



ТУКАЛО

Михайло Арсентійович – член-кореспондент НАН України, доктор біологічних наук, професор, заступник директора Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

НОВІ ПІДХОДИ ДО СТВОРЕННЯ АНТИБІОТИКІВ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНИХ ФОРМ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

Стенограма наукової доповіді на засіданні Президії НАН України 14 червня 2017 року

*Доповідь присвячено актуальним проблемам створення антибіотиків проти резистентних форм патогенних бактерій, зокрема туберкульозної палички (*Mycobacterium tuberculosis*). За результатами робіт, що виконуються в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України, знайдено низку сполук, які ефективно пригнічують ріст туберкульозної палички і мають активність щодо відповідних резистентних штамів. Дві сполуки рекомендовано для подальших доклінічних і клінічних досліджень.*

Шановні члени Президії! Шановні колеги!

Сьогодні супербактерії, тобто бактерії, стійкі до антибіотиків, кидають людству справжній виклик. Якщо не вжити термінових заходів, до 2050 р. від хвороб, спричинених стійкими до антибіотиків бактеріями, на нашій планеті щороку помиратиме 10 млн чоловік, економічний збиток становитиме 100 трлн доларів на рік. Такого висновку дійшли автори доповіді, присвяченої актуальній проблемі антимікробної резистентності і підготовленої на замовлення британського уряду командою провідних експертів під керівництвом відомого економіста Джима О'Ніла (Jim O'Neill). Річ у тім, що людство сьогодні не виробляє достатньо нових антибіотиків і неефективно використовує вже наявні.

Одна з найактуальніших проблем сучасної медицини – множинна стійкість до антибіотиків збудника туберкульозу, а отже, туберкульоз, що нині лікується антибіотиками, може знову стати невиліковною хворобою. За статистичними даними, щорічна захворюваність на туберкульоз у світі становить у середньому 9 млн чоловік, з яких 3 млн помирають від ускладнень. При цьому на сьогодні зафіксовано стійкість мікобактерій туберкульозу (*Mycobacterium tuberculosis*) до таких найпоширеніших антибіотиків, як ізоніазид та рифампіцин, а також

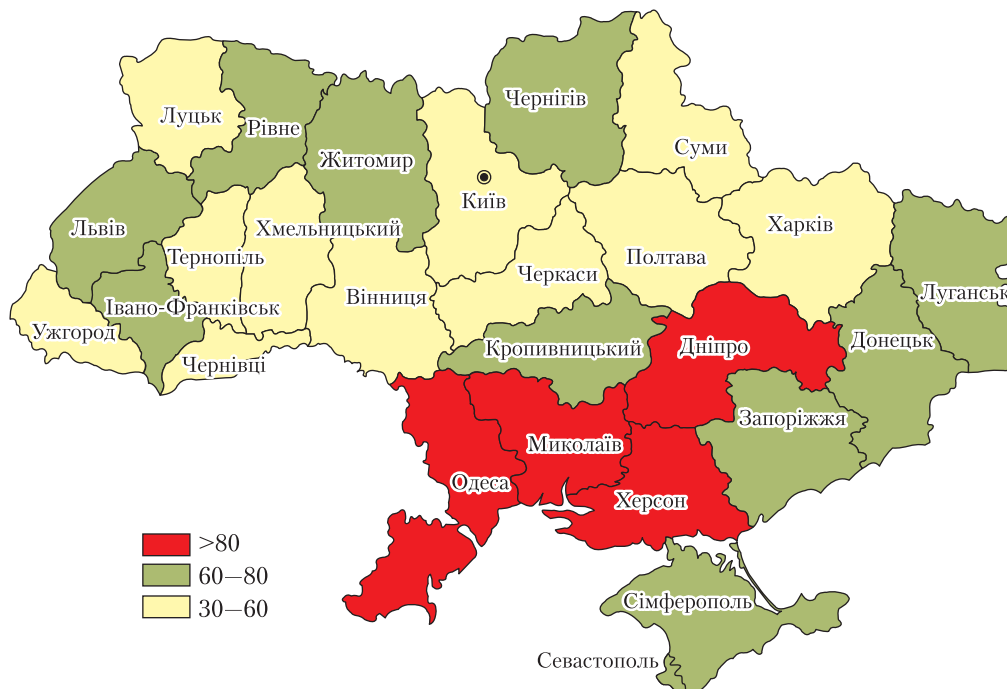


Рис. 1. Рівень захворюваності на туберкульоз в Україні (різними кольорами позначено кількість випадків захворювання на 100 тис. населення)

до протитуберкульозних препаратів другої лінії, зокрема фторхінолонів. У 2012 р. вперше за більш як сорок років FDA було схвалено новий препарат бедахілін (Сіртуро). Його ще навіть немає в Україні, проте нещодавно вже були зафіксовані випадки стійкості збудників до бедахіліну.

Ситуація із захворюваністю на туберкульоз в Україні дуже серйозна. За останніми даними, рівень захворюваності в середньому по країні становить 67,2 випадків на 100 тис. населення, але ці показники значно різняться по регіонах (рис. 1). Якщо у західних і північних областях епідеміологічна ситуація з туберкульозом є більш-менш прийнятною (від 30 до 60 випадків захворювань на 100 тис. населення), то у південних регіонах вона наближається до порогової, захворюваність подекуди сягає 100 випадків на 100 тис. населення.

Проблема поглиблюється тим, що частота первинної резистентності в Україні становить від 7 до 25 % хворих залежно від регіону, а вто-

ринна резистентність сягає 75%. Україна входить до першої п'ятірки країн за темпами зростання лікарсько стійкого туберкульозу і має один з найнижчих показників ефективності його лікування.

Згадана вище експертна комісія запропонувала британському уряду перелік конкретних заходів щодо запобігання ситуації, в якій, за словами керівника групи Джима О'Ніла, медицина буде «відкинута у середньовіччя», проте реалізація цього плану потребує мільярдних інвестицій. Автори доповіді надали такі рекомендації:

- скоротити надмірне використання антибіотиків в агропромисловому секторі, заборонити застосування в сільському господарстві антибіотиків, здатних впливати на здоров'я людей;
- удосконалити систему контролю за поширенням резистентних мікроорганізмів;
- виплачувати фармацевтичним компаніям 1 млрд доларів за розроблення кожного нового антибіотика;

- запровадити фінансові стимули для створення нових аналізів і тестів, що дозволяють уникнути застосування антибіотиків там, де вони не допоможуть;

- сприяти якомога ширшому використанню вакцин та інших альтернатив лікарським засобам.

Ситуація на сьогодні така, що легше запустити в космос супутник, ніж створити новий оригінальний препарат. Ще 10 років тому повний цикл розроблення одного оригінального лікарського засобу обходився у суму близько 1 млрд доларів, сьогодні — від 3 до 10 млрд доларів.

Зараз у медицині вже використовують величезну кількість препаратів, і винайти принципово нові ліки, які будуть ефективнішими за наявні, дуже складно. Весь процес розроблення нового препарату займає близько 12–15 років. Причому немає жодних гарантій, що всі стадії випробувань препарату пройдуть успішно. Аналітики американської асоціації фармацевтичних компаній PhRMA підраховали, що на ринок потрапляє лише 1 з 10 000 медичних препаратів, над розробленням яких працюють дослідники. Усі ці фактори призводять до того, що фармацевтичним фірмам невигідно розробляти нові антибіотики. Набагато легше випускати високовартісні ліки проти, скажімо, нейродегенеративних захворювань.

Яким же чином можна підвищити ефективність процесу розроблення нових антибіотиків? Традиційно основним завданням багатьох секторів фармацевтичної промисловості і академічної науки є пошук молекул, перспективних для створення нових препаратів. Однак якщо раніше дослідники брали кілька десятків тисяч сполук певного класу, перевіряли їх усі на протибактеріальну дію і відбирали найкращі, то зараз використовують раціональний, мішень-спрямований підхід до винайдення ліків. Нагадаю, що молекулярна мішень — це молекула, найчастіше білкова, яка критично задіяна у перебігу на молекулярному рівні тієї чи іншої хвороби. Якщо заблокувати роботу цього білка, можна загальмувати чи навіть повністю припинити розвиток певної хвороби.

Увесь тривалий процес створення нових лікарських засобів можна умовно поділити на дві частини: 1) процес винайдення нових ліків (Drug Discovery) і 2) процес їх розроблення (Drug Development). На перших двох етапах винайдення ліків насамперед потрібно ідентифікувати молекулярні мішені, здійснити їх валідацію, тобто встановити, що певна біомолекула пов'язана з розвитком конкретної патології, а потім провести її всебічне тестування. Наступним етапом є доклінічні дослідження активності сполук, причому здійснюються вони на різних рівнях: молекулярному, клітинному, організмівому. Це, так би мовити, наукові етапи створення ліків, оскільки для якнайкращої ідентифікації та валідації молекул-мішеней, вибору методів дослідження біоактивності, технологій високопродуктивного скринінгу, дизайну та синтезу бібліотек хімічних сполук і подальшої оптимізації лікерної сполуки потрібні знання і навички вчених — біохіміків, біофізиків, молекулярних біологів, генетиків та інших фахівців (рис. 2).

Далі процес створення нових ліків переходить на етап попередніх клінічних тестувань, потім іде тривалий (не менш як 6–7 років) етап клінічних випробувань із залученням добровольців. Нарешті препарат передається на розгляд до FDA — Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів і лише після затвердження FDA передається для виробництва фармацевтичним підприємствам.

З огляду на розподіл за біохімічним критерієм типів молекулярних мішеней, застосовуваних у сучасній фармацевтичній індустрії, роботи Інституту молекулярної біології і генетики НАН України з пошуку хімічних речовин, прототипів лікарських засобів для лікування мультирезистентних форм туберкульозу з використанням методології мішень-спрямованого раціонального способу винайдення ліків проводилися з використанням аміноацил-тРНК-синтетази як перспективних молекулярних мішеней.

Аміноацил-тРНК-синтетази (АРСази) — це одна з основних груп ферментів білкового



Рис. 2. Основні етапи та методичні підходи до винайдення терапевтичних препаратів — «науковий» етап створення нових ліків

синтезу, що відповідає основним критеріям, визначеним у сучасній фармацевтиці:

- АРСази є важливими для життєдіяльності всіх живих організмів;
- порівняння послідовностей АРСаз бактерій і людини засвідчило для деяких представників значні еволюційні розходження, що дає змогу сподіватися на розроблення антибактеріальних інгібіторів, які не будуть токсичними для людини;
- відповідні АРСази мають високу консервативність серед різних бактеріальних патогенів, що уможливує створення антибіотиків широкого спектра дії;
- АРСази не мають перехресної резистентності з більшістю відомих антибіотиків;
- велика кількість вивчених на сьогодні просторових структур АРСаз надає платформу для раціонального пошуку ліків;
- ці ферменти є розчинними, відносно стабільними, їх можна легко очищувати у великих кількостях, використовуючи генні конструкції, що значно спрощує широкомасштабний скринінг.

У відділі ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України АРСази вивчають уже багато років. Відпрацьовано систему клонування, суперпродукції, очищення цих ферментів

з подальшою кристалізацією і вивченням їх за допомогою методів рентгеноструктурного аналізу (роботи проводилися спільно з Європейською молекулярно-біологічною лабораторією (European Molecular Biology Laboratory, EMBL)).

Як приклад нашої роботи з ідентифікації і валідації мішені можу навести результати нашої співпраці з компанією Anacor Pharmaceuticals (США). Ця компанія свого часу традиційним класичним методом перебору віднайшла новий антигрибковий препарат AN2690, який добре діяв при лікуванні оніхомікозу, на який страждає 10–20% населення. Однак для того, щоб отримати позитивний висновок FDA, вони мали дослідити молекулярний механізм дії препарату, для чого потрібно було знати мішень. Проведені дослідження на штаммах, стійких до антигрибкового препарату, дозволили висунути гіпотезу про те, що його мішенню є лейцил-тРНК-синтетаза. На підтвердження цієї гіпотези компанія Anacor запропонувала нам дослідити третинну структуру ферменту в комплексі з транспортною РНК і препаратом AN2690. Ми зробили аналіз кристалів за допомогою рентгенографії у співробітництві з доктором С. Кусаком (Гренобльське відділення EMBL) і виявили абсолютно новий механізм дії антибіотика. З'ясувалося, що препарат

AN2690 (тепер це вже антибіотик, який продається на ринку) пришивається до кінцевого нуклеозиду транспортної РНК і в такий спосіб прикріплює її до ферменту. Внаслідок цього припиняється функціонування ферменту, переривається біосинтез білків, що й призводить до загибелі грибкових клітин.

Отже, ми знайшли новий механізм дії антибіотиків, опублікували результати в одному з найпрестижніших журналів, але найголовніше в цьому те, що ми знайшли нову мішень лейцил-тРНК-синтетази і використали це в подальших дослідженнях, пов'язаних з пошуком протитуберкульозних антибіотиків. Ці дослідження проводилися спільно з відділом медичної хімії нашого Інституту, яким керує професор С.М. Ярмолук. За допомогою методу віртуального скринінгу і комп'ютерного моделювання зі 100 тис. сполук, що містяться в інститутській бібліотеці сполук, ми відібрали ті, які підходили нам найбільшою мірою, і провели з ними біохімічні тестування. Причому ми вивчали інгібувальну активність низки обраних вресіт-ресіт сполук і щодо туберкульозної палички (*MtLeuRS*), і щодо лейцил-тРНК-синтетази людини (*HsLeuRS*), намагаючись досягти якомога більшої селективності препарату. У результаті було побудовано модель комплексу лейцил-тРНК-синтетази *M. tuberculosis* з інгібітором (рис. 3).

З усіх етапів процесу винайдення нових ліків я хотів би детальніше зупинитися на біологічному скринінгу сполук для дослідження протитуберкульозної активності. На стадії попереднього скринінгу у нас була можливість налагодити співпрацю з американським Національним інститутом алергології та інфекційних захворювань (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIAID) – провідною установою цього профілю у світі. Колеги з NIAID допомогли нам з проведенням тестування 963 сполук різних хімічних класів на інгібувальну активність відносно штаму *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv за аеробних умов.

У результаті тестувань було відібрано 59 речовин, які найбільшою мірою пригнічували розвиток патогенних бактерій, причому не



Рис. 3. Модель комплексу лейцил-тРНК-синтетази *Mycobacterium tuberculosis* з інгібітором

лише за нормальних умов, а й у середовищі зі знизеним вмістом кисню, що дуже важливо. На стадії розширеного біологічного дослідження ми вивчали їх бактерицидну активність, а також перевіряли на цитотоксичність та внутрішньоклітинну активність. Крім того, всі ці 59 речовин досліджували на ізоніазид-, рифампіцин- та флуорохінолін-резистентних штаммах мікобактерій.

На наступній стадії три найперспективніші сполуки (0129665536 – 1, 7016362302 – 2, 7016362348 – 3) досліджували на ADME-властивості (абсорбція, розподілення, метаболізм, екскреція). Експериментально вивчали зв'язування з білками плазми крові, проникнення крізь мембрану на моношарі клітин *Saco-2*, інгібувальну активність до шести ізоформ цитохрому P450, мікросомальну стабільність та цитотоксичність на клітинній лінії *HerG2* (клітини печінки людини). У підсумку дві сполуки (1 та 2) було рекомендовано для досліджень на тваринній моделі туберкульозу.

Результати цих досліджень опубліковано в престижних міжнародних журналах, отримано два патенти на корисну модель: «Низькомолекулярні органічні сполуки з антитуберкульозною дією на основі тіосемікарбазону

бензальдегідів» і «Низькомолекулярні органічні сполуки з антитуберкульозною дією на основі гідразиду ізоніотинової кислоти». Зараз ми шукаємо можливості для проведення доклінічних, а потім і клінічних випробувань. На жаль, потрапити до державної програми з боротьби з туберкульозом нам так і не вдалося, як не вдалося зацікавити відповідні державні органи України у фінансуванні подальших робіт зі створення лікарських препаратів для лікування мультирезистентних форм туберкульозу.

Отже, в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України розроблено повний цикл методології мішень-спрямованого, раціонального пошуку низькомолекулярних інгібіторів

аміноацил-тРНК-синтез *Mycobacterium tuberculosis* з протитуберкульозною активністю. Знайдено низку сполук, які пригнічують ріст туберкульозної палички. Їх активність близька до таких відомих і поширених у медичній практиці препаратів, як ізоніазид, рифампіцин та офлоксацин, але розроблені нами сполуки мають активність щодо відповідних резистентних штамів. Дві сполуки показали обнадійливі ADME-властивості та низьку цитотоксичність відносно клітин печінки людини і їх рекомендовано для подальших доклінічних і клінічних досліджень.

Дякую за увагу!

За матеріалами засідання підготувала О.О. МЕЛЕЖИК

M.A. Tukalo

Institute of Molecular Biology and Genetics
of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kyiv)

NEW APPROACHES TO THE CREATION OF ANTIBIOTICS
FOR THE TREATMENT OF MULTI-RESISTANT FORMS OF TUBERCULOSIS

Transcript of scientific report at the meeting of the Presidium of NAS of Ukraine, June 14, 2017

The report is devoted to the actual problems of creating antibiotics against resistant forms of pathogenic bacteria, in particular tuberculosis bacilli (*Mycobacterium tuberculosis*). According to the results of the work carried out at the Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine, a number of compounds have been found that effectively inhibit the growth of tuberculosis bacilli and are active against corresponding resistant strains. Two compounds are recommended for further preclinical and clinical studies.

Keywords: new antibiotics, multi-resistant strains, *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis.