

Tehnologija antibiotika

Biotehnološka proizvodnja antibiotika

Dr. sc. Jagoda Šušković, red.prof.

PRIPRAVA ANTIBIOTIKA ZA
MEDICINSKU I
NE-MEDICINSKU UPORABU

PRIPRAVA MEDICINSKIH OBLIKA ANTIBIOTIKA

- Završni stupanj u pripravi lijekova za primjenu u medicini i veterinarstvu
- Zahtjevi koji se postavljaju da bi antibiotik bio lijek; osim odgovarajuće aktivnosti prema patogenim mikroorganizmima (i stanicama karcinoma)
- 1. Niska toksičnost antibiotika i razgradnih proizvoda na ljudski organizam:
 - akutna i kronična toksičnost
- Ispituje se na pokusnim životinjama, a izražava se kao LD₅₀ (letalna doza za 50% pokusnih životinja) u mg antibiotika/kg tjelesne težine
- 2. Izražena antimikrobna aktivnost pri minimalnim koncentracijama/tjelesnih tekućina (oko 1 μg/ml).
- 3. Minimalna pojava rezistencije (stečena antibiotska rezistencija)
- 4. Dobra topivost u vodi pri odgovarajućem pH
- 5. Stabilnost pri skladištenju, primjeni
- 6. Optimalni uvjeti primjene (raspodjela, izlučivanje, sačuvanje antimikrobnog djelovanja u ljudskom organizmu)
- 7. Apirogenost-ne smije izazvati groznicu (povišenje tjelesne temperature za 0,6 °C) niti alergijske reakcije

- 8. Ne smije izazvati sekundarne efekte na:
 - stanice, krvni serum, leukocite
 - 9. Ne smije izazvati nus-pojave pri liječenju:
 - oštećenja organa ili funkcija organizma
 - antibiotici širokog spektra (tetraciklini) uništavaju simbiotsku mikrofloru crijeva pa se nasele kandidate iz usne šupljine
- Niti jedan antibiotik ne zadovoljava u potpunosti ove zahtjeve-možda PENICILIN koji može izazvati alergije (anafilaktički šok), i raširena je pojava rezistencije.

Farmaceutski oblici (preparati) antibiotika

- 1. Unutarnja primjena: tablete, dražeje, kapsule, granule, prašci, vodene suspenzije i sirupi
- 2. Injekcijski preparati: sterilni prašci u bočicama i ampulama
- 3. Vanjska primjena: masti, kreme, zubni konusi (u stomatologiji), ginekološki oblici, kapi za uho, grlo, nos, aerosoli (vanjske infekcije u kirurgiji)

Priprema tableta i kapsula

Antibiotik u želatinskim ili šećernim omotačima

- Sprječavanje: neprijatnog okusa i mirisa, nadraživanja sluzokože, preranog otapanja antibiotika u želucu

-Kiselo stabilne kapsule-otapaju se u crijevima hidrolitičkim enzimima (ne kiselinom u želucu): acetilftalil celuloza, ftalil dekstran

-Kapsuliranju ili tabletiranju podvrgavaju se: prašci antibiotika određene sipkosti ili granule

Uz dodatak:

1.Sredstva za razrjeđivanje (punila) koja osiguravaju dobro i brzo otapanje antibiotika (brzo raspadanje tableta) i daju stabilnost tabletama pri skladištenju (laktoza, škrob, talk, Ca-stearat)

2.Tekućine za postizanje granulacije: šećerni sirup, otopina škroba ili želatine, viši alkoholi

Nasipna masa praška ili granula važna pri priređivanju kapsula (volumen kapsule/volumen antibiotika).

Sirupi sadrže: prašak antibiotika, šećere (fruktoza, sorbitol), površinski aktivne tvari, konzervanse i stabilizatore.

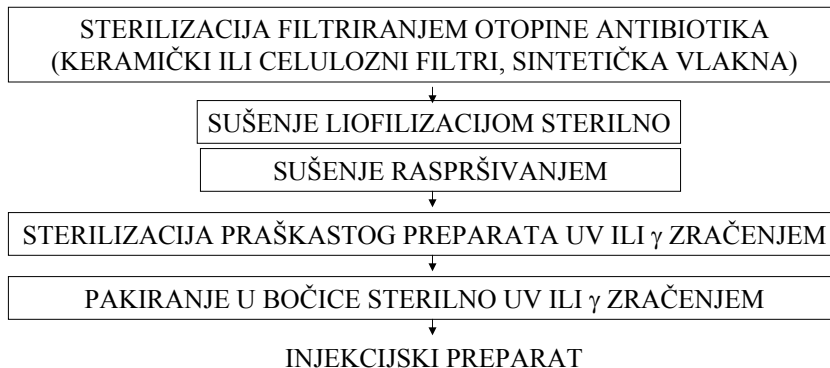
Priprava injekcijskih preparata

- u obliku praška (kristala) u bočicama ili ampulama

- vodene otopine antibiotika su nestabilne pa se primjenjuju rijetko

- pri pripremi injekcijskih preparata obavezna je sterilnost antibiotika

Schema pripreme injekcijskog preparata



Bočice, neoprenski čepovi i aluminijski zatvarači se također prethodno steriliziraju

Topivost injekcijskih preparata ovisi o načinu taloženja/kristalizacije

(kristali se brže otapaju od amornog taloga) i veličini kristala/čestica

Priprava masti i krema

- prašci antibiotika
- masna osnovica: vazelin, lanolin, parafin, polietilen oksid
- površinski aktivne tvari
- emulgatori
- stabilizatori

Potrebana sterilna priprava.

Priprava aerosola (sprejevi)

- za liječenje kožnih bolesti i infekcija, bolesti uha, grla, nosa i u kirurgiji
- antibiotik u obliku suspenzije, praška, kreme, masti
- propelanti ukapljeni (stlačeni) plinovi: N₂, CO₂, argon, propan, butan
- Dvije faze u posudi za aerosole: homogeni tekući plin (propelant), Otopina antibiotika u propelantu (smjesa izlazi iz posude dok postoji propelant u tekućem stanju).

4. NEMEDICINSKA UPOTREBA ANTIBIOTIKA

Krmiva u stočarstvu i peradarstvu

- stimulator je rasta stoke i peradi ako se dodaje s hranom (krmiva)
 - dodatak 20-50 g antibiotika/l tonu krmiva
 - efekt postignut dodatkom antibiotika: brži rast životinja, bolji prirast po jedinici mase hrane, ušteda krmiva, preventiva (sprječavanje) infekcija životinja
- Posebno epidemija u velikim hranilištima

Povećanje prirasta 10-20% uz iste uvjete

- nesilice-povećanje perioda nesenja jaja

Koriste se :bacitracin, tilozin, flavomicin, antibiotici koji se ne koriste u medicini zbog mogućnosti nastajanja rezistentnih mikroorganizama

Fitopatologija

- liječenje bolesti biljaka uzrokovanih: virusima, bakterijama, gljivama, protozoama
- liječenje bolesti biljaka u rasadnicima: sjemena (izvana ili iznutra) gomolja, lukovica, sadnica, supstrata
- način primjene. Prskanje, kvašenje, naprašivanje (supstrat, biljka, sjeme) zalijevanje (difuzija u cijelu biljku).
- koncentracije antibiotika u biljci

Lista antibiotika za humanu primjenu, najčešće primjenjivanih u kliničkoj praksi

ANTIBIOTICI S CITOSTATIČKIM I ANTITUMORNIM DJELOVANJEM

ANTIBIOTIC	PRODUCER STRAIN
Actinomycin	<i>S. antibioticus</i>
Adriamycin	<i>S. pucetius</i>
L-asparaginase	<i>E. coli</i>
Azaserine	<i>S. fragilis</i>
Bleomycin	<i>S. verticillus</i>
Carcinomycin	<i>S. carcinomyceticus</i>
Chromomycin	<i>S. griseus</i>
Cyclosporin	<i>Tolypocladium inflatum</i>
Daunomycin	<i>S. coreuleorubidus</i>
Macromomycin	<i>S. macromyceticus</i>
Mitomycin	<i>S. caespitosus</i>
Krestin	<i>Basidiomycete</i>
Neothramycin	<i>Streptomyces</i> sp.
Oxanosine	<i>Actinomycetes</i>
Pepleomycin	<i>S. verticillus</i>
Sarkomycin	<i>S. erythrochromogenes</i>
Sporamycin	<i>Streptosporangium pseudovulgare</i>
Streptozotocyn	<i>S. achromogenes</i>
Tallysomyin	<i>Streptoalloteichus hindustanus</i>

Antibiotici koji se primjenjuju u veterinarskoj medicini i kao promotori rasta životinja

Antibiotics	Class	Organism producing
Bacitracin	Peptide antibiotic complex	<i>Bacillus licheniformis</i>
Bambermycins	Substituted aminoglycosides	<i>Streptomyces bambergensis</i>
Efrotomycin	Natural product antibiotic	<i>Streptomyces lactamdurans</i>
Laidlomycin propionate K	Polyether ionophore	<i>Streptomyces</i> spp.
Maduramycin ammonium	Polyether ionophore	<i>Nocardia</i> spp.
Monensin sodium	Polyether ionophore	<i>Streptomyces cinnamonensis</i>
Narasin	Polyether ionophore	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Oleandomycin	Macrolide	<i>Streptomyces antibioticus</i>
Salinomycin	Polyether ionophore	<i>Streptomyces albus</i>
Tylosine phosphate	Macrolide	<i>Streptomyces fradie</i>
Virginiamycin	Macrolide	<i>Streptomyces virginiae</i>

Antibiotici koji se primjenjuju u fitopatologiji

Antibiotic, chemical type in ()	Organism producing	Uses
Blasticidin S (Nucleoside)	<i>S. griseochromogenes</i>	Rice fungicide against <i>Piricularia oryzae</i> (rice burn); relatively toxic
Polyoxin (Nucleoside)	<i>S. curacaoi</i> subsp. <i>asoensis</i>	Multi-purpose fungicide
Prumycin (Nucleoside)	<i>S. kagawaensis</i>	Fungicide against <i>Botrytis</i> and <i>Sclerotinia species</i>
Cycloheximide (Cycloalkane derivative)	<i>S. griseus</i>	Leaf fungicide, highly toxic to warm-blooded animals; aids harvesting
Kasugamycin (Aminoglycoside)	<i>S. kasugaensis</i>	Rice fungicide against <i>Piricularia oryzae</i>
Validamycin (Aminoglycoside)	<i>S. hygrosopicus</i> var. <i>limoneus</i>	Fungicide against <i>Rhizoctonia solani</i> (leaf dropping and stalk diseases; vegetable crops)
Tetranactin (Macrotetrolide)	<i>S. flaveolus</i>	Insecticide (mites)

Primjena antibiotika u prehrambenoj industriji i konzerviranju

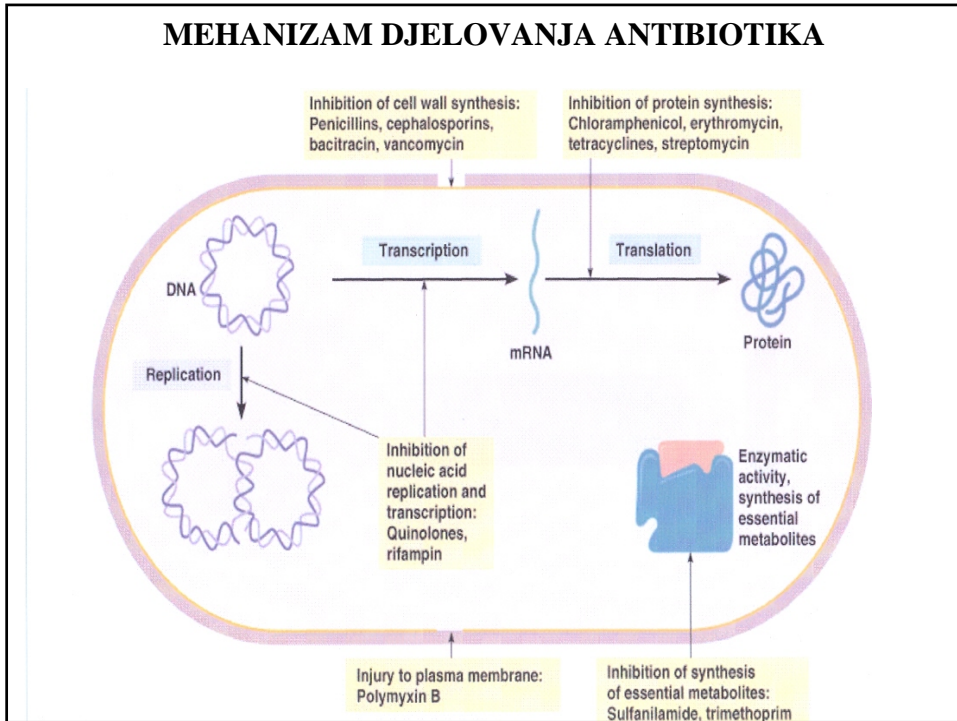
- Kvarenje hrane je uzrokovano mikroorganizmima i enzimima ili toksinima mikroorganizama
- Mali broj mikroorganizama se brzo razmnoži u namirnicama i uzrokuje kvarenje
- Koriste se antibiotici širokog spektra djelovanja i polipeptidni antibiotici; antibiotici iz biljaka (fitoncidi)
- Konzerviranje namirnica:
 - Preduga toplinska sterilizacija kvari ukus namirnica
 - Dodatak antibiotika skraćuje vrijeme sterilizacije (energetska ušteda)
 - Dodatak nisina, subtilina (polipeptidi) sprječava rast spora klostridija (termorezistentne).
- Mliječne prerađevine: sprječavanje klostridijskog napuhavanja sireva, jogurta, pudinga i sličnih namirnica (nisin)
- Pivarstvo i kultura kvasaca: dodatak polimiksina sprječava rast Gram-negativnih bakterija (bolje vrenje i mogućnost reciklacije kvasca)

MEHANIZAM DJELOVANJA ANTIBIOTIKA

MEHANIZAM DJELOVANJA ANTIBIOTIKA

- Omogućava racionalniji pristup pronalaženju novih i modificiranju postojećih antibiotika.
- Podjela prema mjestu djelovanja u stanici mikroorganizama:
 1. Antibiotici inhibitori biosinteze stanične stijenke
(penicilini, cefalosporini, cikloserin, bacitracin)
 - Onemogućavanje umrežavanja peptidoglikanskog sloja stanične stijenke bakterija što dovodi do autolize stanice
 2. Antibiotici inhibitori biosinteze proteina
(antibiotici širokog spektra djelovanja – tetraciklini, streptomycin, kloramfenikol)
 - Onemogućavaju proces očitavanja amino kiselina i sintezu peptida sa m-RNA u ribosomima
 3. Antibiotici inhibitori funkcije DNA:
(antitumorni antibiotici – aktinomycin, bleomicin, daunomicin)
 - Onemogućavaju sintezu nukleozida, replikaciju DNA, transkripciju m-RNA na DNA kalupu
 4. Antibiotici koji se vežu na citoplazmenu membranu:
(polipeptidni antibiotici: bacitracin, gramicidin, polimiksin, nisin)
 - dovode do disfunkcije citoplazmine membrane (osmotska barijera) i nekontroliranog prolaza otopljenih molekula u i iz stanice
- Rezistencija na antibiotike: stečena otpornost na antibiotike. Nastaje genetičkim promjenama u stanici mikroorganizma: spontanom mutacijom i prenošenjem ekstra kromosomalne DNA

MEHANIZAM DJELOVANJA ANTIBIOTIKA



1. Antibiotici inhibitori biosinteze stanične stijenke

Stanična stijenka - čvrsti omotač u stanicama bakterija, funga i biljaka, a nedostaje animalnim i humanim stanicama.

- Antibiotici najčešće djeluju na staničnu stijenku bakterija- onemogućuju biosintezu stanične stijenke, čime stanica gubi mehaničku čvrstoću, lizira i puca
- Antibiotici netoksični za ljude i životinje (nemaju stanice sa staničnom stijenkom)
- Mehanizam djelovanja antibiotika je utemeljen na sprječavanju sinteze peptidoglikanskog (mukopeptidnog, muerinskog) polimera u staničnoj stjenici bakterija koji daju čvrstoću staničnoj stijenki.

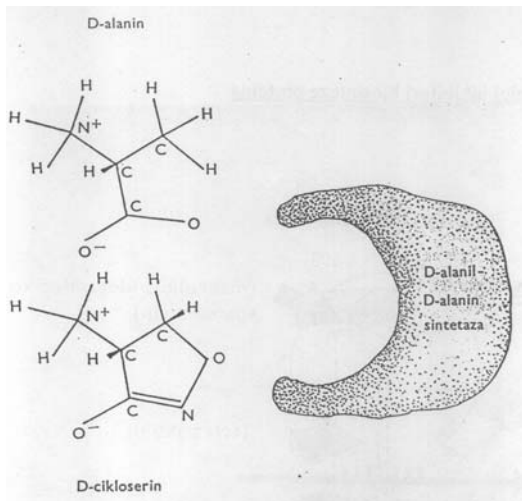
Gram- pozitivne bakterije (50-90% peptidoglikana) osjetljive na ovaj tip antibiotika

Gram-negativne bakterije (10% peptidoglikana)

- viši protisti imaju staničnu stijenku sasatvljenu od različitih polimera (polisaharidi: hemiceluloza, celuloza, glukani, manani)-antibiotici ne djeluju na ove organizme
- Penicilinski i cefalosporinski antibiotici su specifični inhibitori enzima (strukturni analozi D-alanil-D-alanina):

1. Peptidoglikan transpeptidaze enzima koji umrežava peptidoglikan vezanjem D-alanina i L-lizina
 2. D-alanin karboksipeptidaze koja otejepljuje posljednji D-alanin u nizu (slike 1. i 2.)
- cikloserin je specifični inhibitor D-alanil-D-alanin sintetaze (Sl.3) te se ne sintetizira pentapeptid.

-U prisustvu ovih antibiotika biosinteza peptidoglikana se ne završava, pa litički enzimi stanice započnu djelovati i u potpunosti razgrade peptidoglikane, te dolazi do lize stanica



3. Sličnost struktura D-cikloserina i D-alanina

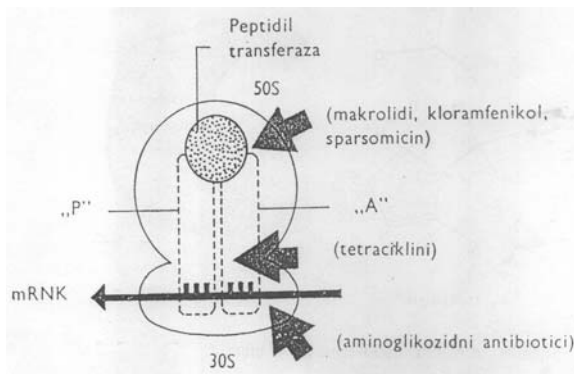
- Stanična stijenka funga je građena od hitina (poli N-Ac glukozamin) pa penicilin i srodni antibiotici ne djeluju na ove mikroorganizme.

Djeluju tzv. polioksini - vjerojatno interferiraju sa sintezom hitina

-Antibiotici koji se vežu na citoplazminu membranu

- često polipeptidni antibiotici: tirocidin, gramicidin, polimiksini, bacitracin i dr.
 - Vežu se s membranom i dezorganiziraju njenu funkciju –rezultat: slobodno istjecanje otopljenih tvari iz citoplazme u okoliš ili nekontrolirani ulazak tvari u stanicu – izaziva smrt mikroorganizma.
- Povezivanje citoplazme i polipeptidnih antibiotika uvjetuju:
 - ciklička građa ovih antibiotika
 - D-amino kiseline
 - slobodne bazične grupe (-NH₂)
- Antifungalni antibiotici (djeluju na kvasce i plijesni) djeluju na staničnu membranu funga (nistatin)
- Membrana sadrži sterole, a antibiotici sadrže velike laktonske prstene sa sekvencama dvostrukih konjugiranih veza (slični sterolima), te dolazi do disfunkcije membrane funga i smrti mikroorganizma.
- Toksični za ljude jer membrane stanica sisavaca sadrže sterole

2. Antibiotici inhibitori biosinteze proteina



4. Moguća mjesta djelovanja antibiotika na ribosomu mRNA= informacijska RNA, 30S i 50S = podjedinice ribosoma, "A" mjesto za prihvaćanje aa-tRNA, "P" = mjesto za prihvaćanje peptidil -tRNA

Antibiotici koji inhibiraju biosintezu proteina

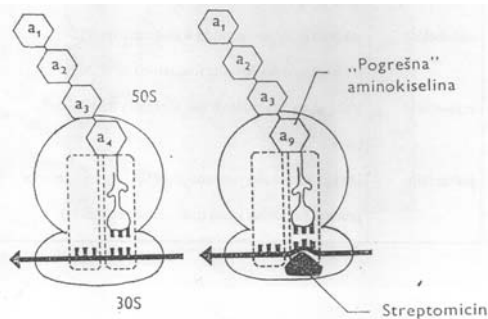
Antibiotik	Mehanizam djelovanja
Streptomycin	Inhibira inicijaciju i izaziva pogrešno čitanje mRNA (prokarioti)
Tetraciklin	Veže se na 30S-podjedinicu ribosoma i inhibira vezanje aminoacil-tRNA (prokarioti)
Kloramfenikol	Inhibira aktivnost peptidil-transferaze na 50S-ribosomskoj podjedinici (prokarioti)
Cikloheksimid	Inhibira aktivnost peptidil-transferaze na 60S-ribosomskoj podjedinici (eukarioti)
Eritromicin	Veže se na 50S podjedinicu i inhibira translokaciju (prokarioti)
Puromicin	Djeluje kao analog aminoacil t-RNA, pa zato izaziva prerani završetak lanca (prokarioti i eukarioti)

Streptomycin:

Uzrokuje konformacijske promjene na 30 S podjedinici ribosoma i mRNA - dolazi do izmjene kodona na mRNA i antikodona amino acil tRNA. Rezultat je krivo očitavanje aminokiselina i nefunkcionalnih proteina (Slika 5.)

Puromicin:

Ugrađuje se kao molekula aminoacil tRNA u peptidni lanac i uvjetuje završetak sinteze proteina. Strukturni je analog s aminoacil tRNA.



Slika 5. Ugradnja "pogrešne" aminokiseline u polipeptidni lanac $a_{1,2,3,4,9}$ = aminokiseline

Tetraciklini:

Natječu se s aminoacil tRNA za mjesto na kompleksu ribosom- mRNA i ometaju vezanje na mjesto "A" novopridošle aminoacil tRNA

Kloramfenikol:

Inhibira peptidil transferazu (50S podjedinicu) i produženje peptidnog lanca

Antibiotici koji inhibiraju biosintezu proteina su širokog spektra djelovanja. Većina djeluje na 70S ribosome, pa nisu toksični za ljude (80S ribosomi)

Antibiotici inhibitori funkcije DNA:

-često su i citostatici

-toksični i za ljude (uloga DNA je univerzalna biološka kategorija)

Dvije grupe ovih vrsta antibiotika:

- a. Djeluju na biosintezu purinskih i pirimidinskih nukleotida i nukleozida (građevnih jedinica) što onemogućava biosintezu DNA i RNA (azaserin, mikofenolna kiselina)
- b. Djeluju na polimerizaciju nukleotida, replikaciju DNA ili prepisivanje informacije genetičkog koda na RNA (aktinomicini, mitomicini, rifamicini).

a. Inhibitori biosinteze nukleotidnih prekursora**Azaserin:**

Kompetitivno inhibira aminaciju glutaminom u toku biosinteze gvanin i adenin nukleotida.

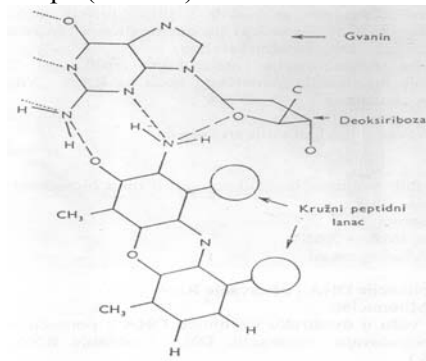
Mikofenolna kiselina:

Inhibira reakciju $IMP \rightarrow XMP$, tj. enzim IMP dehidrogenazu

b. Inhibitori replikacije DNA i transkripcije RNA

Aktinomicini i mitomicini:

Interkalarno se vežu u dvostruku uzvojnica DNA pomoću vodikovih veza i onemogućavaju: replikaciju DNA i transkripciju RNA s DNA kalupa (Slika 6.)



6. Model vezanja aktinomicina i deoksiribonukleinske kiseline

Rifamicin:

Inhibira prepisivanje genetičke informacije s DNA na mRNA. Rifamicin se ugrađuje umjesto prvog nukleotida u mRNA pomoću RNA polimeraze.

Biokemijski mehanizmi rezistencije na antibiotike:

1. Konverzija antibiotika u neaktivni oblik djelovanjem enzima
2. Modifikacija mjesta vezanja antibiotika
3. Gubitak permeabilnosti stanice za antibiotik
4. Povećanje nivoa enzima kojeg inhibira antibiotik
5. Povećanje koncentracije metabolita – antagonista antibiotiku
6. Mijenjanje inhibiranog metaboličkog puta (by-passing)
7. Smanjenje potrebe na proizvodu inhibiranog metaboličkog puta