

NOVES TECNOLOGIES EN LA RECERCA D'ANTIMICROBIANS

CRISTINA TARRAGÓ, CRISTINA ALEMANY, CELIA PALACÍN, JOSÉ TERCENIO I ANTONIO GUGLIETTA

Centre d'Investigació i Desenvolupament Farmacèutic de Ferrer Internacional.

Adreça per a la correspondència: Cristina Tarragó. Departament de Malalties Infeccioses, Centre I+D Laboratoris Ferrer Internacional. Joan de Sada, 32. 08028 Barcelona.
Adreça electrònica: ctarrago-research@ferrergrupo.com.

RESUM

Les infeccions bacterianes són una important causa de mort en els nostres dies i diversos factors són responsables de la seva transcendència, com el mal ús dels antibiòtics, la capacitat d'adaptació bacteriana a les teràpies actuals i la manca de noves famílies d'antibiòtics que apareguin a la mateixa velocitat que els patògens es fan resistents als productes del mercat. Per superar aquest problema la comunitat científica inverteix importants esforços en la recerca de nous antibacterians, a través tant de la utilització del coneixement adquirit dels antibiòtics existents i de les tecnologies clàssiques, com de la incorporació de la genòmica per a la recerca de noves dianes, de fonts de productes naturals no explorades, de noves tecnologies de síntesi, i del rastreig d'alt rendiment per a una major optimització en la detecció d'antibiòtics potencials. Al llarg d'aquest article s'intenta repassar l'evolució en la recerca d'antimicrobians, des del problema que representa l'adaptació dels bacteris a l'ús dels antibiòtics, fins a arribar a la utilització de noves tecnologies en la recerca de productes amb nous mecanismes d'acció.

Paraules clau: antibiòtics, resistència, descobriment de drogues, noves dianes, noves tecnologies.

SUMMARY

Infectious diseases are the leading cause of death worldwide, and the main reasons for the accelerated development and dissemination of bacterial resistance are the increase of the global selective pressure through inappropriate use of antimicrobials in therapy, the bacterial ability to select for resistant organisms, and the lack of development of new drugs as fast as bacteria can adapt to current antibacterials. The scientific community and drug companies are refocusing their discovery efforts in developing novel agents with new modes of action, adding to the classical antibiotic knowledge and detection methods the use of rapidly emerging technologies including genomics, combinatorial chemistry, high throughput scanning, and novel sources of natural products. This review summarize the evolution of the antimicrobial drug discovery process through the use of novel technologies in order to fight against resistant pathogens.

Keywords: antimicrobial, resistance, drug discovery, new targets, novel technologies.

INTRODUCCIÓ

El descobriment, desenvolupament i explotació dels antibiòtics ha estat un dels avenços més significatius en medicina del segle xx, juntament amb la millora de les condicions de salut pública. L'era daurada de la recerca d'antimicrobians va ser la compresa entre 1940 i el final dels anys seixanta, i d'aquells esforços va resultar un ampli ventall d'agents estructuralment diversos i efectius per a tractar les infeccions bacterianes. A finals dels setanta, la batalla davant les infeccions es va considerar guanyada; era aquesta una sensació de victòria excessiva i prematura (Spellberg *et al.*, 2004).

En els últims anys les resistències als antibiòtics, tant als hospitals com en la comunitat, estan augmentant d'una manera alarmant, a causa sobretot d'un grup de patògens que han esdevingut resistents a múltiples antibiòtics del mercat. Aquests patògens són els *Staphylococcus aureus* resistents a la meticil·lina (MRSA) o amb sensibilitat intermèdia a la vancomicina (VISA), els *Enterococcus* resistents a la vancomicina (VRE) i els *Streptococcus pneumoniae* amb sensibilitat disminuïda a la penicil·lina i a altres antibacterians, juntament amb organismes com *Pseudomonas sp.* multiresistent, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.* i *Acinetobacter sp.*

SITUACIÓ ACTUAL: APARICIÓ INEVITABLE DE RESISTÈNCIES

Quan s'introdueix una nova classe d'antibiòtics en l'ús clínic, aquesta és efectiva al principi, però eventualment es pot seleccionar la supervivència d'una petita fracció de població bacteriana amb un mecanisme de resistència intrínseca o adquirida. Quan emergeixen els patògens resistents a múltiples antibiòtics ho acostumen a fer en tot el món, i més o menys al

mateix temps (Walsh, 2003). Aquest problema afecta de manera molt directa la vancomicina, fins fa poc considerada teràpia de darrera elecció, i que avui dia està perdent la seva efectivitat davant algunes soques multiresistents.

Els mecanismes de resistència es poden resumir en bloqueig de l'entrada de l'antibiòtic, afavoriment de l'expulsió, modificació de la diana i desactivació enzimàtica o *bypass*. Tot i que els bacteris resistents són infreqüents dins una població normal (p. ex.: un de cada 10^8), en presència contínua d'un antibiòtic determinat les resistents augmenten respecte als bacteris que no són capaços de sobreviure. El termini per al desenvolupament de resistències clínicament significants és multifactorial i depèn de la quantitat d'antibiòtic utilitzat, l'amplitud de la prescripció, la freqüència d'ús de nivells subterapèutics d'antibiòtics, els reservoris de mecanismes de resistència existents, el nombre de mutacions requerides perquè emergeixi resistència en una diana determinada i la capacitat de supervivència dels organismes resistents. La realitat és que les resistències bacterianes, al llarg del temps, s'han desenvolupat davant cada una de les classes d'antibiòtics, tant naturals com sintètics (entre un any o una dècada després del seu primer ús clínic). La resistència, doncs, no és una qüestió de si apareix, sinó de quan ho fa. Des del moment que entra a la clínica un nou antibacterià, el rellotge comença a comptar per a la primera aparició de soques resistents. El nombre de nous antibiòtics que es necessiten per a tractar la mateixa infecció bacteriana va augmentant en el temps a mesura que apareixen soques resistents als antibiòtics usats. L'últim exemple és l'oxazolidinona linezolid, per a la qual les primeres soques resistents van aparèixer només un any després de l'aprovació del producte per la FDA (Schmidt, 2004).

CANVI D'ESTRATÈGIES EN L'EMPRESA ACTUAL

El 2003, el mercat global d'antimicrobians es va estimar en trenta-dos bilions de dòlars i s'espera que estigui per sobre dels trenta-vuit bilions el 2006 (Basbaum, 2003). Les indústries farmacèutiques valoren aquest fet i també la postura de les administracions d'intentar fomentar la investigació en aquest camp, però la realitat és que inverteixen cada cop menys en antibacterians. La primera causa que ho explica és l'elevat cost de la recerca i el desenvolupament (estimacions de 400-800 milions de dòlars/producte aprovat) (Smolinski *et al.*, 2003). Una altra és el fet que aquest tipus de productes són econòmicament menys atractius per al desenvolupament que altres tipus de fàrmacs, ja que s'utilitzen com a teràpia de curta durada enfront dels medicaments indicats per a malalties cròniques (Projan, 2003). També, l'elevat nombre d'antimicrobians aprovats és un competidor important a l'hora d'intentar nous registres, juntament amb el fet que els organismes de salut pública transmetin a l'opinió mèdica la necessitat de limitar l'ús d'antibiòtics d'ampli espectre amb l'objectiu de minimitzar les pressions que originen l'aparició de resistències i, per tant, desaconsellin l'ús com a primera opció dels nous antibacterians (Powers, 2003).

La situació afecta de manera diferent petites companyies farmacèutiques o de biotecnologia que poden estar més interessades en aquest camp, ja que preveuen el desenvolupament de fàrmacs amb mercat més reduït, i per tant, amb menor marge econòmic (Spellberg *et al.*, 2004). Òbviament, també disposen de menys recursos, però sovint la col·laboració entre aquestes o amb diferents grups de treball acadèmics intenta suplir aquesta mancança. De totes maneres, qualsevol tipus de companyia farmacèutica que treballi en aquest camp ha de preveure la recerca en la identificació i validació de noves dianes, ha de disposar d'experiència en mecanismes de

rastreig d'alt rendiment (HTS) i també en sistemes i programes per a la identificació i optimització de *leads*.

ESTRATÈGIES CLÀSSIQUES EN LA RECERCA D'ANTIMICROBIANS

En el passat, el mètode tradicional utilitzat per al desenvolupament de nous antibiòtics era la síntesi d'anàlegs de compostos existents o el rastreig de substàncies naturals i l'avaluació de tots aquests amb la recerca de millores en l'activitat terapèutica i en l'espectre. S'utilitzaven també mètodes *in vitro* i *in vivo* per a determinar la seva activitat bacteriostàtica o bactericida, però sempre amb organismes sencers (bacteris o animals d'experimentació). A continuació, es definien les relacions d'estructura-activitat amb sèries d'anàlegs químics fins a identificar el millor compost per al desenvolupament clínic. La situació habitual era identificar l'activitat antimicrobiana i després l'estructura de la molècula responsable i les dianes involucrades (Yuan *et al.*, 2001). Aquesta aproximació va tenir èxit durant dècades i va permetre la identificació d'un nombre limitat d'antibacterians que, tot i no ser baix, condueix a situacions de resistència creuada, ja que molts tenen com a diana els mateixos processos cel·lulars o els mateixos enzims (vegeu la taula 1). Algunes companyies farmacèutiques encara utilitzen aquest procés i, tot i que hi ha hagut certa innovació al llarg del temps, han passat més de trenta anys entre la introducció de les quinolones l'any 1962 i la següent classe estructural d'antibiòtics, l'oxazolidinona linezolid (Rachakonda i Carlee, 2004).

Avui dia, sis antibiòtics superen un bilió de dòlars en vendes: dos β -lactàmics (ceftriaxona i amoxicil·lina/clavulànic), dos macròlids (azitromicina i claritromicina) i dues fluoroquinolones (ciprofloxacina i levofloxacina). Aquests productes reflecteixen tres classes estructurals

TAULA 1. Llistat d'antibiòtics representants de les principals classes d'antibiòtics, amb les seves dianes d'acció i la dècada de la seva introducció clínica

Dècada	Compost (classe)	Diana bacteriana
1930	Sulfonamides	Metabolisme dels àcids grassos (àc. fòlic)
1940	Penicil·lines (β -lactàmics)	Síntesi de la paret celular
	Estreptomicina (aminoglicòsids)	Síntesi de proteïnes
1950	Cloramfenicol	Síntesi de proteïnes
	Tetracicl·lines	Síntesi de proteïnes
	Vancomicina (glicopèptids)	Síntesi de la paret celular
1960	Eritromicina (macròlids)	Síntesi de proteïnes
	Cefalosporines (β -lactàmics)	Síntesi de la paret celular
	Piostacina (estreptogramines)	Síntesi de proteïnes
	Àcid nalidíxic (quinolones)	Replicació del DNA
1980	Fluoroquinolones (quinolones)	Replicació del DNA
	Cefalosporines de 3a generació (β -lactàmics)	Síntesi de la paret celular
	Carbapenems (β -lactàmics)	Síntesi de la paret celular
	Segona generació de macròlids	Síntesi de proteïnes
1990	Quinudalfopristina (estreptogramines parenterals)	Síntesi de proteïnes
2000	Linezolid (oxazolidones)	Síntesi de proteïnes
	Telitromicina (ketòlids)	Síntesi de proteïnes

que han estat les més importants durant quatre dècades (Walsh, 2003).

Una estratègia per a superar les resistències bacterianes és la identificació de substàncies que interfereixen amb els trets de resistència. Aquest concepte va ser introduït amb èxit en la teràpia a començaments de la dècada dels vuitanta amb la comercialització per part de GlaxoSmithKline de l'àcid clavulànic, un inhibidor de β -lactamases obtingut a partir de *Streptomyces clavuligerus*, conjuntament amb la preparació amb amoxicil·lina. També és, doncs, molt important en la recerca de nous antibacterians la modificació de l'estructura química dels antibiòtics per neutralitzar els mecanismes de resistència i la recerca de nous compostos amb mecanismes d'acció desconeguts (Schmidt, 2004).

Molts dels compostos que estan avui en desenvolupament són encara modificacions menors de les famílies β -lactàmiques, macròlids i fluoroquinolones; les segones i terceres generacions d'aquestes molècules són extremadament importants en la millora en eficàcia i farmacocinètica. Variants d'altres

classes d'antibiòtics, com les tetracicl·lines i glicopèptids, s'han obtingut amb l'objectiu d'augmentar l'eficàcia davant bacteris patògens importants. La daptomicina (lipopèptid), pot ser efectiva especialment davant VRE (Walsh, 2003). Oritanvancina i dalbavancina són derivats glicopèptids amb una vida mitjana en sèrum molt llarga i activitat davant molts dels grampositius resistents a altres antibiòtics. Altres exemples a comentar són les noves fluoroquinolones i les desfluoroquinolones, que han incrementat molt la seva activitat davant microorganismes grampositius, fins i tot resistents a les anteriors fluoroquinolones. També, les glicilglicines són compostos que han estat modificats químicament per superar les resistències a la tetraciclina mitjançant protecció ribosòmica i l'*efflux*. D'aquestes molècules, la tigeciclina presenta tan bona activitat davant grampositius, anaerobis i enterobacteris com una molt disminuïda toxicitat gastrointestinal per via endovenosa. Finalment, els ketòlids són derivats dels macròlids no subjectes al mecanisme de resistència d'aquests, a causa de l'*efflux*, no indueixen re-

sistència als macròlids i tenen activitat relativa davant soques amb els gens *erm* (Douthwaite i Champney, 2001).

INCORPORACIÓ DE LA GENÒMICA A LA RECERCA DE NOVES DIANES

La major part dels antibiòtics actuals estan dirigits a un nombre reduït de funcions cel·lulars, com la síntesi de la paret bacteriana, replicació del DNA, transcripció i traducció (Moir *et al.*, 1999). La identificació de funcions cel·lulars no explorades com a dianes potencials és necessària per al desenvolupament de nous antibiòtics. En aquest punt, la genòmica ha esdevingut una nova estratègia per a la identificació de noves dianes que ha revolucionat totes les àrees terapèutiques, especialment el camp de la microbiologia.

El primer genoma bacterià totalment seqüenciat va ser el d'*Haemophilus influenzae* l'any 1995 (Fleischmann *et al.*, 1995), i actualment ja són més de cent els genomes bacterians completament seqüenciats disponibles en les bases de dades públiques. Aquesta gran quantitat d'informació ha impulsat el desenvolupament d'extensos programes per a cercar noves dianes, tant en la indústria com en el món acadèmic. Malgrat tot, aquest procés no és senzill, ja que s'han de tenir en compte molts criteris per a triar una diana i després s'han de desenvolupar diferents eines per a validar-la.

Elecció d'una nova diana antimicrobiana

A partir de la seqüència de DNA bacterià, i mitjançant programes bioinformàtics d'anàlisi i comparació de seqüències (Galperin, 2004), es poden localitzar els marcs oberts de lectura (ORF) i assignar-los possibles funcions per homologia amb altres proteïnes, per anàlisi dels dominis o per l'estructura de l'operó (McDevitt *et al.*, 2002). Dels milers d'ORF

nous identificats s'han de tenir en compte una sèrie de criteris per a poder triar els més indicats per a esdevenir una diana potencial. El primer dels criteris és l'espectre. Per al desenvolupament d'antibiòtics d'ampli espectre es poden identificar aquells gens que estan altament conservats en un gran nombre d'organismes patògens comparant múltiples seqüències genòmiques bacterianes i incloent-hi genomes de diferents soques de les mateixes espècies. En principi l'ampli espectre és el més buscat en un antibiòtic, atès que té un mercat major i, a més, seria d'elecció en els casos en què la teràpia s'hagués d'iniciar abans d'haver identificat l'agent causal de la infecció. De totes maneres, l'elecció de dianes d'espectre més reduït presenta l'avantatge de desenvolupar agents antimicrobians amb menors efectes secundaris, a causa de la conservació de la flora comensal i la menor aparició de resistències (McDevitt i Rosenberg, 2001). El segon criteri a tenir en compte és la selectivitat enfront de l'home. Gràcies a la seqüenciació del genoma humà (Venter *et al.*, 2001) es pot determinar la presència o no d'un gen concret o si les diferències són suficientment importants per a preveure que un compost serà selectiu entre la diana bacteriana i la humana.

Un cop definit l'espectre i la selectivitat, s'ha de definir l'essencialitat de la diana. Mitjançant diferents tecnologies que es discutiran al següent apartat de validació de noves dianes, s'ha de determinar el paper essencial de la nova diana en el creixement o la viabilitat cel·lular. Sembla raonable pensar que els gens que resulten essencials per al creixement o la viabilitat en medis de cultiu del laboratori també ho seran a l'hoste infectat. Malgrat això, s'ha observat que determinats gens varien el seu patró d'expressió en un procés d'infecció, i aquells que resultaven essencials en les condicions experimentals del laboratori ja no ho són a l'hoste (Moir *et al.*, 1999; Rachakonda i Cartee, 2004). Per tant, aquest gen ha perdut el seu interès com a diana terapèutica.

Finalment, és important poder caracteritzar

funcionalment la nova diana, per desenvolupar assaigs bioquímics, si és possible en format de HTS, i poder mesurar l'activitat de diferents compostos químics (McDevitt i Rosenberg, 2001).

Validació de noves dianes terapèutiques

La validació d'una diana consisteix a determinar el seu paper essencial en la supervivència celular mitjançant diferents metodologies. Malgrat que el gen es trobi conservat en diferents espècies, establir l'essencialitat del gen en una soca bacteriana no implica l'essencialitat en la resta. Per tant, l'essencialitat d'una diana potencial s'ha de determinar en un ampli ventall d'espècies patògenes (Donadio *et al.*, 2002).

Algunes de les metodologies per a validar una diana es basen en la disrupció del gen i l'estudi de l'efecte de la pèrdua de funció del gen destruït sota diferents condicions de creixement. Les insercions que tinguin lloc en gens essencials conduiran a la mort del bacteri. Els mètodes que provoquen la disrupció d'un gen són ràpids i senzills. Exemples d'aquests mètodes són el test d'inserció de transposons (Miesel *et al.*, 2003; Gerdes *et al.*, 2002) o la mutagènesi per inserció de plasmidis (Link *et al.*, 1997; Vagner *et al.*, 1998). Ambdues tècniques es diferencien en el fet que la primera consisteix en la introducció aleatòria de transposons al llarg de tot el genoma bacterià, mentre que la inserció de plasmidis va dirigida a un gen en concret. A més, en la mutagènesi per inserció de plasmidi s'eviten els efectes polars que es poden produir en la inserció de transposons (Link *et al.*, 1997).

Altres metodologies per a validar una diana utilitzen soques mutants condicionals. Aquestes aproximacions permeten l'estudi de gens essencials gràcies al fet que en condicions de cultiu permissives, el gen s'expressa i la soca creix, mentre que en condicions més restrictives en què el gen no s'expressa, la soca no

sobreviu. La utilització de mutants condicionals permet identificar i caracteritzar gens essencials i compostos antimicrobians. Hi ha diferents estratègies dins els mutants condicionals, com a) els mutants termosensibles, en què s'introdueix una mutació que converteix la proteïna essencial en termolàbil (Schmid *et al.*, 1989); b) RNA antisentit, que inhibeix la traducció totalment o parcialment, tant *in vitro* com *in vivo* (Ji *et al.*, 1999) i c) el control de l'expressió gènica per substitució o disrupció del promotor endogen del gen diana per un promotor regulable mitjançant la incubació amb un inductor (Greendyke *et al.*, 2002). Aquestes metodologies s'utilitzen per a estudiar l'essencialitat d'un gen en concret, però també han estat adaptades, per exemple, en el cas d'empreses farmacèutiques per a la identificació massiva de multitud de gens essencials en una mateixa soca patògena (Forsyth *et al.*, 2002).

Mitjançant tècniques de genòmica s'han pogut identificar i validar dianes concretes, com la pèptid-deformilasa, i fins i tot vies bioquímiques senceres, com la ruta biosintètica dels àcids grassos bacterians, la via del corismat i la via del MEP per a la biosíntesi d'isoprenoides, exemplificats al final d'aquest treball.

FONTS D'ANTIMICROBIANS: PASSAT I FUTUR

L'ús de *compostos naturals* va ser l'estratègia dominant entre 1940 i 1960 en l'època daurada del descobriment d'antibiòtics. El descobriment de l'activitat antibacteriana dels productes naturals va facilitar el desenvolupament d'assaigs per a la purificació i caracterització de penicil·lines, cefalosporines, aminoglicòsids, tetraciclins, macròlids, etc. Els antibiòtics d'origen natural acostumen a tenir estructures i grups funcionals complexos per a la interacció específica o reconeixement per les dianes dels bacteris patògens. Aquestes estructures complexes normalment són produï-

des a gran escala per processos de fermentació, més que per síntesi. També, s'han utilitzat de base química per a crear posteriors generacions de *derivats semisintètics* que han arribat al mercat (Walsh, 2003).

Les fonts d'on normalment s'extreien aquests tipus de productes (fongs, bacteris i plantes medicinals) s'han esgotat després de cinquanta anys de rastreig intensiu. Actualment hi ha empreses que criben l'activitat antibiòtica de compostos procedents d'orígens no explorats anteriorment, com organismes marins, pèptids procedents d'insectes, o plantes de diferents zones del món.

Cal també recordar i considerar que només una petita part dels microbis existents són cultivables en laboratori. Això fa que més del 90% del metagenoma, o conjunt de genomes del total de microbis presents en la natura, sigui desconegut, i és una font de dianes i de productes naturals (Daniel, 2004) encara per explotar. Mitjançant el clonatge de grans fragments (50-100 kb) de DNA a partir de microbis aïllats en entorns naturals, i la seva expressió en un microorganisme de laboratori com *E. coli*, s'han pogut identificar nous gens. Aquesta aproximació és molt nova i malgrat la gran quantitat d'esforços invertits, encara no ha permès revelar noves estructures químiques.

La segona línia de descobriment d'antibiòtics van ser els *antibacterians sintètics* procedents d'estructures que no es troben a la natura. En són exemple les sulfonamides, les fluoroquinolones i les oxazolidinones, la darrera família d'antibiòtics descoberta i que té el linezolid (Zyvox®) com a únic representant en el mercat.

L'habilitat de la *química combinatòria* de sintetitzar ràpidament un nombre elevat de compostos diferents ha permès generar una gran quantitat de quimiotèques de compostos sintètics, que són el punt de partida per a la cerca i l'optimització de nous antibacterians. La metodologia que s'utilitza per a la síntesi d'una àmplia matriu de compostos és un procés ite-

ratu d'enllaçar peces (*building blocks*). Es van creant noves estructures basades en la seqüència o disposició de les unitats monomèriques que s'han afegit, i un cop testejades les seves activitats biològiques es poden convertir en *lead compounds*.

La validesa de la química combinatorial realment radica en la diversitat dels compostos creats i en la utilització de tècniques de HTS que fa que sigui avaluada la possible activitat biològica d'aquests milers o milions de compostos en un període de temps relativament curt.

Les quimiotèques petites es consideren més adequades per a explorar farmacòfors específics (grups estructurals amb activitat biològica) i han representat un gran impacte en els projectes de recerca d'antibiòtics basats en el mecanisme d'acció (Trias, 2001). Les quimiotèques de molts compostos, en canvi, posseeixen una diversitat estructural molt gran i són més adequades per a projectes dirigits a identificar un *lead* o un *hit*, amb els quals es pot iniciar un programa de química mèdica.

També s'ha utilitzat la química combinatorial per a augmentar la diversitat al voltant d'antibiòtics existents, com els β -lactàmics i les quinolones, però és difícil trobar noves molècules al voltant de les classes extensament explorades en el passat. A més, l'elevat nombre de publicacions és una barrera per a la patentabilitat de les noves molècules. Els projectes que, en canvi, explorin la diversitat química al voltant dels nous antibiòtics (p. ex.: oxazolidinones) segurament tindran major probabilitat d'èxit.

Rastreig d'alt rendiment

Per a poder avaluar l'activitat biològica de les quimiotèques diverses davant les dianes potencials s'han desenvolupat mètodes d'alt rendiment que permeten el cribratge d'un gran nombre de productes, i a més en un període de temps raonable. Els mètodes clàssics

consisteixen a testejar els candidats a fàrmacs utilitzant cèl·lules o organismes sencers (*whole-cell scanning*). Com a avantatge tenen que es criben moltes dianes alhora i de manera senzilla i, com a desavantatge, que s'han de superar les barreres naturals d'accés a totes (embolcalls cel·lulars, degradació enzimàtica...). Amb aquests mètodes s'obtenen productes amb activitat final, tot i que sense coneixement sobre el mecanisme d'acció, a diferència de quan es fa el rastreig amb dianes aïllades. L'avantatge d'utilitzar dianes aïllades per al rastreig de compostos és que es posa en contacte directe el potencial inhibidor amb la diana, mentre que el desavantatge és que segurament qualsevol producte actiu haurà de ser químicament optimitzat perquè mantingui l'activitat en els organismes sencers després de travessar les barreres naturals. Els assaigs amb dianes aïllades i amb mètodes de rastreig d'alt rendiment permeten avui cribar tantes dianes quasi com amb les cèl·lules completes, i alhora disposar de coneixement sobre el mecanisme d'acció d'un compost (Schmidt, 2004).

Un altre tipus de rastreig és el que s'utilitza quan es disposa d'una proteïna diana lliure en solució i de sistemes automàtics d'identificació de lligands. S'anomena *rastreig amb afinitat pel lligand* i estan sent utilitzats per companyies de biotecnologia.

Una altra possibilitat és el *rastreig virtual* (*in silico*), que implica l'avaluació de les estructures químiques segons un model computacional. Aquest model pot ser una equació tradicional QSAR, un farmacòfor 3D, o l'acoblament a una estructura cristal·lina d'una proteïna. Les familiars regles de Lipinski o àrea de superfície polar són eines per a calcular l'absorció, i són també exemples de rastreig virtual. El dogma principal del disseny de productes basat en l'estructura és l'obtenció de l'estructura tridimensional de la diana que s'utilitza per a fer rastreig. La situació òptima és disposar del complex diana-inhibidor, ja que permet la identificació del lloc actiu. Es construeix un algorisme

que s'utilitzarà per a poder predir l'acoblament de molècules al lloc actiu de la diana i es necessita disposar d'accés a una sèrie de quimioteques; per mitjà d'una computadora potent es podran escanejar *in silico* grans quantitats de molècules d'acord amb la disponibilitat de l'estructura tridimensional. Cal puntualitzar que el rastreig virtual no substitueix mai el rastreig *in vitro* real; s'utilitza per a identificar noves estructures que puguin complir un determinat perfil entre bases de dades de compostos existents, sense requerir una mostra física de la molècula per a ser criada.

Tot i aquests aspectes prometedors, encara no s'ha desenvolupat cap antibiòtic a partir de les aproximacions combinatòries i de l'ús massiu de tècniques de rastreig. Una de les possibles raons és que el disseny de derivació química dels compostos de les quimioteques és massa a l'atzar i no es basa en el coneixement precís dels mecanismes de resistència. Conseqüentment, és raonable també escollir estratègies més racionals per a investigar l'estructura de les dianes bacterianes alhora que s'intenten entendre precisament quines propietats són interessants per a dissenyar les modificacions químiques, com ha passat en el cas de la vancomicina (Nicolaou, 2001). Aquestes tècniques permetran que quimioteques de bilions d'estructures teòriques siguin testejades en funció de la seva capacitat d'encaixar en un determinat receptor bacterià. De la mateixa manera, i com ja hem dit, les eines de preselecció poden ajudar a crear quimioteques més focalitzades i, així, reduir el nombre de compostos a sintetitzar (Rusinko *et al.*, 2002).

DIANES POTENCIALS EN EL DESCOBRIMENT DE NOUS ANTIMICROBIANS

Durant tot aquest temps s'ha anat treballant en la recerca d'antibacterians derivats d'estructures conegudes o inhibidors de dianes

considerades essencials per a la viabilitat cel·lular. Actualment s'ha ampliat la recerca a la possibilitat d'inhibir altres dianes que no afecten les funcions metabòliques essencials, sinó factors responsables de la colonització tissular, superació del sistema immunitari de l'hoste, virulència, patogenicitat o comunicació cel·lular (Schmidt, 2004). Un avantatge d'aquest nou enfocament és que, en no representar funcions cel·lulars vitals, la inhibició d'aquests sistemes podria tenir menys incidència sobre els fenòmens de resistència.

Entre els processos essencials per a la supervivència cel·lular, la replicació del DNA i la síntesi proteica continuen sent una font de possibles noves dianes. En el cas de la replicació del DNA intervien vora trenta proteïnes amb un alt grau d'homologia entre bacteris, de manera que poden donar lloc a inhibidors d'ampli espectre. A més, gràcies a les noves metodologies de rastreig, s'han pogut desenvolupar assaigs en format de HTS, cosa que probablement aportarà nous compostos amb activitat antibacteriana en els propers temps.

Pel que fa a la síntesi proteica, ha estat font de molts grups d'antibacterians, com tetraciclins, macròlids, o les recents oxazolidinones. Actualment, la síntesi proteica s'està explorant per a la cerca de nous compostos des de diferents punts de vista. D'una banda, desenvolupant assaigs d'alt rendiment, igual que en el cas del procés de replicació; d'altra banda, i gràcies a la disponibilitat de l'estructura del ribosoma procariòtic (Ban *et al.*, 2000), hi ha empreses que estan desenvolupant rastreig *in silico* (com Rib-X). I per acabar, amb la introducció de la genòmica s'han identificat noves dianes potencials com la *peptid-deformilasa* (PDF), enzim procariòtic que intervé en l'eliminació de la formilmetionina de la proteïna naixent. L'èxit recent de l'ús d'un inhibidor de la PDF en un model d'infecció bacteriana vàlida aquest enzim com una nova diana per a antibiòtics (Clemens *et al.*, 2001)

La *divisió cel·lular* també és crítica per a la supervivència bacteriana, i és probablement un

dels processos que menys s'entenen fins ara, tot i que se sap que implica una xarxa d'interaccions proteïna-proteïna necessària per a la formació dels septes. Aquest procés és regulat, entre d'altres, per les proteïnes Fts. Una de les proteïnes involucrades, i que seria una diana potencial, és la FtsZ, ja que la seva concentració regula la freqüència de formació del septa previ a la divisió cel·lular (Lutkenhaus, 1993).

Les *cobertes i barreres de membrana* en bacteris són estructures interessants com a dianes en la recerca d'antimicrobians, com ho demostra el fet que al mercat hi ha nombrosos productes que interfereixen amb la seva estructura o el seu funcionament. Aquestes estructures no solament actuen com a barrera física, sinó que, a més, els bacteris són capaços d'expulsar productes a través d'aquestes, o de bloquejar-ne específicament l'entrada. El bloqueig dels sistemes expulsors de molècules, la desestabilització de la membrana externa o la interferència en diversos punts de la construcció de la paret cel·lular poden conduir a l'obtenció de bons candidats a antibiòtics.

Entre els enzims que participen en la síntesi de la paret bacteriana, la fosfo-N-acetilmuramyl-pentapèptid-translocasa (o translocasa 1) catalitza la primera reacció a la membrana de la *biosíntesi del peptidoglicà*. S'han descobert dos antibiòtics nucleòsids que inhibeixen aquest enzim, la mureidomicina A i la liposidomicina B (Brandish *et al.*, 1996) que, contràriament a la tunicamicina, inhibidor de la biosíntesi de glicoproteïnes de mamífers, no són tòxics en ratolins.

Un altre enzim essencial que participa en la síntesi de la paret, i per al qual s'estan desenvolupant inhibidors, és el producte del gen *murA*. Fins ara només es coneix la fosfomicina. Recents anàlisis dels genomes microbians han revelat que els cocs grampositius tenen dues còpies de *murA* (*murA1* i *murA2*) (Du *et al.*, 2000), i només la delecció de totes dues és letal. Per tant, els inhibidors que es desenvolupin han de ser capaços, igual que la fosfomicina, d'inhibir tots dos enzims.

Dins encara l'estructura de la paret bacteriana com a font de noves dianes, la recerca d'inhibidors dels sistemes d'efflux bacterians és una de les estratègies més atractives per als nous antimicrobians. Moltes de les bombes d'efflux estan àmpliament distribuïdes entre les cèl·lules procariotes, i els bacteris les utilitzen per a expulsar tant restes metabòliques i toxines com agents antimicrobians, cosa que contribueix a la resistència als antibiòtics en certes espècies bacterianes. S'han desenvolupat alguns inhibidors efectius fins al moment (Malléa *et al.*, 2003), però atès que hi ha una considerable redundància en l'existència de mecanismes d'efflux, els agents haurien d'inhibir-los tots per a ser efectius.

Entre els processos no essencials per a la supervivència cel·lular, un exemple de noves dianes són els sistemes de percepció de quòrum, o senyals cèl·lula-cèl·lula. Les poblacions bacterianes coordinen les seves activitats gèniques mitjançant la producció i intercanvi extracel·lular de molècules senyal o autoinductors (Schmidt, 2004). A més d'activitats com la simbiosi, motilitat, competència, conjugació, esporulació i producció d'antibiòtics, els autoinductors són també responsables de la formació de factors de virulència medicament rellevants (Branny *et al.*, 2001), i de la formació de biofilms per algunes soques. Els biofilms escuden o protegeixen els microbis de les defenses immunitàries de l'hoste, dels antibiòtics, i fins i tot dels desinfectants. Els anàlegs dels autoinductors són bons candidats a antibacterians, ja que bloquegen els llocs dels receptors sense induir l'activitat gènica (Schmidt, 2004).

Els sistemes de transducció de senyals de dos components (TCST) són sistemes d'interacció amb el medi extern (Roychoudhury *et al.*, 1993), que consisteixen en dues proteïnes anomenades sensor i regulador (transductor), i que controlen molts gens de virulència. Els bacteris els utilitzen per a monitoritzar el seu ambient extern i adaptar-se per a la supervivència. Aquest tipus de sistema en *P. aeruginosa*, per exemple, condueix a la síntesi d'una

coberta bacteriana d'exopolisacàrids que té un paper crític en la patogènesi de la fibrosi cística. Un inhibidor de sistemes TCST podria ser d'ampli espectre i selectiu, i segurament seria capaç de comprometre l'adaptació i supervivència bacteriana en qualsevol ambient.

També s'estan dedicant molts esforços a la investigació de determinades vies metabòliques com a possibles dianes antibacterianes. La genòmica bacteriana ha proporcionat un gran coneixement de la via biosintètica dels àcids grassos bacterians, de la via del corimat i de la biosíntesi d'isoprenoides. També s'han trobat atractives altres vies, com les de síntesi de glicogen i secreció de proteïnes.

La biosíntesi lipídica o d'àcids grassos és duta a terme pel sistema FAS o de la sintasa d'àcids grassos. En mamífers trobem el sistema FAS de tipus I, mentre que en bacteris, protozous i plantes existeix el sistema FAS II. La validació de la síntesi bacteriana dels àcids grassos com a diana antimicrobiana s'ha demostrat recentment en descobrir el mecanisme d'acció de la isoniazida i amb la detecció de dos leads que inhibeixen l'enzim FabI del sistema FAS II, i que tenen activitat antibacteriana (McDevitt *et al.*, 2002).

Una altra via essencial que s'ha revelat com a font de dianes antibacterianes és la via de la biosíntesi de corimat (McDevitt *et al.*, 2002). Els bacteris necessiten aquesta via per a la síntesi d'aminoàcids aromàtics, àcid p-aminobenzoic, vitamina K, ubiquinona i enterquelina. Els mamífers no posseeixen aquesta via i, per tant, és altament selectiva. És evident que els bacteris no poden obtenir els productes finals dels hostes, de manera que és essencial per a créixer *in vivo* i per a mantenir la infecció. Aquesta essencialitat s'ha demostrat predominantment en gramnegatius, en els quals una mutació o deleció d'un dels gens, com l'EPSP-sintasa, dona lloc *in vivo* a soques altament atenuades pel que fa a la seva virulència. S'ha desenvolupat un assaig en format de HTS per a la detecció de l'activitat EPSP-sintasa de *S. pneumoniae*, que s'espera que serveixi per

a detectar antibiòtics que serien d'ampli espectre.

Per a la biosíntesi d'isoprenoides s'han descrit dues vies: la clàssica del *mevalonat* i la més recentment identificada com a la del *no-mevalonat* o *via del metileritritol* (MEP). La via del mevalonat es troba en animals, fongs, citoplasma de les plantes, arquees i alguns eubacteris (Wilding *et al.*, 2000). Mitjançant anàlisis genòmiques comparatives s'han identificat tots els enzims de la via en estreptococs, estafilococs i enterococs, i s'ha comprovat que són suficientment diferents dels de mamífers, de manera que hi ha un racional de selectivitat potencial d'aquesta diana. La via del MEP és present en eubacteris (pràcticament en tots els gramnegatius —excepte *Borrelia burgdorferi*— i alguns grampositius —*Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*...—), en alguns eucariotes unicel·lulars, en el paràsit responsable de la malària *Plasmodium falciparum* i als cloroplasts de tots els organismes fotòtrofs (Rodríguez-Concepción i Boronat, 2002); en canvi, no és utilitzada pels mamífers per a sintetitzar isoprenoides. Tots els enzims de la via del MEP són, per tant, dianes potencials per a antibacterians, productes antimalàrics i herbicides (Rodríguez-Concepción, 2004). Recentment s'ha afegit un nou candidat com a diana potencial en la síntesi d'isoprenoides, una isopentenil-difosfat isomerasa que, diferentment de les descrites fins ara, és essencial per a la viabilitat cel·lular (Rohmer, 2004).

A part de noves dianes potencials, també hi ha molts exemples de noves famílies de compostos com a possibles antimicrobiàns. S'està estudiant, per exemple, la possible activitat antimicrobiana dels *anàlegs dels nucleòsids* (Rachakonda i Cartee, 2004). Compostos d'aquest tipus han mostrat una moderada o bona activitat davant algunes soques bacterianes. Els 5'-peptidilnucleòsids semblen una classe interessant, i tenen com a diana l'enzim PDF. Recentment, la informació genètica i la comparació de les vies corresponents i de les funcions individuals entre els patògens i l'hos-

te humà han centrat l'atenció en el metabolisme de cofactors adenilats, com el NAD(P), el coenzim A i el dinucleòtid d'adenina i flavina (FAD), ja que també podrien actuar com a dianes potencials per als antibacterians. A més, es creu que inhibidors de les vies bacterianes involucrades en la síntesi o utilització del NAD i d'altres cofactors adenilats podrien ser específics i és probable que siguin del tipus nucleòsid o anàleg de nucleòsid.

Una altra aproximació investigada és el desenvolupament d'*oligonucleòtids antisentit* que s'uneixin a segments crítics de DNA o RNA a la cèl·lula bacteriana. Entre tots els possibles problemes, la dificultat per a l'entrega intacta dels oligonucleòtids a les dianes intracel·lulars sembla la més important, tot i que podria ser superada en un futur utilitzant liposomes o bacteriòfags. El problema de la inestabilitat química o metabòlica dels oligonucleòtids podria solucionar-se sintetitzant oligòmers morfolino-antisentit, que serien molt més estables que els clàssics oligonucleòtids.

Fa ja un temps que es disposa de *quimioteques peptídiques*. Els pèptids naturals posseeixen *per se* activitat antimicrobiana, ja que són part de les defenses innates dels hostes. La química per a sintetitzar quimioteques peptídiques està ben establerta, i es disposa de l'activitat antimicrobiana de moltes quimioteques. Els pèptids antimicrobiàns són sovint agents actius contra membrana i poden formar canals transmembranosos ocasionals, però molts tenen també activitat hemolítica i són tòxics. Un objectiu, sembla que possible, serà que l'acció sobre membranes sigui selectiva per a bacteris i no afecti mamífers, de manera que no presentin toxicitat i es puguin utilitzar per a la recerca d'antibacterians.

CONCLUSIONS

Clarament hi ha una necessitat creixent d'antimicrobiàns capaços de combatre les infeccions causades per bacteris resistents a al-

tres fàrmacs. Per això, la recerca de nous antibiòtics ha de ser l'objectiu dels esforços de les indústries farmacèutiques i de la comunitat científica en els nostres dies per intentar aturar aquest problema creixent.

La genòmica ens proporciona una gran quantitat de noves dianes potencials, des de molts aspectes diferents de la fisiologia cel·lular bacteriana. També, les noves tecnologies de rastreig i de síntesi aporten diversitat i la possibilitat d'estudiar gran nombre de compostos davant un important grup de dianes validades. El repte actual és l'optimització d'aquesta fase inicial de descobriment fins a fer els *leads* adequats per a la seva avaluació clínica. Aquesta tasca complexa implica combinar en la mateixa molècula diverses característiques, com la potència davant la diana en l'organisme clau, l'activitat antimicrobiana tant en el cultiu cel·lular com durant la infecció, la manca d'interacció amb el CitP450 humà, juntament amb propietats farmacocinètiques idònies.

Factors com l'alt cost del desenvolupament dels fàrmacs, la curta durada dels tractaments antibacterians i l'elevat nombre de compostos existents i de dianes ja explorades, han provocat una disminució de l'interès de les indústries farmacèutiques en aquest camp. Malgrat això, sembla possible arribar a obtenir compostos interessants dels esforços que avui dia s'inverteixen en la recerca de nous antimicrobians.

Noves estratègies en la recerca d'antibacterians han estat donades per l'evolució en biotecnologia, biologia molecular, química combinatorial i rastreig d'alt rendiment, juntament amb l'exploració de noves fonts de productes. La combinació d'aquestes noves eines amb les tècniques clàssiques de recerca d'antibiòtics fan possible creure en una propera revolució de la teràpia antimicrobiana.

Hem de fer també èmfasi en el fet que una de les principals raons pel a l'accelerat desenvolupament i disseminació de resistències, a més de l'enorme creixement mundial i l'era

de les comunicacions, és l'augment de la pressió global selectiva a través de l'ús inadequat d'antibacterians en la teràpia humana i l'abús com a acceleradors del creixement en animals de granja. Per tant, destacarem que, tot i trobar nous antibacterians, la recerca ha d'anar acompanyada de l'esforç dels governs, de les autoritats legislatives i de la comunitat mèdica per poder garantir l'ús apropiat d'antibacterians sota la vigilància de les recomanacions de l'Organització Mundial de la Salut. Sembla ser aquest l'únic camí per a guanyar o, almenys controlar, la cursa contra la supremacia microbiana en les infeccions.

BIBLIOGRAFIA

- BAN, N.; NISSEN, P.; HANSEN, J.; MOORE, P. B.; STEITZ, T. A. (2000). «The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution». *Science*, vol. 289, pàg. 905-920.
- BASBAUM, A. (2003). «Anadys Pharmaceuticals, Inc.» *Pharmacogenomics*, vol. 4, pàg. 511-518.
- BRANDISH, P. E.; KIMURA, K. I.; INUKI, M.; SOUTHGATE, R.; LONSDALE, J. T.; BUGG, T. D. (1996). «Modes of action of tunicamycin, liposidomycin B, and mureidomycin A: inhibition of phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide translocase from *Escherichia coli*». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 40, pàg. 1640-1644.
- BRANNY, P.; PEARSON, J. P.; EVERETT, C. P.; KÖHLER, T.; IGLEWSKY, B. H.; DELDEN, C. VAN (2001). «Inhibition of quorum sensing by a *Pseudomonas aeruginosa* dksA homologue». *J. Bacteriol.*, vol. 183, pàg. 1531-1539.
- CLEMENTS, J. M.; BECKETT, R. P.; BROWN, A.; CATLIN, G.; LOBELL, M.; PALAN, S.; THOMAS, W.; WHITAKER, M.; WOOD, S.; SALAMA, S. [et al.] (2001). «Antibiotic activity and characterization of BB-3497, a novel peptide deformylase inhibitor» *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 45, pàg. 563-570.
- DANIEL, R. (2004). «The soil metagenome—a rich resource for the discovery of novel natural products». *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 15, pàg. 199-204.
- DONADIO, S.; CARRADO, L.; BRANDI, L.; SERINA, S.; SOFFIENTINI, A.; RAIMONDI, E.; MONTANINI, N.; SOSIO, M.; GUALERZI, C. O. (2002). «Targets and assays for discovering antibacterial agents». *Journal of Biotechnology*, vol. 99, pàg. 175-185.
- DOUTHWAITE, S.; CHAMPNEY, W. S. (2001). «Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site». *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 48, pàg. 1-8.

- DU, W.; BROWN, J. R.; SYLVESTER, D. R.; HUANG, J.; CHALKER, A. F.; SO, C. Y.; HOLMES, D. J.; PAYNE, D. J.; WALLIS, N. G. (2000). «Two active forms of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase in gram-positive bacteria». *J. Bacteriol.*, vol. 182, pàg. 4146-4152.
- FLEISCHMANN, R. D.; ADAMS, M. D.; WHITE, O.; CLAYTON, R. A.; KIRKNESS, E. F.; KERLAVAGE, A. R.; BULT, C. J.; TOMB, J. F.; DOUGHERTY, B. A.; MERRICK, J. M. [et al.] (1995). «Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd». *Science*, vol. 269, pàg. 496-512.
- FORSYTH, R. A.; HASELBECK, R. J.; OHLSSEN, K. L.; YAMAMOTO, R. T.; XU, H.; TRAWICK, J. D.; WALL, D.; WANG, L.; BROWN-DRIVER, V.; FROELICH, J. M. [et al.] (2002). «A genome-wide strategy for the identification of essential genes in *Staphylococcus aureus*». *Mol. Microbiol.*, vol. 43, pàg. 1387-1400.
- GALPERIN, M. Y. (2004). «The molecular biology database collection: 2004 update». *Nucl. Acids Res.*, vol. 32, pàg. D3-D22.
- GERDES, S. Y.; SCHOLLE, M. D.; D'SOUZA, M.; BERNAL, A.; BAEV, M. V.; FARRELL, M.; KURNASOV, O. V.; DAUGHERTY, M. D.; MSEEH, F.; POLANUYER, B. M. [et al.] (2002). «From genetic footprinting to antimicrobial drug targets: examples in cofactor biosynthetic pathways». *J. Bacteriol.*, vol. 184, pàg. 4555-4572.
- GREEN, D. V. S. (2003). «Virtual screening of virtual libraries». *Progress in Medicinal Chemistry*, vol. 41, pàg. 61-97.
- GREENDYKE, R.; RAJAGOPALAN, M.; PARISH, T.; MADIRAJU, M. V. (2002). «Conditional expression of *Mycobacterium smegmatis* dnaA, an essential DNA replication gene». *Microbiology*, vol. 148, pàg. 3887-3900.
- JI, Y.; MARRA, A.; ROSENBERG, M.; WOODNUTT, G. (1999). «Regulated antisense RNA eliminates alpha-toxin virulence in *Staphylococcus aureus* infection». *J. Bacteriol.*, vol. 181, pàg. 6585-6590.
- LINK, A. J.; PHILLIPS, D.; CHURCH, G. M. (1997). «Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization». *J. Bacteriol.*, vol. 179, pàg. 6228-6237.
- LUTKENHAUS, J. (1993). «FtsZ ring in bacterial cytokinesis». *Mol. Microbiol.*, vol. 9, pàg. 403-409.
- MALLÉA, M.; MAHAMOUD, A.; CHEVALIER, J.; ALIBERT-FRANCO, S.; BROUANT, P.; BARBE, J.; PAGÈS, J. M. (2003). «Alkylaminoquinolines inhibit the bacterial antibiotic efflux pump in multidrug-resistant clinical isolates». *Biochem. J.*, vol. 376, pàg. 801-805.
- MCDEVITT, D.; PAYNE, D. J.; HOLMES, D. J.; ROSENBERG, M. (2002). «Novel targets for the future development of antibacterial agents». *Journal of Applied Microbiology Symposium*, vol. 92 (supl.), pàg. 285-345.
- MCDEVITT, D.; ROSENBERG, M. (2001). «Exploiting genomics to discover new antibiotics». *Trends in Microbiology*, vol. 9, pàg. 611-617.
- MIESEL, L.; GREENE, J.; BLACK, T. A. (2003) «Genetic strategies for antibacterial drug discovery». *Nature*, vol. 4, pàg. 442-456.
- MOIR, D. T.; SHAW, K. J.; HARE, R. S.; VOVIS, G. F. (1999). «Genomics and antimicrobial drug discovery». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 43, pàg. 439-446.
- NICOLAOU, K. C. (2001). «Behind enemy lines». *Sci. Am.*, vol. 284, pàg. 46-53.
- POWERS, J. H. (2003). «Development of drugs for antimicrobial-resistant pathogens». *Curr. Opin. Infect. Dis.*, vol. 16, pàg. 547-551.
- PROJAN, S. J. (2003). «Why is Big Pharma getting out of antibacterial drug discovery?» *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 6, pàg. 427-430.
- RACHAKONDA, S.; CARTEE, L. (2004). «Challenges in antimicrobial drug discovery and the potential of nucleoside antibiotics». *Current Medicinal Chemistry*, vol. 11, pàg. 775-793.
- RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. (2004) «The MEP pathway: a new target for the development of herbicides, antibiotics and antimalarial drugs». *Curr. Phar. Design*, vol. 10, pàg. 2391-2400.
- RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; BORONAT, A. (2002) «Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics». *Plant Physiol.*, vol. 130, pàg. 1079-1089.
- ROHMER, M.; GROSDEANGE-BILLIARD, C.; SEEMANN, M.; TRITSCH, D. (2004). «Isoprenoid biosynthesis as a novel target for antibacterial and antiparasitic drugs». *Current opinion in investigational drugs*, vol. 5, pàg. 154-162.
- ROYCHOUDHURY, S.; ZIELINSKI, N. A.; NINFA, A. J.; ALLEN, N. E.; JUNGHEIM, L. N.; NICAS, T. I.; CHAKRABARTY, E. M. (1993). «Inhibitors of two-component signal transduction systems: inhibition of alginate gene activation in *Pseudomonas aeruginosa*». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 90, pàg. 965-969.
- RUSINKO, A.; YOUNG, S. S.; DREWRY, D. H.; GERRITZ, S. W. (2002). «Optimization of focused chemical libraries using recursive partitioning». *Comb. Chem. High Throughput Screen*, vol. 5, pàg. 125-133.
- SCHMID, M. B.; KAPUR, N.; ISAACSON, D. R.; LINDROOS, P.; SHARPE, C. (1989). «Genetic analysis of temperature-sensitive lethal mutants of *Salmonella typhimurium*». *Genetics*, vol. 123, pàg. 625-633.
- SCHMIDT, F. R. (2004). «The challenge of multidrug resistance: actual strategies in the development of novel antibacterials». *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 63, pàg. 335-343.
- SPELLBERG, B.; POWERS, J. H.; BRASS, E. P.; MILLER, L. G.; EDWARDS JR., J. E. (2004). «Trends in antimicrobial drug development: implications for the future». *Clin. Infect. Dis.*, vol. 38, pàg. 1279-1286.
- SMOLINSKI, M. S.; HAMBURG, M. A.; LEDERBERG, J. (2003). *Microbial threats to health: emergence, detection, and response*. Washington, DC: Institute of Medicine.
- TRIAS, J. (2001). «The role of combichem in antibiotic discovery». *Curr. Opinion Microbiol.*, vol. 4, pàg. 520-525.

- VAGNER, V.; DERVYN, E.; EHRLICH, S. D. (1998). «A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*». *Microbiology*, vol. 144, pàg. 3097-3104.
- VENTER, J. C. [et al.] (2001). «The sequence of the human genome». *Science*, vol. 291, pàg. 1304-1351.
- WALSH, C. H. (2003). «Where will new antibiotics come from?» *Nature Reviews Microbiology*, vol. 1, pàg. 65-70.
- WILDING, E. I.; BROWN, J. R.; BRYANT, A. P.; CHALKER, A. F.; HOLMES, D. J.; INGRAHAM, K. A.; IORDANESCU, S.; SO, C. Y.; ROSERBERG, M.; GWYNN, M. N. (2000). «Identification, evolution and essentiality of the mevalonate pathway for isopentenyl diphosphate biosynthesis in gram-positive cocci». *J. Bacteriol.*, vol. 182, pàg. 4319-4327.
- YUAN, Z.; TRIAS, J.; WHITE, R. J. (2001). «Deformylase as a novel antibacterial target». *Drug Discov. Today*, vol. 6, pàg. 954-61.