



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ •Экспериментальные и теоретические статьи•
•Experimental and theoretical articles•

Биолог. журн. Армении, 4 (67), 2015

НОВЫЕ ДАННЫЕ ОБ ИНГИБИТОРАХ ФЕРМЕНТОВ, МОДИФИЦИРУЮЩИХ АНТИБИОТИКИ

Н.А. ОГАНЕСЯН

НПЦ "Армбиотехнология" НАН РА
arm_biotech@yahoo.com, nelliog@yahoo.fr

Число бактериальных инфекций, устойчивых к антибиотикам, постоянно растет, что приводит к повышению уровня смертности. Предложены разные способы преодоления этой проблемы. Устойчивость бактерий к бета-лактамам и аминогликозидам в основном обусловлена присутствием бета-лактамаз и модифицирующих аминогликозиды ферментов. Наиболее удачным способом восстановления активности антибиотиков является использование их с ингибиторами ферментов. В настоящем обзоре обсуждаются последние данные, касающиеся изучения ингибиторов бета-лактамаз и модифицирующих аминогликозиды ферментов.

*Антибиотик – ингибитор – бета-лактамаза – фермент,
модифицирующий аминогликозиды*

Հակաբիոտիկների նկատմամբ կայուն ինֆեկցիոն մանրէների թիվը շարունակ աճում է, ինչը բերում է մահվան դեպքերի աճին: Այդ խնդրի լուծման համար առաջարկվել են տարբեր եղանակներ: Բետա-լակտամների և ամինագլիկոզիդների նկատմամբ կայունությունը հիմնականում պայմանավորված է բակտերիաներում բետա-լակտամազների և ամինագլիկոզիդներ մոդիֆիկացնող ֆերմենտների առկայությամբ: Հակաբիոտիկների օգտագործումը ֆերմենտների արգելակիչների հետ միասին հակաբիոտիկների ակտիվության վերականգան առավել արդյունավետ եղանակներից է: Տվյալ ակնարկում քննարկվում են բետա-լակտամազային և ամինագլիկոզիդներ մոդիֆիկացնող ֆերմենտների արգելակիչների ուսումնասիրության վերաբերյալ վերջին տվյալները:

Հակաբիոտիկ – արգելակիչ – բետա-լակտամազ – ամինագլիկոզիդներ ձևափոխող ֆերմենտ

The number of bacterial infections resistant to antibiotics is growing up day by day with a significant impact on the mortality. Various strategies have been investigated to overcome this problem. Bacterial resistance to beta-lactams and aminoglycosides predominantly occurs through production of beta-lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes. The most successful way to restore antibiotics activity is the use of antibiotics together with enzymes inhibitors. In this review recent data concerning the research of beta-lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes inhibitors are discussed.

Antibiotic – inhibitor – beta-lactamase – aminoglycoside-modifying enzyme

Антибиотики это природные или синтетические соединения, убивающие бактерии. Открытие первых антибиотиков произвело революцию в лечении инфекционных заболеваний, представляющих большую угрозу для жизни человека и животных. Однако при длительном лечении антибиотиками, преимущественно в

клиниках, стали выделяться штаммы патогенных бактерий, которые обладают устойчивостью к одному или нескольким антибиотикам. Появление и быстрое распространение резистентных к антибиотикам инфекций признано опасным явлением, препятствующим лечению инфекционных заболеваний. Исследования выявили несколько механизмов, обеспечивающих устойчивость бактерий к антибиотикам. Это модификация мишени действия антибиотика, нарушение проницаемости микробной клетки, активное выведение антибиотика из клетки с помощью специальной системы - multi drug efflux systems [17].

Наиболее распространенной причиной приобретения устойчивости бактерий к антибиотикам является присутствие ферментов, модифицирующих антибиотики. С таким механизмом устойчивости борьба ведется в следующих направлениях:

- создание новых антибиотиков, не подвергающихся воздействию ферментов;
- поиск ингибиторов ферментов, инактивирующих антибиотики;
- обеспечение контроля над регуляцией экспрессии ферментов, инактивирующих антибиотики.

Относительно первого направления необходимо отметить, что работы по созданию новых антибиотиков ведутся непрерывно и довольно успешно. Несмотря на интенсивные попытки модифицировать антибиотики, многие бактериальные штаммы достаточно быстро приобретают устойчивость к каждому из новых антибиотиков, внедряемых в клиники. Перспективным направлением является воздействие на регуляцию экспрессии ферментов, инактивирующих антибиотики. Современная медицина предусматривает также комбинирование использования антибиотиков, в том числе в паре с другими лекарствами.

Ферменты, разрушающие либо модифицирующие антибиотики, широко распространены среди бактерий. В данном обзоре рассматриваются вопросы, связанные с поиском и созданием ингибиторов ферментов, модифицирующих бета-лактамовые антибиотики и аминокликозиды.

Ингибиторы бета-лактамаз

Бета-лактамы принадлежат к одному из трех наиболее крупных классов антибиотиков. Представители этого класса проявляют высокую эффективность при лечении различных бактериальных инфекций уже более 60-ти лет, составляя более 65% рынка всех антибиотиков. Однако параллельно с их применением возникает проблема распространения клинических, устойчивых к бета-лактамам бактериальных штаммов.

Бактерии приобретают устойчивость к бета-лактамовым антибиотикам в основном двумя путями: синтез бактериями бета-лактамаз, разрушающих лактамовое кольцо антибиотика и приобретение мутации в пенициллин связывающем белке (РВР), которая приводит к понижению аффинности белка к большинству бета-лактамовых антибиотиков [28]. На сегодняшний день наиболее успешным подходом к преодолению устойчивости бактерий к бета-лактамовым антибиотикам является поиск ингибиторов бета-лактамаз.

Существует два типа бета-лактамаз, структурно отличающихся друг от друга.

1) ***Сериновые бета-лактамазы***. К сериновым бета-лактамазам относится широкий спектр бета-лактамаз (**ESBL**—extended spectrum beta-lactamases) и карбапенемазы, гидролизующие карбапены, например, карбапенемаза *Klebsiella pneumoniae* (**KPC**) [1].

2) **Металло-бета-лактамазы (MBL)**. Металло-бета-лактамазы - это цинк-зависимые ферменты, подвергающие гидролизу почти все бета-лактамовые антибиотики, включая карбапенемы. Активный центр этих ферментов способен связываться с большинством бета-лактамов.

Устойчивость к бета-лактамовым антибиотикам может быть обусловлена также тем, что бактерии приобретают плазмиды, содержащие несколько генов, кодирующих бета-лактамазы различных классов. В последнее время были выявлены грам-отрицательные бактерии, которые содержат плазмиды с генами, кодирующими несколько MBLs, включая New-Dehli металло-бета-лактамазу (**NDM-1**) [6]. Такие плазмиды быстро распространяются среди различных видов бактерий. В результате появляются бактерии, обладающие множественной устойчивостью (**MDR - multiple drug resistance**) ко всем известным лактамовым антибиотикам [2].

Для подавления роста устойчивых штаммов было предложено использовать ингибиторы бета-лактамаз в паре с антибиотиком.

Клавулановая кислота, выделенная из *Streptococcus clavuligerus* в 1972 г., оказалась одним из первых ингибиторов многих сериновых бета-лактамаз [10]. Клавулановая кислота, благодаря наличию лактамового кольца, связывается с активным центром фермента, проявляя свойства конкурентного ингибитора. При формировании комплекса происходит либо временное ингибирование активности фермента, либо необратимое инактивирование фермента [23]. В 1984 г. клавулановая кислота была внедрена в клиники для использования в паре вместе с амоксициллином под коммерческим названием **аугментин (Augmentin)** Это был первый опыт успешного использования комбинации бета-лактамовый антибиотик/ингибитор бета-лактамазы против бактериальных инфекций. В 2001 г. аугментин оказался наиболее продаваемым лекарством. После аугментина были синтезированы и другие ингибиторы бета-лактамаз, демонстрирующие хорошие результаты в экспериментах *in vitro*. К таким соединениям относится, например, соединение BLI-489, которое представляет собой имидазол, замещенный 6-метилиден-пенем и трициклический карбапенем LK-157 [19, 18].

Бета-лактамовые ингибиторы класса диаза-бицикло-октана (DBO) появились в середине 1990-х. Это класс ингибиторов не лактамового происхождения. Ингибиторы класса DBO ингибируют сериновые бета-лактамазы, включая ESBLs и KPCs, но они не активны по отношению к MBL [5]. Два из DBO ингибиторов - МК-7655 и авибактам (**Avibactam**) находятся на стадии клинических испытаний. Препарат МК-7655 повышает чувствительность к имипенему штаммов *P. aeruginosa*, содержащих бета-лактамазу AmpC, и *K. pneumoniae*, содержащих KPC [11]. Подобно другим ингибиторам бета-лактамаз, авибактам ковалентно и необратимо связывается с ферментом. В отличие от ингибиторов лактамового происхождения, авибактам, находясь с ферментом в связанном состоянии, нечувствителен к гидролизу. Деацилирование комплекса ингибитор/фермент приводит к высвобождению интактного авибактама [8]. Кроме того, авибактам не индуцирует синтез бета-лактамаз, как в случае клавулановой кислоты. Использование комбинации цефтазидин/авибактам разрешено в США для лечения инфекционных заболеваний, вызванных *Enterobacteriaceae*, устойчивых к карбопенемам. К сожалению, недавно в клиниках обнаружен штамм *K. pneumoniae*, содержащий устойчивый к цефтазидин/авибактаму фермент KPC [27]. Для лечения усложненных инфекций сегодня предлагается новая комбинация цефалоспорины и ингибитора бета-лактамазы цефтолозан/тазобактам [4]. Тазобактам является сильным ингибитором бета-лактамаз класса ESBL, продуцируемых *Enterobacteriaceae*, а также некоторыми анаэробными бактериями.

Среди инфекций, обладающих множественной устойчивостью к лекарствам, преобладают носители ферментов MBLs, поэтому особое внимание уделяется поиску соединений, ингибирующих этот класс бета-лактамаз. Ферменты MBLs не ингибируются применяемыми в клиниках ингибиторами бета-лактамаз. Вследствие большого разнообразия MBLs конструирование ингибиторов к этим лактамазам затруднено. Известно, что активность металлопротеаз падает в присутствии хелатирующих металлы соединений. Однако при поиске ингибиторов MBLs следует принимать во внимание тот факт, что соединения, хелатирующие металлы, обладают неспецифическим действием. Такие ингибиторы могут ингибировать не только бактериальные ферменты, но и металлосодержащие ферменты хозяина и тем самым вызвать побочные действия. Недавно были предложены два новых ингибитора MBLs: 2-фенил-4,5-дигидро-1H-имидазол-4-карбоксильная кислота, ингибирующая MBL IMP-1 из *P. aeruginosa*, и 2-(3-аминофенил)-4,5-дигидро-1H-имидазол-4-карбоксильная кислота, ингибирующая фермент Bla2 из *Bacillus anthracis* [3].

Многообещающие результаты демонстрируют тиоэфиры аминокислот и их производные. Синтезировано десять новых производных тиоэфиров аминокислот, которые обладают способностью ингибировать метало-бета-лактамазу L1, NDM-1 и ImiS. Согласно результатам, полученным путем компьютерного моделирования, эти соединения связываются с активным центром фермента L1, экспрессируемого в *E. coli* [14]. Одним из последних потенциальных ингибиторов MBLs является новое соединение NOTA [21].

Ингибиторы ферментов, модифицирующих аминокликозидные антибиотики.

Стрептомицин был выделен из *Streptomyces griseus* в 1944 г. и оказался первым эффективным аминокликозидным антибиотиком, применяемым для лечения туберкулеза. Аминокликозидные антибиотики – это группа антибактериальных соединений, состоящих из двух и более модифицированных аминокликозидов. Широкий спектр антибактериальной активности обусловлен вмешательством аминокликозидов в процесс биосинтеза белка. Аминокликозидные антибиотики связываются с рРНК и белками 30S субъединицы бактериальной рибосомы и препятствуют сцеплению аминоацил-тРНК с антикодом. Это приводит к ошибкам трансляции и, соответственно, к изменению аминокислотной последовательности синтезируемых белков [16]. Природные аминокликозидные антибиотики продуцируются бактериями родов *Streptomyces* и *Micromonospora*, которые защищаются от действия внутренних аминокликозидов путем метилирования 16S рРНК [9]. К сожалению, аминокликозидные антибиотики обладают побочным действием, обусловленным связыванием с А-сайтом эукариотической рибосомы, который отличается от А-сайта прокариотической рибосомы одной парой оснований (нуклеотид A1408 прокариотической рибосомы соответствует G1408 эукариотической рибосомы) [15].

Устойчивость бактерий к антибиотикам семейства аминокликозидных антибиотиков чаще обеспечивается действием на антибиотики аминокликозид модифицирующих ферментов (АГМФ).

Обнаружено три вида АГМФ: аминокликозид ацетилтрансферазы (AACs), аминокликозид нуклеотидилтрансферазы (ANTs) и аминокликозид фосфотрансферазы (APHs). N-ацетилтрансферазы катализируют ацетилирование свободных амино групп молекулы субстрата. Это наиболее распространенный среди бактерий тип АГМФ. Из различных организмов выделено более 50-ти AACs, включая уникальный фермент Eis, который способен ацетилировать аминокликозиды в различных положениях. [12]. Существует пять классов ANT, способных переносить аденозин-монофосфат на положения 6, 9, 4', 2" или 3" молекулы аминокликозида.

APHs катализируют перенос фосфатной группы на положения 4, 6, 9, 3', 2", 3" или 7". Для ANTs и APHs ко-субстратами являются АТФ и ГТФ [20].

Одним из путей преодоления устойчивости бактерий к аминогликозидным антибиотикам является “дизайн” ингибиторов АГМФ. Предполагается, что использование ингибиторов АГМФ вместе с аминогликозидными антибиотиками может защитить антибиотики от ферментов и восстановить чувствительность бактерий. После того как было показано, что Ас-СоА является ко-субстратом для AACs, в качестве ингибиторов АГМФ стали использоваться бисубстраты, состоящие из аминогликозида и Ас-СоА. Однако такие ингибиторы в экспериментах *in vivo* оказались неэффективными, по-видимому, из-за больших размеров и отрицательного заряда, не позволяющих преодолеть мембранный барьер [24]. Далее были созданы про-лекарства, состоящие из аминогликозида и пантотенового линкера. Такой линкер узнаваем бактериальными ферментами PanK (пантотенат киназа K), PPAT (фосфорибозил пиррофосфат амидотрансфераза) и DPCK (дефосфо-СоА-киназа). Внутри бактериальной клетки в результате ферментативного действия бисубстрат аминогликозид-пантотен превращается в аминогликозид-пантотен-СоА, который ингибирует активность AACs. Использование таких ингибиторов вместе с канамицином приводит к подавлению роста устойчивого к аминогликозидам штамма *Enterococcus faecium*, содержащего AAC(6')-Ii [25].

Недавно показано, что в качестве ингибиторов широкого спектра AACs и Eis могут служить соли целого ряда металлов [13].

Так как APHs катализируют перенос фосфатной группы на аминогликозиды, т.е. проявляют киназную активность, в качестве ингибиторов APHs могут выступать ингибиторы бактериальных или эукариотических киназ. Из более 80-ти ингибиторов киназ были выявлены соединения, обладающие потенциальной способностью ингибировать APHs. Один из них – кверцетин (quercetin) является природным ингибитором казеин киназы 1, который способен ингибировать ряд APHs как *in vitro*, так и *in vivo* [7]. Однако при использовании ингибиторов киназ следует учесть тот факт, что они могут оказаться ингибиторами киназ человека, что может привести к нежелательным последствиям.

Чрезвычайно важно найти ингибиторы, которые могут воздействовать на широкий спектр АГМФ. С этой целью было осуществлено моделирование 45-и ингибиторов АГМФ не углеводной природы. Показано, что группа производных 3-(диметиламино)-пропиламина является наиболее перспективной среди потенциальных ингибиторов как ANTs, так и APHs [26].

Многообещающим является поиск ингибиторов АГМФ среди природных соединений. Так аранорозин, продукт выделенный из *Gymnascella aurantiaca*, ингибирует рост и MRSA, а также ингибирует AACs и APHs [22].

Заключение

Распространение бактерий, устойчивых к широкому спектру антибиотиков, представляет серьезную угрозу при лечении инфекционных заболеваний. Для решения этой проблемы проводятся исследования в разных направлениях, в том числе идет поиск путей подавления активности ферментов, разрушающих антибиотики. “Дизайн” и синтез новых соединений, способных ингибировать широкий спектр бета-лактамаз и аминогликозид модифицирующих ферментов позволяет эффективнее использовать антибиотики в борьбе с инфекционными заболеваниями. Однако в ответ на применение ингибиторов, появляются устойчивые к ним ферменты. Очевидно, что для подавления устойчивости к антибиотикам необходимо комбинировать различные подходы. Сегодня ведется поиск соединений, способных взаимодействовать одновременно с несколькими мишенями в клетке устой-

чивых к антибиотикам бактерий. Такой подход позволит избежать или замедлить селекцию устойчивых к антибиотикам мутантов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bush K., Jacoby G.A.* Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 3, 969-976, 2010.
2. *Bush K.* Alarming beta-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 5, 558-564, 2010.
3. *Chen P., Horton L.B., Mikulski R.L., Deng L., Sundriyal S., Palzkill T., Song Y.* 2-substituted 4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acids are novel inhibitors of metallo-beta-lactamases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 19, 6229-6232, 2012.
4. *Cho J.C., Fiorenza M.A., Estrada S.J.* Ceftolozane/Tazobactam: A Novel Cephalosporin/beta-Lactamase Inhibitor Combination. *Pharmacotherapy*, 35, 7, 701-715, 2015.
5. *Coleman K.* Diazabicyclooctanes (DBOs): a potent new class of non-beta-lactam beta-lactamase inhibitors. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 550-555, 2011.
6. *Cornaglia G., Giamarellou H., Rossolini G.M.* Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis.* 11, 5, 381-93, 2011.
7. *Daigle D.M., McKay G.A., Wright G.D.* Inhibition of aminoglycoside antibiotic resistance enzymes by protein kinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 272, 40, 24755-24758, 1977.
8. *Ehmann D.E., Jahic H., Ross P.L., Gu R.F., Hu J., Kern G., Walkup G.K., Fisher S.L.* Avibactam is a covalent, reversible, non-beta-lactam beta-lactamase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 109, 29, 11663-11668, 2012.
9. *Galimand M., Courvalin P., Lambert T.* Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 8, 2565-2571, 2003.
10. *Geddes A.M., Klugman K.P., Rolinson G.N.* Introduction: historical perspective and development of amoxicillin/clavulanate. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 30, 2, 109-112, 2007.
11. *Hirsch E.B., Ledesma K.R., Chang K.T., Schwartz M.S., Motyl M.R., Tam V.H.* In vitro activity of MK-7655, a novel beta-lactamase inhibitor, in combination with imipenem against carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 7, 3753-3757, 2012.
12. *Houghton J.L., Green K.D., Pricer R.E., Mayhoub A.S., Garneau-Tsodikova S.* Unexpected N-acetylation of capreomycin by mycobacterial Eis enzymes. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 4, 800-805, 2013.
13. *Li Y., Green K.D., Johnson B.R., Garneau-Tsodikova S.* Inhibition of aminoglycoside acetyltransferase resistance enzymes by metal salts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 7, 4148-4156, 2015.
14. *Liu X.L., Shi Y., Kang J.S., Oelschlaeger P., Yang K.W.* Amino Acid Thioester Derivatives: A Highly Promising Scaffold for the Development of Metallo-beta-lactamase L1 Inhibitors. *ACS Med Chem Lett.* 6, 6, 660-664, 2015
15. *Lynch S.R., Puglisi J.D.* Structural origins of aminoglycoside specificity for prokaryotic ribosomes. *J. Mol. Biol.* 306, 5, 1037-1058, 2001.
16. *Magnet S., Blanchard J.S.* Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem. Rev.* 105, 2, 477-497, 2005.
17. *Morita Y., Tomida J., Kawamura Y.* Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Frontiers in Microbiology.* 4, 422, 1-8, 2014.
18. *Paukner S., Hesse L., Prezelj A., Solmajer T., Urleb U.* In vitro activity of LK-157, a novel tricyclic carbapenem as broad-spectrum beta-lactamase inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2, 505-511, 2009.
19. *Petersen P.J., Jones C.H., Venkatesan A.M., Bradford P.A.* Efficacy of piperacillin combined with the Penem beta-lactamase inhibitor BLI-489 in murine models of systemic infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4, 1698-1700, 2009.

20. Shi K., Berghuis A.M. Structural basis for dual nucleotide selectivity of aminoglycoside 2''-phosphotransferase IVa provides insight on determinants of nucleotide specificity of aminoglycoside kinases. *J.Biol.Chem.* 287, 16, 13094-13102, 2012.
21. Somboro A.M., Tiwari D., Bester L.A., Parboosing R., Chonco L., Kruger H.G., Arvidsson P.I., Govender T., Naicker T., Essack S.Y. NOTA: a potent metallo- β -lactamase inhibitor. *J Antimicrob Chemother.* 70, 5, 1594-1596, 2015.
22. Suga T., Ishii T., Iwatsuki M., Yamamoto T., Nonaka K., Masuma R., Matsui H., Hanaki H., Omura S., Shiomi K. Aranorosin circumvents arbekacin-resistance in MRSA by inhibiting the bifunctional enzyme AAC(6'')/APH(2''). *J.Antibiot.* 65, 10, 527-529, 2012.
23. Therrien C., Levesque R.C. Molecular basis of antibiotic resistance and beta-lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 3, 251-62, 2000.
24. Vong K., Auclair K. Understanding and overcoming aminoglycoside resistance caused by N-6'-acetyltransferase. *Med.Chem.Commun.* 3, 4, 397-407, 2012.
25. Vong K., Tam I.S., Yan X., Auclair K. Inhibitors of aminoglycoside resistance activated in cells. *ACS Chem.Biol.* 7, 3, 470-475, 2012.
26. Welch K.T., Virga K.G., Whittemore N.A., Ozen C., Wright E., Brown C.L., Lee R.E., Serspersu E.H. Discovery of non-carbohydrate inhibitors of aminoglycoside-modifying enzymes. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 22, 6252-6263, 2005.
27. Winkler M.L., Papp-Wallace K.M., Hujer A.M., Domitrovic T.N., Hujer K.M., Hurless K.N., Tuohy M., Hall G., Bonomo R.A. Unexpected challenges in treating multidrug-resistant Gram-negative bacteria: resistance to ceftazidime-avibactam in archived isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 2, 1020-1029, 2015.
28. Worthington R.J., Melander Ch. Overcoming Resistance to β -Lactam Antibiotics. *Org. Chem.* 78, 9, 4207-4213, 2013.

Поступила 30.09.2015