Università di Modena e Reggio Emilia

Dipartimento di Scienze della Vita

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

LA BIOSINTESI DEGLI ACIDI GRASSI COME NUOVO TARGET NELLA LOTTA ALLA RESISTENZA ANTIMICROBICA

Relatore:

Prof.ssa Emilia CASELLI

Tesi compilativa di Laurea Magistrale in Farmacia di:

Marta NATALIZIA

Anno Accademico 2026/2027

INDICE

ABSTRACT 3

CAPITOLO I - INTRODUZIONE 4

1.1 SISTEMI DI SORVEGLIANZA 6

1.2 TIPI DI RESISTENZE E MECCANISMI D'AZIONE 7

1.3 ANTIBATTERICI INNOVATIVI 8

CAPITOLO II - LA BIOSINTESI DEGLI ACIDI GRASSI BATTERICI 11

2.1. RUOLO BIOLOGICO DEGLI ACIDI GRASSI NEI PROCARIOTI 11

2.2 CONFRONTO STRUTTURALE E FUNZIONALE: SISTEMA FAS I VS SISTEMA FAS II 14

2.2.1 FAS I 14

2.2.2 FAS II 16

2.3 FASI E MECCANISMO DELLA VIA FAS II 17

2.3.1. Origine metabolica dei precursori 17

2.3.2 Fase di innesco della sintesi 20

2.3.3 Il ciclo iterativo di allungamento 21

2.4 LA SCELTA DELL'ENZIMA FABI COME TARGET FARMACOLOGICO D'ELEZIONE 21

2.4.1. Architettura molecolare, sito attivo e meccanismo catalitico dell'enzima FabI 23

CAPITOLO III - INIBITORI FabI 28

3.1. GLI ETERI BIFENILICI: IL TRICLOSANO 29

3.1.1 La base strutturale dell'inibizione 31

3.1.2 Relazioni struttura-attività e meccanismi di resistenza 32

3.1.3. Peculiarità dell'enzima Stafilococcico (saFabI) 34

3.2 LA TOSSICITÀ DEL TRICLOSANO 36

3.3 ACRILAMMIDI E NAFTIRIDINONI: DALLO SCREENING AL CANDIDATO CLINICO 37

3.4 DAL DEBIO-1452 ALL'AFABICINA (DEBIO-1450) 40

3.4.1 Sviluppo del profarmaco estero-fosfato e meccanismo d'azione *41*

3.4.2 Struttura del complesso con FabI 43

3.4.3 Inibizione di FabI e selettività 45

3.4.4 Conferma genetica del bersaglio e sviluppo di resistenza 45

3.4.5 Effetto sulla vitalità batterica 46
3.4.6 Dimostrazione del meccanismo nell'animale infetto 47
3.5 SPETTRO RISTRETTO E MICROBIOTA 47
3.6 FARMACOCINETICA 51
3.7 SVILUPPO CLINICO: GLI STUDI DI FASE II NELLE ABSSSI E NELLE INFEZIONI OSTEOARTICOLARI 56
3.7.1 Fase II nelle ABSSSI 56
3.7.2 Fase II nelle infezioni osteoarticolari 60
3.8 ESTENSIONE DELLO SPETTRO AI GRAM-NEGATIVI: LE *ENTRY RULES* 62
CONCLUSIONI **66**
BIBLIOGRAFIA 68

ABSTRACT

La continua diffusione della resistenza antimicrobica (AMR) costituisce ormai una minaccia cruciale per la salute pubblica globale. Per contrastarla, si è resa necessaria la ricerca di bersagli molecolari del tutto inediti, in grado di aggirare i meccanismi di resistenza crociata già sviluppati dai batteri. In questo scenario, la via di biosintesi degli acidi grassi di Tipo II si è imposta come uno dei percorsi metabolici più promettenti per la progettazione di antibatterici di nuova generazione. La forza di questo target risiede anzitutto nella sua elevata tossicità selettiva: mentre il sistema FAS-I umano si struttura in un unico complesso polipeptidico multifunzionale, il percorso FAS-II batterico sfrutta infatti enzimi distinti e monofunzionali, in particol modo nel ciclo di allungamento, il vero e proprio motore dell'intero processo è rappresentato dall'enoil-ACP reduttasi (FabI), che ne costituisce la tappa limitante. La ricerca chimico-farmaceutica indirizzata all'individuazione di inibitori di questa proteina ha registrato notevoli progressi negli ultimi due decenni, passando da molecole dotate di attività biocida aspecifica come gli eteri bifenilici, quali il triclosano, ai più moderni inibitori basati sulla struttura delle acrilammidi legate a naftiridinoni.

Il punto d'arrivo di questa evoluzione è l'Afabicina (Debio-1450), profarmaco del metabolita attivo Debio-1452. Questa molecola vanta uno spettro d'azione mirato ed ultraselettivo verso gli stafilococchi (*Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus*) e MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*), caratteristica che consente di preservare l'integrità del microbiota intestinale. A confermare il valore terapeutico vi sono le evidenze cliniche nelle infezioni cutanee e osteoarticolari, dove l'Afabicina ha dimostrato un'efficacia comparabile a capisaldi della terapia come vancomicina e linezolid. Recenti sviluppi hanno portato all'individuazione di molecole appartenenti alla stessa classe chimica ma attive anche verso i Gram negativi. L'Afabicina è stata infatti modificata applicando le eNTRY rules, definite per migliorarne l'accumulo all'interno del batterio attraverso il superamento dell'ostacolo rappresentato dalla doppia membrana dei Gram-negativi. Sono stati così sviluppati derivati preclinici quali l'afabicina-NH_3 e la fabimicina, attivi sui patogeni Gram negativi, e il Debio 1453, diretto contro *Neisseria gonorrhoeae*.

Il presente lavoro ripercorre l'evoluzione degli inibitori di FabI, mettendone in evidenza il potenziale nel contrasto all'AMR e le principali prospettive di sviluppo. Sebbene i progressi compiuti dimostrino come l'innovazione scientifica possa offrire risposte concrete alla resistenza antimicrobica, nessuno degli inibitori di FabI ha finora completato lo sviluppo clinico, e l'afabicina stessa, la molecola più avanzata della classe, resta in fase II.

CAPITOLO I - INTRODUZIONE

La resistenza antimicrobica (*Antimicrobial Resistance*, AMR) rappresenta una delle principali minacce per la salute pubblica a livello globale. Il fenomeno deriva dalla capacità dei microrganismi di adattarsi all'esposizione ai farmaci antimicrobici, riducendone progressivamente l'efficacia e rendendo più complesso il trattamento delle infezioni. Sebbene la comparsa di meccanismi di resistenza costituisca un naturale processo evolutivo, la loro selezione e diffusione sono state considerevolmente accelerate dall'impiego esteso e, in numerosi contesti, non appropriato degli antimicrobici in medicina umana e veterinaria[1,2].

La rilevanza del problema risiede non soltanto nell'aumento della difficoltà terapeutica, ma anche nelle conseguenze cliniche associate alla progressiva perdita di efficacia degli antibiotici disponibili. L'insorgenza di ceppi resistenti può infatti determinare un prolungamento delle infezioni, una maggiore probabilità di complicanze e la necessità di ricorrere a farmaci di seconda o ultima linea. L'AMR costituisce inoltre un fenomeno complesso, che non può essere limitato esclusivamente all'ambito della medicina umana. La diffusione dei determinanti di resistenza coinvolge anche gli animali, la produzione agroalimentare e l'ambiente, secondo una dinamica strettamente interconnessa riconducibile all'approccio *One Health* [1,2].

L'uso inappropriato degli antibiotici rappresenta uno dei principali fattori responsabili dell'accelerazione del fenomeno. Prescrizioni non necessarie, automedicazione, impiego improprio di antibiotici ad ampio spettro, dosaggi o durate terapeutiche non adeguati e utilizzo indiscriminato degli antimicrobici possono favorire la selezione delle popolazioni batteriche resistenti. A tali fattori si aggiungono le difficoltà nel controllo delle infezioni nelle strutture sanitarie, l'impiego di antimicrobici nel settore veterinario e zootecnico e la dispersione nell'ambiente di residui farmacologici, batteri resistenti e determinanti genetici di resistenza [1,2].

Particolare importanza assume il contesto ospedaliero, nel quale l'elevato impiego di antimicrobici e la presenza di pazienti particolarmente vulnerabili favoriscono la selezione e la diffusione di microrganismi multiresistenti. Tra questi, i patogeni appartenenti al gruppo ESKAPE rappresentano una delle principali criticità cliniche, per la loro capacità di sviluppare resistenza nei confronti di numerose classi di antibiotici. La rilevanza di tali

microrganismi è evidenziata anche dai sistemi internazionali di sorveglianza e prioritizzazione, tra cui il Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) che ha stilato una Bacterial Priority Pathogens List, nella quale vengono monitorati l'andamento epidemiologico delle resistenze e i patogeni per i quali risulta maggiormente urgente sviluppare nuovi strumenti terapeutici[3,4].

Alla crescente diffusione della resistenza si associa inoltre una progressiva riduzione delle opzioni farmacologiche efficaci. Lo sviluppo di nuovi antibiotici presenta infatti numerose difficoltà scientifiche, cliniche ed economiche. L'identificazione di nuove molecole e di nuovi bersagli farmacologici è complessa, mentre gli elevati costi e l'elevato rischio di fallimento associati alla ricerca e allo sviluppo si accompagnano a ritorni economici generalmente inferiori rispetto a quelli di altre categorie terapeutiche. Gli antibiotici vengono somministrati per periodi relativamente brevi e le molecole più innovative devono essere utilizzate con particolare cautela per limitarne la perdita di efficacia. Questi elementi hanno contribuito alla progressiva riduzione dell'interesse industriale verso il settore e al fenomeno comunemente indicato come *dry pipeline* [5,6].

La comprensione del fenomeno dell'AMR richiede pertanto di considerare parallelamente sia i meccanismi d'azione degli antibiotici, sia le strategie attraverso le quali i batteri possono eluderne l'attività. La resistenza può essere intrinseca oppure acquisita in seguito a mutazioni genetiche o all'acquisizione di determinanti di resistenza mediante fenomeni di trasferimento genico orizzontale, quali coniugazione, trasformazione e trasduzione[7]. La conoscenza di questi processi rappresenta un presupposto fondamentale per comprendere l'origine della multiresistenza e per individuare nuovi bersagli e approcci terapeutici.

In questo contesto, lo sviluppo di strategie capaci di contrastare i microrganismi resistenti e di preservare l'efficacia delle terapie disponibili costituisce una delle principali sfide della ricerca farmacologica contemporanea. Il presente elaborato si propone pertanto di analizzare il fenomeno dell'antimicrobico-resistenza partendo dalle sue basi microbiologiche ed epidemiologiche, considerando i principali meccanismi responsabili dell'insorgenza e della diffusione della resistenza, i sistemi di sorveglianza e i patogeni di maggiore rilevanza clinica. Saranno inoltre esaminate le criticità associate all'attuale sviluppo di nuovi antibiotici e il conseguente bisogno di strategie terapeutiche innovative per il trattamento delle infezioni sostenute da microrganismi multiresistenti. Tra queste strategie verrà

approfondita in particolare l'inibizione della via di biosintesi degli acidi grassi batterici e in specifico dell'enzima FabI: da questo approccio è stata sviluppata l'afabicina, primo rappresentante di una nuova classe di antibatterici selettivi per gli stafilococchi, compresi i ceppi meticillino-resistenti, attualmente in sperimentazione clinica di fase.

1.1 Sistemi di sorveglianza

Per monitorare e tracciare la diffusione dei ceppi multiresistenti, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha istituito nel 2015 il "Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS)", successivamente esteso al 2020. Il sistema ha l'obiettivo di raccogliere, analizzare e condividere dati standardizzati sia in ambito ospedaliero sia comunitario. I risultati restituiscono un quadro estremamente complesso: la resistenza ad antibiotici essenziali si sta espandendo rapidamente, in particolare tra i batteri Gram-negativi e nei contesti ospedalieri.

Secondo il rapporto GLASS 2025, a livello mondiale circa un'infezione batterica confermata su sei (il 17,2%) è ormai causata da ceppi resistenti agli antibiotici. Particolarmente critico appare il quadro delle infezioni del flusso sanguigno, come la sepsi, causata da un batterio Gram-positivo quale lo *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina, il quale registra una prevalenza globale del **27,1%**, con punte che raggiungono il **50,3%** nella Regione del Mediterraneo Orientale. Parallelamente, tra i bacilli Gram-negativi responsabili di sepsi, la resistenza alle cefalosporine di terza generazione raggiunge il 44,8% in *Escherichia coli* e il 55,2% in *Klebsiella pneumoniae*. A questi dati si aggiungono i trend temporali osservati tra il 2018 e il 2023, che mostrano un incremento annuo allarmante della resistenza ai carbapenemi, antibiotici di ultima istanza appartenenti alla classe "Watch": +15,3% per infezioni causate da *K. pneumoniae*, +12,5% per *E. coli* e +5,3% per *Acinetobacter* spp. Nel complesso, questi numeri confermano quanto sia urgente intervenire prima che tali farmaci perdano del tutto la loro efficacia.[4]

La rilevanza di questi dati emerge con particolare evidenza nel contesto nosocomiale e, soprattutto, nei reparti ad alta intensità di cura, dove la minaccia clinica più rilevante è rappresentata dal cosiddetto gruppo "ESKAPE". L'acronimo comprende una serie di patogeni multiresistenti considerati ad altissima priorità, tra cui ceppi resistenti di *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *Enterobacter* spp. (Santajit & Indrawattana, 2016). La pericolosità di questi microrganismi risiede nella loro spiccata capacità di eludere l'azione

dei principali farmaci antimicrobici, rendendo particolarmente complessa la gestione delle infezioni ospedaliere.

Per strutturare in modo sistematico la risposta a questa minaccia, i *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) hanno sviluppato un quadro regolatorio che suddivide i batteri resistenti in categorie di minaccia crescente, definite in base alla gravità dell'allarme clinico ed epidemiologico. In questo sistema, patogeni Gram-negativi opportunisti come l'*Acinetobacter baumannii* resistente ai carbapenemi sono inseriti tra le *"Urgent Threats"* [8], poiché la loro diffusione richiede un intervento clinico e di contenimento immediato e particolarmente aggressivo. Lo *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina è invece classificato tra le *"Serious Threats"*[8], categoria che richiede un impegno costante e prolungato in termini di sorveglianza epidemiologica e *stewardship* antimicrobica. Un'impostazione analoga si ritrova nella recente WHO *Bacterial Priority Pathogens List* (BPPL 2024), che colloca i bacilli Gram-negativi carbapenem-resistenti nel livello di priorità "Critica" e MRSA nel gruppo a priorità "Alta"[3].

Il l quadro delineato dai sistemi di sorveglianza si inserisce in una situazione resa ancora più problematica dalla progressiva riduzione delle opzioni terapeutiche disponibili. L'aumento della multiresistenza ha infatti ridotto il numero di antibiotici efficaci e ha portato le aziende farmaceutiche a ritirarsi dal campo della ricerca sugli antibiotici, determinando una condizione caratterizzata dalla crescita della resistenza e dal mancato sviluppo di nuovi farmaci. Di fatto, siamo entrati in una pericolosa era post-antibiotica[1], in cui infezioni comuni e lesioni di lieve entità possono tornare a essere letali.

1.2 Tipi di resistenze e meccanismi d'azione

Gli agenti antimicrobici possono essere classificati come naturali, semisintetici o sintetici. Gli antibiotici agiscono sui batteri per trattare ed eradicare le infezioni da essi prodotte e possono essere battericidi, ossia in grado di uccidere i batteri, oppure batteriostatici, capaci di arrestarne la crescita. Per comprendere come i batteri riescano a eludere l'azione dei farmaci, è necessario considerare sia le diverse forme di resistenza sia i processi vitali e le strutture cellulari su cui agiscono gli antibiotici.

La resistenza può manifestarsi innanzitutto come resistenza intrinseca, cioè come una mancanza di suscettibilità naturale dovuta alla struttura stessa del batterio. Un esempio è la resistenza ai β-lattami manifestata da microbi privi di parete cellulare o dotati nativamente di barriere e di enzimi inattivanti, come la β-lattamasi AmpC. Si parla invece di resistenza

acquisita quando batteri inizialmente sensibili a un farmaco diventano resistenti. Questo può avvenire attraverso due vie. La prima è la modificazione genetica per via verticale: mutazioni spontanee nel DNA alterano proteine e recettori bersaglio, impedendo il legame dell'antibiotico, e vengono trasmesse alla progenie. La seconda è il trasferimento orizzontale di geni di resistenza tra batteri, anche di specie diverse, che può avvenire per coniugazione (trasferimento di plasmidi tramite pilo), trasformazione (assorbimento di DNA libero dall'ambiente) e trasduzione (trasferimento mediato da batteriofagi) [5,7].

Accanto ai meccanismi attraverso cui si sviluppa la resistenza, è necessario considerare i principali bersagli dell'azione antibiotica. Un primo meccanismo è l'inibizione della sintesi della parete cellulare: molecole come β-lattamici e vancomicina bloccano la formazione del peptidoglicano legandosi alle proteine PBP o ai suoi componenti, provocando il cedimento strutturale e la lisi del batterio. Un secondo meccanismo è l'alterazione della membrana esterna e di quella citoplasmatica, sfruttato dalle polimixine, come la colistina, che utilizzano la propria carica positiva per legarsi alla superficie negativa dei Gram-negativi. Questi batteri possiedono infatti anche una membrana esterna: l'antibiotico si lega dapprima ai lipidi che la costituiscono, alterandone l'integrità e attraversandola per raggiungere il periplasma, e da qui si lega anche alla membrana citoplasmatica, aumentandone la permeabilità e provocando la fuoriuscita di ioni e acidi nucleici. L'inibizione della sintesi proteica colpisce invece l'apparato ribosomiale: farmaci come amminoglicosidi e tetracicline bersagliano la subunità 30S, mentre cloramfenicolo, macrolidi e lincosamidi bloccano la subunità 50S, interrompendo la produzione delle proteine batteriche. Un ulteriore meccanismo è l'inibizione della sintesi degli acidi nucleici, tipica dei fluorochinoloni, che ostacolano la replicazione del DNA bloccando l'enzima DNA girasi nei Gram-negativi e la topoisomerasi IV nei Gram-positivi. Infine, l'inibizione delle vie metaboliche si realizza attraverso l'azione coordinata di sulfonamidi e trimethoprim, che bloccano, in stadi differenti, la sintesi dei folati necessaria alla produzione di acidi nucleici e proteine[7].

1.3 Antibatterici Innovativi

La progressiva riduzione delle opzioni terapeutiche rende particolarmente rilevante la ricerca di nuovi bersagli farmacologici. Nonostante vi siano molti candidati in fase di sperimentazione, si evidenzia infatti una netta carenza di farmaci realmente innovativi. Per valutarne il valore terapeutico, la WHO ha definito criteri per i quali un antibiotico si può definire innovativo. Essi sono essenzialmente 4, cioè la presenza di una nuova classe

chimica, l'individuazione di un target molecolare inedito, o di un nuovo meccanismo d'azione e l'assenza di resistenza incrociata (*cross-resistance*), cioè i meccanismi che rendono i batteri resistenti agli antibiotici non conferiscono resistenza anche al nuovo farmaco. Quest'ultimo aspetto viene verificato tramite studi *in vitro* e *in vivo* su isolati batterici resistenti.[3] Al contrario, i farmaci che ottimizzano strutture già note senza modificarne il bersaglio biologico non vengono classificati come innovativi.

Alla luce di tali criteri, la grande maggioranza dei farmaci antibatterici registrati di recente o attualmente in fase di sperimentazione clinica non introduce aspetti innovativi, ma rappresenta soprattutto un'ottimizzazione o un perfezionamento di classi chimiche preesistenti. Un esempio è offerto dalle recenti combinazioni tra β-lattamici e inibitori delle β-lattamasi: pur essendo preziose per ripristinare l'efficacia contro ceppi resistenti, queste associazioni non agiscono su bersagli molecolari inediti né mettono al riparo dal rischio di resistenza crociata con le terapie convenzionali [9]

Anche strategie concettualmente avanzate come i siderofori β-lattamici (ad esempio il *cefiderocol*) non soddisfano formalmente i criteri di innovatività stabiliti dall'OMS: sebbene sfruttino un meccanismo di penetrazione cellulare attiva a "cavallo di Troia" per eludere la perdita di porine e l'azione delle pompe di efflusso, la molecola mantiene la struttura fondamentale delle cefalosporine e il bersaglio battericida tradizionale sulle PBP.

Al contrario, la vera innovazione, secondo i parametri OMS, è rappresentata da una ristretta minoranza di molecole capaci di introdurre nuove classi chimiche o agire su bersagli e meccanismi d'azione inediti, azzerando il rischio di resistenza crociata. Tra queste figurano i nuovi inibitori delle topoisomerasi batteriche (NBTI), che introducono nuove classi chimiche dirette su un sito molecolare distinto della DNA girasi e i bloccanti del trasporto del lipopolisaccaride nei Gram-negativi[9].

Il presente lavoro di tesi si occuperà di una nuova classe di antibiotici attualmente in via di sviluppo, cioè gli inibitori della via biosintetica dei lipidi batterici e, in particolare, del sistema di biosintesi degli acidi grassi di tipo II. A differenza dell'essere umano e dei mammiferi, nei quali la sintesi dei lipidi è affidata a un unico complesso polipeptidico multifunzionale, nei batteri la via FAS-II è organizzata in una sequenza di singoli enzimi monofunzionali distinti. Questa profonda divergenza meccanicistica garantisce un'elevata selettività agli inibitori della sintesi dei lipidi nei confronti dei procarioti. Rispetto ad altri approcci, l'inibizione di questa via offre molteplici vantaggi, tra cui l'assenza di resistenza

crociata, la stabilità chimica tipica delle piccole molecole e la selettività d'azione contro patogeni ad alta priorità quali *Staphylococcus aureus*, inclusi i ceppi meticillino-resistenti MRSA e sensibili MSSA, e gli stafilococchi coagulasi-negativi[10]. A ciò si aggiunge uno spettro d'azione mirato, che comporta la salvaguardia del microbiota intestinale.

Lo sviluppo di molecole capaci di inibire l'enzima enoil-ACP riduttasi si inserisce in un percorso di ricerca che ha radici storiche negli eteri bifenilici, come il *triclosano*, sintetizzato negli anni '60. Sebbene impiegati a lungo come disinfettanti e antisettici topici, gli eteri bifenilici non hanno mai ottenuto l'approvazione per il trattamento delle infezioni sistemiche a causa di problemi di selettività e tossicità. Successivamente, nei primi anni 2000, programmi di *screening* su *Staphylococcus aureus* hanno portato all'identificazione delle acrilamidi legate a naftiridinoni, il cui primo esponente attivo è stato Debio-1452 (AFN-1252). Pur mostrando una potente selettività antistafilococcica, Debio-1452 presentava tuttavia una ridotta solubilità e un profilo di biodisponibilità orale non ottimale.

Per superare definitivamente tali criticità farmacocinetiche, è stata sintetizzata l'Afabicina (Debio-1450, profarmaco del metabolita attivo Debio-1452 / AFN-1252), appartenente alla nuova famiglia delle pirido-enamidi. Bloccando selettivamente l'enzima FabI, l'Afabicina esercita un'azione battericida diretta e ha già dimostrato, negli studi clinici di Fase II per le infezioni acute della cute (ABSSSI) e osteoarticolari, un'efficacia clinica comparabile ai farmaci di riferimento standard, come vancomicina e linezolid.[11].

CAPITOLO II – LA BIOSINTESI DEGLI ACIDI GRASSI BATTERICI

2.1. Ruolo biologico degli acidi grassi nei procarioti

La biosintesi degli acidi grassi rappresenta una via metabolica insostituibile per la vita cellulare, ponendosi come un pilastro fondamentale della fisiologia dei procarioti. Nei batteri, questo processo non serve soltanto a costruire la matrice fosfolipidica e ad assemblare la membrana cellulare, ma è direttamente coinvolto nella conservazione dell'energia, nei meccanismi di trasduzione del segnale e nella regolazione dell'espressione genica [12].

Nei mammiferi e funghi, la sintesi lipidica viene affidata a un'unica grande struttura proteica multifunzionale, nei batteri, invece, viene utilizzano la via di biosintesi di Tipo II. Si tratta di un sistema completamente dissociato, organizzato attraverso una serie di enzimi solubili distinti, ognuno dei quali viene codificato da un gene specifico e indipendente. Gli acidi grassi saturi, insaturi e ramificati generati da questo pathway costituiscono la materia prima fondamentale per i fosfolipidi di membrana, e la presenza specifica delle catene insature si rivela indispensabile per permettere alla cellula di mantenere la corretta struttura, la fluidità e le normali funzioni fisiologiche del doppio strato. Oltre alla costruzione della barriera cellulare, la via FAS-II svolge un ruolo cruciale nella sintesi di metaboliti secondari e molecole segnale, deviando parte dei suoi intermedi verso la produzione di componenti vitali quali l'acido lipoico, la biotina , il lipide A e le molecole responsabili del *Quorum Sensing*, il sistema chimico con cui le popolazioni batteriche comunicano per attivare fenomeni come la formazione di biofilm, la produzione di tossine o altri fattori di virulenza e la bioluminescenza [12–15].

Protagonisti fondamentali nella via di sintesi FAS-II sono le proteine trasportatrici **ACP** (**Acyl Carrier Proteins**) in grado di legare e trasportare gli intermedi della sintesi degli acidi grassi da un enzima al successivo. Essi legano sia la catena in crescita sia il malonile, che fornisce i carboni necessari per allungarla. In questo modo permettono agli enzimi della via di modificare progressivamente la catena fino a ottenere l'acido grasso. Negli **ACP funzionali della FAS-II** un braccio flessibile di **4′-fosfopanteteina** è legato a un residuo di serina (Figura 1). La sua estremità tiolica è dunque in grado di legare covalentemente, tramite

un legame tioestereo[16] il malonile **oppure** la catena in crescita portando così un gruppo alla volta nella catena in allungamento [12,17].

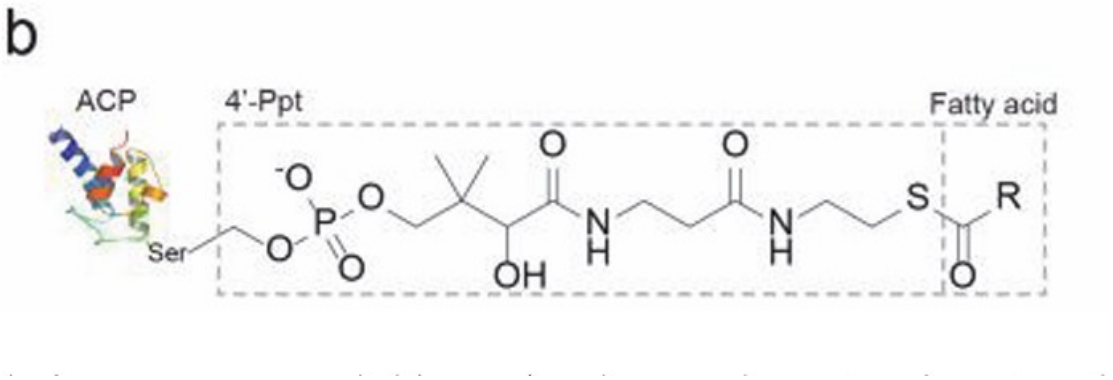


Figura 1. *Struttura chimica del braccio 4'-fosfopanteteinile (4'-Ppt)* [12].

Dal punto di vista metabolico, la sintesi de novo degli acidi grassi è un processo energeticamente molto costoso per un patogeno. Per ridurre questo costo, molti batteri hanno sviluppato sistemi dedicati per catturare e attivare i lipidi già presenti nei tessuti dell'ospite durante l'infezione, per esempio nei nei batteri Gram-negativi, l'acido grasso entra nella cellula attraverso la porina di membrana esterna FadL e viene poi attivato dalla sintetasi FadD o da AasS. Nei Gram-positivi, che non possiedono trasportatori dedicati, l'acido grasso attraversa spontaneamente il doppio strato lipidico tramite un flip, viene catturato sul foglietto interno dalla proteina di legame FakB e infine fosforilato dalla chinasi FakA, nell'ambito del sistema a due componenti FakAB.

Nonostante ciò, nei Gram-negativi la FAS-II resta indispensabile, perché è l'unica fonte degli intermedi idrossiacilici a catena corta necessari per costruire il componente lipidico del lipopolisaccaride di membrana, ossia il lipide A.

Un caso ancora più istruttivo è quello di *Staphylococcus aureus*. Per assemblare i propri fosfolipidi di membrana questo batterio deve acilare due posizioni distinte dello scheletro di glicerolo-fosfato, e lo fa con due enzimi diversi: PlsY si occupa della posizione sn-1, mentre PlsC si occupa della sn-2. L'acil-fosfato prodotto dal sistema FakAB può essere impiegato direttamente da PlsY oppure essere convertito in acil-ACP da PlsX, rientrando così nel ciclo di allungamento della via FAS-II. PlsY non è particolarmente esigente e può tranquillamente utilizzare gli acidi grassi recuperati dall'ospite, come il palmitato o l'oleato. PlsC, invece, è molto più selettiva e utilizza preferenzialmente l'acido anteiso-pentadecanoico (15:0), un

acido grasso a catena ramificata che solo la via FAS-II è in grado di produrre. Il problema è che questo particolare acido grasso ramificato non si trova nei tessuti dell'ospite umano: di conseguenza, per quanti lipidi *S. aureus* riesca a sottrarre all'organismo che infetta, la posizione sn-2 dei suoi fosfolipidi non potrà essere acilata correttamente a meno che il batterio non continui sintetizzare autonomamente il 15:0 tramite FAS-II.

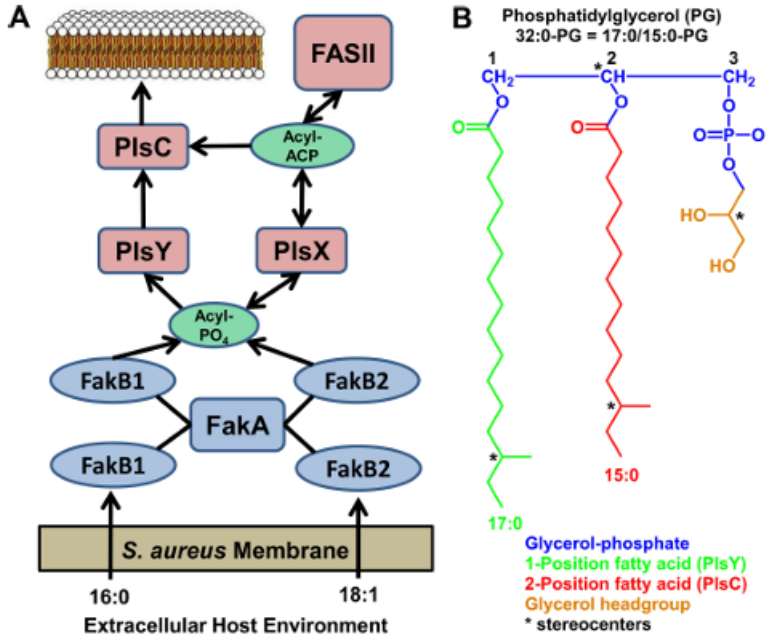


Figura 2. *Modello di utilizzo degli acidi grassi dell'ospite per la sintesi del fosfatidilglicerolo (PG) in Staphylococcus aureus. (A) Struttura del PG(B)* [12].

È proprio questo vincolo strutturale a rendere la via FAS-II un bersaglio farmacologico valido anche durante l'infezione *in vivo*: bloccandola, si priva il batterio dell'unica via che gli permette di completare correttamente i propri fosfolipidi di membrana, senza che il recupero di grassi dall'ospite possa in alcun modo compensare questa carenza[15–18].

In virtù di questa sua assoluta essenzialità per la sopravvivenza batterica e delle marcate differenze strutturali che la separano dal sistema FAS-I umano, l'insieme degli enzimi della via FAS-II costituisce una classe di bersagli farmacologici di enorme interesse per lo sviluppo di nuovi antibatterici a tossicità selettiva[12,16].

2.2 Confronto strutturale e funzionale: Sistema FAS I vs Sistema FAS II

2.2.1 FAS I

Negli eucarioti superiori e nell'uomo, la biosintesi *de novo* degli acidi grassi si svolge interamente all'interno del compartimento del citosol ed è gestita dal sistema FAS-I, si presenta come una struttura macromolecolare fortemente associata e multifunzionale. Essa è infatti costituita da un'unica grande catena polipeptidica che racchiude in sé ben sette distinti domini che catalizzano il ciclo a quattro tappe più le tappe di caricamento. A questa di aggiunge la proteina trasportatrice di acili ACP, nonché il vero e proprio perno funzionale attorno a cui ruota l'intero meccanismo sintetico. È costituito da un gruppo prostetico 4'-fosfopanteteina legato a un residuo di serina la sua funzione è quella di trattenere saldamente la catena acilica in fase di accrescimento, guidandola e spostandola in sequenza tra i vari siti attivi del complesso. Per consentire l'ancoraggio e il continuo trasferimento degli intermedi lungo la catena di montaggio enzimatica, il sistema sfrutta due gruppi tiolici (-SH) fondamentali: il primo appartiene a un residuo di cisteina situato nel sito attivo della beta-chetoacil-ACP sintasi (KS), mentre il secondo è presente all'estremità del braccio di 4'-fosfopanteteina dell'ACP. In termini generali, l'intero processo biosintetico prende l'avvio con una fase di caricamento sapientemente coordinata dal dominio della Malonil/Acetil-CoA-ACP Trasferasi (MAT) [19].

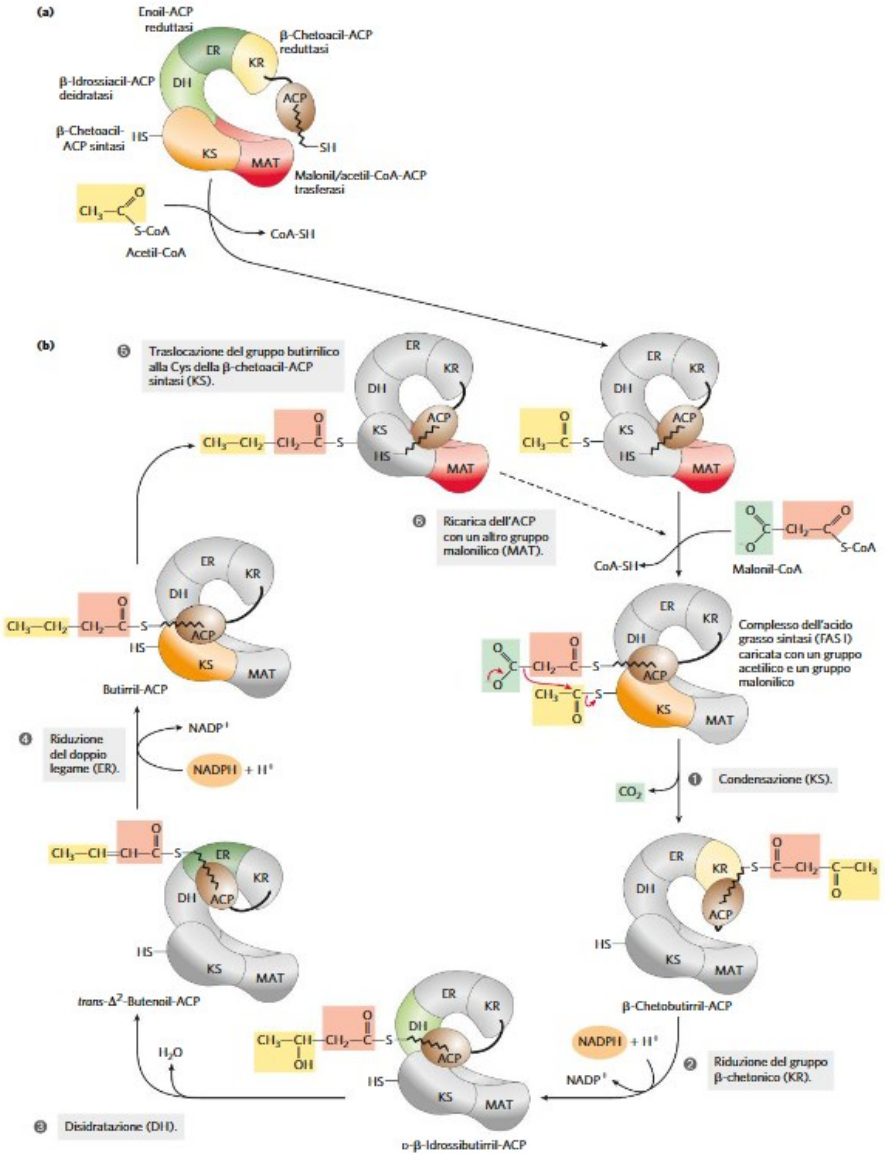


Figura 3. *Meccanismo di caricamento dei substrati e ciclo di allungamento della FAS I. Organizzazione schematica dei domini del complesso della FAS I e sequenza delle reazioni catalitiche. La MAT trasferisce prima il gruppo acetilico d'innesco (giallo) dall'acetil-CoA alla Cys del dominio KS, per poi caricare il malonil-CoA (rosa) sul braccio flessibile dell'ACP. La KS catalizza quindi la condensazione con rilascio di CO2, generando il β-chetobutirril-ACP. Infine, attraverso tre tappe sequenziali di riduzione e disidratazione (KR, DH, ER), l'intermedio viene convertito in un acile saturo (butirril-ACP), pronto per essere traslocato nuovamente su KS e dare inizio a un nuovo ciclo di allungamento.* [19].

Quest'ultima si occupa dapprima di prelevare un gruppo acetilico di innesco dall'acetil-CoA per trasferirlo sul braccio dell'ACP, dal quale viene prontamente traslocato sul residuo di cisteina del dominio della beta-chetoacil-ACP sintasi (KS). Una volta liberato nuovamente il gruppo tiolico dell'ACP, la stessa MAT catalizza il caricamento di una molecola di malonil-CoA sul braccio flessibile dell'ACP. [19]

Completata questa predisposizione iniziale, con i due gruppi acilici attivati e posizionati sui rispettivi siti attivi, si innesca il vero e proprio ciclo iterativo di allungamento. All'interno di questa fase, la catena acilica nascente progredisce attraverso una sequenza ben coordinata di quattro reazioni enzimatiche sequenziali: la condensazione, la prima riduzione, la disidratazione e la seconda riduzione. Attraverso questo percorso metabolico, ciascun ciclo permette l'inserimento di due nuove unità carboniose nella catena, sfruttando l'apporto energetico del potere riducente fornito da due molecole di NADPH. [19]

L'intera sequenza di allungamento si ripete ritmicamente per un totale di sette cicli consecutivi, fino a quando la catena, raggiunto il limite specifico di 16 atomi di carbonio, arresta la propria crescita. A questo punto interviene l'ultimo dominio del complesso, la tioesterasi (TE), la quale idrolizza selettivamente il legame tioestere che tiene ancorata la catena all'ACP, rilasciando così nel citosol il prodotto finale libero, ovvero l'acido palmitico (16:0).[19]

2.2.2 FAS II

A differenza dell'architettura integrata tipica degli eucarioti, la biosintesi *de novo* degli acidi grassi nei procarioti è affidata alla via di Tipo II. Questo sistema si configura come una struttura completamente dissociata (*dissociable system*), in cui ogni singola reazione chimica del ciclo non avviene all'interno di una mega-struttura proteica, ma è catalizzata da un enzima solubile, indipendente e codificato da un gene specifico e distinto. In ques to scenario, la proteina trasportatrice di acili, lega gli intermedi della reazione in modo covalente tramite il braccio flessibile di 4'-fosfopanteteina (ancorato a un residuo conservato di serina) e li presenta, uno dopo l'altro, ai siti attivi dei singoli enzimi lungo il percorso sintetico.

Questa organizzazione segna un'importante differenza di funzionamento rispetto al sistema umano. Mentre la FAS-I dei mammiferi è una struttura rigida e "chiusa", progettata per produrre quasi soltanto acido palmitico (C16:0) senza rilasciare mai intermedi liberi, la via FAS-II batterica offre una straordinaria modularità. Essa permette infatti al batterio di sintetizzare una grande varietà di acidi grassi: saturi a catena lineare, insaturi, idrossilati e ramificati (iso ed *anteiso*). Questa flessibilità è fondamentale per il microrganismo, poiché gli consente di regolare e adattare finemente la composizione lipidica e la fluidità della propria membrana cellulare in base ai cambiamenti dell'ambiente circostante.

La particolarità della via, riguarda il destino degli intermedi acilici, che essendo legati a molecole di ACP sono liberi di muoversi nel citosol e non rimanere ancorati in un megacomplesso proteico chiuso, ed essere in parte, utilizzati da altre vie metaboliche. Il batterio li impiega per sintetizzare componenti e cofattori essenziali alla propria sopravvivenza, come:

- la **biotina** (a partire dal malonil-ACP);
- l'**acido lipoico** (dall'ottanoil-ACP);
- il **Lipide A** nei batteri Gram-negativi (dal β-idrossimristoil-ACP);
- le molecole segnale del **Quorum Sensing**, come gli acil-omoserina lattoni.

L'attuale impiego flessibile e condiviso dei precursori lipidici è un tratto distintivo della biosintesi batterica, reso impossibile dalla compartimentazione e dalla selettività del complesso FAS-I umana[14,16,19,20].

È proprio questa profonda differenza organizzativa e genetica tra i due sistemi a rappresentare il vero punto di forza per un efficace approccio farmacologico, in quanto essa costituisce il fondamento biochimico della tossicità selettiva. Nei procarioti, ogni singola reazione del ciclo è affidata a una proteina specifica, codificata da un gene proprio, di conseguenza sia la sequenza amminoacidica sia la struttura tridimensionale di questi enzimi sono completamente diverse dai domini catalitici della FAS-I dei mammiferi. L'assenza di omologia strutturale offre quindi un grande vantaggio, consentendo di progettare molecole capaci di colpire in modo estremamente mirato i singoli enzimi batterici, come ad esempio l'enoil-ACP reduttasi FabI, senza interferire in alcun modo con la sintesi dei lipidi nell'organismo umano. Attraverso l'inibizione selettiva di FabI è possibile arrestare la crescita del patogeno azzerando il rischio di tossicità fuori bersaglio per i tessuti dell'ospite[12,17,19,21].

2.3 Fasi e meccanismo della via FAS II

2.3.1. Origine metabolica dei precursori

La biosintesi *de novo* degli acidi grassi nei procarioti costituisce una via anabolica finemente regolata, la quale necessita di un costante apporto energetico, di potenziale riducente e di precursori carboniosi derivanti dal catabolismo primario. La materia prima fondamentale per

la costruzione delle catene lipidiche trae origine dalla glicolisi, che genera un bilancio netto di due molecole di ATP, due molecole di NADH e due molecole di piruvato.

Successivamente, il piruvato va incontro a un processo di decarbossilazione ossidativa catalizzato dal complesso della piruvato deidrogenasi (PDC), che porta alla formazione di acetil-CoA. Quest'ultimo può entrare nel ciclo di Krebs per la produzione di energia oppure fungere da substrato di partenza per la biosintesi dei lipidi di membrana.

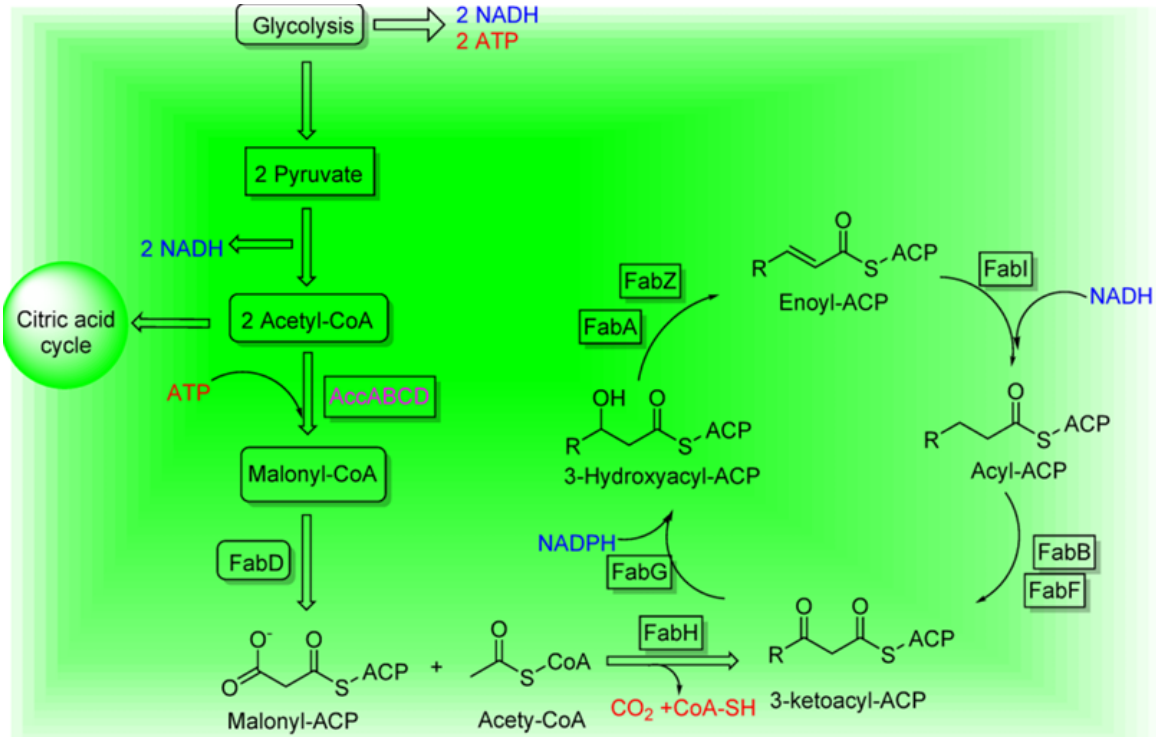


Figura 4. *Schematizzazione della via biosintetica FAS-II e ruolo dell'enzima FabI nello stadio limitante di riduzione dell'enoil-ACP.*[22]

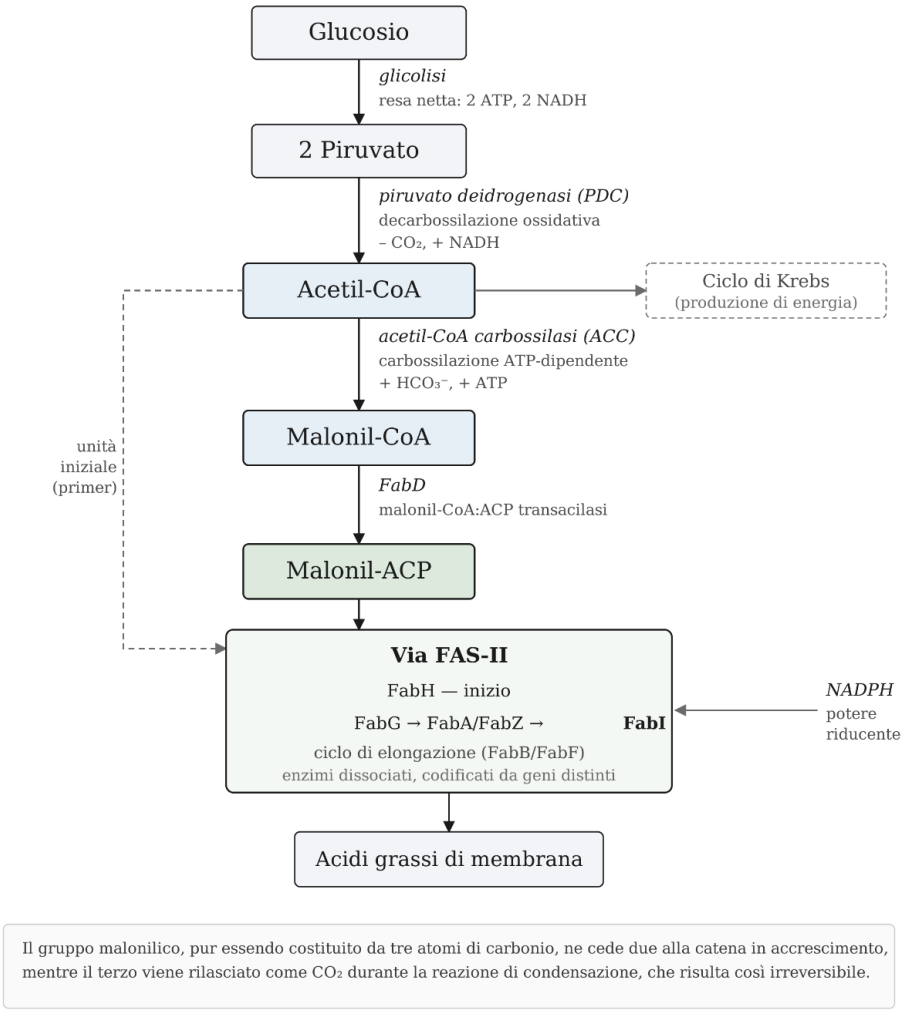


Figura 5. *Via biosintetica degli acidi grassi di tipo II (FAS-II) nei batteri. L'acetil-CoA prodotto dalla decarbossilazione ossidativa del piruvato può essere ossidato nel ciclo dell'acido citrico oppure carbossilato a malonil-CoA dall'acetil-CoA carbossilasi; il malonil-CoA è trasferito sulla proteina trasportatrice di acili da FabD e, per condensazione con acetil-CoA catalizzata da FabH, dà avvio al ciclo di allungamento. Ciascun ciclo comprende la riduzione del 3-chetoacil-ACP a 3-idrossiacil-ACP (FabG), la disidratazione a enoil-ACP (FabA/FabZ), la riduzione a acil-ACP catalizzata da* ***FabI****, e una nuova condensazione (FabB/FabF) che allunga la catena di due atomi di carbonio.*

Per poter accedere alla via FAS-II, una frazione dell'acetil-CoA deve essere attivata mediante una reazione di carbossilazione catalizzata dall'enzima acetil-CoA carbossilasi (ACC). Questa reazione converte l'acetil-CoA in malonil-CoA, fornendo l'intermedio ad alta energia necessario ad alimentare i successivi cicli di elongazione: il gruppo malonilico, pur essendo costituito da tre atomi di carbonio, ne cede due alla catena in accrescimento, mentre il terzo viene rilasciato come CO_2 durante la reazione di condensazione. Il potenziale riducente

richiesto dalle due reazioni di riduzione del ciclo è invece fornito prevalentemente dal NADPH.[17,20,22]

2.3.2 Fase di innesco della sintesi

Le catene aciliche nascenti e i relativi intermedi reattivi non rimangono liberi nel citosol, ma vengono ancorati covalentemente a un supporto proteico specializzato: la proteina trasportatrice di acili (ACP). Il prodotto primario della trascrizione del gene acpP è una proteina priva di attività catalitica, nota come apo-ACP. La sua attivazione in holo-ACP è catalizzata dall'enzima [ACP] sintasi (AcpS), che trasferisce il braccio prostetico flessibile di 4'-fosfopanteteina da una molecola di coenzima A a un residuo conservato di serina della proteina. È proprio questo braccio molecolare a garantire il trasporto dinamico dei substrati lungo l'intero percorso metabolico: l'ancoraggio avviene infatti attraverso la formazione di un legame tioestereo ad alta energia tra il gruppo carbossilico dell'intermedio acilico e il gruppo solfidrilico (-SH) terminale della 4'-fosfopanteteina.

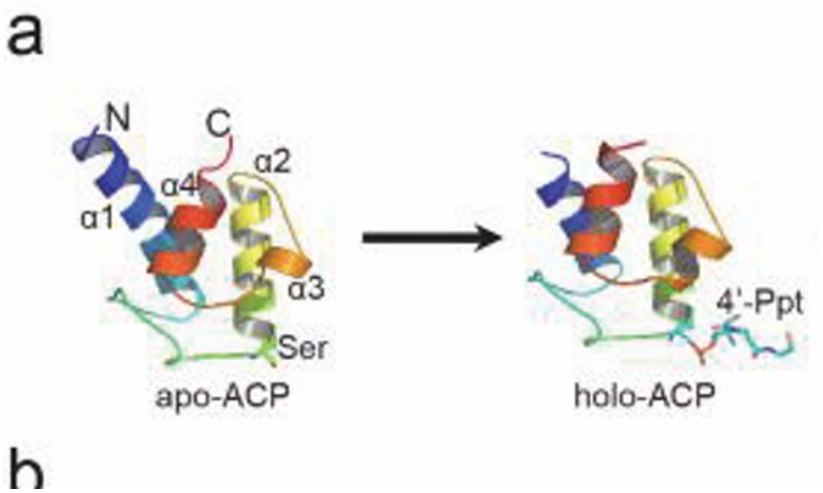


Figura 6. *Rappresentazione schematica delle strutture cristallografiche dell'ACP nelle forme apo- e holo- ottenute da* Helicobacter pylori [12].

Una volta predisposta la holo-ACP, il processo di innesco richiede l'intervento dell'enzima malonil-CoA:ACP transacilasi, noto come FabD. L'enzima FabD catalizza il trasferimento del gruppo malonilico dal malonil-CoA al gruppo tiolico dell'ACP mediante un meccanismo a "ping-pong", generando l'intermedio attivato malonil-ACP. Questo passaggio rende il substrato idoneo ad accedere alla prima reazione di condensazione e inoltre costituisce un

importante snodo metabolico, poiché una quota di esso viene deviata verso la via biosintetica della biotina.[14,22]

2.3.3 Il ciclo iterativo di allungamento

L'allungamento consiste nell'addizione successiva di unità dicarboniose al gruppo acilico nascente. Il primo passaggio è una condensazione di Claisen tra un donatore acilico e il malonil-ACP, accompagnata dalla decarbossilazione di quest'ultimo, che genera un β-chetoacil-ACP allungato di due atomi di carbonio. La condensazione d'innesco è catalizzata dalla β-chetoacil-ACP sintasi III, o FabH, che utilizza come donatore un acil-CoA, mentre nei cicli successivi la condensazione tra malonil-ACP e acil-ACP è affidata agli enzimi di allungamento FabB e FabF.

Il β-chetoacil-ACP così ottenuto viene poi convertito in acil-ACP saturo attraverso tre reazioni successive, catalizzate da tre enzimi distinti. La β-chetoacil-ACP reduttasi FabG, dipendente dal NADPH, riduce il gruppo β-chetonico a gruppo β-idrossilico; la β-idrossiacil-ACP deidratasi, cioè FabZ o FabA, elimina una molecola d'acqua generando il trans-2-enoil-ACP; infine l'enoil-ACP reduttasi riduce il doppio legame, utilizzando NADH o NADPH a seconda dell'isoforma.

Al termine di ciascun ciclo la catena acilica in accrescimento viene ritrasferita alla chetosintasi per iniziare il giro successivo. Il ciclo si ripete finché la catena non raggiunge la lunghezza richiesta: a quel punto l'acil-ACP viene ceduto al sistema delle aciltransferasi per la sintesi dei fosfolipidi di membrana.[22]

2.4 La scelta dell'enzima FabI come target farmacologico d'elezione

La selezione dell'enzima bersaglio ideale all'interno della via di biosintesi degli acidi grassi di tipo II richiede un'attenta valutazione delle caratteristiche cinetiche e regolatorie dell'intero flusso metabolico. Gli enzimi di condensazione (FabH e FabF), le enoil-ACP reduttasi e il complesso enzimatico dell'acetil-CoA carbossilasi catalizzano *reazioni limitanti* che determinano la velocità del processo e agiscono in fasi regolatorie chiave, configurandosi come bersagli farmacologici desiderabili. Al contrario, gli enzimi ad alto turnover che catalizzano *reazioni reversibili* all'equilibrio (come FabD, FabZ e FabA) si rivelano pessimi bersagli, poiché è necessaria una percentuale di inibizione estremamente elevata prima di causare un effetto fenotipico apprezzabile. Allo stesso modo, anche la -

chetoacil-ACP reduttasi (FabG), pur essendo un'unica isoforma altamente conservata in praticamente tutte le specie batteriche, non svolge un ruolo di controllo sulla velocità della via biosintetica, risultando anch'essa un target di poco interesse per lo sviluppo di nuovi farmaci [14,17].

Nel ciclo di allungamento della sintesi degli acidi grassi si verificano due distinte reazioni di riduzione, la seconda delle quali è catalizzata **da diversi tipi di enoil-ACP reduttasi**, gli enzimi responsabili della conversione del *trans*-2-enoil-ACP in acil-ACP. Poiché la reazione di disidratazione che precede immediatamente l'enoil-ACP reduttasi è un processo all'equilibrio, quest'ultima costituisce una delle tappe limitanti che determinano la velocità dell'intera cascata biosintetica.[14,17]

Nel regno batterico sono state individuate e caratterizzate **quattro distinte isoforme strutturali** di enoil reduttasi, la prima delle quali è **FabI**, identificata inizialmente in *Escherichia coli* e nota per essere il bersaglio molecolare del biocida triclosan. A quest'ultima si affianca l'isoforma **FabL**, che risulta solo lontanamente correlata a FabI e si ritrova, in combinazione con essa, all'interno delle specie del genere *Bacillus*. Al contrario, l'isoforma **FabK** è una flavoproteina priva di qualsiasi relazione strutturale con FabI e rappresenta la principale enoil-ACP reduttasi nelle specie appartenenti a *Streptococcus* e in un numero significativo di altri *firmicutes*. Infine, l'isoforma **FabV** si configura come la meno caratterizzata tra quelle note e si riscontra prevalentemente nei cladi dei -Proteobacteria, quali le specie di *Vibrio*, *Yersinia* e *Pseudomonas*; si ipotizza infatti che FabV possa aver avuto origine in *Pseudomonas fluorescens* per codificare la sintesi di inibitori di prodotti naturali diretti contro FabI. [17]

L'esistenza di queste quattro forme strutturali distinte dell'enzima enoil-ACP reduttasi offre un notevole vantaggio in ambito terapeutico, poiché permette di ridurre lo spettro d'azione dei potenziali inibitori della sintesi degli acidi grassi batterici, consentendo un approccio mirato. Sebbene FabI non sia l'isoforma più diffusa in assoluto, essa costituisce l'enoil-ACP reduttasi essenziale per la sopravvivenza di numerosi patogeni chiave di primaria rilevanza clinica, tra cui *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Enterococcus*, *Acinetobacter* e varie specie di *Enterobacter*.[17]

Inoltre, nonostante in passato siano state sollevate perplessità sul fatto che l'assunzione di acidi grassi esogeni dall'ambiente dell'ospite potesse permettere ai batteri di aggirare l'inibizione metabolica, rigorosi esperimenti condotti su *Staphylococcus* e *Neisseria* hanno

dimostrato in modo conclusivo che gli acidi grassi esogeni non possono bypassare l'inibizione di FabI in questi organismi. Di conseguenza, poiché FabI non è ampiamente distribuita in modo ubiquitario tra tutti i batteri, la maggior parte della ricerca orientata alla scoperta di nuovi antibiotici diretti contro questo target si è concentrata prevalentemente sul genere *Staphylococcus*[17].

2.4.1. Architettura molecolare, sito attivo e meccanismo catalitico dell'enzima FabI

FabI si organizza come omotetramero, formato da quattro subunità identiche di circa 30 kDa. Ciascun protomero appartiene alla superfamiglia delle deidrogenasi/reduttasi a catena corta, all'interno della sottofamiglia *divergent*, e presenta un'architettura a singolo dominio costruita attorno al ripiegamento di Rossmann. In questo ripiegamento i motivi βαβ si organizzano in due unità βαβαβ che formano un foglietto β parallelo centrale di sei o sette filamenti, affiancato su entrambi i lati da tre o quattro α-eliche. È proprio sopra questo foglietto che si colloca il sito di legame del cofattore, riconoscibile per la presenza di un motivo sequenziale conservato e ricco in glicine (Gx_5SxA). Il legame del cofattore (NADH o NADPH), oltre a preparare l'enzima alla catalisi, ne riorganizza il sito attivo: si stabiliscono così canali d'acqua che mettono in comunicazione i siti attivi delle diverse subunità con una cavità acquosa centrale (o una camera d'acqua centrale) interna al tetramero, una disposizione che garantisce un flusso efficiente di protoni durante la reazione.[14,23]

Il cofattore e il substrato acilico non occupano tasche separate, ma si collocano all'interno della stessa cavità: la catena acilica si dispone sopra l'anello nicotinammidico assumendo una caratteristica conformazione a U. La porzione della tasca che accoglie la catena è rivestita soprattutto da residui idrofobici appartenenti all'ansa di legame del substrato (SBL, *substrate-binding loop*), una regione conformazionalmente molto flessibile, che nelle diverse strutture cristallografiche è stata osservata in stati descritti come disordinato, ampiamente aperto, aperto o chiuso. Questa flessibilità, apparentemente un dettaglio tecnico, si rivelerà determinante nel comportamento di alcuni inibitori.[23]

All'interno del sito attivo si riconosce la firma catalitica conservata delle SDR, il motivo $Yx_2(x)Mx_3K$, corrispondente a una diade formata da una tirosina e da una lisina. Su questa base è stato proposto che la triade catalitica dei FabI batterici sia costituita da Phe149, Tyr158 e Lys165, secondo la numerazione di InhA di *Mycobacterium tuberculosis*, con la fenilalanina sostituita da una tirosina in molti altri FabI. La tirosina catalitica, che

corrisponde a Tyr156 in *E. coli* e a Tyr157 in *S. aureus*, instaura l'unico legame a idrogeno esistente tra il substrato e la proteina, coinvolgendo l'ossigeno carbonilico del tioestere. Per poterlo fare il residuo deve riorientarsi: nei complessi in cui è legato il solo cofattore la tirosina si trova infatti nella conformazione *out*, mentre l'arrivo del substrato ne provoca la rotazione verso la conformazione *in*, rivolta all'interno del sito attivo. Gli studi sull'effetto isotopico cinetico indicano che in questa posizione la tirosina agisce da catalizzatore elettrofilo, stabilizzando l'intermedio della reazione. La lisina catalitica, a sua volta, ha il compito di trattenere il cofattore nella posizione corretta: si è a lungo ritenuto che formasse una cavità ossianionica per l'ossigeno carbonilico del substrato, ma l'ipotesi è stata successivamente smentita. Il terzo residuo, Phe149, contribuisce invece a modulare la conformazione del cofattore, favorendo l'orientamento pseudoassiale dell'idrogeno 4S che verrà trasferito al substrato. Anche questo residuo può assumere le conformazioni *in* e *out*, ma con un vincolo importante: le due conformazioni *in*, della fenilalanina e della tirosina, si escludono a vicenda per ingombro sterico, e questo significa che stabilizzare una delle due equivale a impedire l'altra [23].

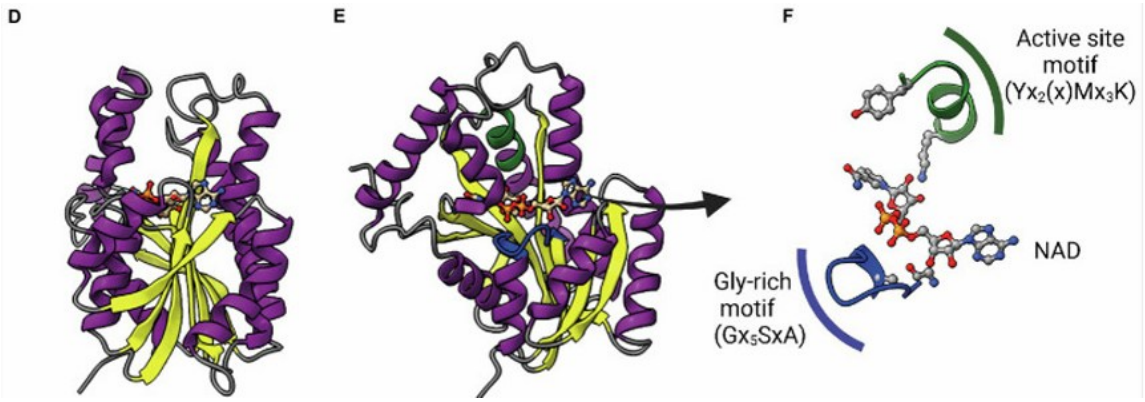


Figura 7. *Il pannello D mostra la struttura di InhA con il foglietto β centrale affiancato dalle α-eliche; il pannello E evidenzia i due motivi conservati (Gx5SxA e Yx₂(x)Mx₃K); il pannello F ingrandisce il NAD con la tirosina e la lisina catalitiche*[23]

Dal punto di vista cinetico, i due substrati (cofattore ed enoil-ACP) si legano all'enzima secondo un meccanismo sequenziale, che varia leggermente da una specie all'altra: in InhA l'ordine non è strettamente obbligato, ma il cofattore si lega preferenzialmente per primo, mentre in FabI-1 di *B. pseudomallei* il meccanismo è di tipo Bi-Bi ordinato, sempre con il cofattore come primo substrato. La riduzione si svolge poi in due semireazioni successive. Nella prima, uno ione idruro viene trasferito per addizione nucleofila coniugata dalla posizione 4S dell'anello nicotinammidico al carbonio C3 (Cβ) del tioestere α,β-insaturo: il

cofattore si ossida a $NAD(P)^+$ e si forma un intermedio enolato, stabilizzato dalla tirosina catalitica. Il trasferimento dell'idruro pro-S è reso possibile dalla conformazione estesa con cui il cofattore si lega negli enzimi SDR. Nella seconda semireazione l'intermedio enolato viene protonato sul carbonio C2 (Cα), e si ottiene così l'acil-ACP. Poiché l'idruro e il protone vengono aggiunti sulla stessa faccia del doppio legame, la reazione segue una stereochimica di addizione *syn*. L'origine del protone resta invece oggetto di discussione: secondo un primo modello proverrebbe dal solvente attraverso la rete ordinata di molecole d'acqua contenuta nel canale interno, il cui accesso al sito attivo sarebbe regolato dalla rotazione di Phe149; secondo un'ipotesi alternativa, sarebbe la stessa tirosina catalitica a protonare direttamente il C2.[23]

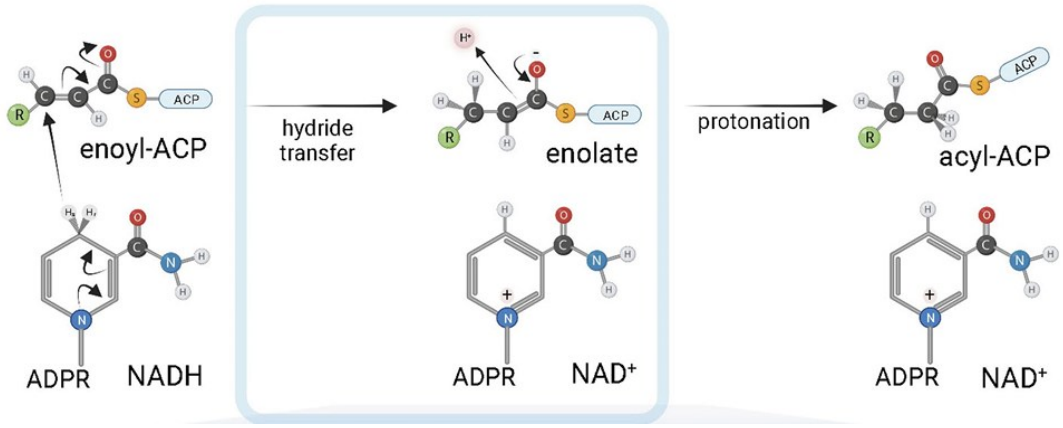


Figura 8. *Meccanismo di riduzione dell'enoil-ACP: primo trasferimento dell'idruro al C3 ad opera di NADH, formazione dell'intermedio enolato, protonazione al C2.* [23]

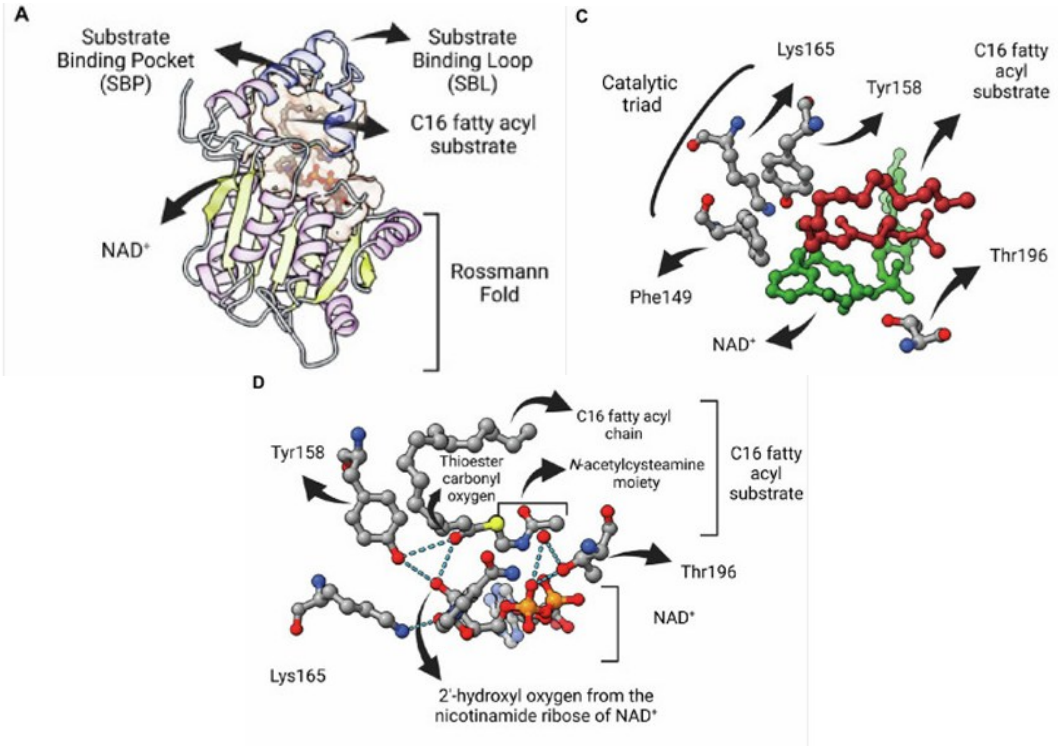


Figura 9. *A. mostra la tasca con il substrato a U, l'SBL e il cofattore; C. mostra la triade Phe149-Tyr158-Lys165; D. mostra i legami a idrogeno tra tirosina, lisina, substrato e ribosio del cofattore.* [23]

L'enzima di *Staphylococcus aureus*, *Sa*FabI, condivide questa organizzazione generale, ma se ne discosta per un aspetto di particolare rilievo farmacologico: la specificità per il cofattore. Mentre i FabI di *E. coli*, *B. subtilis* e *B. pseudomallei* mostrano una marcata preferenza per il NADH, e InhA ne è strettamente dipendente, *Sa*FabI predilige nettamente il NADPH, pur essendo altamente omologa agli altri enzimi della famiglia. La base strutturale di questa differenza risiede in due residui carichi positivamente, Arg40 e Lys41, che si trovano in prossimità del gruppo 2'-fosfato legato al ribosio adenosinico del NADPH; negli enzimi NADH-dipendenti le posizioni corrispondenti sono occupate da residui polari, come la Gln40 di *E. coli*, o apolari, come la Phe41 di InhA. Il ruolo di Arg40 e Lys41 è stato confermato per mutagenesi sito-specifica: i mutanti R40Q e K41N mostrano infatti una riduzione di almeno cinquanta volte del kcat/Km per il NADPH, accompagnata da un aumento di cinque-sette volte del kcat/Km per il NADH. In *Sa*FabI la diade catalitica essenziale è costituita da Tyr157 e Lys164, ai quali si affianca Tyr147, anch'essa coinvolta nella catalisi al punto che la sua mutazione ne compromette l'attività. È stato inoltre proprio questo enzima a fornire le prove più solide a favore del modello del canale d'acqua: mutando

i residui che stabilizzano la catena ordinata di molecole d'acqua se ne compromette l'efficienza catalitica, ed è stato così proposto un percorso di trasporto protonico che parte dalla camera d'acqua interna al tetramero e prosegue lungo il canale fino al sito attivo.[14,23]

Un ultimo elemento merita attenzione, perché condiziona in modo decisivo l'intera strategia farmacologica: le enoil-reduttasi batteriche costituiscono un gruppo estremamente eterogeneo. Molte specie possiedono enzimi alternativi non imparentati strutturalmente con FabI, come FabL, FabV e FabK, e gli stessi FabI si suddividono a loro volta in quattro cladi strutturalmente distinti. I siti attivi dei FabI espressi dai batteri del microbiota intestinale, per esempio, differiscono da quello di *Sa*FabI a sufficienza da renderli insensibili all'afabicina. Ne consegue che un inibitore diretto contro questo bersaglio non potrà che essere patogeno-specifico. Quella che in apparenza è una limitazione si traduce però nel principale vantaggio terapeutico dell'approccio: un antibiotico mirato su *Sa*FabI colpisce lo stafilococco senza perturbare la flora batterica dell'ospite.[14,23]

Le caratteristiche strutturali descritte in questo paragrafo sono esattamente quelle che gli inibitori di FabI sfruttano. Alcuni competono con il substrato acilico occupandone la tasca di legame; altri formano addotti covalenti con il cofattore; altri ancora interagiscono simultaneamente con entrambi i siti. In molti casi il legame dell'inibitore stabilizza conformazioni particolari dei residui catalitici o dell'ansa di legame del substrato, condizionandone potenza e durata d'azione. Il capitolo che segue ripercorre la storia di queste molecole, dal triclosano fino all'afabicina, il primo inibitore di FabI giunto alla sperimentazione clinica avanzata.

CAPITOLO III- INIBITORI FabI

La pipeline attuale di antibatterici ha pochi esempi di target innovativi, ma fra questi uno dei più studiati è rappresentato dalla enoil-ACP reduttasi. Come visto nel capitolo precedente, esso rappresenta un target singolo e specie-dipendente, ma questo aspetto può avere dei vantaggi. Le mutazioni di senso (missense mutations) rappresentano infatti da sempre uno dei principali punti deboli dei farmaci diretti contro un singolo bersaglio molecolare. In questo contesto, l'enzima enoil-ACP reduttasi (FabI) costituisce un esempio emblematico: trattandosi di un unico bersaglio proteico intracellulare, una singola sostituzione nucleotidica è sufficiente ad alterare il sito di legame e a conferire una rapida resistenza al farmaco. Poiché nelle infezioni umane la carica batterica è estremamente elevata, è spesso così alta da rendere quasi inevitabile la comparsa di mutazioni casuali. È proprio questa fragilità ad aver alimentato nel tempo la cosiddetta «ipotesi multitarget», secondo cui gli antibiotici capaci di agire contemporaneamente su più bersagli cellulari sarebbero intrinsecamente superiori alle molecole monotarget.

Tuttavia, l'analisi dei meccanismi di resistenza agli inibitori di FabI dimostra che i limiti della terapia a bersaglio singolo possono essere superati ottimizzando le proprietà chimico-fisiche e farmacologiche mediante una progettazione guidata dalla struttura (structure-guided design). In primo luogo, la molecola deve possedere un'elevatissima affinità per il proprio bersaglio (bassa MIC) e un'ampia finestra terapeutica, così da consentire la somministrazione di concentrazioni superiori a quelle necessarie per eradicare eventuali sottopopolazioni portatrici di mutazioni di senso. Inoltre, l'adozione di una cinetica di legame rapida (fast on/off) evita la dipendenza da complessi conformazionali rigidi, riducendo la probabilità di selezione di mutazioni compensatorie volte a destabilizzare la transizione dell'enzima. Allo stesso tempo, ridurre al minimo le interazioni dirette con le catene laterali degli amminoacidi non essenziali del sito attivo, limita lo spazio disponibile alla mutazione, per lo sviluppo della resistenza senza che il batterio incorra in un elevato costo fisiologico (fitness cost). In conclusione, sebbene il rispetto di questi criteri imponga lo sviluppo di antibiotici patogeno-specifici a scapito di un ampio spettro d'azione, tale approccio consente di prevenire l'evoluzione della resistenza clinica e di preservare l'efficacia dei farmaci monotarget [24]

Gli inibitori dell'enzima enoil-ACP reduttasi ad oggi individuati sono stati divisi in tre principali classi sulla base del loro meccanismo di legame.

La prima categoria comprende gli inibitori bisubstrato, capaci di interagire con il cofattore nicotinammidico o di formare con esso addotti covalenti. Vi appartengono le diazaborine, composti eterociclici contenenti un atomo di boro che inibiscono FabI legandosi covalentemente al gruppo 2′-ossidrilico del ribosio dell'NAD^+, e soprattutto l'isoniazide (INH), che ne costituisce il principale rappresentante clinico. L'isoniazide è un antibiotico a spettro ristretto, diretto specificamente contro InhA, l'enoil-ACP reduttasi di *Mycobacterium tuberculosis* coinvolta nella biosintesi degli acidi micolici. Sebbene agisca esclusivamente su questo patogeno micobatterico e richieda una precedente attivazione da parte della catalasi-perossidasi KatG, l'isoniazide ha fornito la prima, storica e fondamentale dimostrazione clinica dell'efficacia terapeutica derivante dal blocco dell'enoil-ACP reduttasi in medicina umana [24–26].

La seconda categoria comprende eteri bifenilici che si legano in modo non covalente al complesso enzima-prodotto $NAD(P)^+$–FabI. Il prototipo di questa classe è il triclosano, un etere bifenilico triclorurato che agisce come inibitore reversibile di tipo slow, tight-binding e mostra un'elevata affinità per la forma ossidata E–NAD^+. Gli studi strutturali indicano che il gruppo fenolico del triclosano interagisce con il sito attivo formando legami a idrogeno con il residuo catalitico Tyr156 e con il 2′-OH del ribosio nicotinamidico del cofattore NAD^+ [23,27].

La terza categoria è costituita da inibitori ad alta affinità che si legano direttamente al complesso enzima-substrato rappresentato dalla forma ridotta NAD(P)H–FabI. Tra questi composti spicca il candidato clinico AFN-1252 (Debio-1452)[24].

3.1. Gli eteri bifenilici: il Triclosano

Il triclosano (5-cloro-2-(2,4-diclorofenossi) fenolo) rappresenta il capostipite della seconda delle tre grandi classi di inibitori di FabI ed esempio emblematico di molecola la cui efficacia antibatterica è stata riconosciuta oltre trent'anni prima che se ne comprendesse il meccanismo d'azione. L'attività antibatterica del composto fu osservata per la prima volta alla fine degli anni '60, determinandone la rapida introduzione nelle procedure sanitarie ospedaliere e, successivamente, in un'ampia gamma di prodotti di consumo [28]. Quando ne fu caratterizzato il bersaglio molecolare, il triclosano era già impiegato da più di trent'anni come agente antibatterico e antifungino generico in formulazioni eterogenee, tra cui dentifrici, cosmetici, saponi antisettici, tappeti, utensili da cucina in plastica e giocattoli; altre

fonti ne documentano l'utilizzo in saponi antisettici, dentifrici, tessuti e materie plastiche [26].

La diffusione di questo fenomeno, era giustificata dalla convinzione che la molecola esercitasse un'azione battericida aspecifica, analoga a quella di altri disinfettanti, come l'etanolo, per questo non c'era nessuna preoccupazione dello sviluppo di una resistenza batterica [28]. L'ipotesi fu smentita nel 1998, quando McMurry, Oethinger e Levy dimostrarono che il triclosano blocca la sintesi lipidica in *Escherichia coli* e che mutazioni o sovraespressione del gene FabI, che codifica l'enoil-reduttasi, prevengono tale blocco. Si trattava di quella che gli stessi autori definirono la prima evidenza di un'azione su un bersaglio batterico specifico, anziché di un effetto biocida aspecifico[26].

Per confermare questa ipotesi gli autori portarono prove di natura genetiche e funzionali. Sul piano genetico, l'analisi di cinque mutanti indipendenti di *E. coli* K12 resistenti al triclosano evidenziò tre sostituzioni amminoacidiche puntiformi: Gly93→Val, Met159→Thr e Phe203→Leu, associate rispettivamente a incrementi della concentrazione minima inibente di 95, 12,2 e 6,1 volte rispetto al ceppo parentale[26]. È significativo che quattro dei cinque mutanti resistenti al triclosano risultassero resistenti anche alla diazaborina: un dato che conferma l'identità del bersaglio e stabilisce una continuità diretta con la classe di inibitori nota fin dagli anni '60 [26].

Table 1 Characteristics of triclosan-resistant *E. coli* mutants

Strain	*fabI* mutation	MIC (ratio to wild-type)	
		Triclosan	Diazaborine
AG100	None (wild-type)	1.0	1.0
AGT8	ND	5.8	7.1
AGT9	ND	3.1	3.6
AGT11	Gly 93→Val	95	37
AGT23	Met 159→Thr	12.2	0.6
AGT25	Phe 203→Leu	6.1	4.3

Minimal inhibitory concentration (MIC) values, determined by broth dilution with twofold steps, are the average of three experiments and are expressed as ratios to the MIC for the wild-type strain AG100 (MIC for triclosan, 0.8 μg ml^{-1}; diazaborine, 6 μg ml^{-1}). ND, not determined.

Tabella 1. *Caratteristiche della resistenza del triclosano nelle mutazione di E.*coli [26]

Sul piano funzionale, il triclosano, alla concentrazione di 0,24 μg/mL, inibiva il 92% dell'incorporazione di acetato nei lipidi entro 3 minuti, a fronte di riduzioni del 19% del cloramfenicolo (13 μg/mL) e del 2% della ciprofloxacina (0,045 μg/ml), utilizzati come controlli in quanto inibitori della sintesi proteica e del DNA[26]

Alla fine del lavoro si arrivò alla considerazione che altri composti allora ritenuti biocidi aspecifici avrebbero potuto, in realtà, possedere bersagli molecolari definiti [26].

3.1.1 La base strutturale dell'inibizione

Una volta identificato il bersaglio, rimaneva ancora da comprendere il meccanismo molecolare alla base di questa specificità. La risposta giunse grazie all'ottenimento della struttura cristallografica del complesso ad alta risoluzione (2.2 Å) ternario formato dall'enoil-reduttasi di *E. coli*, dal NAD^+ e dal triclosano [29].

La struttura del triclosano è costituita da due anelli aromatici uniti da un ponte etereo: l'anello A, con il gruppo ossidrilico fenolico e il sostituente clorurato in posizione 5, e l'anello B, che presenta due atomi di cloro nelle posizioni 2 e 4. L'inibitore si colloca, all'interno del sito attivo, in posizione adiacente all'anello nicotinamidico del cofattore. L'anello fenolico (A) si dispone faccia a faccia con l'anello nicotinamidico, consentendo estese interazioni di stacking π–π, mentre entrambi gli anelli del triclosano instaurano ulteriori contatti di van der Waals con i residui che delimitano il sito attivo e la tasca di legame del substrato. Il gruppo idrossile fenolico forma inoltre legami a idrogeno con il 2′-OH del ribosio nicotinamidico e con l'ossigeno fenolico della tirosina 156 (Tyr156), residuo ritenuto un donatore di protoni durante il ciclo catalitico dell'enzima [29,30].

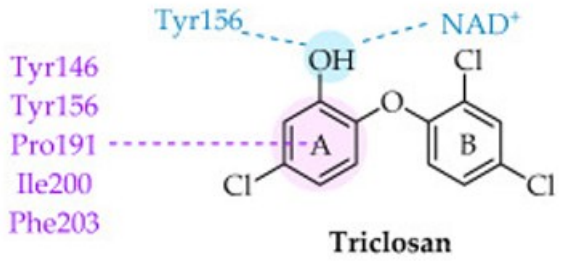


Figura 10 *Struttura, SAR e rappresentazione delle principali interazioni con Ec FabI* [21]

L'elemento concettualmente più rilevante emerso da questa analisi è il mimetismo del substrato: la struttura dell'intermedio enolato generato durante la catalisi è fedelmente riprodotta da una porzione dell'anello fenolico del triclosano. Il carbonio C3 e l'ossigeno dell'enolato occupano infatti i medesimi siti del carbonio in posizione 5 dell'anello fenolico e dell'ossigeno fenolico dell'inibitore [29]

Il triclosano agisce dunque come un inibitore sito-diretto estremamente potente proprio in virtù della sua somiglianza con il substrato naturale dell'enzima. L'analisi strutturale spiega l'origine delle tre mutazioni di resistenza, che colpiscono proprio i residui a contatto con la molecola. L'esempio più significativo è la mutazione in posizione 93 (Gly93Val), causa del picco di resistenza e del cospicuo incremento della MIC: la catena laterale della valina crea infatti contatti sterici sfavorevoli con l'anello B (2,4-diclorofenossi), ostacolando il corretto alloggiamento del triclosano. [29]

3.1.2 Relazioni struttura-attività e meccanismi di resistenza

Definita la geometria del legame e i determinanti fondamentali al riconoscimento, si è reso necessario studiare il meccanismo di binding del triclosano. Il problema fu affrontato mediante studi cinetici secondo due strategie complementari: prima di tutto, intervenire sul ligando, attraverso la sintesi di analoghi progressivamente semplificati, e a seguire sull'enzima, attraverso la mutagenesi sito-diretta dei residui del sito attivo[30,31]

Il punto di partenza fu la caratterizzazione cinetica dell'interazione. Il triclosano si comporta come un inibitore reversibile di tipo slow, tight-binding: l'inibizione non è immediata, ma si instaura progressivamente nel tempo, e il complesso che ne risulta si dissocia con estrema lentezza. Il composto riconosce selettivamente la forma associata al cofattore ossidato, ossia il complesso E·NAD^+ generato al termine del ciclo catalitico, riuscendo a legarsi all'enzima. La costante di inibizione relativa a tale forma, indicata come K_1, è pari a 7 pM, valore rivisto rispetto ai 23 pM precedentemente stimati.

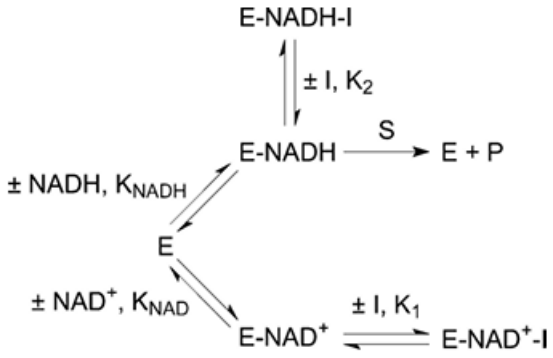


Figura 11. *Schema cinetico dell'inibizione di FabI. L'enzima libero (E) lega il cofattore nelle forme ossidata (E·NAD^+) e ridotta (E·NADH); l'inibitore (I) può legarsi a entrambi i complessi enzima–cofattore, con costanti di inibizione K_1 e K_2 rispettivamente. S indica il substrato e P il prodotto.* [30]

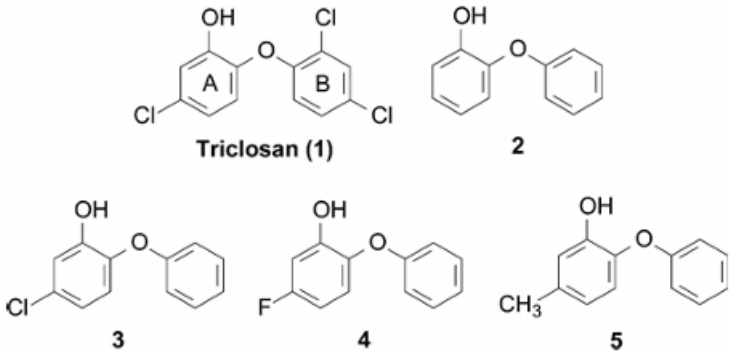


Figura 12. *Le strutture molecolari del triclosano (**1**), del 2-fenossifenolo (**2**, privo di clori), del 5-cloro-2-fenossifenolo (**3**), del 5-fluoro-2-fenossifenolo (**4**) e del 5-metil-2-fenossifenolo (**5**).*[30]

Al fine di determinare quali singoli sostituenti alogenidrici contribuisse maggiormente al legame del triclosan, gli autori procedettero dapprima alla rimozione di tutti e tre gli atomi di cloro. L'analogo così ottenuto, il 2-fenossifenolo **2**, si lega all'enzima 70 000 volte più debolmente rispetto il triclosano. Oltretutto non manifesta un'inibizione di tipo slow-binding e si lega con uguale affinità alle due forme del complesso enzima–cofattore, con costanti di 0,50 μM verso E·NAD$^+$ e 0,40 μM verso E·NADH [31]. La reintroduzione del solo sostituente clorurato dell'anello A porta al 5-cloro-2-fenossifenolo **3**, che si lega preferenzialmente alla forma E·NAD$^+$, con K_i = 1,1 pM, risultando circa sette volte più affine dello stesso triclosano. Presenta inoltre una concentrazione minima inibente (MIC) su *E. coli* pari a 0,07 μg/mL, rispetto 0,3 μg/mL del triclosano [30].

Il confronto fra gli analoghi è evidente: rispetto al 2-fenossifenolo, che ne è privo, la presenza del solo alogeno in posizione 5 dell'anello A aumenta l'affinità di **3** per l'enzima di 450 000 volte, mentre i due atomi di cloro dell'anello B, che distinguono il triclosano dal 5-cloro-2-fenossifenolo, partecipano a interazioni steriche sfavorevoli con l'enzima [31]. Oltre all'effetto sull'affinità, il sostituente in posizione 5, determina quale forma dell'enzima venga riconosciuta. L'analogo **4** recante un atomo di fluoro si lega ad entrambe le forme dell'enzima, ma si lega all' E·NAD$^+$, con costanti inibizione pari a 3,2 nM e all' E-NADH con 240 nM[1], mentre l'analogo **5** recante un gruppo metilico si lega esclusivamente alla

[1] La Tabella 1 del articolo" Inhibition of the Bacterial Enoyl Reductase FabI by Triclosan: A Structure-Reactivity Analysis of FabI Inhibition by Triclosan Analogues" riporta due determinazioni indipendenti; si adottano qui i valori relativi alla forma il cui cofattore era fatto variare, secondo l'indicazione degli autori.

forma ridotta E·NADH, con K_2 di 7,2 nM [30]. Gli autori conclusero pertanto che il sostituente alogenidrico dell'anello A deve essere presente affinché si verificano forme di inibizione lente, tight-binding e che la sua interazione con la laterale del residuo Phe203 sia determinante per l'affinità del complesso enzima–cofattore ossidato [30]

Table 1. Data for Triclosan Analogues: pK_a, Minimum Inhibitory Constants Toward *E. coli*, and Inhibition Constants for Binding to Wild-Type FabI

			FabI inhibition		
compound	pK_a	MIC *E. coli* (μg/mL)[a]	K_1	K_2	binding preference
triclosan (**1**)	7.8 ± 0.1 8.4 ± 0.1[b]	0.3	7 ± 1 pM[c]		E·NAD$^+$ [d]
2	9.12 ± 0.03	3.7	0.50 ± 0.02 μM	0.40 ± 0.01 μM	NC with respect to DDCoA[e]
3	8.13 ± 0.02	0.07	1.1 ± 0.1 pM		E·NAD$^+$ [d]
4	8.12 ± 0.06	0.6	3.2 ± 0.4 nM	42 ± 1 nM	E·NAD$^+$ and E·NADH[d]
			68 ± 8 pM	240 ± 40 nM	E·NAD$^+$ and E·NADH[d]
5	9.15 ± 0.09	1.0		7.2 ± 0.2 nM	E·NADH[d]
				9.7 ± 0.4 nM	E·NADH[d]
6	ND[f]	2.0	0.15 ± 0.01 μM		UC with respect to DDCoA[g]
7	ND[f]	>40	53 ± 8 μM	30 ± 5 μM	NC with respect to DDCoA[e]
8	ND[f]	>100	1.7 mM	1.9 mM	NC with respect to DDCoA[e]

[a] The experiment was repeated twice for each analogue and the values reported are average of two readings. [b] pK_a for triclosan bound to FabI.[30] [c] Data from Sivaraman et al.[30] [d] Slow binding inhibition. [e] Noncompetitive inhibition. K_{ii} and K_{is} have been listed under K_1 and K_2, respectively. [f] ND: not determined. [g] Uncompetitive inhibition. K_{ii} has been listed under K_1.

Tabella 2. *Valori di pKa, concentrazione minima inibente su E. coli e costanti di inibizione (K_1 verso E·NAD$^+$, K_2 verso E·NADH) per il triclosano e i suoi analoghi, con la preferenza di legame per ciascuna forma enzima–cofattore.* [30]

Per chiarire ulteriormente il meccanismo di inibizione del triclosano, fu studiato il legame del composto ai mutanti del sito attivo di FabI di *E. coli*. La mutazione Tyr156Phe, che elimina l'ossidrile coinvolto nel legame a idrogeno con il gruppo fenolico dell'inibitore, riduce l'affinità di circa 400 volte; sebbene il composto rimanga in grado di legarsi anche alla forma ridotta E·NADH, esso mantiene comunque una preferenza residua per il complesso E·NAD$^+$. La mutazione di resistenza Gly93Val riduce l'affinità di circa 9000 volte, senza alterare in modo significativo sui parametri catalitici dell'enzima. Tale studio sul triclosano e suoi derivati come inibitori di FabI , porta la consapevolezza che dovessero essere progettati nuove molecole in grado di aggirare la mutazione in posizione Gly93, che si configura come determinante molecolare generale della resistenza batterica [31].

3.1.3. Peculiarità dell'enzima Stafilococcico (saFabI)

Le evidenze fin qui descritte riguardano tuttavia l'enzima di *E. coli*, e la loro trasposizione al patogeno stafilococcico richiede alcune precisazioni. L'enoil-ACP reduttasi di *Staphylococcus aureus* è infatti l'unica FabI nota a mostrare una netta preferenza per il NADPH anziché per il NADH [32]. I dati ad alta risoluzione sui complessi ternari dei due eteri difenilici asimmetrici (5-cloro-2-fenossifenolo e il 5-etil-2-fenossifenolo) mostrano una modalità di legame del tutto simile a quella già osservata nelle proteine FabI omologhe. In pratica, il gruppo ossidrilico dell'anello A forma due legami a idrogeno con la Tyr157 e con il 2′-OH del ribosio nicotinamidico, rispettivamente a 2,5 e 2,6 Å di distanza. In aggiunta,

gli inibitori si inseriscono perfettamente in una tasca di legame formata dal $NADP^+$ e da diversi amminoacidi idrofobici, a una distanza media di circa 3,8 Å .[32]

Il ruolo importante proviene dai sostituenti dell'anello B. L'ossigeno carbonilico di Ala97 forma con il cloro in posizione 4 un legame alogeno geometricamente favorevole a 3,2 Å, mentre lo stesso atomo di cloro instaura, alla medesima distanza, un debole legame idrogeno con il gruppo NH ammidico dello stesso residuo. Lo spazio necessario ad accogliere l'anello B era disponibile dallo spostamento di Phe96, che forma al contempo un canale acilico allungato [33]. La rilevanza di queste interazioni emerge dal confronto con il 5-cloro-2-fenossifenolo **3**: privo dei due cloro dell'anello B, esso si dispone ruotato di 11° all'interno della fessura di legame e mostra un valore di Ki*(app) (costante di inibizione apparente) di quasi tre volte superiore a quello del triclosano [32].

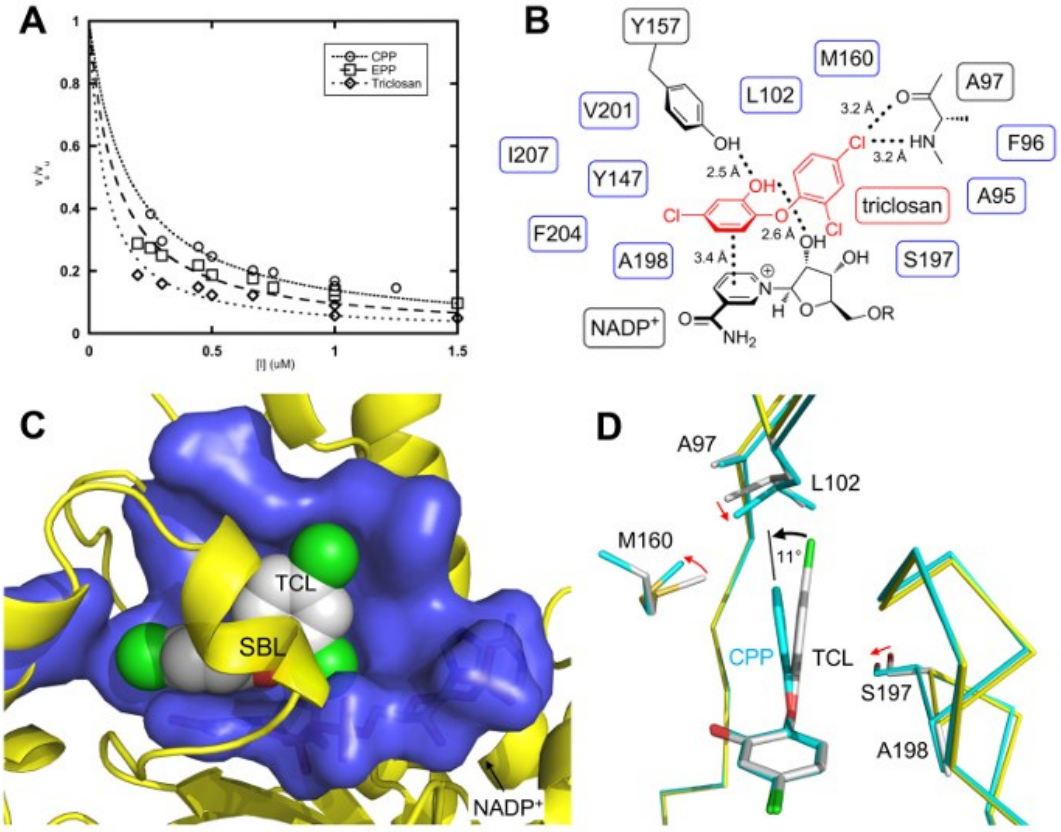


Figura 13. *Interazioni degli eteri difenilici con saFabI.* ***(A)*** *Curve dose-risposta di 5-cloro-2-fenossifenolo (CPP), 5-etil-2-fenossifenolo (EPP) e triclosano.* ***(B)*** *Schema delle interazioni del triclosano (in rosso) con l'enzima e il cofattore: in evidenza i legami a idrogeno dell'ossidrile dell'anello A con Tyr157 e con il 2'-OH del ribosio nicotinamidico (2,5 e 2,6 Å) e i due contatti del cloro in posizione 4 con l'ossigeno carbonilico e l'NH ammidico di Ala97 (3,2 Å); nei riquadri azzurri i residui della tasca idrofobica.* ***(C)*** *Alloggiamento del triclosano nella tasca di legame, con l'inibitore a spazio pieno e i residui circostanti in rappresentazione di superficie.* ***(D)*** *Modalità di legame a confronto: triclosano in grigio e giallo, CPP in azzurro, il cui anello B ruota di circa 11° in assenza dei due atomi di cloro.* [32]

3.2 La tossicità del triclosano

Sebbene il triclosano sia stato dimostrato essere un inibitore caratterizzato da un'alta ligand efficacy (costante di inibizione picomolare per il legame al complesso enzima-cofattore a fronte di un basso peso molecolare), a sconsigliarne l'impiego sistemico sono la componente biocida e la tossicità per via endovenosa [33]. Il primo aspetto è dimostrato dal fatto che il triclosano continua a funzionare anche su batteri in cui FabI non è affatto il bersaglio, con concentrazioni minime inibenti di 2 µg/mL su *Enterococcus faecalis* e di 8 µg/mL su *Streptococcus pneumoniae*, e dalla citotossicità su cellule eucariotiche della linea HepG2, con ED_{50} di 2 µg/mL [33]. Tramite questi saggi viene monitorato l'effetto biocida aspecifico: per i composti attivi su FabI, un valore di clogD superiore a 3 risulta correlato alla sua comparsa, e l'effetto cresce al crescere del clogD, tanto che il triclosano, con un valore di 5,2, manifesta l'effetto aspecifico più marcato fra i derivati riportati [33]. Con il clogD aumenta infatti il grado di lipofilia che circonda il gruppo catecolico idrofilo, conferendo alle molecole un carattere anfifilico; e poiché l'azione aspecifica del triclosano è stata associata a effetti di destabilizzazione della membrana, gli autori ritengono verosimile che gli effetti biocidi dei suoi analoghi siano direttamente connessi a tale carattere [33].

Alla componente biocida si aggiunge una tossicità sistemica documentata su più fronti. Il composto manifesta effetti ormonali, fra cui alterazioni dell'omeostasi degli ormoni tiroidei con modificazioni dell'assorbimento dello ioduro attraverso la modulazione del simporto sodio/ioduro, e l'attivazione della trascrizione mediata dal recettore pregnano X, coinvolta nel metabolismo steroideo[21]. Manifesta inoltre una tossicità mitocondriale che può indurre effetti indesiderati a lungo termine sulle cellule somatiche, riproduttive, nervose ed epatiche, interferendo con la respirazione mitocondriale sia attraverso un effetto protonoforo sia mediante l'inibizione dell'attività del complesso II, con conseguente morte cellulare per apoptosi; più recentemente è stato ipotizzato che possa indurre tossicità mitocondriale anche attraverso effetti membranotropi, quali la permeabilizzazione della membrana plasmatica, la produzione di specie reattive dell'ossigeno e l'influsso di ioni calcio [21]. È in ragione dei potenziali rischi sanitari legati all'esposizione a lungo termine che la Food and Drug Administration ha rimosso il triclosano dal mercato americano nel 2016, mentre nell'Unione Europea esso resta legale, seppure soggetto a regolamentazioni molto severe [21,33].

3.3 Acrilammidi e naftiridinoni: dallo screening al candidato clinico

La seconda grande classe di inibitori di FabI non nacque dal tentativo di migliorare una molecola già nota, ma da uno screening sistematico condotto nei primi anni 2000 sull'enzima stafilococcico. I laboratori GlaxoSmithKline saggiarono 305.189 composti della propria collezione proprietaria direttamente sul FabI di *Staphylococcus aureus* e ne isolarono un derivato 1,4-benzodiazepinico che inibiva l'enzima con una IC_{50} di 16.5 µM, ma non uccideva il batterio: la concentrazione minima inibente (MIC) restava infatti superiore a 64 µg/mL su quasi tutte le specie saggiate. Si decise comunque di proseguire lungo questa linea di ricerca e si ipotizzò che l'attività antibatterica potesse emergere modificando la struttura per l'aumentare la potenza sul bersaglio [34,35] .

Lo studio è partito rimuovendo alcuni elementi strutturali del capostipite (la benzodiazepina in Tabella 3) per stabilire quali fossero davvero necessari. La catena esterea laterale si rivelò superflua e la sua rimozione fece comparire la prima, modesta attività antibatterica, con MIC di 16 µg/mL; anche l'anello benzodiazepinico a sette membri poteva essere sostituito da due gruppi sostituenti su due carboni dell'anello aromatico senza perdita di attività. La rimozione del gruppo amminico in posizione *para*, al contrario, abbatteva l'attività. [34]

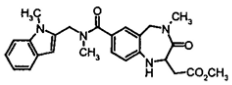
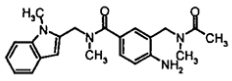
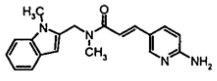
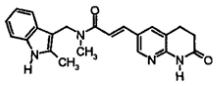
Compound	IC_{50} (µM)			MIC (µg/ml)				
	S. aureus FabI	*H. influenzae* FabI	*S. pneumoniae* FabK	*S. aureus* (Oxford)	*E. faecalis (1)*	*S. pneumoniae (1629)*	*H. influenzae (Q1)*	*M. catarrhalis (1502)*
1 	17.1	6.9	>30	>64	>64	>64	>64	32
2 	6.7	4.7	>30	16	>64	>64	>64	64
3 	2.4	4.2	>30	0.5	>64	>64	>64	4
4 	0.047	0.13	2	0.06	16	8	2	<0.06

Tabella 3. *Evoluzione strutturale della serie GSK: dal capostipite benzodiazepinico identificato per screening al lattame naftiridinonico, con le relative attività enzimatiche e antibatteriche.* [35]

La spiegazione dell'ottima attività del derivato *anilinico* (il secondo in tabella) emerse dall'analisi cristallografica del complesso cristallografico con il FabI di *Escherichia coli* e il NAD^+, in cui si osservò che la porzione indolica alloggiava in una tasca lipofila delimitata

da Tyr146, Tyr156 e Phe203, e che l'ammide di collegamento, disposta in conformazione *cis*, si sovrapponeva all'anello nicotinamidico del cofattore mentre il suo ossigeno carbonilico formava legami con l'ossidrile di Tyr156 e il 2′-ossidrile del ribosio. Si tratta delle stesse interazioni descritte al §3.1.1 per l'ossidrile fenolico del triclosano; su questa base, gli autori ipotizzarono che anche questa ammide funzionasse da *mimetico dell'enolato di stato di transizione* [34].

Tuttavia, si evidenziò nel corso della preparazione dei derivati che andavano incontro a ciclodeidratazione, e le diidrochinazoline che ne risultavano erano inattive. Era quindi necessaria un'impalcatura molecolare stabile e la struttura cristallografica suggerì come ottenerla, tramite la sostituzione dell'anilina con un'*amminopiridina*, nell'aspettativa che la disposizione amidino-simile dei due azoti, protonata nel sito attivo, legasse l'ossigeno fosfatico del cofattore.

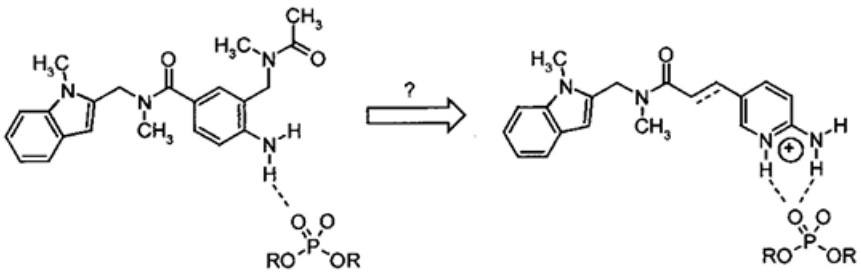


Figura 14. *Modello di progettazione degli inibitori amminopiridinici:*[34].

Il composto risultò efficace (IC_{50} di **2,4 µM** e MIC di **0,5 µg/mL** su *S. aureus*) ma per una ragione diversa da quella prevista. l'analisi cristallografica mostrò infatti che l'anello non è protonato e che, invece dell'interazione attesa con il fosfato, forma **due legami a idrogeno con il residuo Ala95**: è infatti la disposizione di un accettore e di un donatore, propria della specie neutra, a rendere possibile il contatto con la catena principale della proteina, in quella che gli autori descrissero come una nuova e rilevante modalità di legame. L'ulteriore analisi per sottrazione di questo composto permise infine di individuare nella **3-(2-amminopiridinil) acrilammide** il farmacoforo minimo della classe [34].

Il derivato lattamico tetraidronaftiridinico, la (E)-N-metil-N-(2-metil-1H-indol-3-ilmetil) -3-(7-oxo-5,6,7,8-tetraidro-1,8-naftiridin-3-il) acrilammide, con IC_{50} di 0,047 µM e quindi 350 volte più potente del capostipite da screening. Si distingue anche per la clearance plasmatica nel ratto, che risultò inferiore a quella dell'amminopiridina, mentre il tempo

durante il quale la frazione libera rimaneva al di sopra della concentrazione minima inibente aumentò a quattordici ore. Sul piano microbiologico, il composto raggiunse una MIC di 0,06 µg/mL su *S. aureus*, nei pannelli di isolati clinici multiresistenti di *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis* registrò MIC_{50} di 0,03 e MIC_{90} di 0,06 µg/mL per entrambe le specie: valori oltre 500 volte inferiori a quelli dei nove antibiotici commerciali impiegati come confronto. Comparve inoltre una debole attività su FabK, con IC_{50} di 2 µM, che estese l'attività antibatterica anche agli organismi dipendenti da quell'isoforma. L'efficacia fu confermata in *vivo*, nel modello di ascesso inguinale da *S. aureus* nel ratto, nel quale emerse il vantaggio farmacocinetico del derivato lattamico, infatti l'amminopiridina induceva per via orale una riduzione di appena 1,5 log_{10}, mentre il lattame di ben 3,5 log_{10}, valore statisticamente non distinguibile da quello dell'amoxicillina-clavulanato somministrata a una posologia equivalente alla dose umana di riferimento [35].

Quest'ultimo dato chiarisce la relazione tra l'isoforma enzimatica bersaglio e lo spettro d'azione: come illustrato al §2.4, la distribuzione non uniforme delle isoforme dell'enoil-ACP reduttasi fa sì che un inibitore specifico di FabI presenti, per sua natura, uno spettro ristretto, perché dovrebbe colpire i patogeni in cui FabI è l'unica reduttasi e non agire su quelli che dispongono di FabK, a meno che non acquisisca attività su entrambe. I dati ottenuti per questa serie lo confermavano, poiché solo il derivato dotato di attività duale risultò attivo su *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pneumoniae*. Negli stafilococchi, invece, FabI è l'unica forma di enoil-ACP reduttasi. L'enzima è quindi essenziale per la vitalità cellulare e la sua inibizione può configurarsi come una terapia antistafilococcica mirata [35–37]

I limiti della serie emersero negli studi sui Gram-negativi, di fatti il composto si rivelò un substrato delle pompe di efflusso e risultava molto più potente sui mutanti di *Haemophilus influenzae* privi di tali sistemi, inoltre la sua attività aumentava in presenza di un inibitore dell'efflusso; tuttavia, su *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Pseudomonas aeruginosa* neppure l'inibitore dell'efflusso produsse alcun effetto. Gli autori attribuirono il fenomeno all'impermeabilità di questi organismi e, per *P. aeruginosa*, alla possibile presenza di una pluralità di enoil-ACP reduttasi [35].

Nel 2009 la serie è passata da GlaxoSmithKline ad Affinium Pharmaceuticals, e i successivi studi di esplorazione sulla porzione aromatica hanno evidenziato una maggiore attività dei benzofurani rispetto a benzotiofeni e indoli [21]. Su queste basi, una collezione di inibitori di FabI fu sottoposta a un processo iterativo di ottimizzazione guidata dalla struttura: la

valutazione di 500 composti aggiuntivi consentì un aumento della potenza antistafilococcica, che portò alla designazione di **AFN-1252** quale candidato allo sviluppo. La molecola, (2E)-N-metil-N-[(3-metil-1-benzofuran-2-il)metil]-3-(7-oxo-5,6,7,8-tetraidro-1,8-naftiridin-3-il)prop-2-enammide, accosta una porzione 3-metilbenzofuranica e una ossotetraidronaftiridinica mediante una N-metilpropenammide. Su *S. aureus* le sue MIC si collocano fra 0,002 e 0,12 μg/mL, con MIC_{90} non superiori a 0,015 μg/mL, mentre rimane inattiva su un'ampia gamma di altri Gram-positivi e Gram-negativi [36–38].

3.4 Dal Debio-1452 all'Afabicina (Debio-1450)

La designazione di AFN-1252 come candidato allo sviluppo si inseriva in un contesto clinico preciso. *S. aureus*, che l'Organizzazione Mondiale della Sanità colloca fra i patogeni di priorità II, provoca infezioni di diversa natura ed è sempre più resistente a numerosi antibiotici di impiego corrente; nella forma meticillino-resistente, cui si aggiunge la resistenza alla vancomicina e ai fluorochinoloni, può causare malattie particolarmente gravi e infezioni persistenti e difficili da trattare, comprese le infezioni batteriche acute della cute e dei tessuti molli. La crescente gravità di queste infezioni ha assunto proporzioni allarmanti a livello mondiale, poiché, sebbene siano disponibili diversi agenti anti-MRSA per il loro trattamento, la presenza di comorbilità e complicanze le rende una causa principale di visite ambulatoriali e ricoveri ospedalieri, negli Stati Uniti e nel resto del mondo. Da qui nasce l'appello dell'OMS e di altri organismi sanitari internazionali a sviluppare nuovi farmaci antibatterici, costituiti da entità chimiche o biologiche inedite, diretti contro bersagli essenziali ma ancora inesplorati di *S. aureus* e caratterizzati da profili di sicurezza migliori e da una maggiore flessibilità nelle formulazioni e negli schemi posologici. Le scoperte basate sulla genomica dei primi anni 2000 permisero di individuare nella via biosintetica degli acidi grassi di tipo II uno di quei bersagli ancora poco sfruttati. [10]

Con l'intento di migliorare il profilo di biodisponibilità orale e di solubilità è stato successivamente sviluppata l'afabicina , o il Debio-1450, precedentemente nota come AFN-1720. L'afabicina si presenta come primo inibitore sperimentale di FabI sviluppato da Debiopharm con l'obiettivo dichiarato di individuare una "*magic bullet*" per *S. aureus*, MRSA compreso. L'afabicina è infatti il profarmaco del Debio-1452, denominato anche afabicina desfosfono o AFN-1252, con un profilo migliorato: la sua struttura comprende un gruppo addizionale che viene rapidamente scisso *in vivo*, liberando la porzione attiva [10].

Il Debio-1452 è un antibiotico specie-specifico e a spettro ristretto, attivo su oltre cinquemila ceppi di *S. aureus* compresi quelli resistenti alla meticillina. Gli studi condotti nel topo e nell'uomo ne hanno documentato un'eccellente capacità di penetrazione. Il farmaco ha inoltre mostrato buoni profili di sicurezza e tollerabilità negli studi clinici ed è attualmente oggetto di sperimentazioni di fase II in pazienti con infezioni ossee o articolari[10].

3.4.1 Sviluppo del profarmaco estero-fosfato e meccanismo d'azione

La strategia sintetica dell'afabicina (Debio-1450) si sviluppa attraverso una sequenza convergente incentrata sulla preparazione dell'intermedio acrilammidico **3** e sul suo successivo accoppiamento con il frammento naftiridinico protetto **4**.

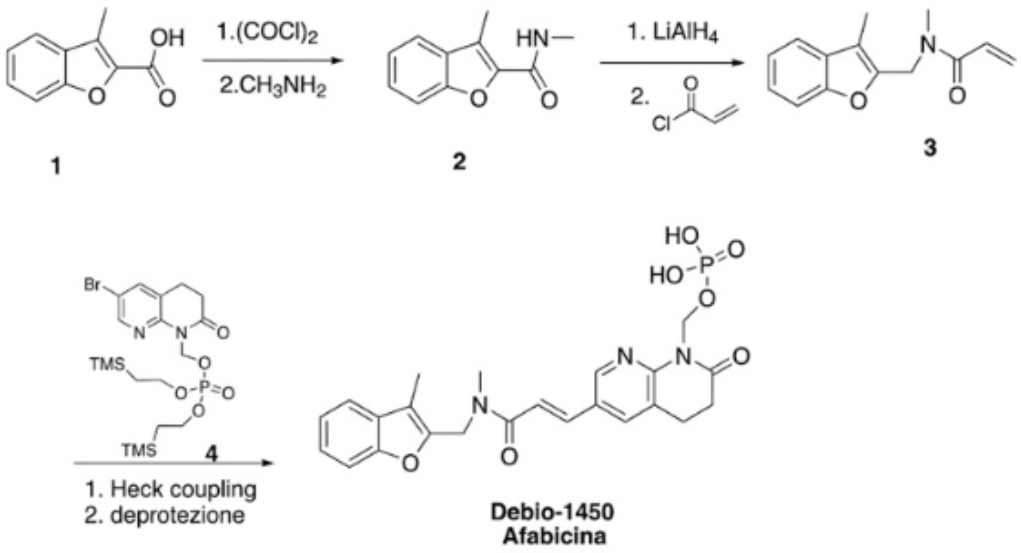


Figura 15. *Sintesi del Debio-1450*

Inizialmente, l'acido 3-metilbenzofuran-2-carbossilico (**1**) viene attivato al corrispondente cloruro d'acido tramite reazione con cloruro di ossalile e fatto reagire *in situ* con metilammina per fornire la *N*,3-dimetilbenzofuran-2-carbossammide (**2**). Il gruppo ammidico dell'intermedio **2** viene quindi ridotto ad ammina secondaria mediante l'impiego litioalluminio idruro, e la successiva acilazione con cloruro di acriloile permette di introdurre l'insaturazione terminale, fornendo l'acrilammide **3**.

Infine, l'alchene terminale **3** viene fatto reagire con il bromo-derivato naftiridinico **4**, recante il gruppo fosfonossimetilico protetto come estere 2-(trimetilsilil)etilico, attraverso una reazione di accoppiamento di Heck catalizzata da palladio. La sequenza si conclude con la

deprotezione acida dei gruppi protettori trimetilsililetilici per liberare la funzione fosfonica, fornendo l'afabicina (Debio-1450) [10].

La sintesi produce l'acido fosfonico libero, ma il principio attivo non è l'acido, bensì un suo sale. Per individuare la forma solida ottimale, tre diversi sali sono stati caratterizzati mediante diffrazione di raggi X su polveri (XRPD): il sale disodico è risultato amorfo, mentre quello dipotassico ha mostrato una struttura parzialmente cristallina, unitamente a un'instabilità chimica già a un mese. Il sale di bis(etanolammonio) è risultato invece cristallino e stabile, mantenendosi inalterato per tre mesi sia a 30 °C con il 65% di umidità relativa sia a 50 °C, oltre a resistere all'irraggiamento gamma a 28,6-30,9 kGy. È questo sale a costituire il principio attivo, da cui la denominazione afabicina bis(etanolammina) [39].

La molecola così ottenuta è di per sé priva di attività antimicrobica[40]. L'afabicina presenta una maggiore solubilità e una migliore biodisponibilità orale. In seguito a defosforilazione con rimozione del gruppo fosfato, si forma un emiamminale intermedio che per scissione libera la frazione attiva, l'afabicina desfosfono [38]. La conversione è stata esaminata in studi farmacocinetici condotti su ratti Sprague-Dawley e cani beagle, ai quali il Debio-1450 è stato somministrato per via orale ed endovenosa alla dose di 7 mg/kg nel ratto e, nel cane, alle dosi di 15 mg/kg per via orale e di 7 mg/kg per via endovenosa. Il profarmaco viene convertito rapidamente in Debio-1452, con emivita breve, pari a 0,10 ore nel ratto e a 0,12 ore nel cane, e valori di clearance elevati, rispettivamente di 2610 e 2632 mL/h/mg. Dopo somministrazione endovenosa, la concentrazione plasmatica massima del Debio-1450 è risultata di 4,233 ng/mL nel ratto e di 3,899 ng/mL nel cane: il profarmaco è quindi misurabile in circolo, ma vi permane solo per un tempo molto breve. Nonostante la rapida scomparsa dal circolo, il profarmaco rende disponibile il metabolita attivo in modo efficace, con esposizioni ed emivite adeguate e una buona biodisponibilità orale, pari al 117% nel ratto e al 59% nel cane[10].

Un comportamento analogo è stato osservato nell'uomo. In uno studio a dose singola crescente condotto in soggetti sani, i profili concentrazione-tempo del Debio-1450 hanno mostrato una rapida conversione del farmaco nella frazione attiva: la concentrazione massima del profarmaco è raggiunta tra una e due ore dall'inizio dell'infusione, mentre quella del Debio-1452 compare circa quindici minuti dopo il termine dell'infusione. La concentrazione plasmatica del Debio-1452 diminuisce in modo monoesponenziale, con un'emivita terminale media di 7-8 ore[10].

Una conferma nei pazienti è giunta dallo studio di penetrazione osteoarticolare condotto in soggetti sottoposti a protesi d'anca elettiva, trattati con afabicina per via orale alla dose di 240 mg ogni 12 ore [41]. Lo stesso comportamento è stato osservato nell'uomo e nei pazienti, come si vedrà a proposito della farmacocinetica (§3.6).

3.4.2 Struttura del complesso con FabI

La struttura del complesso ternario comprendente i residui da 1 a 256 di FabI di S. aureus, il 3′-NADPH e l'inibitore è stata risolta a 1,8 Å ed è stata depositata nella Protein Data Bank con il codice 4FS3. L'impiego del substrato non naturale 3′-NADPH ha permesso al complesso ternario di cristallizzare agevolmente. Il cofattore si lega in una conformazione estesa all'estremità carbossi-terminale del foglietto β, con l'anello nicotinamidico alloggiato in profondità in una tasca sulla superficie dell'enzima, mentre un'ansa flessibile della proteina, costituita dai residui da 194 a 204, ricopre la molecola di inibitore nel sito di legame. La cavità disponibile per il legame dell'inibitore si colloca al di sopra del NADPH ed è di natura idrofobica, con numerosi residui aromatici raggruppati nel sito di legame [37].

Il carbonile della cis-ammide che unisce le due porzioni della molecola si colloca in una posizione che gli consente di accettare due legami a idrogeno, uno dal 2′-ossidrile del NADPH e l'altro dall'ossidrile della Tyr157, oltre a disporsi parallelamente all'anello nicotinamidico del cofattore stabilendo un'interazione di impilamento π. Dall'altra parte della molecola, il nucleo ossotetraidronaftiridinico è trattenuto da due ulteriori legami a idrogeno con lo scheletro peptidico dell'Ala97, che interagisce sia con l'azoto piridinico sia con l'idrogeno N-acilico. La porzione 3-metilbenzofuranica, infine, si incunea nella tasca idrofobica delimitata dalle catene laterali lipofile di Phe204, Tyr157 e Tyr147, con cui instaura forti interazioni idrofobiche [37].

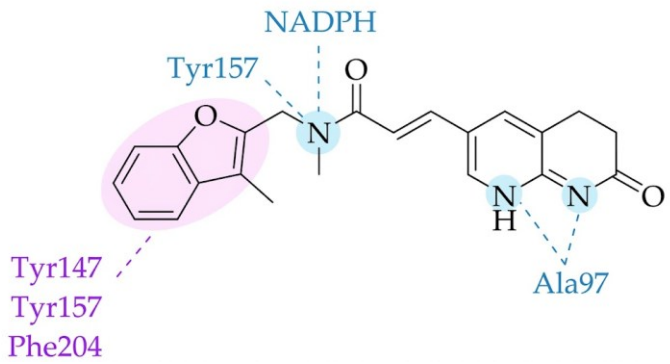


Figura 16. *Rappresentazione schematica delle principali interazioni di legame tra l'afabicina desfosfono e il FabI di S. aureus.*

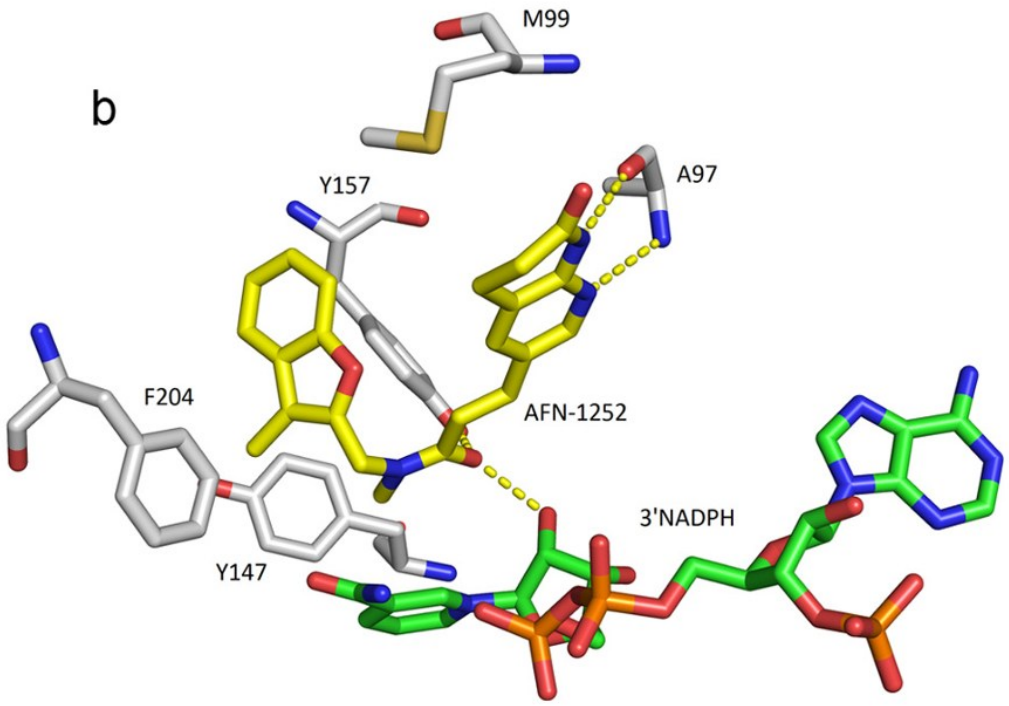


Figura 17. *Residui dell'enzima FabI che interagiscono con l'AFN-1252 e il 3'-NADPH. L'ossidrile dell'anello ribosidico del 3'-NADPH, Ala97 (A97) e Tyr157 (Y157) formano legami a idrogeno con l'inibitore, mentre, Tyr147 (Y147) e Phe204 (F204) delimitano una tasca idrofobica* [37]

Tali contatti riprendono puntualmente le interazioni già descritte lungo l'intera serie evolutiva che ha condotto all'AFN-1252. Nel cocristallo del derivato benzammidico con il FabI di Escherichia coli, l'ossigeno carbonilico dell'ammide forma due legami a idrogeno con la Tyr156 e il cofattore, mentre il gruppo indolico occupa la tasca lipofila delimitata da Tyr146, Tyr156 e Phe203. L'amminopiridina che ne derivò si lega con le medesime interazioni per le porzioni ammidica e indolica, mentre il nuovo anello forma due legami a idrogeno con l'Ala95, e il naftiridinone le conserva tutte [21].

La corrispondenza con quanto descritto per l'afabicina desfosfono in *S. aureus* è diretta, poiché la Tyr157 del FabI stafilococcico equivale alla Tyr156 di *E. coli* e l'Ala97 all'Ala95. L'apertura dell'anello benzodiazepinico, la sostituzione dell'anilina con l'amminopiridina, la ciclizzazione a lattame e il passaggio dall'indolo al benzofurano hanno dunque lasciato invariata la triade di ancoraggio. Studi di modellistica molecolare indicano infine che l'inibitore compromette la formazione dell'intermedio I del ciclo catalitico di FabI, lo stesso intermedio che risultava mimato già dall'ammina primaria del derivato benzammidico e dal carbonile dei composti successivi[21].

3.4.3 Inibizione di FabI e selettività

La caratterizzazione biochimica dell'afabicina desfosfono è stata condotta sulla riduzione del crotonil-ACP catalizzata da FabI di *Staphylococcus aureus*. La concentrazione necessaria a inibire il 50% dell'attività enzimatica è risultata pari a 14 nM, mentre la costante di inibizione, determinata variando contemporaneamente le concentrazioni dell'inibitore e del substrato, è risultata pari a 12,8 ± 0,5 nM. Nessuna inibizione dell'enzima umano FAS1 è stata invece osservata fino a concentrazioni di 67 μM, con un rapporto di selettività per l'enzima batterico superiore a 4800. La dimostrazione dell'inibizione di un enzima isolato non è però sufficiente a stabilire che la stessa via metabolica sia colpita all'interno della cellula batterica. Per verificarlo si è ricorsi ai saggi di sintesi macromolecolare, nei quali si misura l'incorporazione di precursori radiomarcati nelle diverse classi di macromolecole e si osserva quale di esse risenta del trattamento. Nelle cellule esposte al farmaco, l'incorporazione dell'acetato nei lipidi scende al 24% del controllo, mentre quella di N-acetilglucosammina, timidina, uridina e isoleucina, che misurano rispettivamente la sintesi della parete cellulare, del DNA, dell'RNA e delle proteine, si mantiene al 90, 101, 106 e 61% dei valori di controllo. È dunque la via degli acidi grassi a risultare selettivamente colpita dall'esposizione al farmaco; lo stesso effetto sull'incorporazione dell'acetato si osserva con il triclosan, anch'esso inibitore di FabI[37].

3.4.4 Conferma genetica del bersaglio e sviluppo di resistenza

Il sequenziamento del gene *fabI* in dodici ceppi spontaneamente resistenti di *S. aureus*, derivati da tre ceppi parentali diversi, ha mostrato in tutti i casi sostituzioni amminoacidiche singole. Sette di questi mutanti, rappresentativi di tutti e tre i parentali, portavano la sostituzione M99T che interessa un'ansa flessibile adiacente al sito attivo, la quale raddoppia la MIC dell'afabicina desfosfono senza avere invece alcun effetto sull'attività del triclosan, che pure si lega a FabI sovrapponendosi al lato 3-metilbenzofuranico della molecola. La seconda sostituzione, Y147H, da tirosina a istidina in posizione 147, è stata individuata nei mutanti resistenti di entrambi i ceppi parentali di *S. aureus*. Localizzata nel sito attivo dell'enzima, è la sostituzione che incide maggiormente sulla potenza del farmaco: nei ceppi che la portano le MIC dell'afabicina desfosfono risultano aumentate di otto-sedici volte e quelle del triclosan di sessantaquattro-centoventotto volte [37].

Le stesse due sostituzioni sono state individuate in una serie sperimentale indipendente, mediante selezione di *S. aureus* RN4220 su un terreno contenente 40 ng/mL di farmaco: quarantanove cloni resistenti portavano la mutazione missenso T296C, corrispondente a M99T, con MIC di 250 ng/mL e tempo di duplicazione di 27-30 minuti, mentre un solo isolato portava la mutazione T439C, corrispondente a Y147H, con MIC di 500 ng/mL e tempo di duplicazione di 120 minuti in assenza di acidi grassi esogeni. I doppi mutanti M99T/Y147H crescevano in modo limitato anche in terreni addizionati di basse concentrazioni di farmaco, indicando che la resistenza deriva dall'acquisizione di mutazioni puntiformi in *fabI* capaci di alterare il legame del farmaco [37].

Nel complesso, la comparsa di resistenza è un evento poco frequente. In seguito all'esposizione di un ceppo MRSA a concentrazioni subinibitorie di Debio-1452, la MIC è aumentata di quattro volte nei primi dieci giorni e non è più cresciuta per tutta la durata dell'esperimento, mentre nelle stesse condizioni la MIC della ciprofloxacina è aumentata di sedici-sessantaquattro volte [10].

3.4.5 Effetto sulla vitalità batterica

Resta da chiedersi che cosa comporti, per il batterio, il blocco di FabI. La risposta è emersa dagli studi sulla cinetica di uccisione, condotti in parallelo su un ceppo meticillino-sensibile e su uno meticillino-resistente. In entrambi i casi, la vitalità si riduce in funzione del tempo, e non della concentrazione: entità e velocità dell'uccisione sono risultate infatti sovrapponibili a concentrazioni pari a quattro e centoventotto volte la MIC, con riduzioni di 2,0 e 2,9 logaritmi decimali delle unità formanti colonia a ventiquattro ore, rispettivamente per il ceppo sensibile (MSSA) e per quello resistente (MRSA). La velocità di riduzione della vitalità è analoga a quella osservata con linezolid, mentre la vancomicina uccide più rapidamente e in misura maggiore [37].

Gli acidi grassi partecipano alla formazione di numerose componenti biosintetiche e strutturali essenziali della cellula batterica, ed è possibile che l'effetto dell'inibizione di FabI sulla vitalità si manifesti soltanto dopo l'esaurimento delle riserve cellulari. L'ipotesi è sostenuta da due osservazioni: in un modello farmacodinamico *in vitro* la riduzione raggiunge i tre logaritmi fra le 26 e le 28 ore, e nel modello murino della tasca granulomatosa si raggiunge una riduzione di quattro logaritmi somministrando 100 mg/kg una volta al giorno per tre giorni [37].

3.4.6 Dimostrazione del meccanismo nell'animale infetto

Un esperimento condotto con array Affymetrix ha dimostrato che la produzione dei fattori di virulenza di *S. aureus*, controllata dal sistema *sae*, viene regolata negativamente quando la via di sintesi degli acidi grassi è inibita, indipendentemente dal fatto che l'inibizione derivi da una mutazione o dipenda da un antibiotico diretto contro FASII: entro quindici minuti dal trattamento con Debio-1452 i trascritti associati alla virulenza risultavano repressi di oltre tre volte, e nello stesso intervallo si osservava un aumento dell'espressione dell'mRNA di *fabH*. Il dato è stato ritrovato in un modello murino di granuloma infettato con *S. aureus*, impiegato per valutare la penetrazione e l'efficacia degli antibiotici negli ascessi sottocutanei. Dopo una singola dose orale di 100 mg/kg è stata osservata una riduzione di 3,0 logaritmi decimali delle cfu/mL medie nel fluido della tasca granulomatosa, e il farmaco, somministrato per via orale, ha mostrato una penetrazione efficace nel fluido infetto, dove restava rilevabile anche dopo 24 ore. In quello stesso fluido si è registrato un aumento consistente e persistente dei livelli di mRNA di *fabH*, pari a tre volte e mezza, mantenuto per tutte le 12 ore successive alla somministrazione, a indicare la presenza del farmaco a concentrazioni tali da inibire il ciclo FASII [10].

3.5 Spettro ristretto e microbiota

Il profarmaco non possiede attività antimicrobica, è la frazione attiva, l'afabicina desfosfono a mostrare una potente attività sugli stafilococchi: compresi i ceppi coagulasi-positivi e coagulasi-negativi resistenti ad altre classi di antibiotici, mostrando al contempo un'efficacia molto limitata sulle specie non stafilococciche. Su questo duplice comportamento si fonda il profilo dell'Afabicina, la quale soddisfa ciascuno dei quattro criteri di innovazione stabiliti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, ossia classe chimica inedita, bersaglio inedito, assenza di resistenza crociata e meccanismo d'azione inedito, e la sua attività specie-specifica lascia prevedere effetti antimicrobici indesiderati limitati al di fuori del bersaglio [40].

La verifica è iniziata *in vitro*, estendendo l'analisi a un pannello di 39 isolati rappresentativi del microbiota umano, (tra cui bifidobatteri, lattobacilli, clostridi, batteroidi, prevotelle, fusobatteri e altri anaerobi). L'afabicina desfosfono non è risultata inibitoria su nessuno di essi, con valori di MIC superiori a 8 mg/L per ciascuno. Il confronto con la clindamicina, impiegata come antibiotico di controllo, evidenzia la differenza tra i due profili di attività: essa si è dimostrata attiva sulla maggior parte degli isolati, con una concentrazione inibente

il 50% dei ceppi pari a 0,5 mg/L, e soltanto sei isolati (~15%)presentavano una MIC uguale o superiore a 16 mg/L.[40]

Nel topo sono stati condotti studi sull'effetto della composizione del microbiota, mediante sequenziamento del DNA ribosomiale 16S, su campioni fecali raccolti prima, durante e dopo il trattamento. Per descrivere lo stato della comunità sono stati utilizzati due indici: **l'indice di Shannon** (diversa alfa) e **l'indice di Chao1** (richezza nella popolazione).[40]

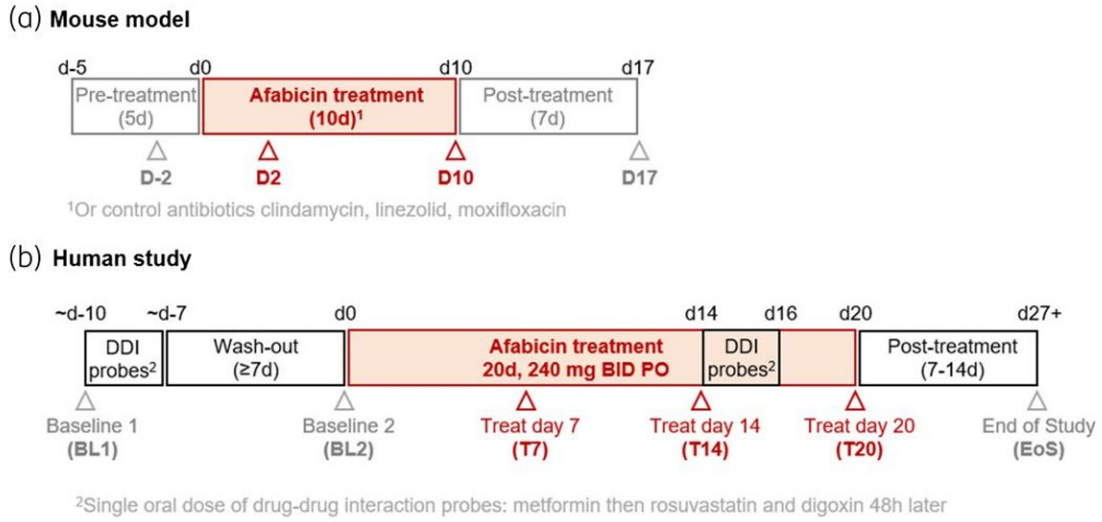


Figura 18. ***Rappresentazione schematica del disegno sperimentale.(a) Modello murino:*** *gli animali hanno ricevuto per via orale afabicina (65 mg/kg), clindamicina (100 mg/kg), linezolid (100 mg/kg) o moxifloxacina (65 mg/kg) due volte al giorno per 10 giorni consecutivi.****(b) Studio nell'uomo:*** *nell'ambito di uno studio sulle interazioni farmacologiche (DDI), volontari sani sono stati trattati per via orale con afabicina 240 mg due volte al giorno per 20 giorni. Per entrambi gli schemi* ***(a)*** *e* ***(b)****, il campionamento fecale per il sequenziamento del DNA ribosomiale 16S è stato eseguito in corrispondenza dei punti temporali indicati dai triangoli.*[40].

Nel gruppo trattato con afabicina, l'analisi delle coordinate principaliha mostrato una netta sovrapposizione tra i campioni post-trattamento e i controlli basali. Non sono state osservate differenze significative né nell'indice di Shannon né in quello di Chao1 durante o dopo il trattamento rispetto al basale, indicando un impatto limitato sulla composizione complessiva del microbiota intestinale. Le sola oscillazione rilevate all'interno del gruppo sono state una riduzione delle *Erysipelotrichaceae*, dal 2,2% al basale allo 0,75% al giorno 2 e allo 0,85% al giorno 10, e un aumento delle *Peptococcaceae_1* al giorno 10, dallo 0,57% all'1,09%; entrambe le variazioni erano rientrate nei valori basali al giorno 17. Dal giorno iniziale e il giorno 17 risultava significativo soltanto un aumento del phylum dei *Firmicutes*, dal 44,3% al 61,9%, e in particolare della famiglia delle *Lachnospiraceae*, dal 10,5% al 32,1% questi valori, tuttavia, non differivano statisticamente da quelli del gruppo di controllo alla

medesima data: i *Firmicutes* erano al 61,23% nei controlli e al 61,93% nei trattati, le *Lachnospiracea*e al 29,55% e al 32,06%[40].

Il confronto con i tre antibiotici impiegati come comparatori mostra un quadro opposto. I campioni degli animali trattati con clindamicina, linezolid e moxifloxacina non si raggruppavano né con i rispettivi basali né con i controlli; clindamicina e linezolid si raggruppavano fra loro, separatamente dalla moxifloxacina, ed entrambi i trattamenti si sono accompagnati a riduzioni statisticamente significative dell'indice di Shannon durante e dopo il trattamento e a una riduzione dell'indice di Chao1 in almeno un punto temporale, evidenziando un severo impoverimento della flora intestinale. Tutti e tre hanno prodotto variazioni significative l'abbondanza relativa di quasi tutti i phyla analizzati, determinando una disbiosi profonda. Il mutamento più rilevante nei gruppi trattati con clindamicina e linezolid è stato l'aumento delle *Enterobacteriaceae*, che dallo 0,23% e dallo 0,08% al basale sono aumentate rispettivamente fino all'84,94% al giorno 2 e al 97,56% al giorno 10, arrivando così a costituire quasi l'intera comunità [40].

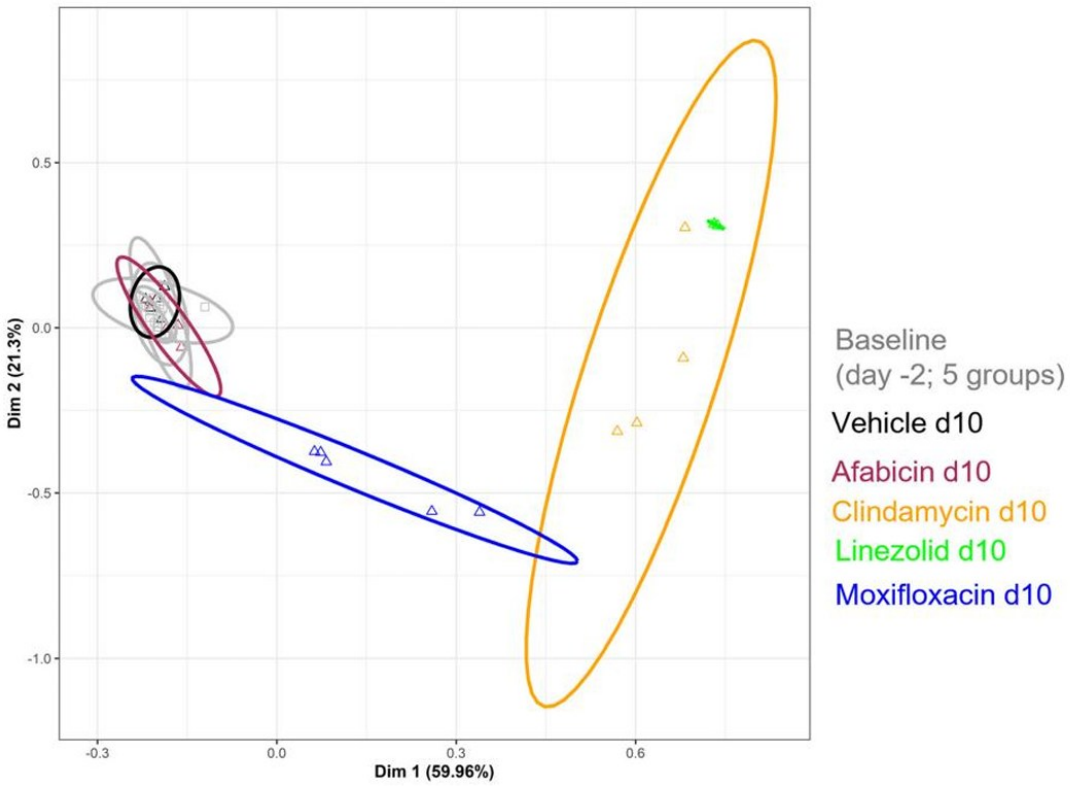


Figura 19. *Analisi delle coordinate principali (distanza di Bray-Curtis) dei dati di sequenziamento del DNA ribosomiale 16S nel microbiota intestinale murino, al basale (giorno −2, quadrati) e dopo dieci giorni di trattamento (triangoli). I campioni trattati con afabicina si sovrappongono ai basali e ai controlli veicolo; quelli trattati con clindamicina, linezolid e moxifloxacina se ne discostano.*[40].

La valutazione nell'uomo è avvenuta nell'ambito di uno studio di fase I di interazione farmacologica in aperto, nel quale volontari sani hanno ricevuto afabicina per via orale alla dose di 240 mg due volte al giorno per venti giorni consecutivi. Secondo i risultati del modello murino, il trattamento non ha modificato né l'indice di Shannon né quello di Chao1 rispetto ai controlli basali, e non si sono osservate variazioni statisticamente significative dell'abbondanza microbica relativa media a livello di phylum, di famiglia o di genere in alcuno dei tempi esaminati[40].

Gli autori riconoscono alcuni limiti, legati soprattutto alla capacità di rilevare effetti di piccola entità. Un campione di 4-5 animali per gruppo è capace di individuare le ampie variazioni dell'abbondanza relativa dei taxa, quali quelli prodotti dai comparatori, ma può non bastare a cogliere mutamenti più sottili eventualmente indotti dall'afabicina. L'analisi delle sequenze 16S basata su Unità Tassonomiche Operative (OTU) potrebbe non possedere la sensibilità necessaria a rilevare piccole differenze di abbondanza relativa, e studi futuri dovrebbero considerare l'impiego delle varianti di sequenza dell'amplicone (ASV), meno esposte alle distorsioni dell'allineamento, o del sequenziamento shotgun a bassa profondità. La mancata misurazione delle concentrazioni fecali di farmaco non ha inoltre permesso di correlare direttamente l'esposizione locale agli effetti osservati. La conclusione che gli autori ritengono ragionevole è dunque che l'afabicina abbia prodotto una disgregazione del microbiota significativamente minore rispetto a clindamicina, linezolid e moxifloxacina, pur non potendosi escludere alterazioni disbiotiche di piccola entità non rilevate a causa dei limiti descritti. Su questa base l'afabicina si colloca nel breve elenco degli antibiotici capaci di risparmiare il microbiota attualmente in sviluppo clinico [40].

La selettività dipende dalla distribuzione dell'enzima bersaglio fra le specie batteriche. Ai meccanismi già descritti al paragrafo §2.4 (la sostituibilità di FabI con isoforme quali FabK, FabV o FabL) se ne affiancano altri due: i batteri capaci di captare efficacemente acidi grassi esogeni, compresi quelli presenti nel siero, superano l'inibizione dell'enzima, e l'afabicina desfosfono è generalmente inattiva sui Gram-negativi. Sono questi meccanismi, nel loro insieme, a spiegare il limitato impatto dell'afabicina sul microbiota intestinale del topo e dei soggetti sani [40].

A riprova di questo profilo di efficacia mirata, i dati di una sorveglianza epidemiologica globale condotta tra il 2018 e il 2023 hanno confermato l'elevata potenza dell'afabicina

desfosfono su un ampio pannello di isolati clinici recenti. Sono 602 isolati clinici di stafilococco in Europa, Nord America, America Latina, Asia-Pacifico e Africa-Medio Oriente, provenienti da infezioni di cute e tessuti molli, delle basse vie respiratorie, del sangue e di sede intraddominale, e saggiati per microdiluizione in brodo secondo gli standard CLSI. Sui 423 isolati di *Staphylococcus aureus* l'afabicina desfosfono è risultata l'agente più attivo fra quelli esaminati, con una MIC_{50} di 0,004 mg/L, una MIC_{90} di 0,008 mg/L e un intervallo compreso fra 0,002 e 0,12 mg/L; parallelamente, nella stessa raccolta la vancomicina e la daptomicina presentavano una MIC_{90} di 1 mg/L e il linezolid di 2 mg/L. Il 49,2% degli isolati era meticillino-resistente, e i sottogruppi resistenti alla meticillina, alla clindamicina e alla levofloxacina hanno mantenuto la medesima MIC_{90} di 0,008 mg/L osservata sull'insieme dei ceppi. Risultati del tutto analoghi sono stati ottenuti sui 179 stafilococchi coagulasi-negativi, dove il farmaco ha confermato la sua superiore potenza (MIC_{50} 0,015 mg/L, MIC_{90}di 0,06 mg/L) con valori sovrapponibili nelle diverse regioni geografiche e del tutto indipendenti dai fenotipi di resistenza alle terapie convenzionali [42].

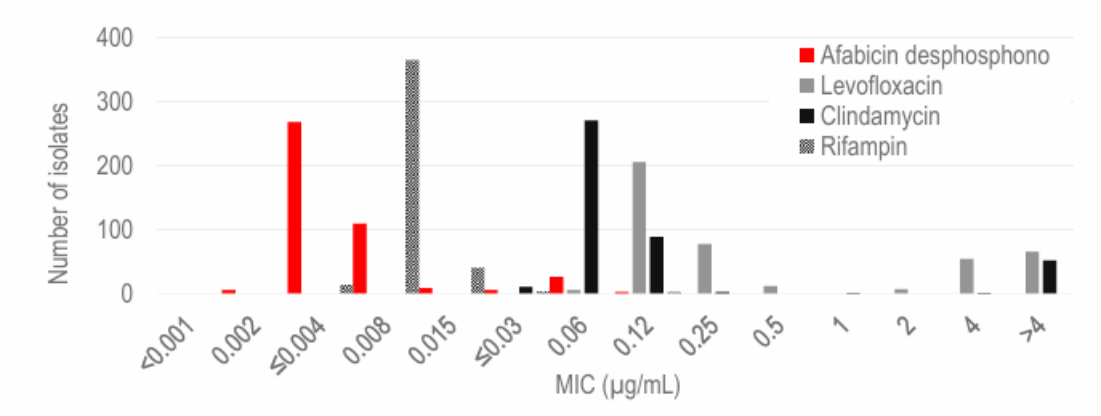


Figura 20. *Distribuzione delle MIC di afabicina desfosfono e dei comparatori su 423 isolati clinici di Staphylococcus aureus raccolti fra il 2018 e il 2023*[42].

3.6 Farmacocinetica

Gli studi preliminari sull'assorbimento orale condotti nel ratto modello di perfusione intestinale a passaggio singolo, indicano che il composto viene assorbito lungo tutto l'intestino con una preferenza per i tratti superiori e medi rispetto al crasso (ileo ≥ digiuno > colon), in aggiunta si è mostrato un potenziale di permeazione sostanzialmente analogo a quello dell'antipirina, superiore a quello dell'atenololo [10]. Lo studio di permeabilità bidirezionale su cellule Caco-2, ha confermato che la penetrazione attraverso la mucosa

intestinale avviene tramite semplice diffusione passiva, non mediata dal trasportatore PepT1 [10]

Il metabolita attivo presenta un elevato legame con le proteine sieriche umane, indipendente dalla concentrazione, con una quota compresa fra il 92,5% e il 98,4% e a questo elevato legame si associano una lunga emivita di eliminazione, bassi livelli di farmaco libero e quindi la possibilità di somministrazioni meno frequenti[10]

Negli studi a dose singola crescente condotti su soggetti sani, l'esposizione è cresciuta in modo lineare all'aumentare della dose. A seguito di somministrazione endovenosa di dosi comprese tra 48 e 320 mg, la concentrazione plasmatica massima del profarmaco è salita da 897 a 5822 ng/mL e quella del metabolita attivo da 837 a 3740 ng/mL, con aree sotto la curva per quest'ultimo compresa da 8.704 a 45,414 h·ng/mL. L'emivita del profarmaco risulta breve, compresa fra 0,64 e 1,18 ore, quella del metabolita attivo è rimasta fra 7e 8 ore, indipendentemente dal dosaggio[10].

Il Debio-1452 presenta un'escrezione urinaria trascurabile, meno del 0,03% della dose eliminata immodificata nelle urine, con una clearance renale compresa tra 1,6 e 2,6 mL/h che risulta di gran lunga inferiore alla clearance plasmatica (5-9 L/h). Lo studio di bilancio di massa con afabicina marcata con carbonio-14 ha identificato nel plasma due metaboliti principali, entrambi privi di attività antimicrobica e ha chiarito il destino metabolico della molecola, permettendo il recupero di quasi la totalità della radioattività somministrata (tra l'87,4% e il 94,8%), distribuita prevalentemente nelle urine (51–68%) e nelle feci (27–37%). Lo stesso studio ha mostrato la sovrapponibilità del profilo ADME fra somministrazione orale ed endovenosa, un dato che sostiene la possibilità di passare da una via di all'altra durante il trattamento [10].

Gli studi di fase I a dose singola crescente hanno valutato dosi endovenose comprese fra 48 e 320 mg e, in un secondo studio (NCT02162199), dosi orali di 80, 160, 320, 480, 640 e 800 mg. Il farmaco è risultato ben tollerato a tutte le concentrazioni, con eventi avversi di lieve entità, principalmente cefalea, senza alterazioni dei parametri ematologici, biochimici, elettrocardiografici o delle analisi delle urine. I livelli terapeutici sono attesi a circa 240 mg di afabicina, corrispondenti a circa 180 mg di afabicina desfosfono [10].

La distribuzione nei tessuti osteoarticolari è stata misurata in uno studio (NCT02726438) condotto in diciassette pazienti sottoposti a protesi d'anca elettiva, quindici dei quali trattati con tre somministrazioni orali di 240 mg di afabicina a circa dodici ore di distanza, con

l'ultima dose somministrata due, quattro, sei o dodici ore prima dell'intervento. Le concentrazioni del metabolita attivo sono state determinate mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa tandem nel plasma e nei campioni di osso corticale, osso spongioso, midollo osseo, tessuto molle e liquido sinoviale prelevati durante l'intervento [41].

Nel plasma, la concentrazione massima è stata raggiunta a circa due ore dalla somministrazione, con un valore medio di 2.360 ng/mL, per poi diminuire in modo monoesponenziale con un'emivita media di 11,8 ore. A 12 ore dalla dose, la concentrazione, pari a 1.120 ng/mL, era sovrapponibile a quella pre-dose di 1.200 ng/mL, indicando che lo stato stazionario era stato raggiunto già alla terza somministrazione; l'area sotto la curva nell'intervallo di 12 ore era di 20.400 ng·h/mL, in linea con l'intervallo osservato negli studi precedenti su volontari sani [41].

Nei tessuti, le concentrazioni misurate al momento della resezione hanno raggiunto il valore massimo al prelievo effettuato dopo sei ore in ciascun distretto, ed erano ancora misurabili a dodici ore. Fra le due e le dodici ore, i valori medi sono andati da 196 a 441 ng/g nell'osso corticale, da 496 a 841 ng/g nell'osso spongioso, da 436 a 695 ng/g nel midollo osseo, da 430 a 759 ng/g nel tessuto molle e da 614 a 1.280 ng/mL nel liquido sinoviale. L'esposizione nel midollo osseo, nell'osso spongioso e nel tessuto molle è risultata simile, con aree sotto la curva fra 6.790 -8.040 ng·h/g, mentre quella dell'osso corticale è stata la più bassa fra i tessuti ossei, con 4.240 ng·h/g, e quella del liquido sinoviale tra quelli esaminati, con 12.300 ng·h/mL[41].

I rapporti di penetrazione, calcolati come rapporto fra l'area sotto la curva tissutale e quella plasmatica totale, sono risultati di 0,21 per l'osso corticale, 0,40 per l'osso spongioso, 0,35 per il midollo osseo, 0,34 per il tessuto molle e 0,61 per il liquido sinoviale, e sono rimasti costanti fra le due e le dodici ore dalla dose. La penetrazione più elevata è stata quella nel liquido sinoviale, con rapporti individuali compresi fra 0,39 e 0,77; il midollo osseo, il tessuto molle e l'osso spongioso hanno mostrato un comportamento simile, con valori individuali fra 0,21 e 0,60; la penetrazione più bassa è stata osservata nell'osso corticale, con rapporti individuali fra 0,13 e 0,36 [41].

Parameter	Value(s) for: Plasma (n = 14)	Sparse sampling (from n = 2–4 at each time of resection) Plasma	Cortical bone	Cancellous bone	Bone marrow	Soft tissue	Synovial fluid
AUC_τ (ng·h/ml for fluids or ng·h/g for tissues)	20,400 (30.6)	20,100	4,240	8,040	7,060	6,790	12,300
C_{12} (ng/ml for fluids or ng/mg for tissues)	1,120 (43.4)	1,500	373	648	640	526	1,210
C_{max} (ng/ml for fluids or ng/mg for tissues)	2,360 (28.0)	2,150	441	841	695	759	1,280
C_{trough}[a] (ng/ml for fluids or ng/mg for tissues)	1,200 (36.7)	—	—	—	—	—	—
$t_{1/2}$[b] (h)	11.8 (70.1)	—	—	—	—	—	—
t_{max} (median [range]) (h)	2 (0.5–2)	6	6	6	6	6	6
Penetration ratio							
AUC for tissue/AUC for plasma	—	1	0.21	0.40	0.35	0.34	0.61
C_{max} for tissue/C_{max} for plasma	—	1	0.21	0.39	0.32	0.35	0.60
AUC for free tissue/AUC for free plasma[c]	—	1	—	—	—	—	2.88

[a]C_{trough} was not obtained for bone resection-associated sparse sampling, as surgery occurred after the 3rd afabicin dose.
[b]$t_{1/2}$ was not calculated for data obtained from sparse samples, as an elimination phase could not be characterized from the mean profile.
[c]The free fraction of afabicin desphosphono was 2% in plasma and 9.4% in synovial fluid.
[d]Afabicin was administered at 240 mg q12h. Results are geometric means (geometric CV [in percent]) unless otherwise indicated. AUC_τ, area under the curve at steady state; C_{12}, concentration 12 h after the last dose; C_{max}, maximum observed plasma concentration; C_{trough}, measured concentration at the end of the dosing interval at steady state, just prior to the last dose; $t_{1/2}$, terminal elimination half-life; t_{max}, time of maximum observed plasma concentration; n, number of observations; —, no reportable data.

Tabella 4. *La tabella fornisce l'evidenza quantitativa di come il metabolita attivo (afabicina desfosfono) si distribuisca nei vari distretti osteoarticolari rispetto ai livelli plasmatici, mostrando che la penetrazione nei tessuti target (specie liquido sinoviale e osso spongioso) si mantiene consistente per l'intero intervallo di somministrazione delle 12 ore*[41].

Questi rapporti confrontano concentrazioni tissutali totali con concentrazioni plasmatiche totali, mentre solo il farmaco libero penetra nei tessuti: le concentrazioni tissutali totali rappresentano quindi più propriamente la concentrazione bioattiva nel tessuto, e vanno confrontate con le concentrazioni libere nel plasma. La frazione libera dell'afabicina desfosfono è risultata del 2% nel plasma umano, corrispondente a un legame proteico stimato del 98% per ultrafiltrazione e dialisi all'equilibrio, e, in media, del 9,4% nel liquido sinoviale, con valori individuali compresi fra il 2,4% e il 34%. Dal rapporto fra l'area sotto la curva del farmaco libero nel liquido sinoviale e quella del farmaco libero nel plasma si ottiene un valore medio di 2,88, con intervallo da 0,75 a 10,4 [41].

Il confronto con le concentrazioni totali degli altri antibiotici, sulla base di studi con disegno analogo condotti in pazienti sottoposti a interventi di protesizzazione elettiva, evidenzia per questi ultimi una penetrazione inferiore. per la vancomicina, i rapporti osso corticale/siero e osso spongioso/siero sono risultati di 0,07 e 0,13 in pazienti sottoposti ad artroprotesi d'anca, mentre in un secondo studio su protesi di ginocchio il rapporto liquido sinoviale/siero è stato di 0,35; per l'ertapenem, i valori sono stati di 0,13, 0,19 e 0,41, rispettivamente per osso corticale, osso spongioso e liquido sinoviale; per la daptomicina, di 0,14 per l'osso e di 0,54 per il liquido sinoviale; per la dalbavancina il rapporto fra le aree sotto la curva osso/plasma è stato di 0,13. Soltanto il linezolid ha mostrato valori comparabili, con 0,40 per l'osso e 0,92 per il liquido sinoviale [41].

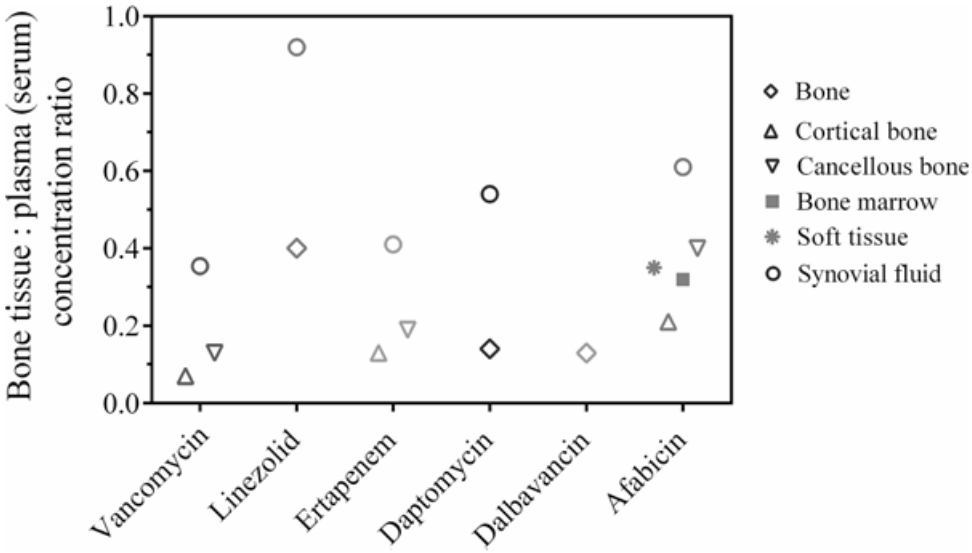


Figura 21. *Rapporti di concentrazione tessuto osteoarticolare/plasma (o siero) per vancomicina, linezolid, ertapenem, daptomicina, dalbavancina e afabicina desfosfono, ottenuti da studi con disegno analogo in pazienti sottoposti a chirurgia protesica elettiva.*[41].

Il parametro farmacocinetico-farmacodinamico che con maggiore probabilità predice l'efficacia dell'afabicina desfosfono, sulla base dei modelli murini di infezione della coscia, è il rapporto fra l'area sotto la curva del farmaco libero e la MIC. In questo studio, le concentrazioni libere nel liquido sinoviale, comprese fra 0,047 e 0,149 µg/mL, si sono mantenute al di sopra della MIC_{90} di *S. aureus*, pari a 0,015 µg/mL, per l'intero intervallo fra le dosi [41].

Lo studio presenta alcuni limiti. In primo luogo, la numerosità dei pazienti valutati per ciascun intervallo di prelievo era contenuta e le misurazioni sono state condotte su tessuti sani non infetti, mentre nell'osso infetto e nell'osso midollare potrebbero risultare più elevate, come è stato mostrato nei modelli animali, nei quali la penetrazione dell'afabicina desfosfono migliorava nettamente in presenza di infezione. Altri limiti riguardano il trattamento dei campioni, poiché i tessuti sono stati omogeneizzati, le concentrazioni rappresentano un insieme di contributi dei compartimenti intracellulare ed extracellulare, e non si può escludere una contaminazione ematica [41].

3.7 Sviluppo clinico: gli studi di fase II nelle ABSSSI e nelle infezioni osteoarticolari

3.7.1 Fase II nelle ABSSSI

Il primo studio in pazienti sul principio attivo è stato uno studio di fase II (NCT01519492), non controllato e aperto, progettato come prova di concetto per valutare sicurezza, tollerabilità ed efficacia di 200 mg di afabicina desfosfono somministrati per via orale due volte al giorno nelle infezioni batteriche acute della cute e dei tessuti molli dovute a stafilococchi. I pazienti con diagnosi clinicamente documentata di ascesso, infezione di ferita o cellulite sono stati selezionati sulla base della colorazione di Gram del materiale lesionale[36].

Nello studio, la popolazione intention-to-treat comprendeva 103 pazienti con comorbilità rilevanti, e al terzo giorno, c'è stata una risposta precoce nella popolazione microbiologicamente valutabile pari del 97,3%, (ferita 100%; ascesso 96,6%; cellulite 94,4%). Al medesimo controllo, l'82,9% dei pazienti presentava una riduzione dell'area eritematosa pari o superiore al 20% e il 77,9% una riduzione analoga dell'area di indurimento. S*taphylococcus aureus* è stato isolato nel 97,7% dei pazienti, con 37 pazienti con MRSA e 39 MSSA e nessun isolato ha mostrato un aumento della MIC di AFN-1252 dopo il trattamento. I tassi di eradicazione microbiologica di *S. aureus* sono stati del 93,2% al controllo a breve termine e del 91,9% a quello a lungo termine nella popolazione microbiologicamente valutabile. Gli eventi avversi correlati al farmaco più frequenti, prevalentemente di entità lieve o moderata, sono stati la cefalea, nel 26,2% dei pazienti, e la nausea, nel 21,4%; quattro pazienti hanno manifestato eventi avversi gravi, nessuno dei quali ritenuto correlato al farmaco [36].

Il secondo studio di fase II (NCT02426918) ha confrontato il profarmaco con il trattamento di riferimento attraverso un disegno multicentrico a gruppi paralleli, in doppio cieco e con doppio placebo. Sono stati randomizzati 330 pazienti in rapporto 1:1:1 a ricevere afabicina a basso dosaggio, ossia 80 mg per via endovenosa seguiti da 120 mg per via orale due volte al giorno; afabicina ad alto dosaggio, ossia 160 mg endovena seguiti da 240 mg per via orale due volte al giorno; oppure vancomicina endovenosa, 1 g o 15 mg/kg due volte al giorno, seguita da linezolid orale alla dose di 600 mg due volte al giorno. Il regime ad alto dosaggio corrisponde, in termini di frazione attiva, a circa 200 mg due volte al giorno di afabicina desfosfono, ossia alla dose impiegata nello studio precedente [11].

La popolazione microbiologica intention-to-treat comprendeva 284 pazienti. *S. aureus* è stato isolato in 277 pazienti, pari al 97,5%, con una frequenza di ceppi meticillino-resistenti (MRSA) del tutto sovrapponibile a quella dei ceppi meticillino-sensibili (MSSA). Stafilococchi coagulasi-negativi patogeni, per lo più *Staphylococcus epidermidis*, sono stati isolati in 11 pazienti, e una coinfezione fra una specie stafilococcica e una non stafilococcica è stata individuata nelle lesioni primarie del 21,1% dei pazienti. Negli isolati raccolti al basale, sia sensibili sia resistenti alla meticillina, l'afabicina desfosfono ha mostrato una MIC_{50} di 0,008 mg/L e una MIC_{90} non superiore a 0,015 mg/L. La durata media del trattamento endovenoso è stata di 1,1 giorni e quella del trattamento orale di 6,6 giorni [11].

Almeno l'82,2% dei pazienti aveva una storia di abuso di sostanze, una condizione associata a infezioni più avanzate a causa del ritardo nel ricorso alle cure, e una quota elevata presentava obesità ma nonostante ciò, l'84,8% dei pazienti randomizzati ha completato lo studio fino al controllo a breve termine [11].

L'endpoint primario, definito in base alle linee guida della Food and Drug Administration, era la risposta clinica precoce a 48-72 ore dalla randomizzazione. I tassi di risposta sono risultati del 94,6% nel braccio a basso dosaggio, del 90,1% in quello ad alto dosaggio e del 91,1% nel braccio vancomicina/linezolid: entrambi i regimi di afabicina hanno soddisfatto il criterio di non inferiorità, con differenze di: -3,5% per il basso dosaggio (intervallo di confidenza al 95% da −10,8% a 3,9%) e di 1,0% per l'alto dosaggio (da −7,3% a 9,2%). Fra i 23 pazienti che non avevano raggiunto l'endpoint primario, quelli appartenenti ai due bracci afabicina, presentavano in tutti i casi soltanto S. aureus come patogeno al basale. Tutti i pazienti con infezione polimicrobica che coinvolgeva un patogeno non stafilococcico e appartenenti ai bracci afabicina (19 nel gruppo a basso dosaggio e 15 in quello ad alto dosaggio) hanno risposto, ciò indica che il trattamento selettivo del patogeno stafilococcico ha condotto a un esito positivo anche in presenza di batteri non sensibili al farmaco [11].

Population and treatment	No. (%) of patients		
	Nonresponder	Responder	Total
Monomicrobial population (mITT subjects with *Staphylococcus* species only)			
Vancomycin/linezolid, BID	5 (6.7)	70 (93.3)	75 (33.5)
Afabicin, 80 mg/120 mg BID	5 (6.9)	68 (93.1)	73 (32.6)
Afabicin, 160 mg/240 mg BID	9 (11.8)	67 (88.2)	76 (33.9)
Total monomicrobial population	19 (8.5)	205 (91.5)	224 (100)
Polymicrobial population (mITT subjects with *Staphylococcus* species and other bacterial species)			
Vancomycin/linezolid, BID	4 (15.4)	22 (84.6)	26 (43.3)
Afabicin, 80 mg/120 mg BID	0 (0)	19 (100)	19 (30)
Afabicin, 160 mg/240 mg BID	0 (0)	15 (100)	15 (26.7)
Total polymicrobial population	4 (6.7)	56 (93.3)	60 (100)
Total mITT population	23 (8.1)	261 (91.9)	284 (100)

Tabella 5. *Risposta clinica precoce nelle popolazioni monomicrobiche e polimicrobiche (popolazione mITT)* [11].

Gli esiti clinici secondari sono stati valutati al termine del trattamento e al controllo a breve termine. Nella popolazione microbiologica intention-to-treat il successo a fine trattamento è stato del 92,4%, dell'87,9% e del 92,1% nei tre bracci, mentre al controllo a breve termine è sceso all'84,8% e all'83,5% nei bracci afabicina contro il 92,1% del comparatore, però questa differenza deve essere interpretata tenendo conto delle visite di controllo mancate. Nei pazienti giunti al controllo senza deviazioni rilevanti dal protocollo, i tassi di successo sono risultati sovrapponibili fra i bracci, pari al 97,0%, al 98,2% e al 100% [11].

Il profilo di tollerabilità è risultato favorevole, di fatti nella popolazione di sicurezza, costituita da 324 pazienti, 144 hanno manifestato almeno un evento avverso emergente dal trattamento, con frequenze del 40,9%, del 45,8% e del 46,7% nei tre bracci; nel 97,9% dei casi gli eventi sono stati di intensità lieve o moderata. L'evento più comune in ciascun gruppo era la cefalea, riportata nel 9,1% dei pazienti trattati con il dosaggio basso e nel 16,8% di quelli trattati con il dosaggio alto, seguita dalla nausea, nel 6,4% e nell'8,4%. Quattro pazienti hanno manifestato un evento avverso grave; soltanto uno è stato ritenuto correlato alla somministrazione endovenosa del farmaco in studio (un'esacerbazione dell'infezione cutanea di intensità moderata) e non si sono registrati decessi correlati al trattamento [11].

Variable	Value for treatment group		
	LD afabicin (80/120 mg BID) (*n* = 110)	HD afabicin (160/240 mg BID) (*n* = 107)	Vancomycin/linezolid (BID) (*n* = 107)
Patients with ≥1 TEAE, *n* (%)	45 (40.9)	49 (45.8)	50 (46.7)
Severe	1 (0.9)	2 (1.9)	0
Moderate	12 (10.9)	13 (12.1)	19 (17.8)
Mild	32 (29.1)	34 (31.8)	31 (29.0)
Patients with TEAE related to i.v. administration, *n* (%)	10 (9.1)	21 (19.6)	15 (14.0)
Severe	1 (0.9)	0	0
Moderate	2 (1.8)	5 (4.7)	1 (0.9)
Mild	7 (6.4)	16 (15.0)	14 (13.1)
Patients with TEAE related to oral administration, *n* (%)	16 (14.5)	21 (19.6)	19 (17.8)
Severe	1 (0.9)	0	0
Moderate	2 (1.8)	5 (4.7)	5 (4.7)
Mild	13 (11.8)	16 (15.0)	14 (13.1)
Patients with most commonly reported qaTEAEs (≥5% in any group), *n* (%)			
Diarrhea	3 (2.7)	3 (2.8)	6 (5.6)
Nausea	7 (6.4)	9 (8.4)	7 (6.5)
Vomiting	1 (0.9)	6 (5.6)	2 (1.9)
Abscess	3 (2.7)	6 (5.6)	0
Headache	10 (9.1)	18 (16.8)	9 (8.4)
Patients with SAEs, *n* (%)	2 (1.8)	1 (0.9)	1 (0.9)
Deaths, *n* (%)	0	1 (0.9)	0

[a]AE, adverse event; BID, twice daily; i.v., intravenous; HD, high dose; LD, low dose; *n*, total number of patients; SAE, serious adverse event; TEAE, treatment-emergent adverse event.

Tabella 6. *Quadro generale degli eventi avversi (popolazione di sicurezza)* [11].

Un ulteriore dato è coerente con il profilo microbiologico del farmaco: la diarrea emergente dal trattamento ha interessato, in entrambi i bracci afabicina, un numero di pazienti pari alla metà di quello osservato nel braccio vancomicina/linezolid [11].

Lo studio riporta la verifica clinica del passaggio dalla via endovenosa a quella orale. Dopo un minimo di due somministrazioni endovenose, circa due terzi dei pazienti sono stati ritenuti dagli sperimentatori idonei per la terapia orale. Un passaggio precoce offre la possibilità di una dimissione ospedaliera anticipata, con beneficio per il paziente e riduzione dei costi assistenziali, inoltre l'afabicina consente di passare dalla formulazione endovenosa a quella orale del medesimo antibiotico, una soluzione ritenuta meno complessa di altre strategie e non praticabile con diversi farmaci approvati per questa indicazione, daptomicina, ceftarolina, dalbavancina e oritavancina, privi di formulazione orale, e vancomicina di cui la formulazione orale non è usata per via sistemica [11].

Gli autori sottolineano tuttavia un elemento di cautela: studi *in vitro* hanno dimostrato che ambienti ricchi di acidi grassi possono favorire la comparsa di varianti di *S. aureus* resistenti all'afabicina desfosfono. I risultati dello studio indicano comunque che, nel contesto delle

infezioni acute della cute e dei tessuti molli, colpire FabI rappresenta un approccio valido [11].

3.7.2 Fase II nelle infezioni osteoarticolari

Il trattamento delle infezioni osteoarticolari rimane complesso poiché richiede cicli prolungati di antibiotici, spesso associati a un intervento chirurgico, a causa della scarsa vascolarizzazione del sito di infezione. L'efficacia di un antimicrobico in questa sede dipende perciò, oltre che dall'attività sul patogeno, dalla sua capacità di penetrare in quei compartimenti. Gli stafilococchi, *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente compreso, rappresentano i patogeni predominanti in queste infezioni[41]. Le linee guida raccomandano infatti antibiotici ad ampio spettro, in aggiunta allo sbrigliamento chirurgico dell'osso devitalizzato o alla rimozione del dispositivo protesico infetto [41]. Diversi elementi suggeriscono l'afabicina come possibile opzione terapeutica in questa indicazione: lo spettro ristretto, l'efficacia nei modelli animali di osteomielite, la disponibilità di formulazioni endovenosa e orale e la penetrazione nel tessuto osseo e nel liquido sinoviale misurata nello studio NCT02726438 (§3.6). A ciò si aggiunge la capacità dell'afabicina desfosfono di eradicare *S. aureus* intracellulare negli osteoblasti [41].

Lo sviluppo clinico per questa indicazione è stato valutato in uno studio interventistico di fase II (NCT03723551), randomizzato, multicentrico, in aperto e controllato con farmaco attivo, condotto in pazienti adulti con infezione osteoarticolare documentata (artrite settica, osteomielite o infezione di protesi articolare) sostenuta da *S. aureus*, meticillino-sensibile o resistente, e da stafilococchi coagulasi-negativi. I partecipanti sono stati randomizzati in rapporto 5:1 a ricevere afabicina oppure una terapia standard scelta dallo sperimentatore fra opzioni predefinite, per due-tre settimane nella prima coorte e per tre-sei settimane nella seconda. L'afabicina è stata somministrata alla dose di 55 mg per via endovenosa due volte al giorno per uno-quattordici giorni, seguiti da 80 mg per via orale due volte al giorno per il periodo restante[43].

Nella seconda coorte, la popolazione microbiologica intention-to-treat ha compreso 26 partecipanti, 22 nel braccio afabicina e 4 in quello di confronto. La diagnosi più frequente era l'osteomielite, nel 65% dei casi, seguita dall'infezione di protesi articolare e dall'artrite settica; il patogeno predominante è stato *S. aureus*, isolato in 21 dei partecipanti, 18 dei quali con ceppo meticillino-sensibile, mentre gli stafilococchi coagulasi-negativi sono stati isolati in 9 partecipanti, tutti nel braccio afabicina. La durata mediana del trattamento è stata di 40

giorni con afabicina e di 38 con la terapia standard, di cui rispettivamente 8 e 9 giorni per via endovenosa[43].

All'ottavo giorno di trattamento, il 100% dei partecipanti ha risposto positivamente alla terapia. Al termine del ciclo terapeutico, la risposta clinica si è mantenuta in 21 dei 22 pazienti trattati con afabicina (95,5%) e in tutti e quattro i soggetti del gruppo di controllo. A quattro e dodici settimane dal termine dello studio, i **pazienti rispondenti** nel braccio afabicina sono stati 18 su 22 (81,8%), mentre si è registrata una risposta del 100% (4/4) nel braccio della terapia standard. Va tuttavia evidenziato che la definizione di risposta adottata nello studio era particolarmente rigida, infatti le visite di controllo mancate comportavano l'automatica classificazione del paziente come **non rispondente**, e in ciascuno dei due controlli post-trattamento mancava la valutazione di un partecipante.[43]

Key Efficacy

Clinical response at:	Afabicin (N=22) n (%)	Standard of Care (N=4) n (%)
EOT*	21/22 (95.5%)	4/4 (100%)
4 weeks post-EOT*	18/22 (81.8%)	4/4 (100%)
12 weeks post-EOT* (END OF STUDY)	18/22 (81.8%)	4/4 (100%)

Isolated causative pathogens:**
- *S. aureus:* n=21 (randomized to afabicin arm, 17; randomized to SoC arm, 4)
- CoNS: n=9 (randomized to afabicin arm)

N = Number of participants in mITT population; n = Count; CoNS= coagulase-negative staphylococci; EOT= end of treatment
* A strict response definition was applied as missed visits led to classification as non-responders. Response assessment was missing for 1 participant at each time point of 4 weeks post-EOT and 12-weeks post-EOT.
**Some participants may have had more than 1 pathogen at baseline.

Figura 22. *Risposta clinica nella seconda coorte dello studio di fase II sulle infezioni osteoarticolari (popolazione microbiologica intention-to-treat)* [43].

Per quanto riguarda la sicurezza, l'incidenza di eventi avversi emergenti dal trattamento è stata simile nei due bracci, pari al 77,3% con afabicina e al 75,0% con la terapia standard, e tutti gli eventi si sono risolti spontaneamente. Un solo evento, un episodio di capogiro, è stato giudicato correlato all'afabicina. 4 dei partecipanti del braccio afabicina hanno manifestato un evento avverso grave, ma nessuno di questi eventi è stato considerato correlato al trattamento, e l'unico evento a esito fatale non è stato ritenuto attribuibile al farmaco. Nessun evento ha determinato l'interruzione del farmaco in studio, e non sono state

rilevate alterazioni di rilievo clinico dei parametri di laboratorio né anomalie elettrocardiografiche significative[43].

Gli autori concludono che il regime di 55 mg per via endovenosa e 80 mg per via orale due volte al giorno, somministrato fino a 6 settimane, è stato ben tollerato, che l'efficacia si è mantenuta fino a dodici settimane dal termine del trattamento con risultati simili a quelli della terapia standard, e che l'afabicina offre la possibilità di passare dalla via endovenosa a quella orale con il medesimo farmaco [43].

3.8 Estensione dello spettro ai Gram-negativi: le *entry rules*

Le infezioni da batteri Gram-negativi rappresentano un emergenza sanitaria e la scarsità di nuove classi di farmaci diretti contro questi patogeni è stata ricondotta all'incapacità della maggior parte dei capostipiti di accumularsi all'interno della cellula batterica [44]. Esperimenti condotti su ceppi mutanti con difetti di permeabilità hanno individuato numerosi bersagli biologici aggredibili nei Gram-negativi, ma la robusta membrana esterna e le pompe di efflusso aspecifiche di questi microrganismi impediscono a molti candidati di raggiungerli. Fra tali bersagli vi è FabI, che catalizza lo stadio limitante della biosintesi batterica degli acidi grassi e i cui inibitori sono giunti alla sperimentazione clinica per il trattamento delle infezioni da *Staphylococcus aureus*, ma non di quelle da Gram-negativi [44,45].

Le proprietà chimico-fisiche che favoriscono l'accumulo intracellulare sono note in letteratura come *entry rules*. La presenza di un azoto ionizzabile, una bassa tridimensionalità e un numero ridotto di legami ruotabili conferiscono a un composto una probabilità significativamente maggiore di accumularsi in *Escherichia coli*. Per consentire un applicazione veloce, è stato sviluppato uno strumento chemioinformatico ad accesso libero, denominato eNTRyway, che, analizza la struttura di una molecola e fornisce una classificazione binaria del suo accumulo nel batterio [44].

Testando lo strumento a un insieme di quasi 70 composti, fra antibiotici approvati dalla Food and Drug Administration e attivi soltanto sui Gram-positivi, farmaci in sviluppo clinico e capostipiti preclinici ha mostrato l'esistenza di numerosi candidati alla conversione in ogni stadio dello sviluppo. In questo modo, il Debio-1452 è emerso come candidato di particolare interesse per la trasformazione in una versione attiva sui Gram-negativi, dovuta da un valore di globularità pari a 0,093 e quattro legami ruotabili, esso soddisfa due delle tre regole, essendo privo soltanto dell'ammina primaria. Fino a quel momento, nonostante ne fossero

già stati preparati oltre 100 derivati, nessuno di essi risultava dotato di attività consistente sui patogeni Gram-negativi del gruppo ESKAPE [44].

Siccome la molecola possedeva già caratteristiche favorevoli in termini di globularità e flessibilità, la conversione in un analogo capace di accumularsi in *E. coli* e dotato di attività sui Gram-negativi richiedeva l'introduzione mirata di un'ammina primaria. L'esame della struttura co-cristallina del Debio-1452 legato a FabI di *S. aureus* ha indicato nella posizione 3 dell'anello naftiridinonico, adiacente al carbonile lattamico, nonché la regione della molecola maggiormente esposta al solvente. Infatti dati di attività antibatterica segnalavano quella posizione come tollerante alla sostituzione. Lo strumento predittivo ha indicato che le molecole contenenti un'ammina in quella posizione si sarebbero accumulate nel batterio, e il docking computazionale, condotto anche sul Debio-1452-NH_3, ha mostrato che la modifica non avrebbe compromesso il legame con il target [44].

Mentre il Debio-1452 non mostrava alcun accumulo statisticamente significativo rispetto ai controlli, i derivati dotati di azoto ionizzabile si accumulavano in *E.coli*. Il composto capofila**, Debio-1452-NH_3,** mostra attività antibatterica sui ceppi di *E.coli* a membrana esterna integra, con una MIC di 4 μg/mL, mentre il Debio-1452 risulta privo di attività su tali ceppi, con MIC superiori a 32 μg/ml; la sua efficacia si estesa su *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*, con MIC comprese fra 4 e 8 μg/mL. In opposto, sia il Debio-1452 e un derivato contenente un azoto non ionizzabile in posizione 3, mostrano invece un profilo differente: sono molto potenti su *S.aureus* e sui ceppi di *E. coli* privi di efflusso o con membrana esterna modificata, ma del tutto inattivi sui Gram-negativi a membrana integra. Come previsto, neppure gli analoghi amminici sono risultati attivi su *Pseudomonas aeruginosa*, pur raggiungendo livelli di accumulo statisticamente significativi, poiché tale microrganismo possiede un'isoforma aggiuntiva di FabI, FabV, che consente il recupero della via FAS-II dall'inibizione dell'enzima. Negli isolati clinici, le *Enterobatteriacee* multiresistenti si sono dimostrate nettamente più sensibili al derivato amminico che al composto di partenza [44].

Il meccanismo d'azione è stato confermato mediante la selezione, di colonie di *E.coli* resistenti al composto, con il metodo del grande inoculo. La frequenza di resistenza è risultata dell'ordine di 10^{-8}-10^{-9}, sovrapponibile a quella osservata per il Debio-1452 in *S.aureus*, e il sequenziamento di *FabI* nei cloni resistenti ha identificato sostituzioni amminoacidiche in prossimità del sito attivo, alle posizioni 116 e 148. I ceppi portatori della

sostituzione A116V presentavano MIC di 64 μg/mL con scarso impatto sulla velocità di crescita, mentre quelli con la sostituzione G148S, pur raggiungendo MIC superiori a 64 μg/mL, presentavano una *fitness* significativamente ridotta. Il triclosan ha mostrato una resistenza crociata minima nei confronti dei mutanti G148S e nessuna nei confronti di quelli A116V [44].

In vivo, il derivato a dimostrato un'alta tollerabilità, ed è risultato capace di ridurre la carica batterica nel topo e di salvare gli animali da infezioni letali sostenute da isolati clinici di *A.baumannii*, *K.pneumoniae* ed *E.coli*. In questi modelli sono state valutate sia la sopravvivenza complessiva sia la carica batterica, impiegando ceppi verso i quali il composto presenta MIC di 4-8 μg/mL. Nel modello di sepsi indotta con un isolato clinico di *A. baumannii* resistente ai carbapenemi e alle cefalosporine, quattro somministrazioni endovenose da 50 mg/kg, una al giorno hanno determinato un aumento significativo della sopravvivenza rispetto al composto progenitore. L'efficacia del composto è stata inoltre confermata in un modello di polmonite acuta, dove si è registrato un netto abbattimento della carica batterica [44].

Uno studio successivo si è basato sulla sintesi di una serie di inibitori di FabI le cui strutture rispettavano le regole di permeazione per i Gram-negativi, utilizzando come criterio di selezione l'attività su un pannello particolarmente impegnativo di isolati clinici. Il composto emerso da questa selezione, la **fabimicina**, possiede attività su oltre duecento isolati clinici di *E.coli*, *K.pneumoniae* e *A.baumannii* e non uccide i batteri commensali. La fabimicina ha dimostrato di essere attiva in più modelli murini di infezione da Gram-negativi, compreso un impegnativo modello di infezione delle vie urinarie [45].

Le strutture cristallografiche del complesso con FabI hanno chiarito le basi molecolari di tale azione inibitoria, in particolare, l'analisi strutturale del co-cristallo fabimicina–*Ec*FabI ha messo in luce una rete di interazioni chiave del tutto analoga a quella osservata nel complesso afabicina desfosfono–*Sa*FabI. Entrambi gli azoti del sistema piridoazepinaminico formano infatti legami a idrogeno con l'Ala95, il carbonile del *linker* acrilammidico si lega alla tirosina catalitica (Tyr156), mentre l'anello benzofuranico instaura contatti idrofobici con i residui Tyr146, Pro191, Ile153, Met206 e Phe203[21].

Un ulteriore derivato, **Debio 1453**, è stato sviluppato con l'obiettivo di contrastare *Neisseria gonorrhoeae*, agente della gonorrea, un patogeno che ha dimostrato una notevole capacità di sviluppare resistenza agli antibiotici, con ceppi emergenti refrattari a tutte le linee

terapeutiche convenzionali. Anche in questo patogeno, *FabI* costituisce un bersaglio antibatterico essenziale per la biosintesi degli acidi grassi e rimasto finora inesplorato. La progettazione è stata guidata dalle informazioni strutturali: nuove strutture co-cristalline di inibitori legati a *FabI* gonococcico hanno orientato lo sviluppo di composti con potenze di ordine subnanomolare, fino all'identificazione di Debio 1453. Il composto, ottimizzato per l'attività sul gonococco, è altamente attivo *in vitro* su isolati diversi di *N.gonorrhoeae*, compresi quelli resistenti alle ultime opzioni terapeutiche rimaste, presenta una bassa propensione a selezionare mutanti con sensibilità ridotta ed è efficace *in vivo* su isolati con fenotipi di multiresistenza clinicamente rilevanti in un modello murino di infezione vaginale da gonococco [46].

Lo scheletro molecolare dell'afabicina ha così costituito l'impalcatura di partenza per l'ottenimento di tre nuovi derivati: l'afabicina-NH_3, la fabimicina e il Debio 1453, ciascuno caratterizzato da uno spettro d'azione esteso a patogeni del tutto refrattari al composto progenitore. Va tuttavia evidenziato come tutte e tre le molecole si trovino attualmente ancora in una fase di sviluppo preclinico, supportate da saggi *in vitro* su isolati clinici e da modelli di infezione murina. A oggi, l'unica struttura della serie ad aver fatto il salto verso la sperimentazione clinica nell'uomo rimane pertanto l'afabicina, il cui sviluppo non ha finora superato la fase II.

CONCLUSIONI

Il percorso svolto all'interno di questo lavoro ha mostrato come l'enzima enoil-ACP reduttasi, possa acquisire un ruolo di primo piano nel panorama della ricerca scientifica e delle strategie terapeutiche contro la resistenza antimicrobica. A partire dall'inquadramento microbiologico e dall'analisi delle differenze strutturali rispetto al sistema multifunzionale FAS-I umano, è stato possibile comprendere quanto l'inibizione selettiva di singoli enzimi procariotici possa produrre effetti significativi sull'eradicazione dei patogeni, garantendo al contempo un'elevata tossicità selettiva e l'assenza di resistenza crociata con le classi antibiotiche tradizionali.

Mentre una prima classe di inibitori dell'enoil ACP-reduttasi batterica, gli eteri bifenilici come il triclosano, ha presentato problemi relativi alla tossicità e aspecificità, è stata ottenuta una classe di inibitori ad alta affinità e con un meccanismo d'azione mirato grazie all'ottimizzazione molecolare di una benzodiazepina a modesta affinità enzimatica.

Il modello più rappresentativo di questo nuovo filone di ricerca è indubbiamente l'Afabicina (Debio-1450) e dal suo metabolita attivo afabicina desfosfono (Debio-1452). Sviluppata attraverso la progettazione del profarmaco estero-fosfato per migliorare la solubilità e la biodisponibilità, l'afabicina ha segnato un punto di svolta nelle sperimentazioni di Fase II per il trattamento delle infezioni acute della cute e delle infezioni osteoarticolari. La dimostrazione della sua efficacia clinica comparabile ai regimi standard di penetrare nei tessuti ossei e nel liquido sinoviale e alla disponibilità di una doppia formulazione endovenosa ed orale per un pratico switch terapeutico, prova come un intervento chimico mirato possa generare un impatto significativo sulla gestione clinica delle infezioni severe da *Staphylococcus aureus* e inclusi i ceppi MRSA.

La vera e propria peculiarità dell'afabicina rispetto agli antibiotici ad ampio spettro non si limita al solo contesto antistafilococcico e alla salvaguardia del microbiota intestinale ma apre la strada a ulteriori evoluzioni molecolari. L'applicazione delle *eNTRY rules*, come l'introduzione di gruppi amminici ionizzabili, ha già condotto allo sviluppo di derivati di seconda generazione, tra cui la fabimicina e il Debio 1453, capaci di estendere l'attività inibitoria verso FabI a patogeni Gram-negativi critici e a isolati multiresistenti di *Neisseria gonorrhoeae*, a conferma di quanto la chimica degli inibitori di FabI stia diventando uno strumento trasversale di grande potenzialità.

Occorre tuttavia considerare che il targeting sulla via FAS-II comporta anche gestire qualche limite e di sfide che la comunità scientifica dovrà affrontare con metodo e attenzioni. Si pensa, ad esempio, alla possibilità che possano emerge mutazioni spontanee nel gene *FabI*, alla presenza di enzimi alternativi o vie di "salvataggio" che permettono ad alcuni batteri di aggirare il blocco, o ancora a tutte le complicazioni pratiche quando si cerca di portare i candidati per i Gram-negativi dal laboratorio fino alla fase clinica.

In conclusione, l'utilizzo degli inibitori selettivi di FabI oggi rappresenta uno strumento solido, innovativo ed efficace per la progettazione di terapie antibatteriche mirate e meglio tollerate, aprendo la strada a farmaci capaci di eradicare infezioni complesse senza alterare l'ecosistema microbico dell'ospite. Allo stesso tempo, questo ambito di ricerca mostra un potenziale di crescita considerevole nei prossimi anni, alimentato non solo dall'interesse dell'industria farmaceutica e della ricerca di base, ma anche dalla crescente ed urgente esigenza globale di disporre di opzioni terapeutiche personalizzate ed efficaci nell'era post-antibiotica.

Si confida che quanto emerso possa ispirare lo sviluppo di nuove applicazioni molecolari, portando l'afabicina e la nuova generazione di inibitori di FabI a consolidarsi come preziosi alleati non solo nella sperimentazione preclinica, ma soprattutto nella pratica clinica quotidiana, con un impatto concreto sulla qualità di vita di tutti quei pazienti affetti da infezioni multiresistenti che, ancora oggi, dispongono di limitate alternative terapeutiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Ahmed SK, Hussein S, Qurbani K, Ibrahim RH, Fareeq A, Mahmood KA, et al. Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects. Journal of Medicine, Surgery, and Public Health. 2024;2:100081. https://doi.org/10.1016/j.glmedi.2024.100081

2. Endale H, Mathewos M, Abdeta D. Potential Causes of Spread of Antimicrobial Resistance and Preventive Measures in One Health Perspective-A Review. Infect Drug Resist. 2023;16:7515–45. https://doi.org/10.2147/IDR.S428837

3. Sati H, Carrara E, Savoldi A, Hansen P, Garlasco J, Campagnaro E, et al. The WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: a prioritisation study to guide research, development, and public health strategies against antimicrobial resistance. Lancet Infect Dis. 2025;25:1033–43. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(25)00118-5

4. World Health Organization. Global antibiotic resistance surveillance report 2025: WHO Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) – Summary [Internet]. World Health Organization; 2025 [cited 2026 Sept 3]. https://doi.org/10.2471/B09585

5. 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:e70070. https://doi.org/10.1002/jobm.70070

6. Sabtu N, Enoch DA, Brown NM. Antibiotic resistance: what, why, where, when and how? Br Med Bull. 2015;ldv041. https://doi.org/10.1093/bmb/ldv041

7. Ombašić A. An Insight into Antibiotic Resistance Mechanisms: Microbiological Implications for Public Health. Acta Microbiol Bulg. 2024;40:131–41. https://doi.org/10.59393/amb24400201

8. Flynn CE, Guarner J. Emerging Antimicrobial Resistance. Modern Pathology. 2023;36:100249. https://doi.org/10.1016/j.modpat.2023.100249

9. Analysis of antibacterial agents in clinical and preclinical development: overview and analysis 2025. Geneva: World Health Organization; 2025.

10. Saxena, D., Kaul, G., Dasgupta, A., Chopra, S. Afabicin. Enoyl-(acyl-carrier-protein) reductase FabI inhibitor, Antibacterial drug. Drugs of the Future. 2021;46:5. https://doi.org/10.1358/dof.2021.46.1.3179432

11. Wittke F, Vincent C, Chen J, Heller B, Kabler H, Overcash JS, et al. Afabicin, a First-in-Class Antistaphylococcal Antibiotic, in the Treatment of Acute Bacterial Skin and Skin

Structure Infections: Clinical Noninferiority to Vancomycin/Linezolid. Antimicrob Agents Chemother. 2020;64:e00250-20. https://doi.org/10.1128/AAC.00250-20

12. Zhou J, Zhang L, Zhang L. Advances on Mechanism and Drug Discovery of Type-II Fatty Acid Biosynthesis Pathway. Acta Chim Sinica. 2020;78:1383. https://doi.org/10.6023/A20070299

13. Ridgway ND, McLeod RS, editors. Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. Seventh edition. Amsterdam: Elsevier Science; 2021.

14. Radka CD, Rock CO. Mining Fatty Acid Biosynthesis for New Antimicrobials. Annu Rev Microbiol. 2022;76:281–304. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-041320-110408

15. Parsons JB, Rock CO. Bacterial lipids: Metabolism and membrane homeostasis. Progress in Lipid Research. 2013;52:249–76. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.02.002

16. Gullett JM, Rock CO. Fatty acid and phospholipid biosynthesis in prokaryotes. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes [Internet]. Elsevier; 2021 [cited 2026 Sept 20]. p. 85–120. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824048-9.00007-9

17. Yao J, Rock CO. Bacterial fatty acid metabolism in modern antibiotic discovery. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. 2017;1862:1300–9. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.09.014

18. Balemans W, Lounis N, Gilissen R, Guillemont J, Simmen K, Andries K, et al. Essentiality of FASII pathway for Staphylococcus aureus. Nature. 2010;463:E3–E3. https://doi.org/10.1038/nature08667

19. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principi di Biochimica. 8a ed. Bologna. Zanichelli; 2022.

20. White SW, Zheng J, Zhang Y-M, Rock CO. THE STRUCTURAL BIOLOGY OF TYPE II FATTY ACID BIOSYNTHESIS. Annu Rev Biochem. 2005;74:791–831. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133524

21. Bibens L, Becker J-P, Dassonville-Klimpt A, Sonnet P. A Review of Fatty Acid Biosynthesis Enzyme Inhibitors as Promising Antimicrobial Drugs. Pharmaceuticals. 2023;16:425. https://doi.org/10.3390/ph16030425

22. Patel R, Singh G, Kajal K, Nandini, Alam P, Kharkwal H, et al. Exploring FabH inhibitors for antimicrobial therapy: medicinal chemistry, synthetic approaches, and SAR evaluation. Mol Divers. 2025;30:3291–341. https://doi.org/10.1007/s11030-025-11383-4

23. Hopf FSM, Roth CD, De Souza EV, Galina L, Czeczot AM, Machado P, et al. Bacterial Enoyl-Reductases: The Ever-Growing List of Fabs, Their Mechanisms and Inhibition. Front Microbiol. 2022;13:891610. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.891610

24. Yao J, Rock CO. Resistance Mechanisms and the Future of Bacterial Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase (FabI) Antibiotics. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016;6:a027045. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027045

25. Rana P, Ghouse SM, Akunuri R, Madhavi YV, Chopra S, Nanduri S. FabI (enoyl acyl carrier protein reductase) - A potential broad spectrum therapeutic target and its inhibitors. European Journal of Medicinal Chemistry. 2020;208:112757. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112757

26. McMurry LM, Oethinger M, Levy SB. Triclosan targets lipid synthesis. Nature. Nature Publishing Group; 1998;394:531–2. https://doi.org/10.1038/28970

27. Heath RJ, Rubin JR, Holland DR, Zhang E, Snow ME, Rock CO. Mechanism of Triclosan Inhibition of Bacterial Fatty Acid Synthesis. Journal of Biological Chemistry. 1999;274:11110–4. https://doi.org/10.1074/jbc.274.16.11110

28. Cain BN, Kent JE, Elane M, Williams JD, Lee MR, Lau GW, et al. Fatty Acid BiosynthesisInhibitors─Fabimycinand Triclosan─Trigger Distinct Resistance Mutations in FabIand Potently Kill Gram-Negative Pathogens. ACS Infectious Diseases. 2026;12:3159–68. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6c00339

29.Levy CW, Roujeinikova A, Sedelnikova S, Baker PJ, Stuitje AR, Slabas AR, Rice DW, Rafferty JB. Molecular basis of triclosan activity. Nature. 1999 Apr 1;398(6726):383-4. doi: 10.1038/18803. PMID: 10201369.

30. Sivaraman S, Sullivan TJ, Johnson F, Novichenok P, Cui G, Simmerling C, et al. Inhibition of the Bacterial Enoyl Reductase FabI by Triclosan: A Structure−Reactivity Analysis of FabI Inhibition by Triclosan Analogues. J Med Chem. 2004;47:509–18. https://doi.org/10.1021/jm030182i

31. Sivaraman S, Zwahlen J, Bell AF, Hedstrom L, Tonge PJ. Structure−Activity Studies of the Inhibition of FabI, the Enoyl Reductase from *Escherichia coli* , by Triclosan: Kinetic Analysis of Mutant FabIs. Biochemistry. 2003;42:4406–13. https://doi.org/10.1021/bi0300229

32. Schiebel J, Chang A, Lu H, Baxter MV, Tonge PJ, Kisker C. Staphylococcus aureus FabI: Inhibition, Substrate Recognition and Potential Implications for In Vivo Essentiality. Structure. 2012;20:802–13. https://doi.org/10.1016/j.str.2012.03.013

33. Gerusz V, Denis A, Faivre F, Bonvin Y, Oxoby M, Briet S, et al. From Triclosan toward the Clinic: Discovery of Nonbiocidal, Potent FabI Inhibitors for the Treatment of Resistant Bacteria. J Med Chem. 2012;55:9914–28. https://doi.org/10.1021/jm301113w

34. Miller WH, Seefeld MA, Newlander KA, Uzinskas IN, Burgess WJ, Heerding DA, et al. Discovery of Aminopyridine-Based Inhibitors of Bacterial Enoyl-ACP Reductase (FabI). J Med Chem. 2002;45:3246–56. https://doi.org/10.1021/jm020050+

35. Payne DJ, Miller WH, Berry V, Brosky J, Burgess WJ, Chen E, et al. Discovery of a Novel and Potent Class of FabI-Directed Antibacterial Agents. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:3118–24. https://doi.org/10.1128/AAC.46.10.3118-3124.2002

36. Hafkin B, Kaplan N, Murphy B. Efficacy and Safety of AFN-1252, the First Staphylococcus-Specific Antibacterial Agent, in the Treatment of Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections, Including Those in Patients with Significant Comorbidities. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60:1695–701. https://doi.org/10.1128/AAC.01741-15

37. Kaplan N, Albert M, Awrey D, Bardouniotis E, Berman J, Clarke T, et al. Mode of Action, *In Vitro* Activity, and *In Vivo* Efficacy of AFN-1252, a Selective Antistaphylococcal FabI Inhibitor. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:5865–74. https://doi.org/10.1128/AAC.01411-12

38. Heimann D, Kohnhäuser D, Kohnhäuser AJ, Brönstrup M. Antibacterials with Novel Chemical Scaffolds in Clinical Development. Drugs. 2025;85:293–323. https://doi.org/10.1007/s40265-024-02137-x

39. Partridge, J.J., Colucci, J., Gareau, Y. et al. (Affinium Pharmaceuticals, Inc.). Prodrug derivatives of (E)-N-methyl-N((3-methylbenzofuran-2-yl)methyl)-3-(7-oxo-5,6,7,8-tetrahydro1,8-naphthyridin-3-yl)acrylamide. WO 2013190384.

40. Nowakowska J, Cameron DR, De Martino A, Kühn J, Le Fresne-Languille S, Leuillet S, et al. Evaluation of the microbiota-sparing properties of the anti-staphylococcal antibiotic afabicin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2023;78:1900–8. https://doi.org/10.1093/jac/dkad181

41. Menetrey A, Janin A, Pullman J, Overcash JS, Haouala A, Leylavergne F, et al. Bone and Joint Tissue Penetration of the *Staphylococcus* -Selective Antibiotic Afabicin in Patients Undergoing Elective Hip Replacement Surgery. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63:e01669-18. https://doi.org/10.1128/AAC.01669-18

42. Paukner S, Hawser S, Cameron DR. Afabicin desphosphono in vitro activity against Staphylococcus spp.: data from a five-year susceptibility surveillance study (2018–2023). 2026. p. Poster P2637.

43. Shamaei-Tousi A, Marquardt M, Cameron DR, de la Fuente L, Amersdorffer J. Clinical outcome of afabicin in bone and joint infections: efficacy and safety findings from a phase 2 trial of a novel anti-staphylococcal agent. 2026. p. Poster P1081.

44. Parker EN, Drown BS, Geddes EJ, Lee HY, Ismail N, Lau GW, et al. Implementation of permeation rules leads to a FabI inhibitor with activity against Gram-negative pathogens. Nat Microbiol. 2019;5:67–75. https://doi.org/10.1038/s41564-019-0604-5

45. Parker EN, Cain BN, Hajian B, Ulrich RJ, Geddes EJ, Barkho S, et al. An Iterative Approach Guides Discovery of the FabI Inhibitor Fabimycin, a Late-Stage Antibiotic Candidate with *In Vivo* Efficacy against Drug-Resistant Gram-Negative Infections. ACS Cent Sci. 2022;8:1145–58. https://doi.org/10.1021/acscentsci.2c00598

46. Gerusz V, Regenass P, Rousseau Q, Moraine V, Dao J, Lavé X, et al. The bactericidal FabI inhibitor Debio 1453 clears antibiotic-resistant Neisseria gonorrhoeae infection in vivo. Nat Commun. 2025;16:8309. https://doi.org/10.1038/s41467-025-63508-w