

BOJ PROTI BAKTERIJSKI ODPORNOSTI: ALI SO BAKTERIJSKE TOPOIZOMERAZE TIPA II ŠE ZANIMIVE TARČE?

THE FIGHT AGAINST BACTERIAL RESISTANCE: ARE BACTERIAL TYPE II TOPOISOMERASES STILL INTERESTING TARGETS?

AVTORJI / AUTHORS:

Maša Zorman, mag. ind. farm.^{1,2}

dr. Nikola Minovski, mag. farm.¹

prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.²

prof. dr. Stanislav Gobec, mag. farm.²

izr. prof. dr. Martina Hrast Rambaher, mag. farm.²

¹ Kemijski inštitut, Laboratorij za kemijsko informatiko,
Teoretični odsek,
Hajdrihova 19, 1001 Ljubljana

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: martina.hrast-rambaher@ffa.uni-lj.si



POVZETEK

Topoizomeraze tipa II so pomembne tarče za protibakterijsko terapijo. Prvi zaviralci topoizomeraz tipa II, kinoloni in aminokumarini, so se na trgu pojavili že pred desetletji, vendar njihova uporabnost postopoma upada zaradi nizke učinkovitosti, neželenih učinkov in pojava bakterijske rezistence. Za premagovanje odpornosti in ohranjanje topoizomeraz kot zanimivih tarč, so ključne inovacije na tem področju – izboljšanje dosedanjih razredov učinkovin in odkrivanje novih tipov zaviralcev. V članku so predstavljeni različni razredi zaviralcev bakterijskih topoizomeraz, njihove prednosti in slabosti ter obeti za prihodnost.

KLJUČNE BESEDE:

aminokumarini, kinoloni, novi zaviralci bakterijskih topoizomeraz, protibakterijska terapija, zaviralci topoizomeraze tipa II

ABSTRACT

Type II topoisomerases are important targets for antibacterial therapy. The first inhibitors of type II topoisomerases, quinolones and aminocoumarins, emerged more than half a century ago, but their use is now in slow decline due to toxic side effects, low effectiveness and emergence of bacterial resistance. Innovations in this field – improvement of already existing classes of antibacterials and discovery of novel classes of compounds, are essential for overcoming resistance and maintaining topoisomerases as viable targets. In this paper, we present various classes of bacterial topoisomerase inhibitors, their advantages and shortcomings, as well as future perspectives.

KEY WORDS:

aminocoumarins, antibacterial therapy, novel bacterial topoisomerase inhibitors, quinolones, type II topoisomerase inhibitors

1 UVOD

Topoizomeraze so skupina esencialnih encimov, ki nadzirajo spremembo terciarne ali kvartarne strukture DNA in so pri-

sotni tako v evkariontskih kot v prokariontskih celicah (1). Udeležene so pri uravnavanju dodatnega zvijanja in razvijanja DNA med podvojevanjem in prepisovanjem DNA. Glede na prehodno stanje jih delimo v dve skupini – DNA-topoizomeraze tipa I, ki v prehodnem stanju cepijo eno samo verigo DNA, in DNA-topoizomeraze tipa II, ki naenkrat cepijo obe verigi dvovijačne DNA (2). Zaradi udeležnosti v osnovnih celičnih procesih so človeške topoizomeraze tipa II zanimive kot tarče za kemoterapijo rakavih obolenj, strukturne razlike med evkariontskimi in prokariontskimi topoizomerazami tipa II pa omogočajo selektivno ciljanje bakterij (2).

Prve protibakterijske učinkovine, usmerjene proti bakterijskim topoizomerazam tipa II, aminokumarini, so bile odkrite pred skoraj 75 leti (3). Tako kinoloni, najuspešnejši razred bakterijskih topoizomeraznih zaviralcev, kot aminokumarini so bili prvič registrirani v šestdesetih letih 20. stoletja. Ta dva razreda predstavljata doslej edina dva odobrena razreda zaviralcev bakterijskih topoizomeraz (4–6). Zaradi pomanjkljivosti učinkovin iz obeh razredov, kot so vprašljiv varnostni profil ter pojav odpornih bakterijskih sevov, se je njihova uporaba močno zmanjšala. Inovacije na področju zaviralcev tipa II so zato ključne za premagovanje bakterijske odpornosti in pri ohranjanju bakterijskih topoizomeraz kot zanimivih tarč v protibakterijski terapiji. V nadaljevanju bomo predstavili zgradbo in delovanje bakterijskih topoizomeraz ter obravnavali posamezne skupine zaviralcev, njihove prednosti, slabosti in obete pri razvoju novih učinkovin.

2 BAKTERIJSKE TOPOIZOMERAZE TIPA II

Pri prokariontih poznamo dva podtipa topoizomeraze tipa II – DNA-girazo in topoizomerazo IV (topoIV); in čeprav sta si encima po strukturi zelo podobna, opravljata v celici nekoliko drugačne vloge (2, 6). Oba encima sta sposobna sproščati dodatno zvitje, vendar DNA-giraza poleg tega uvaja tudi negativno dodatno zvitje, kar je ključno za shranjevanje DNA v bakterijski celici. Po drugi strani je topoIV ključna za razvijanje sestrskih kromatid med podvojevanjem DNA (7). Oba encima imata heterotetramerno strukturo in sta si topološko zelo podobna. DNA-giraza je sestavljena iz dveh podenot GyrA in dveh podenot GyrB, topoIV pa iz dveh podenot ParC in dveh podenot ParE, ki sta po strukturi analogni GyrA in GyrB (slika 1). Katalitski mesti encima,

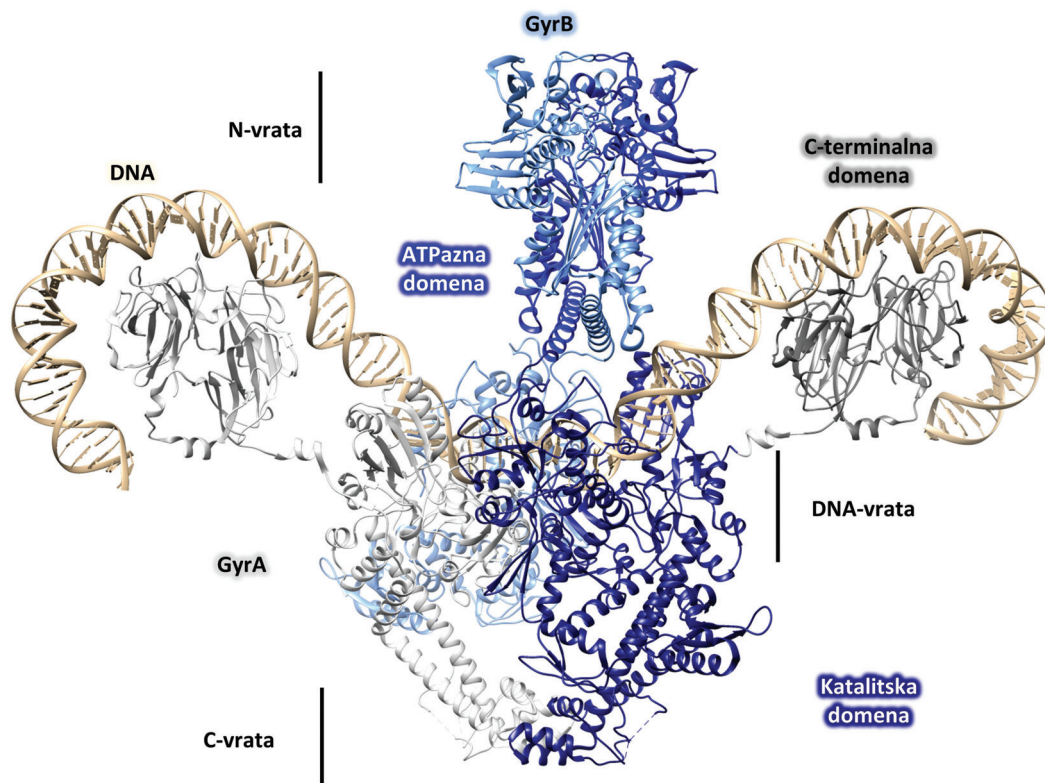
ki omogočata cepitev in ponovno združitve dvovijačne DNA, se nahajata na podenoti GyrA/ParC, delno pa ju sestavlja tudi C-terminalni konec GyrB/ParE. Cepitev adenozin trifosfata (ATP) in s tem zagotavljanje energije za encimsko reakcijo izvajata ATPazni domeni, ki se nahajata na N-terminalnem koncu podenot GyrB/ParE. C-terminalni domeni encima, ki sta odgovorni za zvijanje DNA, se nahajata na C-terminalnem koncu GyrA/ParC. Heterotetramerni encim oblikuje troje "vrat", ki nadzirajo katalitski cikel encima preko vezave DNA in uravnavajo prehajanje posameznih verig (8). N-vrata se nahajajo na N-terminalnem koncu encima, na stičišču dveh podenot GyrB/ParE v ATPazni domeni encima. DNA-vrata so v bližini katalitskega mesta, na stičišču obeh podenot GyrA/ParC in obeh podenot GyrB/ParE. C-vrata pa se nahajajo na distalnem koncu encima, na ponovnem stičišču dveh podenot GyrA/ParC (slika 1).

Katalitski cikel encima poteka v več korakih (slika 2). G-segment dvovijačne DNA se najprej veže na DNA-vrata, medtem ko se drugi segment dvovijačne DNA, t. i. T-segment, veže na odprta N-vrata. Ob vezavi dveh molekul GyrB/ParE dimerizira in N-vrata se zaprejo, ob enem pa se G-segment cepi. Hidroliza prve molekule ATP povzroči razprtje DNA-vrat in prečkanje T-segmenta skozi razcepljeno DNA. Ligacija G-segmenta poteče ob sprostitvi adenozin difosfata (ADP) iz ATPazne domene, T-segment pa lahko zapusti encim skozi C-vrata. Ob hidrolizi druge molekule ATP nazadnje pride do sprostitve G-segmenta iz encima (2, 5, 8). Posamezni tipi topoizomeraznih zaviralcev delujejo na različne korake v katalitskem ciklu in s tem prekinajo delovanje encima v enem izmed vmesnih stanj. Zaviranje delovanja encima in s tem ključnih celičnih procesov, kot je npr. prepisovanje DNA, v bakterijskih celicah sproži signal za celično smrt.

3 ZAVIRALCI TOPOIZOMERAZ TIPA II

Zaviralce bakterijskih topoizomeraz delimo v več skupin, ki se med seboj razlikujejo po mehanizmu delovanja in mestu vezave na encim. V grobem delimo zaviralce v dve skupini: topoizomerazne strupe in katalitske zaviralce topoizomeraz (6). Topoizomerazni strupi interagirajo tako z encimom kot z DNA in stabilizirajo vmesno razcepljeno stanje DNA. Delujejo kot fizična prepreka, ki onemogoča ponovno povezavo (re-ligacijo) DNA. To v bakterijah sproži





Slika 1: Prikaz strukture heterotetramera DNA-giraze iz *Escherichia coli* z vezanim fragmentom DNA (PDB ID: 6RKW) (8). Monomer GyrA je prikazan v svetlo sivi barvi, monomer GyrB pa v svetlo modri barvi. Posamezne domene encima so označene z različnimi barvami – ATPazna domena (modro), ki jo sestavlja N-terminalni del GyrB, in katalitska domena (temno modro), ki jo sestavlja C-terminalni del GyrB in N-terminalni del GyrA, ter C-terminalna domena (temno sivo). ATP – adenosin trifosfat

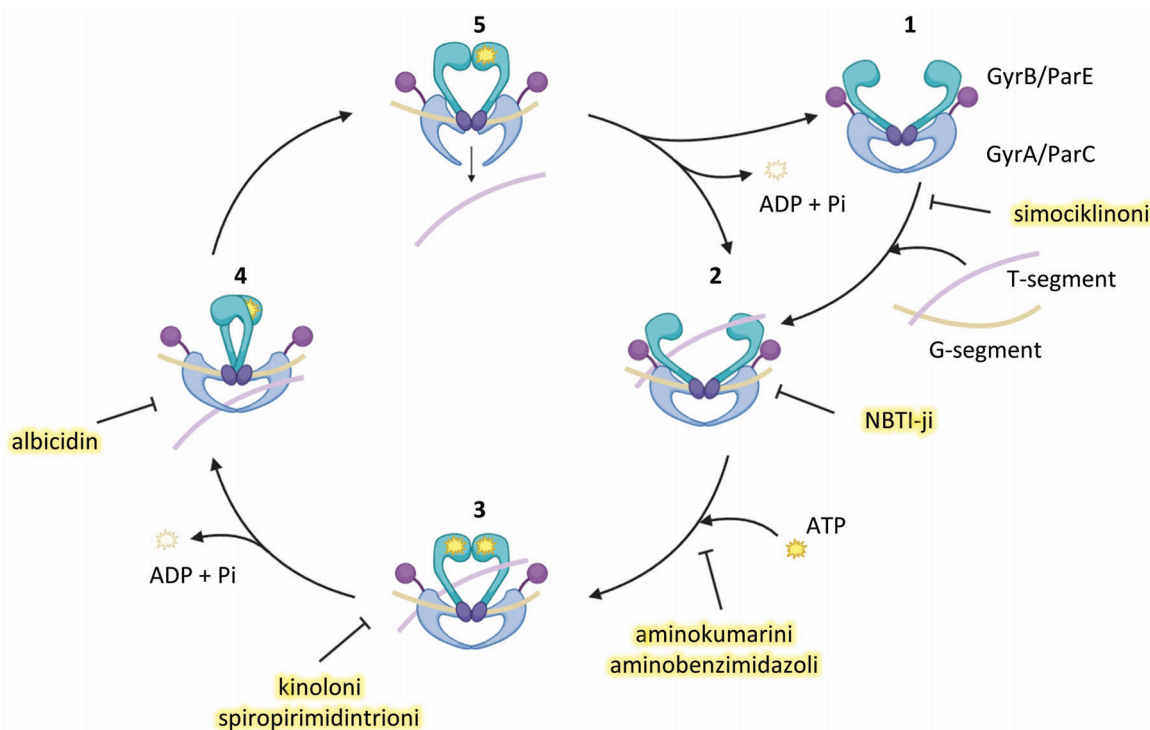
Figure 1: Heterotetrameric structure of *Escherichia coli* DNA gyrase with bound DNA fragment (PDB ID: 6RKW) (8). A GyrA monomer is shown in light grey and a GyrB monomer in light blue. Individual domains are labeled with different colors – ATPase domain (blue), catalytic domain (dark blue), and C-terminal domain (dark grey). ATP – adenosine triphosphate

obrambni odziv, inducira nastajanje reaktivnih kisikovih zvrsti, povzroči razgradnjo DNA in vodi v celično smrt (6). Katalitski zaviralci topoizomeraz so učinkovine, ki zavirajo delovanje encima, ne da bi poveševale koncentracijo encimskih kompleksov s cepljeno DNA (5). Delujejo v različnih stopnjah katalitskega cikla topoizomeraz, npr. pri vezavi DNA, vezavi ATP ali cepitvi DNA (5).

3.1 KINOLONI

Nalidiksna kislina, ki je predhodnica kinolonskih protibakterijskih učinkovin, je bila leta 1962 naključno odkrita pri proizvodnji kinina in le nekaj let kasneje odobrena za zdravljenje bakterijskih okužb (slika 3A) (5, 10). Sprva so imeli kinoloni zelo omejeno terapevtsko uporabnost, predvsem so se uporabljali za zdravljenje okužb urinarnega trakta, ki so jih povzročale *Escherichia coli* in nekaj drugih gramne-

gativnih bakterij. Z uvedbo fluora na mesto 6 v osrednjem kinolonskem skeletu in bazičnega dušikovega heterocikla na mesto 7 (slika 3B), se je njihova terapevtska uporabnost močno povečala. Nova generacija kinolonskih protimikrobnih učinkovin, katere prvi predstavnik, norfloksacin, ki je leta 1983 pridobil dovoljenje za promet, je tako dobila ime fluorokinoloni. Strukturne spremembe fluorokinolonov so privedle do izboljšanja njihovih farmakokinetičnih in farmakodinamičnih lastnosti, biološke uporabnosti, znatnega povečanja protimikrobnega učinka in razširile spekter delovanja spojin tudi na nekatere grampozitivne bakterije in mikobakterije (4, 10, 11). Ciprofloksacin je bil prvi predstavnik skupine, ki je izkazoval dobro sistemsko uporabnost in je spodbudil razvoj še naprednejših in široko uporabnih kinolonov (slika 3C). Predstavniki tretje in četrte generacije kinolonskih antibiotikov (npr. levofloksacin in moksifloksacin) vsebujejo še dodatne spremembe na mestih 7 in 8, ki



Slika 2: Katalitski cikel bakterijskih topoizomeraz tipa II s prikazanimi mesti delovanja posameznih skupin protibakterijskih učinkovin (2, 8). 1 – prost encim; 2 – vezava G-segmenta na DNA-vrata in T-segmenta na N-vrata; 3 – vezava adenozin trifostata (ATP), dimerizacija GyrB/ParE, cepitev G-segmenta; 4 – prehod T-segmenta skozi G-segment, cepitev ATP in nastanek adenozin difostata (ADP) in fosfata (Pi); 5 – sprostitve T-segmenta skozi N-vrata. NBTI – novi zaviralci bakterijskih topoizomeraz

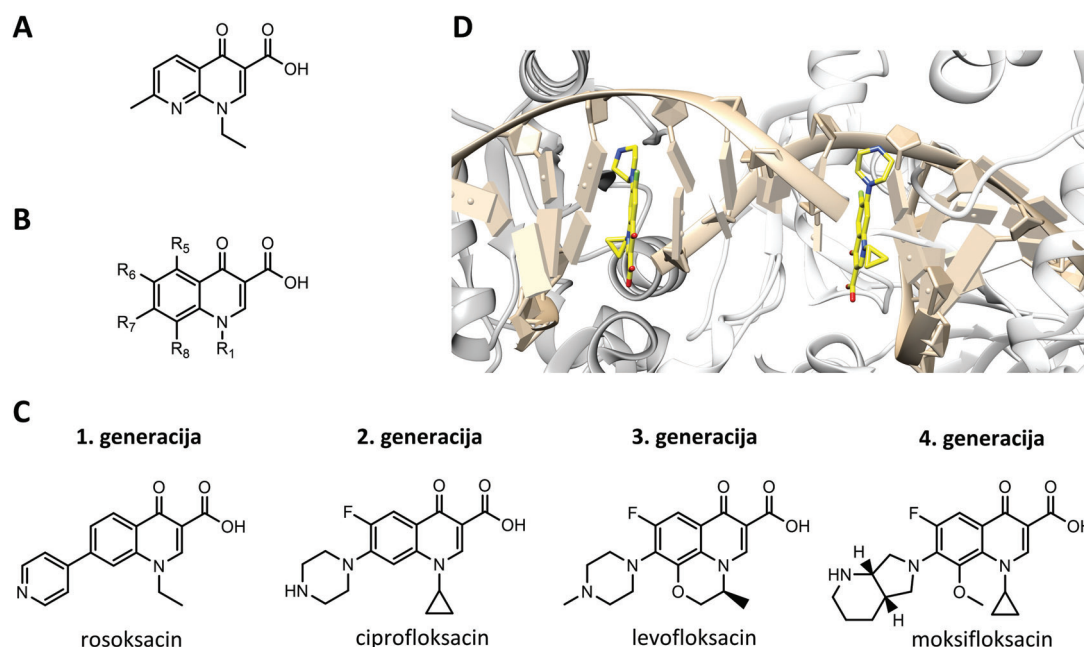
Figure 2: Catalytic cycle of bacterial type II topoisomerases with indicated sites of action for different groups of antibacterial agents (2, 8). 1 – free enzyme; 2 – binding of the G-segment to the DNA gate and the T-segment to the N-gate; 3 – binding of adenosine triphosphate (ATP), dimerization of GyrB/ParE, cleavage of the G-segment; 4 – passage of the T-segment through the G-segment, ATP hydrolysis, and formation of adenosine diphosphate (ADP) and phosphate (Pi); 5 – release of the T-segment through the N-gate. NBTI – novel bacterial topoisomerase inhibitor

omogočajo dodatno izboljšanje aktivnosti na grampozitivne bakterije in, v primeru spojin četrte generacije, tudi delovanje na anaerobne organizme (slika 3C) (11).

Kinoloni se vežejo na encim v bližini katalitskega mesta na vsako izmed dveh podenot GyrA/ParC na območju DNA-vrat in se hkrati umestijo med bazne pare DNA tik ob mestu cepitve DNA ter s tem stabilizirajo kompleks med cepljeno DNA in encimom (slika 3D) (12). Interakcija med kinoloni, DNA in proteinom prepreči nadaljnje delovanje encima, ustavi dodatno zvijanje ali sproščanje DNA ter zavre podvojevanje in prepisovanje DNA.

Fluorokinoloni so bili nekaj desetletji med najpogostejše predpisanimi antibiotiki. Med letoma 1995 in 2002 so bili celo najpogostejše predpisani antibiotiki v ZDA s kar 7 do 22 milijoni izdanih receptov (13). Nepravilno postavljene diagnoze in neustrezen izbor antibiotikov pri približno 42 % predpisanih receptov sta najverjetneje pomembno prispevala k pojavu

in širjenju na kinolone odpornih bakterijskih sevov. Najpogostejši in klinično najpomembnejši mehanizem odpornosti na kinolone je pojav specifičnih mutacij v tarčnem encimu, ki oslabijo vezavo učinkovin. Do odpornosti lahko pride tudi zaradi pridobitve genov, ki vplivajo na metabolizem kinolonov, povečajo izražanje izlivnih črpalk ali porinov (14). Vedno več dokazov predvsem iz veterinarske in kmetijske stroke kaže na to, da kinoloni sami spodbujajo razvoj odpornosti na druge vrste protimikrobnih učinkovin, kar lahko vodi v razvoj multiple odpornosti (12). Indukcija mehanizma popravljanja DNA pri subletalnih koncentracijah kinolonov naj bi povečala stopnjo mutagenoze in rekombinacije ter povzročila nastanek odpornosti tudi proti drugim vrstam protimikrobnih učinkovin (15). Zaradi pojava hudih neželenih učinkov, kot so bolečine v sklepih, možnost rupture aorte in teratogenost, je predpisovanje kinolonov omejeno pri določenih skupinah bolnikov, otrocih, starejših in nosečnicah (11,16).



Slika 3: Kinoloni (11). A) Struktura nalidiksne kisline. B) Splošna struktura kinolonskih antibiotikov. Spremembe na mestih R1, R5, R6, R7 in R8 omogočajo izboljšanje delovanja in fizikalno-kemijskih lastnosti spojin. C) Predstavniki različnih generacij kinolonov. D) Kokristaliziran ciprofloksacin (rumena) z DNA-girazo iz *Staphylococcus aureus* (PDB ID: 2XCT), posamezni podenoti označeni s svetlo in temno sivo. Kinoloni stabilizirajo cepljeno DNA na obeh mestih cepitve in tvorijo interakcije z encimom v bližini katalitskega centra GyrA.

Figure 3: Quinolones (11). A) Structure of nalidixic acid. B) General structure of quinolone antibiotics. Modifications at positions R1, R5, R6, R7 and R8 allow for improved activity and physicochemical properties of the compounds. C) Representatives of different generations of quinolones. D) Cocrystallized ciprofloxacin (yellow) with DNA gyrase from *Staphylococcus aureus* (PDB ID: 2XCT), with individual subunits marked in light and dark gray. Quinolones stabilize cleaved DNA at both cleavage sites and form interactions with the enzyme near the catalytic center of GyrA.

3.2 AMINOKUMARINI

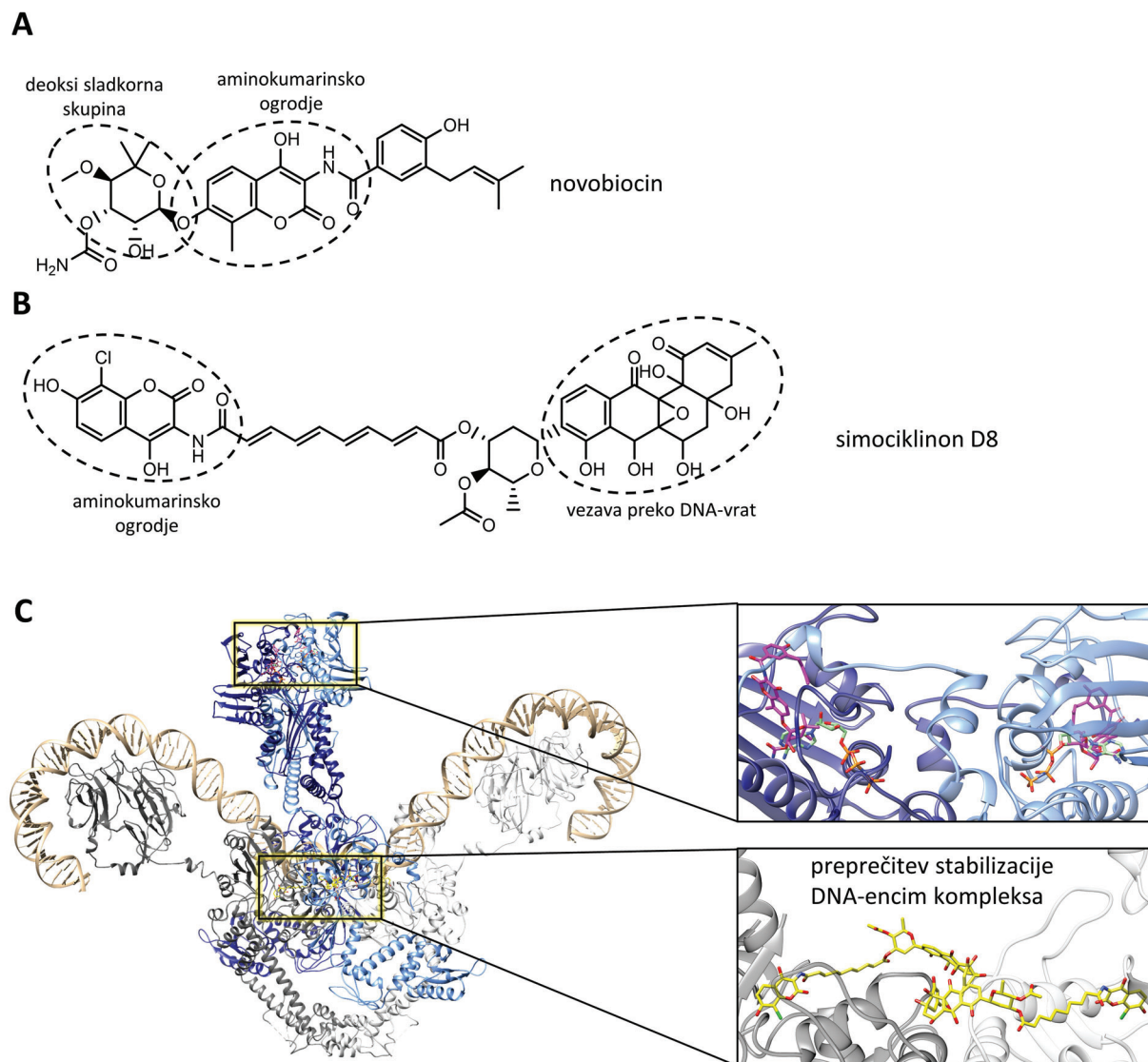
Aminokumarini, kamor uvrščamo novobiocin (slika 4A), klorobiocin in kumermicin A1, so ATP-kompetitivni zaviralci topoisomeraza tipa II, ki jih proizvaja rod bakterij *Streptomyces*. Poleg kinolonov so aminokumarini edina skupina zaviralcev topoisomeraza tipa II, ki so bili kdaj odobreni za klinično uporabo. Čeprav v pogojih *in vitro* izkazujejo boljše zaviralno delovanje na aktivnost kot kinoloni, pa njihovo uporabo omejuje slaba topnost in toksičnost v evkariontskih celicah (2). Prvič so bili registrirani v šestdesetih letih 20. stoletja za zdravljenje okužb, ki jih povzročajo grampozitivne bakterije (4). Njihovo delovanje na gramnegativne bakterije je omejeno, predvsem zaradi slabega prehajanja skozi zunanjo membrano ali delovanja izlivnih črpalk (17). Aminokumarinski antibiotiki delujejo kot katalitski zaviralci, ki z vezavo v ATP-vezavni žep v ATPazni domeni encima preprečujejo delovanje encima (slika 4C). V grampozitivnih bakterijah primarno delujejo na DNA-girazo, kjer izkazujejo

za nekaj velikostnih razredov močnejše zaviralno delovanje kot na topo IV (17).

DNA-giraza, glavna tarča aminokumarinov, spada v družino encimov GHKL, ki imajo podobno ATP-vezavno domeno. S tem lahko pojasnimo vezavo aminokumarinov na protein toplotnega šoka 90, encim iz družine GHKL, kar je lahko vzrok za pojav neželenih učinkov pri ljudeh (4). Tudi pri uporabi aminokumarinskih antibiotikov se je pojavila odpornost določenih bakterijskih sevov. Večinoma gre za pojav odpornosti zaradi specifičnih mutacij encima v ATP-vezavnem mestu, kar pa privede tudi do znižanja katalitske aktivnosti mutiranega encima (6).

3.3 SIMOCIKLINONI

Podobno kot aminokumarini so tudi simociklinoni biosintezni produkti bakterij iz rodu *Streptomyces*. Simociklinoni strukturno spominjajo na aminokumarine, saj vsebujejo aminokumarinsko ogrodje, manjka pa jim deoksi-sladkorna



Slika 4: Aminokumarini in simociklinoni (2, 17). **A)** Strukturna predstavitev novobiocina z označimi pomembnimi strukturnimi deli. **B)** Strukturna reprezentacija simociklinona D8 z označenimi pomembnimi deli za interakcijo z encimom. **C)** Novobiocin (roza), adenosin trifosfat (ATP) (zelena) in SD8 (rumena) v DNA-girazi iz *Escherichia coli*, slika je bila narejena s prekrivanjem treh kristalnih struktur (PDB ID: 6RKW, 4URO in 4CKL). Posamezni podenoti sta prikazani s svetlo/temno sivo, podenoti pa s svetlo/temno modro. Novobiocin je vezan v podenoti GyrB, opazimo lahko prekrivanje z ATP, kar ilustrira ATP-kompetitivno zaviranje aminokumarinskih antibiotikov. SD8 interagira s prvo podenoto GyrA preko aminokumarinskega dela in preprečuje vezavo DNA ter stabilizacijo kompleksa DNA-encim, tetraciklični del SD8 se veže preko DNA-vrata in interagira z sosednjo podenoto GyrA.

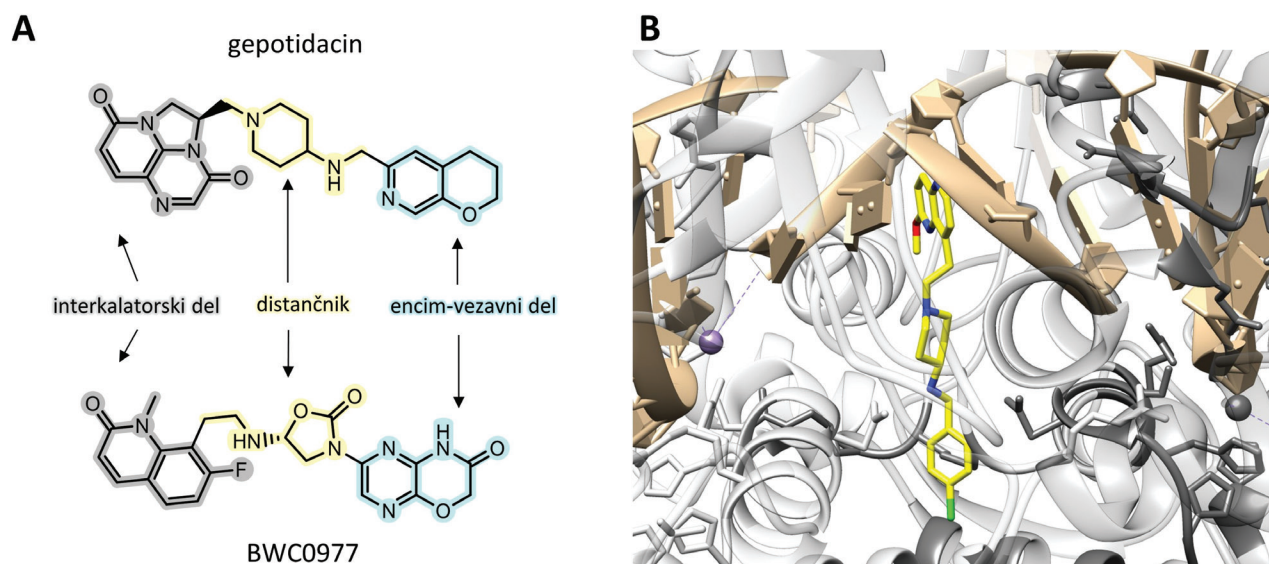
Figure 4: Aminocoumarins and Simocyclinones (2, 17). **A)** Structural representation of novobiocin with important structural parts labeled. **B)** Structural representation of simocyclinone D8 with labeled key regions for interaction with the enzyme. **C)** Novobiocin (pink), adenosine triphosphate (ATP) (green), and SD8 (yellow) in DNA gyrase from *Escherichia coli*; the image was created by overlaying three crystal structures (PDB ID: 6RKW, 4URO, and 4CKL). Individual subunits are shown in light/dark gray, while additional subunits are displayed in light/dark blue. Novobiocin is bound to the GyrB subunit, with observable overlap with ATP, illustrating the ATP-competitive inhibition of aminocoumarin antibiotics. SD8 interacts with the first GyrA subunit via its aminocoumarin portion, preventing DNA binding and stabilizing the DNA-enzyme complex, while the tetracyclic part of SD8 binds across the DNA gate and interacts with an adjacent GyrA subunit.

skupina (4). Kljub strukturni podobnosti med aminokumarini in simociklinoni je med njimi ključna razlika v mehanizmu delovanja (2, 3). Simociklinon D8 (SD8) (slika 4B), nedavno odkrit predstavnik skupine simociklinonov, izkazuje močno zaviranje dodatnega zvitja in relaksacije DNA s strani DNA-giraze *in vitro* (slika 4) (2, 17). Ne veže se na običajno vezavno mesto za aminokumarine in ne zavira ATPazne aktivnosti encima, ampak deluje kot zaviralec v zgodnji fazi katalitskega cikla s preprečitvijo vezave DNA na encim (18). Kristalna struktura SD8 z DNA-girazo je razkrila, da se spojina veže na N-terminalno domeno v obeh podenotah GyrA preko DNA-vrat in s tem prepreči vezavo DNA na encim (slika 4C) (19). Vezavno mesto za SD8 je sicer zelo blizu, ampak se ne prekriva z vezavnim mestom za kinolone, kar odpira možnosti za razvoj bifunkcionalnih spojin, ki bi se vezale na obe mesti hkrati (4, 18). Poleg vezave na N-terminalno domeno GyrA se SD8 delno veže tudi na C-terminalno domeno GyrB, vendar pomen te vezave še ni popolnoma razjasnjen (20). Težave pri razvoju

novih simociklinonskih antibiotikov so podobne kot pri aminokumarinih – zaradi slabega prehajanja ne delujejo na gramnegativne bakterije, slaba topnost in toksičnost, ki se izkazuje pri evkariontih, pa onemogočata klinično uporabo pri ljudeh (4).

3.4 NOVI ZAVIRALCI BAKTERIJSKIH TOPOIZOMERAZ

Novi zaviralci bakterijskih topoizomeraz (angl. *novel bacterial topoisomerase inhibitor*; NBTI) so relativno nov razred zaviralcev, ki je zanimiv tako za farmacevtsko industrijo kot tudi za akademsko okolje. NBTI-ji se strukturno razlikujejo od prej omenjenih razredov spojin, saj se vežejo na drugo vezavno mesto in imajo drugačen mehanizem delovanja (21–23). Vezavno mesto za NBTI-je leži centralno med dvema podenotama GyrA/ParC in je ločeno od vezavnega mesta za kinolone. Zaviralci tvorijo interakcije tako z encimom kot tudi z DNA in stabilizirajo ternarni kompleks



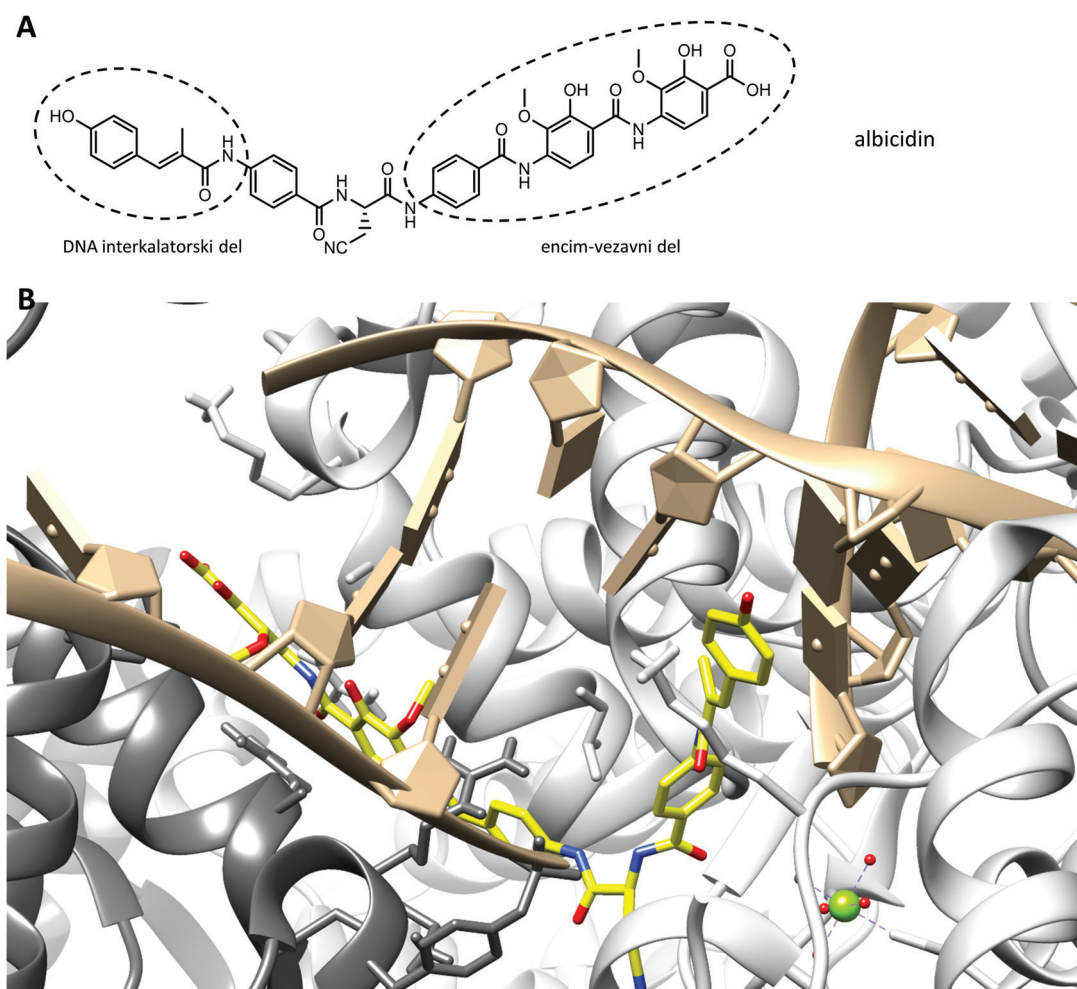
Slika 5: Novi zaviralci bakterijskih topoizomeraz (NBTI) (24, 25, 31). A) Strukturi: Kemijski strukturi gepotidacina in BWC0977 z označenimi deli, ključnimi za interkalacijo in vezavo na encim. B) Struktura NBTI -ja AMK12, razvitega na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in Kemijskem Inštitutu, (rumena) v girazi iz *Staphylococcus aureus* (PDB ID: 6Z1A). Interkalatorski levi del molekule, vezan med centralni bazni par v DNA (svetlo rjava), desni del, usidran med dve podenoti (prikazano s svetlo in temo sivo).

Figure 5: Novel bacterial topoisomerase inhibitors (NBTI) (24, 25, 31). A) Structures – Chemical structures of gepotidacin and BWC0977 with labeled regions crucial for intercalation and enzyme binding. B) Structure of the NBTI AMK12, developed at the Faculty of Pharmacy and the National Institute of Chemistry (yellow), in gyrase from *Staphylococcus aureus* (PDB ID: 6Z1A). The intercalating left part of the molecule is bound between the central base pair in DNA (light brown), while the right part is anchored between two subunits (shown in light and dark gray).

(slika 5). Sestavljeni so iz treh delov: levega dela, osrednjega distančnika in desnega dela. Levi del spojin je ključen za interkalacijo DNA in se umesti med centralna bazna para molekule DNA. Desni del se veže v globok hidrofobni vezavni žep, ki ga tvorita obe podenoti encima, distančnik pa povezuje levi in desni del ter zagotavlja ustrezno prostorsko usmerjenost in fizikalno-kemijske lastnosti (23, 24). NBTI-ji imajo širokospektralno delovanje. V grampozitivnih bakterijah se primarno vežejo na DNA-girazo, v gramnegativnih bakterijah pa na topo IV. Z ustreznimi strukturnimi spremembami je mogoč tudi enakomeren učinek na obe

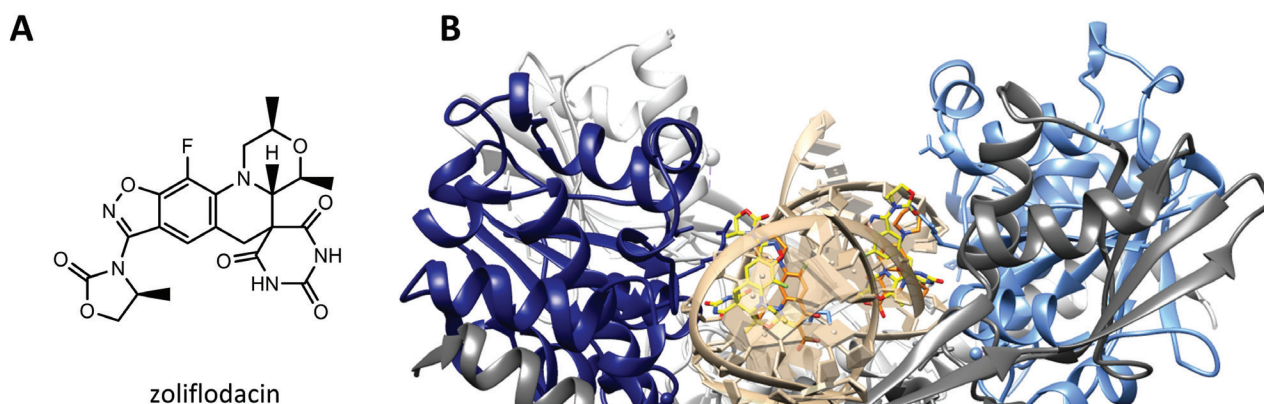
tarči, kar pripomore k zmanjševanju verjetnosti pojava bakterijske odpornosti.

Kljub dokazanim močnim terapevtskim učinkom NBTI-jev trenutno na tržišču še ni nobene spojine iz tega razreda. Vikvidacin je bil prvi predstavnik razreda, ki je vstopil v prvo fazo kliničnih preskušanj, vendar so bila ta prekinjena zaradi kardiotsičnosti, ki je bila posledica vezave na hERG (kalijev ionski kanal, ki ga kodira človeški gen, povezan z Et-her-a-go-go fenotipom) (26). Številna farmacevtska podjetja in akademske raziskovalne skupine so skušale zmanjšati kardiotsičnost teh spojin, kar pa je večinoma vodilo do



Slika 6: Albicidini (2, 32). A) Struktura: Kemijska struktura albicidina z označenimi pomembnimi deli za interakcijo z DNA in z encimom. B) Albicidin (rumena) v girazi iz *Escherichia coli* (PDB ID: 7z9c) (33). C-terminalni interkalatorski del zaviralca je vezan med fragmente DNA v eni izmed področji cepitev, N-terminalni del je usidran med dve podenoti (prikazano s svetlo in temo sivo).

Figure 6: Albicidins (2, 32). A. Structure: Chemical structure of albicidin with labeled key regions for interaction with DNA and the enzyme. B. Albicidin (yellow) in gyrase from *Escherichia coli* (PDB ID: 7Z9C) (33). The C-terminal intercalating part of the inhibitor is bound between DNA fragments at one of the cleavage sites, while the N-terminal part is anchored between two subunits (shown in light and dark gray).



Slika 7: Spiropirimidintrioni (35). A) Struktura: Kemijska struktura zoliflodacina. B) Prekrivanje zoliflodacina (rumena) in ciprofloksacina (oranžna) v girazi iz *Staphylococcus aureus* (PDB ID: 8BP2, 2XCT). Posamezni podenoti sta prikazani v svetlo in temno sivi, dela podenot pa v svetlo in temno modri.

Figure 7: Spiropirimidintriones (35). A) Structure: Chemical structure of zoliflodacin. B) Overlay of zoliflodacin (yellow) and ciprofloxacin (orange) in gyrase from *Staphylococcus aureus* (PDB ID: 8BP2, 2XCT). Individual subunits are shown in light and dark gray, with parts of the subunits displayed in light and dark blue.

šibkejšega protibakterijskega delovanja (27–29). Kljub temu je podjetju GSK uspelo razviti učinkovino gepotidacin s primernim varnostnim profilom in dobro protibakterijsko učinkovitostjo. Gepotidacin je uspešno zaključil tretjo fazo kliničnih preskušanj za zdravljenje nezahtevnih okužb urinarnega trakta in gonoreje ter je na dobri poti, da postane prvi predstavnik razreda NBTI-jev na tržišču (30, 31). V prvi fazi kliničnega preskušanja je tudi spojina BWC0977, ki je namenjena zdravljenju resnejših bolnišničnih okužb, za katere trenutno ni primerne terapije.

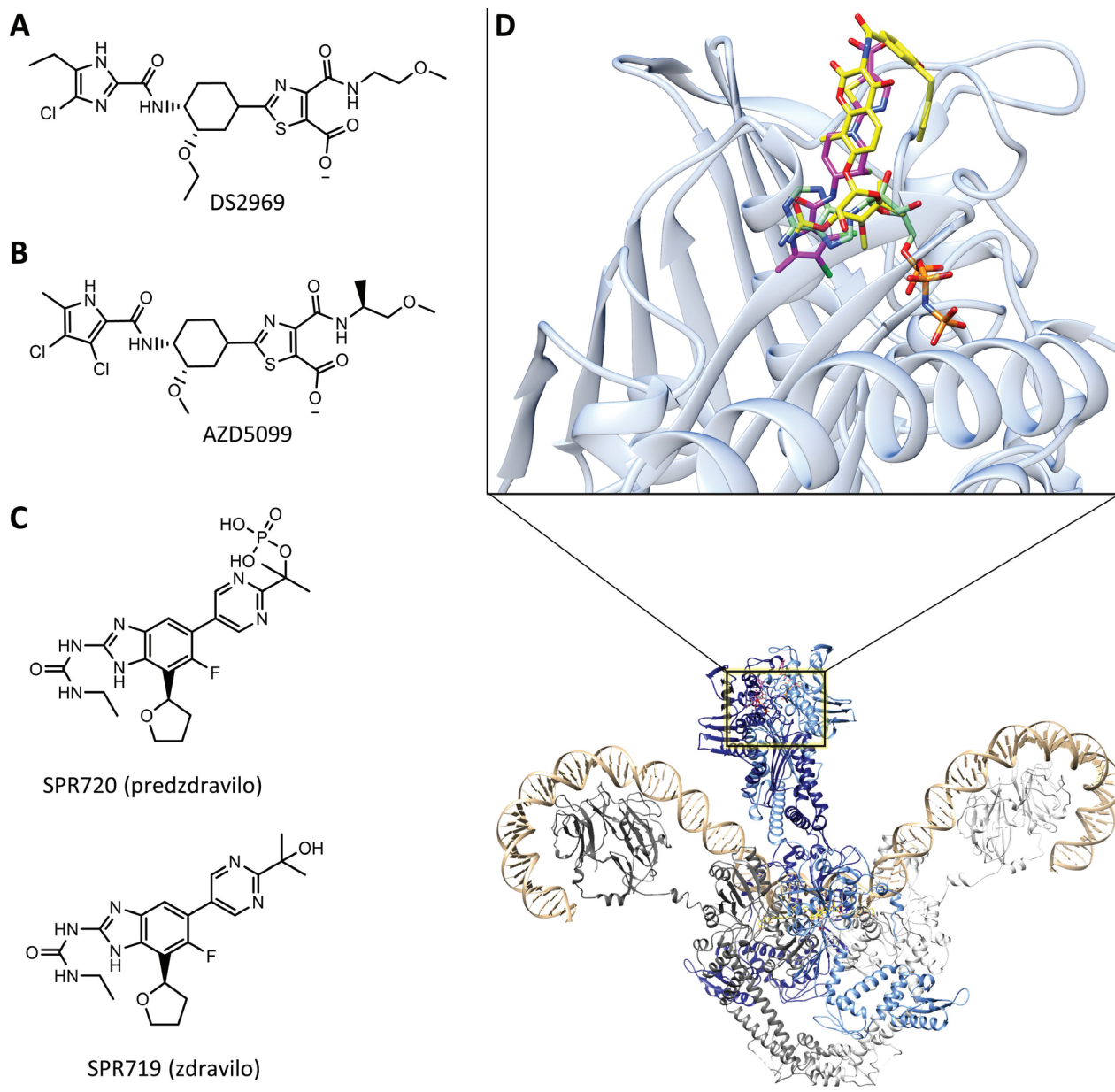
3.5 ALBICIDINI

Albicidin je peptidni fitotoksin, ki ga izločajo rastlinski patogeni *Xanthomonas albilineans* (2) (slika 6A). Albicidin deluje baktericidno na gramnegativne in grampozitivne bakterije v nizkih nanomolarnih koncentracijah in ne izkazuje toksičnosti na sesalskih celicah v koncentraciji pod 8 µg/mL (32). Albicidin se z enim delom molekule veže med fragmente razcepljene DNA, drugi del pa tvori interakcije z encimom na stičišču obeh podenot GyrA/ParC (slika 6B). Na ta način stabilizira razcepljeno intermediarno stanje DNA, prepreči njeno ponovno povezavo in sklenitev verig DNA ter sproži bakterijsko smrt. Albicidin tvori kompleks z DNA in encimom ob prisotnosti ATP, kar je tudi ena izmed razlik med delovanjem albicidinov in kinolonov (2). Za razliko od kinolonov, ki se vežejo na kompleks simetrično ob cepit-

venem mestu DNA in tvorijo interakcije z eno izmed podenot GyrA/ParC, se albicidin prednostno veže v eno izmed mest cepitve in tvori interakcije z obema podenotama GyrA/ParC. Albicidin se najverjetneje veže na encim v trenutku, ko je T-segment DNA že prešel skozi G-segment, a se ta še ni sklenil (33). Ob spremembi enega izmed aminokislinskih ostankov, ki povzroča rezistenco na kinolone, so že opazili navzkrižno odpornost s kinoloni (32). Sintetični derivati albicidina s krajšo strukturo se lahko simetrično vežejo v vezavna žepa v obeh podenotah in so manj občutljivi na spremembe v regiji proteina, ki so povezane z odpornostjo na kinolone. Nekateri sintetični derivati albicidina so bili dokazano varni in učinkoviti v živalskih modelih *in vivo* ter so izkazovali celo boljšo protibakterijsko učinkovitost kot NBTI-ji (34).

3.6 SPIROPIRIMIDINTRIONI

Spiropirimidintrioni podobno kot kinoloni stabilizirajo kompleks med DNA in tarčo ter se vežejo med cepljene bazne pare DNA. Za razliko od kinolonov, ki tvorijo interakcije z podenoto GyrA/ParC, se spiropirimidintrioni vežejo na podenoto GyrB/ParE (slika 7B) (35). Znano je, da mutacije, ki privedejo do odpornosti bakterij na kinolone, ne vplivajo na učinkovitost delovanja spiropirimidintrionov, kar potrjuje drugačen mehanizem delovanja kljub podobnemu vezavnemu mestu. Spiropirimidintrioni so učinkoviti tako proti



Slika 8: Ne-aminokumarinski ATP-kompetitivni zaviralci bakterijskih topoizomeraz (3, 36, 37). A) Struktura imidazolamidne učinkovine DS2969. B) Struktura pirolamidne učinkovine AZN5099. C) Struktura predzdravila SPR720 in aktivnega metabolita SPR719. D) Prekrivanje pirolamidne spojine 07N (roza), novobiocina (rumena) ATP (zelena) v ATP-vezavnem DNA-giraze iz *Escherichia coli*, slika je bila narejena s prekrivanjem treh kristalnih struktur (PDB ID: 6RKW, 4URO in 3TTZ). ATP – adenozin trifosfat

Figure 8: Non-aminocoumarin ATP-competitive inhibitors of bacterial topoisomerases (3, 36, 37). A) Structure of the imidazolamide compound DS2969. B) Structure of the pyrrolamide compound AZN5099. C) Structure of the prodrug SPR720 and its active metabolite SPR719. D) Overlay of the pyrrolamide compound 07N (pink), novobiocin (yellow), and ATP (green) in the ATP-binding site of DNA gyrase from *Escherichia coli*. The image was created by overlaying three crystal structures (PDB ID: 6RKW, 4URO, and 3TTZ). ATP – adenosine triphosphate

grampozitivnim kot tudi gramnegativnim bakterijam. Zoliflodacin (slika 7A), ki je že uspešno zaključil tretjo fazo kliničnih preskušanj za zdravljenje okužb z *Neisseria gonorrhoeae*, trenutno čaka na odobritev s strani ameriške uprave za hrano in zdravila (FDA) (35).

3.7 NE-AMINOKUMARINSKI ATP-KOMPETITIVNI ZAVIRALCI BAKTERIJSKIH TOPOIZOMERAZ TIPA II

Ne-aminokumarinski ATP-kompetitivni zaviralci bakterijskih topoizomeraz tipa II so heterogena skupina zaviralcev v katero uvrščamo spojine iz različnih strukturnih razredov. Skupno tovrstnemu tipu zaviralcev je, da tako kot aminokumarini ciljajo ATP-vezavno mesto encima, vendar so strukturno drugačni. V ta razred spojin spadajo med drugim tudi triazinski, azaindolni, arilaminopirimidinski, imidazolamidni, pirolamidni in aminobenzimidazolni zaviralci, izmed katerih so v klinične študije prišli samo predstavniki zadnjih treh strukturnih skupin (3). DS2969 je imidazolamidna učinkovina, ki je uspešno zaključila 1. fazo kliničnih preskušanj, vendar se njen razvoj ni nadaljeval (slika 8A) (3, 36). Pirolamidna učinkovina AZD5099 je prav tako zaključila 1. fazo kliničnih preskušanj, vendar je bil njen nadaljnji razvoj ustavljen zaradi težav z učinkovitostjo in varnostjo (slika 8B) (3). Ena izmed najbolj zanimivih učinkovin iz tega razreda spojin je zagotovo SPR720 oz. fobrepodacin (slika 8C), aminobenzimidazolno predzdravilo, ki je trenutno v drugi fazi kliničnih preskušanj za zdravljenje pljučnih obolenj, ki jih povzroča *Mycobacterium avium*. Status zdravila sirote za SPR720 je FDA dodelil za zdravljenje netuberkuloznih okužb z mikobakterijami (37).

4 SKLEP

Iz števila različnih skupin zaviralcev bakterijskih topoizomeraz, raznolikih vezavnih mest in unikatnih mehanizmov delovanje je razvidno, da so topoizomeraze tipa II resnično ustrezne tarče za razvoj novih protibakterijskih zdravilnih učinkovin, kljub vedno manjši klinični uporabi trenutno dostopnih zaviralcev. V članku smo se osredotočili samo na nizkomolekularne zaviralce topoizomeraz. Poleg njih so v različnih stopnjah razvoja tudi nekateri peptidni in proteinski

zaviralci. S poglobljanjem znanja o topoizomerazah kot tarčah se možnosti za njihovo raziskovanje širijo. Na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani se z razvojem zaviralcev bakterijskih topoizomeraz ukvarjata kar dve raziskovalni skupini – ena svoj čas posveča zaviralcem GyrA/ParC, druga pa raziskuje zaviralce GyrB/ParE (38, 39). Glede na velikost in kompleksnost bakterijskih topoizomeraz kot tarč smo verjetno šele na začetku odkrivanja vseh potencialnih načinov, kako jih učinkovito izkoristiti pri ciljanju bakterij. S svojim lastnim doprinosom želimo tudi v bodoče širiti znanje na tem področju in pustiti pečat v svetovni znanstveni skupnosti.

5 LITERATURA

1. Schoeffler AJ, Berger JM. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Q Rev Biophys.* 2008 Feb;41(1):41–101.
2. Bush NG, Evans-Roberts K, Maxwell A, Lovett ST. DNA Topoisomerases. Lovett ST, editor. *EcoSal Plus.* 2015 Apr 17;6(2).
3. 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 Jan 9;1(1):4–41.
4. Heide L. New aminocoumarin antibiotics as gyrase inhibitors. *International Journal of Medical Microbiology.* 2014 Jan 1;304(1):31–6.
5. Bisacchi GS. Origins of the Quinolone Class of Antibacterials: An Expanded "Discovery Story." *J Med Chem.* 2015 Jun 25;58(12):4874–82.
6. Collin F, Karkare S, Maxwell A. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011 Nov;92(3):479.
7. Kato J ichi, Nishimura Y, Imamura R, Niki H, Hiraga S, Suzuki H. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell.* 1990 Oct 19;63(2):393–404.
8. Vanden Broeck A, Lotz C, Ortiz J, Lamour V. Cryo-EM structure of the complete *E. coli* DNA gyrase nucleoprotein complex. *Nature Communications* 2019 10:1. 2019 Oct 30;10(1):1–12.
9. Basu A, Parente AC, Bryant Z. Structural dynamics and mechanochemical coupling in DNA gyrase. *J Mol Biol.* 2016 May 5;428(9 Pt B):1833.
10. Lesher GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage RP. 1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents. *J Med Pharm Chem.* 1962 Sep 1;5(5):1063–5.
11. Pham TDM, Ziora ZM, Blaskovich MAT. Quinolone antibiotics. *Medchemcomm.* 2019 Oct 10;10(10):1719.
12. Bush NG, Diez-Santos I, Abbott LR, Maxwell A. Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. *Molecules* 2020, Vol 25, Page 5662. 2020 Dec 1;25(23):5662.

13. Linder JA, Huang ES, Steinman MA, Gonzales R, Stafford RS. Fluoroquinolone prescribing in the United States: 1995 to 2002. *Am J Med.* 2005 Mar 1;118(3):259–68.
14. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry.* 2014 Mar 18;53(10):1565–74.
15. Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell.* 2010 Feb 12;37(3):311–20.
16. Fluoroquinolone antibiotics: reminder of measures to reduce the risk of long-lasting, disabling and potentially irreversible side effects | European Medicines Agency. [cited 2024 Jul 2]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/news/fluoroquinolone-antibiotics-reminder-measures-reduce-risk-long-lasting-disabling-potentially-irreversible-side-effects>
17. Alt S, Mitchenall LA, Maxwell A, Heide L. Inhibition of DNA gyrase and DNA topoisomerase IV of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by aminocoumarin antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2011 Sep 1;66(9):2061–9.
18. Flatman RH, Howells AJ, Heide L, Fiedler HP, Maxwell A. Simocyclinone D8, an inhibitor of DNA gyrase with a novel mode of action. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Mar;49(3):1093–100.
19. Hearnshaw SJ, Edwards MJ, Stevenson CE, Lawson DM, Maxwell A. A new crystal structure of the bifunctional antibiotic simocyclinone D8 bound to DNA gyrase gives fresh insight into the mechanism of inhibition. *J Mol Biol.* 2014 May 15;426(10):2023–33.
20. Sissi C, Vazquez E, Chemello A, Mitchenall LA, Maxwell A, Palumbo M. Mapping simocyclinone D8 interaction with DNA gyrase: Evidence for a new binding site on GyrB. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jan;54(1):213–20.
21. Bax BD, Chan PF, Eggleston DS, Fosberry A, Gentry DR, Gorrec F, et al. Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. *Nature.* 2010 Aug 19;466(7309):935–40.
22. Tse-Dinh YC. Targeting bacterial topoisomerases: how to counter mechanisms of resistance. *Future Med Chem.* 2016 Jun 1;8(10):1085–100.
23. Charrier C, Salisbury AM, Savage VJ, Duffy T, Moyo E, Chaffer-Malam N, et al. Novel Bacterial Topoisomerase Inhibitors with Potent Broad-Spectrum Activity against Drug-Resistant Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 May 1;61(5).
24. Kolaric A, Anderluh M, Minovski N. Two Decades of Successful SAR-Grounded Stories of the Novel Bacterial Topoisomerase Inhibitors (NBTIs). *J Med Chem.* 2020 Jun 11;63(11):5664–74.
25. Kokot M, Anderluh M, Hrast M, Minovski N. The Structural Features of Novel Bacterial Topoisomerase Inhibitors That Define Their Activity on Topoisomerase IV. *J Med Chem.* 2022 May 5;65(9):6431.
26. Black MT, Coleman K. New inhibitors of bacterial topoisomerase GyrA/ParC subunits. *Curr Opin Investig Drugs.* 2009 Aug 1;10(8):804–10.
27. Reck F, Alm RA, Brassil P, Newman J V, Ciaccio P, McNulty J, et al. Novel N-linked aminopiperidine inhibitors of bacterial topoisomerase type II with reduced p K a: Antibacterial agents with an improved safety profile. *J Med Chem.* 2012 Aug 9;55(15):6916–33.
28. Li L, Okumu AA, Nolan S, English A, Vibhute S, Lu Y, et al. 1,3-Dioxane-Linked Bacterial Topoisomerase Inhibitors with Enhanced Antibacterial Activity and Reduced hERG Inhibition. *ACS Infect Dis.* 2019 Jul 12;5(7):1115–28.
29. Kokot M, Weiss M, Zdovc I, Anderluh M, Hrast M, Minovski N. Diminishing hERG inhibitory activity of aminopiperidine-naphthylidine linked NBTI antibacterials by structural and physicochemical optimizations. *Bioorg Chem.* 2022 Nov 1;128.
30. Scangarella-Oman NE, Hossain M, Hoover JL, Perry CR, Tiffany C, Barth A, et al. Dose Selection for Phase III Clinical Evaluation of Gepotidacin (GSK2140944) in the Treatment of Uncomplicated Urinary Tract Infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022 Mar 1;66(3).
31. Ali ASM, Anderson CS. Gepotidacin, a new first-in-class antibiotic for treating uncomplicated urinary tract infection. *The Lancet.* 2024 Feb 24;403(10428):702–3.
32. Hashimi SM. Albicidin, a potent DNA gyrase inhibitor with clinical potential. *The Journal of Antibiotics* 2019 72:11. 2019 Aug 26;72(11):785–92.
33. Michalczyk E, Hommernick K, Behroz I, Kulike M, Pakosz-Stępień Z, Mazurek L, et al. Molecular mechanism of topoisomerase poisoning by the peptide antibiotic albicidin. *Nature Catalysis* 2023 6:1. 2023 Jan 23;6(1):52–67.
34. Zborovsky L, Kleebauer L, Seidel M, Kostenko A, von Eckardstein L, Gombert FO, et al. Improvement of the antimicrobial potency, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of albicidin by incorporation of nitrogen atoms. *Chem Sci.* 2021 Nov 10;12(43):14606–17.
35. Morgan H, Lipka-Lloyd M, Warren AJ, Hughes N, Holmes J, Burton NP, et al. A 2.8 Å Structure of Zoliflodacin in a DNA Cleavage Complex with *Staphylococcus aureus* DNA Gyrase. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 1;24(2):24.
36. Dennie J, Vandell AG, Inoue S, Gajee R, Pav J, Zhang G, et al. A Phase I, Single-Ascending-Dose Study in Healthy Subjects to Assess the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of DS-2969b, a Novel GyrB Inhibitor. *The Journal of Clinical Pharmacology.* 2018 Dec 1;58(12):1557–65.
37. Stokes SS, Vemula R, Pucci MJ. Advancement of GyrB Inhibitors for Treatment of Infections Caused by *Mycobacterium tuberculosis* and Non-tuberculous *Mycobacteria*. *ACS Infect Dis.* 2020 Jun 12;6(6):1323–31.
38. Durcik M, Tomašič T, Zidar N, Zega A, Kikelj D, Mašič LP, et al. ATP-competitive DNA gyrase and topoisomerase IV inhibitors as antibacterial agents. *Expert Opin Ther Pat.* 2019 Mar 4;29(3):171–80.
39. Zorman M, Hrast Rambauer M, Kokot M, Minovski N, Anderluh M. The overview of development of novel bacterial topoisomerase inhibitors effective against multidrug-resistant bacteria in an academic environment: From early hits to in vivo active antibacterials. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2024 Jan 1;192:106632.

