



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

TRABAJO FIN DE GRADO

**Diseño de nuevas terapias antiadhesivas
antibacterianas basadas en carbohidratos.**

Autor: Inés Morales Gómez-Luengo.

Fecha: 22/07/2020

Tutor: María José Hernainz Gómez-Dégano.

Índice.

- 1. Resumen y Abstract. Pag.3.**
- 2. Introducción y antecedentes. Pag.3.**
 - 2.1 Infecciones por *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC). Pag 3.
 - 2.2 Infecciones por *Escherichia coli* Adherente Invasiva (AIEC). Pag4.
 - 2.3 Mecanismo de patogenia de *Escherichia coli*. Pag 5.
 - 2.4 Estructura de la adhesina FimH de las fimbrias de tipo 1 de *Escherichia coli*. Pag 6.
 - 2.5 Resistencia a antibióticos. Pag. 7.
- 3. Objetivos. Pag.8.**
- 4. Material y métodos. Pag.8.**
- 5. Resultados y discusión. Pag.8.**
 - 5.1 Inhibidores monovalentes de FimH.
 - A) O-Derivados de α -D-manosa. Pag 9.
 - B) Profármacos de los O-derivados de α -D-manosa. Pag 13.
 - C) C-derivados de α -D-manosa. Pag 14.
 - 5.2 Inhibidores multivalentes de FimH.
 - A) Heptil manosa trivalente. Pag 17.
 - B) Heptil Manosa heptavalente unida a β -ciclodextrina. Pag 18.
- 6. Conclusión. Pag 19.**
- 7. Bibliografía. Pag 20.**

1. Resumen.

Los expertos llevan mucho tiempo investigando el mecanismo de las infecciones producidas por microorganismos. En el contexto actual de la pandemia del COVID esto cobra más sentido que nunca. El tratamiento por defecto, muy conocido, para combatir estas enfermedades son los antibióticos. Sin embargo resulta necesario el desarrollo de nuevas terapias prometedoras basadas en otros mecanismos a causa de la resistencia a los antibióticos que se ha convertido en un problema muy grave de salud pública mundial. Este trabajo se centra en las infecciones bacterianas por *Escherichia coli*, ya que son la primera causa de infección del tracto urinario y de enfermedad inflamatoria del intestino delgado, ambas muy comunes.

La nueva terapia antiadhesiva para el tratamiento de bacterias como *E. coli* se basa en el mecanismo de adhesión de las mismas. Los investigadores han sintetizado las moléculas denominadas glicoconjugados y glicomiméticos que se unen a la bacteria y evitan la adhesión natural a las células epiteliales de la mucosa del hospedador. De esta manera se impide la fase inicial de la enfermedad, la infección y los procesos inflamatorios mediados por el sistema inmune que provocan los síntomas de la enfermedad. El diseño de la terapia antibacteriana se basa en la estructura del carbohidrato manosa. La proteína de las fimbrias de la pared bacteriana se une de manera natural a los oligosacáridos de manosa de la célula humana. Esta terapia se ha mostrado eficaz en numerosos estudios en los que se demuestra cómo se evita la adhesión bacteriana en el huésped.

Abstract.

Experts have been investigating microorganism infections for a long time. In the current COVID pandemic context this makes more sense than ever. The default, very well-known, treatment for these diseases is the antibiotics. However, it is necessary to develop new promising therapies based on alternative mechanisms because of the antibiotic resistance that has become one of the biggest global health problems. This work is focused on *Escherichia coli* infections which are the first cause of Urinary Tract Infections (UTIs) and Inflammatory Bowel Diseases (IBDs), both very common.

The new antiadhesive therapy for the treatment of *E. coli* is based on the bacterial adhesive mechanism. The investigators have synthesized the molecules called glycoconjugates and glicommimetics that attach to the wall pili of the bacteria in order to avoid the natural bacterial adhesion to the host mucosa epithelial cells. Thus preventing the first step of the disease, the infection and the inflammatory processes mediated by the immune system that cause the symptoms. The antibacterial therapy design is based on the mannose carbohydrate structure. The wall bacteria fimbriae protein adhere naturally to the mannose oligosaccharides of human cell. This new therapy has proved effective in numerous studies that show the prevention of bacterial adhesion in the host.

2. Introducción y antecedentes:

- i. Infecciones por *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC).

Las infecciones del tracto urinario (UTIs) son una de las infecciones más prevalentes en el mundo.(1) Las cepas de *Escherichia coli* actúan penetrando en el organismo y

colonizando el tracto urinario. Este tipo de cepas se denominan *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC). Las UTIs son enfermedades muy comunes que afectan a una gran parte de la población y las sufren 150 millones de personas al año. “Se estima que el 50% de las mujeres desarrollaran al menos una vez en su vida una infección del tracto urinario”. Esto supone un problema sanitario y altos costes sociales. Cuando la infección alcanza a través de la uretra el riñón pueden surgir complicaciones graves e irreversibles como septicemia, lo que provoca fallo renal e incluso la muerte del individuo. Alternativamente, cuando las bacterias alcanzan la vejiga, se produce cistitis que es muy típica en mujeres con síntomas como quemazón al orinar, dolor de vejiga y aumento de la frecuencia urinaria. Se sabe que el 90% de las bacterias que causan las infecciones urinarias son de cepas de *Escherichia coli* Uropatógena. (1)

Hasta ahora, los pacientes con UTIs leves como la cistitis, son tratados con antibióticos como trimetropín-sulfametoxazol, nitrofurantoína, ciprofloxacino, norfloxacina, ceftriaxona, entre otros.(2) Estos fármacos, tienen como diana la célula bacteriana, de tal manera, que penetran en ella y permiten la disminución de la sintomatología de la enfermedad. Además, previenen las complicaciones de la infección que pueden ser mortales. Sin embargo, el uso recurrente de los antibióticos, ha llevado a que las bacterias desarrollen resistencias, lo que da lugar a un problema de fallo en el tratamiento. Este tratamiento fallido de los antimicrobianos, se convierte en un problema de salud pública a nivel mundial y lleva a muchos investigadores a destacar la necesidad de desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento y prevención de UTIs.(1) La clave para el desarrollo de nuevas terapias es el mecanismo de adhesión que realiza *Escherichia coli* al invadir la mucosa del hospedador.

ii. Infecciones por *Escherichia coli* Adherente Invasiva (AIEC).

Al igual que en las cepas de *E.coli* Uropatógena, las células de *Escherichia coli* Adherente Invasiva (AIEC) desarrollan su principal mecanismo de patogenia adhiriéndose a la mucosa intestinal. En la enfermedad inflamatoria del intestino delgado, comúnmente conocida como enfermedad de Crohn, los autores afirman la presencia de un desorden en la flora intestinal normal del paciente. Se trata de una enfermedad que cursa con una elevada respuesta del sistema inmune y una inflamación grave que afecta a las células epiteliales intestinales de pacientes predispuestos genéticamente. (3)

El tratamiento de esta enfermedad inflamatoria intestinal ha sido, hasta ahora, tratamiento inmunosupresor, al ser una infección con una gran participación del sistema inmunitario. Las cepas de AIEC, se unen a las células epiteliales del intestino, activan macrófagos y otras células del sistema inmune, lo que induce la secreción de citoquinas proinflamatorias y de altos niveles de TNF- α . Este Factor de Necrosis Tumoral, explica la grave respuesta inflamatoria característica de esta enfermedad. Por ello, los fármacos innovadores empleados en la última década han sido los anticuerpos monoclonales que disminuyen los mediadores proinflamatorios. Este tratamiento sintomático, ha demostrado éxito mejorando la calidad de vida de una minoría de pacientes, debido a que sufre remisiones un año después de haberlo tomado. (4)

La terapia antiadhesiva antibacteriana ha sido descrita por los investigadores como una buena nueva alternativa para el tratamiento de la enfermedad de Crohn y de la enfermedad inflamatoria del tracto urinario. Esta terapia posee como diana el

mecanismo específico de la patogenicidad de la enfermedad en una etapa temprana y evita los procesos inflamatorios que dañan al huésped.

iii. Mecanismo de patogenicidad de *Escherichia coli*.

Las cepas de *E. coli* UPEC y AIEC desarrollan un mecanismo de patogenicidad que da lugar a la diana clave en la terapia antiadhesiva. Se trata de la unión carbohidrato-proteína que tiene lugar entre el hospedador y las bacterias.

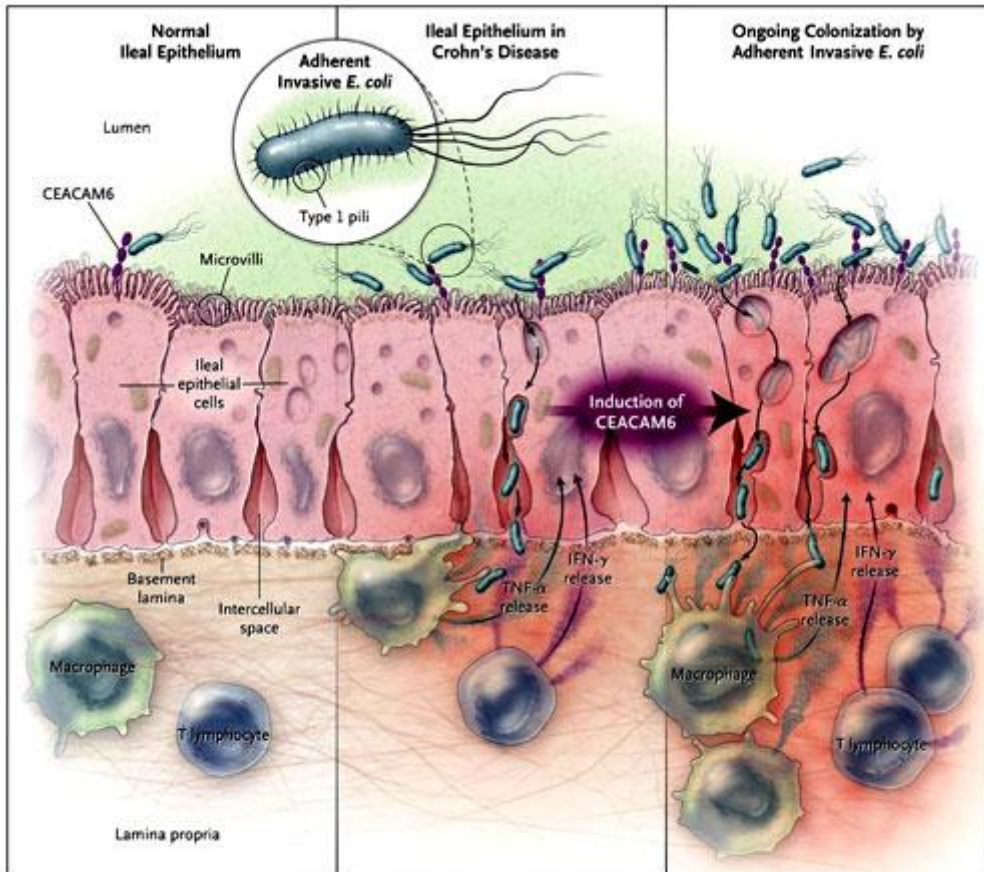


Figura 1. Mecanismo de adhesión de *Escherichia coli* en las células epiteliales del intestino.

La unión a las células del hospedador se realiza a través de unos orgánulos de las bacterias llamados fimbrias de tipo 1 y se encuentran en la pared celular bacteriana. Son capaces de reconocer moléculas formadas por hidratos de carbono que se hallan naturalmente en las membranas de las células epiteliales en la mucosa del hospedador. Las fimbrias reconocen específicamente los oligosacáridos del hospedador a través de una proteína denominada FimH y se unen a ellos produciendo el fenómeno de la adhesión carbohidrato-proteína.

La unión en el hospedador está mediada por la glucoproteína Uroplakin 1a en la mucosa de la vejiga humana que tiene estructura de manosa. La unión moderada de FimH a la mucosa urotelial es suficiente para que la bacteria evada las células fagocíticas del sistema inmune, pueda quedar en un estado de latencia y de lugar a futuras recaídas.(5)

De la misma manera, las cepas de *E. coli* Adherente Invasiva, en el intestino delgado también expresan las fimbrias de tipo 1. La proteína FimH en la superficie de estos orgánulos, se une específicamente a CEACAM 6 (Molécula 6 de Adhesión Celular Relacionada con el Antígeno Carcinoembrionario) que se encuentra en la membrana apical de la mucosa intestinal.(6) Los investigadores confirman la existencia de una sobreexpresión de CEACAM 6 en los pacientes enfermos de Crohn, lo que provoca un aumento del mecanismo de adhesión de las bacterias, una elevada colonización de AIEC en el intestino y el agravamiento de la enfermedad. (7)

La terapia antiadhesiva posee como diana el mecanismo de adhesión de las bacterias a la mucosa para evitar su adhesión a las células, prevenir y tratar la enfermedad.

El mecanismo de adhesión da lugar a la formación de una estructura ordenada y organizada entre las bacterias en respuesta al sistema inmune. Estas estructuras, denominadas biofilmes, constituyen la excreción de glicopolímeros extra celulares que van a ayudar a la formación de una red con el fin de establecer una comunicación entre ellas. Los antibióticos convencionales resultan incapaces de penetrar en la bacteria a través de esta red de defensa. Sin embargo, la terapia antiadhesiva, resulta un escalón más, ya que al actuar fuera de la célula y prevenir la adhesión, impide la formación de biofilmes y la unión entre bacterias. (8)

iv. Estructura de la adhesina FimH de las fimbrias de tipo 1 de *Escherichia coli*.

Como se ha visto, la unión de las bacterias a la mucosa se produce a través de la proteína específica de manosa de las fimbrias de tipo 1: FimH. Los investigadores en la terapia antiadhesiva denotan la importancia de la estructura de FimH en la unión específica a los carbohidratos de membrana.

La proteína FimH, posee dos dominios, el N-terminal o dominio de lectina que se encuentra en el extremo apical y está formado por el Dominio de Unión a Manosa o Dominio de Unión a Carbohidratos (CDR). Tiene como función mediar la unión específica a los residuos de manosa en la superficie de la célula epitelial hospedadora. El C-terminal o dominio de pili, se encuentra unido a las otras proteínas de la fimbria bacteriana y tiene como función unir la proteína a la pared celular. Entre ambos dominios encontramos un dominio conector que media la conexión de los otros dos dominios. Este dominio posee una importante función: modula la conformación de la proteína del estado de alta afinidad por manosa (abierto) al estado de baja afinidad por manosa (cerrado). En numerosas ocasiones, las bacterias se encuentran en situación de estrés en el organismo y son capaces de cambiar de la conformación de baja afinidad (Low Affinity, LA) a la conformación de alta afinidad (High Affinity, HA), lo que permite a las bacterias pasar del estado de latencia a superar situaciones extremas y alargar su supervivencia.

El dominio de unión a carbohidratos CDR consta de un bolsillo polar, formado por aminoácidos polares como el ácido aspártico, la glutamina y la asparagina (Asp, Gln, Asn). Sin embargo, alrededor del bolsillo de unión a manosa se encuentran aminoácidos hidrofóbicos como la tirosina, la isoleucina y la fenilalanina (Tyr, Ile, Phe). "Muchos de estos aminoácidos no varían entre las distintas cepas de *Escherichia coli*", afirman los autores. (9)

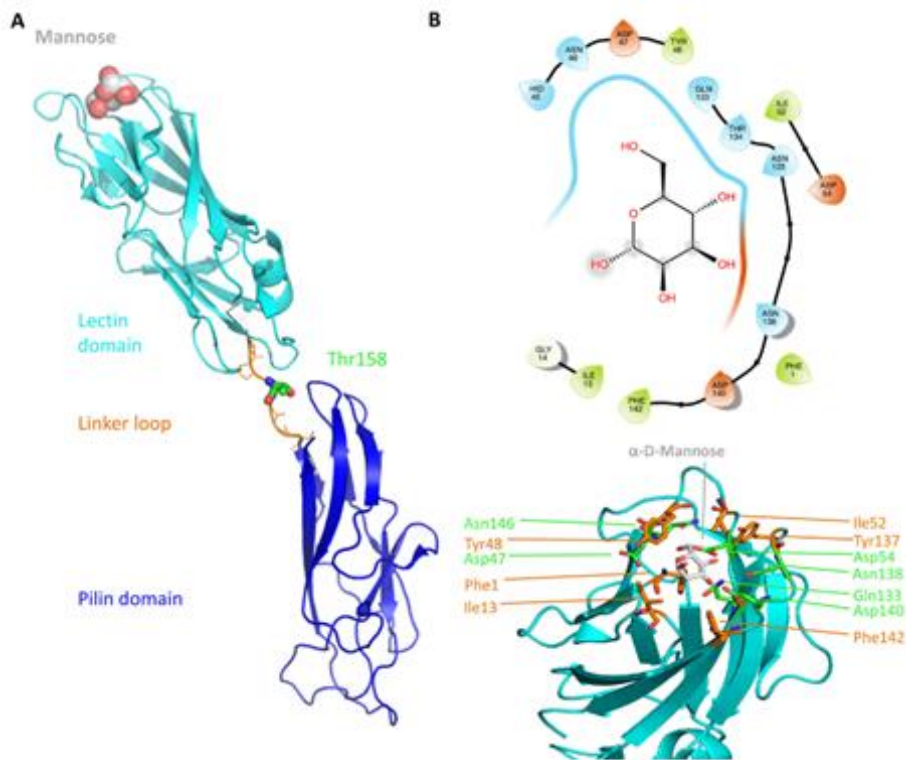


Figura 2. Estructura de la adhesina FimH de *Escherichia coli*.

v. Resistencia a antibióticos.

La resistencia a un fármaco es la capacidad que desarrolla un microorganismo a evadir el efecto terapéutico antimicrobiano. La resistencia a antibióticos es un problema grave de salud pública a nivel mundial que se encuentra hoy en día muy presente entre la comunidad científica. Estas resistencias, hacen que los investigadores aseguren necesario el desarrollo de nuevos fármacos. Las resistencias a los antibióticos por *E. coli* están creciendo cada vez más y los antibióticos tradicionales son menos eficaces contra esta bacteria. Se observa en la figura 3, la sensibilidad a los antibióticos es cada vez menor, y la resistencia a los mismos cada vez mayor.

Las terapias antiadhesivas actúan frente a la adhesión de *E.coli* a la mucosa, lo que reduce el riesgo de resistencias debido a su mecanismo superficial. La adhesina FimH no da lugar a mutaciones ya que no son beneficiosas para la propia bacteria. Las mutaciones en FimH impedirían la adhesión de las bacterias y la consecuente invasión. En definitiva, la resistencia a la terapia antiadhesiva frenaría el mecanismo de la patogenicidad y la infección. (10)

Por todo ello, los investigadores abogan por una urgencia en el desarrollo de nuevas terapias antibacterianas para la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas, con el fin de minimizar las resistencias que provocan los antibióticos y las recaídas causadas por la patogenicidad de la enfermedad, que podrían verse disminuidas con la terapia antiadhesiva.

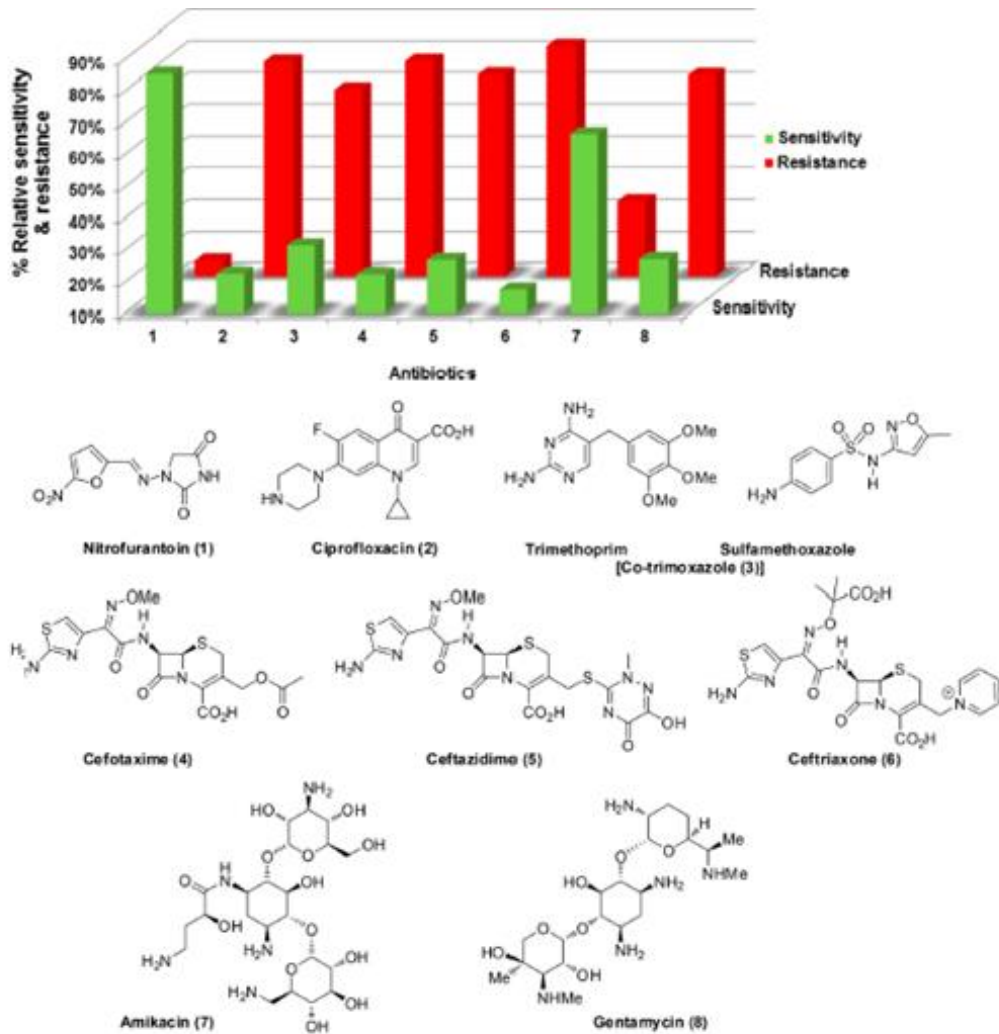


Figura 3. Patrones de resistencia y sensibilidad a los antibióticos convencionales en *Escherichia coli*.

3. Objetivo:

El objetivo de mi Trabajo de Fin de Grado es hacer una revisión bibliográfica de la literatura, con el fin de mostrar los nuevos hallazgos en el diseño de terapias antibacterianas antiadhesivas basadas en carbohidratos para el tratamiento de enfermedades bacterianas, poniendo como ejemplo la infección por *Escherichia coli*.

4. Material y métodos:

Para la revisión bibliográfica de artículos científicos, los materiales empleados han sido las bases de datos: Web of Science, Pub Med, Science direct, Google Scholar, entre otras.

5. Resultados y Discusión.

Los investigadores han hallado una nueva terapia antiadhesiva basada en carbohidratos que impide la unión de FimH a los carbohidratos de la membrana de la célula epitelial hospedadora. La nueva terapia previene la adhesión de las bacterias a la mucosa

intestinal o vesical, lo que evita la invasión celular en su fase temprana y la posterior infección.

En 1986 N. Firon y col. verifican la especificidad de la α -Metil manosa por la unión a FimH. Este compuesto tiene capacidad de unión a esta proteína e impide la adhesión de las bacterias cuando se encuentra unida a ella.(11) Treinta años más tarde L. Mousavifar y col., confirman dicha especificidad. Los resultados de su estudio relacionan la terapia basada en la estructura de la α -Metil manosa unida a una cepa de UPEC con una disminución significativa de la adherencia de *E. coli* en las células del hospedador en la vejiga humana tal y como se observa en la figura 4. (10)

Desde el descubrimiento de la unión de las bacterias a los carbohidratos naturales, los investigadores han basado sus esfuerzos en sintetizar los hidratos de carbono.

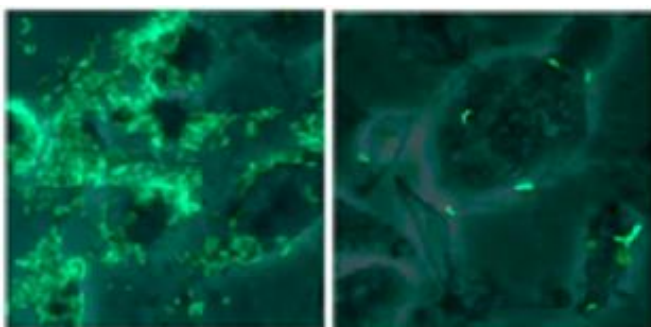


Figura 4. Células in vitro epiteliales humanas de la vejiga invadidas por *Escherichia coli* unida a una proteína de fluorescencia GFP, antes (izquierda) y después (derecha) de la exposición a la terapia antiadhesiva con α -Metil manosa.

5.1 Inhibidores monovalentes de FimH.

Los glicoconjugados derivados de manosa son moléculas compuestas por una unidad de α -manosa y una parte no glucosídica unida a través del enlace O-glucosídico. Tienen una elevada afinidad por la adhesina de *E.coli* debido a que interaccionan con ella. Son prometedoras para actuar frente a la diana en la terapia antiadhesiva y evitan la unión de los carbohidratos naturales de las células epiteliales del hospedador. Muchos investigadores los han descrito como los “inhibidores monovalentes de FimH”, debido a que se unen a FimH a través de una sola unidad de carbohidrato: la manosa.

A) O-Derivados de α -D-manosa.

Los derivados O-derivados de α -D-manosa están formados por una unidad de α -manosa y un sustituyente hidrofóbico no glucosídico en el oxígeno del carbono anomérico. Su biodisponibilidad oral se asemeja a la de la manosa y es alta ya que son capaces de llegar al torrente sanguíneo y distribuirse a los tejidos. Los derivados monovalentes de O-manosa se describen como ventajosos para el tratamiento y prevención de Infecciones del Tracto Urinario (UTIs), debido a que son capaces de acceder a la mucosa del tracto urinario por absorción oral en el intestino y posterior excreción a la vejiga por vía renal. (8)

- O-Alquil α -D-manosa:
- Heptil manosa (HM):

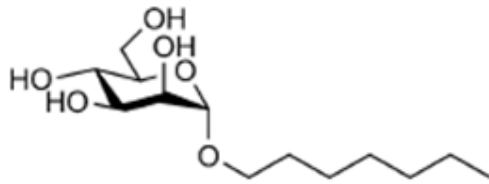


Figura 5. Heptil Manosa (HM).

Los investigadores L. Mousavifar y col. describen, gracias a las técnicas avanzadas de rayos X, los aminoácidos que participan en la unión entre la Heptil manosa y FimH. La cadena hidrofóbica no glucosídica es esencial, ya que se unen a los dos aminoácidos hidrofóbicos de tirosina: Tyr 48, Tyr 137. Estas dos tirosinas se denominan “la puerta de tirosina” y se encuentran alrededor del dominio de unión a carbohidratos (CDR) de la proteína. Otro aminoácido hidrofóbico de FimH que tiene un papel crucial es la isoleucina 52, Ile 52, que forma parte del CDR en el bolsillo de unión a manosa de la proteína. La cadena no glucosídica se une por interacciones fuertes hidrofóbicas o de Van der Waals a las tirosinas Tyr 48 y Tyr 137 de la puerta de tirosina. A su vez, la isoleucina, Ile 52, se une al residuo de α -D-manosa por interacciones hidrofóbicas o de Van der Waals y el OH de la α -D-manosa se une a una fenilalanina (Phe1) en el bolsillo de unión a manosa CDR a través de puentes de hidrógeno. (10)

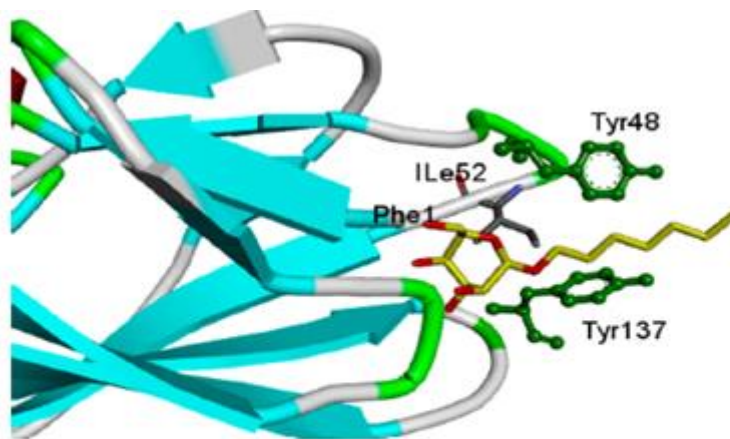


Figura 6. Estructura de rayos X de la Heptil manosa unida a la llamada "puerta de tirosina" de la adhesina FimH de *Escherichia coli*.

La afinidad de un compuesto que se une reversiblemente a su receptor se mide por su constante de disociación: K_d . Es más afín a la interacción, cuanto menor es el valor de la constante de disociación. En concreto, la Heptil Manosa posee una elevada afinidad a la unión a FimH, ya que su K_d es de 5 nM, comparada con la α -manosa y la α -Metil manosa cuyas constantes de disociación son de 2300 nM y 2200 nM, respectivamente. (10)

A pesar de la gran afinidad de HM por FimH in vitro, tiene una baja efectividad in vivo al ser su biodisponibilidad oral muy baja. No permite atravesar las membranas celulares para llegar a la vejiga a través de la sangre. El impedimento a alcanzar el sitio de la infección, hace a los investigadores enfocarse en análogos de Heptil Manosa que mejoren la eficacia in vivo. (12)

Tabla 1. Constantes de disociación de los derivados de O-Alquil manosa. (Elaboración propia. Fuente:(11)):

Compuesto	Constante de disociación K_d (nM)	K_d relativa
Manosa	2 300	0,96
O-Metil α -D manosa	2 200	1
O-Heptil α -D manosa (HM)	5	440

➤ O-Aril α -D-manosa:

El dominio de unión a carbohidratos (CDR) de la proteína FimH está compuesto por la puerta de tirosina que posee dos anillos aromáticos de la Tyr 48 y de la Tyr 137. Los investigadores europeos B. Fiege y col., describen en su publicación el diseño racional de nuevos derivados de O-manosa basados en la sustitución de la cadena alquílica por un sustituyente aromático. Estos sustituyentes aromáticos se unen al CDR ya que son estructuralmente similares al dominio. Los anillos bencénicos se unen por fuerzas de Van der Waals, interacciones de tipo $\pi - \pi$, a la Tyr 48 y a la Tyr 137 de la puerta de tirosina, estas uniones son más fuertes. La molécula de manosa se une al bolsillo de unión a manosa en el CDR. (12)

- O-bifenil α -D-manosa:

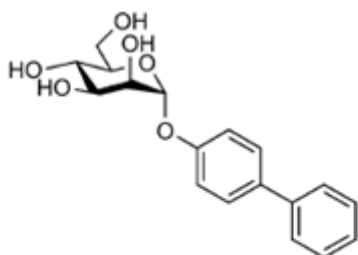


Figura 7. O-bifenil α -D-manosa

Los derivados de O-manosa con anillos aromáticos son compuestos prometedores por vía oral para la infección en la mucosa urotelial por UPEC. Los investigadores afirman este tipo de compuestos poseedores de un equilibrio justo entre la solubilidad por vía oral y el grado de lipofilia. De esta manera, atraviesan las membranas al ser moléculas anfipáticas, alcanzan el torrente sanguíneo, lo que les permite llegar al sitio de la infección: la vejiga. Además, su K_d es baja de 17,7 nM, indica una gran afinidad por el CDR de FimH. (12)

- Orto-cloro O-bifenil carboxilo α -D-manosa y Orto-cloro O-bifenil carbonitrilo α -D-manosa:

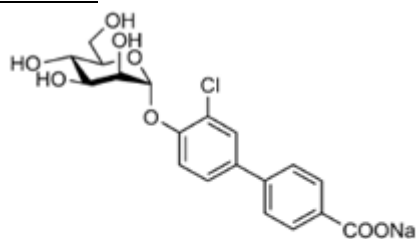


Figura 8. Orto-cloro O-bifenil carboxilo α -D-manosa.

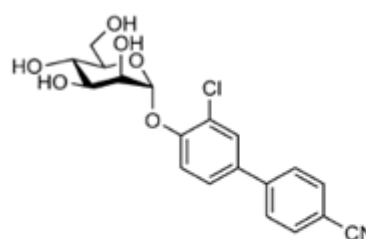


Figura 9. Orto-cloro O-bifenil carbonitrilo α -D-manosa.

Al igual que su derivado bifenil, estos compuestos poseen una elevada afinidad por FimH al unirse a los residuos de tirosina en el Dominio de Reconocimiento de Carbohidratos (CDR). El carboxilo posee una constante de disociación (Kd) de 3,5 nM y el derivado con su grupo bioisostero carbonitrilo, posee una Kd solo de 1,3 nM. Esto es debido a la presencia del sustituyente cloro, del sustituyente carboxilo y ciano en la cadena aromática de los compuestos. Los investigadores afirman una disminución de la densidad electrónica en los dos anillos aromáticos debido a la presencia de estos dos sustituyentes que atraen carga electrónica por fuerzas electroestáticas. Esto permite una disminución de la nube electrónica en los anillos aromáticos de la molécula y una fuerte unión $\pi - \pi$ entre estos y las tirosinas (Tyr 48 y Tyr 137) de la puerta de tirosina del CDR. Se unen a la proteína FimH en su conformación de baja afinidad por manosa (LA), lo que supone una ventaja en la prevención y tratamiento de las enfermedades como UTIs debido a que se unen a la bacteria en su estado de latencia (12). Además, en el estudio de farmacocinética de estos compuestos realizado por los investigadores S. Kleeb y col., se afirma la mejora de biodisponibilidad oral respecto a la de su derivado bifenilo y su alta Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de adhesión mantenida durante 8h en la orina. (13)

- Nitro-indolinil O-fenil α -D-manosa:

Los autores X. Jiang y col. de la Universidad de Basilea, describen este compuesto como óptimo para el acoplamiento al dominio de FimH, lo que da lugar a una mejora de la afinidad, por lo tanto de la actividad. Su constante de disociación es la más baja hasta ahora, con un valor de 1 nM. "Este compuesto es el compuesto más activo probado in vivo hasta la fecha". Estas afirmaciones se explican por la presencia del grupo nitro en la molécula de indolina. Este grupo es un potente aceptor de electrones y estabiliza la molécula, lo que da lugar a la disminución de densidad electrónica en el anillo aromático de la indolina y a un acoplamiento perfecto a través de interacciones de tipo $\pi - \pi$ con la tirosina rica en electrones, Tyr 48, de FimH.

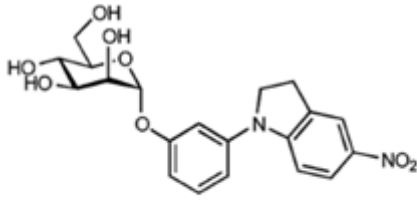


Figura 10. Nitro-indolinil O-fenil α -D-manosa.

La farmacocinética de este compuesto resulta tener buenos parámetros de absorción oral y excreción renal. Los estudios in vivo en animales revelan que la Mínima Concentración Inhibitoria de adhesión de este compuesto en la vejiga es clave porque es duradera. Posee una elevada tasa de inhibición de FimH tanto en la vejiga, como en los riñones ya que impide la adhesión de UPEC a las células hospedadoras. La actividad de esta molécula resulta equiparable a la actividad del antibiótico ciprofloxacino en los mismos modelos animales, lo que resultó muy prometedor para el nuevo compuesto al presentarse como su sustituto a bajas dosis. Por todo ello, los autores resaltan que el Nitro-indolinil O-fenil α -D-manosa es una buena terapia antiadhesiva, alternativa y prometedora, para el tratamiento y prevención de UTIs con terapia monovalente. (14) El objetivo en la terapia antiadhesiva es el tratamiento y prevención de infecciones bacterianas de una forma eficaz y efectiva. Por ello, uno de los retos de los investigadores tras el descubrimiento de estas terapias es mejorar el perfil farmacocinético por vía oral de los compuestos in vivo. El fin es aumentar su concentración en el lugar de acción donde se encuentra el mayor número de bacterias, dianas principales de estos fármacos. Para ello se han diseñado los profármacos de los O-derivados de manosa y los C-derivados de manosa.

B) Profármacos de los O-derivados de Aril manosa.

Los O-derivados de aril manosa se caracterizan por una solubilidad baja en la luz del intestino delgado que puede llevar a la precipitación del compuesto y a la no absorción oral a través de los enterocitos. Esto ha conducido a los investigadores a poner la lupa sobre posibles profármacos de fosfoesteres. Estos profármacos se han desarrollado y se presentan con un aumento de la solubilidad por vía oral en el intestino delgado.

Los profármacos incrementan la disolución del principio activo en el sistema digestivo, sin embargo no atraviesan la barrera intestinal para ir a sangre. La vida media en sangre de la aril manosa se eleva notablemente con los profármacos hasta llegar al lugar de acción. Los profármacos son hidrolizados de forma lenta por las enzimas fosfodiesterasas asociadas a la membrana apical del enterocito de manera que el principio activo se absorbe lentamente. Esta liberación lenta, da lugar a un aumento de la concentración máxima en el tracto urinario y a un incremento de la biodisponibilidad oral. Además se evita la precipitación en el intestino que impedía la absorción oral. Por lo tanto estos fosfoesteres en C4 de vida larga se presentan como óptimos para suplantar los problemas de disponibilidad oral in vivo de los O-aril derivados de manosa. (15)

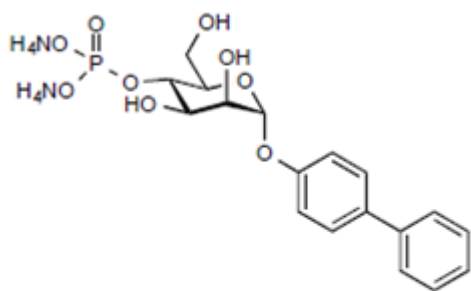


Figura 11. Profármaco en C4 del O-bifenil derivado de manosa

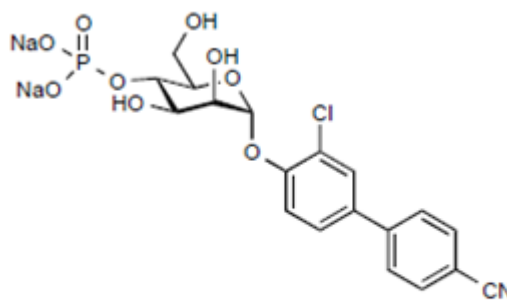


Figura 12. Porfármaco en C4 del Orto-cloro O-bifenil carbonitrilo α -D-manosa.

C) C- Derivados de α -D-manosa:

Las nuevas terapias antiadhesivas son eficaces, sin embargo presentan problemas de efectividad in vivo. En la enfermedad de Crohn está afectado el extremo inferior del intestino delgado y el comienzo del intestino grueso. En el nuevo diseño de inhibidores de la adhesina FimH, se ha sustituido el oxígeno anomérico de la α -manosa por un átomo de carbono. Surgen los llamados glicomiméticos C-derivados de manosa con el fin de evitar los problemas farmacocinéticos que suponen los O-derivados. Estos últimos son más fácilmente degradados en el sistema digestivo por las glicosidasas intestinales.

Las ventajas de los glicomiméticos frente a los O-derivados es la sustitución del oxígeno del carbono anomérico de la manosa. Debido a la presencia del carbono en el lugar del oxígeno, la manosa no es hidrolizada por las glicosidasas en el sistema digestivo. De esta manera, aumenta la biodisponibilidad en el sitio de la infección y la molécula llega intacta a la parte inferior del intestino delgado. A esto se suma que la molécula no se absorbe a nivel intestinal ya que no se degrada, disminuye su concentración en plasma y sus efectos secundarios. La adhesión de estos compuestos con otras proteínas de unión a manosa en macrófagos o en otras células inmunitarias desencadena una respuesta inmune no deseada. El glicomimético no se acopla a otras proteínas de unión específicas de manosa en el organismo ya que no se absorbe a sangre. Merman los efectos adversos no deseados y aumenta su especificidad en el lugar de acción.

- C-bifenil-alil α -D-manosa:

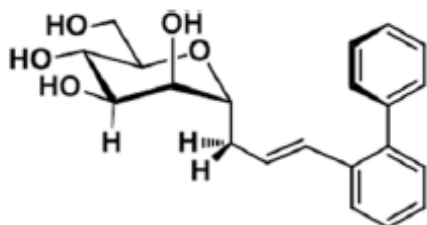


Figura 13. C-bifenil-alil α -D-manosa.

Este compuesto, tiene una cadena hidrofóbica con un grupo bifenilo y un grupo alilo. Los estudios de rayos X han permitido observar la unión a FimH. Al igual que afirman M. Touaibia y col. en su estudio, el primer anillo de fenilo se une a través de interacciones hidrofóbicas a la Tyr 48. El segundo anillo en orto del fenilo se une o a la Tyr 137 o a la

isoleucina 13 (Ile 13) (Figura 12). La flexibilidad de la cadena hidrofóbica de los C-derivados permite que el segundo anillo se una a la Ile 13, que se encuentra más profunda en el CDR. Este aminoácido se halla en el dominio de unión de FimH y se encarga de cambiar de la conformación abierta (HA) a cerrada (LA). Estas uniones fuertes hacen que este compuesto se presente por los investigadores como un compuesto de gran afinidad por FimH. Su constante de disociación es 6,9 nM, muy próxima a la de la Heptil manosa ($K_d = 5\text{nM}$). Los autores destacan su potencial como nueva terapia antiadhesiva debido a la unión a la Ile 13 que controla el cambio de baja afinidad a alta afinidad por manosa en la bacteria, y por lo tanto impide que pueda cambiar de conformación en caso de estrés ambiental. Sin embargo, los autores denotan la necesidad de más investigaciones. (16)

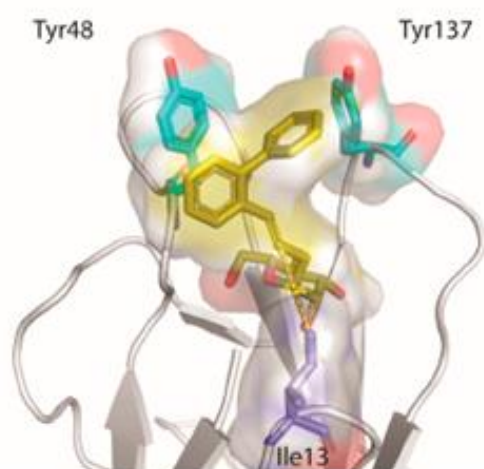


Figura 14. Unión de C-bifenil-alil α -D-manosa a FimH de *E. coli*.

- C-Metilamida orto-metil-bifenil (R)-hidroxi α -D-manosa:

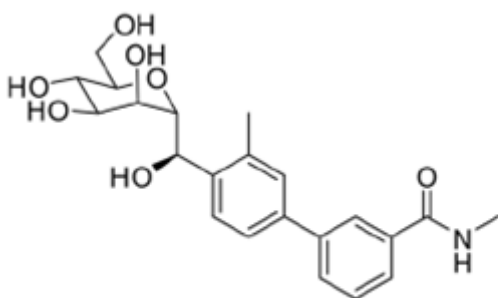


Figura 15. C-Metilamida orto-metil-bifenil (R)-hidroxi α -D-manosa.

Este compuesto se presenta como un glicomimético C-derivado con enlace C-glucosídico y con una fuerte unión. El grupo en orto-metilo en el primer anillo aromático mejora la unión hidrofóbica entre este anillo y la Tyr 137. El segundo anillo del bifenilo produce las interacciones π - π con el anillo de Tyr 48, que al igual que el primero, son más fuertes gracias a la presencia del grupo metilo en orto. El nuevo grupo metil-amida forma nuevas interacciones polares a través de uniones de tipo hidrogeno con FimH. Concretamente el carbonilo de la amida es un aceptor de enlaces de hidrogeno y se une al hidrogeno de la Tyr 137. La clave de la unión a FimH más eficaz se debe a la presencia

del grupo hidroxilo del carbono anomérico de la manosa. Este grupo hidroxilo en conformación R da lugar a una rotación de 40° de los anillos aromáticos del bifenílo. Gracias a dicha rotación, el OH forma las interacciones adicionales de tipo hidrogeno con un aspártico y con una asparagina del bolsillo de unión a manosa (CDR). Los investigadores L. Mydock-McGrane y col., declaran el isómero R como más eficaz con una Concentración Efectiva del 90% (EC90) de 31nM. En contra partida, el isómero S es menos activo debido a que no se produce la rotación de los anillos de bifenílo y no se producen las interacciones de hidrogeno con los aminoácidos polares de la adhesina. Los estudios farmacocinéticos abogan una buena biodisponibilidad oral de este compuesto ya que hay una evasión a las enzimas manosidasas del intestino y del plasma que lo degradan. Este compuesto tiene una gran estabilidad metabólica y da lugar a la prevención de formación de biofilmes. Se concluye que puede tratarse de una terapia prometedora, tanto para el tratamiento como para la prevención de infecciones crónicas tras sus estudios in vivo en modelos animales. (17)

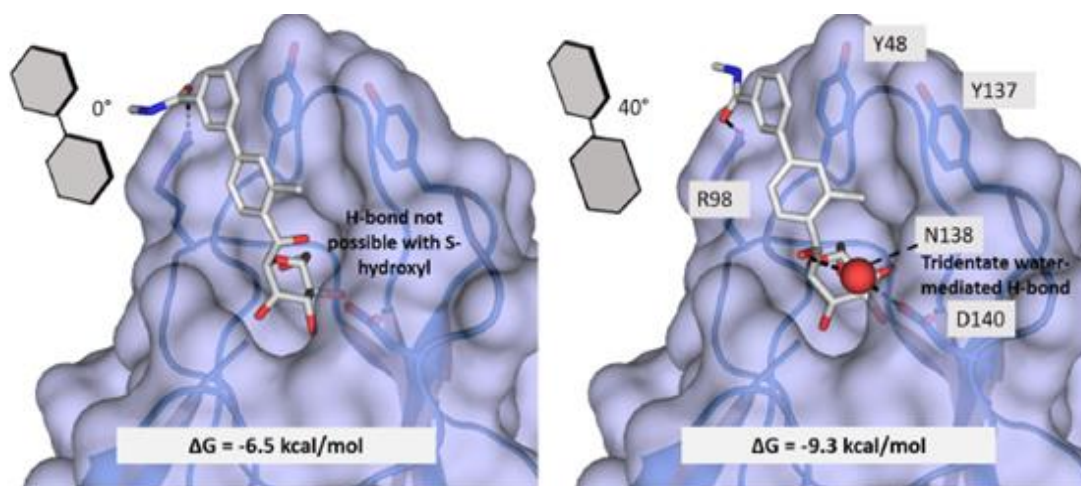


Figura 16. Isómero S-hidroxi (izquierda) y R-hidroxi (derecha) en su unión a través de enlaces de hidrogeno con la adhesina FimH.

5.2 Inhibidores de FimH multivalentes derivados de manosa.

Las glicoproteínas de transmembrana de las células epiteliales a las que se une FimH, no solo poseen un único residuo de manosa, si no que poseen varios residuos a los que se adhiere *E. coli* de forma natural.(10) En *E. coli* la unión a numerosos carbohidratos, llamada unión multivalente, se produce a través de las adhesinas FimH de unión específica manosa. Esta bacteria, con numerosas fimbrias en su superficie y cientos de adhesinas de tipo FimH, es capaz de unirse a un glicopolímero de fluorescencia formado por una única cadena principal y varias ramificaciones de manosa, tal y como muestran P.H Seeberger y col., en su estudio. (18)

Gracias al avance de la terapia antiadhesiva monovalente y al descubrimiento de la unión a muchas unidades de manosa en los procesos de adhesión natural, los investigadores han propuesto nuevas terapias basadas en los llamados “inhibidores multivalentes” de FimH. Estas nuevas moléculas están formadas por un mismo esqueleto de cadena unido a varias unidades de manosa, lo que forma un glicopolímero. La importancia de esta estructura, radica en el llamado “fenómeno de aglutinación”.

Varias bacterias se van a unir a una misma molécula de glicopolímero, lo que da lugar a la precipitación de las células bacterianas. Se produce una trampa para un mayor número de bacterias que van a ser eliminadas posteriormente por las heces y la orina. Se inhibe la formación de biofilmes, una ventaja resulta en una menor necesidad de dosis del fármaco y una disminución de los efectos secundarios encontrados con los glicomiméticos y glicoconjugados. (19)

En el diseño de estos inhibidores multivalentes los investigadores se han basado en la estructura de FimH y en la unión de la Heptil Manosa monoivalente. El objetivo de formar un glicopolímero con varias unidades de Heptil Manosa (HM) en su parte más externa y una cadena base de carbono, ha sido alcanzado por los investigadores.

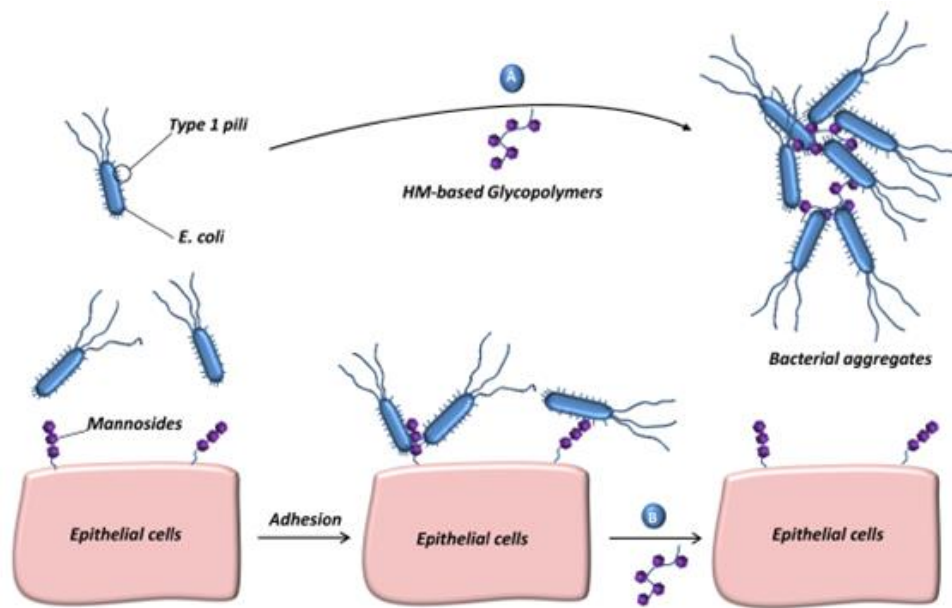


Figura 17. Mecanismo de los inhibidores multivalentes de *E.coli*. en el "fenómeno de aglutinación".

A) Heptil manosa trivalente:

Este compuesto se presenta como potente antiadhesivo, ya que mejora su capacidad de inhibición por FimH en UPEC en comparación con la Heptil manosa (HM). Este compuesto posee una elevada afinidad por FimH. Su K_d es de 2,4 nM, la mitad que la de su derivado HM ($K_d = 5$ nM) y quince veces menor que la de su análogo heptavalente (con 7 unidades de Heptil manosa, $K_d = 36,2$ nM). El análogo heptavalente de Heptil Manosa posee una elevada potencia de inhibición al tener 7 residuos de HM en su estructura, sin embargo el impedimento estérico explica su disminución de la afinidad. Por lo tanto, es importante tener en cuenta en el diseño multivalente de la terapia antiadhesiva, el número de unidades de manosa en el glicopolímero, la denominada "valencia", con el fin de evitar el impedimento estérico. Al igual que los derivados monoivalentes, se unen las unidades de manosa al CDR y la cadena hidrofóbica a la puerta de tirosina de FimH. Por otro lado, se van a unir a varias adhesinas de FimH de bacterias y producen la agregación de células bacterianas que van a ser eliminadas a través de la orina o heces. Es por ello que este compuesto se presenta como un potente inhibidor, ya que es capaz de dar lugar al fenómeno de aglutinación. (20)

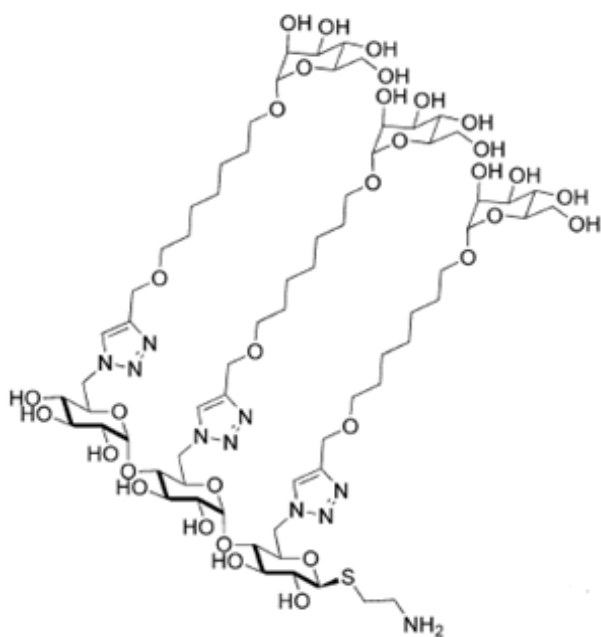


Figura 18. Heptil Manosa trivalente.

B) Heptil Manosa heptavalente unida a β -ciclodextrina:

Los investigadores han aprovechado la potencia inhibitoria de la HM heptavalente para dar lugar a una nueva terapia antiadhesiva que no produzca impedimento estérico y que sea eficaz. Para ello, la Heptil Manosa heptavalente unida a β -ciclodextrina es sintetizada, tal y como se muestra en la publicación de J. Bouckaert y col.(21) La β -ciclodextrina, es empleada por la industria farmacéutica junto a algunos fármacos comerciales. Su utilidad se basa en el poco carácter toxicológico que presenta y el aumento de solubilidad que induce a algunos fármacos liposolubles. Es por ello que se opta por la β -ciclodextrina para la cadena base de la nueva terapia antiadhesiva multivalente en el tratamiento de enfermedad infecciosa del tracto urinario. (22)

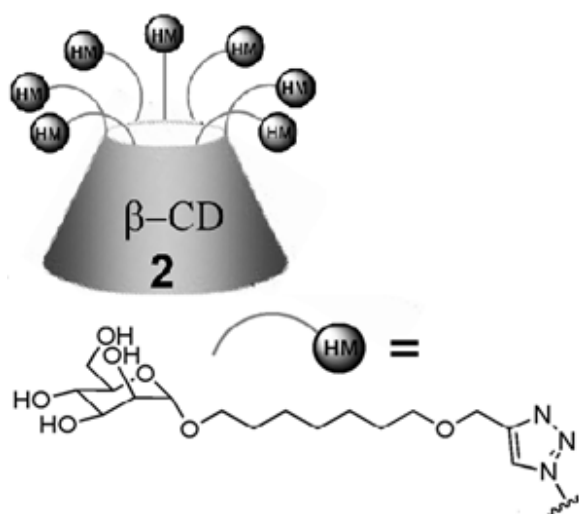


Figura 19. Heptil Manosa heptavalente unida a β -ciclodextrina.

Este compuesto tiene una elevada afinidad por FimH debido a su baja $K_d = 2,9$ nM. La unión de las HM a FimH depende de la longitud de la cadena de unión a la ciclodextrina. Los científicos confirman que la longitud entre la HM y la cadena base debe ser corta, de 7 carbonos tal y como se observa en la figura 17. En este estudio se demuestra la unión de cada unidad de Heptil manosa a una molécula de FimH de diferentes bacterias. Da lugar a agregados de muchas células bacterianas que van a ser eliminados, a lo que se atribuye su elevada potencia de inhibición. Los estudios in vivo en modelos animales, indican un aumento de solubilidad notoria, que le permite acceder a la vejiga a través de los riñones con facilidad y rapidez. Esta elevada especificidad en el lugar de acción hace que se eviten efectos secundarios no deseados. No se produce la unión del fármaco a glicoproteínas de manosa en macrófagos y no da lugar a una respuesta del sistema inmune no esperada. En comparación con su homólogo monovalente Heptil Manosa, los investigadores analizan una necesidad de 100 veces menos dosis de HM β -ciclodextrina heptavalente para alcanzar la misma inhibición. Su elevada solubilidad y elevado peso molecular hacen que tenga un perfil farmacocinético por el cual no pueda ser administrado por vía oral. Por lo tanto, esta nueva terapia antiadhesiva basada en HM multivalente, se presenta como un potente tratamiento y prevención para infecciones del tracto urinario por bacterias como UPEC por vía intravenosa. (21)

6. Conclusión.

El uso recurrente de antibióticos, la evolución y las mutaciones de los microorganismos dan lugar al problema de salud pública mundial que supone la resistencia a los mismos. “La resistencia a los antibióticos prolonga las estancias hospitalarias, incrementa los costos médicos y aumenta la mortalidad” según la Organización Mundial de la Salud (OMS).(23) Se trata de un problema con un alcance a futuro.

Los investigadores apuestan por el diseño de nuevas terapias antiadhesivas antibacterianas. Se presentan como nuevos fármacos innovadores para el tratamiento y prevención de infecciones bacterianas por bacterias como *Escherichia coli*. Esta nueva terapia es muy prometedora debido a que no es invasiva al tener un mecanismo superficial. Actúa en una etapa temprana de la enfermedad, evita las reacciones inflamatorias que tanto dañan al huésped, no desarrolla resistencias frente a *E. coli* y solventa el problema del uso recurrente de los antibióticos. Otro punto a favor es que se han descubierto moléculas muy selectivas que necesitan poca concentración de fármaco en el hospedador, lo que disminuye la aparición de efectos adversos no deseados. En definitiva se trata de una terapia eficaz, efectiva y segura.

La apuesta por la investigación de estas nuevas terapias antibacterianas antiadhesivas en humanos puede ser prometedora y esperanzadora para aminorar este tipo de enfermedades. No solo para el tratamiento de bacterias, sino de otros microorganismos que hoy en día suponen un problema sanitario muy peligroso. En el contexto de la pandemia mundial se ha experimentado que pueden desencadenar complicaciones graves para la salud y dar lugar a un aumento de la mortalidad a nivel mundial.

7. Bibliografía:

1. Mayer K, Eris D, Schwardt O, Sager CP, Rabbani S, Kleeb S, et al. Urinary tract infection: Which conformation of the bacterial lectin FimH is therapeutically relevant? *J Med Chem.* 2017;60(13):5646-62.
2. Calderón-Jaimes E, Casanova-Román G, Galindo-Fraga A, Gutiérrez-Escoto P, Landa-Juárez S, Moreno-Espinosa S, et al. Diagnóstico y tratamiento de las infecciones en vías urinarias: un enfoque multidisciplinario para casos no complicados. *Bol Méd Hosp Infant México.* 2013;70(1):3-10.
3. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory Bowel Disease. *Annu Rev Immunol.* 1 de marzo de 2010;28(1):573-621.
4. Alvarez Dorta D, Sivignon A, Chalopin T, Dumych TI, Roos G, Bilyy RO, et al. The Antiadhesive Strategy in Crohn's Disease: Orally Active Mannosides to Decolonize Pathogenic *Escherichia coli* from the Gut. *ChemBioChem.* 17 de mayo de 2016;17(10):936-52.
5. Zhou G, Mo W-J, Sebbel P, Min G, Neubert TA, Glockshuber R, et al. Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding. *J Cell Sci.* 2001;114(22):4095-103.
6. Barnich N, Carvalho FA, Glasser A-L, Darcha C, Jantscheff P, Allez M, et al. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest.* 1 de junio de 2007;117(6):1566-74.
7. Sivignon A, Yan X, Alvarez Dorta D, Bonnet R, Bouckaert J, Fleury E, et al. Development of Heptylmannoside-Based Glycoconjugate Antiadhesive Compounds against Adherent-Invasive *Escherichia coli* Bacteria Associated with Crohn's Disease. Maloy S, editor. *mBio.* 17 de noviembre de 2015;6(6):e01298-15.
8. Sattin S, Bernardi A. Glycoconjugates and Glycomimetics as Microbial Anti-Adhesives. *Trends Biotechnol.* junio de 2016;34(6):483-95.
9. Krammer E-M, de Ruyck J, Roos G, Bouckaert J, Lensink M. Targeting Dynamical Binding Processes in the Design of Non-Antibiotic Anti-Adhesives by Molecular Simulation—The Example of FimH. *Molecules.* 5 de julio de 2018;23(7):1641.
10. Mousavifar L, Touaibia M, Roy R. Development of Mannopyranoside Therapeutics against Adherent-Invasive *Escherichia coli* Infections. *Acc Chem Res.* 20 de noviembre de 2018;51(11):2937-48.
11. Firon N, Ashkenazi S, Mirelman D, Ofek I, Sharon N. Aromatic alpha-glycosides of mannose are powerful inhibitors of the adherence of type 1 fimbriated *Escherichia coli* to yeast and intestinal epithelial cells. *Infect Immun.* 1987;55(2):472-6.
12. Fiege B, Rabbani S, Preston RC, Jakob RP, Zihlmann P, Schwardt O, et al. The Tyrosine Gate of the Bacterial Lectin FimH: A Conformational Analysis by NMR

- Spectroscopy and X-ray Crystallography. *ChemBioChem*. 26 de mayo de 2015;16(8):1235-46.
13. Kleeb S, Pang L, Mayer K, Eris D, Sigl A, Preston RC, et al. FimH Antagonists: Bioisosteres To Improve the in Vitro and in Vivo PK/PD Profile [Internet]. American Chemical Society; 2015 [citado 21 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jm501524q>
 14. Jiang X, Abgottspon D, Kleeb S, Rabbani S, Scharenberg M, Wittwer M, et al. Antiadhesion Therapy for Urinary Tract Infections—A Balanced PK/PD Profile Proved To Be Key for Success. *J Med Chem*. 24 de mayo de 2012;55(10):4700-13.
 15. Kleeb S, Jiang X, Frei P, Sigl A, Bezençon J, Bamberger K, et al. FimH Antagonists: Phosphate Prodrugs Improve Oral Bioavailability. *J Med Chem*. 14 de abril de 2016;59(7):3163-82.
 16. Touaibia M, Krammer E-M, Shiao TC, Yamakawa N, Wang Q, Glinschert A, et al. Sites for Dynamic Protein-Carbohydrate Interactions of O- and C-Linked Mannosides on the E. coli FimH Adhesin. *Molecules*. julio de 2017;22(7):1101.
 17. Mydock-McGrane L, Cusumano Z, Han Z, Binkley J, Kostakioti M, Hannan T, et al. Antivirulence C -Mannosides as Antibiotic-Sparing, Oral Therapeutics for Urinary Tract Infections. *J Med Chem*. 27 de octubre de 2016;59(20):9390-408.
 18. Disney MD, Zheng J, Swager TM, Seeberger PH. Detection of Bacteria with Carbohydrate-Functionalized Fluorescent Polymers. *J Am Chem Soc*. 1 de octubre de 2004;126(41):13343-6.
 19. Cecioni S, Imberty A, Vidal S. Glycomimetics versus multivalent glycoconjugates for the design of high affinity lectin ligands. *Chem Rev*. 2015;115(1):525-61.
 20. Almant M, Moreau V, Kovensky J, Bouckaert J, Gouin SG. Clustering of Escherichia coli Type-1 Fimbrial Adhesins by Using Multimeric Heptyl α -D-Mannoside Probes with a Carbohydrate Core. *Chem – Eur J*. 29 de agosto de 2011;17(36):10029-38.
 21. Bouckaert J, Li Z, Xavier C, Almant M, Caveliers V, Lahoutte T, et al. Heptyl α -D-Mannosides Grafted on a β -Cyclodextrin Core To Interfere with Escherichia coli Adhesion: An In Vivo Multivalent Effect. *Chem – Eur J*. 10 de junio de 2013;19(24):7847-55.
 22. Caballero FO. Síntesis y reconocimiento molecular de glicoclústeres y glicodendrimeros sobre un núcleo de β -ciclodextrina. Universidad Almería; 2004. 283 p.
 23. Resistencia a los antibióticos [Internet]. [citado 12 de junio de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibióticos>.