



UNIVERSITÀ
POLITECNICA
DELLE MARCHE

E. coli 0157

Tesi di laurea in
Microbiologia Generale

**COMBINAZIONI DI FARMACI:
UNA STRATEGIA PER PROLUNGARE LA VITA DEGLI
ANTIBIOTICI NEL 21° SECOLO**

**DRUG COMBINATIONS:
A STRATEGY TO EXTEND THE LIFE OF ANTIBIOTICS IN
THE 21° CENTURY**

Laureanda:
Maria LEO

Docente referente:
Prof. Francesca BIAVASCO



Il termine **antibiotico** deriva dal greco **anti-biosis** che, letteralmente, significa “**contro la vita**”. Si definisce antibiotico, infatti, una sostanza prodotta da batteri o funghi in grado di inibire la crescita di altri microrganismi.

DEVE ESSERE
MINIMAMENTE
VULNERABILE ALLO
SVILUPPO DELLA
RESISTENZA.

Deve raggiungere
concentrazioni inibitorie
della crescita
sufficientemente alte in
un breve periodo di
somministrazione.

Deve essere immune
alla variazione casuale
che si verifica durante la
replicazione del DNA
dei batteri patogeni.

Deve avere proprietà
fisico-chimiche che gli
permettano di accedere e
penetrare nei tessuti
dell'ospite infetto e negli
stessi patogeni batterici

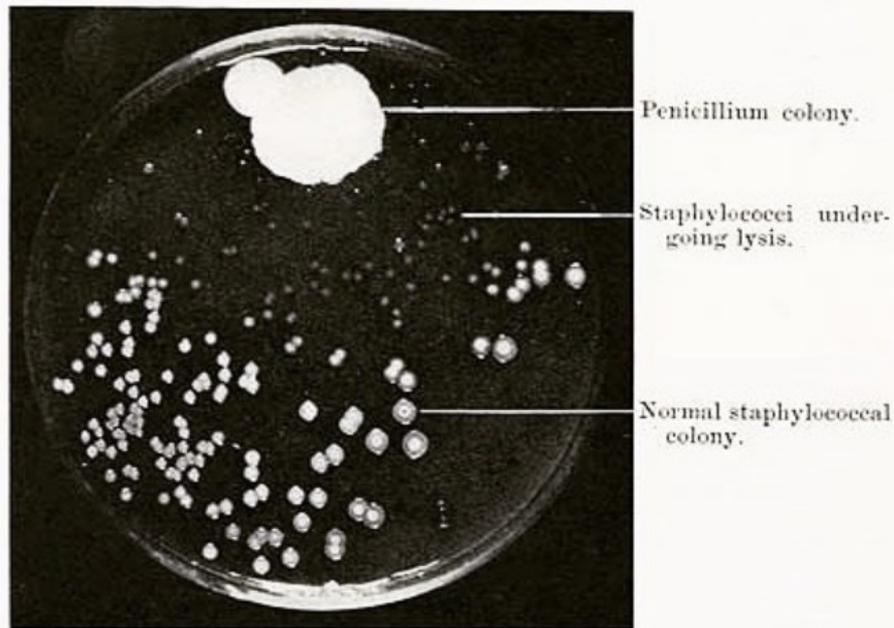
Non deve interferire
con il metabolismo
della cellula ospite.

1930 ➡ scoperta dei sulfamidici, i primi chemioterapici (composti di sintesi) ad ampia efficacia.
BERSAGLIO: singolo enzima metabolico essenziale, la DIIDROPTEROATO SINTASI.

1940 ➡ Scoperta di β -lattamici, aminoglicosidi e tetracicline, antibiotici naturali.
BERSAGLIO PENICILLINE: le proteine leganti la penicillina (PBPs), necessarie per la sintesi della parete cellulare.

BERSAGLIO TETRACICLINE e AMINOGLICOSIDI: il ribosoma batterico che consiste di circa 50 proteine e tre grandi RNA ribosomiali (rRNA) generalmente codificati da geni presenti in più copie sul cromosoma batterico.

BRITISH JOURNAL OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY, VOL. X, No. 3.



LA RESISTENZA MICROBICA E' EMERSA RAPIDAMENTE AGLI AGENTI DIRETTI CONTRO UN SINGOLO BERSAGLIO PROTEICO MENTRE GLI AGENTI DIRETTI CONTRO BERSAGLI MOLECOLARI MULTIPLI O CONTRO MECCANISMI O STRUTTURE MACROMOLECOLARI MULTISUBUNITA' HANNO IMPIEGATO MOLTO PIU' TEMPO A PERDERE EFFICACIA COME CONSEGUENZA DELLA RESISTENZA MICROBICA DOVUTA A MUTAZIONE GENETICA DEI BERSAGLI MOLECOLARI.

Fig. 1.—Photograph of a culture-plate showing the dissolution of staphylococcal colonies in the neighbourhood of a penicillium colony.

PROBLEMA: difficoltà nella progettazione e sintesi di un antibiotico «MULTITARGET» ➡ **SOLUZIONE:**
COMBINAZIONE DI COMPOSTI DISTINTI.

COMBINAZIONE DI COMPOSTI BIOATTIVI

ANTAGONISMO: l'attività dei singoli componenti è diminuita nella combinazione

IPERANTAGONISMO: concentrazione a cui i farmaci si sopprimono a vicenda. Vantaggioso per alcune coppie di farmaci in quanto porta alla soppressione dei ceppi resistenti, avvantaggiando selettivamente i ceppi sensibili → rimozione ceppi resistenti da una popolazione batterica

SINERGIA: l'effetto che si ottiene è maggiore della somma degli effetti dei due composti presi singolarmente

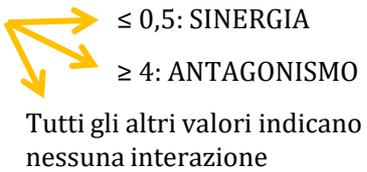
COMBINAZIONI CONGRUE: si basano su composti che hanno attività di inibizione della crescita microbica agendo su differenti bersagli molecolari

COMBINAZIONI SINCRETICHE: includono un componente che non ha un'attività antibiotica evidente

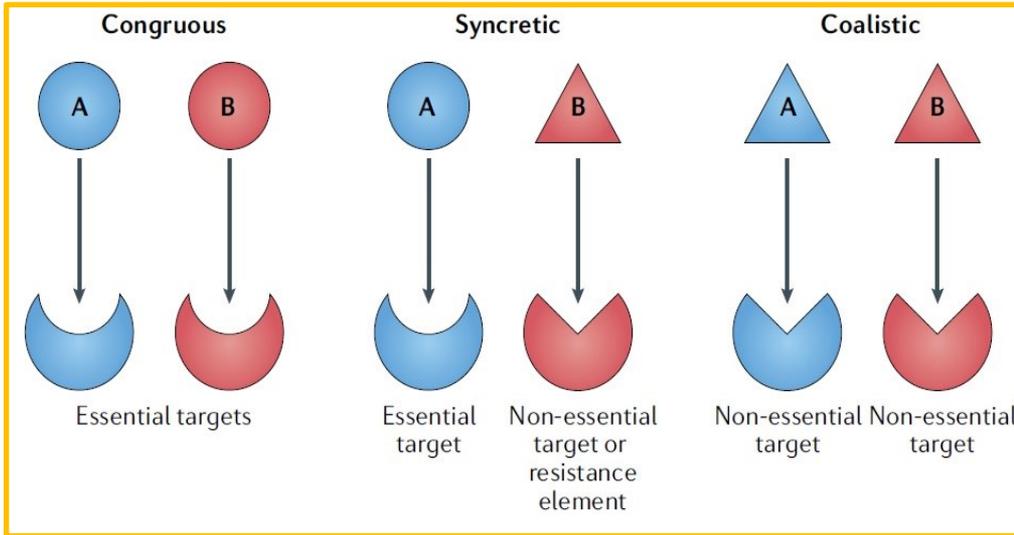
COMBINAZIONI COALISTICHE: si verificano tra composti che da soli non hanno attività antibiotica, ma che insieme sono attivi

La sinergia e l'antagonismo sono formalmente calcolati attraverso l'INDICE DI CONCENTRAZIONE INIBITORIA FRAZIONALE (FICI):

- CONCENTRAZIONE INIBITORIA FRAZIONARIA (FIC) → MIC del composto A in presenza di B divisa per la MIC di A.
- INDICE DI CONCENTRAZIONE INIBITORIA FRAZIONALE (FICI) → somma delle FIC dei composti A e B



VANTAGGIO: semplicità e velocità.
SVANTAGGIO: misura grezza della sinergia → non fornisce informazioni più dettagliate sulla dipendenza dal dosaggio.

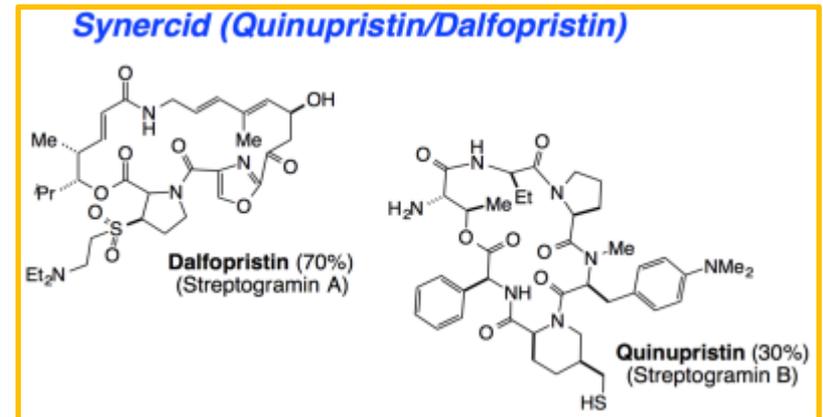


COMBINAZIONI CONGRUE DI ANTIBIOTICI

Si sono dimostrate storicamente efficaci:

- Combinazione di PENICILLINA con STREPTOMICINA → per INFEZIONI ENTEROCOCCICHE.
- Combinazione di RIFAMPICINA, ISONIAZIDE, PIRAZINAMIDE → per TRATTAMENTO TUBERCOLOSI

- CO-TRIMOXAZOLO (nomi commerciali: SEPTRA e BACTRIM)
- SYNERCID → combinazione sinergica di antibiotici streptograminici (QUINUPRISTIN e DALFOPRISTIN)



QUESTE COMBINAZIONI AUMENTANO L'EFFICACIA E SOPPRIMONO LA RESISTENZA, MA VI E' SCARSITA' DI ALTRE COMBINAZIONI A DOSE FISSA DI FARMACI ANTIBIOTICI IN QUANTO I SINGOLI AGENTI SONO PER LA MAGGIOR PARTE EFFICACI E UTILI DA SOLI E L'EFFICACIA DELLE COMBINAZIONI DEVE ESSERE SUPPORTATA DA STUDI CLINICI BEN PROGETTATI.

**MA CHI SPONSORIZZERA' TALI STUDI?
LA RISPOSTA E' UNA QUESTIONE POLITICA IMPORTANTE.**

COMBINAZIONI SINCRETICHE

I composti con poca o nessuna attività antibiotica ma che potenziano l'efficacia degli antibiotici sono chiamati ADIUVANTI ANTIBIOTICI o INIBITORI DI RESISTENZA

Adiuvanti di classe I: agiscono sul metabolismo o sulla fisiologia batterica

CLASSE Ia

CLASSE Ib

Adiuvanti di classe II: aumentano l'efficacia degli antibiotici alterando la biologia dell'ospite

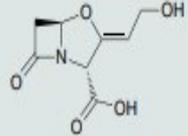
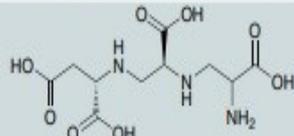
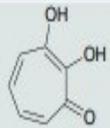
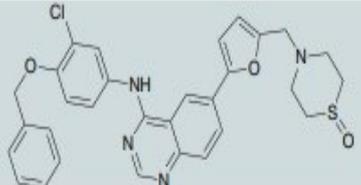
ADIUVANTI DI CLASSE Ia: composti che bloccano direttamente la resistenza, esemplificati dagli inibitori delle β -lattamasi.

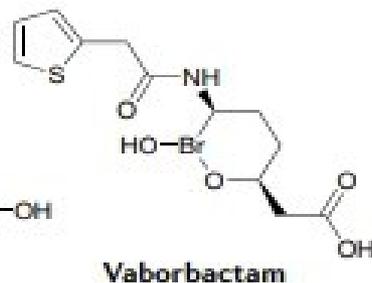
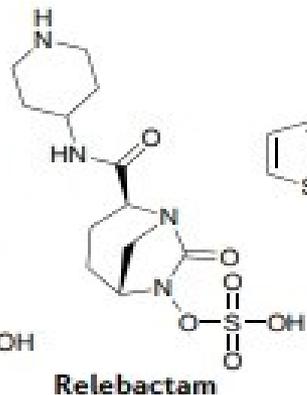
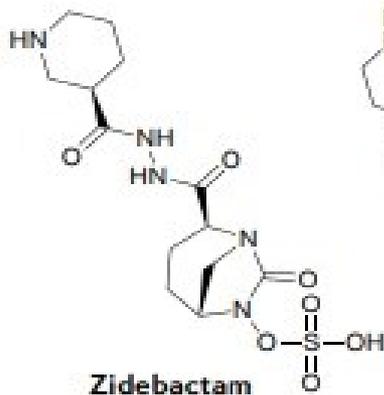
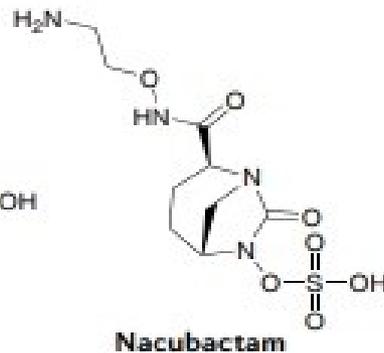
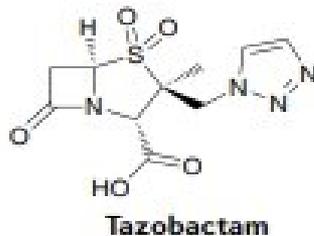
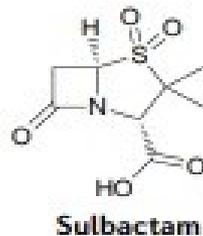
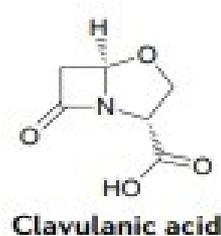
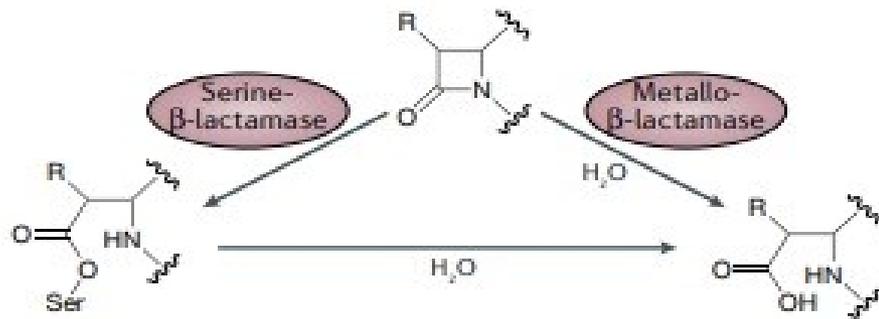
1980→ scoperta dell'inibitore della β -lattamasi, acido clavulanico, un composto β -lattamico con una debole attività antibiotica ma una potente inibizione delle serine β -lattamasi. ACIDO CLAVULANICO accoppiato con AMOXICILLINA→ AUGMENTIN: prima combinazione clinicamente sincretica ANTIBIOTICO- β -LATTAMASI INIBITORE.

2016→ FDA approva AVIBACTAM, un diazabicicloottano con potente inibizione di molte serina- β -lattamasi. Combinazione a dose fissa di AVIBACTAM+CEFTAZIDIME→ AVYCAZ

2017→ FDA approva VABORBACTAM, boronato ciclico con inibizione della serina- β -lattamasi. VABORBACTAM+MEROPENEM→ VABOMERE.

ECCEZIONALE SUCCESSO DEGLI ADIUVANTI DI CLASSE Ia CHE BLOCCANO L'ATTIVITA' DELLA SERINA- β -LATTAMASI.

Adjuvant	Structure	Mode of action	Refs
Clavulanic acid ^a		Serine- β -lactamase inhibitor	149
Aspergillomarasmine A		Metallo- β -lactamase inhibitor	151
7-Hydroxytropolone		Aminoglycoside adenylyltransferase inhibitor	61
6-Furanylquinazolines		Aminoglycoside adenylyltransferase (2'')-Ia inhibitor	15



Altri obiettivi per gli adiuvanti di classe Ia:

- Metallo-β-lattamasi
- Metiltransferasi del ribosoma → resistenza agli AMINOGLICOSIDI.
- Metiltransferasi delle grandi subunità del ribosoma come Erm e Cfr → resistenza a MACROLIDI e OXAZOLIDINONI.
- Inibitori di efflusso ad ampio spettro, in particolare della classe RND che predomina nei patogeni Gram-negativi.

LE COMBINAZIONI SINCRETICHE OFFRONO UN'ECCELLENTI OPPORTUNITA' PER POTENZIARE L' ATTIVITA' DELLE CLASSI DI ANTIBIOTICI GIA' ESISTENTI.

ADIUVANTI DI CLASSE Ib: composti che potenziano gli antibiotici attraverso meccanismi indiretti, sfruttando l'attività antimicrobica esistente inerente al componente antibiotico della combinazione.

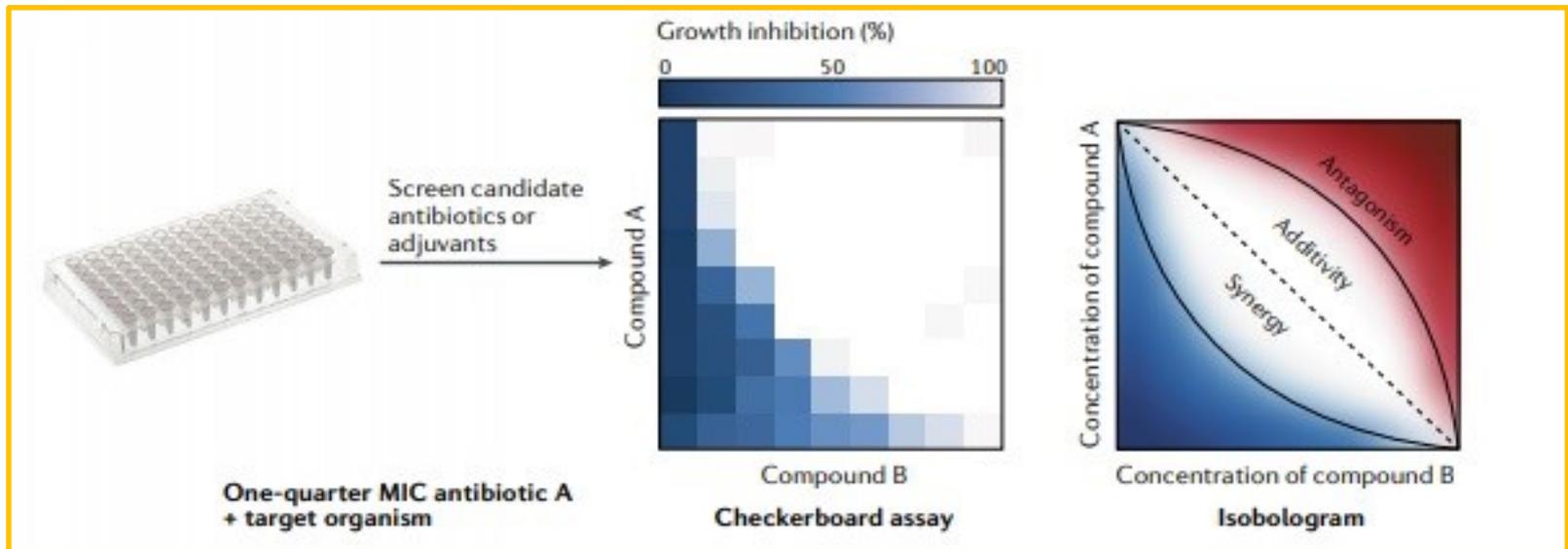


AUMENTA L'ATTIVITA' ANTIBIOTICA IDENTIFICANDO SINERGIE NON OVVIE NELLO SPAZIO GENICO NON ESSENZIALE.



In *E. coli*: uno screening di 15 diversi antibiotici a $\frac{1}{4}$ MIC contro la collezione KEIO, collezione di mutanti di delezione di geni non essenziali, ha identificato 1564 interazioni chimico-genetiche che migliorano l'attività antibiotica.

IDENTIFICAZIONE DI POTENZIATORI DI INIBIZIONE DELLA CRESCITA CELLULARE: agente patogeno direttamente esaminato contro librerie di composti non antibiotici in presenza di concentrazioni sub-MIC ($\frac{1}{4}$ MIC) di un antibiotico noto → COPPIE ANTIBIOTICO-ADIUVANTE NON OVVIE.

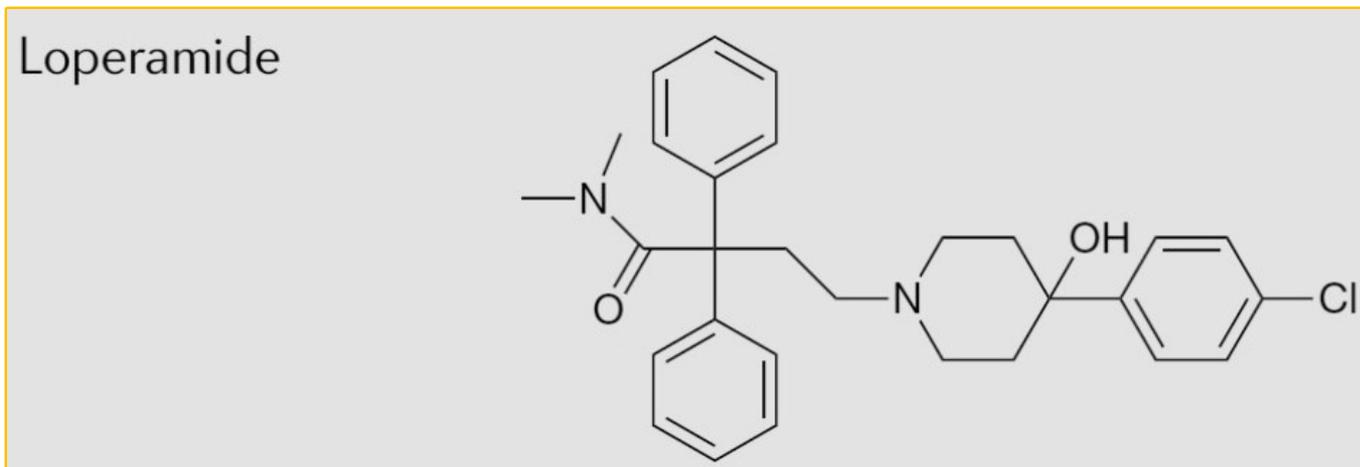


In *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*:



LOPERAMIDE (IMODIUM) potenzia gli ANTIBIOTICI TETRACICLINA nei batteri GRAM-NEGATIVI in vitro e in un modello animale in vivo di infezione da SALMONELLA ENTERICA.

MODALITA' D'AZIONE: interruzione della forza motrice protonica associata alla membrana cellulare → maggior accumulo intracellulare dell'antibiotico → maggiore attività di inibizione del ribosoma batterico.



GLI ADIUVANTI DI CLASSE Ib NON SONO ANCORA IN SVILUPPO CLINICO, POTREBBERO ESSERE MIRATI AGLI ANTIBIOTICI CHE IN MONOTERAPIA HANNO FALLITO A CAUSA DELL'EMERGERE DELLA RESISTENZA, MA E' IMPROBABILE CHE SUPERINO I PROBLEMI LEGATI ALLA TOSSICITA' E ALL'INSTABILITA' CHIMICA O METABOLICA.

ADIUVANTI ANTIBIOTICI DI CLASSE II: sfruttano i sistemi di difesa dell'ospite per migliorare l'efficacia degli antibiotici negli organismi infetti.

**PEPTIDI ANTIMICROBICI IMMUNOMODULATORI SONO SINERGICI CON GLI ANTIBIOTICI.
EFFETTI SULLA RISPOSTA IMMUNITARIA DELL'OSPITE:**



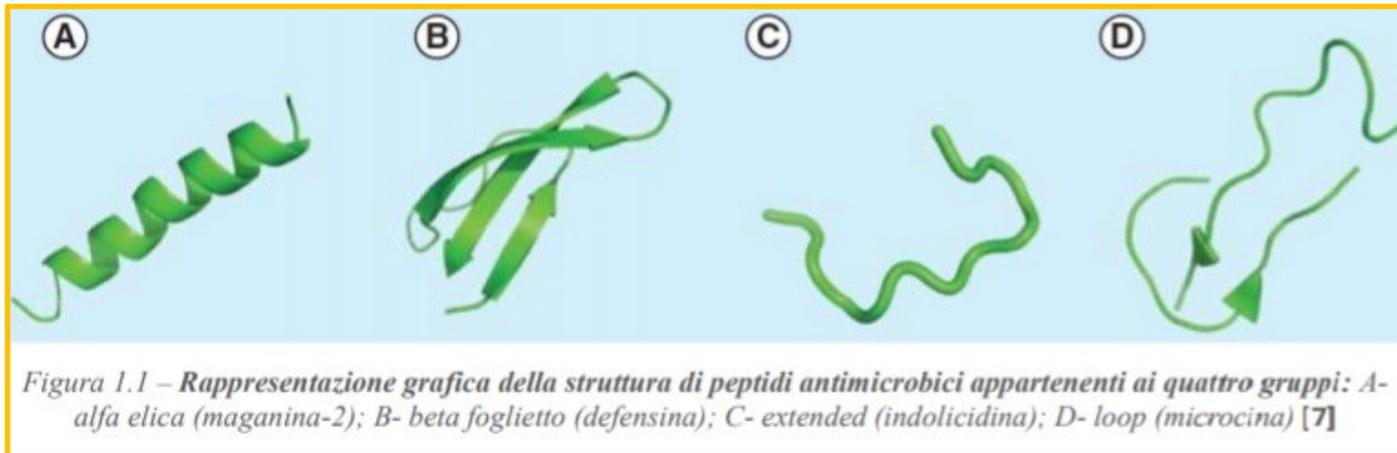
Soppressione dell'infiammazione per evitare una risposta eccessiva a un'infezione che porta alla sepsi



Induzione di attività antimicrobiche basate sulle cellule dell'ospite come una maggiore fagocitosi

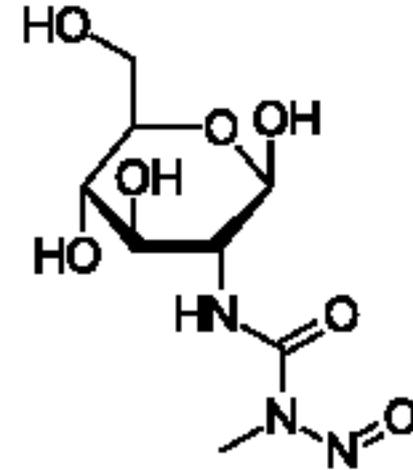


Stimolazione dell'immunità innata con piccole molecole



LE RICERCHE DEGLI ADIUVANTI DI CLASSE II VERTONO SU:

- **STREPTOZOCINA:** prodotto naturale capace di stimolare l'uccisione nei macrofagi dello *Streptococcus pneumoniae*, di indurre la produzione del fattore nucleare-kB con rilascio concomitante di citochine anti-infettive → antibiotici combinati con composti come i peptidi immunomodulatori → CONTROLLO DELL'INFEZIONE.



- **MODULATORI TERAPEUTICI DEL MICROAMBIENTE DELL'OSPITE:** l'alterazione dell'ambiente di crescita può alterare radicalmente la sensibilità agli antibiotici.
- **ADIUVANTI DI CLASSE II CHE IMITANO L'EFFETTO DEI DETERMINANTI DI RESISTENZA DELL'OSPITE:** con l'avvento della tecnologia di screening genetico CRISPR-Cas9 in linee cellulari umane → MAPPARE SISTEMATICAMENTE I DETERMINANTI GENICI DELL'OSPITE CHE ALTERANO LA SENSIBILITA' ALL'INFEZIONE DA PARTE DEI PATOGENI E L'EFFICACIA DELLA TERAPIA ANTIBIOTICA.

GLI ADIUVANTI DI CASSE II NON SONO ANCORA IN FASE DI SVILUPPO CLINICO, MA IL LORO IMPIEGO INTELLIGENTE POTREBBE CONSENTIRE IL RECUPERO DI ANTIBIOTICI ABBANDONATI.

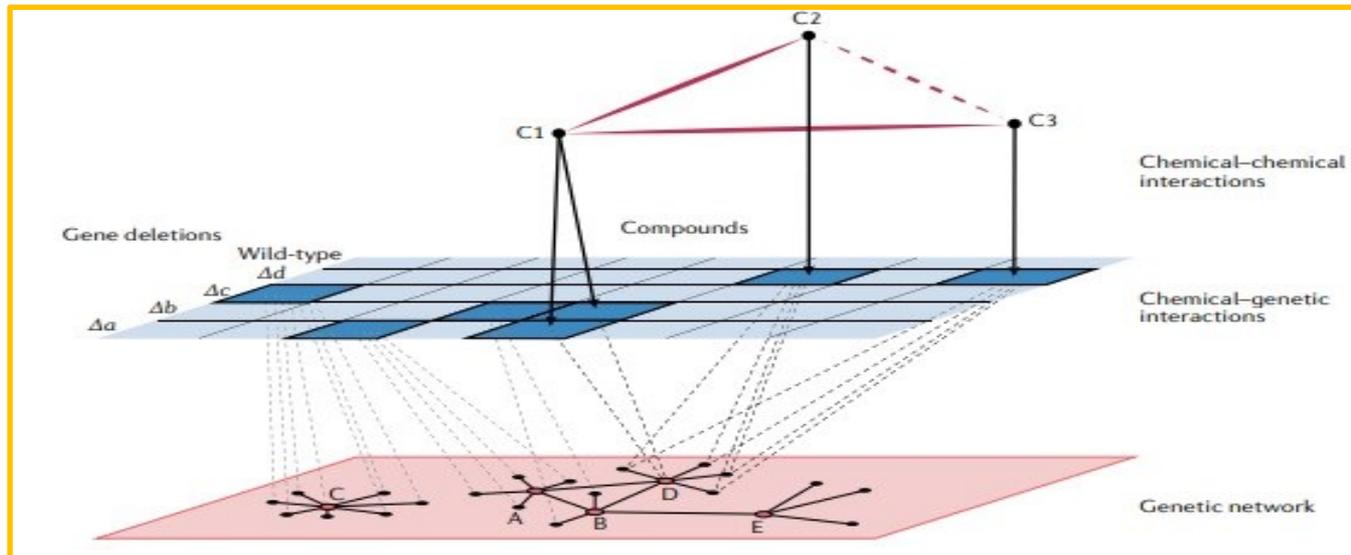
COALISMO → combinazioni di inibitori non antibiotici che mirano a proteine corrispondenti a coppie di interazioni genetiche sintetiche letali → LETALITA' CHIMICA SPECIFICA.

VANTAGGI

- ❑ Gli inibitori che mirano a prodotti genici non essenziali mancano di attività antibiotica intrinseca come agenti singoli → RIDUZIONE DELLA FREQUENZA DELLA RESISTENZA.
- ❑ Combinazioni di farmaci altamente mirati che rimuovono selettivamente l'organismo incriminato con danni minimi all'ospite e al microbioma associato → NUOVE OPPORTUNITA' PER GLI ANTIBIOTICI A SPETTRO RIDOTTO.

SVANTAGGI

- ❑ EMERGERE DELLA RESISTENZA AD UN AGENTE → SUPERAMENTO DELLA COMBINAZIONE.



**LO SVILUPPO DI COMBINAZIONI COALISTICHE E' ANCORA UNA FRONTIERA INESPLORATA, ACCESSIBILE ATTRAVERSO LA BIOLOGIA DEI SISTEMI E APPROCCI COMPUTAZIONALI.
SARANNO NECESSARIE COMBINAZIONI DI TRE O PIU' COMPOSTI.**

La resistenza agli agenti antimicrobici è una pandemia silente, con una prevalenza in Italia molto elevata. Alcune ricerche prevedono che nel 2030 nel nostro Paese ci sarà un incremento della resistenza antimicrobica del 19%. Nonostante la ricerca recentemente sia impegnata a produrre nuovi antibiotici, esiste un problema nella valorizzazione e nello sviluppo delle nuove molecole: la tempistica per realizzare un nuovo antimicrobico è un percorso che dura anche decine di anni.

Gli antibiotici, infatti, devono soddisfare particolari ed esigenti criteri di efficacia e sicurezza e sono altamente suscettibili di una rapida perdita di efficacia attraverso l'evoluzione batterica per selezione naturale. Le analisi condotte sugli antibiotici rivelano che gli agenti diretti contro un singolo bersaglio proteico hanno meno successo di quelli diretti contro bersagli molecolari multipli o contro strutture macromolecolari costituite da multisubunità; un criterio aggiuntivo nella scoperta di nuovi efficaci farmaci antibiotici è la necessità che essi riconoscano più bersagli nella cellula microbica. Sebbene l'individuazione di più bersagli nella progettazione e sintesi di un singolo composto possa essere impraticabile, in linea di principio, può essere ottenuta utilizzando una combinazione di composti distinti. Lo scopo delle combinazioni di composti bioattivi è quello di raggiungere la sinergia per cui la somma delle attività dei singoli componenti risulta aumentata nella combinazione. Le combinazioni antibiotiche sinergiche si classificano in: combinazioni congrue,

combinazioni sincretiche e combinazioni coalistiche. Le combinazioni congrue si basano su composti che individualmente hanno attività di inibizione della crescita cellulare dell'organismo bersaglio. Si sono dimostrate efficaci la combinazione di Penicillina e Streptomina nei confronti delle infezioni enterococciche e la combinazione di rifampicina, isoniazide e pirazinamide per il trattamento della tubercolosi. Tra le poche combinazioni disponibili di antibiotici a dose fissa ritroviamo il Co-trimoxazolo e il Synercid che aumentano l'efficacia e sopprimono la resistenza. Le combinazioni sincretiche includono almeno un componente che non ha un'attività antibiotica evidente, definito adiuvante dell'antibiotico o «breaker» della resistenza. Gli adiuvanti si suddividono in adiuvanti di classe Ia, composti che bloccano direttamente la resistenza (inibitori delle β -lattamasi); adiuvanti di classe Ib, composti che potenziano gli antibiotici attraverso meccanismi indiretti e adiuvanti di classe II, che sfruttano i sistemi di difesa dell'ospite per migliorare l'efficacia degli antibiotici negli organismi infettati. Infine, il terzo tipo di combinazione, il coalismo, si verifica tra composti che da soli non hanno attività antibiotica, ma che insieme sono attivi. Nonostante le difficoltà insite nella ricerca di combinazioni di composti bioattivi è di primaria importanza rinnovare l'interesse e lo sforzo nello sviluppo di combinazioni di farmaci per affrontare la crisi della resistenza agli antibiotici: ci sono ottime ragioni per ipotizzare che il futuro del formulario antibiotico possa essere dominato da terapie a base di combinazioni di farmaci.

