

Современные научные разработки в области создания средств противодействия лекарственной устойчивости патогенов

Актуальная во всем мире проблема резистентности бактерий к лекарственным веществам требует постоянного поиска новых механизмов, обеспечивающих бактериям устойчивость, с целью создания эффективных препаратов, воздействующих на ключевые для обеспечения жизнедеятельности клетки мишени. Значительную роль в этом играют два аспекта: отсутствие или замедленное развитие резистентности к создаваемым новым средствам, а также технологичность и экономическая эффективность производства, внедрения и использования разработанных препаратов. В этом сообщении систематизированы некоторые направления исследований в данной области, определены новые перспективные и отмечены собственные разработки ФБУН ГНЦ ПМБ.



Бактерии имеют несколько механизмов противодействия антимикробным веществам, связанных со снижением проницаемости клеточной стенки, функционированием эффлюксных насосов, деградацией антибиотика ферментами, модификацией и амплификацией мишени. Имеются также некоторые особенности метаболизма бактерий, позволяющие избежать летального действия антимикробных веществ.

Из механизмов антимикробного действия биомолекул следует отметить ингибиторы нуклеиновых кислот, ингибиторы сборки клеточной стенки (в т.ч. бактериоцины), деструкторы мембран (типа полимиксинов), синтетические ингибиторы метаболических процессов (DHF, NHF), ингибиторы синтеза белка на 50S или 30S субъединицах рибосом, ингибиторы свободных радикалов.

Если систематизировать направления разработок в общем виде, то следует выделить следующие: создание антимикробных пептидов, разработка средств специфической профилактики (вакцины), бактериофаги и их клонированные антимикробные ферменты, использование генного редактирования на основе CRISPR-Cas-технологии, вещества и методы борьбы с биопленками, разработка форм адресной доставки антимикробных препаратов, создание «ингибиторов строгого ответа» для борьбы с персистирующими формами, разработка про-, пре- и симбиотиков, использование искусственного интеллекта при конструировании новых эффективных форм.

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) считает одной из ключевых стратегий борьбы с резистентностью создание новых вакцин, использование которых приводит к снижению потребления антибиотиков, снижению устойчивости к антибиотикам за счет сокращения циркуляции или устранения штаммов, устойчивых к лекарственным средствам, определяет возможность разработки вакцин против множества штаммов бактерий. По данным ВОЗ, вакцина против *Klebsiella pneumoniae* для новорожденных могла бы предотвратить приблизительно 27 000 смертей, снизить затраты на больничные расходы на 280 млн долларов США и 2,5 млрд на потери производительности труда ежегодно. В мире существует одна вакцина-кандидат против *K. pneumoniae*, находящаяся в стадии клинической разработки.

В ГНЦ ПМБ в последние годы разработано несколько платформ для создания современных вакцин: полисахаридная, субъединичная рекомбинантная, живая рекомбинантная и на основе теней бактериальных клеток. Их сочетание позволяет существенно продвинуться в данном направлении. Наиболее успешными в разработке вакцин против устойчивых форм патогенов стали: прототип вакцины против *K. pneumoniae* капсульных типов K1, K2, K57 полисахаридная и на основе теней

клеток; конъюгированная бивалентная против *Salmonella enteritidis* и *S. Typhimurium* полисахаридная; сальмонеллезная бивалентная против *S. enteritidis* и *S. Typhimurium* на основе теней клеток; липополисахаридная эшерихиозная против штаммов *Escherichia coli* O157:H7 и O104:H4 с рекомбинантным анатоксином (проходит доклинические испытания).

Кроме того, разработаны вакцины против особо опасных инфекций. Резистентность у природных штаммов этой группы патогенов достаточно низкая, но опасность возникновения или создания в злонамеренных целях резистентных штаммов, особенно в современный период, высока. Разработаны вакцины: чумная рекомбинантная субъединичная, туляремийная живая рекомбинантная (обе проходят клинические исследования), сибиреязвенная рекомбинантная субъединичная (доклинические испытания), бруцеллезная рекомбинантная субъединичная (стадия разработки). Необходимо разработать еще несколько прототипов вакцин против бактерий, значимых с точки зрения биологической безопасности, в частности мелиоидоза, легионеллеза, сапа и некоторых других, с использованием уже разработанных платформ. Основная задача при этом состоит в создании систем иммунного противодействия бактериям, несущим в т.ч. сочетанные факторы патогенности от нескольких возбудителей.

В последние годы начал вновь проявляться интерес к бактериофагам как антимикробным препаратам. Это происходит периодически, но пока не имеет значения для масштабного решения проблемы резистентности в силу нескольких причин: возможно только точечное и не многократное применение, узкая специфичность фагов, невозможность эффективного парентерального применения (только аппликационное или энтеральное) из-за иммунного ответа, быстрое возникновение устойчивости из-за селекции устойчивых клонов патогенов и активации у них CRISPR-Cas-систем, а также некоторые другие.

Наиболее перспективными в этом отношении являются клонированные фаговые ферменты, которые можно получать в больших количествах при использовании бактериальных продуцентов. Так, например, в ГНЦ ПМБ разработан рекомбинантный эндолизин (пептидогликангидролаза), который эффективно уничтожает золотистый стафилококк всех клональных линий без индукции резистентности (срок наблюдения 10 лет). Наиболее сложным моментом явилась разработка масштабируемой технологии его получения с сохранением активных ферментативных свойств, что было с успехом выполнено и препарат готов к внедрению. Также разработаны препараты рекомбинантных деполимераз, разрушающих внеклеточный полисахаридный матрикс патогенов, делая их доступными для антимикробных препаратов и иммунной системы. Эти препараты были разработаны против клебсиелл и ацинетобактера, созданы технологии масштабного выпуска. Данные средства пригодны для парентерального и аппликационного применения. Основной проблемой их использования является узкая специфичность, что заставляет готовить препарат для каждого сероварианта, используя его индивидуально после выяснения принадлежности штамма к определенной группе или применяя коктейли из препаратов к наиболее актуальным штаммам. Эта проблема решается, как это сделано, например, для вакцины против пневмококка, содержащей антигены к 13–23 серовариантам.

В этой связи ближайшими новыми разработками должно стать создание эндолизина против сибиреязвенного микроба и деполимераз против других патогенов из группы ESKAPE и дальнейшее расширение линейки препаратов.

Что касается разработки пептидных антимикробных средств, то к ним относятся в первую очередь липопептиды, гликопептиды, катионные и анионные пептиды, дефензины, пептиды против биопленок и полимиксины. В ГНЦ ПМБ разработаны бактериоцины (клонированные катионные пептиды) против различных групп полирезистентных патогенов. В частности, создана эффективная технология получения из штамма энтерококка бактериоцина мундтицина, который уничтожает энтерококки, листерии и клостридии как *in vivo*, так и *in vitro*. Разработан препарат микроцин из штамма клебсиелл, действующий против эшерихий и вирулентных клебсиелл. Для широкого внедрения данных средств в практику необходимо провести всесторонние исследования по безопасности использования данных препаратов для человека и разработать методы применения.

Использование генного редактирования на основе CRISPR-Cas-технологии для борьбы с резистентностью развивается в двух направлениях: выявлении генов устойчивости и элиминации патогенов. Диагностические технологии связаны с выявлением генов резистентности с использованием платформы DETECTR, когда выявляется ДНК-мишень с помощью комплексов gRNA-Cas12a, и последующей детекцией продукта методами флуоресцентного анализа или иммунохроматографии. Такие разработки проведены в отношении наиболее значимых для клиники генов резистентности с достижением высокой чувствительности метода. Кроме того, разрабатываются безамплификационные методы детекции, когда используются репортеры с ферментами или собственной

каталитической активностью. Расщепление репортера в присутствии мишени запускает автокаталитический процесс разрушения репортеров с высоким уровнем флуоресцентного сигнала. Эта технология наиболее перспективна для использования в нестационарных лабораториях и уже опробована на туляремии в ГНЦ ПМБ.

Генное редактирование для целевого уничтожения патогенов связано с созданием методов направленной элиминации из организма человека патогенных бактерий, несущих гены резистентности, удаление генов токсинообразования или уничтожение бактерий путем тотального разрушения их ДНК. Для этих целей уже создано множество инструментов, в частности с использованием транспозонов, бактериофагов и других структур. Разработка подхода множественного редактирования связана с уже установленной возможностью редактирования в организме одновременно патогенов разных видов, несущих гены резистентности. Для этого используется система адресной доставки под названием «ДНК-редактирующая РНК-направленная CRISPR-Cas-транспозаза», в которой применяется комплекс CRISPR-Cas9 для наведения на определенную последовательность ДНК и вставки транспозона. Технологии генного редактирования в терапевтических целях представляются чрезвычайно перспективными, особенно в свете борьбы с резистентностью, и количество исследований в данном направлении в мире позволяет надеяться на скорый положительный практический результат.

В нашем центре в рамках поиска новых мишеней для таргетной терапии и редактирования генома резистентных патогенов проведена работа с использованием большого набора коллекционных штаммов клебсиелл. В России и мире циркулируют классические штаммы с множественной резистентностью, в т.ч. к карбапенемам (CR-Kp) (в основном возбудители внутрибольничных инфекций), а также гипервирулентные штаммы, чувствительные к большинству антибиотиков, имеющие дополнительные факторы вирулентности (K1, K2, K57, K20 и K5 типы капсулы, наличие сидерофоров, гипермукоидность и плаزمиды гипервирулентности с пятью соответствующими генами) и вызывающие тяжелые инфекции. Было установлено, что гибридные штаммы *K. pneumoniae* объединяют свойства двух патотипов. Широкое распространение среди них получили карбапенемрезистентные гипервирулентные *K. pneumoniae* (CR-hvKp), благодаря приобретению гибридной плазмиды, сформированной из плазмиды резистентности и плазмиды вирулентности. Анализ филогенетического дерева гибридных штаммов *K. pneumoniae*, несущих разное количество генов гипервирулентности, депонированных в ГКПМ-Оболенск, позволил установить сиквенс- и капсульные типы штаммов, количество генов гипервирулентности на плаزمиде, наличие генов карбапенемазы и количество штаммов с SARS-CoV-2-ассоциированной пневмонией. Результаты показали, что гибридные клоны формируются на основе разных генетических линий и несут различные гибридные плазмиды, содержащие от 1 до 4 генов гипервирулентности, локализованных на гибридных плаزمиде гипервирулентности. Также на личинках *Galleria mellonella* показано, что уровень вирулентности гибридных штаммов ($LD_{50} < 10^4$ КОЕ), по сравнению с таковым контрольных штаммов без гибридных плазмид и генов гипервирулентности ($LD_{50} > 10^6$ КОЕ), статистически достоверно выше, а наличие даже одного плазмидного гена гипервирулентности достаточно для проявления гипервирулентных свойств. Это явилось важным шагом к созданию новых генно-инженерных подходов для борьбы с резистентностью.

Таким образом, спектр направлений по разработке новых антимикробных средств преодоления лекарственной устойчивости патогенов чрезвычайно велик и исследования в мире осуществляются широким фронтом, что позволяет надеяться на создание прорывных технологий в данной области в ближайшие годы.

Главный редактор, академик РАН И.А.Дятлов