

УДК 579.61: 615.28: 615.33

## РАЗРАБОТКА НОВЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ – ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Зубов П.В.<sup>1</sup>, Новикова В.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, Пермь, Россия (614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2), e-mail: pet9@yandex.ru

В статье приведен обзор ситуации на рынке антибиотиков – регистрация новых антибиотиков за последние 15 лет в России и мире. Рассмотрены факторы, влияющие на решение фармацевтических компаний инвестировать в разработку новых антибиотиков, а именно - распространение резистентных штаммов микроорганизмов, высокая стоимость выведения нового лекарственного препарата на рынок, длительный срок, необходимый для возврата инвестиций и другие. Во второй части статьи рассмотрены современные подходы к поиску ранее неизвестных мишеней в бактериальной клетке и новых веществ с антибактериальной активностью – рассмотрены методы, используемые для предварительного определения механизма действия вновь синтезированных соединений. Проведен обзор работ, в основе которых лежит анализ генома продуцентов антибиотиков. Статья представляет интерес для исследователей, занимающихся поиском новых биологически активных веществ, а также для всех специалистов, работающих в области фармацевтической и медицинской химии.

Ключевые слова: антибактериальные препараты, резистентность, скрининг, анализ генома.

## DEVELOPMENT OF NEW ANTIBACTERIAL DRUGS – ISSUES AND POSSIBILITIES

Zubov P. V.<sup>1</sup>, Novikova V. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia (614990, Perm, 2 Polevaya street), e-mail: pet9@yandex.ru

The article provides an overview of the situation on the field of antibiotics. Registration of new antibiotics in the last few years in Russia and the world is analyzed in article. The factors influencing the decision of pharmaceutical companies to invest in the development of new antibiotics such as the spread of resistant bacterial strains, the high cost of research and development of a new drug, long duration of return of investment, and others are reviewed. The second part of the article describes the modern approaches to the search for previously unknown targets in the bacterial cell and the new substances with antibacterial activity - the methods used for the screening of the mechanism of action of new derived compounds. Also a review of the works which are based on the analysis of the genome of producers of antibiotics is provided. The article can be useful to chemists specializing in synthesis of new biologically active substances, as well as for all professionals working in the field of pharmaceutical and medical chemistry.

Keywords: antimicrobials, resistance, screening, genome analysis.

Каждый год в мире от инфекционных заболеваний умирает 17 млн. человек, в соответствии с данными ВОЗ, на сегодняшний день инфекционные заболевания занимают 3-4 месте в рейтинге причин смертности [2]. В России, согласно отчету Росстата за 2014 год, смертность от инфекционных заболеваний составляет порядка двух процентов от общего числа умерших, что говорит об относительно благополучной ситуации. Однако следует учитывать, что при статистическом анализе учитывают первичную причину смерти. Согласно нормативным документам, первоначальная причина смерти – это болезнь или травма, вызвавшая цепь событий, непосредственно приведших к смерти, поэтому, при подсчете количества умерших не учитываются осложнения или причины инфекционного происхождения, спровоцировавшие обострение основного заболевания и приведшего в итоге к летальному исходу. По этим причинам, вероятней всего, количество смертей, вызванных

или спровоцированных микроорганизмами, выше, чем приведенная цифра. Таким образом, несмотря на наличие в настоящее время большого количества методов и средств для лечения инфекций, данная группа заболеваний остается достаточно значимой для здравоохранения и человечества в целом.

Особое опасение и тревогу вызывает распространение резистентных штаммов микроорганизмов [19]. На рисунке 1 приведен график на основании информации Американского общества специалистов по инфекционным болезням (IDSA), отражающий распространенность наиболее важных видов резистентных к антибиотикам микроорганизмов. На графике видно, что количество резистентных к антибиотикам штаммов, выявляемых в клиническом материале, растет год от года.

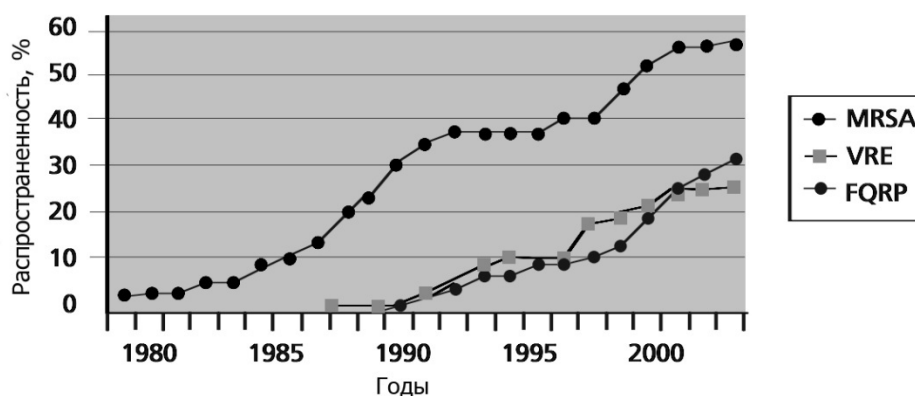


Рис. 1. Динамика распространения наиболее важных резистентных бактериальных штаммов. MRSA – метициллин резистентный *Staphylococcus aureus*, VRE – ванкомицин резистентные бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, FQRP – резистентные к фторхинолонам *Pseudomonas aeruginosa* [13]

Общую статистику по всем случаям инфекционных заболеваний, вызванных резистентными микроорганизмами, привести достаточно сложно. Считается, что порядка 70% внутригоспитальных инфекций вызваны штаммами, которые устойчивы к одному или нескольким антибиотикам. По последней доступной статистике за 2006 год в России ежегодно регистрируется около 60 тысяч случаев внутрибольничных инфекций [3], хотя, по оценкам экспертов, эта цифра выше в 40-50 раз [4].

Уже через 7 лет после введения в практику пенициллина, 50% штаммов *Staphylococcus aureus* были невосприимчивы к действию этого антибиотика по причине распространения штаммов бактерий, вырабатывающих пенициллиназу [23]. В дальнейшем, после введения в практику метициллина, устойчивого к воздействию указанного фермента, появились устойчивые бактериальные штаммы, объединенные в дальнейшем в группу MRSA (*methicillin resistant Staphylococcus aureus*), резистентность которых обусловлена другим механизмом – бактериальная клетка изменяла белок-мишень, предотвращая, таким

образом, его блокирование. Кроме того, помимо снижения чувствительности к антибиотикам, штаммы MRSA более вирулентны – в частности, смертность при бактериемии, вызванной штаммами MRSA, значительно выше по сравнению с уровнем смертности при бактериемии, вызванной штаммами *Staphylococcus aureus*, чувствительными к метициллину [12].

Наибольшее внимание обращает на себя факт увеличения количества зарегистрированных случаев появления устойчивых к резервным антибиотикам штаммов, например, количество сообщений о появлении штаммов *S. aureus*, резистентных к ванкомицину, увеличилось с 2 в 2002 году до 12 в 2010 [21].

Более того, проблема инфекций, вызванных резистентными штаммами бактерий, начала выходить за рамки лечебных учреждений – сообщалось о случаях заболеваний, вызванных MRSA, полученных при использовании одного комплекта спортивного оборудования несколькими людьми [21].

На рисунке 2 приведена схема, отражающая время внедрения в практику антибиотика и время появления первых сообщений о появлении резистентных штаммов чувствительных ранее видов микроорганизмов. Как видно на схеме, скорость появления резистентных штаммов микроорганизмов к вновь введенным в практику антибактериальным препаратам варьирует от 1 до 10 лет.

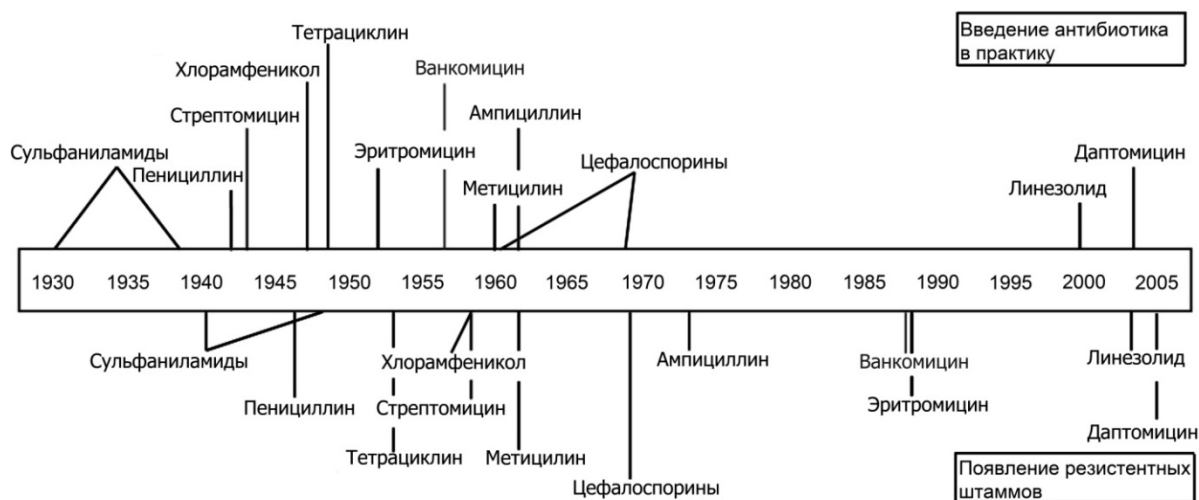


Рис. 2. Внедрение в практику антибиотиков и появление резистентных штаммов [21]

Таким образом, очевидно, что на сегодняшний день, имеется острая необходимость в новых антибактериальных препаратах. Однако, несмотря на это, ситуация с введением в практику препаратов этой группы год от года ухудшается – количество вводимых в практику антибиотиков падает.

Проанализировав информацию из литературных источников и отчетов FDA (Foodanddrugadministration), мы получили следующую закономерность (рис. 3). Из

диаграммы видно, что ежегодно в среднем регистрируется порядка 1-2 антибиотиков преимущественно с известным ранее механизмом действия. Из 184 препаратов, зарегистрированных за последние пять лет ведомством FDA, только 12% были антимикробными препаратами.

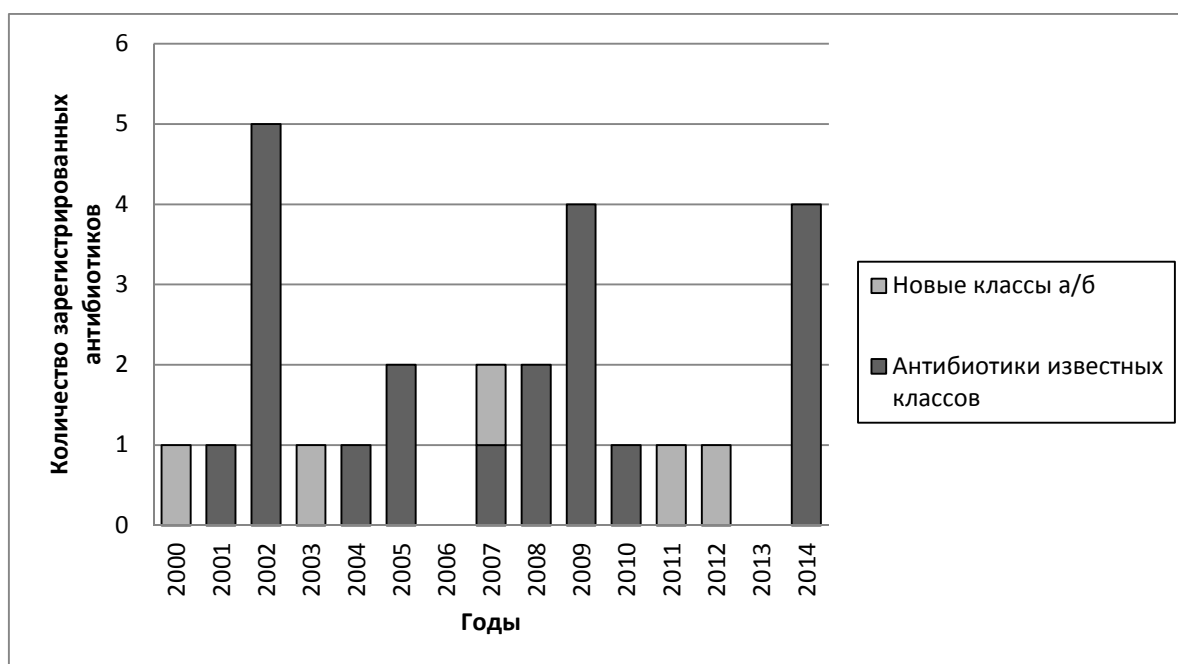


Рис. 3. Количество зарегистрированных FDA антибиотиков с 2000 по 2014 год

В таблице 1 приведены зарегистрированные FDA с 2000 года антибиотики (на основании информации из [9] и отчетов FDA за 2013 и 2014 года), а также информация об их регистрации в России (на основании информации государственного реестра лекарственных средств по состоянию на 6 июля 2015 года). Из таблицы видно, что большая часть антибиотиков, зарегистрированных в западных странах, с некоторой задержкой, но регистрируется также и в России.

Таблица 1

Зарегистрированные с 2000 год антибиотики – их характеристики и статус регистрации в России.

Год регистрации	Название препарата	Класс	Спектр действия	Происхождение	Год регистрации в РФ
2000	Линезолид	Оксазолидиноны	Гр+*	Синт***	2006
2001	Телитромицин	Макролиды	Гр+ / Гр- **	Прир*** *	2004
2002	Биапенем	Карбапенемы	Гр+ / Гр-	Прир	-
2002	Эртапенем	Карбапенемы	Гр+ / Гр-	Прир	2008
2002	Прулифлоксацин	Фторхинолоны	Гр+ / Гр-	Синт	-
2002	Пазуфлоксацин	Фторхинолоны	Гр+ / Гр-	Синт	-
2002	Балофлоксацин	Фторхинолоны	Гр+ / Гр-	Синт	-
2003	Даптомицин	Липопептиды	Гр+	Прир	2009
2004	Гемифлоксацин	Фторхинолоны	Гр+ / Гр-	Синт	2006

2005	Дорипенем	Карбапенемы	Гр+ / Гр-	Прир	2008
2005	Тигециклин	Тетрациклины	Гр+ / Гр-	Прир	2009
2007	Ретапамулин	Плевромутилины	Гр+	Прир	2011
2007	Гареноксацин	Хинолоны	Гр+ / Гр-	Синт	-
2008	Цефтобипроламед окарил	Цефалоспорины	Гр+ / Гр-	Прир	2009
2008	Ситафлоксацин	Фторхинолоны	Гр+ / Гр-	Синт	-
2009	Тебипенемпивокс ил	Карбапенемы	Гр+ / Гр-	Прир	-
2009	Телаванцин	Гликопептиды	Гр+	Прир	2015
2009	Антофлоксацин	Фторхинолоны	Гр+ / Гр-	Синт	-
2009	Безифлоксацин	Фторхинолоны	Гр+ / Гр-	Синт	-
2010	Цефтаролинафоса мил	Цефалоспорины	Гр+ / Гр-	Прир	2012
2011	Фидаксомицин	Макроциклические антибиотики	Гр+	Прир	-
2012	Бедаквилин	Диарилхинолины	Гр+ (ТБ)	Синт	2013
2014	Далбаванцин	Гликопептиды	Гр+	Прир	-
2014	Тедизолид	Оксазолидиноны	Гр+	Синт	-
2014	Оритаванцин	Гликопептиды	Гр+	Прир	-
2014	Цефтолозан/тазоб актам	Цефалоспорин+ ингибитор $\beta$ - лактамаз	Гр+ / Гр-	Прир	-

\* Гр+ – грамположительные, \*\* Гр- – грамотрицательные, \*\*\* Синт – синтетического происхождения, \*\*\*\* Прир – природного происхождения

Снижение количества вновь регистрируемых антибиотиков вызвано низкой инвестиционной привлекательностью данной группы препаратов у производителей. Помимо уже упомянутой высокой скорости распространения резистентных штаммов, данной ситуации способствуют еще несколько факторов:

1. Высокая стоимость разработки и вывода на рынок нового препарата

С 2003 года стоимость работ, проведенных до получения компанией-разработчиком регистрационного удостоверения от FDA, увеличилась более чем в два раза и в настоящее время составляет в среднем 2,6 миллиарда долларов [6], [14].

К сожалению, нам не удалось найти исследований, посвященных стоимости исследовательских работ, проводимых российскими фармацевтическими компаниями до вывода препарата на рынок. Приведем лишь размеры выплат государственным органам за процедуры, необходимые для регистрации препарата. В случае регистрации препарата, который не был в обращении на территории РФ в течение более чем 20 лет, размер государственной пошлины составит 350 000 рублей, а в случае отсутствия проведенных клинических исследований, сумма увеличится еще на 100 000 рублей (на основании требований Налогового кодекса РФ и ФЗ № 61). Таким образом, сумма только

государственных пошлин при регистрации препарата в РФ, составляет около полумиллиона рублей.

Ситуацию усугубляет короткий срок действия патентной защиты – 20 лет. За это время необходимо провести доклинические и клинические испытания, зарегистрировать препарат, что занимает, в среднем, около 10 лет. Таким образом, фармацевтические компании располагают сроком около 10 лет, чтобы вернуть затраченные средства и получить прибыль.

## 2. Короткий курс приема антибактериальных препаратов

В отличие от препаратов, применяемых для лечения сердечнососудистых, пульмонологических, онкологических и других заболеваний, курс приема антибиотиков редко превышает 4 недели, даже в самых серьезных случаях. В среднем прием антибиотиков длится 7 – 14 дней. Этот факт также способствует отказу фармацевтических компаний от дальнейшей разработки антибактериальных препаратов, по причине недостаточно большого объема средств, получаемых от реализации антибиотиков.

## 3. Введение антибиотиков в резерв

После регистрации новых антибактериальных препаратов, регуляторные органы, как правило, в целях предотвращения быстрого развития резистентности, ограничивают обращение этих препаратов [11]. Данный факт еще более ухудшает положение антибиотиков в качестве объекта для инвестиций.

Все вышеперечисленные причины приводят к тому, что крупные фармацевтические компании все чаще отказываются от работ в области разработки новых антибиотиков.

### **Подходы к получению новых антибактериальных препаратов**

Несмотря на все вышеперечисленные причины, новые антибиотики регистрируются. В настоящее время разработкой новых антибактериальных препаратов занимаются небольшие биотехнологические компании, которые, как правило, расположены в США (например, Achaogen, AiCuris, Basilea, Cempra, и др.) [17]. Рассмотрим основные тенденции в области поиска новых биологически активных веществ с антибактериальными свойствами.

### ***Сплошной и направленный скрининг вновь синтезированных или выделенных из природных источников веществ***

Скрининг вновь синтезированных соединений – это ранний подход в поиске новых веществ с антибактериальной активностью. Данное направление широко используется российскими учеными [1], [5]. Сплошной скрининг вновь полученных веществ имеет ряд неоспоримых преимуществ – возможность изучения широкого круга соединений, простота используемых методик, возможность быстрого получения практического результата анализа. Тем не менее, этот подход не обладает должной продуктивностью и вытесняется современными

методиками, которые учитывают биологические особенности микроорганизмов и человека и, как следствие, позволяют получать более активные и безопасные вещества быстрее и с меньшими усилиями.

#### ***Анализ генома патогенных бактерий на предмет выявления потенциальных мишеней***

Отличительной чертой большинства используемых в настоящее время методов поиска антибиотиков является широкое использование информации, получаемой в ходе анализа генома микроорганизмов – как патогенных болезнетворных, являющихся мишенью антибиотиков, так и генома основных известных продуцентов антибиотиков (например, актиномицетов).

В 1995 году был полностью секвенирован геном *Haemophilus influenzae* [15]. Сразу после публикации результатов секвенирования генома *Haemophilus influenzae* компанией GlaxoSmithKline были начаты работы по выявлению генов наиболее важных белков упомянутой бактерии, которые впоследствии могли бы стать мишенями для новых антибиотиков. Используя антисмысловые микро РНК и плазмиды с индуцибельными промоторами (более подробно использованные методы описаны в статьях – [18], [10], [22]), регулируя экспрессию генов, анализировали физиологические проявления пониженной экспрессии тех или иных генов бактерии, после чего анализируемый ген вырезали, получая нокаутные штаммы. При культивировании подобного рода нокаутных штаммов не должно было наблюдаться роста, что подтверждало критическую важность тех или иных белков бактерии.

Через некоторое время после начала описанных выше работ, были опубликованы результаты полного секвенирования генома *Moraxellacatarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus faecalis*. Для выбора общих, универсальных для бактерий белков, в целях определения мишеней для антибактериальных веществ широкого спектра действия, был проведен анализ геномов на выявление белков с наиболее консервативной аминокислотной последовательностью среди перечисленных бактерий и *Haemophilus influenzae*. Таким образом было выделено более 300 консервативных белков, которые в дальнейшем были также проанализированы на значимость для каждого из видов бактерий с использованием описанной выше методики. По результатам анализа из 300 белков были выделены 160 наиболее важных белков, блокирование которых вызывает гибель бактериальной клетки [18], [20].

Таким образом, на сегодняшний день доступна вся требуемая информация для проведения направленного синтеза веществ с антибактериальным действием – белки-мишени определены, информация о белках имеется в открытом доступе.

#### ***Анализ вторичных метаболитов продуцентов антибиотиков***

Другим важным направлением поиска антибиотиков является анализ генома микроорганизмов-продуцентов. Наибольшее количество имеющихся на рынке антибиотиков являются продуктами жизнедеятельности актиномицетов. Эти вещества используются не только в качестве антибактериальных препаратов, но и играют большую роль при лечении онкологических заболеваний [7], [21]. После анализа данных, полученных при полном секвенировании генома актиномицетов, выяснилось, что размер генома актиномицетов несколько больше по сравнению с геномом других групп бактерий. В ходе дальнейших исследований выяснилось, что избыток генетического материала кодирует белки, вовлеченные в процессы, связанные с вторичными метаболитами. По этой причине, в настоящее время пристальное внимание уделяется этой группе веществ.

Помимо актиномицетов, второй группой организмов, являющихся традиционно источником новых антибактериальных препаратов, являются грибы. Около 42% всех антибиотиков имеют грибковое происхождение [8]. По этой причине, данная группа организмов также является объектом пристального внимания со стороны исследователей, занимающихся поиском новых антибиотиков.

Для изучения вторичных метаболитов упомянутых двух групп микроорганизмов, в большинстве случаев используют следующий подход – анализируют геном микроорганизма на предмет наличия генов с неизвестной функцией. Вырезают искомый ген рестриктазами и получают нокаутный по данному гену микроорганизм. Культивируют нокаутный штамм параллельно с обычным штаммом микроорганизма. После этого анализируют культуральную жидкость хроматографическими методами с чувствительным детектором и выявляют наличие дополнительных пиков на хроматограмме культуральной жидкости, полученной при культивировании микроорганизма обычного штамма. Эти дополнительные пики соответствуют тем веществам, биосинтез которых был заблокирован у нокаутных штаммов по причине удаления гена. Затем генно-инженерным способом получают вещества и описывают их свойства. Более подробно методы описаны в работах [8], [16].

### **Заключение**

В заключении стоит отметить, что в настоящее время накоплено достаточно большое количество знаний об особенностях жизнедеятельности микроорганизмов, имеется большой выбор стратегий и методов поиска новых антибактериальных препаратов.

Тем не менее, к сожалению, подавляющее большинство публикаций, посвященных синтезу антимикробных препаратов, в российских журналах по медицинской и фармацевтической химии, описывают, как правило, химическую часть и общую противомикробную активность веществ, оставляя в тени механизмы, обеспечивающие антимикробную активность нового вещества. Однако, очевидно, что в научном поиске новых



веществ с антибактериальной активностью необходимо использовать методы не только медицинской химии, но и молекулярной биологии, генетики и других биологических дисциплин, основные направления, применения которых мы описали. И поскольку крупные фармацевтические компании отказываются от разработок антибиотиков, на сегодняшний день большая надежда в области поиска новых антибиотиков сегодня возлагается на небольшие некоммерческие научные группы, которые имеют частичное государственное финансирование.

### Список литературы

1. Великородов А.В., Ионова В.А., Дегтярев О.В., Сухенко Л.Т. Синтез, антимикробная и противогрибковая активность спиросоединений с карбаматной функцией // Химико-фармацевтический журнал, Вып. 46, №. 12, 2012. Стр. 19-23.
2. Информационный бюллетень ВОЗ № 310 "10 ведущих причин смерти в мире", 2014.
3. Онищенко Г.Г. О состоянии заболеваемости внутрибольничными инфекционными болезнями. // Стерилизация и госпитальные инфекции, 2006. Стр. 1:5-7.
4. Покровский В.И., Семина Н.А., Ковалева, Е.П. Эпидемиология и профилактика внутрибольничных инфекций в Российской Федерации. // Стерилизация и госпитальные инфекции, 2006. Стр. 1:8-11.
5. Юнникова, Л.П., Акентьева Т.А., Александрова Г.А. Синтез и противомикробная активность аминов и иминов с циклогептатриеновым фрагментом // Химико-фармацевтический журнал, Вып. 46, №. 12, 2012. Стр. 27-29.
6. Asher, M. New drugs cost US\$2.6 billion to develop // Nature Reviews Drug Discovery, 2014. P. 877.
7. Baltz, R.H. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes // Current Opinion in Pharmacology, 2008. pp. 8:557–563.
8. Brakhage, A.A., Schroeckh, V. Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters // Fungal Genetics and Biology, 2011. pp. 15–22.
9. Butler, M.S., Blaskovich, M.A., and Cooper, M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013 // The Journal of Antibiotics, 2013. pp. 571–591.
10. Chan, P.F., Macarron, R., Payne, D.J., Zalacain, M., and Holmes, D.J. Novel Antibacterials: A Genomics Approach to Drug Discovery // Current Drug Targets - Infectious Disorders, 2002. pp. 291-308.
11. Christoffersen, R.E. Antibiotics—an investment worth making? // Nat Biotechnol, 2006. pp. 24:1512–1514.

12. Cosgrove, S.E., Sakoulas, D., Perencevich, E.N., Schwaber, M.J., Karchmer, A.W., and Carmeli, Y. Comparison of Mortality Associated with Methicillin-Resistant and Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Meta-analysis // *Clin Infect Dis*, 2006. pp. 36:53–59.
13. Dalovisio, J.R. IDSA: Infancy to adulthood in four decades. // *Clinical Infectious Diseases*, No. 40, 2005. pp. 574–578.
14. DiMasi, J.A., Hansen, R.W., Grabowski, H.G. The price of innovation: new estimates of drug development costs // *Journal of Health Economics*, 2003. pp. 151–185.
15. Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.B., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., et al. Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of *Haemophilus influenzae* Rd // *SCIENCE*, 1995. pp. 496-512.
16. Genilloud, O., González, I., Salazar, O., Martín, J., Tormo, J.R., Vicente, F. Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products // *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011. pp. 375-389.
17. Hesterkamp, T. *Antibiotics Clinical Development and Pipeline*. Springer International Publishing, 2015.
18. Ji, Y., Zhang, B., Van Horn, S.F., Warren, P., Woodnutt, G., Burnham, M.K.R., Rosenberg, M. Identification of Critical Staphylococcal Genes Using Conditional Phenotypes Generated by Antisense RNA // *SCIENCE*, 2001. pp. 2266-2268.
19. Merelli, M., Bassetti, M., Temperoni, C., Astilean, A. New antibiotics for bad bugs: where are we? // *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2013. pp. 12-22.
20. Payne, D.J., Gwynn, M.N., Holmes, D.J., Pompliano, D.L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery // *Nature Reviews Drug Discovery*, 2007. pp. 6:29-40.
21. Scheffler, R.J., Colmer, S., Tynan, H., Demain, A.L., Gullo, V.P. Antimicrobials, drug discovery, and genome mining // *ApplMicrobiolBiotechnol*, 2013. pp. 97:969–978.
22. Schweizer, H.P. Bacterial genetics: past achievements, present state of the field, and future challenges // *BioTechniques 25th Anniversary*, 2008. pp. 633–641.
23. Wenzel, R.P. The antibiotic pipeline—challenges, costs, and values. // *N Engl J Med*, 2004. pp. 351:523–526.

#### **Рецензенты:**

Игидов Н.М., д.фарм.н., профессор, профессор кафедры общей и органической химии ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, г. Пермь;

Молохова Е.И., д.фарм.н., профессор, профессор кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, г. Пермь.