

Químicos de la UIB diseñan nuevas moléculas para hacer frente a las estrategias de resistencia bacteriana

PALABRAS CLAVE:
antibióticos
beta-lactámicos,
beta-lactamasas,
serinenzimas,
química
computacional

Una nueva familia de compuestos ha sido modelada por el grupo de Reactividad Molecular y Diseño de Fármacos con el objeto de inactivar las beta-lactamasas, unos enzimas bacterianos que, en los últimos años, han reducido de forma drástica la eficacia de los antibióticos

KEYWORDS:
beta-lactam
antibiotics, beta-
lactamasas,
elastases, serine
enzymes,
computational
chemistry

Diseñar nuevas moléculas con un efecto antibiótico, capaces de hacer frente a las estrategias de resistencia de las bacterias, es la tarea que se ha propuesto el grupo de Reactividad Molecular y Diseño de Fármacos, un equipo de investigadores del Departamento de Química i del Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS) de la UIB.

El mal uso y el abuso de los antibióticos beta-lactámicos ha potenciado una serie de adaptaciones evolutivas de las bacterias y una diversificación de sus defensas. Enzimas especializados en inhibir la reactividad de los antibióticos han proliferado y la acción de aquellos que un día fueron tan efectivos, como la amoxicilina, ha quedado muy reducida. La llamada Química Computacional toma el relevo de los que, hasta ahora, habían sido los grandes suministradores de antibióticos, los hongos. Con la ayuda de programas de cálculo y diseño molecular, los investigadores han conseguido alumbrar toda una familia de compuestos cuya composición química y arquitectura los hacen idóneos para hacer frente a una de las armas más efectivas de las bacterias, las beta-lactamasas.

Introducción

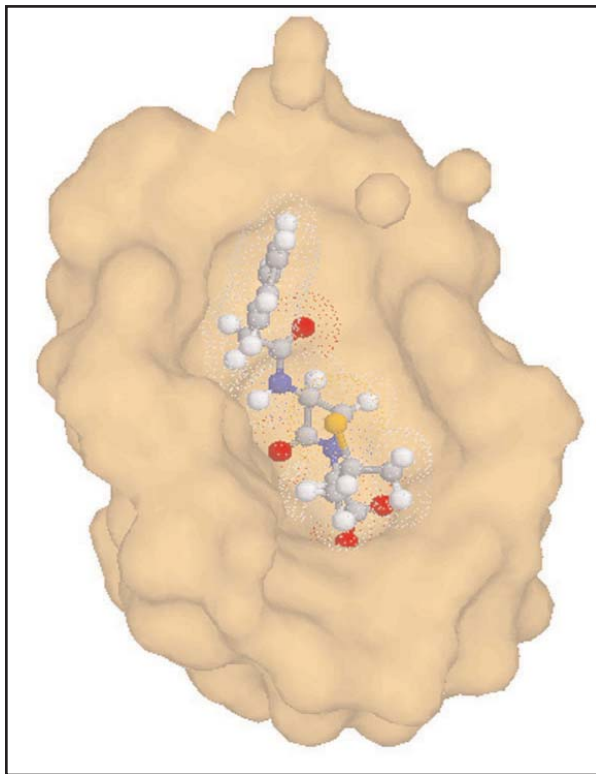
Los mecanismos defensivos que han desarrollado muchas bacterias, haciéndose resistentes o refractarios a los tratamientos con antibióticos, constituye hoy día uno de los problemas más importantes para la salud. Numerosos procesos infecciosos que no hace mucho tiempo eran detenidos



La doctora Josefa L. Donoso visualizando en la pantalla del ordenador una modelización tridimensional de una serinenzima.

con la administración de determinados antibióticos como la amoxicilina, por ejemplo, hoy prosiguen su curso sin verse afectados. Se trata de un problema de salud pública a escala planetaria y se presenta tanto en el tratamiento de unas simples anginas como en las más graves complicaciones que suponen las infecciones nosocomiales, intrahospitalarias.

La resistencia bacteriana está asociada, como no podía ser de otra manera, a la genética. Es gracias a la mutación de determinados genes que una serie de cepas bacterianas han conseguido plantar cara a las moléculas que hasta el momento las mantenían a raya. Se trata de un caso más, esta vez a escala microbiana, de la llamada selección natural. Sólo determinadas cepas bacterianas, aquellas que debido a algunas mutaciones genéticas se han mostrado capaces de resistir el ataque de los antibióticos, han conseguido sobrevivir.



Superficie del sitio activo de una beta-lactamasa con la molécula de un antibiótico (penicilina G), antes de empezar la reacción hidrolítica.

Además de la mutación, un fenómeno azaroso, la transferencia genética constituye una segunda causa del considerable aumento de la resistencia que se aprecia en poblaciones bacterianas. Esta transferencia de los genes que proporcionan la resistencia de una

bacteria a otra se realiza por medio de los llamados plásmidos.

El uso sostenido de antibióticos y, sobre todo, su mal uso con la administración de dosis inadecuadas y sin prescripción médica, sólo ha servido para agravar el problema y beneficiar a las cepas bacterianas resistentes. Lo que ahora acontece había sido previsto hace años. La existencia de algunos mecanismos de defensa bacteriana ya se detectaron antes del uso generalizado de la penicilina y el mismo Alexander Fleming ya advirtió que un uso indiscriminado de antibióticos podía favorecer el desarrollo de esos sistemas de defensa.

¿Cómo actúa un antibiótico beta-lactámico?

Entre los antibióticos más utilizados destacan los llamados beta-lactámicos, llamados así porque el núcleo más esencial de su estructura y su verdadero sitio activo es el conocido "anillo beta-lactámico", compuesto por tres átomos de carbono y un átomo de nitrógeno.

Estos antibióticos actúan con una estrategia muy concreta: inactivan los enzimas que construyen las paredes celulares de las bacterias. Estos enzimas (las transpeptidasas, las carboxipeptidasas y las endopeptidasas) son esenciales para sintetizar la pared celular. Entre los más conocidos se encuentran la penicilina, las cefalosporinas, los carbapenémicos y los monobactámicos. El antibiótico actúa engañando al enzima. Pero, ¿cómo se puede engañar a un enzima?

El enzima es una proteína que tiene una determinada misión, en este caso está programada para construir la pared celular que ha de separar la célula bacteriana del exterior. Se trata de un papel de gran importancia pues la pared celular es indispensable para la bacteria. La pared o cápsula desempeña varias funciones:

- Protege a la bacteria evitando que sea fagocitada por las células del sistema inmunitario del organismo infectado.
- Aísla a la bacteria del entorno y evita que no estalle. Téngase en cuenta que en un medio normal las bacterias presentan una gran presión osmótica interna respecto a la del exterior (de 5 a 20 atmósferas).
- Aísla a la célula bacteriana del medio impidiendo

también su desecación.

d) Permite a la bacteria fijarse sobre sustratos.

El trabajo de este tipo de enzimas es muy parecido a la del obrero que debe levantar un muro de ladrillos. Como el obrero, el enzima coge los polímeros (los ladrillos) y los va uniendo hasta hacer la pared.

La pared celular es una estructura rígida constituida por una capa de mureína, en realidad una red de moléculas de peptidoglicano que da forma a la célula bacteriana. En todas las bacterias, este peptidoglicano que constituye la mureína es un polímero formado por largas cadenas de un polisacárido resultante de la unión de dos monómeros: la acetilglucosamina y el ácido acetilmurámico.

El encargado de encajar los monómeros y construir largas cadenas de polisacáridos para formar esa red de peptidoglicano es el enzima, al igual que un obrero coge los ladrillos y añadiendo cemento levanta la pared.

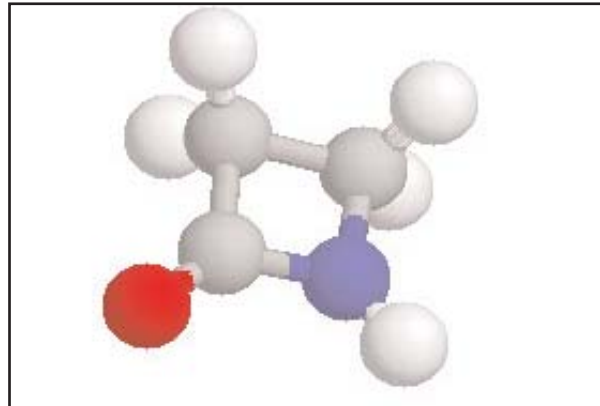
Detengámonos en el obrero. ¿Qué podríamos hacer para inutilizar ese obrero; para evitar que siga levantando la pared? Una fórmula sería mantener ocupadas sus manos, impidiendo que coja más ladrillos. Para hacerlo deberemos engañar al obrero; deberemos hacerle creer que coge un ladrillo cuando en realidad habremos cambiado el ladrillo por otra estructura que una vez haya cogido no podrá soltar. Ese es precisamente el modo en que actúa un antibiótico beta-lactámico. En enzima (el obrero) a la hora de construir la red de peptidoglicano (el muro) reconoce los polímeros (los ladrillos) gracias a una estructura que encaja con el ladrillo (la mano). El antibiótico se sitúa en el anillo beta-lactámico del enzima haciéndole creer que es un polímero. Se encaja perfectamente y no deja al enzima que siga construyendo la pared.

El contraataque de los enzimas

Como hemos dicho antes, resulta evidente que las bacterias han desarrollado estrategias de defensa ante este tipo de ataque de los antibióticos beta-lactámicos. Sin extendernos demasiado, el simple hecho de que la amoxicilina se comenzara a comercializar en dosis de 125 miligramos y que ahora alcance dosis de 1.000 miligramos, nos indica que las bacterias han

desarrollado mecanismos muy eficaces de resistencia.

Uno de esos mecanismos es la producción por parte de las bacterias de las beta-lactamasas. Como su propio nombre indica, se trata de enzimas que se han especializado en dirigir su ataque contra los antibióticos beta-lactámicos. Lo más curioso es que las



Detalle del anillo beta-lactámico.

*Código de colores:
Blanco = átomo de hidrógeno*

Rojo = átomo de oxígeno

Azul = átomo de nitrógeno

Gris = átomo de carbono

beta-lactamasas pertenecen a la misma familia que las proteasas, aquellos enzimas que construyen la pared y que son atacados por los antibióticos. La evolución en este caso, espoleada por el ataque de los antibióticos, ha favorecido la diversificación de estos enzimas: mientras unos siguen haciendo su tarea constructora, otros muy parecidos a ellos se han especializado en atacar a los antibióticos impidiendo que estos puedan llegar hasta la pared celular.

Si el antibiótico engañaba a la proteasa, ahora es la beta-lactamasa que engaña primero al antibiótico. El antibiótico toma a las segundas por las primeras. Confiado se une a una beta-lactamasa pero su futuro está decidido: quedará fragmentado y además no conseguirá que la unión del anillo beta-lactámico sea duradero. La beta-lactamasa, tras fragmentarlo e inactivarlo se separa de él y sigue su camino.

El campo de batalla: la vanguardia y la retaguardia

Planteada así la batalla por parte de los enzimas bacterianos, con una vanguardia de beta-lactamasas que no dejan pasar al antibiótico para que llegue a la pared celular e inactive su construcción, la investigación en el campo de la química se centra en conseguir mejorar las moléculas de antibiótico para

a) Molécula de penicilina g.
b) Molécula más sencilla de la familia de derivados aza-beta-lactámicos.

En verde está señalado el ciclo beta-lactámico.
En el compuesto b, el átomo de carbono se ha sustituido por un átomo de nitrógeno.

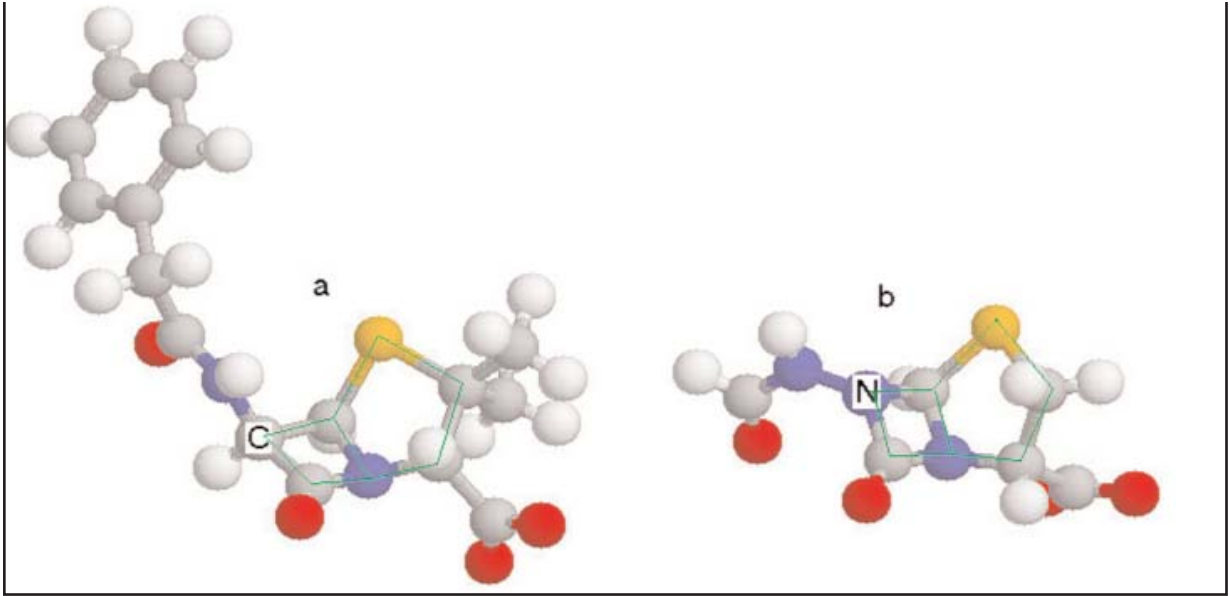
Código de colores:
Blanco = átomo de hidrógeno

Rojo = átomo de oxígeno

Azul = átomo de nitrógeno

Amarillo = átomo de azufre

Gris = átomo de carbono



que resistan ese primer ataque.

En realidad, algunos de los fármacos que hoy día se muestran más efectivos para la detención de algunas infecciones están compuestos por dos tipos de antibiótico que actúan sinérgicamente: mientras uno se enfrenta con las beta-lactamasas, el otro tiene tiempo de llegar hasta la pared e inactivar a las proteasas.

El trabajo del Grupo de Reactividad Molecular y Diseño de Fármacos de la UIB, dirigido por el doctor Francisco Muñoz, se ha centrado precisamente en el estudio de las propiedades estructurales y químicas de las moléculas de antibiótico con el objetivo de mejorarlas y diseñar nuevas moléculas todavía más efectivas.

Los investigadores han trabajado en dos tipos de antibiótico: en los inhibidores de los enzimas constructores de la pared celular y muy especialmente en los que deben enfrentarse al ataque de las beta-lactamasas.

Partiendo del ácido clavulánico, un inhibidor de beta-lactamasas que se obtiene de manera natural a partir de un hongo (*Streptomyces clavuligerus*), el grupo ha desarrollado un modelo de molécula de un derivado que muestra un poder inhibidor todavía mayor. En realidad, los investigadores no hacen sino aprovechar la guerra declarada entre bacterias y hongos por el sustrato en la misma naturaleza.

Cabe decir que el trabajo que lleva a cabo el grupo de investigadores no se limita sólo a modificar la composición química de una molécula. Diseñar un nuevo antibiótico es una tarea comparable a la que realiza un arquitecto, puesto que las moléculas actúan de una determinada manera no solo en función de sus

átomos sino también en función de cómo están estos dispuestos dentro de la estructura general.

Para la doctora Josefa Donoso, "una molécula enzimática es como un bosque. Si sólo te fijas en los átomos es como si mirases únicamente los árboles sin tener la perspectiva general del bosque entero". Y es que este "bosque de átomos" que es la molécula presenta salientes, chaflanes, rincones, entradas, pasillos.

Diseñar un nuevo antibiótico es un trabajo comparable al de un arquitecto, ya que las moléculas actúan de una determinada manera no sólo en función de sus átomos sino también en función de la disposición espacial de estos átomos

El elemento, no sólo químico, sino también estructural y arquitectónico del antibiótico beta-lactámico es el llamado "anillo beta-lactámico", mencionado con anterioridad. Se trata del punto de unión con los enzimas que pretende desactivar. Si ese punto de unión del antibiótico y el enzima no coinciden como un candado y su llave, no hay nada que hacer. Por tanto, la tarea principal a la hora de diseñar un nuevo antibiótico es precisamente la modelización del lugar esencial donde se da la reacción química. En el caso concreto que nos ocupa, habíamos comprobado como la beta-lactamasa conseguía inhibir la acción de los antibióticos, fragmentándolos y desligándose de la unión con ellos. Eso lo consigue gracias a una sola molécula de agua. En efecto, el

enzima hidroliza la unión. Ha evolucionado hasta modificar la arquitectura del punto de unión con el antibiótico permitiendo que "pase" esa molécula de agua. El ácido clavulánico, que no es un buen inhibidor de la construcción de la pared bacteriana, se muestra muy efectivo al enfrentarse a las beta-lactamasas. El clavulánico se avanza a la estrategia de la beta-lactamasa, aplacando la táctica de la autodestrucción. No espera que lo fragmenten, se fragmenta antes él mismo, y al hacerlo impide que la unión con la beta-lactamasa se rompa, inactivándola.

Aquello que han perseguido los investigadores del Grupo de Reactividad Molecular y Diseño de Fármacos de la UIB es modelizar una molécula que tuviera unas buenas características como antibiótico y que, además, sea capaz de detener a las beta-lactamasas todavía con mayor eficacia que el clavulánico.

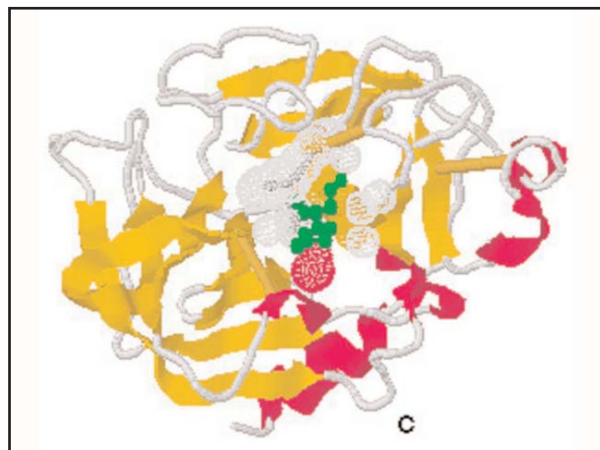
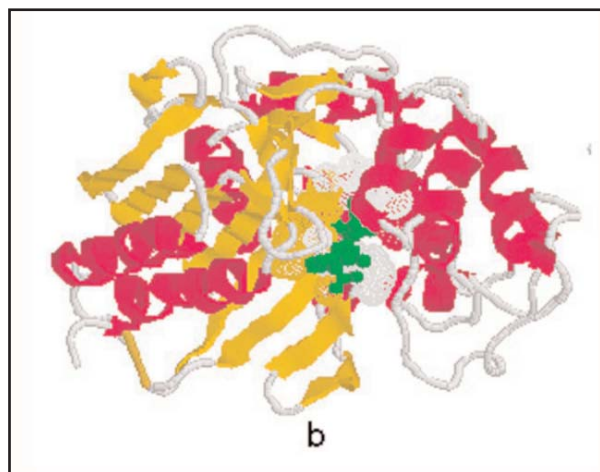
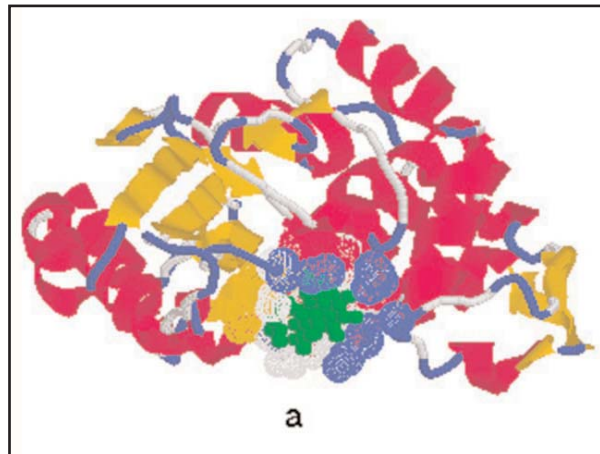
Esto se ha conseguido diseñando un grupo de moléculas, compuestos aza-beta-lactámicos, por la vía de sustituir un átomo de carbono por uno de nitrógeno y consiguiendo una simetría en el enlace beta-lactámico, de manera que en caso de fragmentación cualquiera de las dos mitades queda ligada a la beta-lactamasa inhibiendo su acción.

El paso final será sintetizar en el laboratorio este grupo de moléculas y probar su eficacia.

Un paso más en la guerra de ciertos enzimas

Un paso más dado por el grupo de investigadores ha sido la aplicación de este grupo de moléculas diseñadas para combatir otro tipo de enzima que causa serias complicaciones, por cuanto está implicado en procesos inflamatorios, en pacientes con enfisema pulmonar, fibrosis quística, aterosclerosis o artritis reumática entre otros. Se trata de las elastasas, enzimas que degradan las proteínas que forman los tejidos conectivos o de sostén, como la elastina y el colágeno, una degradación que tiene fatales consecuencias en ciertas patologías vasculares y pulmonares. Estos enzimas tienen en su mecanismo químico de actuación muchos puntos en común con las beta-lactamasas y las DD-peptidasas.

El grupo de investigadores de la UIB ha iniciado una colaboración con un el equipo de Síntesis de Química Orgánica del doctor Veinberg de la Universidad de



Estructura tridimensional de tres serinenzimas diferentes que comparten rasgos comunes en el mecanismo de acción sobre el sustrato. En verde se observa el inhibidor o el sustrato en el sitio activo del enzima.

a) Beta-lactamasa PC1 de *Staphylococcus aureus* formando complejo con la penicilina g,

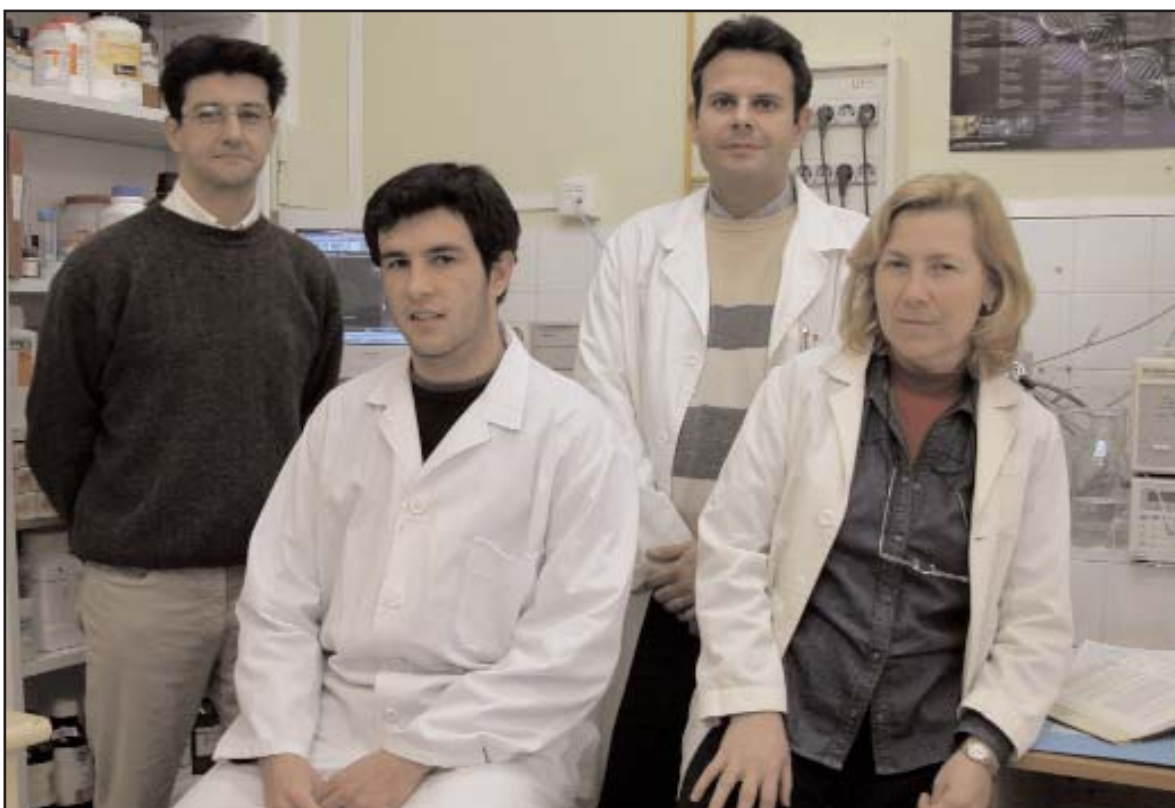
b) D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa traspeptidasa de *Streptomyces R61*, inhibida con cefotaxima (un antibiótico beta-lactámico)

c) Elastasa pancreática porcina (1BRU), inhibida con la molécula sintética GR143783.

Los enzimas a) y b) están relacionados evolutivamente y la c) no lo está.

Letonia. El objetivo es realizar también en este caso una modelización del sitio activo de las elastasas y poder sintetizar en un futuro moléculas capaces de inhibir su acción en determinadas situaciones: cuando la inflamación de algunos tejidos pone en peligro la vida de los enfermos.

Miembros del Grupo de Reactividad Molecular y Diseño de Fármacos de la UIB. De izquierda a derecha: Joan Frau, Miquel Adrover, Bartomeu Vilanova, y Josefa L. Donoso.



Proyectos financiados

Título: Estudio químico-físico de la inactivación de serin-enzimas por antibióticos beta-lactámicos

Referencia: BQU2000-0242.

Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia y Tecnología

Modalidad: P1. Proyecto de investigación básica no orientada.

Classificación UNESCO: 2307

Título: Inactivación y Modelado Molecular de serin-enzimas. Beta-lactamasas de la clase D y elastasas.

Referencia: BQU2003-02592.

Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Modalidad: P1. Proyecto de investigación básica no orientada.

Investigador responsable

Doctor Francisco Muñoz Izquierdo. Catedrático de Química Física.

Director del Grupo de Reactividad Molecular y Diseño de Fármacos.

Departamento de Química e Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS).

Edificio Mateu Orfila i Rotger

Otros miembros del equipo

Dra. Josefa L. Donoso Pardo. Catedrática de Química Física

Tel.: 971 17 34 90

e-mail: josefa.donoso@uib.es

Dr. Joan Frau Munar Profesor de Universidad de Química Física
Bartomeu Vilanova Canet. Profesor de Universidad de Química Física
Miquel Coll Parets. Profesor Asociado en el Departamento de Química
Rafael Garcias Llabrés. Ayudante en el Departamento de Química.
Antoni Salvà Salvà . Profesor de Educación Secundaria.
Cristina Fenollar Ferrer. Alumna de tercer ciclo.
Elena Ruiz. Alumna de tercer ciclo.
Miquel Adrover. Alumno de tercer ciclo.

Instituciones y entidades colaboradoras

Instituto de Síntesis Orgánica de la República de Letonia. Dr. Grigory Veinberg.

Instituciones y entidades que se pueden beneficiar de los proyectos

Instituciones, administraciones y centros sanitarios. Entidades y empresas de investigación farmacológica.

Webs de interés

<http://www.uib.es/depart/dqu/dqf/indexc.htm>

Página del grupo de Reactividad Molecular y Diseño de Fármacos.

<http://www.uib.es/facultat/ciencias/prof/josefa.donoso/>

Web de la doctora Josefa Donoso

<http://www.uib.es/facultat/ciencias/prof/juan.frau/>

Web del doctor Joan Frau

<http://www.drscope.com/pac/infecto-1/c3/index.htm>

Información sobre antibióticos y su acción

Publicaciones (2000-2003)

Theoretical study of the alkaline hydrolysis of a bicyclic aza-beta-lactam. M. Coll, J. Frau, B. Vilanova, J. Donoso, F. Muñoz, F. García Blanco, J. Phys. Chem. B 104 (2000) 11389-11394.

Electrostatic and structural similarities of classical and non-classical lactam compounds. M. Coll, J. Frau, B. Vilanova, J. Donoso, F. Muñoz, J. Comput. Aid. Mol. Des. 15 (2001) 819-833.

The role of beta-proton transfer donor in the degradation of benzylpenicillin. A. Llinás, B. Vilanova, F. Muñoz, J. Donoso, J. Mol. Catal. A 175 (2001) 3-16.

Kinetic and molecular-modelling study of the interaction between *Staphylococcus aureus* PC1 enzyme and imipenem. B. Vilanova, M. Coll, J. Frau, J. Muñoz, J. Donoso, Helv. Chim. Acta 84 (2001) 3366-3379.

Theoretical studies on Schiff base formation of vitamin B6 analogues. A. Salvà, J. Donoso, J. Frau, F. Muñoz, J. Mol. Struct. (Theochem) 577 (2002) 229-238.

Molecular modelling studies on Henry-Michaelis complexes of a class-C beta-lactamase and beta-lactam compounds. C. Fenollar-Ferrer, J. Frau, B. Vilanova, J. Donoso, F. Muñoz, J. Mol. Struct.(Theochem) 578 (2002) 19-28.

The role of beta-lactam carboxyl group on binding of penicillins and cephalosporins to Class C beta-lactamases. C. Fenollar-Ferrer, J. Frau, J. Donoso, F. Muñoz, Proteins. 51 (2003) 442- 452

Theoretical study of the alkaline hydrolysis of an aza-beta-lactam derivative of clavulanic acid R. C. Garcías, M. Coll, J. Donoso, F. Muñoz. Chem. Phys. Lett. 372 (2003) 275-281

Comunicaciones a congresos (2000-2003)

Kinetic and molecular-modelling study on the interaction of a class-A beta-lactamase with beta-lactam compounds. B. Vilanova, J. Frau, A. Llinás, M. Coll, J. Donoso, F. Muñoz. Third European Biophysics Congress. Poster 2F-15. Munich (Alemania) Publicado en European Biophysics Journal, 29 (4-5) 2000.

Michaelis-Menten complexes of Enterobacter cloacae P99. Differentiation among lactam compounds. C. Fenollar, J. Frau, M. Coll, A. Llinás, A. Salvá, J. Donoso, F. Muñoz. Third European Conference on computational chemistry (EUCCO-CC3). Poster P5-6. Budapest (Hungria) 2000.

Ab initio study of the alkaline hydrolysis of a thio beta-lactam structure. M. Coll, J. Frau, C. Fenollar, A. Llinás, A. Salvá, J. Donoso, F. Muñoz. Third European Conference on computational chemistry (EUCCO-CC3). Poster P2-20. Budapest (Hungria) 2000.

Estudio Ab initio del reordenamiento del acil-enzima formado por la bencilpenicilina y la beta-lactamasa TEM-1. C. Fenollar-Ferrer, J. Frau, F. Muñoz, J. Donoso, B. Vilanova, M. Coll, A. Llinás, A. Salvá. 27ème congrès des CHImistes Théoriciens d'Expression Latine. Poster. Toulouse (Francia) 2001.

Similitud electrostática y estructural de compuestos lactámicos clásicos y no clásicos. F. Muñoz, M. Coll, J. Frau, B. Vilanova, A. Llinás, C. Fenollar-Ferrer, A. Salvá, J. Donoso. 27ème congrès des CHImistes Théoriciens d'Expression Latine. Poster. Toulouse (Francia) 2001.

Estudios ab initio de la reactividad de estructuras beta-lactámicas no clásicas. M. Coll, J. Frau, B. Vilanova, A. Llinás, C. Fenollar-Ferrer, A. Salvá, J. Donoso, F. Muñoz. 27ème congrès des CHImistes Théoriciens d'Expression Latine. Poster. Toulouse (Francia) 2001.

Electrostatic and structural similarity of classical and non-classical lactam compounds. M. Coll, J. Frau, B. Vilanova, J. Donoso, F. Muñoz. Electronic Structure and Chemical Reactivity (ESCR). Simposium internacional en honor del professor Juan Bertran. Barcelona (España) 2001.

Interaction between *Staphylococcus aureus* PC1 enzyme and Imipenem. C. Fenollar-Ferrer, R. Garcías, B. Vilanova, J. Frau, M. Coll, A. Llinás, J. Donoso, F. Muñoz, A. Salvá, 8th beta-lactamase Workshop. Poster. Holy Island (Gran Bretaña) 2002.

Influence of S138A mutation in cephalosporinase activity. B. Vilanova, J. Frau, M. Coll, A. Llinás, C. Fenollar-Ferrer, R. Garcías, A. Salvá, J. Donoso, F. Muñoz. 8th beta-lactamase Workshop. Poster. Holy Island (Gran Bretaña) 2002.

Theoretical study of the alkaline hydrolysis of an aza-beta-lactam derivative of the clavulanic acid. R. C. Garcías, M. Coll, J. Frau, J. Donoso, F. Muñoz Electronic Structure: Principles and Applications (ESPA2002). Poster. Sevilla (España) 2002.

Role of Ser318 in class C beta-lactamases. C. Fenollar-Ferrer, B. Vilanova, J. Frau, J. Donoso, F. Muñoz. Electronic Structure: Principles and Applications (ESPA2002). Poster. Sevilla (España). 2002.

Theoretical study of the oxazolidine cleavage of an aza-beta-lactam derivative of clavulanic acid. R. Garcías, J. Frau, M. Coll, B. Vilanova, J. Donoso, F. Muñoz; 29eme Congrès International des Chimistes Théoriciens d'expression latine. Poster. Marrakech (Marruecos) 2003.

Theoretical study of the non classical pathway basic hydrolysis of the aza-beta-clavulanic acid. R. Garcías, F. Muñoz, J. Frau, J. Donoso, M. Coll, B. Vilanova; 10th International Conference on the applications of Density Functional Theory in chemistry and physics. Poster. Bruselas (Bélgica) 2003.

Otras actividades

El grupo de investigación organiza de forma bianual la Escuela de Verano de Química Teórica en la UIB (ya se ha celebrado la cuarta edición).

Miembros del grupo imparten clases en el Programa Interuniversitario de doctorado en Química Teórica y Computacional que ha obtenido la mención de calidad del Ministerio de Educación.