



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO
DISEÑO Y MECANISMO DE ACCIÓN
MOLECULAR DE NUEVOS INHIBIDORES DE
 β -LACTAMASAS

- Autor: D. Pedro López-Terradas Mota.
 - o DNI: 51482083X.
- Tutora: Prof^a. Dra. Dña. Mónica Söllhuber Kretzer.
- Convocatoria: junio de 2016.

1. RESUMEN

Las β -lactamasas son un conjunto de enzimas de tipo proteasa capaces de hidrolizar los antibióticos β -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas, entre otros), por ello constituyen una defensa contra estos fármacos. Contra estas enzimas se desarrollaron inhibidores para neutralizar dicho mecanismo defensivo y así potenciar el efecto de los β -lactámicos. El primer inhibidor de β -lactamasas que se sintetizó fue el ácido clavulánico, que se sigue usando en la actualidad en algunos casos. También se comercializaron la tazobactama y la sulbactama. Sin embargo, las bacterias siguen desarrollando enzimas que hidrolizan los antibióticos β -lactámicos. Las investigaciones que se centran en el desarrollo de nuevos inhibidores de β -lactamasas revelan que se están diseñando inhibidores con estructuras innovadoras porque no son de tipo β -lactámico. La avibactama es el compuesto más prometedor de este grupo de inhibidores noveles y tiene estructura de diazabicyclooctano (DBO). También se están investigando desde hace décadas los ácidos borónicos por las propiedades químicas del boro: es un ácido de Lewis y es más electronegativo que el carbono. Contra las metalo- β -lactamasas (MBL), enzimas con cationes zinc en su centro catalítico, se han estudiado compuestos con grupos sulfhidrilo y otros a base de rodanina.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Tradicionalmente, las enzimas que tenían capacidad de hidrolizar compuestos β -lactámicos se han clasificado en cuatro grupos en función de su secuencia proteica: A, B, C y D.¹ Las β -lactamasas de los grupos A, C y D utilizan un residuo de serina para acilar la lactama e inhibir de esta forma el antimicrobiano, por ello se las denomina serina- β -lactamasas (SBL). En cambio, las proteasas del grupo B utilizan cationes zinc para realizar la hidrólisis, por ello son llamadas metalo- β -lactamasas (MBL).

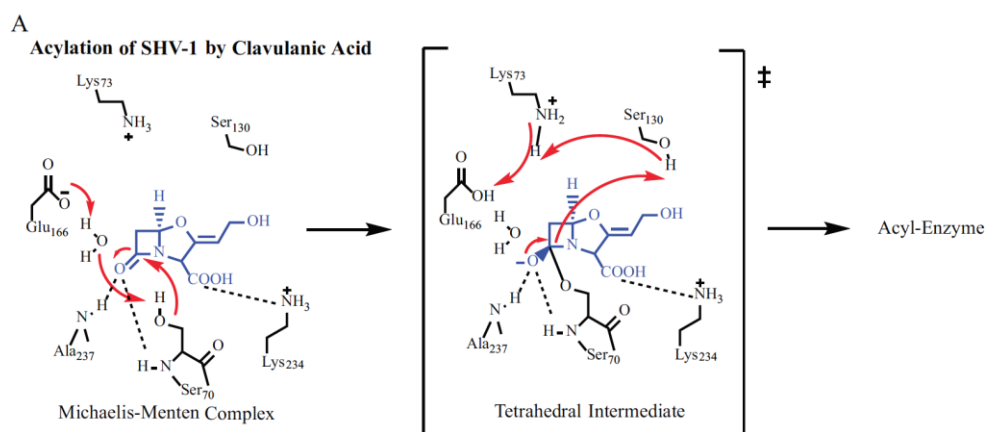
No obstante, las β -lactamasas pueden agruparse siguiendo muchos criterios, como la estructura proteica o la funcionalidad, es decir, el conjunto de inhibidores contra los cuales actúan. En la tabla 1 se muestra una clasificación mixta de β -lactamasas propuesta por diferentes autores. En el grupo A se encuentran TEM-1, SHV-1 y algunas β -lactamasas de amplio espectro (ESBL, por sus siglas en inglés) como CTX-M-15. Las MBL pertenecen al

grupo B. AmpC entra en el grupo C y OXA-10 y OXA-48, entre otras, se encuadran en el grupo D.²

Ambler class	Bush–Jacoby–Medeiros class	Characteristics	No. of enzymes
C	1	Mostly chromosomal enzymes in Gram-negatives. Some are plasmid-coded. Resistant to clavulanic acid.	51
A	2a	Staphylococcal and enterococcal penicillinases.	23
	2b	Broad-spectrum β -lactamases, including TEM-1 and SHV-1, mainly occurring in Gram-negatives.	16
	2be	Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs).	200
	2br	Inhibitor-resistant TEM (IRT) β -lactamases.	24
	2c	Carbencillin-hydrolyzing enzymes.	19
	2d	Cloxacillin (oxacillin) hydrolyzing enzymes.	31
	2e	Cephalosporinases inhibited by clavulanic acid.	20
B	3	Metallo-enzymes that hydrolyze carbapenems and other β -lactams except monobactams.	24
		Not inhibited by clavulanic acid.	
D	4	Miscellaneous enzymes.	9

Tabla 1. Clasificación de β -lactamasas de Ambler, Bush et ál. y Ghafourian et ál.²

El inhibidor clásico de las SBL siempre ha sido, y sigue siendo en algunos casos, el ácido clavulánico. Este compuesto tiene un mecanismo de acción molecular suicida porque la propia enzima transforma al ácido clavulánico en un compuesto intermedio que inutiliza su centro activo (ver esquema 1). Es necesaria una molécula de agua para inactivar la enzima. Además del ácido clavulánico se siguen utilizando actualmente la sulbactama y la tazobactama, que tienen una estructura química similar.

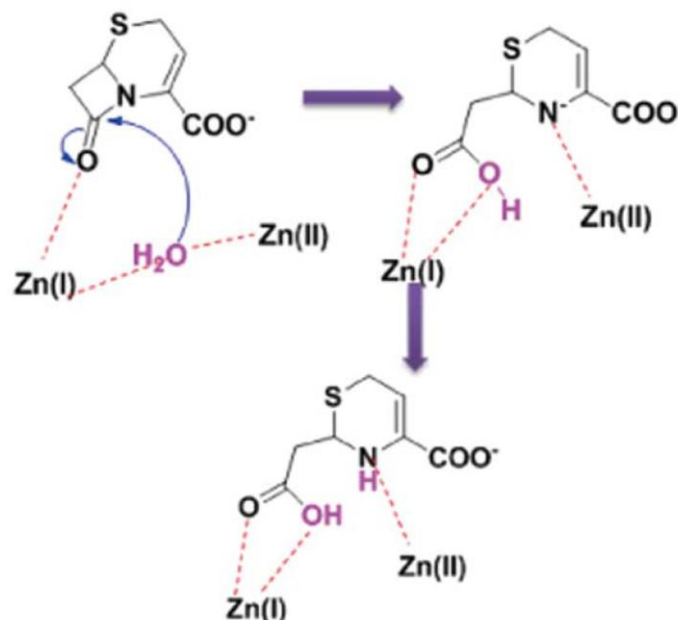


Esquema 1. Mecanismo de inhibición suicida del ácido clavulánico.³

Las MBL tienen un mecanismo de acción diferente puesto que no emplean un residuo de serina para iniciar la hidrólisis del compuesto inhibidor. Utilizan, en cambio, uno o dos cationes

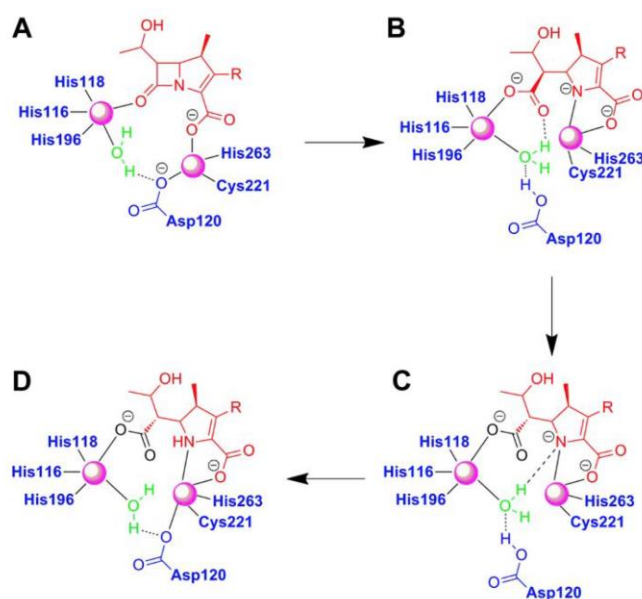
zinc que coordinan una molécula de agua para que ésta hidrolice la β -lactama (ver esquema 2).⁴ En la actualidad se conocen más de veinte MBL,⁵ una de las más conocidas es la MBL de Nueva Delhi porque fue descrita en esta ciudad en el año 2009 en el cuerpo de un paciente sueco.⁴ Hay propuesta una clasificación de MBL en varios subgrupos:⁵

- Subgrupo 1 (B1): el centro activo de la enzima que forma los complejos con dos átomos de zinc está formado por tres residuos de histidina y uno de cisteína.
- Subgrupo 2 (B2): en lugar de una de las histidinas, el centro activo contiene una asparragina y solo un átomo de zinc.
- Subgrupo 3 (B3): tiene cuatro histidinas y necesita dos átomos de zinc.
- Subgrupo 4 (B4): este subgrupo ha sido propuesto por algunos autores, el centro activo de estas enzimas solo necesitaría un átomo de zinc.⁶

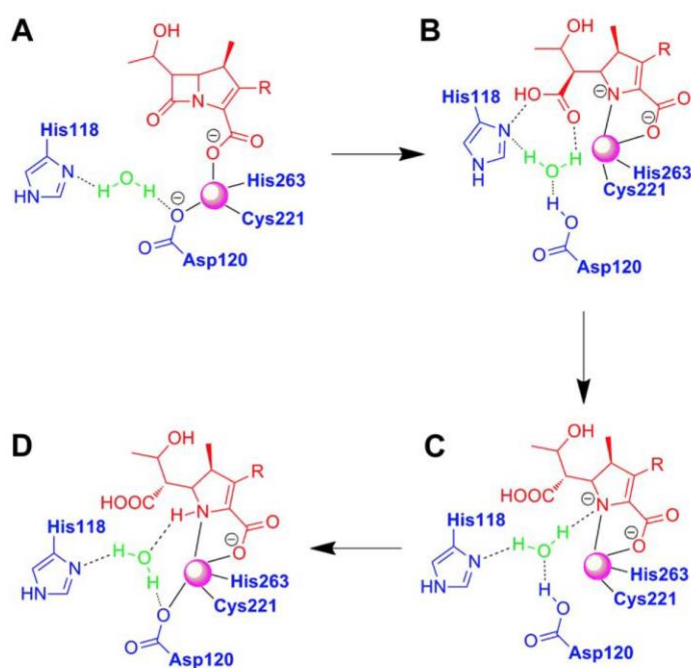


Esquema 2. Mecanismo de inhibición de una cefalosporina por la MBL de Nueva Delhi.⁴

Las MBL de dos cationes zinc y las de un solo catión zinc tienen mecanismos de acción muy similares (ver esquemas 3 y 4). En ambos casos es necesaria la intervención de una molécula de agua, que actúa como nucleófilo. En las MBL de los subgrupos B2 y B4 participan también algunos aminoácidos para *suplir* la falta de un catión zinc.⁵



Esquema 3. Mecanismo catalítico de las MBL de dos cationes zinc (B1 y B3). Una molécula de agua unida a un catión zinc actúa como nucleófilo al hidrolizar el β -lactámico. Tras esto, el nitrógeno del fármaco se protona y los cationes zinc estabilizan el β -lactámico.⁵



Esquema 4. Mecanismo catalítico de las MBL de un catión zinc (B2 y B4). En este caso, la molécula de agua que actúa como nucleófilo no interacciona con el catión zinc. Después, el catión zinc estabiliza el intermedio cuyo carbono termina por protonarse.⁵

Los nuevos inhibidores de β -lactamasas descritos en este trabajo tienen una estructura química completamente distinta, entre ellos destacan la avibactama para las SBL y los compuestos de rodanina para las MBL.

3. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es encontrar y recopilar información sobre las investigaciones que se están llevando a cabo en el diseño y el mecanismo de acción molecular de nuevos compuestos inhibidores de β -lactamasas, unas enzimas con actividad proteasa que constituyen la mayor barrera defensiva de las bacterias para defenderse de los β -lactámicos que se utilizan para combatir las infecciones.

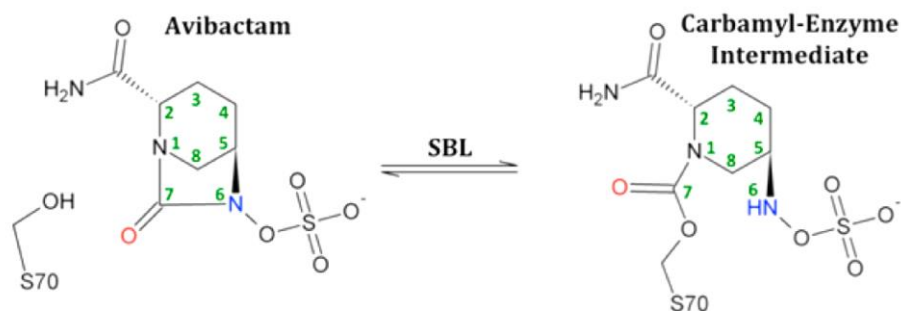
4. MÉTODOS

El método principal utilizado en este trabajo fue la revisión bibliográfica. Se buscaron artículos en diferentes revistas científicas relacionados con las β -lactamasas presentes en los microorganismos patógenos y la investigación que existe actualmente en el desarrollo de inhibidores de estas enzimas. Se utilizaron herramientas como los motores de búsqueda *PubMed* o *ScienceDirect* y se aprovecharon los acuerdos que la Biblioteca de la Universidad Complutense de Madrid tiene contratados para acceder a las publicaciones científicas más prestigiosas como *Journal of Medicinal Chemistry* o *American Chemical Society*.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a. Avibactama y análogos

La **avibactama** es el principal compuesto del grupo de nuevos inhibidores de β -lactamasas. Este inhibidor presenta una estructura de diazabicyclooctano (DBO). La avibactama inhibe especialmente las SBL de los grupos A y C. Los niveles de inhibición son mucho más variables en las enzimas del grupo D y no presenta efectividad frente a las MBL (grupo B). La avibactama se une al residuo catalítico de serina del centro activo de la β -lactamasa. En los inhibidores clásicos se forma un éster entre el inhibidor y la serina; con la avibactama, en cambio, este enlace conduce a la formación de un carbamato. Los carbamatos no se descomponen tan fácilmente mediante hidrólisis como lo hacen los ésteres porque el átomo de nitrógeno cede densidad de carga hacia los orbitales del carbono, esto disminuye su electrofilia. Por tanto, la formación de este carbamato explica en gran medida la mayor efectividad de la avibactama con respecto a los inhibidores de β -lactamasas tradicionales.⁷



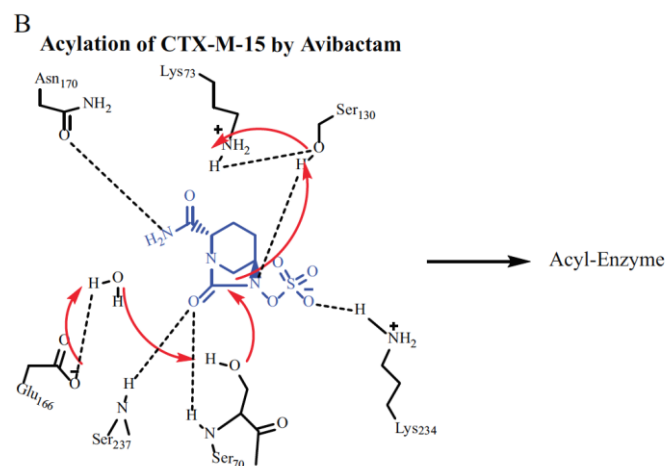
Esquema 5. Mecanismo de inhibición de una β -lactamasa de serina (SBL) por la avibactama.⁷

Se han encontrado resultados de inhibición mejores en las β -lactamasas de los grupos A y C que en las del grupo D. Un modelo de β -lactamasa que se puede utilizar para describir el mecanismo de inhibición de este compuesto es la CTX-M-15. La avibactama establece un equilibrio de reacción al carbamilarse y descarbamilarse de la serina catalítica de la enzima (ver esquemas 5 y 6). En función del comportamiento cinético de estos dos procesos se pueden inferir los residuos de la enzima implicados en la carbamilación y descarbamilación del inhibidor (ver tabla 2). La variante S130A, por ejemplo, destaca por tener un ratio de carbamilación y descarbamilación muy bajo (3.3 ± 0.4). S130A fue una variante obtenida al eliminar el residuo de serina 130. El nitrógeno de la posición 6 de la avibactama necesita estar protonado para iniciar la carbamilación, esto se consigue gracias al residuo S130. Si S130 desaparece la carbamilación se reduce drásticamente. Esta serina es responsable probablemente de que el proceso de carbamilación se inicie. En la descarbamilación ocurre algo similar, al eliminar el residuo S130 de la variante S130A se vio que este aminoácido actúa como base que desprotona el nitrógeno 6 y esto favorece la reciclación de la avibactama.⁷

parameter	WT	K73A	N104A	S130A	N132A	E166Q	K234A
on-rate k_f/K_i ($M^{-1}s^{-1}$)	$1.6 \pm 0.2 \times 10^4$	$2.8 \pm 0.1 \times 10^{-1}$	$3.9 \pm 0.2 \times 10^4$	3.3 ± 0.4	$3.7 \pm 0.3 \times 10^5$	$9.3 \pm 1.2 \times 10^4$	$8.0 \pm 0.9 \times 10^2$
off-rate k_{off} (s^{-1})	$1.5 \pm 0.1 \times 10^{-4}$	$2.1 \pm 0.3 \times 10^{-7}$	$7.1 \pm 0.1 \times 10^{-5}$	$7.7 \pm 0.7 \times 10^{-7}$	$1.6 \pm 0.1 \times 10^{-4}$	$1.8 \pm 0.3 \times 10^{-4}$	$4.0 \pm 0.8 \times 10^{-5}$
off-rate $t_{1/2}$ (min)	76	6×10^4	160	9×10^5	74	63	292
K_d (μM)	0.001	0.8	0.002	0.2	0.001	0.002	0.05

⁴⁸The carbamylation and decarbamylation rates were measured using colorimetric reporter substrate nitrocefin. The K_D values are calculated from the carbamylation and decarbamylation rates.

Tabla 2. Tasas de carbamilación y descarbamilación de diferentes β -lactamasas obtenidas mediante la mutación de la enzima CTX-M-15, utilizada frecuentemente como modelo.⁷



Esquema 6. Mecanismo de acción molecular de la avibactama en la β -lactamasa CTX-M-15.³

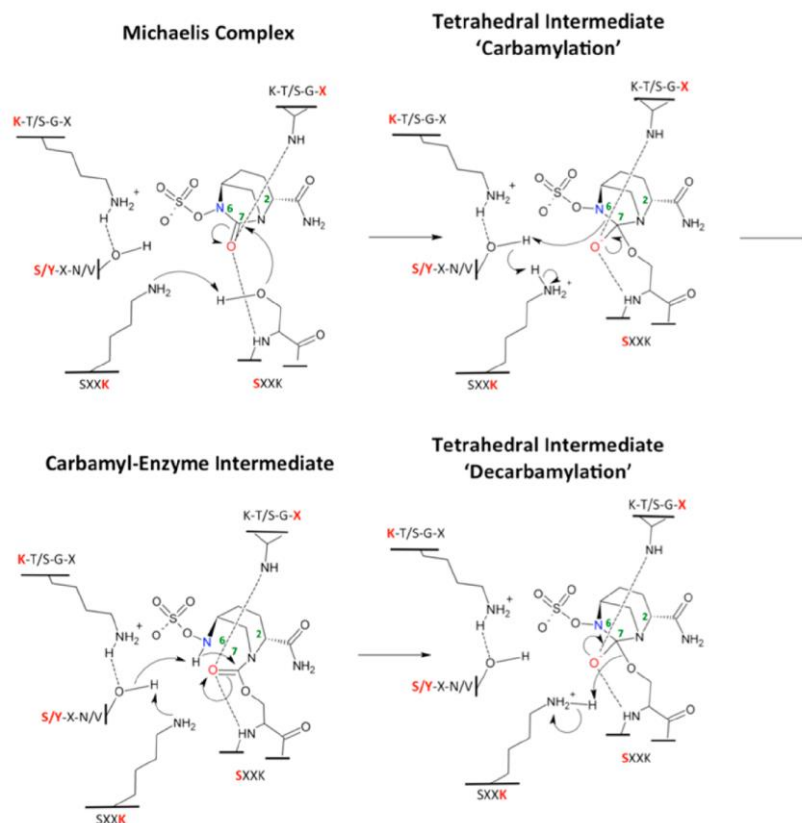
El comportamiento de la avibactama con las β -lactamasas del grupo D se ha estudiado con las enzimas OXA-10 y OXA-48. El residuo S118 actuaría como el S130 de las enzimas del grupo A. En OXA-10 y OXA-48 el anillo piperidínico de la avibactama adquiere una conformación *en silla* con los átomos C4 y N1 situados encima y debajo del plano. El oxígeno de la posición C7 interacciona con las amidas de los enlaces peptídicos de S70 y Y211 a través de enlaces de hidrógeno. El grupo sulfato se proyecta en una cavidad cargada positivamente que se encuentra entre R250, T209 y K208. Por otra parte, los oxígenos O62 y O63 del grupo sulfato de la avibactama interaccionan con el grupo guanidina del R250, este enlace no se ha encontrado en las β -lactamasas de los grupos A y C. Además, el carbamato de la posición C2 no se encuentra estabilizado por el enlace de hidrógeno con residuos de asparragina, algo que sí ocurre en las enzimas de los grupos A y C.⁷

Las enzimas OXA-10 y OXA-48 tienen diferencias pequeñas en su estructura primaria pero la existencia de una estructura *en tallo-bucle* en las láminas $\beta 5$ y $\beta 6$ de la OXA-48 facilitaría la estabilización de la carboxamida de C2 y, con ello, mejoraría el ratio de carbamitación de esta enzima con respecto al de OXA-10. Por ello, el diseño de nuevos fármacos inhibidores debería intentar mantener esta característica.⁷

En síntesis, el mecanismo de acción molecular de la avibactama en SBL es el siguiente (ver esquema 7):

1. La serina catalítica se activa por la desprotonación causada por un residuo de un aminoácido básico (K73 para las del grupo A y D y K67 para las del grupo C).

2. La serina activada ataca al carbono 7 de la avibactama, esto provoca la formación de un intermedio de transición tetrahédrico que es estabilizado por un *bolsillo* oxianiónico de la enzima.
3. Un par de electrones del oxígeno del carbono 7 retrocede para volver a formar el grupo carbonilo, con ello se libera el nitrógeno 6 que se carga negativamente. Este nitrógeno se protona por una serina (tirosina en las enzimas del grupo C). Queda formado un carbamato estable.
4. El carbamato es lo suficientemente estable como para reducir considerablemente la probabilidad de que se hidrolice. Si una descarbamoylación llegare a ocurrir, una serina (tirosina en las enzimas del grupo C) desprotonaría el nitrógeno 6 del inhibidor facilitando así el ataque de este átomo al carbono 7 y, con ello, la liberación del centro activo de la enzima. La avibactama recuperaría su estructura química original y podría volver a realizar un ataque a la enzima. Esta es una diferencia fundamental con el ácido clavulánico.



Esquema 7. Inhibición de OXA-48 y OXA-10 por la avibactama.⁷

Dada la amplia variabilidad de las β -lactamasas, la avibactama tiene un comportamiento cinético diferente en cada enzima (ver tabla 3).

Kinetic values for the acylation and deacylation parameters of avibactam against classes A, C, and D enzymes

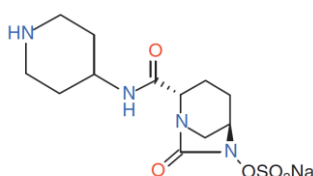
Acylation on rates and deacylation off rates were measured using reporter assays detecting nitrocefín turnover. K_d values are calculated from the off and on rates.

Parameter	TEM-1 ^a	CTX-M-15	KPC-2	<i>E. cloacae</i> P99 AmpC	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 AmpC	OXA-10	OXA-48
Acylation k_a/K_i ($M^{-1}s^{-1}$)	$1.6 \pm 0.1 \times 10^5$	$1.3 \pm 0.1 \times 10^5$	$1.3 \pm 0.1 \times 10^4$	$5.1 \pm 0.1 \times 10^3$	$2.9 \pm 0.1 \times 10^3$	$1.1 \pm 0.1 \times 10^1$	$1.4 \pm 0.1 \times 10^3$
Deacylation k_{off} (s^{-1})	$8 \pm 4 \times 10^{-4}$	$3 \pm 1 \times 10^{-4}$	$1.4 \pm 0.1 \times 10^{-4}$	$3.8 \pm 0.2 \times 10^{-5}$	$1.9 \pm 0.6 \times 10^{-3}$	$<1.6 \times 10^{-6}$	$1.2 \pm 0.4 \times 10^{-5}$
Deacylation $t_{1/2}$ (min)	16 ± 8	40 ± 10	82 ± 6	300 ± 20	6 ± 2	>7200	1000 ± 300
K_d (μM)	0.005	0.002	0.011	0.007	0.66	<0.15	0.009

^a Data were from Ref. 18.

Tabla 3. Valores cinéticos de acilación y desacilación de la avibactama en β -lactamasas de los grupos A, C y D.⁸

Otro compuesto prometedor de la familia de los DBO es **MK-7655** (denominado también relebactama). Su estructura química recuerda a la avibactama (ver figura 1). Su mecanismo de acción es similar al de la avibactama y actúa sobre todo contra β -lactamasas de los grupos A y C. La avibactama requiere de una a cinco moléculas para inhibir la enzima. MK-7655, sin embargo, necesita hasta 22 moléculas por cada β -lactamasa para ser efectivo. Está propuesta su utilización de forma sinérgica con imipenem.²



MK-7655

Figura 1. Estructura química de MK-7655.⁹

b. Ácidos borónicos

Además de la avibactama y sus análogos, se han venido desarrollando diferentes **ácidos borónicos** que son capaces de inhibir β -lactamasas y otras enzimas. El boro es un elemento químico del decimotercer grupo y segundo período de la tabla periódica. La configuración electrónica de sus átomos es, por tanto: $1s^2 2s^2 2p^1$. Los nuevos inhibidores de β -lactamasas derivan del ácido bórico, cuya fórmula molecular es $B(OH)_3$. La teoría de orbitales moleculares explica la hibridación de los orbitales 2s y 2p del boro para formar tres orbitales híbridos sp^2 y así enlazar con los tres grupos hidroxilo, quedando sin hibridar un orbital 2p. Este orbital 2p no contiene electrones y es la causa de que los ácidos borónicos se comporten como ácidos de Lewis. Los ácidos de Lewis se caracterizan por ser aceptores de electrones porque tienen algún

orbital vacío. Esto explica por qué admiten enlaces covalentes dativos, que son más estables que los no covalentes. Además, a diferencia de lo que ocurre con los inhibidores suicidas, los enlaces que se forman son reversibles. Estos enlaces confieren cierto carácter hidrofóbico al intermedio que se forma.¹⁰

La investigación de compuestos de boro como inhibidores de β -lactamasas se remonta a la década de 1970 cuando Kiener y Waley encontraron en el ácido bórico, el ácido fenilborónico y el ácido *m*-aminofenilborónico una leve actividad inhibitoria de una β -lactamasa de *Bacillus cereus* (K_i de 1.2 a 4.0 mM).¹¹ Posteriormente, se fueron realizando modificaciones en el anillo aromático para mejorar la actividad inhibitoria como el ácido 3-yodoacetamidofenilborónico o el ácido *m*-aminofenilborónico. Estos compuestos, a pesar de no presentar el grupo amida que sí contienen las penicilinas y cefalosporinas, inhibían las β -lactamasas de los grupos C y D, fundamentalmente.¹²

Otro compuesto interesante que se sintetizó en los años 1990 fue el ácido benzo[b]tiofeno-2-borónico o BZBTH2B (ver figura 2) con una afinidad por la enzima AmpC (grupo C) de *Escherichia coli* de 27 nM, inhibía 100 veces más que los derivados borónicos previamente utilizados para esta enzima.¹² Este compuesto es importante porque su estructura química sentó la base del desarrollo de este grupo de inhibidores. El BZBTH2B presentaba dos ventajas interesantes con respecto a las resistencias bacterianas. Por una parte, no inducía la síntesis de AmpC por parte del microorganismo; por otra, no se veía afectado por la falta de porinas (este es un mecanismo de resistencia frecuente entre las bacterias).¹³ Se observó que el sitio de unión de las β -lactamas en AmpC también era reconocido por los anillos aromáticos de los ácidos arilborónicos, concretamente, en el residuo de asparragina 152. También se encontró una unión a través de enlaces de hidrógeno en la tirosina 150, un bolsillo hidrofóbico entre las leucinas 119 y 293 y una región entre la asparragina 346 y la arginina 349 donde se unía el carboxilato de las β -lactamas.¹² Además, cuatro moléculas de agua estabilizaban el inhibidor por medio de enlaces de hidrógeno.

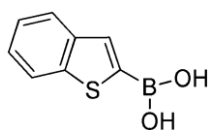
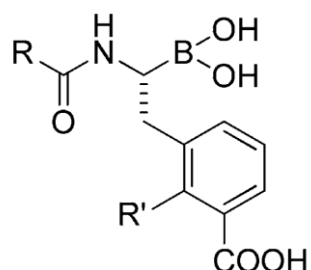


Figura 2. Ácido benzo[b]tiofeno-2-borónico.¹²

En cuanto a las β -lactamasas del grupo A, se observó que el ácido (1*R*)-1-acetamido-2-(3-carboxifenil)etanoborónico (ver figura 3) era un potente inhibidor de TEM-1, la principal enzima de este grupo de β -lactamasas.



- 100:** R = CH₃, R' = H
101: R = CH₃, R' = OH
102: R = PhCH₂, R' = H

Figura 3. Ácido (1*R*)-1-acetamido-2-(3-carboxifenil)etanoborónico. Valores de inhibición de TEM-1: $K_{i(100)} = 110$ nM, $K_{i(101)} = 13$ nM, $K_{i(102)} = 5.9$ nM.¹²

Posteriormente, se llegó al desarrollo de ácidos glicilborónicos, con una estructura química mixta pues estos inhibidores incluyen, además del núcleo borónico, las cadenas laterales de los compuestos β -lactámicos (ver figura 4). Se han desarrollado numerosos compuestos derivados del ácido bórico semejantes a las penicilinas y cefalosporinas (ver figura 5).¹²

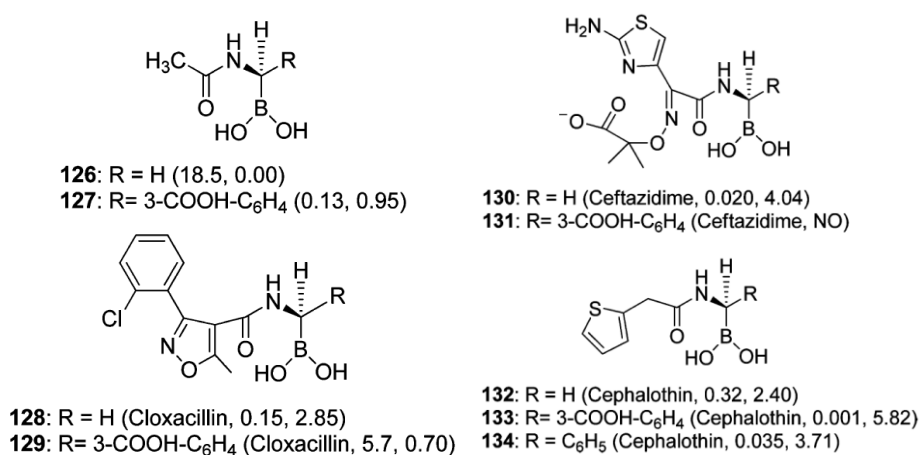


Figura 4. Análogos borónicos de β -lactámicos, sus valores de K_i y los valores de las energías de enlace expresados en kcal · mol⁻¹ con respecto al valor del compuesto 126.¹²

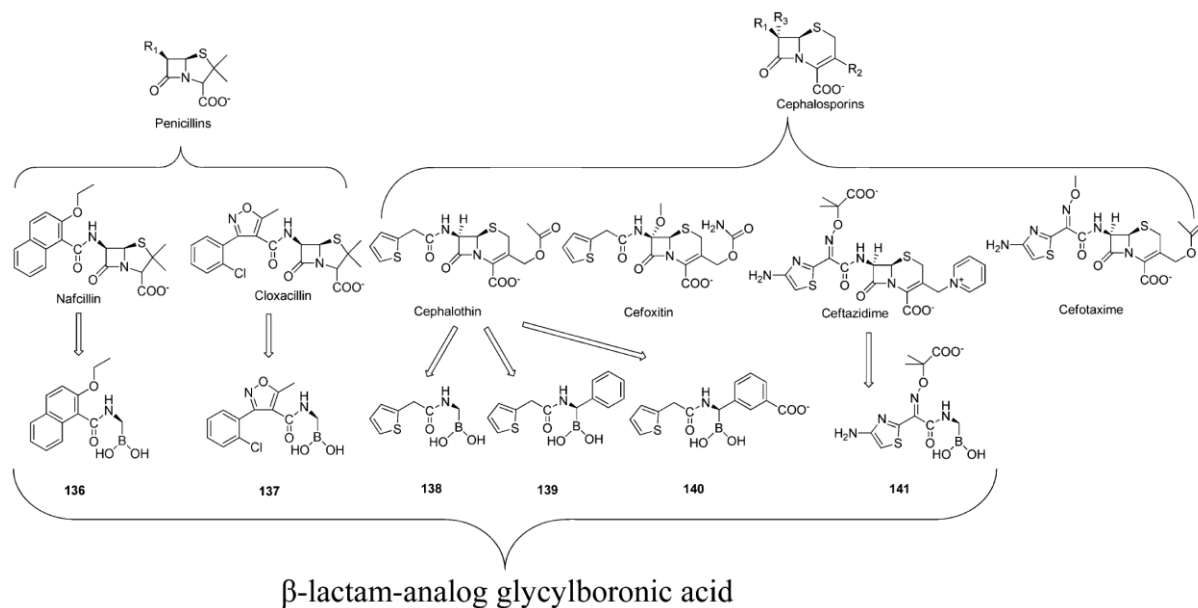


Figura 5. Ácidos glicilborónicos análogos de β -lactámicos.¹²

Los ácidos borónicos inhiben muchas enzimas del grupo C de β -lactamasas, como la AmpC, algunas del grupo A e incluso algunas ESBL como la CTX-M-16 ($K_i = 4$ nM).¹²

En cuanto a su diseño, se han ido sintetizando y probando inhibidores según se variaban los sustituyentes de las cadenas laterales. Un estudio de 2015 de Prati et ál. propone la sustitución de un fenilo por un anillo de triazol, al que se le pueden ir añadiendo diferentes sustituyentes (ver tabla 4).¹⁴

Values of Compounds 13a, 13d, and 13f and Reference Compounds A and B

Cmp	Structure	K_i (μ M) vs. PDC-3	K_i (μ M) vs. P99
13a		0.004 \pm 0.001	0.023 \pm 0.002
13d		0.008 \pm 0.001	0.014 \pm 0.001
13f		0.164 \pm 0.008	0.134 \pm 0.006
Ref cmp A		0.411 \pm 0.001	0.451 \pm 0.002
Ref cmp B		0.013 \pm 0.006	0.015 \pm 0.005

Tabla 4. Valores de K_i en β -lactamasas del grupo C PDC-3 y P99.¹⁴

Algunas publicaciones hablan de la sustitución de la carboxamida por una sulfonamida porque esta última aumenta los enlaces de hidrógeno del inhibidor con la enzima.¹⁵ En general, los ácidos borónicos con estructura de sulfonamida tienen mejor comportamiento inhibitorio que los de estructura de carboxamida. Además, la actividad disminuye si se añaden sustituyentes voluminosos en los ácidos sulfonamidaborónicos y, curiosamente, la adición de un carboxilato en los carboxamídicos resulta beneficiosa, no así en los inhibidores del otro grupo.

Uno de los compuestos más prometedores del grupo de los ácidos borónicos es el **RPX7009** (ver figura 6). El RPX7009 está pensado para combinarlo con carbapenemos porque demuestra tener buena actividad inhibitoria contra las carbapenemasas del grupo A.¹⁶

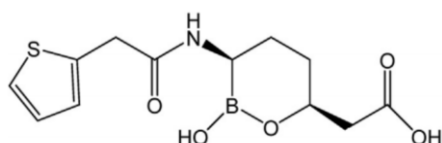


Figura 6. Estructura química de RPX7009.¹⁶

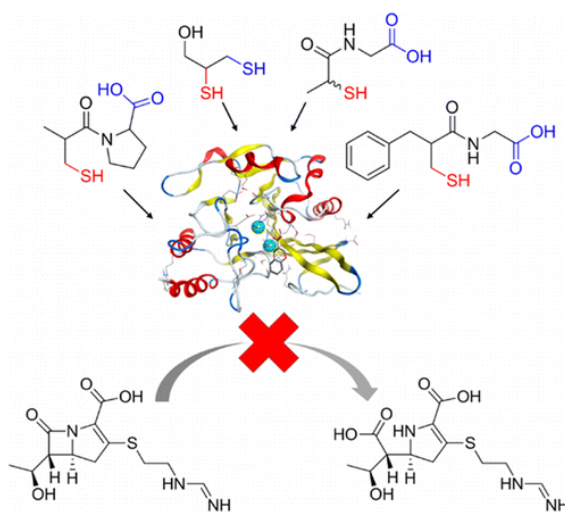
Los fármacos suelen presentar una conformación predominante a las demás para ejercer su acción farmacológica de la manera más efectiva. Se pensó que los boronatos cíclicos se ajustarían mejor a la conformación óptima para inhibir las β -lactamasas. Así, se acotaban las posibles moléculas líderes a la conformación más idónea para la inhibición enzimática. Otra razón para dirigir el diseño de la estructura química hacia los boronatos cíclicos fue la selectividad mayor de estos compuestos hacia las β -lactamasas. El carboxilato que está presente en penicilinas y cefalosporinas se mantiene. La amida forma enlaces de hidrógeno, el grupo hidroxilo del ácido borónico entra en el espacio oxianiónico de la enzima y las cadenas y anillos lipofílicos interaccionan con las regiones hidrofóbicas del centro catalítico de la β -lactamasas.¹⁷ RPX7009 contiene un carboxilato, que interacciona de igual manera que lo hace en los β -lactámicos. La amida enlaza con dos grupos donadores de enlaces de hidrógeno. El hidroxilo libre del ácido borónico entra en el bolsillo oxianiónico y la región lipofílica del tiofeno interacciona con dos leucinas.

En cualquier caso, la amplia variabilidad de β -lactamasas hace difícil establecer un diseño óptimo de fármacos válido para todos los casos. Existe una estructura central compuesta por un

ácido borónico y dos cadenas laterales que aceptan diferentes sustituyentes en función de la enzima que deba ser atacada.

c. Compuestos con grupos sulfhidriilo

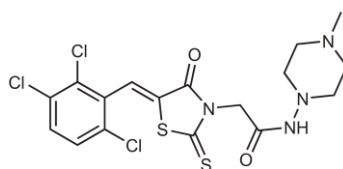
Actualmente las MBL suponen un problema importante en el tratamiento de infecciones por bacterias que presentan estas enzimas (ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y las especies del género *Enterobacter*) porque no se conocen muchos compuestos que sean capaces de inhibirlas. Las monobactamas, como el aztreonam, se han venido utilizando para combatir estas enzimas. Algunos compuestos con grupos sulfhidrilos son capaces de inhibir las MBL porque actúan como quelantes de los cationes divalentes de zinc. Proschak et ál. comprobaron actividad inhibitoria en captopril, racecadotril, dimercaprol y tiopronina, fármacos que no fueron diseñados con el objetivo de inhibir las MBL (ver esquema 8).¹⁸



Esquema 8. Los grupos tioles neutralizan los cationes zinc de las MBL, no así los β -lactámicos.¹⁸

d. Compuestos de rodanina

También se han encontrado resultados esperanzadores en compuestos de rodanina como ML302 (ver figura 7).¹⁹



ML302

Figura 7. ML302 está formado por un núcleo de rodanina.¹⁹

ML302 tiene un mecanismo de acción peculiar. Se comprobó que su estructura química inhibe la *Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase-1* (VIM-1) pero también lo hace un fragmento derivado de su hidrólisis (ML302F). No obstante, la inhibición más efectiva se consigue al administrar ambos compuestos, ML302 y ML302F. Esta enzima tiene dos regiones fundamentales en su centro catalítico, la cadena A y la cadena B. ML302 y ML302F se unen a la cadena A. Sin embargo, solo ML302F es capaz de unirse a la cadena B. Ambas cadenas tienen que inhibirse para bloquear la actividad enzimática. Por ello, la mezcla en proporción 1:1 de ML302 y ML302F (ML302M) reporta una menor concentración inhibitoria 50 (IC₅₀, por sus siglas en inglés) que la administración de ambos compuestos de forma separada (ver gráfica 1). En la cadena A, el anillo de rodanina de ML302 y el 1,2,4-triclorobenceno de ML302F sufren una interacción π - π entre sí. El plano del grupo aromático de ML302F rota sobre el enlace C3-C7 para que este apilamiento se dé. Al rotar, los dobles enlaces resonantes del 1,2,4-triclorobenceno no pueden conjugarse con el alqueno C3-C7. Los dos sustituyentes de cloro en posición *orto* en el benceno son los responsables de que se produzca este impedimento estérico y favorecen así una unión óptima al sitio activo de la MBL. Por otra parte, ML302F interacciona a través del grupo tiol con un catión zinc, el cual enlaza con el grupo carboxilato del residuo de aspártico 120. Uno de los oxígenos del carboxilato interacciona con un catión zinc y con la histidina 263. El otro oxígeno carboxílico interacciona con la arginina 228 en la cadena A. En la cadena B, y no en la A, el cloro de la posición 6 del anillo bencénico de ML302F enlaza con la asparragina 233 (ver esquema 9).¹⁹

Otras MBL como NDM-1, SPM-1, IMP-1 o BcII muestran unos niveles de inhibición similares, con valores de IC₅₀ por debajo de 1 µM en todos los casos, especialmente al administrar conjuntamente ML302 y ML302F (ver tabla 5).¹⁹

IC ₅₀ (µM)			
MBL	ML302	ML302F	ML302M
NDM-1	9.44 ± 1.44	1.05 ± 0.3	0.52 ± 0.18
VIM-1	0.66 ± 0.25	0.44 ± 0.19	0.26 ± 0.13
VIM-2	0.49 ± 0.18	0.30 ± 0.09	0.016 ± 0.004
SPM-1	1.32 ± 0.62	1.76 ± 0.51	0.14 ± 0.04
IMP-1	0.1749 ± 0.060	2.88E-3 ± 0.50	0.061 ± 0.017
BcII	0.50 ± 0.15	0.02 ± 0.07	0.56 ± 0.19

Tabla 5. Niveles de IC₅₀ para diferentes MBL.¹⁹

ML302 y otros compuestos con estructura de 1-carboxi-2-mercaptotioenolato son inhibidores potentes de MBL. Además, son compuestos de amplio espectro y potencian la actividad de β-lactámicos como el imipenem. ML302 puede ser una buena cabeza de serie para la síntesis de nuevos inhibidores de MBL.¹⁹

6. CONCLUSIONES

En la investigación de nuevos inhibidores de β-lactamasas existen muchos enfoques diferentes. Las investigaciones actuales en este campo se centran en el desarrollo de inhibidores con mayor espectro de acción y con mayor potencia que los inhibidores clásicos. Los nuevos compuestos se están probando contra β-lactamasas de los grupos C y A fundamentalmente y los resultados son esperanzadores. Las β-lactamasas del grupo D, en cambio, son más variables y los inhibidores responden de manera diferente en cada una. Las MBL, o β-lactamasas del grupo B, constituyen el principal reto en el tratamiento de infecciones. No hay una gran gama de compuestos contra estas enzimas. En cualquier caso, estos compuestos deben administrarse conjuntamente con inhibidores de las enzimas con actividad transpeptidasa, así se consigue un efecto sinérgico entre el inhibidor de β-lactamasa y el antibacteriano. Es necesario continuar investigando en estos y otros compuestos porque para el desarrollo de un medicamento hace falta mucho tiempo y dinero y las infecciones bacterianas son cada vez más difíciles de controlar.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ K. Bush, G. A. Jacoby. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **2010**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54 (3), 969-976. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2825993/>
- ² I. Olsen. New promising β -lactamase inhibitors for clinical use. **2015**. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 34 (7), 1303-1308. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10096-015-2375-0>
- ³ M. L. Winker, K. M. Papp-Wallace, M. A. Taracila, R. A. Bonomo. Avibactam and Inhibitor-Resistant SHV β -Lactamases. **2015**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59 (7), 3700-3709. <http://aac.asm.org/content/59/7/3700.long>
- ⁴ Z. Liang, L. Li, Y. Wang, L. Chen, X. Kong, Y. Hong, L. Lan, M. Zheng, C. Guang-Yang, H. Liu, X. Shen, C. Luo, K. K. Li, K. Chen, H. Jiang. Molecular Basis of NDM-1, a New Antibiotic Resistance Determinant. **2011**. *PLoS One*. 6 (8), e23606. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3161043/>
- ⁵ J. F. Wang, K. C. Chou. Metallo- β -lactamases: structural features, antibiotic recognition, inhibition, and inhibitor design. **2013**. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 13 (10), 1242-1253. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23647546>
- ⁶ C. F. D. Hou, E. K. Phelan, M. Miraula, D. L. Ollis, G. Schenk, N. Mitić. Unusual metallo- β -lactamases may constitute a new subgroup in this family of enzymes. **2014**. *American Journal of Molecular Biology*. 4 (1), 11-15. <http://www.scirp.org/journal/Pap8erInformation.aspx?PaperID=41626>
- ⁷ D. T. King, A. M. King, S. M. Lal, G. D. Wright, N. C. J. Strynadka. Molecular Mechanism of Avibactam-Mediated β -Lactamase Inhibition. **2015**. *ACS Infectious Disease*. 1 (4), 175-184. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsinfecdis.5b00007>
- ⁸ D. E. Ehmann, H. Jahic, P. L. Ross, R. F. Gu, J. Hu, T. F. Durand-Réville, S. Lahiri, J. Thresher, S. Livchak, N. Gao, T. Palmer, G. K. Walkup, S. L. Fisher. Kinetics of avibactam inhibition against Class A, C, and D β -lactamases. **2013**. *The Journal of Biological Chemistry*. 288 (39), 27960-27971. <http://www.jbc.org/content/288/39/27960.long>
- ⁹ K. Coleman. Diazabicyclooctanes (DBOs), a potent new class of non- β -lactam β -lactamase inhibitors. **2011**. *Current Opinion in Microbiology*. 14 (5), 550-555. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136952741100110X>
- ¹⁰ S. J. Baker, J. W. Tomsho, S. J. Benkovic. Boron-containing inhibitors of synthetases. **2011**. *Chemical Society Reviews*. 40, 4279-4285. <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/cs/2011/c0cs00131g - !divAbstract>
- ¹¹ P. A. Kiener, S. G. Waley. Reversible Inhibitors of Penicillinases. **1978**. *Biochemical Journal*. 169 (1), 197-204. <http://www.biochemj.org/content/169/1/197.long>
- ¹² R. Smoum, A. Rubinstein, V. M. Dembitsky, M. Srebnik. Boron Containing Compounds as Protease Inhibitors. **2012**. *Chemical Reviews*. 112 (7), 4156-4220. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr608202m>
- ¹³ R. A. Powers, J. Blázquez, G. S. Weston, M. I. Morosini, F. Baquero, B. K. Shoichet. The complexed structure and antimicrobial activity of a non- β -lactam inhibitor of AmpC β -lactamase. **1999**. *Protein Science*. 8 (11), 2330-2337. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2144209/>
- ¹⁴ E. Caselli, C. Romagnoli, R. Vahabi, M. A. Taracila, R. A. Bonomo, F. Prati. Click Chemistry in Lead Optimization of Boronic Acids as β -Lactamase Inhibitors. **2015**. *Journal of Medicinal Chemistry*. 58 (14), 5445-

5458. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jmedchem.5b00341>

¹⁵ O. Eidam, C. Romagnoli, E. Caselli, K. Babaoglu, D. T. Pohlhaus, J. Karpiak, R. Bonnet, B. K. Shoichet, F. Prati. Design, Synthesis, Crystal Structures, and Antimicrobial Activity of Sulfonamide Boronic Acids as β -Lactamase Inhibitors. **2010**. *Journal of Medicinal Chemistry*. 53 (21), 7852-7863.

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm101015z>

¹⁶ K. Bush. A resurgence of β -lactamase inhibitor combinations effective against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. **2015**. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 46 (5), 483-493.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857915003180>

¹⁷ S. J. Hecker, K. R. Reddy, M. Totrov, G. C. Hirst, O. Lomovskaya, D. C. Griffith, P. King, R. Tsivkovski, D. Sun, M. Sabet, Z. Tarazi, M. C. Clifton, K. Atkins, A. Raymond, K. T. Potts, J. Abendroth, S. H. Boyer, J. S. Loutit, E. E. Morgan, S. Durso, M. N. Dudley. Discovery of a Cyclic Boronic Acid β -Lactamase Inhibitor (RPX7009) with Utility vs Class A Serine Carbapenemases. **2015**. *Journal of Medicinal Chemistry*. 58 (9), 3682-3692. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jmedchem.5b00127>

¹⁸ F. M. Klingler, T. A. Wichelhaus, D. Frank, J. Cuesta-Bernal, J. El-Delik, H. F. Müller, H. Sjuts, S. Göttig, A. Koenigs, K. M. Pos, D. Pogoryelov, E. Proschak. Approved Drugs Containing Thiols as Inhibitors of Metallo- β -lactamases: Strategy To Combat Multidrug-Resistant Bacteria. **2015**. *Journal of Medicinal Chemistry*. 58 (8), 3626-3630. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm501844d>

¹⁹ J. Brem, S. S. van Berkel, W. Aik, A. M. Rydzik, M. B. Avison, I. Pettinati, K. D. Umland, A. Kawamura, J. Spencer, T. D. Claridge, M. A. McDonough, C. J. Schofield. Rhodanine hydrolysis leads to potent thioenolate mediated metallo- β -lactamase inhibition. **2014**. *Nature Chemistry*. 6 (12), 1084-1090.

<http://www.nature.com/nchem/journal/v6/n12/full/nchem.2110.html>