

PROTIBAKTERIJSKE SPOJINE Z MULTIPLIM DELOVANJEM

ANTIBACTERIAL COMPOUNDS WITH MULTIPLE MODE OF ACTION

AVTORJA / AUTHORS:

asist. Martina Durcik, mag. farm.
prof. dr. Janez Ilaš, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko kemijo,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: janez.ilas@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Odkritje antibiotikov je bilo ena največjih prelomnic sodobne medicine. V t. i. zlati dobi antibiotikov je odkritje protibakterijskih spojin, kot so eritromicin, kloramfenikol, vankomicin, kanamicin in gentamicin, močno zmanjšalo smrtnost zaradi bakterijskih okužb, poleg tega pa tudi omogočilo napredek na drugih področjih medicine, kot so presaditve organov, zdravljenje raka itd. (1,2). Že od odkritja penicilina leta 1928 bakterijsko odpornost povezujemo z rabo antibiotikov (3). Pojav odpornosti je

POVZETEK

Odkritje antibiotikov, ki jih včasih imenujemo kar »čudežna zdravila«, je močno pripomoglo k manjši smrtnosti in pozitivno vplivalo na medicinski napredek. V odgovor na rabo antibiotikov so bakterije razvile različne mehanizme odpornosti in tako narašajoča bakterijska odpornost proti znanim protibakterijskim učinkovinam v 21. stoletju predstavlja globalni problem. Bakterije lahko razvijejo odpornost na vsa znana protimikrobnna zdravila in kljub velikemu številu raziskav ter veliko spojinam v kliničnih preskušanjih je potreba po odkrivanju novih učinkovin in terapevtskih pristopov vedno večja. Spojine, ki zavirajo več bakterijskih tarč, multitarčni ligandi, so ena od strategij boja z bakterijsko odpornostjo. Simultano zaviranje več tarč v bakteriji namreč pomeni, da bi mutacije za pridobitev odpornosti morale poteči na več mestih hkrati, kar je manj verjetno. Četudi spojine z multiplim delovanjem ne predstavljajo absolutne rešitve, pa lahko znatno pripomorejo k upočasnitvi pojava odpornih sevov.

KLJUČNE BESEDE:

bakterijska odpornost, konjugati, multipli zaviralci, protibakterijske spojine

ABSTRACT

The discovery of antibiotics, the so-called »wonder drugs«, contributed significantly to the reduction of mortality rates and had a positive impact on medical progress. After the introduction of antibiotics, bacteria started to develop various mechanisms of resistance, and so increasing bacterial resistance to known antibacterial agents is a global problem in the 21st century. Bacteria can develop resistance to all known antimicrobials, and despite a large number of studies and many compounds in clinical trials, the need to discover new active ingredients and therapeutic approaches is growing. Compounds that inhibit multiple bacterial targets, known as multitarget ligands, are one of the strategies to fight bacterial resistance. Simultaneous inhibition of multiple targets in bacteria means that mutations leading to resistance should originate in several sites at the same time, which is less likely. Although multiple-acting compounds do not represent an absolute solution, they can contribute



significantly to slowing down the emergence of resistant strains.

KEY WORDS:

antibacterial compounds, bacterial resistance, conjugates, multitarget inhibitors

neizbežen, vendar se zaradi nepravilne uporabe ter pretirane rabe tako v medicini kot veterini in kmetijstvu problem bakterijske odpornosti (pre)hitro stopnjuje (4). Pojavile so se večkratno odporne (*multidrug resistant, MDR*) bakterije. Mednje spada skupina bakterij, imenovana »ESKAPE« (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Enterobacter spp.*) (2), ki je odgovorna za večino bolnišničnih okužb in večjo smrtnost. Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je bakterije iz skupine »ESKAPE« uvrstila na seznam patogenov, za katere sta nujna odkrivanje novih učinkovin in uvedba le-teh v terapijo (5).

Eden od pristopov k zmanjšanju oz. upočasnitvi pojava bakterijske odpornosti je zaviranje več različnih tarč v bakteriji. Mutacije, ki vodijo v odpornost bakterij, morajo namreč v tem primeru poteči na več mestih hkrati, kar pa je manj verjetno oz. se zgodi počasneje (6). V nadaljevanju podajamo pregled glavnih skupin protibakterijskih spojin s poudarkom na spojinah, ki imajo možnost delovanja na več tarč.

2 SKUPINE PROTIBAKTERIJSKIH UČINKOVIN

Poznamo več vrst razdelitve protibakterijskih učinkovin. Delimo jih bodisi na bakteriostatične, torej takšne, ki zavirajo rast bakterij, ali baktericidne, ki ubijejo bakterije. Protibakterijske spojine imajo lahko širokospektralno ali ozkospetralno delovanje, glede na kemijski tip pa poznamo majhne molekule, peptide, nukleinske kisline in ostale tipe protibakterijskih učinkovin (7). Glede na mehanizem delovanja protibakterijske učinkovine delimo na pet glavnih razredov. Prvi razred so spojine, ki zavirajo celični metabolizem, npr. sulfonamidi (sulfametoksazol) in trimetoprim, ki zavirajo sintezo folne kisline. Sulfametoksazol je antimetabolit *p*-aminobenzojske kisline in z njim tekmuje za vezavo na dihidropteroat sintazo, trimetoprim pa je zaviralec dihidrofolat reduktaze (slika 1A) (7). Drugi razred so spojine, ki zavirajo biosintezo bakterijske celične stene. To so β -laktamski antibiotiki, ki zavirajo transpeptidaze – penicilin vezuje pro-

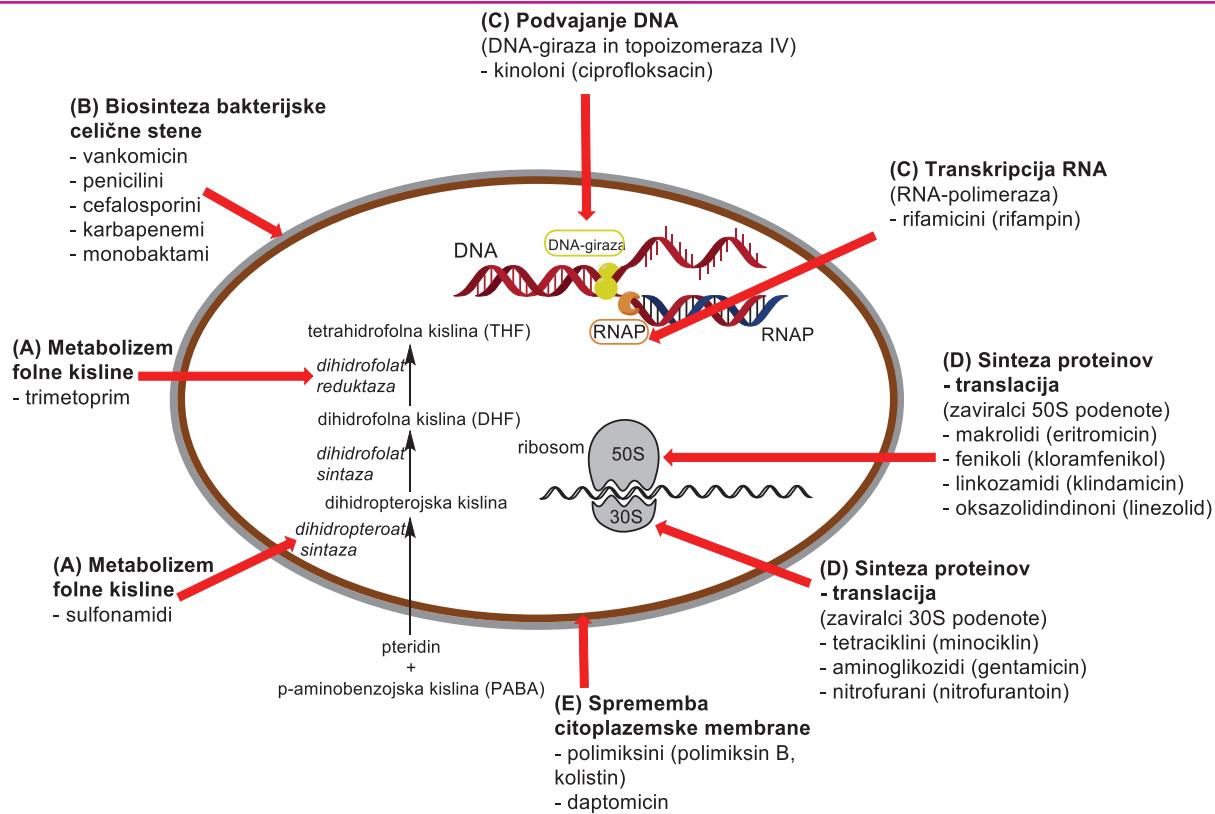
teine (PBP), in vankomicin, ki se z vodikovimi vezmi veže na terminalne *D*-Ala-*D*-Ala ostanke peptidoglikanske verige in prepreči navzkrižno povezovanje s transpeptidazami (slika 1B). Tretji razred so spojine z delovanjem na nuklein-ske kisline (DNA in RNA), npr. kinoloni, z zaviranjem DNA-giraze in topoizomeraze IV preprečijo sintezo DNA, rifampin pa z vezavo na β -podenoto od DNA-odvisne RNA-polimeraze prepreči začetek transkripcije RNA (slika 1C). Četrти razred so spojine, ki ovirajo sintezo proteinov z vezavo na podenoto bakterijskega ribosoma 30S ali 50S (slika 1D), npr. makrolidi, aminoglikozidi, nitrofurantoin itd. (8). Nitrofurantoin bakterijske nitroreduktaze pretvorijo v reducirani intermediati, ki se veže na ribosome in prepreči sintezo proteinov, poleg tega pa zavira tudi bakterijske encime, udeležene v sintezi DNA, RNA in proteinov, in druge prenovne encime (9). Peti razred so spojine, ki interagirajo s celično membrano (8). Sprememba integrirate celične membrane vodi v depolarizacijo celice in izgubo membranskega potenciala. Zaradi tega je zavrta sinteza proteinov, DNA in RNA. Polimiksini, ki delujejo kot kationski detergenti, in daptomicin (linopeptidni antibiotik) spremenijo strukturo membrane celic (slika 1E) (7).

Bakterije lahko razvijejo odpornost proti vsem tipom antibiotikov. Odpornost je lahko intrinzična oz. naravna, lahko pa jo bakterije pridobijo bodisi s spontano mutacijo genov, povezanih z odpornostjo, bodisi pridobijo genetski zapis za odpornost od drugih bakterij s procesi konjugacije, transformacije in transdukcije (10).

Poznamo štiri glavne mehanizme odpornosti. Bakterije izločajo encime, ki kemijsko razgradijo oz. spremenijo antibiotike (slika 2A). Tovrstni encimi so β -laktamaze, ki hidrolizirajo amidno vez β -laktamskih antibiotikov. Z mutacijo tarče bakterije razvijajo odpornost npr. proti fluorokinolonom in rifampinu, ki se na spremenjen protein ne morejo več vezati (slika 2B). Veliko bakterij, posebej po Gramu negativnih, ima izlivne črpalke, ki po prehodu antibiotika v celico le-tega aktivno prečrpajo iz nje (slika 2C). Z modifikacijo proteinov celične stene pa bakterije preprečijo vstop antibiotikov v celico, npr. spremembu porinov povzroči odpornost proti antibiotikom, ki vstopajo v celico skozi porine, npr. fluorokinoloni in β -laktami (slika 2D) (10, 11).

3 UČINKOVINE Z DELOVANJEM NA VEČ TARČ

Pri protibakterijskih spojinah je delovanje na več tarč pomembna prednost, saj se morajo zgoditi mutacije na več



Slika 1: Mehanizmi delovanja različnih skupin protibakterijskih učinkovin.

Figure 1: Mechanism of action of different types of antibacterial compounds.

mestih, da bi bakterije postale odporne, kar pa se zgodi redko. Mutacije, ki vodijo v odpornost na posamezni tarči, se pojavljajo s frekvenco od 10^{-6} do 10^{-9} , z multitarčnim pristopom pa se lahko frekvanca pojava odpornosti precej zniža (12).

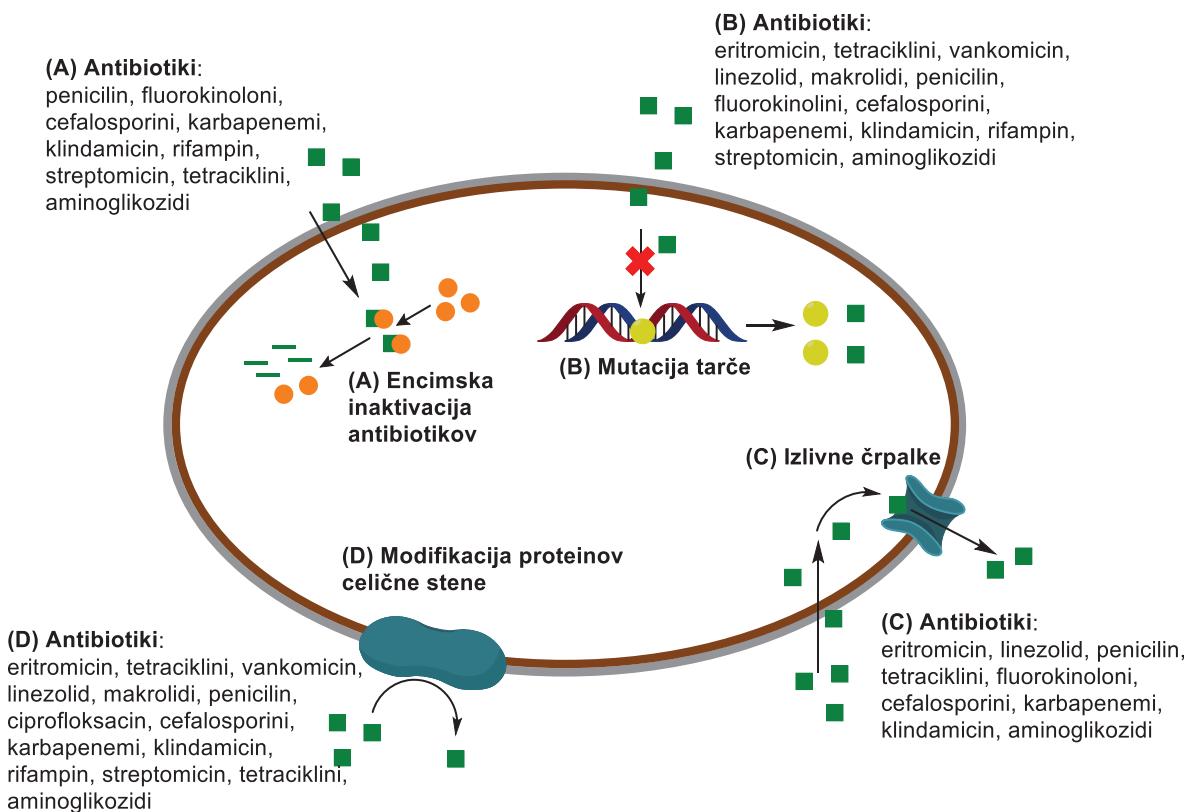
Multitarčna terapija lahko širše pomeni a) terapijo s kombinacijo več posamičnih učinkovin, ki delujejo sinergistično, a se vežejo na različne biološke tarče (slika 3a), ali b) terapijo z eno spojino, ki modulira farmakološki odziv več različnih tarč (multitarčni ligand; en ligand – več tarč) (slika 3b). Ligandi z multiplim delovanjem so produkt dveh ali več spojin, ki so bodisi povezane preko dodatnega linkerja, ki je lahko cepljiv ali ne (konjugati; slika 3b1), ali spojene brez linkerja (slika 3b2). Lahko pa so tudi združene v eno spojino (slika 3b3), ki vsebuje specifične strukturne značilnosti, ki so pomembne za tvorbo interakcij z več različnimi biološkimi tarčami (spojina ima en farmakofor) (6). Pri protibakterijskih spojinah najdemo večinoma ligande zadnjega tipa, in sicer v primerih, kjer imata biološki tarči strukturno podobno vezavno mesto ali imata sorodne substrate (z istim farmakoforom). Prednosti takih združenih ligandov

pred povezanimi ali spojenimi so njihova manjša molekulska masa in bolj zaželene fizikalno-kemijske in farmakokinetične lastnosti (12).

3.1 ZAVIRALCI PODVAJANJA DNA

3.1.1 Zaviralci topoizomeraz

DNA-giraza in topoizomeraza IV sta bakterijska encima iz družine topoizomeraz tipa II, ki spreminjata topologijo DNA med njenim podvajanjem. DNA-giraza uvaja dodatne negativne zavoje v molekulo DNA pred podvojevalne vilice, pri čemer se sprosti torzilska napetost med podvajanjem, topoizomeraza IV pa sodeluje pri dekatenaciji hčerinskih kromosomov po koncu podvajanja DNA (13). Obe sta heterotetramerne proteini, DNA-giraza je zgrajena iz dveh podenot GyrA in dveh podenot GyrB (A_2B_2), topoizomeraza IV pa iz dveh podenot ParC in dveh podenot ParE (C_2E_2), ki so homologne GyrA in GyrB. Encima se v 40 % ujemata v sekvenci aminokislin in njuna strukturno podobna vezava mesta omogočajo razvoj zaviralcev z dvoj-



Slika 2: Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom.

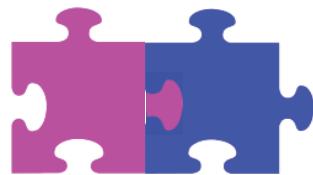
Figure 2: Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics.

a) dva liganda - dve tarči**b) en ligand - dve tarči**

1) Povezana liganda (konjugati)



2) Spojena liganda



Slika 3: Shematski prikaz multitarčne terapije in ligandov z multiplim delovanjem.

Figure 3: Schematic representation of multitarget therapy and multitarget ligands.



nim delovanjem (13). Zaviralci bakterijskih topoizomeraz so med najbolj reprezentativnimi spojinami z multiplim delovanjem.

Poznamo zaviralce podenot GyrA in ParC, ki so eni od najbolj uporabljenih antibiotikov – to so kinoloni in fluorokinoloni (slika 4a). Zavirajo katalitično aktivnost DNA-giraze in topoizomeraze IV, tako da stabilizirajo kompleks med encimom in DNA, kar prepreči združitev dveh verig DNA med podvajanjem. Delujejo baktericidno in jih uvrščamo v skupino najbolj širokospektralnih antibiotikov (14).

Proti fluorokinolonom bakterije razvijajo odpornost in kljub novejšim smernicam, ki priporočajo omejitev predpisovanja, odpornost še vedno narašča. Glavni mehanizmi razvoja odpornosti so mutacije tarčnega mesta, s plazmidi posredovana odpornost, prisotnost izlivnih črpalk ter spremenjena permeabilnost bakterijske membrane zaradi mutacij, ki vodijo v manjšo prisotnost porinov (15).

Incidenca neželenih učinkov pri fluorokinolonih, kot so gastrointestinalne težave, genotoksičnost, fototoksičnost, motnje centralnega živčnega sistema in blažji neželeni učinki, je veljala za relativno nizko (14). Zaradi naraščanja resnih, onesposabljaljajočih in potencialno dolgotrajnih neželenih učinkov, povezanih z mišicami, kitami, kostmi ter živčnim sistemom, je leta 2018 EMA predlagala omejitev uporabe fluorokinolonskih antibiotikov (16). Eden najbolj znanih fluorokinolonov je ciprofloksacin iz druge generacije fluorokinolonov, ki ga uporabljamo za zdravljenje številnih bakterijskih okužb, med drugim okužb spodnjih dihal, sečil, spolovil, prebavil, kosti in sklepov. Med novejše (četrta generacija) sodi moksifloksacin, ki ga v glavnem uporabljamo za zdravljenje okužb dihalnih poti. V zadnjem času je bilo odobrenih oz. prišlo v klinična preskušanja še veliko drugih fluorokinolonskih antibiotikov, npr. delafloksacin, zabofloksacin (slika 4a) in ostali, ki pa jih v Sloveniji še ne uporabljamo (14).

Drugi tip zaviralcev so t. i. novi zaviralci bakterijskih topoizomeraz (*novel bacterial topoisomerase inhibitors*, NBTI) med katere spadata gepotidacin (NBTI tipa 1) in zoliflodacin (NBTI tipa 2) (slika 4b) (17). Vezavno mesto gepotidacina je na podenoti A DNA-giraze, zoliflodacina pa na podenoti B DNA-giraze. Njun mehanizem delovanja je drugačen kot pri ostalih zaviralcih teh podenot (17). Na trgu ni še nobenega zavirala NBTI, sta pa omenjena zavirala v kliničnih preskušanjih za zdravljenje okužb z bakterijo *Neisseria gonorrhoeae* (18).

V tretji tip zaviralcev topoizomeraz spadajo zaviralci podenot GyrB in ParE. To so ATP-kompetitivni zavirali, saj temujojo z molekulo ATP za vezavo na svojo tarčo. Za katalitičen proces podvajanja DNA, posredovan s podenotama

GyrA in ParC je potrebna energija, ki jo encim pridobi s hidrolizo molekule ATP na podenoti GyrB (13). Ob vezavi zavirala tako encim nima energije za delovanje. Edini ATP-kompetitivni zaviralec, ki je bil v klinični rabi, je novobiocin (slika 4c), in sicer za zdravljenje okužb z odpornimi sevi *Staphylococcus aureus*. Zaradi toksičnosti in razvoja bakterijske odpornosti so ga umaknili iz uporabe (19). Na tem področju so razvili veliko različnih strukturnih razredov spojin, med katerimi so le nekatere prišle v zgodnja klinična preskušanja, na trgu pa ni nobene (19).

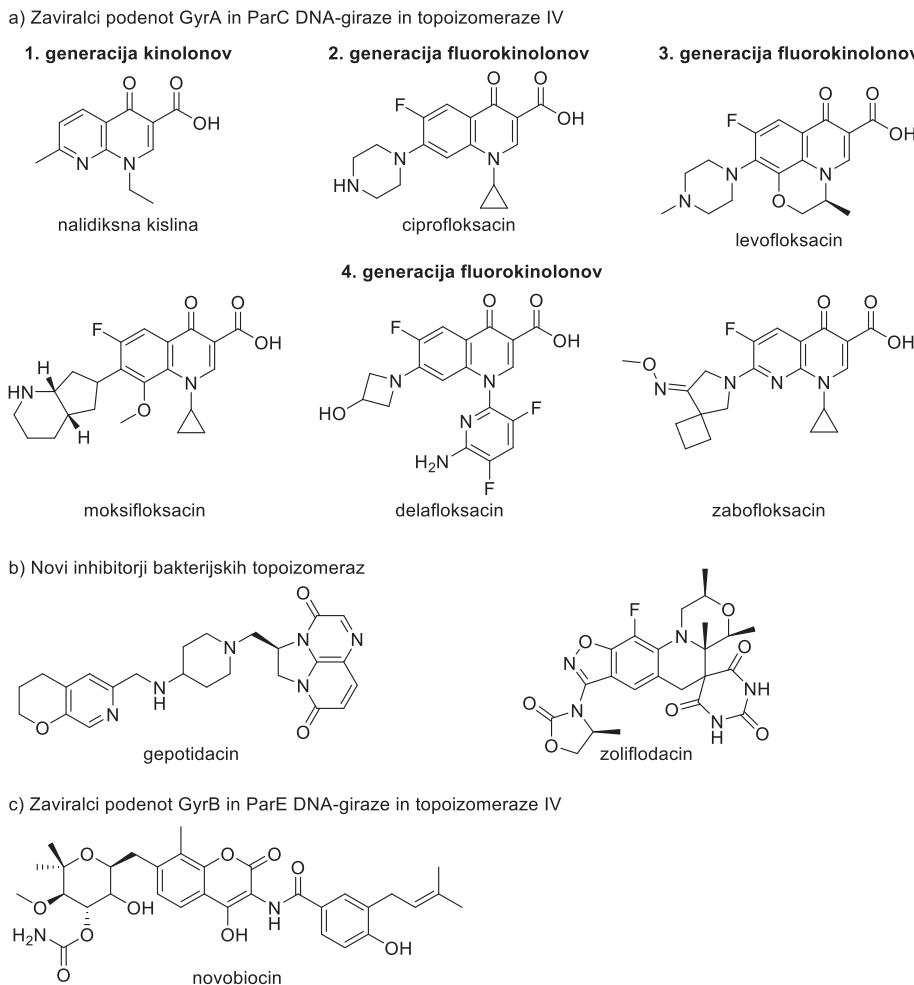
3.1.2 Zaviralci DNA-polimeraz III

Encim DNA-polimeraza III sodeluje v biosintezi bakterijske DNA, in sicer se aktivnost encima prične ob ločitvi verig DNA na mestu začetka podvajanja. DNA-polimeraza III na osnovi matrične verige katalizira sintezo nove komplemetarne verige DNA od 5'-konca proti 3'-koncu. Encim ima tudi eksoneukleazno aktivnost, s katero od 3'-konca proti 5'-koncu odstrani napačno vstavljene nukleotide (20). Poznamo DNA-polimerazi IIIC (pol IIIC) in IIIE (pol IIIE). DNA-pol IIIC je bolj raziskana, odkrili pa so tudi dvojne zaviralec obeh encimov (slika 5a) z delovanjem na po Gramu pozitivne bakterije (21). Trenutno na trgu še ni zavirala DNA-polimeraz III, je pa v letu 2018 spojina ibezapolstat (ACX-362E) (22) (sicer monotarčna) (slika 5b) kot prvi zaviralec DNA-pol IIIC vstopila v klinična preskušanja in v letu 2019 tudi uspešno zaključila 1. fazo kliničnih preskušanj za zdravljenje okužb z bakterijo *Clostridium difficile* (23), trenutno pa poteka faza testiranja 2a.

3.2 ZAVIRALCI SINTEZE CELIČNE STENE

Pomemben gradnik bakterijske celične stene tako pri po Gramu pozitivnih kot pri po Gramu negativnih bakterijah je peptidoglikan. Sestavlja ga glikanska veriga, ki je prečno premrežena s peptidi. Celici daje obliko, trdnost in zaščito pred vstopom snovi v celico oz. iz nje. Pri po Gramu pozitivnih bakterijah je plast peptidoglikana debelejša kot pri po Gramu negativnih bakterijah (24).

Biosinteza peptidoglikana je kompleksen proces, v katerem sodelujejo mnogi encimi in zato predstavlja veliko možnosti za zaviranje posameznih korakov tega procesa. Čeprav je plast peptidoglikana pri po Gramu negativnih bakterijah tanjsa, pa je pri teh bakterijah celična stena kompleksnejša, saj imajo še zunanjou membrano, ki varuje celico in vsebuje lipopolisaharide (LPS). Glavni gradnik lipopolisaharidov je lipid A, ki deluje kot endotoksin, ki sproži imunski sistem in lahko vodi tudi v sepso (25). Lipid A je ključen za preživetje



Slika 4: Strukture zavircev topoizomeraz.

Figure 4: Structures of topoisomerase inhibitors.

po Gramu negativnih bakterij, zato zaviranje encimov, ki sodelujejo v njegovi biosintezi, predstavlja nove terapevtske možnosti.

3.2.1 Zaviralci penicilin vezičih proteinov

Penicilin veziči proteini (*penicillin-binding proteins*, PBP) sodelujejo v kasnejših stopnjah biosinteze bakterijske celične stene. Sodijo v skupino encimov transpeptidaz in katalizirajo tvorbo prečnih peptidnih vezi med molekulami peptidoglikana (26).

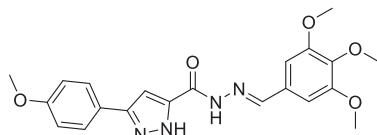
Različne bakterije vsebujejo različne kombinacije PBP. V posamezni bakteriji najdemo med tri do osem encimov te vrste, med katerimi so nekateri esencialni, drugi pa ne (27). Pri po Gramu negativnih bakterijah so esencialni PBP1a, PBP1b, PBP2 in PBP3. Zaviranje enega ali več encimov

lahko vodi v smrt bakterije. Ker pa ni nujno, da zaviranje enega samega encima vodi v smrt celice, je multitarčno delovanje dobrodošlo. Npr. pri bakteriji *Escherichia coli*, ki ima skupno 12 PBP, morata biti za preživetje bakterije aktivna vsaj dva encima, in sicer PBP1a ali PBP1b, poleg enega od njiju pa še PBP2 ali PBP3. Za učinkovito protibakterijsko delovanje je torej potrebno zaviranje vsaj dveh ali več različnih PBP (14).

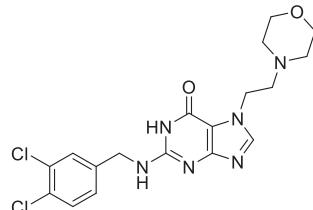
Zaviralci PBP so β-laktamski antibiotiki, ki so nasprotno med najbolj raziskanimi in klinično uporabljenimi antibiotiki. Poleg kinolonov (pod poglavje 3.1.1) so edini zaviralci z multiplim delovanjem z veliko spojinami v klinični rabi. β-laktami so baktericidni antibiotiki, ki zavirajo sintezo celične stene bakterij s tem, ko se kovalentno vežejo na aminokislino serin v aktivnem mestu penicilin vezičih proteinov. Delimo jih v



a) dvojni zaviralec DNA polimeraz IIIC in IIIE



b) ACX-362E, zaviralec DNA polimeraze IIIC v kliničnih testiranjih za zdravljenje infekcij s C. difficile



Slika 5: Primera zaviralcev DNA-polimeraz III.

Figure 5: Examples of DNA polymerase III inhibitors.

štiri razrede: penicilini, cefalosporini, monobaktami in karbapenemi (slika 6a) (28).

Tudi pri β -laktamih se je že kmalu po uvedbi penicilina v terapijo pojavila in razširila odpornost nanje. Glavni mehanizem je encimsko posredovana odpornost, saj bakterije izločajo encime – β -laktamaze, ki razgradijo antibiotik. Delno rešitev problema je predstavljala uvedba terapije s kombinacijo β -laktamskega antibiotika in zavirala β -laktamaz (npr. klasična kombinacija amoksicilina in klavulanske kisline ali novejša kombinacija ceftazidima in avibaktama), vendar so se bakterije prilagodile z razvojem encimov, odpornih proti zaviralcem (t. i. β -laktamaze širokega spektra; *extended-spectrum β -lactamase*, ESBL) (29, 30).

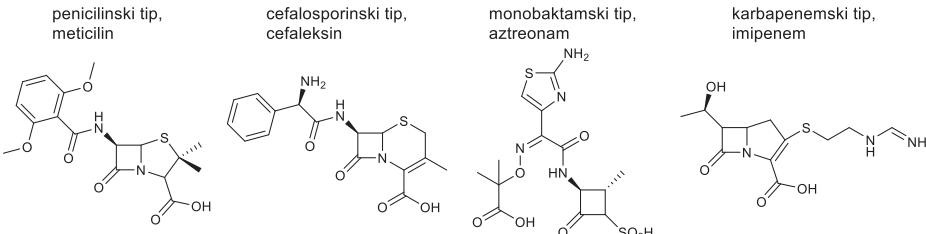
Raziskujejo tudi možnost zaviranja PBP z reverzibilnimi zaviralcji, ki ne vsebujejo β -laktamskega fragmenta in zato niso podvrženi razgradnji z β -laktamazami (12). Primeri takih zaviralcev z multitarčnim delovanjem na različne PBP so prikazani na sliki 6b.

3.2.2 Zaviraci ligaz Mur

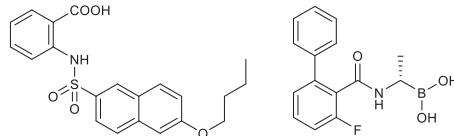
Encimi MurA-F katalizirajo prvi šest korakov biosinteze peptidoglikana, ki se zaključijo z nastankom UDP-*N*-acetilmuramoil pentapeptida. Ligaze MurC-F katalizirajo tvorbo peptidne vezi z vezavo molekule ATP in substrata UDP-*N*-acetilmuramoila in tako predstavljajo privlačne možnosti za sintezo multitarčnih ligandov (31). Medtem ko je vezavno mesto za ATP dobro ohranjeno pri vseh štirih encimih, pa so vezavna mesta za UDP-*N*-acetilmuramoil podobna v parih MurC/D in MurE/F (31). Odkrili so več multitarčnih zaviralcev encimov Mur, kar potrjuje dejstvo, da je možno zaviranje več encimov, vendar pa zaenkrat ti niso imeli obetavne protibakterijske aktivnosti (12, 32).

3.2.3 Zaviraci biosinteze lipida A

Prve tri stopnje biosinteze lipida A katalizirajo encimi LpxA, LpxC in LpxD. Zaviralec encima LpxC, ACHN-975 (33) (slika 7a), ki se sicer veže na eno tarčo, je prvi in tudi

a) β -laktamski zavirali

b) Nekovalentni zavirali PBP-jev

Slika 6: a) β -laktamski zavirali PBP in b) nekovalentni zavirali PBP.Figure 6: a) β -lactam PBP inhibitors and b) non-covalent PBP inhibitors.

edini, ki je prišel v klinična preskušanja med zaviralci biosinteze lipida A. Klinične raziskave s tem zaviralcem so zaradi toksičnosti leta 2017 prekinili. Možnost dvojnega zaviranja pa nudita LpxA in LpxD, aciltransferazi, ki ju zavira spojina RJPXD33 (34, 35) (slika 7b). Ta spojina je dodekapeptid in glede na to, da je razvoj dolgih peptidnih verig kot protibakterijskih učinkovin zahteven, so raziskave še v začetnih fazah. Kljub temu izboljšanje razumevanja potrebnih farmakofornih značilnosti predstavlja možnosti za odkritje majhnih molekul, ki bi delovale kot dvojni zaviralci (12).

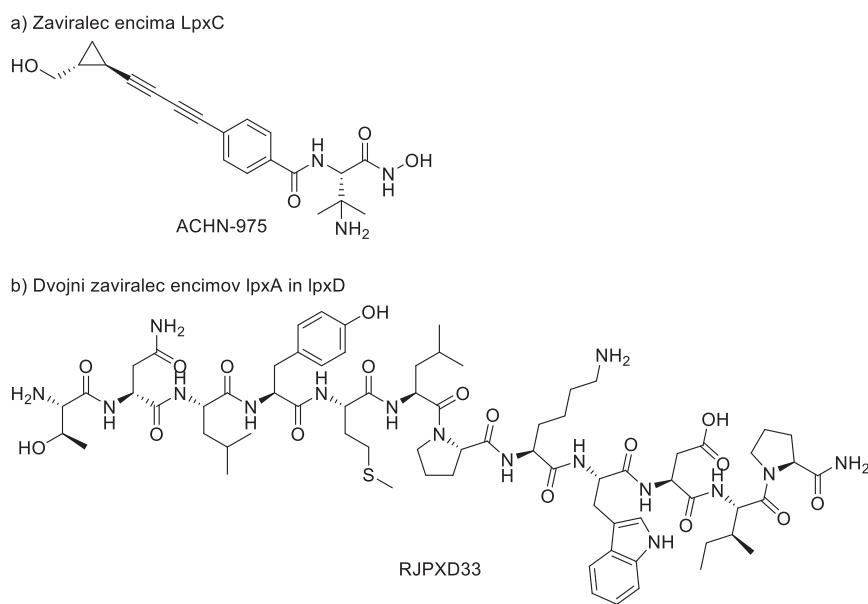
3.3 DRUGI ZAVIRALCI Z MULTIPLIM DELOVANJEM

Čeprav so v literaturi opisali tudi primere drugih zaviralcev z multiplim delovanjem, je informacij o njih zelo malo. Med njimi so npr. spojine, ki motijo biosintezo folne kisline (spojina MANIC (36), ki je dvojni zaviralec dihidropteroat sintaze (DHPS) in dihidrofolat reduktaze (DHFR); slika 8a), in spojine, ki zavirajo biosintezo maščobnih kislin v bakterijah. V biosintezi maščobnih kislin sodelujejo npr. encimi FabI, FabF in FabH. FabI je validirana tarča, saj nanjo delujeta učinkovini triklosan (antiseptik) in izoniazid (antituberkulotik) (37). Encima FabF in FabH sta dobro ohranjena med različnimi patogeni, zavira pa ju naravna spojina platencin (slika

8b) s širokim spektrom delovanja na po Gramu pozitivne bakterije (38).

3.4 KONJUGATI

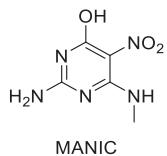
Poleg spojin, opisanih v podpoglavljih 3.1 do 3.3, ki vsebujejo en farmakofor, s katerim se lahko vežejo na več bioloških tarč, pa razvijajo tudi spojine, t. i. konjugate, ki vsebujejo dva farmakofora, ki sta med seboj povezana (slika 3b1) (32). Zaradi njihove velike molekulske mase in dveh različnih farmakoforov je težje odkriti spojino z ustrezнимi lastnostmi zdravilnih učinkovin. Ker sta v tem primeru dve spojini povezani, ne moremo prilagajati njune koncentracije, kar lahko vodi v omejitve pri odmerjanju zaradi potencialne toksičnosti ene od komponent molekule (32). Vseeno pa lahko ob optimizaciji vseh omejitev odkrivanja novih spojin tudi konjugati predstavljajo obetaven pristop k zmanjšanju bakterijske odpornosti, kar dokazujejo nekatere spojine, ki vstopajo v klinična preskušanja. Odkrili so veliko konjugatov s fluorokinolonskimi zaviralci topoizomeraz (GyrA/ParC), npr. a) fluorokinolone in anilinouracilne zaviralce DNA-polimeraze IIIC (slika 9a), ki izkazujejo uravnoteženo delovanje na več tarč in obetavno protibakterijsko aktivnost tako na po Gramu pozitivne kot na po Gramu negativne bakterije (39), b) fluorokinolone in ok-sazolidinonske zaviralce sinteze proteinov, kot je spojina



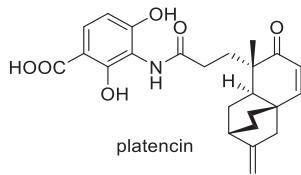
Slika 7: Zaviralci encimov LpxC, LpxA in LpxD.
Figure 7: LpxC, LpxA and LpxD inhibitors.



a) Zaviralec DHPS in DHFR



b) Zaviralec FabF in FabH



Slika 8: Drugi zaviralci z multiplim delovanjem.

Figure 8: Other multitarget ligands.

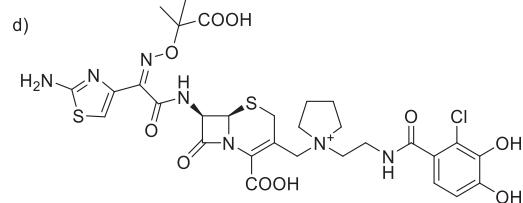
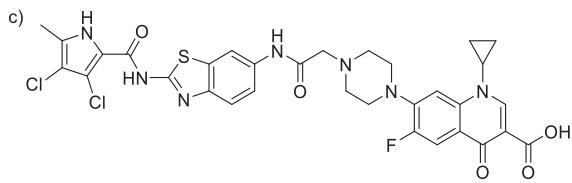
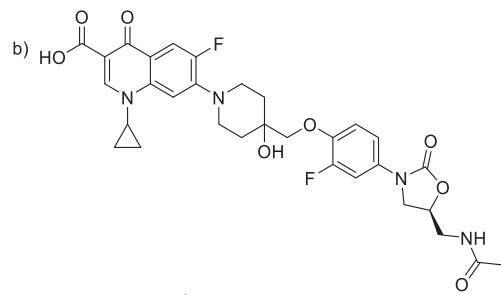
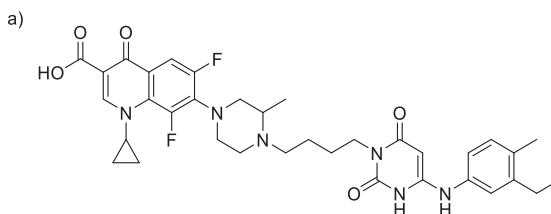
DNV3837 (slika 9b), ki je trenutno v 2. fazi kliničnih preiskovanj za zdravljenje okužb z bakterijo *C. difficile* (14, 40) in c) fluorokinolone in benzotiazolne ATP-kompetitivne zaviralce topoizomeraz (GyrB/ParE) (slika 9c) (41).

Kot zanimiv primer konjugatov omenimo še cefiderokol, ki je sestavljen iz cefalosporina (ceftazidim) in kateholu (2-kloro-3,4-dihidroksibenzojska kislina) (slika 9d). Tu sicer ne gre za spojino s klasičnim delovanjem na dve tarči, temveč za enega od pristopov k zmanjšanju odpornosti oz. pristop za prehajanje spojine v bakterijsko celico. Ta spojina za vstop v bakterijo uporablja princip »trojanskega konja«, saj kateholni fragment deluje kot siderofor. Siderofori so molekule, ki jih bakterije izločajo v okolico, tam kelirajo ione Fe^{3+} , nastali kompleks pa bakterije prepozna in spet privzamejo v celico preko svojih transportnih sistemov. Na ta način pridobijo železo, ki ga za svoje delovanje nujno potrebujejo. Če torej na protibakterijsko spojino

pripnemo mimetik siderofora, ki kelira železo, lahko bakterija ta kompleks prepozna in z aktivnim transportom privzame v celico, pri tem pa pride v celico tudi antibiotik (42). Cefiderokol so novembra 2019 v ZDA odobrili za zdravljenje komplikiranih okužb sečil s po Gramu negativnimi bakterijami (43).

4 SKLEP

Odkrivanje novih protibakterijskih spojin je nujno za uspešen boj z vedno bolj odpornimi patogeni iz skupine ESKAPE. Uspešnih protibakterijskih učinkovin primanjkuje in kljub številnim raziskavam na trg vstopi le malo novih



Slika 9: Konjugati: a) fluorokinolon in zaviralec DNA pol IIC, b) fluorokinolon in zaviralec ribosomske podenote 50S, c) fluorokinolon in zaviralec ATP-vezavnga mesta topoizomeraz in d) cefalosporin in mimetik siderofora.

Figure 9: Conjugates: a) fluoroquinolone and DNA pol IIC inhibitor, b) fluoroquinolone and ribosome 50S subunit inhibitor, c) fluoroquinolone and ATP-competitive topoisomerase inhibitor, and d) cephalosporin and siderophore mimetic.

spojin z novimi mehanizmi delovanja. Pristop zaviranja več tarč z multitarčnimi ligandi je ena od možnosti razvoja spojin, ki lahko upočasnijo pojav bakterijske odpornosti. DNA giraza/topoizomeraza IV in penicilin vezični proteini so tarče klinično validiranih učinkovin z multiplim delovanjem in predstavljajo obetavne možnosti razvoja novih kemijskih razredov spojin, npr. ATP-kompetitivnih zaviralcev GyrB in ParE ali nekovalentnih zaviralcev penicilin vezičnih proteinov. Z multitarčnimi ligandi lahko zaviramo tudi encime, kot so aciltransferaze v biosintezi lipida A, ligaze Mur in DNA polimeraze III. Konjugati, tj. spojine z dvema povezanimi farmakoforoma, so še en zanimiv način delovanja na več tarč. Bakterijska odpornost je sicer kompleksen problem in multipli ligandi so še vedno lahko podvrženi mehanizmom odpornosti, kot so npr. izlivne črpalki ali bakterijska razgradnja spojine. Vseeno pa tudi zmanjšanje in upočasnitev pojava tarčnih mutacij, kar taki ligandi omogočajo, pomembno pripomore k reševanju tega problema.

5 LITERATURA

- Lyddiard D, Jones GL, Greatrex BW. Keeping it simple: lessons from the golden era of antibiotic discovery. *FEMS Microbiology Letters*. 2016;363(8).
- Rice LB. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis*. 2008;197(8):1079–81.
- D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, idr. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011;477(7365):457–61.
- Van Boeckel TP, Pires J, Silvester R, Zhao C, Song J, Criscuolo NG, idr. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. *Science*. 2019;365(6459):1944.
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, idr. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(3):318–27.
- Oldfield E, Feng X. Resistance-resistant antibiotics. *Trends in Pharmacol Sci*. 2014;35(12):664–74.
- Penchovsky R, Traykovska M. Designing drugs that overcome antibacterial resistance: where do we stand and what should we do? *Expert Opin Drug Discov*. 2015;10(6):631–50.
- McManus MC. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J Health Syst Pharm*. 1997;54(12):1420–33.
- McOsker CC, Fitzpatrick PM. Nitrofurantoin: Mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *J Antimicrob Chemother*. 1994;33:23–30.
- Peterson E, Kaur P. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Front Microbiol*. 2018;9:2928.
- Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Res Int*. 2016;2016:1–8.
- East SP, Silver LL. Multitarget ligands in antibacterial research: progress and opportunities. *Expert Opin Drug Discov*. 2013;8(2):143–56.
- Tomašič T, Mašič L. Prospects for Developing New Antibacterials Targeting Bacterial Type IIA Topoisomerases. *Curr Top Med Chem*. 2013;14(1):130–51.
- Pham TDM, Ziora ZM, Blaskovich MAT. Quinolone antibiotics. *MedChemComm*. 2019;10(10):1719–39.
- Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol*. 2014;22(8):438–45.
- Fluoroquinolone and quinolone antibiotics: PRAC recommends restrictions on use [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cited 2021 Nov 1]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/fluoroquinolone-quinolone-antibiotics-prac-recommend-s-restrictions-use_en.pdf
- Badshah SL, Ullah A. New developments in non-quinolone-based antibiotics for the inhibition of bacterial gyrase and topoisomerase IV. *Eur J Med Chem*. 2018;152:393–400.
- Fernandes P, Martens E. Antibiotics in late clinical development. *Biochem Pharmacol*. 2017;133:152–63.
- Bisacchi GS, Manchester JL. A New-Class Antibacterial—Almost. Lessons in Drug Discovery and Development: A Critical Analysis of More than 50 Years of Effort toward ATPase Inhibitors of DNA Gyrase and Topoisomerase IV. *ACS Infect Dis*. 2015;1(1):4–41.
- Barnes MH, Miller SD, Brown NC. DNA Polymerases of Low-GC Gram-Positive Eubacteria: Identification of the Replication-Specific Enzyme Encoded by dnaE. *J Bacteriol*. 2002;184(14):3834–8.
- Butler M. Antibacterial Pyrazole Carboxylic Acid Hydrazides. WO2004094370.
- Xu W-C, Silverman MH, Yu XY, Wright G, Brown N. Discovery and development of DNA polymerase IIIC inhibitors to treat Gram-positive infections. *Bioorg Med Chem*. 2019;27(15):3209–17.
- FDA Grants QIDP Designation to Acurx's Lead Antibiotic Product Candidate, ACX-362E for Clostridium difficile Infection [Internet]. [cited 2020 Feb 1]. Available from: <https://www.acurxpharma.com/news-media/press-releases/detail/5/fda-grants-qidp-designation-to-acurxs-lead-an-tibiotic>
- Vollmer W, Blanot D, De Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32(2):149–67.
- Steimle A, Autenrieth IB, Frick J-S. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *Int J Med Microbiol*. 2016;306(5):290–301.
- Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32(2):234–58.
- Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(8).
- Silver LL. Multi-targeting by monotherapy antibiotics. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(1):41–55.
- Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, idr. β -Lactamases and β -Lactamase



- Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol.* 2019;431(18):3472–500.
30. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care.* 2020;8(1):13.
 31. Smith CA. Structure, Function and Dynamics in the mur Family of Bacterial Cell Wall Ligases. *J Mol Biol.* 2006;362(4):640–55.
 32. Silver LL. Challenges of Antibacterial Discovery. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(1):71–109.
 33. Kalinin DV, Holl R. LpxC inhibitors: a patent review (2010–2016). *Expert Opin Ther Pat.* 2017;27(11):1227–50.
 34. Ma X, Prathapam R, Wartchow C, Chie-Leon B, Ho C-M, De Vicente J, idr. Structural and Biological Basis of Small Molecule Inhibition of Escherichia coli LpxD Acyltransferase Essential for Lipopolysaccharide Biosynthesis. *ACS Infect Dis.* 2019;acsinfectdis.9b00127.
 35. González-Bello C. The Inhibition of Lipid A Biosynthesis-The Antidote Against Superbugs? *Adv Ther.* 2019;2(3):1800117.
 36. Bennett BC, Xu H, Simmerman RF, Lee RE, Dealwis CG. Crystal Structure of the Anthrax Drug Target, *Bacillus anthracis* Dihydrofolate Reductase †. *J Med Chem.* 2007;50(18):4374–81.
 37. Lu H, Tonge PJ. Inhibitors of FabI, an Enzyme Drug Target in the Bacterial Fatty Acid Biosynthesis Pathway. *Acc Chem Res.* 2008;41(1):11–20.
 38. Wang J, Kodali S, Lee SH, Galgoci A, Painter R, Dorso K, idr. Discovery of platencin, a dual FabF and FabH inhibitor with in vivo antibiotic properties. *Proc Natl Acad Scis.* 2007;104(18):7612–6.
 39. Butler MM, LaMarr WA, Foster KA, Barnes MH, Skow DJ, Lyden PT, idr. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of a Novel Anilinouracil-Fluoroquinolone Hybrid Compound. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(1):119–27.
 40. An Exploratory, Open-Label, Oligo-Center Study to Evaluate the Safety, Efficacy, and Pharmacokinetics of Intravenous DNV3837 in Subjects With Clostridium difficile Infection [Internet]. [cited 2021 Nov 1]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03988855>
 41. Fois B, Skok Ž, Tomašić T, Ilaš J, Zidar N, Zega A, idr. Dual *Escherichia coli* DNA Gyrase A and B Inhibitors with Antibacterial Activity. *ChemMedChem.* 2020;15(3):265–269.
 42. Domalaon R, Idowu T, Zhanel GG, Schweizer F. Antibiotic Hybrids: the Next Generation of Agents and Adjuvants against Gram-Negative Pathogens? *Clin Microbiol Reviews.* 2018;31(2).
 43. FDA news release; FDA approves new antibacterial drug to treat complicated urinary tract infections as part of ongoing efforts to address antimicrobial resistance [Internet]. [cited 2021 Nov 1]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-antibacterial-drug-treat-complicated-urinary-tract-infections-part-ongoing-efforts>