

OMAGGIO A PAUL EHRLICH.

Oggi noi ci accingiamo a commemorare il centenario della nascita di Paul Ehrlich, fondatore della moderna chemioterapia antimicrobica. Nella storia della medicina terapeutica il significato di questa data non potrà mai esser sopravvalutato, poichè l'umanità deve a Paul Ehrlich — i cui lavori di pioniere nel campo della chemioterapia hanno avuto la più vasta influenza sugli sviluppi delle ricerche successive — alcuni dei più grandi trionfi della medicina sulle malattie infettive.

Quelli di noi che si occupano attivamente di ricerche chemioterapiche, ancor oggi, nel loro lavoro di ogni giorno, avvertono questa influenza e, quindi, il centenario della nascita di Paul Ehrlich rappresenta un evento di particolare importanza che ci tocca personalmente.

In questa così memorabile occasione l'assegnazione del premio Paul Ehrlich e l'invito a tenere la principale conferenza commemorativa rappresenta per me un onore ed un privilegio che apprezzo profondamente.

La chemioterapia antimicrobica, nel senso concepito da Ehrlich, è essenzialmente un metodo di trattamento delle infezioni microbiche per cui gli agenti patogeni invadenti vengono distrutti nell'interno dell'organismo ospite mediante sostanze antimicrobiche di costituzione chimica relativamente semplice e di tossicità sufficientemente bassa da non essere nociva.

Il tentativo di Ehrlich di incorporare in un composto organico l'arsenico metallico, la cui azione antispirochetica era nota sin dal Medioevo, in forma tale che, pur conservando la sua azione antispirochetica, fosse sufficientemente non tossico da poter trovare applicazione pratica nella clinica, ha portato alla scoperta del famoso composto 606, il Salvarsan, 606.mo composto da lui sperimentato e che si era mostrato efficace nel trattamento della sifilide. Questo suo lavoro è ormai troppo noto per essere ulteriormente commentato in questa occasione.

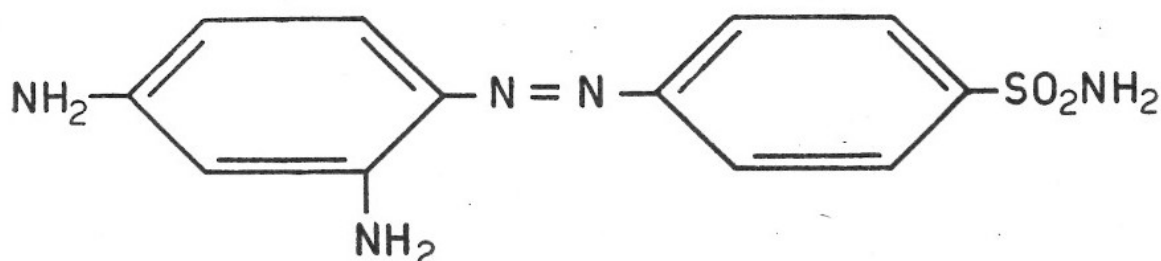
Dagli studi istologici di Ehrlich è derivato un altro importante punto di attacco ai problemi della chemioterapia microbica. Come è ben noto, con la scoperta della colorazione differenziale. Ehrlich ha contribuito in modo fondamentale al progresso dell'istologia.

Egli aveva osservato che molti dei coloranti anilini che usava per i suoi studi istologici, avevano una marcata attività antibatterica e questo

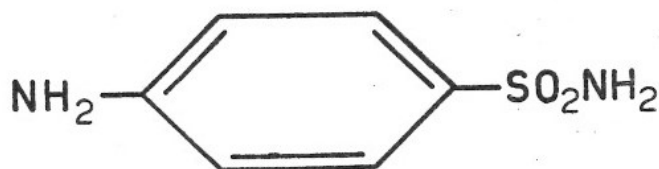
(*) Conferenza tenuta a Frankfurt am Mein il 14 marzo 1954 nella ricorrenza della celebrazione del centenario della nascita di Paul Ehrlich.

lo indusse a sperare che, così come esistevano coloranti che si fissavano esclusivamente su determinate cellule, o parti di cellule, lasciandone inalterate altre, un giorno si sarebbe potuto scoprire un colorante antibatterico che esercitasse un effetto tossico specifico sulla cellula microbica, senza agire sulla cellula animale.

Non v'è dubbio che tutto il lavoro di Paul Ehrlich sulla chemioterapia è strettamente legato ed è stato sensibilmente stimolato dallo straordinario sviluppo della chimica organica in Germania in quel periodo ed anche notevolmente facilitato dalla concomitante straordinaria espansione dell'industria tedesca dei coloranti.



PRONTOSIL

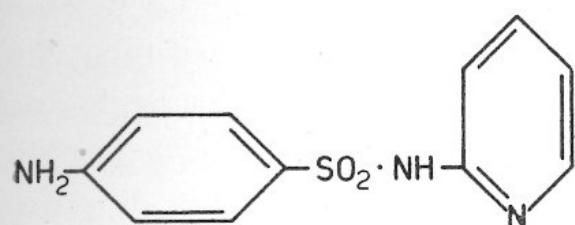


SULFANILAMMIDE

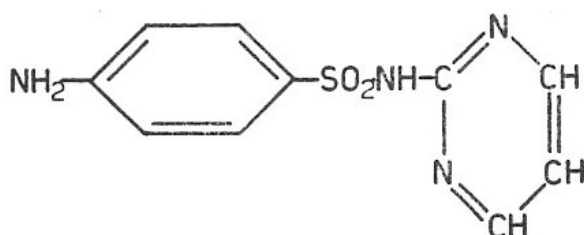
Fig. 1.

Ehrlich esaminò l'attività chemioterapeutica nelle infezioni batteriche dei numerosi coloranti anilini di cui disponeva, ma i risultati erano scoraggianti, poichè tutti si mostravano troppo tossici per l'applicazione clinica. Tuttavia, dopo la morte di Ehrlich si continuò secondo questa direttiva e nel 1935 DOMAGK scoprì che un azocolorante anilino, il prontosil (fig. 1), costituiva un efficace agente chemioterapeutico contro le infezioni streptococciche. Questa scoperta rappresentava una pietra miliare nello sviluppo della chemioterapia, poichè dimostrava, per prima volta, che la chemioterapia antibatterica era possibile. Tuttavia, alcuni mesi dopo la scoperta di DOMAGK, i TREFOUEL, D. BOVET e F. NITTI, dell'Istituto Pasteur di Parigi, dimostravano che, contrariamente all'ipotesi di EHRLICH, l'azione terapeutica del prontosil non era dovuta alla sua natura di colorante, ma risiedeva nella parte incolore della molecola, la sulfanilammide. La sulfanilammide è una sostanza estremamente semplice; sono stati sin-

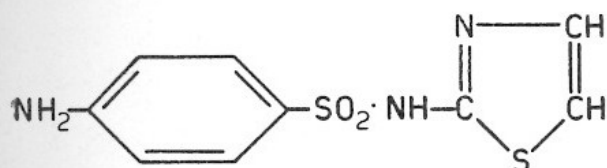
tetizzati migliaia di analoghi, tra cui parecchi possiedono un'azione chemioterapeutica in una gamma abbastanza estesa di infezioni batteriche.



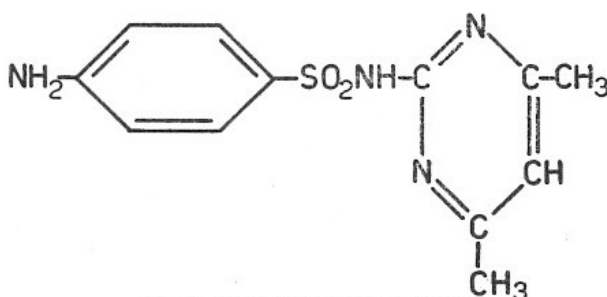
SULFOPIRIDINA



SULFODIAZINA



SULFOTIAZOLO



SULFOMETAZINA

Fig. 2.

Oggi noi siamo in grado di combattere la grande maggioranza delle più gravi infezioni batteriche, situazione che probabilmente va al di là delle più ottimistiche previsioni di EHRLICH. Questo rimarchevole successo deriva da due principali ed indipendenti linee di sviluppo. Di una di queste, lo sviluppo dei sulfoamidici, che deriva direttamente dalle idee avanzate da PAUL EHRLICH, ho già fatto cenno. L'elucidazione da parte di Woods del meccanismo di azione di queste sostanze, insieme con i sostanziali progressi della biochimica generale, ha aperto nuove vie di attacco con grandi possibilità potenziali per la chemioterapia.

L'altro importante sviluppo comincia con l'introduzione degli antibiotici nella medicina ed è principalmente di questo argomento che parlerò in questa mia conferenza.

L'ERA DEGLI ANTIBIOTICI - STORIA.

Le ricerche intensive sugli antibiotici iniziarono nel 1940, anno in cui FLOREY, io, ed i miei colleghi dell'Università di Oxford annunciammo

che la penicillina, prodotto del metabolismo del *Penicillium chrysogenum*, la cui esistenza era stata osservata undici anni prima dal batteriologo londinese ALEXANDER FLEMING, possedeva marcate proprietà curative nelle infezioni sperimentali in animali. Da allora in poi, l'aumento della letteratura sugli antibiotici mostra lo stesso andamento logaritmico che è caratteristico della curva della crescita dei batteri, così che oggi, anche per uno specialista in questo campo, è difficile seguire tutte le pubblicazioni sull'argomento, che ormai ammontano a molte migliaia di articoli.

In questa breve conferenza non mi è possibile passare in rassegna



Fig. 3.

l'intero campo degli antibiotici, ma mi limiterò a discutere alcuni dei risultati chimici e biologici di portata più generale.

Voglio cominciare con l'illustrare, in una breve introduzione storica, gli eventi che hanno portato alla scoperta delle proprietà chemioterapetiche della penicillina.

Il fenomeno per cui alcuni microorganismi sono capaci di inibire la crescita di altri microorganismi viene chiamato « antagonismo microbico » ed è stato descritto per la prima volta da PASTEUR e dal suo collaboratore JOUBERT nel 1877. Costoro avevano osservato che la crescita del *B. anthracis* veniva inibita da un bacillo non identificato, non patogeno, che avevano isolato dall'aria. Intuirono immediatamente la possibilità di sfruttare questo fenomeno per fini terapeutici ed infatti riuscirono ad inibire lo sviluppo dell'antrace nei conigli iniettando insieme al *B. anthracis* patogeno, il bacillo antagonista saprofita dell'aria. I risultati ottenuti li

indussero ad esprimersi in questi termini: « questi fatti forse giustificano il più grande ottimismo riguardo alla terapeutica ».

Le ricerche successive, sulla base delle osservazioni di JOUBERT e PASTEUR, hanno dimostrato che esistono diversi tipi di microorganismi, come batteri, muffe e lieviti, capaci di inibire la crescita di altri microorganismi. In molti casi si è visto che l'azione antagonistica di una specie microbica su un'altra è dovuta alla produzione di prodotti metabolici antibatterici da parte della specie antagonista. Questi prodotti microbici antibatterici sono noti col nome di « antibiotici », termine introdotto da WAKSMAN. L'idea di usare gli antibiotici nella medicina terapeutica non è nuova; i primi tentativi in questa direzione risalgono al 1899. La fig. 3 mostra una fotografia ripresa da un articolo pubblicato da EMMERICH nel 1907 nel *Münchener Medizinische Wochenschrift*, in cui egli illustra l'uso della piocianasi, miscela di antibiotici prodotti dal *P. pyocyanea*, nel trattamento della difterite. L'antibiotico è spruzzato localmente nella gola di un bambino per mezzo di un atomizzatore.

L'uso clinico di queste miscele di antibiotici continuò per molti anni, pur senza risultati soddisfacenti. I preparati di antibiotici allora usati non differivano sostanzialmente dai numerosi antiseptici allora noti, come ad es. il cloruro mercurico, lo iodio, la formalina, i saponi, le acridine ecc., tutti troppo tossici per essere usati come agenti chemioterapeutici. Questa era la situazione nel campo degli antibiotici alla fine del 1938.

In quell'anno ebbi occasione di rivedere la vecchia letteratura sulle sostanze antibatteriche prodotte da microorganismi. Risultò che, sebbene fossero state descritte molte di queste sostanze, poco si conosceva in relazione alle loro proprietà farmacologiche. Perciò, al fine di trovare nuovi tipi di sostanze antibatteriche e, quindi, di aprire nuove vie alla chimica organica ed alla biochimica che potessero portare allo sviluppo di nuovi preparati antibatterici, il Prof., ora « Sir HOWARD », FLOREY ed io alla School of Pathology di Oxford decidemmo di iniziare uno studio sistematico delle proprietà chimiche e farmacologiche delle sostanze antibatteriche prodotte da micro-organismi. Tra i numerosi esempi di antagonismo microbico riportati nella letteratura, la nostra attenzione fu attratta in modo particolare da uno descritto da FLEMING nel 1929. Egli aveva osservato che l'agar di una capsula di Petri impiegata per una coltura di stafilococchi si era incidentalmente contaminato con una muffa appartenente al genere *Penicillium*, e che, nelle vicinanze della muffa contaminante, le colonie di stafilococchi cominciavano a sparire (fig. 4). Questo antagonismo tra la muffa e gli stafilococchi era così pronunciato da meritare di essere ulteriormente studiato. FLEMING fece sub-culture della muffa facendola sviluppare sulla superficie di un mezzo di coltura liquido di tipo

comune. Così osservò che il liquido di coltura, dopo che la muffa aveva coperto la sua superficie, inibiva fortemente anche ad alte diluzioni la crescita, non solo degli stafilococchi, ma anche di molti altri batteri patogeni gram-positivi, mentre non agiva sui batteri gram-negativi, ad eccezione dei gonococchi e meningococchi. Evidentemente, la muffa aveva prodotto un principio antibatterico potente, ma, poichè a quel tempo la natura di tale principio non era nota, nè si sapeva se consistesse di una

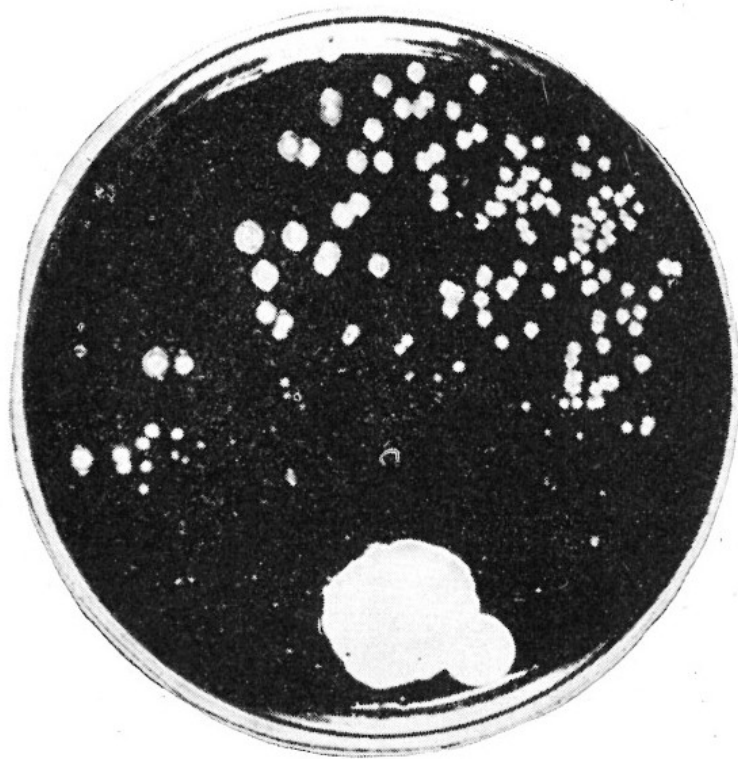


Fig. 4.

sola sostanza o di una miscela, FLEMING assegnò il nome « penicillina » non ad una particolare sostanza antibatterica, ma all'intero filtrato della coltura della muffa avente la proprietà di inibire la crescita dei batteri. Successivamente, il micologo americano THOM identificò la muffa come *Penicillium notatum*. FLEMING dimostrò che la « penicillina » poteva essere impiegata per il trattamento locale delle ferite infette, senza che si riscontrassero effetti tossici maggiori di quelli causati dai normali brodi di coltura; ma per questo stesso scopo potevano essere usati (ed infatti lo erano) molti altri antisettici. Perciò le osservazioni di FLEMING non suscitavano un interesse particolare, quantunque egli avesse chiaramente dimostrato che la « penicillina » differiva dagli antisettici noti nel fatto molto importante che non era tossica per i leucociti del sangue. Va ricordato che a quel tempo, sei anni prima dell'introduzione del prontasil da parte di DOMAGK e dei sulfamidici da parte di TREFOUEL, BOVET

e NITTI, l'atteggiamento della maggior parte dei batteriologi verso la chemioterapia batterica era assolutamente negativo e principalmente per questa ragione le osservazioni di FLEMING suscitavano un così scarso interesse.

L'esperimento cruciale per scoprire se la penicillina potesse essere usata internamente nelle infezioni batteriche come agente terapeutico nel senso di PAUL EHRLICH — esperimento che avrebbe posto la penicillina in una categoria fondamentalmente differente da tutte le altre sostanze antibatteriche allora note — non fu fatto, nè forse, avrebbe potuto esser fatto a quel tempo col brodo di coltura grezzo, senza che il principio antibatterico fosse stato isolato in forma almeno parzialmente purificata.

Una sostanza, perchè possa essere classificata come agente chemioterapeutico, deve soddisfare rigorosamente varie condizioni. Tra queste le due più importanti sono: 1) il suo potere antibatterico deve persistere nei tessuti senza notevole diminuzione; 2) nelle concentrazioni antibatteriche, non deve avere effetti tossici, non solo dopo una singola iniezione, ma anche dopo ripetute iniezioni per prolungati periodi di tempo.

Soltanto uno studio farmacologico dettagliato può indicare se una sostanza antibatterica possenga effettivamente tali proprietà ed è evidente che nel caso di un antibiotico è impossibile effettuare un tale studio impiegando il mezzo di coltura grezzo dell'organismo produttore l'antibiotico, senza aver precedentemente concentrato e purificato il prodotto metabolico antibatterico.

L'isolamento del principio antibatterico del *Penicillium notatum*, sia pure allo stato parzialmente purificato, non è stato un processo privo di difficoltà. Fu tentato nel 1932, tre anni dopo la scoperta di FLEMING, dal Professor RAISTRICK e collaboratori dell'Università di Londra, ma con scarso successo. Sembrò che il principio attivo fosse molto instabile e che venisse distrutto nelle condizioni in cui si tentava il suo isolamento dal mezzo di coltura. A causa di questi risultati scoraggianti, nel laboratorio di RAISTRICK si desistette dal continuare i lavori intrapresi per isolare il principio antibatterico del *Penicillium notatum*. Il fatto che il Professor RAISTRICK, pioniere nel campo dei prodotti del metabolismo delle muffe, che nel corso di molti anni di lavoro aveva isolato centinaia di queste sostanze e ne aveva chiarita la struttura chimica, non ritenesse opportuno perseverare nel suo lavoro, è senz'altro dovuto all'atteggiamento generalmente negativo dei batteriologi di quest'epoca verso la possibilità della chemioterapia antibatterica. Questo atteggiamento negativo era così profondamente radicato che nessuno allora sospettò, sia pure vagamente, che un prodotto come la « penicillina » potesse avere

proprietà fondamentalmente diverse da quelle di ogni altra sostanza antibatterica allora nota, tale da permettere il suo impiego nell'organismo umano nel trattamento clinico delle infezioni batteriche interne.

SCOPERTA DELL'AZIONE CHEMIOTERAPEUTICA DELLA PENICILLINA.

Per cominciare il nostro studio sistematico FLOREY ed io scegliemmo alcuni tra i numerosi esempi di antibiotici riportati nella letteratura, e tra questi la penicillina di FLEMING su cui ultimamente si concentrava la nostra attenzione. Questa scelta fu determinata da ragioni di carattere biochimico e biologico. La penicillina era uno dei pochi antibiotici su cui erano state fatte alcune osservazioni chimiche, sia pure molto incomplete, e le condizioni della sua produzione biologica sembrano riproducibili con relativa facilità. L'instabilità osservata da RAISTRICK, causa delle difficoltà incontrate nel suo isolamento, attrasse particolarmente il mio interesse di biochimico, perché mi sembrò che indicasse che il principio attivo aveva una struttura chimica non comune e finora non incontrata in alcun'altra delle sostanze antibatteriche note. FLOREY, invece, come patologo, fu attratto dal fatto che il principio era attivo contro gli stafilococchi, contro i quali a quel tempo non si conoscevano rimedi. Il lavoro sulla penicillina iniziò circa un anno prima della guerra e, quindi, non è stato stimolato, come spesso si è detto, dalla necessità di trovare nuovi e più efficaci metodi per il trattamento delle ferite di guerra. La decisione di riprendere lo studio delle proprietà della penicillina non è stata motivata dalla speranza di sviluppare le applicazioni cliniche di una sostanza antibatterica, le cui grandi possibilità pratiche erano state dimostrate, ma che, per ragioni incomprensibili, era stata trascurata per nove anni; i lavori pubblicati sulla penicillina non contenevano nulla che avrebbe potuto giustificare una tale speranza ed, al contrario, ai fini dell'applicazione pratica in medicina, l'instabilità del principio antibatterico rappresentava uno svantaggio. La ricerca fu considerata esclusivamente come un problema di biochimica, destinata a stabilire la natura chimica di un prodotto antibatterico naturale, molto instabile, ed attivo contro lo stafilococco.

Il ceppo di *Penicillium notatum* che produsse la penicillina con cui si iniziarono gli studi a Oxford, discendeva da quello originale di FLEMING, e faceva parte della collezione di colture della School of Pathology di Oxford. L'estrazione dal liquido di coltura del principio antibatterico prodotto dal *Penicillium notatum*, in una forma molto impura, ma relativamente stabile ed adatta per esperimenti su animali, fu cosa relativamente facile. Il mio collega HEATLEY ed io l'ottenemmo dopo averne determinato le condizioni di produzione ed alcune delle più importan-

ti proprietà chimiche. Il nome « penicillina » con cui FLEMING aveva designato l'intero mezzo di coltura antibatterico, fu da noi ritenuto per il principio antibatterico attivo isolato. Successivamente si dimostrò che questo principio attivo di fatto non consisteva di una singola sostanza, ma di una miscela di sostanze di struttura chimica affine.

I primi preparati di penicillina ottenuti, pur essendo molto impuri, avevano una potente azione inibitrice rispetto agli stafilococchi, agendo ancora anche a diluizione di 1:500.000; erano quindi circa dieci volte più attivi delle sulfoammidi in condizioni optimum di attività. Le iniezioni di questi preparati in animali dimostrarono immediatamente che la loro tossicità era estremamente bassa e che la sostanza conservava il suo potere antibatterico nell'organismo animale. In tal modo, la penicillina veniva a possedere quelle due importanti proprietà suddette che son requisito fondamentale di un agente chemioterapeutico antibatterico.

Infatti, i primi esperimenti su topi infettati con streptococchi, pur essendo effettuati in scala molto limitata, indicavano chiaramente che la penicillina era capace di influenzare favorevolmente il corso delle infezioni batteriche. Gli ulteriori esperimenti su animali, effettuati in collaborazione con altri membri del reparto, (I. GARDNER, J. ORR-EWING, M. A. JENNINGS e A. G. SANDERS), mostrarono che la penicillina era indubbiamente un agente terapeutico che poteva curare effettivamente le più gravi infezioni da stafilococchi, pneumococchi ed organismi come il *Clostridium welchii* ed il *Clostridium oedematiens*. Solo per una combinazione di circostanze incredibilmente fortunate quei primi e così impuri preparati, che erano serviti a dimostrare l'azione chemioterapeutica della penicillina, avevano una così bassa tossicità. Oggi noi sappiamo che, malgrado la loro marcata azione antibatterica, questi preparati contenevano meno dell'1% di penicillina pura; il materiale rimanente era una miscela di sostanze diverse, ciascuna delle quali avrebbe potuto essere sufficientemente tossica da mascherare la non-tossicità della penicillina. Le prime prove di tossicità sull'uomo, che seguirono gli esperimenti su animali, indicarono infatti che i preparati usati con tanto successo negli esperimenti su animali erano troppo tossici per l'impiego clinico e richiedevano di essere ulteriormente purificati. Quantunque la prima estrazione della penicillina dal liquido di coltura fosse un'operazione relativamente semplice, l'ulteriore purificazione presentò serie difficoltà che occuparono per molto tempo un gran numero di chimici in Inghilterra e negli Stati Uniti. Questo era dovuto al fatto che la penicillina, in accordo con le prime osservazioni di RAISTRICK e colleghi, è effettivamente una sostanza molto instabile, quantunque, per fortuna, sufficientemente stabile nelle condizioni in cui deve agire nell'organismo animale.

ABRAHAM ed io, dopo un profondo studio sulle proprietà chimiche della penicillina, siamo riusciti ad ottenere un preparato di maggiore purezza, rivelatosi sufficientemente non tossico per l'uso clinico. Le prime prove cliniche con questi preparati hanno confermato le precedenti esperienze su animali ed hanno dimostrato che la penicillina rappresenta il più efficace agente chemioterapeutico in molte delle più gravi infezioni batteriche dell'uomo.

Con la scoperta dell'azione chemioterapeutica della penicillina da parte dei ricercatori di Oxford (il loro lavoro è stato pubblicato in due articoli nel periodico « The Lancet »; uno nel 1940 sui risultati degli esperimenti su animali; l'altro nel 1941 sulle prime esperienze cliniche) si è iniziata una nuova era per la chemioterapia batterica — l'era degli antibiotici — che non ha ancora raggiunto il culmine del suo sviluppo.

AZIONE ANTIBATTERICA ED USO CLINICO DELLA PENICILLINA.

La penicillina è una delle più attive e meno tossiche tra le sostanze antibatteriche note. E' attiva verso i batteri gram-positivi ed alcuni organismi gram-negativi come il meningococco ed il gonococco. E' attiva anche contro la spirocheta che causa la sifilide. Per circa otto anni, nell'uso clinico sono stati impiegati esclusivamente sali cristallini puri di penicillina. La penicillina pura ha un'attività che è circa 2000 volte maggiore delle sulfoammidi, essendo attiva anche a diluizioni di 1:100.000.000. Anche in dosi elevatissime è praticamente non tossica, infatti, farmacologicamente, è quasi totalmente inerte, se si eccettua il fatto che provoca sintomi allergici nel 5% dei pazienti trattati. Quindi, ha proprietà molto superiori ai sulfamidici e, per il fatto che riunisce un'attività antibatterica estremamente elevata con la quasi totale assenza di tossicità, è unica fra tutte le sostanze chemioterapeutiche note a tutt'oggi. Clinicamente è efficace in tutte le malattie provocate da batteri che sono penicillino-sensibili. Risultati particolarmente degni di nota sono stati ottenuti in casi di gravi infezioni da stafilococchi, streptococchi, pneumococchi e meningococchi. In dosi elevate è stata usata con successo nel trattamento delle endocarditi batteriche, malattia che prima dell'introduzione della penicillina provocava il 100% di mortalità. La penicillina, a differenza dei sulfoamidici, conserva completa l'attività antibatterica anche in presenza di pus o di prodotti di degradazione dei tessuti, né la sua attività antibatterica è influenzata in modo significativo dal numero di batteri presenti. Ha, quindi, la massima efficacia nel trattamento delle ferite infette e perciò il pericolo di sepsi delle ferite è divenuto cosa del passato.

RESISTENZA ACQUISITA.

I micro-organismi hanno un metabolismo molto versatile e sono capaci di adattarsi alle più avverse condizioni esterne. E' noto infatti sin dal tempo di EHRLICH che i protozoi possono sviluppare resistenza alle sostanze chemioterapeutiche. I batteri si comportano in modo analogo. Così, ad esempio, il gonococco ha sviluppato resistenza ai sulfoamidici nel corso del trattamento clinico e, in conseguenza, non risponde più a queste sostanze chemioterapeutiche. E' possibile anche indurre la penicillino-resistenza in batteri penicillino-sensibili, ma solo con speciali metodi di laboratorio. E' opinione diffusa, spesso confermata anche dalla stampa, che i micro-organismi divengono facilmente resistenti alla penicillina, ma, per quanto mi consta, non è stato riportato nemmeno un caso in cui si sia avuto un autentico sviluppo di resistenza alla penicillina durante il trattamento clinico. Vi sono stati rapporti ben documentati e attendibili su un sensibile aumento nella frequenza delle infezioni stafilococciche penicillino-resistenti in corsie di ospedali; forse, proprio per questi rapporti, ha trovato credito l'idea che i micro-organismi possono divenire rapidamente penicillino-resistenti. Pur tuttavia, un esame più accurato di questi casi ha dimostrato che essi non hanno nulla a che fare con l'acquisita resistenza alla penicillina, ma si spiegano con il fatto che esistono due tipi di stafilococchi, di cui uno è penicillino-sensibile e l'altro naturalmente resistente alla penicillina. Nelle corsie degli ospedali erano presenti pazienti con infezioni causate sia da stafilococchi penicillino-sensibili che da stafilococchi penicillino-resistenti. Il trattamento con penicillina aveva eliminato i ceppi penicillino-sensibili, lasciando inalterati quelli naturalmente resistenti. A causa di insufficienti precauzioni, l'infezione da stafilococchi naturalmente resistenti si era propagata da un paziente all'altro, facendo erroneamente pensare ad una resistenza indotta. Questo può essere facilmente dimostrato. Esiste un metodo molto semplice che permette di distinguere gli stafilococchi naturalmente penicillino-resistenti da quelli resi artificialmente resistenti con metodi di laboratorio. I ceppi penicillino-resistenti producono un enzima, scoperto da ABRAHAM e da me, chiamato penicillinasi; tale enzima distrugge la penicillina, causando così la resistenza. I ceppi resi resistenti artificialmente invece non producono questo enzima.

Negli ospedali in cui durante il trattamento con penicillina aumentava il numero delle infezioni da stafilococchi penicillino-resistenti, è stato dimostrato che in tutti i casi esaminati i ceppi stafilococcici isolati producevano penicillinasi e, quindi, erano naturalmente penicillino-resistenti.

In tal modo questi casi non provano assolutamente che i micro-organismi possono diventare facilmente resistenti alla penicillina e, per quanto risulta fino ad oggi dall'esperienza, il pericolo di rendere i batteri penicillino-resistenti deve essere considerato non imminente. Anzi proprio per questa sua proprietà di non indurre facilmente resistenza, la penicillina differisce favorevolmente da molte sostanze antibatteriche sintetiche e naturali. Per la sua sorprendente combinazione di proprietà positive, tra le quali la difficoltà di indurre una resistenza acquisita è una delle più importanti, la penicillina si avvicina molto all'agente chemioterapeutico ideale, la famosa « pallottola magica » di cui EHRLICH sognava.

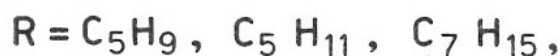
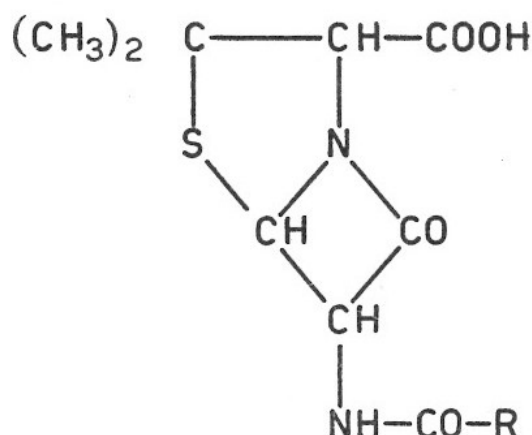
MECCANISMO D'AZIONE: STRUTTURA.

La penicillina è una sostanza antibatterica di enorme potenza, ma uccide i batteri solo quando questi sono sospesi in un mezzo in cui possono moltiplicarsi in assenza di sostanze antibatteriche. Essa non agisce, neppure a concentrazioni elevate, sui batteri in condizioni di quiescenza; così, ad esempio non è attiva contro i batteri sospesi in acqua distillata.

A questo riguardo la penicillina differisce dalle altre sostanze antibatteriche che, a sufficienti concentrazioni, uccidono sia i batteri in condizioni di quiescenza che quelli in condizioni di crescita, quantunque, in generale, i batteri nella fase di crescita siano più sensibili all'azione delle sostanze battericide che in condizioni di quiescenza. A basse concentrazioni l'azione di molte sostanze battericide è predominantemente batteriostatica. Per determinare il meccanismo d'azione della penicillina è stata usata penicillina radioattiva, cioè penicillina marcata con solfo radioattivo. In tal modo si è visto che la penicillina si combina con i batteri sensibili, mentre non si attacca a quelli resistenti. Misurando la radioattività di uno stafilococco sensibile dopo esposizione a penicillina, è stato dimostrato che 10 molecole di penicillina per organismo sono sufficienti ad ucciderlo.

La formula strutturale della molecola della penicillina, (Fig. 5) proposta per la prima volta nel 1943 da ABRAHAM, BAKER, CHAIN e ROBINSON, indica che essa è composta di due ammino acidi, *d*- β -tiovalina e formilglicina acilata, tenuti insieme mediante un sistema ciclico non comune, cioè mediante un anello a quattro termini che sino ad oggi non è stato ritrovato in alcun'altra sostanza naturale. Esistono varie penicilline naturali con differente catena laterale (R nella fig. 5), di cui quel-

la più diffusa e normalmente impiegata nella clinica è la benzil-penicillina con catena laterale benzilica ($R = C_6H_5-CH_2$).



PENICILLINA

Fig. 5.

La grande instabilità della penicillina e le sue proprietà biologiche sono dovute all'effetto combinato del sistema tiazolidina- β -lattame e della catena laterale. L'anello β -lattamico di per sé stesso è molto stabile e si comporta come un normale legame peptidico. Il primo attacco di sostanze inattivanti (fig. 6), come alcoli, acidi, ioni metallici, ecc., alla molecola della penicillina ha luogo sull'anello tiazolidinico. L'apertura di questo anello porta alla formazione di un composto intermedio instabile il quale, reagendo con la forma enolica della catena laterale peptidica, subisce una trasposizione interna per dare un composto osazonico intermedio, forse l'acido penicillenico. Questa sostanza, trattata con alcali, si idrolizza per formare un derivato a catena aperta, l'acido penicilloico, e può subire due tipi di acilazioni interne di cui una dà luogo ad un derivato dell'imidazolina (acido penillico) l'altra, invece, ad un derivato dell'imidazolone (acido penillonico).

La muffa *Penicillium chrysogenum* può introdurre vari acidi sintetici nella molecola della penicillina ed infatti, aggiungendo un appropriato precursore al fluido di coltura, si ottengono numerose penicilline biosintetiche. Le diverse penicilline biosintetiche non differiscono in modo significativo nella loro attività biologica, quantunque risulti che al-

cuni pazienti allergici alla benzil-penicillina non mostrino ipersensibilità nel trattamento con alcune penicilline semisintetiche. A questo riguardo è particolarmente interessante ricordare che un antibiotico prodotto da un *Cephalosporium* (già isolato in Sardegna da BROTZU) è stato ottenuto da ABRAHAM, FLOREY e colleghi in forma molto purificata, quantunque non ancora cristallina, ed ha mostrato un comportamento

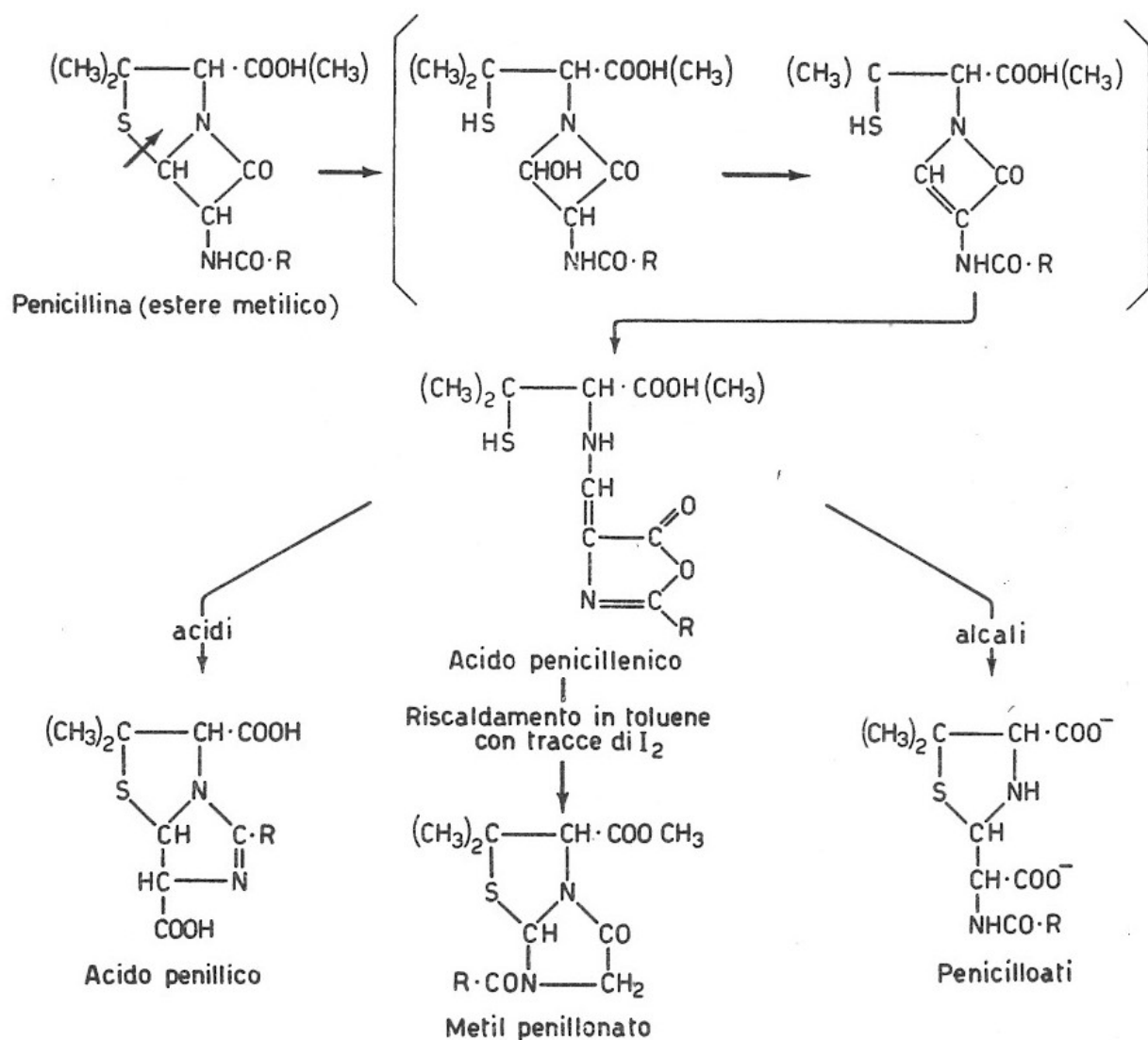


Fig. 6.

chimico simile sotto molti riguardi a quello della penicillina, cioè la medesima instabilità nel trattamento con alcali ed acidi, la medesima decomposizione ad opera del cloruro mercurico con formazione dell'amminoacido β -tiovalina (penicillammina) e la medesima inattivazione ad opera dell'enzima penicillinasi, ma una diversa solubilità ed un'attività biologica nei riguardi di alcuni organismi gram-negativi, verso cui le ordinarie penicilline sono inattive. Evidentemente, al nucleo tiazolidina- β -lattamico è attaccato un raggruppamento che conferisce alla molecola una differente specificità biologica. La natura chimica di questo raggrup-

pamento è ancora ignota, ma è oggetto di studio attuale; per il momento si può dire solo che contiene acido α -ammino-adipico. La scoperta di una sostanza del tipo della penicillina, ma attiva contro i batteri gram-negativi è estremamente importante poiché indica che l'azione antibatterica della struttura tiazolidina- β -lattame è molto più generale di quanto si potesse prevedere. Poiché la penicillina è ancora il meno tossico fra tutti gli antibiotici, è ovvia l'importanza che la scoperta di una sostanza penicillino-simile, con un più vasto campo di attività antibatterica potrebbe avere per la chemioterapia.

ANTIBIOTICI PRODOTTI DA ALTRI MICRO-ORGANISMI.

I sorprendenti risultati ottenuti con la penicillina naturalmente hanno stimolato le ricerche verso altri antibiotici. Tra i molti micro-organismi esaminati, gli actinomiceti rappresentano la più ricca e, per il momento l'unica, sorgente di antibiotici di importanza pratica per la medicina.

In questa mia conferenza io discuterò brevemente di alcuni di essi, ma prima mi soffermerò su alcuni antibiotici che non hanno importanza come sostanze chemioterapeutiche per la medicina clinica, ma, non di meno, presentano caratteristiche di notevole interesse biologico e chimico.

ACIDO ASPERGILLICO.

Tra le molte sostanze antibatteriche prodotte dai penicilli e dagli aspergilli, vorrei richiamare la vostra attenzione sull'acido aspergillico (fig. 7).

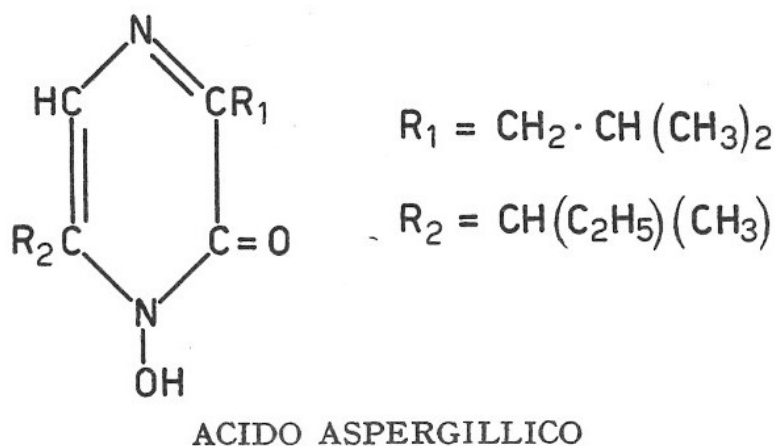


Fig. 7.

Questa sostanza è un derivato pirazinico contenente un raggruppamento dell'acido idrossamico e rappresenta il primo derivato dell'acido idrossamico che sia stato ritrovato in natura. La sua attività anti-

batterica è dovuta alla sua capacità di « chelare » metalli cataliticamente attivi di importanza biologica, come il rame ed il ferro. Il suo meccanismo d'azione è simile a quello dell'8-idrossichinolina. Recentemente sono stati sintetizzati composti analoghi all'acido aspergillico.

ANTIBIOTICI DAI BATTERI.

Un gran numero di antibiotici è stato isolato da batteri. Sono tutti polipeptidi composti da vari ammino-acidi. I primi due polipeptidi

GRAMICIDINA D	GRAMICIDINA S	TIROCIDINA A
d-leucina (4)	l-valina	d-fenilalanina (2)
d-valina (2)	l-ornitina	l-fenilalanina (1)
l-valina (2)	l-prolina	l-leucina (1)
l-alanina (2)	l-leucina	l-valina (1)
glicina (1)	d-fenilalanina	l-tirosina (1)
etanolammina (1)		l-prolina (1)
l-triptofano		l-ornitina (1)
		l-glutammina (1)
		l-asparagina (1)

Fig. 8.

antibatterici sono stati isolati da DUBOS allo stato cristallino nel 1939 e sono stati chiamati gramicidina e tirocidina. La composizione degli ammino acidi in queste sostanze è nota, grazie soprattutto ai lavori di SYNGE, nei quali ha fatto uso esteso del metodo di cromatografia su carta, sviluppato da lui insieme con MARTIN e CONSDEN. Come si può vedere in fig. 8, entrambi questi antibiotici consistono di ammino acidi semplici, come si trovano nelle proteine normali, ma alcuni sono presenti nella forma destrogira, non-naturale. La gramicidina-S, chiamata anche tirocidina, consiste solamente di cinque ammino-acidi che si seguono nell'ordine: l-valina, l-ornitina, l-leucina, d-fenilalanina, l-prolina. Molto probabilmente, la gramicidina S è una sostanza ciclica formata da due pentapeptidi della suddetta composizione.

Malgrado la loro costituzione apparentemente semplice, questi peptidi sono biologicamente molto attivi; sono potenti battericidi ed allo

stesso tempo molto tossici per gli animali. La ragione della loro tossicità ed attività antibatterica non è nota: probabilmente è nelle caratteristiche strutturali dell'unità polipeptidica ciclica, ma questo interessante problema resta ancora aperto per i biochimici. Recentemente Work ha

<u>SUBTILINA</u>		<u>MICOSUBTILINA</u>	
glicina	(2)	alanina	
alanina	(1)	valina	
valina	(1)	norvalina	
leucina	(4)	isoleucina	
isoleucina	(1)	leucina	
prolina	(1)	norleucina	
fenilalanina	(1)	fenilalanina	
triptofano	(1)	prolina	
lisina	(3)	tirosina	
acido aspartico	(1)	arginina	
acido glutammico	(3)	acido glutammico	
lantionina	(1)	acido aspartico	
$C_7H_{14}O_4N_2S$	(4)		

Fig. 9.

ottenuto per sintesi un semplice penta-peptide, che non è tossico, e possiede un basso grado di attività antibatterica.

I peptidi antibatterici hanno un'azione notevolmente specifica e, sotto questo punto di vista, ricordano le proteine ad elevato peso molecolare biologicamente attive, come gli enzimi, le tossine e gli ormoni. Ad esempio, la subtilina (fig. 9) è un antibiotico molto attivo contro i batteri grampositivi, mentre la micosubtilina è quasi totalmente inattiva contro i batteri, ma molto attiva contro i funghi. Poichè i polipeptidi antibatterici hanno una composizione molto più semplice delle proteine ad elevato peso molecolare, essi si prestano allo studio dei fat-

tori strutturali responsabili della specificità delle proteine biologicamente attive. E' questo uno dei problemi centrali della biochimica, e, quindi, questi polipeptidi hanno un eccezionale interesse biochimico, quantunque il loro uso pratico in medicina sia limitato.

POLIMIXINA A ed E

l-treonina
acido l- α , γ -diamminobutirrico
acido 6-d-metil-octan-1-oico
d-leucina

POLIMIXINA B

l-treonina
acido l- α , γ -diamminobutirrico
acido 6-d-metil-octan-1-oico
d-leucina
d-fenilalanina

POLIMIXINA C

l-treonina
acido l- α , γ -diamminobutirrico
acido 6-d-metil-octan-1-oico
l-fenilalanina

POLIMIXINA D

l-treonina
acido l- α , γ -diamminobutirrico
acido 6-d-metil-octan-1-oico
d-leucina
l-serina

Fig. 10.

BACITRACINA

l-leucina
d-isoleucina (2)
d,l-fenilalanina
l-istidina
l-cisteina
acido l-glutammico
acido d,l-aspartico
lisina
ornitina
NH₃

Fig. 11.

La polimixina e bacitracina (figg. 10 e 11) hanno limitate possibilità di applicazioni cliniche, specialmente nel trattamento delle infezioni superficiali. La loro tossicità generale è bassa, ma, se somministrate per un periodo prolungato, provocano disturbi ai reni. Sono stati iso-

lati molti altri antibiotici di origine batterica e di natura peptidica (licheniformina, circulina, biocerina, alveina, laterosporina, colicina).

Passiamo ora a discutere degli antibiotici prodotti dagli actinomiceti, cioè degli antibiotici più importanti dal punto di vista pratico. Gli actinomiceti sono micro-organismi del suolo, per la maggior parte non patogeni. Nella vecchia letteratura esistono molte pubblicazioni che illustrano l'azione antagonistica di questa specie di micro-organismi verso altri microbi. Gli actinomiceti hanno interessato sempre, ed in modo particolare, i microbiologi del suolo poiché sono responsabili della formazione di quell'humus che ha una così grande importanza nell'agricoltura; tuttavia, a parte la loro capacità a produrre l'humus, ben poco era noto sulle loro proprietà fisiologiche.

STREPTOMICINA.

Quasi nello stesso tempo in cui i ricercatori di Oxford iniziavano il loro studio sistematico sulle sostanze antibatteriche prodotte da micro-organismi, in America il microbiologo SELMAN A. WAKSMAN, uno dei più eminenti esperti nel campo degli actinomiceti, cominciava con i suoi collaboratori uno studio analogo sulle proprietà antagonistiche di questo particolare gruppo di micro-organismi. Nel corso di molti anni, WAKSMAN, che ha dedicato tutta la sua vita allo studio degli actinomiceti, è riuscito a raccogliere una delle più complete collezioni di questi organismi. WAKSMAN e collaboratori all'inizio dei loro studi hanno isolato dagli actinomiceti alcune sostanze antibatteriche molto attive, che, però, si sono rivelate estremamente tossiche e, quindi, non hanno potuto trovare applicazione come agenti chemioterapeutici.

Nel 1944, però, SCHATZ e WAKSMAN annunciavano di aver isolato, dal filtrato di una coltura di *Streptomyces Griseus*, un prodotto antibatterico, sia pure in forma grezza, a bassa tossicità che chiamarono « Streptomicina ». Circa un anno dopo questa fu ottenuta in forma pura da diversi gruppi di chimici negli Stati Uniti.

La streptomicina ha un'attività antibatterica che è da 50 a 100 volte inferiore a quella della penicillina, ma è attiva in vitro anche contro specie batteriche su cui la penicillina non ha effetto. Tra queste specie sono molti organismi gram-positivi, compresi la *Pasteurella*, la *Salmonella* ed il *B. coli*. Gli organismi gram-positivi sensibili alla penicillina, come gli stafilococchi, in genere, sono meno sensibili alla streptomicina di quanto lo siano gli organismi gram-negativi, ma è interessante che gli stafilococchi penicillino-resistenti sono streptomicino-sensibili. Di particolare importanza è il fatto che il bacillo tubercolare, sia di tipo umano che bovino, è streptomicino-sensibile.

La streptomycin, come la penicillina, deve essere somministrata parentalmente, poiché non viene facilmente assorbita dall'intestino. La streptomycin è molto più tossica della penicillina e, essendo meno attiva, deve essere usata in concentrazioni più elevate. Tuttavia, la tossicità del prodotto puro è sufficientemente bassa da permetterne l'uso come agente chemioterapeutico. La streptomycin dev'essere usata allo stato puro perchè, a differenza di quanto è avvenuto nel caso fortunato della penicillina cui ho accennato, i preparati non purificati di streptomycin contengono impurezze molto tossiche che, nei primi casi clinici esaminati, dettero non poche preoccupazioni. La streptomycin, come molte altre basi organiche ha effetti tossici anche in forma pura, che sono particolarmente marcati se la somministrazione è prolungata. Tali effetti tossici sono caratterizzati da disturbi dell'ottavo nervo cranico e conseguenti disturbi dell'equilibrio con vertigini, nausea e debolezza, che talvolta durano per molti mesi.

La streptomycin è efficace in molte infezioni delle vie urinarie causate da batteri gram-negativi, come il bacillus di Friedlander ed il B. coli. E' particolarmente efficace nella tularemia, provocata dalla *Pasteurella tularensis*, e molto efficace nella peste. La streptomycin, tuttavia non è molto efficace in tutte le malattie provocate da micro-organismi streptomycin-sensibili.

Così, non ha azione soddisfacente nelle infezioni intestinali, come le infezioni tifoidi ed il colera. Nelle infezioni da *Brucella* non è efficace se somministrata da sola, ma dà buoni risultati se accoppiata con la sulfodiazina.

Una delle ragioni per cui alcuni dei batteri streptomycin-sensibili non rispondono al trattamento con streptomycin è la facilità con cui la streptomycin induce resistenza nei micro-organismi. Ceppi sensibili di *Salmonella*, B. coli e *Pseudomonas pyocyanea* possono essere resi resistenti alla streptomycin dopo poche subcolture in presenza di streptomycin, e la resistenza acquisita è di natura permanente. Anche il bacillo della tubercolosi acquista facilmente resistenza alla streptomycin.

Lo sviluppo della resistenza alla streptomycin è stato spesso osservato durante il trattamento clinico della tubercolosi ed altre malattie. La facilità con cui la streptomycin induce resistenza nei micro-organismi limita la sua applicabilità terapeutica e, in un futuro non troppo distante, la sua efficacia clinica come agente chemioterapeutico contro alcune delle infezioni batteriche in cui adesso è attiva sarà ridotta ad un grado che oggi non è possibile prestabilire.

E' interessante osservare che alcuni batteri, una volta diventati resistenti alla streptomycin, sono incapaci di svilupparsi in assenza di

antibiotici; per questi organismi la streptomina, da potente inibitore della crescita, è trasformata in un fattore essenziale alla crescita.

STREPTOMICINA E IL PROBLEMA DELLA TUBERCOLOSI.

La tubercolosi differisce dalle altre infezioni batteriche acute in molti importanti aspetti. Il bacillo della tubercolosi è uno degli organismi a crescita lenta, e la tubercolosi, nella forma polmonare comune, è una malattia cronica a lento sviluppo in cui l'organismo ospite risponde al bacillo invadente con un responso cellulare caratteristico — la formazione del tubercolo. Questo consiste di masse compatte di tessuto caseoso necrotico, derivante da cellule tissulari morte, da tessuto fibroso coagulato e da materiale lipidico. Inoltre, nella tubercolosi polmonare in seguito all'azione distruttiva dei bacilli della tubercolosi, nel tessuto polmonare si formano recessi e cavità.

Un agente chemioterapeutico, se vuole essere efficace nella tubercolosi, deve raggiungere i bacilli tubercolari ovunque essi si annidino, cioè, deve poter penetrare nei tubercoli, nei recessi e cavità, ed entro le cellule fagocitiche, ove i bacilli possono rimanere vitali per lunghi periodi. Un agente chemioterapeutico efficace contro il bacillo tubercolare deve esercitare una forte azione battericida; la mera azione batteriostatica non è sufficiente e conduce ad una ricaduta della malattia, poiché le forze dell'immunità naturale al bacillo tubercolare sono molto indebolite nell'organismo ospite e non sono capaci di rafforzare l'azione antibatterica dell'agente chemioterapeutico. Poiché la completa eliminazione di tutti i bacilli della tubercolosi dall'organismo ospite dev'essere necessariamente un processo lento, l'agente chemioterapeutico dev'essere somministrato per lunghi periodi di tempo e, quindi, deve possedere un grado di tossicità particolarmente basso. E', così, evidente che i problemi della chemioterapia della tubercolosi differiscono in molti aspetti da quelli della chemioterapia delle infezioni batteriche acute in cui l'organismo ospite non risponde con la formazione di un ostacolo, come è il tubercolo, e generalmente gli organismi patogeni invadenti sono facilmente raggiunti dalla corrente sanguigna. I requisiti di un agente chemioterapeutico efficace nella tubercolosi sono quindi molto più esigenti di quelli di un agente chemioterapeutico che deve agire nelle infezioni acute.

Nella tubercolosi la valutazione dell'efficacia terapeutica di un medicamento è molto più difficoltosa che nel caso delle infezioni batteriche acute. Non si trovano facilmente animali da esperimento in cui il corso delle tubercolosi riproduca quello della malattia dell'uomo. Nei porcellini d'India e nei topi, animali frequentemente usati nel saggio dei

medicamenti antitubercolari, la tubercolosi indotta ha un carattere molto più acuto di quella umana e le lesioni vengono penetrate dai medicamenti più facilmente che i tubercoli umani. Entrambe le specie di animali praticamente non hanno resistenza naturale ai bacilli della tubercolosi e soccombono all'infezione, anche se il numero degli organismi infettanti è molto piccolo; né in essi si ha mai guarigione spontanea, come avviene invece frequentemente nell'uomo. Per valutare mediante esperimenti su animali l'efficacia terapeutica di una sostanza antitubercolare non basta stabilire la percentuale di animali che sopravvivono all'infezione; è necessario uno studio patologico profondo della malattia in vari stadi del suo sviluppo.

W. H. FELDMAN e colleghi hanno dato forse il contributo più importante allo studio della tubercolosi sperimentale. In una lunga serie di laboriose osservazioni protrattesi per molti anni essi hanno gettato le basi delle nostre conoscenze attuali in questo campo ed hanno sviluppato molte tecniche fondamentali che vengono oggi universalmente usate per il saggio di nuovi medicamenti antitubercolari.

Nella chemioterapia della tubercolosi gli esperimenti su animali richiedono molti mesi di sperimentazione, contrariamente a quanto avviene nella valutazione dei medicamenti contro le infezioni acute, i cui risultati si ottengono in pochi giorni. Anche dopo esperimenti su animali eseguiti con la massima cura, non è possibile prevedere con assoluta certezza quale sarà il comportamento di un medicamento nella tubercolosi umana. Si può dire però che, mentre un medicamento che si è rivelato inefficace contro la tubercolosi sperimentale in animali non ha neppure la minima probabilità di essere efficace nella tubercolosi umana, non si può prevedere se un prodotto che ha dato risultati incoraggianti nella tubercolosi sperimentale darà o meno risultati positivi nella malattia umana. In ogni caso, se la malattia è giunta in uno stadio troppo avanzato, nessun agente chemioterapeutico potrà, e neppure è da aspettarsi differentemente, far retrocedere completamente le lesioni ed indurne la sostituzione con tessuto fresco. La valutazione dell'efficacia di un agente chemioterapeutico contro la tubercolosi umana non è cosa facile, poichè questa malattia può regredire spontaneamente o rispondere ai classici metodi di trattamento non chemioterapeutici. La valutazione può essere fatta solo sulla base dei risultati statistici dedotti da un gran numero di casi, studiati nelle condizioni più rigorosamente controllate, e devono trascorrere molti mesi prima che dai risultati si possano trarre conclusioni. Sino ad oggi non si conosce un medicamento che possa essere considerato soluzione definitiva del problema della tubercolosi umana, quantunque in questi ultimi anni i risultati di alcuni sviluppi siano stati incoraggianti e le prospettive per il futuro si siano allargate.

Va notato, però, che fino ad oggi non c'è nessuna base per affermare con certezza che il problema della tubercolosi sia risolvibile con i soli metodi chemioterapeutici. Anche ammettendo che si possa scoprire un agente chemioterapeutico la cui azione battericida contro il bacillo della tubercolosi sia pari a quella della penicillina contro gli stafilococchi o gli streptococchi sensibili, e, supponendo anche che questa sostanza fin adesso sconosciuta riesca a penetrare non solo nei tubercoli ma anche nell'interno dei macrofagi, entro cui i bacilli sopravvivono per molto tempo, ed inoltre che, per l'azione battericida di questa sostanza ogni singolo bacillo possa essere eventualmente eliminato dall'organismo ospite, anche con tutte queste premesse, è ancora dubbio se questa sostanza possa rappresentare un rimedio permanente contro la tubercolosi umana. Poichè, ovviamente, la resistenza naturale al bacillo della tubercolosi è estremamente ridotta nei soggetti affetti da forme croniche, la prima nuova esposizione al bacillo probabilmente porterà ad una reinfezione, se non si provvederà contemporaneamente ad aumentare l'immunità naturale. Quindi, per la soluzione del problema della tubercolosi, è di primaria importanza l'individuazione e lo studio dei fattori che determinano la naturale immunità dell'organismo ospite al bacillo tubercolare, oltre alla ricerca di un nuovo agente chemioterapeutico antitubercolare. I recenti lavori di DUBOS e coll. sullo studio delle sostanze antitubercolari nei tessuti sono molto promettenti.

L'attività in vitro della streptomina contro il bacillo della tubercolosi è stata osservata per la prima volta da SCHATZ e WAKSMAN nel 1944. E' stato merito di FELDMAN e coll. l'aver dimostrato che la streptomina era capace di sopprimere lo sviluppo della tubercolosi sperimentale nei porcellini d'India anche se l'antibiotico veniva somministrato parecchie settimane dopo l'infezione, cioè quando la malattia era già in uno stadio avanzato, con lesioni tubercolari ben definite. Un'elevata percentuale di animali trattati con la streptomina sopravvisse all'infezione e, quando, parecchie settimane dopo il trattamento, gli animali furono sacrificati per l'autopsia si vide chiaramente che le lesioni erano totalmente scomparse o fortemente regredite. Era questa la prima volta nella storia della chemioterapia batterica in cui si ottenevano così impressionanti risultati nella chemioterapia della tubercolosi sperimentale e la grande importanza dei lavori di FELDMAN — lavori ormai classici — è dovuta al fatto che essi hanno indicato, per la prima volta, che la chemioterapia della tubercolosi ha concrete possibilità, anche se la streptomina non rappresenta la soluzione finale per la cura di tutte le forme di questa malattia.

Altri ricercatori hanno dimostrato in seguito che se gli animali non vengono sacrificati per l'autopsia subito dopo l'interruzione del trattamento con streptomina, ma vengono lasciati più a lungo senza somministrazione dell'antibiotico, la tubercolosi riappare ed infine gli animali soccombono alla malattia. Questo è dovuto al fatto, già menzionato, che i porcellini d'India, contrariamente all'uomo, non possiedono neppure la minima resistenza naturale al bacillo tubercolare ma, soccombono al più piccolo numero di organismi invadenti. Evidentemente la streptomina, anche dopo somministrazione prolungata, non era riuscita ad eliminare completamente tutti i bacilli tubercolari con cui i porcellini erano stati infettati e, cessata la somministrazione dell'antibiotico, gli organismi rimasti avevano ripreso la crescita provocando così un nuovo insorgere dell'infezione.

I primi risultati clinici con la streptomina ottenuti da HINSHAW in collaborazione con FELDMAN nella Mayo Clinic, dimostrarono che le infezioni tubercolari acute come la meningite tubercolare, rispondono bene al trattamento con streptomina. La mortalità nella meningite tubercolare, che prima dell'introduzione della streptomina era del 100%, è stata fortemente ridotta dal trattamento con l'antibiotico. Questa terribile malattia colpisce spesso i bambini e quindi il successo del trattamento con streptomina deve essere considerato come uno dei maggiori progressi nella medicina terapeutica. Risultati notevolmente soddisfacenti sono stati anche ottenuti nel trattamento della tubercolosi miliare acuta, malattia che prima dell'introduzione della streptomina dava una mortalità del 100%. Nelle infezioni tubercolari a tipo cronico invece, come nella comune tubercolosi polmonare, il trattamento con streptomina ha avuto meno successo, specialmente nei casi in cui le lesioni erano già avanzate. Spesso all'inizio del trattamento si osserva un temporaneo miglioramento, ma molto spesso dopo la cessazione della somministrazione dell'antibiotico avvengono ricadute. Evidentemente in questi casi era impossibile sterilizzare completamente tutte le lesioni tubercolari con i loro numerosi recessi e cavità, pieni di masse compatte ed impenetrabili di tessuto fibroso morto.

Un importante fattore che contribuisce all'insuccesso della streptomina nell'eliminazione di tutti i bacilli tubercolari è la già menzionata facilità con cui questi organismi sviluppano resistenza alla streptomina durante il trattamento clinico, fenomeno dimostrato in modo conclusivo in molti casi.

Lo sviluppo della resistenza dei bacilli tubercolari alla streptomina può essere sensibilmente ritardato somministrando questo antibiotico con altre sostanze antitubercolari, come l'acido p-ammino salicilico

e l'idrazide dell'acido isonicotinico. Clinicamente queste sostanze sintetiche se somministrate da sole sono meno efficaci della streptomina, poichè inducono resistenza al bacillo tubercolare ancora più rapidamente, ma il loro impiego in combinazione con la streptomina ha dato buoni risultati, per cui clinicamente vengono usate adesso quasi esclusivamente combinazioni di antibiotici con sostanze antitubercolari sintetiche. I migliori risultati nel trattamento moderno della tubercolosi vengono ottenuti combinando metodi chirurgici con metodi chemioterapeutici. In ogni caso, una diagnosi nei primissimi stadi dello sviluppo della malattia è essenziale per il successo clinico.

MECCANISMO D'AZIONE E STRUTTURA CHIMICA.

La streptomina ha azione battericida su quegli organismi verso cui è più fortemente attiva, come per esempio la *Pasteurella tularensis*; contro altri organismi essa è battericida ad elevate concentrazioni, ma

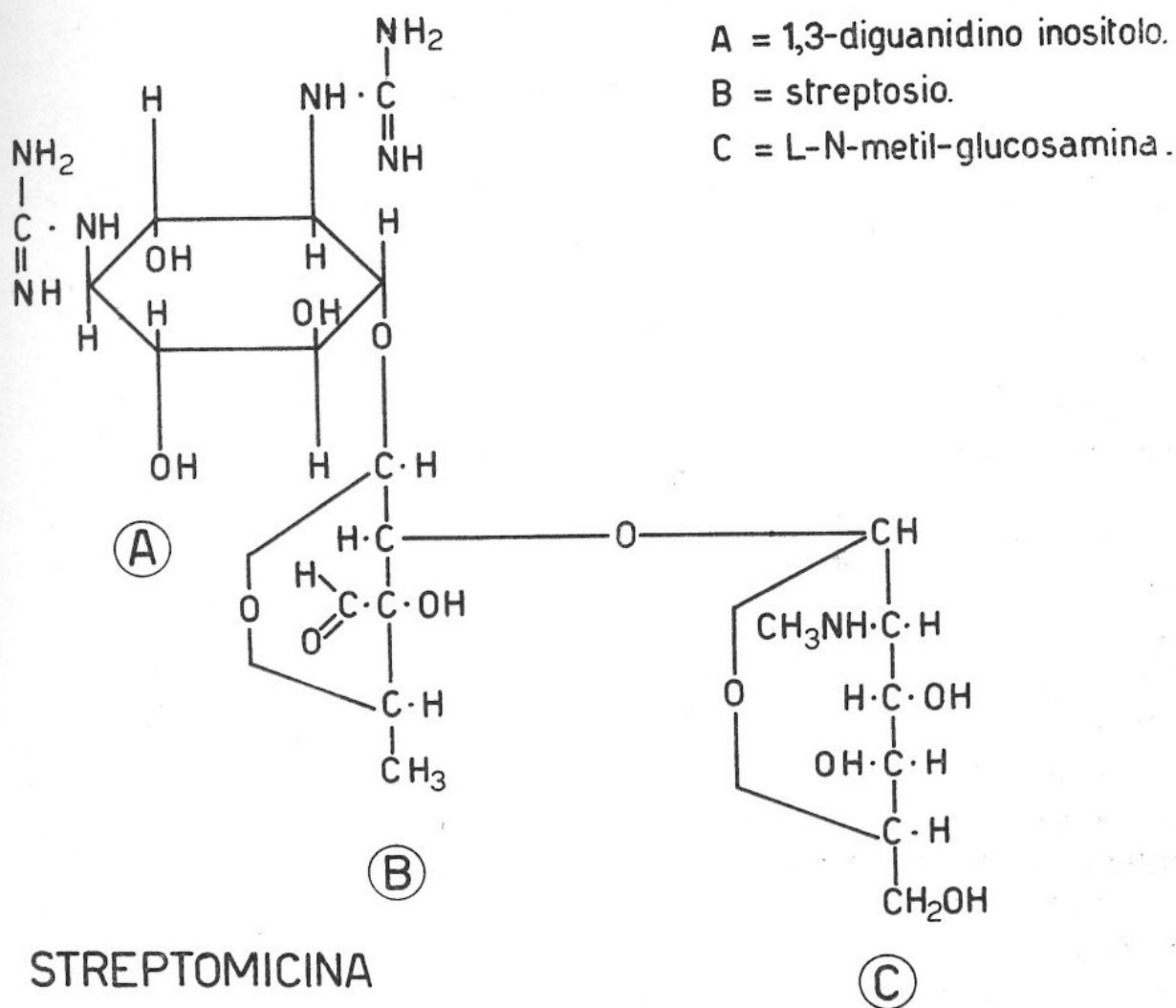


Fig. 12.

a basse concentrazioni è solamente batteriostatica. La sua azione sul bacillo tubercolare alle concentrazioni in cui è attiva, è parzialmente batteriostatica e parzialmente battericida. Dalla struttura chimica, illustrata nella fig. 12, risulta che la streptomicina è una sostanza antibatterica di tipo completamente nuovo e di natura saccaroidica. La sua molecola è composta di tre parti: il 1,3 diguanidino - inositolo; lo streptotio, che è uno zucchero nuovo, e la N-metil-glucosammina, nella forma levogira non-naturale.

Data la complessità della struttura della streptomicina, è improbabile che si possa effettuarne la sintesi in laboratorio. Il meccanismo della sua azione antibatterica ancora non è noto.

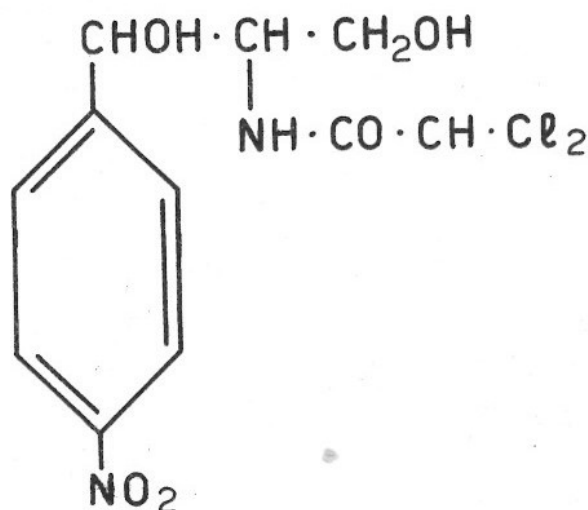
CLORAMFENICOLO.

L'antibiotico cloramfenicolo, noto anche col nome di Cloromicetina, è un altro prodotto del metabolismo di un actinomicete. E' stato isolato negli Stati Uniti nel 1948 da due gruppi di ricercatori che lavoravano indipendentemente. Un gruppo, facente parte del personale della Park, Davis & Co., insieme con i ricercatori dell'università di Yale, ha isolato l'organismo produttore il cloramfenicolo da un campione di terra del Venezuela; l'altro gruppo, all'università di Illinois, lo ha isolato da una fonte molto più vicina, cioè da un campione di terra concimata raccolto presso il laboratorio universitario. L'organismo è stato chiamato *Streptomyces venezuelae*.

Il cloramfenicolo ha una gamma estesa di attività, essendo efficace sia contro batteri gram-positivi che contro batteri gram-negativi, tra cui i gruppi della *Salmonella* e della *Brucella*. La sua più interessante proprietà, e forse quella che lo differenzia dagli altri gruppi di antibiotici già menzionati, è la sua attività contro le *Rickettsiae*, causa della febbre fluviale giapponese e del tifo epidemico. Questi organismi hanno dimensioni inferiori ai più piccoli batteri ed occupano una posizione intermedia tra i batteri ed i virus filtrabili. Essi, al contrario dei batteri, non possono essere coltivati in assenza di cellule animali viventi e l'efficacia di antibiotici con azione anti-rickettsiaca può essere stabilita soltanto mediante esperimenti su animali o su culture di tessuti. Il cloramfenicolo è la prima sostanza che si sia mostrata attiva nelle malattie da *Rickettsiae*, e, quindi, rappresenta un'altra pietra miliare nello sviluppo della chemioterapia antimicrobica.

Il cloramfenicolo può essere dato per bocca. Deve essere somministrato con precauzione, perchè è abbastanza tossico e sono stati riportati casi di serie alterazioni del sangue in conseguenza dell'uso di questo antibiotico, come del resto era da aspettarsi da un nitro-composto

aromatico. Il maggior merito del cloramfenicolo è nella sua grande efficacia contro la febbre fluviale giapponese ed il tifo epidemico; e infatti è la prima sostanza chemioterapeutica che sia attiva nel trattamento



CLORAMFENICOLO (CLOROMICETINA)

Fig. 13.

clinico di queste malattie. E' efficace anche nella febbre tifoidea e nelle infezioni da Brucella.

La struttura del cloramfenicolo (fig. 13) è di tipo nuovo ed ha una fisionomia caratteristica; essa possiede: 1) il gruppo nitro-benzenico e 2) il gruppo dicloroacetilico. E' questo il primo nitro-composto che sia stato trovato in natura; ha struttura relativamente semplice e può essere preparato per sintesi in laboratorio. Attualmente si conoscono molti metodi di sintesi economicamente attuabili ed è possibile anche sintetizzare numerose sostanze analoghe aventi proprietà antibatteriche.

Quantunque con metodi di laboratorio sia possibile indurre resistenza nei microorganismi al cloramfenicolo, non si conoscono casi di resistenza sviluppatasi durante il trattamento clinico.

CLOROTETRACICLINA ED OSSITETRACICLINA.

Queste due sostanze che rappresentano le ultime conquiste nel campo degli antibiotici con possibilità cliniche, saranno considerate insieme, poichè la loro struttura chimica e, in conseguenza, le loro proprietà biologiche sono molto simili. Entrambe sono prodotte da actinomiceti del suolo; la clorotetraciclina dallo *Streptomyces aureofaciens* e l'ossitetraciclina dallo *Streptomyces rimosus*. Sono state isolate da ricercatori di società farmaceutiche americane e sono il risultato di intensivi stu-

di d'equipe nel corso dei quali centinaia di migliaia di actinomiceti sono stati sottoposti ad un esame sistematico della loro eventuale attività antibiotica. Per lo sviluppo di una ricerca di questo tipo in larga scala è richiesta una organizzazione formidabile.

La clorotetraciclina e l'ossitetraciclina sono attive contro i batteri gram-positivi e gram-negativi e, come il cloramfenicolo, contro le *Rickettsiae* che causano la febbre fluviale giapponese, il tifo epidemico e la febbre Q. In tutte queste malattie da *Rickettsiae* questi antibiotici hanno un'azione marcatissima. Tra gli organismi gram-positivi particolarmente sensibili sono gli stafilococchi, compresi i ceppi penicillino-resistenti. Sia l'ossitetraciclina che la clorotetraciclina hanno un gran valore nel trattamento di infezioni provocate da stafilococchi penicillino-resistenti, e sono state impiegate con successo nel trattamento di varie forme di polmoniti causate da stafilococchi, dal bacillus di Friedlander ed altri organismi. L'ossitetraciclina e la clorotetraciclina sono interessanti anche perchè sono efficaci nelle vere malattie da virus; tra queste la cosiddetta polmonite atipica da virus, il linfogranuloma e la psittacosi rispondono al trattamento con questi antibiotici. Così, per la prima volta, le infezioni da virus possono essere debellate dal trattamento con agenti chemioterapeutici.

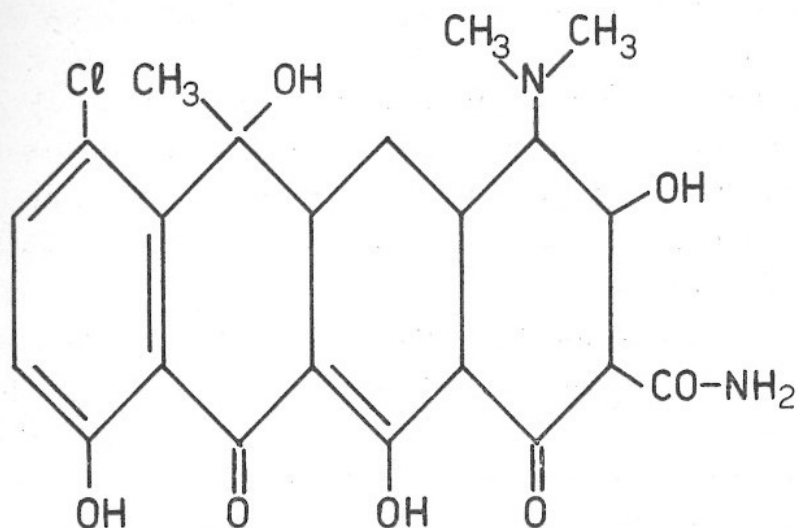
I virus su cui agiscono la clorotetraciclina e l'ossitetraciclina sono però quelli di grandi dimensioni; i virus piccoli, come i comuni virus del raffreddore e dell'influenza, non rispondono a questi antibiotici.

Non sembra che durante il trattamento clinico si sviluppi resistenza alla ossitetraciclina e clorotetraciclina, quantunque con metodi di laboratorio sia possibile rendere i batteri resistenti anche a questi antibiotici.

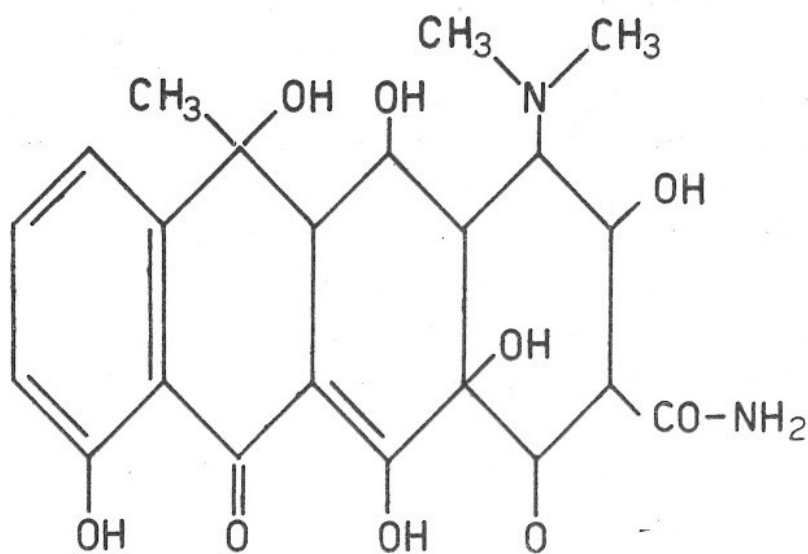
La loro struttura chimica (fig. 14) è stata chiarita recentemente. Questi antibiotici, come gli altri già menzionati, sono sostanze di tipo veramente fuori del comune e contengono un sistema ciclico sino ad oggi sconosciuto, cioè un anello tetraciclico naftacenico, cui è stato dato il termine « tetraciclina ». Entrambi i composti sono polifenoli chinoidi, e rappresentano l'unico tipo di antibiotici la cui attività batterica poteva essere prevista in base alla formula di struttura. Infatti, era noto già da molti anni che le sostanze chinoidi e fenoliche, come alcuni derivati di coloranti anilini, hanno una marcata azione antibatterica ma, fin ad oggi, composti di questa classe erano considerati inutilizzabili come sostanze chemioterapeutiche in vista della loro elevata tossicità non-selettiva.

L'espressione « antibiotici a largo spettro », con cui sono designati antibiotici come l'ossitetraciclina e la clorotetraciclina, è coniata per indicare un loro particolare vantaggioso, cioè il fatto che essi sono atti-

vi nei confronti di una grande varietà di microorganismi, in contrasto con gli antibiotici « più limitati » come la penicillina, che sono definiti a « ristretto spettro di attività ». Tuttavia l'espressione « antibiotici a largo spettro » non è fra le più appropriate; sarebbe stato meglio de-



CLOROTETRACICLINA (AUREOMICINA)



OSSITETRACICLINA (TERRAMICINA)

Fig. 14.

signarli come antibiotici a limitata specificità d'azione antibatterica. L'esperienza ha dimostrato che quanto più vasto è lo spettro di attività di una sostanza antibatterica, cioè quanto meno specifica la sua azione, tanto maggiore è la sua tossicità; in altre parole, se lo spettro di attività è molto esteso, la sostanza diventa un veleno protoplasmatico generale e, quindi, non può essere utilizzata come agente chemio-

rapeutico. Così, ad esempio, il cloruro mercurico, è una sostanza antibatterica il cui spettro di attività è particolarmente vasto, dato che esso uccide sia i macroorganismi che i microorganismi. Come ho già detto, è noto che i chinoni e le sostanze ad essi analoghe, alcune delle quali posseggono una potente azione antibatterica, sono molto tossici anche per le cellule animali e devono essere considerati come veleni generali del protoplasma.

Nel caso della ossitettraciclina e clorotetraciclina, il fatto sorprendente non è tanto che queste sostanze abbiano attività antibatterica, quanto il fatto che, malgrado la loro struttura chinoidica, siano sufficientemente non tossiche da trovare applicazione come agenti chemioterapeutici per uso interno.

L'esperienza clinica ha dimostrato più volte che la clorotetraciclina e l'ossitettraciclina non sono completamente innocue, ma hanno un certo grado di tossicità, per cui devono essere somministrate con precauzione. Cionondimeno, esse sono agenti chemioterapeutici di indubbio valore e nella chemioterapia antibatterica occupano un posto ben definito. Prescindendo dalla loro tossicità, il trattamento con questi antibiotici può causare l'effetto indesiderabile di provocare cambiamenti nella flora batterica del tratto intestinale, comportando spesso l'apparizione dei monilia, organismi del tipo di lieviti, i quali non sono fortemente patogeni, ma possono dar luogo a fastidiose irritazioni intestinali, tanto più che, una volta stabiliti nell'intestino sono difficili ad eliminare. Il fatto che sia stato possibile dimostrare che i fenoli chinoidici del tipo della ossitettraciclina e della clorotetraciclina possono essere usati in chemioterapia è di notevole interesse ed importanza per la chimica organica. Questo ci induce a sperare che, quantunque forse non si potrà attuare la sintesi di una molecola della complessità della ossitettraciclina e clorotetraciclina, sarà forse possibile sintetizzare fenoli chinoidici più semplici, aventi la medesima tossicità di questi antibiotici e possibilità di applicazione come agenti chemioterapeutici. Si aprono così nuove possibilità per il chimico organico che, indubbiamente, sono oggetto di studio in vari laboratori.

PROSPETTIVE PER IL FUTURO.

E' ovvio che col considerevole numero di antibiotici terapeuticamente efficaci, noi oggi disponiamo di un formidabile complesso di nuove armi per combattere con successo la maggioranza delle infezioni batteriche. La situazione è molto soddisfacente e significa un così brillante successo nella lotta contro le malattie infettive che alcuni anni fa, non solo non poteva essere previsto, ma neppure auspicato. Tuttavia, la

ricerca di nuovi agenti antibatterici deve continuare con immutato vigore. La possibilità che i batteri sviluppino resistenza agli agenti antibatterici oggi chemioterapeuticamente attivi incombe sempre come una minaccia. Sarebbe, inoltre, desiderabile trovare medicamenti meno tossici e più attivi di quelli odierni per il trattamento delle malattie enteriche. La chemioterapia della tubercolosi rappresenta ancora una sfida che richiede profondi studi e ulteriori ricerche. Infine, il problema della chemioterapia delle infezioni da virus, come l'influenza, la polmonite, la febbre gialla ed il comune raffreddore, che dal punto di vista epidemiologico sono molto più importanti delle infezioni batteriche, attualmente è del tutto insoluto, e non è nemmeno certo che, allo stato presente delle nostre conoscenze, sia solubile.

RICERCHE SU NUOVI ANTIBIOTICI, MECCANISMO D'AZIONE DEGLI ANTIBIOTICI, ANTIMETABOLITI, METABOLISMO INTERMEDIO DI MICROORGANISMI.

Gli ulteriori progressi nel campo della chemioterapia batterica dipenderanno dal progresso generale nelle varie branche della microbiologia chimica, importantissimo ramo della biochimica. Le ricerche su nuovi antibiotici rappresentano una di queste branche che attualmente è molto studiata. Mentre stendevo questo articolo un considerevole numero di nuovi antibiotici è apparso nella letteratura e nuovi sviluppi sono imminenti. La fig. 15 mostra una lista, sia pure incompleta, di nuovi antibiotici isolati negli ultimi anni. A proposito di nuovi antibiotici scoperti recentissimamente, è interessante osservare che alcuni hanno una forte azione contro i funghi patogeni, mentre altri sono attivi in vitro contro i batteriofagi, virus che esercitano sui batteri una specifica azione di lisi. Naturalmente, è ancora troppo presto per poter definire quali, seppure ve ne sono, dei nuovi antibiotici troveranno applicazione pratica nella medicina terapeutica, ma è indubbio che si è dischiuso un fertile campo di ricerca, tale da presentare problemi sufficienti ad occupare per molti anni avvenire chimici, biochimici e biologi. Uno dei più importanti aspetti di questo lavoro di ricerca, è la elucidazione del meccanismo d'azione dei nuovi medicamenti antibatterici, da cui potranno derivare nuovi ed insospettati indirizzi di attacco ai problemi chemioterapeutici, anche se i medicamenti studiati non avranno applicazione pratica. Sino ad oggi, ben poco si conosce sull'attacco primario alla cellula batterica da parte di alcuni degli antibiotici noti, quantunque siano state osservate varie alterazioni metaboliche secondarie. E' anche possibile che oggi noi non conosciamo ancora la natura delle reazioni metaboliche con cui vari antibiotici interferiscono; per poter

progredire in questa direzione è essenziale estendere lo studio del metabolismo intermedio dei microorganismi.

ANTIBIOTICI	FORMULA GREZZA	PUNTO DI FUSIONE
ACTINORODINA	$C_{24}H_{22}O_{11}$	
ACTINOMICINA A	$C_{41}H_{56}O_{11}N_8$	250 °C
ACTINOMICINA C	$C_{40}H_{57}O_{11}N_7$	252 °C
AMICETINA	$C_{29}H_{44}N_6O_9$	160-165 °C
ANTIMICINA	$C_{28}H_{40}O_9N_2$	139,2-140,6 °C
CINNAMICINA	polipeptide contenente zolfo	
COLLINOMICINA		280-282 °C
ENDOMICINA		
ERITROMICINA (Ilotycin)	$C_{34-36}H_{60-65}NO_{11-14}$	
EUMICINA		
FRADICINA	$C_{30}H_{34}N_4O_4$	
MAGNAMICINA (Carbomicina)	$C_{41-42}H_{67-69}NO_{16}$	199,5-200,5 °C
NEOMICINA A	$C_{12}H_{26}N_4O_6$	250-260 °C
NETROPSINA	$C_{32}H_{48}N_{18}O_4$	168-172 °C
PICROMICINA	$C_{25}H_{43}O_7N$	169-170 °C
RESISTOMICINA	$C_{23}H_{18}O_6$	315 °C (punto di decomp. senza fusione)
RIMOCIDINA		151 °C
RODOMICINA (Perclorato)	$C_{22}H_{30}O_{11}NCl$	198 °C
VIOMICINA		252 °C

Fig. 15.

L'interpretazione del meccanismo d'azione dei sulfoammidici ad opera di Woods, cui ho già accennato, ha introdotto un concetto nuovo, quello degli « antimetaboliti » che promette di essere un campo molto fertile per i futuri sviluppi della chemioterapia. Tuttavia, la maggior parte dei fattori sino ad oggi noti come essenziali alla crescita dei batteri ha un ruolo importante anche nel metabolismo delle cellule degli animali superiori; sarebbe, quindi, estremamente interessante trovare fattori di crescita che abbiano una funzione specifica sulla sola cellula batterica. Anche qui il progresso può derivare solo da una maggiore conoscenza del metabolismo intermedio dei microorganismi.

MEZZI ED ORGANIZZAZIONE DELLE RICERCHE NECESSARI AI FUTURI SVILUPPI
DELLA MICROBIOLOGIA CHIMICA.

La microbiologia chimica è un campo complesso che richiede la più stretta collaborazione tra chimici, microbiologi ed ingegneri, ed anche molte attrezzature ed impianti speciali. Gli antibiotici ed i fattori di crescita sono prodotti dalle cellule batteriche solo in quantità relativamente piccole; conseguentemente, per produrre quantità di tali sostanze sufficienti a permettere lo studio delle loro proprietà chimiche e biologiche, si richiedono impianti in larga scala che generalmente non esistono nei laboratori universitari. Questi impianti comprendono grandi fermentatori per la produzione di microorganismi ed attrezzature per l'estrazione e le lavorazioni successive necessarie alla produzione del prodotto metabolico desiderato, che è impossibile improvvisare. Va fatto notare che anche le attrezzature più adeguate non sono sufficienti di per sé stesse a garantire il successo del lavoro; egualmente importante è la disponibilità di un personale tecnico ben preparato ed in numero sufficiente per seguire le fermentazioni che talvolta si prolungano ininterrottamente per molte settimane.

Sino ad oggi, i principali progressi nel campo della microbiologia chimica sono stati fatti negli Stati Uniti, ove, specialmente nei grandi complessi commerciali, c'è larga disponibilità di mezzi.

In Europa, si deve dar atto al Governo Italiano di essere stato il primo ad apprezzare l'importanza della microbiologia chimica nel progresso della scienza moderna e di aver messo a disposizione considerevoli fondi per il suo sviluppo. Un grande centro di ricerche è sorto a Roma come parte dell'Istituto Superiore di Sanità ed è dotato di un impianto pilota per le fermentazioni su scala industriale ove è possibile produrre qualunque sostanza di origine microbica ed estrarla in quantità sufficienti per i successivi studi chimici e biologici. In esso i problemi di microbiologia chimica possono essere affrontati adeguatamente dai punti di vista chimico, microbiologico e tecnico. Questa realizzazione è stata resa possibile grazie all'iniziativa, l'energia infaticabile e l'eccezionale capacità organizzativa del Direttore Generale dell'Istituto Superiore di Sanità, Professor D. Marotta, ed ha certamente alzato il livello del potenziale scientifico europeo in tutti i settori del campo della microbiologia chimica. Pur facendo parte di un Istituto Statale di ricerche e pur essendo finanziato totalmente dal Governo Italiano, il Nuovo Centro Internazionale di Ricerche per la Microbiologia Chimica incoraggia la più vasta collaborazione scientifica internazionale; è affiliato alla World Health Organisation ed ha già ospitato biochimici e microbiologi di molte nazioni.

Un esame sommario dei prodigiosi sviluppi della microbiologia chimica in questi ultimi anni, giustifica la speranza che in futuro, come risultato dalle diverse linee di ricerca cui abbiamo accennato, sarà possibile controllare un numero sempre maggiore di malattie infettive.

La chemioterapia, così brillantemente iniziata da PAUL EHRLICH, ha fatto progressi tali da rappresentare una delle più potenti ed efficienti armi della medicina terapeutica; ha salvato innumerevoli vite ed i suoi successi costituiscono un monumento perenne e glorioso al genio ed alla dinamica personalità del grande scienziato, la cui memoria noi oggi abbiamo il privilegio di onorare.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Centro internazionale di chimica microbiologica.
