

UNIVERSIDAD CEU CARDENAL HERRERA

CEINDO - CEU Escuela Internacional de Doctorado

PROGRAMA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LA SALUD



CEU

*Escuela Internacional  
de Doctorado*

**Desarrollo de modelos matemático-topológicos a partir de quinolonas para predecir actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM).  
Búsqueda y obtención de nuevos antibacterianos.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por  
Dña. Beatriz Suay García

Directores:  
Dr. D. Pedro Alemán López  
Dra. Dña. María Teresa Pérez Gracia

Valencia, 2018



## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi gratitud al finalizar este trabajo a todos aquellos que han hecho posible que sea hoy una realidad:

A la Dra. Teresa Pérez Gracia, gracias por ayudar a este pequeño saltamontes a dar su primer salto hacia el mundo de la investigación. Ha sido un auténtico privilegio aprender al lado de alguien que transmite tanta ilusión y pasión por lo que hace. De ti he aprendido que la ciencia, como todo en la vida, siempre sale mejor cuando se le pone corazón. Tu absoluta disponibilidad, tu forma de trabajar y, sobre todo, tu eterna paciencia a la hora de enseñar, son los responsables de que este trabajo sea una realidad. El apoyo incondicional que he recibido por tu parte, desde aquel primer congreso de estudiantes hace 6 años hasta el día de hoy, ha sido clave en mi evolución como investigadora y como persona. Gracias por todos los momentos pasados y, sobre todo, por los que quedan por venir.

Al Dr. Pedro Alemán López, gracias por acogerme bajo tu tutela para la realización de este trabajo. Contigo he entendido el famoso dicho de que “la paciencia es la madre de la ciencia”. Que a veces, es mejor dar un paso hacia atrás para coger impulso y poder dar dos hacia delante. Sin tu meticulosidad y tu afán por llegar a la excelencia, este trabajo no sería lo mismo. Gracias por todos los conocimientos transmitidos y por el tiempo dedicado en la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Antonio Falcó Montesinos, gracias por tu contribución a esta tesis. Tu intervención ha sido clave para que este trabajo haya dado frutos y no quiero perder la oportunidad de agradecerte las horas de trabajo que me has dedicado con inagotable paciencia. Aunque al principio todo sonara un poco marciano, ha resultado en un buen tándem de “maquinetas científicas”.

Al Dr. Jose Ignacio Bueso, por ayudarme a dar mis primeros pasos en el mundo de la topología molecular.

A mis padres, Matías y Amparo por vuestro apoyo incondicional. Por permitirme perseguir mis sueños y estar a mi lado levantándose con cada piedra del camino. Soy quien soy gracias a vosotros y a vuestro amor.

A mi novio, Gonzalo, porque no podía haber soñado con tener mejor compañero de viaje. Gracias por tu amor y tu apoyo constante.

A mi familia, mis tíos y mis primos, por su cariño y apoyo durante estos años. Y, de forma muy especial, a mis abuelos, Carmen, Amparo, Matías y Emilio, que, pese a no estar aquí, su recuerdo ha sido siempre un pilar para mí.

A mis amigos, por los buenos momentos de desconexión. En especial a Alex y Bea, por todas las aventuras que hemos vivido durante estos años y que, de una forma u otra, también han contribuido a la finalización de este trabajo.

Al equipo de técnicos de laboratorio, que a diario me ayudaban con cada duda que surgía, gracias.

Al resto de doctorandos, Sara, Susi, Elena, Cris, Roberto y Ángel... por compartir alegrías y penas y, sobre todo, por el compañerismo y la amistad forjados durante estos años.

Por último, quisiera agradecer a la Universidad CEU Cardenal Herrera por haberme apoyado económicamente en la realización de este trabajo de investigación.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN / ABSTRACT.....	iii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS GENERALES.....	9
ANTECEDENTES.....	13
1. Resistencia bacteriana.....	15
1.1. Introducción.....	15
1.2. <i>Escherichia coli</i> .....	20
1.3. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (SARM).....	22
2. Quinolonas.....	25
3. Herramientas QSAR para la obtención de modelos de predicción.....	29
3.1. Estrategias 2D.....	30
3.1.1. Técnicas basadas en regresión lineal.....	32
3.1.2. Técnicas basadas en clasificación lineal.....	33
3.1.3. Técnicas basadas en <i>machine learning</i> .....	33
3.1.3.1. <i>Artificial Neural Networks</i> (ANN).....	34
3.1.3.2. <i>Random Forests</i> (RF).....	35
3.2. Estrategias 3D.....	36
4. QSAR en el desarrollo de fármacos antibacterianos.....	39
5. Referencias.....	48
CAPÍTULO 1.....	61
Modelo discriminante de actividad frente a <i>E. coli</i> .....	63
1. Introducción.....	63
1.1. Caracterización topológica de las quinolonas.....	63
1.2. Análisis lineal discriminante (ALD).....	67
1.3. Desarrollo de las funciones discriminantes.....	68
1.4. Diagrama de distribución farmacológica.....	69
1.5. Obtención de un modelo topológico.....	70
2. Objetivos.....	71

3. Modelo discriminante de actividad frente a <i>E. coli</i> .....	72
3.1. Aplicación del análisis lineal discriminante.....	73
3.2. Cribado virtual de actividad antibacteriana.....	90
3.2.1. Filtros de volumen de distribución y tiempo de residencia medio vía oral.....	93
4. Optimización del modelo.....	96
4.1. Cribado virtual.....	104
5. Conclusiones.....	106
6. Referencias.....	106
CAPÍTULO 2.....	109
Modelos discriminantes jerárquicos de predicción de actividad antibacteriana.....	111
1. Introducción.....	111
2. Objetivos.....	114
3. Modelo jerárquico de predicción de actividad frente a SARM.....	115
3.1. Selección de índices discretos.....	115
3.2. Selección de grupos.....	116
3.3. Aplicación del análisis lineal discriminante.....	117
3.4. Aplicación del modelo.....	123
3.5. Cribado farmacológico virtual.....	125
4. Modelo jerárquico de predicción de actividad frente a <i>E. coli</i> .....	126
4.1. Selección de las variables discretas.....	126
4.2. Aplicación del análisis lineal discriminante.....	128
4.3. Aplicación del modelo.....	133
4.4. Cribado virtual.....	133
5. Conclusiones.....	135
6. Referencias.....	136
CAPÍTULO 3.....	139
Búsqueda de nuevos compuestos antibacterianos entre fármacos comercializados. Reposicionamiento de fármacos.....	139
1. Introducción.....	141
2. Objetivos.....	142
3. DrugBank.....	143

3.1.	Generación de la base de datos.....	143
4.	Cribado farmacológico virtual de la base de datos.....	145
4.1.	Fármacos activos teóricos frente a <i>E. coli</i> .....	145
4.1.1.	Modelo de predicción tradicional optimizado.....	145
4.1.2.	Modelo de predicción jerárquico.....	148
4.2.	Fármacos activos teóricos frente a SARM.....	154
5.	Conclusiones.....	155
6.	Referencias.....	156
CAPÍTULO 4.....		165
Búsqueda de nuevas quinolonas antibacterianas.....		167
1.	Introducción.....	167
2.	Objetivos.....	168
3.	Biblioteca combinatoria virtual.....	168
4.	Cribado farmacológico.....	171
4.1.	Modelo de predicción tradicional optimizado frente a <i>E. coli</i> .....	171
4.2.	Modelo de predicción jerárquico frente a SARM.....	173
5.	Conclusiones.....	175
6.	Referencias.....	175
CAPÍTULO 5.....		177
Selección de compuestos para la validación experimental de los modelos.....		179
1.	Introducción.....	179
2.	Objetivos.....	179
3.	Selección y síntesis de nuevas quinolonas.....	180
3.1.	Síntesis de nuevas quinolonas.....	183
4.	Selección de compuestos comerciales.....	187
4.1.	Extracción del felodipino.....	188
5.	Conclusiones.....	190
6.	Procedimientos experimentales.....	190
6.1.	Procedimiento para la obtención de quinolonas.....	191
6.1.1.	Obtención de <b>1a7w8a</b> .....	191
6.1.2.	Obtención de <b>1a7c8a</b> .....	191
6.2.	Obtención de felodipino.....	192

7. Espectros de <b>1a7c8a</b> .....	193
8. Referencias.....	195
CAPÍTULO 6.....	197
Síntesis de quinolonatos.....	199
1. Introducción.....	199
2. Objetivos.....	203
3. Síntesis de quinolonatos zwitteriónicos.....	203
4. Conclusiones.....	209
5. Procedimientos experimentales.....	209
5.1. Obtención de los compuestos 54 y 57.....	209
5.2. Obtención del compuesto 55.....	210
6. Espectros de quinolonatos zwitteriónicos.....	211
7. Referencias.....	218
CAPÍTULO 7.....	221
Ensayos microbiológicos <i>in vitro</i> .....	223
1. Introducción.....	223
2. Objetivos.....	225
3. Microorganismos.....	225
4. Preparación de disoluciones madre.....	226
5. Ensayos de actividad antibacteriana.....	227
5.1. Preparación del cultivo bacteriano.....	227
5.2. Ensayos de actividad mediante el método Kirby-Bauer.....	227
5.3. Determinación de la CMI y la CMB.....	228
5.3.1. Compuestos disueltos en disoluciones acuosas.....	228
5.3.2. Compuestos disueltos en DMSO.....	228
5.3.3. Determinación de la CMI.....	229
5.3.4. Determinación de la CMB.....	230
6. Resultados de la actividad antibacteriana.....	232
7. Discusión.....	234
8. Conclusiones.....	235
9. Referencias.....	236
CAPÍTULO 8.....	239



Ensayos de toxicidad <i>in vivo</i> utilizando el modelo de larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	241
1. Introducción.....	241
1.1. Descripción del insecto y su sistema inmunitario.....	242
1.2. Experimentación con <i>G. mellonella</i> .....	243
1.3. Inconvenientes del modelo.....	249
2. Objetivos.....	251
3. Procedimiento experimental.....	251
4. Ensayos de toxicidad de disolventes.....	254
5. Ensayos de toxicidad de compuestos.....	256
6. Conclusiones.....	258
7. Referencias.....	259
CONCLUSIONES GENERALES.....	263
ANEXOS.....	267
Anexo I.....	269
Anexo II.....	283
Anexo III.....	289
Anexo IV.....	302



## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>AINE</b>	Antiinflamatorio no esteroideo
<b>ALD</b>	Análisis Lineal Discriminante
<b>ANN</b>	<i>Artificial Neural Network</i>
<b>BLEE</b>	$\beta$ -lactamasas de espectro extendido
<b>BMDP</b>	<i>BioMedicine Department Program</i>
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina
<b>CECT</b>	Colección Española de Cultivos Tipo
<b>CLSI</b>	<i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i>
<b>CMB</b>	Concentración mínima bactericida
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>CoMFA</b>	<i>Comparative Molecular Field Analysis</i>
<b>CoMSIA</b>	<i>Comparative molecular similarity index</i>
<b>DBU</b>	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undeca-7-eno
<b>DDF</b>	Diagrama de distribución farmacológica
<b>DDT</b>	Diclorodifeniltricloroetano
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal 50
<b>DMAP</b>	4-dimetilaminopiridina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>E</b>	Expectancia
<b>E<sub>a</sub></b>	Expectancia de actividad
<b>E<sub>i</sub></b>	Expectancia de inactividad
<b>EMA</b>	<i>European Medicine Agency</i>
<b>ESI-TOF</b>	<i>Electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
<b>F</b>	Parámetro de Fischer-Snedecor
<b>FD</b>	Función discriminante
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>h</b>	Horas
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HRMS</b>	<i>High-Resolution Mass Spectrometry</i>
<b>IR</b>	Infrarrojos
<b>LDA</b>	<i>Linear Discriminant Analysis</i>

<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mg</b>	Miligramos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MLR</b>	<i>Multiple Linear Regression</i>
<b>mmol</b>	Milimoles
<b>MRT<sub>vo</sub></b>	Tiempo de residencia medio vía oral
<b>NaOH</b>	Hidróxido sódico
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>Numhba</b>	<i>Number of hydrogen bond acceptors</i>
<b>OECD</b>	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PBP</b>	<i>Penicillin Binding Protein</i>
<b>PLS</b>	<i>Partial Least Squares</i>
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>PR2</b>	Número de pares de ramificaciones separadas por 2 ejes
<b>QSAR</b>	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
<b>QSPR</b>	<i>Quantitative Structure-Property Relationship</i>
<b>REA</b>	Relación estructura-actividad
<b>RF</b>	<i>Random Forest</i>
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>SARM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>Vd</b>	Volumen de distribución
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana

## RESUMEN

Las resistencias antibacterianas se han convertido en una grave amenaza para la salud pública a nivel mundial debido al mal uso de los antibióticos. El uso indiscriminado de estos fármacos en animales y humanos, así como la interrupción temprana de los tratamientos ha dado lugar a la aparición de cepas bacterianas resistentes a todos los antibióticos disponibles en la actualidad. Además, la I+D farmacéutica ha abandonado el desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos. Esto deja a la sociedad en un enfrentamiento con un enemigo creciente y un armamento empobrecido. Ante esta problemática, los métodos QSAR aparecen como una herramienta eficiente para la obtención de nuevos antibacterianos de forma rápida y económica.

La presente tesis busca desarrollar modelos matemático-topológicos a partir de quinolonas utilizando métodos QSAR y topología molecular para la predicción de actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Además, se han planteado otros objetivos secundarios que incluyen el desarrollo de una nueva metodología para la obtención de modelos de predicción empleando análisis lineal discriminante (ALD), el desarrollo de una nueva base de datos para el posible reposicionamiento de fármacos como antibacterianos y la puesta a punto del modelo de larvas de *Galleria mellonella* para su aplicación en ensayos de toxicidad *in vivo*.

Se han obtenido 3 modelos de predicción de actividad antibacteriana. El primero de ellos, de predicción de actividad frente a *E. coli*, se ha desarrollado utilizando la metodología tradicional con ALD y, tras su optimización, muestra un acierto total para compuestos inactivos y del 78.5% para activos. Este modelo señala la existencia de una estrecha relación entre la actividad antibacteriana de un compuesto frente a *E. coli* y la simetría estructural del mismo, medida a través del índice topológico *Nclass*. Además, muestra un 42% de acierto inicial al aplicar el modelo a la base de datos Index Merck.

Los otros dos modelos, uno de predicción de actividad frente a *E. coli* y otro frente a SARM, se han desarrollado utilizando la nueva metodología jerárquica. Este nuevo enfoque para la obtención de modelos de predicción mediante ALD se basa en el estudio inicial de los índices con valores discretos y, tras determinar cuáles tienen una correlación marcada con la actividad de las moléculas, se pasa a desarrollar funciones discriminantes

utilizando los índices continuos. Esto permite la creación de un árbol de decisión jerárquico, en el que primero se filtran los compuestos en función de sus valores para los índices discretos seleccionados y luego se les aplica una función discriminante u otra. Los modelos obtenidos señalan una clara dependencia entre la actividad frente a SARM y el número de átomos aceptores de hidrógenos y la superficie y volumen molecular, así como una clara dependencia entre el número de átomos aceptores de hidrógenos y la actividad frente a *E. coli*. Estos modelos han mostrado tener igual o mejor capacidad de predicción respecto a los modelos tradicionales.

Para la búsqueda de nuevos antibacterianos se han seguido dos rutas. En primer lugar, se ha llevado a cabo el cribado farmacológico virtual de las bases de datos Index Merck y DrugBank, con el fin de validar los modelos y reposicionar moléculas que tienen otras aplicaciones comerciales. Por otra parte, se han aplicado los modelos a una biblioteca combinatoria virtual formada por 1000 quinolonas, con la intención de encontrar nuevas quinolonas activas teóricas que no hubieran sido descritas hasta ahora y abordar su síntesis.

Finalmente, se seleccionaron 11 compuestos comerciales activos teóricos y se sintetizaron 2 quinolonas de la biblioteca combinatoria virtual para la validación de los modelos mediante su ensayo de actividad antibacteriana *in vitro*. Un compuesto comercial, la tiomorfolina, resultó ser activo, así como ambas quinolonas, que mostraron actividad antibacteriana comparable a la del ciprofloxacino. Estos resultados validan las predicciones de los modelos.

Ante la buena actividad de las nuevas quinolonas de síntesis, se decidió estudiar su perfil de actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y *Candida albicans*. Ambas mostraron ser quinolonas de amplio espectro, con **1a7c8a** mostrando cierta actividad frente a *Candida albicans*. Por último, se estudió la toxicidad de estas dos quinolonas *in vivo* utilizando el modelo de larvas de *Galleria mellonella*, para lo que hubo que diseñar un protocolo y estudiar la toxicidad de distintos disolventes. Finalmente, las dos quinolonas resultaron ser inocuas a las dosis más altas ensayadas, por lo que siguen siendo interesantes para posteriores estudios de actividad y toxicidad *in vivo*.

Ala vista de todos los resultados obtenidos, se puede concluir que la topología molecular y los métodos QSAR son herramientas potentes para la obtención de nuevos fármacos. Esto es especialmente relevante en el caso de los antibacterianos, ya que la creciente aparición de resistencias requiere de métodos rápidos y económicos para la ampliación inmediata del arsenal terapéutico.

## **ABSTRACT**

Antibacterial resistance has become a serious threat for the public health worldwide due to antibiotic misuse. The indiscriminate use of these drugs in animals and humans, as well as early interruption of the treatment has resulted in the appearance of bacterial strains resistant to all antibiotics currently available. Moreover, pharmaceutical R&D has abandoned the development of new antibacterial drugs. This has left society in a battle against a growing enemy with a depleted armament. As a consequence, QSAR methods appear as an efficient tool for the fast and economic development of new antibacterial agents.

This thesis strives to develop mathematical-topological models, based on quinolones, using QSAR methods and molecular topology for the prediction of antibacterial activity against *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Moreover, other secondary aims have been established, which include the development of a new methodology for the obtention of prediction models using linear discriminant analysis (LDA), the development of a new database for the possible repurposing of drugs as antibiotics and the tuning of the model using *Galleria mellonella* larvae for its application in *in vivo* toxicity assays.

Three antibacterial prediction models have been developed. The first one, for the prediction of activity against *E. coli*, has been developed using traditional LDA methodology and, after its optimization, has a total success rate for inactive compounds and 78.5% for active compounds. This model emphasizes the existence of a close relationship between the antibacterial activity of a compound against *E. coli* and its structural symmetry, measured using the topological index *Nclass*. Moreover, the model has a 42% success rate when applied to the Index Merck database.

The other two models, one for the prediction of activity against *E. coli* and the other one against MRSA, have been developed using the new hierarchical methodology. This new approach for the development of prediction models using LDA is based in the initial study of the indexes with discrete values and, after identifying those highly correlated to the activity, discriminant functions are calculated using the continuous indexes. This allows for the creation of a hierarchical decision tree in which the compounds are firstly filtered depending on their values for the selected discrete indexes and then the corresponding discriminant functions are applied. The models obtained indicate a clear dependence between anti-MRSA activity and the number of hydrogen accepting atoms and the molecular surface and volume, as well as a clear dependence between the number of hydrogen accepting atoms and the activity against *E. coli*. These models have proven to have equal or better prediction capability when compared to the traditional models.

Two different approaches have been applied for the search of new antibacterial agents. Firstly, a virtual screening of the Index Merck and DrugBank databases was carried out in order to validate the models and repurpose molecules with other commercial applications. Secondly, the models were applied to a virtual combinatorial library formed by 1000 quinolones in order to find new theoretically active molecules that have not been described yet and synthesize them.

Finally, 11 theoretically active commercial compounds were selected, and 2 quinolones were synthesized in order to validate the models by carrying out *in vitro* antibacterial activity assays. One commercial compound, thiomorpholine, and both quinolones showed antibacterial activity, with the quinolones having activity comparable to ciprofloxacin. These results validate the predictions made by the models.

Seeing the promising activity of the new quinolones, we decided to study their antibacterial profile against Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as *Candida albicans*. Both showed broad-spectrum antibacterial activity, with **1a7c8a** showing moderate activity against *C. albicans*. Lastly, the toxicity of these two quinolones was studied *in vivo* using de larval model of *Galleria mellonella*, for which a protocol had to be designed and the toxicity of different solvents had to be studied. Both quinolones resulted



to be innocuous at the highest dose tested, which makes these two quinolones good candidates for further studies.

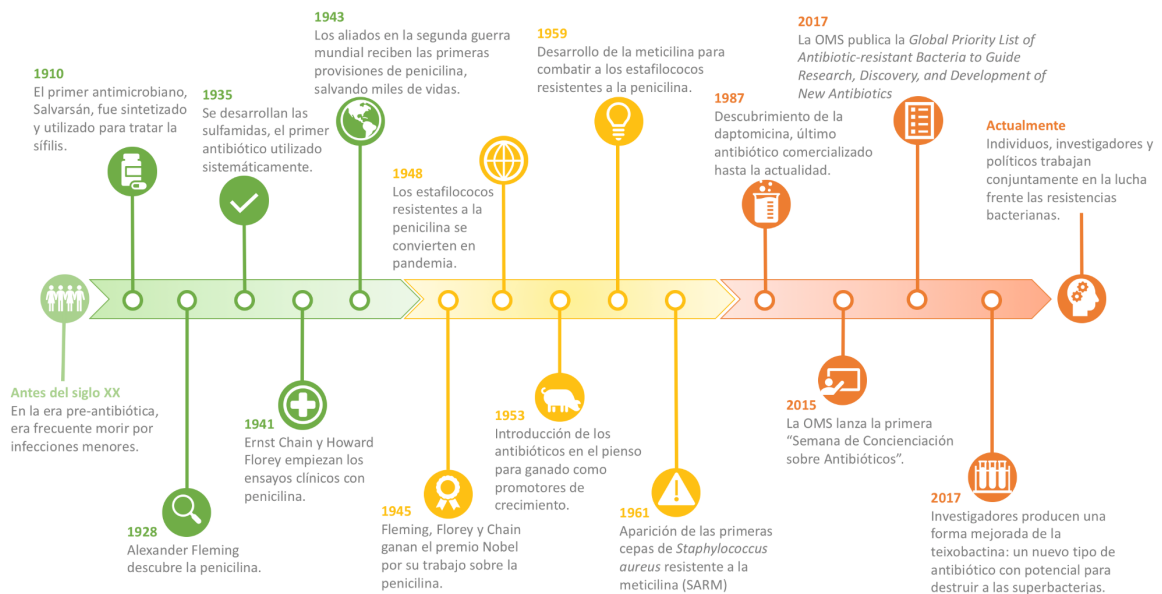
In conclusion, molecular topology and QSAR methods are efficient tools for the development of new drugs. This is especially relevant in the case of antibiotics, seeing as the increasing appearance of resistances calls for fast and economic methods for the enlargement of the therapeutic arsenal.



# **INTRODUCCIÓN**



La síntesis de quimioterápicos, así como el descubrimiento y mejora de los antibióticos, han supuesto una auténtica revolución farmacológica en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, la extrema versatilidad y adaptabilidad de los microorganismos ha impedido disminuir la prevalencia de estas enfermedades, debido a que muchas bacterias han ido desarrollando mecanismos que las hacen resistentes a estos fármacos (**Figura I.1**) (1).



**Figura I.1.** Evolución de la terapia antimicrobiana en el tiempo.

Tras el descubrimiento de la penicilina en 1928 por Fleming, todo hacía presagiar que el fin de las enfermedades infecciosas estaba próximo. Sin embargo, poco después, el propio Fleming alzó una voz de precaución, ya que, a medida que se estudiaba la penicilina, descubrió que existía la posibilidad de graduar la cantidad de principio activo al que se exponía la bacteria, y las posibles consecuencias que esto podía conllevar. Por ello, en su discurso al recoger el premio Nobel de Medicina en 1945 pronunció lo siguiente: *“Quiero dar una advertencia, la penicilina aparece como no-tóxica, de modo que no hay preocupación con sobredosificar e intoxicar al paciente. Sin embargo, puede existir el peligro de sub-dosificación. No es difícil conseguir microorganismos resistentes a penicilina en el laboratorio exponiéndolos a concentraciones no letales y lo mismo puede pasar en el organismo”*. Como se puede deducir de sus palabras, él ya vaticinaba lo que podía implicar un mal uso de los antibióticos (2).

Este problema de las resistencias se detectó en los años 60, cuando un grupo de expertos en enfermedades infecciosas anunció la necesidad de acelerar el desarrollo de nuevos antibacterianos debido a la creciente resistencia de algunas bacterias, como el neumococo y estafilococo, a los antibióticos convencionales (3). Desde esa primera reunión, la comunidad científica ha visto como el número de bacterias resistentes a antibióticos se ha multiplicado de forma exponencial en las últimas décadas. Tanto es así, que la OMS ya señala que, si la aparición de resistencias sigue a este ritmo, las infecciones por bacterias resistentes a antibióticos serán la primera causa de muerte a nivel mundial, superando a las muertes causadas por cáncer, diabetes y enfermedades cardiovasculares (4).

Dos de los microorganismos que están forzando el desarrollo de nuevos antibacterianos de forma más urgente son *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). De hecho, la OMS coloca a *E. coli* como patógeno de prioridad 1 (crítica) y a SARM como patógeno de prioridad 2 (alta) en su lista de patógenos prioritarios para el desarrollo de nuevos antibióticos (5).

*E. coli* es un comensal habitual del tracto gastrointestinal que coexiste en simbiosis con su hospedador (6). Sin embargo, existen cepas de *E. coli* que han adquirido atributos de virulencia que incrementan su habilidad para adaptarse a nuevos nichos, permitiéndoles causar un amplio espectro de enfermedades (7). En general, estas enfermedades se agrupan en tres tipos: entérica o diarreica, infección del tracto urinario y septicemias. El desarrollo de resistencias en esta bacteria es especialmente grave, habiéndose detectado en algunos pacientes cepas de *E. coli* resistente a todos los antibióticos disponibles en el mercado, incluyendo la colistina (8).

SARM es un patógeno causante de importantes infecciones que generalmente son cutáneas, pero que también pueden afectar a heridas quirúrgicas, sangre, pulmones o tracto urinario (9). Fue inicialmente detectada en pacientes ancianos ingresados en centros hospitalarios, y, en la actualidad, se ha convertido en un patógeno con vertiente comunitaria y ganadera (10). Además, su propagación a nivel mundial supone un grave problema, ya que limita las opciones de tratamiento (11). La vancomicina era el antibiótico de elección para el tratamiento de infecciones por SARM, sin embargo, la aparición de

cepas de *S. aureus* resistente a vancomicina (SARV) supone más retos en el tratamiento de estas infecciones (12).

Este aumento de cepas resistentes hace necesaria la investigación de nuevos agentes antibacterianos para ampliar el arsenal terapéutico (13). Además, la OMS ha señalado repetidamente que la inversión para el desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos es insuficiente (14). Es en este punto donde los métodos QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships*) desempeñan un papel importante, ya que aportan información útil para el diseño racional de nuevas moléculas con un coste mínimo (15). La gran ventaja de estos métodos QSAR es que son capaces de predecir la actividad farmacológica de un compuesto sin la necesidad de obtenerlo o sintetizarlo previamente. Esto ha hecho que la llamada Química Computacional y la Química Combinatoria Virtual hayan tenido un gran auge en los últimos años (16).

En concreto, nuestro equipo utiliza el Método de Conectividad Molecular, desarrollado por Kier y Hall (17), que consiste en la obtención de una serie de índices topológicos que se calculan a partir de la estructura de una molécula. De esta forma, podemos clasificar un compuesto como activo o no activo frente a una determinada actividad farmacológica utilizando técnicas de reconocimiento de patrón como el análisis lineal discriminante (18), las redes neuronales (19) o el análisis de componentes principales (20). Esto nos permite desarrollar modelos matemático-topológicos capaces de identificar dicha actividad, convirtiéndose en una poderosa herramienta para la búsqueda y diseño de nuevos compuestos con la actividad farmacológica deseada.

En esta misma línea, el afán por abaratar y acelerar el proceso de descubrimiento de nuevos antibióticos ha llevado al desarrollo de nuevos modelos de experimentación *in vivo*, que supongan alternativas más económicas y rápidas a los modelos originales. Dentro de estos modelos alternativos, el modelo de larvas de *Galleria mellonella* está ganando popularidad ya que, a diferencia de otros modelos no-mamíferos, permite la realización de ensayos de toxicidad y actividad antibacteriana (21). Su bajo coste, la rapidez con la que se pueden obtener resultados y la ausencia de limitaciones éticas hacen de este modelo una herramienta ideal como primer paso previo a los ensayos en

mamíferos, ahorrando dinero y tiempo en el caso de que el compuesto resulte ser tóxico o inactivo en las larvas.

## REFERENCIAS

1. Yeh RF, Jain R, Palmer HR. 49th ICAAC anual meeting: optimization of anti-infective use in the clinical setting. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7(10): 1167-1172. doi: 10.1586/eri.09.106.
2. Belloso W. Historia de los antibióticos. *Rev Hosp Ital B Aires* 2009; 29(2): 102-111.
3. Finland M, Kirby WM, Chabbert YA, Chain EB, Dowling HF, et al. Round table: are new antibiotics needed? *Antimicrob Agents Chemothe* 1965; 5: 1107-1114.
4. World Health Organization. United Nations meeting on antimicrobial resistance. <http://www.who.int/bulletin/volumes/94/9/16-020916.pdf> [Último acceso: 16 de julio, 2018].
5. World Health Organization. WHO Priority Pathogens List for R&D of New Antibiotics. [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1) [Último acceso: 16 de julio, 2018].
6. Sweeney NJ, Klemm P, McCormick BA, Moller-Nielsen E, Utley M, Schembri MA, Laux DC, Cohen PS. The *Escherichia coli* K-12 gntP gene allows *E. coli* F-18 to occupy a distinct nutritional niche in the streptomycin-treated mouse large intestine. *Infect Immun* 1996; 64(9): 3497-3503.
7. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 142-201.
8. Mediavilla JR, Patrawalla A, Chen L, Chavda KD, Mathema B, Vinnard C, Dever LL, Kreiswirth BN. Colistin- and Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and *bla<sub>NDM-5</sub>*, Causing a Complicated Urinary Tract Infection in a Patient from the United States. *mBio* 2016; 7(4): e01191-16. doi: 10.1128/mBio.01191-16.
9. Vindel A, Cuevas O, Cercenado E, Marcos C, Bautista V, Castellares C, Trincado P, Boquete T, Pérez-Vázquez M, Buza E. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: Molecular Epidemiology and Utility for Different Typing Methods. *J Clin Microbiol* 2009; 47(6): 1620-1627. doi: 10.1128/JCM.01579-08.



10. Udo EE. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: new face of an old foe? *Med Princ Pract* 2013; 22 Suppl 1: 20-29. doi: 10.1159/000354201.
11. Boswihi SS, Udo EE. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An update on the epidemiology, treatment options and infection control. *Curr Med Res Pract* 2017; 8(1): 18-24. doi: 10.1016/j.cmrp.2018.01.001.
12. Chang S, Sievert DM, Hafeman JC et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *N Eng J Med* 2003; 348: 1342-1346. doi: 10.1056/NEJMoa025025.
13. Suay-García B, Pérez-Gracia MT. The Antimicrobial Therapy of the Future: Combating Resistances. *J Infect Dis Ther* 2014; 2: 146. doi: 10.4172/2332-0877.1000146.
14. World Health Organization. 10 Facts on Antimicrobial Resistance. [http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial\\_resistance/en/](http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial_resistance/en/) [Último acceso: 22 de julio de 2018]
15. Tute MS. History and objectives of quantitative drug design. In: Hansch C, Sammes PG, Taylor JB (eds) *Comprehensive medicinal chemistry*, Pergamon Press, Oxford, 1990.
16. López-Vallejo F, Caulfield T, Martínez-Mayorga K, Giulianotti MA, Nefzi A, Houghten RA, Medina-Franco JL. Integrating virtual screening and combinatorial chemistry for accelerated drug Discovery. *Comb Chem High Throughput Screen* 2011; 14(6): 475-487.
17. Kier LB, Hall LH. *Molecular Connectivity in Chemistry and Drug Research*; Academic Press: New York, 1976.
18. Maldonado FH. El análisis multivariante en la investigación con antimicrobianos. *Rev Esp Quimioterap* 2007; 20(3): 300-309.
19. Baskin II, Palyulin VA, Zefirov NS. Neural networks in building QSAR models. *Methods Mol Biol* 2008; 458: 137-158.
20. Yoo C, Shahlaei M. The applications of PCA in QSAR studies: A case study on CCR5 antagonists. *Chem Biol Drug Des* 2018; 91(1): 137-152. doi: 10.1111/cbdd.13064.
21. Ignasiak K, Maxwell A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. *BMC Res Notes* 2017; 10: 482. doi: 10.1186/s13104-017-2757-8.