicos, los cuales sintetizaron y evaluaron varios cientos de análogos intentando optimizar la actividad del omeprazol, esto es, que

fuesen más activos. De todos ellos, se seleccionaron 7 candidatos pero, cuando se compararon todos los parámetros, inhibición de la secreción ácida, propiedades farmacocinéticas, y seguridad, quedó un solo compuesto como el único que superaba al omeprazol: su **enantiómero S**, al que se denominó **esomeprazol**.

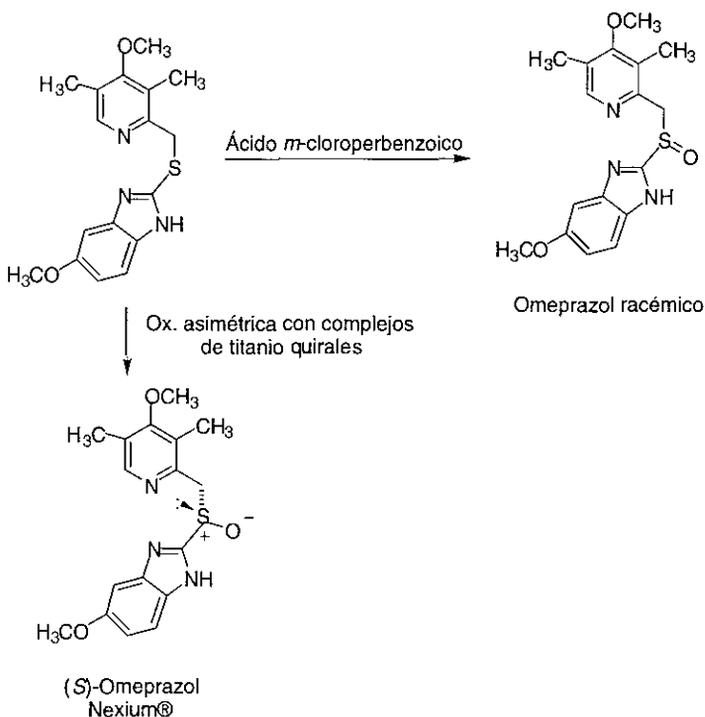
Es interesante preguntarse cómo no se había investigado previamente la actividad de ambos enantiómeros del omeprazol, ya que ésta era en esos años una práctica obligada cuando se investigaba un **fármaco quiral**. El omeprazol lo es porque se trata de un sulfóxido con sustituyentes  $R^1$  y  $R^2$  diferentes, siendo el oxígeno y el par de electrones no compartido del azufre los sustituyentes tercero y cuarto. Sin embargo en este caso, dado que la forma activa propuesta de ácido sulfénico no es quiral, **podría proponerse que ambos enantiómeros fuesen igualmente activos, aunque también cabría esperar que ambos enantiómeros se metabolizaran a distinta velocidad o de forma diferente.**

Estos estudios metabólicos eran estudios *in vivo* que requerían disponer de una cantidad bastante grande de muestra de ambas formas enantioméricamente puras. Antes de 1990, en que se prepararon **algunos miligramos de los dos enantiómeros puros**, sólo había sido posible investigar su actividad *in vitro* utilizando el modelo de la pared gástrica de cobaya, y en este ensayo ambos mostraron **la misma actividad inhibidora de la ATPasa**. Además, se observó que en solución acuosa se producía una lenta **equilibración** de uno en otro para dar una mezcla racémica [13].

Aunque todas estos datos parecían descartar el interés de un **enantiómero en particular respecto al fármaco racémico**, se siguió intentando desarrollar un procedimiento de síntesis asimétrica que permitiera disponer de ambos enantiómeros en cantidad suficiente. Para ello, se estudiaron procedimientos de síntesis enantioselectiva utilizando microorganismos o enzimas con resultados no demasiado satisfactorios, y se encontró finalmente que **el racémico podía resolverse a través de la formación de sales diastereoisómeras con ácido mandélico enantioméricamente puro** y su separación cromatográfica posterior.

Así pudieron obtenerse cantidades suficientes para ser ensayadas *in vivo*. Utilizando ratas como animales de laboratorio se observó que el enantiómero *R* era 4-5 veces más activo que el *S*, lo que suponía un incremento de actividad suficiente, frente al fármaco racémico, como para ensayar ambos enantiómeros **en humanos**. Curiosamente este estudio, que se realizó en 1994 [14], demostró que en este caso el enantiómero *S* era **4 veces más activo que el *R***. La diferencia es debida a que el *R*-omeprazol se metaboliza oxidativamente más rápidamente que el enantiómero *S* por la isoforma del citocromo P450 CYP2C19 que está presente en el hígado de casi todos los humanos pero no en el de las ratas.

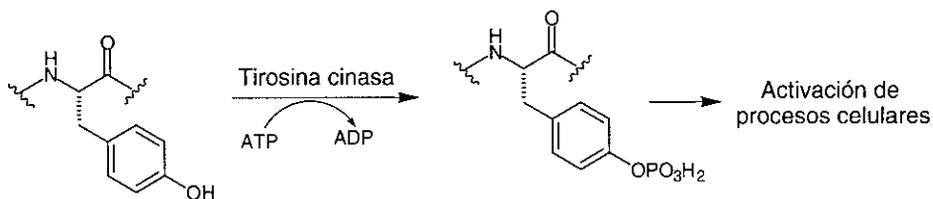
Inspirados en la epoxidación asimétrica de Sharpless, que utiliza catalizadores de titanio con ligandos quirales, se puso a punto finalmente un método para oxidar **asimétricamente a sulfóxido un precursor de tipo sulfuro**, obteniéndose un exceso enantiomérico del 94%. Así se produjo el enantiómero *S*, al que se denominó **esomeprazol**, y se comercializó con una nueva patente en el año 2000 como **Nexium®** [15].



#### 4. DISEÑO Y DESARROLLO DE IMATINIB (GLIVEC® DE NOVARTIS)

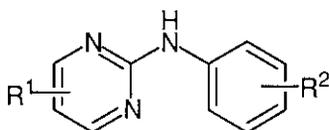
Este es el primer antitumoral dirigido a una diana específica, una **cinasa Abl** dependiente de ATP que posee una superactividad para fosforilar grupos hidroxilo de restos de tirosina de diferentes proteínas. Esta actividad se traduce en varios procesos alterados que conducen a un tumor: la **leucemia mieloide crónica**. Este tumor es un trastorno hematopoyético que se corresponde en el 95% de los casos con personas portadoras del **cromosoma de Filadelfia**, denominado así porque se descubrió en dicha ciudad hacia 1960 pero que se desentrañó con posterioridad. Mediante una traslocación, el oncogen *c-Abl* del cromosoma 9 se yuxtapone con secuencias del cromosoma 22 (*c-Bcr*), y el **producto de este gen fusionado, Bcr-Abl, es una tirosina cinasa con una actividad enzimática mucho mayor que la cinasa Abl «normal»**, afectando a muchas señales implicadas en el crecimiento, adhesión y supervivencia celular. La inhibición de esta cinasa no parecía tener efectos indeseables, ya que los ratones «knock out» que carecían de esta enzima por ingeniería genética, eran viables.

Sin embargo, los primeros intentos para encontrar inhibidores de esta cinasa parecieron demostrar que sólo podrían tener estructura peptídica, al igual que los sustratos de esta enzima, siendo compuestos de muy difícil farmacocinética. Así pues, quedaba el recurso de encontrar inhibidores que se fijasen al lugar de interacción entre la enzima y el ATP, pero si eran análogos de ATP, por estar éste implicado en muchos procesos biológicos, estos análogos deberían ser poco selectivos y, por tanto, muy tóxicos.

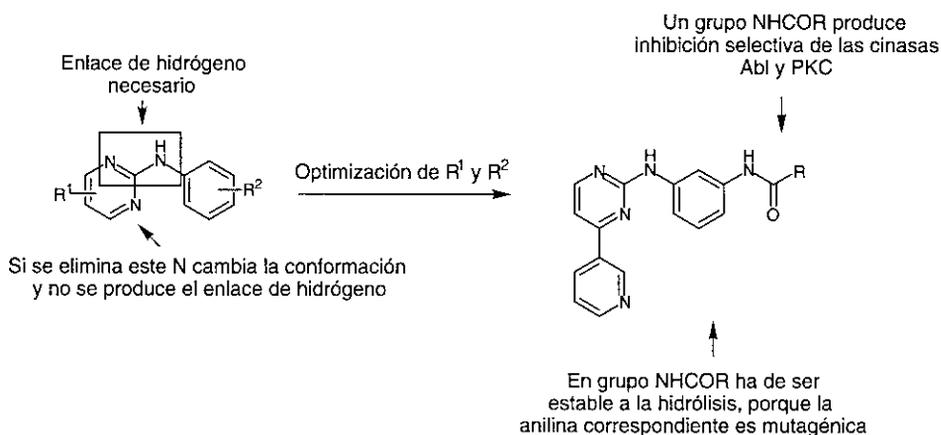


Así las cosas, se realizó en Ciba-Geigy (hoy Novartis) un cribado al azar de alto rendimiento (HTSM) en el que se estudió la afinidad de

varios compuestos previamente sintetizados en la empresa por diferentes cinasas. De dicho estudio surgió el compuesto 2-fenilaminopirimidina como prototipo. Éste tenía baja actividad y poca selectividad, pero era fácilmente manipulable por introducción de sustituyentes en ambos anillos.

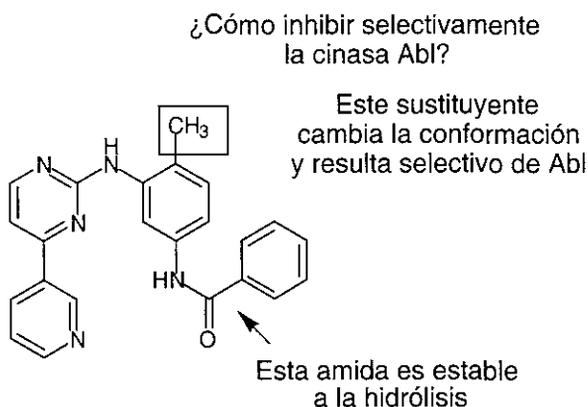


Al sintetizarse varios análogos, se observó que el agrupamiento de guanidina era imprescindible para la actividad, ya que debía estar implicado en enlaces de hidrógeno en los que un nitrógeno de pirimidina actúa como aceptor y el grupo NH como donador. También se determinó que el mejor sustituyente  $R^1$  era 3-piridilo, y que los mejores sustituyentes  $R^2$  eran de tipo acilamino. Estos grupos aumentaban la afinidad por dos cinasas: la proteína cinasa C (PKC) y la cinasa Abl (la diana farmacológica deseada en este caso), pero debían ser estables metabólicamente, porque los derivados de hidrólisis con grupo amina libre tenían acción mutagénica.

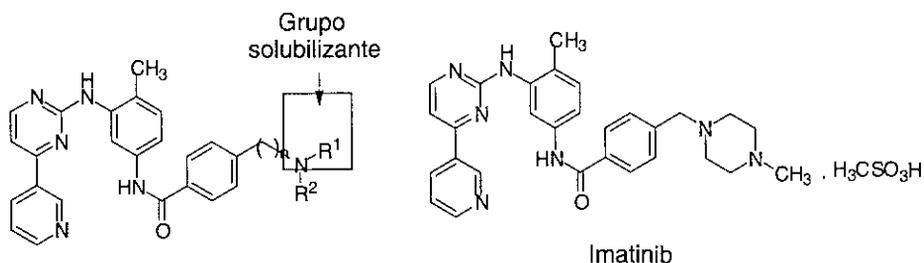


Los intentos para encontrar inhibidores selectivos de la cinasa Abl se vieron premiados cuando se introdujo un grupo metilo en la posi-

ción *orto* del grupo fenilo. Este sustituyente impide la libre rotación del enlace NH-fenilo, y el compuesto así formado se dispone en una conformación preferente que resulta afín por la cinasa cuya inhibición se desea. En el siguiente ejemplo se representa el benzoilamino derivado, que fue estable al metabolismo hidrolítico.



Desafortunadamente, este fármaco tan optimizado tenía muy poca solubilidad acuosa. Aunque se pensó en derivarlo a un profármaco con mejor perfil ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo, y Eliminación), se decidió finalmente introducir en su estructura grupos solubilizantes, como los bien conocidos de tipo dialquilaminoalquilo, que se solvatan con agua tras protonarse a pH fisiológico. Se llegó así al mesilato denominado **imatinib**, que se comercializó como **Glivec®**. Esta sal es soluble, no corrosiva, activa por vía oral, no mutagénica y eficaz en el 95% de los pacientes con este tipo de tumor (leucemia mieloide crónica) asociado a este tipo de mutación genética (presencia del cromosoma de Filadelfia).



En 1998 se iniciaron los ensayos clínicos en Fase I utilizando pacientes para los que había fracasado la terapia con interferón  $\alpha$ . **Hoy está comercializado con gran éxito**, y sus descubridores han recibido el reconocimiento mundial.

En el año 2000, cuando la comercialización era inminente por su selectividad, se supo con sorpresa que el fármaco interactúa con la forma inactiva de la enzima, en contraste con los escasos estudios de modelado molecular que se habían realizado con antelación los cuales parecían indicar que el fármaco interactuaba con la forma activa de aquélla. Cabe pensar que si se hubiese hecho más énfasis en estos estudios teóricos, y se hubiera determinado la afinidad de estas estructuras por la forma inactiva de la enzima, no se hubiera continuado con su desarrollo.

Los ejemplos que se han seleccionado muestran que **el diseño y desarrollo de fármacos está basado en una interacción interdisciplinar y puede estar influido por circunstancias difícilmente previsibles.**

## 5. DISEÑO DE NOVO

En los últimos años se ha ido estableciendo lo que se ha venido a denominar «**diseño racional**» de fármacos, que está basado en el conocimiento de las interacciones que tienen lugar entre éstos y sus dianas farmacológicas. Esta última denominación supone un homenaje a **Ehrlich**, un químico y médico alemán que, para explicar cómo una minúscula cantidad de un compuesto puede producir efectos tan importantes cuando se administra a un sistema vivo, predijo en el año 1900 que los fármacos actúan como dardos que penetran en el organismo en busca de sus dianas [16].

El descubrimiento de las **bases moleculares en las que se fundamentan los procesos biológicos normales y patológicos** ha abierto una nueva era en la investigación de fármacos, de tal forma que **la enfermedad ya no se estudia sólo como un problema médico sino como un problema biológico**. La **Biología Molecular** caracteriza cada día nuevos recep-

tores, y los programas de modelado molecular permiten visualizar en la pantalla de un ordenador las estructuras tridimensionales de los ligandos, de sus receptores y de los complejos ligando-receptor.

La **genética** está haciendo posible que se conozcan proteínas cuyo papel todavía no ha podido caracterizarse en muchos casos. A estas macromoléculas se les denomina «**receptores huérfanos**», y gran parte de la investigación básica en las grandes compañías farmacéuticas se dirige hoy a la validación de estas dianas farmacológicas, esto es, a determinar si puede ser importante encontrar ligandos específicos de las mismas.

Cada vez se tiene más información acerca de la estructura y función de las macromoléculas biológicas y de la de los complejos que forman cuando interactúan con sus ligandos específicos. El establecimiento de las relaciones cuantitativas entre la actividad biológica de distintos ligandos en función de determinadas variables estructurales es la finalidad de los estudios **QSAR**: *quantitative structure-activity relationship*. Éstos pueden hacerse con la ayuda de ordenadores, por lo que estas técnicas de diseño se denominan **computed aided drug design** y utilizan en algunos casos aproximaciones al problema fácilmente comprensibles. Así, cuando se habla de los métodos de «docking» (encajado), se está considerando el fármaco (o ligando) como un barco y a la diana farmacológica (receptor) como un puerto de atraque. En realidad, lo que hacen estos programas es ajustar el ligando por rotación y traslación, y una vez modelado el complejo, calcular su energía [17].

Aunque todavía es difícil reconocer **qué variables son verdaderamente significativas** entre las muchas que pueden estar implicadas en la **interacción ligando-receptor** (con frecuencia se desprecian los efectos de solvatación-desolvatación que suelen ser muy importantes), se puede calcular la afinidad de un ligando antes de que sea sintetizado y ensayado.

Para **calcular la energía libre del enlace ligando-receptor** ( $\Delta G$ ), se divide aquélla en diferentes componentes que se suponen que influyen de forma aditiva. Los distintos métodos que pueden utilizarse para este cálculo se diferencian en el modo en que se realiza dicha división.

Un grupo de métodos rápidos y adecuados para comenzar un proyecto de búsqueda de nuevos prototipos, considera que la energía libre puede dividirse en **contribuciones hidrófobas, electrostáticas y entrópicas**. La contribución hidrófoba puede determinarse si se conocen los parámetros hidrófobos de un átomo o grupo de átomos (los más utilizados son los **valores  $\pi$  de Hansch**), mientras que los **parámetros electrónicos de Hammett** se utilizan para determinar las contribuciones electrostáticas.

$$\Delta G = f (\text{contribuciones hidrófobas} + \text{contribuciones electrostáticas} + \text{contribuciones entrópicas})$$

Un segundo grupo de métodos se basa en **cálculos de mecánica molecular**, de forma que la energía libre del enlace ligando-receptor se aproxima a la entalpía calculada mediante funciones empíricas. Así, las repulsiones de van der Waals y las interacciones de dispersión se representan por medio del **término de Lennard-Jones**, y las interacciones electrostáticas por medio del **término culómbico**, que utiliza cargas atómicas. Las contribuciones entrópicas suelen ignorarse, aunque a veces se añaden **términos de solvatación** calculando, por ejemplo, las diferencias entre la solvatación del ligando libre y del lugar de interacción de la macromolécula antes y después de la formación del complejo.

Incluso cuando los resultados de los estudios QSAR, que relacionan la afinidad calculada con la actividad experimental ( $K_i$ ,  $CI_{50}$  ó  $K_D$ ) son satisfactorios, los **modelos de regresión** con estos cálculos son normalmente poco predictivos acerca de la potencia de compuestos que no se incluyeron en la elaboración del modelo teórico. Sin embargo, la predicción puede mejorarse si se comparan y seleccionan según su «peso» (importancia) las contribuciones de los fragmentos que hacen variar la energía de interacción. Este **método** se denomina **COMBINE** y contiene una gran cantidad de descriptores de energía, al igual que el **método** denominado **CoMFA** (*comparative field analysis*), que da información acerca de las propiedades de interacción de los ligandos.

El tercer grupo de métodos requiere cálculos más rigurosos y complejos. Por **dinámica molecular** o por **simulaciones tipo Monte Carlo**, por

ejemplo, pueden determinarse diferencias de energía pero, con los recursos computacionales actuales, estos métodos son todavía impracticables incluso para comparar series pequeñas de complejos.

Así pues, podemos concluir que el descubrimiento y diseño de fármacos dispone hoy de herramientas de trabajo para racionalizarse o para realizarse en menor tiempo, pero el trabajo de manipulación de un prototipo mediante la síntesis y ensayo biológico de sus análogos sigue siendo imprescindible.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. «Heterocycles in Life and Society», Pozharskii, A.F.; Soldatenkov, A.T.; Katritzky, A.R.; John Wiley&Sons, 1997.
2. C. Avendaño; J.C. Menéndez, *Curr. Med. Chem.*, 2002, 171-172 (y referencias relacionadas).
3. «Introducción a la Química Farmacéutica», Mc-Graw Hill Interamericana, C. Avendaño (Coord.), 2001, Capítulo 12.
4. H.N. Doods, *Drug News&Perspectives*, 1992, 5, 345-352.
5. D.R. Budman, «Capecitabine», *Inv. New Drug*, 2000, 18, 355-363.
6. E. Carlsson, P. Lindberg, S. Von Unge, «Two of a kind», *Chemistry in Britain*, 2002, 38, 42.
7. E. Fellenius y cols., *Nature*, 1981, 290, 159.
8. H. Larsson y cols., *Gastroenterol.* 1983, 85, 900.
9. P. Lindberg y cols.; *Med. Res. Rev.* 1990, 10, 1.
10. P. Lindberg, A. Brändstöm, B. Wallmark, *Trends Pharmacol. Sci.* 1987, 8, 399.
11. K. Gedda y cols., *Gastroenterol.* 1995, 109, 1134.
12. P. Ealandsson y cols., *Clin. Pharmacokinet.* 1990, 532, 305.
13. T. Anderson y cols., *Clin. Pharmacokinet.*, 2001, 40, 411.

14. J.E. Richter y cols., *Ann. J. Gastroenterol.* 2001, 96, 656.
15. H. Cortoy cols., *Tetrahedron Asymmetry*, 2000, 11, 3819.
16. H.J. Smith (ed.), «Smith and Williams Introduction to the Principles of Drug Design and Action», (3ª ed.), Harwood Academic Publishers, 1998.
17. a) «New perspectives in Drug Design», I.O. Kuntz, E.C. Meng, B.K. Schoi-  
chet (Eds); Academic Press, 1995. b) A.R. Leach, I.D. Kuntz, *J. Comp.*  
*Chem.* 1992, 13, 730.

# Inhibidores de proteasas

## 1. PROTEASAS

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de proteínas. Las cuatro clases más importantes son las que contienen en su sitio activo un residuo de aspártico, serina o cisteína y las metaloproteasas, que requieren la participación de un metal. Unas proteasas liberan hormonas y neurotransmisores a partir de ciertos precursores que son inactivos, mientras que otras son responsables de poner fin a determinadas respuestas biológicas mediadas por péptidos, estando regulada su acción por inhibidores endógenos selectivos.

Estas enzimas controlan procesos fisiológicos tan importantes como la digestión, la fertilización, el crecimiento, la diferenciación celular, la defensa inmunológica, la cauterización de las heridas, y la apoptosis. Es por tanto comprensible que los inhibidores de proteasas de origen natural o de síntesis se estudien con fines terapéuticos y de estos estudios hayan surgido muchos e interesantes fármacos.

En los últimos años, sobre todo desde el descubrimiento del antihipertensivo captopril y del desarrollo de la idea de peptidomimético, los inhibidores de proteasas están teniendo un avance espectacular. Hoy se utilizan en el tratamiento del cáncer y de las enfermedades infecciosas causadas por parásitos, hongos y virus, desde la malaria hasta el herpes,

pasando por la esquistosomiasis, las candidiasis, el HIV o la hepatitis. También han demostrado ser útiles en los procesos inflamatorios, inmunológicos, respiratorios, cardiovasculares y neurodegenerativos, incluyendo la enfermedad de Alzheimer.

Para ser fármacos eficaces, los inhibidores de proteasas deben ser no sólo muy potentes, sino muy selectivos a fin de que inhiban una determinada enzima y no muestren efectos secundarios. Además, deben tener una farmacocinética y farmacodinamia apropiadas.

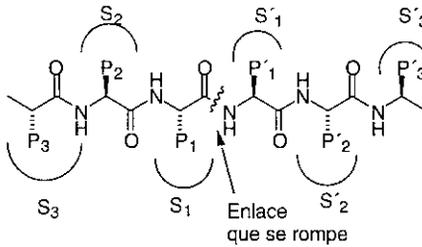
Las proteasas reconocen de forma específica a determinados péptidos, que son sus sustratos, por los que los análogos de estos péptidos tendrían en principio una capacidad similar para ser reconocidos por la enzima que desea inhibirse. Sin embargo, como los péptidos no pueden utilizarse normalmente como fármacos por ser bastante inestables a la hidrólisis y poseer una biodisponibilidad muy mala, los inhibidores de proteasas se diseñan de forma que tengan el mínimo carácter peptídico.

**Tradicionalmente, los inhibidores de proteasas han surgido por cribado al azar de productos naturales.** Así se ha puesto de manifiesto esta actividad en un prototipo, a partir del cual se ha optimizado la actividad biológica a través de la síntesis y estudio de sus análogos. **Alternativamente, el sustrato peptídico de una proteasa puede también simplificarse hasta un número de aminoácidos menor de 10, reemplazarse el enlace de amida que se hidroliza por otro que no se hidroliza, y manipularse la estructura para optimizarla como en el primer caso.**

Aprovechando que se conoce la estructura del sitio activo de muchas proteasas, pueden también utilizarse **programas de ordenador** para diseñar moléculas que encajen en ellos. El diseño de inhibidores de proteasas muy activos se basa en estrategias de síntesis a veces muy sofisticadas, en los estudios de cinética enzimática, y en el modelado molecular.

Ya hemos dicho que las proteasas presentan en general **especificidad de sustrato**, es decir, el tamaño y la hidrofobia de sus sitios activos definen cuáles aminoácidos de un polipéptido pueden situarse en ellos, y

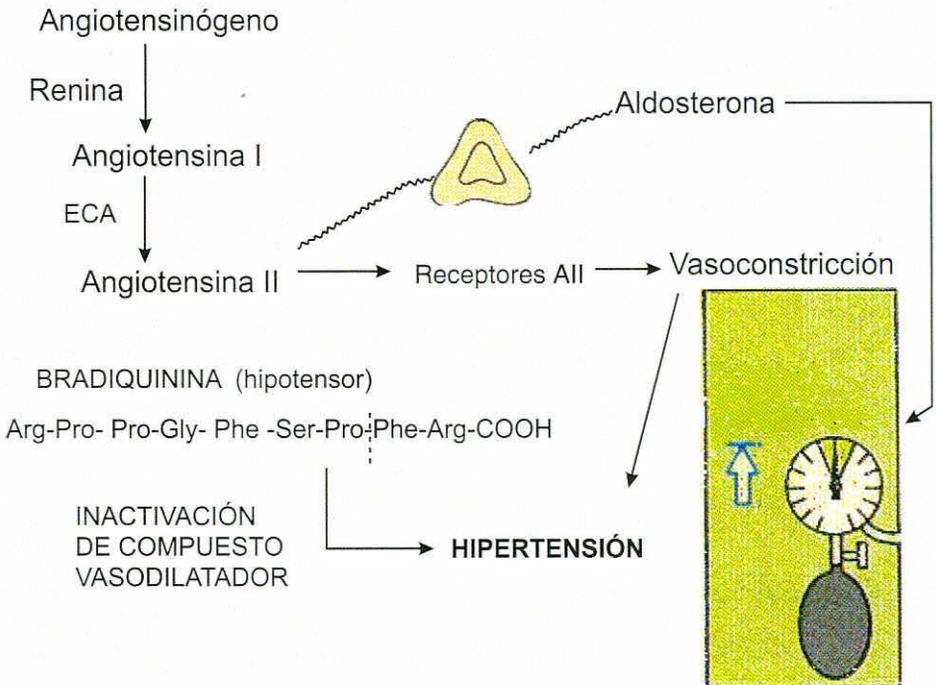
catalizan la hidrólisis de un determinado enlace peptídico. Utilizando la nomenclatura indicada para los diferentes residuos de aminoácidos de los sustratos, en este reconocimiento es especialmente importante el residuo  $P'_1$ , que es el que va a ser liberado en la ruptura como extremo amino del nuevo péptido.



## 2. INHIBIDORES DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA. IECA

### 2.1. El sistema renina-angiotensina

La **renina** es una proteasa de aspártico cuya presencia en los extractos de riñón se descubrió hace unos 100 años. Se libera a la sangre cuando las células yuxtaglomerulares del riñón detectan una disminución de la presión sanguínea, y su función es hidrolizar el **angiotensinógeno** para dar el decapeptido **angiotensina I**. El angiotensinógeno es una  $\alpha$ -globulina que se biosintetiza en el hígado y circula en la sangre hasta que se hidroliza por la renina.



La angiotensina I, que carece prácticamente de actividad, es a su vez el sustrato de otra enzima que hidroliza el dipéptido histidil-leucina del extremo C-terminal y lo convierte en el octapéptido angiotensina II. Esta segunda enzima se denomina **enzima convertidora de angiotensina (ECA)**, y es una **metaloproteasa de  $Zn^{2+}$**  que se produce fundamentalmente en el pulmón y en el riñón. La angiotensina II se transforma en **angiotensina III** por hidrólisis del residuo de ácido aspártico del extremo N-terminal.

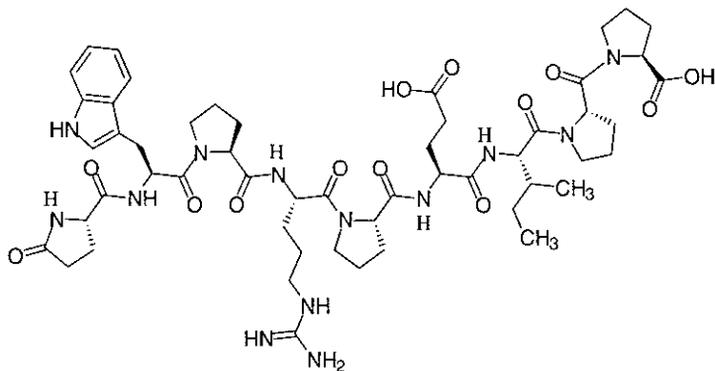
La **angiotensina II eleva la presión sanguínea** por varios mecanismos: al interactuar con sus receptores de membrana específicos localizados en los vasos sanguíneos se produce vasoconstricción y, por tanto, un aumento de la resistencia periférica. Por otro lado, tanto la angiotensina II como la III estimulan la liberación de aldosterona, una hormona encargada de regular el balance electrolítico de los fluidos corporales promoviendo la excreción de iones potasio y la retención de sodio y agua con el consiguiente efecto vasopresor. Finalmente, como la ECA además

de catalizar la hidrólisis de la angiotensina I, cataliza la hidrólisis de otro péptido que es un potente vasodilatador: la bradiquinina, su inhibición se traduce en la prolongación del tiempo de acción de ese péptido y, en consecuencia, de la vasodilatación.

Los tres mecanismos explican la acción antihipertensiva de los inhibidores de ECA (IECA). La hipertensión afecta al 20% de los adultos y este porcentaje se eleva a un 60% en los mayores de 65 años, constituyendo los IECA una de las varias opciones terapéuticas posibles [1].

## 2.2. Desarrollo del captopril

Ondetti y Cushman, que trabajaban en los laboratorios Squibb, propusieron que la ECA y la carboxipeptidasa A podrían tener sitios activos semejantes, ya que ambas son  $Zn^{2+}$ -metaloexopeptidasas que hidrolizan enlaces próximos al extremo C-terminal. La primera libera un dipéptido y la segunda, cuya estructura por rayos X se conocía desde hace varios años y podía inhibirse por el ácido (R)-2-bencilsuccínico, libera un único aminoácido [2-4]. También se descubrió que el **teprótido**, un nonapéptido aislado del veneno de la víbora brasileña *Bothrops jararaca* que posee cuatro residuos de prolina y uno de ácido piroglutámico, inhibía competitivamente a la ECA.



Teprótido

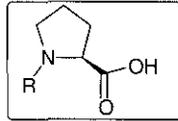
*Bothrops jararaca* (víbora brasileña)

La actividad inhibidora de alguno de sus análogos más sencillos puso de manifiesto la importancia del resto de prolina terminal, como se refleja en la siguiente tabla.

	CI <sub>50</sub> (µg/ml)
pGlu-Lys-Trp-Ala -Pro (BPP5a)	0.05
pGlu-Lys-Phe-Ala-Pro	0.05
Phe-Ala-Pro	1.4
Ala-Pro	50

Dado que el ácido 2-bencilsuccínico era inhibidor de carboxipeptidasa A, los científicos de Squibb investigaron la *N*-succinil-L-prolina, como posible inhibidor de ECA, ya que podría enlazarse a su sitio activo sin hidrolizarse. Sin embargo, aunque este compuesto se utilizó como prototipo, fue poco activo (CI<sub>50</sub> del orden µM). Una de las primeras modificaciones que se ensayaron en él fueron los **análogos obtenidos por variación de la longitud de la cadena lateral**, observándose que por debajo de cuatro y por encima de seis átomos de carbono, la actividad inhibidora de ECA disminuye. En segundo lugar, se sustituyó la L-prolina por otros aminoácidos como Arg, Phe, Leu e His, siendo el **residuo Pro** el mejor.

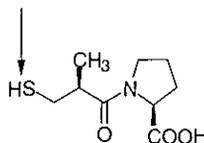
En este momento, se sustituyó la cadena de **succinilprolina** introduciendo un resto metilo en α a ambos grupos carbonilo del ácido succínico, y se ensayaron los enantiómeros de configuración *R* y *S*. El más activo fue el 2*R*-metil derivado.



R	CI <sub>50</sub> (μM)
	22
	1500
	2600
	1,1
	0,20
	0,023

Con objeto de mejorar su actividad, se introdujeron otros grupos funcionales diferentes al ácido carboxílico que fueran capaces de mejorar la coordinación con  $Zn^{2+}$ , que es un *ácido blando*. El cambio del grupo carboxilo del ácido succínico inicial por un **grupo mercapto**, que es una *base blanda* condujo al **captopril**. Éste fue 1000 veces más potente que el prototipo y el primer IECA que se comercializó, constituyendo un enorme éxito para los laboratorios Squibb. Este antihipertensivo puede administrarse por vía oral ya que el enlace amídico acil-prolina es resistente a la hidrólisis.

La fuerza de enlace entre Zn y grupo SH  
aumenta la actividad  
casi 1000 veces

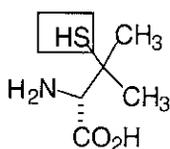


CAPTOPRIL

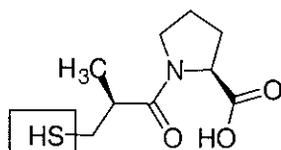
Enseguida se observó que el captopril tenía algunos efectos adversos, como son alteraciones y pérdida del gusto, sabor metálico, unión a proteínas, y reacciones alérgicas (prurito). Aunque muchos de estos efectos se eliminan al disminuir la dosis, el grupo Merck emprendió la búsqueda de un sustituto del captopril que careciera de grupo mercapto.

### 2.3. Búsqueda de un sustituto de captopril. Enalaprilato y enalapril

Las reacciones adversas del captopril eran similares a las que produce la penicilamina, utilizada en ciertas intoxicaciones metálicas por su capacidad para formar complejos con diversos metales. Dado que ambas estructuras comparten un grupo mercapto, fue a éste al que se atribuyeron los efectos indeseables. Por ello, los científicos de Merck decidieron volver al grupo carboxilo como grupo coordinante del catión  $Zn^{2+}$  en el centro activo de ECA. Estos compuestos tendrían, además, una mayor estabilidad metabólica, ya que el grupo mercapto se oxida fácilmente a disulfuro *in vivo*.



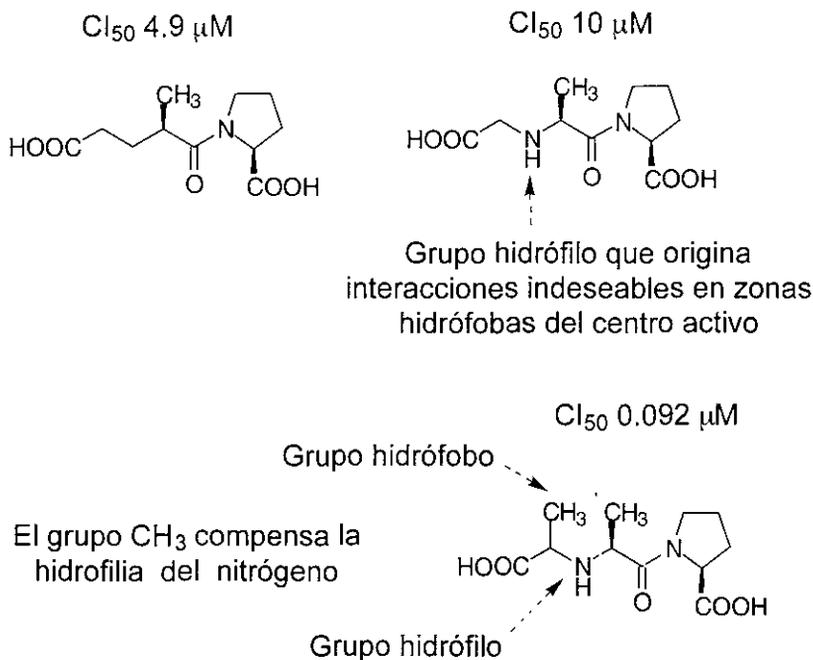
Penicilamina



Captopril

Teniendo en cuenta que de los análogos de acilprolina la longitud óptima de la cadena alifática era de 5 eslabones, correspondiente a glutarilprolina (esta cadena era mejor que la de 4 eslabones que dio lugar al captopril), y que la introducción de grupos metilo en la posición 2R aumentaba la actividad en la serie anterior, se utilizó la **2R-metilglutarilprolina como prototipo**, siendo una de las primeras modificaciones la sustitución del metileno C-3 por un grupo NH, a fin de que la estructura se pareciera más a un péptido. Desafortunadamente, este análogo era la mitad de activo. Se razonó que la pérdida de actividad podría deberse a

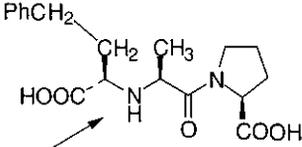
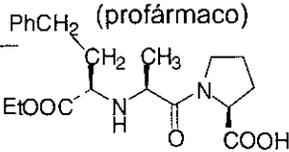
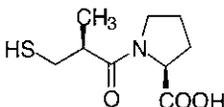
que este compuesto, cuyo grupo NH estaría protonado a pH fisiológico, era demasiado hidrófilo, por lo que para contrarrestar este aumento de hidrofilia se introdujo un **grupo metilo en la posición  $\alpha$  al carboxilo terminal**. De este modo se llegó a un compuesto mucho más activo [5].



Estos datos sugerían que el grupo metilo en  $\alpha$  al carboxilo, además de aumentar la lipofilia, podía interaccionar con una región del centro activo de la enzima (la región  $S_1$ ) por enlace hidrófobo. Para confirmar esta hipótesis se introdujeron otros sustituyentes lipófilos y de distinto tamaño en dicha posición. Uno de los primeros fue el grupo **fenetilo**, que mostró un gran aumento en la actividad. Cuando se prepararon ambos estereoisómeros, el isómero *S* fue el más activo y pasó a ensayos clínicos, comercializándose posteriormente como **enalaprilato**. En este fármaco, el grupo NH debe interaccionar de alguna manera con el centro activo, ya que su sustitución conduce a la pérdida de la actividad.

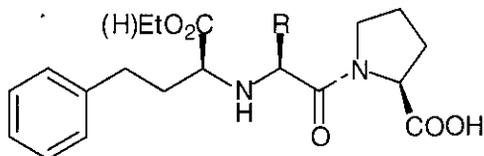
La  $Cl_{50}$  de enalaprilato es 19 veces menor que la de captopril, no presenta los efectos secundarios de captopril, pero no puede administrarse

se por vía oral. Se resolvió entonces preparar un derivado de tipo éster que poseyera una solubilidad adecuada como profármaco, lo que condujo al **enalapril**. Es de destacar, que la esterificación modifica sustancialmente el **pKa del grupo amino** de la cadena, ya que éste es 7,6 en enalaprilato y 5,5, en enalapril. Esta circunstancia, junto con el enmascaramiento de un grupo carboxilo, explica la diferente solubilidad, y por tanto farmacocinética, de este profármaco respecto al fármaco activo.

	<i>In vitro</i> Cl <sub>50</sub>	DE <sub>50</sub> (en ratas)	
		Intravenosa	Oral
<p style="text-align: center;"><b>Enalaprilato</b></p> 	1,2 nM	8,2 µg/kg	2,29 mg/kg
<p>Activación metabólica</p> <p style="text-align: center;"><b>Enalapril (profármaco)</b></p> 	124 nM	14 µg/kg	0,29 mg/kg
<p style="text-align: center;"><b>Captopril</b></p> 	23 nM	26 µg/kg	0,33 mg/kg

#### 2.4. Manipulación de enalaprilato

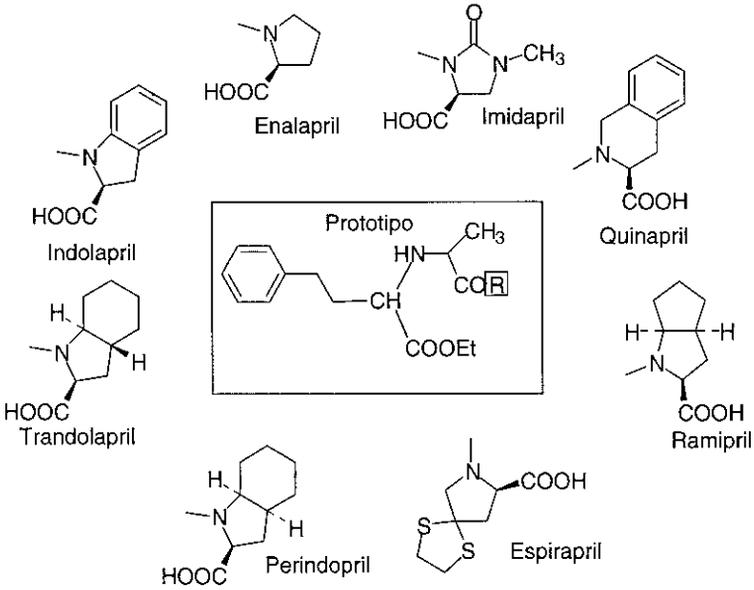
Las variaciones del residuo S<sub>1</sub> del enalaprilato condujeron a lisinopril, que puede administrarse como ácido sin necesidad de transformarlo en un éster profármaco.

Estudio de la zona S'<sub>1</sub>

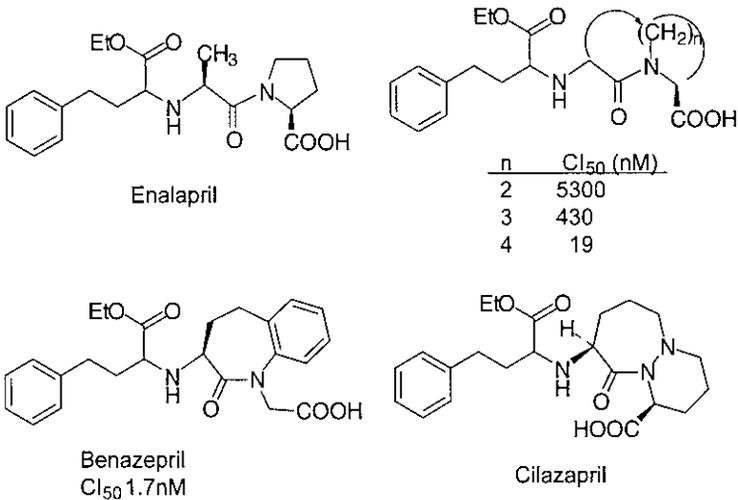
R	Cl <sub>50</sub> (nM)	R	Cl <sub>50</sub> (nM)
-H	230	-CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	240
-CH <sub>3</sub> (S) Enalapril	3.8	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	19
-CH <sub>3</sub> (R)	2500	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	2.2
-CH <sub>2</sub> F	3.6	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	1.2
-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> Lisinopril	5.0	(activo como ácido)	
-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	8.8		
-CH <sub>2</sub> Ph	52		

**Lisinopril** se absorbe lentamente, tiene una vida media muy superior a captopril y puede administrarse una vez al día, al contrario que captopril que ha de administrarse dos o tres veces al día por la labilidad metabólica del grupo SH anteriormente mencionada.

La manipulación del anillo de prolina (porción P<sub>2</sub>) de enalaprilato puede también dar lugar a compuestos activos siempre que permanezca el carácter de aminoácido que posee la prolina. Así se desarrollaron **indolapril**, **imidapril**, **quinapril**, **trandolapril**, **perindopril**, **espirapril**, o **ramipril**. Todos están comercializados.

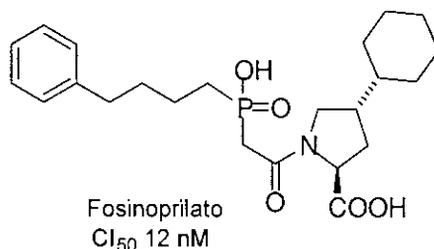
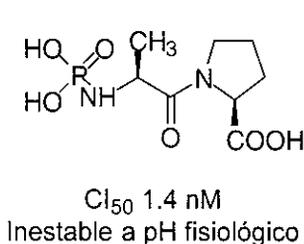


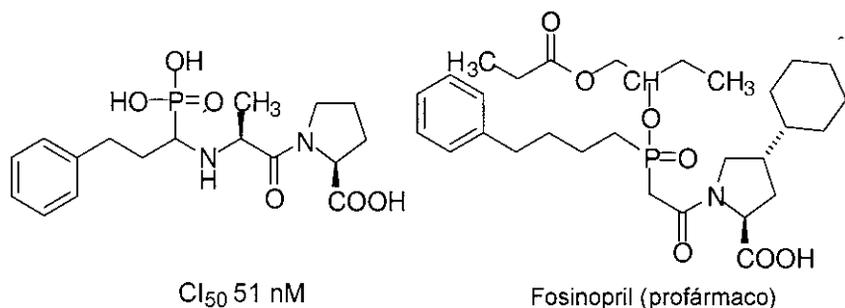
Una segunda modificación fue la obtención de **análogos rígidos** mediante el establecimiento de un anillo fusionado con el anillo terminal en el que está incorporado el metilo en  $\alpha$  al carbonilo de amida. El tamaño óptimo para este anillo, fusionado al de prolina, fue de 7 eslabones. Estas estructuras fijan un ángulo de torsión óptimo para interactuar con ECA.



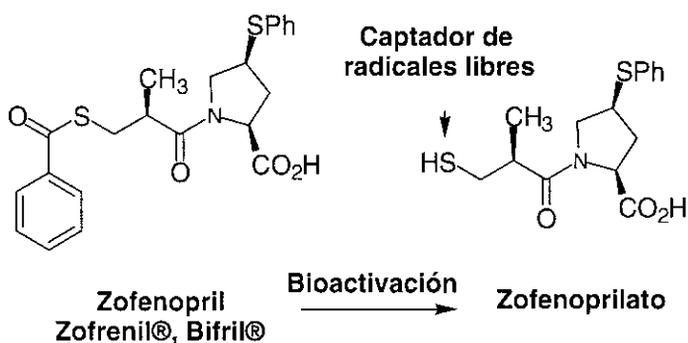
## 2.5. Desarrollo de IECA derivados de ácido fosfórico y fosfónico

Desde que se descubrió que un péptido fosforilado de origen microbiano, la **fosforamidona**, era un inhibidor de otra  $Zn^{2+}$ -metaloproteasa, la **termolisina**, la estructura de este compuesto se utilizó como prototipo para diseñar nuevos IECA. El complejo formado por termolisina y fosforamidona pudo estudiarse por cristalografía de rayos X y comprobarse que el oxígeno ionizado del grupo fosforamida está enlazado con el catión metálico. Los primeros análogos que se ensayaron fueron inestables a pH fisiológico, por lo que el ácido fosfórico se substituyó por ácido fosfónico. Estos análogos, debido a que el átomo de carbono está enlazado directamente al de fósforo en vez de hacerlo a través de un átomo de oxígeno, fueron más estables a la hidrólisis y mostraron una actividad biológica aceptable como IECA. A partir de ellos surgió un derivado de ácido fosfónico: **fosinoprilato**, en el que existen dos porciones muy lipófilas: la cadena fenilbutílica y el sustituyente ciclohexilo de la prolina. Como no se absorbe por vía oral se comercializó como su profármaco **fosinopril**. Los laboratorios Squibb han desarrollado varios análogos de fosinoprilato en los que existen grupos fosfonamida o fosfonato en vez de un grupo fosfónico (isosterismo  $CH_2/NH$  y  $CH_2/O$ ). Muchos no son activos por vía oral, como ocurría con fosinoprilato, pero la hidrólisis de estos grupos puede evitarse situando en la posición contigua ( $\alpha$  al NH o al O) un **grupo 4-aminobutilo**. Esta mayor estabilidad por vía oral se aplicó antes al enalaprilato para obtener lisinopril.





Otro IECA más reciente (zofenopril, 1999), también es un profármaco en el que la forma activa posee un grupo mercapto, como captopril [6]. La hidrólisis *in vivo* de su agrupamiento tioéster origina **zofenoprilato**, de estructura próxima a captopril salvo que posee un metileno menos en la cadena alquílica y que el anillo de prolina está sustituido por un grupo feniltilio.



Este último agrupamiento lo hace muy lipófilo y le permite acceder a diversos órganos más difícilmente accesibles para otros IECA, como son el cerebro, el pulmón o el corazón. Esta distribución es especialmente importante en el caso del corazón, porque dada la actividad de los grupos SH para atrapar los radicales libres, actúa como cardioprotector pudiendo ser útil en la prevención de la mortalidad postinfarto de miocardio.

## 2.6. Aplicaciones terapéuticas de los IECA

Los alrededor de 15 IECA comercializados se utilizan mucho en terapéutica, siendo el tratamiento de elección para muchos casos de hipertensión e insuficiencia cardíaca congestiva, especialmente en diabéticos, pero no deben administrarse conjuntamente con diuréticos ahorradores de potasio, ya que al inhibir la liberación de aldosterona el potasio no se excreta por esta vía y se puede producir hiperkalemia. Algunos, como ya se ha dicho, se proponen para prevenir la mortalidad tras un infarto de miocardio. Son menos eficaces en individuos de raza negra porque éstos producen renina en menor cantidad.

Aunque desde fechas relativamente recientes otros fármacos que actúan sobre el sistema de renina-angiotensina pero que tienen menos efectos secundarios: los **antagonistas de los receptores de angiotensina II** (conocidos como **sartanes**) compiten con ellos, no acaban de desbancarlos. Por el contrario, continúa la investigación de nuevos IECA. Muchos son compuestos de estructura novedosa, de origen microbiano o de síntesis [7].

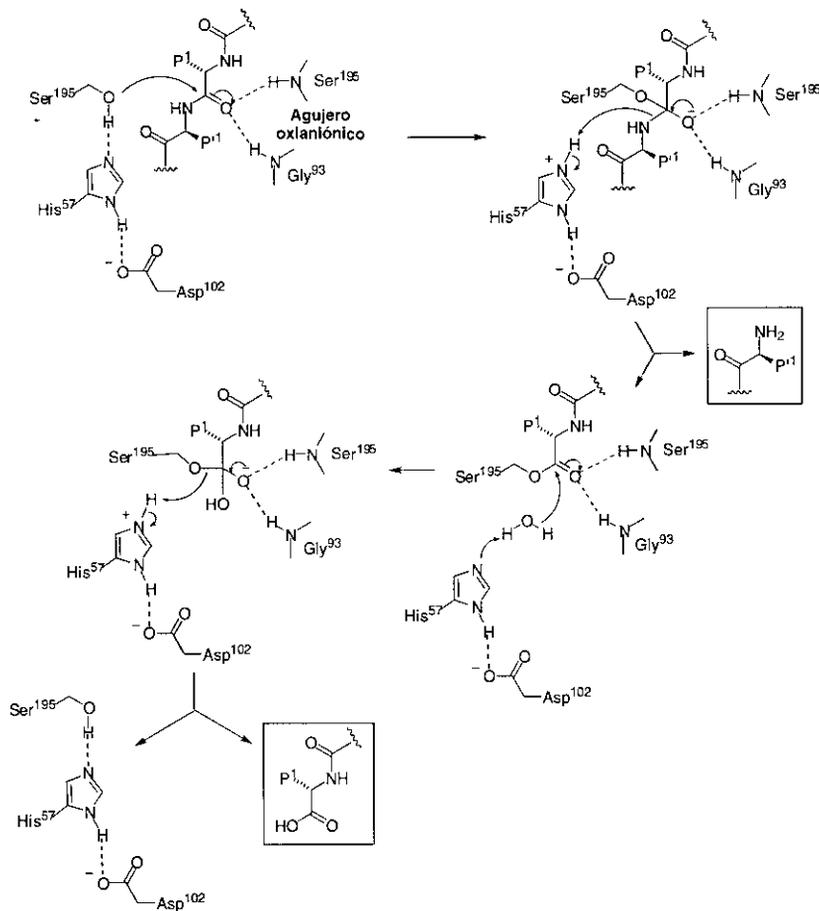
## 3. INHIBIDORES DE ELASTASA

La elastasa es una enzima que pertenece al grupo de proteasas de serina. Las **proteasas de serina** se clasifican en función de su sustrato en tres tipos: tipo tripsina, que rompe sustratos que contienen aminoácidos en P<sub>1</sub> cargados positivamente, tipo quimotripsina, que prefiere en dicho lugar aminoácidos aromáticos o alifáticos de cadena larga, y tipo elastasa, que prefiere aminoácidos alifáticos de cadena corta, como alanina o valina. Entre las varias proteasas de serina cuya estructura se conoce por rayos X, se encuentran la **elastasa neutrófila humana** y la trombina. La primera está implicada en el enfisema pulmonar, la artritis reumatoide, la fibrosis quística y la bronquitis crónica [8].

Su sitio activo consiste en una **triada catalítica** formada por los aminoácidos Ser195, His57 y Asp102 (los números corresponden a la quimotripsina) y una porción estructural denominada «**agujero oxianiónico**». El sustrato se enlaza a este sitio activo formando un complejo en el

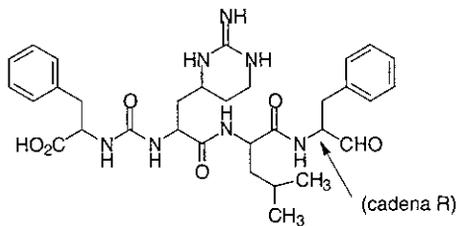
que el carbonilo del enlace amida que ha de romperse sufre el ataque nucleófilo del grupo OH de la serina que, a su vez, está activado por el imidazol del residuo His57. Se forma así un intermedio tetraédrico que se estabiliza por enlace de hidrógeno, enlazándose a grupos NH amídicos de los residuos Ser195 y Gly193, los cuales forman el agujero oxianiónico.

La transferencia de un protón de His57 al grupo amina del intermedio tetraédrico facilita la expulsión de éste como grupo saliente. El enlace covalente acil-enzima se ataca por el agua y se forma un nuevo intermedio tetraédrico, que posteriormente se rompe por la catálisis ácida del resto His57. Se libera así el fragmento carboxi-terminal del sustrato y se regenera el resto Ser195.

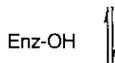


La elastasa se libera desde los leucocitos polimorfonucleados en respuesta a estímulos inflamatorios, siendo responsable de la degradación de proteínas del tejido conectivo, como son colágeno, elastina, laminina, fibronectina y proteoglicano. Su actividad está regulada en circunstancias normales por inhibidores de elastasa endógenos, pero en ciertos estados patológicos la regulación se rompe, resultando una actividad elastolítica incontrolada que produce la degradación del tejido sano y el desarrollo de la enfermedad. En estos casos, los fármacos inhibidores de elastasa pueden actuar del mismo modo que los factores de inhibición naturales que se han perdido.

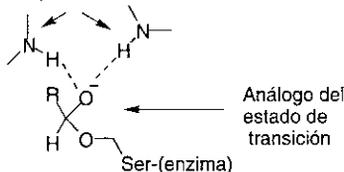
Los compuestos más prometedores en este sentido son los **inhibidores dirigidos al centro activo**, cuyo carácter puede ser más o menos irreversible. Entre ellos se encuentran **péptidos con secuencias que se asemejan al sustrato pero poseen un grupo aldehído situado cerca del enlace a hidrolizar**. Este grupo forma un **aducto semiacetalico** con el residuo de serina del sitio activo de la proteasa, que puede estabilizarse además por enlaces de hidrógeno con grupos NH de la enzima (ver el aducto que forma la proteasa A de *Streptomyces griseus* con la quimostatina, que es un inhibidor de este tipo).



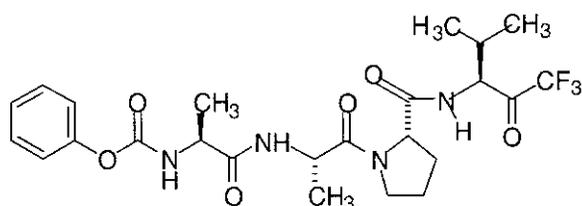
Quimostatina  
Inhibidor de la proteasa de *Streptomyces griseus*



Grupos amida de la enzima

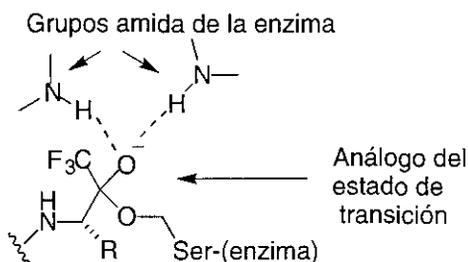


Las estructuras de estos aductos son semejantes a las de los **intermedios tetraédricos** que se forman en la hidrólisis de un péptido catalizada por proteasas de serina. Sin embargo, estos inhibidores no suelen ser suficientemente selectivos para ser utilizados como inhibidores de elastasa y, además, tienen una vida muy corta debido a la fácil oxidación del grupo aldehído. Por ello, se han desarrollado para este propósito **trifluorometilcetonas** sobre la base de la deficiencia electrónica de estos grupos carbonilo y, por tanto, su reactividad para enlazarse al grupo OH de la serina.

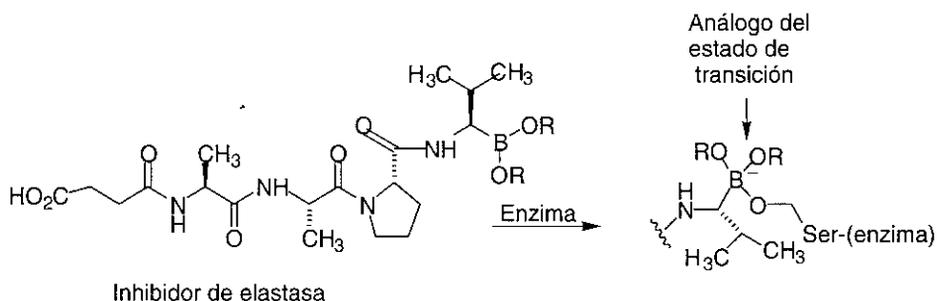


Inhibidor de elastasa

Enzima  
↓



Los **ácidos borónicos** y los **boronatos** adicionan fácilmente un ion hidróxido, para formar aductos que se asemejan también al intermedio tetraédrico de la hidrólisis de un péptido catalizada por proteasas de serina. Por ello, se han diseñado péptidos con residuos de ácido  $\alpha$ -aminoalquilborónico como inhibidores de elastasa.



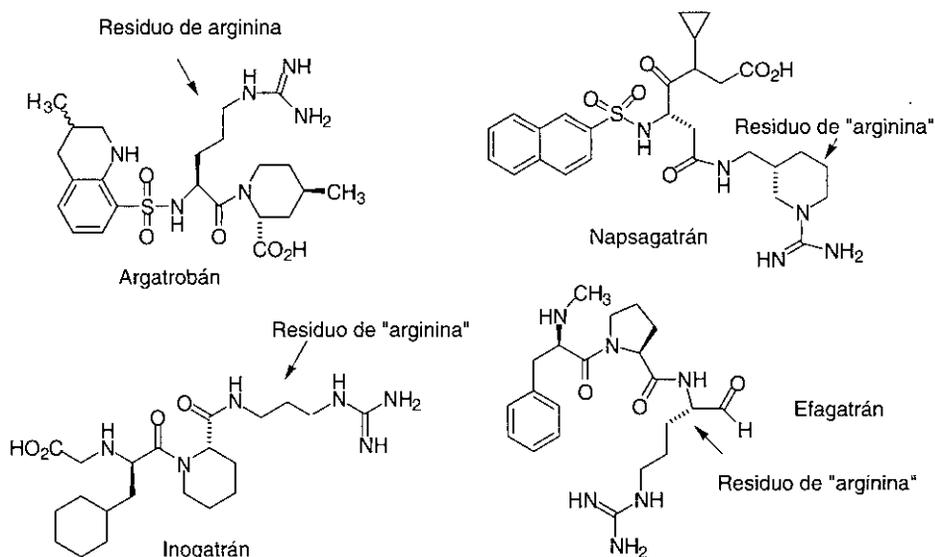
También se conocen **inhibidores de elastasa con estructura heterocíclica**, algunos de los cuales actúan como inhibidores suicidas. Dado que las enzimas microbianas que se enlazan a penicilinas, denominadas **PBPs**, y las que degradan a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos ( $\beta$ -lactamasas) son también proteasas de serina (ver los capítulos 4 y 5), algunos de sus **inhibidores** han resultado ser también inhibidores de elastasas.

#### 4. INHIBIDORES DE TROMBINA

La **trombina** es una enzima que interviene al final de la cascada de acontecimientos que producen finalmente la **coagulación de la sangre**. Es otra **proteasa de serina perteneciente a la familia de la tripsina** que se caracteriza porque ataca a enlaces peptídicos contiguos a residuos de aminoácidos básicos, como son la lisina o la arginina. Son sus sustratos el **fibrinógeno** y los **factores V, VIII y XIII**, y al hidrolizarlos libera los **péptidos de fibrina A y B que originan fibrina**. La polimerización de esta última forma el núcleo del **coágulo** [9]. El desarrollo de muchos de estos inhibidores depende, no tanto de su actividad, sino de sus propiedades farmacocinéticas, especialmente de una buena biodisponibilidad tras su administración oral.

Los **inhibidores de trombina** conocidos poseen o imitan las cadenas laterales de lisina y arginina de los sustratos y se utilizan ya **en terapéutica** como anticoagulantes y antitrombóticos como alternativa a la **heparina**. El **argatrobán** es un derivado de arginina muy potente como inhibidor de trombina ( $K_i = 39$  nM), pero ha de administrarse por vía

intravenosa porque no se absorbe bien por vía oral; además tiene una duración de acción corta. Sus análogos **napsagatrán** e **inogatrán** poseen también una gran actividad como inhibidores de trombina ( $K_i = 0,3$  y  $15$  nM, respectivamente), encontrándose en ensayos clínicos muy avanzados. Otro análogos, como **efagatrán**, se encuentran también en estudio clínico.



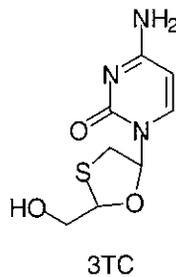
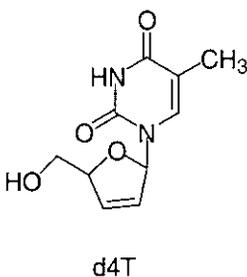
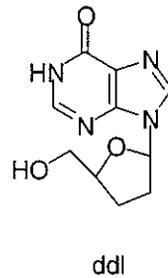
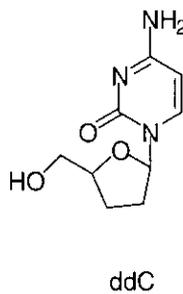
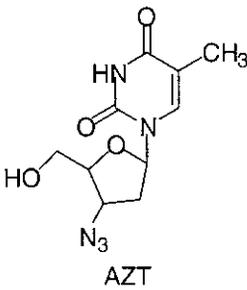
## 5. INHIBIDORES DE LA PROTEASA HIV-1

### 5.1. El virus del SIDA y los primeros inhibidores de la enzima transcriptasa inversa.

Desde que en 1982 se identificó al virus responsable de esta pandemia, se han producido progresos notables en su tratamiento aunque éste sólo es accesible a un número de pacientes menor del 10%. Las dianas de estos fármacos han sido enzimas del virus que son imprescindibles en su ciclo vital. Una de ellas es la **transcriptasa inversa** (TI), un heterodímero formado por las subunidades p66, que contienen los dominios con actividad de **ARNasa** y **polimerasa** y catalizan la síntesis del ADN pro-

vírico a partir del ARN vírico, y la subunidad p51, que actúa como soporte estructural de la subunidad p66 para adoptar la conformación activa.

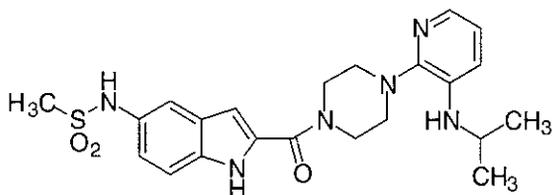
Se han desarrollado hasta el momento dos clases de inhibidores de dicha enzima. Los más conocidos son los **2,3-didesoxinucleósidos**, que requieren ser bioactivados a sus correspondientes 5-trifosfatos y actúan como inhibidores competitivos de los sustratos naturales y/o como terminadores de cadenas de ADN. Entre ellos están **AZT**, **ddC**, **ddI**, **ddC**, **d4T**, **3TC** y **abacavir (ABC)**, todos ellos utilizados en el tratamiento de los enfermos de SIDA.



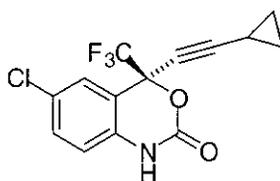
El otro tipo de inhibidores se denominan **inhibidores específicos no-nucleósidos** y algunos, como la **nevirapina**, **delavirdina** y **efavirenz**, se utilizan en terapias de combinación junto con los nucleósidos anteriormente citados y los inhibidores de proteasa HIV. La estructura de los inhibidores de transcriptasa inversa no nucleósidos es diversa, ya que todos se unen a una región hidrófoba de la enzima distinta de su lugar catalítico, aunque relacionada con él funcional y espacialmente.



Nevirapina



Delavirdina



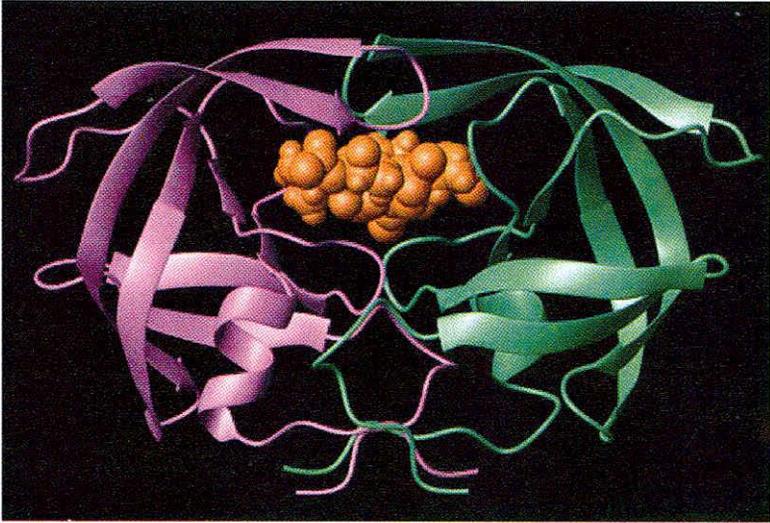
Efavirenz

## 5.2. La proteasa HIV-1

La replicación del virus HIV-1, requiere la ruptura proteolítica de una poliproteína que contiene varias proteínas víricas fundamentales. La proteólisis se lleva a cabo por una de estas proteínas codificadas por el virus incluida en dicha poliproteína y denominada **proteasa HIV-1**.

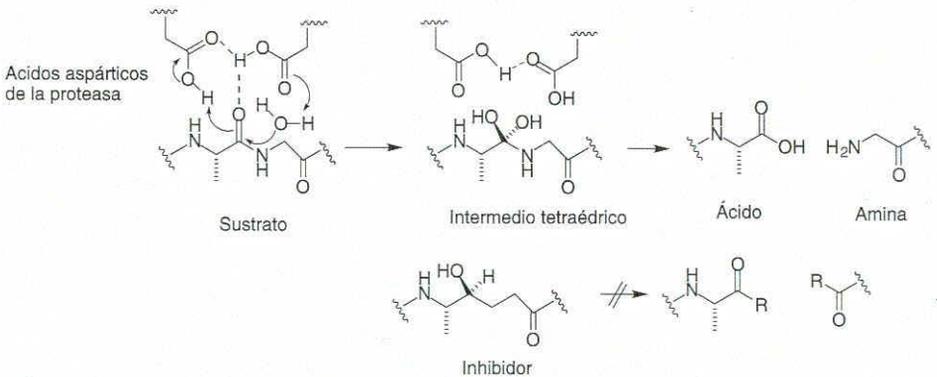
La presencia en ésta de la secuencia Asp-Thr-Gly, que se repite en los centros activos de la familia de **aspartilproteasas**, sugirió su pertenencia a dicha familia, si bien es más pequeña que otras aspartilproteasas de eucariotas como la renina, ya que esta proteasa-vírica sólo posee 99 aminoácidos. La *proteasa HIV-1* es un dímero simétrico con los dos residuos clave de aspartato, uno de cada cadena, en la interfase entre las subunidades. La mutación en el centro activo de uno de los aspartatos origina una proteasa totalmente inactiva, y el virus así mutado no resulta infeccioso. La necesidad de esta proteasa para la multiplicación vírica ha hecho de ella una diana importante para combatir el SIDA.

En la siguiente figura se representa un modelo de esta proteasa con un sustrato en su centro activo.



Para comenzar el diseño de sus inhibidores se necesitaba conocer la interacción de la enzima con el sustrato o sus análogos. La proteasa HIV-1 funciona como unas tijeras liberando una molécula de agua desde los dos ácidos aspárticos al lugar de ruptura del sustrato, creando inicialmente un **intermedio de transición tetraédrico**. El intermedio tetraédrico se rompe rápidamente para dar el péptido C-terminal y la amina N-terminal de dos proteínas más pequeñas que se utilizan por el virus.

Muchos inhibidores de proteasas se han desarrollado incorporando una **subestructura que mimetiza la porción P<sub>1</sub>-P'<sub>1</sub>** y no es hidrolizable. Esto ocurre especialmente en los «**análogos del estado de transición**».

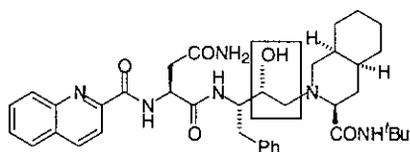




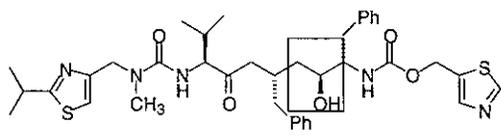
Pronto se dedujo que estos peptidomiméticos presentan una gran afinidad por la proteasa HIV-1 y que ésta hidroliza enlaces peptídicos formados por un residuo hidrófobo de prolina y otro aminoácido hidrófobo. Teniendo en cuenta que **un fármaco contra el SIDA no debe inhibir apreciablemente las aspartilproteasas humanas importantes, como la renina** (que hidroliza el angiotensinógeno en angiotensina I), y que la proteasa vírica difiere de la humana en que posee simetría binaria, se supuso que los inhibidores simétricos serían específicos de aquélla.

Un buen fármaco anti-SIDA que actúe por este mecanismo debe tener buena biodisponibilidad, una adecuada duración de acción y no debe ser tóxico. Debe ser también bien tolerado, puesto que se trata de terapias crónicas utilizadas durante largos periodos de tiempo. Todo ello implica que además de ser potente debe penetrar en las células y no debe enlazarse a otras proteínas fisiológicas como la albúmina sérica o la glicoproteína ácida de forma significativa. Finalmente, hay que cuidar su solubilidad acuosa y su peso molecular, ya que ambos influyen significativamente en la biodisponibilidad oral y son muy importantes para aumentar la absorción, favorecer la eliminación renal y controlar el metabolismo de primer paso en el hígado.

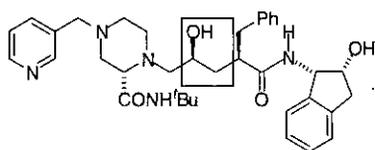
Existen varios inhibidores de proteasa HIV-1 utilizados en terapéutica, como mesilato de saquinavir (Inverasa®, Hoffmann-La Roche), ritonavir (Norvir®, Abbott), sulfato de indinavir (Crixivan®, Merck) y mesilato de nelfinavir (Viracept®, Agouron Pharmaceuticals), entre otros.



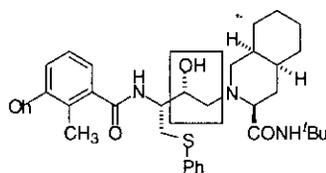
Saquinavir



Ritonavir



Indinavir



Nelfinavir

Vamos a analizar brevemente las aproximaciones para su descubrimiento, los problemas encontrados a lo largo del proceso y sus soluciones.

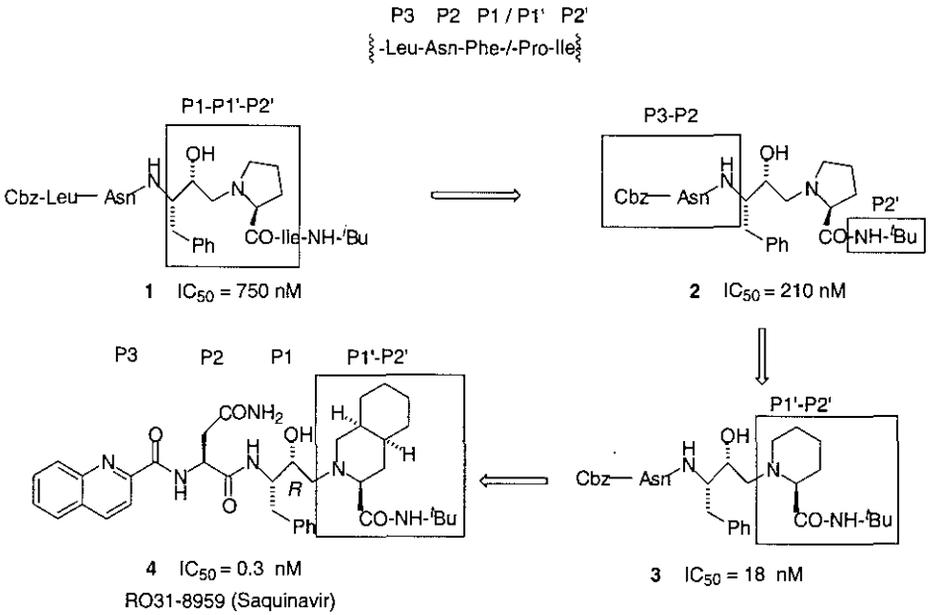
### 5.3. Desarrollo de saquinavir, ritonavir, indinavir y nelfinavir

El **saquinavir** contiene un residuo  $P_1/P'_1$  de tipo hidroxietilamina. Los investigadores de Hoffman-La Roche empezaron a explorar inhibidores basados en el sustrato que contuvieran como grupos  $P_3$ - $P_2$  los residuos asparagina-fenilalanina. También eligieron análogos del estado de transición de tipo hidroxietilamina (en vez de fenilalanina como residuo  $P_1$ ), pensando en la selectividad frente a proteasas HIV, ya que hasta ese momento los inhibidores potentes de renina, pepsina y otras proteasas de eucariotas, no eran de ese tipo. Finalmente, colocaron como residuos  $P'_1$ - $P'_2$  los residuos prolina-isoleucina porque los enlaces peptídicos que contienen prolina son más estables a la degradación por proteasas, lo que ayudaría a su biodisponibilidad [10].

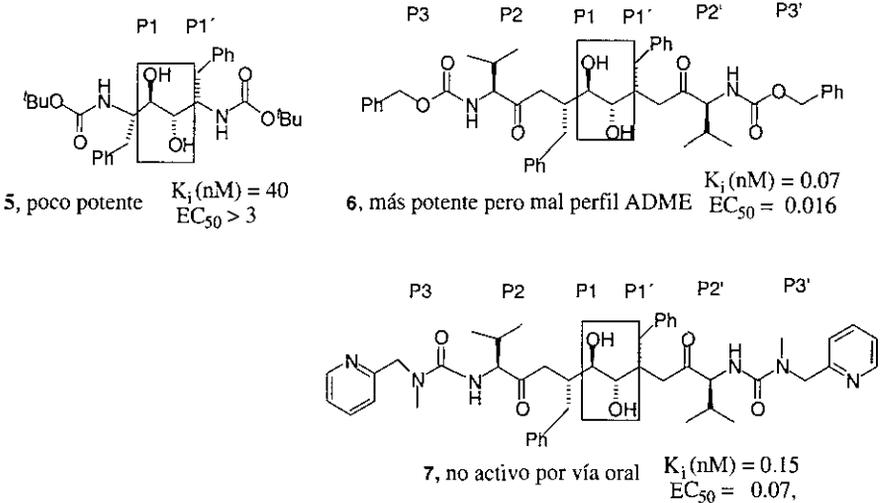
Uno de los compuestos inicialmente ensayados (1) tuvo una  $CI_{50}$  de 750 nM, y a partir de éste, se modificaron sistemáticamente cada uno de los residuos encontrándose que la asparagina se debía mantener en la posición  $P_2$ . Además, el resto de prolina podía sustituir por otros aminoácidos homólogos no naturales derivados de piperidina (3) o decahidroisoquinolina (4). Éstos eran los residuos  $P'_1$  preferidos, siendo el mejor grupo  $P'_2$  un resto de *t*-butilamina que forma un enlace amídico más estable que el de un éster terbutílico. Finalmente, el ácido quinolina-2-carboxílico fue idóneo como grupo  $P_3$ . La estereoquímica *R* del grupo hidroxilo en la porción de hidroxietileno es esencial, ya que los enantiómeros *S* fueron inactivos.

El saquinavir es muy potente *in vitro* frente a las proteasas HIV-1 ( $CI_{50} < 0,37$  nM) y HIV-2 ( $CI_{50} < 0,8$  nM) y no inhibe otras proteasas de aspártico a concentraciones menores de 10 nM. Sin embargo, su biodisponibilidad *in vivo* es muy pequeña (4%) debido a su baja absorción oral y al efecto del primer paso. Todo ello es debido probablemente al

número de enlaces amídicos que todavía contiene y a su gran peso molecular (671 g/mol).

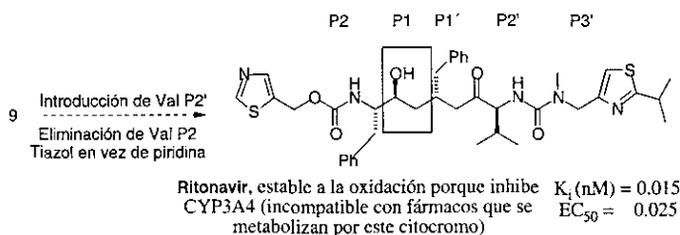
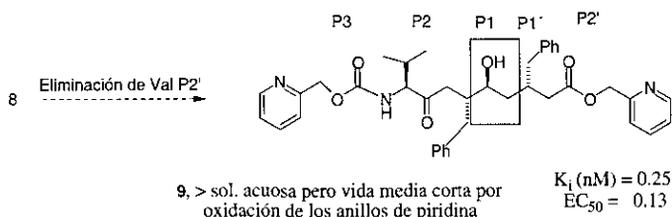
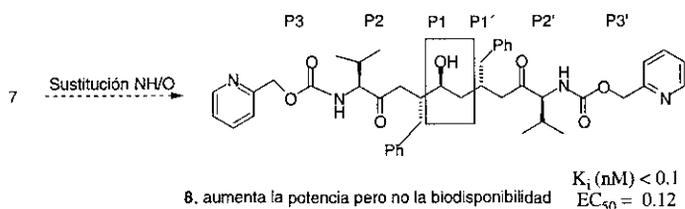


El razonamiento de los investigadores de Abbott para el desarrollo de **ritonavir** se basó en la naturaleza simétrica de la proteasa HIV-1 [11].



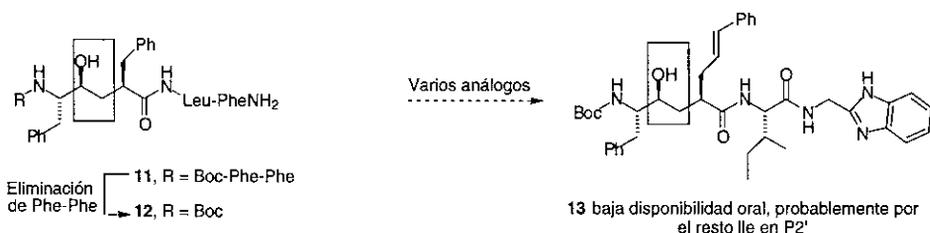
La estructura simétrica 5 fue un inhibidor débil, pero añadiendo valina en las posiciones P<sub>2</sub> y P'<sub>2</sub> para dar el compuesto 6 se recuperó mucha potencia. Cuando el grupo benciloxicarbonilo (Cbz) sobre los residuos de valina se sustituyó por el grupo N-metil-2-piridilmetilcarbamoil, que hacía de residuo P<sub>3</sub> y P'<sub>3</sub>, se dispuso del primer candidato para los ensayos clínicos, el compuesto 7 (A77003). Desgraciadamente este compuesto no fue activo por vía oral, requiriendo la vía intravenosa. Además, su vida media era muy corta.

La supresión de uno de los grupos OH y la sustitución del grupo N-metil-2-piridilmetilcarbamoil por 2-piridilmetiloxycarbonil originó el compuesto 8 (A77003) en el que aumentó la potencia (K<sub>i</sub>) pero no la biodisponibilidad (DE<sub>50</sub>). La eliminación de la valina como residuo P'<sub>2</sub> dejando un grupo carbamato de 2-piridilmetilo dio un compuesto con mayor solubilidad acuosa (9, A80987), que se comportó muy bien en los ensayos clínicos pero que mostró una vida media corta y una elevada afinidad por las proteínas plasmáticas (un problema que acompaña frecuentemente a los peptidomiméticos).



Un estudio profundo del metabolismo del compuesto **9**, demostró que en los microsomas hepáticos se producía una notable oxidación de los grupos piridínicos: Por ello, se realizaron varias modificaciones introduciendo otros heterociclos hasta llegar al ritonavir, con dos agrupamientos de tiazol y, de nuevo, la incorporación de un residuo de valina como P<sub>2</sub>'. A pesar de su gran peso molecular (721g/mol) y de sus muchos enlaces amida, este compuesto es muy estable al metabolismo porque inhibe al sistema enzimático CYP3A4 [12], una circunstancia que lo hace incompatible con muchos fármacos que se metabolizan por dicho sistema.

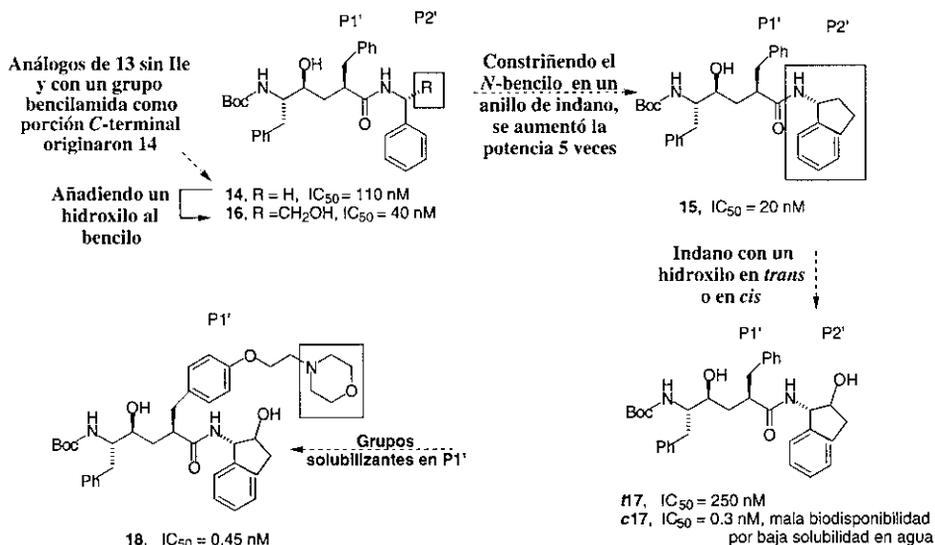
En cuanto al **indinavir**, la aproximación inicial de los investigadores de Merck fue ensayar compuestos que habían demostrado previamente ser inhibidores de renina que, como ya hemos dicho, transforma el angiotensinógeno en angiotensina I en el organismo humano. De este trabajo, resultó el compuesto **11** (L364505), un peptidomimético derivado de hidroxietileno como grupo isótero del estado de transición tetraédrico, que mostró ser selectivo para la proteasa HIV-1 (CI<sub>50</sub> = 1 nM) frente a la renina (CI<sub>50</sub> = 73 nM), pero que requería concentraciones mucho mayores para detener la extensión de la infección HIV-1 en células enteras [13].



Compuesto	IC <sub>50</sub> (nM) Renina	IC <sub>50</sub> (nM) Proteasa HIV-1
<b>11</b>	73	1.0
<b>12</b>	> 10.000	0.6
<b>13</b>	> 10.000	< 0.03

El primer objetivo fue entonces disminuir la inhibición de la renina, lo que se consiguió eliminando los dos residuos de fenilalanina  $P_2$ - $P_3$ . Así se llegó al compuesto **12** (L682679), que mantuvo la actividad frente a la proteasa vírica ( $CI_{50} = 0.6$  nM) y careció de actividad frente a renina ( $CI_{50} > 10$   $\mu$ M), deteniendo la infección en cultivos celulares a  $CI_{50} = 6$   $\mu$ M. De esta estructura se hicieron muchos análogos, obteniéndose finalmente el compuesto **13** (L687908,  $CI_{50} < 0.03$  nM), que no siguió desarrollándose por su baja disponibilidad por vía oral.

Este resultado adverso se debía probablemente a la baja solubilidad acuosa y a la inestabilidad que produce el aminoácido Ile en la posición  $P'_2$ , haciéndolo sensible a la hidrólisis por enzimas intestinales y hepáticas. Este problema se abordó con análogos que contenían un simple grupo bencilamida como porción C-terminal (**14**, R = H).



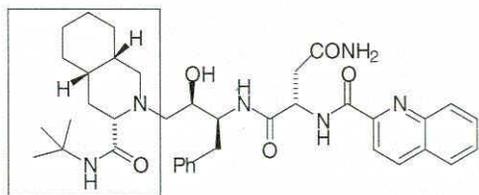
Reduciendo la libre rotación del bencilo mediante su transformación a un anillo de indano para dar el compuesto **15** se aumentó la potencia 5 veces y, alternativamente, sustituyendo la posición bencílica de **14** por un grupo hidroximetilo se obtuvo **16**, también más activo. La combinación de estas dos variantes dio un indano con un hidroxilo. Cuando la disposición era *trans* (compuesto *t*-17) se perdía mucha actividad ( $CI_{50}$

= 250 nM); sin embargo, cuando se invirtió el hidroxilo para dar el isómero *cis* (compuesto **c-17**) la actividad aumentó mucho ( $CI_{50} = 0,3$  nM). Éste fue el primer compuesto que contenía una porción *cis*-1-amino-2-hidroxiindano como residuo  $P'_2$  [14].

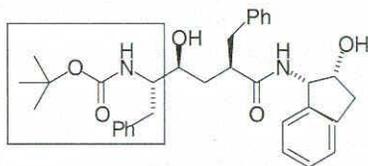
Aunque **c-17** no poseía ningún aminoácido natural, su biodisponibilidad fue pequeña y no se desarrolló más. Uno de sus problemas era que tenía una solubilidad acuosa baja. Tras el análisis por modelado molecular del complejo que forma dicho compuesto en el sitio activo de la enzima, se determinó que los anillos de fenilo de los grupos  $P_1$  y  $P'_1$  se situaban hacia el disolvente fuera del sitio activo y, por tanto, su manipulación no afectaría en principio a la potencia.

Esta hipótesis se confirmó sintetizando muchos análogos en los que los residuos  $P_1/P'_1$  contenían grupos solubilizantes, siendo el mejor el compuesto **18** (L689502,  $CI_{50} = 0.45$  nM), que mostró una biodisponibilidad en perros del 5%. Su toxicidad hepática determinó su eliminación como candidato a un desarrollo posterior, pero su complejo con la proteasa HIV-1 se cristalizó y permitió conocer el modo de unión con el sitio activo de la enzima [15].

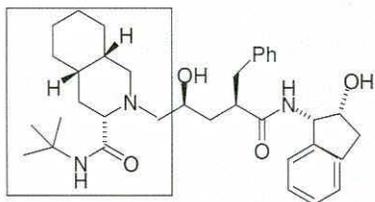
En este punto, se compararon las estructuras de **saquinavir** y de **c-17**, suponiendo según indicaban los estudios de modelado que las porciones de decahidroisoquinolina de aquél y el resto *N*-terminal de éste (enmarcados en la Figura), ocuparían el mismo lugar en el sitio activo. Combinando la solubilidad que aporta aquel resto en el saquinavir con la estructura no peptídica de **c-17**, se llegó a **19** (L704486), cuya optimización condujo finalmente a **indinavir**. Éste no se une en gran medida a las proteínas plasmáticas y posee una buena bioisponibilidad [16].



Saquinavir

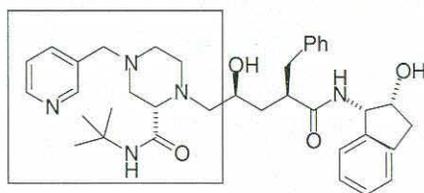


c17



19

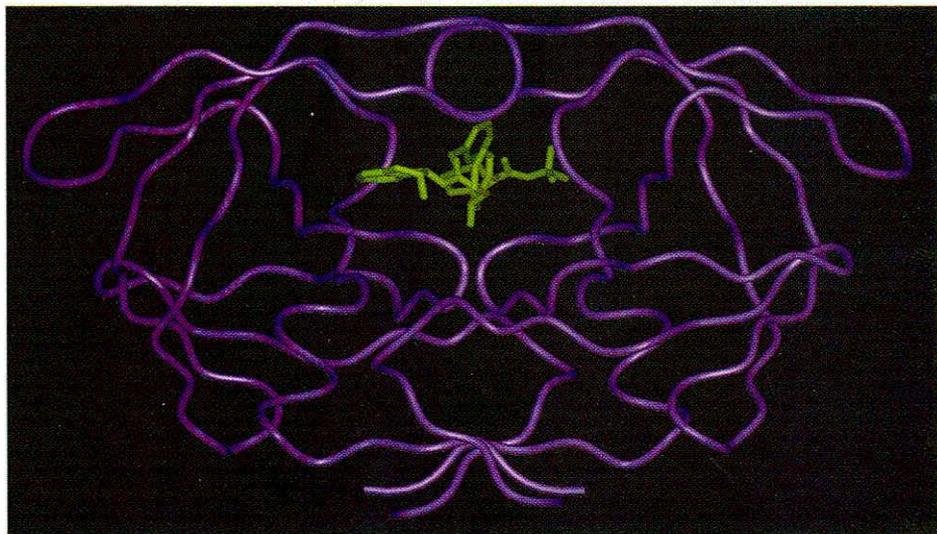
$IC_{50} = 7.8 \text{ nM}$ ,  $CIC_{95} = 200 \text{ nM}$



Indinavir

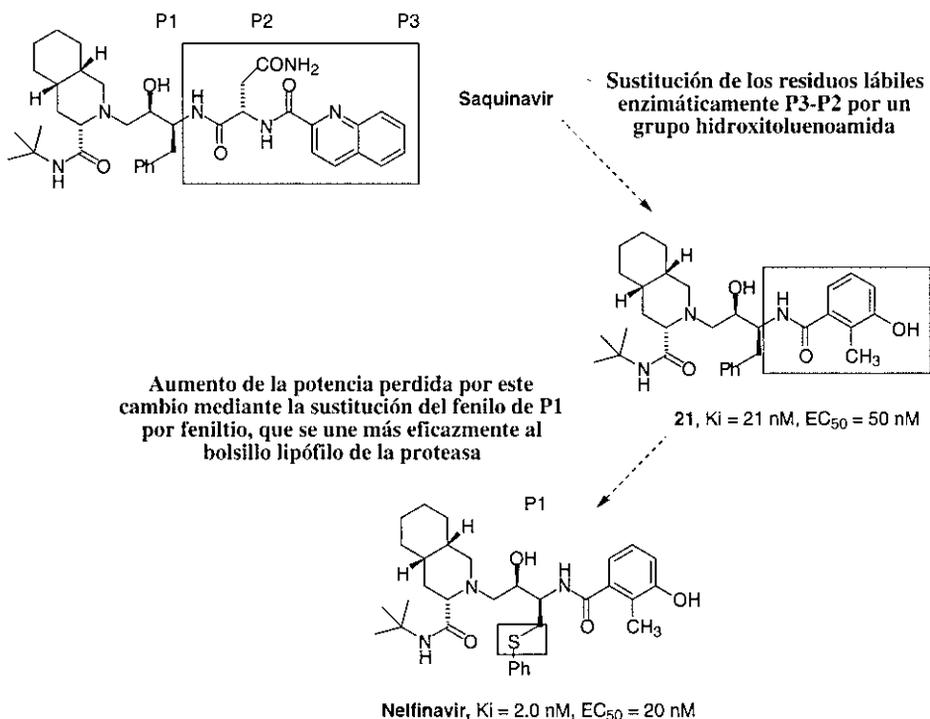
$IC_{50} = 0.4 \text{ nM}$ ,  $CIC_{95} = 50 \text{ nM}$

En la siguiente figura se representa un modelo en el que indinavir se encuentra enlazado a la proteasa HIV-1.

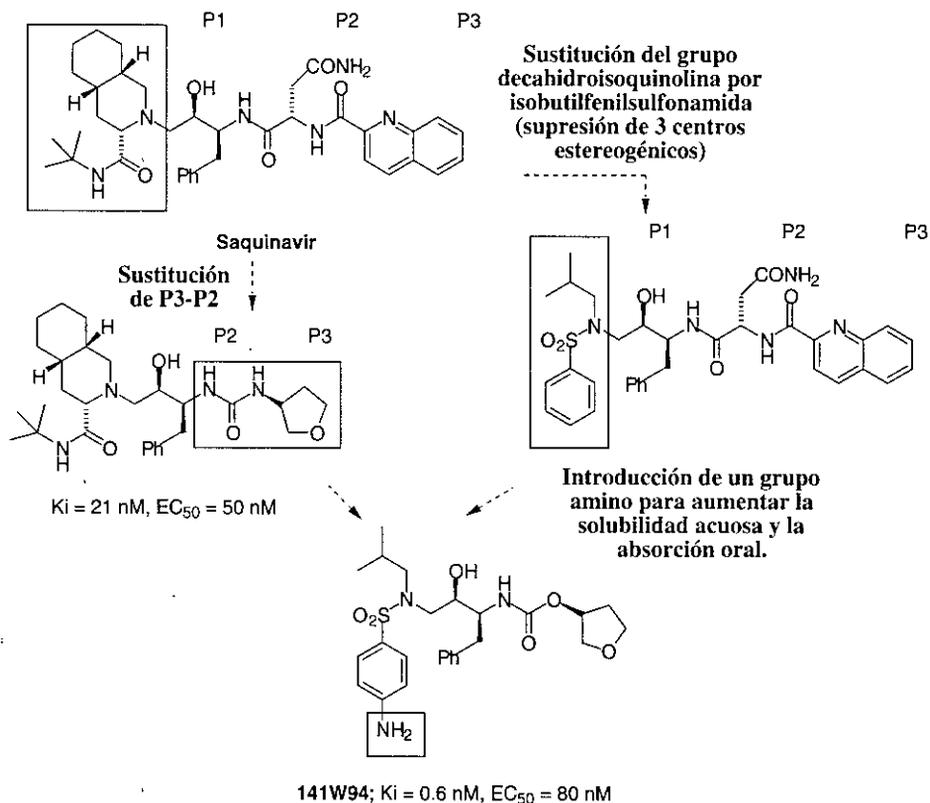


El fármaco anti-SIDA **nelfinavir** resultó de la colaboración entre dos compañías farmacéuticas: Lilly y Agouron, basándose en la estructura del saquinavir con dos cambios: la sustitución de los residuos lábiles enzimá-

ticamente P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub> por un grupo 3-hidroxi-2-metilbencenocarboxamida (21) y aumento de la potencia perdida por este cambio mediante la sustitución del fenilo del residuo P<sub>1</sub> por feniltio, que se une más eficazmente al bolsillo lipófilo de la proteasa.



La asociación Glaxo Wellcome/Vertex tiene otro inhibidor en fase clínica, el compuesto 25 (141W94) en que el grupo decahidroisoquinolina del saquinavir se ha sustituido por un grupo *N*-isobutilfenilsulfonamida. Esta modificación supone una reducción de centros estereogénicos (de 6 a 3). Por otra parte, para lograr una mayor sencillez y menor carácter peptídico, los grupos P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub> de aquél se han sustituido por un carbamato de tetrahydrofurilo, una modificación que ya había sido estudiada por Merck para el residuo P<sub>2</sub> en los análogos de saquinavir. Finalmente, se introdujo un grupo amino en el benceno de la sulfonamida para aumentar la solubilidad acuosa y la absorción oral [17, 18].



## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. I. Narváez y cols, *J. Clin. Basic Cardiol.* 2001, 4, 225.
2. D.W. Cushman; H.S. Cheung; E.F. Sabo., M.A. Ondetti, *Biochemistry*, 1977, 16, 5484-91.
3. Para una revisión reciente sobre los inhibidores de proteasas de Zn(II) basados en el mecanismo ver: D.H. Kim, S. Mobashery, *Current Medicinal Chemistry*, 200, 81, 959-965.
4. M.A. Ondetti; D.W. Cushman; B. Rubin: «Captopril», en «Chronicles of Drug Discovery», J.S. Bindra y D. Lednicer (eds.), Wiley and Sons, 1983, Vol. 2, pág. 3-31. d) R.A. Maxwell; S.B. Eckhardt: «Captopril», en «Drug-Discovery- A case book and analysis», N.J. Clifton (ed.), Humana Prtess, 1990, 19-34.

5. a) A.A. Patchett; E. Harris; E.W. Tristram; M.J. Wyvratt; M.T. Wu; D. Taub; y otros, *Nature*, 1980, 280-283. b) A.A. Patchett, «The design of Enalapril», en: «Hypertension and the Angiotensin system: Therapeutic approaches», A.E. Doyle, A.G. Bearn (eds.), Raven Press, 1983, 155-166.
6. Subissi y cols. *Cardiovascular Drug Reviews*, 1999, 17, 115.
7. O'Connor S. y cols. *J. Antibiot.* 1995, 38, 993.8. Clive, L.J. y cols. *J. Org. Chem.* 1999, 64, 1447.
9. Clive, L.J. y cols. *Acad. Sci. París*, 2001, 4, 505.
10. Leung, D.; Abbenante, G.; Fairlie, D.P., *J. Med. Chem.* 2000, 43, 305-341.
11. Roberts, N.A. y cols. *Science* 1990, 248, 358-361.
12. a) Erickson, J. y cols. *Science*, 1990, 249, 527-533. b) Kempf, D.J. y cols., *J. Med. Chem.* 1990, 33, 2687-2689. c) Kempf, D.J. y cols., *J. Med. Chem.* 1993, 36, 320-330.
13. Kumar, G.N. y cols. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277, 423-431.
14. Vacca, J.P. y cols. *J. Med. Chem.* 1991, 34, 1225.
15. Lyle, T.A. y cols. *J. Med. Chem.* 1991, 34, 1228-1230.
16. Thompson, W.J. y cols. *J. Med. Chem.* 1992, 35, 1685-1701.
17. Lin, J.H. y cols. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995, 274, 264-269.
18. Kalish, V. y cols. *Eur. J. Med. Chem.* 1995, 30, S201-214.

# Resistencias a los antibióticos

## 1. LAS RESISTENCIAS A LOS ANTIBIÓTICOS

El origen de los quimioterápicos antibacterianos tuvo lugar a principios del siglo XX cuando **Paul Ehrlich** desarrolló el concepto de **toxicidad selectiva** y el arsenical antisifilítico **salvarsán** (ver el Tema 2).

Estos compuestos pueden ser básicamente de dos tipos. Los **análogos de un factor de crecimiento**, que suelen actuar como inhibidores competitivos de una ruta biosintética esencial, entre los que se encuentran las sulfamidas que ya hemos comentado, y los **antibióticos**, compuestos producidos por microorganismos (originariamente) que inhiben el crecimiento o producen la muerte de otros microorganismos. De todos los antibióticos conocidos, menos de un 1% han resultado útiles como fármacos, pero su introducción en medicina ha tenido una gran repercusión en la salud de la humanidad.

La mayor parte de los antibióticos que se utilizan en terapéutica son producidos por diferentes especies de **bacterias y hongos** para su propia supervivencia y, en su medio natural, **intercambian información genética** con gran facilidad, incluidos los genes inductores de resistencia. La transferencia de genes y su recombinación puede realizarse a través de la **ingeniería genética** para la construcción de nuevos organismos que pueden ser muy útiles, pero también ocurre en la natu-

raleza. Las **mutaciones** se originan al **cambiar una secuencia de bases del material genético** y pueden ser **espontáneas**, por la acción de algunas radiaciones-o por errores en el apareamiento de las bases (ver el Tema 2). Si implican a un par o a unos pocos pares de bases, se llaman **mutaciones puntuales** (un gen tiene alrededor de 1000 pares de bases). También pueden ser **mutaciones inducidas** por ciertos compuestos químicos.

En el caso de las resistencias a los antibióticos tienen gran importancia los **plásmidos**, elementos genéticos pequeños que se replican con independencia del cromosoma y son ubicuos en procariontes, a los que pueden conferir determinadas características. Los **plásmidos de resistencia (plásmidos R)** confieren resistencia a los antibióticos y a a otros inhibidores del crecimiento bacteriano, lo que tiene gran importancia médica porque las resistencias pueden transmitirse a cepas sensibles mediante el contacto de célula a célula.

La **naturaleza infecciosa de los plásmidos R**, que pueden incorporar una gran variedad de genes de resistencia, permite su **rápida diseminación a las distintas poblaciones de bacterias**.

La **resistencia a los antibióticos puede ser una propiedad inherente al microorganismo**. Así, algunas bacterias que carecen de la típica pared bacteriana son resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, ya que éstos actúan interfiriendo la biosíntesis de aquélla (ver más adelante). Otro ejemplo lo encontramos en la mayor resistencia a algunos antibióticos que poseen las bacterias Gram negativas en comparación con las Gram positivas, por la impermeabilidad de su pared. Pero la **resistencia a los antibióticos puede ser también una propiedad adquirida**. Así, muchas bacterias mutan para **modificar la diana** sobre la que actúa un antibiótico determinado, para producir **enzimas que lo metabolizan**, o para **aumentar su eflujo**. Por ejemplo, la *Neisseria gonorrhoeae* (que causa la gonorrea) era sensible a la penicilina, pero alrededor de 1980 se hizo insensible mediante la producción de  $\beta$ -lactamasas que la metabolizan. Por eso, el uso continuado de un antibiótico conduce a resistencias más extendidas.

El desarrollo económico, en el que se incluye la creación de grandes hospitales, ha conducido a una mucho mayor calidad de vida. Sin embargo, éstos han contribuido a difundir las denominadas **infecciones hospitalarias o nosocomiales**. Éstas están originadas por un número muy limitado de patógenos, pero se han convertido en un **grave problema sanitario** por las resistencias que dichos patógenos muestran y conducen en muchos casos a la septicemia y a la muerte. Son ejemplos los *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* (infecciones de vías urinarias), *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

La resistencia a múltiples fármacos (*multi drug resistance*, **MDR**) es la causa principal de los fracasos que ocurren en los tratamientos antiinfecciosos. Algunos opinan que los antibióticos tradicionales que actualmente se emplean para curar las infecciones comunes no se podrán utilizar en un futuro más o menos próximo [1-7].

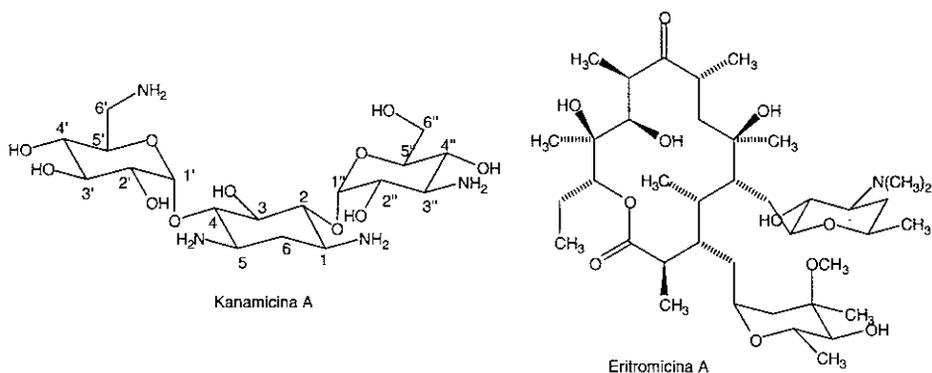
En 1967 se pensaba que los antibióticos y otros agentes quimioterápicos podían eliminar cualquier microorganismo patógeno, y se declaró oficialmente que el problema de las infecciones había terminado. Desgraciadamente, aquellas declaraciones menospreciaron la capacidad que tienen las bacterias para adaptarse por selección natural. De hecho, cada vez se producen más infecciones causadas por gérmenes que se han hecho resistentes a los tratamientos habituales y sabemos que el desarrollo de resistencias para cada nuevo antibacteriano que se introduce en el mercado es sólo cuestión de tiempo. El uso indiscriminado de antibióticos para consumo humano y su adición a los piensos para evitar infecciones y conseguir mayores rendimientos en explotaciones ganaderas, ha acelerado el desarrollo de estas resistencias.

Existe una gran variedad de fármacos antibacterianos, la mayor parte de los cuales interfiere la síntesis proteica de las bacterias, la replicación y reparación de sus ácidos nucleicos y la biosíntesis de sus paredes celulares. Las bacterias actúan contra ellos, como ya se ha dicho, modificando su estructura o la de sus propias dianas macromoleculares, siendo además frecuente la sobreexpresión de proteínas de membrana que im-

piden su concentración en el interior celular transportándolos activamente al exterior [8]. Comentaremos algunos ejemplos.

## 2. ANTIBIÓTICOS QUE INHIBEN LA BIOSÍNTESIS PROTEICA

Las diferencias que existen en la síntesis de ARN y proteínas de los sistemas procariontes y eucariontes han permitido el desarrollo de **antibióticos** muy selectivos, como son los **aminoglucósidos** o los **macrólidos** (ver la estructura de la kanamicina A y de la eritromicina A como representantes de ambos tipos). Los primeros siguen siendo útiles en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias aeróbicas Gram negativas. La **estreptomina** fue el primer antibiótico utilizado en el tratamiento de la tuberculosis, pero tiene efectos secundarios y desarrolla fácilmente resistencias (ver el Apartado 5). Su análogo **kanamicina** es quimioterápico de segunda línea en el tratamiento de esta enfermedad. La **eritromicina A**, el más importante de los antibióticos macrólidos, interacciona con la subunidad 50S de las bacterias. Estos compuestos contienen un anillo de lactona de 12 a 16 eslabones de carbono al que se unen uno o más restos de azúcar. Eritromicina A se utiliza especialmente contra *Legionella pneumophila* y en pacientes alérgicos a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos [9].

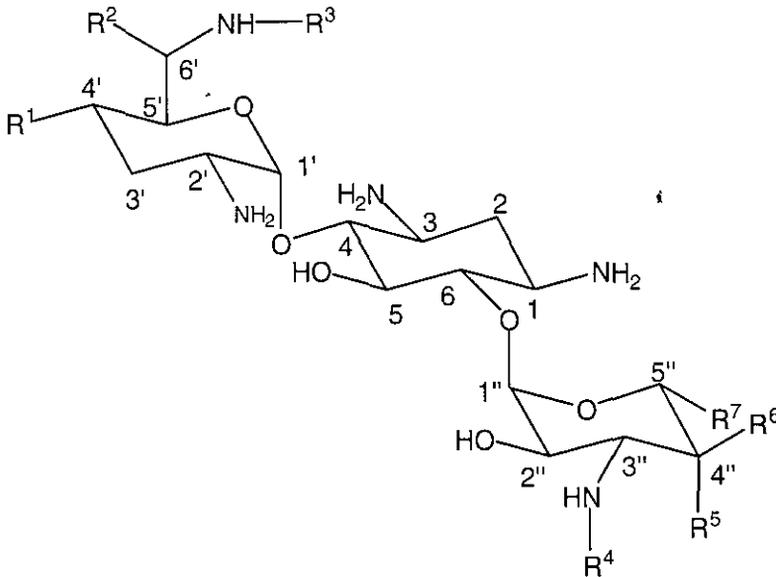


La información que transmite el ADN para la síntesis de proteínas se basa en el hecho de que un aminoácido que ha de incorporarse a una

secuencia peptídica está codificado por un determinado trinucleótido (codón del ARNm), existiendo 64 modos de organizar los cuatro nucleótidos naturales en conjuntos de tres para codificar los aminoácidos que constituyen las proteínas.

Los ribosomas bacterianos, donde tiene lugar la síntesis proteica, están constituidos por dos subunidades de un complejo formado por ARN y proteínas: la subunidad 30S (unidades Svedberg de sedimentación en ultracentrífuga) y la subunidad 50S. Esta última contiene ARNr de 23S y 5S y alrededor de 34 proteínas. La subunidad 30S contiene ARNr de 16S y 21 proteínas y está muy conservada porque es en la que se produce el reconocimiento específico entre los anticodones del ARNt y los codones del ARNm, que se mantiene «enhebrado» para interactuar con aquél. El subsitio P (peptidil), es donde se encuentra el péptido naciente, mientras que el subsitio A (aceptor) es el lugar al que se une el nuevo aminoacil-ARNt. Una vez elongada la cadena con un nuevo aminoacil-ARNt, este ARNt debe traslocarse del subsitio A al P para dejar libre aquél, a fin de que pueda unirse un nuevo aminoacil-ARNt. Pero, a cada paso de traslocación, el mensaje avanza tres nucleótidos exponiendo un nuevo codón en el subsitio A. Los antibióticos aminoglucósidos interaccionan con este subsitio A, produciendo fallos en la «lectura» de los codones.

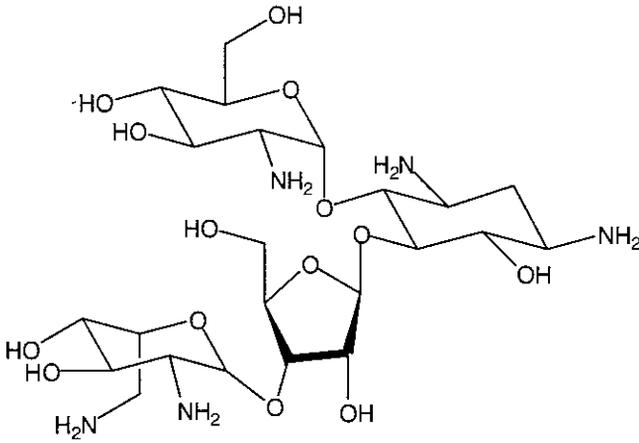
Un mecanismo de resistencia a estos antibióticos implica su inactivación metabólica. Los microorganismos son capaces de inducir enzimas para acetilar, fosforilar o adenilar sus grupos hidroxilo o amino produciendo su inactivación. Por ello, se ha modificado la estructura de los compuestos naturales, obtenidos por fermentación, a fin de que carezcan de estos grupos susceptibles al ataque enzimático o que, si los poseen, estén impedidos estéricamente. Así, las gentamicinas y la tobramicina no tienen el grupo hidroxilo en la posición 3 y, por tanto, no se inactivan por fosfotransferasas que fosforilan específicamente dicho grupo. Las gentamicinas también son resistentes a la acción de nucleotidiltransferasas, capaces de adenilar hidroxilos secundarios que se encuentren en una disposición ecuatorial. La gentamicina C<sub>1</sub>, posiblemente por razones estéricas, es también insensible a la acción de acetiltransferasas (que acetilan el grupo amino en la posición 6).



Nombre	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>
Gentamicina C <sub>1</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H
Gentamicina C <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H
Gentamicina C <sub>3</sub>	H	H	H	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H
Tobramicina	OH	H	H	H	H	OH	CH <sub>2</sub> OH

Las bacterias también generan otros mecanismos de resistencia a los antibióticos aminoglucósidos mediante la modificación de su diana macromoleular.

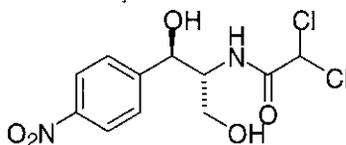
Así, diversos estudios de RMN han permitido conocer la estructura del complejo que forma un oligonucleótido ARN que codifica el lugar A de la subunidad 16S con el antibiótico aminoglucósido **paromomicina**. Éste se une al surco mayor del ARN a través de diversos enlaces de H y ciertos enlaces iónicos y esta unión estabiliza una conformación de este ARN que es muy diferente a la que posee en ausencia del antibiótico, lo que produce errores en la traducción. Ciertas cepas de micobacterias se han hecho resistentes a paromomicina por mutagénesis de los residuos de la diana farmacológica que están implicados en estas interacciones.



Paromomicina

También son frecuentes las mutaciones en genes que codifican las proteínas ribosómicas en cepas de *M. tuberculosis* resistentes a **estreptomina**, lo que conduce a que el ribosoma deje de tener afinidad por el fármaco.

En cuanto a los **antibióticos macrólidos**, apenas se conocen enzimas con capacidad para modificar su estructura, produciéndose las resistencias por mutación de la diana o por sobreexpresión de bombas de transporte. Estos fármacos se **enlazan al centro activo de la peptidiltransferasa en la subunidad 50S del ribosoma** produciendo la inhibición de la síntesis proteica. La estructura cristalina de este ribosoma refleja que **las mutaciones que generan resistencia a eritromicina y cloranfenicol**, que es otro antibacteriano sin ninguna relación estructural con la eritromicina pero que actúa igualmente inhibiendo la peptidiltransferasa, se producen en el lazo de esta enzima, frecuentemente por metilación del residuo de adenina 2058 del ARN 23S.



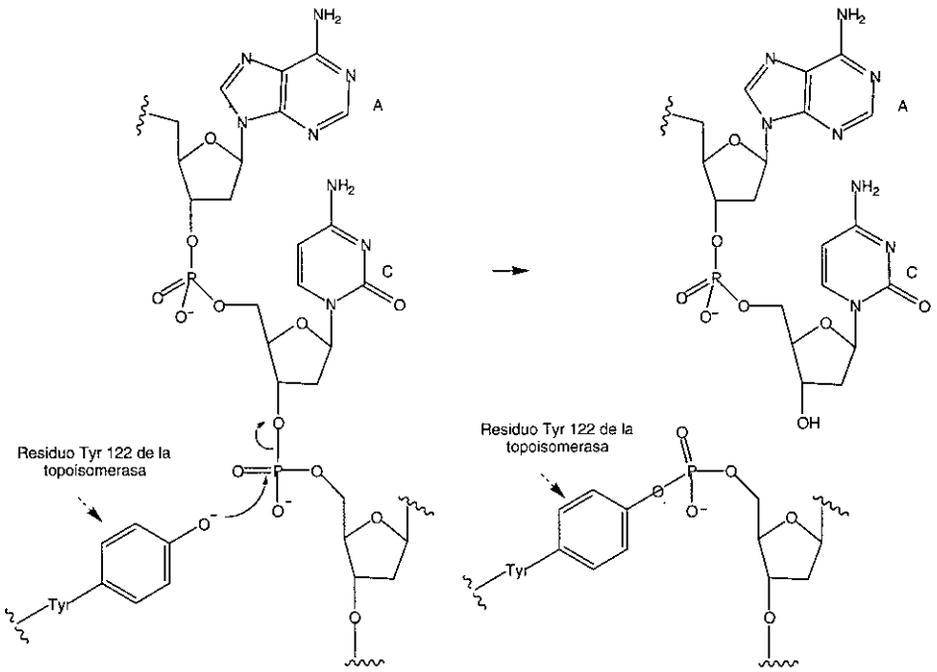
Cloranfenicol

Esta metilación está catalizada por la enzima metiltransferasa Erm (*erythromycin resistance methylase*), que utiliza S-adenosilmetionina como cofactor. De hecho *Streptomyces erythreus*, que es el microorganismo que produce la eritromicina, utiliza la metiltransferasa Erm para proteger su ribosoma del antibiótico, metilando su propio ARN 23S. También se producen resistencias por otra mutación: la sustitución de la adenina 2058 por guanosina, citosina o uracilo.

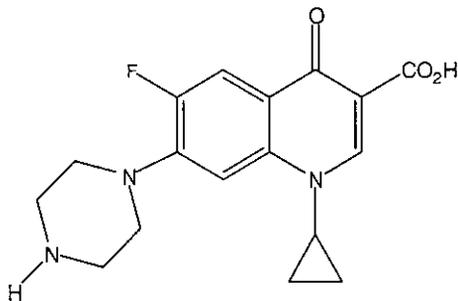
En bacterias resistentes a los macrólidos se ha encontrado el gen *mefE*, que expresa una proteína de transmembrana (MefE). Ésta produce el eflujo de estos antibióticos.

### 3. ANTIBIÓTICOS QUE AFECTAN A LA REPLICACIÓN Y REPARACIÓN DEL ADN

Las quinolonas antibacterianas, por ejemplo ciprofloxacino, son fármacos sintéticos que tienen como diana a las girasas de ADN (topoisomerasas de tipo II en las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas y a la topoisomerasa IV en algunas Gram-positivas). Las girasas intervienen en el enrollamiento de las hebras a través del grupo fenóxido del residuo Tyr122 de la enzima después de cada replicación del ADN. Este grupo fenóxido produce la ruptura de ambas hebras formando ésteres entre el fosfato en 5 del ADN y el OH fenólico de aquel aminoácido.



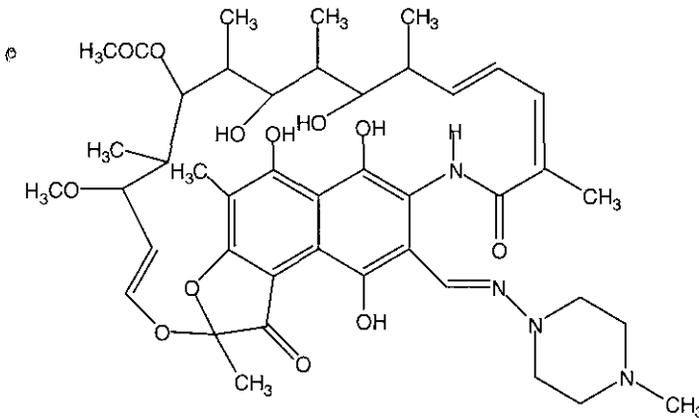
Las quinolonas se unen al complejo ADN-girasa haciendo incapaz a la enzima para ejercer su función, bloqueando la replicación del ADN y produciendo finalmente la muerte celular. Las resistencias se producen por mutaciones en la región N-terminal de la girasa de ADN y, concretamente, tienen lugar en los residuos 67-106. De esta forma se reduce la probabilidad de que se forme el complejo ternario enzima-ADN-quinolona o éste complejo está desestabilizado.



Ciprofloxacino

También se han observado resistencias producidas por una disminución de la concentración intracelular mediante el eflujo de estos antibióticos al exterior, un fenómeno que se ha relacionado con la sobreexpresión de una proteína de membrana de 12 hélices (NrA). Este sistema de transporte exporta también otros antibióticos hidrófilos.

La rifampicina, es un derivado semisintético de la rifamicina que se utiliza en los tratamientos multifármaco de infecciones causadas por micobacterias, como es el caso de la tuberculosis. Actúa enlazándose a la subunidad  $\beta$  de la polimerasa de ARN, inhibiéndola. Las resistencias también se producen en este caso por mutagénesis de la diana, y tienen lugar en tres regiones muy conservadas. Otros análogos sintéticos de la rifampicina, como la rifabutina, rifapentina y el compuesto KRM-1684 no son mucho más eficaces que aquella.



Rifampicina

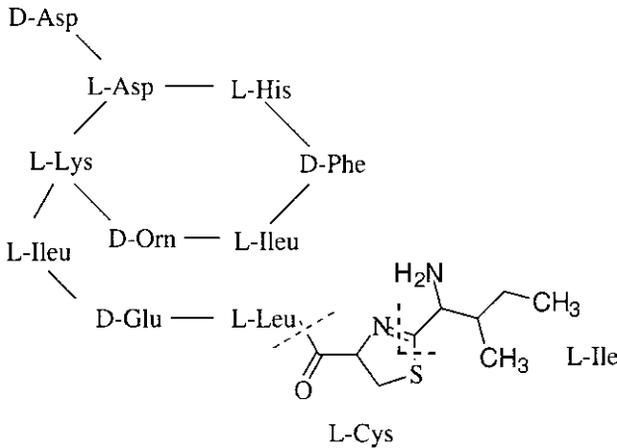
#### 4. ANTIBIÓTICOS QUE AFECTAN A LA BIOSÍNTESIS DE LA PARED CELULAR

Además de la membrana citoplasmática, las bacterias poseen una estructura adicional formada por peptidoglicano, una macromolécula de polisacárido en la que se alternan *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico y en la que los residuos de *N*-acetilmurámico se enlazan a un

pentapéptido del que parten enlaces cruzados por transpeptidación entre determinados aminoácidos.

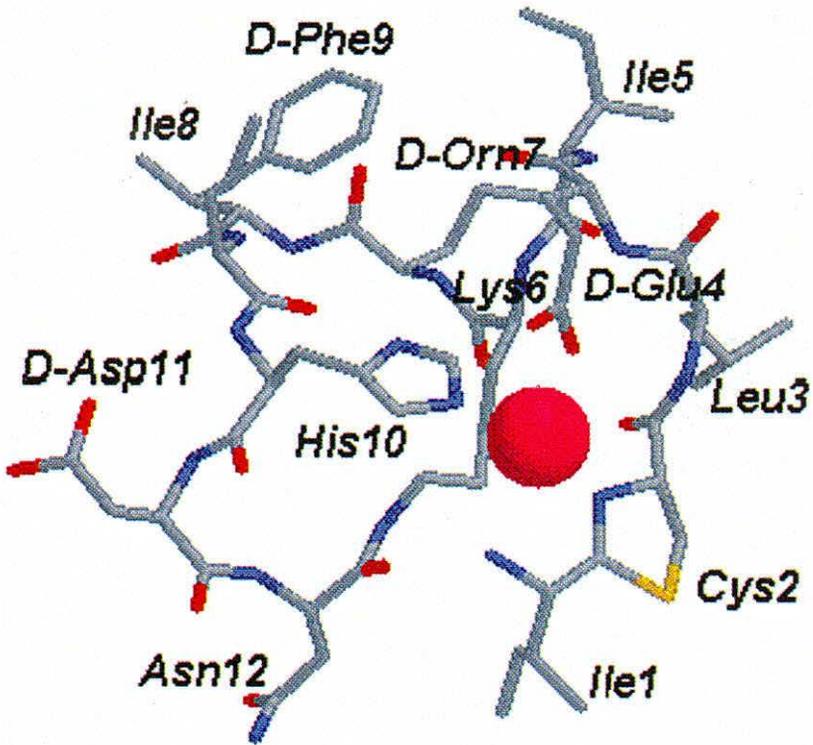
Esta estructura protege a la célula de las variaciones de la presión osmótica y determina su forma, siendo muchos los antibióticos naturales que van dirigidos a enzimas o a sustratos que están implicados en su biosíntesis, ya que tiene varias etapas. Así, la **fosfomicina**, inhibe la síntesis del ácido *N*-acetilmurámico y la **D-cicloserina** (un tuberculostático) actúa en la biosíntesis del pentapéptido inhibiendo varias enzimas en las que participa D-alanina.

La **bacitracina A** (un antibiótico peptídico aislado de *B. licheniformis*), impide que cadenas de disacárido péptido se unan a un transportador lipídico de la membrana y se trasloquen al periplasma bacteriano para que varias enzimas completen la polimerización y realicen la transpeptidación.



Bacitracina A

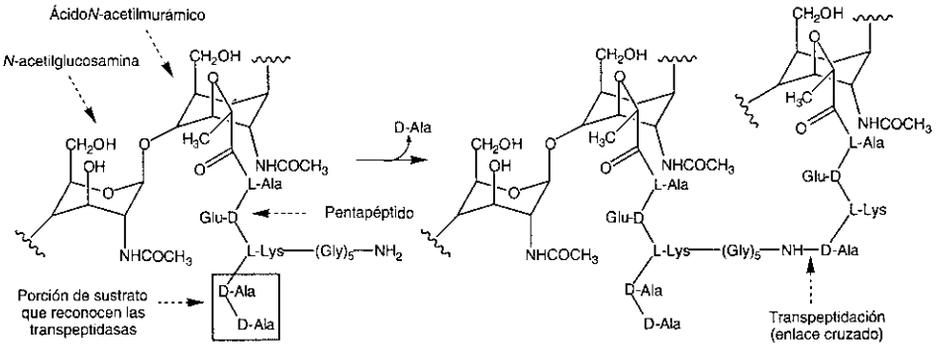
Este antibiótico inhibe la defosforilación de fosfato de undecaprenilo («phospholipid carrier») formando un complejo con éste, siempre que esté presente un catión divalente que generalmente es  $Zn^{2+}$ . El metal se une al grupo fosfato del fosfato de undecaprenilo y la cadena lipófila de éste a residuos lipófilos de Phe e Ile del antibiótico.



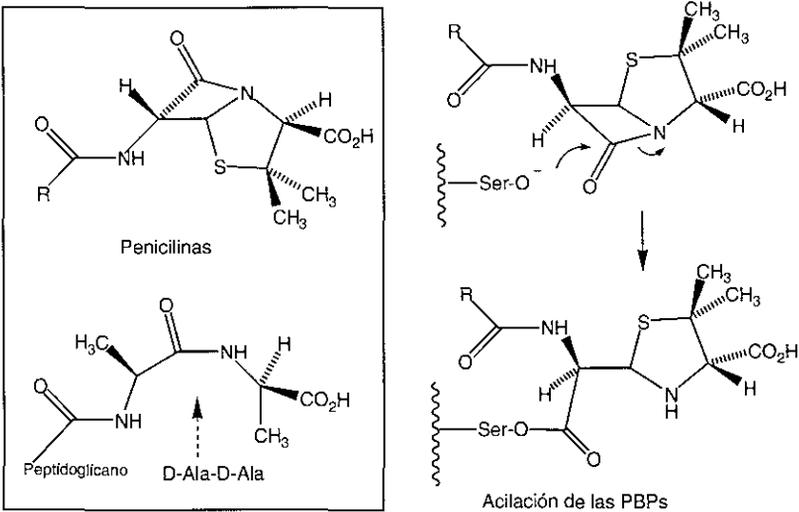
Bacitracina A incluyendo  $Zn^{2+}$

El proceso de biosíntesis en el que está implicada la bacitracina A se representa a continuación:





Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, entre los que se encuentran las penicilinas y las cefalosporinas, ejercen su acción terapéutica a través de la inhibición de las PBP. Actúan como falsos sustratos acilando un residuo de serina situado en el lugar activo, debido a la apertura del anillo  $\beta$ -lactámico, formando derivados de tipo éster que se hidrolizan muy lentamente. De esta forma, deja de realizarse la biosíntesis de esta pared, se produce su ruptura y, finalmente, la muerte de las bacterias que se encuentren en crecimiento.

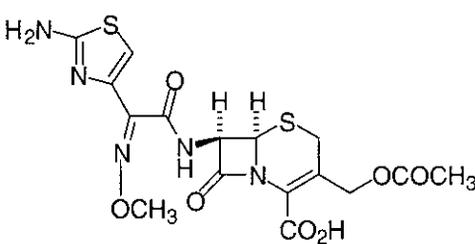


Las bacterias se protegen de estos fármacos expresando  $\beta$ -lactamasas, unas peptidasas similares a las PBPs que, una vez aciladas, se hidrolizan rápidamente, lo que conduce a que el antibiótico se inactive [10]. La se-

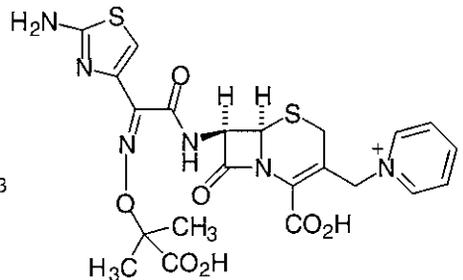
mejanza citada explica que sea muy difícil diseñar antibióticos  $\beta$ -lactámicos que sean poco sensibles a las  $\beta$ -lactamasas pero que se enlacen a las PBP.

A lo largo del tiempo, la estructura de estas enzimas ha evolucionado, pudiéndose clasificar en cuatro tipos: las  $\beta$ -lactamasas de clases A, C y D actúan como se ha comentado porque contienen un resto de serina en el sitio activo. Las de clase A se codifican generalmente por un plásmido mientras que las de las clases C y D se codifican cromosómicamente. Las  $\beta$ -lactamasas de clase B son metaloproteasas de  $Zn^{2+}$  [11]. Desde el punto de vista terapéutico las más importantes son las  $\beta$ -lactamasas de la clase A, que incluyen a las penicilinas TEM, y las  $\beta$ -lactamasas de la clase C, entre las que se encuentran algunas cefalosporinas como AmpC [12].

*Streptococcus pneumoniae* no biosintetiza  $\beta$ -lactamasas, sino que se hace resistente a estos antibióticos modificando sus PBP por mutaciones en varios aminoácidos que conducen a dianas con menor afinidad por casi todas las  $\beta$ -lactamas, incluyendo la tercera generación de cefalosporinas, como cefotaxima y ceftazidima.

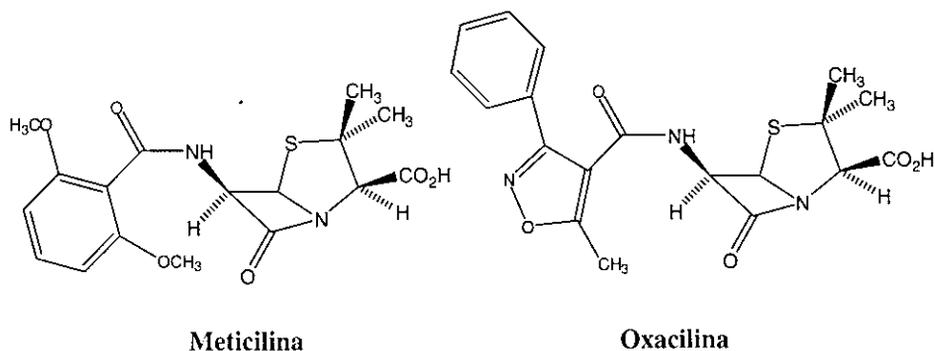


Cefotaxima



Ceftazidima

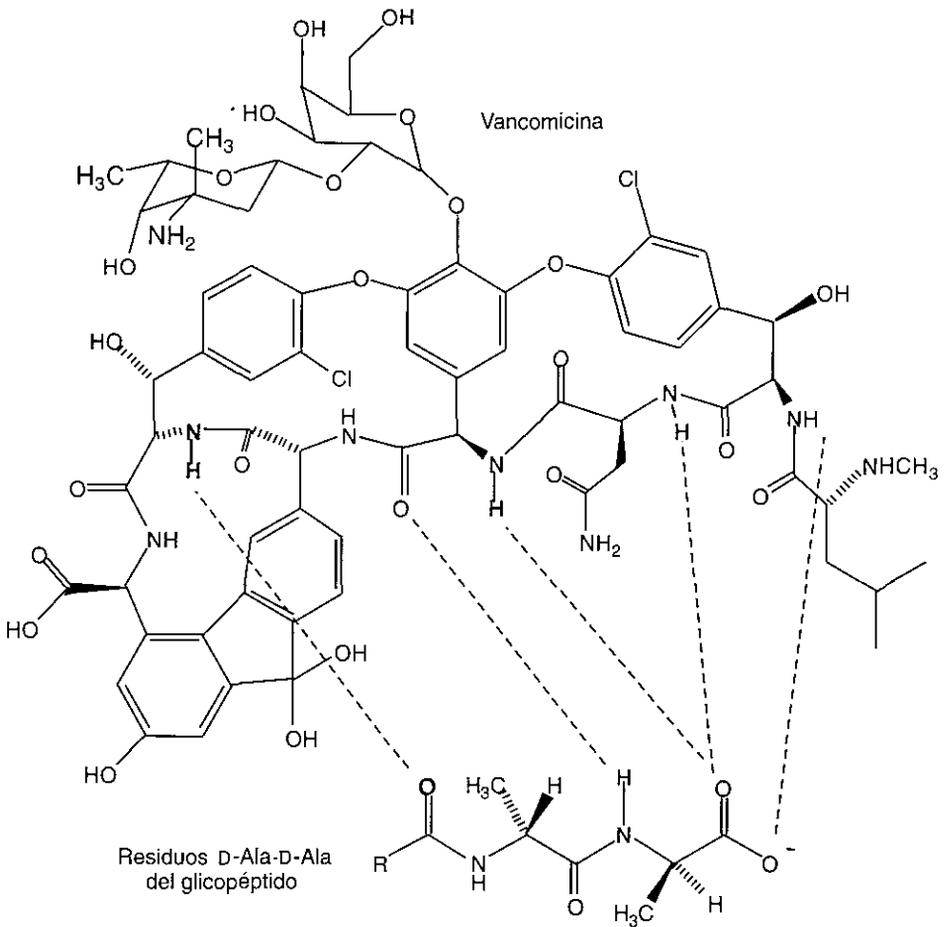
Las penicilinas resistentes a  $\beta$ -lactamasas poseen grupos acilo en la cadena lateral con impedimento estérico. Una de ellas es **metcilina**, que no puede administrarse por vía oral pero se utiliza intramuscularmente. Otras son las penicilinas isoxazólicas, como **oxacilina**, que sí pueden administrarse por vía oral por tener, además de impedimento estérico, agrupamientos electrón-atrayentes.



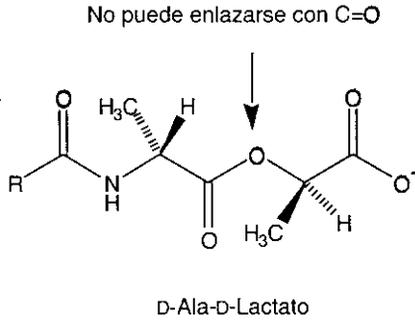
Un ejemplo dramático de resistencia bacteriana es el caso de la **vancomicina**, un glicopéptido que se desarrolló en Lilly y que se emplea en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias que se han hecho resistentes a los antibióticos que anteriormente eran resistentes a  $\beta$ -lactamasas por tener restos acilo voluminosos o por cualquier otra circunstancia estructural.

Entre ellas se encuentran las cepas de *S. Aureus* resistentes a metcilina y el *E. fecalis*, que produce la mayor parte de infecciones hospitalarias (especialmente en enfermos con tratamientos de diálisis y en pacientes cancerosos tratados con quimioterapia). Estas infecciones pueden ser mortales.

La vancomicina es un **glicopéptido** que por su gran hidrofobia y su gran tamaño no puede atravesar las membranas celulares e **interfiere** la biosíntesis del peptidoglicano enlazándose a través de cinco enlaces de hidrógeno al extremo **D-Ala-D-Ala** de la cadena de pentapéptido en la estructura precursora de peptidoglicano que hemos indicado anteriormente. De esta forma impide que la cadena peptídica sea reconocida por las transpeptidasas y bloquea la formación de los enlaces cruzados.

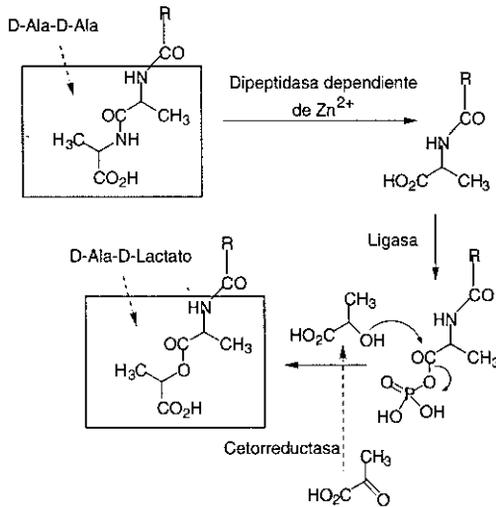


Las bacterias se han hecho resistentes a la vancomicina reemplazando la porción D-Ala-D-Ala de la cadena polipeptídica por otra de D-Ala-D-lactato. Así, el antibiótico sólo puede enlazarse con 4 enlaces de H, ya que el enlace entre los átomos indicados en color rojo no puede producirse. La ausencia del quinto enlace de hidrógeno es suficiente para hacer unas 3 veces más débil el complejo citado, perdiéndose la actividad antibacteriana.

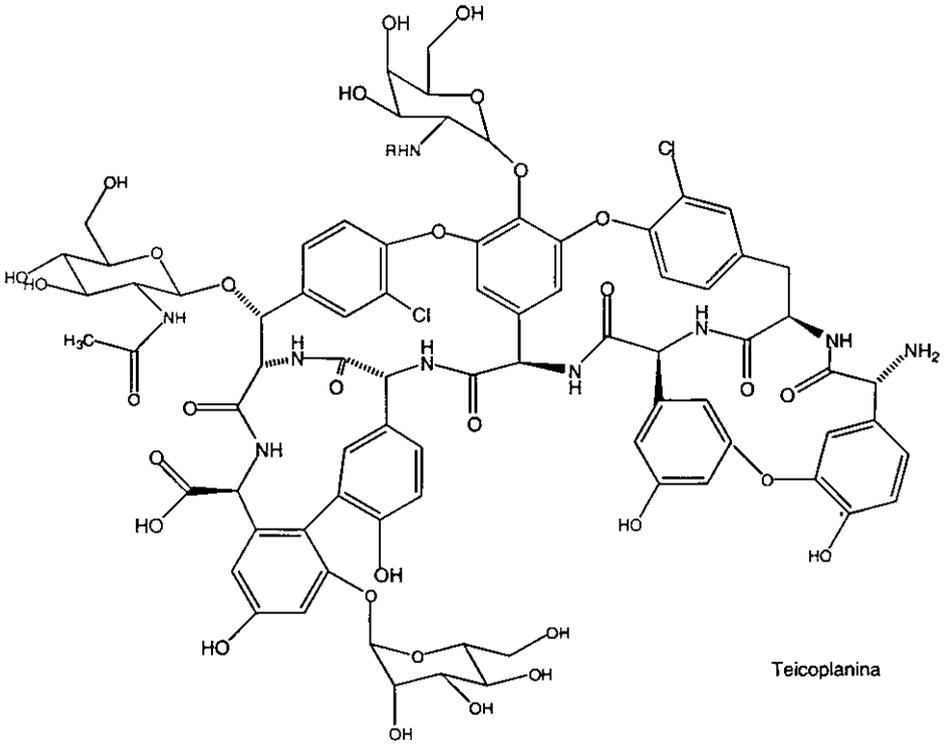


Esta mutación se realiza por activación de los genes que codifican una  $\alpha$ -ceto-reductasa que convierte el piruvato en D-lactato, así como de una ligasa dependiente de ATP que cataliza la unión de D-lactato a D-alanina. Al mismo tiempo, se sobreexpresa una D-Ala-D-Ala dipeptidasa dependiente de  $Zn^{2+}$ , que hidroliza selectivamente este dipéptido y permite que se acumule D-Ala-D-lactato y se incorpore al peptidoglicano. Estas ligasas comienzan fosforilando D-Ala y, posteriormente, forman el enlace éster con el OH del lactato como nucleófilo.

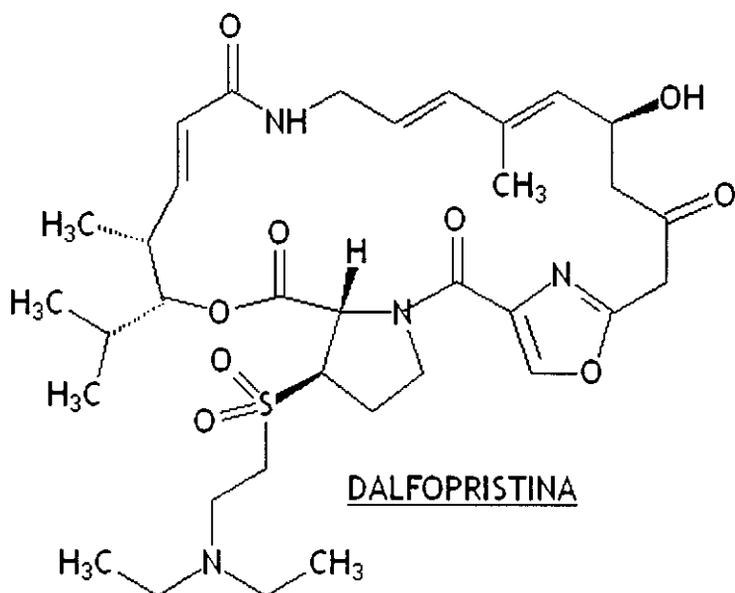
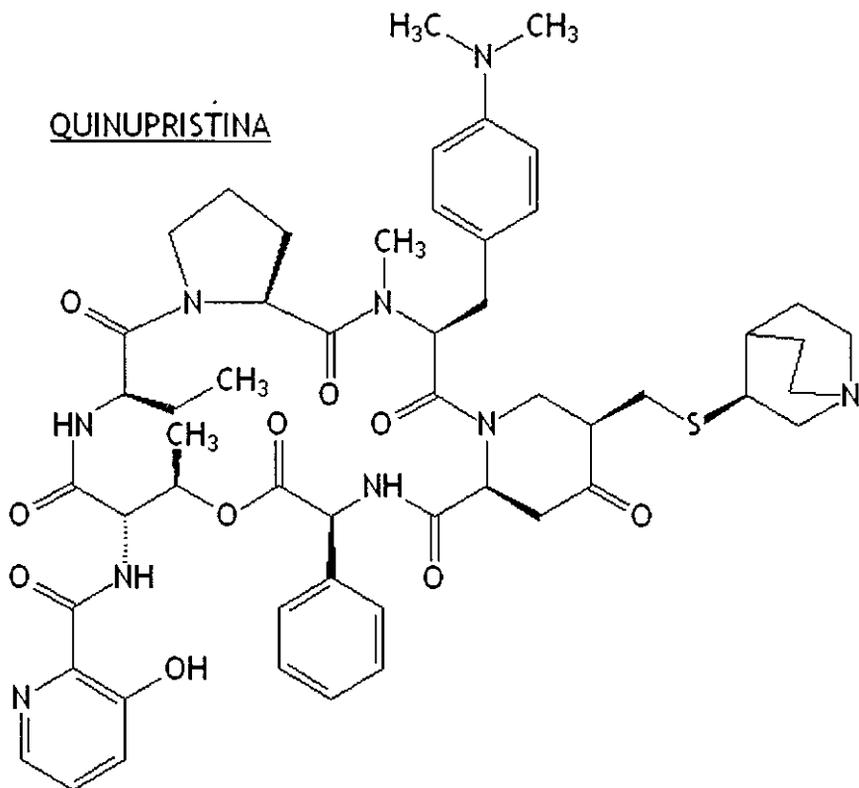
Aunque en el caso de cepas de *S. aureus* resistentes a vancomicina no se han encontrado estas ligasas, sí se han detectado niveles aumentados de PBP<sub>2</sub>, que compiten con la vancomicina por su sustrato D-Ala-D-Ala y forman complejos reversibles.



Otro antibiótico glicopéptido utilizado en el tratamiento de infecciones hospitalarias SARM (*S. Aureus* resistentes a mitomicina) es la teicoplanina, uno de los cinco compuestos que produce mayoritariamente *Actinoplanes feicomyceticus* (los compuestos se diferencian en el resto R).

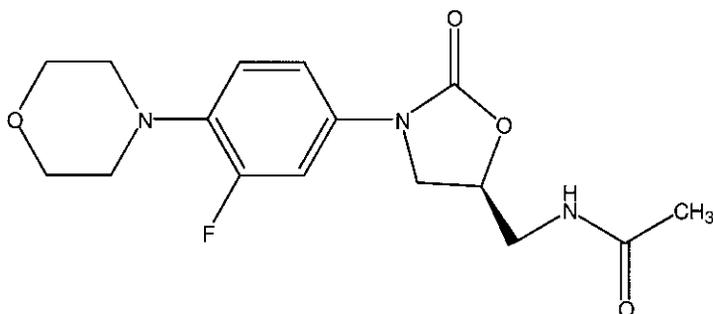


Los primeros casos de *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina se conocieron en Europa en los años 80. Las estreptograminas (Synercyd®, de Aventis Pharma) fueron los primeros antibióticos que se utilizaron como antibacterianos de reserva. Son una asociación de dos compuestos que actúan sinérgicamente, inhibiendo la síntesis proteica: quinupristina y dalfopristina.

QUINUPRISTINADALFOPRISTINA

Estos antibióticos, por su función lactona y su mecanismo de acción, se consideran próximos a los macrólidos, aunque su estructura es semejante a la de los antibióticos glicoproteicos (como vancomicina).

Por otra parte, después de 35 años de búsqueda de un antibiótico eficaz frente a cepas resistentes a meticilina y vancomicina, Pharmacia&Upjohn ha desarrollado **linezolida (Zyvoxid®)**, que es el primer antibiótico comercializado con estructura de oxazolidinona. Otros análogos, como DUP 721, DUP 105 o PNU 100592 (eperozolida), tuvieron que desecharse por su toxicidad. Linezolida puede administrarse por vía oral o intravenosa, y actúa inhibiendo los primeros pasos de la biosíntesis proteica por un nuevo mecanismo que se sitúa en la interacción de ARNm-ARNt con la subunidad 30S del ribosoma [13, 14]. Linezolida ha sido galardonada en diciembre de 2002 con uno de los premios a la innovación «Panorama».



**Linezolida**

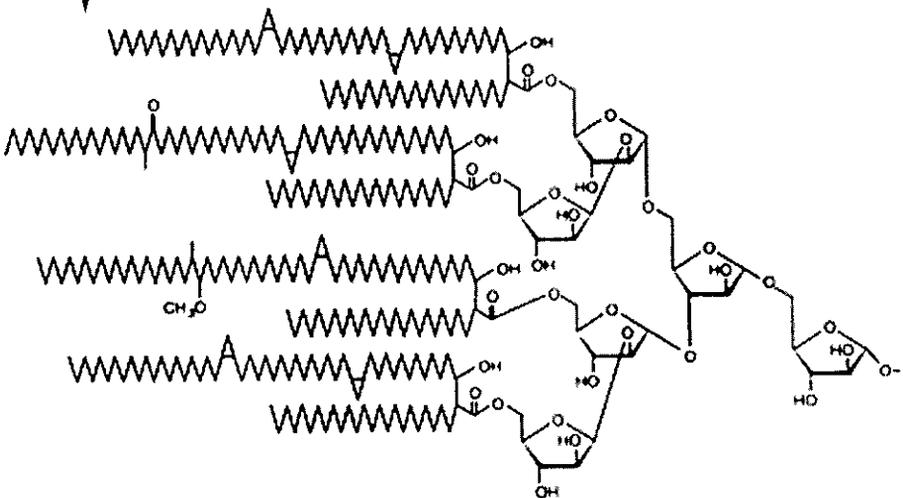
## 5. LA TUBERCULOSIS MULTIRRESISTENTE

Hay dos tipos de **bacilos tuberculosos** que pueden causar esta enfermedad en el hombre: uno es responsable de casi todos los casos de tuberculosis pulmonares, el bacilo tuberculoso humano; el otro es el bacilo tuberculoso bovino, que parasita al ganado y se vincula a la tuberculosis de ganglios y huesos en las personas jóvenes. También existen otras micobacterias atípicas que provienen del suelo, los pájaros u otros animales y pueden producir infecciones humanas del mismo tipo que la tuberculosis, pero tienen una incidencia mucho menor.

El género *Mycobacterium*, a cuyo estudio dedicó una especial atención el Premio Nobel de Medicina y Fisiología de 1905 Robert Koch, posee en su cubierta unos compuestos lipídicos especiales denominados **ácidos micólicos** que están enlazados a polisacáridos de galactosa-arabinosa, además del peptidoglicano con enlaces cruzados entre D-Ala y ácido diaminopimélico [15, 16]. Quizás porque este carácter hidrófobo de la superficie hace a las células muy impermeables a los nutrientes, estos bacilos tienen un crecimiento lento. Otro componente importante de la envoltura es el lipoarabinomano, que posee un **carácter inmunogénico para los macrófagos** (células B y T). Estos macrófagos poseen receptores que reconocen a dichos componentes y, al hacerlo, fagocitan al parásito e intentan destruirlo en el fagosoma por varios mecanismos, entre los que se encuentra la formación de especies reactivas como superóxido y radical hidroxilo [17].

El bacilo tuberculoso se multiplica muy lentamente y es muy difícil de eliminar, siendo el oxígeno fundamental en su desarrollo ya que es un germen estrictamente aerobio que pone en juego procesos oxidativos –prooxidantes y antioxidantes– para defenderse del ataque de los macrófagos. Puede decirse que **la tuberculosis es una enfermedad vinculada al estrés oxidativo** y entenderse el empleo de antioxidantes en su prevención y/o tratamiento de la tuberculosis.

Ácidos micólicos



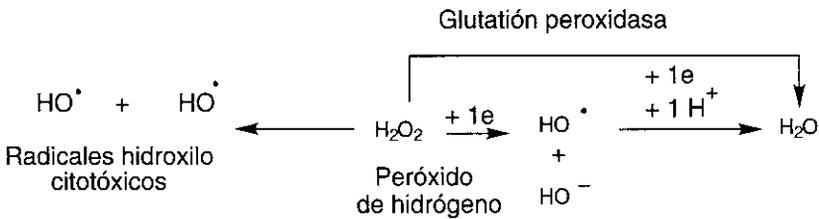
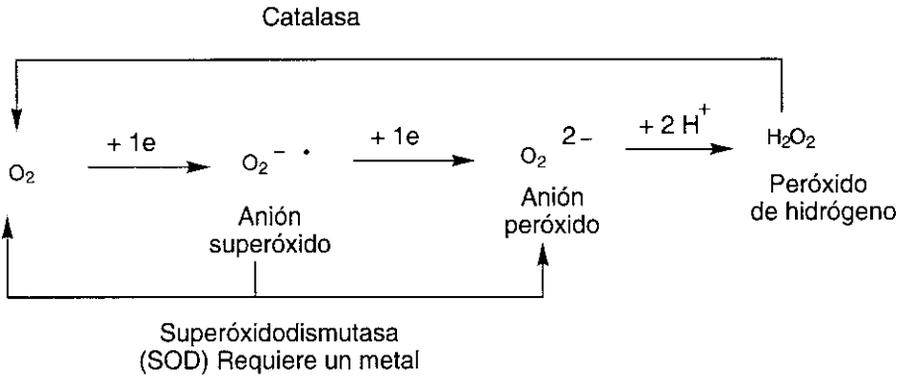
La tuberculosis no es sinónimo de bacilo de Koch, ya que éste es causa necesaria pero no suficiente para producir la enfermedad. Por tanto, el tratamiento de la tuberculosis no es sinónimo de «eliminar al bacilo de Koch». La tuberculosis humana es una enfermedad antiquísima, pero hasta mediados del siglo XIX apenas se conocía su etiología, patogenia y tratamiento. Los trabajos de Villemin (1827-1892) y de Koch (1843-1910) dieron lugar a los fundamentos de su etiología y patogenia. Pero aún así quedaban muchas incógnitas importantes: ¿Por qué el bacilo de Koch produce en unos organismos una tuberculosis progresiva que lleva a la muerte; en otros, una enfermedad de curso benigno y hasta de curación espontánea; en otros la «infección tuberculosa» que sólo se manifiesta por marcadores inmunológicos; y en otros no produce nada?

La interacción de *M. tuberculosis* y el hospedador humano es extremadamente compleja y está determinada en parte por la virulencia de la cepa, aunque probablemente sea más importante la resistencia específica y no específica del hospedador. La virulencia de los cultivos de *M. tuberculosis* se ha correlacionado con la formación de estructuras longitudinales en forma de cuerda que reflejan la presencia del glicolípidos denominados «factor cuerda». En las infecciones primarias, que afectan por primera vez a un individuo, las bacterias se depositan y desarrollan en los pulmones. Entonces se produce la **sensibilidad retardada**, formándose agregados de macrófagos activados que se denominan **tubérculos**.

Las células fagocíticas destruyen las bacterias empleando formas tóxicas de oxígeno ( $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $HO^\cdot$  y  $^1O_2$ ), pero algunos organismos patógenos han desarrollado mecanismos para neutralizar estos efectos. Así, *M. Tuberculosis* parece que emplea glicolípidos fenólicos asociados a la pared celular que son muy eficaces para eliminar  $HO^\cdot$  y  $O_2^-$ , las especies más perjudiciales.

La molécula de oxígeno tiende a aceptar electrones de uno en uno, originando en primer lugar el **anión superóxido** ( $O_2^-$ ), que por la acción de la **superóxido dismutasa** (SOD) se descompone en  $O_2$  y **anión peróxido**. Éste se protona a **peróxido de hidrógeno** ( $H_2O_2$ ), que es un precursor directo de los dañinos **radicales hidroxilo** ( $HO^\cdot$ ). También puede

reducirse a agua por la catálisis de **glutación peroxidasa** u oxidarse a  $O_2$  por la **catalasa** [18].



En los casos en que las bacterias no se controlan, se produce una infección pulmonar que puede conducir a la destrucción masiva del tejido, a la dispersión de las bacterias a otros lugares del organismo, y a la muerte. Pero en la mayor parte de los casos, no se produce la infección aguda y la infección no es aparente, aunque el individuo está hipersensibilizado a la bacteria y sus productos. Esta hipersensibilidad es el fundamento de la prueba diagnóstica de la tuberculina. En esta prueba, los antígenos derivados del bacilo inyectados por vía subcutánea a un animal previamente inmunizado frente al mismo antígeno, desencadenan una reacción en la piel a las 24-48 h, ya que las citocinas liberadas estimulan a las células  $T_D$ , que atraen grandes cantidades de macrófagos para ingerir y digerir el antígeno invasor.

Los individuos con este diagnóstico positivo pueden convertirse en enfermos crónicos si se producen infecciones renovadas o si, tras perma-

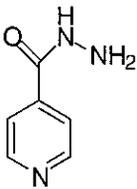
necer algunos bacilos latentes en los pulmones, se reactivan como consecuencia de malnutrición, hacinamiento, estrés, desequilibrio hormonal, etc.

En 1922 se introdujo la **prevención de la tuberculosis** por inmunización con B.C.G. (Bacilo Calmette Guerin), pero su valor no respondió a las expectativas cifradas en ella. La historia de la moderna quimioterapia de la tuberculosis comienza con **Dubos**, quien, trabajando con Waksman en Estados Unidos, estudió la actividad de compuestos producidos por gérmenes del suelo sobre otros gérmenes. Estos trabajos motivaron a **Waksman** a ampliar este estudio. Así nació la estreptotricina y luego, con la colaboración de Schatz, en 1944, la **estreptomycinina** (ver el apartado 2). Ese mismo año Feldman, Hinshaw y Pfuetze iniciaron su empleo en el tratamiento de la tuberculosis.

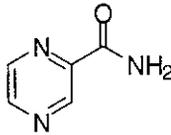
En 1943 Lehman desarrolló el **ácido 5-aminosalicílico** y, a principios de la década de los cincuenta, **Domagk** e investigadores de Hoffman La Roche, Squibb y Bayer encontraron, en la búsqueda sistemática de derivados de tiosemicarbazonas, que la **isoniazida** (o hidrazida del ácido isonicotínico) era tuberculostático. En julio de 1950 Bergel había publicado el trabajo «Fundamento del empleo de los antioxígenos en el tratamiento de la tuberculosis». Dado que ciertos metales en estados de valencia no usuales, como el hierro, intervienen en procesos oxidantes se estudiaron las tiosemicarbazonas como agentes quelantes con posible actividad antituberculosa. De este estudio surgió la isoniazida y luego el **etambutol**.

La **isoniazida** es un **producto de síntesis** barato que puede administrarse por vía oral y es específico del bacilo, por lo que **supuso una verdadera revolución en el tratamiento de la enfermedad**. A mediados del siglo XX ya se disponía por tanto de estreptomycinina y de isoniazida como antituberculosos eficaces, además de pirazinamida, etambutol, etionamida, D-cicloserina, tiacetazona, y en 1970, la rifampicina (ver la estructura y acción en el apartado 3). Los fármacos que se utilizan como primera opción en el tratamiento de la tuberculosis causada por cepas sensibles son una combinación de isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambu-

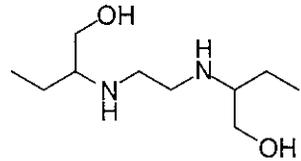
tol o estreptomina, que va cambiando a lo largo del tratamiento. En casos de toxicidad y de resistencia se utilizan como fármacos de segunda línea ácido 5-minosalicílico, kanamicina, etionamida, D-cicloserina (un inhibidor de la enzima alanina racemasa que participa en la biosíntesis de peptidoglicano catalizando la transformación de L-Ala en D-Ala, por ejemplo), capreomicina y tiacetazona (que forma complejos con metales como la isoniazida o el etambutol).



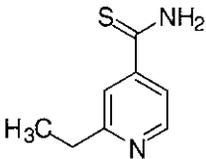
Isoniazida



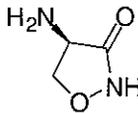
Pirazinamida



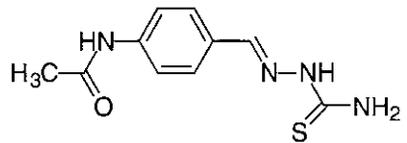
Etambutol



Etionamida



Cicloserina



Tiacetazona

Parecía que se había conseguido el fin de la enfermedad, y comenzaron a cerrarse los sanatorios para tuberculosos, pero no debe olvidarse que el descenso de mortalidad por tuberculosis ya había comenzado cien años antes debido a factores económicos que supusieron mejoras en la calidad media de la vida y en la alimentación. Aún seguía sin estar clara la diferencia entre infección tuberculosa y enfermedad tuberculosa, el papel de las defensas naturales o la predisposición. A estas incógnitas se sumaron la aparición de resistencias bacterianas y el SIDA.

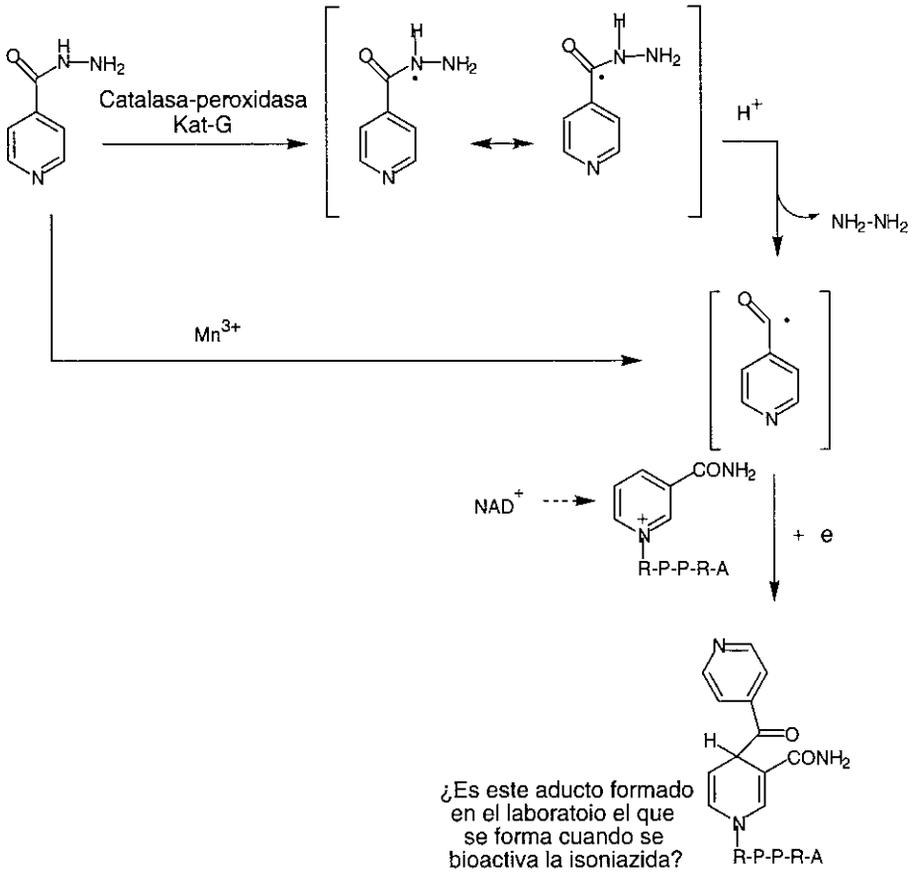
En la actualidad fallecen de tuberculosis alrededor de 3.000.000 de personas al año, pero, a pesar de la necesidad de desarrollar antituberculosos de tercera línea eficaces y poco tóxicos, desde el descubrimiento de

la rifampicina en 1970 no se ha introducido ningún avance terapéutico destacable hasta que recientemente se han empezado a emplear la rifabutina, un derivado de rifamicina relacionado con rifampicina, la amikacina (un aminoglucósido) y algunas quinolonas, como ciprofloxacino u ofloxacino.

Todos estos compuestos actúan por diversos mecanismos. Algunos inhiben la transcripción del DNA a RNA o la unión de proteínas en los ribosomas micobacterianos, mientras que otros interfieren la síntesis del ácido micólico de la membrna del parásito.

Al tratar a las bacterias con una pequeña cantidad de isoniazida, se produce la total inhibición de la síntesis de ácidos micólicos, mientras que una incubación continua con este fármaco produce la pérdida de la membrana externa y la muerte. El mecanismo de acción más probable para explicar la actividad antituberculosa de la isoniazida sugiere que es un profármaco que, tras bioactivarse por la enzima KatG (con actividad de catalasa-peroxidasa), inhibe una enoil-ACP reductasa dependiente de NADH que reduce *trans*-enoiltioésteres de la proteína ACP (*acyl carrier protein*). Esta reacción es esencial para la formación de las cadenas de ácidos micólicos [19-21].

Este proceso no está corroborado, pero sí se ha demostrado que la isoniazida se oxida en presencia de pirofosfato de  $Mn^{3+}$  por pérdida de un electrón y ganancia de un protón, para dar un radical de acilo posiblemente a través de radicales captodativos sobre el átomo de nitrógeno contiguo a  $C=O$  y  $NH_2$ . Éste, tras la adición de un electrón, se enlaza covalentemente al cofactor de la reductasa en su forma oxidada ( $NAD^+$ ). La isoniazida también podría actuar como quelante de cationes metálicos que, como el  $Cu^{2+}$ , son necesarios para la actuación de las enzimas que utiliza el parásito en la desactivación de los radicales de oxígeno producidos por los macrófagos.



Algunos parásitos consiguen sobrevivir por mecanismos diferentes a la respuesta inmune y a la acción de los fármacos haciéndose resistentes a ellos, de tal forma que hay muchas cepas diferentes que pueden causar la enfermedad y cada una puede ser resistente a un fármaco distinto. Por esto, es importante determinar cuál es la que hay que atacar en un enfermo a fin de establecer el antibacteriano o mezcla de antibacterianos más idónea. Para detectar las mutaciones en *locus* asociados a resistencias a antibióticos se han desarrollado ensayos de PCR («Polymerase Chain Reaction») y «biochips» capaces de efectuar miles de reacciones biológicas en muy poco tiempo.

La resistencia a isoniazida está asociada a varias mutaciones. Una de ellas se produce en el gen *KatG* que codifica la enzima KatG por eli-

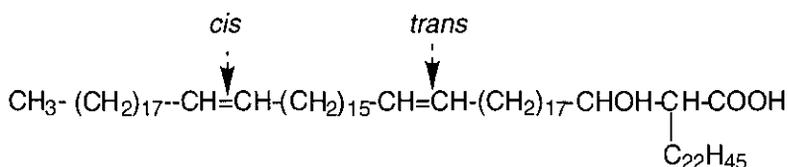
minación de un aminoácido, lo que conduce a una menor actividad de esta enzima. Las cepas resistentes también presentan una mutación T-G que se traduce en la sustitución en la estructura de la enzima de un residuo de Ser-94 por otro de alanina, presentando esta isoforma de la reductasa una menor afinidad por el cofactor NADH.

Estas resistencias están propiciadas por los propios pacientes por incumplimiento del tratamiento, ya que éste requiere la administración diaria de isoniazida durante 12 meses y, si no se hace así, los microorganismos que sobreviven suelen ser resistentes a este fármaco.

También se conocen mutaciones en determinados genes que están asociadas con resistencias a rifampicina, estreptomicina, etambutol, pirazinamida y kanamicina.

En cuanto al estado actual de las investigaciones dirigidas a resolver el problema de esta enfermedad, podemos decir que estamos ante un caso en que los estudios dirigidos a determinar la composición química de la fascinante diversidad de estructuras de los glicolípidos micobacterianos han concluido después de más de 70 años, sin embargo, el conocimiento de las enzimas implicadas en su biosíntesis es todavía muy poco conocido, existiendo diversas propuestas sin confirmación.

Anderson aisló por primera vez un ácido micólico en 1939 y determinó la fórmula  $C_{88}H_{172}O_4$ . Entre 1949 y 1960 se pudo definir, gracias a las técnicas cromatográficas, que los ácidos micólicos eran ácidos grasos de gran peso molecular que tenían un grupo hidroxilo en la posición 3 y una cadena larga en la posición 2. Finalmente, la resonancia magnética nuclear permitió dar en 1964 la primera estructura de un ácido micólico.



En otros ácidos los dobles enlaces se han transformado en subestructuras de ciclopropano. Se han identificado también prácticamente todos

los glicolípidos como el «factor cuerda», que es una 6,6-dimicoil- $\alpha$ -D-tre-  
alosa, pero **falta por determinar** su organización física en la envuelta bac-  
teriana y, lo que es más importante para el diseño de vacunas o de fár-  
macos eficaces, **su importancia biológica**.

En este aspecto, **los avances deben provenir de la genética**. Inacti-  
vando los genes que codifican los componentes de esta cubierta, o expre-  
sándolos en otros organismos, se podrá conocer su papel y su patogenei-  
dad [22].

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. M.L. Cohen, «Epidemiology of Drug Resistance: Implications for a Post-Antibiotic Era»; *Science*, 1992, 257, 1050.
2. H.C. Neu, «The Crisis in Antibiotic Resistance» *Science*, 1992, 257, 1064.
3. J. Davies, *Science*, 1994, 264, 375.
4. B. Hyde, «Anticipating the Arrival of the Post-Antibiotic Era»; *ASM News*, 1994, 60, 5.
5. M.L. Cohen, «Antimicrobial resistance: Prognosis for Public Health», *Trends Microbiol.* 1994, 2, 422.
6. P. Courvalin, «Evasion of Antibiotic Action by Bacteria», *J. Antimicrob. Chemother.* 1996, 37, 855.
7. a) R. Novak, B. Henriques, E. Charpentier, S. Noemark, E. Tuomanen, *Nature*, 1999, 399, 590. b) C. Walsh, *Nature*, 2000, 406, 775.
8. A. Dessen, A.M. Di Guilmi, T. Vernet, O. Dideberg, «Molecular mechanisms of Antibiotic Resistance in Gram-positive Pathogens», *Current Drug Targets-Infection Disorders*, 2001, 1, 63.
9. C. Pedregal, C. Avendaño, «Inhibidores enzimáticos que interfieren la biosíntesis de las paredes celulares», pp 251-258 en «Introducción a la Química Farmacéutica», Avendaño, C. (ed), McGraw-Hill Interamericana, 2001.
10. B.G. Spratt, «Bacterial Cell Wall», pp. 517-534; Ghuyen, J.-M.; Hakeubeck, R. (eds.), Elsevier, 1994.

11. I. Massova, S. Mobashery, «Kinship and Diversification of Bacterial Penicillin-Binding Proteins and Beta-Lactamases», *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42, 1.
12. K. Bush, G.A. Jacoby, A.A. Medeiros, «A Functional Classification Scheme for  $\beta$ -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure»; *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39, 1211.
13. D.J. Diekema, R.N. Jones, *Drugs*, 2000, 59, 7.
14. S.M. Swaney, H. Aoki, M.C. Ganpza, D.L. Shinbenger, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42, 3251.
15. M.T. Madigan, J.M. Martinko, J. Parker, «Brock. Biología de los microorganismos», 8ª edición, Prentice Hall Iberia, 1999.
16. G. Canetti, «Le bacille de Koch dans la lesion tuberculeuse du poumon», Masson Ed. 1946.
17. M. Arias, M. Rojas, J. Zavaleta, J.I. Rodríguez, S.C. Paris, L.F. Barrera, L.F. García, «Inhibition of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by Bcg r and Bcg s macrophages correlates with Nitric Oxide Production.» *The Journal of Infections Diseases* 1997, 176, 1552.
18. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, «Free Radicals in Biology and Medicine», Oxford University Press, 3ª Ed., 1999.
19. V. Deretic, W. Philipp, S. Dhandayuthapani, M.H. Mudd, R. Curcic, Garbe, T. Heym, B.; L.E. Via, S.T. Cole, «*Mycobacterium tuberculosis* is a natural mutant with an inactivated oxidative – stress regulatory gene: implications for sensitivity to isoniazid.» *Molecular Microbiology*, 1995, 17, 8900.
20. Y. Dhandayuthapani, M. Zhang, H. Mudd, V. Deretic, «Oxidative stress response and its role in sensitivity to isoniazid in mycobacteria.» *Journal of Bacteriology* 1996, 178, 3641.
21. Y. Zhang, S. Dhandayuthapani, V. Deretic, «Molecular basis for the exquisite sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid.» *Proc. National Acad. Sci. (U.S.A.)* 1996, 93, 13212.
22. J. Asselineau, G. Lanéelle, «Mycobacterial Lipids: A Historical Perspective», *Frontiers in Bioscience*, 1998, 3, 164.

11. I. Massova, S. Mobashery, «Kinship and Diversification of Bacterial Penicillin-Binding Proteins and Beta-Lactamases», *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42, 1.
12. K. Bush, G.A. Jacoby, A.A. Medeiros, «A Functional Classification Scheme for  $\beta$ -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure»; *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39, 1211.
13. D.J. Diekema, R.N. Jones, *Drugs*, 2000, 59, 7.
14. S.M. Swaney, H. Aoki, M.C. Ganpza, D.L. Shinbenger, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42, 3251.
15. M.T. Madigan, J.M. Martinko, J. Parker, «Brock. Biología de los microorganismos», 8ª edición, Prentice Hall Iberia, 1999.
16. G. Canetti, «Le bacille de Koch dans la lesion tuberculeuse du poumon», Masson Ed. 1946.
17. M. Arias, M. Rojas, J. Zavaleta, J.I. Rodríguez, S.C. Paris, L.F. Barrera, L.F. García, «Inhibition of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by Bcg r and Bcg s macrophages correlates with Nitric Oxide Production.» *The Journal of Infections Diseases* 1997, 176, 1552.
18. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, «Free Radicals in Biology and Medicine», Oxford University Press, 3ª Ed., 1999.
19. V. Deretic, W. Philipp, S. Dhandayuthapani, M.H. Mudd, R. Curcic, Garbe, T. Heym, B.; L.E. Via, S.T. Cole, «*Mycobacterium tuberculosis* is a natural mutant with an inactivated oxidative – stress regulatory gene: implications for sensitivity to isoniazid.» *Molecular Microbiology*, 1995, 17, 8900.
20. Y. Dhandayuthapani, M. Zhang, H. Mudd, V. Deretic, «Oxidative stress response and its role in sensitivity to isoniazid in mycobacteria.» *Journal of Bacteriology* 1996, 178, 3641.
21. Y. Zhang, S. Dhandayuthapani, V. Deretic, «Molecular basis for the exquisite sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid.» *Proc. National Acad. Sci. (U.S.A.)* 1996, 93, 13212.
22. J. Asselineau, G. Lanéelle, «Mycobacterial Lipids: A Historical Perspective», *Frontiers in Bioscience*, 1998, 3, 164.

11. I. Massova, S. Mobashery, «Kinship and Diversification of Bacterial Penicillin-Binding Proteins and Beta-Lactamases», *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42, 1.
12. K. Bush, G.A. Jacoby, A.A. Medeiros, «A Functional Classification Scheme for  $\beta$ -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure»; *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39, 1211.
13. D.J. Diekema, R.N. Jones, *Drugs*, 2000, 59, 7.
14. S.M. Swaney, H. Aoki, M.C. Ganpza, D.L. Shinbenger, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42, 3251.
15. M.T. Madigan, J.M. Martinko, J. Parker, «Brock. Biología de los microorganismos», 8ª edición, Prentice Hall Iberia, 1999.
16. G. Canetti, «Le bacille de Koch dans la lesion tuberculeuse du poumon», Masson Ed. 1946.
17. M. Arias, M. Rojas, J. Zavaleta, J.I. Rodríguez, S.C. Paris, L.F. Barrera, L.F. García, «Inhibition of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by Bcg r and Bcg s macrophages correlates with Nitric Oxide Production.» *The Journal of Infections Diseases* 1997, 176, 1552.
18. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, «Free Radicals in Biology and Medicine», Oxford University Press, 3ª Ed., 1999.
19. V. Deretic, W. Philipp, S. Dhandayuthapani, M.H. Mudd, R. Curcic, Garbe, T. Heym, B.; L.E. Via, S.T. Cole, «*Mycobacterium tuberculosis* is a natural mutant with an inactivated oxidative – stress regulatory gene: implications for sensitivity to isoniazid.» *Molecular Microbiology*, 1995, 17, 8900.
20. Y. Dhandayuthapani, M. Zhang, H. Mudd, V. Deretic, «Oxidative stress response and its role in sensitivity to isoniazid in mycobacteria.» *Journal of Bacteriology* 1996, 178, 3641.
21. Y. Zhang, S. Dhandayuthapani, V. Deretic, «Molecular basis for the exquisite sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid.» *Proc. National Acad. Sci. (U.S.A.)* 1996, 93, 13212.
22. J. Asselineau, G. Lanéelle, «Mycobacterial Lipids: A Historical Perspective», *Frontiers in Bioscience*, 1998, 3, 164.

# Algunos modos de superar las resistencias a los antibióticos

## 1. MODOS DE SUPERAR LAS RESISTENCIAS A LOS ANTIBIÓTICOS

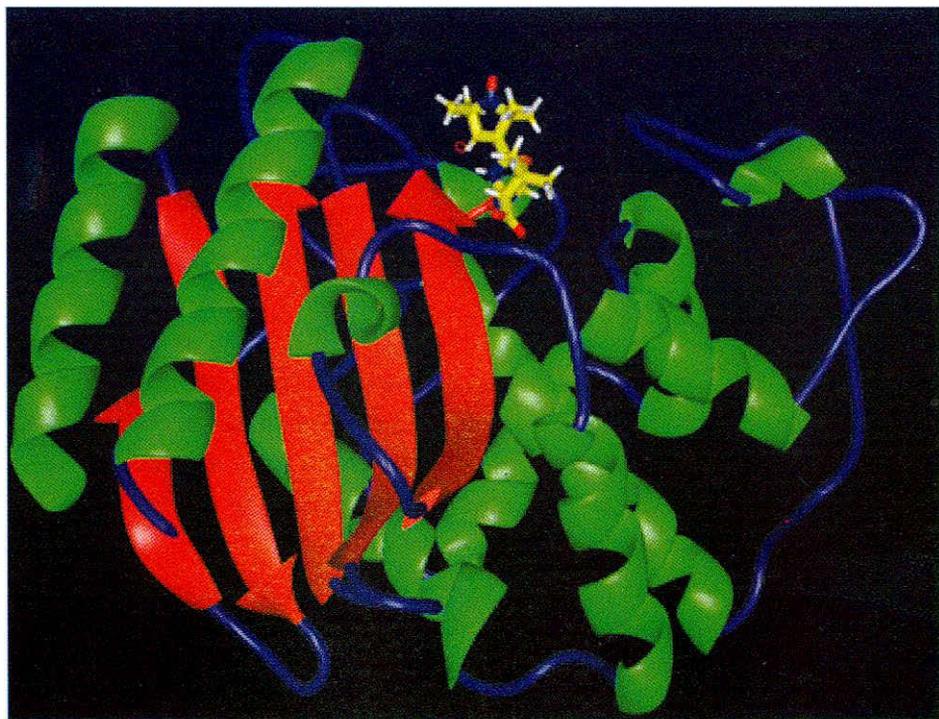
De lo anteriormente expuesto puede deducirse que básicamente existen dos modos de superar las resistencias que generan las bacterias a los antibióticos: desarrollando estructuras semejantes pero modificadas estructuralmente o desarrollando fármacos completamente nuevos por síntesis o cribado de microorganismos.

En este último supuesto es importante señalar que aunque se conocen más de 8.000 sustancias antibióticas, en su mayoría proceden de unos pocos géneros (*Streptomyces*, *Penicillium* y *Bacillus*), por lo que casi con certeza se encontrarán otros antibióticos examinando otros microorganismos. Por otra parte, parece probable que puedan modificarse estos últimos por técnicas de ingeniería genética.

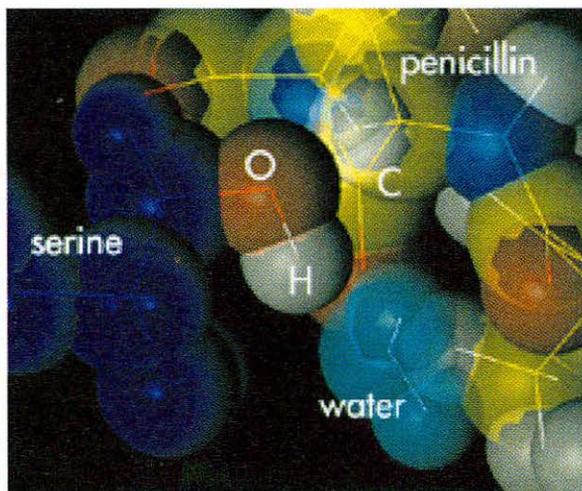
En relación al primer supuesto, las modificaciones deben estar basadas en el conocimiento de los mecanismos de acción y de resistencia a nivel molecular. A continuación veremos algunos ejemplos.

## 2. EL PROBLEMA DE LAS $\beta$ -LACTAMASAS

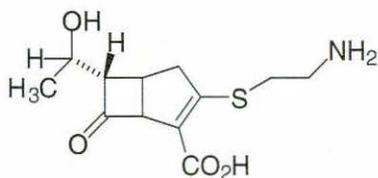
Ya hemos comentado que estas enzimas catalizan la hidrólisis de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. En la siguiente figura se representa un modelo de la  $\beta$ -lactamasa de TEM-1, en el que las hélices se han coloreado de verde y las láminas  $\beta$  de rojo, indicándose en color azul los lazos de conexión. La penicilina sustrato se sitúa en el centro activo de la enzima, y está representada con el esqueleto de carbono en amarillo, el nitrógeno en azul, el oxígeno en rojo, el hidrógeno en blanco, y el azufre en naranja.



En la otra figura encontramos un modelo CPK del sitio activo de la  $\beta$ -lactamasa en el que el residuo catalítico de serina (OH) se sitúa para transferir un protón a la molécula de agua (en color azul claro). Esta transferencia vuelve más nucleófila a la serina para que su átomo de oxígeno (O) ataque al átomo de carbono (C, en amarillo) de la penicilina sustrato.

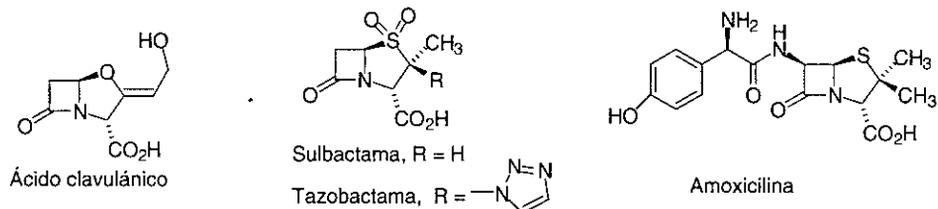


Para superar las resistencias producidas por estas enzimas metabólicas bacterianas se ha actuado de dos modos: desarrollando  $\beta$ -lactamas con características estructurales diferentes que hacen menos eficiente la acción enzimática y desarrollando inhibidores específicos de estas enzimas para asociarlos a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos que son sensibles. Entre las primeras se encuentran algunas **cefalosporinas** (como **cefotaxima**) y **carbapenemos** (como **tienamicina**), que difieren bastante de la estructura de los primitivos antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

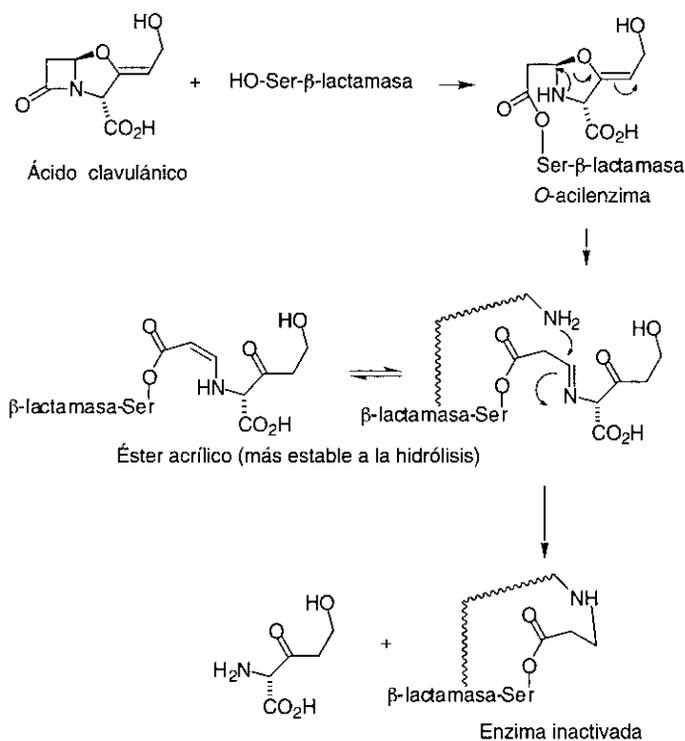


Tienamicina

Los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, entre los que se encuentran el **ácido clavulánico**, la **sulbactama** y la **tazobactama**, son compuestos sin actividad antibacteriana pero que pueden asociarse a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos para protegerlos de su hidrólisis. Un ejemplo muy conocido de dicha asociación es la combinación de **amoxicilina con ácido clavulánico**, que se ha comercializado como **Augmentine®**.



El mecanismo por el que el ácido clavulánico y las sulfonas de penamo inhiben a las  $\beta$ -lactamasas se debe a que, tras interaccionar con estas enzimas en lugar de los antibióticos con los que se combinan, un resto de serina de éstas rompe la función lactama, formando una acilenzima que experimenta una serie de reacomodos por los que se transforma en un éster acrílico intrínsecamente más estable a la hidrólisis que el derivado primitivo al que se une la enzima. A continuación, a través de una adición conjugada de un resto nucleófilo de la enzima se forma un enlace covalente y aquélla queda inactivada. Este mecanismo se refleja en el siguiente esquema relativo al ácido clavulánico.



Desgraciadamente, las bacterias son capaces de desarrollar nuevas  $\beta$ -lactamasas a través de mutaciones, escapando de esta forma a la acción de los inhibidores mencionados. Por ello se requiere la búsqueda de nuevos inhibidores.

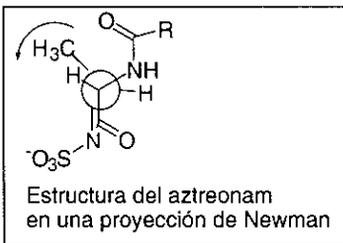
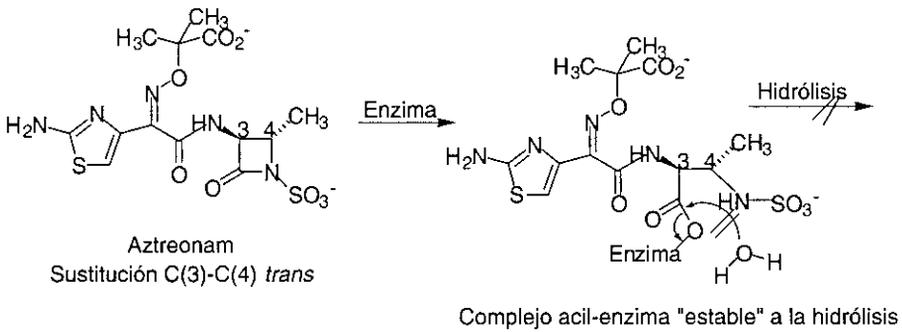
### 3. DISEÑO DE INHIBIDORES DE $\beta$ -LACTAMASAS C.

Algunas  $\beta$ -lactamasas de la clase A mutadas (como IRT-1, IRT-2 y IRT-3) y las  $\beta$ -lactamasas de la clase C (como AmpC) [1,2], ya no se inhiben por el ácido clavulánico o los restantes inhibidores comercializados. Por tanto, la combinación de estos inhibidores con los antibióticos susceptibles no es efectiva frente a estos microorganismos emergentes que han mutado. La información acerca de la estructura de estas isoenzimas y de su cinética ha permitido el diseño de nuevos inhibidores que son eficaces porque bloquean específicamente la desacilación de los derivados acilenzima.

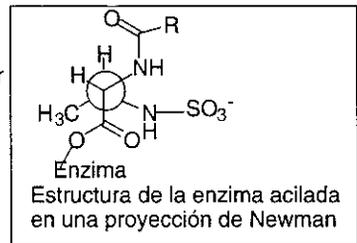
Esta información procede de estudios por rayos X de las estructuras cristalinas de las enzimas y de los complejos acilenzima. Así se han estudiado la  $\beta$ -lactamasa C de *Citrobacter freundii* 1203 y el complejo acilenzima que forma dicha enzima con el antibiótico aztreonam. Este fármaco es una  $\beta$ -lactama totalmente sintética que no se hidroliza, ya que se transforma en una acilenzima muy resistente a la hidrólisis.

Comparando las estructuras de la enzima libre y de la acilenzima se observó que para que se forme este último derivado ha tenido que producirse una rotación alrededor del enlace C(3)-C(4) del antibiótico. Esta rotación va en contra de las agujas del reloj y es de  $70^\circ$  aproximadamente. Así se relaja la conformación eclipsada del aztreonam y la convierte en una conformación «gauche», con menor impedimento estérico. Se ha comprobado que la rotación alternativa, en el sentido de las agujas del reloj, es menos favorable porque dispondría al sustituyente metilo ( $\text{CH}_3$ ) en C-4 demasiado próximo a dos aminoácidos de la enzima: la tirosina 150 y la leucina 119.

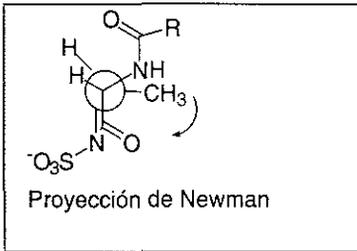
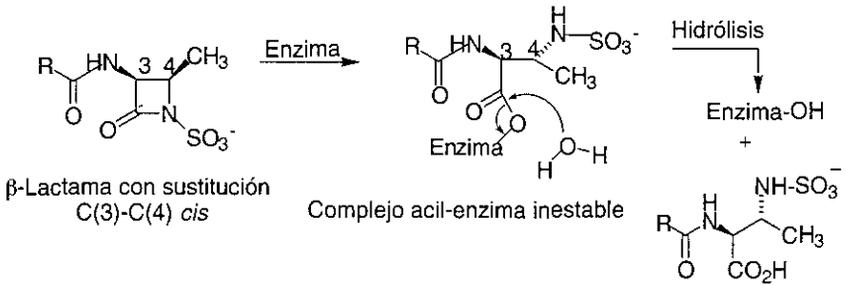
Tras esta rotación, el grupo  $\text{NH-SO}_3^-$  del aztreonam bloquea una cara de la función éster que se ha formado entre su grupo carbonilo  $\beta$ -lactámico y la serina 64 de la  $\beta$ -lactamasa C. El giro mencionado también desplaza a una molécula de agua, que se encontraba previamente enlazada por enlaces de hidrógeno con varios residuos de la enzima nativa: lisina 67, tirosina 150, asparagina 152 y lisina 315, los cuales contribuyen a su activación como nucleófilo para producir la hidrólisis (desacilación) del complejo acilenzima.



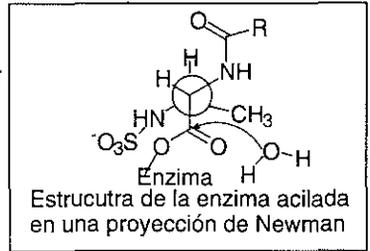
Enzima-OH  
[Giro alrededor  
del enlace  
C(3)-C(4)]



Diversas técnicas de modelado molecular utilizando estos conocimientos permitieron sugerir que si se utilizaban penicilinas, cefalosporinas o monobactamas que poseyeran dos sustituyentes en los carbonos C(3)-C(4) en disposición *cis*, este enlace podría girar en el sentido de las agujas del reloj sin interactuar negativamente con los residuos de las cadenas laterales de la enzima mencionados y, por tanto, al no bloquearse una cara del grupo éster por el agrupamiento sulfamoylo y no desplazar al agua activada, estos compuestos serían rápidamente hidrolizados tras la interacción con esta  $\beta$ -lactamasa C.



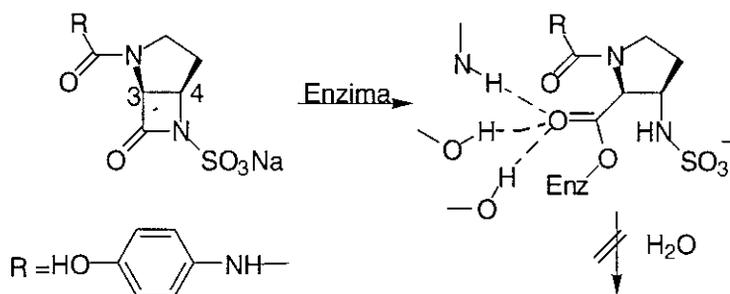
Enzima-OH  
[Giro alrededor  
del enlace  
C(3)-C(4)]



Asimismo, también se predijo que si en una molécula que tuviera sustituyentes en C-3 y C-4 con configuración *cis* se impedía la rotación a través de este enlace, se podría impedir el acceso del agua a la función éster y, de este modo, el complejo acilenzima sería más estable y se podría disponer de inhibidores eficaces de  $\beta$ -lactamasa C.

Sobre esta base se diseñaron monobactamas fusionadas en las posiciones C-3 y C-4 con un anillo de pirrolidina N-acilado [3]. En esta estructura la disposición *cis* de los sustituyentes, antes metilo y acilamino, está fijada y la rotación está impedida como consecuencia de este ciclo.

En efecto, se comprobó que la actividad inhibidora *in vitro* sobre la enzima aislada de alguno de los compuestos de esta serie (que se obtuvo por modificación de la cadena R del grupo acilo del compuesto «cabeza de serie») llegó a ser muy grande, alcanzándose valores  $K_i = 120 \text{ nM}$  (R = 4-hidroxifenilamino). En general, las monobactamas bicíclicas sintetizadas fueron menos potentes como inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas de clase A.



Los hechos que explican la actividad inhibitoria de estos compuestos se hicieron patentes cuando se estudió por rayos X la estructura del complejo acil- $\beta$ -lactamasa C de *C. freundii* con el representante citado (R = 4-hidroxifenilamino). En este complejo no se observaron cambios significativos en la estructura de la proteína, excepto que la cadena lateral del aspartato 123 se desplazaba para acomodar al inhibidor. El anillo de  $\beta$ -lactama de éste se había roto, formando un agrupamiento éster con el residuo catalítico de serina 64, la porción estructural de *N*-sulfonato formaba una sal con la lisina 315 y el grupo *p*-hidroxifenilcarbamoilo bloqueaba el acceso del agua desde la posición en que ésta podía activarse. Esta última circunstancia explica la importancia de que el sustituyente en  $\alpha$  sea flexible y no sea voluminoso. De hecho, se comprobó que otros análogos, en los que esta cadena lateral era rígida, tenían muy poca afinidad por la enzima.

En el complejo citado, la cadena lateral del inhibidor se sitúa en paralelo con una de las cadenas de la lámina  $\beta$  que constituye uno de los extremos del centro catalítico de la enzima, formando un enlace de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico y el nitrógeno amídico de la asparagina 152. Además, el oxígeno carbonílico del éster forma enlaces de hidrógeno con los grupos NH y OH de la cadena, en donde se encuentran la serina 64 y la serina 318. Dado que en estos enlaces el oxígeno carbonílico es aceptor, la reactividad del éster para el ataque por agua sería comparable a la de un sustrato fácilmente hidrolizable. Por ello, la estabilidad del complejo acilenzima sólo puede explicarse en este caso porque el acceso de la molécula de agua activada a dicho agrupamiento está impedido.

Cuando se estudió la estructura cristalina de una  $\beta$ -lactamasa de clase A, se observó la presencia de un residuo de serina en el lugar del de tirosina presente en la clase C, y se dedujo que la molécula de agua estaría aquí menos activada. Con estas enzimas, el ataque del agua al grupo éster ocurre por el lado opuesto al de las  $\beta$ -lactamasas de la clase C. El agua se activa aquí por enlaces de hidrógeno diferentes, y la restricción de la rotación tiene menos impacto sobre la estabilidad del complejo acilenzima.

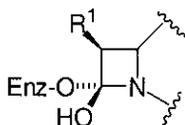
#### 4. INHIBIDORES DE $\beta$ -LACTAMASAS CON ESTRUCTURA DE ÁCIDO BORÓNICO

Dado que tanto aztreonam como los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas más conocidos: ácido clavulánico, sulbactama y tazobactama, tienen en común una estructura  $\beta$ -lactámica [4], se supuso que la producción de  $\beta$ -lactamasas podría activarse por estos inhibidores y las bacterias podrían hacerse resistentes a estos compuestos con mayor facilidad que si los inhibidores tuvieran unas estructuras muy diferentes. En consecuencia, se pensó que podría ser más adecuado diseñar inhibidores que carecieran de la estructura de  $\beta$ -lactama, para que no generasen mecanismos de resistencia desarrollados contra aquel tipo de estructuras.

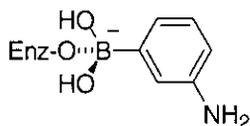
Ya hemos comentado que la mayor parte de las  $\beta$ -lactamasas son proteasas de serina, al igual que quimotripsina o elastasa. En el tema 3 hemos visto que el estado de transición de la reacción que catalizan estas enzimas, la hidrólisis de un enlace peptídico, es tetraédrico. Por eso, muchos inhibidores de proteasas se han diseñado, no por analogía con los péptidos sustrato, sino por analogía con el estado de transición tetraédrico.

Dado que el átomo de boro presente en los ácidos borónicos puede aceptar electrones de un nucleófilo, estos compuestos podrían ser inhibidores, y funcionar como análogos del estado de transición [5]. Al demostrarse esta posibilidad con la enzima elastasa, es lógico que los boronatos también se estudiaran como posibles inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Así se

encontró que los ácidos fenilborónico y *m*-aminofenilborónico inhibían débilmente la  $\beta$ -lactamasa de clase A procedente de *Bacillus cereus* ( $K_i = 1,2-4,0$  mM) [6], al igual que otros ácidos fenilborónicos diferentemente sustituidos que actuaban como inhibidores reversibles de  $\beta$ -lactamasas C procedentes de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* ( $K_i = 2,4-920,0$  mM).

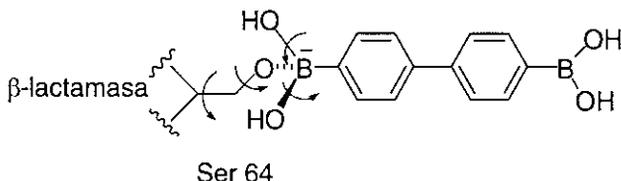


Hidrólisis enzimática de una  $\beta$ -lactama.  
Estado de transición



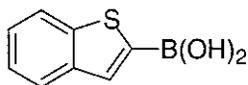
Complejo enzima-boronato  
Análogo del estado de transición

Basándose en la estructura cristalina determinada por difracción de rayos X del complejo formado por esta enzima y el ácido *m*-aminofenilborónico, se modelizaron las interacciones de distintos conformémeros de ácidos aril(heteroaril)borónicos con el sitio activo de la  $\beta$ -lactamasa AmpC. Por ejemplo, en el ácido 4,4'-bifenilbaborónico pueden variarse los ángulos de torsión representados en la figura y determinar, con los programas adecuados, aquéllos que presentan menores conflictos estéricos en el sitio activo de la enzima, es decir, cuál es la geometría que minimiza la energía del complejo.



Este estudio permitió sugerir varios sitios de interacción de estos ligandos, explorar la importancia de los factores estéricos y electrónicos de los sustituyentes sobre el anillo de arilo o heteroarilo, y encontrar algunos compuestos, como el ácido benzo[b]tiofeno-2-borónico, con una actividad 100 veces mayor que la del ácido *m*-aminofenilborónico prototipo. Éstos fueron capaces de proteger a antibióticos  $\beta$ -lactámicos de su

bioinactivación. En este caso, es importante que no tengan actividad significativa frente a otras proteasas de serina, como la quimotripsina o la elastasa [7,8], ya que los fármacos, además de ser muy activos, deben ser muy selectivos.



Ácido benzo[b]tiofeno-2-borónico

## 5. DISEÑO DE UN ANTIBIÓTICO QUE SE INACTIVA POR LA LUZ

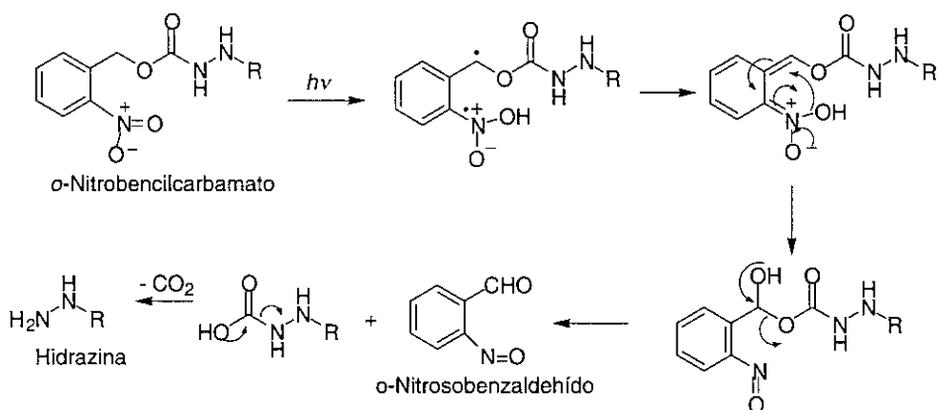
Ya hemos dicho, que el uso de antibióticos está muy extendido en el mundo, tanto para uso humano como para uso veterinario. Como en general estos compuestos se eliminan antes de que se metabolicen, se excretan al medio ambiente en cantidades masivas y continúan actuando sobre las bacterias presentes en las aguas fecales, favoreciendo la aparición de cepas resistentes que se distribuyen a las tierras de labor cuando se abonan con estos residuos. Las bacterias resistentes, resultado de esta selección natural, pueden pasar a las frutas, vegetales, e incluso a las moscas, y vuelven a infectar al hombre como microorganismos patógenos que entonces son difíciles de tratar.

Sobre esta idea se ha trabajado, y se han diseñado antibióticos  $\beta$ -lactámicos que poseen en su estructura una función enmascarada que se reactiva tras varias horas de exposición a la luz. Esta reactivación conduce a la destrucción del anillo de  $\beta$ -lactama y a la pérdida de su actividad antibiótica. De esta forma, podría acortarse la vida media de estos antibióticos en el medio ambiente disminuyendo así el problema de la aparición de cepas resistentes [9].

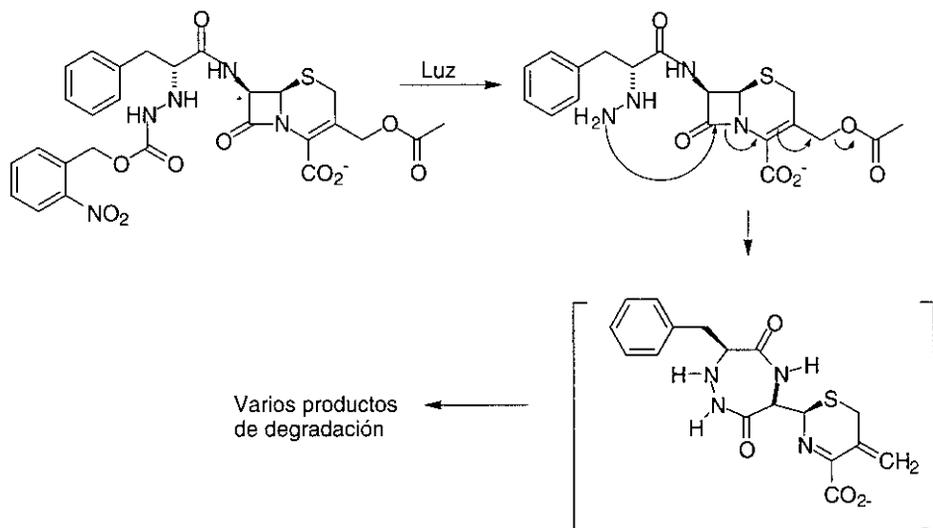
Entre estos compuestos se ha descrito un derivado fotolábil del ácido 7-aminocefalosporánico que contiene un resto acilo con una función hidrazina que, a su vez, está protegida por el grupo *o*-nitrobenci-

**loxicarbonilo** (*o*-NBC), que es cromóforo. Este grupo es relativamente estable a la mayoría de los reactivos químicos, pero es fotolábil (sensible a la luz).

Los carbamatos de *o*-nitrobencilo se transforman por irradiación de la siguiente forma: un protón y un electrón de la posición bencílica se eliminan para adicionarse al grupo nitro. La reorganización posterior de los distintos intermedios da lugar finalmente a *o*-nitrosobenzaldehído y a una amina, que en nuestro ejemplo es la hidrazina [10].



El derivado fotolábil del ácido 7-aminocefalosporánico así diseñado se comportó como una cefalosporina, ya que mostró actividad antibacteriana. Presenta la ventaja de que el grupo *o*-NBC puede eliminarse después de varias horas a la luz solar o artificial (10-16 horas) dando la hidrazina desprotegida, que al ser un nucleófilo muy eficaz, reacciona intramolecularmente con el grupo carbonilo del anillo lactámico produciendo un reacomodo que origina un nuevo heterociclo, el cual sufre posteriormente la descomposición a varios compuestos inactivos. Desgraciadamente, esta cefalosporina semisintética se inactiva por  $\beta$ -lactamasas de las clases A y C.



Para limitar la vida media de los antibióticos en el medio ambiente también podrían diseñarse análogos sensibles a la humedad o a determinados valores de pH, que se vuelvan inactivos e incapaces de contribuir a la selección de organismos resistentes.

## 6. DISEÑO DE ANTIBIÓTICOS CONJUGADOS CON SIDERÓFOROS

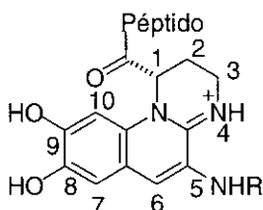
El microorganismo patógeno más importante entre las pseudomonas fluorescentes es *Pseudomonas aeruginosa*. Ésta es una bacteria oportunista peligrosa que se encuentra presente en todas partes y se distribuye fácilmente a través de los sistemas de aire acondicionado siendo responsable de infecciones hospitalarias frecuentemente letales, especialmente en pacientes quemados, con grandes heridas, inmunodeficientes, o con fibrosis quística.

Es insensible a muchos agentes desinfectantes y, lo que es peor, hay cada vez más cepas resistentes a la mayoría de los antibióticos y antibacterianos [11]. Estas resistencias se deben a que las bacterias se rodean frecuentemente de una película de un polímero denominado alginato, a

que su membrana externa es poco permeable, a que posee un mecanismo que expulsa al exterior las sustancias de bajo peso molecular, y a que expresa  $\beta$ -lactamasas que desactivan los antibióticos  $\beta$ -lactámicos [12].

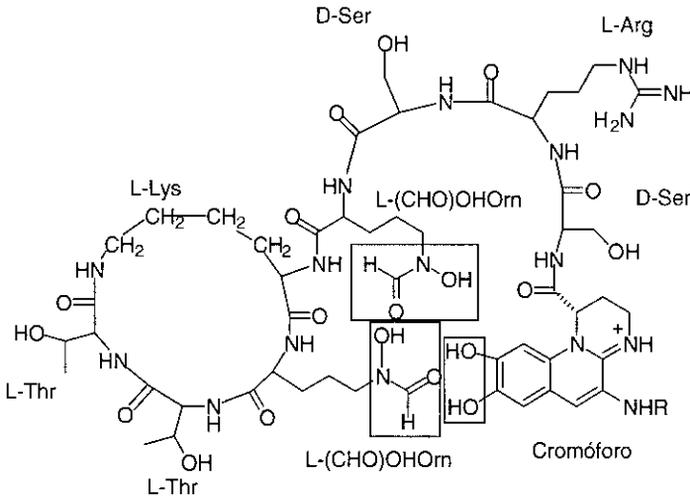
En 1887, Pasteur observó que si inoculaba *Bacillus anthracis* junto con otros organismos patógenos en animales, éstos no desarrollaban ántrax (carbunco). En 1889 se supo que uno de estos organismos era el *Bacillus pyocyaneus*, que es el nombre que se utilizaba en un principio para *Pseudomonas aeruginosa*. Esta observación podría haber conducido al aislamiento de los que hubieran sido los primeros antibióticos, anteriores a la penicilina, pero como era difícil preparar bacterias estándar, estos trabajos no se desarrollaron después del descubrimiento de la actividad antibacteriana de las sulfamidas. Después se supo que ciertos metabolitos de este microorganismo eran los compuestos activos [13] y, finalmente, en 1981 se determinó su estructura. Estos compuestos son las pioverdinas o pseudobactinas que originan una fluorescencia amarillo-verdosa observable cuando las bacterias se cultivan en medios pobres en hierro debido a que este metal es necesario para muchos procesos biológicos de tipo oxidativo [14]. *Pseudomonas aeruginosa* se ha adaptado para sobrevivir en estos medios produciendo estos compuestos con actividad siderófora, capaces de formar complejos con  $\text{Fe}^{3+}$ . Esta capacidad de adaptación a bajas concentraciones de Fe explica por qué tiene más posibilidades de supervivencia que otras bacterias.

La estructura de las pioverdinas es muy variada y engloba una serie de compuestos que tienen como cromóforo al ácido (1S)-5-amino-2,3-dihidro-8,6-dihidroxi-1H-pirimido[1,2-a]quinolina-1-carboxílico. En algunos casos el grupo carboxilo está en la posición 3 y el sustituyente R sobre el grupo amino en 5 suele ser un ácido dicarboxílico [15].



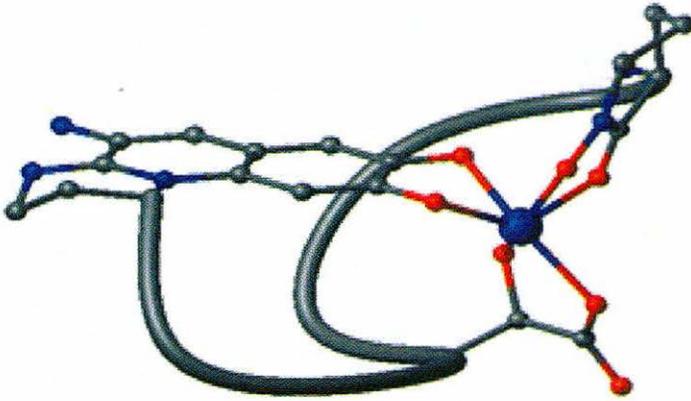
Pioverdinas

Según su estructura, se clasifican dentro de los grupos I-III. Como ejemplo se representa la pioverdina del grupo I PAO1.

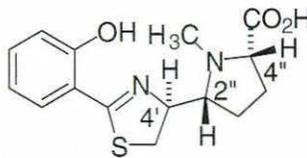


Pioverdina del Grupo I  
(se han recuadrado los grupos quelantes)

La cadena peptídica suele tener de 6 a 12 aminoácidos, de los cuales algunos no son proteinogénicos, como los  $\delta$ -*N*-hidroxi- $\delta$ -*N*-formil derivados de la ornitina (Orn), ciertos ácidos  $\beta$ -hidroxilados, o el ácido 2,3-diaminobutírico (Dab). Este último se encuentra en ocasiones formando un anillo de tetrahidropirimidina por condensación con el grupo carbonilo del aminoácido precedente. Su capacidad quelante de  $\text{Fe}^{3+}$  se debe a los grupos OH catecólicos y a los grupos hidroxámicos formados en la *N*-hidroxilación-*N*-formilación de la ornitina, recuadrados en la figura anterior [16]. En la siguiente figura tenemos un modelo de uno de estos complejos con los átomos de oxígeno que intervienen en el enlace con el metal (bola azul más grande) en color rojo y la cadena peptídica representada como un lazo unido al grupo cromóforo.



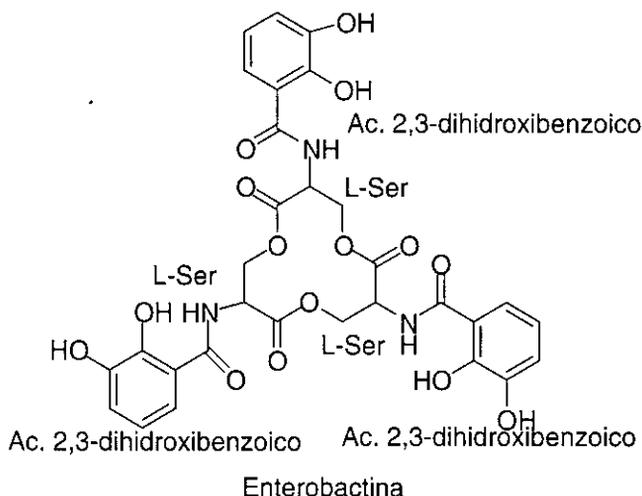
*Pseudomonas aeruginosa* biosintetiza otra estructura que es también capaz de formar complejos férricos, la **pioquelina**, que deriva de ácido salicílico y de dos restos de cisteína. Los tres centros estereogénicos de este compuesto (4', 2'' y 4'') han de tener la configuración *R* para poder formar el complejo con el catión férrico. Éste tiene lugar a través de enlaces de los aniones fenóxido y carboxilato y de los pares de electrones no compartidos de los dos átomos de nitrógeno.



Pioquelina

El propio **ácido salicílico** producido por *P. aeruginosa* puede actuar como sideróforo, aunque con menor capacidad quelante que los compuestos anteriormente citados.

Este microorganismo también puede utilizar sideróforos externos sintetizados por otros, entre los que se encuentra la **enterobactina** producida por *Escherichia coli*.



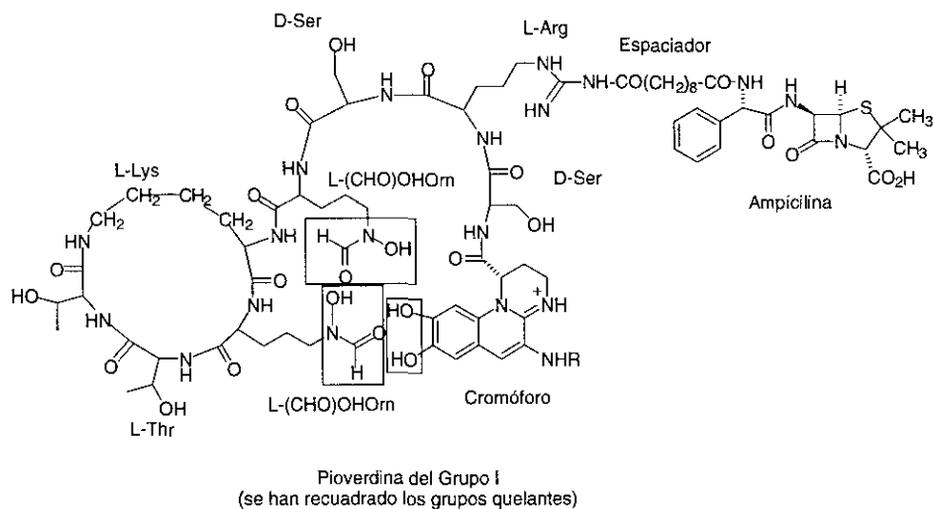
El conocimiento de la estructura y función de los compuestos sideróforos en las bacterias ha conducido al **desarrollo de conjugados sideróforo-antibiótico que pueden utilizarse como «caballos de Troya» para atacarlas**, introduciendo antibióticos que de otra forma no tendrían acceso a su interior [17]. Se trata de aprovechar el sistema de transporte que utilizan los sideróforos para introducir el hierro. La naturaleza ha «pensado» antes en esta posibilidad, ya que se conocen compuestos de este tipo de origen natural como son los formados por algunos antibióticos aminoglucósidos y un sideróforo con tres agrupamientos de ácido hidroxámico [18].

Entre los de origen sintético son importantes los diseñados como **quimioterápicos en infecciones producidas por *P. Aeruginosa***. En ellos se ha utilizado una pioverdina para enlazarla a un antibiótico  $\beta$ -lactámico sin perder su actividad quelante [19].

Para la formación de este enlace pueden utilizarse el grupo amino de la posición 5, el grupo amino de ornitina o el grupo guanidino de arginina (este último en el caso de las de clase I). La síntesis de estas estructuras es problemática porque requiere trabajar en medios acuosos por motivos de solubilidad y esta circunstancia limita el uso de muchos reactivos. Además, puesto que los restantes grupos funcionales de la pioverdina no

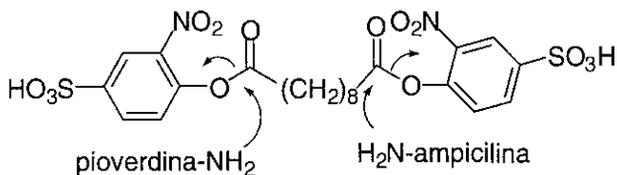
deben reaccionar, es mejor realizar el enlace con el antibiótico en el propio complejo férrico y, finalmente, el anillo  $\beta$ -lactámico es bastante lábil.

En la siguiente figura se ha representado un complejo de este tipo con ampicilina.



En esta figura podemos observar que la ampicilina se enlaza a través de un espaciador que incorpora 8 grupos metilénicos, para evitar que pierda actividad debido al impedimento estérico que ejerce el complejo pivoverdina- $\text{Fe}^{3+}$  en la aproximación de la transpeptidasa de peptidoglicano.

Para su síntesis se puede utilizar como reactivo el diéster del ácido sebácico que se indica, aprovechando la conocida capacidad de los derivados de *o*-nitrofenol como buenos salientes en reacciones de sustitución nucleófila.



Mientras que *P. aeruginosa* es insensible a ampicilina, este conjugado es muy activo siempre que la pioverdina utilizada sea de la clase que biosintetiza la cepa bacteriana en cuestión, ya que es preciso que pueda reconocerla y transportar el complejo al interior.

También se han preparado otros complejos con sideróforos sintéticos más sencillos y con otros antibióticos, como la vancomicina [20].

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Massova, I.; Mobashery, S.; «Kinship and Diversification of Bacterial Penicillin-Binding Proteins and Beta-Lactamases», *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42, 1-17.
2. Bush, K.; Jacoby, G.A.; Medeiros, A.A.; «A Functional Classification Scheme for  $\beta$ -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure»; *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39, 1211-1233.
3. Heinze-Krauss, I.; Angehrn, P.; Charnas, R.L.; Gubernator, K.; Gutknecht, E-M.; Hubschwerlen, Ch.; Kania, M.; Oefner, Ch.; Page, M.G.P.; Sogabe, S.; Specklin, J-L.; Winkler, F.; «Structure-Based Design of  $\beta$ -lactamase Inhibitors. I. Synthesis and Evaluation of Bridged Monobactams», *J. Med. Chem.*, 1998, 41, 3961-3971.
4. Coulton, S.; Francois, I.; « $\beta$ -Lactamases: Targets for drug Design»; *Progr. Med. Chem.* 1994, 31, 297-349.
5. Bone, R.; Shenvi, A.B.; Kettner, C.A.; Agard, D.A.; «Serine Protease Mechanism: Structure of an Inhibitory Complex of Alpha-Lytic Protease and a Tightly Bound Peptide Boronic Acid»; *Biochemistry*, 1987, 26, 7609-7614.
6. Kiener, P.A.; Waley, S.G. «Reversible Inhibitors of Penicillinases», *Biochem. J.* 1978, 169, 197-204.
7. Beesley, T.; Gascoyne, N.; Knott-Hunziker, V.; Petursson, S.; Waley, S.G.; Jaurin, B.; Grundstrom, T. «The Inhibition of Class C  $\beta$ -Lactamases by Boronic Acids» *Biochem. J.* 1983, 209, 229-233.

8. Weston, G.S.; Blázquez, J.; Baquero, F.; Shoichet, B.K. «Structure-Based Enhancement of Boronic Acid-Based Inhibitors of AmpC  $\beta$ -Lactamase»; *J. Med Chem.* 1998, 41, 4577-4586.
9. Lee, W.; Li, Zh-H.; Vakulenko, S.; Mobashery, Sh.; «A Light-inactivated Antibiotic», *Journal of Medicinal Chemistry*, 2000, 43, 128-132.
10. Kociński, Ph.J.; «Protecting Groups», Georg Thieme Verlag, 1994.
11. a) Kallová, J.; Bujdaková, H.; Macikková, T.; Hletková, M.; Miloovi, P.; Kettner, M. «Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* serotype 001 isolates to aminoglycoside and  $\beta$ -lactam antibiotics and mechanism of resistance», *Biología (Bratislava)*, 1996, 51, 237-242. b) Hancock, R.E.W. «Resistance mechanism in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria»; *Clinical Infection Diseases*, 1998, 27, 593-599.
12. Matagne, A.; Dubus, A.; Gelleni, M.; Frère, J.-M. «The  $\beta$ -lactamase cycle: a tale of selective pressure and bacterial ingenuity», *Nat. Prod. Rep.* 1999, 16, 1-19.
13. a) Pasteur, L.; Joubert, J., «Carbón et septicémie», *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 1877, 85, 101-115. b) Bouchard, C. «L'influence qu'exerce sur la maladie Charbonneuse l'inoculation du bacille pyrocyanique», *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 1889, 108, 713-714. c) Budzikiewicz, H. «Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads» *FEMS Microb. Rev.* 1993, 104, 209-228.
14. Xiao, R.; Kisaalite, W.S. «Iron acquisition from transferrin and lactoferrin by *P.aeruginosa* ploverdin», *Microbiology*, 1997, 143, 2509-2515.
15. a) Gessard, M.C., «Sur la fonction fluorescinogène des microbes», *Ann. Inst. Pasteur*, 1892, 12, 801-823. b) Tenitse, M.; Hossain, M.B.; Barnes, C.L.; Leong, J.; van der Helm, D., «Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting *Pseudomonas*» *Biochemistry*, 1981, 20, 6446-6457.
16. Budzikiewicz, H. «Siderophores of the human pathogenic fluorescent Pseudomonads», *Curr. Top. Med. Chem.* 2001, 1, 1-6.
17. Meyer, J.-M.; Stintzi, A.; de Vos, D.; Cornelis, P.; Tappe, R.; Taraz, K.; Budzikiewicz, H; «Use of siderophores to type pseudomonads: the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems», *Microbiology*, 1997, 143, 35-43.

18. Vértesy, L.; Aretz, W.; Fchlaber, H.-W.; Kogler, H. «Salymicin A-D, Antibiotika aus *Streptomyces violaveus*, DSM 8286, mit Siderophor-Aminoglycosid-Struktur», *Helv. Chim. Acta.* 1995, 78, 46-60.
19. Budzikiewicz, H., «Siderophore-Antibiotic Conjugates used as Trojan Horses against *Pseudomonas aeruginosa*», *Curr. Top. Med. Chem.* 2001, 1, 73-82.
20. Clarke, T.E.; Leslie, W.T.; Vogel, T. and H., «Structural Biology of Bacterial Iron Uptake Systems», *Curr. Top. Med. Chem.* 2001, 1, 7-30.

## Índice de compuestos cuya estructura se ha representado en las figuras

- Ácido clavulánico, 130  
Ácidos micólicos, 116, 123  
Alizarina, 14  
Amoxicilina, 130  
Ampicilina, 144  
Argatrobán, 78  
Arsfenamina, 16  
Atoxilo, 16  
Atropina, 38  
Aztreonam, 132
- Bacitracina A, 105, 106  
Benazepril, 70  
Biosósteros, 40
- Capecitabina, 39  
Captopril, 65, 66, 68  
Cianina, 20  
Cicloserina, 120  
Cilazapril, 70  
Cefalexina, 24  
Cefotaxima, 109  
Ceftazidima, 109  
Ciprofloxacino, 103  
Clonidina, 36
- Cloranfenicol, 101  
Clorofila, 30  
Colchicina, 24  
Cortisona, 21  
Cromokalim, 37
- Delavirdina, 79  
Diosgenina, 21
- Efagratán, 78  
Efavirenz, 80  
Enalapril, 68, 70  
Enalaprilato, 68  
Enterobactina, 143  
Eritromicina A, 98  
Espirapril, 52  
Etambutol, 120  
Etionamida, 120
- 5-Fluoruracilo, 39  
Fosinopril, 71, 72  
Fosinoprilato, 71
- GABA, 38  
Gentamicinas, 100

- Hemoglobina, 30
- Imatinib, 52
- Imidapril, 70
- Imidazol, 27
- Índigo, 14
- Indinavir, 83, 90
- Indolapril, 70
- Inogratán, 78
- Isoniazida, 120, 122
- Kanamicina, 98
- Linezolida, 115
- Lisinopril, 69
- Meticilina, 110
- NADH, 29
- Napsagratán, 78
- Nelfinavir, 83, 91
- Nevirapina, 80
- Omeprazol, 45, 47, 49
- Oxacilina, 110
- Paramomicina, 101
- Penicilamina, 66
- Penicilinas, 22
- Perindopril, 52
- Picoprazol, 45
- Pioverdinas, 140, 141, 144
- Pirazinamida, 120
- Piridina, 29
- Progesterona, 21
- Prontosil rubrum*, 17
- Propranolol, 37
- Quimostatina, 75
- Quimupristina, 114
- Quinapril, 70
- Ramipril, 70
- Rifampicina, 104
- Ritonavir, 83, 86
- Saquinavir, 83, 85, 90, 92
- Sulbactama, 130
- Tazobactama, 130
- Teicoplanina, 113
- Teprótido, 63
- Tiacetazona, 120
- Tienamicina, 129
- Timoprazol, 45
- Tobramicina, 100
- Trandolapril, 52
- Vancomicina, 111
- Zofenopril, 72
- Zofenoprilato, 72