

Selektivna toksičnost
SAR sulfonamidov
SAR inhibitorjev giraze
Antibiotiki in rezistenca

Izr. prof. dr. Marko Anderluh

20. december 2012

Infekcijske bolezni

- Drugi najpogostejši vzrok za smrt na svetu
- Najpogostejši razlog za smrt v državah v razvoju
- Tretji najpogostejši razlog za smrt v razvitih državah
- Nenehno bojevanje: mikroorganizmi – človek
- Preteklo stoletje – zgodba o uspehu

Bakterije – povzročitelji bolezni

Louis Pasteur (1822-1895)

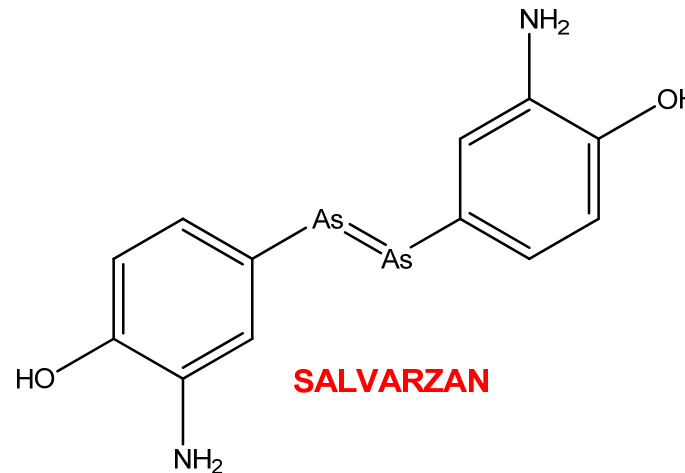
- Utemeljitelj teorije o mikrobih, ovrgel teorijo o spontanem nastanku bolezni/živega
- Eden začetnikov vakcinacije/cepljenja
- Listerju predlagal aseptično delo v kirurgiji (sir Jospeh Lister)



Kemoterapija

Paul Ehrlich – utemeljitelj kemoterapije

- Iskanje “magic bullet” – osnova selektivna toksičnost
- Nobelova nagrada 1908



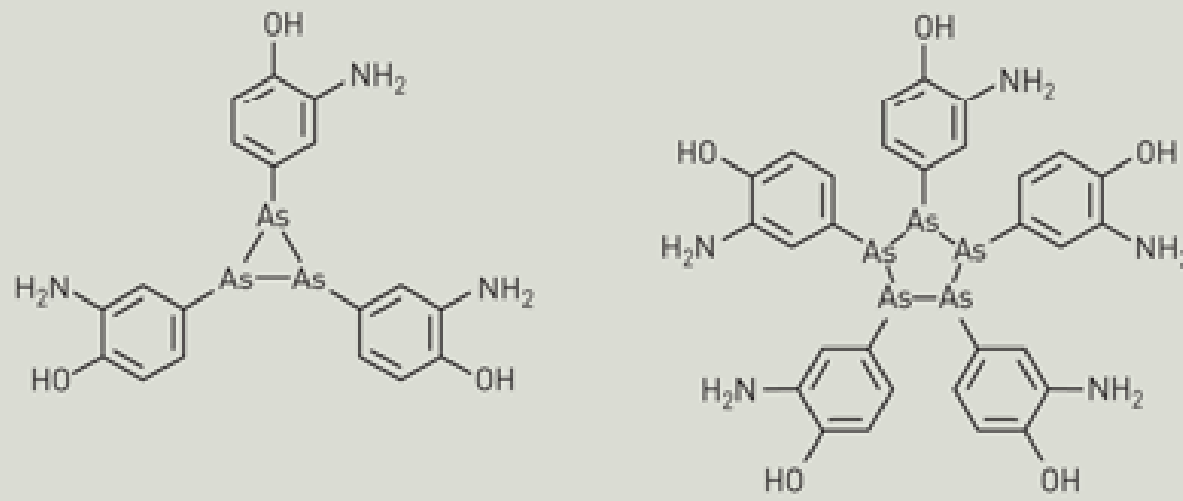
Učinkovit zoper spalno bolezen
(trypanosomioza), sifilis

Kemoterapija

Salvarsan

MISTAKEN IDENTITY

Ehrlich's Salvarsan is actually a mixture of cyclic species



Protibakterijske učinkovine na trgu

- Sredi 30-ih let 20. stoletja - sulfonamidi
- Konec 30-ih let 20. stoletja Florey, Chain in Abraham izolirajo penicilin: prvi odkrit beta-laktamski antibiotik
- Prvi uspešen poskus na človeku leta 1941
- Leta 2000 je trg protimikrobnih učinkovin vreden več kot 10 milijard \$: od tega več kot polovica predpisanih protibakterijskih učinkovin beta-laktamov

Protibakterijske učinkovine

PRIDOBIVANJE:

- BIOSINTEZNO, npr.: **gentamicin**
kompletno sintezo izvedejo mikroorganizmi
- POLSINTEZNO, npr.: **amoksicilin**
mikroorganizmi sintetizirajo osnovno spojino, ki jo nadalje modificirajo
- SINTEZNO, npr.: **kloramfenikol**
sinteza je ekonomsko smiselna.

Protibakterijske učinkovine

KEMOTERAPEVTIKI:

- Protimikrobne učinkovine sinteznega izvora, katerih delovanje temelji na principu selektivne toksičnosti, t.j. lastnosti, da uničujejo patogene mikroorganizme, na gostitelja (človeka, žival) pa nimajo škodljivega učinka
- V širšem pomenu vse protibakterijske učinkovine
- Protitumorske učinkovine

Protibakterijske učinkovine

ANTIBIOTIKI:

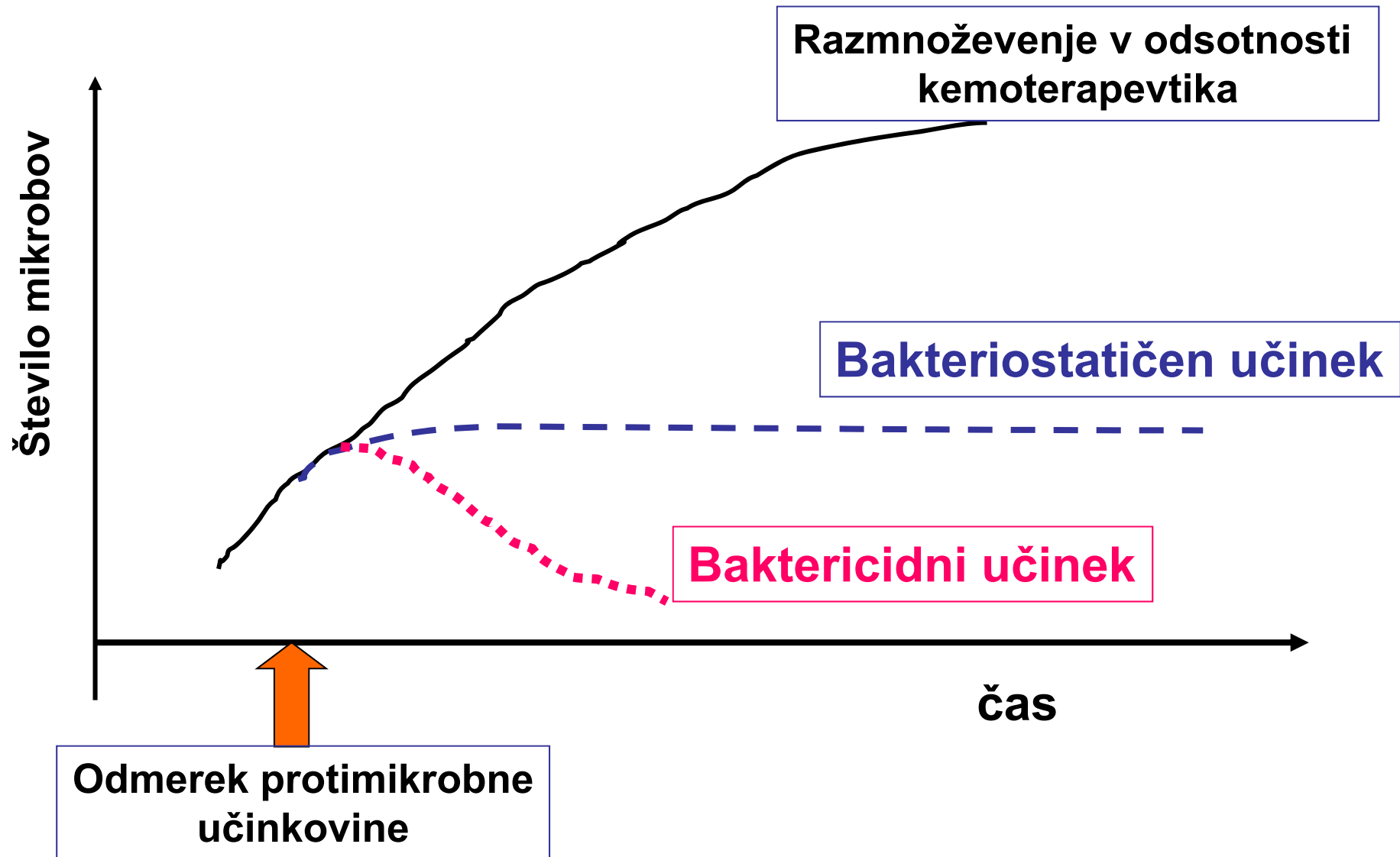
- So vse snovi, ki jih proizvajajo različne vrste mikroorganizmov (bakterije, glive, aktinomicete) za zaviranje rasti drugih mikroorganizmov.
- Nekateri pojem širijo na sintezne učinkovine z antimikrobnim delovanjem (sulfonamidi in kinoloni).

TABLE 20.1

Representative Sources of Antibiotics

Microorganism	Antibiotic
Gram-Positive Rods	
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacitracin
<i>Bacillus polymyxa</i>	Polymyxin
Actinomycetes	
<i>Streptomyces nodosus</i>	Amphotericin B
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Chloramphenicol ←
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Chlortetracycline and tetracycline
<i>Streptomyces erythraeus</i>	Erythromycin ←
<i>Streptomyces fradiae</i>	Neomycin
<i>Streptomyces griseus</i>	Streptomycin ←
<i>Micromonospora purpureae</i>	Gentamicin ←
Fungi	
<i>Cephalosporium</i> spp.	Cephalothin ←
<i>Penicillium griseofulvum</i>	Griseofulvin
<i>Penicillium notatum</i>	Penicillin ←

Baktericidnost - bakteriostatičnost



Baktericidnost - bakteriostatičnost

Baktericidno

- β -laktami
- Aminoglikozidi
- Vankomicin
- Ubije bakterije, ko je imunski sistem gostitelja manj učinkovit

Bakteriostatično

- Makrolidi
- Tetraciklini
- Kloramfenikol
- Zaviranje bakterijske rasti, imunski sistem gostitelja odstrani mikrobe

Spekter delovanja

- Po G+
- Po G-
- Aerobi/anaerobi
- Širokospektralni antibiotiki
- mikobakterije

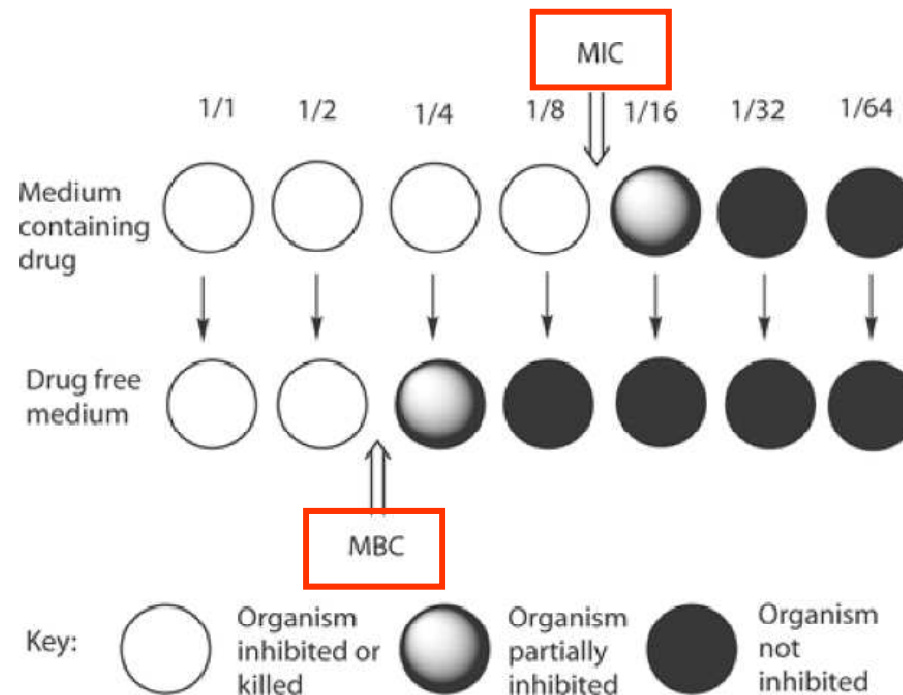
Predpisovanje antibiotikov

- Izkustveno
- Antibiogram; difuzijska ali Kirby-Bauerjeva metoda z diski



Parameter za vrednotenje antibiotskega učinka

- MIC = minimalna inhibitorna koncentracija; kvantitativno merjenje z razredčitvami antibiotika
- MBC = minimalna baktericidna koncentracija; kvantitativno merjenje z vzorci iz MIC

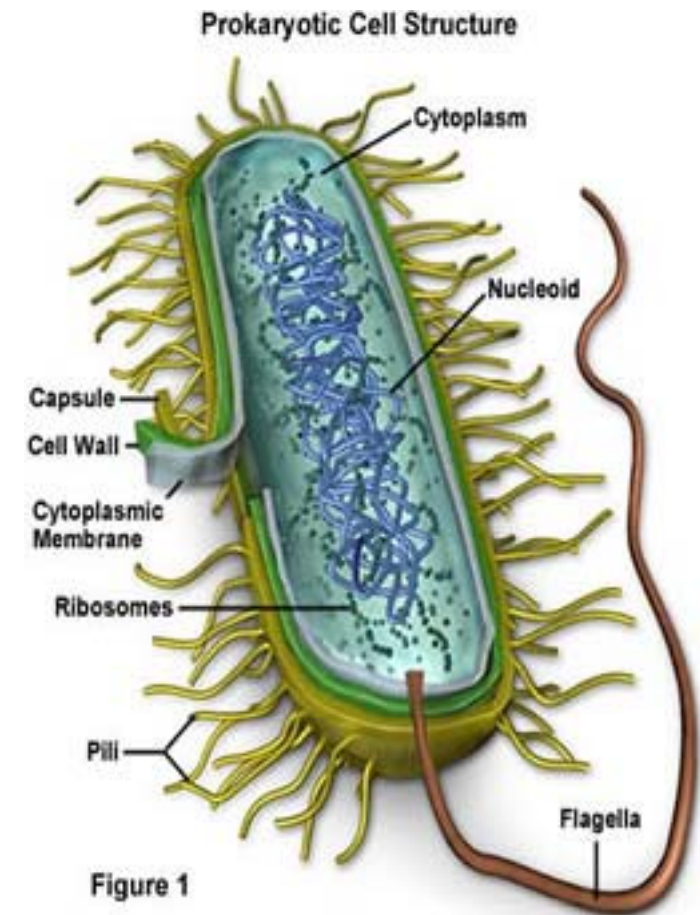


Selektivna toksičnost

- Temelji na razlikah med bakterijskimi in človeškimi celicami

Selektivna toksičnost

Celične komponente	PROKARIONTI	ČLOVEŠKE CELICE
Jedro	Ni membrane, cirkularni kromosom, ni proteinov	Membrana, kromosomi, stabilizirani z bazičnimi proteini (spermini)
Ekstra-kromosomska DNA	Plazmidi	V organelih (mitohondriji)
Organeli v citoplazmi	/	Mitohondriji, kloroplasti ER, ...
Citoplazemska membrana	Sinteza & Dihanje	Selektivna absorpcija/sekrecija
Celična stena	Obstaja	/
Biosinteza	Sinteza esencialnih vitaminov	/
Steroli	/, izjema: <i>Mycoplasma</i>	Prisotni
Ribosomi	70S (50S/30S)	80S (60S/40S)

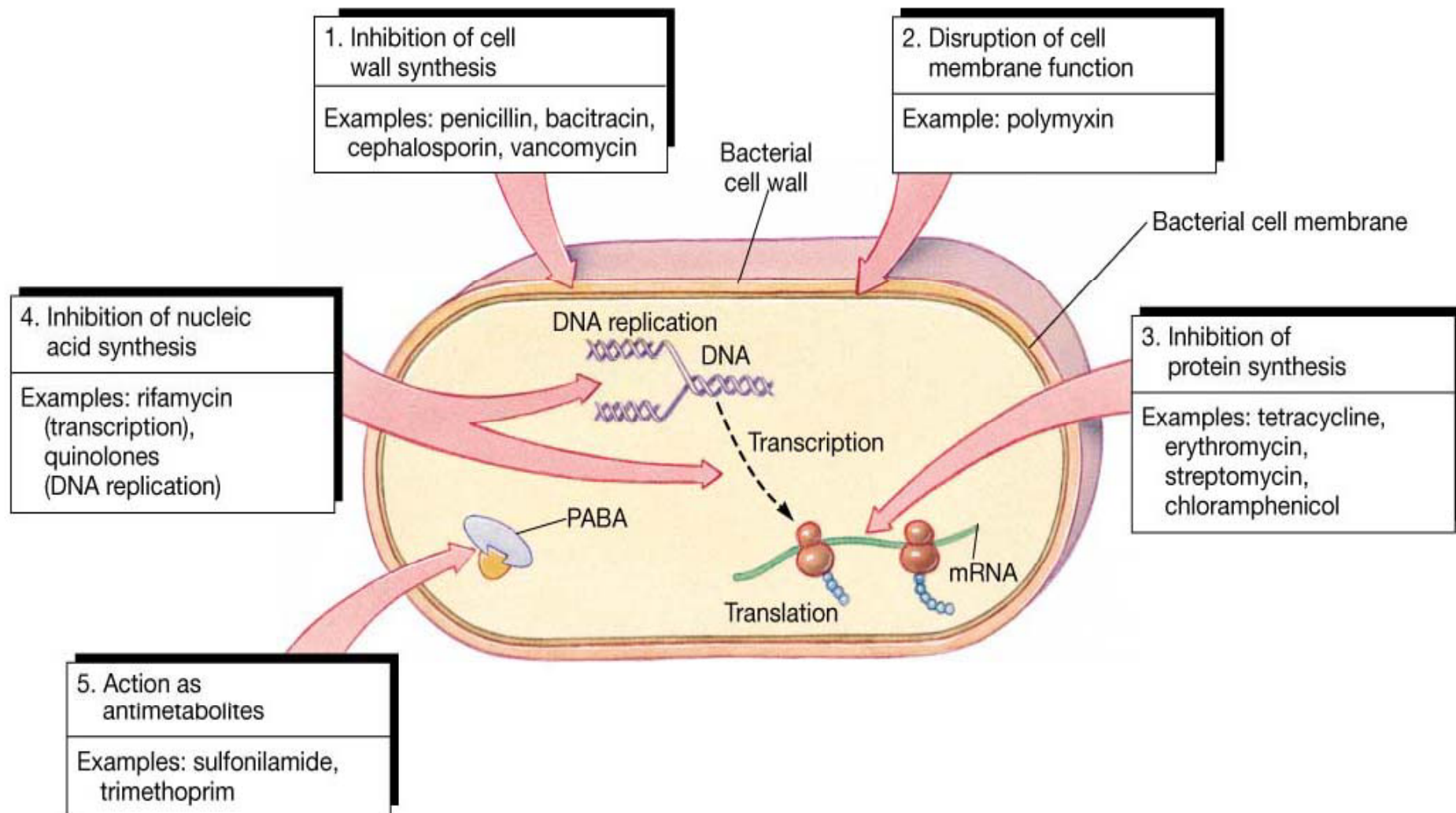


Mehanizmi delovanja protibakterijskih učinkovin

Inhibicija samo tistih procesov izgradnje, ki so lastni bakterijam in ne človeku.

- Inhibicija metabolizma - antimetaboliti
- Inhibicija biosinteze celične stene
- Inhibicija transkripcije, replikacije, zvijanja DNA
- Interakcija s celično membrano
- Oviranje sinteze proteinov

Mehanizmi delovanja protibakterijskih učinkovin



Antimetaboliti

- Sulfonamidi
- Inhibitorji dihidrofolat reduktaze

Sulfonamidi

Prvi široko uporabljeni kemoterapevtiki

- Gerhardt Domagk, 1932, azo-barvila delujejo protibakterijsko
- Azo-barvila se kovalentno vežejo na proteine blaga ali usnja → kovalentna vezava na bakterijske proteine → bakteriohistatično/cidno delovanje
- **Prontosil rubrum** – protibakterijska učinkovina
- *In vitro* neučinkovit, učinkovit *in vivo*
- Predzdravilo sulfanilamida

Sulfonamidi

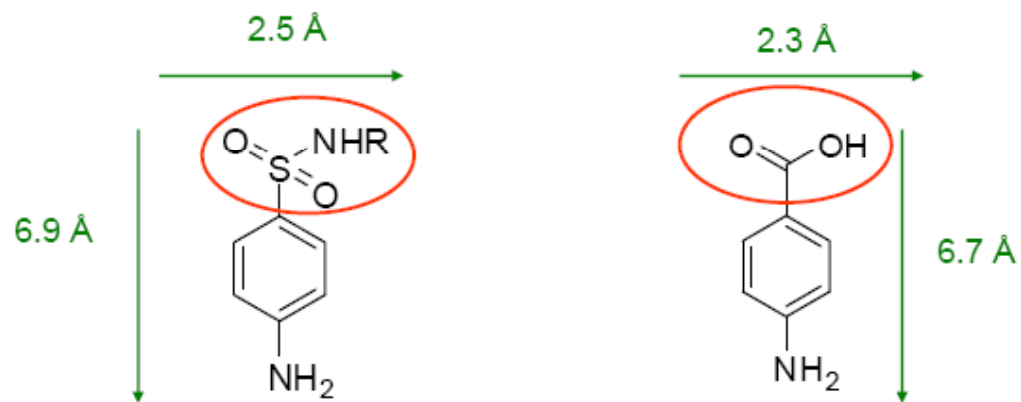
Mehanizem delovanja - dvojen

- Antimetaboliti PABA
- Produkt zaviralec naslednjega encima – dihidrofolat sintaze

Sulfonamidi

Mehanizem delovanja

- Zakaj antimetaboliti PABA?



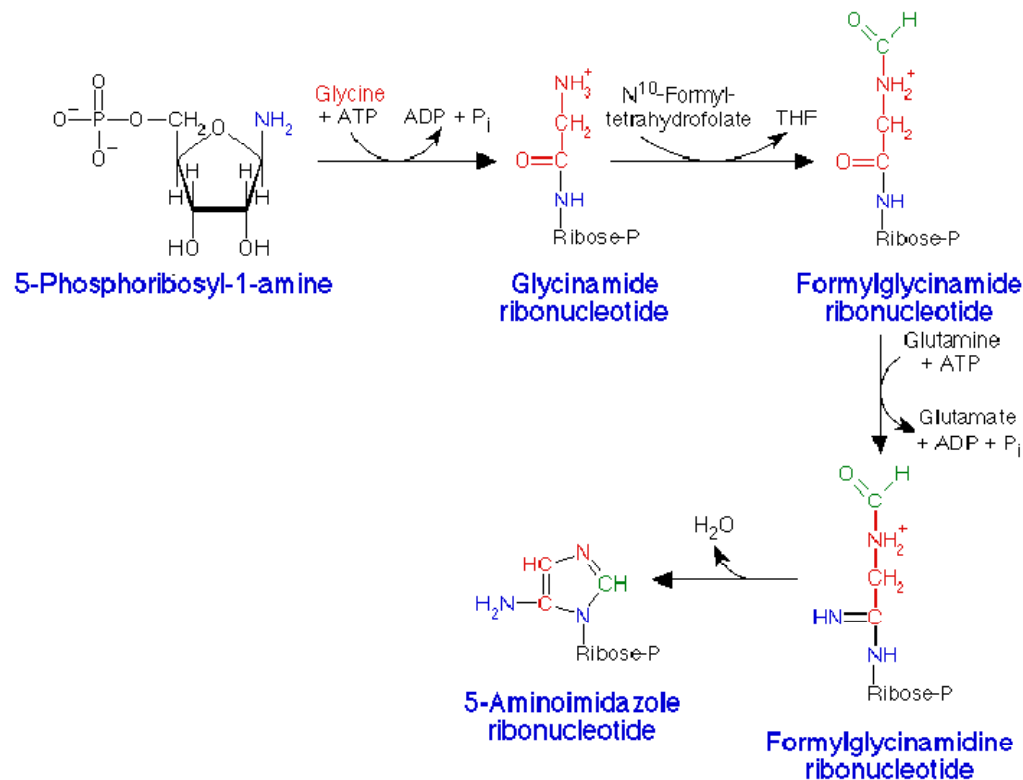
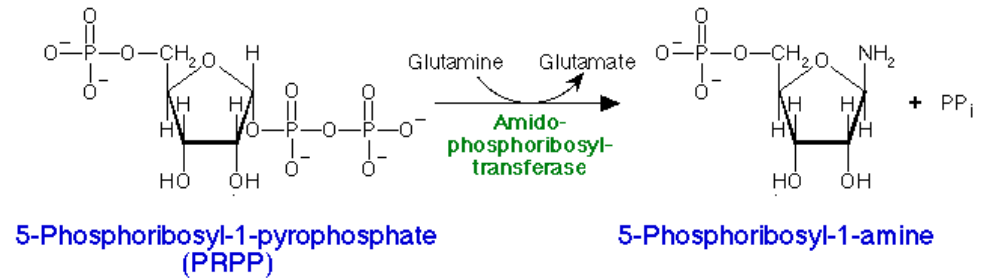
Sulfonamidi

Mehanizem delovanja

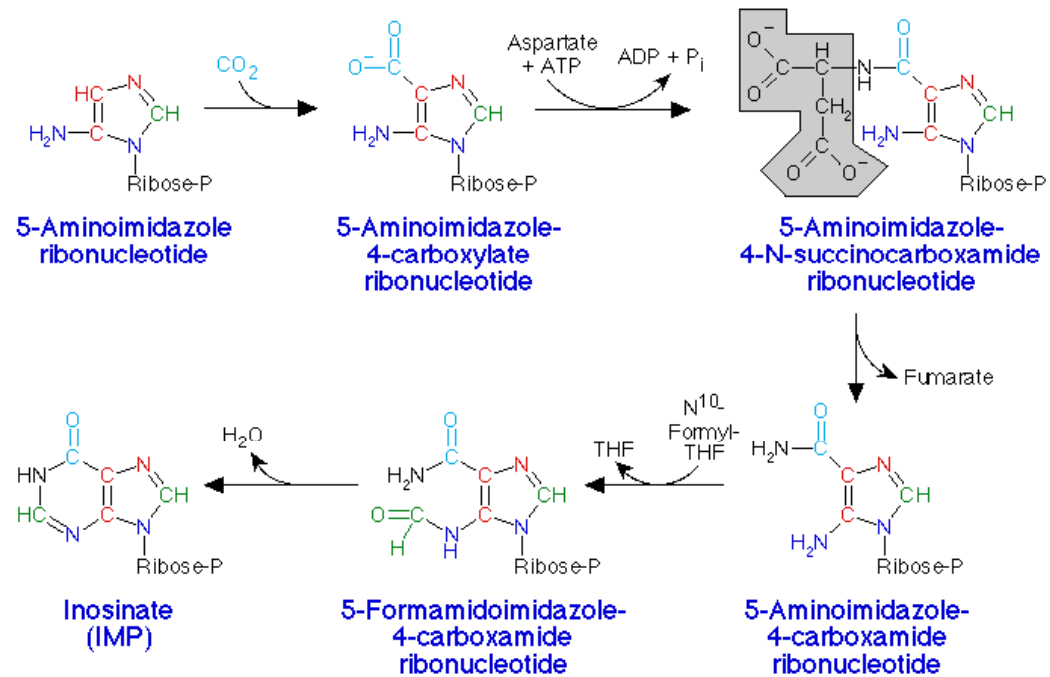
- Tetrahidrofolna kislina je kofaktor v encimu C1-transferaza
- sodeluje pri prenosu 1C skupin (metil-, formil-) - sinteze aminokislin, purinov, pirimidinov
- → **blokirana biosinteza purinskih in pirimidinskih baz** → ni DNA, RNA → ni možno podvajanje celic →
- **Bakteriostatični učinek** – ne ubijejo zrelih celic
- Človeški organizem dobiva dihidrofolno kislino s hrano, ker sam ni sposoben celotne sinteze THF → **selektivna toksičnost**

Biosinteza purinov

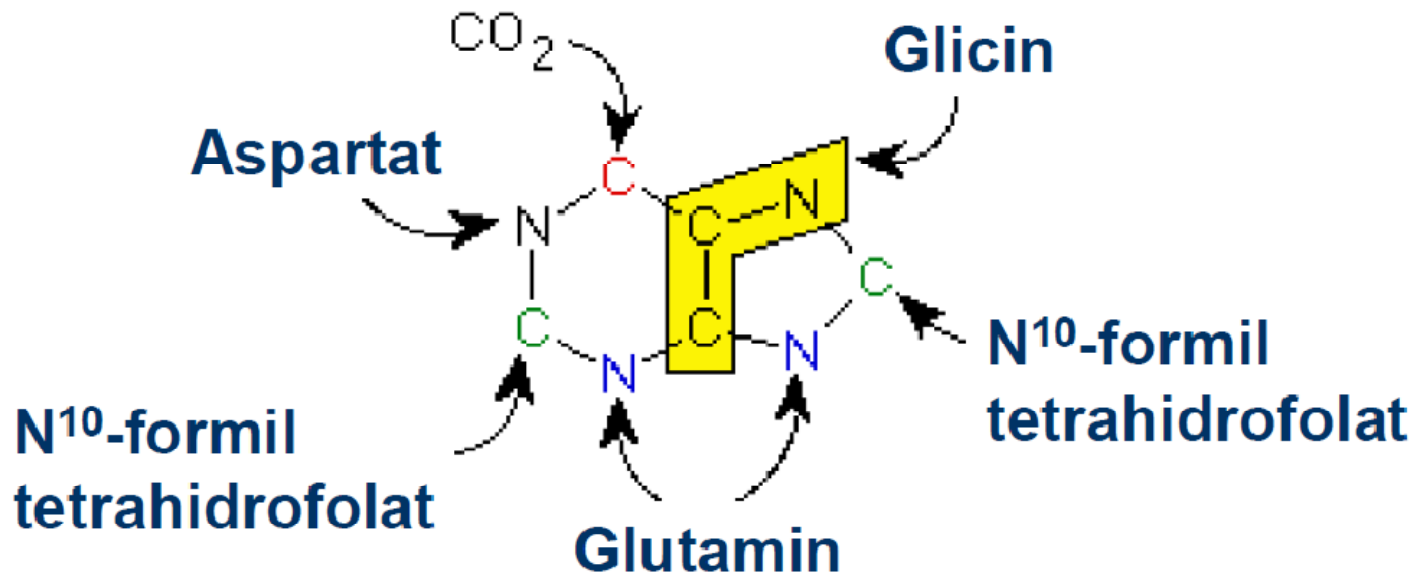
Kofaktor: formiltetrahidrofolna kislina



Biosinteza purinov

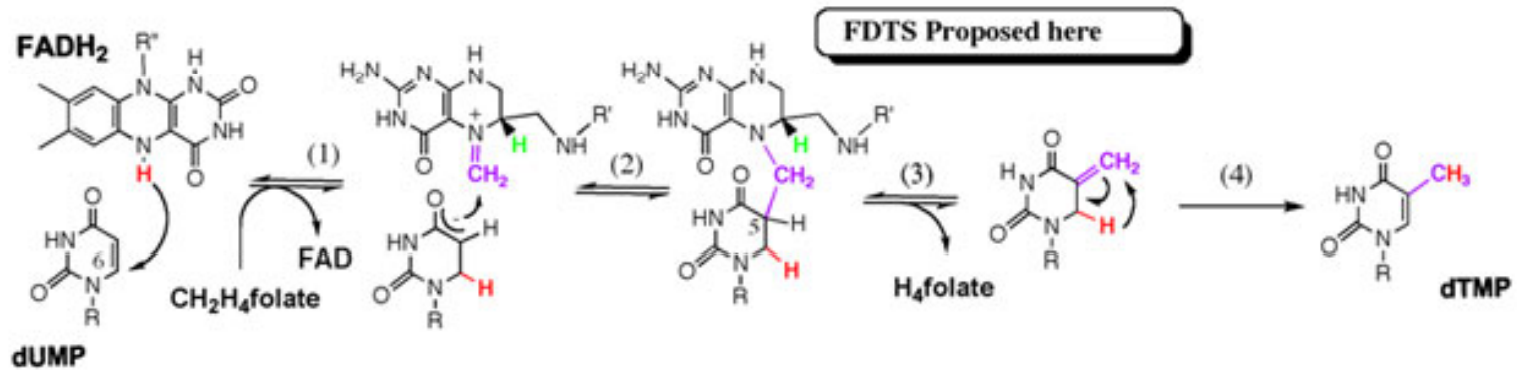
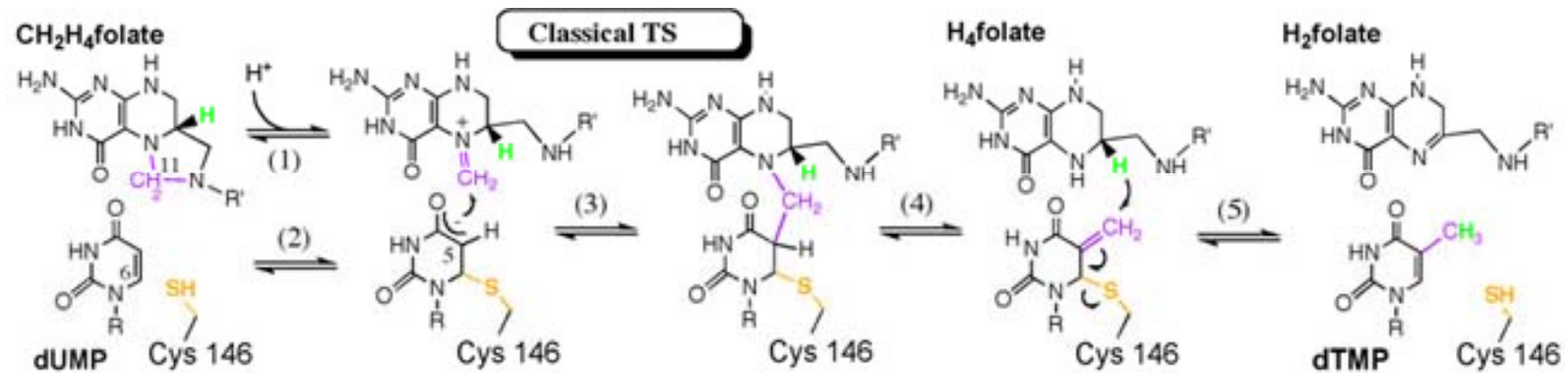


Biosinteza purinov



Izvor atomov v purinskem skeletu

Biosinteza timidina



Sulfonamidi

SAR – odnos med strukturo in delovanjem

- 1,4 – substitucija obroča
- R⁴ – nesubstituiran
- R¹ – monosubstituiran

Sulfonamidi

Spremembe R¹

- Vezava na proteine - razpolovni čas: bolj lipoflni substituenti **povečujejo** vezavo na plazemski albumin
- FK lastnosti!

Sulfonamidi

Spremembe R¹

Biološki učinek je odvisen od R:

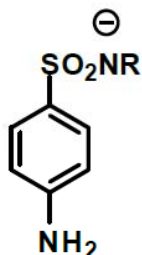
- vpliva na topnost v različnih okoljih-
porazdelitveni koeficient
- Bolj lipofilna spojina → v večji meri veže na plazemske beljakovine → počasnejše izločanje → daljši učinek → daljši biološki razpolovni čas
- biološki razpolovni čas KRATEK: SA primerni za zdravljenje infekcij urinarnega trakta, neprimerni za zdravljenje sistemskih infekcij

Sulfonamidi

Delovanje je funkcija pKa!

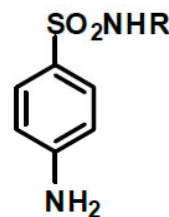
- elektronski vpliv skupine R na SO_2NR^2 :
- **R = elektron akceptorska:** → SA močnejša ksl. (↓ pKa)
- **R = elektron donorska:** → SA šibkejša ksl. (↑ pKa)

• pKa?



Aktivna oblika

Ne prehaja bioloških membran



Neaktivna oblika

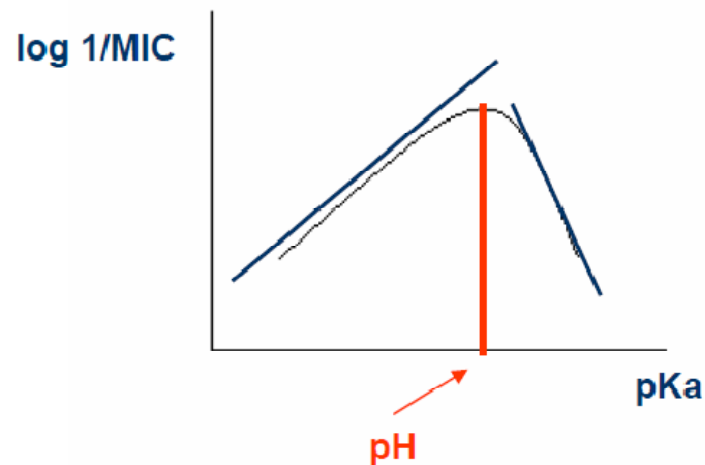
Prehaja biološke membrane

Biološki učinek je funkcija pKa vrednosti!

$$\text{BU} = f(\text{pK}_a)$$

Sulfonamidi

Delovanje je funkcija pKa – QSAR model



minimalna inhibitorna koncentracija (MIC)

- Biološki učinek in čas delovanja sta pogojena z α (stopnja disociacije) in **lipofilnostjo**

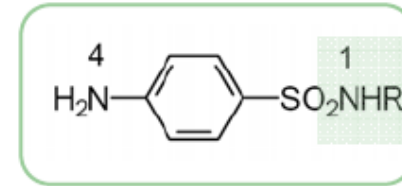
stopnja disociacije α

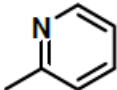
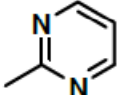
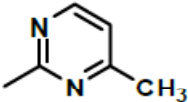
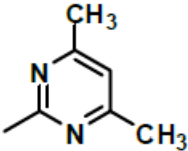
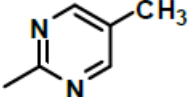
$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pKa}}}$$

- α mora biti med **0 in 1**
- optimalno $\alpha = 1/2$
→ **pKa=pH(7.4)** →
R mora biti takšen, da pKa vrednost SA čim bližje 7.4

Sulfonamidi

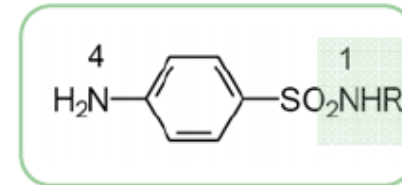
- Predstavnik



Ime /SULFA/	R	pKa	$\tau_{1/2}$
SULFANILAMID	- H	10.2	10
-ACETAMID	- COCH ₃	8	5.4
-PIRIDIN		8.4	9-10
-DIAZIN		6.4	8-16
-MERAZIN		6.95	24
-METAZIN		7.4	8
-METILDIAZIN		6.8	40

Sulfonamidi

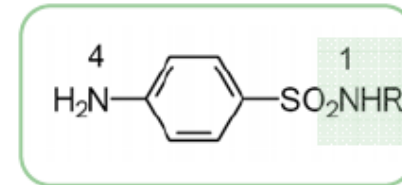
- Predstavnik



Ime /SULFA/	R	pKa	$\tau_{1/2}$
-METOKSIPIRAZIN		6.8	65
-TIAZOL		7.2	4
-METIAZOL		5.5	2-3
-METOKSAZOL		5.7	11
-IZOKSAZOL		5	7

Sulfonamidi

- Predstavnik

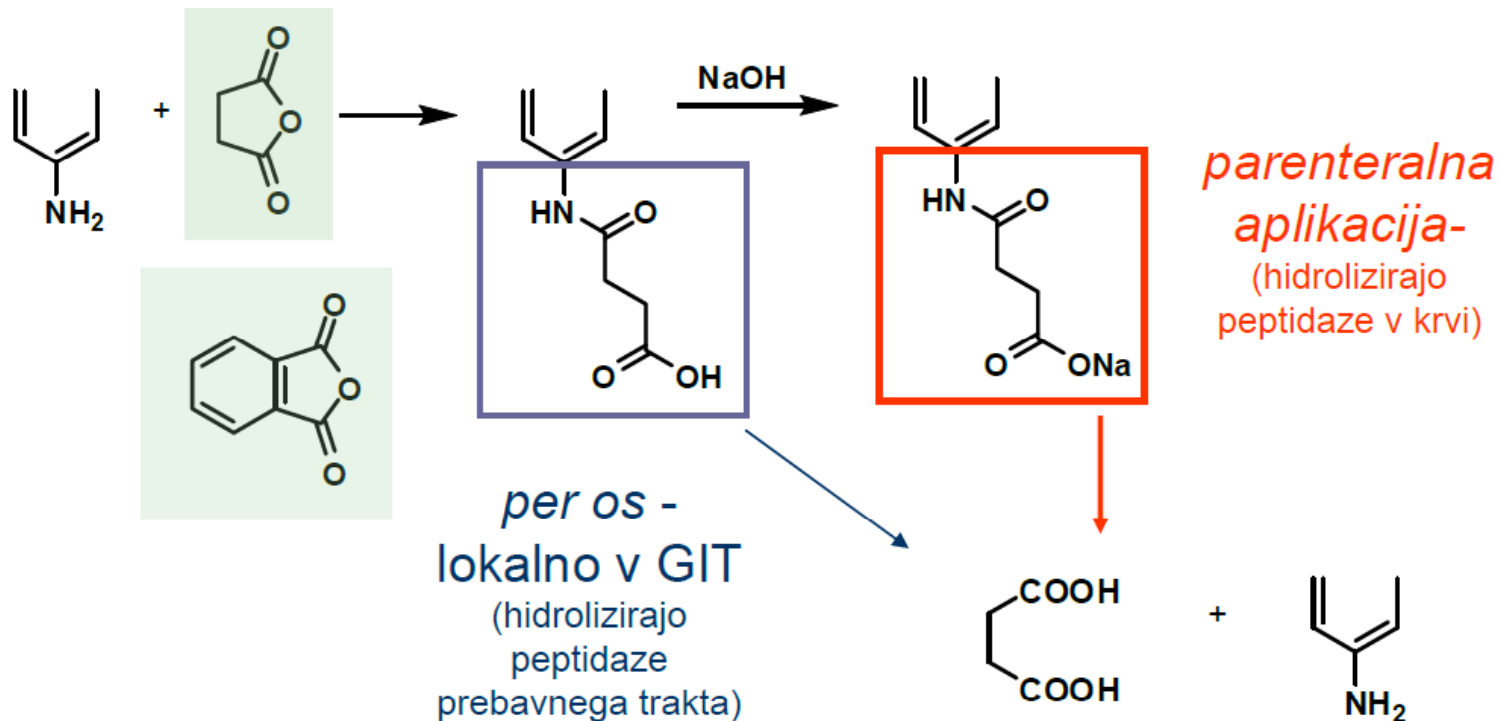


Ime /SULFA/	R	pKa	$\tau_{1/2}$
-MOKSOL		7.4	12
-FENAZOL		6.1	10
- METOKSIPIRAZOL		6.2	53-81

Sulfonamidi

Spremembe R⁴

- Karboksilni derivati, predzdravila – vpliv na topnost



Sulfonamidi

Spremembe R⁴

- Karboksilni derivati, predzdravila – izogibanje grenkemu okusu

Sulfonamidi

Metabolizem

- Acetiliranje – kristaluriija!



Ukrepi

- Uživanje večje količine tekočine
- Kombinacija treh SA
- Zagotovimo bazičnost urina (Na-bikarbonat)

Sulfonamidi

V RS registrirani

- Sulfafurazol – Sulfasol[®] 4% kapljice za oko
- Sulfametoksazol/trimetoprim - Primotren[®]

Klinična uporaba

- Uroinfekti
- GIT infekcije
- Očesne infekcije/infekcije ostalih sluznic
- Pljučnice (zdravljenje pljučnice povzročene s *Pneumocytis carinii*), kronični bronhitis
- Načeloma dobra BU, visoka vezava na proteine plazme

Trimetoprim

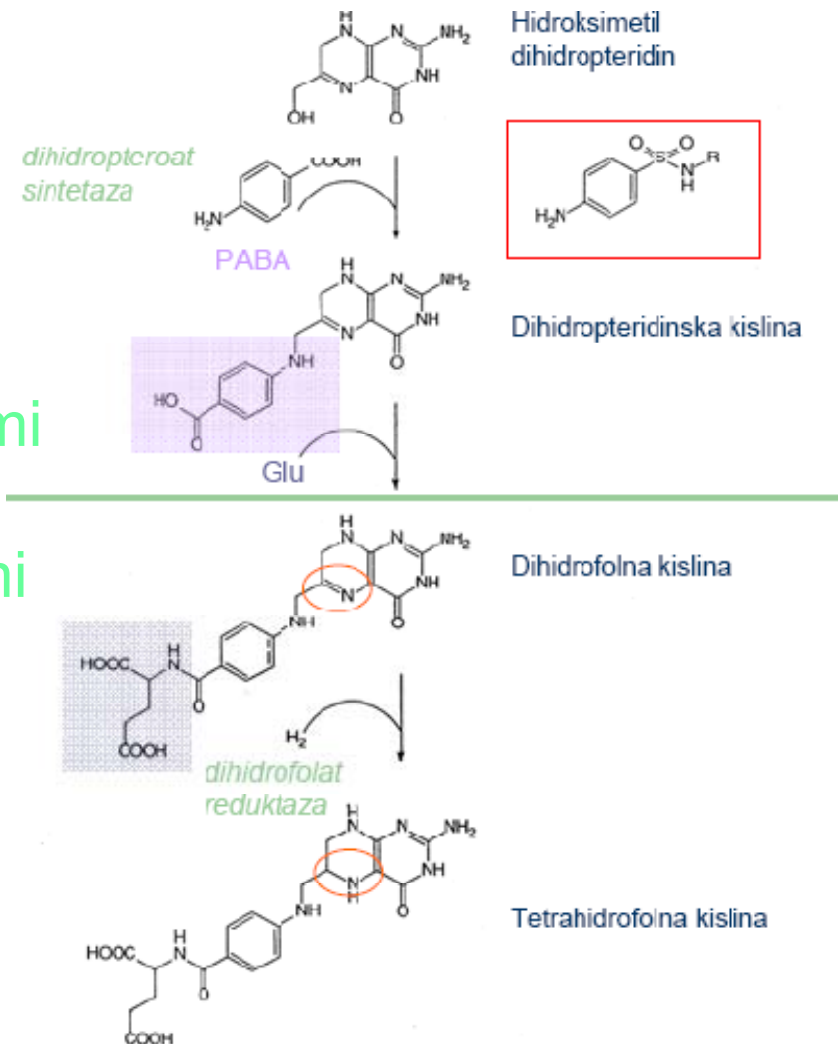
- Kompetitivni antagonist dihidrofolat reduktaze
- afiniteta 2,4-diaminopirimidinov do bakterijske DHFR je 1000-10000 krat večja kot do sesalske DHFR
- Timinska smrt
- Razmeroma selektivno toksičen
- Souporaba s sulfametoksazolom (primotren)

mikroorganizmi

mikroorganizmi

+

človek



Sinergizem

trimetoprim/sulfametoksazol

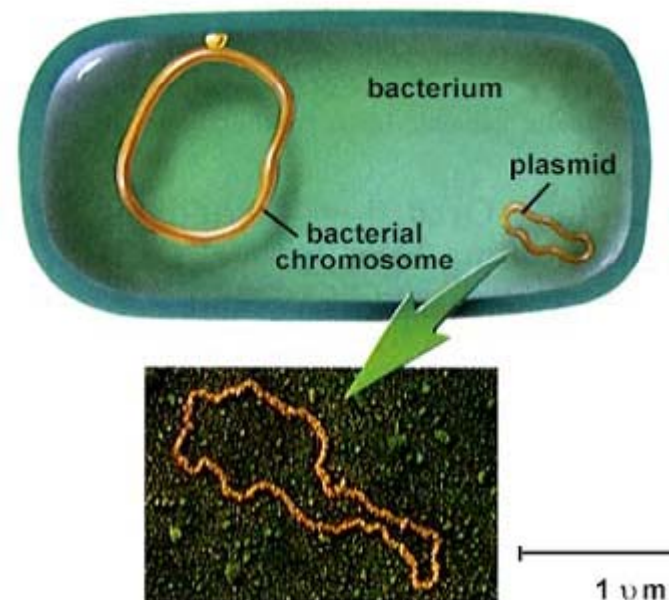
- Kompetitivni antagonist dihidrofolat reduktaze + inhibitor dihidropteroat sintaze?
- Sinergizem: zaviranje iste kaskade reakcij na dveh različnih tarčah!
- **Baktericidna kombinacija!**
- Osnova za skupno uporabo? $t_{1/2} = 8-10h$
- Terapevtsko razmerje 1/20
- Razmerje v farmacevtski obliki 1/5 (80 mg trimetoprima, 400 mg sulfametoksazola v tabletah)

Inhibicija transkripcije, replikacije, zvijanja DNA

- Kinoloni, fluorokinoloni

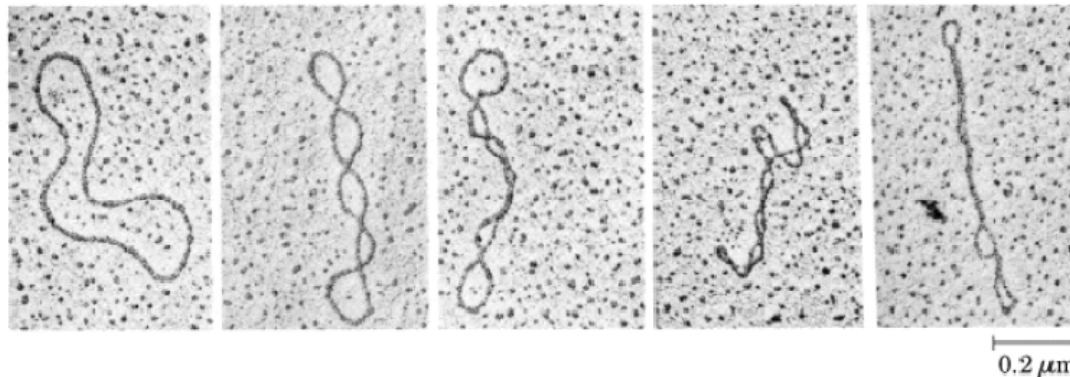
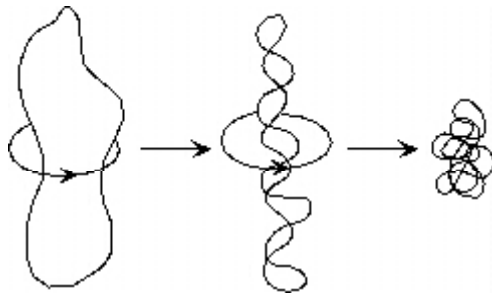
Bakterijska DNA

- Bakterijska celica ne vsebuje jedra
- Ena sama dvovijačna krožna DNA
- Tipična celica *E. coli* je velika $1\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$
- dolžina kromosoma *E. coli* je $1700\mu\text{m}$
- Dolžina razvite DNA molekule bi pri večini bakterij 1000-krat presegala dolžino celice!



Bakterijska DNA

- “Supercoiled DNA”
- DNA ni linearno položena v celico, ampak je močno negativno (levo) zvita

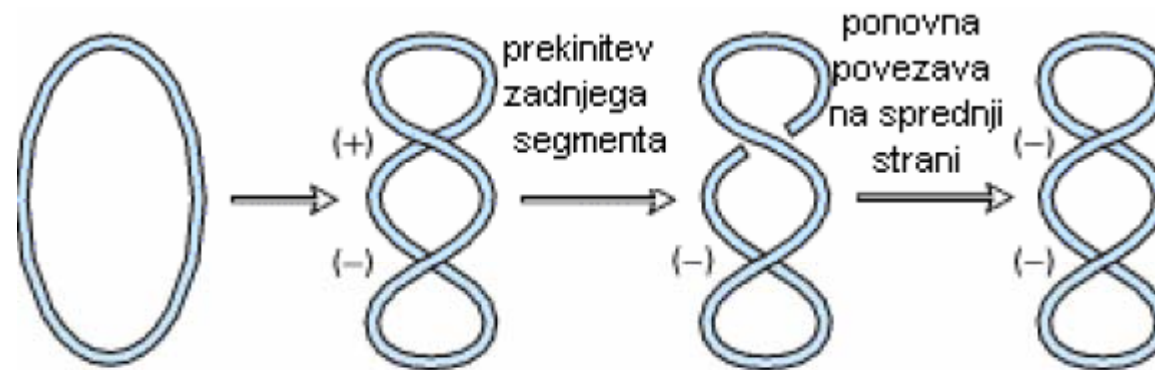


Topoizomeraze

- Encimi, ki spreminjajo topološka stanja DNA
- Prehod med različnimi topoizomeri molekule DNA je možen le s cepitvijo ene ali obeh verig dvovijačne DNA in kasnejšo povezavo cepljenih verig.
- **TOPOIZOMERAZE TIP I:** odvijajo supernavito DNA, tvorijo energetsko ugodnejšo, relaksirano obliko DNA (cepijo le eno verigo dvovijačne DNA.)
- **TOPOIZOMERAZE TIP II:** zavijajo molekulo DNA, tvorijo negativni supernavoj (cepijo obe verigi dvojne vijačnice hkrati)
- Bakterije vsebujejo dva različna tipa IIa topoizomeraz: **DNA girazo in topoizomerazo IV**

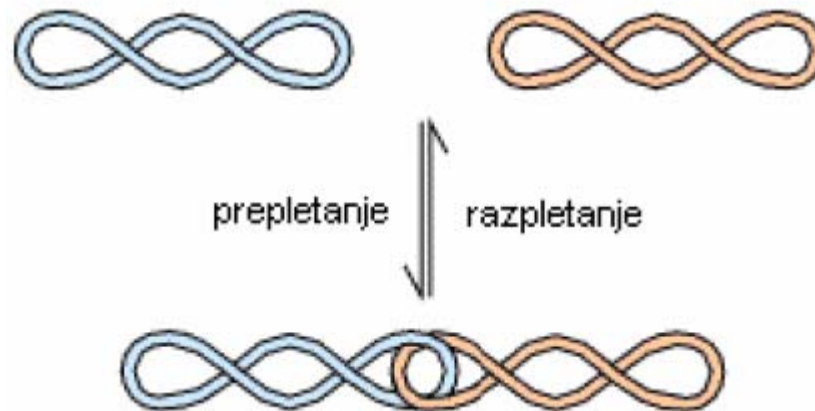
Bakterijska DNA giraza

- Bakterijska DNA giraza je encim, ki uvaja dodatne negativne zavoje v krožno molekulo DNA z uporabo sproščene energije ob hidrolizi ATP



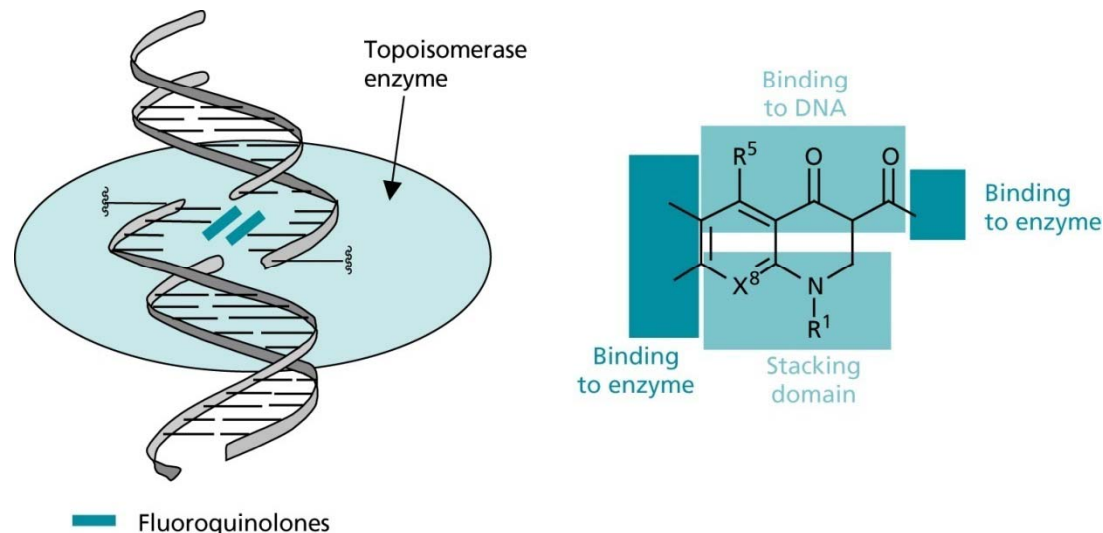
Bakterijska topoisomeraza IV

- Funkcije topoisomeraze IV še ne razumemo dobro.
- Znano je, da je odgovorna za razpletanje hčerinskih DNA verig na koncu podvojitve kromosoma.



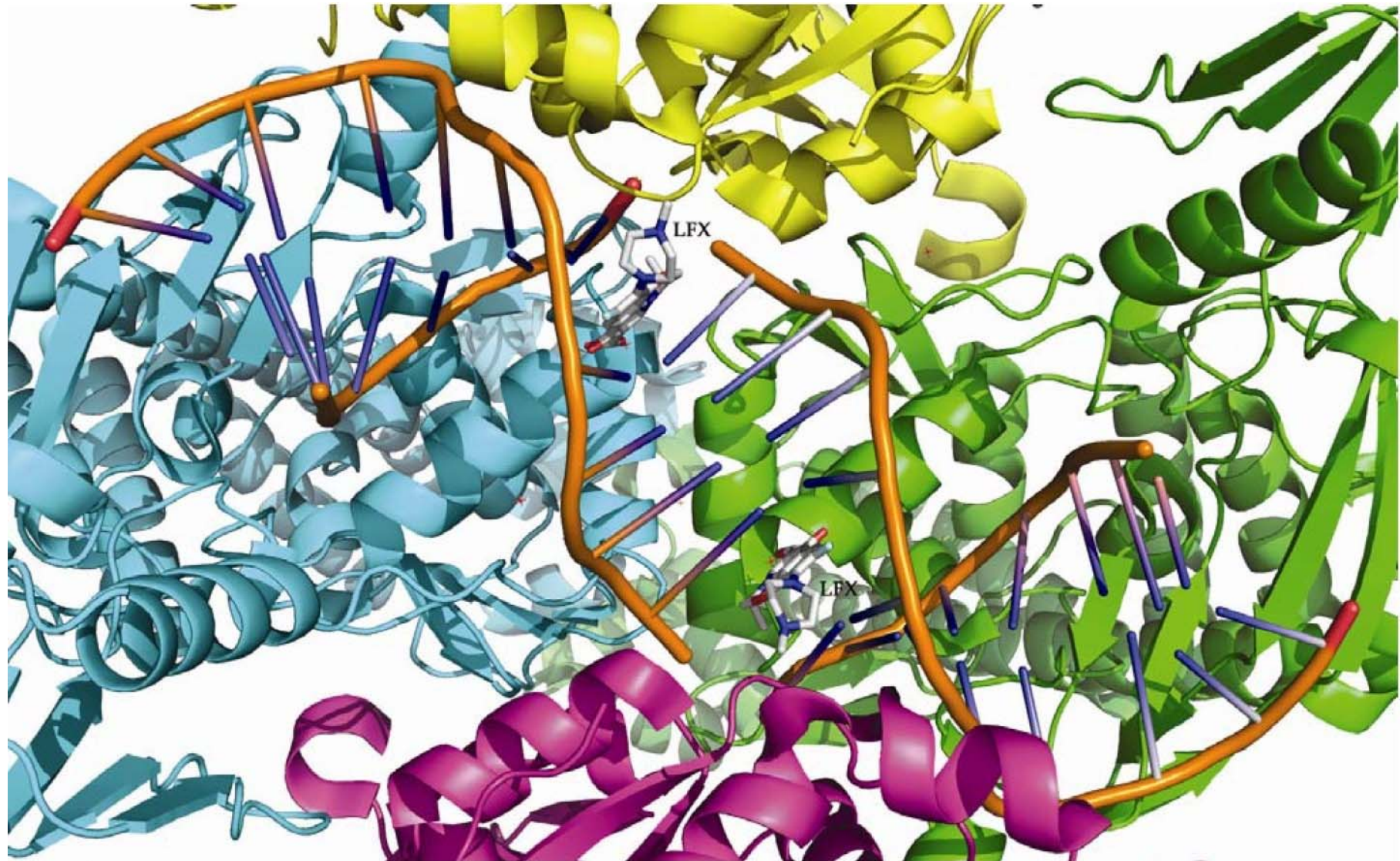
Mehanizem delovanja kinolonov

- Vezava na DNA girazo in topoizomerozo IV
- Tvori se kompleks: 2 x kinolon-giraza(topoizomeroza)-DNA

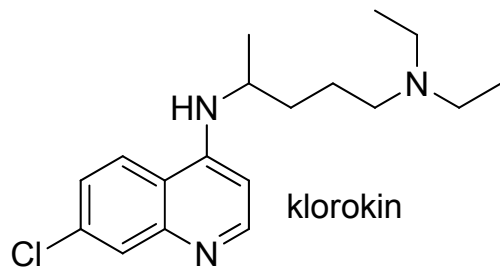


- Zaviranje zavijanja/odvijanja DNA - replikacija in transkripcija sta onemogočeni
- Vrzeli v DNA verigah inducirajo sintezo encimov, ki popravljajo DNA (SOS response) - nekoordinirano popravljanje vodi v ireverzibilne poškodbe DNA in v celično smrt – **baktericidno delovanje**

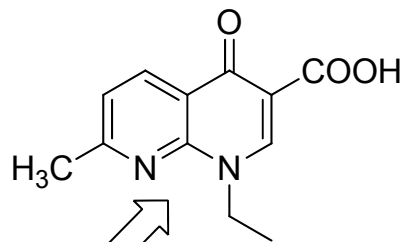
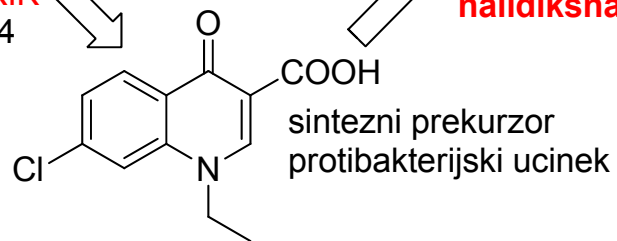
Mehanizem delovanja kinolonov



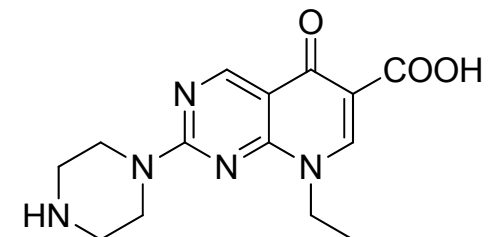
Kinoloni 1. generacije



ANTIMALARIK
Bayer, 1934



nalidiksna kislina



pipemidna kislina

Kinoloni 1. generacije

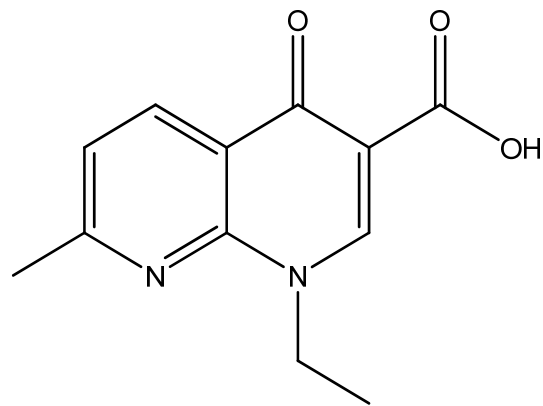
NALIDIKSNA KISLINA

- je derivat naftiridona (N na mestu 8)
- ozek spekter delovanja na po Gr(-) mikroorg mikroorg. (Enterobacteriace)
- Sicer uporabna per os, kratka razpolovna doba (1.5 h),
- Izloča prek ledvic, slabo prehaja v tkiva
- Zdravljenje infekcij urinarnega trakta

Kinoloni 2. generacije

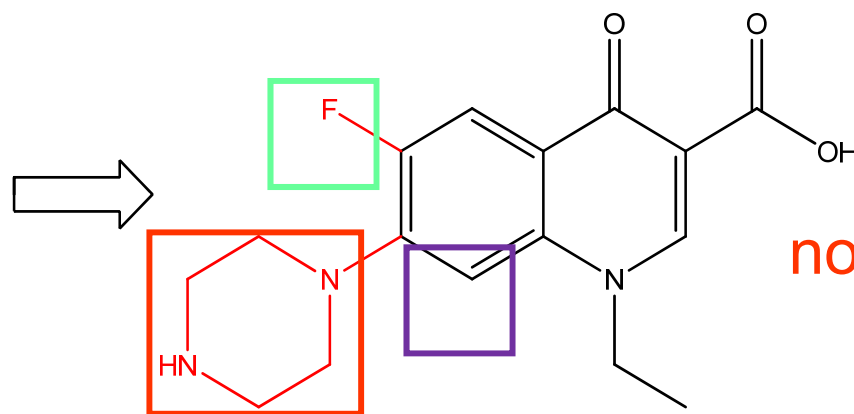
- razširjena po G-aktivnost
- daljša razpolovna doba
- za sistemsko uporabo
- Ne zoper *S. aureus* in *S. pneumoniae*

- Druga generacija - **fluorokinoloni**

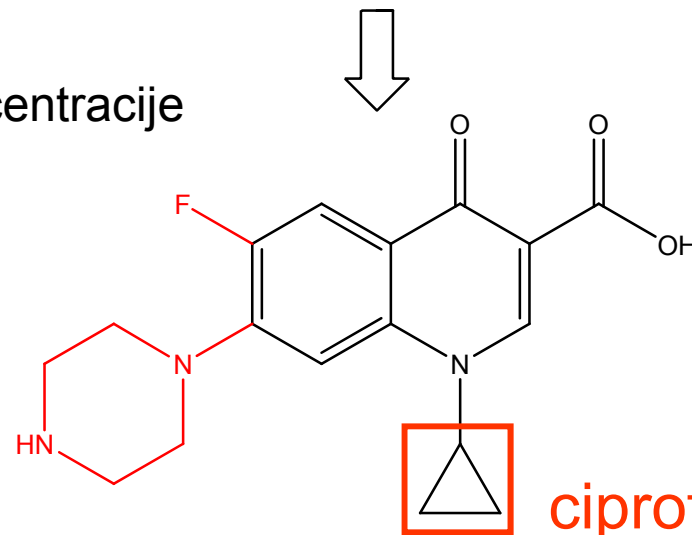


nalidiksna kislina

Glavni problem - nizke plazemske koncentracije



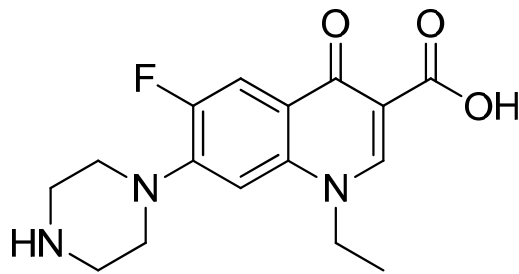
norfloksacin



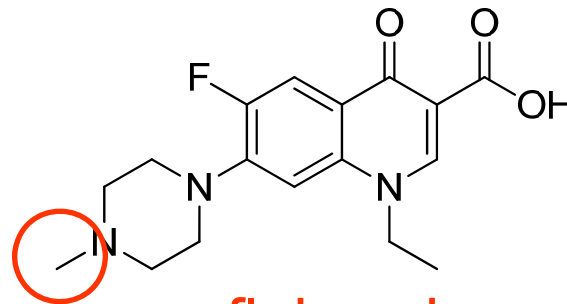
ciprofloksacin

Kinoloni 2. generacije

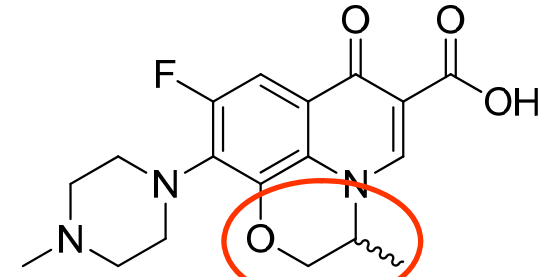
- Druga generacija - **fluorokinoloni**



norfloksacin



pefloksacin



ofloksacin



Kinoloni 2. generacije

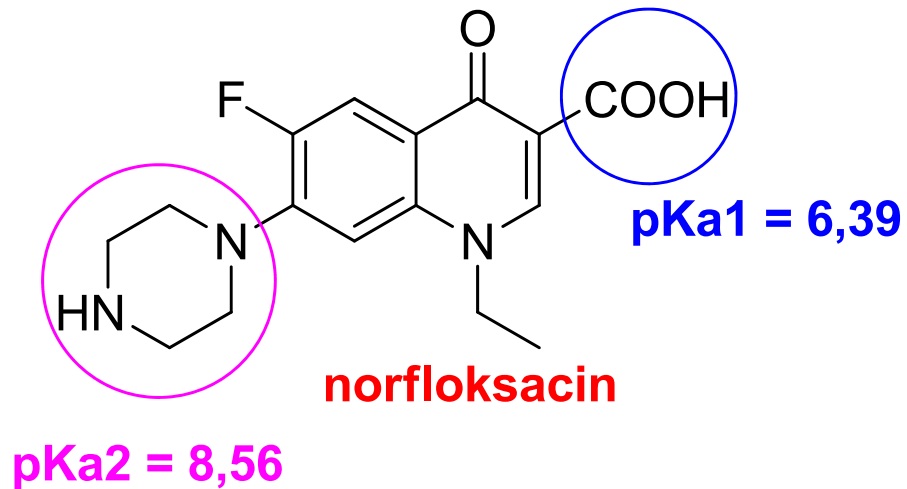
- Druga generacija – fluorokinoloni

ime	T 1/2	učinek
norfloksacin	3-4h	++
ciprofloksacin	3-4h	+++
pefloksacin	11h	+
ofloksacin	6h	+++
levofloksacin	6h	++++

- Razmeroma omejen spekter na G-, manj na G+
- Enterobacteriaceae, atipični patogeni, *Pseudom. aeruginosa* (le ciprofloksacin)
- Večja serumska, intracelularna konc.
- KomPLICIRANE infekcije urinarnega trakta, gastroenteritisi z diarejo, prostatitis, spolno prenosljive bolezni

Kinoloni 2. generacije

- Norfloksacin – podoben aminokislinam



- Pri pH = 7,4 – ion dvojček!
- Dobra per os absorpcija

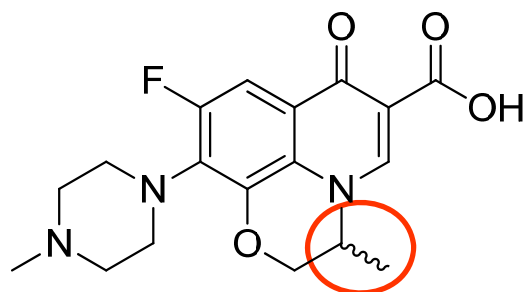
Superkinoloni

Kako pripraviti superkinolone?

- Obdržati učinek zoper G-!
- Izboljšati učinek zoper G+! (3. generacija)
- Izboljšati učinek zoper anaerobe! (4. generacija)
- Podaljšati $t_{1/2}$!

Kinoloni 3. generacije

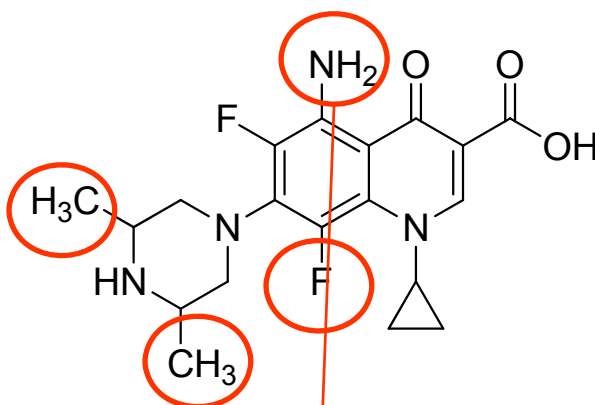
- Razširitev spektra delovanja (80')



ofloksacin

levofloksacin

Ofloksacin je racemat –
levofloksacin je S-
enantiomer

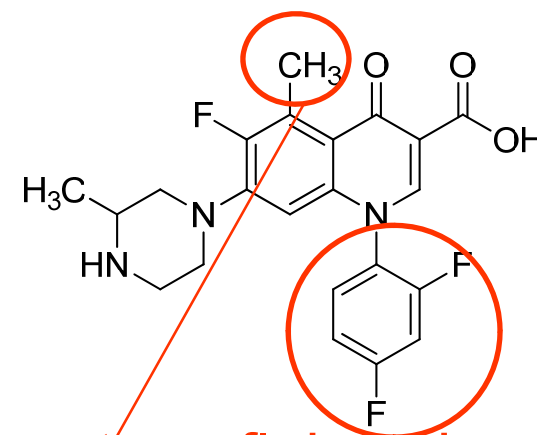


sparfloksacin

BU = 90%, $t_{1/2}$ = 18,7h

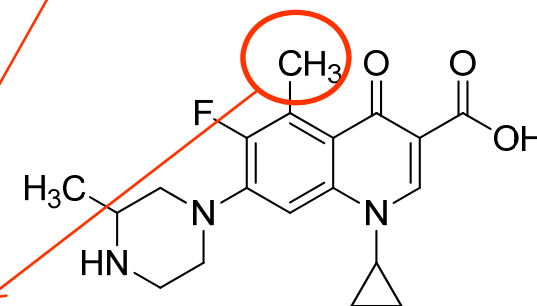
Ohranitev G- učinka

Razširitev G+ učinka



temafloksacin

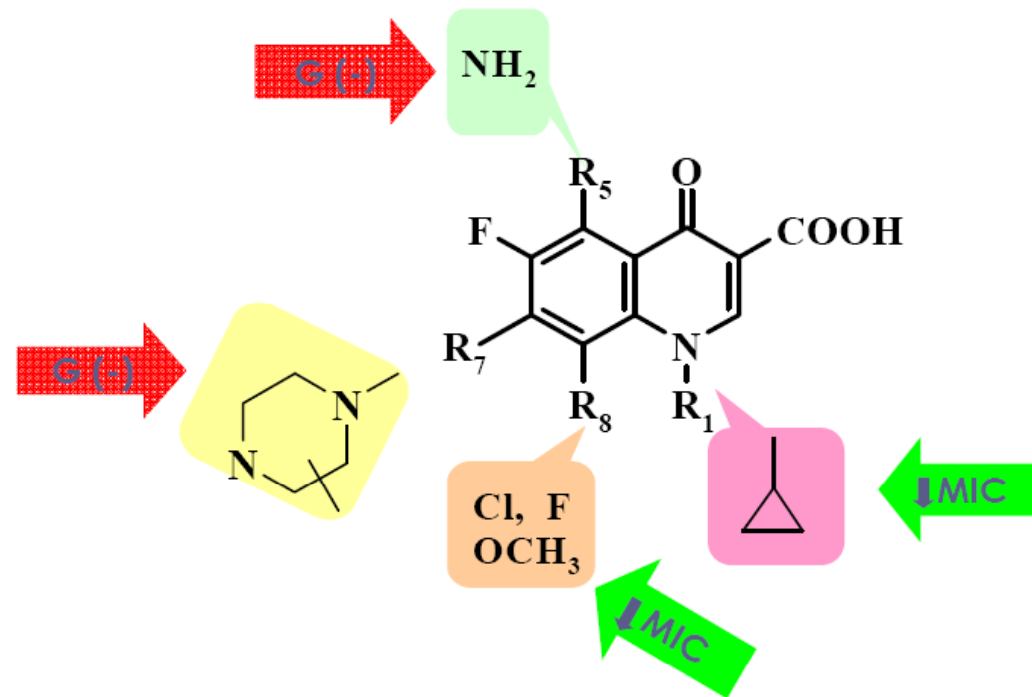
BU > 90%, $t_{1/2}$ = 7-8h



BU ~ 70%, **grepafloksacin**

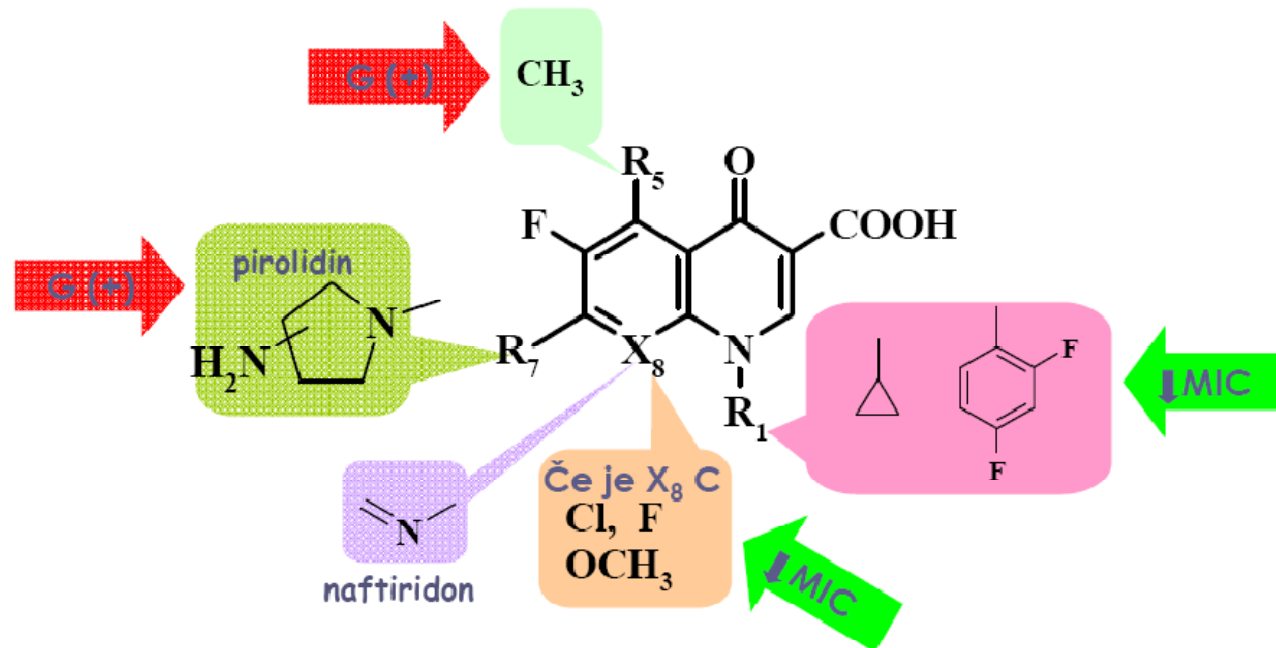
Kinoloni 3. generacije

- SAR – ohranitev G-, razširitev na G+, izboljšanje FK lastnosti



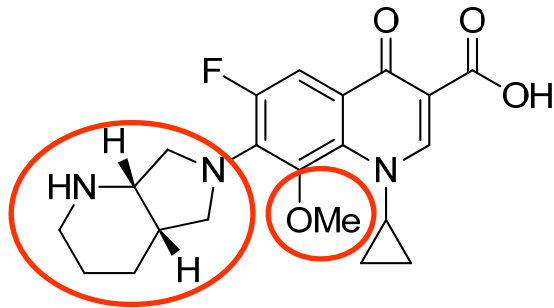
Kinoloni 3. in 4. generacije

- SAR - razširitev na G⁺, anaerobe



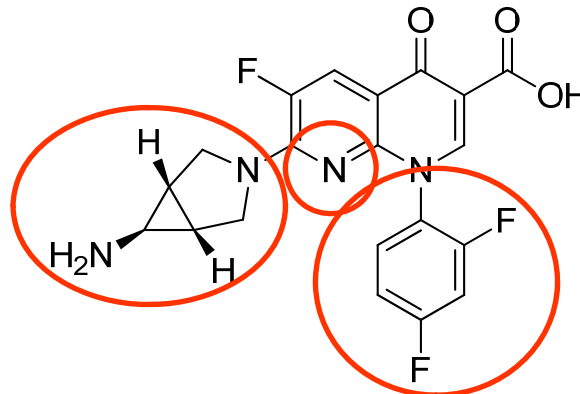
Kinoloni 4. generacije

- Razširitev spektra delovanja (okoli 1990)



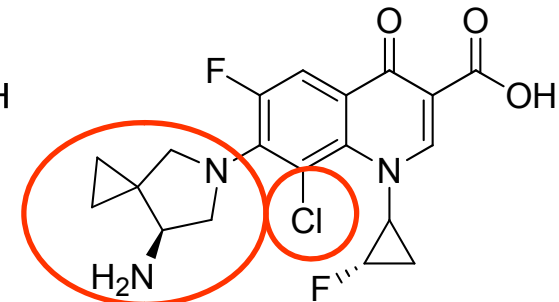
moksifloksacin

BU = 86%, $t_{1/2}$ = 12,1h



trovafloksacin

BU = 88%, $t_{1/2}$ = 11h

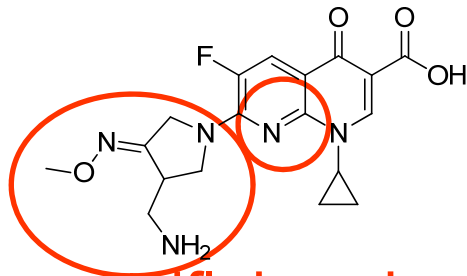


sitafloksacin

Intraabdominalne infekcije - *Enterobacteriaceae* (atipični patogeni, MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) streptokoki, anaerobi

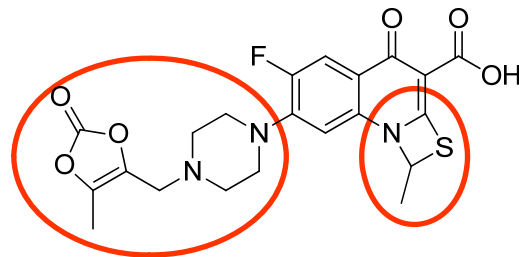
Kinoloni 4. generacije

- **novejši**



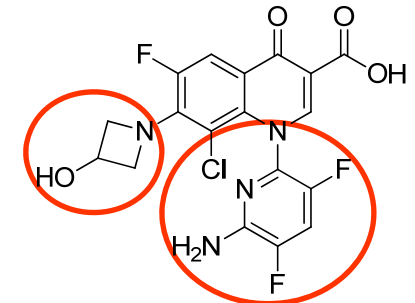
gemifloksacin

BU = 71%, $t_{1/2}$ = ?



prulifloksacin

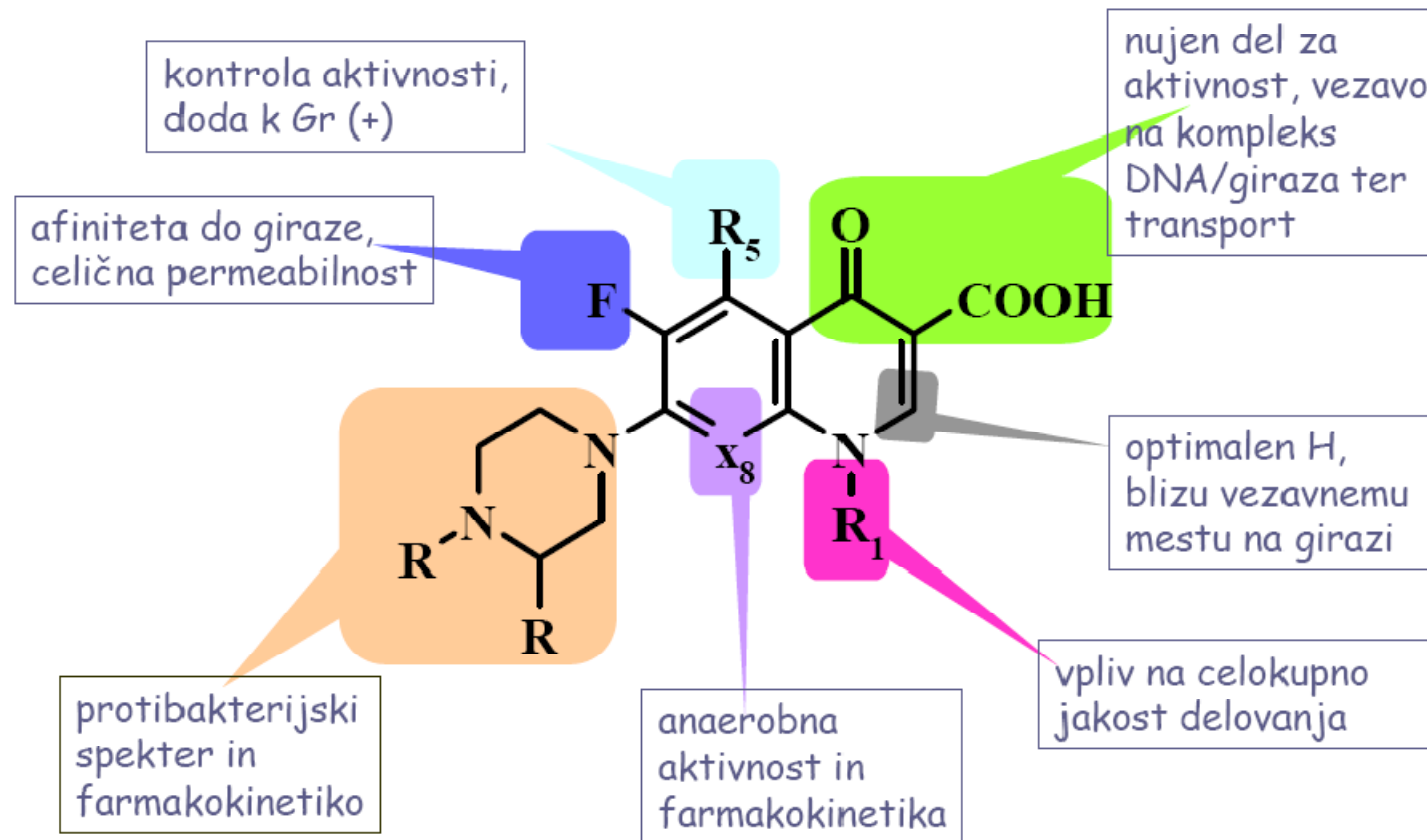
BU = ?, $t_{1/2}$ ~ 8 h



delafloksacin

V razvoju, II faza KT

Celokupni SAR



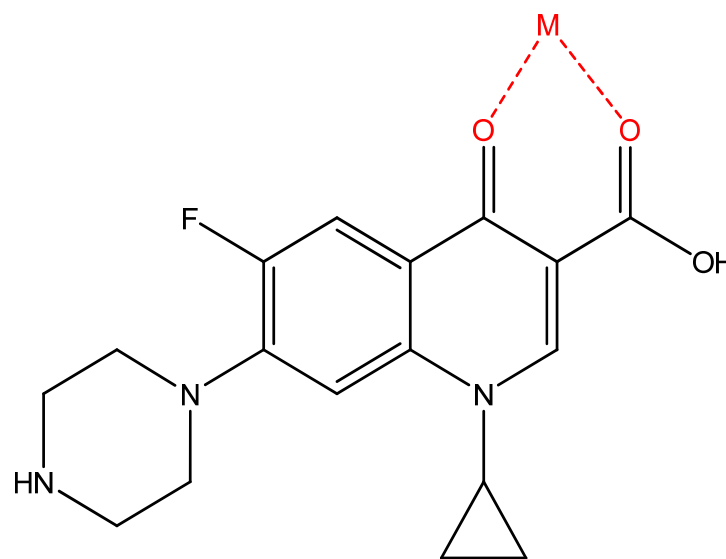
Kinoloni 3. in 4. generacije

Umik s trga

- temafloksacin (1992, Omniflox, Abbott) – hemoliza, odpoved ledvic
- trovafloksacin (1999, Trovan, Pfizer) – odpovedi jeter
- grepafloksacin – motnje srčnega ritma
- sparfloksacin – fototoksičnost , motnje srčnega ritma

Kinoloni – kompleksi s kationi

- Kinoloni tvorijo komplekse z dvo- (Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+}) in trovalentnimi kovinskimi ioni (Al^{3+})
- slabo topni, se slabo absorbirajo
- Inkompatibilnost z različnimi ekscipienti, antacidi



Kinoloni

Generacija	Glavne lastnosti
1.	Nizka serumska, tkivna konc, učinek na le G-
2.	Višje serumske in tkivne konc., zdravljenje sistemskih infekcij, zoper G-, tudi <i>P. Aeruginosa</i> , <i>S. pneumoniae</i>
3.	Močno izboljšane FK lastnosti – enkrat dnevno doziranje, <i>P. Aeruginosa</i> , <i>S. pneumoniae</i>
4.	Tudi zoper anaerobe

Selektivna toksičnost? – učinek na mitohondrijsko DNA!

Kinoloni - rezistenca

- Uporaba v veterini – pospeševalci rasti

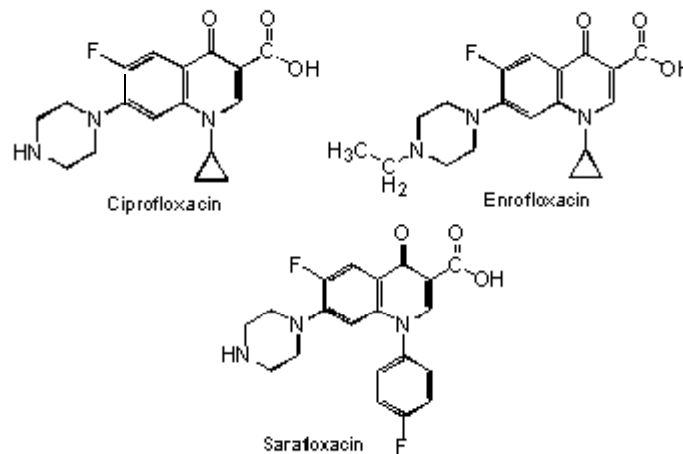
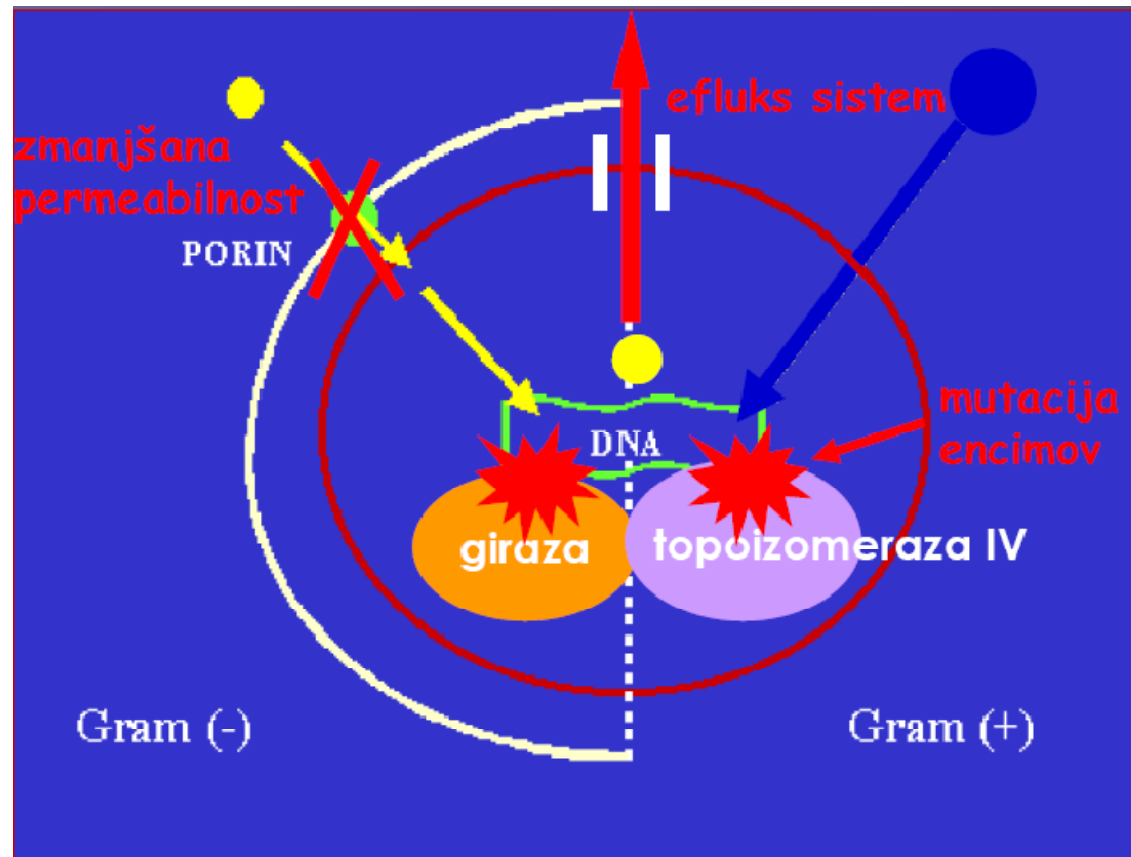


Figure 7. Structures of the fluoroquinolones ciprofloxacin, enrofloxacin, and sarafloxacin

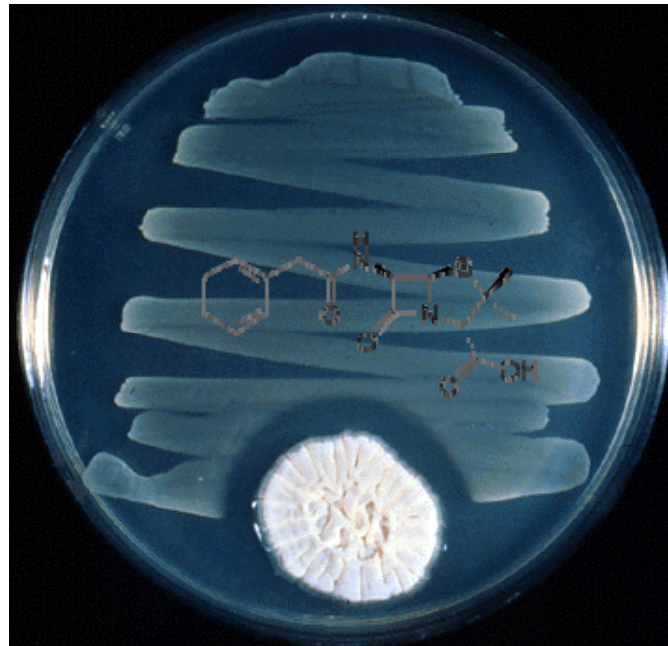
Kinoloni - rezistenca



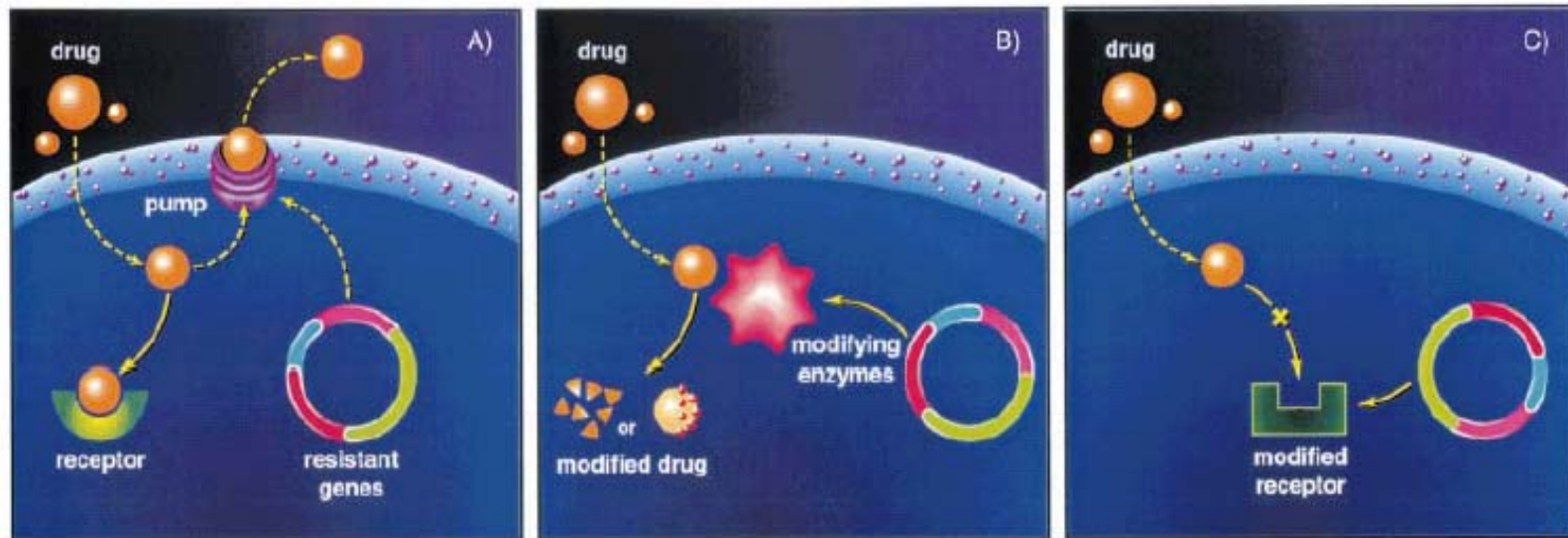
Antibiotiki

Odkritje penicilina

- Alexandra Fleminga I. 1928: glivice rodu *Penicillium* izločajo snovi, ki zavirajo rast stafilokokov
- Ali smo zmagali?
- **Scenarij za prihodnost? Rezistenca!**

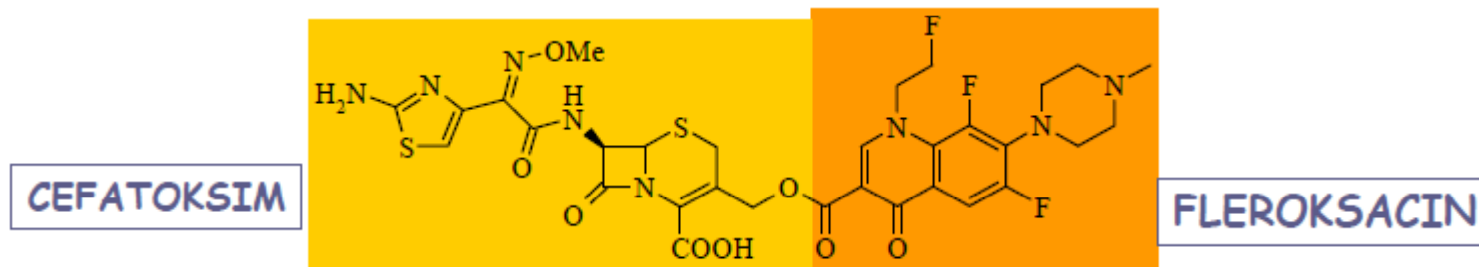


Bakterijska rezistenca



Boj z rezistenco

- Vedno novi antibiotiki
- “Šparanje” antibiotikov
- Kolobarjenje
- Kombinacije antibiotikov
- Hibridi antibiotikov – uspešno zaviranje rezistentnih sevov

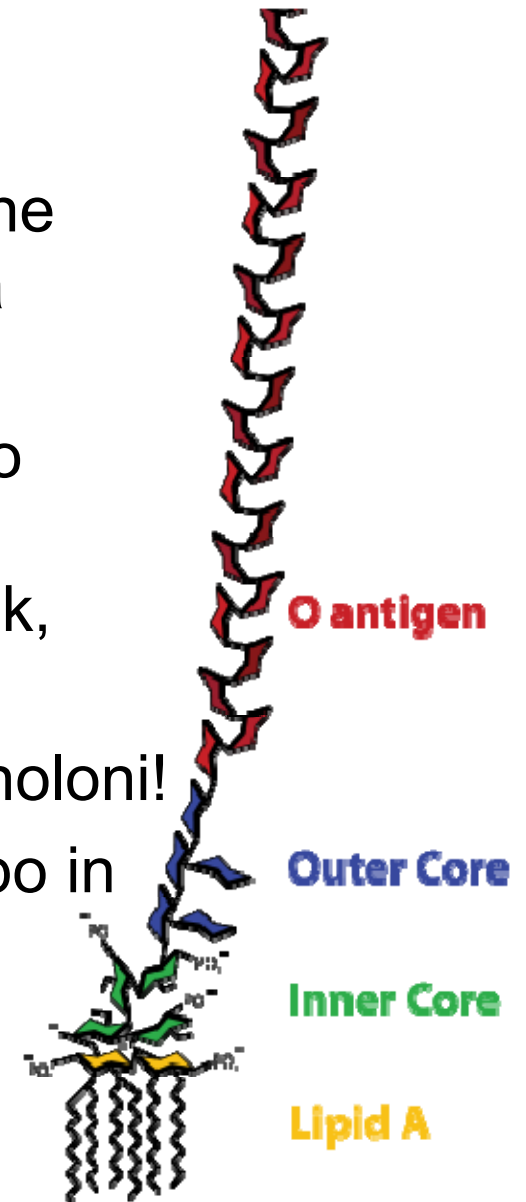


Bakterije si ne podajajo le rezistence...

- *E. Coli*, seva O104:H4 in O157:H7
- Izbruh epidemije v Evropi (Nemčija, ZDA, Švedska...)
- <http://slowwwenia.ena.com/Novice/Druzba/Za-epidemijo-E.Coli-krivi-nemski-kalcki.html>
- <http://www.rtv slo.si/zdravje/nemcija-uradni-konec-epidemije-okuzb-z-e-coli/262805>

Bakterije si ne podajajo le rezistence...

- Načeloma nenevarna bakterija, del normalne črevesne flore – seva sta “pridobila” gen za Shiga toksin
- Shiga toksin – lipopolisaharid (od tod O); po odmrtnju bakterij – liza, v plazmi povzročajo vročino, diarejo, tudi fatalni endotoksični šok, hemolitični-uremični sindrom
- E. Coli - G- bakterija; logični pomislek – kinoloni!
- Problem! Antibiotiki lahko poslabšajo okužbo in smrtnost!



Literatura predavanj

G. L. Patrick: An introduction to medicinal chemistry, Oxford University press, 4. izdaja:

- 19. poglavje

Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6. izdaja:

- 38. poglavje