

# NOI OPORTUNITĂȚI ÎN DEZVOLTAREA REMEDIILOR ANTITUBERCULOASE

*Dr hab. Fliur MACAEV\**  
*Dr. Veaceslav BOLDESCU\**  
*Acad. Gheorghe Duca*  
*\*Institutul de Chimie al AȘM*

## NEW OPPORTUNITIES IN ANTITUBERCULOSIS DRUGS DEVELOPMENT

**Summary.** Contemporary research for development of new antituberculosis drugs focuses on the following main areas: targeting of mycobacterial cell protein export systems, targeting cell wall integrity, intracellular energy processes targeting, targeting the mechanisms involved in the development of resistance, etc. Despite some obvious progress in development of new anti-TB drugs, a continuous research is still needed to overcome the problems connected with wide spread of MDR and XDR tuberculosis.

**Keywords:** tuberculosis, cell protein export systems, cell wall integrity, intracellular energy processes, MDR, XDR

**Rezumat.** Cercetările actuale de dezvoltare a noilor medicamente antituberculoase se axează pe următoarele domenii principale: țintirea sistemelor micobacteriene de export al proteinelor celulare, țintirea integrității peretelui celular, țintirea proceselor energetice intracelulare, țintirea mecanismelor implicate în dezvoltarea rezistenței etc. În pofida unor progrese evidente în dezvoltarea noilor medicamente antituberculoase, este necesară o cercetare continuă pentru a depăși problemele generate de răspândirea tuberculozei MDR și XDR.

**Cuvinte-cheie:** tuberculoza, sisteme micobacteriene de export l proteinelor, integritatea peretelui celular, procesele energetice intracelulare, MDR, XDR.

O treime din populația planetei este infectată cu *Mycobacterium tuberculosis*, agentul cauzator al tuberculozei (TBC). Tuberculoza, o boală veche, continuă să rămână prima în topul infecțiilor bacteriene provocatoare de decese [1]. Cauzele principale ale persistenței bolii sunt tratamentul de lungă durată, cantitatea mare de medicamente administrate, dezvoltarea rezistenței etc. Astfel, este o nevoie stringentă de a elabora remedii antituberculoase noi, cu mecanisme de acțiune și ținte intracelulare diferite

de cele caracteristice pentru medicamentele antituberculoase utilizate în prezent.

Secreția de proteine este unul din procesele celulare cheie. Aproximativ o cincime din toate proteinele bacteriene sunt exportate în mediul extracelular, promovând motilitatea, biosinteza peretelui celular, chemotaxia, adeziunea la celule gazdă și absorbția nutrienților [2]. În *M. tuberculosis*, peste 250 de proteine sunt exportate prin membrana citoplasmatică prin mecanismele mediate signalaze de tip I sau tip II. Mai multe din aceste proteine sunt importante în patogeneză bacteriană [3, 4].

Signalaza de tip I (SPase I) este o endopeptidază legată de membrană, responsabilă de scindarea peptidului semnal de proteinele secretate. SPase I este o țintă atractivă pentru dezvoltarea de remedii antituberculoase noi deoarece:

- este esențială pentru supraviețuirea tuturor speciilor bacteriene studiate până în prezent;
- situsul activ al enzimei este situat pe suprafața extracelulară a membranei citoplasmatică, sugerând accesibilitate sporită;
- SPase I utilizează un situs activ unic Ser/Lys – o diadă catalitică, care permite dezvoltarea de inhibitori foarte specifici;
- SPases bacteriene se deosebesc de SPases eucariotice, sugerând o oportunitate terapeutică promițătoare pentru om [5].

Cea mai eficientă clasă de inhibitori ai SPase I face parte din grupul de compuși beta lactamici sau inhibitori de tip penem. A fost studiată extensiv inhibarea SPase de arilomicină. A fost studiată și descrisă structura cristalină a arilomicinei A2 legată de SPase I a *E. coli* [6, 7]. Cu toate acestea, numărul de inhibitori-specifiți ai SPase I se menține redus.

Peretele celular micobacterian este format din trei macromolecule legate covalent între ele: peptidoglican, arabinogalactan și acizi micolici. Biosinteza peretelui celular este o sursă deosebit de bună de ținte moleculare pentru designul remediilor antituberculoase noi, deoarece enzimele biosintetice nu au omologi în organismele mamiferelor. Medicamente anti-TB utilizate în prezent includ inhibitori ai acizilor micolic (izoniazidă și etionamidă), arabinogalactanului (etambutol) și peptidoglicanului (cicloserină).

Cu toate acestea, una dintre problemele dificile este incertitudinea în privința faptului că inhibarea sintezei peretelui celular poate reduce durata tratamentului. Actualmente, inhibitorii cunoscuți ai biosintezei peretelui celular nu pot scurta durata tratamentului tuberculozei și e necesar de a dezvolta inhibitori noi cu activitate mai pronunțată care vor

eradica boala într-o perioadă mai scurtă de timp. În cadrul unui studiu [8] a fost descrisă structura cristalină a enzimei alanin racemază care participă în biosinteza peptidoglicanului. Rezultatele acestui studiu pot fi utile pentru un design mai precis al unor inhibitori ai alanin racemazei (Fig. 1).

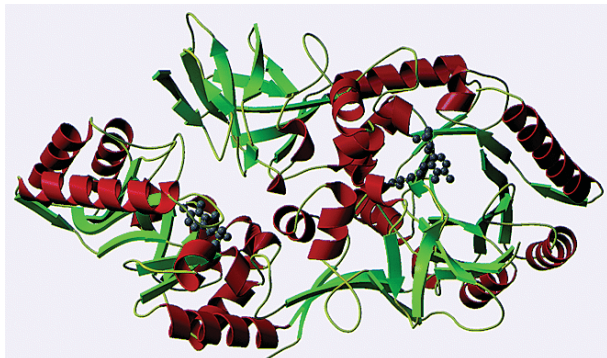


Figura 1. Diagrama dimerilor alanin racemazei *M. tuberculosis* [8]

O altă țintă importantă în celulele *M. tuberculosis* poate fi colesterolul, care se acumulează în peretele celular al micobacteriilor. Extragerea lui din peretele celular crește permeabilitatea acestuia pentru moleculele remediilor antituberculoase. Ciclodextrinele pot fi utilizate în calitate de extractori ai colesterolului (Fig. 2). Proprietatea ciclodextrinelor de a forma compuși complecși cu diferite substanțe endogene, printre acestea numărându-se colesterolul și lipidele din componența membranelor celulare, este bine cunoscută [9]. În cazul celulelor *M. tuberculosis*, ciclodextrinele pot extrage colesterolul depozitat în peretele celular al micobacteriilor, dezorganizând stratul lipidic de protecție și crescând permeabilitatea acestuia pentru diferite substanțe antituberculoase [10, 11].

Toate bacteriile au nevoie de energie pentru a supraviețui. Deși căile de producție a energiei în *M. tuberculosis* nu sunt bine caracterizate, importanța

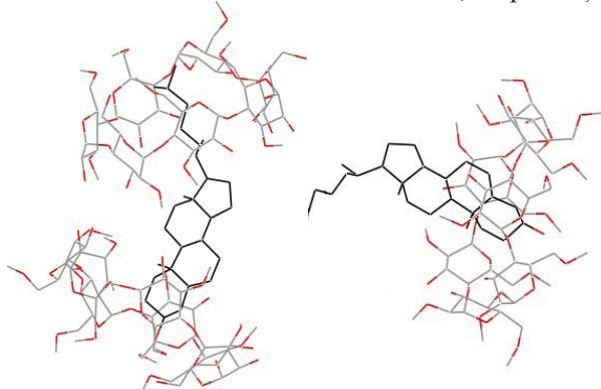


Figura 2. Reprezentarea schematică a compușilor complecși de incluziune ai sterolilor cu  $\beta$ -CD în raport 1:1 și 1:2 [12]

lor ca ținte pentru acțiunea remediilor antituberculoase a fost demonstrată printr-o descoperire recentă. Un grup de cercetători a demonstrat că pirazinamida (un medicament TB prima linie) acționează prin perturbarea potențialului de membrană și prin epuizarea energiei în *M. tuberculosis* [13]. Acest studiu arată că producerea sau păstrarea energiei este importantă pentru viabilitatea micobacteriilor *in vivo*.

O altă descoperire recentă a unui remediu eficient contra tuberculozei – bedaquiline (Fig. 3) – subliniază, de asemenea, importanța căilor de producere a energiei pentru micobacterii. Așadar, este firesc ca procesele de producere a energiei, precum lanțul de transport de electroni, căile glicolitice (de exemplu, calea Embden-Meyerhof) și căile de fermentare să reprezinte niște ținte bune pentru dezvoltarea remediilor antituberculoase noi.

Cercetările cu bacteriile *E. coli* au identificat că perechi de toxină și antitoxină (numite module TA), de felul MazEF, HigAB, ParDE, Phd/Doc, RelBE, VapBC, sunt implicate în moartea și rezistența celulelor bacteriene [14]. Expresia inadecvată sau necontrolată a toxinei sau o descreștere în expresia antitoxinei poate provoca moartea celulei bacteriene. În *E. coli*, unele antibiotice (cum ar fi rifampicina, cloramfenicolul și spectinomycină), care inhibă procesele de sinteză a proteinelor, precum și medicamentele din grupul sulfaderivaților ce produc insuficiență de timidină,ucid bacteriile prin inducerea toxinei MazF [15]. Este interesant că genomul *M. tuberculosis*, descifrat recent, conține cel puțin 38 de module de AT, inclusiv trei relBE și nouă mazEF loci [14]. Modulele TA sunt ținte atractive în *M. tuberculosis* pentru designul remediilor antituberculoase, care fie induc producerea toxinei, fie inhibă expresia antitoxinei.

Un obiectiv aparte pentru dezvoltarea remediilor antituberculoase noi pot fi mecanismele de rezistență. Rezistența micobacteriană se referă la ca-

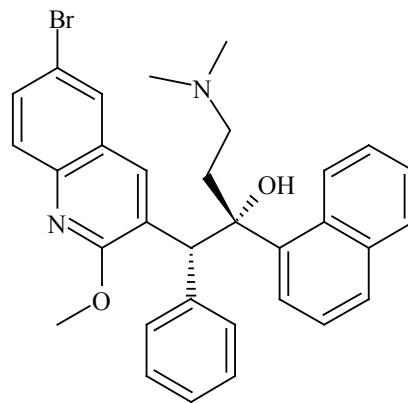


Figura 3. Structura moleculei de bedaquiline

pacitatea bacilului tuberculos de a supraviețui sub influența chimioterapiei sau a activității sistemului imunitar [16].

Mai multe grupuri de cercetători studiază biologia rezistenței *M. tuberculosis* și dezvoltarea remediilor noi care combat rezistența tuberculoasă [17, 18]. Au fost identificate produsele genelor implicate în persistența micobacteriană, cum ar fi izocitrat de liază (ICL), PcaA (metil transferaza implicată în modificarea acidului micolic), RelA (ppGpp sintaza) și DosR (care controlează supraviețuirea micobacteriilor în condiții hipoxice). Acestea ar putea constitui obiective noi pentru dezvoltarea medicamentelor antituberculoase inedite care vizează bacili persistenti.

### Concluzii

Cercetările actuale în domeniul dezvoltării noilor remedii antituberculoase se axează pe câteva direcții principale: țintirea procesului de eliminare a proteinelor din celula micobacteriană, țintirea integrității peretelui celular prin extragerea colesterolului, țintirea proceselor energetice din celula *M. tuberculosis*, țintirea mecanismelor implicate în dezvoltarea rezistenței etc.

Acumularea cunoștințelor noi despre procesele intracelulare ale *M. tuberculosis* și o abordare complexă în designul compușilor noi cu proprietăți antituberculoase au avut deja rezultate pozitive, cum ar fi aprobarea bedaquiline pentru utilizare. Totuși, odată cu creșterea incidenței tuberculozei multi-rezistente și cu rezistență extinsă este prematur să anunțăm progrese mari în învingerea tuberculozei.

*Autorii articolului își exprimă mulțumirile pentru susținerea parțială a acestei lucrări de către fondul STCU, proiectul #5800.*

### Bibliografie:

1. Global Tuberculosis Report 2012, Geneva, World Health Organization, 2013 [www.who.int/tb/data](http://www.who.int/tb/data) (Accesat: 03.02.2014).
2. Pugsley A. P. *The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria*. In: *Microbiological reviews*. 1993, 57(1), 50-108.
3. Beatty W. L., Russell D. G. *Identification of mycobacterial surface proteins released into subcellular compartments of infected macrophages*. In: *Infection and immunity*. 2000, 68(12), 6997-7002.
4. Stewart G. R., Patel J., Robertson B. D., Rae A., Young D. B. *Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification*. In: *PLoS pathogens*.

2005, 1(3), 269-278.

5. Paetzel M., Karla A., Strynadka N. C., Dalbey R. E. *Signal peptidases*. In: *Chemical Reviews*. 2002, 102(12), 4549-4580.

6. Kulanthaivel, P., Kreuzman, A. J., Strege, M. A., Belvo, M. D., Smitka, T. A., Clemens, M., Peng, S. B. *Novel lipoglycopeptides as inhibitors of bacterial signal peptidase I*. In: *Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279(35), 36250-36258.

7. Paetzel M., Goodall J. J., Kania M., Dalbey R. E., Page M. G. *Crystallographic and biophysical analysis of a bacterial signal peptidase in complex with a lipopeptide-based inhibitor*. In: *Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279(29), 30781-30790.

8. Le Magueres P., Im H., Ebalunode J., Strych U., Benedik M.J., Briggs J.M., Kohn H., Krause K.L. *The I.9 A crystal structure of alanine racemase from Mycobacterium tuberculosis contains a conserved entryway into the active site*. In: *Biochemistry*, 2005, 44, 1471-1481.

9. Duca Gh., Ivancic A., Boldescu V. *Cyclodextrins: fields of application*. Part II. In: *Chemistry Journal of Moldova*. 2012, 7 (2), 39-45.

10. Brzostek A., Pawelczyk J., Rumijowska-Galewicz A., Dziadek B., Dziadek J. *Mycobacterium tuberculosis is able to accumulate and utilize cholesterol*. In: *Journal of Bacteriology*. 2009, 191 (21), 6584-6591.

11. Donova M.N., Nikolayeva V.M., Dovbnya D.V. et al. *Methyl-β-cyclodextrin alters growth, activity and cell envelope features of sterol-transforming Mycobacteria*. In: *Microbiology*. 2007, 153, 1981-1992.

12. Macaev F., Boldescu V., Geronikaki A., Sucman N. *Recent advances in the use of cyclodextrins in antifungal formulations*. In: *Current Topics of Medicinal Chemistry*. 2013, 21, 2677-2683

13. Zhang Y., Wade M. M., Scorpio A., Zhang H., Sun Z. *Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid*. In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003, 52(5), 790-795.

14. Gerdes, K., Christensen, S. K., Løbner-Olesen, A. *Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci*. In: *Nature Reviews Microbiology*. 2005, 3(5), 371-382.

15. Engelberg-Kulka, H., Sat, B., Reches, M., Amitai, S., Hazan, R. *Bacterial programmed cell death systems as targets for antibiotics*. In: *Trends in Microbiology*. 2004, 12(2), 66-71.

16. Mc Dermott, W. *Microbial persistence*. In: *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 1958, 30(4), 257.

17. O'Brien R. J., Nunn P. P. *The need for new drugs against tuberculosis: obstacles, opportunities, and next steps*. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2001, 163(5), 1055-1058.

18. Zhang Y. *The magic bullets and tuberculosis drug targets*. In: *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2001, 45, 529-564.