



Università degli studi di Genova

SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE
DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea Magistrale in
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

TESI SPERIMENTALE DI LAUREA

**Progettazione e sintesi di derivati benzilidenici della 2-fenil-2,3-
diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazolo-7-carboidrazide quali
potenziali farmaci antitubercolari**

Relatore: Prof.ssa Olga Bruno

Laureando: Matteo Piovani

Anno accademico 2014/2015

Ai nonni

INDICE

1. Introduzione: La tubercolosi

<i>1.1 Eziologia</i>	Pag	1
<i>1.2 Patogenesi</i>		2
<i>1.3 Diagnosi</i>		5
<i>1.4 Epidemiologia</i>		6
1.4.1 Situazione epidemiologica mondiale		8
1.4.2 Situazione epidemiologica in Italia		13
<i>1.5 Terapia</i>		17
1.5.1 I farmaci utilizzati nella terapia		19
1.5.2 Terapia della tubercolosi attiva		20
1.5.3 Nuovi farmaci per la tubercolosi		25
<i>1.6 Tubercolosi multi ed estesamente resistente</i>		26

2. Progetto della ricerca

<i>2.1 Background della ricerca</i>	29
<i>2.2 Nuove molecole progettate</i>	33

3. Discussione

<i>3.1 Sintesi dei composti 1, 2, 3a-f</i>	35
<i>3.2 Sintesi dei derivati ammidici 4a-e</i>	41

4. Test biologici e risultati

5. Conclusioni

6. Parte sperimentale

Bibliografia

1. Introduzione: La tubercolosi

1.1 Eziologia

La tubercolosi è una patologia infettiva, spesso contagiosa, causata dal *Mycobacterium tuberculosis*.(1).

Le caratteristiche del micobatterio e le risposte dell'organismo rendono la tubercolosi una malattia peculiare tra tutte quelle infettive con una estrema varietà di quadri clinici, anatomopatologici e radiologici.

Il *Mycobacterium tuberculosis* fu individuato da Robert Koch come responsabile della malattia nel 1882 e da allora è stato definito bacillo di Koch. I patogeni per l'uomo sono le varietà *hominis*, *bovis* e *africanum*, definiti *tipici* per le loro caratteristiche di crescita e raggruppati nel cosiddetto "*M. tuberculosis complex*".

I *Micobatteri atipici*, patogeni in determinate condizioni di immunodepressione, formano delle colonie atipiche ossia a rapida crescita, insensibili o sensibili alla luce. Tra questi va ricordati il *Mycobacterium avium intracellulare complex* il quale colpisce principalmente pazienti con AIDS e determina un quadro clinico a decorso grave con forme sistemiche.(2)

Il *bacillo di Koch* è un bacillo aerobio a 37 °C e a crescita molto lenta (la scissione semplice avviene in 24 ore), resistente al calore ma non alla luce solare.(2)

Essendo un gram positivo alla colorazione di Ziehl-Nielsen appare di colore rosso su sfondo azzurro: la spessa parete del bacillo non viene danneggiata dal trattamento con acido solforico ed alcol etilico e pertanto trattiene il colore viola al suo interno.(1)

La parete cellulare gioca un ruolo fondamentale nella crescita e nella sopravvivenza del *M. tuberculosis*, infatti molti dei farmaci utilizzati mirano a inibirne la sua biosintesi. Essa è molto complessa: ha un elevato spessore (oltre 20 nm) ed è separata dalla membrana plasmatica per mezzo di uno spazio periplasmatico di circa 10 nm. Più del 30% del suo peso secco è determinato da lipidi.(3)

Nella parete cellulare si identificano due parti: inferiore e superiore.

La porzione inferiore, ovvero la più interna, è costituita dal peptidoglicano

legato covalentemente all'arabinogalattano, il quale è a sua volta legato agli acidi micolici. Ciò determina il cosiddetto "core" ossia il complesso micol-arabinogalattan-peptidoglicano (mAGP).(4)

Il peptidoglicano è caratterizzato dall'alternanza di unità di N-acetilglucosamina (GlcNAc) con unità di acido N-acetil muramico.

Gli acidi micolici rappresentano le molecole peculiari dei micobatteri: sono acidi grassi ramificati in posizione α e con un ossidrilico in posizione β e hanno grandi dimensioni (70-90 atomi di carbonio).

Il *M. tuberculosis* produce tre tipi di acido micolico, i quali differiscono soprattutto per la presenza e la natura dei sostituenti contenenti ossigeno nella porzione distale del ramo meromicolato. Gli acidi micolici sono orientati perpendicolarmente al piano della membrana e formano una barriera lipidica speciale responsabile di molti aspetti della fisiologia e della patogenicità di *M. tuberculosis*.(4)

La porzione superiore della parete cellulare, ovvero quella esterna, è costituita invece da lipidi liberi polari ed apolari: sono molecole legate non covalentemente e con un profilo di distribuzione sulla superficie cellulare ceppo dipendente.

All'interno della parete cellulare è possibile riconoscere anche piccole proteine, dette tubercoline, e lipidi come il lipidoarabinomannano (LAM) responsabili della virulenza e della immuno-patogenicità del micobatterio.(4)

1.2 Patogenesi

La via di infezione da *M. tuberculosis* più frequente è quella aerogena per inalazione di goccioline bacillifere o pulviscolo in cui sono presenti bacilli tubercolari i quali possono giungere alle più fini diramazioni bronchiali. Altre vie come quella enterica (causata dal *M. bovis*), quella cutanea e genitale sono assai più rare e responsabili di forme cliniche particolari.(1,2)

L'interazione tra *M. tuberculosis* e l'ospite umano inizia nel momento in cui vengono inalati i nuclei di goccioline infette contenenti i microrganismi. La maggior parte di essi viene trattenuta ed eliminata dalla clearance muco ciliare respiratoria e pertanto solo una frazione pari al 10% del totale raggiunge gli

alveoli. A tale livello macrofagi alveolari, non specificatamente attivati, fagocitano i bacilli. A questo stadio l'attività batteriostatica macrofagica è minima. L'equilibrio che si stabilisce tra la funzione macrofagica e la virulenza dei micobatteri è correlata sia alla composizione della parete cellulare, ricca di lipidi, sia alla capsula glicolipidica, che conferiscono resistenza al complemento e ai radicali liberi del fagocita. Le possibili evoluzioni sono due: i macrofagi limitano la moltiplicazione bacillare, oppure questi proliferano lisando i macrofagi. In tal caso la replicazione dei bacilli intracellulari procede per settimane sia nel focus alveolare sia a livello di foci metastatici linfo-ematogeni.

L'organismo ospite fronteggia l'infezione tubercolare attraverso lo sviluppo di due tipi di reazioni immunitarie, dalla cui interazione dipende la storia naturale dell'infezione e della malattia tubercolare: l'ipersensibilità di tipo ritardato e la reazione immunitaria cellulo-mediata attivante i macrofagi.(1)

L'ipersensibilità di tipo ritardato è un processo rapido e lesivo per l'organismo che determina la distruzione dei macrofagi non attivati contenenti bacilli proliferanti. Tale reazione, apparentemente svantaggiosa, costituisce in realtà una modalità potente di controllo della moltiplicazione dei micobatteri che nel citoplasma macrofagico presentano una crescita logaritmica. Il risultato della reazione è la formazione locale di un focolaio di necrosi caseosa al centro del granuloma tubercolare, costituito dall'esterno verso l'interno da linfociti, macrofagi, cellule epitelioidee dette di Langhans. Il *caseum* costituisce un ambiente sfavorevole per la crescita dei micobatteri a seguito della bassa tensione di ossigeno. L'evoluzione del focolaio caseoso è variabile in quanto può subire una trasformazione fibrotica e calcifica, oppure può andare incontro ad una trasformazione estremamente sfavorevole per l'ospite: la colliquazione che ripristina le condizioni ottimali per una ripresa della crescita microbica per l'aumento della tensione di ossigeno.(1,2)

La ***risposta cellulo-mediata*** rappresenta il momento patogenetico più importante nell'ambito della storia naturale dell'infezione. Consiste in un processo di attivazione dei macrofagi i quali acquisiscono piena competenza nell'espletare con la massima efficienza la loro attività battericida nei confronti

dei bacilli fagocitati. La reazione è antigene specifica e richiede il fondamentale intervento dei linfociti T helper. I macrofagi processano e presentano gli antigeni micobatterici esponendoli ai linfociti T. L'interazione comporta in sequenza l'attivazione, la proliferazione clonale dei linfociti T e la secrezione di un ampio spettro di linfocine le quali intervengono nel processo di attivazione macrofagica, in seguito al quale aumenta la concentrazione di enzimi litici e di metaboliti intermedi che aumentano l'attività di killing intracellulare dei monociti.(1,2)

L'evoluzione dell'infezione è pertanto variabile in ogni individuo, ed anche in diversi momenti nello stesso individuo, in rapporto al bacillo di Koch (carica e virulenza) ed alla resistenza dell'organismo infettato.

È ormai assodato che il sistema immunitario gioca un ruolo chiave nello sviluppo della malattia.(1,2)

La tubercolosi viene suddivisa in primaria e post-primaria.

Nella **tubercolosi primaria** l'impianto del micobatterio avviene in un organismo vergine e, nella maggioranza dei casi nel polmone, con la formazione del complesso primario, detto anche *tubercolo*. I macrofagi circondano e fagocitano i bacilli trasformandosi in cellule istiocitarie epitelioidi, che determinano la formazione di *granulomi caseosi*. Intorno i linfociti si addossano ai macrofagi e per ultimo avviene la reazione fibroblastica che tenta di isolare la zona. Al centro si forma pertanto un'area di necrosi.

Questo tipo di meccanismo attuato dal nostro organismo va considerato come un meccanismo di difesa: infatti la scarsa ossigenazione del focolaio caseoso ostacola e quindi arresta la moltiplicazione dei microrganismi, che alla fine soccombono. Nella maggior parte dei casi il complesso primario evolve verso la fibrosi, spesso seguita da calcificazioni radiograficamente visibili, e quindi verso la guarigione spontanea. Dal punto di vista clinico nella maggior parte dei casi decorre in forma asintomatica (silente) o pauci-sintomatica (lieve astenia, febbricola e tosse).(1,2)

Tuttavia nel 10% dei pazienti è possibile, in due differenti modi, l'evoluzione come **tubercolosi post-primaria**. Essa può essere dovuta a riattivazione

endogena oppure a reinfezione (esogena) con manifestazioni polmonari o extrapolmonari.

Nel primo caso si ha riattivazione di batteri quiescenti, circoscritti all'interno del complesso primario, e la loro diffusione per via endo-canalicolare. Nell'altro si ha la colliquazione del caseum, con drenaggio nei bronchi o nei vasi sanguigni, con conseguente disseminazione a distanza ed eliminazione del micobatterio all'esterno con rischio elevato di contagio. Questo secondo caso, più raro in Italia, è molto rappresentato nei paesi ad alta endemia.

Lo spettro di manifestazioni sintomatiche della TB post-primaria abbraccia diversi quadri clinici, il più rappresentativo dei quali è la tubercolosi miliare, una vera e propria sepsi tubercolare.(1,2)

1.3 Diagnosi

E' importante sottolineare che la diagnosi di certezza si basa sull'isolamento in coltura di *M. tuberculosis*, che ad oggi rappresenta ancora il punto fondamentale nell'iter diagnostico della tubercolosi.(2)

La diagnosi di tubercolosi si basa essenzialmente su tre criteri: microbiologici, radiologici e immunologici.

Per quanto riguarda quelli microbiologici si evidenzia l'agente patogeno su campioni biologici (escreato, liquido pleurico, urine, feci, prelievi istologici) mediante un esame batterioscopico diretto, che sfrutta la colorazione di Ziehl-Nielsen, oppure tramite l'esame colturale, effettuando una insemminazione del campione su opportuni terreni di crescita. (1,2)

La radiologia convenzionale, nonostante l'avvento della TAC e delle altre tecniche di diagnostica per immagini, resta il principale strumento di diagnosi e anche di classificazione delle varie forme cliniche di tubercolosi.(2)

Molto utilizzati sono i test cutanei tubercolinici (TST, Tuberculin Skin Test) i quali consistono nell'impiego di sostanze (tubercoline) costituite da antigeni batterici e hanno una notevole importanza sia nel campo diagnostico che in quello epidemiologico, ad esempio per rilevare l'entità dell'endemia tubercolare

in una determinata popolazione.

Il meccanismo che si sfrutta implica una reazione ritardata di IV tipo e valuta, dopo inoculo nel derma, l'avvenuta sensibilizzazione al bacillo di Koch. La sua positività indica che l'organismo è già venuto in contatto col bacillo e quindi è in grado di sviluppare una risposta immunitaria specifica. Quindi non è diagnostico di malattia in atto, ma solo di pregressa infezione o di avvenuta vaccinazione. Si utilizza per l'inoculo la PPD (purified protein derivative), una miscela di antigeni micobatterici; una unità tubercolinica (UT) corrisponde a 0.02 mcg di PPD. Il test alla tubercolina si può effettuare:

- con dispositivi già pronti (tine test), costituiti da 4 punte imbevute di PPD
- mediante inoculazione intradermica di 0.1 mL di PPD (reazione di Mantoux)

Il risultato si legge dopo 48-72 ore; la positività è documentata da eritema, papule, infiltrazione, indurimento.(5)

1.4 Epidemiologia

La tubercolosi è un'infezione molto antica, presente nella storia dell'uomo fin dai suoi albori. Lo sviluppo di città sovraffollate e una diffusa povertà determinarono le condizioni ideali per lo sviluppo endemico della tubercolosi la quale a partire dal 1600 e per i successivi 200 anni, causò circa il 25% delle morti in Europa e le valse l'appellativo di "great white plague"^a

Con il miglioramento delle condizioni igieniche, sanitarie ed economiche della popolazione, disponibilità terapeutiche efficaci ed una adeguata profilassi, a partire dai primi anni del 900 l'incidenza della malattia è progressivamente diminuita.(6)

Da alcuni anni, tuttavia, il numero dei casi risulta in progressivo aumento in alcuni Paesi, soprattutto negli Stati Uniti, ma anche in Europa, in concomitanza con il diffondersi dell'infezione da HIV, a causa dell'immunodepressione che ne consegue.

^a Dubos R, Dubos E: The White Plague. Boston, Little, Brown, 1952

L'HIV e l'AIDS hanno abbreviato il decorso della tubercolosi, aumentando considerevolmente la sua mortalità.(7)

La stretta correlazione tra HIV e tubercolosi è fondata sui seguenti fattori:(7)

- l'infezione da HIV aumenta il rischio di sviluppare la malattia tubercolare in persone con un'infezione latente da *M. tuberculosis*;
- l'infezione da HIV accelera la velocità di progressione della malattia tubercolare nelle persone che hanno recentemente contratto l'infezione da *M. tuberculosis*;
- l'infezione da HIV è associata a focolai di forme multiresistenti di tubercolosi, cioè resistenti almeno ad isoniazide e rifampicina, in ospedali e carceri;
- una persona immunodepressa infettata con *M. tuberculosis* ha un rischio di sviluppare la malattia tubercolare con una percentuale di rischio del 10% nel corso della vita. Questo rischio aumenta del 7-10% per anno nelle persone con infezione da HIV;
- nelle persone con infezione da HIV, la mancanza di specifici reperti clinici normalmente utilizzati per la diagnosi, positività al test cutaneo con la tubercolina e quadri patologici alla radiografia del torace, rende la diagnosi di tubercolosi più difficile. Il conseguente ritardo nella diagnosi e la mancanza di isolamento dei malati contribuiscono alla diffusione del *M. tuberculosis*.

Per valutare l'andamento epidemiologico tubercolare di norma si fa ricorso a tre parametri: l'incidenza ovvero il numero di nuovi casi in un anno, la prevalenza, definita come il numero di casi presenti in un dato anno, e la mortalità ossia il numero di morti di TBC riferiti ad un anno.(8)

Il numero dei nuovi casi di tubercolosi è da sempre correlato con le condizioni economiche. La più alta prevalenza di TB si registra, infatti, nelle regioni con il PIL più basso, quali l'Africa, l'Asia e l'America Latina. Nonostante le nazioni europee possiedano tassi di incidenza assai minori rispetto ai paesi di cui sopra, la tubercolosi rimane uno dei principali problemi di Salute Pubblica. In molti stati dell'Europa Occidentale, la tubercolosi è spesso imputabile ai migranti e il numero totale di stranieri con tubercolosi attiva supera

il numero dei casi di tubercolosi nella popolazione indigena. Fra le cause principali vi sono l'elevata prevalenza fra conviventi, un più alto tasso di co-infezione con HIV e condizioni di vita più disagiate in abitazioni sovraffollate. Misure di controllo e prevenzione focalizzate su questo gruppo a rischio stanno assumendo una sempre maggiore importanza nelle nazioni industrializzate a bassa prevalenza.(9)

Tutte le più aggiornate informazioni relative allo stato epidemiologico mondiale dell'infezione tubercolare sono presenti all'interno del WHO Report 2014 – Global Tuberculosis Control, il quale raccoglie i dati provenienti da 198 Stati e regioni su un totale di 216.

1.4.1 Situazione epidemiologica mondiale

Nel 1993 il *World Health Organization* dichiarò la tubercolosi un'emergenza globale di Sanità Pubblica; si stimavano circa 7–8 milioni di casi e 1,3–1,6 milioni di morti ogni anno nel mondo.

Nel 2013 sono stati stimati nel mondo 9 milioni di nuovi casi di TBC equivalenti a 126 casi ogni 100.000 abitanti.

La maggior parte di nuovi casi di TBC è presente in Asia (56%) ed in Africa (29%) mentre in Europa ed in America le percentuali di nuovi casi sono rispettivamente del 4% e del 3%.

Sono stati identificati 22 Paesi ad elevata incidenza (High-Burden Countries), i quali da soli aggregano l'82% di tutti i casi dell'anno 2013: Afghanistan, Bangladesh, Brasile, Cambogia, Cina, Repubblica Democratica del Congo, Etiopia, India, Indonesia, Kenya, Mozambico, Birmania, Nigeria, Pakistan, Filippine, Federazione Russa, Sud Africa, Tanzania, Thailandia, Uganda, Vietnam e Zimbabwe.(8)

I paesi con il più alto tasso di incidenza nel 2013 sono 6: India (2-2,3 milioni), Cina (0,9-1,1 milioni), Nigeria (340-880 mila), Pakistan (370-650 mila) Indonesia (410-520mila) e Sud Africa (410-520 mila) .

Possiamo dire che l'India e la Cina coprono rispettivamente il 24% e l'11% dei casi globali. (8)

L'incidenza media di nuovi casi di tubercolosi (figura 1) varia a seconda delle nazioni. Il tasso minore è stato calcolato in Canada, USA, Giappone, Australia, Nuova Zelanda e Europa dell'Ovest dove i nuovi casi sono inferiori a 10 ogni 100 mila abitanti nell'arco di un anno.

La maggior parte delle regioni del Sud America hanno una incidenza media al di sotto di 50 nuovi casi ogni 100mila abitanti.

Le regioni a più alto rischio presentano un tasso medio di incidenza superiore a 150-300 casi ogni 100 mila abitanti.(8)

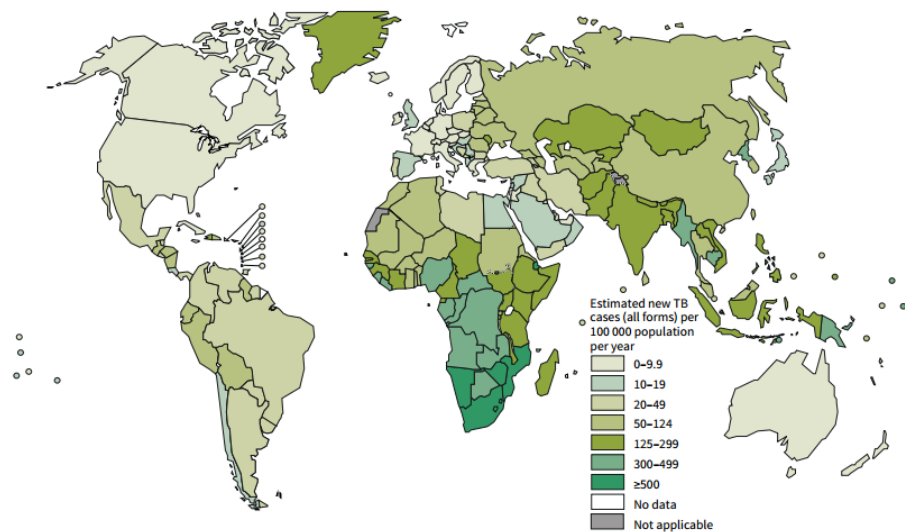


Figura 1. Tasso di incidenza mondiale di nuovi casi di TBC nel 2013 (WHO, Global Tuberculosis Report 2014)

E' importante sottolineare che, tra i 9 milioni di casi registrati nel 2013, 1-1,2 milioni sono pazienti affetti da HIV (13%).

La più alta incidenza di casi co-affetti da TBC e HIV (stimati al 34%) è stata rilevata in Africa e il 50% di essi sono presenti in Sud Africa (figura 2). (8)

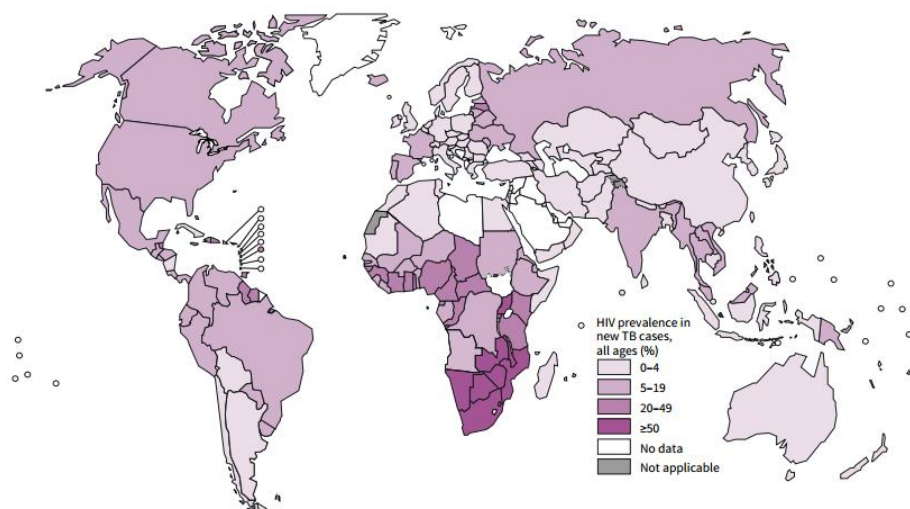


Figura 2. Tasso di incidenza di nuovi casi di TBC co-affetti da HIV nel 2013 (WHO, Global Tuberculosis Report 2014)

Il trend di incidenza dell'infezione tubercolare è sceso gradualmente dal 1990 al 1997 in tutte le regioni OMS (Figura 3), per poi risalire nel 2001, quando l'epidemia da HIV raggiungeva il suo picco in Africa.

Dal 2002 il numero di nuovi casi si è ridotto di circa 1,5% l'anno. Anche la prevalenza è in diminuzione dal 1990, ed in modo più rapido dal 1997 (Figura 4).

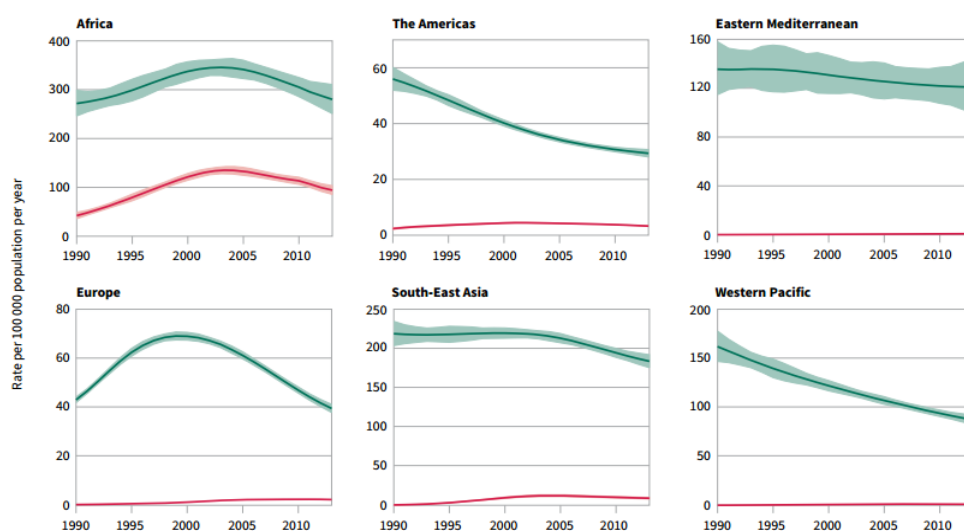


Figura 3 Tasso di incidenza di nuovi casi di TBC (linea verde) e nuovi casi di TBC co-infetti da HIV (linea rossa) nei paesi del WHO, 2013 (WHO, Global Tuberculosis Report 2014)

Se questo andamento dovesse essere confermato, i target stabiliti dai Millenium Development Goals, che si propongono di arrestare e invertire il trend di incidenza, prevalenza e mortalità, potrebbero essere conseguiti entro il 2015.(8)

La situazione globale rispetto ai tassi di incidenza di tubercolosi multi-farmaco-resistente (MDR) è poco chiara, principalmente a causa della mancanza di dati rappresentativi di ampi territori, quali, ad esempio, l'India e svariati stati africani, che non possiedono adeguati programmi di sorveglianza.

Per tubercolosi MDR si intende la tubercolosi provocata da ceppi di *M. tuberculosis* resistenti almeno ad isoniazide e rifampicina. Sono considerati "extensively drug-resistant" (XDR) quei ceppi MDR resistenti anche ai fluorochinoloni oltre che ad almeno un antibiotico di seconda linea, amikacina, kanamicina o capreomicina. La proporzione globale di casi multiresistenti sul totale delle nuove diagnosi di tubercolosi fra il 1994 e il 2013 è di circa 3,4%; se si considerano tutti i casi precedentemente trattati tale proporzione risulta del 19,8%. In entrambi i casi si evidenzia un'ampia variabilità geografica. Nel 2013 sono stati stimati 650.000 casi MDR in tutto il mondo.

I dati disponibili confermano che l'Europa dell'est e l'Asia centrale continuano ad avere la maggiore percentuale di tubercolosi MDR nel periodo 2007-2013.

Il tasso stimato di notifiche dei ceppi MDR è in aumento in nazioni come Botswana, Perù e Repubblica della Corea, mentre è stazionario in Estonia, Lettonia e Stati Uniti. In altre regioni è sostanzialmente stazionario, come in Russia.

Globalmente fra i ceppi di tubercolosi MDR, la percentuale di ceppi XDR è del 9,4%.(8)

E' stato stimato che dal 2000 al 2013 la diagnostica e i trattamenti per la TBC hanno salvato 37 milioni di vite e ciò ha permesso di ottenere una riduzione della mortalità pari al 45% (Figura 4).

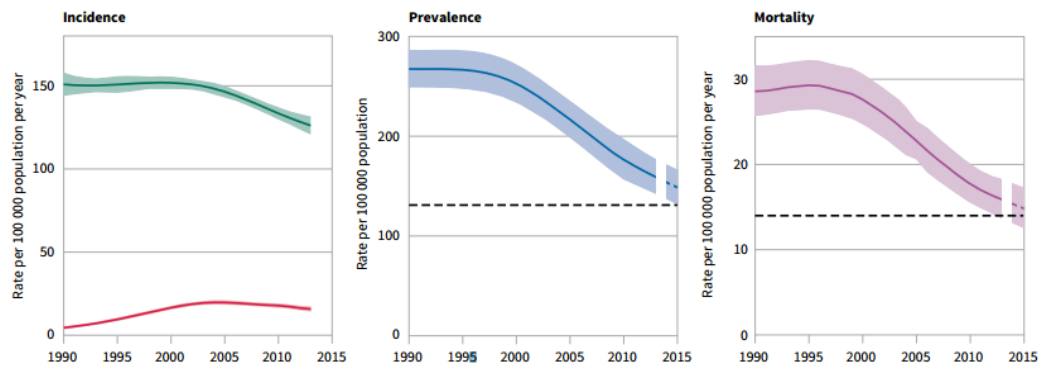


Figura 4: trend globale dei casi di TBC riferiti a incidenza, prevalenza e mortalità, 2013 (WHO, Global Tuberculosis Report 2014)

Nel 2013 sono stati stimati 1.5 milioni di morti di TBC, tra questi 500.000 erano affetti anche da HIV.

Approssimativamente, il 78% delle morti di TBC ed il 73% delle morti di TBC co-affette da HIV avvengono in Africa e in alcune regioni asiatiche con India e Nigeria che coprono circa un terzo delle morti globali per TBC.

Come si può vedere dalla figura 5, la mortalità nel mondo varia da nazione a nazione: si passa da un caso di morte ogni 100.000 abitanti infetti (Europa, Canada, USA, Australia) a oltre 40 morti ogni 100.000 persone infette (Africa, Bangladesh, Cambogia, Miamar, Afghanistan e Pakistan).(8)

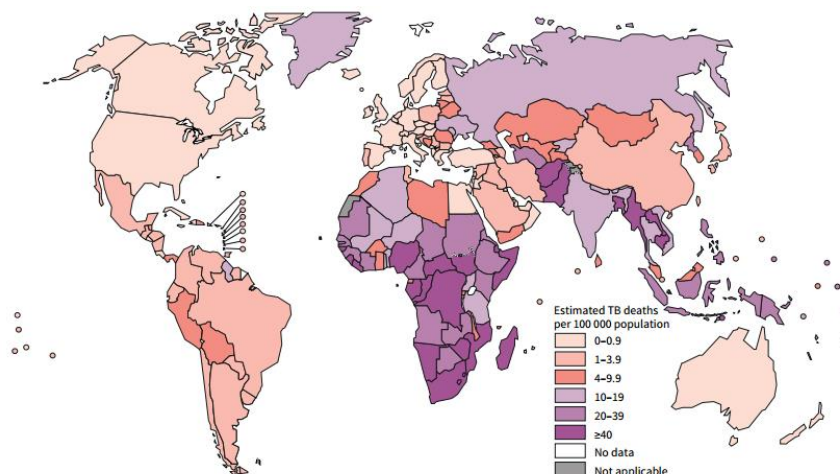


Figura 5: tasso di mortalità, 2013 (WHO, Global Tuberculosis Report 2014)

1.4.2 Situazione epidemiologica in Italia

In Italia sono presenti notevoli differenze tra Regioni sia nei tassi grezzi di incidenza totale sia nei tassi disaggregati per classi di età e nazionalità, che riflettono da una parte la differenza a livello territoriale delle caratteristiche della popolazione suscettibile, e dall'altra una diversa sensibilità e scarsa considerazione del problema da parte dei servizi e degli operatori sanitari, con conseguente sottonotifica di casi o possibile selettività nei confronti di specifiche fasce di popolazione.

Le fasce di popolazione maggiormente coinvolte sono quella di età più avanzata e la straniera in generale.

La popolazione anziana risulta a maggior rischio di riattivazione di infezioni latenti rispetto alla popolazione generale, a causa dell'aumentata suscettibilità connessa al progressivo peggioramento delle condizioni generali (fisiche, sociali e psicologiche) e del sistema immunitario, determinato dal processo di invecchiamento. Tali condizioni predispongono, inoltre, a maggiore severità e letalità della malattia tubercolare.

La particolare condizione di immigrato determina un incremento del rischio di sviluppare la TBC, sia per i maggiori tassi di incidenza nei Paesi di origine, che per le particolari condizioni di fragilità sociale e di complessità legate al processo migratorio e alla multiculturalità, i quali influiscono notevolmente sui percorsi di prevenzione, diagnosi e cura. A differenza della popolazione generale, la popolazione immigrata risulta a maggiore rischio di infezione da *M. tuberculosis* multiresistente con maggiore frequenza di esiti sfavorevoli del trattamento.

Nel decennio 1999-2008 i tassi di incidenza di tubercolosi sono stati stabili e inferiori ai 10 casi per 100.000 abitanti, valore che pone l'Italia al di sotto della soglia per essere considerato un paese a bassa prevalenza ed è quindi tra quelli a cui l'Organizzazione Mondiale della Sanità non fornisce assistenza prioritaria nella lotta alla tubercolosi (9,10).

Nel 2008 sono stati notificati 4.418 casi di tubercolosi in 19 Regioni e 2 Province autonome (P.A. Bolzano e P.A. Trento), con una diminuzione del 2,4% dei casi rispetto al 2007. Questi dati confermano l'andamento in discesa

osservabile dal 1995 (nel periodo 1995 - 2006 il decremento è stato superiore al 20%).

Il trend decennale mostra un leggero aumento dell'incidenza nel Nord Italia, incidenza media pari a 10,2/100.000 abitanti, una sostanziale stabilità al Centro, 9,5/100.000 ed una riduzione nel Sud e nelle isole, circa 3,5/100.000.

Nel 2008 Lombardia, Lazio, Veneto, Emilia Romagna e Piemonte hanno notificato da sole più del 70% dei casi totali di tubercolosi. Il tasso di incidenza più elevato si è riscontrato in Lombardia con oltre 13 casi/100.000 abitanti. L'analisi per Provincia di notifica evidenzia come un quarto dei casi sia stato notificato a Roma e a Milano.

Nel periodo 1999-2008 per tutte le forme di tubercolosi la classe di età che presenta l'incidenza più elevata è quella anziana. Tuttavia, nel decennio l'incidenza in questa classe è andata via via diminuendo passando dai circa 14 casi per 100.000 ultra-sessantacinquenni nel 1999 a 8 casi per 100.000 nel 2008, a fronte di un costante aumento del numero di casi di tubercolosi tra i giovani. Infatti nella classe di età 15-24 anni nel 2008 l'incidenza è risultata aumentata del 40% rispetto al 1999, pari a 9 casi/100.000 giovani. Nella fascia 0-14 anni l'incidenza è rimasta stabile (Figura 7).(9)

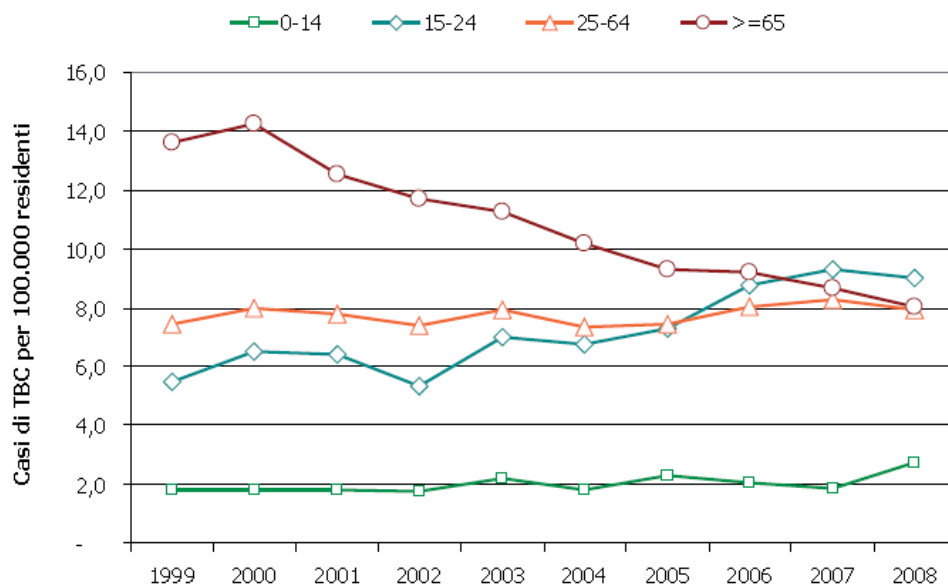


Figura 6: Tassi di incidenza di tubercolosi per classi di età dal 1999 al 2008. (La Tubercolosi in Italia, Rapporto 2008, Istituto Superiore di Sanità)

Negli ultimi 50 anni il trend di incidenza della malattia è risultato diverso per sede anatomica: la tubercolosi polmonare, in netta e decisa diminuzione fino agli anni '80, è divenuta successivamente relativamente stabile, con tassi annuali intorno a 6/100.000. Viceversa, mentre prima degli anni '80 non si osservavano variazioni di rilievo nell'incidenza di tubercolosi extra-polmonare, oscillando intorno a valori pari a 0,4-0,5 casi per 100.000 abitanti, nel periodo successivo l'incidenza è aumentata progressivamente fino a raggiungere più di 2 casi per 100.000 all'anno, con tassi di aumento annuale intorno all'8-12% a seconda del quinquennio considerato fino al 1995.

Nell'ultimo decennio il tasso sembra essersi stabilizzato. L'interessamento polmonare costituisce, comunque, la maggior parte dei casi segnalati, circa il 74%, mentre i casi di tubercolosi extrapolmonare rappresentano, al 2008, circa un quarto del totale.

L'attuale situazione epidemiologica italiana riflette la presenza di gruppi ad alto rischio, come immigrati e sieropositivi per HIV, i quali concentrano un numero a poco a poco più alto di notifiche.(9)

Dal 1999 al 2008 i casi di tubercolosi registrati in "cittadini nati all'estero" hanno rappresentato, nel complesso, il 36,5% del totale dei casi notificati in Italia con un costante aumento di tale proporzione, dal 22% del 1999 al 46% nel 2008.

Utilizzando come denominatore le stime del totale degli stranieri in Italia e per singola Regione al 31 dicembre 2007, si evidenziano tassi di incidenza di tubercolosi negli stranieri molto elevati in gran parte delle Regioni con intervalli di confidenza molto variabili in relazione alla numerosità della popolazione immigrata. In particolare, in Lazio, Lombardia e Veneto l'intervallo di confidenza inferiore delle stime di incidenza si colloca al di sopra di 50 casi per 100.000 immigrati.

Anche tra i cittadini nati all'estero i casi di TBC nei maschi sono la maggioranza, circa il 60%. La distribuzione dei casi notificati per classi di età e nazionalità evidenzia che il maggior numero di casi tra le persone nate all'estero si verifica nelle classi di età intermedie, con picco nella classe 25-34 anni, peraltro la più rappresentata fra i cittadini non italiani presenti nel Paese. Nel 2008 sia per la classe d'età 25-64 che per quella 15-24 anni, il numero di casi di

TBC negli stranieri era superiore a quello negli italiani.(Figura 7)

Per la classe di 65 anni e oltre, più del 90% dei casi notificati riguarda la popolazione italiana.(9)

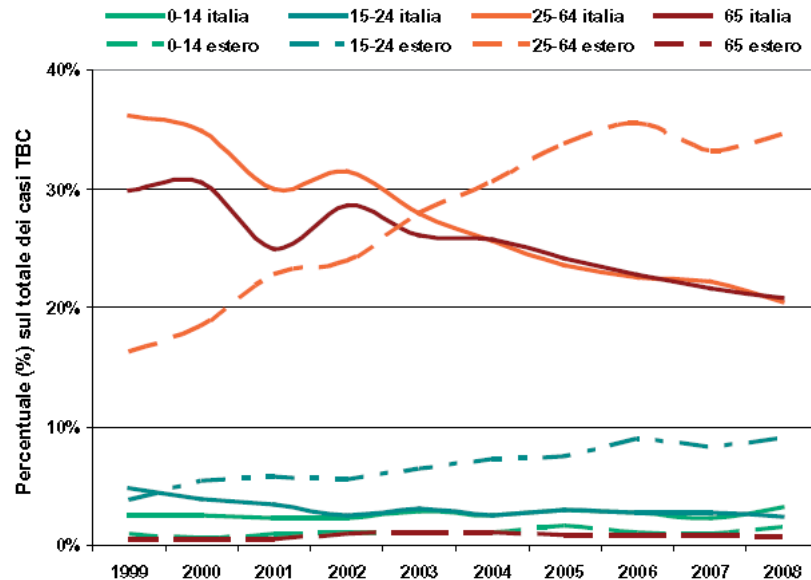


Figura 7: Percentuale casi TBC per classi di età e nazionalità sul totale dei casi TBC dal 1999 al 2008 (La Tubercolosi in Italia, Rapporto 2008, Istituto Superiore di Sanità)

Tra i cittadini nati all'estero, il continente di provenienza prevalente risulta essere l'Africa, con circa il 35% dei casi segnalati nell'intero decennio. Seguono l'Europa e l'Asia. Nell'ultimo decennio, nonostante il numero dei casi sia in sostanziale aumento per tutti i continenti di provenienza, la proporzione di casi in cittadini africani è progressivamente diminuita, mentre la proporzione in cittadini europei è in costante aumento. Nel 2008, tra le nazionalità con maggior numero di casi di tubercolosi spicca la Romania con 505 casi, seguita da Marocco, Senegal, Perù, Pakistan e India.

La proporzione di casi per sesso varia da nazionalità a nazionalità. In genere sono più numerosi i casi in persone di sesso maschile, con eccezioni in alcune nazionalità (es. Perù). Tale variabilità nel numero assoluto dei casi dipende chiaramente anche dalla composizione della popolazione residente.

Alcune nazionalità sembrano essere a particolare rischio con tassi maggiori o intorno a 100 casi per 100.000 residenti: il Corno d'Africa (Etiopia, Eritrea, Somalia, Gibuti), Senegal, Sudan, Costa d'Avorio, Nigeria, Perù, Bolivia, India, Pakistan e Bangladesh.(9)

Considerando il periodo 2004–2007 la percentuale di tubercolosi mono e multi-farmacoresistente si è mantenuta abbastanza stabile oscillando complessivamente tra il 10% e il 12% dei casi, mentre nel 2008 tale valore è stato superiore al 14% dei casi di tubercolosi. Per quanto riguarda la tubercolosi multi-farmacoresistente (MDR) i valori oscillano tra 3% e il 4% del totale dei ceppi/paziente analizzati. Dalle stime effettuate, se per i casi di tubercolosi precedentemente trattati i trend ipotizzati sono controversi ma tendenzialmente in diminuzione, per i nuovi casi il trend di MDR sembra essere comunque in aumento, soprattutto fra i pazienti di origine straniera.

Dal 1993 al 2008, mentre il numero totale di casi di AIDS è notevolmente diminuito per l'introduzione delle terapie antiretrovirali, in proporzione la percentuale di casi di AIDS diagnosticati per insorgenza di tubercolosi è aumentata fino a raggiungere il 10% del totale dei casi di AIDS. In Lombardia e nel Lazio si concentra oltre il 38% dei casi totali di TBC/AIDS notificati nel periodo dal 1999 al 2008. Tra gli immigrati, specialmente provenienti dall'Africa, i tassi di coinfezione sono maggiori che tra gli italiani.

In Italia, pertanto, la facilità all'accesso e l'efficacia della terapia antitubercolare ha consentito di ottenere, negli ultimi 50 anni, una drastica riduzione della mortalità per infezione da *M. tuberculosis*, la quale nel 2006 si attesta a 0,7 per 100.000.(9)

1.5 Terapia

La tubercolosi costituisce tuttora un rilevante problema di Sanità Pubblica, per il cui controllo è necessario un intervento organico di riduzione della diffusione della malattia nella popolazione. Le misure individuate dalle linee guida proposte dal Ministero della Salute, anche attraverso interventi individuali, concorrono complessivamente ad un obiettivo di salute collettiva. (12)

Le principali attività necessarie per realizzare il controllo della tubercolosi sono:

- 1) Il trattamento farmacologico e la gestione degli ammalati con tubercolosi attiva.
- 2) L'identificazione, la sorveglianza e il trattamento preventivo dei gruppi ad alto rischio:

- a) contatti di un caso di tubercolosi;
 - b) persone con infezione da HIV;
 - c) altri gruppi a rischio.
- 3) La vaccinazione con bacillo di Calmette-Guérin (BCG)
- 4) La sorveglianza epidemiologica e la valutazione dei programmi di controllo.

L'inizio del trattamento della tubercolosi coincide con la scoperta nel 1944 dell'efficacia della streptomina, seguita nel 1952 dall'isoniazide e della rifampicina negli anni Settanta (11): nacque così la cosiddetta "short course therapy", che ha profondamente trasformato la prognosi e l'evoluzione della tubercolosi. Nel 1993 fu riconosciuto che la short course therapy per la tubercolosi possedeva un ottimo rapporto costo-beneficio. Grazie a ciò, l'Organizzazione Mondiale della Sanità formulò e promosse la strategia DOTS (Directly Observed Therapy, Short-course), un nuovo approccio i cui risultati furono davvero incoraggianti: si stima che alla fine del 2004 più di 20 milioni di persone nel mondo erano state trattate all'interno di questo programma e 16 milioni erano state guarite. I punti nevralgici e innovativi sono: (13,14)

- l'impegno da parte dei governi nel sostenere le attività di controllo della patologia;
- l'identificazione dei casi mediante analisi microscopica diretta degli escreti nei pazienti sintomatici;
- l'applicazione di un regime di trattamento standard (6 o 9 mesi), per almeno tutti i casi positivi all'esame microscopico diretto dell'escreto, con osservazione diretta dell'assunzione dei farmaci prescritti per i primi due mesi di terapia;
- una regolare ed ininterrotta somministrazione dei farmaci anti-TB essenziali;
- la presenza di un sistema di raccolta dati e registrazione che permetta di valutare gli esiti dei trattamenti e quindi l'efficacia globale del programma di controllo.

Nonostante negli ultimi dieci anni si sia riuscito a controllare la diffusione della tubercolosi grazie alla DOTS, vi sono ancora delle problematiche soprattutto nei paesi del terzo mondo (MDR e la diffusione dell'HIV). Pertanto nel 2005 è stata stesa la STOP TB strategy, che mira ad un mondo senza malati di tubercolosi ("a world free of TB") e si articola in sei punti fondamentali (13):

- garantire l'espansione ed il miglioramento dei programmi DOTS (aumento dei finanziamenti, diagnosi dei casi mediante strumenti di alta qualità, trattamenti standardizzati, favorire l'accesso alle cure);
- prestare attenzione alla coesistenza TB/HIV ed allo sviluppo di farmacoresistenza;
- rafforzare i sistemi sanitari;
- coinvolgere tutti coloro che operano in campo sanitario (sia strutture pubbliche che strutture private);
- dare voce e sostenere i malati e le loro comunità;
- promuovere la ricerca

1.5.1 I farmaci utilizzati nella terapia

I farmaci antitubercolari attualmente impiegati vengono suddivisi in farmaci di prima e seconda scelta a seconda dell'efficacia e della tossicità

Quelli di prima scelta costituiscono la prima linea terapeutica e sono:

- isoniazide (INH), caratterizzata da una attività battericida nei confronti dei batteri in replicazione e batteriostatica verso i batteri quiescenti;
- rifampicina (RMP) dotata di potente attività battericida;
- etambutolo (EMB) batteriostatico,
- pirazinamide (PZN) con attività battericida sui bacilli tubercolari intracellulari;
- streptomina (SM) attiva contro i bacilli in rapida replicazione nel distretto extracellulare.(11)

I farmaci di seconda linea, invece, possiedono una minore specificità, efficacia e tollerabilità; devono pertanto essere utilizzati nei pazienti resistenti o intolleranti alla terapia di prima linea. Questi farmaci presentano meccanismi di

azione diversi e sono: capreomicina, amikacina, kanamicina, acido paraminosalicilico (PAS), cicloserina, etionamide, tiacetazone, i fluorochinoloni ed alcuni β -lattamici.(11)

1.5.2 Terapia della tubercolosi attiva

La diagnosi tempestiva e il trattamento efficace di tutti i casi, con particolare riguardo alle forme polmonari con esame dell'espettorato positivo per micobatteri tubercolari, sono i cardini fondamentali su cui si basa il controllo della tubercolosi.

Il trattamento ha, infatti, un duplice scopo:

- perseguire la guarigione del soggetto ammalato;
- ridurre il numero delle fonti di infezione presenti nella collettività, rendendo il paziente non contagioso nel più breve tempo possibile. Il trattamento mal condotto, oltre ad avere conseguenze negative nel singolo individuo, infatti, favorisce la persistenza di fonti di contagio e l'acquisizione di farmacoresistenza.(12)

Per un trattamento efficace sono indispensabili:

- la prescrizione d'uno schema terapeutico corretto, con l'impiego obbligatorio di più farmaci in associazione, per un periodo di tempo sufficientemente lungo e la posologia corretta.
- l'assunzione regolare dei farmaci da parte del paziente per tutta la durata della terapia ricorrendo anche al trattamento direttamente osservato.

Fanno parte integrante del corretto trattamento l'educazione alla terapia del paziente e la continua supervisione del trattamento stesso da parte di personale sanitario qualificato.(12)

Sulla base delle indicazioni predisposte dalle linee guida per il trattamento antitubercolare fornite dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, dai Centers for Diseases Control di Atlanta e diverse società scientifiche nazionali, lo schema posologico da utilizzare deve essere valutato attentamente.(12)

Per quanto riguarda i casi di primo accertamento in popolazioni a bassa probabilità di resistenza all'isoniazide (INH) il trattamento iniziale è costituito da tre farmaci: isoniazide (INH), rifampicina (RMP), pirazinamide (PZN) per due mesi (2HRZ).

Gli schemi terapeutici in caso di sospetta resistenza iniziale all'INH prevedono una fase iniziale di 2 mesi con INH, RMP, PZN, etambutolo (EMB) o streptomicina (SM) (2HRZE o 2 HRZS). In caso di persistenza di positività dell'escreato per micobatteri, la fase iniziale viene estesa per ulteriori quattro settimane.

Dopo la prima fase e ottenuta la negativizzazione dell'escreato, segue la fase di continuazione: essa viene solitamente condotta per quattro mesi con INH e RMP (4HR).(12)

I farmaci sono somministrati ogni giorno, oppure tre volte alla settimana, dopo una prima fase di trattamento giornaliero. L'osservanza della terapia deve essere verificata e, in generale, occorre somministrare i farmaci sotto supervisione, almeno durante i primi 2 mesi.(12,15)

Invece nei casi di recidiva o fallimento della terapia vi è il sospetto di resistenza ai farmaci. Pertanto, all'inizio del trattamento va sempre eseguito un test di sensibilità farmacologica e controllare la terapia precedentemente seguita. In questi casi la terapia dovrebbe essere iniziata preferibilmente in regime di ricovero.

La scelta del regime iniziale di trattamento deve comprendere non meno di 5 farmaci (RMP, INH, PZN, EMB, SM) e, in caso di elevato rischio di multiresistenza o in caso di eventi epidemici da ceppi multi-farmaco-resistenti, possono essere somministrati sino a 7 farmaci (aggiungendo un fluorochinolone e/o cicloserina o PAS).

Lo schema terapeutico va quindi reimpostato non appena disponibili i risultati dell'antibiogramma:(12)

- Se il test di sensibilità farmacologica effettuato all'inizio del trattamento ha escluso resistenza ai farmaci antitubercolari maggiori, lo schema globale di terapia può essere il seguente:

- fase iniziale: 5 farmaci (RMP, INH, PZN, EMB, SM) per 2 mesi seguito da 4 farmaci (RMP, INH, PZN, EMB) per 1 mese.
- fase di continuazione INH - RMP - EMB per 5 mesi (5HRE).
- se il test di sensibilità farmacologica all'inizio del trattamento ha evidenziato resistenza a RMP o INH, lo schema di terapia deve essere personalizzato ricorrendo al parere di un esperto di gestione della tubercolosi multiresistente. La terapia deve essere effettuata sotto stretta osservazione, preferibilmente in ambiente ospedaliero (almeno nella fase iniziale).

Infine in caso di tubercolosi polmonare cronica la probabilità di guarigione della malattia è bassa, anche con trattamento ottimale. Dal momento che tali forme verosimilmente sono causate da ceppi multiresistenti, si consiglia di eseguire un test di sensibilità farmacologica e tentare un ri-trattamento, anche con l'impiego di farmaci di seconda scelta.(12)

Tra i pazienti portatori di HIV e colpiti da una tubercolosi non resistente, il prolungamento del trattamento non accresce i tassi di successo terapeutico né riduce quelli di ricaduta, che sono anzi elevati. Questi pazienti saranno dunque trattati in modo standard.(15,16,17)

Se la risposta terapeutica è lenta o non ottimale, il trattamento sarà prolungato caso per caso. Di contro, i pazienti sieropositivi presentano nel corso del trattamento un tasso di effetti indesiderati maggiore rispetto alle altre tipologie di pazienti.(18)

E' importante sottolineare come vengano trattati i bambini: spesso in essi la tubercolosi si presenta in una forma clinica diversa rispetto all'adulto (prevalenza di forme disseminate nella prima infanzia, più forme ganglionari). (19) Pertanto, in linea di principio, il trattamento della tubercolosi nel bambino dovrebbe essere diverso da quello dell'adulto. Tuttavia, non esistono farmaci specifici pertanto la terapia ricalca quella dell'adulto. Poiché in genere la tubercolosi infantile è di carattere paucibacillare (ossia presenta un numero limitato di batteri), una tripla associazione è sufficiente in gran parte dei casi.

L'uso dell'etambutolo è normalmente sconsigliato nel bambino prima dell'età scolare, quando il campo visivo non può essere controllato, anche se esistono poche prove formali della sua tossicità nel bambino. Se si sospetta una resistenza, oppure se la forma di tubercolosi è grave (interessamento cerebro-meningeo), l'aggiunta di etambutolo può essere indicata per i bambini, ma solo dopo aver valutato i rischi del trattamento rispetto a quelli della malattia. (20)

A causa della tossicità di alcuni farmaci antitubercolari è importante monitorare, mediante un'attenta analisi della sintomatologia del paziente ed esami ematochimici e strumentali, l'eventuale comparsa di effetti collaterali, principalmente a carico del fegato e del sistema nervoso centrale e periferico. Altri possibili effetti collaterali possono coinvolgere il sistema articolare e la cute.(15)

L'effetto secondario più frequente è rappresentato dall'epatotossicità di isoniazide, rifampicina e pirazinamide. L'isoniazide ha un'epatotossicità che aumenta con la dose, l'età del paziente (molto rara fra i soggetti giovani, ma del 2% circa a partire dai 50 anni), l'abuso di alcool, la malnutrizione, nella fase post-parto tra le donne africane e i pazienti acetilatori lenti (che hanno ridotta espressione della N-acetiltransferasi).(21,22,23)

La neuropatia periferica associata all'isoniazide può essere prevenuta somministrando quotidianamente vitamina B6, 40 mg/ die. Il rischio aumenta in caso di gravidanza, alcolismo, malnutrizione, infezione con HIV ed epatopatie croniche.(15)

La tossicità ottica dell'etambutolo insorge con il trattamento prolungato o con dosi pari o superiori a 25 mg/kg. In questo caso è fondamentale effettuare specifiche analisi per individuare l'esordio di nevrite ottica, malgrado i sintomi possano manifestarsi fra i controlli.(24)

Se il paziente lamenta prurito senza lesione cutanea visibile, viene proposto un trattamento sintomatico con antistaminici senza modificare la terapia. In presenza di lesione cutanea visibile, bisogna interrompere immediatamente la somministrazione degli antitubercolari e reintrodurli separatamente una volta scomparse le lesioni. (25)

Per ragioni epidemiologiche, è importante conoscere il risultato del

trattamento dei malati tubercolari di un paese o di una regione secondo i criteri standardizzati, per permettere di scoprire le eventuali divergenze tra i programmi. L'OMS, l'Unione internazionale contro la tubercolosi e il Gruppo di consenso europeo raccomandano di valutare l'esito del trattamento di una tubercolosi, almeno per quel che riguarda le forme polmonari bacillari, secondo otto categorie reciprocamente esclusive.(26) (Tabella 1)

Tabella 1 Esito del trattamento antitubercolare secondo l'OMS Europa

Guarigione	Trattamento compiuto e documentato con conversione colturale
Trattamento compiuto	Trattamento completato senza documentazione di conversione colturale
Trattamento interrotto	Interruzione del trattamento per almeno due mesi o non completamento del trattamento per nove mesi per un programma di sei mesi (rispettivamente per 12 mesi per un programma di 9 mesi) o assunzione dei farmaci <80%
Insuccesso del trattamento	Persistenza o ricomparsa di colture positive per <i>M. tuberculosis</i> dopo cinque mesi di trattamento o più
Decesso per la TB	Decesso dovuto alla TB, prima o durante il trattamento antitubercolare
Decesso per altre ragioni	Decesso dovuto ad altre ragioni (non a TB), prima o durante il trattamento antitubercolare
Trasferimento	Paziente trasferito ad un altro servizio e per il quale si ignora l'esito del trattamento
Altri risultati	per es. continuazione del trattamento di un caso di MDR

La prevenzione gioca un ruolo chiave: infatti nell'articolo 1 del DPR 7 Novembre 2001 N. 465 vengono indicati i soggetti da sottoporre a vaccinazione antitubercolare obbligatoria:

- a) Neonati e bambini di età inferiore a 5 anni, con test tubercolinico negativo, conviventi o aventi contatti stretti con persone affette da tubercolosi in fase contagiosa, qualora persista il rischio di contagio.
- b) Personale sanitario, studenti in medicina, allievi infermieri e chiunque, a qualunque titolo, con test tubercolinico negativo, operi in ambienti sanitari ad alto rischio di esposizione a ceppi multi-farmaco-resistenti oppure che operi in ambienti ad alto rischio.(27)

La vaccinazione, effettuata tramite il bacillo di Calmette-Guérin (BCG), un ceppo molto attenuato del *Mycobacterium bovis*, è utilizzata dagli anni '40 a livello mondiale ed è stata introdotta nel 1974 nel «Programma ampliato di vaccinazione» sviluppato dall'Organizzazione mondiale della sanità (OMS). L'efficacia della vaccinazione col BCG si limita alla protezione contro

l'evoluzione mortale della tubercolosi, in particolar modo la meningite tubercolare e la malattia disseminata (miliare).

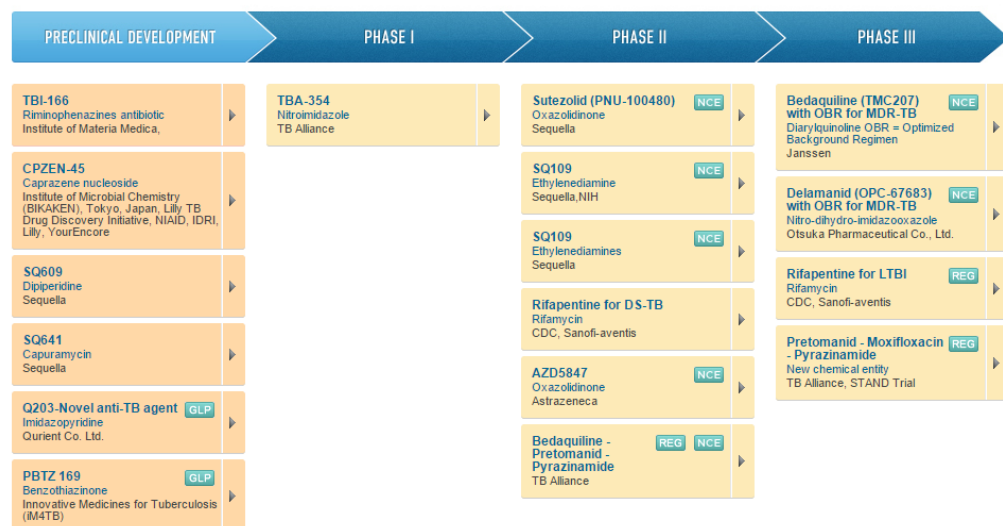
L'effetto protettivo che si ha per il neonato, diminuisce nel bambino più grande, per diventare minimo nell'adulto.

Anche se i paesi in via di sviluppo così come i paesi con endemia tubercolare elevata fanno ancora largamente ricorso alla vaccinazione con il BCG, quest'ultima è stata abbandonata dalla maggior parte dei paesi industrializzati oppure il suo uso si è altamente ridotto. Le ricerche tuttora in corso permettono di intravedere un miglioramento della protezione da parte del vaccino BCG o l'introduzione di vaccini più efficaci. (28)

1.5.3 Nuovi farmaci per la tubercolosi

Dopo un lungo periodo in cui non sono emersi farmaci antitubercolari di nuova formulazione, l'arsenale terapeutico si è modificato e sono stati sviluppati nuove molecole con attività antitubercolare. (29,30) (tabella 2)

Tabella 2 Farmaci attualmente in fase di sperimentazione preclinica e clinica. Working Group on New TB Drugs, 2015



Alcuni medicinali già conosciuti vengono usati in nuove indicazioni terapeutiche, ad esempio i chinoloni. Fra essi, attualmente il più promettente sembra essere la moxifloxacina, la cui attività battericida è equivalente a quella dell'isoniazide, e potrebbe permettere di abbreviare la durata del trattamento. (30,31)

Altri sono totalmente nuovi e vengono sottoposti alla sperimentazione clinica: Bedaquiline e Delamanid sono due nuovi farmaci per il trattamento di MDR-TB attualmente in fase II e fase III della sperimentazione. (Figura 8)

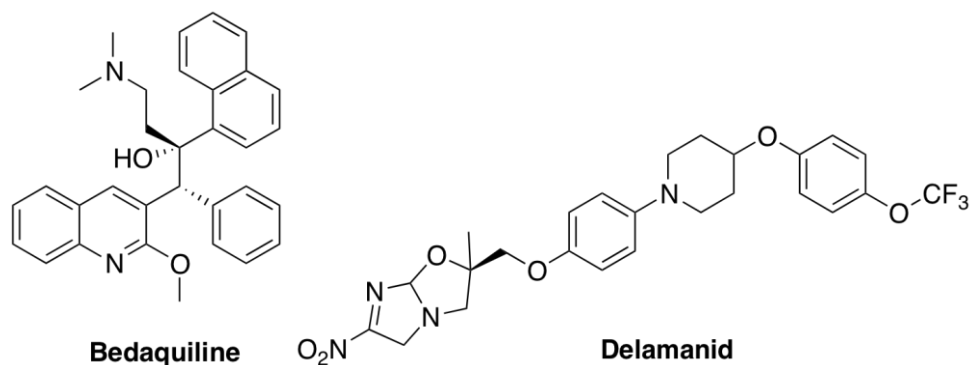


Figura 8: Strutture di alcuni farmaci antitubercolari in sperimentazione clinica

1.6 Tubercolosi multi ed estesamente resistente

Negli ultimi anni si è assistito ad un drammatico incremento di ceppi di *M. tuberculosis* resistenti ad uno o più farmaci.

L'assunzione di un numero inappropriato di farmaci o interruzione della terapia, sintomatici di una scarsa aderenza del paziente alla terapia, prescrizioni inappropriate, scarsa qualità dei farmaci, la mancanza di linee guida standardizzate, mancata identificazione di una resistenza preesistente e monitoraggio inefficace da parte degli operatori sanitari determinano la selezione di batteri resistenti.(32,33)

Infatti, poiché la terapia è molto lunga e si protrae per almeno 6 mesi, è molto frequente, soprattutto nei paesi in via di sviluppo, una errata e non continua assunzione dei farmaci da parte dei pazienti e le conseguenze di ciò sono allarmanti. (32)

Con MDR-TB (*MultiDrug-Resistant Tuberculosis*) si intende una forma di tubercolosi causata da micobatteri che sono diventati resistenti ai due farmaci antitubercolari più efficaci, l'isoniazide e la rifampicina. La MDR-TB deve quindi essere trattata con altri farmaci, detti farmaci di seconda linea. La terapia è più lunga, più costosa e più difficoltosa.(12, 33)

Come gli altri batteri, i micobatteri possono subire mutazioni genetiche, che

possono renderli naturalmente resistenti a un farmaco antitubercolare.

Per quanto riguarda l'isoniazide, essa è un pro-farmaco e viene attivata in vivo tramite una reazione di ossidazione da un enzima (katG) dotato di attività catalasica-perossidasi. L'isoniazide diventa a sua volta specie reattiva, capace di acilare un sistema enzimatico presente solo nel *M. tuberculosis*. Ceppi resistenti di *M. tuberculosis* presentano una attività catalasica minore e questa attività diminuita è associata alla delezione di un gene della catalasi. A dimostrazione di ciò, la reintroduzione di tale gene rende il microrganismo nuovamente sensibile al farmaco.(34,35)

Anche la resistenza alla pirazinamide è dovuta ad una mutazione genetica: tale farmaco viene attivato in vivo da una pirazinamidasi, prodotta dai microrganismi, ad acido pirazinoico. La mutazione del gene della pirazinamidasi (pncA) produce ceppi resistenti al *M. tuberculosis*.(36,37)

Pertanto un trattamento a base di 3 o 4 farmaci può prevenire la diffusione dei micobatteri resistenti, evitando che vadano a sostituire quelli “sensibili” eliminati dalla normale terapia antitubercolare.(33)

Come si può vedere dal diagramma 1 se i micobatteri resistenti sviluppano una nuova resistenza a un altro farmaco, può succedere che l'intera popolazione micobatterica sia sostituita da un ceppo mutato almeno due volte e divenuto resistente a entrambi i farmaci. I micobatteri resistenti possono trasmettersi ad altre persone, che si riveleranno resistenti fin da subito alla normale terapia antitubercolare.(33)

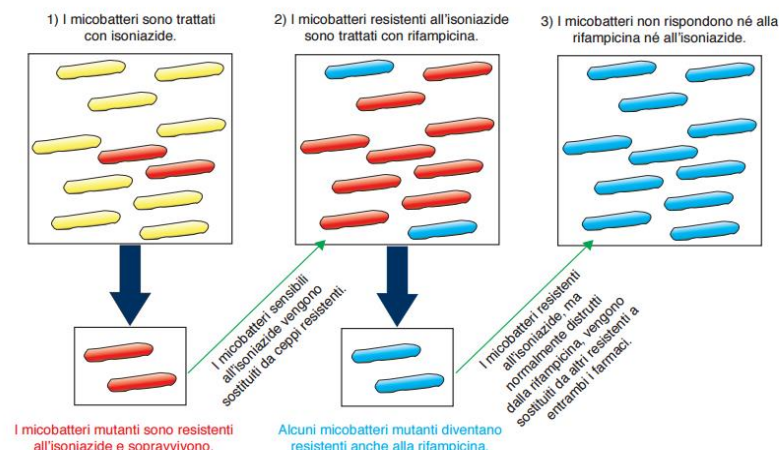


Diagramma1 Sviluppo della MDR-TB e della resistenza all'isoniazide e alla rifampicina. Tuberculosis multifarmaco-resistente (MDR-TB), European Lung Foundation

Il termine *Extensively Drug Resistant Tuberculosis* (XDR-TB) fu coniato per la prima volta nel novembre 2005 (38,39) e definiva inizialmente una forma di tubercolosi resistente ad almeno due farmaci di prima scelta (isoniazide e rifampicina) e a tre o più farmaci tra quelli di seconda scelta.

Nell'ottobre 2006 l'Organizzazione Mondiale della Sanità rivisitò e cambiò la definizione: con XDR-TB si intende, pertanto, la malattia provocata da ceppi di *M. tuberculosis* resistenti a isoniazide, rifampicina, un fluorochinolone ed ad almeno una molecola iniettabile tra quelle di seconda linea, ossia amikacina, capreomicina e kanamicina.(40)

MDR-TB e XDR-TB sono in stretta correlazione: infatti, per curare pazienti affetti da tubercolosi multi farmaco-resistente sono necessari i farmaci di seconda scelta i quali però, a loro volta, sono inefficaci nella tubercolosi estesamente farmaco-resistente. Non sorprende, pertanto, che i più alti tassi di insorgenza e conseguente diffusione di XDR TB avvenga proprio in quei paesi dove le terapie non sono sotto stretta sorveglianza.(41)

Il 9 Ottobre 2006 venne organizzato con estrema urgenza, dalla Global Task Force della WHO, un meeting a Ginevra con lo scopo di sensibilizzare e dettare nuove strategie per fermare il diffondersi della tubercolosi estesamente farmaco-resistente. Venne sottolineata l'importanza di attuare un sistema di prevenzione e monitoraggio, nonché di una rapida diagnosi di tale forma di tubercolosi.(42)

Ciò che preoccupa di più, infatti, è la possibile insorgenza di epidemie di tubercolosi farmaco-resistente dovute non tanto alla conversione di ceppi suscettibili in ceppi farmaco-resistenti durante il trattamento, quanto dalla trasmissione di forme di *M. tuberculosis* resistenti tra individui.

Dal punto di vista clinico e sintomatico queste forme di farmaco-resistenza presentano gli stessi sintomi e riguardano gli stessi organi della tubercolosi normale (perdita di peso, febbre moderata e stanchezza, con tosse, produzione di espettorato e dolore toracico se i micobatteri si trovano nei polmoni). Tuttavia, la malattia dura di più, poiché i micobatteri scompaiono più lentamente e non vengono distrutti completamente. La terapia, infatti, può durare fino a 2 anni ed è spesso accompagnata da effetti collaterali più o meno seri.(33)

2. Progetto della ricerca

2.1 Background della ricerca

L'elevata insorgenza di forme di tubercolosi multi ed estesamente resistente richiede urgentemente lo sviluppo di nuovi farmaci, possibilmente attivi con meccanismi differenti da quelli attualmente in uso.

La letteratura più recente riporta numerose nuove strutture alcune delle quali (composti **I-II**, Figura 9) hanno suscitato un certo interesse nel gruppo di ricerca presso cui ho svolto la mia tesi sperimentale. Queste molecole appartengono alla classe delle tetraidropirazolo[1,5-*a*]pirimidina-3-carbossamidi. La molecola **I** presenta una MIC pari a 0,16-0,6 μM ma un profilo farmacologico e farmacodinamico deficitario. Pertanto è stato sviluppato il composto **II** che mantiene un ottimo profilo antitubercolare ($\text{MIC} < 0,5 \mu\text{M}$) e che possiede un migliore profilo farmacologico.(43)

Una serie di derivati imidazopirazolici con struttura generale **III** (Figura 10), precedentemente progettate e sintetizzate dal gruppo della prof.ssa Bruno, mostrano una certa somiglianza strutturale con le molecole **I** e **II** sopra citate.

Figura 9. Struttura dei composti **I** e **II**

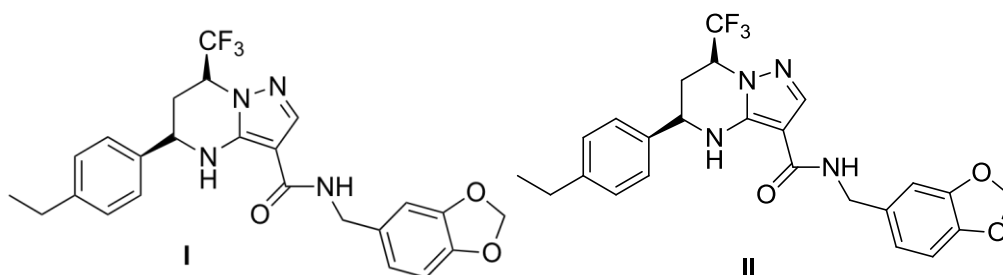
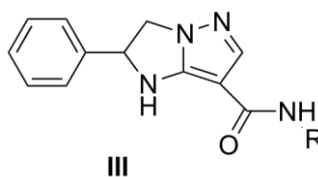


Figura 10. Struttura generale dei composti **III**



Allo scopo di verificare la loro eventuale attività antitubercolare è stata selezionata una piccola libreria (38 molecole) di imidazopirazoli e pirazoli

analogamente sostituiti, prodotti nel nostro laboratorio, che è stata inviata presso l'Institute for Tuberculosis Research, University of Chicago (Illinois, USA) diretto dal prof. Scott Franzblau con il quale è stata avviata una collaborazione. I composti sono stati testati preliminarmente alla concentrazione di 100 μ M su una linea cellulare geneticamente modificata ottenuta inserendo nel *M. tuberculosis* H₃₇Rv un vettore plasmidico con un promotore contenente un gene di luciferasi batterica (LORA test).(44,45,46) In questo test, che sarà spiegato più dettagliatamente nella sezione 4, sono considerati interessanti i composti con % di inibizione superiore al 90%. I risultati del test eseguito preliminarmente sulla libreria di 38 molecole sono riportati, come percentuali di inibizione a 100 μ M, nella tabella 3.

Molti dei composti testati hanno mostrato % di inibizione alte, alcuni anche superiori al 90%. Tra essi ci è sembrato interessante il composto indicato nella libreria come **TB-BB2** (Figura 11).

Figura 11. Struttura delle molecole **TB-BB2**, **TB-BB11** e **TB-BB19**.

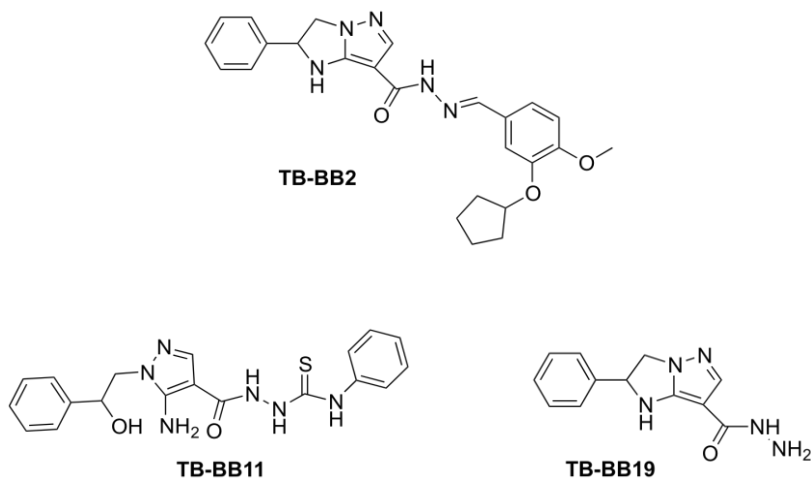


Tabella 3 Risultati dei test biologici, LORA test

Sigla	% inibizione (100 μ M)	Sigla	%inibizione (100 μ M)
TB-BB1	63	TB-BB20	50
TB-BB2	95	TB-BB21	97
TB-BB3	87	TB-BB22	30
TB-BB4	77	TB-BB23	9
TB-BB5	82	TB-BB24	54
TB-BB6	71	TB-BB25	47
TB-BB7	63	TB-BB26	61
TB-BB8	79	TB-BB27	90
TB-BB9	69	TB-BB28	98
TB-BB10	74	TB-BB29	48
TB-BB11	56	TB-BB30	94
TB-BB12	72	TB-BB31	58
TB-BB13	73	TB-BB32	95
TB-BB14	40	TB-BB33	86
TB-BB15	98	TB-BB34	89
TB-BB16	94	TB-BB35	90
TB-BB17	17	TB-BB36	67
TB-BB18	2	TB-BB37	10
TB-BB19	42	TB-BB38	94

Il composto **TB-BB2** era stato sintetizzato come potenziale farmaco antiinfiammatorio ad azione multi target. Contiene infatti in sé la struttura imidazopirazolica (che caratterizza gli inibitori della chemiotassi dei neutrofili precedentemente sviluppati dal gruppo di ricerca) e la porzione catecolica sostituita tipica di inibitori delle PDE4 (che sono recentemente entrati in terapia per il trattamento della broncopneumopatia cronica ostruttiva, BPCO). E' opportuno ricordare che i neutrofili vengono attivati in seguito ad infezioni batteriche, e la loro iperattivazione, seguita da reclutamento, infiltrazione e

produzione di sostanze reattive (quali anione superossido e perossido di idrogeno) causa l'insorgenza di malattie infiammatorie autoimmuni.

Il composto **TB-BB2**, testato su neutrofili stimolati con TNF-alfa riduce la produzione di perossido di idrogeno in modo dose-dipendente. Inoltre si è rivelato anche un ottimo inibitore delle PDE4B (la isoforma di PDE4 più coinvolta nei processi infiammatori). Quindi esso ha un'elevata potenzialità per essere sviluppato come farmaco per i processi infiammatori autoimmuni.

Come è noto, e ampiamente riportato nell'introduzione, la tubercolosi è caratterizzata da processi infiammatori molto estesi conseguenti alla infezione e pertanto sarebbe molto interessante sviluppare farmaci che, accanto all'azione antibatterica, avessero anche una buona azione antiinfiammatoria.

Lo scopo della ricerca oggetto di questa tesi è stato quello di progettare nuove molecole analoghe a **TB-BB2** che avessero in sé anche alcuni requisiti strutturali tipici delle molecole **I** e **II** riportati in letteratura, nella speranza di ottenere composti attivi come antitubercolari oltre che come antiinfiammatori.

L'importanza della struttura imidazopirazolica è dimostrata dal fatto che alcuni composti a struttura pirazolica, che si possono considerare i precursori aperti dei nostri imidazopirazoli, erano presenti nella nostra libreria e sono risultati inattivi. Interessante notare che il composto **TB-BB11** (Figura 11) che porta anche una catena tiosemicarbazonica (presente in molti vecchi farmaci antitubercolari) ha mostrato solo un 56% di inibizione. Questo porterebbe a pensare che il meccanismo d'azione di queste molecole sia diverso dai quello dei vecchi farmaci.

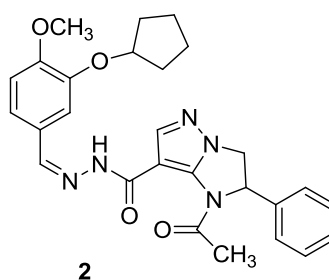
Inoltre, tra le 38 molecole testate preliminarmente era presente anche il derivato idrazidico, precursore sintetico di **TB-BB2** privo della porzione catecolica. Questo composto (**TB-BB19**, Figura 11) è risultato molto poco attivo (42%) e questo dimostra l'importanza della porzione catecolica per avere attività antitubercolare in questo tipo di molecole.

2.2 Nuove molecole progettate

Partendo dalle considerazioni precedenti abbiamo ritenuto interessante sviluppare molecole analoghe a **TB-BB2** aventi la porzione imidazopirazolica legata per mezzo di un linker di tipo idrazonico ad una porzione aromatica diversamente funzionalizzata.

Preliminarmente abbiamo ritenuto importante ripreparare il composto **TB-BB2** (che sarà d'ora in poi indicato con il numero **1**) e per valutare l'importanza dell'azoto libero nell'anello imidazopirazolico, lo abbiamo mascherato trasformandolo nel derivato acetilato (composto **2**, Figura 12).

Figura 12 Struttura del composto **2**



In secondo luogo, il fenile direttamente legato all'imidazopirazolo è stato mantenuto invariato mentre i sostituenti sull'altro anello benzenico, legato mediante funzione idrazonica, sono stati variati in modo da avere:

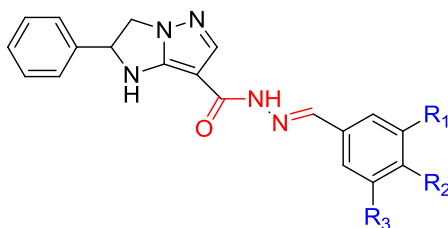
- diverse caratteristiche elettroniche: gruppi elettrondonatori (O-alchili, O-cicloalchili) o elettronattrattori (OCHF₂)
- diverso ingombro sterico: O-CH₃, O-ciclopentile, O-cicloesile, O-*sec*-butile
- diversa disposizione: uno, due o tre sostituenti nelle posizioni 3, 4 e 5

Sono state così disegnate le molecole, **3a-f**, riportare nella tabella 4.

Una seconda serie di molecole è stata progettata sostituendo il linker idrazonico con uno di tipo ammidico e mantenendo invariati alcuni dei sostituenti sull'anello fenilico e la porzione imidazopirazolica.

Le molecole così disegnate (**4a-e**), sono riportate nella tabella 5.

Tabella 4 Strutture dei composti **3a-f**



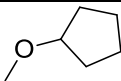
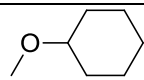
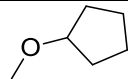
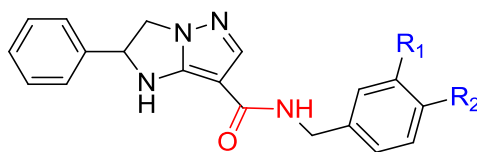
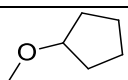
Composti	R ₁	R ₂	R ₃
3a	H	-OCH ₃	-OCH ₃
3b	H	-OCH ₃	-OCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
3c	H		-OCH ₃
3d	H	-OCH ₃	
3e	H	-OCHF ₂	
3f	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃

Tabella 5 Strutture dei composti **4a-e**



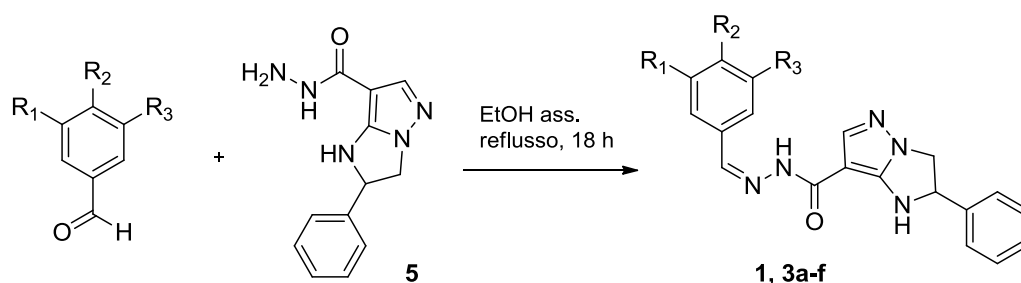
Composti	R ₁	R ₂
4a	H	-OCH ₃
4b	H	-OCF ₃
4c	-OCH ₃	-OCH ₃
4d		-OCH ₃
4e	F	F

3. Discussione

3.1 Sintesi dei composti 1, 2, 3a-f

I derivati idrazonici **1** e **3a-f** sono stati ottenuti mediante una reazione di condensazione in etanolo assoluto tra la 2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazolo-7-carboidrazide **5** e le opportune benzaldeidi diversamente sostituite (schema 1).

SCHEMA 1

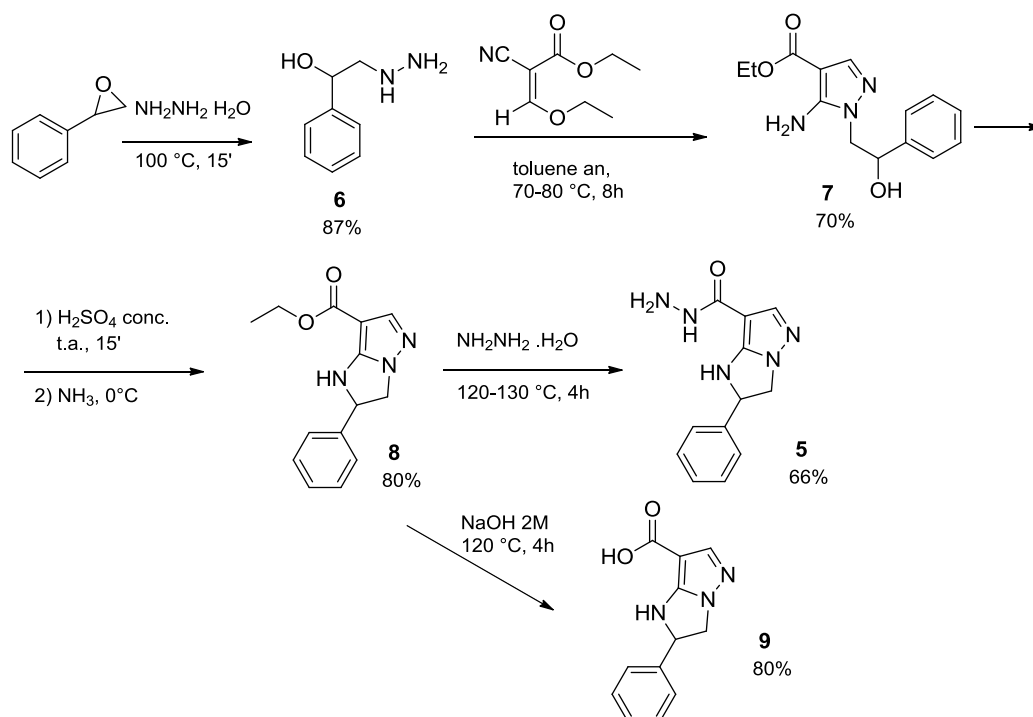


Per la sintesi dell'imidazo-pirazol-carboidrazide **5** si parte dalla reazione tra l'ossido di stirene e idrazina idrata ottenendo il fenilidrazino-etanolo **6**, il quale viene fatto ciclizzare con etossimetilencianoacetato in toluene anidro a dare l'estere etilico dell'acido 5-ammino-1-(2-idrossi-2-feniletil)-1*H*-pirazolo-4-carbossilico **7** (schema 2).

Il pirazolo **7** viene trattato con acido solforico concentrato per dare l'estere etilico dell'acido 2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazolo-7-carbossilico **8**, il quale a sua volta viene fatto reagire con idrazina idrata per ottenere la desiderata carboidrazide **5**.

Il derivato estereo **8** è stato anche trattato con idrossido di sodio 2M a dare il corrispondente acido 2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazolo-7-carbossilico **9**.

SCHEMA 2

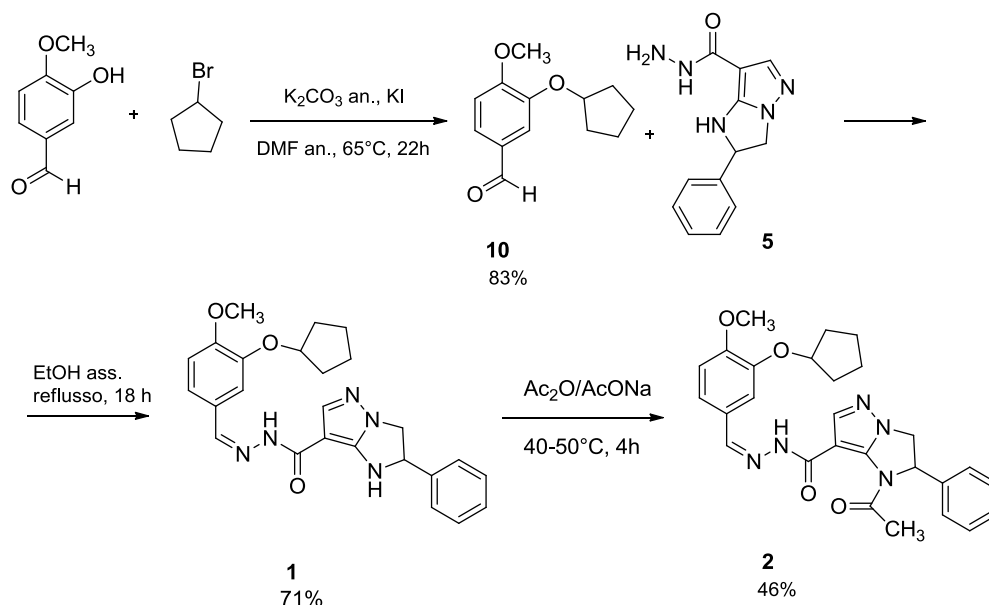


Per ottenere i composti finali è stato necessario preparare le varie benzaldeidi con i diversi sostituenti sull'anello aromatico.

L'aldeide di partenza necessaria per la sintesi del composto **1** è la 3-(ciclopentilossi)-4-metossibenzaldeide **10** che è stata preparata dalla commerciale 3-idrossi-4-metossibenzaldeide mediante alchilazione con bromociclopentano in DMF anidra, in presenza di K_2CO_3 e KI, a 65°C per 22 h. L'aldeide **10** viene fatta reagire con l'imidazo-pirazol-carboidrazide **5** in etanolo assoluto per dare il desiderato idrazone *N'*-[3-(ciclopentilossi)-4-metossibenzilidene]-2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-carboidrazide **1**.

L'idrazone **1** è stato poi trattato con acetato di sodio in anidride acetica a dare il derivato 1-acetil-*N'*-[3-(ciclopentilossi)-4-metossibenzilidene]-2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-carboidrazide **2** (schema 3).

SCHEMA 3



Per la preparazione degli idrazoni *N'*-(3,4-dimetossibenzilidene)-2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-carboidrazide **3a** e *N'*-[4-(ciclopentilossi)-3-metossibenzilidene]-2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-carboidrazide **3c** le opportune aldeidi **11** e **12** sono state condensate con l'imidazo-pirazol-carboidrazide **5** in etanolo assoluto (Schema 4).

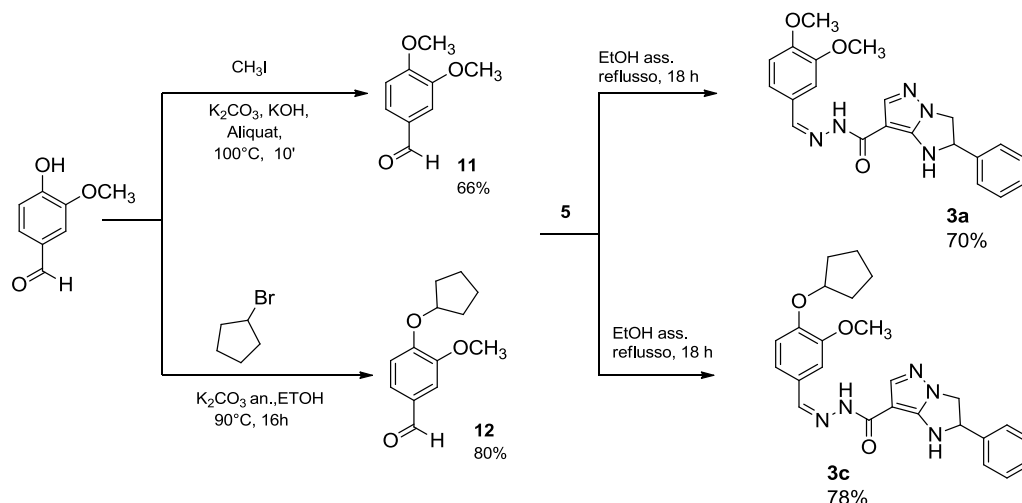
Le aldeidi **11** e **12** sono state a loro volta preparate dalla commerciale 4-idrossi-3-metossibenzaldeide o vanillina secondo due metodiche diverse.

La 3,4-dimetossibenzaldeide **11** è stata ottenuta trattando la vanillina con ioduro di metile in presenza di carbonato di potassio anidro, idrossido di sodio e aliquat. La reazione è stata condotta in reattore a microonde, eseguendo 3 cicli successivi di irraggiamento/raffreddamento per evitare che la temperatura superasse i 100 °C e per un totale di 6 minuti (schema 4). Dopo trattamento la resa ottenuta è del 66%. Da notare che con irraggiamento per 5 minuti, a potenza tale da raggiungere rapidamente 120°C, la reazione portava alla carbonizzazione della miscela di reazione.

Per ottenere la 4-ciclopentilossi-3-metossibenzaldeide **12** la vanillina viene fatta reagire con ciclopentilbromuro in presenza di carbonato di potassio anidro in etanolo. La reazione è stata condotta a 90°C mediante riscaldamento

convenzionale per 16 ore ottenendo l'aldeide con resa dell'80% (Schema 4).

SCHEMA 4



Per quanto riguarda la preparazione degli idrazoni *N'*-[3-(*sec*-butossi)-4-metossibenzilidene]-2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazol[1,2-*b*]pirazol-7-carboidrazide **3b** e *N'*-[3-(cicloesilossi)-4-metossibenzilidene]-2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-carboidrazide **3d** le opportune aldeidi **13** e **14** vengono fatte reagire con l'imidazo-pirazol-carboidrazide **5** in etanolo assoluto a riflusso (schema 5).

Le aldeidi **13** e **14** sono state a loro volta preparate a partire dalla commerciale 3-idrossi-4-metossibenzaldeide o isovanillina.

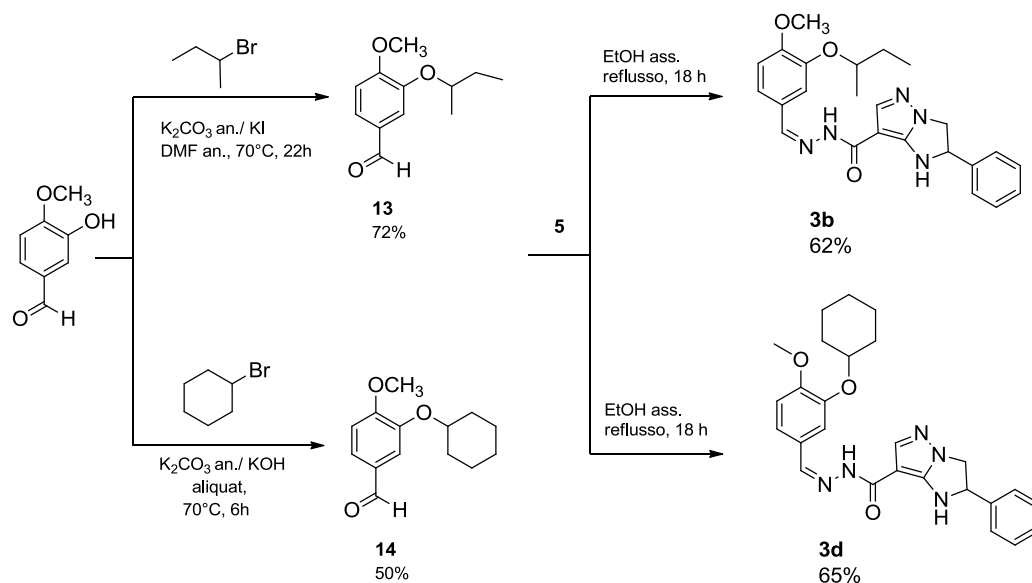
La 3-isobutilossi-4-metossibenzaldeide **13** viene ottenuta trattando la 3-idrossi-4-metossibenzaldeide con 2-bromobutano in presenza di carbonato di potassio anidro e dimetilformammide anidra a 70°C per 22 ore.

Per preparare la 3-cicloesilossi-4-metossibenzaldeide **14** inizialmente è stata utilizzata la stessa metodica dell'aldeide **13**, ma la resa di reazione è stata molto bassa (5%). Abbiamo quindi applicato la stessa metodica utilizzata per l'aldeide **11** (riscaldamento con microonde, cicloesilbromuro, carbonato di potassio anidro, idrossido di potassio e aliquat). Anche in questo caso le rese di reazione non sono state soddisfacenti (16%).

Si è quindi pensato di utilizzare una metodica mista: in pratica è stata

effettuata una reazione in fase solida, con gli stessi reagenti usati nella tecnica a microonde, effettuando il riscaldamento in modo convenzionale con bagno ad olio. In questo modo è stata ottenuta la 3-cicloesilossi-4-metossibenzaldeide **14** con una resa decisamente migliore, ossia del 50%.

SCHEMA 5



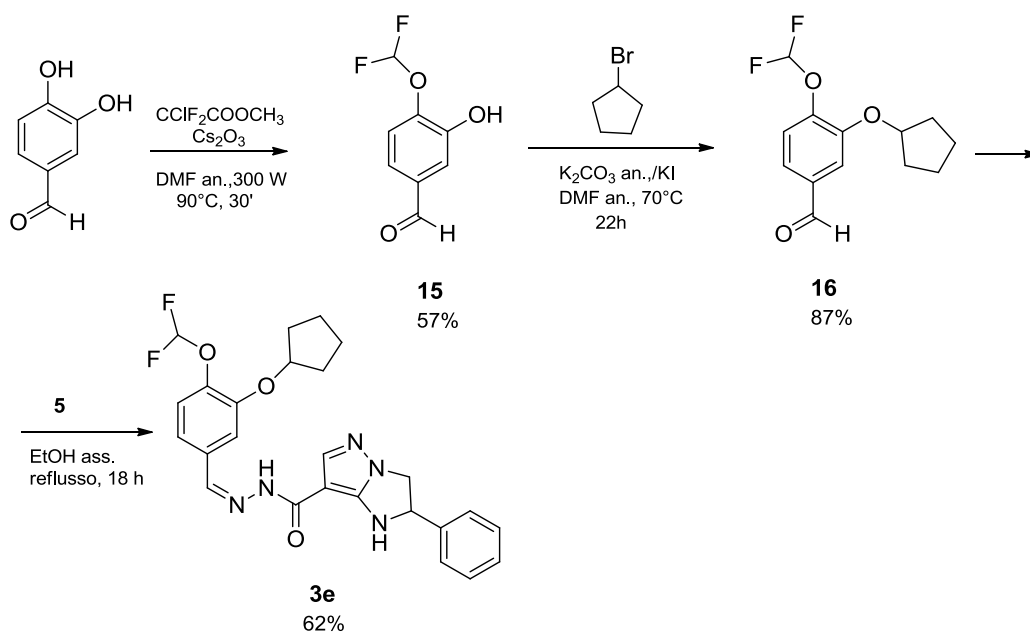
Per la sintesi dell'idrazone *N'*-[3-(ciclopentilossi)-4-(difluorometossi)benzilidene]-2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-carboidrazide **3e** l'aldeide **15** viene fatta reagire con l'imidazo-pirazol-carboidrazide **5** in etanolo assoluto a riflusso (Schema 6).

La 3-ciclopentilossi-4-(difluorometossi)benzaldeide **15** è stata ottenuta mediante una reazione a due step: nel primo, partendo dalla commerciale 3,4-diidrossibenzaldeide si ottiene l'intermedio 4-(difluorometossi)-3-idrossibenzaldeide **16**. Questo è il passaggio limitante in quanto le reazioni riportate in letteratura (che prevedono l'uso di metil 2-clorodifluoroacetato in presenza di diversi sali basici, con riscaldamento tradizionale) hanno tutte bassa resa e soprattutto portano ad un grezzo la cui purificazione è complessa.⁽⁴⁷⁾ Anche in questo caso per ottimizzare le condizioni di reazione e la resa abbiamo messo a punto una metodica alternativa che prevede l'uso di microonde per il riscaldamento. Tale metodo ha permesso di ottenere una resa migliore rispetto a

quelle di letteratura (57%) e soprattutto un grezzo più pulito che è stato purificato per semplice filtrazione cromatografica.

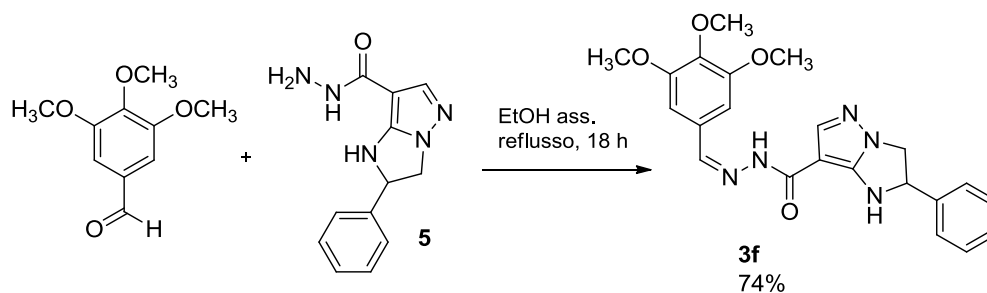
Il secondo step prevede la alchilazione della 4-(difluorometossi)-3-idrossibenzaldeide **16** con ciclopentilbromuro, come è riportato in letteratura, a dare la 3-ciclopentilossi-4-(difluorometossi)benzaldehyde **15**.(48)

SCHEMA 6



Per la preparazione dell'idrazone 2-fenil-*N*-(3,4,5-trimetossibenzilidene)-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-carboidrazide **3f**, viene fatta reagire la 3,4,5-trimetossibenzaldeide, disponibile commercialmente, con la stessa imidazopirazol-idrazide **5** in etanolo assoluto (schema 7).

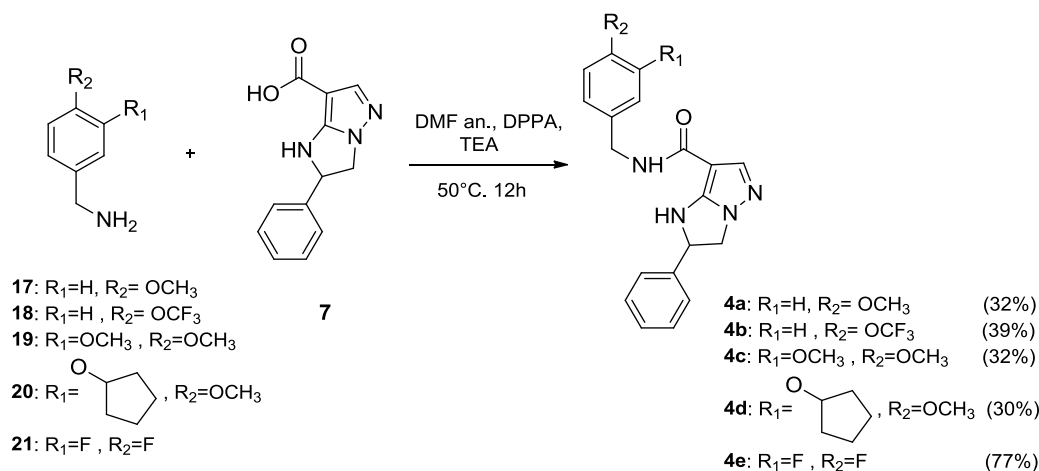
SCHEMA 7



3.2 Sintesi dei derivati ammidici 4a-e

I composti **4a-e** sono stati ottenuti per mezzo di una reazione convergente di condensazione tra l'acido imidazo-pirazol carbossilico **7** (la cui sintesi è illustrata nello schema 2) e le relative benzilammine (**17-21**) diversamente sostituite, in dimetilformammide anidra, trietilammina e difenilfosforilazide (schema 8).

SCHEMA 8



La 4-metossibenzilammina **17**, la 4-trifluorometossibenzilammina **18**, la 3,4-dimetossibenzilammina **19** e la 3,4-difluorobenzilammina **21**, disponibili in commercio, reagendo con l'acido imidazo-pirazol carbossilico **9** hanno dato luogo rispettivamente alla *N*-(4-metossibenzil)-2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-carbossammide **4a**, alla 2-fenil-*N*-(4-trifluorometossi)benzil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-carbossammide **4b**, alla *N*-(3,4-dimetossibenzil)-2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-carbossammide **4c** e alla *N*-(3,4-difluorobenzil)-2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-carbossammide **4e** (schema 7).

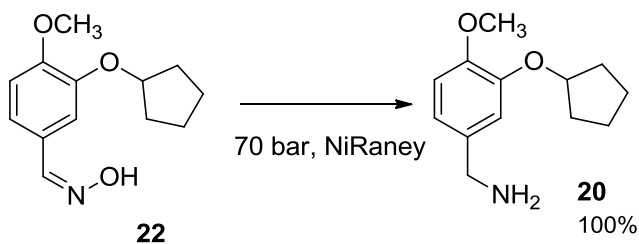
Per la preparazione della *N*-[3-(ciclopentilossi)-4-metossibenzil]-2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-carbossammide **4d** l'acido imidazo-pirazol carbossilico **7** è stato fatto reagire con la 4-ciclopentilossi-3-metossibenzilammina **20** come descritto nello schema 6.

La 4-ciclopentilossi-3-metossibenzilammina **20** è stata ottenuta dalla nota 3-ciclopentilossi-4-metossibenzaldeide ossima **22** (49) mediante idrogenazione

catalitica utilizzando l'idrogenatore H-CUBE. La letteratura indicava il Ni-Raney come miglior catalizzatore per ridurre un'ossima e come migliori condizioni operative la pressione di 60 bar, la temperatura di 80°C, la concentrazione della soluzione di ossima di 0,1M e la velocità di eluizione di 0,1 mL/min.

Ma in tali condizioni la reazione non procedeva totalmente: pertanto abbiamo effettuato una serie di prove e abbiamo individuato le seguenti come migliori condizioni operative: 70 bar, 90 °C, concentrazione della soluzione pari a 0,01M e velocità di eluizione di 0,5 mL/min (schema 9). In tali condizioni la resa è quantitativa (100%).

SCHEMA 9



4. Test biologici e risultati

I composti sintetizzati (**1**, **2**, **3a-g**, **4a-f**) sono stati inviati all'Institute of Tuberculosis Research, University of Chicago (Illinois, USA) diretto dal prof. Scott Franzblau. I composti sono stati testati alla concentrazione di 50 µg/mL mediante MABA test (50) e LORA test.

Il MABA test viene utilizzato per valutare in modo quantitativo la proliferazione di diverse linee cellulari, tra le quali anche quella del *Mycobacterium tuberculosis*. Tale test consiste nell'uso di un indicatore colorimetrico/fluorimetrico redox che viene aggiunto alle cellule nelle quali è presente la molecola da testare. Il tutto viene incubato per 4 ore a 37 °C in atmosfera di CO₂ al 5%. Il blocco della crescita cellulare determina il passaggio dell'indicatore dalla forma ossidata (che corrisponde alla situazione in cui le cellule proliferano liberamente, ossia di non fluorescenza, colore blu) alla forma ridotta, quella di fluorescenza con comparsa del colore rosso. La valutazione quantitativa della fluorescenza permette di calcolare la % di inibizione della crescita batterica e la MIC.

Il LORA test viene eseguito su una linea cellulare geneticamente modificata ottenuta inserendo nel *M. tuberculosis* H₃₇Rv un vettore plasmidico con un promotore contenente un gene di luciferasi batterica. Nei micro pozzetti delle piastre, al micobatterio, vengono aggiunti i composti da testare e il tutto viene incubato per 10 giorni in condizioni di anaerobiosi (concentrazione di O₂ < 0,16%). Le colture vengono poi esposte per 28 ore ad un ambiente contenente il 5% di CO₂. La % di inibizione e la MIC vengono così calcolate in base alla luminescenza prodotta dall'enzima luciferasi: un'alta luminescenza è indice di alta attività batterica e quindi scarsa attività dei composti testati.

Successivamente, solo per i composti aventi % di inibizione della crescita batterica superiore al 90% è stata calcolata la MIC (minima concentrazione necessaria per avere una riduzione della crescita del micobattere del 50%) in entrambi i test.

La MIC è stata calcolata in µg/mL e successivamente da noi ricalcolata ed espressa come concentrazione µM per poter confrontare i risultati con quelli dei composti di riferimento (Rifampicina, Isoniazide e TMC207).

I risultati ottenuti sono riportati in tabella 6.

Tabella 6

Composto	MABA test			LORA test		
	% inibizione (50µg/mL)	MIC (µg/mL)	MIC (µM)	% inibizione (50µg/mL)	MIC (µg/mL)	MIC (µM)
1	96	23,1	51,8	94	24,1	54,2
2	90	49,7	101,8	89	>50	
3a	28	>50		40	>50	
3b	34	>50		49	>50	
3c	28	>50		37	>50	
3d	54	>50		63	>50	
3e	89	>50		81	>50	
3f	37	>50		50	>50	
4a	93	24,3	69,7	53	>50	
4b	53	>50		35	>50	
4c	65	>50		62	>50	
4d	61	>50		56	>50	
4e	87	>50		50	>50	
Rifampicina	nn		0,061	nn		0,670
Isoniazide	nn		0,498	nn		> 256
TMC207	nn		0,075	nn		0,122

5. Conclusioni

La presente tesi ha avuto come oggetto la progettazione di nuovi potenziali agenti terapeutici per il trattamento delle infezioni tubercolari.

Mediante screening di una piccola libreria di composti abbiamo selezionato un composto (**TB-BB2**) che aveva delle buone potenzialità come possibile agente antitubercolare. Tale composto ci sembrava particolarmente interessante dal momento che aveva già manifestato una buona attività antiinfiammatoria. Infatti è risultato capace di ridurre la produzione di acqua ossigenata in neutrofili attivati con TNF-alfa ed anche di inibire con elevata potenza le fosfodiesterasi di tipo 4B. Il composto quindi poteva essere il capostipite di una nuova classe di antitubercolari-antiinfiammatori multi target.

Abbiamo quindi disegnato e sintetizzato due piccole serie di composti analoghi, esplorando soprattutto le possibili variazioni su una delle due porzioni chiave della molecola, l'anello benzenico.

Come si può notare dai dati riportati in tabella 6, solo i composti **1**, **2** e **4a** hanno manifestato una % di inibizione superiore al 90% alla concentrazione di 50µg/mL. A questo proposito è opportuno sottolineare che effettuando il test a concentrazioni 50µg/mL, dal momento che i composti hanno pesi molecolari abbastanza alti, la quantità effettiva (in moli) di composto somministrato, rispetto al test di screening iniziale, è molto piccola. Inoltre i dati di % di inibizione, e poi di MIC, non sono facilmente confrontabili ai fini di una discussione SAR. Per questo abbiamo poi convertito i risultati in concentrazione µM.

In ogni caso, la MIC è risultata abbastanza interessante, in linea con le MIC di altri composti presenti in letteratura,⁽⁵¹⁾ anche se non ai livelli dei composti di riferimento. In particolare, il composto **1** ha confermato in entrambi i test la % di inibizione manifestata nello screening iniziale (effettuato a concentrazioni 100µM, quindi molto alte rispetto a quelle utilizzate poi nel secondo test). La sua MIC (51 µM nel MABA e 54 µM nel LORA test) è comunque la migliore per i composti testati. L'acetilazione dell'N imidazolico (composto **2**) ha creato una diminuzione di attività in entrambi i test. Nel caso del MABA test la potenza è dimezzata (MIC = 101,8 µM) mentre nel LORA test non si raggiunge il cut off

di 90% di inibizione. Questo dimostra che il gruppo NH dell'anello imidazopirazolico deve essere preferibilmente libero.

Le variazioni di sostituzione sull'anello catecolico hanno fatto diminuire l'attività rispetto al composto di riferimento **1** e quindi tutti i composti della serie idrazonica **3** hanno manifestato percentuali di inibizione inferiori al 90%. Si può comunque sottolineare che il composto **3e** ha manifestato % di inibizione pari a 89% nel MABA e 81% nel LORA test. In questo composto il gruppo ciclopentilossi è in posizione 4 mentre in **3** c'è un gruppo difluorometilico. Il composto **3e** quindi è quello che mantiene la maggiore somiglianza strutturale con il composto **1** e si può concludere che per avere attività sia necessario un certo ingombro sterico su questo anello aromatico.

Tra i derivati di tipo ammidico solo il composto **4a** ha mostrato una percentuale di inibizione superiore al 90% nel MABA test e una MIC pari a 69,7 μ M. I composti **4b**, **4c**, **4d** hanno manifestato percentuali di inibizione intorno al 50% e quindi sono molto meno attivi, mentre il composto **4e** (87% di inibizione) ha una potenza paragonabile a quella del composto **4a**, ma per esso non è stata calcolata la MIC.

In conclusione, le modifiche apportate nei derivati di tipo idrazonico non hanno incrementato l'attività antitubercolare rispetto al composto **1** di riferimento, che rimane il composto più attivo della serie. Tra i derivati di tipo ammidico il composto **4a** e **4e** sono risultati i più attivi. Da questi risultati si può evincere che sia l'anello catecolico che l'anello imidazopirazolico sono coinvolti nell'interazione con il target, che per il momento non è stato identificato. Inoltre la variazione del linker (idrazonico o ammidico) sembra determinare anche una variazione di target (o di disposizione sul target) dal momento che nelle due serie i composti più attivi hanno sostituenti diversi sull'anello catecolico (nella serie **3** sono migliori i composti più ingombrati, mentre nella serie **4** sono migliori quelli meno ingombrati) e quindi il farmacoforo potrebbe essere diverso.

6. Parte sperimentale

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio BÜCHI M-560 e non sono corretti.

Gli spettri IR sono stati registrati in parte in soluzione di CHCl_3 , in parte in KBr, in parte in film, mediante uno spettrofotometro Perkin-Elmer 39. Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati registrati con un apparecchio Varian Gemini 200 (200 MHz) sui campioni sciolti in CDCl_3 o in DMSO-d_6 ; i chemical shifts sono riportati in δ (ppm) usando come standard interno il TMS; le J sono espresse in Hz.

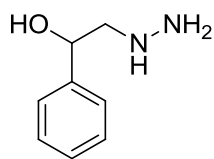
Tutti i composti sono stati analizzati per C, H, N con un analizzatore elementare Carlo Erba 1106; i risultati analitici sono compresi nell'intervallo $\pm 0,4\%$ rispetto ai valori teorici.

La purezza dei composti è stata testata mediante TLC (Kieselgel 60F254 DC-Alufohlen, E.Merk, Darmstadt, Germany).

L'idrogenazione catalitica è stata eseguita con ThalesNano H-CUBE HC-2SS, versione del software: 2.5.0.6.

Per le reazioni con microonde è stato utilizzato l'apparecchio CEM Discover® (CEM Corporation, Matthews, NC, USA), strumento scientifico monomodale potenza massima erogabile 300 Watt, misurazione della temperatura del campione (sonda IR o fibra ottica), possibilità di lavorare con o senza agitazione magnetica del campione, monitoraggio permanente tramite software con funzione di interfaccia con il PC, possibilità di lavorare a pressione ambiente o sottovuoto, sistema di raffreddamento ad aria compressa, alloggiamento di palloni di volume massimo 150 mL.

6.1 Sintesi del 2-idrazino-1-feniletanolo 3



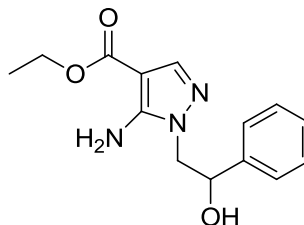
Ad idrazina idrata (30 mL, 0.6 moli) scaldata fino a 100 °C, viene aggiunto a goccia a goccia il 2-fenilossirano (20 mL, 0,17 mmoli). La miscela viene mantenuta a 100 °C per 15 minuti. L'eccesso di idrazina viene rimosso mediante evaporazione a pressione ridotta (sotto cappa con cautela per non respirare vapori). L'olio che si ottiene viene purificato mediante distillazione in alto vuoto (t.eb. 155-158°C/0.6 mmHg). Il prodotto puro è un olio giallino che solidifica lentamente (solido ceroso bianco).

Resa: 87%

Formula molecolare: C₈H₁₂N₂O (PM: 152.19)

I dati spettrali e i dati dell'analisi elementare non vengono riportati perché già noti in letteratura.(52)

6.2 Sintesi dell'estere etilico dell'acido 5-ammino-1-(2-idrossi-2fenilettil)-1H-pirazol-4-carbossilico **7**



Il 2-idrazino-1-feniletanolo **6** (3.04 g, 20 mmol) viene aggiunto ad una soluzione di etossimetilencianoacetato (3.38 g, 20 mmol) in toluene anidro (20 mL) e la miscela viene scaldata a 80 °C per 8 ore. La soluzione viene poi concentrata fino a metà del volume di partenza mediante evaporazione a pressione ridotta e lasciata raffreddare sino a temperatura ambiente. Precipita un solido giallo che viene filtrato e ricristallizzato da toluene.

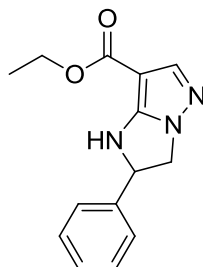
Resa: 70%

P. f.: 136-137 °C

Formula molecolare: C₁₄H₁₇N₃O₃ (PM: 275.30)

I dati spettrali e i dati dell'analisi elementare non vengono riportati perché già noti in letteratura.(53)

6.3 Sintesi dell'estere etilico dell'acido 2-fenil-2,3-diidro-1H-imidazo[1,2-b]pirazol-7-carbossilico 8



L'estere etilico dell'acido 5-ammino-1-(2-idrossi-2-fenilettil)-1H-pirazol-4-carbossilico **7** (2.7 g, 10 mmol) viene disciolto in una soluzione concentrata di acido solforico (10 mL) a 0 °C e la miscela viene lasciata a temperatura ambiente per 15 minuti. Poi viene aggiunta acqua ghiacciata (600 mL) e la soluzione viene neutralizzata con una soluzione di NH₄OH; precipita un solido bianco che viene filtrato, lavato con acqua e ricristallizzato da etanolo assoluto.

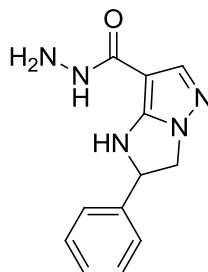
Resa: 80%

P. f.: 162-163 °C

Formula molecolare: C₁₄H₁₅N₃O₃ (PM: 257.29)

I dati spettrali e i dati dell'analisi elementare non vengono riportati perché già noti in letteratura.(54)

6.4 Sintesi del 2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-carboidrazide 5



All'estere etilico dell'acido 2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-carbossilico **8** (0.8 g, 3.1 mmoli) viene aggiunta idrazina idrata (5 mL, 100 mmoli). La miscela viene scaldata a 120 °C per 6 h. Il solido ottenuto viene ricristallizzato da etanolo/metanolo. (2:1)

Resa: 66%

P. f.: 250-252 °C

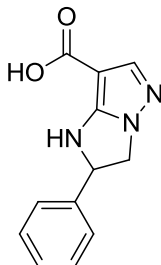
Formula molecolare: C₁₂H₁₃N₅O (PM: 243.26)

Analisi elementare. Valori calcolati (%): C, 59.25; H, 5.39; N, 28.79. Valori sperimentali trovati (%): C, 59.02; H, 5.44; N, 28.60.

IR (KBr) cm⁻¹: 3269 (NH₂), 1627 (C=O).

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 3.77 (q t, 1H, H₃); 4.26 (s all, 2H, NH₂, scompare con D₂O); 4.58 (q t, 1H, H₂); 5.42 (q t, 1H, H₃); 7.05 (s all, 1H, NH, scompare con D₂O); 7.26-7.52 (m, 5H, Ar); 7.67 (s, 1H, H₆); 8.81 (s all, 1H, NH, scompare con D₂O).

6.5 Preparazione dell'acido 2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-carbossilico **9**



L'estere etilico dell'acido 2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-carbossilico **8** (2.57 g, 10 mmoli) viene sospeso in NaOH 2 M (30 mL). La sospensione viene scaldata a 120 °C per 4 h. Dopo raffreddamento con acqua e ghiaccio, alla miscela di reazione viene aggiunto acido acetico glaciale fino a pH 5. Il solido che precipita viene filtrato, lavato con acqua e ricristallizzato da CHCl₃/EtOH assoluto (1:1).

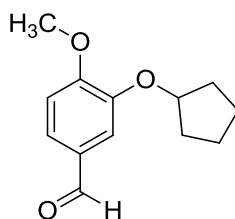
Resa: 79%

P. f.: 188-189 °C

Formula molecolare: C₁₂H₁₁N₃O₂ (PM: 229.23)

I dati spettrali e i dati dell'analisi elementare non vengono riportati perché già noti in letteratura.(54)

6.6 Sintesi della 3-(ciclopentilossi)-4-metossibenzaldeide 10



Una sospensione di 3-idrossi-4-metossibenzaldeide (10.0 g, 65.79 mmoli), carbonato di potassio anidro (13.6 g, 98.55 mmoli) e KI (0.3 g, 1.81 mmoli) in dimetilformammide anidra (65 mL) viene scaldata a 65 °C agitando. Si aggiunge ciclopentilbromuro (9.07 mL, 12.61 g, 84.63 mmoli) a goccia a goccia per 20 minuti. Terminata l'aggiunta si agita la miscela di reazione per 22 ore a 65 °C.

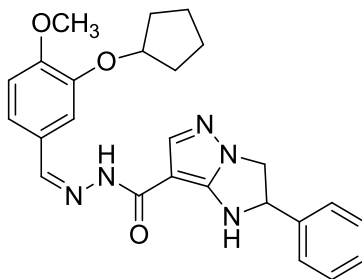
Dopo raffreddamento a temperatura ambiente si diluisce con toluene (200 mL), si lava 2 volte con NaOH 1M (150 mL) e le fasi acquose riunite sono estratte con toluene (50 mL). Le fasi tolueniche sono riunite e lavate tre volte con H₂O (50 mL), essiccate con MgSO₄, filtrate e svaporate per ottenere 13,49 g di olio scuro che diventa incolore dopo distillazione sotto alto vuoto (160 °C/0.4 mmHg) (12,0 g).

Resa: 83%.

Formula molecolare: C₁₃H₁₆O₃ (P. M.: 220.26).

I dati spettrali e i dati dell'analisi elementare non vengono riportati perché già noti in letteratura. (55)

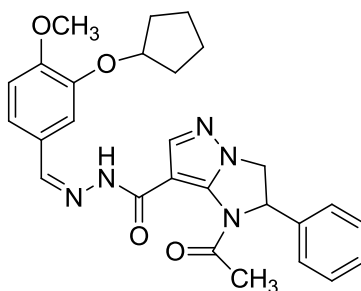
6.7 Sintesi dell' *N'*-[3-(ciclopentilossi)-4-metossibenzilidene]-2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-carboidrazide **1**



All'imidazopirazol-idrazide **5** (750 mg, 3 mmoli) sciolta in miscela di etanolo assoluto/metanolo (7:3) (20 mL), viene aggiunta la 3-ciclopentilossi-4-metossibenzaldeide (663 mg, 3 mmoli) precedentemente solubilizzata in una miscela (7:3) di etanolo assoluto/metanolo (10 mL). La miscela di reazione viene scaldata a 90 °C a riflusso per 18 h. Dopo raffreddamento precipita un solido che viene filtrato e ricristallizzato da etanolo assoluto.

Rese, caratteristiche chimico fisiche, analisi elementari e dati spettrali del composto **1** sono riportati nelle Tabelle **I**, **IV** e **VII**.

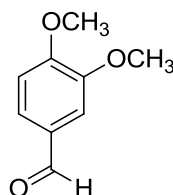
6.8 Sintesi dell'1-acetil-N'-[3-(ciclopentilossi)-4-metossibenzilidene]-2-fenil-2,3-diidro-1H-imidazo[1,2-b]pirazol-7-carboidrazide 2



N'-[3-(ciclopentilossi)-4-metossibenzilidene]-2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-carboidrazide **1** (445 mg, 1 mmole) e acetato di sodio anidro (125 mg) vengono sospesi in anidride acetica (5 mL). La miscela di reazione viene scaldata a 40-50 °C per 4 h. Dopo raffreddamento, la miscela viene versata in acqua ed estratta con diclorometano (2 x 20 mL). Le fasi organiche riunite vengono lavate con una soluzione di NaCl satura (3 x 40 mL), essiccate su MgSO₄ filtrate ed evaporate a pressione ridotta. Dopo raffreddamento in freezer precipita un solido bianco che viene ricristallizzato da etanolo assoluto.

Rese, caratteristiche chimico fisiche, analisi elementari e dati spettrali del composto **2** sono riportati nelle Tabelle **I**, **IV** e **VII**.

6.9 Sintesi della 3,4-dimetossibenzaldeide 11



Alla 4-idrossi-3-metossibenzaldeide (3.04 g, 20 mmoli) vengono aggiunti carbonato di potassio anidro (2.76 g, 20 mmoli), KOH (1.12 g, 20 mmoli) e aliquat (180 mg). La miscela di reazione viene irraggiata in forno a microonde a potenza variabile controllando che la temperatura non salga oltre i 100 °C e successivamente viene aggiunto CH₃I (8 mL) in 3 cicli: 4 mL in 30'', 2 mL in altri 30'' e infine 2 mL in 5'.

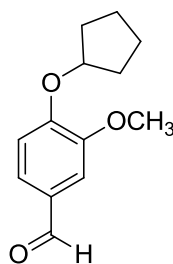
Dopo raffreddamento il grezzo viene purificato per filtrazione su Florisil usando etere dietilico come eluente. Dopo evaporazione del solvente il grezzo cristallizza per aggiunta di una miscela (1:1) di etere dietilico/etere di petrolio (p.eb. 40-60 °C).

Resa: 40%

Formula molecolare: C₉H₁₀O₃ (PM: 166.17)

I dati spettrali e i dati dell'analisi elementare non vengono riportati perché già noti in letteratura.(56)

6.10 Sintesi della 4-ciclopentilossi-3-metossibenzaldeide 12



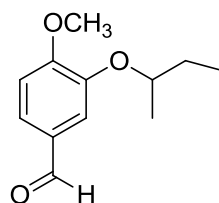
Ad una sospensione di 4-idrossi-3-metossibenzaldeide (2.5 g, 16.5 mmoli) e carbonato di potassio anidro (6.8 g, 49.5 mmoli) in etanolo (37.5 mL) viene aggiunto ciclopentilbromuro (3.5 mL, 33 mmol) a goccia a goccia. Terminata l'aggiunta si agita la miscela di reazione per 16 ore a 90 °C. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, la sospensione viene filtrata e la soluzione viene concentrata sotto vuoto. L'olio grezzo ottenuto viene purificato tramite distillazione sotto alto vuoto (160 °C/0,4 mmHg) ottenendo 2.91 g di olio giallo.

Resa: 80%.

Formula molecolare: C₁₃H₁₆O₃ (P. M.: 220,26)

I dati spettrali e i dati dell'analisi elementare non vengono riportati perché già noti in letteratura.^(57^{a-b})

6.11 Sintesi della 3-isobutilossi-4-metossibenzaldeide 13



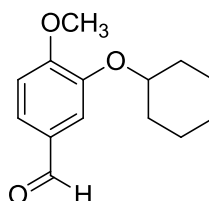
Una sospensione di 3-idrossi-4-metossibenzaldeide (1.52 g, 10 mmoli), carbonato di potassio anidro (2.07 g, 15 mmoli) e ioduro di potassio (0.05 g, 0.27 mmoli) in dimetilformammide anidra (10 mL) viene scaldata a 65 °C agitando. Si aggiunge il 2-bromobutano (1.43 mL, 1.76 g, 12.87 mmol) a goccia a goccia. Terminata l'aggiunta si agita la miscela di reazione per 22 ore a 70 °C. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, la soluzione viene versata in NaOH 1 M (200 mL) ed estratta due volte con toluene (2 x 50 mL) e due volte con etilacetato (2 x 50 mL). Le fasi organiche riunite vengono lavate con NaOH 1M (20 mL), poi con una soluzione satura di NaCl (2 x 30 mL), quindi con acqua (10 mL) essiccate su MgSO₄, filtrate e svaporate a pressione ridotta per ottenere 1.51 g di olio scuro che diventa incolore (1.05 g, 5.04 mmol) dopo distillazione in alto vuoto (160 °C/0.4 mmHg).

Resa: 51%.

Formula molecolare: C₁₂H₁₆O₃ (P. M.: 208,25).

I dati spettrali e i dati dell'analisi elementare non vengono riportati perché già noti in letteratura.(58)

6.12 Sintesi della 3-cicloesilossi-4-metossibenzaldeide 14



METODO A

Una sospensione di 3-idrossi-4-metossibenzaldeide (3.04 g, 20 mmoli), carbonato di potassio anidro (4.14 g, 30 mmoli) e ioduro di potassio (0.1 g, 0.54 mmoli) in dimetilformammide anidra (20 mL) viene scaldata a 65 °C agitando. Si aggiunge cicloesilbromuro (2.86 mL, 4.2 g, 25.74 mmoli) a goccia a goccia. Terminata l'aggiunta si agita la miscela di reazione per 22 ore a 65 °C.

Dopo raffreddamento a temperatura ambiente si diluisce con toluene (50 mL), si lava 2 volte con NaOH 1M (30 mL) e le fasi acquose riunite sono estratte con toluene (50 mL). Le fasi tolueniche sono riunite e lavate con H₂O (3 x 50 mL) e con una soluzione satura di NaCl (3 x 25 mL), essiccate con MgSO₄, filtrate e svaporate a pressione ridotta per ottenere 320 mg di olio giallo.

Resa: 7%.

Formula molecolare: C₁₄H₁₈O₃ (P. M.: 234.29)

METODO B

Alla 3-idrossi-4-metossibenzaldeide (760 mg, 5 mmoli) si aggiungono carbonato di potassio anidro (690 mg, 5 mmoli), KOH finemente polverizzato (280 mg, 5 mmoli) e aliquat (0,05 mg). Dopo vigorosa agitazione si aggiunge cicloesilbromuro (2 mL, 12 mmoli) e si scalda mediante forno a microonde a 100 °C per 6 minuti.

Il grezzo viene filtrato su Florisil usando etere dietilico come eluente. La fase eterica viene lavata con NaOH 1M (20 mL), essiccata su MgSO₄, filtrata e svaporata ottenendo 190 mg di olio giallo.

Resa: 16%

METODO C

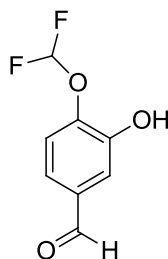
Alla 3-idrossi-4-metossibenzaldeide (760 mg, 5 mmoli) si aggiungono carbonato di potassio anidro (690 mg, 5 mmoli), KOH finemente polverizzato (280 mg, 5 mmoli), aliquat (300 mg) e successivamente cicloesilbromuro (2 mL, 12 mmoli) a goccia a goccia. La miscela viene scaldata a 70 °C in bagno ad olio, sotto agitazione, per 6 ore.

Il grezzo viene filtrato su Florisil usando etere dietilico come eluente. La fase eterea viene lavata con NaOH 1M (20 mL), essiccata su MgSO_4 , filtrata e svaporata a pressione ridotta ottenendo 380 mg di olio giallo.

Resa: 50%

I dati spettrali e i dati dell'analisi elementare non vengono riportati perché già noti in letteratura. (59)

6.13 Sintesi della 4-(difluorometossi)-3-idrossibenzaldeide 15



METODO A

Una sospensione di 3,4-diidrossibenzaldeide (1.38 g, 10 mmoli) in dimetilformammide anidra (15 mL) viene agitata in atmosfera inerte (sotto azoto) per 10 minuti. Quindi si aggiunge carbonato di cesio (3.26 g, 10 mmoli) e successivamente 2-clorodifluoro acetato di metile (1.37 g, 9.5 mmoli). La miscela viene riscaldata e agitata a 60-70 °C per 6 ore.

Dopo raffreddamento a temperatura ambiente la soluzione viene versata in acqua (30 mL) ed estratta con etilacetato (2 x 40 mL). Le fasi organiche vengono lavate con soluzione satura di NaCl (2 x 20 mL), essiccate con MgSO₄, filtrate e svaporate a pressione ridotta. L'olio che si ottiene viene purificato mediante cromatografia su gel di silice usando una miscela di etilacetato/esano (15:85) come eluente. Il prodotto puro che si ottiene è un solido bianco.

Resa: 39%

METODO B

La 4-(difluorometossi)-3-idrossibenzaldeide è stata preparata utilizzando la tecnica del microonde per incrementare le rese.

Ad una soluzione di 3,4-diidrossibenzaldeide (0.415g, 3 mmoli) in dimetilformammide anidra (5 mL) vengono aggiunti carbonato di cesio (0.975 g, 3 mmoli) e 2-clorodifluoro acetato di metile (0.520 g, 3.6 mmoli). La miscela viene irradiata con microonde, sotto pressione, aumentando la potenza fino a 300 W in 2 minuti e allo stesso tempo raffreddando con aria compressa per evitare che la temperatura superi i 90 °C. La miscela viene irradiata ancora per 3 minuti, trascorsi i quali viene raffreddata a temperatura ambiente con aria compressa per 1 minuto. Questo ciclo viene ripetuto per 5 volte per un tempo totale di reazione

di 30 minuti.

La miscela viene versata in acqua (100 mL) ed estratta tre volte con etilacetato (60 mL). Le fasi organiche vengono lavate con acqua (20 mL), con una soluzione satura di NaCl (20 mL), essiccate con MgSO₄, filtrate e svaporate a pressione ridotta. L'olio che si ottiene viene purificato mediante cromatografia su gel di silice usando una miscela di etilacetato/esano (15:85) come fase eluente. Il prodotto puro che si ottiene è un solido grigio.

Resa: 57%

P. f.: 86-88 °C

Formula molecolare: C₈H₆F₂O₃ (PM: 188.13)

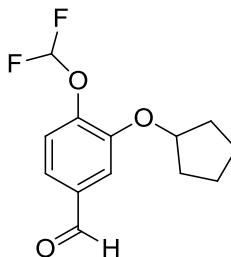
Analisi elementare: valori calcolati (%) C, 51.07; H, 5.85; Valori sperimentali trovati (%) C, 50.96; H, 6.21.

IR (KBr) cm⁻¹: 3305 (OH), 1687 (C=O).

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 6.05 (s. all, 1H, OH, scompare con D₂O); 6.65 (t, 1H, *J* = 72.6 Hz, OCHF₂); 7.26 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₅Ar); 7.45 (dd, 1H, *J* = 8.2 Hz, 2.0 Hz, H₆Ar), 7.12 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H₂Ar).

6.14 Sintesi della 3-ciclopentilossi-4-(difluorometossi)benzaldehyde

16



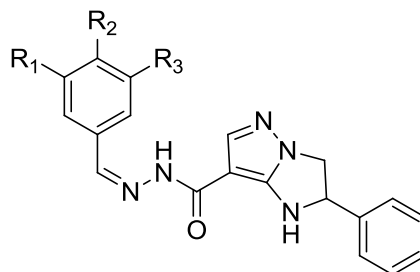
Questo intermedio è stato ottenuto con un metodo già riportato in letteratura.⁽⁴⁵⁾

Una sospensione di 4-(difluorometossi)-3-idrossibenzaldeide (1 g, 5.31 mmoli), carbonato di potassio anidro (1.1 g, 7.96 mmoli) e ioduro di potassio (0.02 g, 0.14 mmoli) in dimetilformammide anidra (10 mL) viene scaldata ed agitata a 65 °C. Si aggiunge ciclopentilbromuro (1.02, 6.85 mmoli) a goccia a goccia. Terminata l'aggiunta si agita la miscela di reazione per 22 ore a 65 °C. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente si diluisce con toluene (30 mL), si lava con NaOH 1M (2 x 30 mL) e le fasi acquose riunite sono estratte con toluene (10 mL). Le fasi tolueniche sono riunite e lavate con H₂O (3 x 60 mL), essiccate con MgSO₄, filtrate e svaporate a pressione ridotta per ottenere un olio scuro che sarà usato come tale nella fase successiva.

Resa: 87%.

Formula molecolare: C₁₃H₁₄F₂O₃ (P. M.: 256.25).

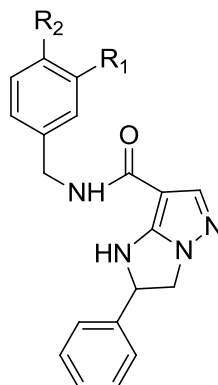
6.15 Procedura generale per la sintesi delle *N'*-(benzilidene)-2-fenil-2,3-diidro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pirazol-7-carboidrazidi 3a-f



All'imidazopirazol-idrazide **5** (244 mg, 1 mmole) sciolta in 20 mL di miscela etanolo assoluto/metanolo (7:3) viene aggiunta a goccia a goccia l'opportuna benzaldeide (1 mmole) precedentemente solubilizzata in una miscela di etanolo assoluto/metanolo (7:3) (10 mL). La miscela di reazione viene scaldata a riflusso per 18 h. La soluzione viene poi concentrata a pressione ridotta e lasciata a riposo alcune ore in freezer. Si ottengono dei solidi che sono filtrati e ricristallizzati da etanolo assoluto.

Rese, caratteristiche chimico fisiche, analisi elementari e dati spettrali dei composti **3a-f** sono riportati nelle tabelle **II**, **V**, **VIII**.

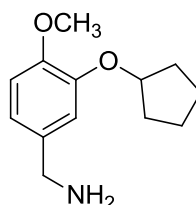
6.16 Procedura generale per la sintesi delle N-benzil-2-fenil-2,3-diidro-1H-imidazo[1,2-b]pirazol-7-carbossammidi 4a-e



Ad una soluzione dell'acido imidazopirazol carbossilico **9** (458.5 mg, 2 mmoli) in dimetilformammide anidra (6 mL) si aggiungono a goccia a goccia trietilammina (0.4 ml) e difenilfosforilazide (0.53 ml). Successivamente viene aggiunta a goccia a goccia l'opportuna benzilammina sostituita (4 mmoli). Per i composti **4a-c** e **4e** sono state usate le benzilammine disponibili in commercio mentre per il composto **4d** è stata preparata la benzilammina **20** secondo la procedura riportata nella sezione successiva. La miscela viene mantenuta in agitazione scaldando a 50 °C per 12 ore. Dopo raffreddamento, la miscela viene versata in acqua (100 mL) e lasciata in frigo per una notte. Si ottengono dei solidi che sono filtrati e ricristallizzati da etanolo assoluto.

Rese, caratteristiche chimico fisiche, analisi elementari e dati spettrali dei composti **4a-e** sono riportati nelle tabelle **III**, **VI** e **IX**.

6.17 Sintesi della -3- ciclopentilossi 4- metossibenzilammina 20



L'ossima della 3-ciclopentilossi-4-metossibenzaldeide **22** (421 mg, 1.8 mmoli) viene solubilizzata in metanolo (185 mL) per ottenere una soluzione 0.01 M che è sottoposta a riduzione catalitica mediante apparecchiatura H-CUBE impostando un flusso di 0.05 mL/min, una pressione di 70 bar e una temperatura di 90 °C. La soluzione eluita dallo strumento viene svaporata a pressione ridotta, ripresa con diclorometano e lavata con HCl 3 M (3 x 15 mL). La fase acquosa acida viene portata a pH basico con NaOH 4 M ed estratta con diclorometano. La fase organica viene essiccata con MgSO₄, filtrata e svaporata a pressione ridotta per dare un solido bianco (421 mg).

Resa: 100 %

pf: 89 – 90°C (lett.: 90°C).(60)

I dati spettrali e i dati dell'analisi elementare non vengono riportati perché già noti in letteratura. (60)

TABELLA I

Caratteristiche chimico-fisiche dei composti **1** e **2**

Comp.	P. f. (°C)	Resa (%)	Aspetto fisico
1	150-151	71	Solido bianco
2	133-134	45	Solido bianco

TABELLA II

Caratteristiche chimico-fisiche dei composti **3a-f**

Comp.	P. f. (°C)	Resa (%)	Aspetto fisico
3a	206-207	70	Solido bianco
3b	130-131	62	Solido bianco
3c	150-151	78	Solido bianco
3d	119-120	65	Solido bianco
3e	104-105	62	Solido rossiccio
3f	120-121	74	Solido bianco

TABELLA III

Caratteristiche chimico-fisiche dei composti **4a-e**

Comp.	P. f. (°C)	Resa (%)	Aspetto fisico
4a	203-204	32	Solido bianco
4b	230-231	39	Solido bianco
4c	229-230	32	Solido bianco
4d	238-239	30	Solido bianco
4e	234-235	77	Solido bianco

TABELLA IVAnalisi elementare dei composti **1e 2**

Comp.	Formula molecolare	P.M	Valori	Analisi Elementare		
				%C	%H	%N
1	$C_{25}H_{27}N_5O_3$	446,51	teorici	67,40	6,11	15,72
			sperimentali	67,41	6,10	15,35
2	$C_{27}H_{28}N_5O_4$	487,55	teorici	66,51	6,00	14,36
			sperimentali	66,71	6,40	13,96

TABELLA VAnalisi elementare dei composti **3a-f**

Comp.	Formula molecolare	P.M	Valori	Analisi Elementare		
				%C	%H	%N
3a	$C_{21}H_{21}N_5O_3$	391,42	teorici	64,44	5,41	17,85
			sperimentali	64,07	6,15	17,55
3b	$C_{24}H_{27}N_5O_3$	433,51	teorici	66,49	6,28	16,16
			sperimentali	66,68	6,52	16,04
3c	$C_{25}H_{27}N_5O_3$	445,52	teorici	67,40	6,11	15,72
			sperimentali	67,49	6,13	15,34
3d	$C_{26}H_{29}N_5O_3$	459,54	teorici	67,95	6,36	15,24
			sperimentali	67,62	6,38	15,59
3e	$C_{25}H_{25}F_2N_5O_3$	481,49	teorici	62,36	5,23	14,55
			sperimentali	62,10	5,60	14,32
3f	$C_{22}H_{23}N_5O_4$	421,45	teorici	62,70	5,50	16,62
			sperimentali	62,96	5,43	16,31

TABELLA VI

Analisi elementare dei composti **4a-e**

Comp.	Formula molecolare	P.M	Valori	Analisi Elementare		
				%C	%H	%N
4a	$C_{20}H_{20}N_4O_2$	348,40	teorici	68,95	5,79	16,18
			sperimentali	69,11	5,50	15,89
4b	$C_{20}H_{17}F_3N_4O_2$	402,37	teorici	59,70	4,26	13,92
			sperimentali	59,89	4,39	13,71
4c	$C_{21}H_{22}N_4O_3$	378,43	teorici	66,65	5,86	14,81
			sperimentali	66,80	5,49	14,48
4d	$C_{19}H_{16}F_2N_4O$	354,35	teorici	64,40	4,55	15,81
			sperimentali	64,58	4,61	14,49
4e	$C_{25}H_{28}N_4O_3$	432,52	teorici	69,42	6,53	12,95
			sperimentali	69,65	6,38	12,65

TABELLA VII

Spettri IR ed ^1H NMR dei composti **1** e **2**

Comp.	IR (KBr) cm^{-1}	^1H -NMR (DMSO) δ
1	3415-3324 (NH) 1633 (CONH) 1581 (C=N)	1.47-2.20 (m, 8H, ciclopent.); 3.90 (s, 3H, OCH ₃); 4.07 (q.t., 1H, H ₃); 4.62 (q.t., 1H, H ₂); 4.79-4.95 (m, 1H, OCH); 5.50 (q. t, 1H, H ₃); 6.83 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H ₅ Ar); 7.09 (dd, $J = 8.2$, $J=1.6$ Hz, 1H, H ₆ Ar); 7.29 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H ₂ Ar); 7.32-7.52 (m, 5H, Ar); 7.82 (s, 1H, H ₆); 8.25 (s. all., 1H, NH scompare con D ₂ O); 9.18 (s, 1H, CH=N).
2	3400-3223 (NH) 1645 (CONH) 1510 (C=N)	1.51-2.20 (m, 8H, ciclopent.); 3.91 (s, 3H, OCH ₃); 3.97 (s, 3H, CH ₃ C=O); 4.15-4.25 (m, 1H, H ₃); 4.78-5.03 (m, 2H, H ₂ + OCH); 5.78-5.91 (m, 1H, H ₃); 6.85 (d, $J = 10$ Hz, 1H, H ₅ Ar); 7.00 (dd, $J = 10$, $J=2$ Hz, H ₆ Ar); 7.15- 7.25 (m, 1H, H ₂ Ar); 7.35-7.60 (m, 5H, Ar); 8.15 (s, 1H, H ₆); 8.30 (s. all., 1H, NH scompare con D ₂ O); 9.87 (s, 1H, CH=N).

TABELLA VIII

Spettri IR ed ^1H NMR dei composti **3a-f**

Comp.	IR (KBr) cm^{-1}	^1H -NMR (DMSO) δ
3a	3432-3213 (NH) 1700-1600 (CONH + C=N)	3.70-3.92 (m, 7H, 2 OCH ₃ + H ₃); 4.63 (q.t., 1H, H ₃); 5.48 (q.t., 1H, H ₂); 7.02 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H ₅ Ar); 7.09 (dd, $J = 7.8$, $J=1.6$ Hz, 1H, H ₆ Ar); 7.24-7.53 (m, 6H, 5H Ar + H ₂ Ar + H ₆); 8.00 (s. all., 2H, 2NH scompaiono con D ₂ O); 11.08 (s, 1H, CH=N).
3b	3373 (NH) 1631 (CONH) 1594 (C=N)	0.95 (t, 3H, <u>CH</u> ₃ CH ₂); 1.25 (d, $J = 5.6$ Hz, 3H, <u>CH</u> ₃ CH); 1.45-1.80 (m, 2H, CH <u>CH</u> ₂ CH ₃); 3.60-3.95 (m, 4H, OCH ₃ + OCH); 4.20-4.40 (q.t., 1H, H ₃); 4.60 (q.t., 1H, H ₂); 5.40 (q.t., 1H, H ₃); 6.90-7.60 (m, 8H, Ar); 7.95 (s. all., 2H, H ₆ + NH, 1H scompare con D ₂ O); 11.10 (s, 1H, CH=N).
3c	3392- 3234 (NH) 1644 (CONH) 1594 (C=N)	1.47-2.20 (m, 8H, ciclopent.); 3.72-3.95 (m, 4H, OCH ₃ + H ₃); 4.62 (q. t., 1H, H ₂); 4.75-4.92 (m, 1H, OCH); 5.48 (q.t., 1H, H ₃); 7.00 (d, $J = 10$ Hz, 1H, H ₅ Ar); 7.18 (dd, $J = 10$, $J=1.8$ Hz, 1H, H ₆ Ar); 7.23-7.52 (m, 7H, 5H Ar+ + H ₂ Ar + H ₆); 7.99 (s. all., 2H, 2NH scompare con D ₂ O); 11.07 (s, 1H, CH=N).
3d	3584 (NH) 1633 (CONH) 1581 (C=N)	1.20-2.20 (m, 10H, cicloes.); 3.80-4,10 (m, 4H, OCH ₃ + OCH); 4.25 (q.t., 1H, H ₃); 4.40-4.60 (q.t., 1H, H ₂); 5.40 (q.t., 1H, H ₃); 6.60-7.60 (m, 8H, Ar); 7.90 (s. all., 1H, NH scompare con D ₂ O); 8.20 (s, 1H, H ₆); 10.15 (s, 1H, CH=N).

Comp.	IR (KBr) cm ⁻¹	¹ H-NMR (DMSO) δ
3e	3228, 2961 (NH) 1642 (CONH) 1599 (C=N)	1.52-2.00 (m, 8H, ciclopent.); 3.82 (q. t., 1H, H ₃); 4.64 (q.t., 1H, H ₂); 4.87-4.99 (m, 1H, OCH); 5.48 (q.t., 1H, H ₃); 7.07 (s, 1H, OCHF ₂); 7.17-7.54 (m, 9H, 8H Ar + H ₆); 7.99 (s., 1H, CH=N).
3f	3400-3200 (NH) 1643 (CONH) 1611 (C=N)	3.60-3.90 (m, 9H, 3OCH ₃); 4.60 (t., 1H, H ₃); 5.30 (q.t., 1H, H ₃); 5.40 (q.t., 1H, H ₃); 6,90-7.60 (m, 7H, Ar); 7.90 (s. all., 1H, H ₆); 11.10 (s.all., 1H, CH=N).

TABELLA IX

Spettri IR ed ^1H -NMR dei composti **4a-e**

Comp.	IR (KBr) cm^{-1}	^1H -NMR (DMSO) δ
4a	3500-3100 (NH) 1635 (CONH)	3.80 (s, 3H, OCH_3); 3.95 (q.t., 1H, H_3); 4,40 (s, 2H, CH_2); 4.55 (q.t., 1H, H_2); 5.45 (q.t., 1H, H_3); 5.70 (s. all., 1H, NH scompare con D_2O); 6.80-7.60 (m, 9H, Ar); 7.80 (s, 1H, H_6)
4b	3302 (NH) 1627 (CONH)	3.80 (q.t., 1H, H_3); 4.40 (d, $J=6.0$ Hz, 2H, CH_2 diventa s con D_2O); 4.60 (q.t., 1H, H_2); 5.40 (q.t., 1H, H_3); 5.70 (s. all., 1H, NH scompare con D_2O); 7.15-7.60 (m, 9H, Ar); 7.75 (s, 1H, H_6).
4c	3376-3265 (NH) 1623 (CONH)	3.50-3.85 (m, 7H, 2 OCH_3 + H_3); 4.30 (d, $J=5.80$ Hz, 2H, CH_2 diventa s con D_2O , 2H, CH_2); 4,60 (q.t., 1H, H_2); 5.40 (q.t., 1H, H_3); 6.60-7.50 (m, 8H, Ar); 7.70 (s, 1H, H_6) ; 8,05 (s. all., 1H, NH scompare con D_2O)
4d	3350-3100 (NH) 1608 (CONH)	3.80 (q.t., 1H, H_3); 4.35 (s, 2H, CH_2); 4.55 (q.t., 1H, H_2); 5.40 (q.t., 1H, H_3); 6.90-7.60 (m, 8H, Ar); 7.75 (s, 1H, H_6); 8.20 (s. all., 1H, NH scompare con D_2O)
4e	3500-3100 (NH) 1635 (CONH)	3.80 (q.t., 1H, H_3); 4.40 (d, $J=6.0$ Hz, 2H, CH_2 diventa s con D_2O); 4.60 (q.t., 1H, H_2); 4.65-4.85 (m, 1H, OCH) 5.45 (q.t., 1H, H_3); 5.70 (s. all., 1H, NH scompare con D_2O); 6.65-7.60 (m, 8H, Ar); 7.75 (s, 1H, H_6)

Bibliografia

- [1] Moroni M., Esposito R., Antinori S., *Malattie Infettive* 8/ed., pag 486-502.
- [2] Passalacqua G., Braidò F. Elementi di malattie dell'apparato respiratorio, *Dispense per il Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia*, pag 54-58.
- [3] Brennan P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*, *Tuberculosis* **2003**, 83, 91-97.
- [4] Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action, *Current Opinion in Chemical Biology* **1997**, 1, pag 579-588.
- [5] Passalacqua G., Braidò F. Elementi di malattie dell'apparato respiratorio, *Dispense per il Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia*, pg 39.
- [6] Bates J. H., Stead W. W. The history of tuberculosis as a global epidemic, *Medical clinics of North America*, **1993**, 77, 1205-1217.
- [7] Fatkenheuer G., Taelman H., Lepage P., Scwenk A., Wenzel R., The return of tuberculosis, *Diagn Microbiol Infect Dis* **1999**, 34, 139-146.
- [8] WHO, *Global Tuberculosis Report* **2014**.
- [9] Morandi M. , d'Amato S. *La Tuberculosis in Italia*, Rapporto **2008**, Istituto Superiore di Sanità, Ministero della Salute, Servizio Sanitario Regionale Emilia Romagna.
- [10] *Epidemiologia della tubercolosi in Italia (1995-2007)*. Ufficio V - Malattie Infettive e Profilassi Internazionale Dipartimento della Prevenzione e della Comunicazione – DG Prevenzione Sanitaria, Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali.
- [11] Thomas L. Lemke, David A. Williams. Foye's Principi di chimica farmaceutica, quinta edizione, pag 1232-1246.
- [12] Linee guida per il controllo della malattia tubercolare, su proposta del Ministro della Sanità, ai sensi dell'art. 115, comma 1, lettera b), del decreto legislativo 31 marzo 1998, n. 112.
- [13] WHO, *The stop TB strategy*, Building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goals.
- [14] WHO, What is DOTS? A Guide to Understanding the WHO-

recommended TB Control Strategy Known as DOTS, **1999**.

- [15] Manuale della Tubercolosi, Dipartimento Federale dell'Interno (DFI) Ufficio federale della sanità pubblica UFSP, Maggio **2007**.
- [16] World Health Organization. Treatment of tuberculosis. Guidelines for National Programmes. World Health Organization, editor. WHO / CDS / TB **2003**, Geneva.
- [17] Kwara A., Flanigan T.P., Carter E.J. Highly active antiretroviral therapy (HAART) in adults with tuberculosis: current status. *Int J Tuberc Lung Dis*, **2005**, 9, pag 248-257.
- [18] Prevention and treatment of tuberculosis among patients infected with human immunodeficiency virus: principles of therapy and revised recommendations. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep*, **1998**, 47, pag 1-58.
- [19] Burman W.J. Issues in the management of HIV-related tuberculosis. *Clin Chest Med*, **2005**, 26, 283- 290.
- [20] Feja K., Saiman L. Tuberculosis in children. *Clin Chest Med*, **2005**, 26, pag 295-312.
- [21] Trebucq A. Should ethambutol be recommended for routine treatment of tuberculosis in children? A review of the literature. *Int J Tuberc Lung Dis*, **1997**, 1, pag 12-15.
- [22] Schaberg T., Rebhan K., Lode H. Risk factors for side-effects of isoniazid, rifampin and pyrazinamide in patients hospitalized for pulmonary tuberculosis. *Eur. Respir. J.*, **1996**, 9, pag 2026-2030.
- [23] Dossing M., Wilcke J.T.R., Askgaard D.S., Nybo B. Liver injury during antituberculosis treatment: an 11-year study. *Tubercle Lung Dis.*, **1996**, 77, pag 335-340.
- [24] Huang Y.S., Chern H.D., Su W.J., Wu J.C., Lai S.L., Yang S.Y. Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology*, **2002**, 35, pag 883-889.
- [25] Griffith D.E., Brown-Elliott B.A., Shepherd S., McLarty J., Griffith L., Wallace R.J. Ethambutol Ocular Toxicity in Treatment Regimens for Mycobacterium avium Complex Lung Disease. *Am J Respir Crit Care*

Med, **2005**, 172, pag 250-253.

- [26] Ormerod L.P., Horsfield N. Frequency and type of reactions to antituberculosis drugs: observations in routine treatment, *Tubercle Lung Dis*, **1996**, 77, pag 37–42.
- [27] Veen J., Raviglione M., Rieder H.L., Migliori G.B., Graf P., Grzemska M. Standardized tuberculosis treatment outcome monitoring in Europe. Recommendations of a Working Group of the World Health Organization (WHO) and the European Region of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) for uniform reporting by cohort analysis of treatment outcome in tuberculosis patients. *Eur Respir J*, **1998**, 12, pag 505-510.
- [28] *La vaccinazione antitubercolare* – DPR 7 novembre **2001** n. 465.
- [29] O'Brien R.J., Spigelman M. New drugs for tuberculosis: current status and future prospects. *Clin Chest Med*, **2005**, 26, pag 327- 340.
- [30] Duncan K., Barry C.E. Prospects for new antitubercular drugs. *Curr Opin Microbiol*, **2004**, 7, pag 460-465.
- [31] Pletz M.W., De Roux A., Roth A., Neumann K.H., Mauch H., Lode H. Early bactericidal activity of moxifloxacin in treatment of pulmonary tuberculosis: a prospective, randomized study. *Antimicrob Agents Chemother*, **2004**, 48, pag 780-782.
- [32] *Drug-resistant tb surveillance & response supplement global tuberculosis report* **2014**.
- [33] World Health Organization. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. *Geneva: WHO*, **2003**.
- [34] Zhang Y., Heym B., Allen B. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium Tuberculosis. *Nature*, **1992**, 358, pag 591-593.
- [35] Johnsson K., Schultz P.G. Mechanistic studies of the oxidation of isoniazid by the catalase-peroxidase from Mycobacterium Tuberculosis. *J Am Chem Soc*, **1994**, 116, pag 7425-7426.
- [36] Blanchard J.S. Molecular mechanisms of drug resistance in Mycobacterium Tuberculosis. *Annu Rev Biochem*, **1996**, 65, pag 215-239.

- [37] Scorpio A., Zhang Y. Mutation in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamide, cause resistance to the antituberculosis drug pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med*, **1996**, 2, pag 662-667.
- [38] Dr. Jean-Pierre Zellweger. Tuberculosis multifarmaco-resistente (*MDR-TB*), *European Lung Foundation*.
- [39] Shah N.S., Wright A., Drobniewski F. Extreme drug resistance in tuberculosis (“XDR-TB”): Global survey of supranational reference laboratories for *Mycobacterium tuberculosis* with resistance to second-line drugs. *Int J Tuberc Lung Dis*, **2005**, 9, pag 77-88.
- [40] Holtz T.H., Riekstina V., Zarovska E., Laserson K.F., Wells C.D., Leimane V. XDR-TB: extreme drug-resistance and treatment outcome under DOTS-Plus, Latvia, 2000-2002. *Int J Tuberc Lung Dis*, **2005**, 9, pag 58-88.
- [41] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Extensively drug-resistant tuberculosis - United States, 1993-2006. *MMWR*, **2007**, 56, pag 250-253.
- [42] Lawn S.D., Wilkinson R. Extensively drug resistant tuberculosis. *BMJ*, **2006**, 333, pag 559-60.
- [43] Remuiñán M.J., Pérez-Herrán E., Rullás J., Alemparte C., Martínez-Hoyos M., Dow D.J., Afari J., Mehta N., Esquivias J., Jiménez E., Ortega-Muro F., Fraile-Gabaldón M.T., Spivey V.L., Loman N.J., Pallen M.J., Constantinidou C., Minick D.J., Cacho M., Rebollo-López M.J., González C., Sousa V., Angulo-Barturen I., Mendoza-Losana A., Barros D., Besra G.S., Ballell L., Cammack N. Tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-carboxamide and N-benzyl-6',7'-dihydrospiro[piperidine-4,4'-thieno[3,2-c]pyran] analogues with bactericidal efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* targeting MmpL3. *Plos One* 8, **2013**, pag 1-10.
- [44] Brazier J. S., S. A. Smith. Evaluation of the Anoxomat: a new technique for anaerobic and microaerophilic clinical bacteriology. *J. Clin. Pathol.* 42, **1989**, pag 640-644.
- [45] Changsen C., S. G. Franzblau, P. Palittapongarnpim. Improved green fluorescent protein reporter gene-based microplate screening for

- antituberculosis compounds by utilizing an acetamidase promoter. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, **2003**, pag 3682-3687
- [46] Pauli G. F., R. J. Case, T. Inui, Y. Wang, S. Cho, N. H. Fischer, and S. G. Franzblau. New perspectives on natural products in TB drug research. *Life Sci.*, 78, **2005**, pag 485-494.
- [47] Gavhane S. B., Wakade S. M., Kadam, S.M. *PCT Int. Appl.* **2012**, WO 2012147098.
- [48] Thomas A., Balasubramian L.A., Gharat J.R., Mohite V.S.P.R., Lingam A.D., Lakdawala U., Karunakaran R.V. *PCT Int. Appl.* **2004**, WO 2004016596
- [49] O. Bruno, C. Brullo, N. Arduino, S. Schenone, A. Ranise, F. Bondavalli, L. Ottonello, P. Dapino, F. Dallegri "Synthesis and biological evaluation of neutrophilic inflammation inhibitors" *Il Farmaco* **2004**, 59, 223-235.
- [50] Michael V. Lancaster, Rebecca D. Fields, Antibiotic and cytotoxic drug susceptibility assays using resazurin and poisoning agents, **1996**, US5501959 A."
- [51] Pieroni, M., Wan, Cho, S., Franzblau, S. G., Costantino, G.; Original article Design, synthesis and investigation on the structure-activity relationships of N-substituted 2-aminothiazole derivatives as antitubercular agents, *Eur J Med Chem*, **2014**, 72, 26-34.
- [52] Benoit G.. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1939**, 6, pag 708.
- [53] Bondavalli, F.; Botta, M.; Bruno, O.; Ciacci, A.; Corelli, F.; Fossa, P.; Lucacchini, A.; Manetti, F.; Martini, C.; Menozzi, G.; Mosti, L.; Ranise, A.; Schenone, S.; Tafi, A.; Trincavelli, M. L. Synthesis, Molecular Modeling Studies, and Pharmacological Activity of Selective A1 Receptor Antagonists, *J Med Chem* **2002**, 45, 4875.
- [54] O. Bruno, C. Brullo, F. Bondavalli, A. Ranise, S. Schenone, M. S. Falzarano, K. Varani, S. Spisani "Phenyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pyrazole derivatives: new potent inhibitors of fMLP-induced neutrophil chemotaxis" *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, 17, 3696-3701.
- [55] M.J. Ashton, D.C. Cook, G. Fenton, J.A. Karlsson, M.N. Palfreyman, D. Raeburn. Selective type IV phosphodiesterase inhibitors as antiasthmatic agents. The synthesis and biological activities of 3-(cyclopentyloxy)-4-

- methoxybenzamides and analogues. *J Med Chem* **1994**, 37, ,1696-1703.
- [56] Loupy A., Mustapha M. Monomethylation on 3,4-dihydroxybenzaldehyde as an alternate route to isovanillin. *Org Prep and Proc Inter* **1990**, 22, 99-102.
- [57] (a) Jitendra M.G., Balasubramanian G., Pravin S.Y., Sandip D.P., Laxmikant A.G. Synthesis of multi-substituted dibenzo[b,d]furan. *J Het Chem* **2008**, 45, 797-801
- (b) Zammit S.C., Cox A.J., Gow R.M. , Zhang Y., Gilbert R.E., Krum H., Kelly D.J., Williams S.J. Evaluation and optimization of antifibrotic activity of cinnamoyl anthranilates. *Bioor Med Chem Lett* **2009**, 19, 7003-7006.
- [58] Berghausen J., Buschmann N., Furet, P., Gessier F., Hergovich L.J., Holzer P., Jacoby E., Kallen J., Masuya K., Pissot S. C. Isoquinolinone and quinazolinone derivatives as MDM2 and MDM4 inhibitors and their preparation and use for the treatment of diseases. *PCT Int. Appl.* **2011**, WO 2011076786,
- [59] Fenton G., Morley, A.D., Palfreyman M.N., Ratcliffe A.J., Harp B.W., Thurairatnam S., Vacher, B.Y. J., Ashton M.J., Cook D.C., Hills S.J., McFarlane I.M., Vicker N. *N*-(Hetero)aryl-3,4-(cyclo)alkoxybenzamides and analogs useful as tumor necrosis factor and c-AMP phosphodiesterase inhibitors. *U.S. Pat. Appl. Publ.*, **1999**, 5935978.
- [60] Dollinger H., Mack J., Martyres D., Jung B., Nickolaus P. Preparation of pteridines as PDE4 phosphodiesterase inhibitors for the treatment of inflammatory diseases. *U.S. Pat. Appl. Publ.*, **2006**, 20060116373.