



UNIMORE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
MODENA E REGGIO EMILIA

Dipartimento di Scienze della Vita

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Farmacia

**XERUBORBACTAM E INIBITORI BORONICI
DELLE β -LATTAMASI: NUOVE STRATEGIE
FARMACOLOGICHE NELLA LOTTA ALLA
RESISTENZA ANTIMICROBICA**

Relatore:

Prof.ssa Emilia CASELLI

Tesi compilativa

di Laurea Magistrale in Farmacia di:

REBECCA OLIVA

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

INDICE.....	2
ABSTRACT	5
CAPITOLO I - INTRODUZIONE.....	7
1.1 RESISTENZA AI FARMACI ANTIBATTERICI A LIVELLO GLOBALE	7
1.1.1 Dalla scoperta degli antibiotici alla diffusione globale della resistenza	7
1.1.2 Classificazione e meccanismo d'azione degli antibiotici	8
1.1.3 Le cause della crisi: fattori clinici, comportamentali e ambientali	9
1.1.4 Limiti delle terapie attuali e necessità di innovazione	10
1.2 BATTERI GRAM-POSITIVI E GRAM-NEGATIVI.....	11
1.3 IL PEPTIDOGLICANO (PGN) COME BERSAGLIO DEI β -LATTAMICI.....	13
1.4 PATOGENI CRITICI NELL'AMBITO DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA	15
1.5 PRINCIPALI MECCANISMI COINVOLTI NELLA RESISTENZA	18
1.5.1 Resistenza intrinseca del batterio	18
1.5.2 Resistenza acquisita per riduzione di concentrazione intracellulare.....	19
1.5.3 Alterazione dei bersagli degli antibiotici	20
1.5.4 Eliminazione diretta dell'antibiotico	21
1.5.5 Basi genetiche e trasmissione della resistenza	22
1.6 IMPORTANZA DEI β -LATTAMICI	23
1.6.1 Meccanismo di interazione tra PBP e β -lattamici	24
1.7 CLASSIFICAZIONE β - LATTAMASI	27
1.7.1 Classe A.....	28
1.7.2 Classe C.....	29
1.7.3 Classe D.....	30
1.7.4 Classe B.....	30
1.7.5 Sottoclassi delle MBL	31
1.8 MECCANISMI D'AZIONE DELLE β -LATTAMASI	34
1.8.1 Serina- β -lattamasi	34
1.8.2 Metallo- β -lattamasi	35
1.9 STRATEGIA β -LATTAMICO + INIBITORE DI β -LATTAMASI	36
1.10 INIBITORI DI β -LATTAMASI.....	36
1.10.1 Inibitori "classici" di prima generazione	37

1.10.2 Diazabicciclo-ottanoni: uno scaffold versatile di inibitori reversibili	39
CAPITOLO II - GLI ACIDI BORONICI.....	44
2.1 GLI ACIDI BORONICI COME INIBITORI DELLE β - LATTAMASI.....	44
2.2 COLLOCAZIONE STORICA RISPETTO ALLE ALTRE GENERAZIONI DI INIBITORI.....	45
2.3 IL RAZIONALE CHIMICO: PERCHE' IL BORO?	46
2.4 INIBIZIONE DELLE SBL DA PARTE DEGLI ACIDI BORONICI	47
2.5 INIBIZIONE DELLE MBL DA PARTE DEGLI ACIDI BORONICI.....	49
2.6 CLASSIFICAZIONE PER SPETTRO D'AZIONE	50
2.7 CLASSI CHIMICHE DI ACIDI BORONICI	51
2.7.1 Gli acidi boronici aciclici	51
2.7.2 I derivati arilboronici.....	54
2.7.3 Dagli scaffold aciclici ai primi composti ciclici.....	56
2.8 IL VABORBACTAM.....	59
2.8.1 Struttura chimica e razionale progettuale.....	59
2.8.2 Meccanismo d'azione vaborbactam.....	61
2.8.3 Spettro d'azione e proprietà correlate	63
2.8.4 Combinazione attualmente in uso clinico	66
2.9 IL TANIBORBACTAM.....	68
2.9.1 Struttura chimica e razionale progettuale.....	68
2.9.2 Meccanismo d'azione	70
2.9.3 Spettro d'azione e proprietà correlate	71
2.9.4 Combinazione attualmente in fase di sviluppo clinico.....	73
CAPITOLO III – XERUBORBACTAM	75
3.1 IL DESIGN DI UNA NUOVA CLASSE DI ACIDI BORONICI CICLICI.....	75
3.1.1 Aggregazione dei derivati più semplici.....	76
3.1.2 Attività ad ampio spettro	77
3.1.3 Formulazione orale.....	77
3.1.4 Un risultato inatteso: la rimozione del sostituito sul carbonio in alfa al boro .	77
3.1.5 Il sostituito ciclopropilico e la stabilità metabolica	78
3.1.6 La molecola finale.....	78
3.2 IL MECCANISMO D'AZIONE	79
3.2.1 Inibizione delle β -lattamasi	79
3.2.2 Perché lo spettro sulle metallo- β -lattamasi è più ampio di quello di taniborbactam	80
3.2.3 Inibizione delle Penicillin Binding Protein (PBP)	82

3.3 SPETTRO D'AZIONE E PROPRIETA' CORRELATE	83
3.3.1 Potenza e copertura su ampie collezioni di isolati clinici	83
3.3.2 Meccanismi di resistenza intrinseca: porine ed efflusso	85
3.3.3 Proprietà farmacocinetiche.....	86
3.4 COMBINAZIONE E SVILUPPO CLINICO	86
3.4.1 Il partner β -lattamico e lo stato di sviluppo clinico.....	86
3.4.2 Attività contro i ceppi resistenti alle nuove combinazioni già disponibili.....	87
3.4.3 Limiti osservati e situazioni di potenza ridotta	88
3.4.4 Prospettive future	88
CONCLUSIONI	89
BIBLIOGRAFIA	91

ABSTRACT

La resistenza antimicrobica (AMR) rappresenta una delle principali minacce sanitarie globali che compromette progressivamente l'efficacia degli antibiotici disponibili in commercio. I batteri Gram-negativi multiresistenti, in particolare *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* ed *Enterobacteriaceae* spp., rappresentano il rischio più rilevante in questo scenario, a causa della loro capacità di sviluppare resistenza ad ogni classe di antibiotici.

Fra i meccanismi di resistenza agli antibiotici β -lattamici, l'espressione di β -lattamasi, enzimi capaci di idrolizzare e inattivare il caratteristico anello β -lattamico, risulta significativamente il più importante.

La combinazione di un β -lattamico con un inibitore delle β -lattamasi (BLI) resta dunque una delle strategie più affidabili contro questa emergenza. Dopo gli inibitori classici di prima generazione (acido clavulanico, sulbactam, tazobactam), attivi principalmente contro le β -lattamasi a spettro esteso di classe A, sono state sviluppate nuove classi di inibitori di β -lattamasi quali i diazabicicloottanoni (DBO), tra cui avibactam e relebactam, in grado di ampliare lo spettro d'azione alle classi A, C e parzialmente D, e gli inibitori contenenti l'atomo di boro, gli acidi boronici.

Questi ultimi formano con l'enzima un complesso che mima lo stato di transizione tetraedrico dell'idrolisi del β -lattame. Sono state sviluppate diverse classi di acidi boronici, a partire da scaffold aciclici, derivati arilboronici e, infine, strutture cicliche e bicicliche, che hanno uno spettro d'azione più ampio, essendo in grado di inibire sia le Serina β -lattamasi (SBL) che metallo β -lattamasi (MBL).

In questo lavoro di tesi verranno esaminate le diverse classi di acidi boronici con un particolare approfondimento dedicato alle strutture cicliche fra cui il vaborbactam, primo acido boronico ciclico approvato dalla FDA in co-somministrazione con il meropenem; il taniborbactam, che risulta aver terminato la fase clinica 3 in co-somministrazione con il cefepime; ed in fine lo xeruborbactam (in precedenza noto come QPX7728), boronato biciclico di nuova generazione e oggetto centrale di questa tesi. Questo composto mostra uno spettro di inibizione ultra-ampio, capace di inibire con elevata potenza non solo le carbapenemasi seriniche di classe A, ma anche le MBL di classe B e gli enzimi di classe D

tipici di *A. baumannii*, risultando inoltre poco influenzato dai meccanismi di resistenza legati a permeabilità di membrana ed efflusso attivo. A ciò si aggiunge un profilo farmacocinetico favorevole, con buona biodisponibilità anche orale, che rende lo xeruborbactam un candidato promettente sia per via endovenosa che orale, in combinazione con i β -lattamici già in uso clinico.

CAPITOLO I - INTRODUZIONE

1.1 RESISTENZA AI FARMACI ANTIBATTERICI A LIVELLO GLOBALE

1.1.1 Dalla scoperta degli antibiotici alla diffusione globale della resistenza

La scoperta e l'utilizzo degli antibiotici ha rappresentato uno dei maggiori risultati scientifici del XX secolo, segnando una svolta epocale nella storia della medicina. Durante il periodo iniziale del loro impiego, le infezioni batteriche si consideravano efficacemente curabili: tagli e ferite infette non erano più pericolosi per la vita, e varie malattie batteriche, come la sifilide e il colera, erano ritenute in via di eradicazione (1). Questa nuova sicurezza si estendeva anche a interventi medici oggi considerati fondamentali, come la chemioterapia, le chirurgie salvavita e i trapianti di organi, resi possibili dalla profilassi antibiotica capace di prevenire le infezioni post-operatorie (2). Gli antibiotici venivano dunque impiegati con successo per curare infezioni potenzialmente letali, e la comunità scientifica e medica nutriva un ottimismo diffuso circa la possibilità di eliminare definitivamente la minaccia batterica, un equilibrio che la crescente diffusione della resistenza avrebbe presto rimesso in discussione.

Poco dopo la scoperta del primo antibiotico, la penicillina, da parte di Alexander Fleming nel 1928, ebbe infatti inizio anche la battaglia contro la resistenza: con l'uso eccessivo e diffuso di questo farmaco si registrò progressivamente una diminuzione della sua efficacia, dimostrando che i batteri stavano sviluppando meccanismi di resistenza. Con resistenza antimicrobica (AMR) si fa riferimento alla capacità dei microrganismi di sopravvivere all'esposizione ad agenti antimicrobici che normalmente li ucciderebbero o ne limiterebbero la crescita (3). È significativo notare che un ceppo del genere *Staphylococcus* resistente alla penicillina fu isolato già nel 1943, ancor prima che questo antibiotico fosse prodotto su larga scala, suggerendo che la resistenza possa preesistere come carattere genomico in alcune popolazioni batteriche e che tale fenomeno si sia probabilmente evoluto nel corso degli anni (3–6).

L'uso diffuso e spesso improprio degli antibiotici ha favorito l'emergere di patogeni antibiotico-resistenti, inclusi ceppi multiresistenti, la cui diffusione è divenuta oggi una delle minacce più gravi per il settore sanitario globale (1,5). In passato, i ceppi batterici resistenti erano rari e limitati quasi esclusivamente alle infezioni nosocomiali; oggi, invece, sono diventati estremamente comuni, diffondendosi ben oltre i contesti ospedalieri (5,7).

A livello mondiale, si stima che almeno 700.000 persone muoiano ogni anno per cause legate alla resistenza agli antibiotici, un numero destinato a raggiungere i 10 milioni entro il 2050 (8). Secondo le stime disponibili, il consumo globale annuo di antibiotici si aggira tra le 100.000 e le 200.000 tonnellate, e la sola Cina è responsabile di un consumo superiore a 25.000 tonnellate all'anno (8). Una recentissima segnalazione sull'isolamento di *Enterobacter bugandensis* spp. multiresistente dalla Stazione Spaziale Internazionale ha ulteriormente confermato la natura ubiquitaria di questo fenomeno (8).

1.1.2 Classificazione e meccanismo d'azione degli antibiotici

Gli agenti antimicrobici possono essere classificati come naturali, semisintetici o sintetici; gli antibiotici agiscono sui batteri per trattare ed eradicare le infezioni da loro prodotte, potendo essere battericidi, ossia in grado di uccidere i batteri, o batteriostatici, capaci cioè di arrestarne la crescita (3).

Esempi di antibiotici battericidi includono i β -lattamici, gli aminoglicosidi, i glicopeptidi come la vancomicina, i fluorochinoloni e i nitroimidazoli; rientrano invece nella categoria dei batteriostatici i macrolidi, le lincosamidi, le sulfonamidi e le tetracicline (3).

La distinzione tra queste due categorie si fonda sulla concentrazione minima inibente (MIC) e sulla concentrazione minima battericida (MBC): la prima rappresenta la concentrazione minima necessaria per inibire la crescita batterica visibile dopo 24 ore, mentre la seconda indica la dose minima necessaria per uccidere i batteri (5). Il meccanismo d'azione degli antibiotici comprende alterazioni della formazione della parete cellulare, della sintesi proteica, delle vie metaboliche, della replicazione del DNA e della traduzione (3).

1.1.3 Le cause della crisi: fattori clinici, comportamentali e ambientali

Le cause di questa crisi sono molteplici e profondamente interconnesse. Sul piano clinico, tra i fattori responsabili dell'aumento della resistenza si annoverano lo sviluppo e lo sfruttamento eccessivo degli antibiotici, l'uso intensivo di farmaci ad ampio spettro per evitare una diagnosi accurata ma lunga e costosa e la scarsità di farmaci antimicrobici mirati, quest'ultima ulteriormente aggravata dall'incapacità dell'industria farmaceutica di immettere sul mercato nuovi agenti terapeutici, il cosiddetto fenomeno del *dry pipeline* (1,2,5).

La scarsa aderenza dei pazienti ai regimi terapeutici prescritti e la tendenza all'automedicazione rappresentano ulteriori comportamenti umani che contribuiscono in maniera significativa alla proliferazione di ceppi resistenti (9).

La percezione diffusa che gli antibiotici offrano una soluzione rapida ed efficace ai comuni problemi di salute ha portato a pratiche che minano il controllo prescrittivo del medico; secondo un rapporto dei Centers for Disease Control and Prevention (CDC), più del 50% delle prescrizioni di antibiotici negli Stati Uniti è considerato non necessario (9).

Accanto a questi fattori, i cosiddetti "determinanti socioeconomici" svolgono un ruolo altrettanto significativo: la scarsa igiene nelle comunità, pratiche alimentari non sicure, misure inadeguate di controllo delle infezioni nelle strutture sanitarie, la presenza di antibiotici nell'ambiente, pressioni economiche ed esitazione vaccinale contribuiscono tutti all'aggravarsi del fenomeno (9).

Sul piano ambientale, se gli antibiotici vengono rilasciati continuamente negli ecosistemi acquatici naturali, essi esercitano una pressione selettiva sulla popolazione batterica, inducendola ad acquisire resistenza per sopravvivere (8). I principali contesti responsabili dello sversamento diretto o indiretto di antibiotici includono le industrie farmaceutiche, gli ospedali, l'acquacoltura e l'agricoltura (8). Poiché fiumi e laghi sono ampiamente utilizzati come fonti di acqua potabile, per l'irrigazione e per attività ricreative, la proliferazione di geni e batteri resistenti in questi sistemi rende la gestione della AMR particolarmente complessa (8).

Le interconnessioni tra bestiame, esseri umani e comparti ambientali creano ulteriori percorsi per la trasmissione di batteri resistenti e di elementi genetici mobili (9).

L'uso di antibiotici nel bestiame può contribuire all'emergere di batteri resistenti, i quali possono essere trasmessi agli esseri umani attraverso il contatto diretto con gli animali, tramite prodotti alimentari, o attraverso la contaminazione ambientale causata dai rifiuti zootecnici (9). I batteri resistenti possono persistere nel suolo e nell'acqua, diffondendosi potenzialmente ad animali ed esseri umani quando questi vengono a contatto con fonti ambientali contaminate (9). L'assenza di politiche e regolamenti adeguati riguardo all'uso e allo smaltimento degli antibiotici non fa che aggravare ulteriormente il problema (9).

Sebbene l'antibiotico-resistenza sia un processo naturale, la sua diffusione incontrollata si è trasformata in un'emergenza di salute pubblica in gran parte riconducibile all'azione umana, rendendo necessario un approccio integrato di tipo One Health che consideri simultaneamente la salute degli esseri umani, degli animali e dell'ambiente (9).

1.1.4 Limiti delle terapie attuali e necessità di innovazione

Per lungo tempo, l'elevata efficacia degli antibiotici esistenti ha reso non necessario lo sviluppo di terapie alternative. Con l'emergere e il diffondersi della resistenza nuovi antibiotici sono stati introdotti, ma i batteri si sono dimostrati capaci di sviluppare resistenza verso di essi. Il fenomeno è talmente rapido che persino nei confronti di antibiotici non ancora introdotti nella pratica clinica si sono già individuati ceppi resistenti (2). La rapida comparsa di nuove resistenze disturba quindi l'economia globale e richiede lo sviluppo urgente di nuove classi di antibiotici (2).

In questo contesto, l'identificazione di nuovi antibiotici e approcci terapeutici alternativi, la promozione di campagne per un uso responsabile degli antibiotici, il miglioramento delle strategie di prevenzione delle infezioni e lo sviluppo di misure efficaci per contenere la diffusione della AMR si configurano come priorità imprescindibili per la tutela della salute umana e ambientale (2–4,10).

1.2 BATTERI GRAM-POSITIVI E GRAM-NEGATIVI

I batteri possono essere suddivisi in due grandi categorie: gram-positivi e gram-negativi. Tale suddivisione si basa sulle differenze nella struttura e nella composizione della parete cellulare, che si traduce in diverse reazioni cromatiche alla colorazione di Gram.

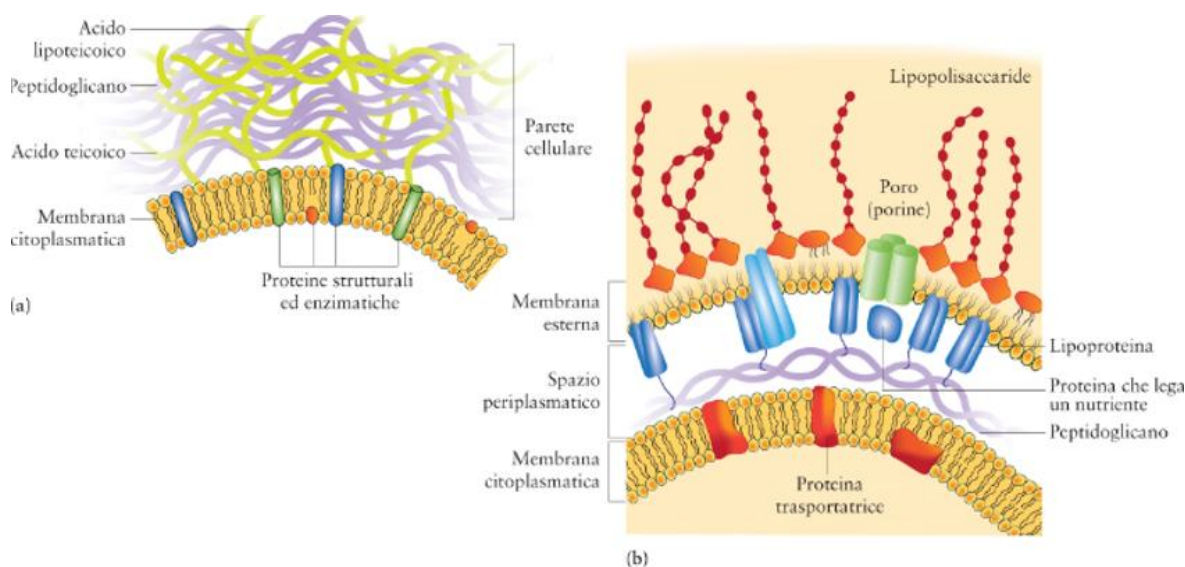


Figura 1. Differenza della parete fra Gram + (a) e Gram – (b)

Nei **batteri Gram-positivi** la membrana cellulare plasmatica è avvolta da uno spesso e rigido strato di parete cellulare detto peptidoglicano (PGN); il PGN si trova vicino alla membrana cellulare, ricoperto esternamente solo da eventuali macromolecole superficiali come come l'acido teicoico e lipoteicoico o polisaccaridi capsulari. Queste strutture, sebbene possano costituire una “capsula” attorno al batterio, sono porose e consentono la diffusione di piccole molecole come ad esempio i β -lattami, gli antibiotici ancora oggi considerati il come l'arma più preziosa a disposizione dell'uomo per combattere le infezioni batteriche. Nei batteri Gram-positivi i β -lattami attraversano facilmente la parete cellulare e raggiungono le penicillin-binding proteins (PBPs), enzimi coinvolti nella fase finale della biosintesi del peptidoglicano. Legandosi irreversibilmente alle transpeptidasi, inibiscono la formazione dei legami crociati tra le catene di peptidoglicano, compromettendo l'integrità della parete cellulare e determinando la lisi batterica. (**figura 1**) (11).

Nei **batteri Gram-negativi**, invece, lo strato di PGN è più sottile ed è racchiuso tra una membrana interna e una membrana esterna, che insieme danno vita a un'architettura della parete cellulare più articolata. La membrana esterna costituisce una vera e propria barriera molecolare: impedisce la fuoriuscita delle proteine periplasmatiche, blocca l'accesso di

enzimi idrolitici esterni e risulta impermeabile a numerosi antibiotici. È composta da fosfolipidi, lipoproteine e lipopolisaccaridi (LPS), questi ultimi considerati il principale fattore di virulenza dei Gram-negativi, poiché amplificano le reazioni infiammatorie dell'ospite. L'LPS agisce come endotossina debole e aspecifica, neutralizzabile dagli anticorpi ma capace di attivare la cascata del complemento: la sua porzione lipidica è rivolta verso l'interno della cellula, mentre quella polisaccaridica si estende verso l'esterno, articolandosi in un polisaccaride centrale (zuccheri a 6, 7 e 8 atomi di carbonio) e in un polisaccaride "O" (zuccheri a 6 atomi di carbonio) che si proietta sulla superficie cellulare. Quest'ultimo, la cui composizione zuccherina varia da organismo a organismo e persino tra ceppi della stessa specie, costituisce un importante determinante antigenico, alla base della suddivisione dei Gram-negativi in diversi sierogruppi.

All'interno della membrana esterna sono inserite le porine, canali proteici formati dall'aggregazione di subunità che creano piccoli pori utilizzati per il trasporto selettivo e non selettivo, ma mai contro gradiente di concentrazione, di molecole a basso peso molecolare, inclusi nutrienti e antibiotici idrofili come i β -lattami. Le molecole con peso superiore a 600 Da non riescono invece a diffondere attraverso questi canali: le porine rappresentano quindi un filtro che limita l'accesso di molti agenti antimicrobici al citoplasma batterico, con numero e dimensioni dei pori che variano da specie a specie (**figura 1**) (11).

Per raggiungere i propri bersagli intracellulari, dunque, l'antibiotico β -lattamico deve attraversare nei Gram-negativi sia la membrana esterna sia la membrana citoplasmatica: la maggior parte vi riesce per diffusione passiva attraverso le porine, mentre altri sfruttano sistemi di trasporto attivo del substrato a livello della membrana citoplasmatica. È proprio questa doppia barriera a rendere i batteri Gram-negativi generalmente più resistenti all'azione degli antibiotici rispetto ai Gram-positivi (11).

1.3 IL PEPTIDOGLICANO (PGN) COME BERSAGLIO DEI β -LATTAMICI

La parete cellulare batterica è una struttura rigida che circonda la membrana citoplasmatica ed è essenziale per mantenere la forma della cellula, resistere alla pressione osmotica e consentire la normale crescita e divisione batterica. Il suo principale componente strutturale è il peptidoglicano (PGN), detto anche mureina o mucopeptide, una macromolecola costituita da catene polisaccaridiche di N-acetilglucosamina (NAG) e acido N-acetilmuramico (NAM), reticolate da brevi ponti peptidici contenenti diversi amminoacidi, tra cui, in molte specie batteriche, l'acido meso-diaminopimelico o la L-lisina. L'elevato grado di reticolazione del peptidoglicano conferisce alla parete cellulare stabilità meccanica e rigidità. Nei batteri Gram-positivi, inoltre, la parete cellulare contiene acidi teicoici e lipoteicoici, che contribuiscono alla sua organizzazione strutturale e alle interazioni con l'ambiente esterno.

La biosintesi del PGN coinvolge circa 30 enzimi diversi e si articola in tre fasi principali:

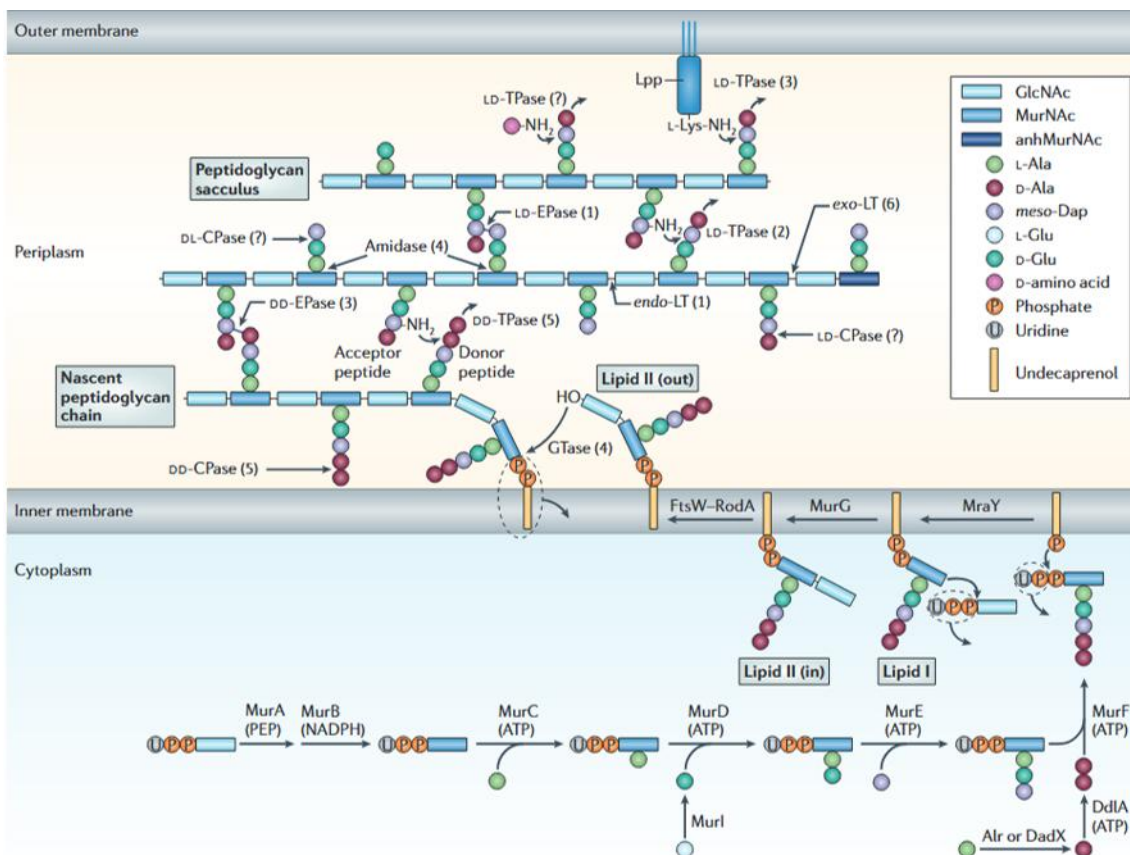


Figura 2. Sintesi e scissione del peptidoglicano (12)

- Nella prima fase, che avviene nel citoplasma, si produce l'uridina difosfato (UDP)-acetilmuramil-pentapeptide, detto anche nucleotide di Park; l'ultima reazione della sua sintesi consiste nell'aggiunta di un dipeptide D-Ala-D-Ala, che richiede a sua volta la racemizzazione della L-alanina e la successiva condensazione catalizzata dalla D-alanil-D-alanina sintetasi.
- Nella seconda fase, l'UDP-acetilmuramil-pentapeptide reagisce con l'UDP-acetilglucosamina: i nucleotidi uridinici vengono liberati e si forma un lungo polimero. La formazione dell'eteropolimero inizia con il legame dello zucchero pentapeptidico a un fosfolipide della membrana citoplasmatica tramite un ponte pirofosfato; viene quindi aggiunto un secondo zucchero, seguito da cinque residui di glicina. La prima unità pentaglicinica reticolata attraversa così la membrana citoplasmatica, orientandosi verso il periplasma (lo spazio compreso tra membrana esterna e membrana citoplasmatica).
- Nella terza e ultima fase, la reticolazione si completa nello spazio periplasmico grazie a una reazione di transpeptidazione catalizzata dalle transpeptidasi. Questi enzimi utilizzano un residuo di serina nel proprio sito attivo per legarsi covalentemente, seppur in modo transitorio, al dipeptide D-Ala-D-Ala della catena pentapeptidica, ristabilendo così i legami peptidici: il gruppo amino-terminale dell'ultimo residuo di glicina dell'unità pentaglicinica si lega quindi al gruppo carbossilico del quarto residuo legato alla transpeptidasi, liberando il quinto residuo (D-Ala) e rigenerando l'enzima per un nuovo ciclo (**figura 2**) (12).

È proprio questa terza fase della biosintesi del peptidoglicano a rappresentare il bersaglio degli antibiotici β -lattamici. L'assenza di peptidoglicano e di transpeptidasi nelle cellule eucariotiche garantisce la tossicità selettiva di questi farmaci, rendendone sicuro l'utilizzo sia negli animali sia nell'uomo (11–14).

1.4 PATOGENI CRITICI NELL'AMBITO DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA

La comunità internazionale si trova ad affrontare una crisi crescente di infezioni resistenti agli antibiotici nei pazienti, che rappresenta una minaccia persistente e in aumento per la salute pubblica. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha pubblicato un elenco aggiornato di 15 famiglie di batteri che costituiscono una minaccia significativa per la salute umana, suddividendoli in tre gruppi di priorità in base all'urgenza di sviluppare nuovi antibiotici per combatterli (**tabella 1**) (15).

Il gruppo a più alta criticità comprende batteri Gram-negativi multiresistenti come *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e alcune Enterobacterales quali *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* e specie di *Enterobacter*, oltre a *Mycobacterium tuberculosis* resistente alla rifampicina.

- *Acinetobacter baumannii* ha sviluppato resistenza ai carbapenemi, classe di antibiotici considerata tra le ultime linee di difesa disponibili;
- le Enterobacterales mostrano resistenza sia ai carbapenemi sia alle cefalosporine di terza generazione, quest'ultima riconosciuta come categoria a sé stante data la sua rilevanza clinica ed epidemiologica, rendendo il loro trattamento clinico particolarmente complesso (15);
- *Mycobacterium tuberculosis* rifampicino-resistente (RR-TB) è incluso in questo gruppo per la sua elevata trasmissibilità per via aerea, il consistente carico di malattia globale e le limitate opzioni terapeutiche disponibili (15).

Questi batteri possono causare infezioni gravi e potenzialmente fatali, soprattutto nei pazienti ricoverati in ospedali e case di cura o in quelli che necessitano di ventilatori e cateteri, dando luogo a condizioni come polmonite e infezioni del flusso sanguigno (9).

La categoria ad alta priorità include patogeni il cui profilo di resistenza desta particolare preoccupazione sul piano terapeutico:

- *Enterococcus faecium* ha sviluppato resistenza alla vancomicina, glicopeptide tradizionalmente impiegato come farmaco di ultima istanza contro i batteri Gram-positivi. *Staphylococcus aureus* presenta invece resistenza alla meticillina, alla base della

ben nota sigla MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*), che identifica uno dei patogeni nosocomiali più temuti a livello mondiale (15).

- *Pseudomonas aeruginosa* ha sviluppato resistenza ai carbapenemi, complicando in modo significativo la gestione delle infezioni nosocomiali, in particolare tra i pazienti immunocompromessi (15).
- *Neisseria gonorrhoeae*, agente della gonorrea, ha sviluppato resistenza alle cefalosporine di terza generazione e/o ai fluorochinoloni, riducendo drasticamente le opzioni terapeutiche disponibili per una delle infezioni sessualmente trasmissibili più diffuse al mondo (15).
- *Salmonella Typhi* e *Salmonella* non tifoidea mostrano resistenza ai fluorochinoloni, complicando sensibilmente la gestione clinica del tifo e delle gastroenteriti batteriche, in particolare nei paesi a basso e medio reddito (15).
- *Shigella* spp., agente della dissenteria batterica, presenta anch'essa resistenza ai fluorochinoloni, classe di farmaci frequentemente impiegata nel trattamento delle infezioni intestinali gravi (15).

La categoria a media priorità comprende patogeni che, pur presentando profili di resistenza meno estremi, richiedono comunque un'attenta sorveglianza clinica ed epidemiologica:

- *Streptococcus pneumoniae*, principale responsabile di polmoniti, meningiti e otiti batteriche, mostra resistenza ai macrolidi, compromettendo uno dei regimi terapeutici comunemente impiegati (15).
- *Haemophilus influenzae*, coinvolto in infezioni respiratorie e meningiti, ha sviluppato resistenza all'ampicillina, antibiotico storicamente utilizzato nel suo trattamento (15).
- Lo Streptococco di gruppo A mostra resistenza ai macrolidi, mentre lo Streptococco di gruppo B presenta resistenza alla penicillina; entrambi i patogeni rivestono particolare rilevanza per il carico di malattia nelle popolazioni vulnerabili e nei paesi a basso e medio reddito (15).

Questi patogeni, pur potendo ancora essere trattati con antibiotici alternativi disponibili, testimoniano come la pressione selettiva esercitata dall'uso prolungato e indiscriminato degli antibiotici stia progressivamente erodendo l'efficacia anche di molecole un tempo considerate affidabili (5,6).

Patogeno	Fenotipo di resistenza
ALTA CRITICITÀ	
<i>Enterobacterales</i>	Resistenti ai carbapenemi
<i>Enterobacterales</i>	Resistenti alle cefalosporine di terza generazione
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Resistente ai carbapenemi
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Resistente alla rifampicina
ALTA PRIORITÀ	
<i>Salmonella Typhi</i>	Resistente ai fluorochinoloni
<i>Shigella spp.</i>	Resistente ai fluorochinoloni
<i>Enterococcus faecium</i>	Resistente alla vancomicina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente ai carbapenemi
<i>Salmonella non tifoidea</i>	Resistente ai fluorochinoloni
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Resistente a cefalosporine di 3ª gen. e/o fluorochinoloni
<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistente alla meticillina (MRSA)
MEDIA PRIORITÀ	
<i>Streptococco di gruppo A</i>	Resistente ai macrolidi
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Resistente ai macrolidi
<i>Haemophilus influenzae</i>	Resistente all'ampicillina
<i>Streptococco di gruppo B</i>	Resistente alla penicillina

Tabella 1. Elenco dei patogeni prioritari secondo l' Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) aggiornato al 2024 (15)

La resistenza nelle principali classi di farmaci, come i beta-lattamici e i fluorochinoloni, è particolarmente diffusa, e molte infezioni batteriche sono nuovamente intrattabili o richiedono il ricorso ad antibiotici di nuova generazione (4,8).

È stato riscontrato che questa resistenza si è sviluppata in tali specie batteriche principalmente a seguito dell'acquisizione di plasmidi attraverso il trasferimento orizzontale di geni di resistenza (5). La rapidità con cui la resistenza si è estesa agli antibiotici di terza e quarta generazione rappresenta una fonte di crescente preoccupazione per la comunità scientifica internazionale (9).

1.5 PRINCIPALI MECCANISMI COINVOLTI NELLA RESISTENZA

1.5.1 Resistenza intrinseca del batterio

I batteri possono essere intrinsecamente resistenti a determinati antibiotici, oppure acquisire resistenza tramite mutazioni nei geni cromosomici o trasferimento genico orizzontale. La *resistenza intrinseca* riflette caratteristiche strutturali o funzionali proprie della specie batterica: l'esempio più semplice è l'assenza di un bersaglio suscettibile per un determinato antibiotico, oppure, nei Gram-negativi, l'incapacità del farmaco di attraversare la membrana esterna lipopolisaccaridica (**figura 3**).

Studi recenti, condotti tramite screening ad alto rendimento di librerie genomiche mutanti in batteri come *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, hanno identificato i geni responsabili della resistenza intrinseca a β -lattamici, fluorochinoloni e aminoglicosidi, una conoscenza che può guidare lo sviluppo di nuove combinazioni terapeutiche con attività migliorata o ampliata contro le specie bersaglio (16).

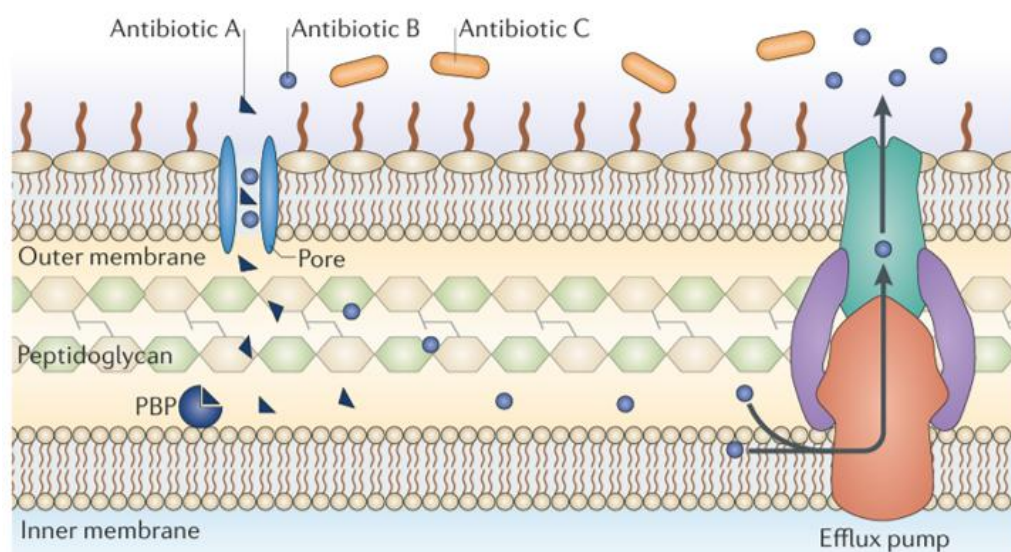


Figura 3. La figura mostra una panoramica dei meccanismi di resistenza intrinseca. L'esempio riportato riguarda gli antibiotici β -lattamici che agiscono sulla proteina legante la penicillina (PBP) come bersaglio. L'antibiotico A può entrare nella cellula attraverso una porina di membrana, raggiungere il proprio bersaglio e inibire la sintesi del peptidoglicano. Anche l'antibiotico B può entrare nella cellula tramite una porina, ma a differenza dell'antibiotico A viene efficacemente rimosso per efflusso. L'antibiotico C non riesce ad attraversare la membrana esterna e non può quindi raggiungere la PBP bersaglio.

1.5.2 Resistenza acquisita per riduzione di concentrazione intracellulare

Oltre alla resistenza intrinseca, i batteri possono acquisire resistenza attraverso meccanismi che agiscono su tre livelli: la riduzione delle concentrazioni intracellulari dell'antibiotico, l'alterazione del suo bersaglio, oppure la sua inattivazione diretta dell'antibiotico mediante idrolisi o modificazioni (16).

➤ Riduzione della concentrazione intracellulare per ridotta permeabilità di membrana

I batteri Gram-negativi sono intrinsecamente meno permeabili a molti antibiotici rispetto alle specie Gram-positive, poiché possiedono una membrana esterna lipopolisaccaridica, impermeabile all'acqua e alle molecole polari, che ne limita l'attraversamento. Tuttavia, alcuni antibiotici costituiti da molecole di piccole dimensioni e sotto forma di zwitterioni riescono ad attraversarla diffondendo tramite le porine di tale membrana.

La riduzione della permeabilità della membrana esterna e la limitazione dell'ingresso degli antibiotici nella cellula batterica si conseguono mediante la down-regulation delle porine o la loro sostituzione con canali più selettivi. Dati recenti hanno dimostrato che in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp., la riduzione dell'espressione delle porine contribuisce significativamente alla resistenza a farmaci più recenti come carbapenemi e cefalosporine, la cui resistenza è solitamente mediata dalla degradazione enzimatica (16).

➤ Riduzione della concentrazione intracellulare per aumento dell'efflusso

Le pompe di efflusso batteriche trasportano attivamente molti antibiotici fuori dalla cellula e contribuiscono in modo significativo alla resistenza intrinseca dei batteri Gram-negativi a molti dei farmaci utilizzabili per trattare le infezioni batteriche Gram-positive. Se sovraesprese, possono conferire elevati livelli di resistenza ad antibiotici precedentemente efficaci dal punto di vista clinico. Mentre alcune pompe presentano una specificità di substrato ristretta (ad esempio, le pompe Tet), molte trasportano un'ampia gamma di substrati strutturalmente dissimili e sono note come pompe di efflusso multi-farmaco resistenti (MDR). Sebbene tutti i batteri portino sui loro cromosomi geni che codificano per pompe di efflusso MDR, alcuni di essi sono stati mobilitati su plasmidi trasferibili tra batteri, un primo esempio di come la collocazione genica influenzi la diffusione della resistenza, tema su cui torneremo più avanti.

La famiglia RND di pompe di efflusso MDR, presente nei batteri Gram-negativi e meglio caratterizzata tra i trasportatori di efflusso MDR clinicamente rilevanti, esporta una gamma estremamente ampia di substrati quando sovraespressa.

L'elevata espressione dei geni di efflusso osservata nei batteri multi-farmaco resistenti è spesso dovuta a mutazioni nella rete regolatoria che controlla l'espressione. Queste mutazioni possono trovarsi all'interno di un repressore locale, di un fattore di trascrizione globale o di siti intergenici che alterano l'espressione dei geni di pompa o dei loro regolatori (1,16)

1.5.3 Alterazione dei bersagli degli antibiotici

➤ Per mutazione genetica

La maggior parte degli antibiotici si lega specificamente ai propri bersagli con elevata affinità, bloccandone così la normale attività. Una mutazione che altera la struttura del bersaglio può conferire resistenza, a patto che il bersaglio mantenga comunque la propria funzione biologica nonostante il cambiamento. Poiché nel corso di un'infezione si formano spesso popolazioni batteriche ampie e diversificate, è sufficiente che una singola mutazione puntiforme insorga in un sottogruppo di cellule perché i ceppi resistenti possano selezionarsi e proliferare. Quando il gene che codifica il bersaglio è presente in copie multiple, però, la resistenza completa richiede che la mutazione si stabilisca su tutte le copie, rendendo il processo più graduale.

La trasformazione, ovvero l'assorbimento di DNA dall'ambiente circostante, rappresenta un'altra via per acquisire resistenza: il DNA esterno può ricombinarsi con quello batterico dando origine a geni "a mosaico", responsabili della sintesi di proteine bersaglio non più riconosciute dall'antibiotico. L'esempio archetipico è la resistenza alla penicillina in *S. pneumoniae*, conferita da geni a mosaico della proteina legante la penicillina (PBP), che codificano enzimi ormai insensibili al farmaco (16).

➤ Modifica (e protezione) dei target

La protezione mediante modifica del bersaglio può anche essere un mezzo efficace di resistenza agli antibiotici che non richiedono mutazioni nei geni che codificano le molecole bersaglio. Un esempio è rappresentato dagli antibiotici glicosidici, inibitori della sintesi proteica che agiscono legandosi al ribosoma. Un meccanismo di resistenza agli aminoglicosidi è la modifica del ribosoma bersaglio mediante metilazione. Sebbene

precedentemente non fosse considerato un meccanismo clinicamente rilevante, gli enzimi responsabili sono stati recentemente rilevati in diversi patogeni batterici; ad esempio, il gene *armA*, che codifica per una metiltransferasi, è stato trovato in isolati clinici di *Enterobacteriaceae* (16).

1.5.4 Eliminazione diretta dell'antibiotico

➤ Inattivazione degli antibiotici mediante enzimi idrolitici

L'idrolisi di un antibiotico catalizzata da enzimi è uno dei più importanti meccanismi di resistenza agli antibiotici, rilevante fin dal primo utilizzo di questi ultimi con la scoperta della penicillinasi (una β -lattamasi) nel 1940. Da allora sono stati identificati enzimi in grado di degradare e modificare antibiotici di diverse classi, tra cui β -lattamici, aminoglicosidi, fenicoli e macrolidi. Esistono anche sottoclassi di enzimi che possono degradare diversi antibiotici della stessa classe: i β -lattamici quali penicilline, cefalosporine, clavami, carbapenemi e monobattami vengono idrolizzati da una vasta gamma di β -lattamasi.

L'introduzione di nuove classi di antibiotici e dei loro derivati, caratterizzati da proprietà farmacologiche migliorate, ha determinato l'insorgenza parallela di enzimi idrolitici con spettri di attività diversificati. I primi enzimi β -lattamasi, inizialmente efficaci nel neutralizzare gli antibiotici β -lattamici di prima generazione, sono stati seguiti dall'evoluzione di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL), caratterizzate da una maggiore capacità di inattivare le cefalosporine di nuova generazione, incluse le ossimino-cefalosporine.

La presenza di diverse ESBL e carbapenemasi, tra cui IMP, VIM, KPC, OXA ed enzimi NDM in batteri Gram-negativi come *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, ha determinato l'emergere di isolati resistenti a tutti gli antibiotici β -lattamici, con considerevoli implicazioni per il trattamento delle infezioni gravi, in particolare nei pazienti ospedalizzati (10,17,18).

➤ Inattivazione dell'antibiotico mediante trasferimento di un gruppo chimico

L'aggiunta di gruppi chimici a siti vulnerabili sulla molecola dell'antibiotico da parte di enzimi batterici causa la resistenza agli antibiotici impedendo il legame con la proteina bersaglio a causa dell'impedimento sterico. Possono essere trasferiti diversi gruppi, tra cui acilici, fosfati, nucleotidici e ribosilici, e gli enzimi responsabili formano una famiglia ampia e diversificata. Gli antibiotici aminoglicosidici sono particolarmente suscettibili a modifiche

poiché tendono ad essere molecole di grandi dimensioni con molti gruppi idrossilici e ammidici esposti. Gli enzimi che li modificano conferiscono elevati livelli di resistenza. Esistono tre classi principali: acetiltransferasi, fosfotransferasi e nucleotidiltransferasi. Sebbene evolutivamente diverse e variabili negli aminoglicosidi che possono modificare e nella parte della molecola interessata, recenti studi di dinamica molecolare hanno suggerito che tutti e tre sono in grado di legarsi agli aminoglicosidi poiché i loro siti attivi imitano l'ambiente bersaglio della fessura di legame ribosomiale (16).

1.5.5 Basi genetiche e trasmissione della resistenza

Come anticipato a proposito delle pompe di efflusso e delle carbapenemasi, i geni responsabili dei meccanismi di resistenza descritti possono essere localizzati sul cromosoma batterico oppure veicolati da elementi genetici mobili, quali plasmidi di resistenza e trasposoni (1). Questi ultimi costituiscono gli elementi genetici mobili più rilevanti, in quanto capaci di ospitare e diffondere un'ampia gamma di geni di resistenza (8).

Per sviluppare resistenza, i batteri utilizzano due strategie genetiche fondamentali: l'evoluzione verticale, o endogena, e quella orizzontale, o esogena (3). La prima si basa sulla formazione di mutazioni spontanee che aumentano la resistenza e si accumulano nel tempo; la seconda si fonda sul trasferimento di geni legati alla resistenza da un batterio a un altro attraverso tre meccanismi distinti: coniugazione, trasduzione e trasformazione (3). Attraverso un pilo coniugativo, un batterio resistente può scambiare materiale genetico trasferendo un plasmide di resistenza contenente geni per la resistenza agli antibiotici; il processo di trasformazione consiste invece nella modifica del genoma batterico mediante l'incorporazione di DNA esterno; la trasduzione, infine, comporta il trasferimento di DNA batterico tramite un vettore virale (3).

È stato inoltre scoperto che gli enterococchi portano plasmidi che conferiscono resistenza agli aminoglicosidi e all'ampicillina, e che i trasposoni possono essere incorporati sia nei plasmidi sia nei cromosomi batterici (3). Il trasferimento di geni di resistenza tra specie batteriche diverse può avere conseguenze particolarmente gravi, in quanto favorisce la diffusione di ceppi resistenti con un impatto significativo sulla salute pubblica (3).

1.6 IMPORTANZA DEI β -LATTAMICI

Gli antibiotici β -lattamici rappresentano la classe di agenti antibatterici più utilizzata nella pratica clinica moderna: nel periodo compreso tra il 2004 e il 2014 hanno costituito il 65% di tutte le prescrizioni di antibiotici iniettabili negli Stati Uniti. All'interno di questa classe, le cefalosporine dominano con quasi la metà delle prescrizioni totali di β -lattamici parenterali, seguite dalle penicilline ad ampio spettro (circa il 37%), dai carbapenemi (circa l'11%), dalle penicilline a spettro ristretto (circa il 3%) e dai monobattami (circa il 2%).

Il successo clinico di questi composti nasce dalla combinazione di un profilo di tollerabilità generalmente buono, un'elevata efficacia battericida e un'ampia disponibilità in diverse formulazioni. La principale limitazione è rappresentata dalle reazioni di ipersensibilità, che si manifestano in una minoranza di pazienti, soprattutto dopo la somministrazione di penicilline e cefalosporine, mentre le reazioni ai monobattami risultano significativamente meno frequenti.

Il nome " β -lattamico" deriva dalla presenza, comune a tutti i composti della classe, di un anello β -lattamico: un anello azotato a quattro atomi (azetidione) caratterizzato da elevata reattività chimica. È proprio questo nucleo strutturale a essere responsabile sia dell'attività biologica del farmaco sia della sua instabilità chimica, poiché risulta suscettibile all'idrolisi da parte delle β -lattamasi, gli enzimi batterici già descritti come uno dei principali meccanismi di resistenza (19–21).

A partire da questo nucleo comune si distinguono cinque sottoclassi principali:

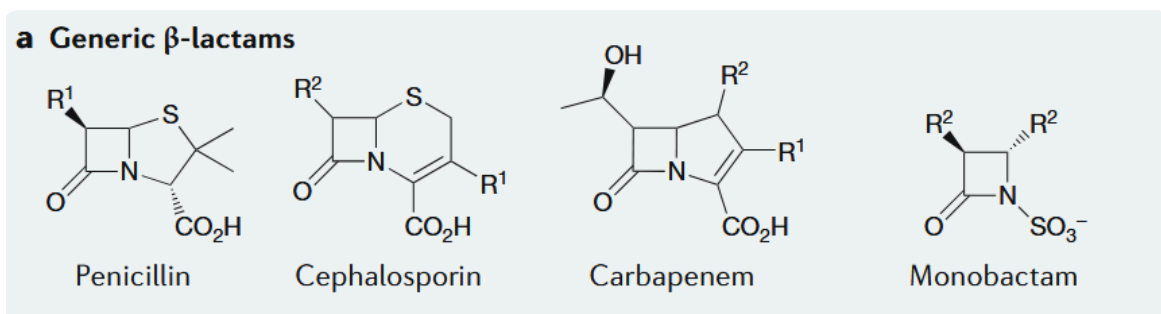


Figura 4. Struttura generale degli antibiotici β -lattamici (21)

- Le **penicilline** presentano il nucleo β -lattamico fuso a un anello tiazolidinico a cinque atomi, e comprendono sia molecole naturali (penicillina G, penicillina V) sia derivati semisintetici con spettro ampliato o maggiore stabilità enzimatica.
- Le **cefalosporine** hanno invece il nucleo fuso a un anello diidrotiazinico a sei atomi, e si vengono classificate in diverse “generazioni” (dalla I alla VI e oltre) strutturalmente in base alla presenza di diversi gruppi R_1 e R_2 che conferiscono un diverso spettro d'azione e stabilità nei confronti delle β -lattamasi.
- Le **cefamicine**, strutturalmente simili alle cefalosporine, si distinguono per un gruppo 7-metossi che conferisce loro una maggiore stabilità verso le β -lattamasi di tipo TEM.
- I **carbapenemi** presentano un anello a cinque termini in cui il carbonio sostituisce lo zolfo in posizione 1, il che conferisce loro un'attività ad ampio spettro e una spiccata stabilità nei confronti della maggior parte delle β -lattamasi.
- Infine, i **monobattami** sono composti monociclici, privi dell'anello fuso caratteristico delle altre sottoclassi, con un'attività selettiva verso i batteri aerobi Gram-negativi (21).

1.6.1 Meccanismo di interazione tra PBP e β -lattamici

Come visto nel paragrafo precedente, le transpeptidasi coinvolte nella fase finale della biosintesi del peptidoglicano rappresentano il bersaglio dei β -lattami; questi enzimi, localizzati nella membrana citoplasmatica batterica, sono comunemente noti come Penicillin-Binding Proteins (PBP), le proteine leganti la penicillina. Il meccanismo d'azione dei β -lattamici si basa proprio sull'inibizione della sintesi della parete cellulare mediante legame covalente con queste proteine.

Ogni specie batterica possiede un profilo caratteristico di PBP, che può comprendere da tre a otto enzimi differenti, ciascuno con una specifica funzione e affinità per i diversi β -lattamici: è proprio questa variabilità interspecifica ad essere alla base delle differenze nello spettro d'attività osservate tra i vari composti della classe.

Il fondamento molecolare dell'interazione tra β -lattamici e PBP fu chiarito per la prima volta da Tipper e Strominger nel 1965, i quali osservarono una notevole analogia strutturale tra la penicillina G e il dipeptide terminale D-Ala-D-Ala del peptidoglicano nascente nella cellula batterica in divisione. È proprio questa somiglianza a spiegare il meccanismo d'azione: il farmaco agisce come un analogo del substrato naturale, ingannando l'enzima e legandosi irreversibilmente al suo sito attivo (**figura 5**) (11).

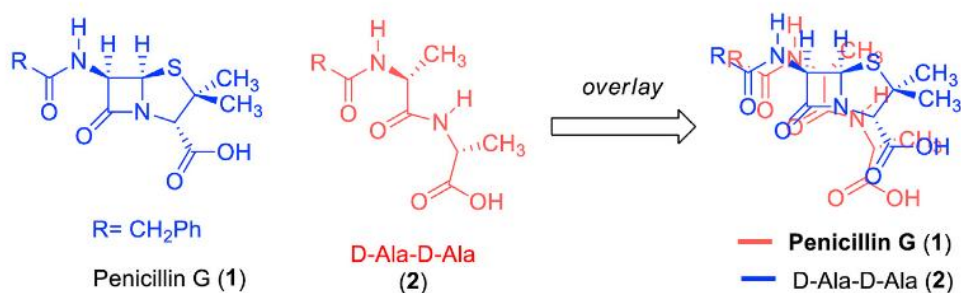
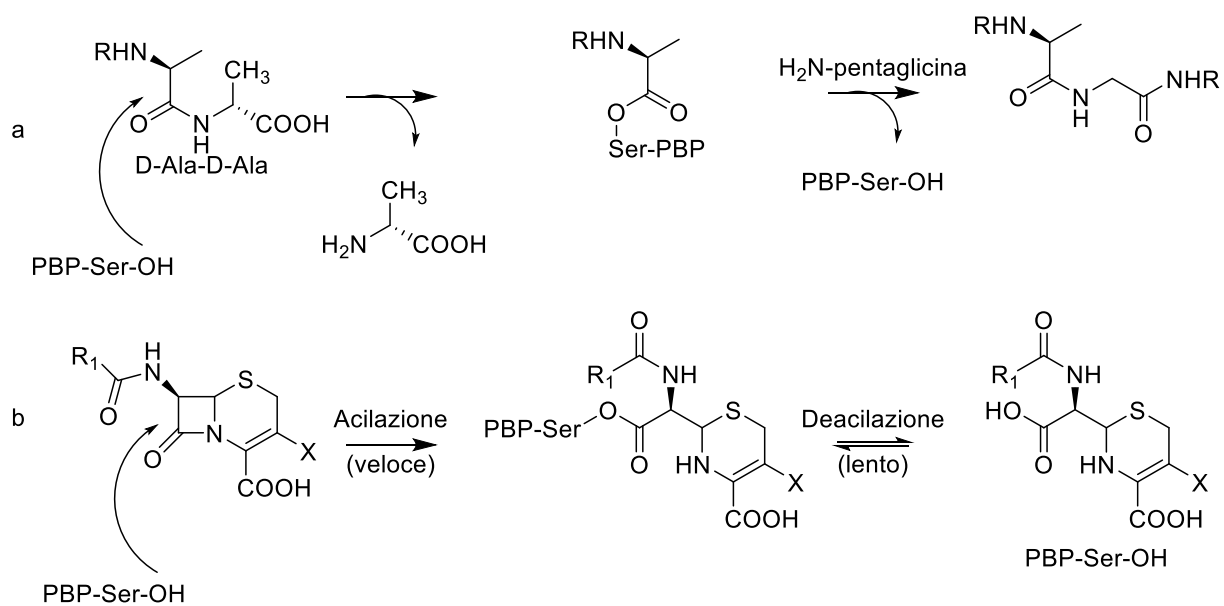


Figura 5. Sovrapposizione tra la penicillina G (1) e il dipeptide D-Ala-D-Ala (2) (11)

Il processo si articola in tre fasi principali (**Schema 1**): Nella prima, di riconoscimento e legame, il β -lattamico si avvicina al sito attivo della PBP, che contiene un residuo di serina catalitica essenziale per l'attività enzimatica, venendo riconosciuto dall'enzima proprio grazie alla sua somiglianza strutturale con il substrato naturale D-Ala-D-Ala.

Segue l'acilazione della serina: l'anello β -lattamico subisce un attacco nucleofilo da parte del gruppo ossidrilico (-OH) della serina del sito attivo, con conseguente apertura dell'anello e formazione di un complesso acil-enzima covalente, una reazione analoga al primo step della normale reazione con il substrato fisiologico, ma che produce un complesso molto più stabile. Si arriva così al blocco dell'attività enzimatica: proprio perché il complesso acil-enzima è più stabile dell'intermedio che si formerebbe con il substrato naturale, la deacilazione risulta estremamente lenta, e l'enzima rimane inattivo per un tempo prolungato. Il risultato finale è l'inibizione della transpeptidazione, ovvero il cross-linking tra le catene peptidiche del peptidoglicano indispensabile per la rigidità e l'integrità strutturale della parete cellulare.



Schema 1. *Formazione del legame peptidico nella parete cellulare (a) e meccanismo d'azione degli antibiotici β -lattamici (b).*

Vale la pena sottolineare che l'enzima inattivato può lentamente idrolizzare il legame acilico, liberando una forma microbiologicamente inattiva del farmaco; tuttavia, questo processo è talmente lento da non avere alcuna rilevanza clinica nell'arco del trattamento (11,19,21).

1.7 CLASSIFICAZIONE β -LATTAMASI

Per la classificazione delle β -lattamasi esistono due sistemi principali. Il primo è la classificazione molecolare di Ambler, che distingue quattro classi (A, B, C e D) sulla base della sequenza amminoacidica: le classi A, C e D raggruppano le serina- β -lattamasi, mentre la classe B comprende le metallo- β -lattamasi (MBL). Il secondo è lo schema funzionale di Bush-Jacoby-Medeiros, che organizza gli enzimi in base ai profili di idrolisi del substrato e alla risposta agli inibitori, articolandosi in quattro gruppi principali: il gruppo 1, il gruppo 2, a sua volta suddiviso nei sottogruppi 2a, 2b, 2br, 2d, 2be, 2c e 2f, e il gruppo 3.

La nomenclatura delle singole β -lattamasi non è mai stata standardizzata: i nomi sono stati attribuiti dai singoli autori sulla base di criteri eterogenei, talvolta creativi, che includevano riferimenti geografici o descrizioni funzionali. Solo con la diffusione del sequenziamento del DNA negli anni '90 i nuovi enzimi ad alta omologia con un enzima di riferimento hanno iniziato a essere numerati progressivamente all'interno della stessa famiglia (**tabella 2**) (22).

Ambler class ^a : catalytic site (spectrum)	Bush-Jacoby-Medeiros group ^b : catalytic site (spectrum)	Substrates	Inhibited by	Examples
A: serine (variable)	2a: serine (penicillinases)	Penicillins	Clavulanate, avibactam and other newer inhibitors ^a	Penicillinases from Gram-positive bacteria
	2b: serine (penicillinases)	Penicillins and narrow-spectrum cephalosporins	Clavulanate, avibactam and other newer inhibitors	TEM-1, TEM-2 and SHV-1
	2be: serine (ESBLs)	Penicillins and cephalosporins, including extended-spectrum	Clavulanate, avibactam and other newer inhibitors	SHV-2, TEM-10, CTX-M and GES-1
	2br: serine (inhibitor-resistant)	Penicillins	Avibactam and other newer inhibitors	TEM-30 and SHV-72
	2c: serine (penicillinases)	Penicillins and carbenicillin	Clavulanate, avibactam and other newer inhibitors	PSE (CARB)
	2f: serine (carbapenemases)	Penicillins, cephalosporins and carbapenems	Avibactam and other newer inhibitors	KPC, SME, NMC-A and GES-2
B: metallo (carbapenemase)	3: metallo (carbapenemases)	Most β -lactams, including carbapenems, but not monobactams	Chelating agents (EDTA) and ANT431	IMP, VIM and NDM
C ^b : serine (cephalosporinases)	1: serine (cephalosporinases)	Penicillins and cephalosporins	Cloxacillin, avibactam and other newer inhibitors	Chromosomal AmpC, CMY, ACT-1 and DHA
D ^c : serine (oxacillinases)	2d: serine (oxacillinases)	Penicillins and cloxacillin; some include cephalosporins and/or carbapenems	Sodium chloride; some by clavulanate, avibactam and other newer inhibitors	OXA-1/30, OXA-10, OXA-23 and OXA-48

Tabella 2. Confronto tra i due schemi di classificazione delle β -lattamasi (22)

1.7.1 Classe A

- **Serina- β -lattamasi ad ampio spettro**

Le β -lattamasi di classe A costituiscono il gruppo più numeroso e versatile e sono suddivise in diversi sottogruppi. Nei Gram (-), quelle appartenenti al gruppo funzionale 2b, note come penicillinasi ad ampio spettro, sono in grado di idrolizzare le prime penicilline e cefalosporine introdotte nella pratica clinica. Tra le più diffuse negli Enterobacteriaceae figurano TEM-1 e SHV-1: la prima era il principale determinante della resistenza all'ampicillina in *Escherichia coli* prima della comparsa delle ESBL, e rimane tuttora il maggior responsabile della resistenza alle penicilline in *Neisseria gonorrhoeae*; la seconda era invece più frequentemente associata alla resistenza all'ampicillina in *Klebsiella pneumoniae* (22).

- **β -lattamasi a spettro esteso (ESBL)**

Le ESBL di classe A (gruppo funzionale 2be) derivano principalmente da mutazioni puntiformi a carico degli enzimi TEM e SHV, che ne ampliano il profilo di substrato includendo penicilline e cefalosporine sia a spettro ristretto che ampliato, la sostituzione di Gly238 con Ser, Ala o Asp rappresenta una delle alterazioni più ricorrenti in entrambi i tipi. Sebbene TEM e SHV abbiano dominato il panorama nel primo decennio di rilevamento delle ESBL, la loro rilevanza clinica è progressivamente diminuita con l'emergere e la rapida diffusione globale delle β -lattamasi di tipo CTX-M, oggi le ESBL più comuni a livello mondiale. Questi enzimi, suddivisi in cinque cluster filogenetici, mostrano una preferenza idrolitica per cefotaxime e ceftriaxone rispetto alla ceftazidima, e risultano efficacemente inibiti da tazobactam e dai nuovi inibitori come avibactam, relebactam e vaborbactam. Oltre a *E. coli* e *K. pneumoniae*, i produttori di CTX-M sono stati identificati in numerose altre specie di Enterobacteriaceae e in alcuni batteri non fermentanti. Tra le altre famiglie di ESBL clinicamente rilevanti, seppur con prevalenza nettamente inferiore, si annoverano GES, PER, VEB, BES, BEL, SFO e TLA (22).

- **β -lattamasi di classe A resistenti agli inibitori**

Le varianti TEM e SHV del gruppo funzionale 2br presentano sostituzioni amminoacidiche che conferiscono refrattarietà all'inibizione da parte di acido clavulanico e sulbactam, pur

mantenendo nella maggior parte dei casi la suscettibilità a tazobactam e avibactam. La maggior parte di questi enzimi sono derivati di TEM-1, nei quali specifiche mutazioni puntiformi a carico di residui chiave riducono l'affinità per gli inibitori; paradossalmente, tali mutazioni riducono anche l'efficienza idrolitica verso alcune penicilline e cefalosporine come la cefalotina, preservando così la sensibilità dell'organismo produttore a questi agenti. Esistono inoltre varianti cosiddette "TEM mutanti complesse", che combinano il fenotipo ESBL con la resistenza agli inibitori (22).

- **Carbapenemasi seriniche**

All'interno della classe A, gli enzimi capaci di idrolizzare i carbapenemi sono raccolti nel gruppo funzionale 2f e comprendono KPC, SME, NMC-A, IMI e alcune varianti di GES. Le varianti KPC-2 e KPC-3 sono le carbapenemasi seriniche più diffuse al mondo, rilevate principalmente in *K. pneumoniae* ma anche in altre Enterobacteriaceae, *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*; questi enzimi non sono suscettibili a clavulanato o tazobactam, ma vengono efficacemente inibiti da avibactam e vaborbactam. Gli enzimi GES erano originariamente classificati come ESBL, finché una singola mutazione puntiforme ha conferito ad alcune varianti (GES-2, GES-4, GES-11 e GES-14) la capacità di idrolizzare i carbapenemi. NMC-A e IMI sono invece carbapenemasi cromosomiche di *Enterobacter cloacae*, mentre SME è un enzima cromosomico esclusivo di *S. marcescens*, dotato di attività carbapenemasi ma con capacità idrolitica limitata verso le cefalosporine a spettro esteso (22,23).

1.7.2 Classe C

- **β -lattamasi di tipo AmpC**

Le AmpC (classe C di Ambler, gruppo funzionale 1) conferiscono resistenza alla maggior parte delle cefalosporine, incluse quelle a spettro esteso come ceftazidima, cefotaxime e ceftriaxone, nonché alle cefamicine; in minor misura, sono attive anche su penicilline e alcuni monobattami. Naturalmente cromosomiche in specie come *C. freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *S. marcescens* e *P. aeruginosa*, queste β -lattamasi possono essere indotte dall'esposizione a determinati β -lattamici oppure espresse costitutivamente ad alti livelli. Le varianti plasmidiche, tra cui CMY-1 e le famiglie MIR, ACT e DHA, sono denominate anche cefamicinasi per la loro spiccata attività idrolitica verso il cefoxitino,

sostenuta da promotori forti e da un alto numero di copie geniche. Negli isolati di *K. pneumoniae* e *Salmonella enterica* portatori di AmpC plasmidiche, la concomitante perdita delle proteine porine può determinare resistenza anche ai carbapenemi (22).

1.7.3 Classe D

- **β -lattamasi idrolizzanti l'oxacillina (OXA)**

Gli enzimi OXA, appartenenti alla classe molecolare D (gruppo funzionale 2d), costituiscono un gruppo eterogeneo con ampia variabilità di substrati e sequenze, distinto dalle altre classi per una bassa identità amminoacidica (inferiore al 20%) con le classi A e C. Mostrano generalmente una maggiore attività idrolitica verso l'oxacillina rispetto alla penicillina G, e alcuni membri sono in grado di idrolizzare anche cefalosporine o carbapenemi; la loro suscettibilità agli inibitori è variabile, debolmente inibiti dal clavulanato, alcuni risultano invece sensibili a tazobactam e avibactam. Varianti come OXA-11 e OXA-14–20 sono associate a fenotipo ESBL, mentre OXA-48 e gli enzimi correlati (OXA-162, OXA-163, OXA-181 e OXA-232) hanno acquisito rilevanza crescente per la loro capacità carbapenemolitica e per la diffusione tra le Enterobacteriaceae in Europa e nel bacino del Mediterraneo. I ceppi produttori di OXA-48 con MIC elevate ai carbapenemi presentano spesso un meccanismo di resistenza aggiuntivo di natura non enzimatica (22).

1.7.4 Classe B

- **Metallo- β -lattamasi (MBL)**

Le metallo- β -lattamasi sono enzimi zinco-dipendenti appartenenti alla classe B di Ambler (gruppo 3 di Bush–Jacoby–Medeiros), noti per la loro capacità di idrolizzare praticamente tutti gli antibiotici β -lattamici, carbapenemi inclusi, con la sola eccezione dei monobattami come l'aztreonam, quest'ultimo, tuttavia, viene spesso inattivato da serina- β -lattamasi co-prodotte dagli stessi batteri, rendendo di fatto il profilo di resistenza ancora più ampio e difficile da gestire clinicamente.

Le MBL possono essere inibite da agenti chelanti come l'EDTA, ma risultano insensibili alla maggior parte degli inibitori delle β -lattamasi oggi disponibili in clinica, inclusi gli attuali inibitori approvati dalla FDA: una caratteristica che le rende uno dei meccanismi di resistenza batterica più temibili. La loro frequente localizzazione su elementi genetici mobili

plasmidici ne favorisce ulteriormente la diffusione, facilitando al contempo l'acquisizione di geni di resistenza ad altre classi di antimicrobici. Tra le varianti acquisite clinicamente più rilevanti figurano IMP, VIM e NDM, oggi identificate in tutto il mondo in isolati di Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (19,22,23).

1.7.5 Sottoclassi delle MBL

Le MBL sono suddivise in tre sottoclassi (B1, B2 e B3) sulla base della similarità strutturale, una classificazione tuttora valida nonostante l'aggiunta di nuovi enzimi nel tempo.

Pur presentando notevoli differenze di sequenza tra le sottoclassi, tutte le MBL condividono una struttura tridimensionale comune, denominata ripiegamento $\alpha\beta\beta\alpha$, ampiamente conservata in natura e caratteristica di una vasta superfamiglia di metallo-enzimi binucleari. Il sito attivo è collocato tra i due foglietti β centrali, e le differenze tra le sottoclassi riguardano principalmente i residui che coordinano lo zinco e gli elementi strutturali circostanti, responsabili della specificità verso substrati e inibitori (**figura 6**) (22).

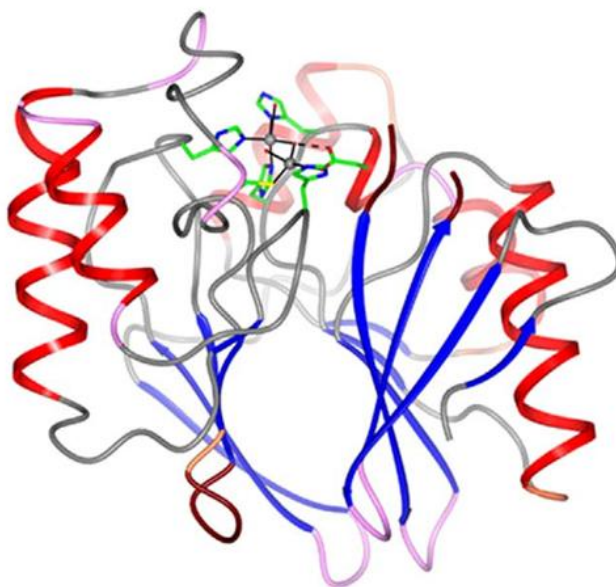


Figura 6. Il fold delle MBL; a posizione del sito attivo è mostrata rappresentando i residui del sito attivo come bastoncini (22).

Tutte le MBL presentano due potenziali siti di legame per lo zinco, ma il numero di ioni effettivamente presenti nell'enzima attivo varia tra le sottoclassi, in base a fattori quali la rete di legami idrogeno del sito attivo, eventuali modificazioni dei residui di cisteina e le condizioni sperimentali. In linea generale, le sottoclassi B1 e B3 funzionano come enzimi

di-zinco, in cui la presenza del secondo ione metallico potenzia l'attività catalitica; gli enzimi B2, al contrario, sono attivi solo nella forma mono-zinco, poiché il legame del secondo ione zinco esercita un effetto inibitorio di tipo non competitivo (22,23).

Dal punto di vista strutturale, negli enzimi **B1** il primo sito zinco (Zn1) è coordinato da tre residui istidinici conservati, mentre il secondo sito (Zn2) coinvolge residui di aspartato, cisteina e istidina, in una geometria bipiramidale trigonale lievemente distorta (**figura 7**).

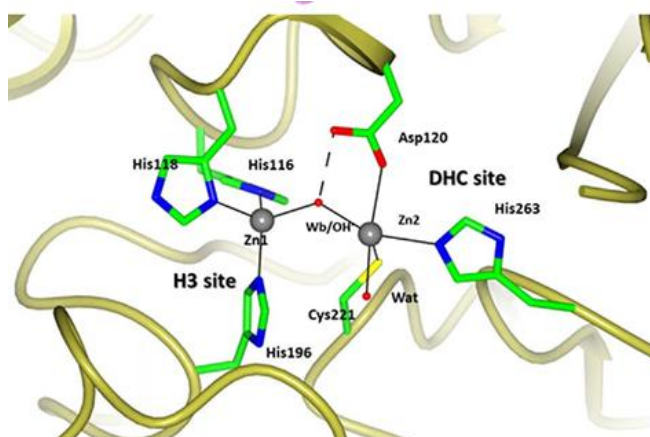


Figura 7. Sottoclasse B1: sito attivo e sfera di coordinazione dello zinco (22)

Negli enzimi **B2**, la posizione 116 è occupata da un residuo di asparagina al posto dell'istidina, e la catalisi avviene esclusivamente a livello del sito Zn2 (**figura 8**).

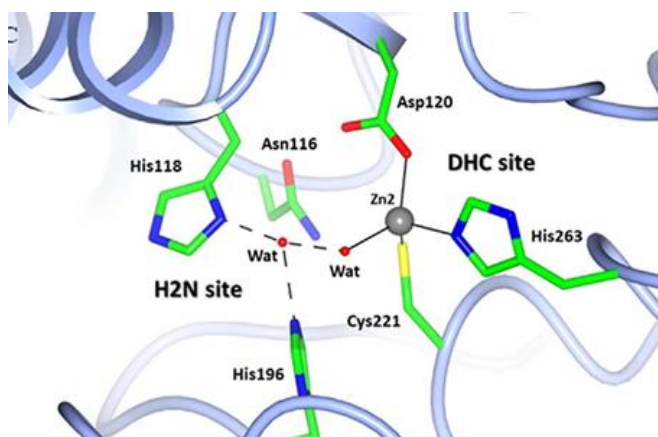


Figura 8. Sottoclasse B2: sito attivo e sfera di coordinazione dello zinco (22)

Nella sottoclasse **B3**, la posizione 116 può ospitare istidina o glutammina, e il sito Zn2 presenta una combinazione inusuale di ligandi costituita da un aspartato e due istidine, pur mantenendo la stessa geometria di coordinazione delle B1 (**figura 9**).

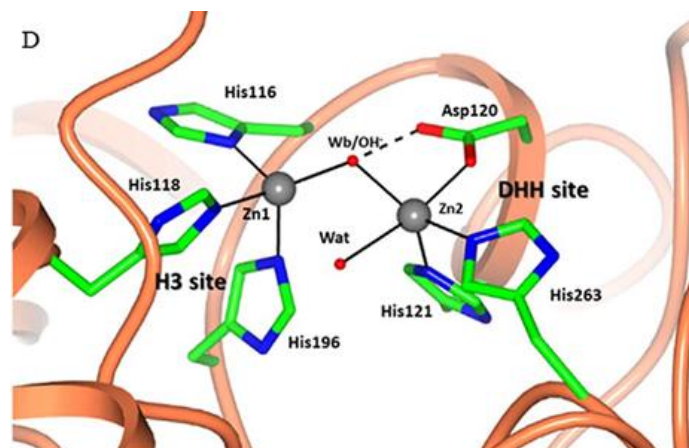
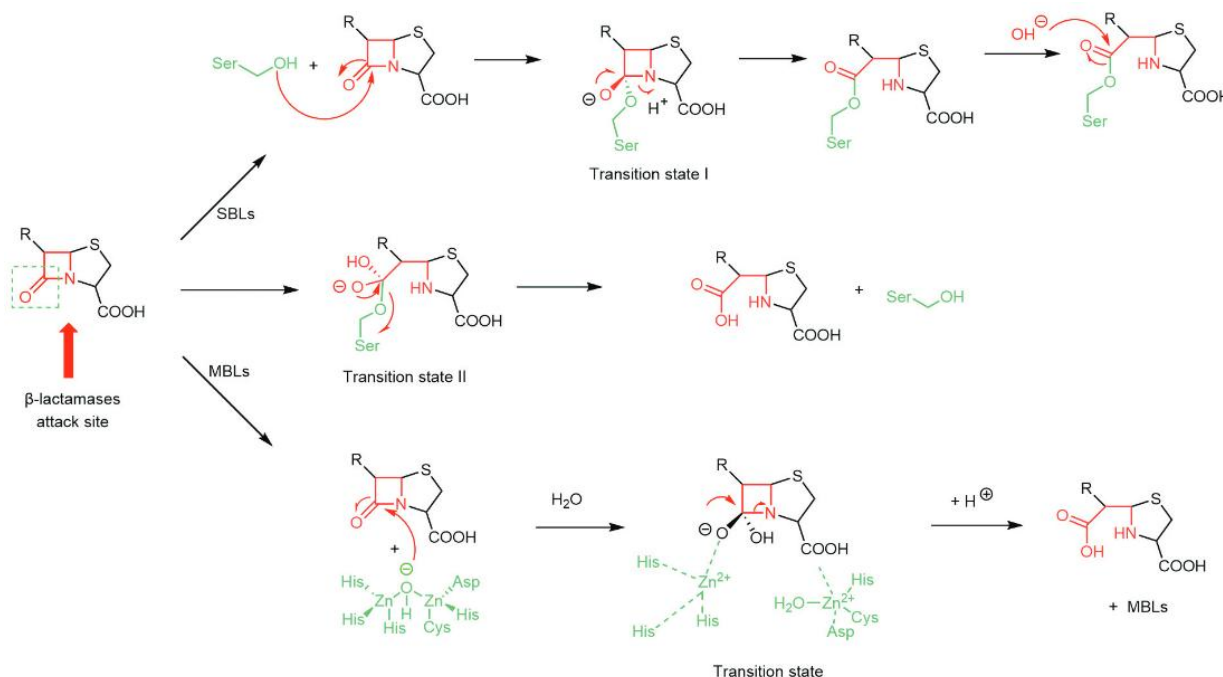


Figura 9. Sottoclasse B3: sito attivo e sfera di coordinazione dello zinco (22)

Un approccio efficace per classificare gli inibitori delle MBL consiste infine nel raggrupparli in base ai determinanti chimici con cui interagiscono con il sito attivo enzimatico (22,23).

1.8 MECCANISMI D'AZIONE DELLE β -LATTAMASI

Le β -lattamasi sono enzimi prodotti dai batteri capaci di idrolizzare il legame ammidico dell'anello β -lattamico a quattro termini, inattivando il farmaco prima che possa raggiungere il proprio bersaglio. Come visto nella classificazione di Ambler (paragrafo 1.7), questi enzimi si dividono in due macrocategorie che riflettono meccanismi catalitici radicalmente diversi: le serina- β -lattamasi (classi A, C e D) e le metallo- β -lattamasi di classe B.



Schema 2. Processo generale di idrolisi dei β -lattami da parte delle SBL e delle MBL (24)

1.8.1 Serina- β -lattamasi

Le serina- β -lattamasi sono distantemente correlate alle proteine leganti la penicillina (PBP), con le quali condividono un motivo invariante Ser-Xaa-Xaa-Lys, e impiegano questa stessa serina come nucleofilo nella reazione. Nonostante le tre classi differiscano sostanzialmente nella sequenza amminoacidica, tutte condividono un meccanismo catalitico comune basato su un ciclo di acilazione e deacilazione, analogo a quello delle serina-proteasi. Nella fase di acilazione, la serina nucleofila viene attivata da una base generale, attacca il carbonio carbonilico del legame ammidico β -lattamico e genera l'intermedio acil-enzima covalente attraverso uno stato di transizione ossanionico tetraedrico. La risoluzione di questo intermedio avviene quando una molecola d'acqua, la cosiddetta "deacylating water", viene a

sua volta attivata da una base generale per idrolizzare il legame acilico, liberando il prodotto degradato e rigenerando l'enzima libero (**schema 2**). Le tre classi divergono tuttavia nel dettaglio meccanicistico, in particolare per quanto riguarda l'identità dei residui che fungono da base generale nelle due fasi della reazione, un aspetto che costituisce ancora oggi un tema di dibattito scientifico attivo.

1.8.2 Metallo- β -lattamasi

Le metallo- β -lattamasi (MBL) di classe B sono invece prive di qualsiasi correlazione con le PBP e appartengono a un'antica e ampiamente distribuita superfamiglia di metallo-idrolasi. A differenza delle serina- β -lattamasi, non generano alcun intermedio covalente lungo il percorso di reazione: sfruttano invece un nucleofilo acqua/idrossido attivato dal metallo per guidare l'idrolisi. Come già visto a proposito delle sottoclassi B1, B2 e B3 (paragrafo 1.7.5), le differenze nell'architettura del centro metallico si riflettono anche sul meccanismo catalitico, sebbene il principio di fondo, l'attivazione di un nucleofilo acqueo mediata dallo zinco, resti comune a tutte e tre (**schema 2**).

Il loro spettro d'attività eccezionalmente ampio, che per gli enzimi binucleari include penicilline, cefalosporine e carbapenemi con la sola eccezione dei monobattami, enzimi come NDM e VIM, già incontrati nel paragrafo 1.7.4, ne sono un esempio emblematico, si accompagna a un'ulteriore criticità clinica: l'indipendenza da un meccanismo basato sulla serina rende le MBL insensibili a tutti gli inibitori delle β -lattamasi attualmente disponibili in clinica, rendendole la sfida terapeutica più complessa nel panorama attuale della resistenza antimicrobica (19–21).

1.9 STRATEGIA β -LATTAMICO + INIBITORE DI β -LATTAMASI

Gli antibiotici β -lattamici costituiscono la prima categoria di composti antibatterici di origine naturale a essere stata introdotta con successo in terapia e successivamente ottimizzata dall'industria farmaceutica. Nonostante l'importanza clinica già discussa nel paragrafo 1.6, condividono con gli altri agenti antibatterici impiegati in clinica una criticità fondamentale: la pressione selettiva esercitata dal loro utilizzo favorisce inevitabilmente l'emergenza di ceppi resistenti, i quali, una volta acquisiti i determinanti genetici di resistenza, sono in grado di propagarsi su scala mondiale con estrema rapidità, come testimoniato dalla diffusione globale di isolati di *K. pneumoniae* produttori di NDM-1 (23).

Per far fronte a questo fenomeno, l'industria farmaceutica ha percorso due strade principali e complementari: da un lato la messa a punto di molecole β -lattamiche intrinsecamente resistenti all'idrolisi enzimatica, come le cefalosporine di ultima generazione e i carbapenemi; dall'altro la progettazione di inibitori selettivi delle β -lattamasi (BLI), da co-formulare con un β -lattamico per proteggerlo dall'inattivazione enzimatica. È proprio questa seconda strategia, le combinazioni β -lattamico/inibitore, a rappresentare ancora oggi uno degli approcci più promettenti per contrastare l'evoluzione della resistenza, come vediamo nel dettaglio nel paragrafo che segue (22,23).

1.10 INIBITORI DI β -LATTAMASI

Lo sviluppo degli inibitori delle β -lattamasi non può essere compreso senza considerare il contesto che ne ha reso necessaria la nascita. Quando, negli anni Settanta, la penicillinasi TEM-1, già incontrata nel paragrafo 1.7.1, iniziò a comparire su plasmidi trasferibili in patogeni come *Neisseria gonorrhoeae* e *Haemophilus influenzae*, divenne evidente che penicilline e cefalosporine stavano rapidamente perdendo efficacia non solo contro questi microrganismi, ma anche contro i batteri enterici e *Pseudomonas aeruginosa*, tutti potenzialmente in grado di acquisire tale enzima. Fu proprio questa minaccia a stimolare la ricerca di molecole capaci di proteggere i β -lattamici dall'idrolisi enzimatica, dando origine alla categoria degli inibitori delle β -lattamasi (BLI).

Gli inibitori delle β -lattamasi sono molecole prive, nella quasi totalità dei casi, di una significativa attività antibatterica intrinseca quando utilizzate come agenti singoli: la loro funzione non è quella di uccidere direttamente il batterio, bensì quella di proteggere il β -

lattamico associato dall'inattivazione enzimatica, consentendogli di raggiungere il proprio bersaglio, le PBP, ed esercitare il proprio effetto battericida. Agendo in sinergia con il farmaco partner e inibendo le β -lattamasi sensibili, si comportano quindi come molecole "scudo", prive di autonomia terapeutica ma capaci di ripristinare e potenziare l'efficacia del β -lattamico in presenza di ceppi produttori di questi enzimi.

Fanno eccezione alcuni casi particolari: l'acido clavulanico presenta una modesta attività intrinseca nei confronti di *Neisseria gonorrhoeae*, mentre il sulbactam esercita una certa attività contro ceppi wild-type di *Acinetobacter* spp. e *Burkholderia cepacia*. Queste attività residue non sono tuttavia sufficienti a giustificare l'impiego in monoterapia, e vengono meno in presenza di meccanismi di resistenza multipli (20,21).

1.10.1 Inibitori "classici" di prima generazione

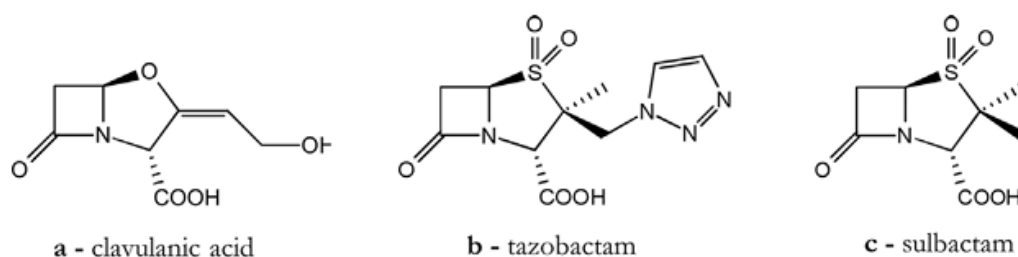


Figura 10. Raffigurazione della struttura chimica degli inibitori "classici" di prima generazione (23)

Clavulanato, tazobactam e sulbactam (figura 10) sono i tre BLI β -lattamici attualmente in commercio e appartengono alla categoria degli inattivatori "meccanismo-dipendenti" delle β -lattamasi. Il loro meccanismo d'azione ricalca, in senso inverso, l'acilazione già descritta per le PBP e le serina- β -lattamasi (paragrafi 1.6.1 e 1.8): anche qui si forma un legame covalente con la serina catalitica dell'enzima bersaglio, in questo caso la β -lattamasi stessa, ma il legame è irreversibile, e l'addotto risultante va incontro a idrolisi lenta o a frammentazione. Un aspetto particolarmente degno di nota è che la frammentazione della molecola inibitrice può generare un addotto inattivato con un'emivita superiore a quella dell'acil-enzima di partenza (25).

Dal punto di vista dello spettro d'azione, questi tre composti si comportano in modo sostanzialmente sovrapponibile, esercitando un'inibizione più efficace sulle β -lattamasi di classe A rispetto alle altre serina- β -lattamasi di classe C e D; sulle metallo- β -lattamasi, coerentemente con l'insensibilità già discussa nel paragrafo 1.8.2, non mostrano invece alcuna attività, anzi, sono proprio le MBL a poterli idrolizzare con una discreta efficienza enzimatica (26).

Con la diffusione clinica di queste combinazioni, non ha tardato a manifestarsi il fenomeno della resistenza. Gli isolati resistenti identificati in ambito ospedaliero avevano percorso due strade distinte: alcuni ospitavano β -lattamasi intrinsecamente poco sensibili all'inibizione, mentre altri avevano accumulato mutazioni nei geni codificanti questi enzimi, dando vita a varianti definite "resistenti agli inibitori". Questo secondo meccanismo è stato caratterizzato in dettaglio soprattutto negli enzimi TEM e SHV, nei quali determinate sostituzioni amminoacidiche risultavano responsabili delle alterazioni funzionali osservate (23).

Parallelamente, la ricerca di nuove combinazioni efficaci ha tratto impulso anche dall'ingegnerizzazione di molecole β -lattamiche con caratteristiche ottimizzate. La combinazione ceftolozano-tazobactam ne è un esempio significativo: l'accoppiamento di una cefalosporina di nuova generazione con il tazobactam garantisce una copertura nei confronti di numerosi enzimi clinicamente rilevanti, conferendo alla combinazione una spiccata attività antibatterica sui patogeni Gram-negativi, con risultati particolarmente rilevanti contro i ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* resistenti ai farmaci tradizionali (21,27).

Un ulteriore filone di ricerca ha esplorato l'introduzione di frazioni "sideroforo", ovvero chelanti del ferro, all'interno di molecole β -lattamiche modificate, indipendentemente dal loro uso in associazione con un inibitore. Questa strategia sfrutta i sistemi batterici di captazione del ferro per facilitare l'ingresso dell'antibiotico nella cellula, aggirando così le barriere di permeabilità che rendono difficoltoso il trattamento di certi patogeni Gram-negativi. I composti ottenuti con questo approccio, spesso definiti "cavalli di Troia" molecolari, hanno mostrato un'attività antibatterica di rilievo proprio contro quei microrganismi, come *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, la cui membrana esterna rappresenta un ostacolo naturale alla penetrazione dei farmaci (28).

1.10.2 Diazabicyclo-ottanoni: uno scaffold versatile di inibitori reversibili

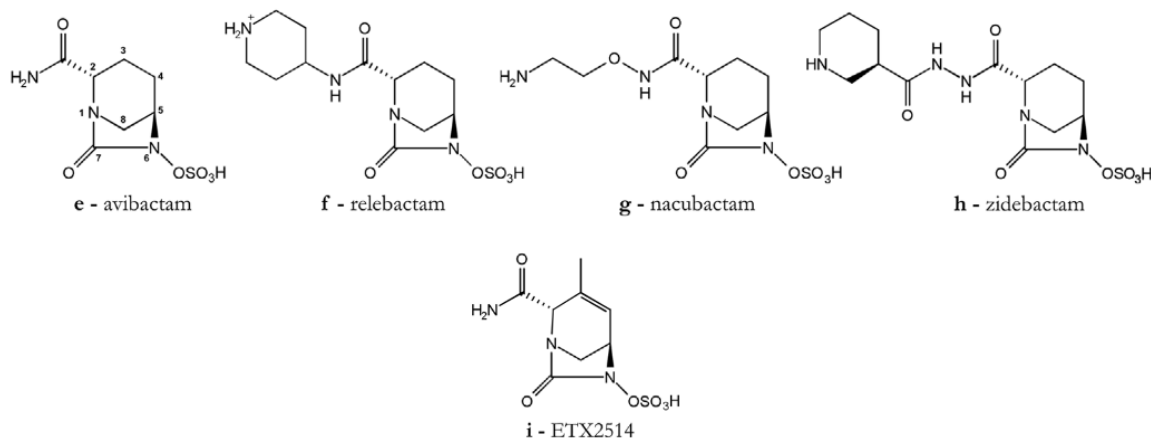


Figura 11. *Raffigurazione della struttura chimica dei principali diazabicyclo-ottanoni (23)*

La diffusione crescente di isolati MDR, XDR e PDR, le stesse categorie di resistenza multipla già introdotte nel paragrafo 1.9, ha reso sempre più urgente la ricerca di nuove combinazioni β -lattamico/inibitore capaci di aggirare i limiti dei BLI classici appena descritti e la resistenza agli agenti di ultima linea come i carbapenemi. Partendo dalle conoscenze sul meccanismo d'azione delle β -lattamasi, i ricercatori di Sanofi-Aventis hanno ideato una piccola molecola che mimasse strutturalmente i β -lattamici senza però esserlo, con l'obiettivo di sfuggire ai meccanismi di resistenza già noti (25). Da questo scaffold, i diazabicyclo-ottanoni (DABCO), è emersa una intera famiglia di composti di nuova generazione (**figura 11**).

- **AVIBACTAM**

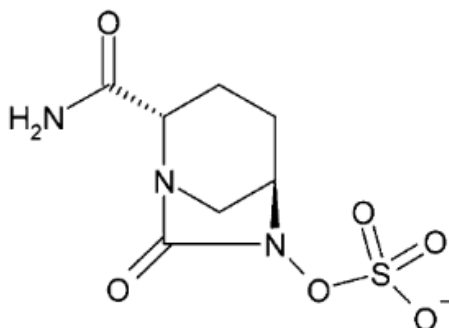


Figura 12. *Struttura chimica bidimensionale avibactam (29)*

Il primo e più studiato di questi composti presenta uno spettro d'azione decisamente più ampio rispetto al clavulanato: è attivo sulla maggior parte delle β -lattamasi di classe A,

comprese le carbapenemasi KPC, già incontrate nel paragrafo 1.7.1 come tra le più difficili da inibire, sugli enzimi di classe C sia cromosomici che plasmidici, e su alcune β -lattamasi di classe D, tra cui OXA-48.

Un aspetto che distingue nettamente l'avibactam dai BLI classici è il suo meccanismo d'azione: pur formando anch'esso un legame covalente con la serina catalitica, si comporta come inibitore reversibile, a differenza dell'irreversibilità che caratterizza clavulanato, tazobactam e sulbactam. Questo comportamento dipende dalla particolare conformazione che la molecola assume nel sito attivo dell'enzima: l'anello piperidinico, posizionato "sopra" il legame C7-N6 anziché lateralmente, impone all'inibitore una conformazione tesa. In queste condizioni, l'atomo N6 risulta un nucleofilo più reattivo della molecola d'acqua responsabile della deacilazione, favorendo così il lento ripristino della molecola originale e la liberazione dell'enzima (29–40).

Fa eccezione la carbapenemasi KPC-2, con la quale l'avibactam subisce una vera e propria trasformazione chimica: dopo la desolfatazione, si forma un intermedio imminico che porta al rilascio di 5-ossopiperidina-2-carbossammide, un percorso insolito e decisamente più complesso rispetto al meccanismo reversibile osservato con le altre β -lattamasi.

Prima della disponibilità clinica della combinazione ceftazidima-avibactam, i potenziali meccanismi di resistenza erano già stati studiati su varianti di laboratorio di AmpC e KPC-2. Vale la pena ricordare che KPC-2 idrolizza la ceftazidima con scarsa efficienza, il che gioca a favore dell'attività della combinazione sui ceppi produttori di questo enzima.

Più preoccupante è invece quanto emerso con KPC-3: varianti di questo enzima, selezionate durante trattamenti con ceftazidima-avibactam, sono state isolate da pazienti con resistenza fenotipica alla combinazione. Dato che KPC-3 è molto diffuso e idrolizza la ceftazidima meglio di KPC-2, la possibilità che singole mutazioni bastino a conferire resistenza è un segnale d'allarme concreto. Le varianti identificate presentavano sostituzioni nell'ansa omega o vicino al motivo KTG, e mostravano anche una ridotta attività idrolitica su carbapenemi, alcune cefalosporine e aztreonam, il che spiegherebbe perché alcuni, ma non tutti, gli isolati di *K. pneumoniae* portatori di queste mutazioni risultassero sensibili al meropenem. Sebbene i carbapenemi possano quindi rappresentare un'opzione terapeutica, il rischio che successive mutazioni ripristinino la resistenza, attraverso modifiche dell'enzima o riduzione della permeabilità di membrana, rimane concreto (23,29,31,34).

Il successo dell'avibactam ha dimostrato il potenziale dello scaffold DABCO non solo come inibitore di β -lattamasi, ma anche come inibitore delle PBP, aprendo la strada a composti con attività antibatterica intrinseca, una prospettiva che ha stimolato lo sviluppo di altri membri della classe.

- **RELEBACTAM**

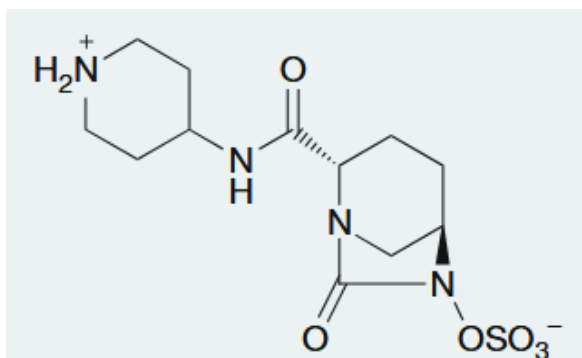


Figura 13. *Struttura chimica bidimensionale relebactam (22)*

Differisce dall'avibactam per la presenza di un gruppo piperidinio sulla catena laterale carbossamidica, ed è sviluppato in combinazione con imipenem-cilastatina, mostrando un profilo molto simile a quello dell'avibactam, con la sola eccezione di una minore efficacia su OXA-48. La combinazione con un carbapenemico, anziché con un'ossimino-cefalosporina, ne modifica leggermente il profilo di attività, soprattutto sulle Enterobacteriaceae produttrici di β -lattamasi di tipo OXA (21,36).

- **NACUBACTAM**

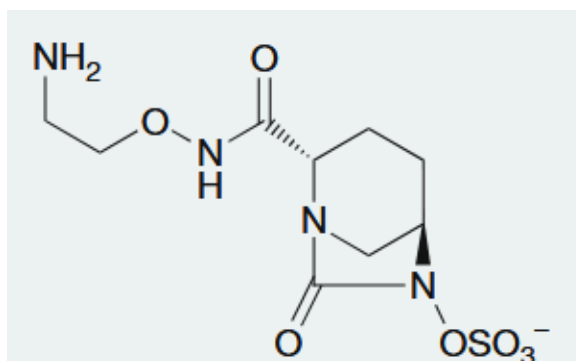


Figura 14. *Struttura chimica bidimensionale nacubactam (22)*

Porta il concetto un passo avanti: oltre a inibire le β -lattamasi, blocca efficacemente anche la PBP2, risultando in un'attività antibatterica intrinseca superiore a quella dell'avibactam (MIC 1–4 $\mu\text{g/ml}$ contro 8–32 $\mu\text{g/ml}$ su Enterobacteriaceae). Questa doppia azione si traduce in una sinergia marcata con numerosi β -lattamici, piperacillina, cefepime, aztreonam, meropenem, un effetto definito "potenziatore" che si mantiene anche nei mutanti resistenti, nonostante questi si selezionino con relativa facilità (23,37,38,40).

- **ZIDEBACTAM**

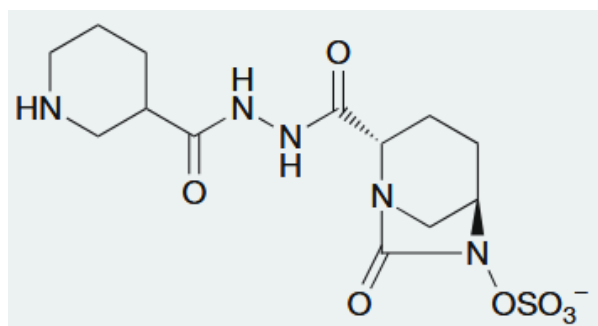


Figura 15. *Struttura chimica bidimensionale zidebactam (22)*

Sfrutta lo stesso principio, esercitando un effetto potenziatore analogo a quello del nacubactam tramite inibizione della PBP2 (39). Dal punto di vista strutturale, sia relebactam che nacubactam legano le β -lattamasi nello stesso modo dell'avibactam: i sostituenti aggiuntivi si proiettano verso l'esterno del sito attivo senza alterare le interazioni chiave,

fatta eccezione per il gruppo amminico terminale del nacubactam, che forma un contatto aggiuntivo con Gln145 (22,23).

- **ETX2514**

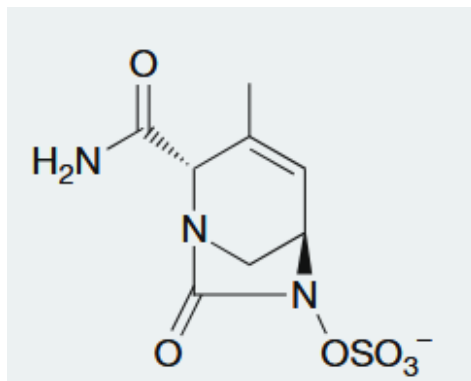


Figura 16. *Struttura bidimensionale ETX2514 (22)*

Una direzione diversa ha portato infine a questo composto, ottenuto modificando l'anello piperidinico dello scaffold DABCO. Combina inibizione delle β -lattamasi e della PBP2, con un'attività intrinseca sulle Enterobacteriaceae e una velocità di inibizione superiore rispetto ai predecessori, particolarmente rilevante sulle β -lattamasi di classe D, inclusa la carbapenemasi OXA-24 di *Acinetobacter*. La sua combinazione con sulbactam, che possiede, come già visto, una modesta attività intrinseca su *Acinetobacter*, ha mostrato risultati promettenti in vitro su isolati clinici di *A. baumannii* multiresistente (23).

CAPITOLO II - GLI ACIDI BORONICI

2.1 GLI ACIDI BORONICI COME INIBITORI DELLE β -LATTAMASI

Tra le strategie sviluppate per contrastare la resistenza batterica mediata dalle β -lattamasi, gli inibitori a base di acido boronico occupano oggi una posizione di particolare rilievo, distinguendosi sia dai classici inibitori β -lattamici (acido clavulanico, sulbactam, tazobactam) sia dai diazabiccicloottanoni (DBO), come l'avibactam (22). Le prime indagini sulla potenziale attività inibitoria di questi composti risalgono al 1971, quando Dobozy e collaboratori scoprirono che gli ioni borato erano in grado di inibire reversibilmente la β -lattamasi I (TEM-1) (41). Pochi anni dopo, nel 1978, Kiener e Waley svilupparono questa osservazione iniziale, dimostrando l'inibizione competitiva e reversibile di una β -lattamasi di classe A da *Bacillus cereus* utilizzando acido borico, acido fenilboronico e acido m-amminofenilboronico, e progettando questi composti specificamente per contrastare le β -lattamasi di classe C (23,24,41). Già in questa fase pionieristica gli autori si interrogarono sulla possibilità che tali composti agissero da inibitori covalenti reversibili, ipotesi poi confermata da studi successivi del laboratorio di Waley, che chiarirono come il legame tra acido boronico e β -lattamasi avvenisse tramite un intermedio tetraedrico di natura covalente e reversibile (**figura 17**) (41). Nonostante questa scoperta precoce, il pieno sviluppo clinico di questa classe si è concretizzato solo decenni più tardi, rendendo gli acidi boronici una delle strategie più recenti e promettenti nel panorama degli inibitori delle β -lattamasi (22).

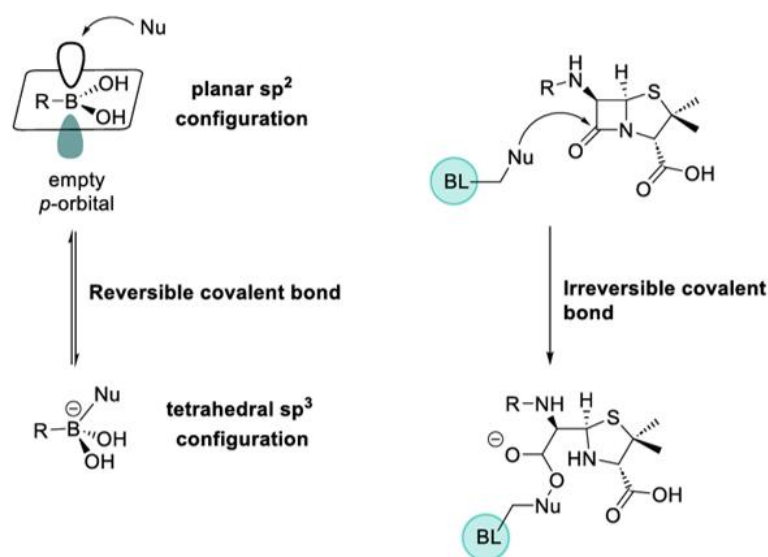


Figura 17. Confronto tra acidi boronici e β -lattami: re-ibridizzazione chimica e meccanismo dopo il legame con un'entità nucleofila (41).

2.2 COLLOCAZIONE STORICA RISPETTO ALLE ALTRE GENERAZIONI DI INIBITORI

Collocando gli inibitori contenenti boro nel contesto evolutivo degli inibitori delle β -lattamasi, è possibile osservare un chiaro percorso di miglioramento progressivo. Gli inibitori di prima generazione, basati sullo scaffold della penicillina (acido clavulanico, sulbactam, tazobactam), mostravano un'efficacia limitata principalmente alla classe A (24). Questi composti agiscono come inattivatori "suicidi" (*mechanism-based inactivators*), formando un addotto covalente irreversibile con la serina catalitica delle serina β -lattamasi, che evolve poi tramite lenta idrolisi alla frammentazione e rilascio della molecola inibitrice stessa idrolizzata e inattiva (23).

Gli inibitori di seconda generazione, caratterizzati da uno scaffold diazabicycloottanico (DBO) come l'avibactam, ampliarono lo spettro d'azione includendo anche le classi C e D, ma rimangono generalmente privi di attività significativa contro la classe B; inoltre, le loro vie sintetiche risultano particolarmente complesse, richiedendo spesso più di dodici passaggi di trasformazione chimica (24). A differenza degli inibitori β -lattamici classici, l'avibactam segue un meccanismo d'inibizione differente, legandosi in maniera covalente ma reversibile alla maggior parte delle β -lattamasi testate, con successiva rigenerazione dell'enzima attivo e dell'inibitore intatto (22,23).

A differenza sia degli inibitori β -lattamici sia dei DBO, gli inibitori a base di acido boronico possiedono scaffold chimici intrinsecamente flessibili, una caratteristica che ha permesso una modulazione fine delle proprietà farmacodinamiche e, in prospettiva, una copertura a spettro più ampio (41). In questo scenario evolutivo, gli acidi boronici si sono affermati come un'alternativa strutturalmente e meccanicamente distinta, capace in alcuni casi, specialmente nelle strutture cicliche e bicicliche, di superare anche i limiti imposti dai DBO, estendendo l'inibizione anche alle metallo- β -lattamasi di classe B (24). Questo risultato è stato favorito da un'osservazione strutturale chiave: le idrolasi seriniche dei mammiferi possiedono generalmente siti attivi stericamente vincolati, più adatti a ospitare composti lineari, mentre le β -lattamasi presentano siti attivi più ampi, capaci di accogliere molecole cicliche in grado di mimare con maggiore efficacia gli stati di transizione tetraedrici (23).

2.3 IL RAZIONALE CHIMICO: PERCHE' IL BORO?

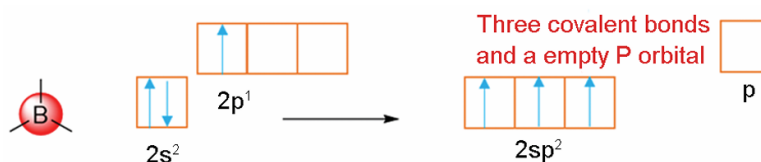


Figura 18. *Diagramma descrittivo degli orbitali elettronici del boro (24)*

Il razionale chimico alla base dell'attività degli acidi boronici risiede nelle proprietà intrinseche dell'atomo di boro, che nello stato trivalente adotta un'ibridazione sp^2 , formando tre legami covalenti e mantenendo un orbitale p vuoto. Questa configurazione elettronica rende il boro altamente elettrofilo, e gli conferisce carattere di acido di Lewis elettron-deficiente, consentendogli di interagire con nucleofili presenti nei siti attivi di numerosi enzimi (**figura 18**) (23,24,41). In seguito, ad attacco nucleofilo, come il gruppo idrossilico della serina catalitica delle β -lattamasi, l'atomo di boro subisce una reibridazione da uno stato trigonale planare (sp^2) a uno stato tetraedrico (sp^3), formando un addotto tetraedrico anionico (**figura 17 e 19**) (41). Questa transizione configurazionale rende gli acidi boronici eccellenti mimetici sia del gruppo carbonilico elettrofilo dell'anello β -lattamico sia dell'intermedio tetraedrico ad alta energia che si forma durante il meccanismo catalitico di idrolisi del β -lattame (24,41).

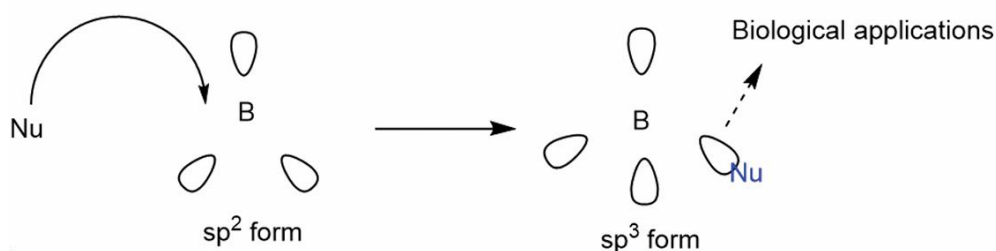


Figura 19. *Modifiche di configurazione del boro (24)*

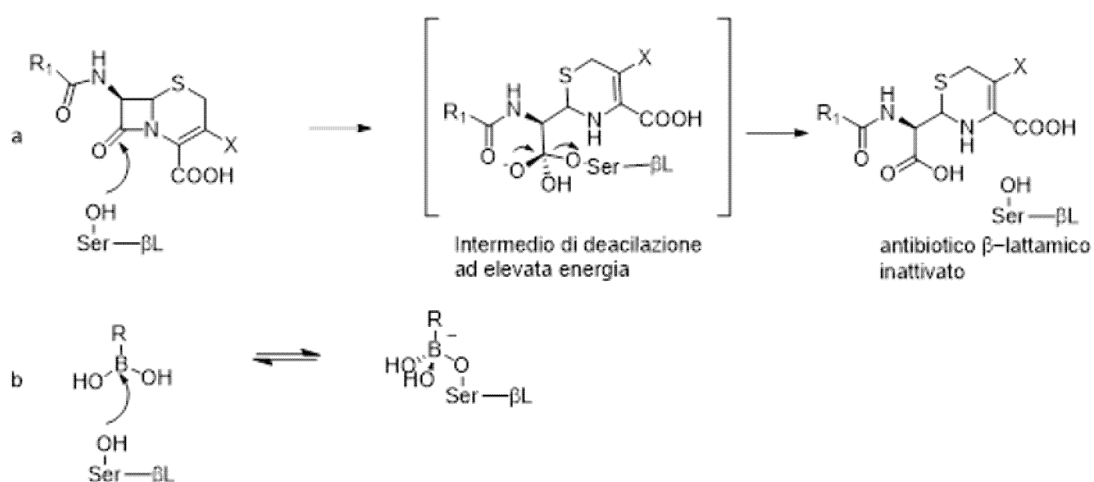
Da un punto di vista strutturale, il legame B–O presenta un parziale carattere di doppio legame ed è circa 0,06 Å più lungo rispetto a un legame singolo C–O (23).

Le peculiari proprietà elettroniche del boro conferiscono a questi composti un'elevata stabilità chimica, pur mantenendo la capacità di reagire reversibilmente con nucleofili (23,41).

Da un punto di vista funzionale, i composti contenenti boro possono agire secondo due modalità distinte (24). La maggior parte di essi inibisce esclusivamente le serina β -lattamasi (SBL), legandosi covalentemente al residuo di serina catalitico presente nel sito attivo dell'enzima, attraverso la formazione di un legame covalente reversibile che blocca efficacemente il sito attivo (24,41). Esiste tuttavia un secondo sottogruppo di inibitori, definiti duali, capaci di agire anche sulle metallo- β -lattamasi (MBL): qui il boro elettrofilo, una volta legato al target, può formare un legame covalente reversibile non solo con la serina nucleofila delle SBL, ma anche, nel caso delle MBL, con uno ione idrossido presente nel loro sito attivo, cooperando con gli ioni zinco catalitici (24,41). Questa duplice capacità d'azione rende alcuni di questi composti particolarmente preziosi, poiché permettono di superare contemporaneamente due classi enzimatiche storicamente difficili da inibire con un unico agente (24) (42–45).

2.4 INIBIZIONE DELLE SBL DA PARTE DEGLI ACIDI BORONICI

L'attacco del gruppo ossidrilico della SBL porta alla formazione di un addotto covalente reversibile che riproduce fedelmente la geometria e la distribuzione elettronica dell'intermedio tetraedrico generato durante l'idrolisi del β -lattame (**Schema 3**):



Schema 3. Reazione tra l'enzima β -lattamasi e l'antibiotico β -lattamico (a). Reazione tra l'enzima β -lattamasi e l'acido boronico (b).

Nelle SBL, il nucleofilo che attacca il boro è la serina catalitica del sito attivo (41). Uno dei due ossigeni legati al boro occupa lo stesso punto del sito attivo in cui normalmente si trova l'ossigeno del carbonile del β -lattamico, il cosiddetto "buco dell'oxianione", mentre il secondo ossigeno prende il posto dell'acqua usata per la deacilazione, formando un legame con un residuo acido conservato dell'enzima (**figura 20**) (41). Questo tipo di legame, covalente ma reversibile, si comporta con una cinetica definita "a legame lento" (*slow-binding*): l'inibitore si lega e si stacca dall'enzima più lentamente rispetto a quanto avviene sulle MBL, garantendo un'inibizione efficace e duratura (46).

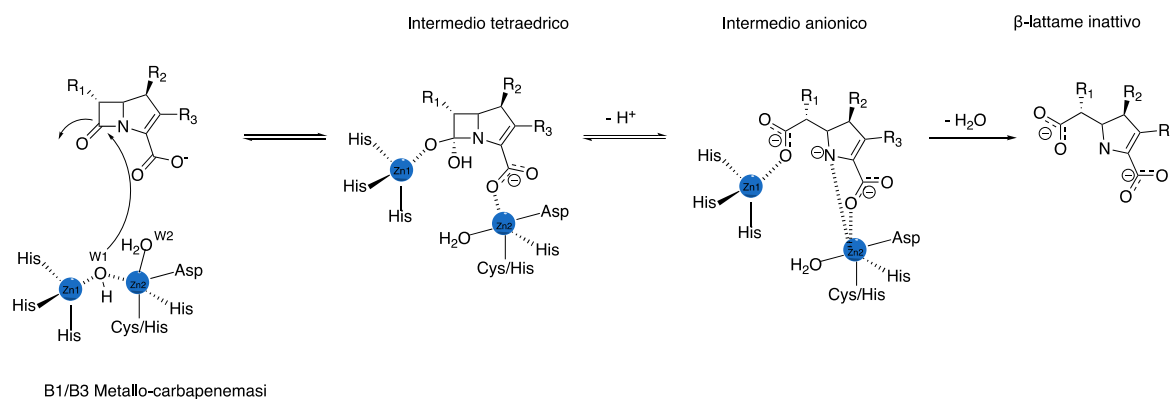
Questa capacità di mimare lo stato di transizione rappresenta il principale razionale dell'attività degli acidi boronici come inibitori delle β -lattamasi ed è un principio applicabile a tutte le classi di questi enzimi, accomunate dalla formazione di uno o più intermedi tetraedrici nel corso del ciclo catalitico.

Per questo motivo, gli inibitori di questa classe vengono comunemente designati con l'acronimo **BATSI** (Boronic Acid Transition-State Inhibitors), proprio a sottolineare un meccanismo basato sul mimetismo dello stato di transizione enzimatico piuttosto che su un'inibizione competitiva classica (24,41). È importante sottolineare che, nonostante questa modalità d'azione covalente, gli acidi boronici possono raggiungere una notevole selettività per le β -lattamasi rispetto ad altre serina-idrolasi, incluse le serina-proteasi dei mammiferi, grazie all'architettura complementare del sito attivo della β -lattamasi e alle interazioni specifiche stabilite dallo scaffold dell'inibitore (23,41). A questo si aggiunge un secondo elemento di riconoscimento strutturale: il carbonio adiacente al centro elettrofilo del boro porta spesso una funzionalità amidica che ricorda strettamente le catene laterali presenti in posizione C(6) o C(7), rispettivamente di penicilline e cefalosporine, inclusa la loro configurazione stereochimica, una conservazione che permette agli acidi boronici di riprodurre fedelmente l'orientamento con cui le catene laterali dei β -lattami vengono presentate al sito attivo enzimatico (41).

Va inoltre ricordato che un crescente corpus di evidenze biochimiche, farmacologiche e cliniche accumulate negli ultimi decenni ha progressivamente dissipato le preoccupazioni iniziali riguardanti la tossicità associata al boro, supportando questa classe di composti come scaffold praticabile e generalmente ben tollerato per lo sviluppo di inibitori delle β -lattamasi (41).

2.5 INIBIZIONE DELLE MBL DA PARTE DEGLI ACIDI BORONICI

Le MBL non hanno una serina catalitica: usano invece uno o due ioni di zinco per attivare una molecola d'acqua, che è il vero nucleofilo della reazione e attacca direttamente il carbonile del β -lattamico (**Schema 4**) (22,41).



Schema 4. Meccanismo d'idrolisi di un carbapeneme catalizzato da B1/B3 metallo-carbapenemasi

Quando un acido boronico inibisce una MBL, il boro non si coordina direttamente agli ioni zinco, ma si lega proprio a questa molecola d'acqua catalitica, che a sua volta resta coordinata allo zinco del sito attivo (**figura 20**) (24,46). L'inibitore blocca così la reazione occupando la posizione del nucleofilo necessario per l'attacco sul β -lattamico, attraverso un'interazione mediata dall'acqua piuttosto che un legame diretto con il metallo (23,46). Su questo tipo di enzimi, il comportamento cinetico dell'acido boronico cambia rispetto alle SBL: il legame e l'idrolisi dall'enzima avvengono molto più rapidamente, in un comportamento descritto come "fast-on/fast-off" (41,46).

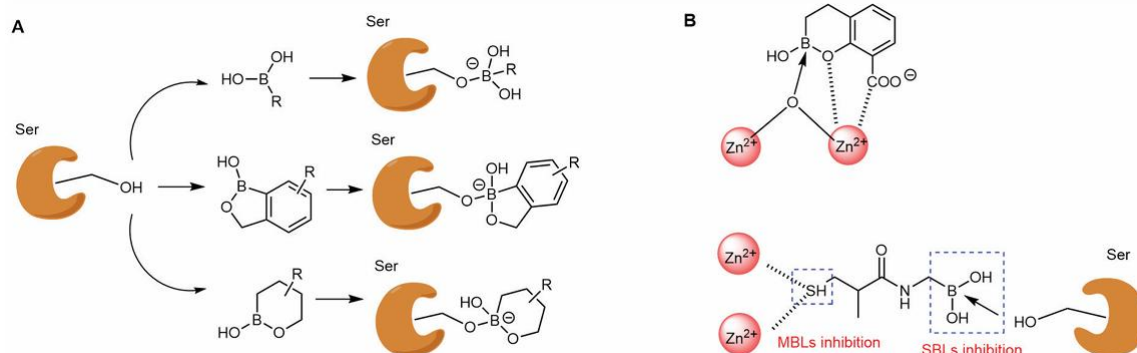


Figura 20. *Meccanismi d'azione dei BLI nell'inibire le SBL e le MBL. (A) Meccanismo d'azione degli inibitori delle SBL. (B) Meccanismo d'azione degli inibitori SBL/MBL per inattivare le MBL (in alto); meccanismo degli inibitori delle MBL che si basano sull'atomo di zolfo per interagire con le MBL e sull'atomo di boro per interagire covalentemente con le SBL, raggiungendo così l'obiettivo della doppia inibizione (in basso) (24).*

Questa differenza, tra legame lento sulle SBL e legame rapido sulle MBL, è il filo conduttore che spiega tutta la storia che segue: i primi acidi boronici sono stati progettati pensando solo all'inibizione delle SBL, e solo dopo molti anni di lavoro la chimica di questi composti si è evoluta fino a riuscire a formare addotti stabili nel sito attivo, completamente diverso, delle MBL.

2.6 CLASSIFICAZIONE PER SPETTRO D'AZIONE

Sul piano della classificazione funzionale, gli inibitori contenenti boro si suddividono in due categorie in base allo spettro d'azione (24): gli inibitori a **spettro ristretto**, attivi principalmente contro le SBL di classe A, C e D, di cui il vaborbactam rappresenta il capostipite, e gli inibitori a **spettro ampio**, capaci di agire efficacemente anche contro le MBL, come il taniborbactam (VNRX-5133), distinto dal vaborbactam proprio per la capacità di inibire le MBL di sottoclasse B1, mantenendo al contempo una buona attività contro le SBL di classe A, C e D (22).

Questa seconda generazione di acidi boronici nasce dall'evoluzione degli scaffold ciclici e biciclici che, diversamente dai composti aciclici e dagli acidi fenilboronici di prima generazione, prevalentemente attivi su classe A e C, dimostrano un'attività estesa anche alle MBL e alle β -lattamasi di tipo OXA di classe D (41), aprendo la strada a una nuova generazione di inibitori potenzialmente "pan-spettro", capaci di colpire simultaneamente SBL, MBL e, in alcuni casi, proteine leganti la penicillina (23,41).

2.7 CLASSI CHIMICHE DI ACIDI BORONICI

2.7.1 Gli acidi boronici aciclici

La vera svolta nella progettazione degli acidi boronici aciclici, cioè a catena aperta, senza che il boro sia inserito in un anello, avvenne negli anni '90, quando Martin e collaboratori applicarono per la prima volta un approccio razionale e biomimetico, incorporando i gruppi funzionali tipici degli antibiotici β -lattamici direttamente nella struttura dell'acido boronico (23,41).

Sfruttando i dati cristallografici del complesso acil-enzima TEM-1:PenG di *E. coli*, gli autori svilupparono l'acido (1R)-1-acetamido-2-(3-carbossifenil)etano boronico, un analogo dello stato di transizione capace di inibire TEM-1 con una K_i di 110 nM, in cui uno dei due ossigeni legati al boro si posizionava nel “oxyanion hole” legandosi a Ser70, mentre il secondo sostituiva l'acqua di deacilazione formando legami a idrogeno con i residui Glu166 e Asn170 (**figura 21**)(41).

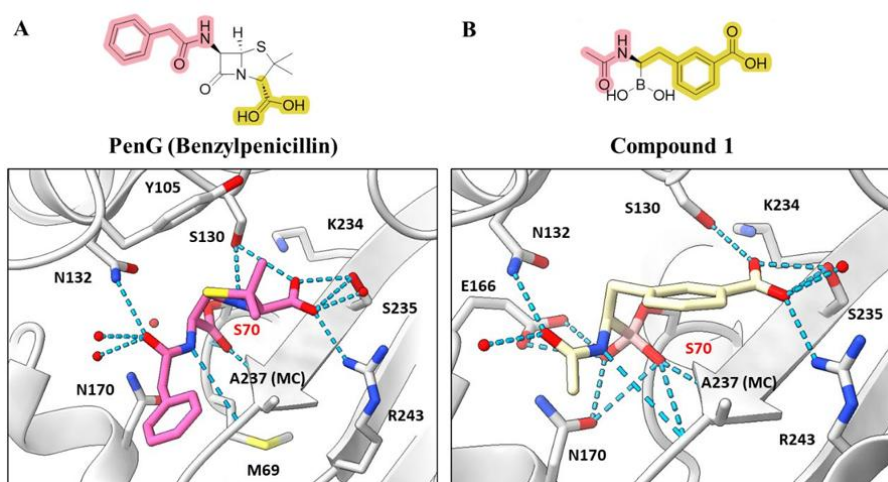


Figura 21. (A) Struttura cristallografica di PenG in complesso con TEM-1; (B) Struttura cristallografica del composto 1 in complesso con TEM-1 (41).

Questo lavoro pionieristico dimostrò per la prima volta, in modo concreto, che la catena laterale dell'inibitore poteva ricalcare fedelmente quella del β -lattamico originale, e pose le basi per tutta l'ottimizzazione successiva di questa famiglia di composti, portata avanti nei decenni seguenti da diversi gruppi di ricerca attraverso lo studio sistematico dei fattori energetici che governano il riconoscimento dei β -lattamici da parte delle β -lattamasi

attraverso l'introduzione di gruppi funzionali aggiuntivi capaci di migliorare l'affinità anche di centinaia di volte (**figura 22**)(41).

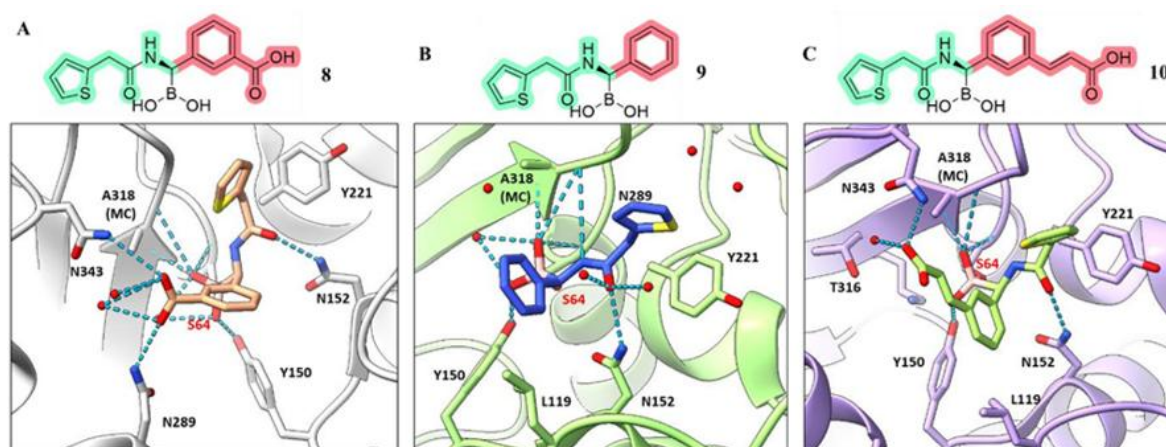


Figura 22. Strutture cristallografiche di AmpC in complesso con tre composti differenti presi come esempio.

Un ulteriore sviluppo di questa famiglia arrivò con l'introduzione della click chemistry come strumento sintetico: sostituendo le catene laterali classiche con un anello triazolico, installabile facilmente nelle fasi finali della sintesi, fu possibile generare in poco tempo un gran numero di nuovi derivati, alcuni dei quali capaci di inibire contemporaneamente più classi di serina- β -lattamasi che hanno dimostrato un'attività inibitoria (K_i) nanomolare, e in seguito di dimostrare un'efficacia battericida anche in modelli animali di infezione, comparabile a quella di combinazioni già approvate per uso clinico (**figura 23**) (41).

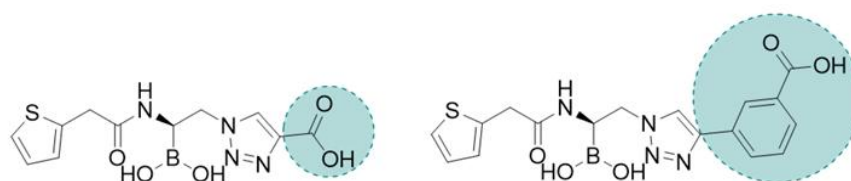


Figura 23. Esempio di composti contenenti l'anello triazolico (41)

Tuttavia, tutti i composti aciclici descritti fino a questo punto condividevano un limite fondamentale: erano efficaci esclusivamente verso le SBL e restavano del tutto inattivi verso le MBL, perché la loro struttura era stata interamente disegnata per occupare lo spazio del sito attivo dove si trova la serina catalitica, non per posizionarsi vicino alla molecola d'acqua coordinata dallo zinco (41). Per superare questo limite, fu introdotta una nuova generazione

di acidi boronici aciclici “duali”, cioè contenenti il gruppo boronico in grado di interagire con la Serina delle SBL e un secondo gruppo funzionale capace di legare direttamente il metallo. Il composto rappresentativo di questa strategia, dotato di un gruppo tiolico, si dimostrò infatti in grado di inibire contemporaneamente sia la SBL KPC-2 sia la MBL VIM-2, grazie a un doppio meccanismo d'azione nella stessa molecola: il gruppo tiolo in grado di coordinare gli ioni zinco di VIM-2, mentre il gruppo boronico lega la Serina formando il consueto addotto covalente con KPC-2 (**figura 24 e 25**) (41).

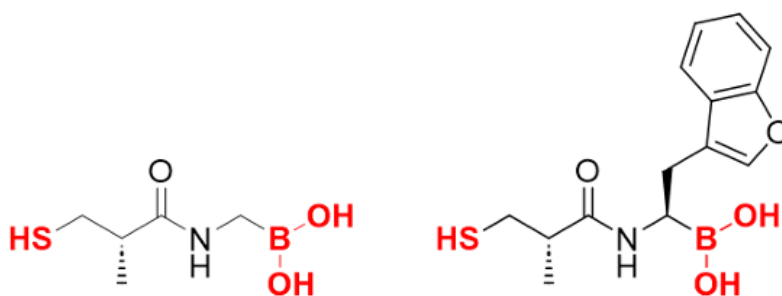


Figura 24. Esempio di strutture di acidi boronici a base tiolica (41)

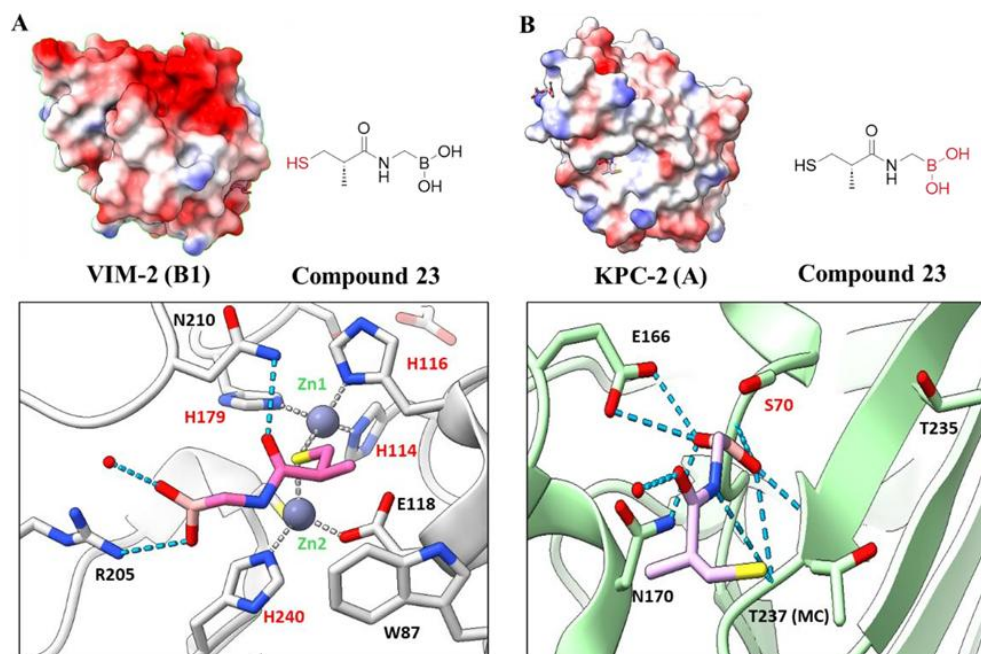


Figura 25. (A) Struttura cristallina di VIM-2 in complesso con un composto boronico a base tiolica; (B) Struttura cristallina di KPC-2 in complesso con lo stesso composto boronico (41).

2.7.2 I derivati arilboronici

In parallelo allo sviluppo degli scaffold aciclici più complessi, un'altra linea di ricerca proseguì a partire dai semplici acidi arilboronici già scoperti da Kiener e Waley, dando origine a una seconda famiglia di composti: i derivati arilboronici, in cui l'atomo di boro è legato direttamente a un anello aromatico. Partendo da semplici acidi fenilboronici sostituiti, un lungo lavoro di progettazione basata sulla struttura cristallografica del sito attivo portò, nel corso di diversi anni e attraverso il contributo di più gruppi di ricerca, a derivati via via più potenti contro le β -lattamasi di classe C. Questo percorso, descritto anche da Docquier e Mangani come avviato dal lavoro di Weston e collaboratori nel 1998 e proseguito da Morandi e Tondi e collaboratori, culminò in acidi boronici sulfonamidici ottenuti tramite un approccio di progettazione basata su frammenti. Tali molecole hanno mostrato un' affinità per la SBL AmpC nell'ordine del picomolare (K_i fino a 50 pM), e si sono dimostrati capaci di triplicare la sopravvivenza di topi infettati con *E. coli* iperproduttrice di AmpC quando somministrati insieme alla cefotaxima (23,41).

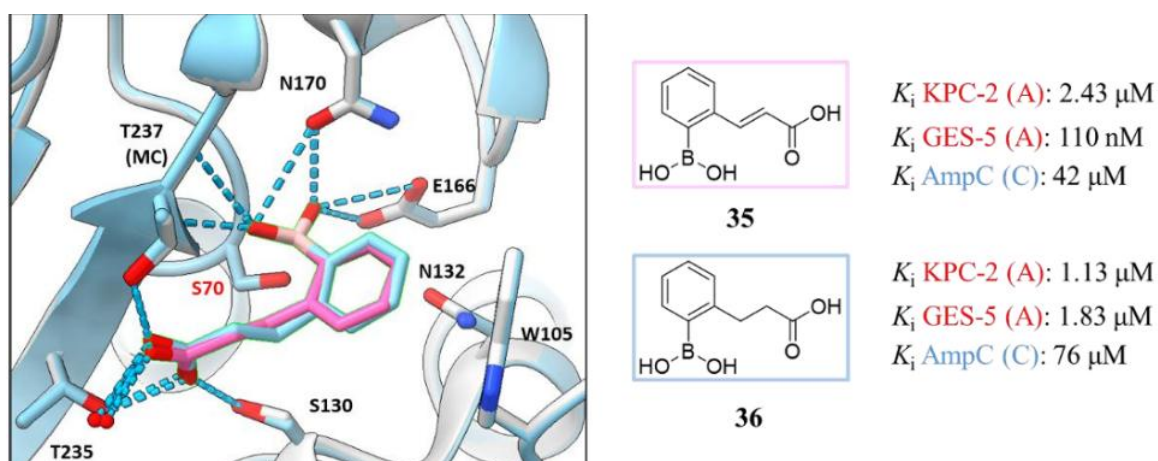


Figura 26. Struttura cristallina di KPC-2 in complesso con il composto rappresentativo degli acidi fenilboronici (41).

Una linea di ricerca parallela portò invece allo sviluppo dei primi acidi fenilboronici progettati specificamente per colpire le carbapenemasi di classe A. Il composto rappresentativo di questo filone, sviluppato per interagire con KPC-2, raggiunse una K_i di 2,43 μ M e fu capace di ridurre le concentrazioni minime inibenti dei β -lattamici da 1024 a 0,25 μ g/mL in isolati clinici resistenti, mostrando inoltre interazioni di stacking aromatico con il residuo W105, tipiche di questa famiglia di inibitori fenilboronici (**figura 26**) (41).

Anche in questa famiglia di composti la click chemistry trovò applicazione, portando allo sviluppo di acidi fenilboronici a base triazolica con potenza nanomolare (**figura 27**) (41).

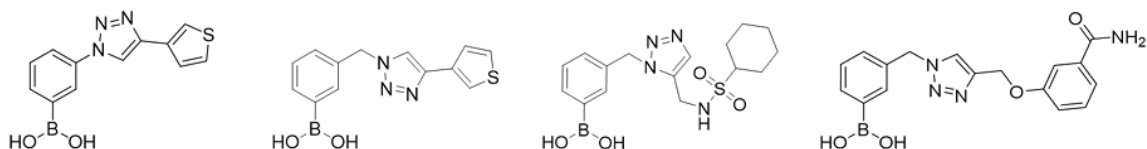


Figura 27. Esempi di acidi fenilboronici a base triazolica (41)

All'interno della famiglia degli arilboronici, una sottoclasse particolarmente importante fu quella basata su uno scaffold a struttura benzo[b]tiofenica. Il composto capostipite di questa sottoclasse, l'acido benzo[b]tiofene-2-borónico, si dimostrò capace di inibire AmpC con una K_i di 27 nM e di potenziare l'attività della ceftazidima fino a 64 volte, agendo come analogo dello stato di transizione dell'acil-enzima e formando un legame covalente transitorio con la serina catalitica S64, sebbene mostrasse una solubilità non ottimale che richiese ulteriori cicli di ottimizzazione (**figura 28**) (41).

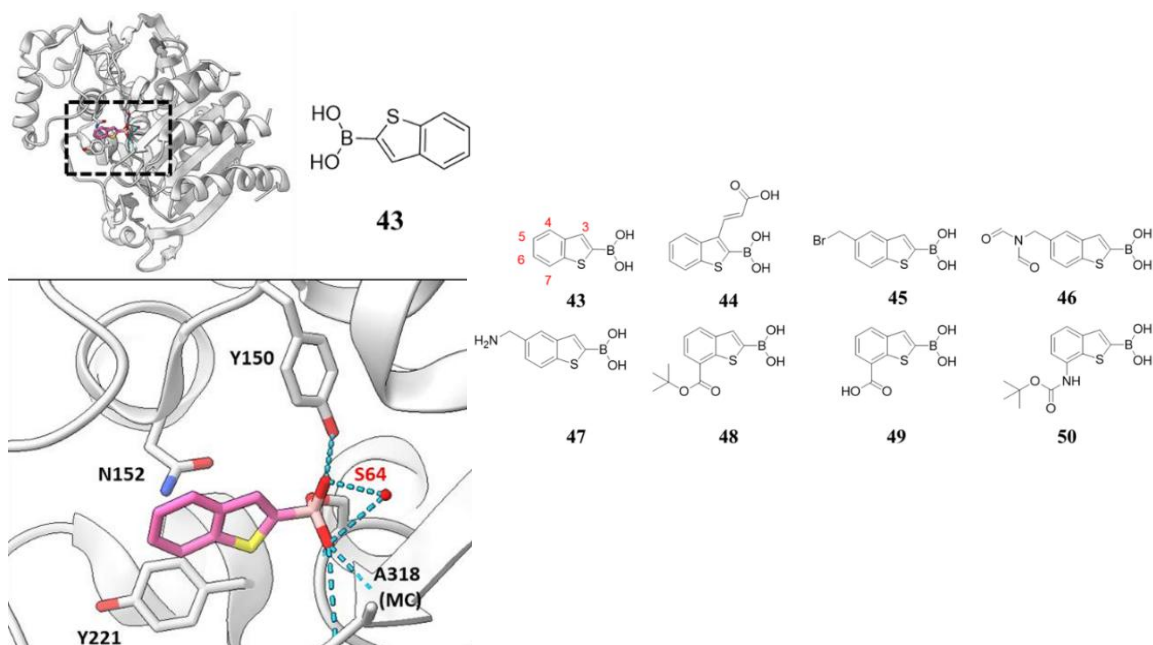


Figura 28 (a sinistra): Struttura cristallina di ampC in complesso con il composto capostipite l'acido benzo[b]tiofene-2-borónico; **figura 29** (a destra): esempi di composti risultati attivi anche contro le metallo- β -lattamasi (41).

Fu proprio la successiva derivatizzazione di questo scaffold a produrre alcuni dei pochi esempi, all'interno di tutta la famiglia degli acidi boronici aciclici e arilici, capaci di mostrare un'attività inibitoria anche contro le metallo- β -lattamasi, accanto ai già citati derivati tiolici (**Figura 29**) (41).

Anche tra gli arilboronici, dunque, lo schema si ripete: un'ottima attività sulle SBL, raggiunta con relativa facilità grazie alla semplicità chimica dello scaffold, e una capacità di colpire le MBL ottenuta solo con modifiche strutturali mirate e in pochi casi isolati. Questo limite condiviso da tutti gli scaffold aciclici e arilboronici è ciò che ha spinto la ricerca verso un cambiamento più radicale della struttura di base dell'inibitore.

2.7.3 Dagli scaffold aciclici ai primi composti ciclici

Il passaggio successivo nell'evoluzione di questa classe di inibitori di β -lattamasi è stato il passaggio a strutture cicliche, in cui l'atomo di boro è inserito stabilmente all'interno di un anello, anziché essere all'estremità di una catena aperta o legato a un anello aromatico. Il primo grande gruppo di composti ciclici a essere stato studiato in modo sistematico è quello dei **benzoxaboroli**: identificati per la prima volta alla fine degli anni '50, questi composti si sono distinti per proprietà chimiche favorevoli, reattività intrinseca, stabilità metabolica, bassa tossicità, che li hanno reso scaffold di interesse anche fuori dal campo degli inibitori delle β -lattamasi, come dimostrano due farmaci già approvati per altre indicazioni terapeutiche, il tavaborolo (Kerydin®, un antifungino) e il crisaborolo (Eucrisa®, un farmaco per la dermatite atopica) (41).

Applicati come BLI a partire dal 2011, i benzoxaboroli dimostrarono da subito un buon profilo di inibizione contro le β -lattamasi di classe C. Il lavoro di ottimizzazione successivo ampliò progressivamente questo spettro d'azione: il composto più rappresentativo di questa evoluzione riuscì a coprire, con un singolo derivato, le classi A, C e D contemporaneamente, con valori di IC₅₀ rispettivamente di 26 nM per KPC-2, 12 nM per P99 e 88 nM per OXA-24/40 (**figura 30**) (41).

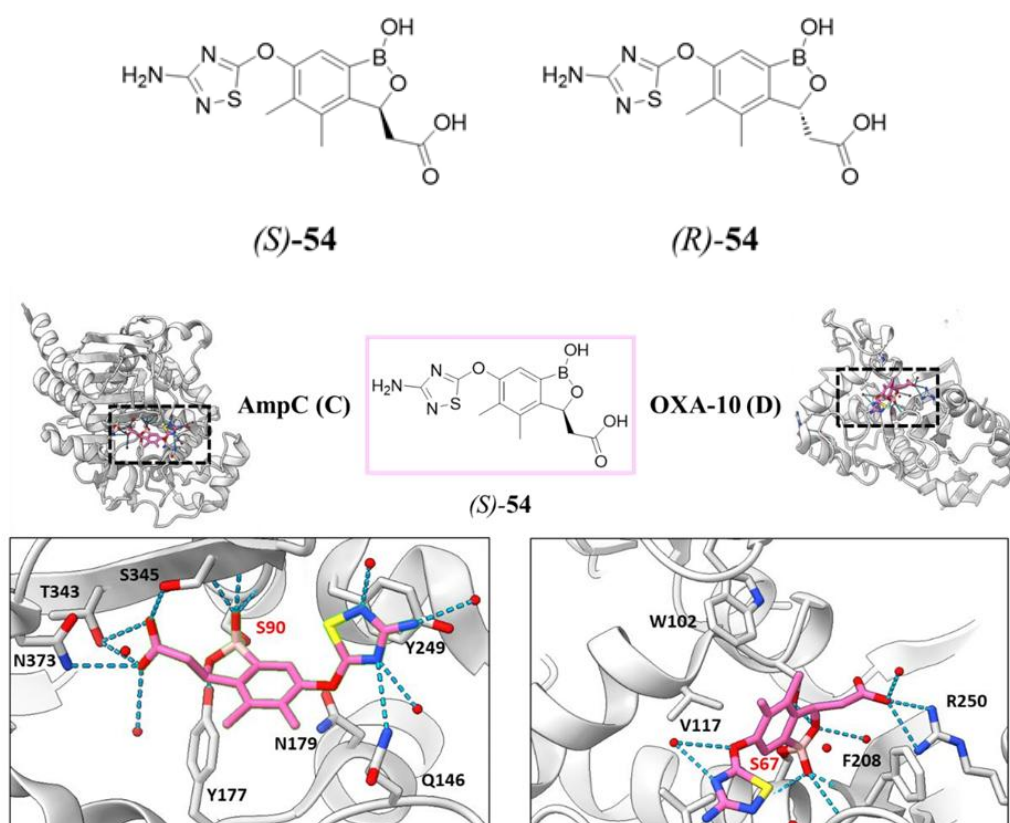


Figura 30. Struttura del composto rappresentativo e rappresentazione cristallografica nel complesso con ampC e OXA-10 (41).

Solo più avanti, attraverso l'introduzione di un centro chirale nella struttura, alcuni derivati di questa famiglia riuscirono a mostrare per la prima volta anche una sia pur modesta attività contro una metallo- β -lattamasi, fino ad arrivare a un composto capace di un'attività submicromolare sia sulle SBL (KPC-2 e OXA-48) che sulla MBL VIM-2, con un comportamento di legame già paragonabile a quello dei boronati biciclici (**figura 31**) (41).

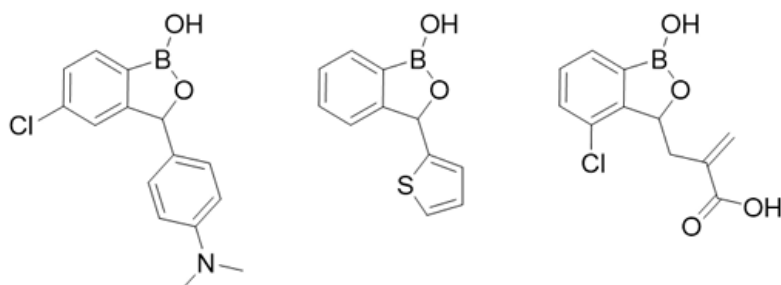


Figura 31. Esempi di strutture dei benzoxaboroli (41)

I benzoxaboroli rappresentano dunque l'anello di congiunzione tra gli scaffold ciclici "semplici", ancora prevalentemente orientati sulle SBL, e l'ultima e più importante tappa di questa evoluzione: i boronati biciclici, capaci di unire in un'unica struttura rigida la capacità di legarsi sia alla serina catalitica delle SBL sia alla molecola d'acqua coordinata dallo zinco delle MBL. Questo risultato è stato raggiunto proprio grazie alla maggiore rigidità geometrica conferita dalla fusione di due anelli, che dà al boro un orientamento più favorevole per adattarsi a due siti attivi profondamente diversi tra loro (24,41).

Il vaborbactam, primo rappresentante clinico di questa nuova famiglia di composti biciclici, sarà oggetto del prossimo paragrafo.

2.8 IL VABORBACTAM

2.8.1 Struttura chimica e razionale progettuale

Il vaborbactam, precedentemente identificato con il codice sperimentale RPX7009, nasce da un programma di ricerca avviato con un obiettivo molto preciso: individuare un inibitore capace di colpire efficacemente la carbapenemasi KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasi), responsabile di una quota crescente delle resistenze ai carbapenemici nelle *Enterobacterales* (47). Il punto di partenza concettuale furono gli inibitori boronici aciclici già descritti, molecole dotate di una buona potenza contro alcune β -lattamasi di classe A ma non ancora ottimizzate per le carbapenemasi.

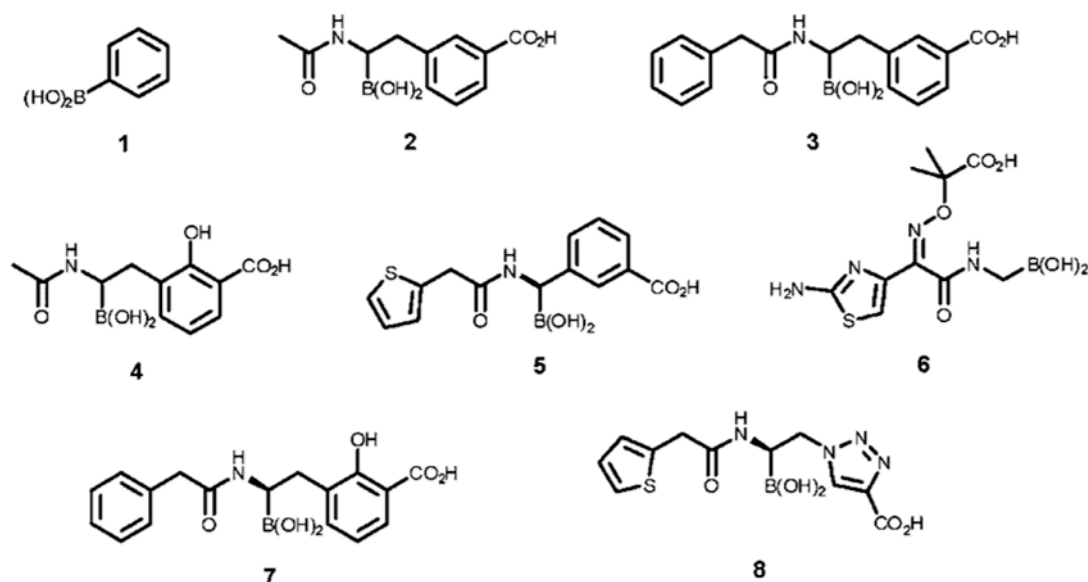


Figura 32: strutture degli inibitori boronici precedentemente riportati in letteratura, da cui viene mosso il confronto (48)

I ricercatori si chiesero se la ciclizzazione di queste strutture, ottenuta tramite formazione di un estere boronico, potesse offrire un duplice vantaggio: da un lato vincolare la molecola in una conformazione tridimensionale più favorevole al legame con l'enzima, dall'altro aumentarne la selettività verso le β -lattamasi rispetto ad altre serina-idrolasi dell'organismo, le cui tasche catalitiche, più ristrette e adattate a substrati lineari, risultano meno in grado di accogliere un mimetico ciclico dello stato di transizione (**figura 32**)(48).

Da questo ragionamento nacque la classe degli acilamminoboronati ciclici, da cui il vaborbactam è stato successivamente isolato come capostipite e, ad oggi, unico rappresentante giunto all'uso clinico (**figura 33**).

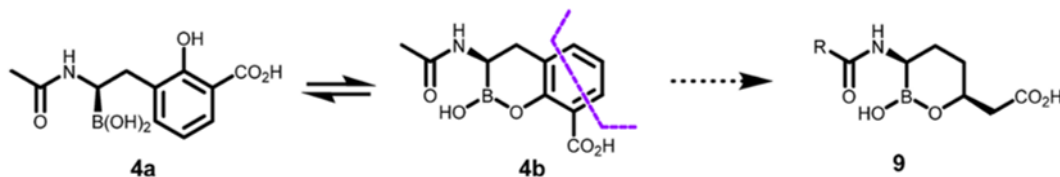


Figura 33. Schema di progettazione del boronato ciclico 9 (vaborbactam) a partire dal precursore aciclico 4a/4b (48)

La struttura finale della molecola, identificata chimicamente come acido {(3R,6S)-2-idrossi-3-[2-(tiofen-2-il)acetamido]-1,2-oxaborinan-6-il} acetico, presenta un anello a sei membri contenente un atomo di boro: una configurazione strutturale priva di precedenti tra gli inibitori delle β -lattamasi commercializzati prima di essa (**figura 34**) (47).

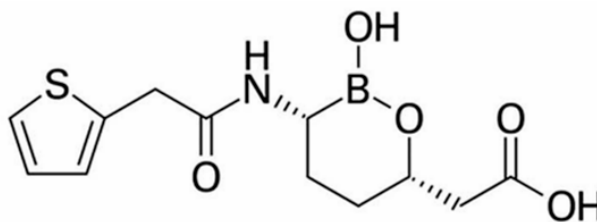


Figura 34. Struttura chimica bidimensionale del vaborbactam, con formula bruta ($C_{12}H_{16}BNO_5S$) e peso molecolare (297,13) (47)

Un secondo elemento determinante per la potenza della molecola riguarda il sostituito legato all'azoto: la sostituzione del semplice gruppo N-acetile con un gruppo 2-tienilacetile, lo stesso presente in cefalosporine di lunga data come cefalotina e cefoxitina, produsse un incremento sostanziale dell'attività inibitoria contro KPC (47,48). Altri sostituenti testati nella stessa serie, gruppi amminotiazolici, piridilici o idrossilati, non offrirono vantaggi comparabili, confermando la specificità del gruppo tienilacetilico per l'ottimizzazione dell'attività anti-KPC (48).

Nelle strutture cristallografiche del complesso con CTX-M-15 (classe A) e con AmpC (classe C) (**figura 35**), il residuo di serina catalitica di entrambi gli enzimi risulta legato covalentemente all'atomo di boro dell'inibitore, mentre il gruppo ammidico instaura una rete

di legami a idrogeno con i residui conservati del sito attivo, comune a entrambe le classi enzimatiche (48). Oltre al legame covalente del boro con la serina catalitica, un ruolo di ancoraggio nella tasca di legame dell'enzima è svolto anche dal sostituito carbossimetilico in posizione tre dell'anello (41). L'anello tiofenico presente nel vaborbactam, a differenza del nucleo boronico centrale, è coinvolto solo in contatti deboli con la cavità catalitica, un dettaglio che aiuta a spiegare perché la selettività della molecola dipenda soprattutto dalla geometria ciclica del nucleo e non dal sostituito periferico (23). È interessante notare che l'anello boronico a sei membri assume conformazioni leggermente diverse nei due enzimi, segno della flessibilità conformazionale che permette al vaborbactam di adattarsi a tasche catalitiche con geometria differente e di mantenere così attività su entrambe le classi (48).

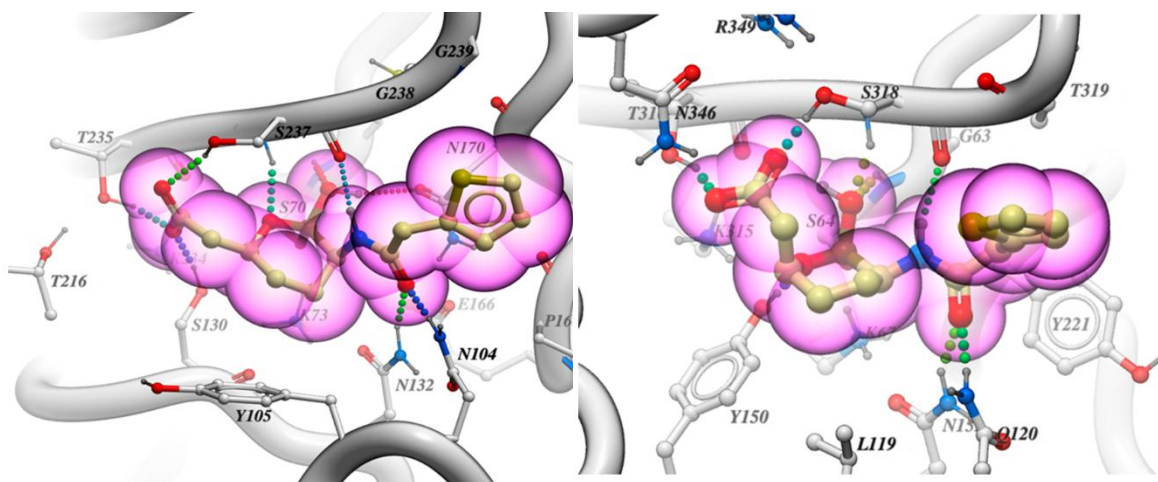


Figura 35. Rappresentazione cristallografica tridimensionale del legame del vaborbactam nel sito attivo di CTX-M-15 (a sinistra) e di AmpC (a destra) (48).

2.8.2 Meccanismo d'azione vaborbactam

Il vaborbactam agisce come inibitore non suicida delle β -lattamasi e non possiede, di per sé, alcuna attività antibatterica intrinseca (47). Questa assenza di attività diretta sul batterio fu peraltro confermata sperimentalmente già nelle prime fasi di sviluppo della molecola, quando nessuno dei composti della serie di acilamminoboronati ciclici mostrò un effetto inibitorio sulla crescita batterica se testato in assenza di un β -lattamico associato (48).

Il meccanismo molecolare alla base dell'inibizione enzimatica sfrutta una proprietà chimica specifica dell'atomo di boro: la sua elevata elettrofilia gli permette di formare un legame

covalente con il residuo di serina presente nel sito catalitico delle β -lattamasi, inattivando l'enzima in modo reversibile (22,47). L'interazione procede in due fasi: una prima formazione di un complesso non covalente tra enzima e inibitore, seguita da un secondo passaggio in cui si stabilisce il legame covalente vero e proprio con la serina catalitica. Questo schema a due tempi, con un'insorgenza lenta e progressiva dell'inibizione, è tipico degli inibitori boronici "a legame stretto" e distingue il vaborbactam dai primi composti boronici descritti in letteratura, i quali raggiungevano l'equilibrio enzima-inibitore in modo quasi istantaneo (49).

A differenza di quanto accade con il substrato naturale dei β -lattamici, questo legame covalente non viene idrolizzato nel corso della reazione: la dissociazione del complesso enzima-inibitore avviene quindi in modo reversibile ma con velocità molto diversa a seconda dell'enzima coinvolto. Nei confronti delle carbapenemasi KPC il legame risulta particolarmente stabile, con tempi di residenza che superano le sedici ore, mentre la dissociazione dal complesso con AmpC è molto più rapida, nell'ordine di pochi minuti (47,49). Anche altre carbapenemasi di classe A strutturalmente distinte dalle KPC, come SME, BKC e FRI, vengono inattivate con tempi di residenza intermedi, confermando un quadro generale in cui il vaborbactam si comporta da inibitore particolarmente persistente sulle carbapenemasi e più labile sulle cefalosporinasi di classe C (49). Un dato biochimico rilevante riguarda inoltre la stabilità chimica dell'inibitore stesso: a differenza di molti inibitori suicidi, nessuna degradazione del vaborbactam è stata osservata dopo incubazione prolungata con KPC-2, segno che il legame, una volta idrolizzato dall'acqua, restituisce la molecola intatta (49).

Questa cinetica di dissociazione particolarmente lenta nei confronti delle carbapenemasi di tipo KPC contrasta nettamente con il comportamento di altri inibitori non β -lattamici di nuova generazione, come l'avibactam: quest'ultimo forma sì un legame covalente con l'anello catalitico dell'enzima, ma tale legame viene generalmente riciclato anziché idrolizzato, e nel caso specifico di KPC l'avibactam viene lentamente desolfonato dall'enzima con formazione di prodotti inattivi, costringendo a mantenere concentrazioni plasmatiche elevate per tutto l'intervallo di somministrazione per garantirne l'efficacia (47).

Affinché possa raggiungere il proprio target enzimatico all'interno della cellula batterica, il vaborbactam deve attraversare la membrana esterna dei batteri Gram-negativi, un passaggio che avviene principalmente attraverso le porine OmpK35 e OmpK36 di *K. Pneumoniae*, le

stesse utilizzate anche dal meropenem (47,50). Tra le due, OmpK36 rappresenta il canale d'ingresso preferenziale per l'inibitore, una preferenza che lo distingue dal meropenem, capace invece di utilizzare entrambe le porine con efficienza paragonabile (50). Anche la pompa di efflusso multidrug AcrAB-TolC è stata implicata nella riduzione della sensibilità ai carbapenemici nelle *Enterobacteriales*; tuttavia, mentre il meropenem ne è un substrato, il vaborbactam non lo è, e la sua iperespressione esercita solo un effetto minimo sulla potenza della combinazione, persino in assenza delle principali porine, la riduzione più marcata di efficacia si osserva infatti solo nei ceppi produttori di KPC che presentano contemporaneamente l'assenza di entrambe le porine e la sovraespressione di AcrAB (47,50).

2.8.3 Spettro d'azione e proprietà correlate

Lo spettro di inibizione del vaborbactam comprende diverse β -lattamasi di classe A, tra cui le carbapenemasi KPC e altre carbapenemasi strutturalmente diverse come SME, BKC e FRI, oltre alle β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) della famiglia CTX-M, SHV e TEM, e alle cefalosporinasi di classe C come CMY e AmpC (47,50). La potenza inibitoria su questi enzimi è generalmente elevata e si colloca in un intervallo nanomolare ristretto, con un'efficienza di inattivazione che risulta massima proprio sulle carbapenemasi KPC, dove bastano quantità equimolari di inibitore ed enzima per ottenere l'inattivazione completa, un rapporto stechiometrico che indica un'inibizione molto efficiente, priva di “sprechi” della molecola (49). Per alcuni enzimi della famiglia SHV e TEM, invece, anche un largo eccesso di inibitore non riesce a produrre un'inattivazione stabile, poiché in questi casi il legame covalente si forma e si rompe troppo rapidamente per dare luogo a una vera inattivazione persistente (49).

Nei confronti delle carbapenemasi di classe D, come le varianti OXA-48-like, l'attività risulta invece molto più debole, di uno o due ordini di grandezza inferiore rispetto a quella osservata sugli enzimi di classe A e C, un comportamento legato alla natura più idrofobica e meno accogliente della tasca catalitica di questi enzimi per il nucleo ciclico del vaborbactam (47,49,50). Contro le metallo- β -lattamasi di classe B, NDM, VIM e IMP, il vaborbactam è praticamente inattivo, poiché questi enzimi non possiedono il residuo di serina catalitica necessario per la formazione del legame covalente con il boro (47,49,50).

Questa selettività di classe determina un limite applicativo ben definito, confermato su larga scala dai dati di sorveglianza *in vitro*: i ceppi di *Enterobacteriales* produttori di carbapenemasi di classe B o D risultano generalmente resistenti alla combinazione meropenem/vaborbactam, mentre le rare sensibilità residue osservate in tali ceppi riflettono unicamente l'attività intrinseca del meropenem, non potenziata in alcun modo dal vaborbactam (47,51). Questo profilo è coerente con la classificazione comparativa degli inibitori delle β -lattamasi, che colloca il vaborbactam tra i composti attivi su ESBL, AmpC e KPC ma privi di attività utile su OXA-48 e MBL, uno spettro che lo distingue da inibitori più recenti come l'avibactam o il taniborbactam, capaci invece di coprire anche queste classi (22,52).

Sul piano della resistenza acquisita, i dati di sorveglianza disponibili indicano un'incidenza ancora molto contenuta di isolati resistenti alla combinazione: in un ampio studio di sorveglianza internazionale, vaborbactam ha permesso di ripristinare l'attività del meropenem nel 99% degli isolati di *Enterobacteriales* produttori di KPC testati (51). Quando la resistenza emerge, essa è legata principalmente a meccanismi di permeabilità di membrana, in particolare mutazioni o inattivazione delle porine OmpK35 e OmpK36, spesso associati a una sovraespressione del gene KPC, piuttosto che a mutazioni dirette dell'enzima KPC stesso, che ad oggi non risultano descritte né *in vitro* né in ambito clinico (22,47,51).

Un secondo aspetto rilevante riguarda la specificità del vaborbactam verso il target batterico rispetto alle proteine dell'organismo ospite. Pur condividendo con altri inibitori boronici, come il bortezomib, un farmaco antitumorale impiegato come inibitore del proteasoma, il medesimo nucleo chimico a base di boro, il vaborbactam non mostra alcuna attività significativa né sulle proteasi umane testate né, più in generale, su altre serina-idrolasi dell'organismo: sottoposto a un pannello di undici diverse proteasi seriniche di mammifero (tra cui tripsina, chimotripsina, trombina ed elastasi), il composto mostrò valori di IC50 sempre pari o superiori a 1000 μ M, un'evidenza che conferma come l'azione inibitoria si concentri quasi esclusivamente sul target batterico (47,48).

Sul piano farmacocinetico, il vaborbactam somministrato da solo in volontari sani mostra un legame con le proteine plasmatiche pari mediamente al 33%, con valori di concentrazione massima (Cmax) e area sotto la curva (AUC) che aumentano in maniera proporzionale alla dose; l'emivita di eliminazione media si attesta attorno a 1,5 ore, con un volume di distribuzione di circa 21,5 litri (47).

L'inibitore viene eliminato prevalentemente per via renale, con il 75-90% della dose ritrovata nelle urine in forma immodificata, senza fenomeni di accumulo significativi dopo somministrazioni multiple (47). Un dato di rilievo riguarda il confronto cinetico con il meropenem: l'emivita del vaborbactam risulta leggermente più lunga di quella del meropenem associato, una caratteristica che garantisce il mantenimento di concentrazioni efficaci dell'inibitore per tutta la durata dell'intervallo di somministrazione, proteggendo così il meropenem anche nelle fasi più tardive del ciclo posologico, un aspetto considerato generalmente poco comune tra le combinazioni β -lattamico/inibitore delle β -lattamasi, nelle quali l'inibitore tende solitamente ad avere un'emivita più breve rispetto al principio attivo associato (47).

Dal punto di vista farmacodinamico, gli studi condotti su modelli animali di infezione hanno permesso di individuare un parametro semplice ma cruciale per prevedere l'efficacia del vaborbactam: non basta che il farmaco raggiunga concentrazioni elevate nel sangue, conta soprattutto quanto la sua esposizione complessiva nelle 24 ore si mantenga al di sopra della soglia minima necessaria a inibire l'enzima bersaglio (il rapporto tra l'AUC libera del vaborbactam e la MIC della combinazione meropenem/vaborbactam) (53).

In altre parole, più a lungo e più intensamente il vaborbactam resta sopra questa soglia nel corso della giornata, più efficace risulta nel bloccare l'enzima e proteggere il meropenem.

I dati sperimentali mostrano che esiste una soglia minima di esposizione sufficiente a ottenere un effetto battericida, ma che, per impedire la comparsa di resistenza durante il trattamento, è necessaria un'esposizione ancora più elevata: in pratica, dosi che garantiscono solo l'efficacia immediata possono non bastare a prevenire la selezione di varianti resistenti nel tempo (53).

2.8.4 Combinazione attualmente in uso clinico

Ad oggi, l'unica combinazione clinicamente disponibile contenente vaborbactam è quella con il meropenem, un carbapenemico di gruppo 2 caratterizzato da un ampio spettro d'azione e da un consolidato profilo di sicurezza (47). Questa associazione a dose fissa (1:1) viene comunemente indicata con l'acronimo M/V e rappresenta, insieme a ceftazidima/avibactam, una delle prime combinazioni di nuova generazione capaci di restituire attività ai β -lattamici nei confronti delle *Enterobacterales* resistenti ai carbapenemi (47). La combinazione, commercializzata con il nome Vabomere® (nota anche, nella fase di sviluppo, come Carbavance), è stata approvata dalla FDA nell'agosto 2017, divenendo la prima associazione carbapenemico/inibitore delle β -lattamasi con attività dimostrata contro le CRE, e indicata inizialmente per il trattamento delle infezioni complicate delle vie urinarie, inclusa la pielonefrite acuta, negli adulti (47). Successivamente, l'EMA ne ha ampliato l'approvazione anche al trattamento delle infezioni intra-addominali complicate, della polmonite nosocomiale e di quella associata a ventilazione meccanica, oltre che, più in generale, delle infezioni da microrganismi Gram-negativi aerobi in pazienti adulti con opzioni terapeutiche limitate (47). Questa approvazione, insieme a quella di ceftazidima/avibactam, ha rappresentato la prima dimostrazione che entità chimiche non β -lattamiche potessero non solo inibire le β -lattamasi in vitro, ma raggiungere con successo lo sviluppo clinico (23).

L'efficacia clinica della combinazione è stata documentata in due studi registrativi di fase 3: il primo, denominato TANGO I, ha confrontato meropenem/vaborbactam con piperacillina/tazobactam in pazienti con infezioni complicate delle vie urinarie: la combinazione si è dimostrata non inferiore al comparatore secondo l'endpoint primario FDA (successo clinico complessivo del 98,4% contro 94%) e, in un'analisi di superiorità successiva, statisticamente superiore ad esso (50); il secondo studio, TANGO II, ha invece valutato la monoterapia con meropenem/vaborbactam contro la migliore terapia disponibile in pazienti con infezioni documentate da CRE, riscontrando tassi di guarigione clinica significativamente più elevati con la combinazione sia al termine del trattamento sia alla visita di controllo, accompagnati da una minore incidenza di eventi avversi renali rispetto ai regimi di confronto, spesso basati su aminoglicosidi o polimixine (47).

Dati di confronto diretto raccolti in setting reali, condotti su una popolazione di 131 pazienti critici con infezioni da CRE, non hanno evidenziato differenze statisticamente significative nel successo clinico complessivo tra meropenem/vaborbactam e ceftazidima/avibactam. Tuttavia, in questo stesso studio l'insorgenza di resistenza durante il trattamento è stata osservata esclusivamente nel gruppo trattato con ceftazidima/avibactam in monoterapia, mentre nessun caso di resistenza emergente è stato registrato tra i pazienti trattati con meropenem/vaborbactam (54).

Va sottolineato, infine, che l'aggiunta del vaborbactam al meropenem non ne amplia l'attività nei confronti dei bacilli Gram-negativi non fermentanti multiresistenti, in particolare *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., nei quali l'attività della combinazione risulta sovrapponibile a quella del meropenem da solo (**figura 36**) (47). Questo limite è coerente con i meccanismi di resistenza predominanti in questi patogeni, che includono l'impermeabilità di membrana, la sovraespressione di sistemi di efflusso e la produzione di β -lattamasi di classe B o D, meccanismi che il vaborbactam, per la sua stessa selettività enzimatica, non è in grado di contrastare (47).

Pathogens and relevant resistance mechanisms (no. isolates)	Sources (years)	% susceptibility (CLSI)	% susceptibility (EUCAST)	References
<i>Enterobacterales</i> KPC+ (294) ^a	Global (2000–2013)	94.6	97.3	[69]
<i>Enterobacterales</i> KPC+ (135) ^b	Global (2014)	99.3	100	[25]
<i>Enterobacterales</i> KPC+ (991) ^c	Global (2014–2015)	99	99.6	[49]
<i>Enterobacterales</i> KPC+ (206)	Global (2015)	99.5	99.5	[33]
<i>Enterobacterales</i> KPC+ (124)	USA (2016–2018)	99.2	100	[23]
<i>Enterobacterales</i> KPC+ (128) ^d	China (2004–2014)	81.3	97.7	[24]
<i>Achromobacter</i> spp. (100) ^e	USA-Canada (2013–2018)	86	≥90	[30]
<i>Burkholderia cepacia</i> complex (150) ^f	USA-Canada (2013–2018)	97	≥97	[30]
<i>Burkholderia gladioli</i> [48]	USA-Canada (2013–2018)	100	100	[30]

^aIncluding *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*.

^bIncluding *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *Serratia marcescens*.

^cIncluding *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia marcescens*.

^dIncluding 94 *K. pneumoniae* and 22 *E. coli*.

^eIncluding *A. dolens*, *A. ruhlandii*, and *A. xylosoxydans*.

^fIncluding *B. cenocepacia*, *B. cenocepacia*, *B. contaminans*, *B. multivorans*, *B. vietnamiensis*.

Figura 36. Attività di meropenem/vaborbactam contro vari patogeni Gram-negativi difficili da trattare (47)

2.9 IL TANIBORBACTAM

2.9.1 Struttura chimica e razionale progettuale

Il taniborbactam, precedentemente noto con il codice sperimentale VNRX-5133, nasce da un programma di ricerca condotto da Venatorx Pharmaceuticals con un obiettivo più ambizioso rispetto a quello che aveva portato all'individuazione del vaborbactam: non limitarsi a individuare acidi boronici in grado di inibire le carbapenemasi di classe A, ma sviluppare il primo inibitore capace di agire contemporaneamente su tutte e quattro le classi di β -lattamasi secondo la classificazione di Ambler, comprese le metallo- β -lattamasi (MBL), storicamente prive di inibitori clinicamente disponibili (55). Il punto di partenza furono acidi boronici semplici, già noti per la loro capacità di legarsi covalentemente al sito attivo delle serina β -lattamasi, ma dotati di un'attività modesta e limitata a alcune classi enzimatiche (56). L'introduzione di un nucleo boronico biciclico, fuso a un anello aromatico sostituito con un gruppo carbossilico, permise di ottenere una molecola capace di adattare la propria geometria sia alle SBL sia alle MBL, sfruttando in questo secondo caso l'interazione tra il gruppo carbossilico e gli ioni zinco presenti nel sito attivo di questi enzimi (**Figura 37**).

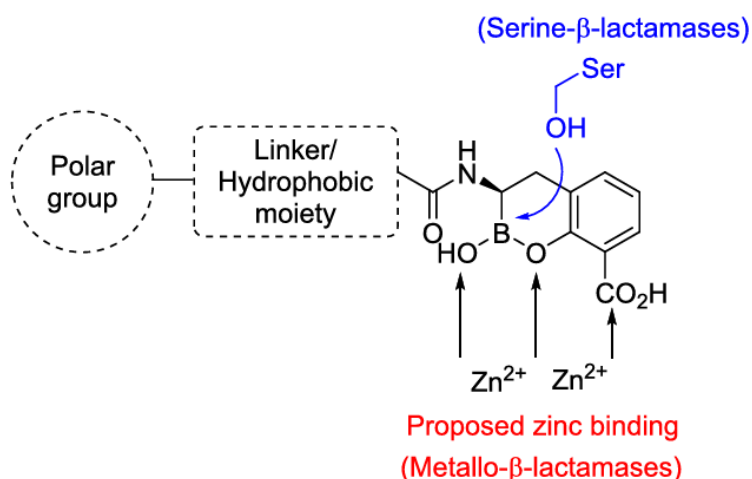


Figura 37. Strategia per la progettazione di un pan-BLI a base di boronato ciclico, che mostra le presunte interazioni di legame con la serina o con lo zinco del sito attivo (55)

Un elemento determinante per l'attività della molecola risultò essere la catena laterale legata al nucleo biciclico: dopo numerosi tentativi con gruppi diversi, i ricercatori individuarono nella catena N-(2-amminoetil) cicloesilamminica il sostituito più efficace, in quanto capace di aumentare in modo sostanziale sia la potenza inibitoria contro le MBL sia la capacità della molecola di attraversare la membrana esterna dei batteri Gram-negativi, un passaggio indispensabile affinché l'inibitore possa raggiungere il proprio bersaglio nel periplasma batterico (55). La struttura finale, identificata chimicamente come acido (3R)-3-(2-{trans-4-[(2-amminoetil)amino]cicloesil}acetamido)-2-idrossi-3,4-diidro-2H-1,2-benzoxaborinina-8-carbossilico, presenta quindi un nucleo biciclico simile nella logica ai boronati monociclici come il vaborbactam, ma reso più complesso proprio dall'aggiunta di questa catena laterale bifunzionale (**Figura 38**).

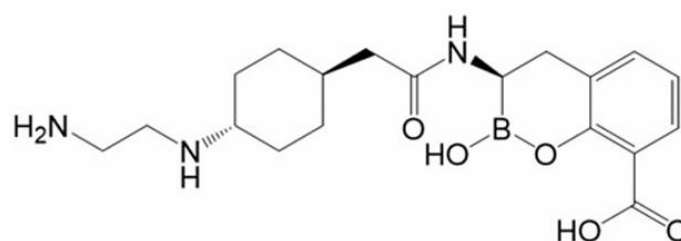


Figura 38. *Struttura chimica bidimensionale del taniborbactam (57)*

Studi cristallografici condotti sul complesso tra taniborbactam e diversi enzimi bersaglio, hanno mostrato che il nucleo centrale della molecola si lega in modo pressoché identico sia alle SBL che alle MBL, mentre è proprio la catena laterale a instaurare interazioni diverse a seconda dell'enzima coinvolto, un comportamento che aiuta a spiegare come una singola molecola riesca a inibire in modo efficace famiglie enzimatiche molto diverse tra loro (56). La stessa analisi cristallografica ha inoltre mostrato che, nel complesso con l'enzima NDM-1, il taniborbactam può assumere non solo la forma biciclica attesa ma anche una forma triciclica inattesa, generata da una ciclizzazione aggiuntiva della catena laterale sul boro, a conferma della notevole flessibilità conformazionale di questa molecola (**Figura 39**) (56).

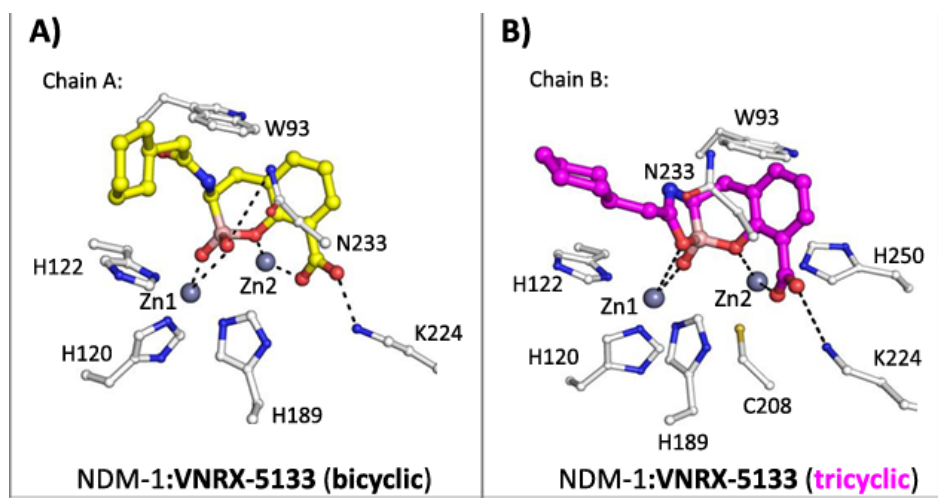


Figura 39. Base strutturale dell'inibizione delle serina- e metallo-β-lattamasi da parte di VNRX-5133. (A) Vista da una struttura cristallina di VNRX-5133 complessato con NDM-1 nella catena A, che mostra la forma biciclica maggioritaria osservata. (B) Vista da una struttura cristallina di VNRX-5133 complessato con NDM-1 nella catena B, che mostra la forma triciclica (56).

2.9.2 Meccanismo d'azione

Come il vaborbactam, anche il taniborbactam non possiede alcuna attività antibatterica intrinseca e agisce esclusivamente come inibitore reversibile delle β-lattamasi (55).

Il meccanismo d'azione sfrutta la medesima proprietà chimica dell'atomo di boro già descritta per il vaborbactam, ovvero la sua capacità di legarsi covalentemente e in modo reversibile al residuo di serina catalitico delle SBL, mimando l'intermedio tetraedrico che si forma durante l'idrolisi del β-lattame (55).

La caratteristica che distingue il taniborbactam dal vaborbactam, e che ne giustifica lo spettro d'azione molto più ampio, riguarda proprio il comportamento nei confronti delle MBL: in questi enzimi, privi del residuo di serina necessario per il legame covalente, il boro del taniborbactam si lega invece direttamente agli ioni zinco presenti nel sito attivo, riproducendo così l'intermedio della reazione anche in assenza di un residuo serinico (55). È proprio questa doppia modalità di legame, adattabile ad entrambe le tipologie di BL, a rendere il taniborbactam un inibitore "pan-spettro", capace di agire su classi enzimatiche che nessun inibitore boronico precedente era in grado di colpire in modo efficace (56).

Affinché possa raggiungere il proprio bersaglio, il taniborbactam deve attraversare la membrana esterna dei batteri Gram-negativi. A differenza di quanto osservato per il

vaborbactam e per numerosi β -lattamici, che dipendono in modo significativo dalle porine di membrana per accumularsi nel periplasma, il taniborbactam mantiene un buon accumulo intracellulare anche in ceppi privati delle principali porine, un dato che suggerisce l'esistenza di vie di penetrazione alternative e che contribuisce a spiegare la sua efficacia anche contro ceppi con ridotta permeabilità di membrana (58).

2.9.3 Spettro d'azione e proprietà correlate

Lo spettro di inibizione del taniborbactam comprende, con potenza generalmente elevata, la maggior parte delle β -lattamasi di classe A (comprese le ESBL e le carbapenemasi KPC), di classe C (AmpC e cefalosporinasi correlate) e di classe D (OXA-48 e varianti simili), oltre a due delle famiglie di MBL clinicamente più rilevanti, NDM e VIM (55,56). Questo spettro lo distingue nettamente da tutti gli inibitori delle β -lattamasi attualmente approvati per uso clinico, compreso il vaborbactam, che restano privi di attività utile contro i metallo-enzimi (59). L'attività risulta invece più debole contro un'altra importante famiglia di MBL, quella degli enzimi IMP, e pressoché assente contro alcune sottoclassi meno diffuse a livello clinico (56).

In combinazione con il partner β -lattamico cefepime, il taniborbactam riduce in modo marcato la concentrazione minima inibente (MIC) necessaria contro isolati multiresistenti di *Enterobacterales* e *Pseudomonas aeruginosa*, comprese numerose forme resistenti ai carbapenemi e ad altre combinazioni β -lattamico/inibitore di più recente introduzione (59). Ampi studi di sorveglianza condotti su collezioni cliniche di provenienza globale hanno confermato questo ampio spettro d'azione, mostrando un buon ripristino dell'attività del cefepime contro la maggior parte dei ceppi produttori di KPC, OXA-48, VIM e NDM; l'attività risulta invece più limitata contro i produttori di IMP e contro i batteri non fermentanti, in particolare *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* portatori di metallo-enzimi, verosimilmente per una minore capacità del taniborbactam di accumularsi in queste specie rispetto a quanto osservato in *Enterobacterales* (57).

Sul piano della resistenza acquisita, è stata descritta una variante enzimatica, denominata NDM-9, capace di sfuggire quasi completamente all'inibizione da parte del taniborbactam pur differendo dall'enzima originario NDM-1 per una singola mutazione puntiforme; questa variante è già stata identificata in isolati clinici, animali e ambientali provenienti da diversi continenti, sebbene la sua diffusione globale resti a oggi contenuta (60).

Una mutazione dello stesso tipo, con effetti analoghi, è stata descritta anche in una variante della famiglia VIM (61). Il meccanismo alla base di questa resistenza è di tipo elettrostatico: la mutazione altera la carica di una piccola porzione della superficie dell'enzima, proprio nel punto in cui normalmente si aggancia la catena laterale amminica carica positivamente del taniborbactam, disturbandone il legame e riducendone drasticamente l'efficacia, come mostrato dal confronto delle superfici elettrostatiche di NDM-1, NDM-9, VIM-2 e IMP-1 (**Figura 40**) (61). Questa vulnerabilità è considerata una caratteristica specifica del taniborbactam, legata alla sua particolare struttura, e non dovrebbe riguardare inibitori boronici di più recente sviluppo con catene laterali diverse.

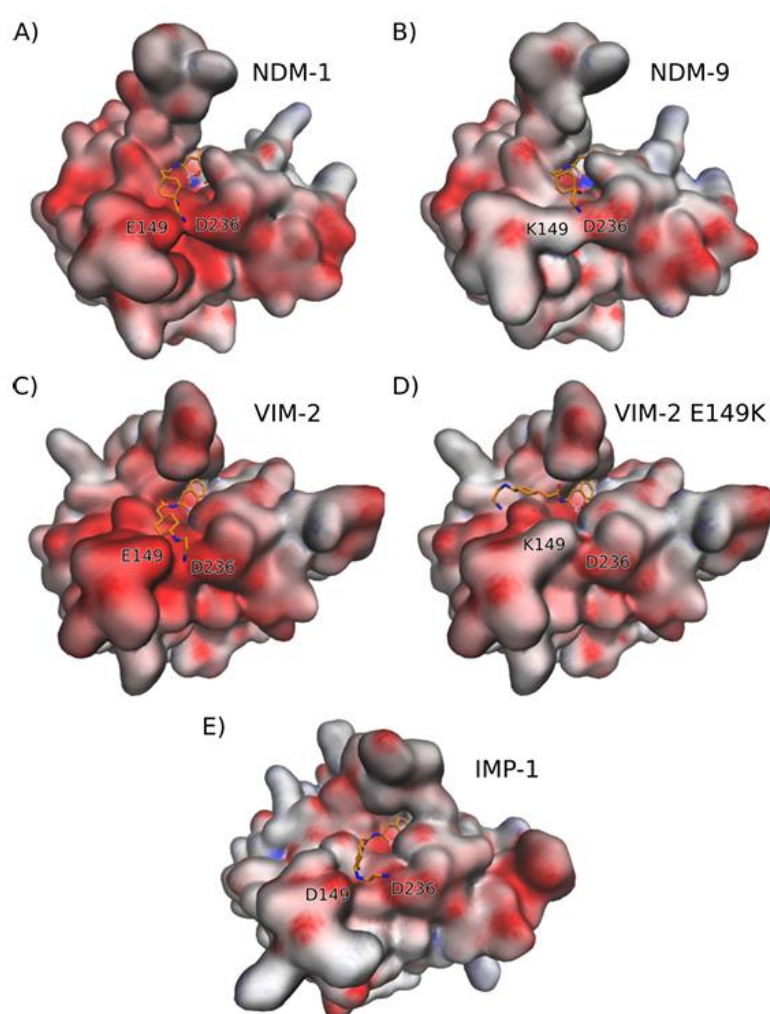


Figura 40. Superfici di potenziale elettrostatico delle proteine (A) NDM-1, (B) NDM-9, (C) VIM-2, (D) VIM-2 Glu149Lys, e (E) IMP-1. I potenziali negativi, neutri e positivi sono colorati rispettivamente in rosso, bianco e blu, su una scala da -10 a 10 kBT/ec (61).

Al di là di questo meccanismo specifico, l'analisi genomica di isolati con ridotta sensibilità alla combinazione mostra che la resistenza clinica al cefepime-taniborbactam è quasi sempre multifattoriale, risultando dalla concomitanza di più meccanismi (produzione di enzimi IMP, alterazioni della proteina bersaglio PBP-3, difetti di permeabilità di membrana e sovraespressione di pompe di efflusso) piuttosto che da un singolo evento isolato (59). Coerentemente con l'assenza di dipendenza dalle porine descritta nel paragrafo precedente, studi dedicati hanno inoltre mostrato che la frequenza di comparsa spontanea di resistenza al cefepime-taniborbactam in ceppi produttori di NDM-1 è molto bassa, e che la mutazione responsabile della variante NDM-9 non è mai stata osservata insorgere spontaneamente durante gli esperimenti di selezione, un dato incoraggiante circa il rischio di sviluppo di resistenza durante l'uso clinico del farmaco (58).

Sul piano farmacocinetico, il taniborbactam presenta un comportamento lineare e dose-dipendente, con un volume di distribuzione allo stato stazionario di circa 20 litri, un'emivita di eliminazione di circa 2,3 ore e un legame alle proteine plasmatiche trascurabile. Come il cefepime, viene eliminato prevalentemente per via renale, e la sua clearance si riduce in proporzione al grado di compromissione della funzione renale, senza interazioni farmacocinetiche rilevanti quando somministrato insieme al partner β -lattamico (59).

Il farmaco raggiunge inoltre buone concentrazioni a livello polmonare, sia nel fluido di rivestimento epiteliale sia nei macrofagi alveolari, un dato rilevante in vista del suo possibile impiego futuro nel trattamento delle polmoniti (59).

2.9.4 Combinazione attualmente in fase di sviluppo clinico

L'unica combinazione attualmente studiata contenente taniborbactam è quella con il cefepime, una cefalosporina di quarta generazione ad ampio spettro già ampiamente utilizzata in ambito ospedaliero (59). A differenza del vaborbactam, il taniborbactam non ha ancora ottenuto l'approvazione regolatoria definitiva: nel febbraio 2024 la Food and Drug Administration statunitense ha emesso una Complete Response Letter, richiedendo dati aggiuntivi relativi alla produzione del farmaco, senza tuttavia sollevare criticità di efficacia o sicurezza clinica né richiedere ulteriori studi clinici (59).

L'efficacia della combinazione è stata documentata nello studio registrativo di fase 3 CERTAIN-1, che ha confrontato cefepime-taniborbactam con meropenem in pazienti ospedalizzati con infezioni complicate delle vie urinarie, inclusa la pielonefrite acuta.

Nella popolazione microbiologica valutabile, il successo composito (microbiologico e clinico) è stato osservato nel 70,6% dei pazienti trattati con cefepime-taniborbactam contro il 58,0% dei pazienti trattati con meropenem, un risultato che ha dimostrato la superiorità statistica della combinazione, guidata soprattutto da un più alto tasso di eradicazione microbiologica (59). Il profilo di sicurezza è risultato sostanzialmente sovrapponibile a quello del meropenem, con cefalea e disturbi gastrointestinali (diarrea, nausea, stipsi) come effetti avversi correlati al farmaco più comunemente riportati (59).

Già negli studi preclinici condotti su modelli murini di infezione polmonare e delle vie urinarie, la combinazione cefepime-taniborbactam si era dimostrata efficace contro ceppi produttori di β -lattamasi di classi diverse, con riduzioni della carica batterica di diversi ordini di grandezza rispetto al cefepime somministrato da solo (**Figura 41**) (55).

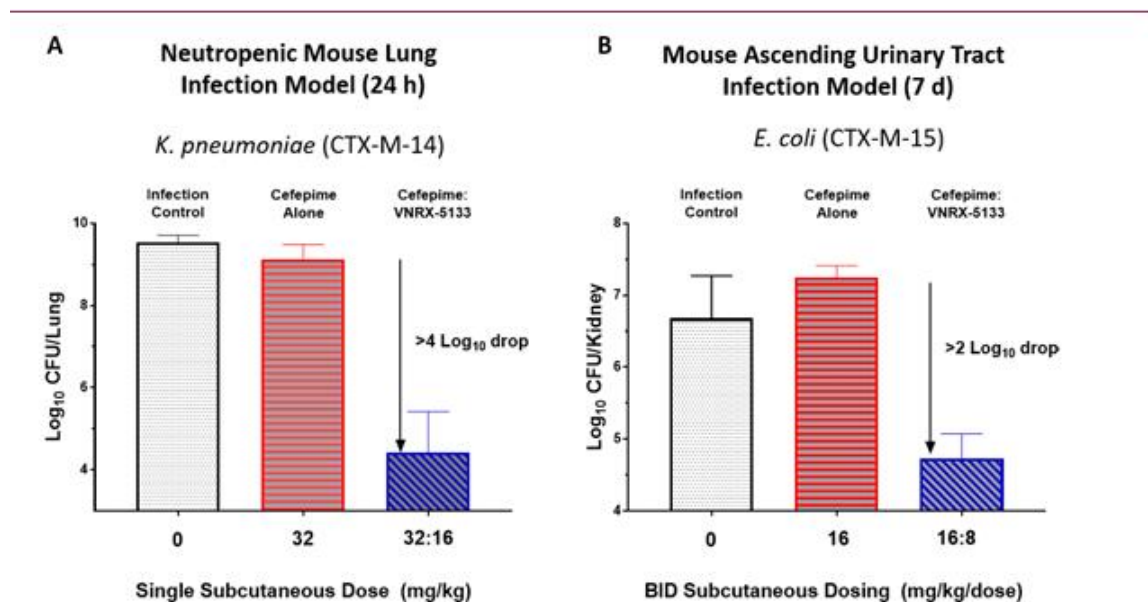


Figura 41. Risultati ottenuti nel modello murino di infezione polmonare neutropenica (A) e nel modello murino di infezione ascendente delle vie urinarie (B) (55).

Sulla base di questi risultati e dell'esito positivo del trial registrativo, lo sviluppo futuro del farmaco prevede l'estensione delle indicazioni terapeutiche al trattamento della polmonite nosocomiale e della polmonite associata a ventilazione meccanica, oltre a un monitoraggio epidemiologico continuo della diffusione delle varianti resistenti come NDM-9, la cui prevalenza, per quanto ancora contenuta a livello globale, rappresenta la principale minaccia all'efficacia futura di questo inibitore (59,60).

CAPITOLO III – XERUBORBACTAM

3.1 IL DESIGN DI UNA NUOVA CLASSE DI ACIDI BORONICI CICLICI

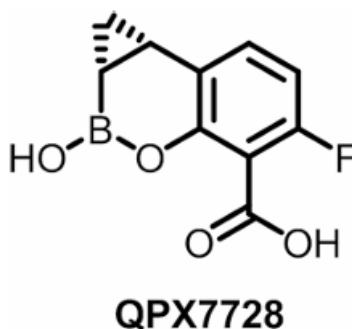


Figura 42. *Xeruborbactam (QPX7728)* (62)

Lo sviluppo di xeruborbactam (**figura 42**) nasce da un problema irrisolto lasciato aperto dalla prima generazione di inibitori boronici ciclici. Vaborbactam, il capostipite di questa classe, aveva dimostrato un'ottima capacità di inibire le SBL, ma restava completamente inattivo nei confronti delle MBL come NDM-1, così come nei confronti delle oxacillinasi di classe D più resistenti, in particolare quelle espresse in *Acinetobacter baumannii* come OXA-23 (46). Il gruppo di ricerca che aveva progettato e portato a uno stadio di sviluppo avanzato il vaborbactam decise quindi di riprendere in mano lo scaffold di partenza per capire se fosse possibile allargarne lo spettro, senza perdere la potenza già raggiunta contro le SBL.

Il punto di partenza chimico non era vaborbactam stesso, ma una struttura più semplice chiamata **benzoxaborinina**, un anello bora-ossigenato fuso a un anello aromatico, individuata per la prima volta da un gruppo dell'Università di Toronto e già nota come un'ottima base per inibitori ad ampio spettro contro le SBL (**figura 43**) (46).

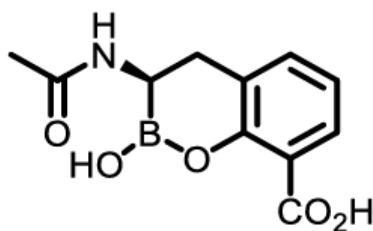


Figura 43. La benzoxaborinina, il composto guida degli inibitori delle β -lattamasi che ha dato origine allo sviluppo di Xeruborbactam (46)

Da qui il lavoro di ottimizzazione è proceduto per tappe successive, ciascuna delle quali ha risolto un problema specifico senza compromettere i risultati già ottenuti.

3.1.1 Aggregazione dei derivati più semplici

Le prime molecole della serie, prive di sostituenti sull'anello aromatico vicino al gruppo carbossilico, tendevano a formare aggregati con loro stesse in soluzione, cioè dimeri e trimeri, un fenomeno legato alla capacità del gruppo boronico di una molecola di formare esteri boronici ciclici con il sostituyente ossidrilico e carbossilico di un'altra molecola eliminando due molecole d'acqua (**figura 44**) (46).

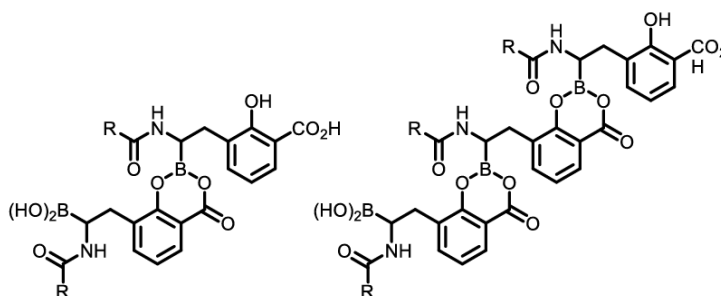


Figura 44. Strutture ipotizzate degli aggregati che si formano in soluzione (46)

Per un farmaco a somministrazione endovenosa, la formazione di questi aggregati rappresenta un rischio concreto per la caratterizzazione delle impurezze richiesta in fase di approvazione regolatoria. Inserendo un piccolo sostituyente proprio accanto al gruppo carbossilico, come un gruppo metossi o un fluoro (**figura 45**, composto **4b**), il problema si riduceva drasticamente, e la molecola restava stabile in forma monomerica anche a concentrazioni elevate. Lo stesso tipo di sostituzione portò anche un secondo vantaggio: nei ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* dotati della pompa di efflusso MexAB-OprM, riduceva l'impatto negativo dell'efflusso sull'attività della molecola.

3.1.2 Attività ad ampio spettro

Fino a questo punto della serie, l'attività contro NDM-1 e le altre metallo-enzimi restava scarsa o assente. La svolta arrivò quando, invece di collegare il gruppo acilamminico al boro tramite un legame ammidico classico, i chimici del gruppo provarono una derivatizzazione tramite zolfo (**figura 45**, composto **7a**). Questa modifica portò a un miglioramento di circa 300 volte della potenza contro NDM-1, che venne confermata anche come attività verso cellule batteriche intere: la molecola, a concentrazioni molto basse, riusciva a ripristinare la sensibilità al biapenem in un ceppo di *Klebsiella pneumoniae* produttore di NDM-1 (46). Questa attività non dipendeva da un sequestro dello zinco nel sito attivo, cioè da una chelazione del metallo, poiché la potenza restava invariata aumentando la concentrazione di zinco nel mezzo di reazione; il composto inoltre dimostrava una buona selettività, non mostrando attività verso un pannello di metalloproteasi umane testate.

3.1.3 Formulazione orale

Una volta consolidata l'attività ad ampio spettro, il gruppo si concentrò sulla possibilità di rendere la molecola disponibile anche in formulazione orale, un obiettivo ambizioso per una classe di farmaci storicamente vincolata alla sola via endovenosa. Il composto scelto come base per questa fase, contenente un anello tiadiazolico e un sostituito metossi sull'anello aromatico (**figura 45**, composto **7b**), aveva però da solo una biodisponibilità orale molto scarsa. La soluzione fu sviluppare dei profarmaci, forme chimicamente mascherate del principio attivo, convertite nella molecola originale una volta assorbite, ottenuti semplicemente esterificando il gruppo carbossilico: alcuni di questi raggiunsero una biodisponibilità orale praticamente completa nel ratto (46).

3.1.4 Un risultato inatteso: la rimozione del sostituito sul carbonio in alfa al boro

Nel tentativo di introdurre un atomo di azoto nell'anello aromatico al posto del carbonio che portava il gruppo metossi, i ricercatori sintetizzarono per prima cosa, come tappa intermedia più semplice, un composto privo di qualsiasi sostituito sul carbonio in alfa al boro. Il risultato fu sorprendente: la molecola mostrò un'attività molto più alta del previsto, nonostante mancasse del sostituito ritenuto fino ad allora necessario per una buona potenza. Da questa osservazione nacque una nuova sottoserie di composti, il cui capostipite (**figura**

45, composto **17b**) mostrò un'ottima potenza sia contro le β -lattamasi delle classi A e C, sia, cosa particolarmente rilevante, contro le oxacillinasi di classe D di *Acinetobacter baumannii*, come OXA-23 e OXA-72 difficilmente inibite da altre molecole, mantenendo anche una buona attività contro le MBL NDM-1 e VIM-2 (46). Questo composto mostrò inoltre un buon profilo farmacocinetico nel ratto, con una discreta biodisponibilità orale anche senza bisogno di un profarmaco, suggerendo come la biodisponibilità potesse essere accessibile per uno scaffold così semplice.

3.1.5 Il sostituito ciclopropilico e la stabilità metabolica

Questa molecola, per quanto promettente, presentava un difetto che ne compromise lo sviluppo: negli studi su cane e scimmia andava incontro a una degradazione ossidativa che rimuoveva l'atomo di boro dalla struttura, generando un metabolita che si legava fortemente alle proteine plasmatiche e veniva eliminato con estrema lentezza. Il rischio di sviluppo legato a un metabolita così persistente fu ritenuto troppo elevato, e il programma su questa specifica molecola venne interrotto (46). Per risolvere il problema, i chimici cercarono modi per proteggere l'atomo di boro introducendo un ingombro sterico nelle sue immediate vicinanze. La maggior parte dei tentativi comportò una perdita di potenza inaccettabile, ma un'eccezione importante fu la fusione di un anello ciclopropanico proprio accanto al boro: questa modifica manteneva quasi intatta l'attività originale, rendendo la molecola molto più resistente alla degradazione metabolica.

3.1.6 La molecola finale

L'ottimizzazione di questa serie ciclopropanica, condotta anche testando le diverse forme speculari (enantiomeri) dei composti, portò all'identificazione del composto **35**, poi denominato QPX7728 e successivamente xeruborbactam (**figura 45** composto **35**). Tra i vari candidati ugualmente potenti, questa molecola fu selezionata per lo sviluppo clinico perché presentava un legame più basso con le proteine plasmatiche umane rispetto all'analogo più simile (46).



Figura 45. Evoluzione strutturale della molecola attraverso i composti chiave descritti sopra: **4b** (serie amidica, solo attività seriniche), **7a** (legame tiolico, attività anche su metallo-enzimi), **17b** (rimozione del sostituito accanto al boro, ampliamento a OXA-23) e infine **35** (fusione ciclopropanica, stabilità metabolica) (46).

3.2 IL MECCANISMO D'AZIONE

Xeruborbactam possiede una caratteristica che lo distingue nettamente sia da vaborbactam che da taniborbactam: agisce attraverso due meccanismi distinti e complementari. Il primo è quello classico degli inibitori boronici, cioè l'inibizione delle β -lattamasi; il secondo, molto più insolito per un inibitore di questa classe, è un'attività antibatterica diretta, dovuta al legame con alcune proteine bersaglio dei β -lattamici stessi (41).

3.2.1 Inibizione delle β -lattamasi

Come tutti gli inibitori di questa famiglia, xeruborbactam si lega in modo covalente e reversibile al sito attivo della β -lattamasi attraverso interazione con il boro elettrofilo con l'enzima. Le strutture cristallografiche ottenute con quattro enzimi rappresentativi delle diverse classi, KPC-2, OXA-48, NDM-1 e VIM-2, hanno permesso di osservare direttamente questo legame (**Figura 46**) (46).

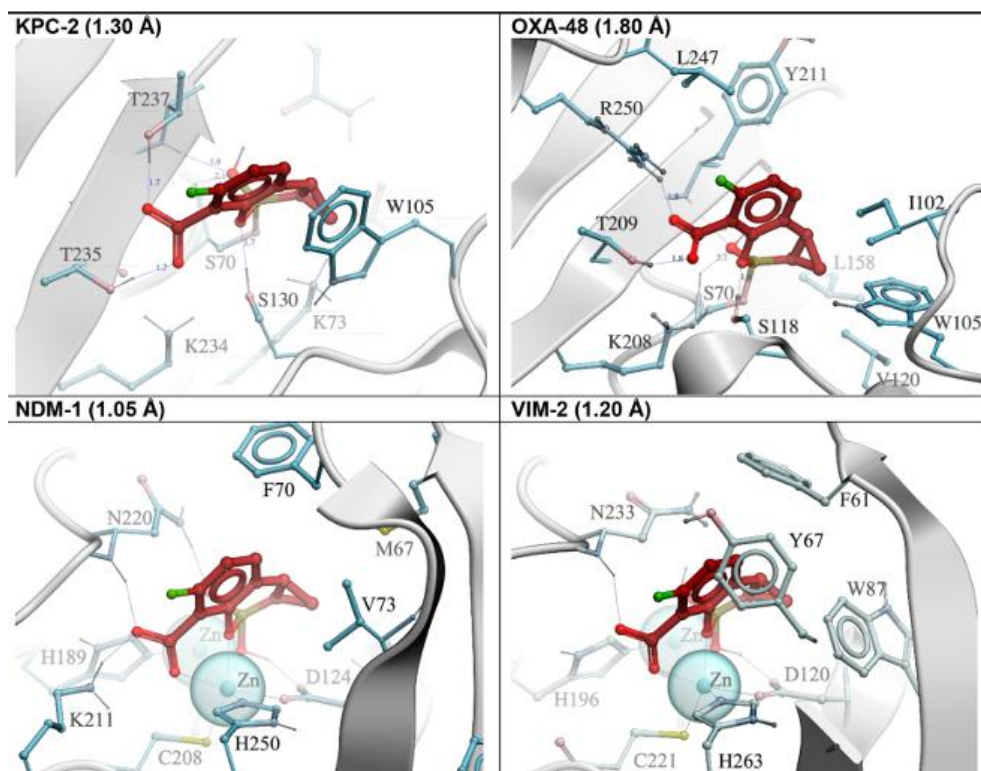


Figura 46. *Strutture cristallografiche ad alta risoluzione di xeruborbactam in complesso con diversi enzimi (46)*

Nelle due β -lattamasi seriniche, il boro si lega covalentemente al residuo di serina che normalmente costituisce il punto di attacco catalitico dell'enzima; nelle due metallo- β -lattamasi, prive di serina catalitica ma dotate di uno ione zinco, il boro si lega invece alla molecola d'acqua che coordina lo zinco nel sito attivo. La forma tridimensionale della molecola resta sostanzialmente identica nelle quattro strutture, cambiando solo l'orientamento del gruppo carbossilico (46).

Dal punto di vista cinetico, xeruborbactam mostra una cinetica di legame "lenta" nei confronti delle SBL, mentre verso le MBL il legame è più rapido sia nella formazione che nella dissociazione (46), una differenza che contribuisce a spiegare perché la sua attività verso le MBL resti generalmente inferiore rispetto a quella osservata contro le SBL più sensibili.

Il confronto biochimico su un ampio pannello di β -lattamasi purificate ha confermato che xeruborbactam possiede lo spettro di inibizione più ampio tra tutti gli inibitori boronici e diazabicyclottani attualmente disponibili o in sviluppo avanzato, superando vaborbactam, avibactam, relebactam e durlobactam per numero di enzimi bersaglio coperti con potenza rilevante (63). Contro le β -lattamasi a spettro esteso di classe A e contro KPC-2, la sua potenza è paragonabile a quella dei migliori inibitori diazabicyclottanici. Contro le oxacillinasi di classe D si distingue nettamente: mentre la maggior parte degli altri inibitori boronici, incluso taniborbactam, ha un'attività scarsa o nulla contro OXA-23, xeruborbactam la inibisce con potenza molto elevata, risultando circa cento volte più efficace (63).

3.2.2 Perché lo spettro sulle metallo- β -lattamasi è più ampio di quello di taniborbactam

Il confronto diretto tra xeruborbactam e taniborbactam, gli unici due inibitori boronici capaci di agire anche sulle MBL, chiarisce alcuni aspetti strutturali che spiegano il più ampio spettro di xeruborbactam. Contro le varianti più diffuse di NDM e VIM i due inibitori mostrano potenza sovrapponibile; le differenze emergono con alcune varianti specifiche, dove taniborbactam perde efficacia mentre xeruborbactam la mantiene.

La spiegazione risiede nel diverso modo in cui le due molecole si ancorano al sito attivo. Taniborbactam sfrutta un'interazione elettrostatica tra la propria catena laterale, carica positivamente, e una tasca dell'enzima carica negativamente, presente nella maggior parte delle varianti di NDM e VIM. Xeruborbactam non dipende da questo tipo di interazione per legarsi e inibire l'enzima (63). Questo diventa rilevante quando compaiono varianti in cui quella tasca viene alterata da una mutazione: è il caso di NDM-9, che differisce da NDM-1 per una singola sostituzione capace di neutralizzare la carica negativa della tasca, sufficiente a renderla resistente a taniborbactam mentre xeruborbactam mantiene una potenza pressoché identica a quella su NDM-1 (63,64).

Lo stesso principio spiega la resistenza di taniborbactam nei confronti della famiglia IMP, che possiede naturalmente una tasca meno favorevole a quel tipo di interazione elettrostatica; xeruborbactam, non dipendendo da questo meccanismo, inibisce efficacemente la maggior parte delle varianti IMP e anche CcrA, la MBL endogena di *Bacteroides fragilis* (63).

Questo vantaggio strutturale, tuttavia, non è assoluto: la variante IMP-10 differisce da IMP-1 per una singola sostituzione amminoacidica in un'ansa dell'enzima coinvolta nel posizionamento della molecola nel sito attivo, che riduce di circa venti volte l'affinità di xeruborbactam, rendendo IMP-10 resistente sia a xeruborbactam che a taniborbactam (64). Il dato ha un certo interesse epidemiologico perché IMP-10 è già stato identificato in diversi paesi asiatici e in Sud America, in *Pseudomonas aeruginosa* e in diverse Enterobacterales, ed è stato coinvolto in un focolaio di infezioni gravi in Brasile (64); un fenomeno analogo, seppure meno marcato, è stato osservato anche per IMP-26 (63).

Infine, alcune metallo- β -lattamasi più rare, SPM-1, SIM-1, e gli enzimi delle sottoclassi B2 e B3 (PFM-1 e AIM-1), restano scarsamente o per nulla inibite da xeruborbactam, ed è proprio in questi casi che taniborbactam può risultare più efficace, come accade per SPM-1 (64). Nessuno dei due inibitori è attivo contro L1, la MBL cromosomica di *Stenotrophomonas maltophilia* (63).

3.2.3 Inibizione delle Penicillin Binding Protein (PBP)

A differenza di vaborbactam e taniborbactam, privi di attività antibatterica propria, xeruborbactam è dotato di una modesta ma reale capacità di inibire direttamente la crescita batterica, dovuta al legame diretto con le PBP, le stesse proteine bersaglio dei β -lattami coinvolte nella sintesi della parete cellulare (62).

Questo legame è stato dimostrato con un test di competizione fluorescente sulle proteine di membrana di diversi Gram-negativi, rilevabile solo abbassando la temperatura di incubazione fino a 0°C, segno che si tratta di un legame relativamente instabile, facilmente spiazzato (62). In *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, xeruborbactam si lega con affinità simile a PBP1a/PBP1b, PBP2 e PBP3; in *Acinetobacter baumannii* mostra una preferenza più marcata per PBP1a, e in *Pseudomonas aeruginosa* per PBP1a e PBP1b (Tabella 3) (62).

Strain	Compound	MIC (μ g/mL) (μ M)	Relative binding [mean IC ₅₀ $\pm$ SD or IC ₅₀ (μ M)] of ^a :			
			PBP1a	PBP1b	PBP2	PBP3
<i>Escherichia coli</i> ECM5497 (MG1655)	Xeruborbactam	16 (72)	47 $\pm$ 13	56 $\pm$ 18	ND ^b	73 $\pm$ 10
	Meropenem	0.03 (0.08)	5.4 (4.4) ^d	21.1 (3.4) ^d	ND (0.003) ^{b,d}	0.46 (1.57) ^d
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPM1001 (ATCC 49816)	Xeruborbactam	16 (72)	41 $\pm$ 6	ND ^c	51 $\pm$ 15	55 $\pm$ 8
	Meropenem	0.03 (0.08)	6.6 (5.2) ^e	ND ^c	0.003 (<0.02) ^e	0.24 (0.31) ^e
<i>Acinetobacter baumannii</i> ACM1320 (ATCC 17978)	Xeruborbactam	16 (72)	1.4 $\pm$ 0.5	ND ^c	23 $\pm$ 2	140 $\pm$ 40
	Meropenem	0.25 (0.66)	0.07 (<0.08) ^f	ND (0.5) ^{c,f}	0.011 (<0.08) ^f	0.19 (0.33) ^f
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAM3034 (PAO1)	Xeruborbactam	16 (72)	7.1 $\pm$ 0.8	1.9 $\pm$ 0.2	370 $\pm$ 120	510 $\pm$ 120
	Meropenem	0.06 (0.16)	0.17 (0.5) ^d	0.23 (0.5) ^d	ND (0.05) ^d	0.096 (0.08) ^d

Tabella 3. Legame di xeruborbactam a più PBP contemporaneamente con affinità diverse a seconda della specie batterica (62).

Una conferma indipendente arriva dall'osservazione al microscopio della forma delle cellule trattate: l'inibizione di più PBP contemporaneamente produce infatti alterazioni morfologiche caratteristiche, come filamenti rigonfi a metà cellula. Cellule di *Klebsiella pneumoniae* trattate con xeruborbactam hanno mostrato proprio questo fenotipo, praticamente sovrapponibile a quello di meropenem, mentre in *Acinetobacter baumannii* la molecola ha prodotto una deformazione cellulare peculiare, diversa da quella di qualsiasi altro antibiotico di controllo (62).

Un ultimo elemento a sostegno di questo meccanismo emerge dagli studi di resistenza: in *Klebsiella pneumoniae* sono stati selezionati mutanti con un modesto aumento della MIC,

privi però di mutazioni nelle PBP e portatori invece di alterazioni nel gene *tolQ*, componente di un complesso proteico coinvolto nel coordinamento tra sintesi della parete e divisione cellulare (62), un'indicazione che il bersaglio complessivo della molecola potrebbe estendersi oltre le sole PBP. Queste mutazioni, in ogni caso, non compromettevano la capacità di xeruborbactam di potenziare i β -lattamici partner attraverso l'inibizione delle β -lattamasi, confermando che i due meccanismi d'azione restano sostanzialmente indipendenti (62).

3.3 SPETTRO D'AZIONE E PROPRIETA' CORRELATE

3.3.1 Potenza e copertura su ampie collezioni di isolati clinici

Al di là del confronto sui singoli enzimi purificati già descritto nel paragrafo precedente, il valore pratico di xeruborbactam si misura soprattutto nella sua capacità di ripristinare l'attività dei β -lattami partner su ampie collezioni di isolati clinici resistenti. I dati più consistenti arrivano dal confronto diretto tra meropenem-xeruborbactam e le principali combinazioni concorrenti, condotto su oltre 1.000 isolati di Enterobacterales resistenti ai carbapenemi raccolti nell'ambito del programma di sorveglianza globale SENTRY (63).

Contro questa collezione, meropenem-xeruborbactam è risultata la combinazione più potente in assoluto, indipendentemente dal tipo di carbapenemasi prodotta. Nei ceppi privi di MBL laa MIC₉₀ è stato di 0,125 μ g/mL, contro valori compresi tra 2 e 32 μ g/mL per le altre combinazioni (**Tabella 4**) (63).

	MEM	MEM + XER at 4 µg/mL	MEM + XER at 8 µg/mL	FEP	FEP + TAN at 4 µg/mL	CAZ + AVI at 4 µg/mL	MEM + VAB at 8 µg/mL	IMP + REL at 4 µg/mL
All				N = 1027			N = 969	N = 507
MIC ₅₀	32	0.06	≤0.03	>32	1	1	4	1
MIC ₉₀	>32	0.5	0.25	>32	8	>32	>32	32
% Inhibited ^b	30.20	98.30	99.60	10.80	92.80	69.60	57	51.30
No MBL				N = 715			N = 677	N = 339
MIC ₅₀	16	0.06	≤0.03	>32	0.5	1	1	0.25
MIC ₉₀	>32	0.25	0.125	>32	4	2	32	4
% Inhibited	39.40	99.40	100.00	15.50	97.60	99.30	79.9	76.70
KPC				N = 369			N = 347	N = 193
MIC ₅₀	32	≤0.03	≤0.03	>32	0.25	1	≤0.03	0.125
MIC ₉₀	>32	0.125	0.06	>32	2	4	2	0.5
% Inhibited	29.50	98.90	100.00	11.70	99.50	99.20	98.6	97.40
OXA-48				N = 247			N = 236	N = 96
MIC ₅₀	32	0.06	≤0.03	>32	1	1	16	2
MIC ₉₀	>32	0.125	0.125	>32	4	2	>32	8
% Inhibited	37.20	100.00	100.00	21.50	97.60	100.00	41.9	27.10
Non-CP CRE				N = 99			N = 94	N = 50
MIC ₅₀	8	0.25	0.125	>32	2	1	1	0.25
MIC ₉₀	16	1	0.5	>32	8	4	4	1
% Inhibited	81.80	100.00	100.00	15.20	90.90	98.00	98.9	92
MBL				N = 310				N = 168
MIC ₅₀	>32	0.06	≤0.03	>32	1	>32	>32	32
MIC ₉₀	>32	4	1	>32	16	>32	>32	>64
% Inhibited	9.00	95.80	98.70	0.00	81.70	1.60	9.6	0
NDM				N = 287				N = 157
MIC ₅₀	>32	0.06	≤0.03	>32	2	>32	>32	32
MIC ₉₀	>32	4	1	>32	32	>32	>32	>64
% Inhibited	6.30	95.80	99.00	0.00	81.20	1.00	6.6	0
VIM				N = 20				N = 11
MIC ₅₀	16	≤0.03	≤0.03	32	0.5	>32	16	16
MIC ₉₀	>32	0.5	0.06	>32	4	>32	32	64
% Inhibited	35.00	100.00	100.00	0.00	100.00	0.00	45	0

Tabella 4. Attività in vitro del meropenem da solo e in combinazione con xeruborbactam a 4 e 8 µg/mL, e degli agenti di confronto in combinazione con altri BLI, contro isolati di sorveglianza di ceppi di Enterobacterales resistenti ai carbapenemi, suddivisi in base al tipo di carbapenemasi prodotta (63).

Nei ceppi produttori di KPC, la combinazione è risultata da 8 a 64 volte più potente rispetto a imipenem-relebactam, meropenem-vaborbactam e ceftazidime-avibactam. Il dato più significativo riguarda però i ceppi produttori di metallo-β-lattamasi, per i quali solo meropenem-xeruborbactam e cefepime-taniborbactam hanno mostrato un'attività residua: qui meropenem-xeruborbactam si è rivelata 16 volte più potente di cefepime-taniborbactam (MIC₉₀ di 1 µg/mL contro 16 µg/mL), con una copertura superiore al 95% degli isolati contro circa l'82% della combinazione concorrente (63).

Questo primato è stato confermato da uno studio più recente su 300 isolati clinici di Enterobacterales produttori di carbapenemasi raccolti in Spagna tra il 2017 e il 2024 (65). Su questa collezione, meropenem-xeruborbactam ha raggiunto una copertura del 100% con

MIC50 e MIC90 pari o inferiori a 0,06 mg/L, nettamente superiore ad aztreonam-avibactam e cefepime-taniborbactam, fermi rispettivamente al 99,3% e al 92,7% di copertura (65).

Anche in questo studio la potenza si è mantenuta massima contro i produttori di OXA-48 e di KPC (MIC90 di 0,06 mg/L per entrambi), scendendo leggermente, ma restando comunque eccellente, contro i produttori di MBL (MIC90 di 0,125 mg/L) (65).

3.3.2 Meccanismi di resistenza intrinseca: porine ed efflusso

L'attività di xeruborbactam non è del tutto immune dai classici meccanismi di resistenza legati alla permeabilità di membrana e all'efflusso attivo, sebbene il suo impatto risulti generalmente più contenuto rispetto ad altri inibitori

In *Klebsiella pneumoniae*, il fattore che più influenza la sua potenza è la funzionalità della porina OmpK36. L'analisi di un pannello di ceppi isogenici ha mostrato che l'inattivazione di OmpK36, da sola o insieme a quella di OmpK35, produce un aumento della concentrazione minima inibente di sole 2-4 volte, un incremento nettamente più contenuto rispetto a quanto osservato con gli inibitori diazabiciclotanici come avibactam o zidebactam (62). Il dato è stato confermato su centinaia di isolati clinici: la percentuale di ceppi con MIC elevata di xeruborbactam saliva dal 5% circa nei ceppi con porina integra fino al 92% in quelli con OmpK36 completamente non funzionale (62).

Diverso il discorso per l'efflusso attivo. In *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, la principale pompa AcrAB-TolC non altera in modo significativo la potenza di xeruborbactam (62). Il quadro cambia radicalmente in *Pseudomonas aeruginosa*, dove la pompa costitutiva MexAB-OprM riduce di 16 volte la MIC della molecola da sola quando viene inattivata. Il confronto diretto con taniborbactam su ceppi di *P. aeruginosa* produttori di MBL ha mostrato che, mentre taniborbactam mantiene una buona capacità di potenziamento anche in presenza di questa pompa attiva, le combinazioni con xeruborbactam risultano molto meno efficaci a causa della sua espulsione dalla cellula (64). Il dato è rilevante perché diversi studi precedenti erano stati condotti su un ceppo di laboratorio geneticamente privo di questa pompa, il che potrebbe aver sovrastimato l'attività reale della molecola contro gli isolati clinici, che nella maggior parte dei casi la esprimono a livelli normali o aumentati (64).

Anche in *Acinetobacter baumannii* la pompa di efflusso AdeIJK influisce sulla potenza della molecola, con un aumento di 2-4 volte della MIC nei ceppi che la sovraesprimono, confermato anche su isolati clinici (62).

3.3.3 Proprietà farmacocinetiche

I dati raccolti nel ratto mostrano un profilo paragonabile a quello dei comuni β -lattamici: esposizione sistemica proporzionale alla dose, emivita breve, volume di distribuzione contenuto e legame alle proteine plasmatiche dell'85% (46).

Un aspetto rilevante, considerando che questa classe di molecole è stata storicamente vincolata alla sola via endovenosa, è la biodisponibilità orale: nel ratto a digiuno i valori si sono attestati tra il 43% e il 53% alle dosi intermedie, scendendo al 24-28% alle dosi più elevate, un comportamento compatibile con un meccanismo di trasporto attivo attraverso l'epitelio intestinale (46).

Questi risultati preclinici hanno trovato conferma negli studi di fase I nell'uomo, dove xeruborbactam è stato somministrato sia per via endovenosa sia per via orale come profarmaco, risultando sicuro e ben tollerato a dosi fino a 1.000 mg al giorno, con esposizioni superiori agli obiettivi farmacocinetico-farmacodinamici preclinici (63).

Su questa base è stata definita la concentrazione di 8 $\mu\text{g/mL}$ come riferimento per i test di sensibilità in vitro di xeruborbactam in associazione con meropenem, corrispondente al livello plasmatico allo stato stazionario osservato nei soggetti sani dopo dose di carico e somministrazioni ripetute ogni 8 ore (63).

3.4 COMBINAZIONE E SVILUPPO CLINICO

3.4.1 Il partner β -lattamico e lo stato di sviluppo clinico

Xeruborbactam è attualmente in sviluppo principalmente in combinazione con meropenem, un abbinamento che sfrutta in modo sinergico le due anime della molecola descritte nei paragrafi precedenti: l'inibizione ad ampio spettro delle β -lattamasi e l'attività diretta sulle PBP, che si somma a quella dello stesso meropenem (63). Il farmaco ha completato due studi di fase I, con somministrazione sia endovenosa sia orale in forma di profarmaco, risultando sicuro e ben tollerato.

A differenza di taniborbactam, il cui sviluppo clinico è più avanzato, avendo già completato uno studio clinico di fase III in combinazione con cefepime, xeruborbactam si trova ancora in una fase preliminare del percorso clinico, e la maggior parte dei dati disponibili riguarda quindi studi in vitro su ampie collezioni di isolati (63).

3.4.2 Attività contro i ceppi resistenti alle nuove combinazioni già disponibili

Un aspetto particolarmente rilevante per il potenziale posizionamento terapeutico di xeruborbactam riguarda la sua capacità di mantenere attività contro ceppi già resistenti alle combinazioni β -lattamico/inibitore più recenti (65).

Un primo esempio riguarda le varianti di KPC resistenti a ceftazidime-avibactam, comparse in seguito all'uso sempre più ampio di questa combinazione. Su un pannello di 14 isolati clinici portatori di queste varianti, tutti resistenti a ceftazidime-avibactam, meropenem-xeruborbactam ha mostrato un'attività superiore anche rispetto a meropenem-vaborbactam e imipenem-relebactam, con la maggior parte dei ceppi inibiti a concentrazioni pari o inferiori a 0,06 mg/L (65).

Un secondo esempio, forse ancora più rilevante dal punto di vista epidemiologico, riguarda i ceppi di *Escherichia coli* ad alto rischio, che combinano la produzione di NDM con un'inserzione di quattro amminoacidi (YRIN o YRIK) nella proteina PBP3.

Questa modifica riduce fortemente l'efficacia dei β -lattamici il cui meccanismo dipende quasi esclusivamente da PBP3, come aztreonam e cefepime, rendendo resistenti anche le combinazioni più moderne come aztreonam-avibactam e cefepime-taniborbactam (65).

Su un pannello di 18 isolati con queste caratteristiche, meropenem-xeruborbactam ha mantenuto un'attività del 100%, riducendo la MIC del meropenem a valori tra 0,06 e 0,25 mg/L in quasi tutti i casi. La spiegazione risiede nella doppia natura d'azione della molecola: poiché sia meropenem che xeruborbactam colpiscono più PBP contemporaneamente e non dipendono in modo esclusivo da PBP3, la mutazione YRIN/YRIK non riesce a intaccare l'efficacia della combinazione (65).

3.4.3 Limiti osservati e situazioni di potenza ridotta

Il fattore più consistentemente associato a una perdita di potenza è la combinazione tra produzione di NDM e una concomitante alterazione delle porine OmpK36/OmpC: in questi casi, pur restando la combinazione ampiamente la più attiva tra quelle disponibili, si osservano MIC più elevate, fino a raggiungere occasionalmente i 4 mg/L (65), un fenomeno coerente con quanto osservato anche nella collezione isogenica di *E. coli* in condizioni di bassa permeabilità (65).

A questo si aggiungono i due limiti già descritti nel paragrafo sullo spettro d'azione: la resistenza intrinseca di metallo- β -lattamasi rare come SPM-1 e della variante IMP-10 (e in misura minore IMP-26) (64,65), e la ridotta efficacia delle combinazioni nei ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* che esprimono a livelli normali o elevati la pompa MexAB-OprM (64).

3.4.4 Prospettive future

Nel complesso, i dati microbiologici raccolti finora delineano un profilo di xeruborbactam particolarmente promettente per il trattamento delle infezioni sostenute da Enterobacterales produttori di carbapenemasi, con un valore aggiunto specifico nei confronti dei ceppi produttori di MBL e delle resistenze emergenti alle combinazioni più recenti (65).

Resta da monitorare con attenzione l'evoluzione delle varianti enzimatiche capaci di sfuggire all'azione della molecola, come dimostra il caso di IMP-10, che suggerisce come anche per xeruborbactam, analogamente a quanto già osservato per taniborbactam con NDM-9, sia talvolta sufficiente una singola sostituzione amminoacidica per generare resistenza (64).

CONCLUSIONI

La resistenza antimicrobica rappresenta una delle sfide più rilevanti per la salute pubblica globale, poiché la crescente diffusione di ceppi batterici resistenti riduce progressivamente l'efficacia degli antibiotici disponibili e complica in modo significativo la gestione clinica delle infezioni, soprattutto quelle sostenute da patogeni Gram-negativi multiresistenti.

Le β -lattamasi restano il meccanismo di resistenza più diffuso contro i β -lattamici, e per lungo tempo gli inibitori disponibili in clinica hanno mostrato attività quasi esclusivamente contro le serina- β -lattamasi, lasciando le metallo- β -lattamasi sostanzialmente refrattarie a qualsiasi strategia di inibizione, rappresentando una delle principali criticità terapeutiche ancora irrisolte nell'ambito della resistenza antimicrobica.

Gli acidi boronici sono stati sviluppati proprio per provare a colmare questo divario. Il loro punto di forza risiede in una proprietà chimica specifica del boro, che è in grado di modificare la propria geometria quando entra in contatto con un nucleofilo, passando da una struttura planare a una tridimensionale: questa transizione riproduce fedelmente lo stato intermedio che si forma naturalmente durante l'idrolisi del β -lattame, un passaggio comune sia agli enzimi a base di serina sia a quelli a base di zinco. A partire da questa osservazione, la ricerca ha attraversato diverse fasi di sviluppo, passando da strutture semplici e aperte a composti sempre più complessi, fino ad arrivare agli inibitori ciclici, i primi realmente in grado di sfruttare questa doppia somiglianza strutturale.

Il primo di questi composti a raggiungere l'uso clinico è stato vaborbactam, approvato dalla FDA nel 2017 in combinazione con meropenem. Ha rappresentato un passaggio importante, perché ha dimostrato concretamente che un inibitore basato sul boro potesse funzionare in ambito terapeutico, ripristinando l'efficacia del meropenem anche contro la carbapenemasi KPC. Il suo limite era però evidente fin dalla progettazione: la struttura della molecola restava vincolata al solo meccanismo serinico, e per questo motivo non mostrava alcuna attività né contro le metallo- β -lattamasi né contro le oxacillinasi più problematiche.

Taniborbactam ha cercato di superare questo limite, diventando il primo inibitore boronico capace di agire su entrambe le famiglie di enzimi, grazie a una struttura più articolata in

grado di legarsi sia alla serina catalitica sia direttamente agli ioni zinco. Si è trattato di un avanzamento significativo, che tuttavia non si è dimostrato privo di criticità: è stata sufficiente una singola mutazione, quella responsabile della variante NDM-9, per ridurre drasticamente l'efficacia dell'inibitore su questo enzima. Sul piano dello sviluppo clinico, taniborbactam ha già completato uno studio clinico di fase III in combinazione con cefepime; a oggi, tuttavia, il farmaco non ha ancora ottenuto l'approvazione regolatoria definitiva, nonostante l'esito positivo degli studi clinici condotti.

È a partire da questi due precedenti che si può inquadrare correttamente il ruolo di xeruborbactam. Il suo sviluppo si colloca in diretta continuità con quello dei due inibitori precedenti, di cui supera i principali limiti: mantiene attività su varianti enzimatiche che sfuggono a taniborbactam, come NDM-9 e diverse metallo- β -lattamasi della famiglia IMP, e possiede una capacità che né vaborbactam né taniborbactam presentano, ovvero un legame diretto con alcune proteine della parete cellulare batterica, che contribuisce a un'attività antibatterica autonoma seppur modesta. I dati raccolti su ampie collezioni di isolati clinici confermano che questo si traduce in un beneficio concreto: la combinazione con meropenem mantiene una buona efficacia anche contro ceppi già resistenti alle terapie più recenti, comprese le varianti di KPC selezionate dall'uso di ceftazidima-avibactam.

Anche xeruborbactam presenta comunque dei limiti. Alcuni enzimi rari, e in particolare una specifica variante della famiglia IMP, riescono a sottrarsi alla sua azione, e in *Pseudomonas aeruginosa* la sua efficacia si riduce quando il batterio esprime attivamente i propri sistemi di espulsione del farmaco. Sul piano dello sviluppo clinico, inoltre, xeruborbactam si trova ancora in una fase più precoce rispetto a taniborbactam, avendo completato finora solo due studi di fase I. Questi elementi non compromettono comunque il quadro generale: xeruborbactam rappresenta a oggi l'inibitore boronico con lo spettro di attività più ampio, e i dati disponibili ne supportano il proseguimento dello sviluppo clinico, pur rendendo necessario un monitoraggio costante dell'evoluzione delle resistenze enzimatiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Kumar A, Schweizer H. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 29 luglio 2005;57(10):1486–513. doi:10.1016/j.addr.2005.04.004
2. Mohammadzadeh R, Shahbazi S, Khodaei N, Sabzi S. Emerging Therapeutic Strategies to Combat Antimicrobial Resistance in the Post-Antibiotic Era. *Journal of Basic Microbiology*. 2025;65(11):e70070. doi:10.1002/jobm.70070
3. Ombašić A. An Insight into Antibiotic Resistance Mechanisms: Microbiological Implications for Public Health. *Acta Microbiol Bulg*. 30 giugno 2024;40(2):131–41. doi:10.59393/amb24400201
4. Stegemann M, Trost U. Neue Entwicklungen in der Bekämpfung bakterieller Infektionen: Update Antibiotikaforschung, -entwicklung und -therapie. *Innere Medizin*. novembre 2023;64(11):1123–8. doi:10.1007/s00108-023-01567-1
5. Bharadwaj A, Rastogi A, Pandey S, Gupta S, Sohal JS. Multidrug-Resistant Bacteria: Their Mechanism of Action and Prophylaxis. *BioMed Research International*. 2022;2022(1):5419874. doi:10.1155/2022/5419874
6. Eisenreich W, Rudel T, Heesemann J, Goebel W. Link Between Antibiotic Persistence and Antibiotic Resistance in Bacterial Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*. 19 luglio 2022;12:900848. doi:10.3389/fcimb.2022.900848 PubMed PMID: 35928205; PubMed Central PMCID: PMC9343593.
7. Sader HS, Mendes RE, Kimbrough JH, Winkler ML, Castanheira M. Multidrug-resistant Enterobacterales in United States hospitals: Frequency and susceptibility to newer β -lactamase inhibitor combinations (2020–2024). *International Journal of Antimicrobial Agents*. agosto 2026;67(8):107835. doi:10.1016/j.ijantimicag.2026.107835
8. Singh R, Singh AP, Kumar S, Giri BS, Kim KH. Antibiotic resistance in major rivers in the world: A systematic review on occurrence, emergence, and management strategies. *Journal of Cleaner Production*. ottobre 2019;234:1484–505. doi:10.1016/j.jclepro.2019.06.243

9. Pandey S, Doo H, Keum GB, Kim ES, Kwak J, Ryu S, et al. Antibiotic resistance in livestock, environment and humans: One Health perspective. *J Anim Sci Technol.* marzo 2024;66(2):266–78. doi:10.5187/jast.2023.e129
10. Abdelaziz SM, Aboshanab KM, Yahia IS, Yassien MA, Hassouna NA. Correlation between the Antibiotic Resistance Genes and Susceptibility to Antibiotics among the Carbapenem-Resistant Gram-Negative Pathogens. *Antibiotics.* 4 marzo 2021;10(3):255. doi:10.3390/antibiotics10030255
11. Lima LM, Silva BNMD, Barbosa G, Barreiro EJ. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry.* dicembre 2020;208:112829. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112829
12. Typas A, Banzhaf M, Gross CA, Vollmer W. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol.* febbraio 2012;10(2):123–36. doi:10.1038/nrmicro2677
13. Mainardi JL, Villet R, Bugg TD, Mayer C, Arthur M. Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* marzo 2008;32(2):386–408. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00097.x
14. Heijenoort JV. Biosynthesis of bacterial peptidoglycan. In: *Microbial Glycobiology* [Internet]. Elsevier; 2010 [citato 16 giugno 2026]. p. 285–304. Disponibile su: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012374546000016X> doi:10.1016/B978-0-12-374546-0.00016-X
15. WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: Bacterial Pathogens of Public Health Importance, to Guide Research, Development, and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance. 1st ed. Geneva: World Health Organization; 2024. 1 p.
16. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* gennaio 2015;13(1):42–51. doi:10.1038/nrmicro3380
17. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clin Infect Dis.* 1 dicembre 2019;69(Suppl 7):S521–8. doi:10.1093/cid/ciz824 PubMed PMID: 31724045; PubMed Central PMCID: PMC6853758.

18. Jean SS, Lai CC, Chang HT, Hsiao HC, Harnold D, Ko WC, et al. New-generation antibiotics and non-antibiotic strategies against carbapenemase-producing Enterobacterales: More focus on metallo- β -lactamase producers. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 20 febbraio 2026;107750. doi:10.1016/j.ijantimicag.2026.107750
19. Katsarou A, Stathopoulos P, Tzvetanova ID, Asimotou CM, Falagas ME. β -Lactam/ β -Lactamase Inhibitor Combination Antibiotics Under Development. *Pathogens*. 8 febbraio 2025;14(2):168. doi:10.3390/pathogens14020168
20. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, et al. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*. agosto 2019;431(18):3472–500. doi:10.1016/j.jmb.2019.04.002
21. Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. agosto 2016;6(8):a025247. doi:10.1101/cshperspect.a025247 PubMed PMID: 27329032; PubMed Central PMCID: PMC4968164.
22. Bush K, Bradford PA. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nat Rev Microbiol*. maggio 2019;17(5):295–306. doi:10.1038/s41579-019-0159-8
23. Docquier JD, Mangani S. An update on β -lactamase inhibitor discovery and development. *Drug Resistance Updates*. gennaio 2018;36:13–29. doi:10.1016/j.drug.2017.11.002
24. Huang Z, Bai L, Liu J, Luo Y. Boron-Containing Compounds as Antimicrobial Agents to Tackle Drug-Resistant Bacteria. *Pharmaceutical Fronts*. dicembre 2024;06(04):e336–54. doi:10.1055/s-0044-1792102
25. Kuzin AP, Nukaga M, Nukaga Y, Hujer A, Bonomo RA, Knox JR. Inhibition of the SHV-1 β -Lactamase by Sulfones: Crystallographic Observation of Two Reaction Intermediates with Tazobactam. *Biochemistry*. 1 febbraio 2001;40(6):1861–6. doi:10.1021/bi0022745
26. Docquier JD. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo-beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 febbraio 2003;51(2):257–66. doi:10.1093/jac/dkg067
27. Bush K. Improving known classes of antibiotics: an optimistic approach for the future. *Current Opinion in Pharmacology*. ottobre 2012;12(5):527–34. doi:10.1016/j.coph.2012.06.003

28. Moynié L, Luscher A, Rolo D, Pletzer D, Tortajada A, Weingart H, et al. Structure and Function of the PiuA and PirA Siderophore-Drug Receptors from *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* aprile 2017;61(4):e02531-16. doi:10.1128/AAC.02531-16
29. Ehmann DE, Jahić H, Ross PL, Gu RF, Hu J, Kern G, et al. Avibactam is a covalent, reversible, non- β -lactam β -lactamase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 17 luglio 2012;109(29):11663–8. doi:10.1073/pnas.1205073109
30. Bonnefoy A. In vitro activity of AVE1330A, an innovative broad-spectrum non- β -lactam β -lactamase inhibitor. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1 luglio 2004;54(2):410–7. doi:10.1093/jac/dkh358
31. Ehmann DE, Jahić H, Ross PL, Gu RF, Hu J, Durand-Réville TF, et al. Kinetics of Avibactam Inhibition against Class A, C, and D β -Lactamases. *Journal of Biological Chemistry.* settembre 2013;288(39):27960–71. doi:10.1074/jbc.M113.485979
32. Lahiri SD, Mangani S, Jahić H, Benvenuti M, Durand-Reville TF, De Luca F, et al. Molecular Basis of Selective Inhibition and Slow Reversibility of Avibactam against Class D Carbapenemases: A Structure-Guided Study of OXA-24 and OXA-48. *ACS Chem Biol.* 20 febbraio 2015;10(2):591–600. doi:10.1021/cb500703p
33. Lahiri SD, Mangani S, Durand-Reville T, Benvenuti M, De Luca F, Sanyal G, et al. Structural Insight into Potent Broad-Spectrum Inhibition with Reversible Recyclization Mechanism: Avibactam in Complex with CTX-M-15 and *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* giugno 2013;57(6):2496–505. doi:10.1128/AAC.02247-12
34. Shi Y, Wu J, Mi W, Zhang X, Ren X, Shen C, et al. Ceftazidime-avibactam induced renal disorders: past and present. *Front Pharmacol.* 22 gennaio 2024;15:1329307. doi:10.3389/fphar.2024.1329307
35. Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* agosto 2016;6(8):a025247. doi:10.1101/cshperspect.a025247
36. Blizzard TA, Chen H, Kim S, Wu J, Bodner R, Gude C, et al. Discovery of MK-7655, a β -lactamase inhibitor for combination with Primaxin®. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* febbraio 2014;24(3):780–5. doi:10.1016/j.bmcl.2013.12.101

37. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Woodford N. Interactions of OP0595, a Novel Triple-Action Diazabicyclooctane, with β -Lactams against OP0595-Resistant Enterobacteriaceae Mutants. *Antimicrob Agents Chemother.* gennaio 2016;60(1):554–60. doi:10.1128/AAC.02184-15
38. Morinaka A, Tsutsumi Y, Yamada M, Suzuki K, Watanabe T, Abe T, et al. OP0595, a new diazabicyclooctane: mode of action as a serine β -lactamase inhibitor, antibiotic and β -lactam ‘enhancer’. *J Antimicrob Chemother.* ottobre 2015;70(10):2779–86. doi:10.1093/jac/dkv166
39. Moya B, Barcelo IM, Bhagwat S, Patel M, Bou G, Papp-Wallace KM, et al. WCK 5107 (Zidebactam) and WCK 5153 Are Novel Inhibitors of PBP2 Showing Potent “ β -Lactam Enhancer” Activity against *Pseudomonas aeruginosa*, Including Multidrug-Resistant Metallo- β -Lactamase-Producing High-Risk Clones. *Antimicrob Agents Chemother.* giugno 2017;61(6):e02529-16. doi:10.1128/AAC.02529-16
40. Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Woodford N. Activity of OP0595/ β -lactam combinations against Gram-negative bacteria with extended-spectrum, AmpC and carbapenem-hydrolysing β -lactamases. *J Antimicrob Chemother.* novembre 2015;70(11):3032–41. doi:10.1093/jac/dkv239
41. Santi N, Corsini F, Bonomo RA, Caselli E, Prati F. Boronic Acid Inhibitors of β -Lactamases: A Promising Strategy Against Antimicrobial Resistance.
42. Ban HS, Nakamura H. Boron-Based Drug Design: Boron-Based Drug Design. *The Chemical Record.* giugno 2015;15(3):616–35. doi:10.1002/tcr.201402100
43. Smoum R, Rubinstein A, Dembitsky VM, Srebnik M. Boron Containing Compounds as Protease Inhibitors. *Chem Rev.* 11 luglio 2012;112(7):4156–220. doi:10.1021/cr608202m
44. Lei J, Hansen G, Nitsche C, Klein CD, Zhang L, Hilgenfeld R. Crystal structure of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor. *Science.* 29 luglio 2016;353(6298):503–5. doi:10.1126/science.aag2419
45. Tompkins K, Van Duin D. Treatment for carbapenem-resistant Enterobacterales infections: recent advances and future directions. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* ottobre 2021;40(10):2053–68. doi:10.1007/s10096-021-04296-1

46. Hecker SJ, Reddy KR, Lomovskaya O, Griffith DC, Rubio-Aparicio D, Nelson K, et al. Discovery of Cyclic Boronic Acid QPX7728, an Ultrabroad-Spectrum Inhibitor of Serine and Metallo- β -lactamases. *J Med Chem.* 23 luglio 2020;63(14):7491–507. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b01976
47. Novelli A, Del Giacomo P, Rossolini GM, Tumbarello M. Meropenem/vaborbactam: a next generation β -lactam β -lactamase inhibitor combination. *Expert Review of Anti-infective Therapy.* 2 luglio 2020;18(7):643–55. doi:10.1080/14787210.2020.1756775
48. Hecker SJ, Reddy KR, Totrov M, Hirst GC, Lomovskaya O, Griffith DC, et al. Discovery of a Cyclic Boronic Acid β -Lactamase Inhibitor (RPX7009) with Utility vs Class A Serine Carbapenemases. *J Med Chem.* 14 maggio 2015;58(9):3682–92. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00127
49. Tsivkovski R, Lomovskaya O. Biochemical Activity of Vaborbactam. *Antimicrob Agents Chemother.* 27 gennaio 2020;64(2):e01935-19. doi:10.1128/AAC.01935-19
50. Dhillon S. Meropenem/Vaborbactam: A Review in Complicated Urinary Tract Infections. *Drugs.* agosto 2018;78(12):1259–70. doi:10.1007/s40265-018-0966-7
51. Gaibani P, Giani T, Bovo F, Lombardo D, Amadesi S, Lazzarotto T, et al. Resistance to Ceftazidime/Avibactam, Meropenem/Vaborbactam and Imipenem/Relebactam in Gram-Negative MDR Bacilli: Molecular Mechanisms and Susceptibility Testing. *Antibiotics.* 6 maggio 2022;11(5):628. doi:10.3390/antibiotics11050628
52. Zhanel GG, Lawrence CK, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Zhanel M, et al. Imipenem–Relebactam and Meropenem–Vaborbactam: Two Novel Carbapenem- β -Lactamase Inhibitor Combinations. *Drugs.* gennaio 2018;78(1):65–98. doi:10.1007/s40265-017-0851-9
53. Griffith DC, Sabet M, Tarazi Z, Lomovskaya O, Dudley MN. Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Vaborbactam, a Novel Beta-Lactamase Inhibitor, in Combination with Meropenem. *Antimicrob Agents Chemother.* gennaio 2019;63(1):e01659-18. doi:10.1128/AAC.01659-18
54. Ackley R, Roshdy D, Meredith J, Minor S, Anderson WE, Capraro GA, et al. Meropenem-Vaborbactam versus Ceftazidime-Avibactam for Treatment of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 21 aprile 2020;64(5):e02313-19. doi:10.1128/AAC.02313-19

55. Liu B, Trout REL, Chu GH, McGarry D, Jackson RW, Hamrick JC, et al. Discovery of Taniborbactam (VNRX-5133): A Broad-Spectrum Serine- and Metallo- β -lactamase Inhibitor for Carbapenem-Resistant Bacterial Infections. *J Med Chem.* 26 marzo 2020;63(6):2789–801. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b01518
56. Krajnc A, Brem J, Hinchliffe P, Calvopiña K, Panduwawala TD, Lang PA, et al. Bicyclic Boronate VNRX-5133 Inhibits Metallo- and Serine- β -Lactamases. *J Med Chem.* 26 settembre 2019;62(18):8544–56. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b00911
57. Mushtaq S, Vickers A, Doumith M, Ellington MJ, Woodford N, Livermore DM. Activity of β -lactam/taniborbactam (VNRX-5133) combinations against carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1 gennaio 2021;76(1):160–70. doi:10.1093/jac/dkaa391
58. Uehara T, Chatwin CL, Miller B, Edwards M, Stevenson A, Colombo J, et al. Impact of porin deletions on cefepime-taniborbactam activity against *Klebsiella pneumoniae*. Shields RK, curatore. *Antimicrob Agents Chemother.* 7 maggio 2025;69(5):e01672-24. doi:10.1128/aac.01672-24
59. Zhanel GG, Mansour C, Mikolayanko S, Lawrence CK, Zelenitsky S, Ramirez D, et al. Cefepime–Taniborbactam: A Novel Cephalosporin/ β -Lactamase Inhibitor Combination. *Drugs.* ottobre 2024;84(10):1219–50. doi:10.1007/s40265-024-02082-9
60. Le Terrier C, Nordmann P, Buchs C, Di DYW, Rossolini GM, Stephan R, et al. Wide dissemination of Gram-negative bacteria producing the taniborbactam-resistant NDM-9 variant: a One Health concern. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 5 settembre 2023;78(9):2382–4. doi:10.1093/jac/dkad210
61. Drusin SI, Le Terrier C, Poirel L, Bonomo RA, Vila AJ, Moreno DM. Structural basis of metallo- β -lactamase resistance to taniborbactam. Carattoli A, curatore. *Antimicrob Agents Chemother.* 7 febbraio 2024;68(2):e01168-23. doi:10.1128/aac.01168-23
62. Sun D, Tsivkovski R, Pogliano J, Tsunemoto H, Nelson K, Rubio-Aparicio D, et al. Intrinsic Antibacterial Activity of Xeruborbactam *In Vitro* : Assessing Spectrum and Mode of Action. *Antimicrob Agents Chemother.* 18 ottobre 2022;66(10):e00879-22. doi:10.1128/aac.00879-22
63. Lomovskaya O, Castanheira M, Lindley J, Rubio-Aparicio D, Nelson K, Tsivkovski R, et al. *In vitro* potency of xeruborbactam in combination with multiple β -lactam antibiotics in

comparison with other β -lactam/ β -lactamase inhibitor (BLI) combinations against carbapenem-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacterales*. Poiriel L, curatore. Antimicrob Agents Chemother. 15 novembre 2023;67(11):e00440-23. doi:10.1128/aac.00440-23

64. Le Terrier C, Freire S, Viguiet C, Findlay J, Nordmann P, Poiriel L. Relative inhibitory activities of the broad-spectrum β -lactamase inhibitor xeruborbactam in comparison with taniborbactam against metallo- β -lactamases produced in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Carattoli A, curatore. Antimicrob Agents Chemother. 10 maggio 2024;e01570-23. doi:10.1128/aac.01570-23

65. Sánchez-Peña L, Rodríguez-Pallares S, Aja-Macaya P, Blanco-Martín T, González-Pinto L, Pérez-Rodríguez G, et al. Broad spectrum of β -lactamase coverage and potent antimicrobial activity of xeruborbactam in combination with meropenem against carbapenemase-producing Enterobacterales, including strains resistant to new β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations. Carattoli A, curatore. Antimicrob Agents Chemother. 3 settembre 2025;69(9):e00533-25. doi:10.1128/aac.00533-25