

KATEDRA ZA FARMACEVTSKO KEMIJO



Člani Katedre za farmacevtsko kemijo (januar 2020): strokovne sodelavke Katja Perc, Damijana Zalar, Martina Tekavec, mladi raziskovalci asist. Matjaž Weiss, asist. Andrej Šterman, Maša Sterle, asist. Žiga Skok, asist. Eva Shannon Schiffner, asist. Matic Proj, Anže Meden, asist. Maša Kenda, Katarina Grabrijan, asist. Ana Dolšak, asist. Martina Durcik, raziskovalci Živa Zajec, Žan Toplak, Niko Strašek, Sjors van Klaveren, Elena Maria Loi, Samo Guzelj, Špela Gubič, Sandra Cetin, asist. Aleša Bricelj, dr. Nina Strah, asist. dr. Eva Ogorevc, asist. dr. Damijan Knez, asist. dr. Urban Košak, asist.-raz.dr. Eva Kranjc, asist.-raz.dr. Aljoša Bolje, asist.-raz.dr. Štefan Možina, asist.-raz.dr. Andrej Emanuel Cotman, znanstvena sodelavca doc. dr. Martina Hrast, prof. dr. Zdenko Časar, asistenti doc. dr. Izidor Sosič, doc. dr. Stane Pajk, doc. dr. Rok Frilan, doc. dr. Nace Zidar, izr. prof. dr. Tihomir Tomašič, izr. prof. dr. Matej Sova, učitelji izr. prof. dr. Janez Mravljak, izr. prof. dr. Žiga Jakopin, izr. prof. dr. Janez Ilaš, izr. prof. dr. Anamarja Zega, prof. dr. Uroš Urleb, prof. dr. Marko Anderluh, prof. dr. Lucija Peterlin Mašič, prof. dr. Aleš Obreza, prof. dr. Marija Sollner Dolenc, prof. dr. Danijel Kikelj, prof. dr. Stanislav Gobec (predstojnik).

Sodelavci Katedre za farmacevtsko kemijo izvajamo raziskave zgodnjega odkrivanja in razvoja novih učinkovin. Raziskave vključujejo načrtovanje, sintezo, biološko in toksikološko vrednotenje novih potencialnih učinkovin ter razvoj novih molekulskih orodij za proučevanje interakcij z biološkimi makromolekulami. Odkrivanje novih učinkovin se začne s strukturno podprtим računalniškim načrtovanjem ali načrtovanjem na osnovi ligandov, nadaljuje s kemijsko sintezo, izolacijo in analizo sintetiziranih spojin ter biološkim in varnostnim vrednotenjem delovanja.

Glavni raziskovalni poudarki so na razvoju novih protibakterijskih učinkovin, protitumornih učinkovin, učinkovin z delovanjem na imunski sistem in učinkovin za zdravljenje nevrodgenerativnih bolezni. Z najsodobnejšimi in inovativnimi pristopi farmacevtske kemije razvijamo zaviralce encimov in modulatorje receptorjev ter ionskih kanalov, ki so validirane tarče za razvoj novih učinkovin. Pri tem razvijamo nove sintezne poti, nove separacijske in analizne metode za identifikacijo spojin, nove metode za biološko vrednotenje sintetiziranih spojin in nove antioksidante ter fluorescenčne označevalce. Pri toksikološkem vrednotenju spojin posebno pozornost posvečamo raziskavam na področju mehanistične toksikologije. Proučujemo mehanizme toksičnega delovanja kemikalij in učinkovin ter s toksikološkimi testi podpiramo projekte zgodnjega razvoja novih učinkovin. Glavna področja toksikoloških raziskav na Katedri vključujejo mehanizme delovanja motilcev endokrinega sistema, vpliv metabolizma na biološko aktivnost, teste citotoksičnosti, računalniške metode za napovedovanje toksičnosti, imunotoksičnost ter ocene tveganja.

ALI LAHKO Z NOVIMI PROTIMIKROBNIMI UČINKOVINAMI ZMAGAMO V BOJU Z BAKTERIJAMI?

CAN WE WIN THE FIGHT WITH BACTERIA USING NEW ANTIMICROBIAL COMPOUNDS?

AVTORJI / AUTHORS:

Prof. dr. Aleš Obreza, mag. farm.

Prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.

Prof. dr. Stanislav Gobec, mag. farm.

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

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: stanislav.sobec@ffa.uni-lj.si

1 UVOD S KRATKIM ZGODOVINSKIM PREGLEDOM

Odgovor na v naslovu zastavljeni vprašanje je dolgoročno gledano zagotovo nikalen, kratkoročno pa lahko človeštvo v boju z mikroorganizmi z razvojem novih proti-

POVZETEK

Pogosto slišimo rek, da je zgodovina najboljša učiteljica za prihodnost. To velja tudi na področju farmacevtske kemije ali ožje definirano, na področju načrtovanja, sinteze in vrednotenja novih učinkovin. Protimikrobne učinkovine odražajo nenehno željo človeštva, da bi se uspešno spopadlo z boleznimi, ki so v preteklosti predstavljale glavni razlog za veliko smrtnost in kratko življenjsko dobo. Ob iztekanju zelo uspešnega obdobja obvladovanja bakterijskih okužb je zelo pomembno iskanje novih molekul za prihodnost. Kljub majhnosti v svetovnem merilu je Katedra za farmacevtsko kemijo na tem področju v zadnjih dveh desetletjih opravila odlično raziskovalno delo s številnimi vrhunskimi rezultati in objavami.

KLJUČNE BESEDE:

farmacevtska kemija, protimikrobne učinkovine, rezistence

ABSTRACT

It is a well-known saying that history is the best teacher for the future. This also applies to the field of pharmaceutical chemistry, narrowly defined as design, synthesis and evaluation of new drug candidates. Antimicrobials reflect the continued desire of mankind to successfully fight with the diseases that have been the main cause of high mortality and short life expectancy in the past. Since a very successful period of control of bacterial infections is reaching the end, the search for new molecules for the future is very important. Despite its small size at the global level, the Chair of pharmaceutical chemistry has done excellent research work over the past two decades, with a number of top results and publications in this field.

KEY WORDS:

antimicrobial drugs, pharmaceutical chemistry, resistance



za relativno počasno podaljševanje pričakovane življenjske dobe. Pogosto so predstavljale ključne mejnike v evropski zgodovini, kar zlahka razberemo, če omenimo samo nekatere najbolje dokumentirane in verjetno tudi najpomembnejše epidemije antičnega sveta in srednjega veka. Atenska kuga (429–427 pr. n. št.) je pomenila pomembno prelomnico v peloponeških vojnah in počasen zaton klasične grške kulture s prehodom v helenizem. Kljub zelo natančnemu opisu bolezni v Tukididovi drugi knjigi, še vedno ni znan povzročitelj (1). Če je bil opis znakov in simptomov ne samo natančen, ampak tudi pravilen, grški zgodovinopisec po vsej verjetnosti ni opisal nobene danes znane bolezni. Obstaja seveda možnost, da je združil opise več različnih obolenj. Dolgo je prevladovala hipoteza o epidemiji črnih koz. Najnovejše raziskave to mnenje zavračajo, arheološke in biokemijske študije kažejo na obliko trebušnega tifusa (2). Epidemija črnih koz pa je bila skoraj zagotovo odgovorna za naslednjo večjo epidemijo, ki se je v času partskih vojn cesarja Marka Avrelijia razširila z vzhoda in zajela celoten imperij (165 do okrog 175). Opisal jo je Galen in je bila eden izmed najpomembnejših vzrokov za gospodarsko in vojaško nazadovanje Rimskega cesarstva konec drugega in v začetku tretjega stoletja (3). Za zaključek uvdgnega dela moramo omeniti dve dokazani epidemiji bubonske kuge, saj so v obeh primerih potrdili prisotnost gramnegativne bakterije *Yersinia pestis* v vzorcih iz omenjenih obdobjij. Prva epidemija (540–541) je prizadela predvsem vzhodni del Evrope v času vojn vzhodnorimskoga cesarja Justinijana (527–565) s sasanidsko Perzijo in jo je v svojih delih podrobno opisal zgodovinar Prokopij (4, 5). Podobno kot bolj znana epidemija črne smrti (1346–1353), ki se je v Evropo razširila iz predelov vzhodno od Črnega in Azovskega morja, je zahtevala nekje med 20 in 40 % prebivalstva prizadetih področij. Slednja se je v velikem loku od genoveške kolonije Kaffa na Krimskem polotoku preko Konstantinopla razširila po Sredozemlju vse do Iberskega polotoka. V prvi fazi so bili močno prizadeti predeli današnje Turčije, bližnjega vzhoda, Egipta, Balkana, Italije, južne Francije okrog Marseillea in Španije. Od tu se je razširila v Anglijo, preostali del Francije, centralno Evropo in Skandinavijo in se v letu 1353 zaključila v ruskih kneževinah (6, 7). Epidemije raznih virusnih in bakterijskih okužb so se pojavljale tudi v naslednjih stoletjih, vendar so bile geografsko omejene in z izjemo epidemij, ki so zdesetkale domorodno prebivalstvo Amerik po stiku z Evropejci (8), in pandemije španske gripe po prvi svetovni vojni (9) niso povzročile tolikšne smrtnosti med prebivalstvom.

2 ZLATA DOBA PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN

V današnji dobi raznovrstnih, učinkovitih, varnih in poceni protimikrobnih učinkovin se le redkodaj zavemo, da so ljudje že od nekdaj v svoji okolini iskali snovi, ki bi jih zaščitile pred infekcijskimi boleznimi. Poleg zdravil rastlinskega izvora, medu, živalskega blata, redkeje urina, so že starci Egipčani, za njimi pa antični Grki in Rimljani opisali uspehe pri zdravljenju ran z dermalnim nanosom plesnivega kruha (10). V tem zgodnjem obdobju so bili nevede v uporabi tudi nekateri sodobni antibiotiki, kar kaže odkritje tetraciklinov na kosteh domačinov, pokopanih v poznoantičnem grobišču v severni Nubiji (11). V Evropi so kljub poznavanju avripigmenta, realgarja in cinabrita, kasneje tudi belega arzenika, šele s Paracelzom začeli pogosteje in relativno uspešno uporabljati anorganske protimikrobine učinkovine, ki so jih aplicirali lokalno ali sistemsko (12). Zlasti zaradi principov »herojske medicine«, ki je priporočala uporabo najvišjih odmerkov, ki jih je posameznik prenesel, pa so neželeni učinki takšnega zdravljenja pogosto vodili v še slabši izid zdravljenja, kot sama bolezen. Pravi preboj se je pričel šele v 20. stoletju z raziskavami Paula Ehricha in njegovega iskanja čarobnih krogel, originalno *magische Kugeln* oz. *Zauberkugeln*, poimenovanih enako kot krogle, ki naj bi jih po ljudskem verovanju uporabljali za ubijanje volkodlakov (13). Druga prelomnica pa so Flemingovo naključno odkritje penicilina (14) in Domagkove raziskave, ki so privedle do protibakterijskih sulfanilamidov. Uvedbi sulfanilamidov in betalaktamskih antibiotikov v zdravljenje bakterijskih okužb v 30-ih in 40-ih letih 20. stoletja sta sprožili zlato dobo protimikrobnih učinkovin, ko so bile v naslednjih tridesetih letih odkrite skoraj vse strukturne skupine danes uporabljenih protimikrobnih učinkovin naravnega, polsinteznega in sinteznega izvora (preglednica 1). S proučevanjem vzorcev prsti iz različnih dežel so izolirali protimikroben delujoče produkte sekundarnega metabolizma, npr. streptomycin, s čimer so prvič v zgodovini omogočili zdravljenje tuberkuloze, in vankomicin, ki je kot širokospektralni antibiotik prišel v klinično uporabo leta 1958. Sredi 60. let prejšnjega stoletja so bile možnosti odkritja novih strukturnih vrst naravnih antibiotikov po klasični poti praktično izčrpane (15). Ker naravne spojine niso bile načrtovane kot zdravilne učinkovine, ampak so bile posledica dolgotrajne evolucije mikroorganizmov v specifičnih razmerah okolja, je večina imela številne neželene lastnosti z vidika farmakokinetike ali toksikologije. Logična je bila spremembra v razmišljjanju in iskanje novih spojin sinteznega izvora, zlasti kinolonov, oz. sintezna modifikacija naravnih antibiotikov (16).



Preglednica 1: Seznam skupin protimikrobnih učinkovin z najpomembnejšimi predstavniki in letnico odkritja.

Table 1: List of groups of antimicrobial compounds with the most important representatives and the year of their discovery.

Skupina protimikrobnih učinkovin	INN najpomembnejših predstavnikov	Leto odkritja
Sulfanilamidi	sulfanilamid sulfametoksazol	1930 1938
Betalaktamski antibiotiki	benzilpenicilin ampicilin amoksicilin cefazolin cefaletsin cefuroksim aztreonam	1929 1958 1958 1967 1967 1971 1982
Tetraciklini	tetraciklin	1953
Aminoglikozidi	streptomycin neomycin gentamicin	1943 1949 1962
Glikopeptidi	vankomicin	1954
Makrolidi	eritromycin klaritromycin azitromycin	1952 1980 1980
Oksazolidinoni	linezolid	1994
Polipeptidni antibiotiki	bacitracin daptomicin kolistin	1945 1988 1947
Kinoloni	ciprofloksacin moksifloksacin	1980 1988
Amfenikoli	kloramfenikol	1947
Ansamicini	rifamicin	1957
Streptogramini	pristinamicin	1990
Linkozamidi	linkomicin klindamicin	1960 1966
Nitrofurani	nitrofurantoin	1953

Uporaba, včasih tudi povsem neracionalna, velikih količin antibiotikov za obvladovanje okužb pri živalih in ljudeh, uporaba protimikrobnih učinkovin v živinoreji in nenadzorovano vračanje učinkovin v naravo so glavni razlogi za zelo hiter pojav odpornosti, rezistence, na protimikrobne učinkovine, ki pridejo v klinično uporabo. Odpornost na več protimikrobnih učinkovin pri patogenih je značilna za zadnjih trideset let in bistveno zmanjšuje našo sposobnost zdravljenja okužb z antibiotiki. Glede na stopnjo rezistence bakterijske seve delimo na multirezistentne, ki so odporni proti vsaj eni učinkovini v najmanj treh različnih skupinah protibakterijskih

učinkovin, zelo rezistentne, odporne proti vsem učinkovinam dveh ali več skupin učinkovin, in panrezistentne, ki so odporni skoraj proti vsem učinkovinam iz vseh skupin protibakterijskih učinkovin (17). Navadno se rezistenca pojavi v nekaj letih po prihodu nove protimikrobne učinkovine na tržišče, pogosto že v obdobju kliničnega vrednotenja posamezne molekule. V zadnjih desetletjih sta opazna še dva fenomena v razvoju novih protimikrobnih učinkovin. Prvi je prehod od širokospektralnih učinkovin, ki so jih za zdravljenje bakterijskih okužb z velikim uspehom uporabljali v desetletjih po drugi svetovni vojni, v iskanje bolj specifičnih molekul z

ožjim spektrom delovanja, oz. v uporabo kombinacij protimikrobnih zdravilnih učinkovin, pogosto z učinkovinami, ki neposredno ne delujejo protimikrobeno, ampak skušajo zaboliti ali preprečiti rezistenco pri mikroorganizmih. Klasičen primer so zaviralci betalaktamaz. Drugi pojav, ki je značilen za zadnje obdobje, pa je čedalje manjši interes farmacevtske industrije za iskanje novih protimikrobnih učinkovin, kar je v veliki meri pogojeno tudi z relativno nizkimi dobički prodaje zdravil, ki jih uporabljamo občasno za zdravljenje akutnih bolezenskih stanj. Danes so najpogosteje nosilci razvoja manjša in srednje velika razvojna podjetja, pogosto tudi raziskovalne inštitucije, inštituti in univerze. Čedalje glasnejši so pozivi k spremembi načina razmišljanja in strategij na področju razvoja novih zdravilnih učinkovin, saj naj bi počasi vstopali v t. i. postantibiotično obdobje, ko nadzor nad z bakterijami povzročenimi okužbami ne bo več tako samoumeven kot danes (18, 19).

3 KATEDRA ZA FARMACEVTSKO KEMIJO V ISKANJU NOVIH PROTİMIKROBNIH UČINKOVIN

Razvoj novih protimikrobnih učinkovin je eno izmed temeljnih področij znanstveno-raziskovalnega dela na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani (UL FFA) v zadnjih dveh desetletjih, financiranega v sklopu programske skupine P1-0208: Farmacevtska kemija; načrtovanje, sinteza in vrednotenje učinkovin, poleg tega pa tudi sodelovanja v štirih evropskih projektih, številnih projektov ARRS in projektnega dela s farmacevtsko industrijou. Celoten raziskovalni opus je nemogoče podrobno predstaviti v obliki kratkega preglednega članka v Farmacevtskem vestniku, zato opisujemo samo izbrane najpomembnejše mejnike in dosežke naših raziskovalcev. Osnova raziskovalnega dela je program raziskovalne skupine, ki ga na kratko povzemamo iz prijave raziskovalnega programa na ARRS: Dolgoročni cilj je odkrivanje novih majhnih biološko aktivnih molekul s potencialom za razvoj do učinkov na pomembnih terapevtskih področjih ob uporabi kombinacije različnih farmacevtsko-kemijskih pristopov. Raziskovalni program se osredotoča na odkrivanje in racionalno načrtovanje spojin z delovanjem na validirane tarče, njihovo sintezo in biološko vrednotenje, z namenom odkrivanja spojin s protimikrobnim, protinevrodregenerativnim, imunomodulatornim in protirakavim delovanjem, ki so velikega pomena za zdravje ljudi zaradi naraščajoče rezistence bakterij in staranja prebivalstva. Med področji razi-

skav je na prvem mestu navedeno odkrivanje protibakterijskih učinkovin, katerih tarče so bakterijski encimi in človeški lektini (optimizacija predhodno odkritih zaviralcev MurA-F, zaviralcev D-Ala-D-Ala ligaze, aspartat ligaze, transpeptidazne in transglukozilazne domene penicilin vezičnih proteinov z vidika jakosti delovanja, fizikalno-kemijskih in farmakokinetičnih lastnosti, odkrivanje zaviralcev reduktaze enoil acil prenašalnega proteina (InhA), DNA giraze B in topoizomeraze IV (ParE) in odkrivanje antagonistov lektinov DC-SIGN and FimH). Slednje se prekriva tudi z vključenostjo v delo na posameznih raziskovalnih projektih.

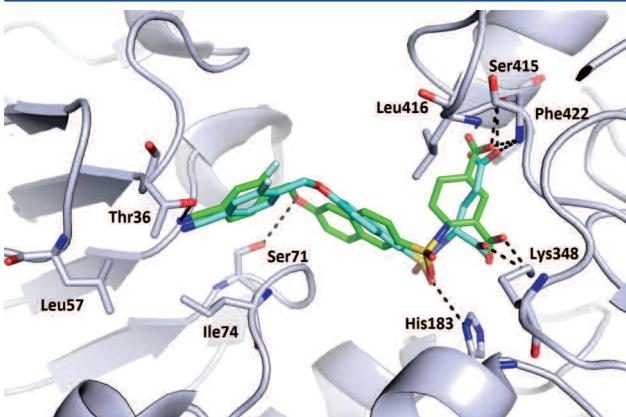
Prvi pomemben mednarodni preboj je bilo sodelovanje v integriranem evropskem projektu EUR-INTAFAR (*Inhibition of new targets for fighting antibiotic resistance*) v letih 2005–2010. V petletnem projektu je sodelovalo 16 partnerjev iz šestih evropskih držav: Belgiji, Franciji, Nizozemske, Velike Britanije, Nemčije in Slovenije. Koordinator integriranega projekta je bil prof. dr. Jean-Marie Frère iz Univerze v Liegu, vodja projekta na UL FFA pa prof. dr. Stanislav Gobec (20). V okviru projekta smo proučevali zaviralce biosinteze bakterijskega peptidoglikana, katerega glavna naloga je ohranjevanje oblike celice in zaradi njegove čvrstosti vzdrževanje celične integritete pred vplivi okolja, kar bakterijam omogoča preživetje. Hkrati tvori tudi opora drugim gradnikom celične membrane, kot so proteini in tehojska kislina, sodeluje pa tudi v procesih celične rasti in delitve. Kakršna koli motnja v biosintezi peptidoglikana lahko vodi v lizo celice (slika 1). Mnogi znani antibiotiki, kot so penicilini, cefalosporini in vankomicin ovirajo ali preprečijo biosintezo peptidoglikana, ki jo katalizira vrsta znotrajceličnih, membranskih in zunajceličnih encimov, ki predstavljajo še dokaj neraziskana in neizkoriščena tarčna mesta (21). S pomočjo sodobnih pristopov farmacevtske kemije smo načrtovali spojine, ki z delovanjem na te nove tarče ovirajo in/ali preprečujejo biosintezo peptidoglikana in povzročijo smrt bakterij. V okviru projekta smo se osredotočili zlasti na encime iz družine ligaz Mur, ki so si strukturno podobne in imajo enak mehanizem delovanja (22). Kristalne strukture ligaz Mur v različnih bakterijskih vrstah razkrivajo, da imajo ti encimi skupne tri domene. N-terminalna in centralna domena sta odgovorni za vezavo prekurzorja UDP in ATP, medtem ko je C-terminalni del odgovoren za vezavo aminokislinskega ostanka. Sodelujejo pri znotrajcelični sintezi pentapeptida, ki se nato prenese na zunanj stran bakterijske membrane in vgradi v nastajajoči peptidoglikan. Kljub zavedanju pomena ligaz Mur v biosintezi peptidoglikana pa je bilo pred začetkom projekta znanih le malo njihovih zaviralcev. Na Katedri smo bili še posebej uspešni pri razvoju zaviralcev encima MurD, ki v nastajajoči peptidoglikan



Slika 1: Zaviranje biosinteze peptidoglikana je pogubno za bakterije, ki se ne morejo več upirati osmotskemu tlaku.

Figure 1: Inhibition of peptidoglycan biosynthesis is fatal for bacteria as they can't resist the external osmotic pressure.

vgrajuje D-glutaminsko kislino in je zaradi tega še posebej zanimiva tarča za razvoj protimikrobnih učinkovin. Razvili smo obsežno serijo zaviralcev MurD (slika 2), kar je omogočilo, da smo kot prvi na svetu skupaj s partnerji na projektu uspeli razrešiti več kristalnih struktur tega encima v kompleksu z nizkomolekularnimi zaviralcem (23-27).

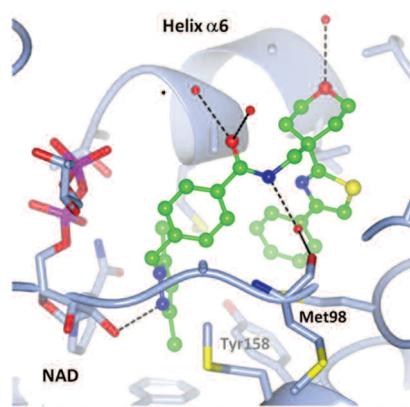


Slika 2: Prileganje kristalnih struktur dveh sulfonamidnih zaviralcev (modre in zelene barve), razvitih na UL FFA, v aktivnem mestu MurD.

Figure 2: Superposition of crystal structures of two sulphonamide inhibitors (blue and green), developed at the Faculty of Pharmacy, in MurD active site.

Logično vsebinsko nadaljevanje projekta INTAFAR je bilo sodelovanje v evropskem projektu ORCHID (*Open Collaborative Model for Tuberculosis Lead Optimisation*) v letih 2010–2015 (28). ORCHID je bil ambiciozen štiriletni projekt s ciljem razvoja novih molekul, ki bi jih lahko uporabljali za zdravljenje na več zdravil odporne tuberkuloze. Projekt je združeval ekspertizo 12 akademskih inštitucij, vladnih raziskovalnih centrov, neprofitnih organizacij in manjših biotehnoloških podjetij s sredstvi iz sedmega okvirnega programa za razvoj EU in je potekal pod vodstvom podjetja GlaxoSmithKline (GSK). Cilj projekta je bil razviti in validirati novo spojino vodnico, primerno za testiranje na človeku. Raziskovalci Katedre smo bili vključeni predvsem v razvoj novih zaviralcev InhA, encima, ki je nujen za preživetje mikobakterij (29). Najbolj znan zaviralec InhA je izoniazid. Ta pomembna učinkovina za zdravljenje tuberkuloze za svoje delovanje potrebuje aktivacijo z encimom KatG, ki pa je dovezten za mutacije, kar vodi v odpornost na izoniazid. Uspeli smo razviti zaviralce InhA, ki ne potrebujejo aktivacije s KatG (t. i. »direktne zaviralce«, slika 3), in kot prvi na svetu dokazali, da taki zaviraliči lahko delujejo tudi v živalskih modelih tuberkuloze (30-32).

Vzopredno je v istem obdobju potekal tudi evropski projekt MAREX (*Exploring Marine Resources for Bioactive Compounds: From Discovery to Sustainable Production and Industrial Applications*). Združeval je 19 akademskih organizacij, raziskovalnih in industrijskih partnerjev iz 13 držav. Glavni namen je bilo odkrivanje in proučevanje biološko aktivnih snovi iz morskih organizmov (33). Protimikrobne



Slika 3: Kristalna struktura InhA v kompleksu s tetrahydropiranskim zaviralcem (zelene barve), razvitim na Fakulteti za farmacijo (31).

Figure 3: Crystal structure of InhA in complex with tetrahydropyran inhibitor (green), developed at the Faculty of Pharmacy (31).

spojine niso bile osrednji cilj projekta, vseeno pa so bile rezultat biokemijskega vrednotenja sinteznih analogov alkaloida iz morskih spužev, oroidina, in njihovega delovanja proti trem bakterijskim sevom (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*). Številni novi imidazolni in indolni derivati so v nizkem mikromolarinem območju zavirali tvorbo biofilmov pri grampozitivnih sevih MRSA in *S. mutans* (34). Presenetljiva strukturalna podobnost med nekaterimi predhodno opisanimi zaviralci bakterijske DNA giraze B in derivati katrodina in oroidina je vodila v načrtovanje in sintezo več sto spojin različnih strukturnih razredov, med katerimi smo identificirali nekaj zelo močnih nanomolarnih zaviralcev giraze in topoizomeraze s protibakterijskim delovanjem (35).

V letih 2015–2018 je Katedra sodelovala pri projektu Marie Skłodowska Curie INTEGRATE (*Interdisciplinary Training Network for Validation of Gram-Negative Antibacterial Targets*), v okviru katerega smo uspeli pripraviti nove močne zaviralce bakterijske giraze (slika 4) in topoizomeraze IV (36, 37).

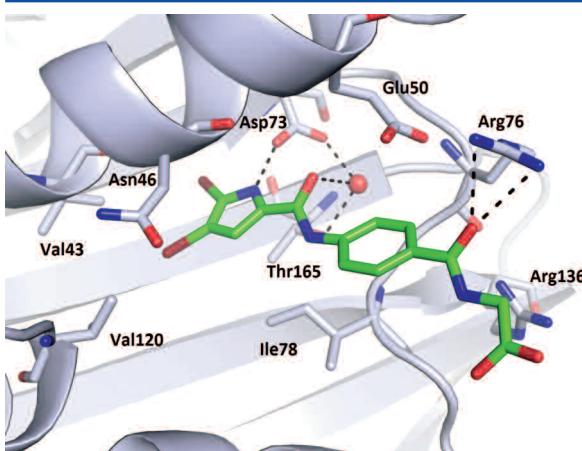
UL FFA je od 1. novembra 2018 partner na mednarodnem projektu IMI – ENABLE (38), pri katerem sodelujejo štiri mednarodne farmacevtske družbe (AstraZeneca, Basilea, Evotec in GlaxoSmithKline) ter 24 univerz, raziskovalnih inštitucij, javnih ustanov in 15 majhnih in srednje velikih podjetij. Projekt spada v okvir programa IMI New Drugs for Bad Bugs (ND4BB). Namen projekta ENABLE je predklinični in zgodnji klinični razvoj novih učinkovin z delovanjem proti gramnegativnim bakterijam, ki zaradi pogoste

rezistence na obstoječe protibakterijske učinkovine predstavljajo velik terapevtski problem in izziv. Cilj projekta, ki je bil podaljšan do 31. januarja 2021, je razviti tri spojine vodnice in dva klinična kandidata ter najmanj z eno spojino začeti prvo fazo kliničnih testiranj. Raziskovalna skupina Katedre pod vodstvom prof. dr. Danijela Kiklja v okviru projekta ENABLE raziskuje optimizacijo v skupini nedavno odkritih in s patentno prijavo PCT (39) zaščitenih ATP-kompetitivnih zaviralcev DNA giraze in topoizomeraze IV z močnim delovanjem proti bakterijam *Acinetobacter baumannii* in *Pseudomonas aeruginosa* do spojine vodnice. Odbor za upravljanje portfelja vsake tri mesece ocenjuje dosežen napredek in odloča o nadalnjem financiranju partnerjev projekta ENABLE.

4 SKLEP

Dolgoročno zmaga proti prokariontskim povzročiteljem bolezni verjetno ni možna, sploh če se bo nadaljeval trenutni trend prekemerne in neracionalne porabe protomikrobnih učinkovin in z njim povezan pojav rezistence pri mikroorganizmih. Zaradi kritičnosti omenjenega področja so dobrodošle vse farmacevtsko-kemijske iniciative na tem področju in spremembe v zavedanju pomena področja infekcijskih bolezni s strani farmacevtske industrije. Katedra za farmacevtsko kemijo UL FFA na področju načrtovanja, sinteze in vrednotenja teh molekul že desetletja zelo uspešno deluje tako na nacionalnem kot tudi mednarodnem področju. Ob upoštevanju materialnih in kadrovskih zmožnosti Katedre in ob dejstvu, da so protomikrobne učinkovine le eno izmed raziskovalnih področij, lahko rečemo, da upravičeno govorimo o odličnosti raziskovalnega, ki se preliva tudi v vrhunsko pedagoško delo.

5 ZAHVALA



Slika 4: Kristalna struktura DNA giraze B iz *E. coli* v kompleksu s pirolamidnim zaviralcem (zelene barve), razvitim na Fakulteti za farmacijo.

Figure 4: Crystal structure of DNA gyrase B from *E. coli* in complex with pyrrolamide inhibitor (green), developed at the Faculty of Pharmacy.

Avtorji se zahvaljujemo vsem sedanjim in bivšim redno in dopolnilno zaposlenim članom Katedre za farmacevtsko kemijo UL FFA za njihov prispevek k razvoju in promociji slovenske farmacije in farmacevtske kemije.

Hvala Tihomirju Tomašiču za pomoč pri pripravi slik.

6 LITERATURA

1. Holladay AJ, Poole JCF. *Thucydides and the Plague of Athens*. Classical Q. 1979; 29:282-300.
2. Papagrigorakis MJ, Yapijakis C, Synodinos PN, Baziotopoulou-Valavani E. DNA examination of ancient dental pulp incriminates typhoid fever as a probable cause of the Plague of Athens. *Int J Infect Dis.* 2006;10:206-14.
3. Duncan-Jones RP. The Antonine plague revisited. *Arctos.* 2018;52:41-72.
4. Drancourt M, Raoult D. Molecular history of plague. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22:911-5.
5. Eisenberg M, Mordechai L. The Justinianic Plague: an interdisciplinary review. *BMGS.* 2019;43:156-80.
6. Benedictow OJ. *The black death 1346-1353, The Complete History*. Woodbridge: The Boydell Press; 2004. p. 433.
7. Bos KI, Schuenemann VJ, Brian Golding G, Burbano HA, Waglechner N, Coombes BK, et al. A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. *Nature.* 2011;478:506-10.
8. Alchon SA. New world epidemics in a global perspective. Albuquerque: University of New Mexico press; 2003. p. 215.
9. Johnson NPAS, Mueller J. Updating the accounts: Global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med.* 2002;76:105-15.
10. Gould K. Antibiotics: from prehistory to the present day. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:572-5.
11. Basset EJ, Keith MS, Armelagos GJ, Martin DL, Villanueva AR. Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (AD 350). *Science.* 1980;209:1532-4.
12. Obreza A. Zgodovina uporabe anorganskih arzenovih spojin v terapiji. *Farm Vestn.* 2008;59:245-9.
13. Marshall EK. *The Present Status and Problems of Bacterial Chemotherapy*. Science. 1940;91:345-50.
14. Fleming A. On antibacterial action of culture of *Penicillium*, with special reference to their use in isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol.* 1929;10:226-36.
15. Lewis K. Antibiotics: recover the lost art of drug discovery. *Nature.* 2012;485:439-40.
16. Emmerson AM, Jones AM. The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:13-20.
17. Theuretzbacher U. Global antibacterial resistance: The never-ending story. *J Glob Antimicrob Resist.* 2013;1:63-9.
18. Brown FD, Wright GD. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature.* 2016;529:336-43.
19. O'Neill J. Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *AMR Review paper.* 2014; p. 16.
20. INTAFAR [Internet, cited 2020 Jan 13]. Available from: <http://www.eur-intafar.ulg.ac.be/>.
21. Silver LL. Does the cell wall of bacteria remain a viable source of targets for novel antibiotics? *Biochem Pharmacol.* 2006;71:996-1005.
22. Barreteau H, Kovač A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microb Rev.* 2008;32:168-207.
23. Kotnik M, Humljan J, Contreras-Martel C, Oblak M, Kristan K, Herve M, et al. Structural and functional characterization of enantiomeric glutamic acid derivates as potential transition state analogue inhibitors of Mur D ligase. *J Mol Biol.* 2007;1:107-15.
24. Zidar N, Tomašič T, Šink R, Kovač A, Patin D, Blanot D, et al. New 5-benzylidenethiazolidin-4-one inhibitors of bacterial MurD ligase: design, synthesis, crystal structures, and biological evaluation. *Eur J Med Chem.* 2011;46:5512-23.
25. Tomašič T, Zidar N, Šink R, Kovač A, Blanot D, Contreras-Martel C, et al. Structure-based design of a new series of D-Glutamic acid-based inhibitors of bacterial UDP-N-acetyl muramoyl-L-alanine:D-glutamate ligase (MurD). *J Med Chem.* 2011;54:4600-10.
26. Humljan J, Kotnik M, Contreras-Martel C, Blanot D, Urleb U, Dessen A, et al. Novel naphthalene-N-sulfonyl-d-glutamic acid derivatives as inhibitors of MurD, a key peptidoglycan biosynthesis enzyme. *J Med Chem.* 2008;51:7486-94.
27. Sosić I, Barreteau H, Simčić M, Šink R, Cesar J, Zega A, et al. Second-generation sulfonamide inhibitors of d-glutamic acid-adducing enzyme: activity optimisation with conformationally rigid analogues of d-glutamic acid. *Eur J Med Chem.* 2011;46:2880-94.
28. ORCHID [Internet, cited 2020 Jan 13]. Available from: <https://projectorchid.org/project-overview/>.
29. Rožman K, Sosić I, Fernandez-Menendez R, Young RJ, Mendoza A, Gobec S, et al. A new 'golden age' for the antitubercular target InhA. *Drug Disc Today.* 2017;22:492-502.
30. Šink R, Sosić I, Živec M, Fernandez-Menendez R, Turk S, Pajk S, et al. Design, synthesis and evaluation of new thiadiazole-based direct inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase (InhA) for the treatment of tuberculosis. *J Med Chem.* 2015;58:613-24.
31. Pajk S, Živec M, Šink R, Sosić I, Neu M, Chung CW, et al. New direct inhibitors of InhA with antimycobacterial activity based on a tetrahydropyran scaffold. *Eur J Med Chem.* 2016;112:252-7.
32. Encinas L, O'Keeffe H, Neu M, Remuinan MJ, Patel AM, Guardia A, et al. Encoded library technology as a source of hits for the discovery and lead optimization of a potent and selective class of bactericidal direct inhibitors of mycobacterium tuberculosis inhA. *J Med Chem.* 2014;57:1276-88.
33. MAREX [Internet, cited 2020 Jan 13]. Available from: <https://www.marex.fi/>.
34. Zidar N, Montalvo S, Hodnik Ž, Nawrot DA, Žula A, Ilaš J, et al. Antimicrobial activity of the marine alkaloids, clathrodin and oroidin, and their synthetic analogues. *Marine drugs.* 2014;12:940-63.
35. Tomašič T, Katsamakas S, Hodnik Ž, Ilaš J, Brvar M, Šolmajer T, et al. Discovery of 4,5,6, 7-tetrahydrobenzo[1,2-d]thiazoles as novel DNA gyrase inhibitors targeting the ATP-binding site. *J Med Chem.* 2015;58: 501-21.
36. Zidar N, Macut H, Tomašič T, Brvar M, Motalvo S, Tammela P, et al. N-phenyl-4,5-dibromopyrrolamides and N-phenylindolamides as ATP competitive DNA gyrase B inhibitors : design, synthesis, and evaluation. *J Med Chem.* 2015;58:6179-94.
37. Gjorgjeva M, Tomašič T, Barančokova M, Katsamakas S, Ilaš J, Tammela P, et al. Discovery of benzothiazole scaffold-based DNA gyrase B inhibitors. *J Med Chem.* 2016;59:8941-54.
38. ENABLE [Internet, cited 2020 Jan 13]. Available from: <https://www.imi.europa.eu/projects-results/project-factsheets/enable>.
39. Tomašič T, Zidar N, Durcik M, Ilaš J, Zega A, Durante Cruz C, et al. New class of DNA gyrase and/or topoisomerase IV inhibitors with activity against gram-positive and gram-negative bacteria. Demande de brevet d'invention LU 100918 (3.9.2018); PCT/EP2019/073412. Munich: Zacco, 2019. p. 115.

