



Казанский федеральный
УНИВЕРСИТЕТ

Лекция 21

Разработка антибактериальных лекарств

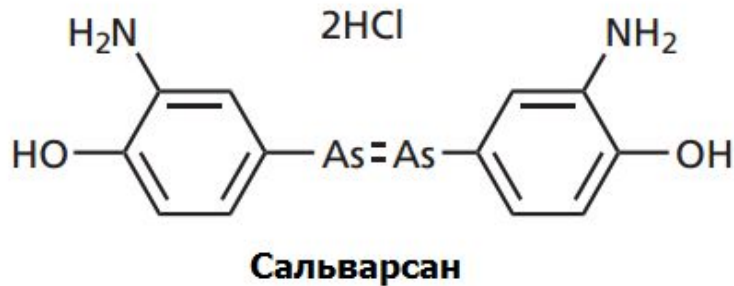
К.В. Балакин

Каф. медицинской химии КФУ

История

Сальварсан (1910) – лечение сифилиса и протозойных заболеваний

Профлавин (1934) – лечение глубоких ран, несистемное действие



Пронтозил (1935) – лечение стрептококковых инфекций, системный, пролекарство сульфониламидов

Сульфаниламиды (начало 1940-х)

Пенициллины (1928, 1940)

Стрептомицин (1944) - аминогликозид

Хлорамфеникол (1947)

Бацитрацин (1945) – пептидный антибиотик

Тетрациклины (1948)

Эритромицин (1952) - макролиды

Валиномицин (1955) - циклопептиды

Цефалоспорины (1955)

Хинолоны (1962)

Бактериальная клетка

Основа селективности:

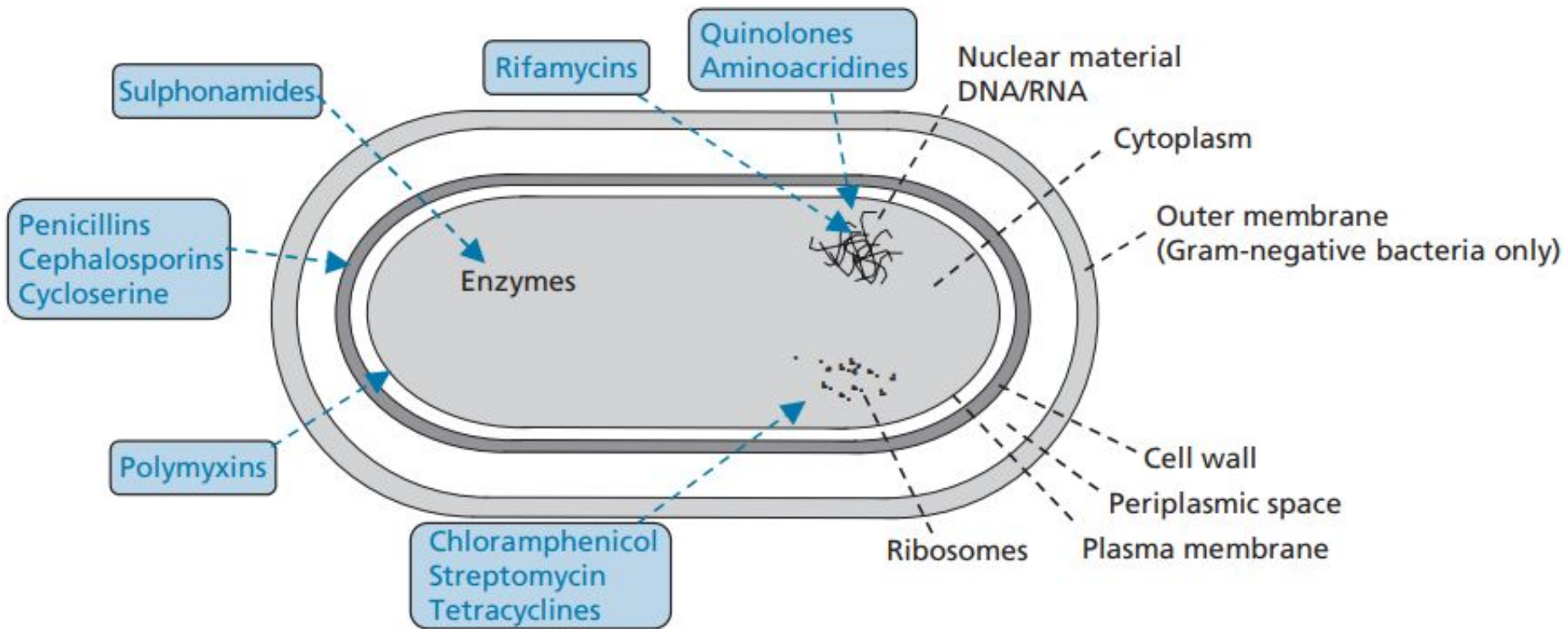
бактерии – прокариоты, клетки животных - эукариоты

Ключевые различия:

- У бактериальной клетки нет ядра, у клеток животных есть.
- Животная клетка содержит ряд органелл (митохондрии, эндоплазматический ретикулум), которые у бактерий недоразвиты.
- Существенные различия в биохимии жизнедеятельности.
- Бактериальная клетка в дополнение к клеточной стенке имеет клеточную мембрану, которая отсутствует в животной клетке. Клеточная мембрана существенная для жизнедеятельности бактерий.

Бактерии бывают **Грам-положительные** и **Грам-отрицательные**, в зависимости от строения внешней мембраны.

Бактериальная клетка: мишени



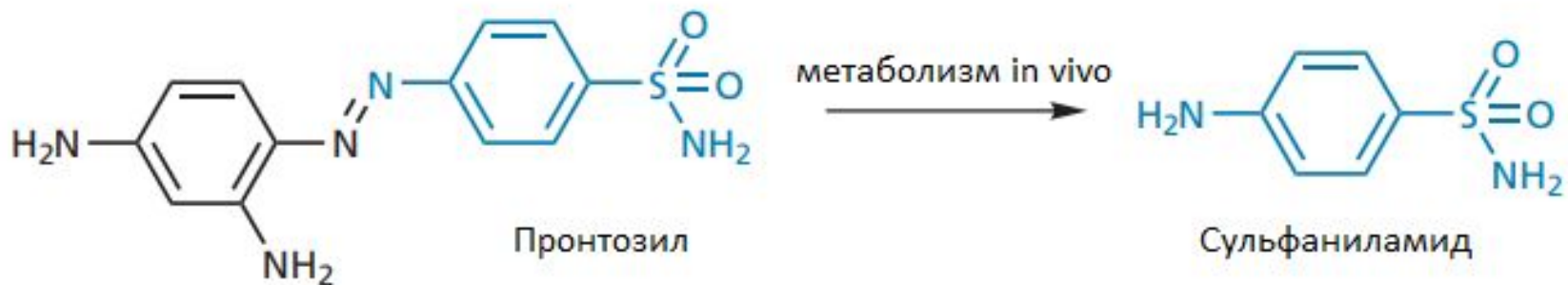
Ключевые механизмы действия антибактериальных лекарств

- Ингибирование клеточного метаболизма (антиметаболиты). *Пример: сульфаниламиды.*
- Ингибирование синтеза бактериальной клеточной стенки. *Пример: пенициллины.*
- Взаимодействие с мембраной плазмы. *Пример: полимиксины.*
- Нарушение синтеза белков. *Пример: рифамицины, тетрациклины.*
- Взаимодействие с транскрипцией и репликацией нуклеиновых кислот. *Пример: фторхинолоновые антибиотики.*

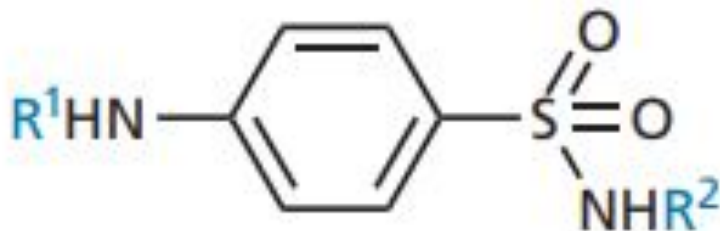
Сульфаниламиды

Тип действия: антиметаболиты

Родоначальник – **пронтозил** (1935), активен *in vivo*, неактивен *in vitro*.
Метаболизируется бактериями тонкой кишки.

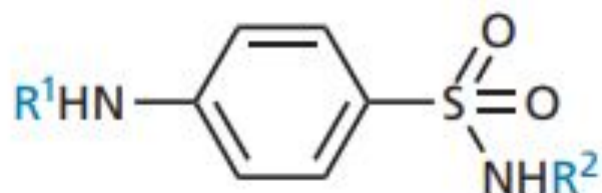


**Общая структура
сульфаниламидов:**

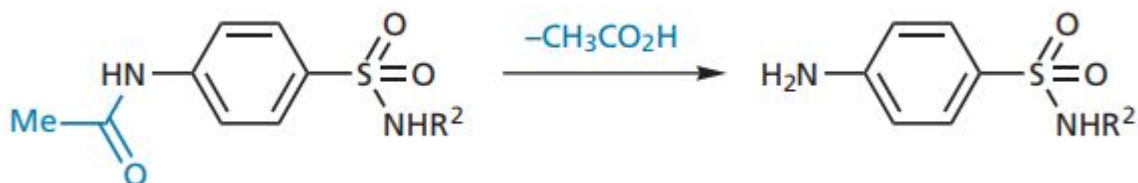


- Активны против Г(+) бактерий, особенно пневмо- и менингококков.
- Неактивны против Г(-) бактерий, вырабатывается резистентность, высокая токсичность продуктов метаболизма.

SAR-зависимости



- *Пара*-аминогруппа необходима для активности и должна быть незамещенной ($R^1 = H$). R^1 может быть ацильным радикалом. Такие амиды неактивны сами по себе, для активации должны метаболизироваться в организме (пролекарства).



- Ароматическая и сульфамидная группы необходимы.
- Только *пара*-замещение. Дополнительные заместители приводят к неактивным соединениям из-за стерических затруднений.
- Сульфамидный азот может быть только первичным или вторичным.
- R^2 является единственной группой, которую можно варьировать.

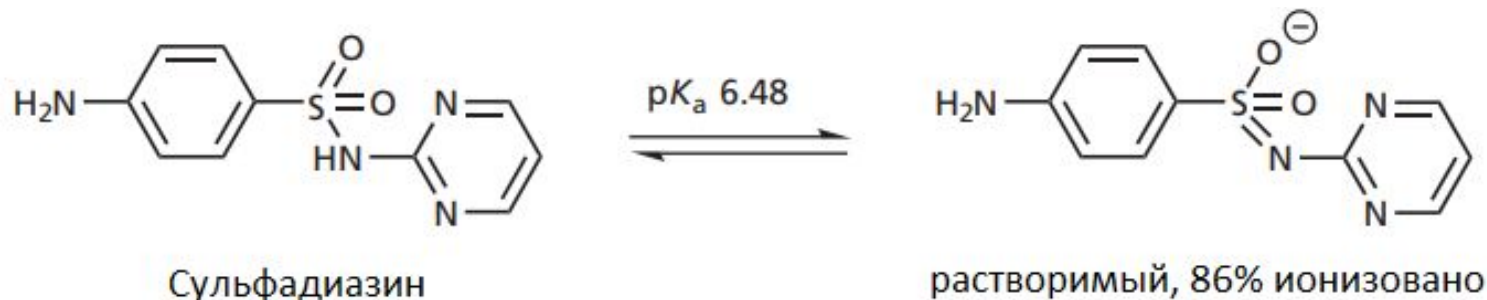


Варьирование сульфамидных заместителей

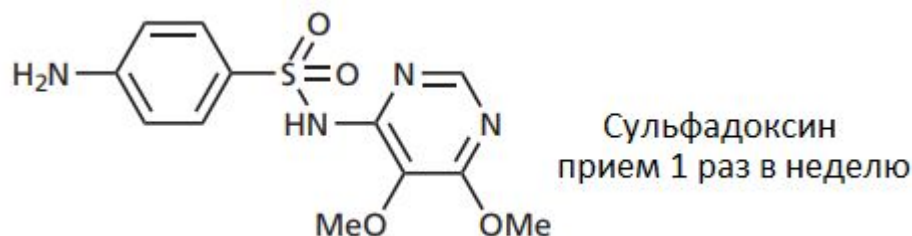
Продукты метаболизма могут быть токсичными:



Заместители могут усиливать растворимость:

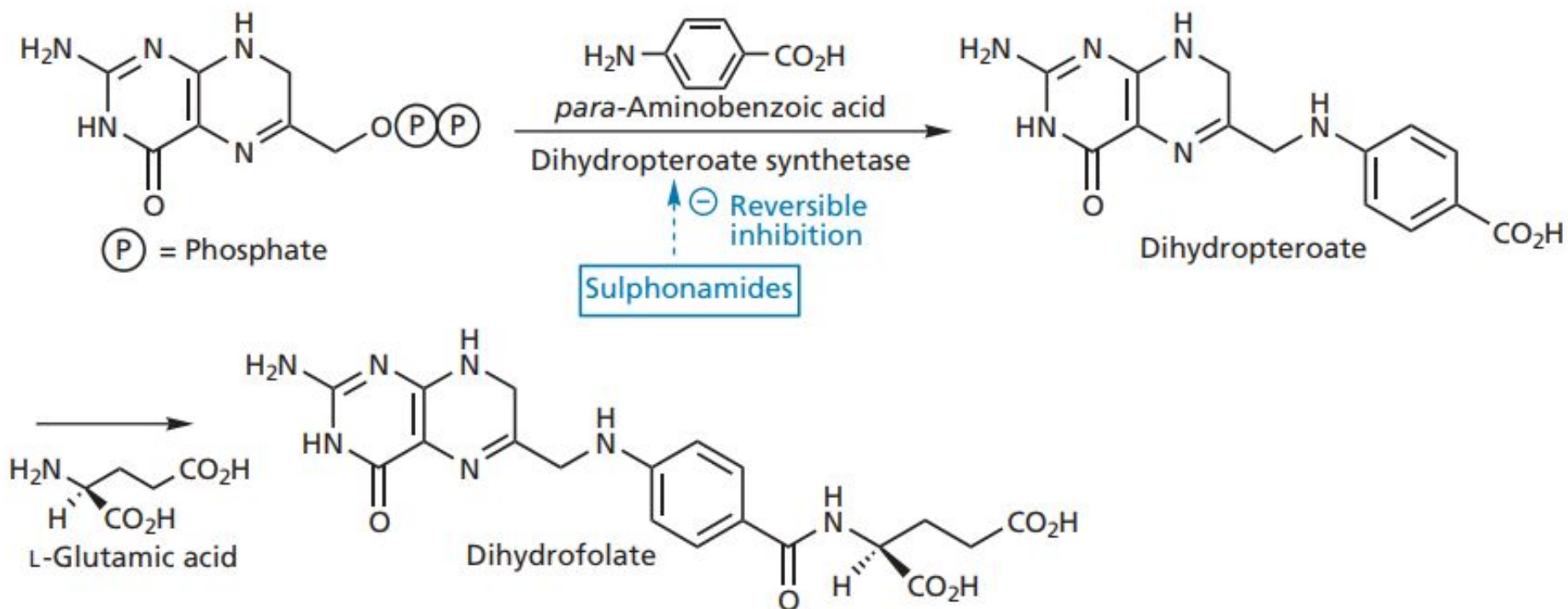


Может быть достигнуто существенное увеличение времени жизни в плазме:



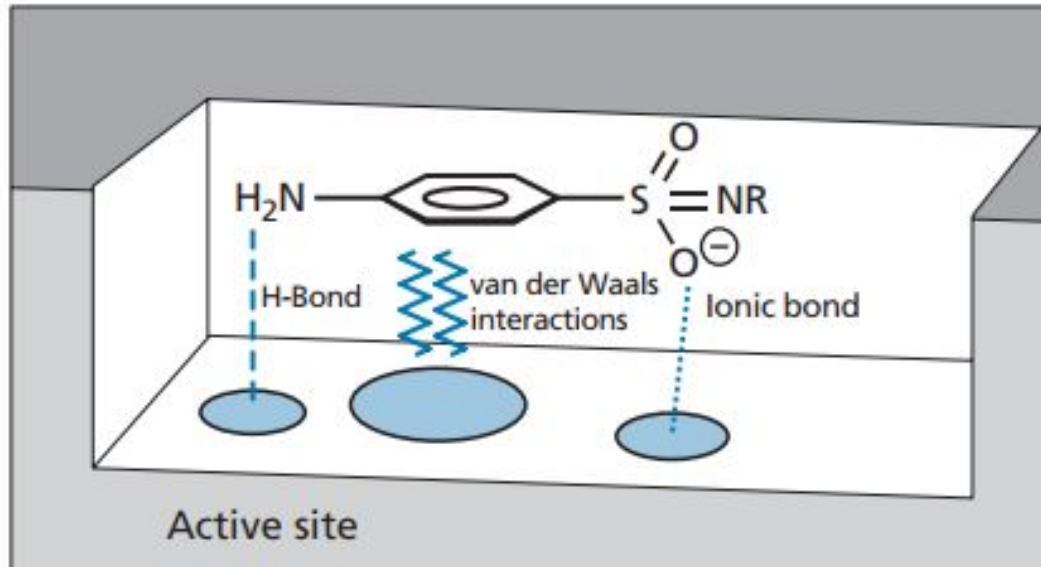
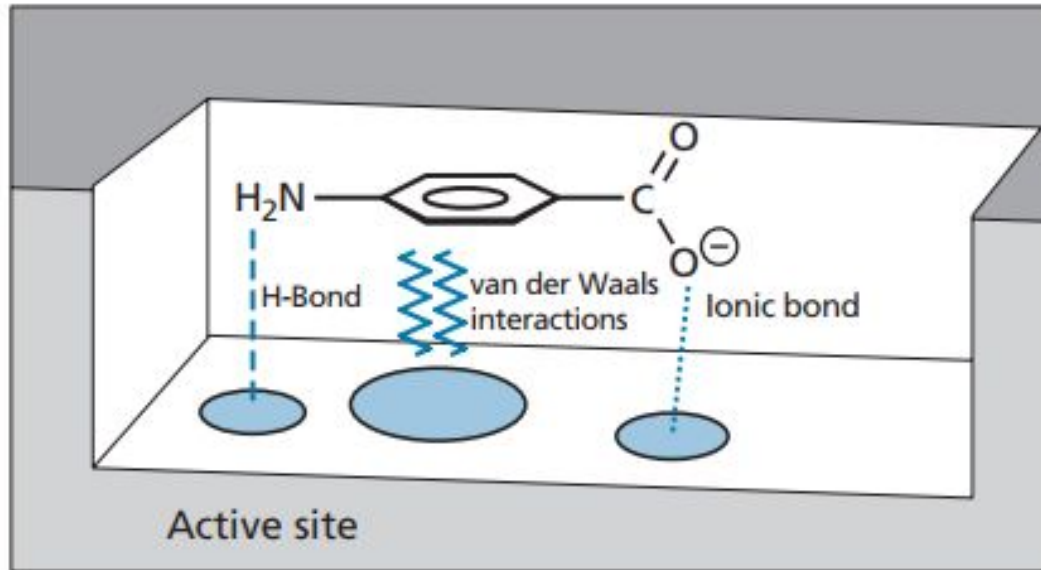
Механизм действия

Обратимые ингибиторы дигидроптероат-синтазы



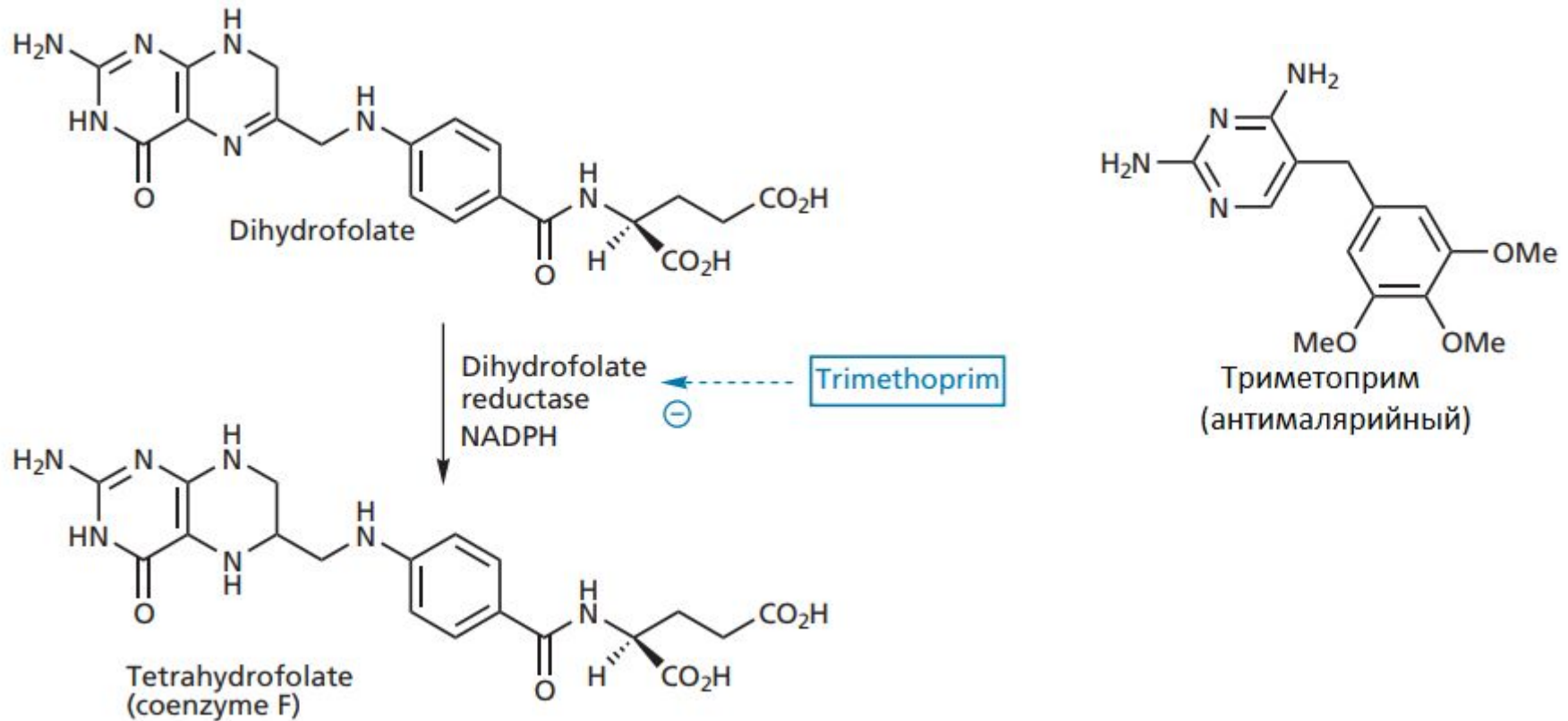
- Дигидрофолат используется в биосинтезе пиримидиновых нуклеиновых оснований.
- В животной клетке дигидрофолат синтезируется другим способом, из фолиевой кислоты.
- Фолиевая кислота не транспортируется в бактерии.

Миметики пара-АБК



Сульфаниламиды – обратимые ингибиторы бактериального фермента, отсутствующего в животной клетке. Являются миметиками природного субстрата и поэтому конкурируют за сайт связывания в концентрационной-зависимой манере.

Другие антиметаболиты



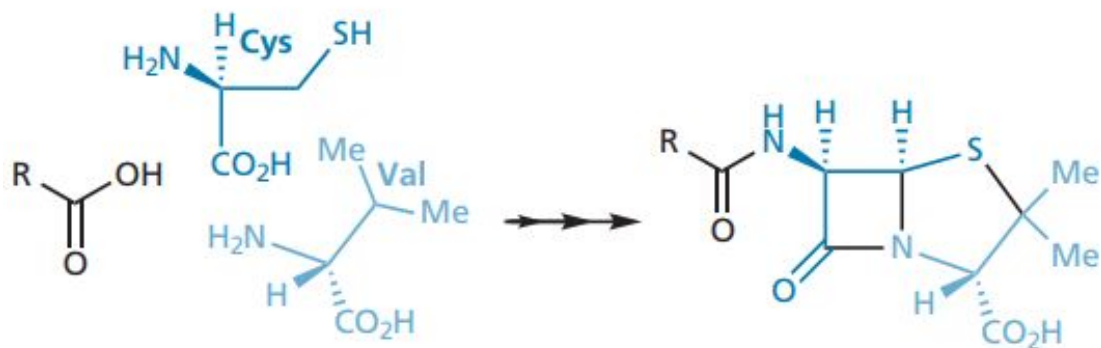
- Триметоприм – ингибитор дигидрофолат-редуктазы (ДГФР). В основном применяется в комбинации с сульфаниламидами для усиления действия (последовательное блокирование).
- Триметоприм в 100 тыс. раз активнее против бактериальной ДГФР по сравнению с человеческой.

Пенициллины

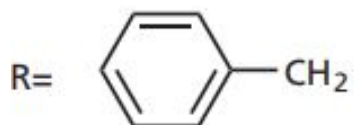
Ингибиторы биосинтеза бактериальной клеточной стенки

- Открытие – Флеминг (1928).
- Технология производства – Флори и Чейн (1938).
- Первые клинические испытания – 1941 г.
- Первый опыт массового применения – 1944 г. (Вторая Мировая).
- СССР – Зинаида Ермольева (крустозин, 1943), Николай Копылов (промышленное производство).

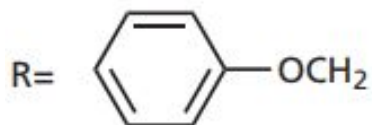
Биосинтез пенициллинов:



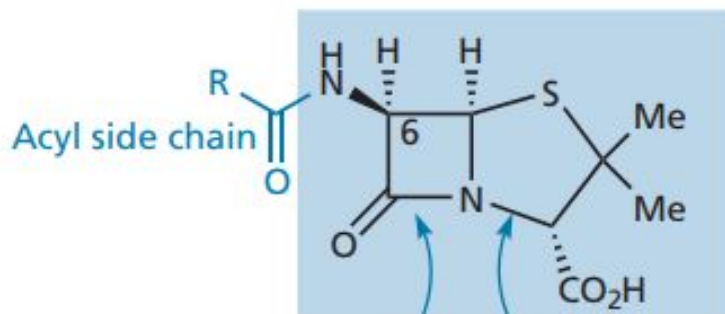
Пенициллины: структура



Benzylopenicillin (penicillin G)



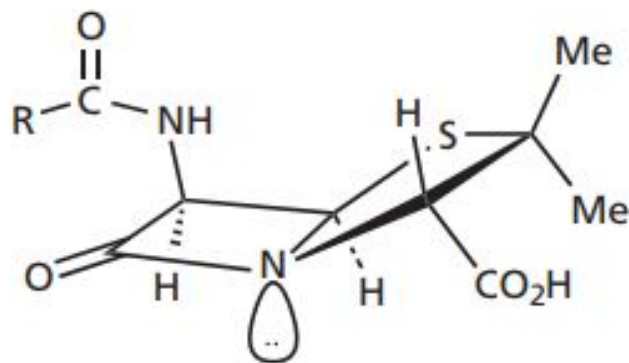
Phenoxymethylpenicillin (penicillin V)



6-Aminopenicillanic acid (6-APA)

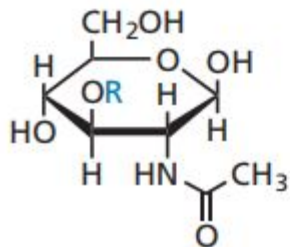
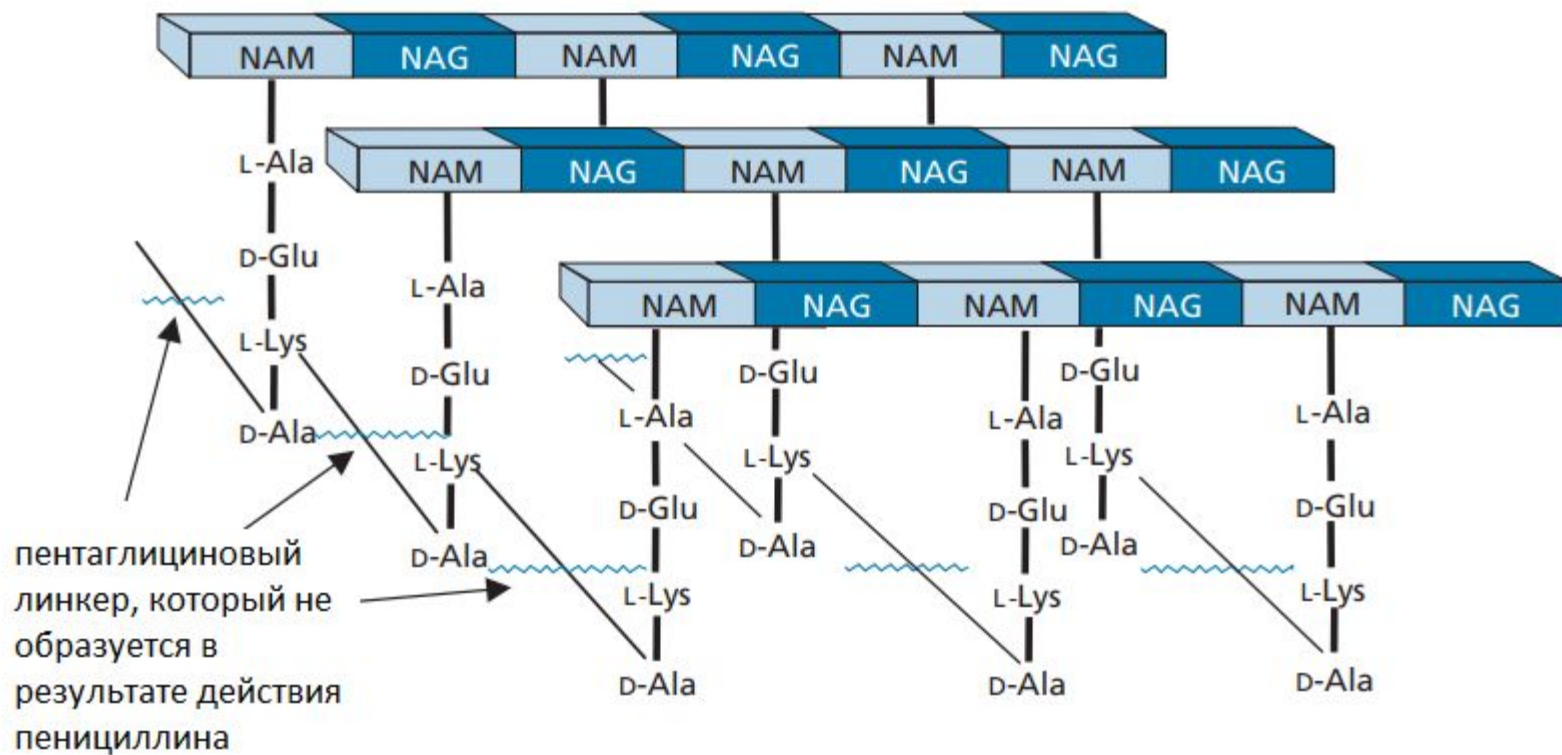
β -Lactam ring

Thiazolidine ring



Пенициллины: механизм действия

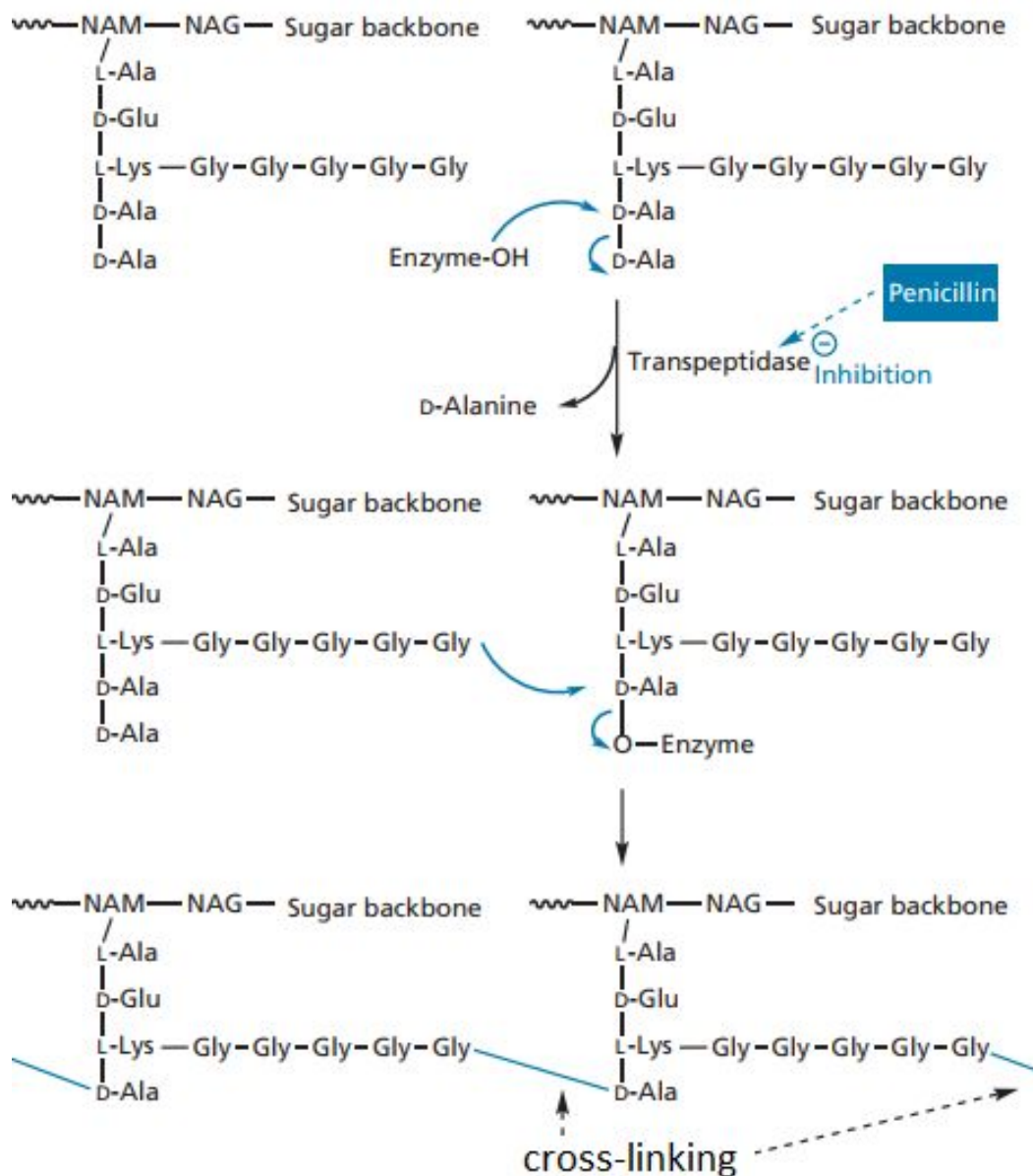
Структура пептидогликана клеточной стенки бактерий:



N-acetylglucosamine (**NAG**):
R = H

N-acetylmuramic acid (**NAM**):
R = CHMeCOOH

Пенициллины: механизм действия

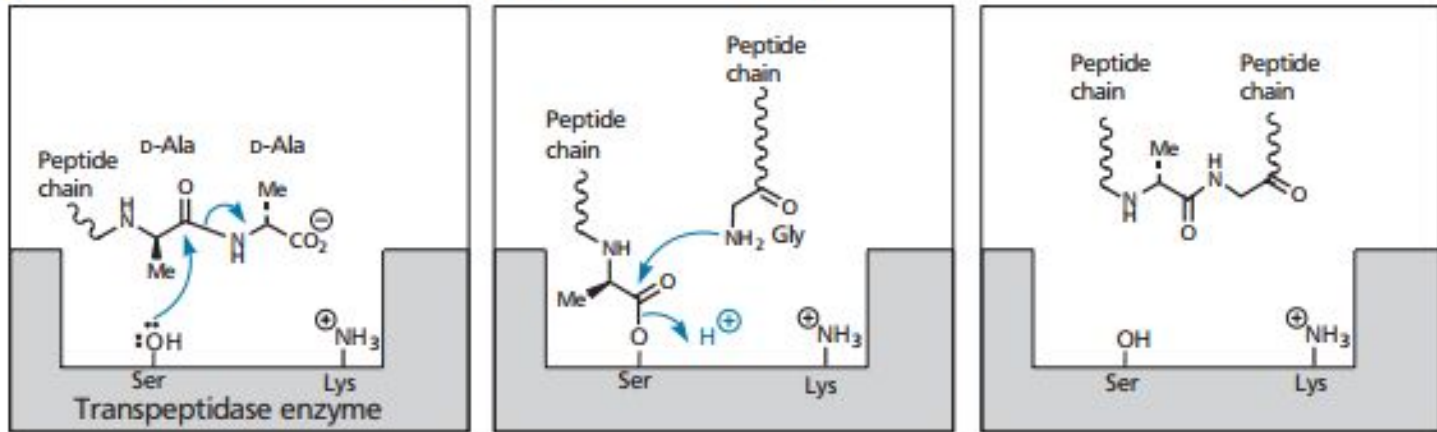


Ингибирование одной из финальных стадий биосинтеза клеточной стенки бактерий (образование кросс-сшивок между пептидными цепями).

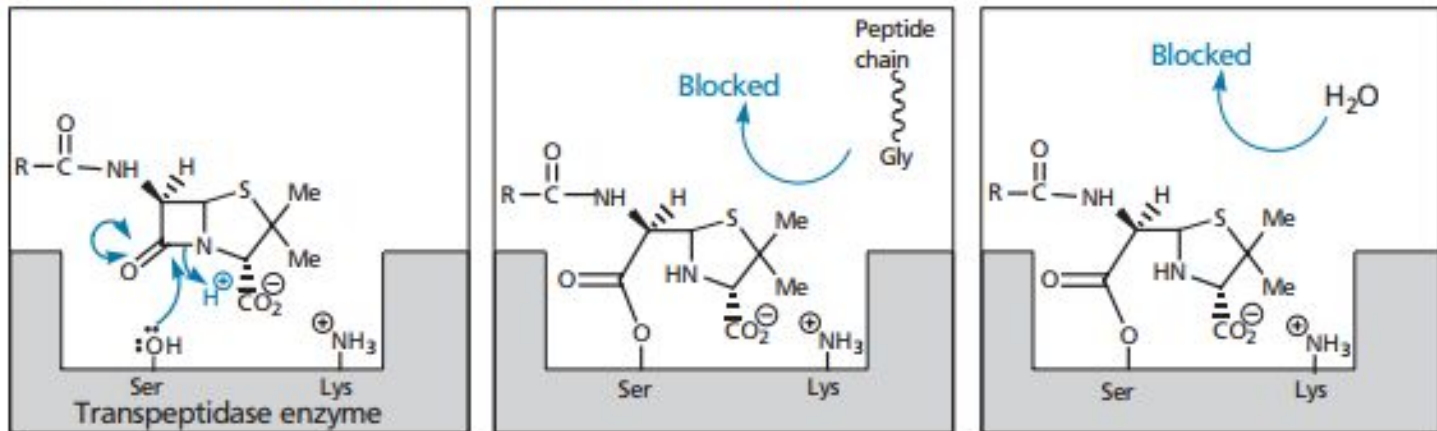


Механизм ингибирования

Действие транспептидазы (кросс-шивка)



Ингибирование процесса пенициллином

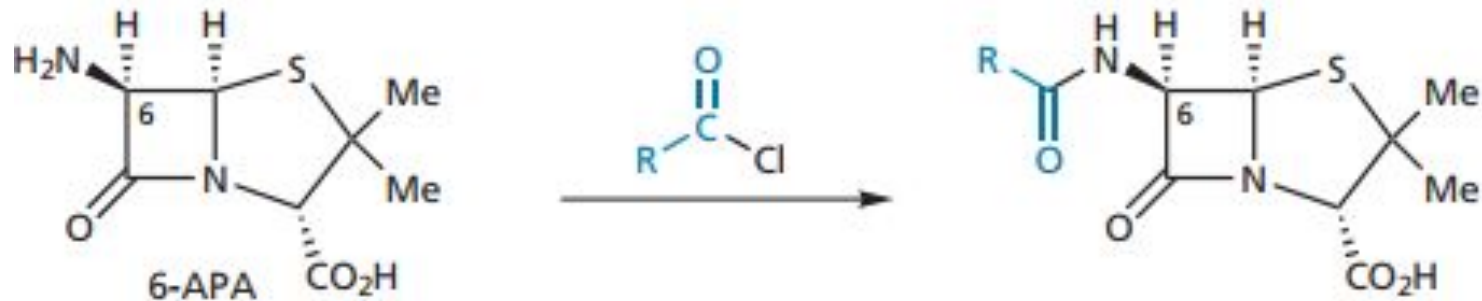


D-Ala отсутствует в организме человека!

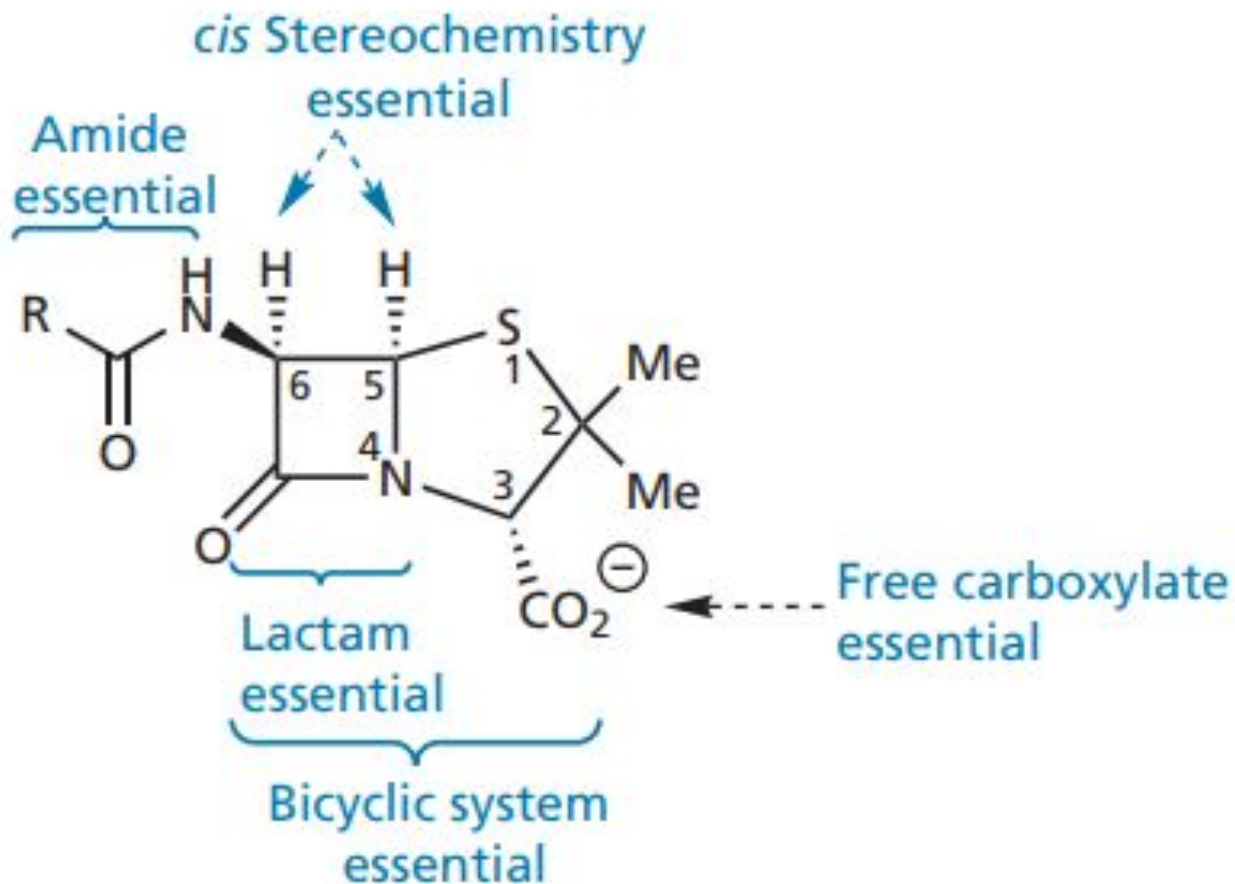
Пенициллины: получение

Этап 1: Биосинтетически получают 6-аминопенициллановую кислоту (6-АРА).

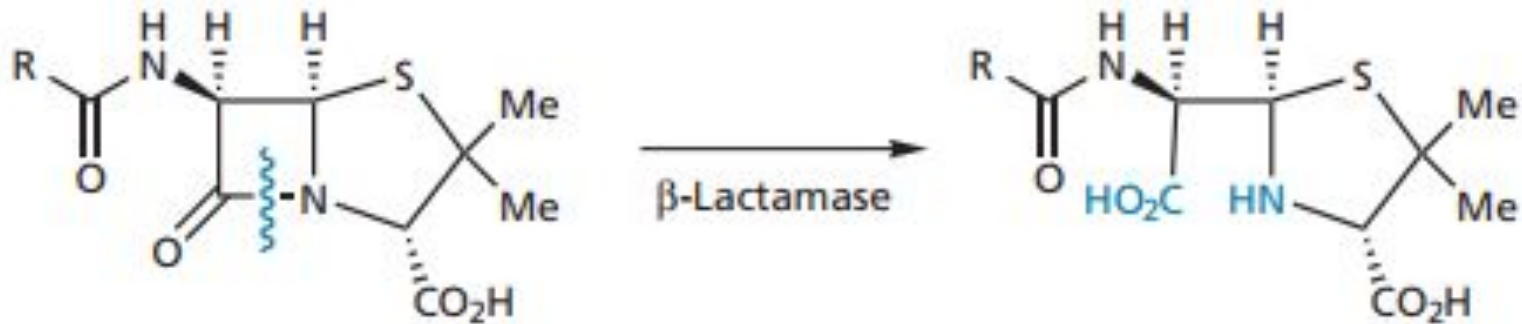
Этап 2: 6-АРА ацилируется производными различных кислот (синтетический этап).



Пенициллины: SAR-зависимости

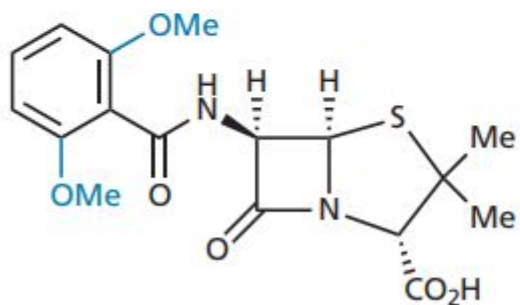
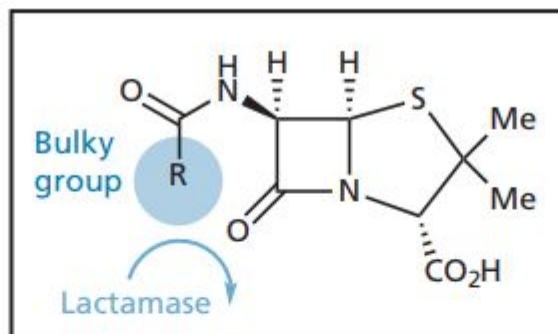


β-лактамазы: резистентность

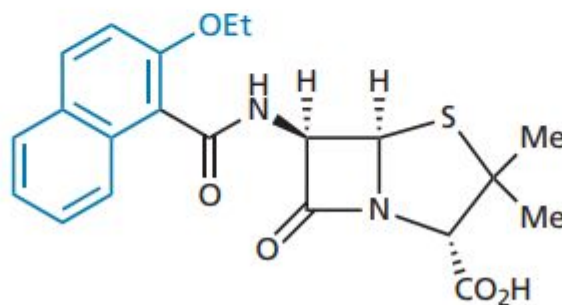


- Некоторые Г(+) бактерии выделяют β-лактамазы, которые окружают клеточную стенку бактерий и тем самым перехватывают молекулы пенициллина.
- Эффективность перехвата: 1 молекула фермента расщепляет 1000 молекул пенициллина в сек.
- Пример: *Staphylococcus aureus* – Г(+) бактерия, которая в принципе чувствительна к пенициллину, но в настоящее время 95% всех штаммов *S. aureus* продуцируют β-лактамазу и, таким образом, резистентны к пенициллину G.

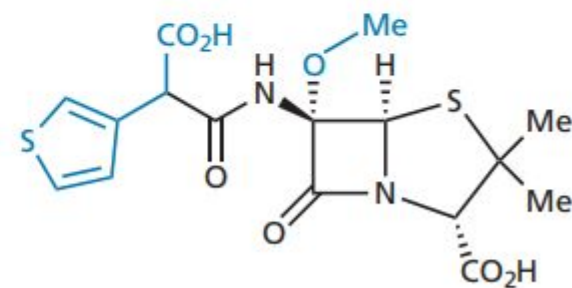
Преодоление β -лактамазной резистентности



Methicillin



Nafcillin

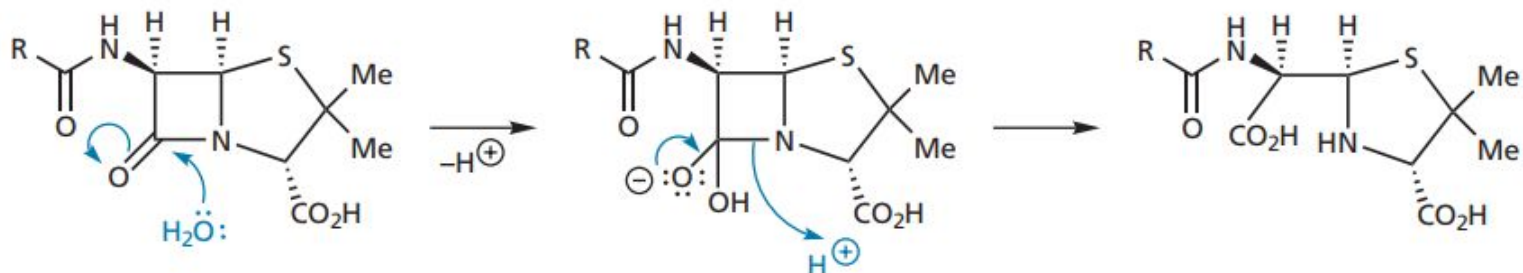


Temocillin

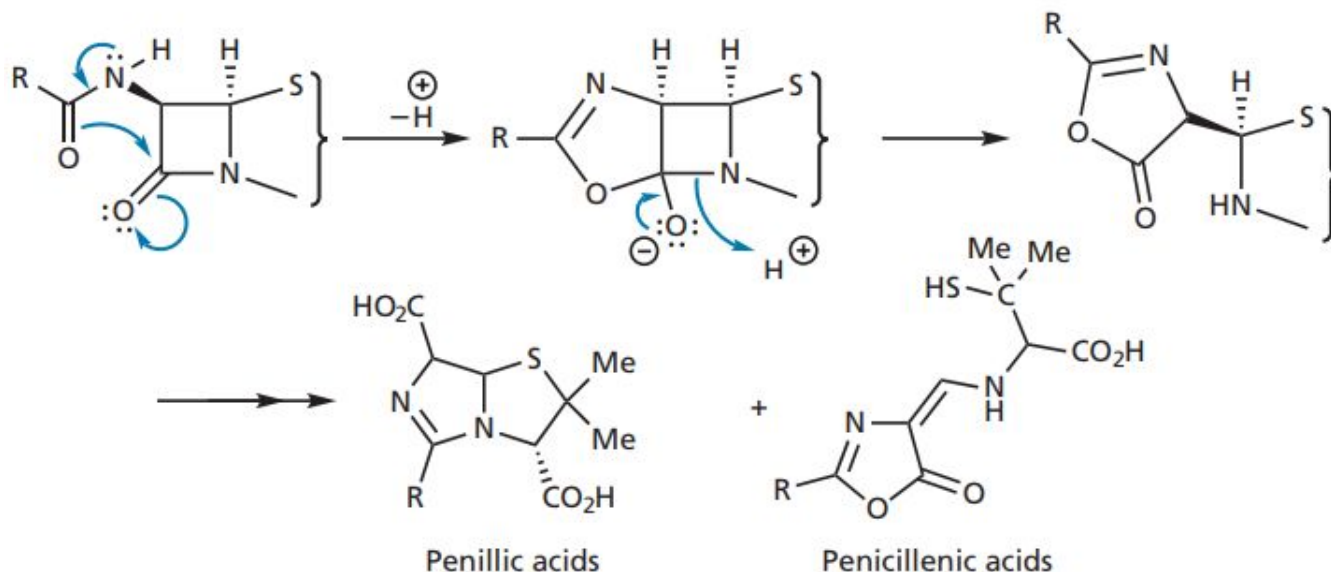
Стратегия преодоления основана на внедрении относительно объемистых R-групп, которые по стерическим причинам не позволяют войти в активный центр бета-лактамазы, но еще позволяют проникнуть в активный центр транспептидазы.

Кислотный гидролиз

Проблема: неустойчивость пенициллинов к кислотному гидролизу:



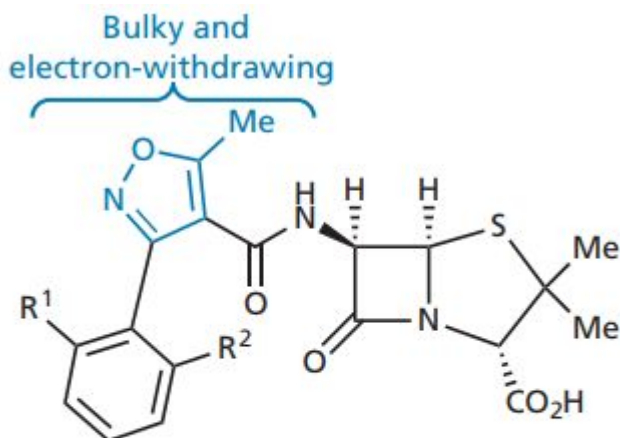
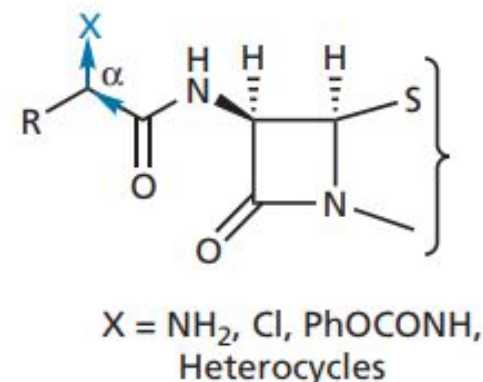
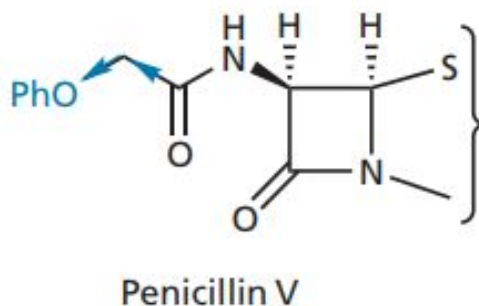
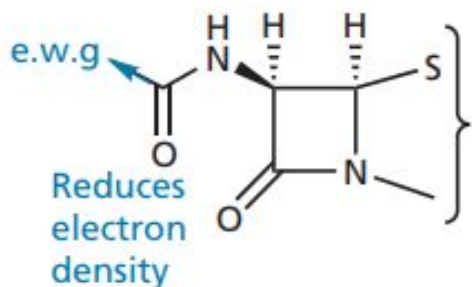
Реакция осложняется внутримолекулярной атакой амидной CO-группы на бета-лактамный карбонильный атом С:



Как следствие, в кислой среде желудка эти молекулы разрушаются.

Орально активные пенициллины

Решение: Внедрение электрон-акцепторных R-групп, которые снижают нуклеофильность амидной CO-группы.



Oxacillin	R ¹ = R ² = H
Cloxacillin	R ¹ = Cl, R ² = H
Flucloxacillin	R ¹ = Cl, R ² = F
Dicloxacillin	R ¹ = Cl, R ² = Cl

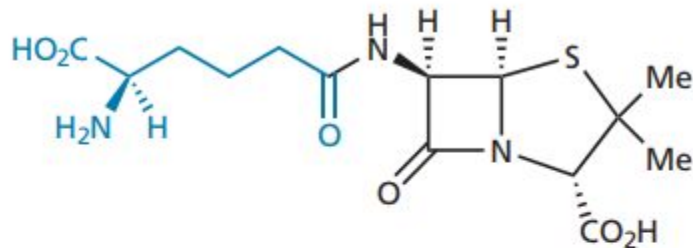
Пример: изоксазольные пенициллины. Орально активные, устойчивые к бета-лактамазам.

Пенициллины широкого спектра действия

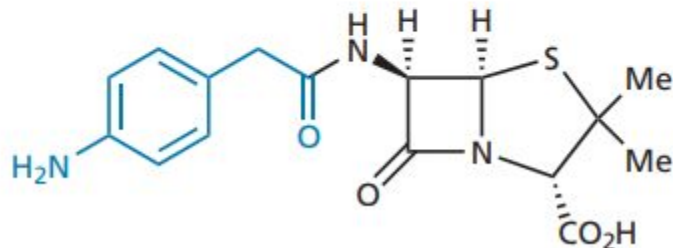
Пенициллины обычно активны только по отношению к $\Gamma(+)$, но не $\Gamma(-)$.

Активность в общем случае зависит от следующих факторов:

- Способность проникать через клеточную мембрану $\Gamma(-)$ бактерий;
- Устойчивость в бета-лактамазам;
- Аффинность к целевой биомишени (транспептидаза);
- Эффективность обратного транспорта (efflux) из $\Gamma(-)$ бактерий.



Penicillin N

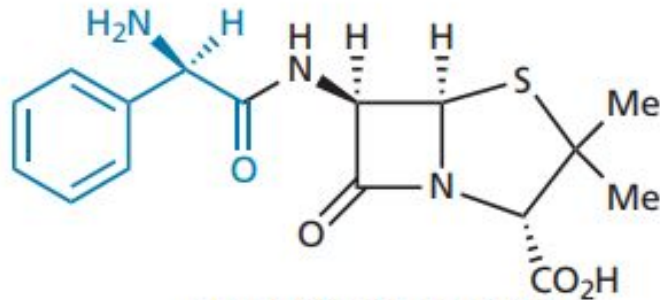


Penicillin T

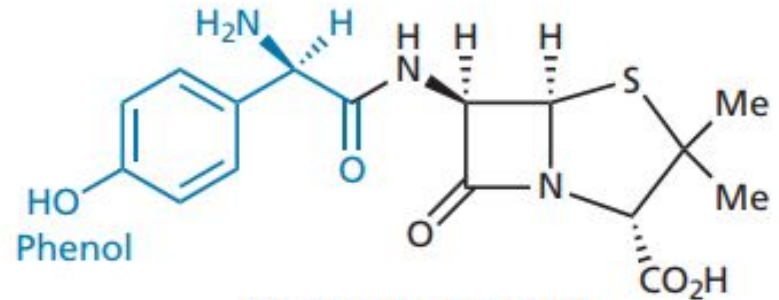
Примеры пенициллинов, активных по отношению к $\Gamma(+)$ и $\Gamma(-)$ бактериям.

Пенициллины широкого спектра действия

Аминопенициллины

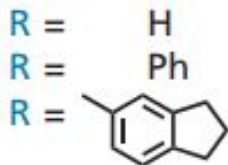
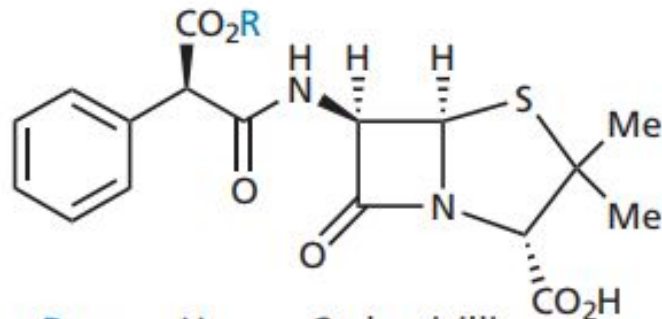


Ampicillin (Penbritin)

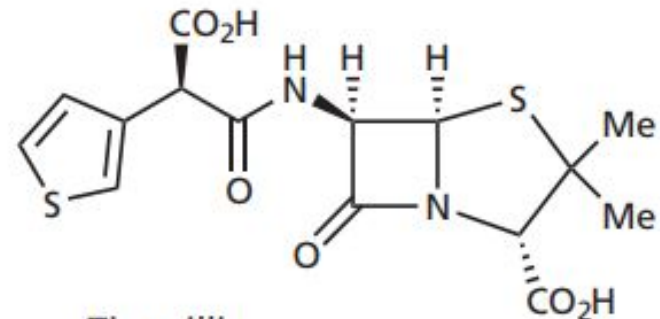


Amoxicillin (Amoxil)

Карбоксипенициллины

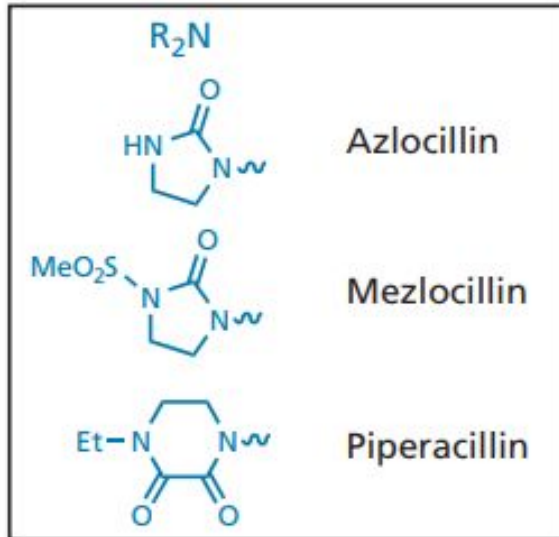


Carbenicillin
Carfecillin
Indanyl carbenicillin

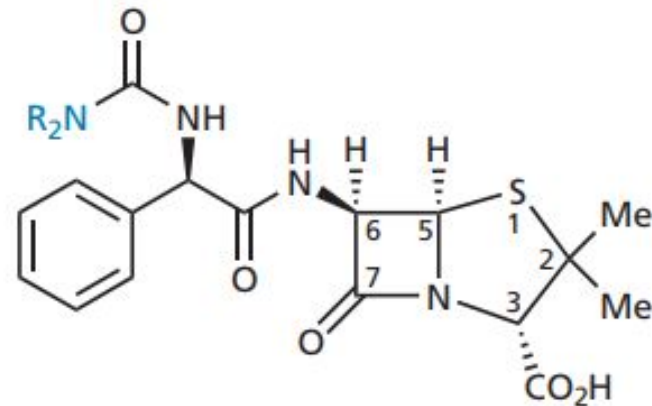


Ticarcillin

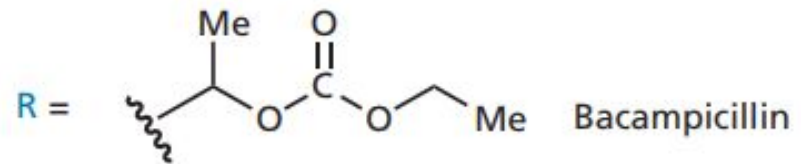
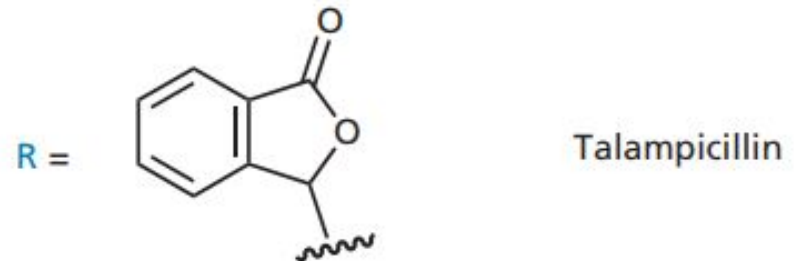
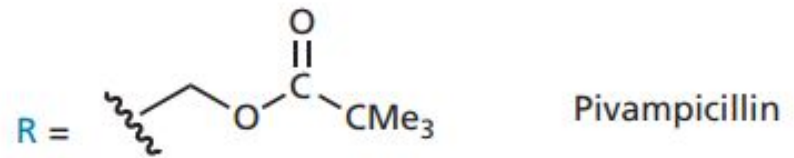
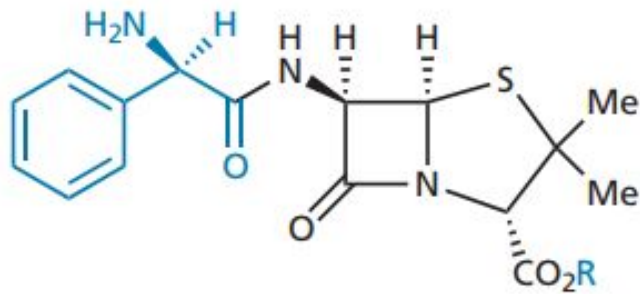
Пенициллины широкого спектра действия



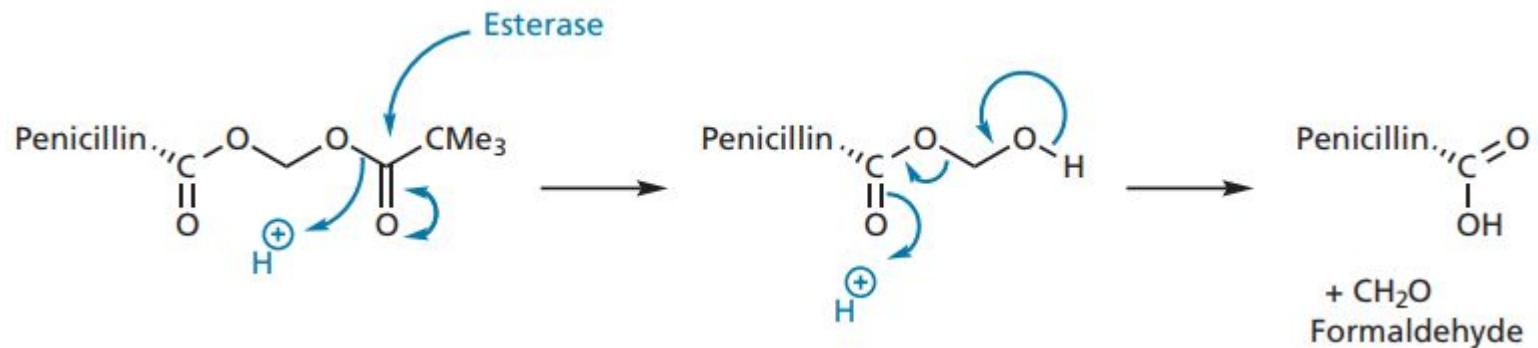
Уреидопенициллины



Пенициллины-пролекарства

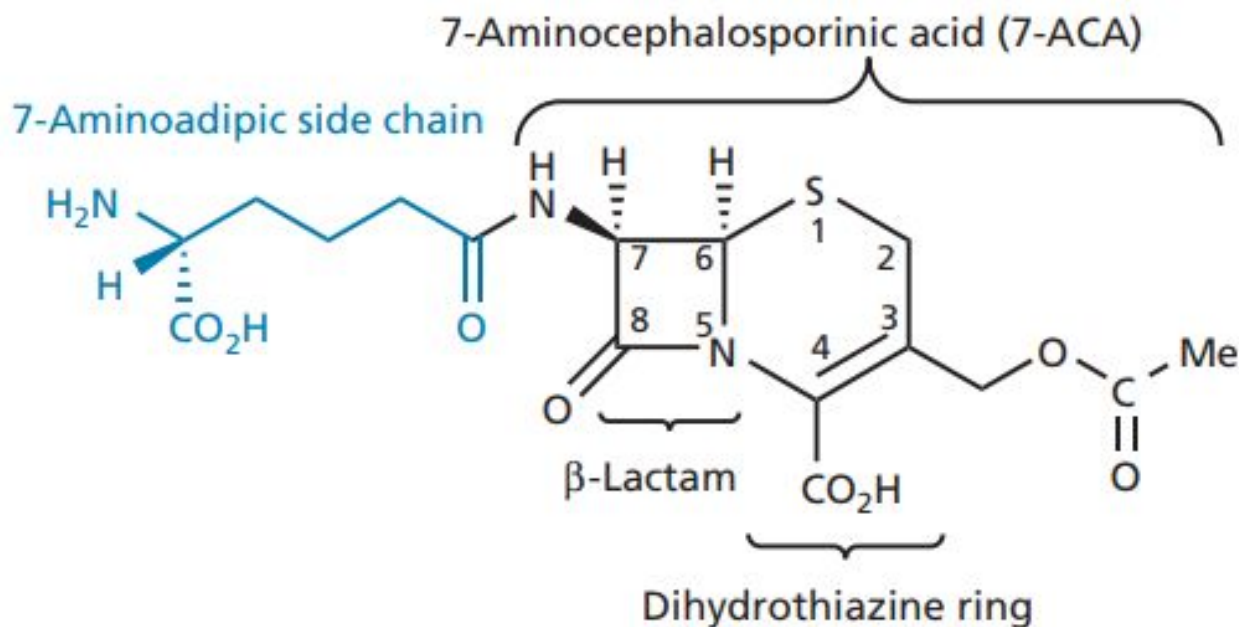


Расщепление ацилосиметильных эфиров:



Такие молекулы более эффективно проникают через стенки ЖКТ и входят в системный кровоток.

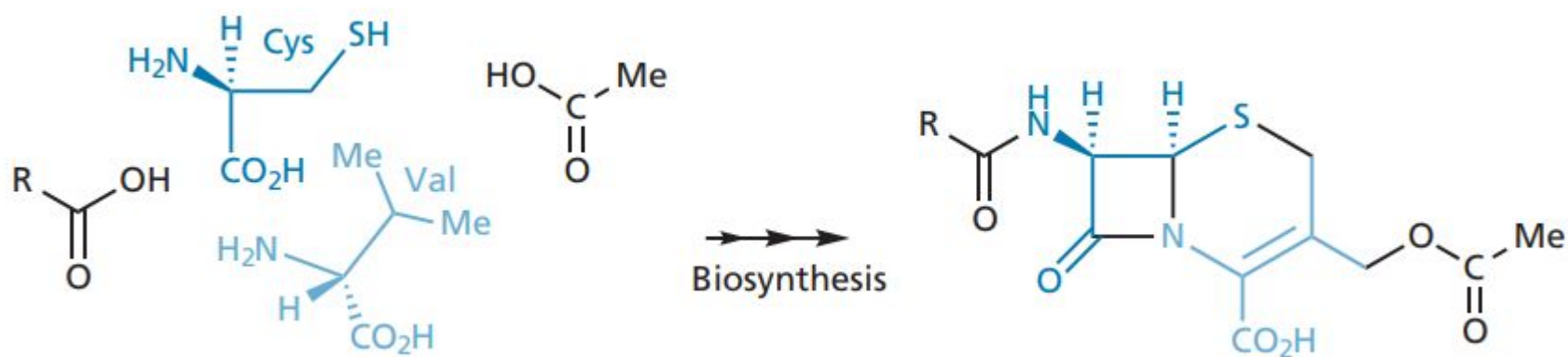
Цефалоспорины. Цефалоспорин С



- Не так активны, как пенициллины (снижение активности на 3 порядка по сравнению с пенициллином G).
- Обладают более широким спектром действия по отношению к $\Gamma(+)$ и $\Gamma(-)$ бактериям.
- Устойчивы к кислотному гидролизу и бета-лактамазам.
- Менее аллергенны.

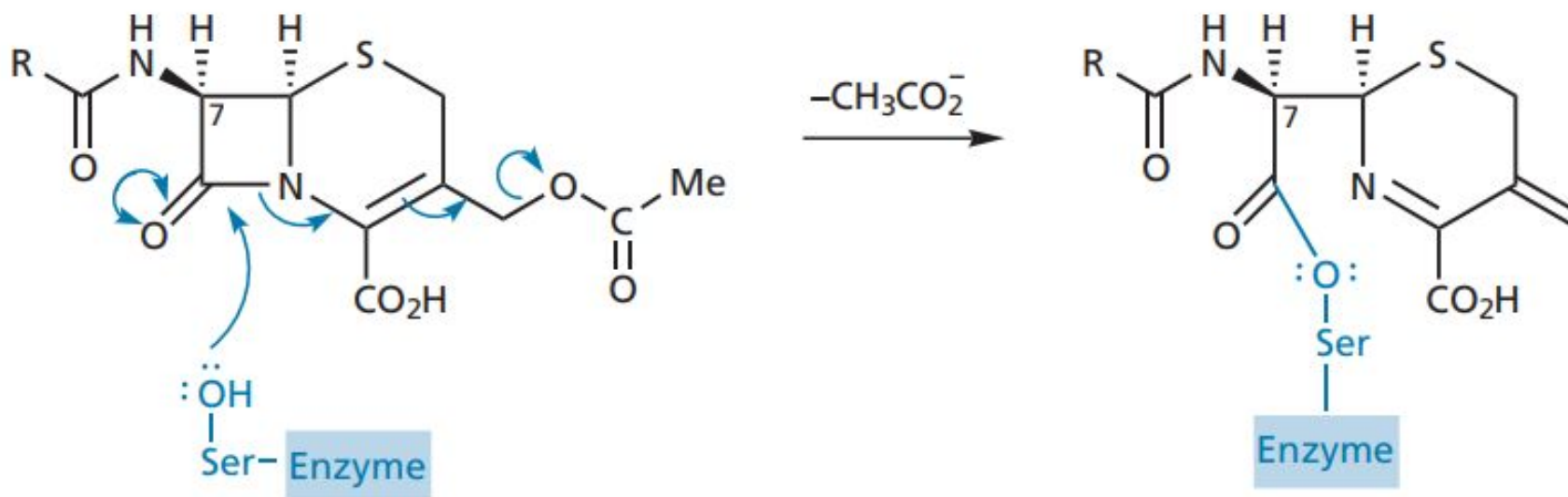
Цефалоспорины

Биосинтез цефалоспорина С:

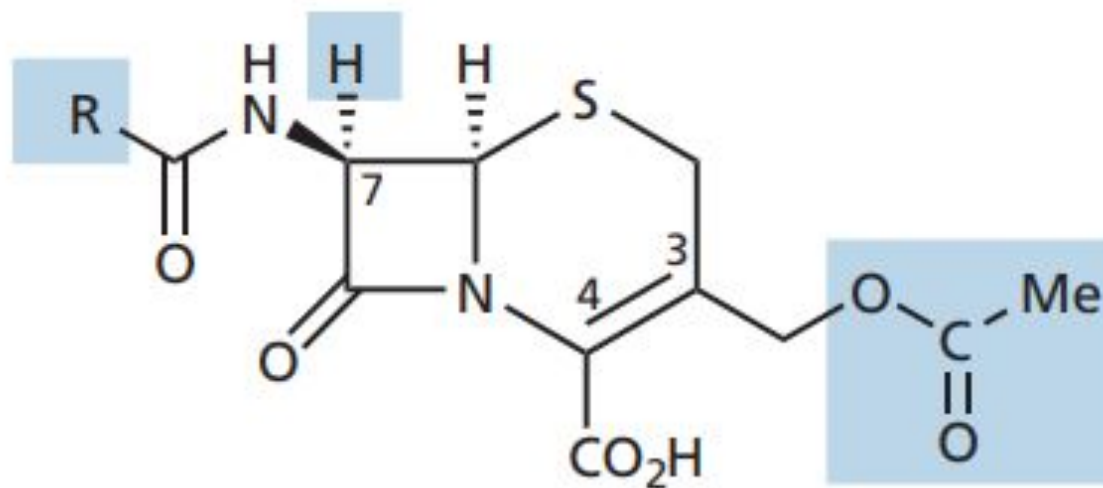


Механизм действия

Ингибирование транспептидазы:

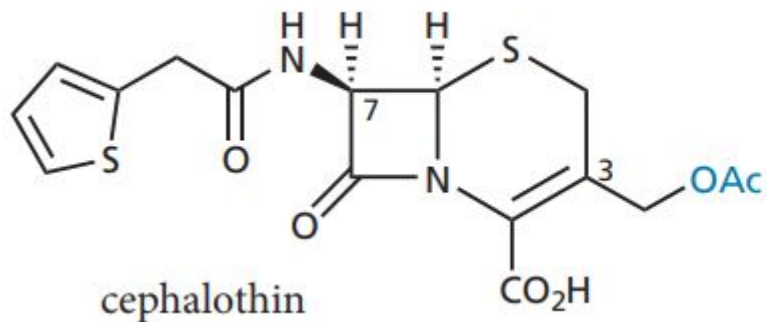


Цефалоспорины: синтез аналогов

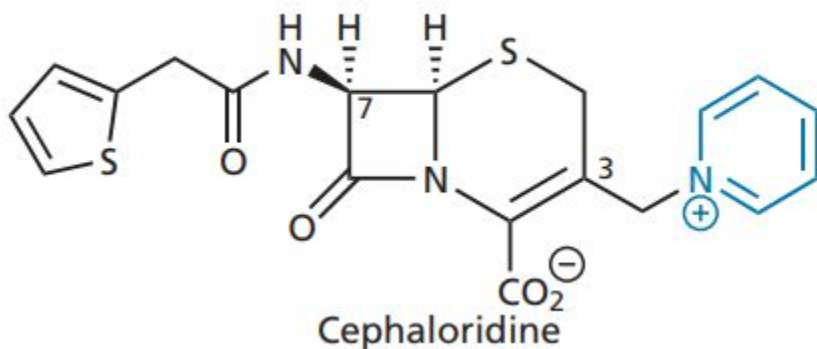
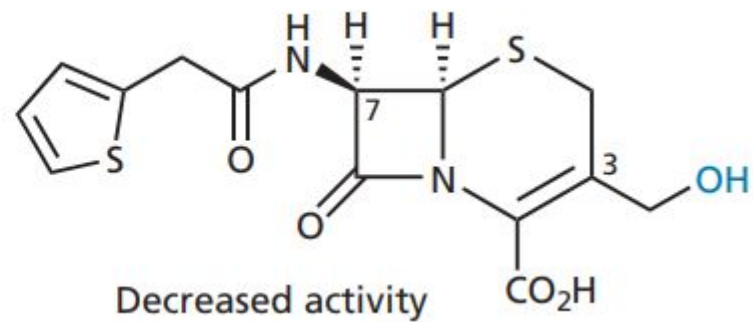


Выделены положения, которые можно заменять, получая модифицированные активные аналоги.

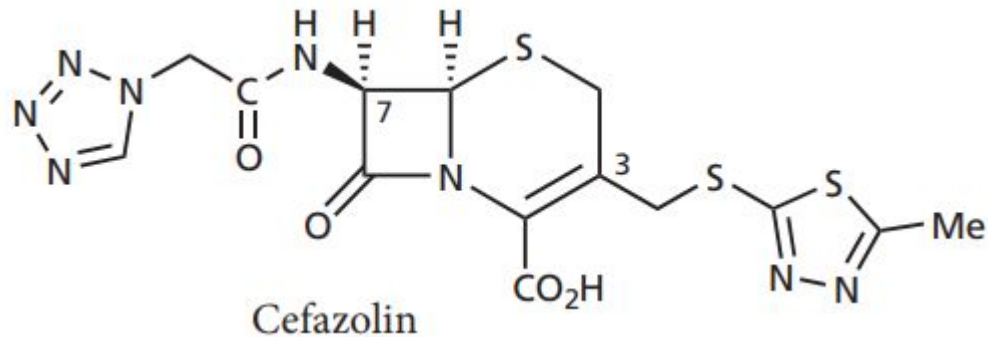
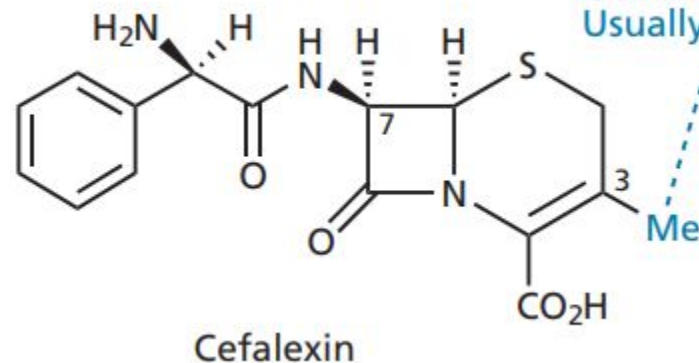
Примеры цефалоспоринов первое поколение



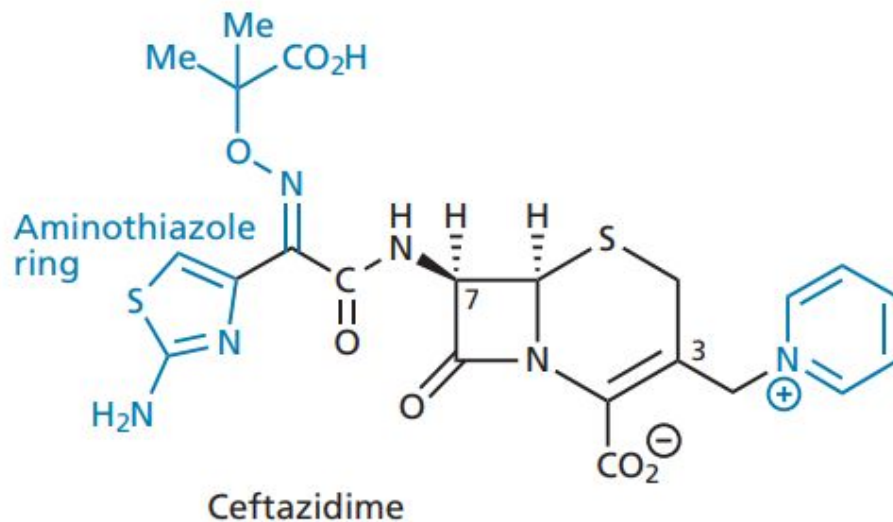
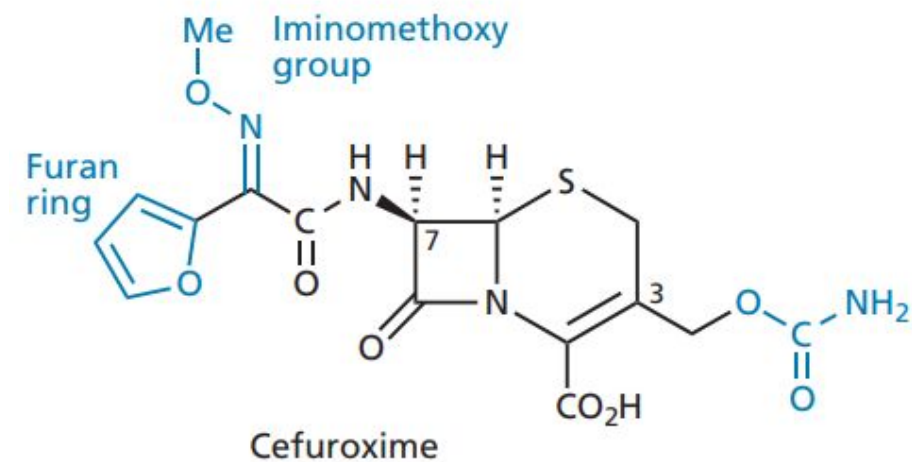
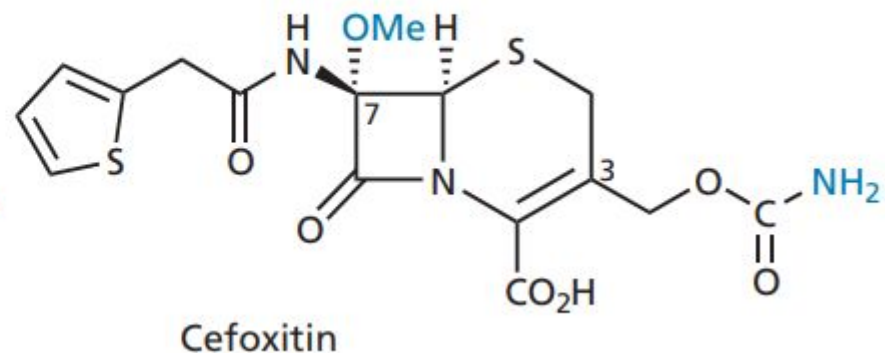
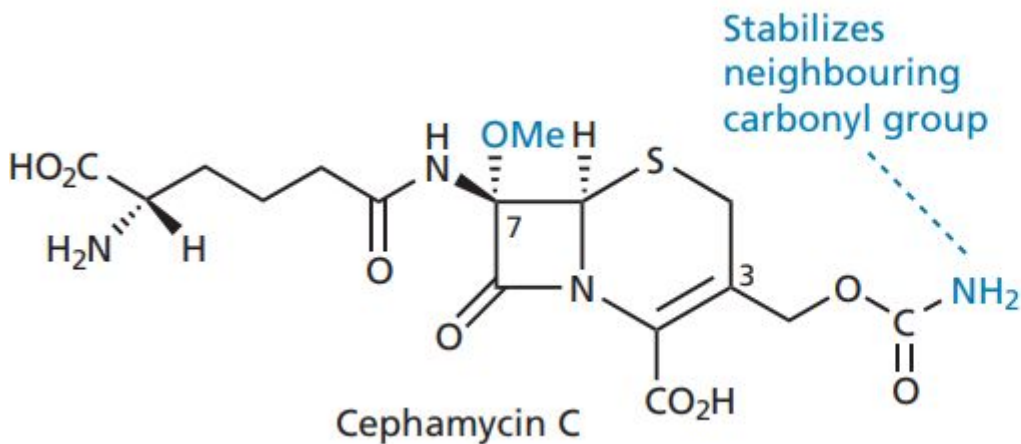
Metabolism



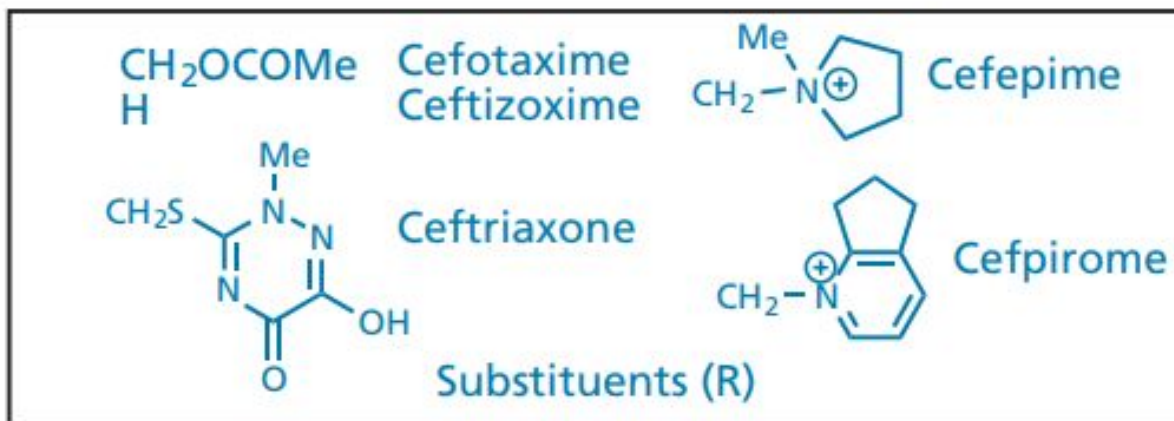
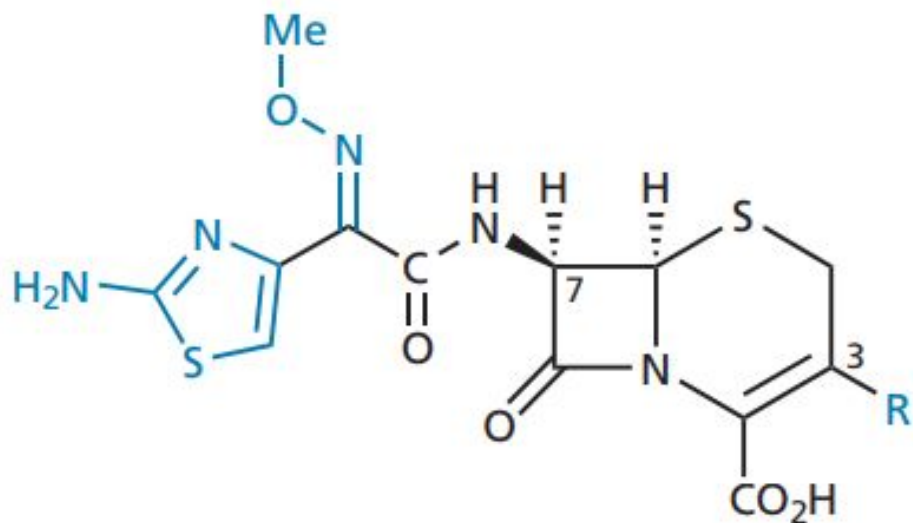
Good for absorption.
Usually bad for activity



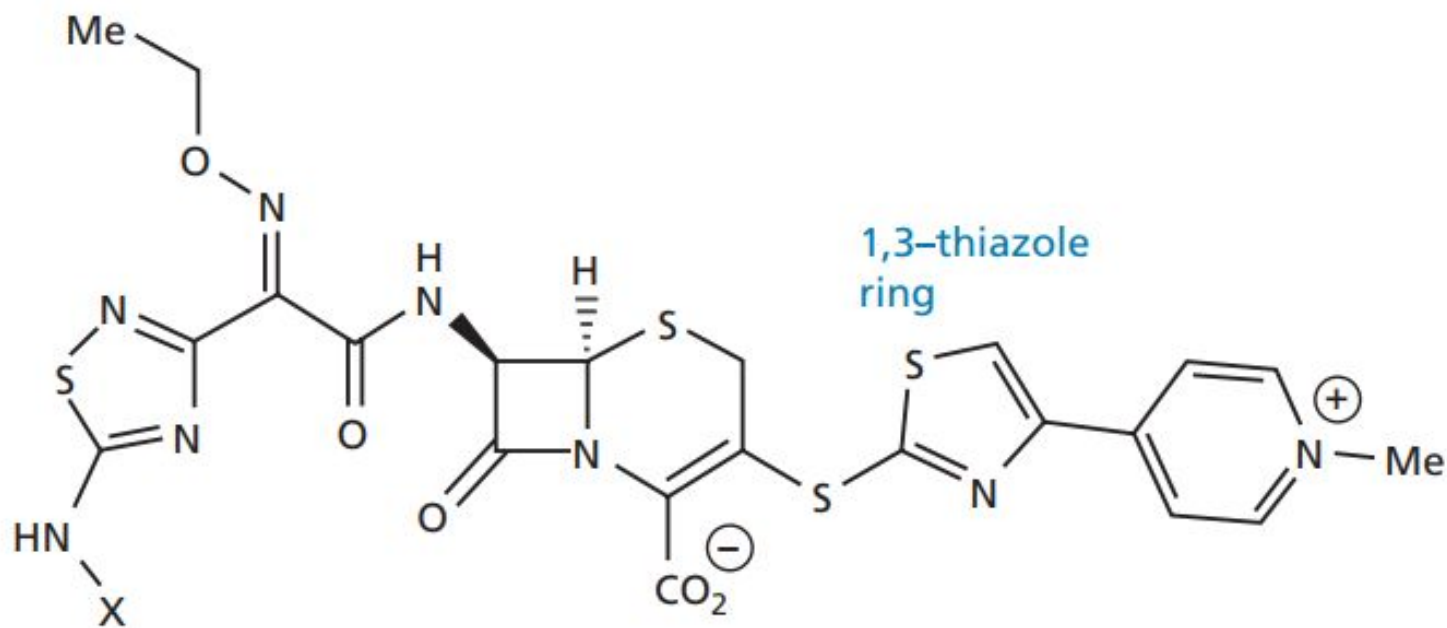
Примеры цефалоспоринов второе и третье поколения



Примеры цефалоспоринов третье и четвертое поколения



Примеры цефалоспоринов пятое поколение



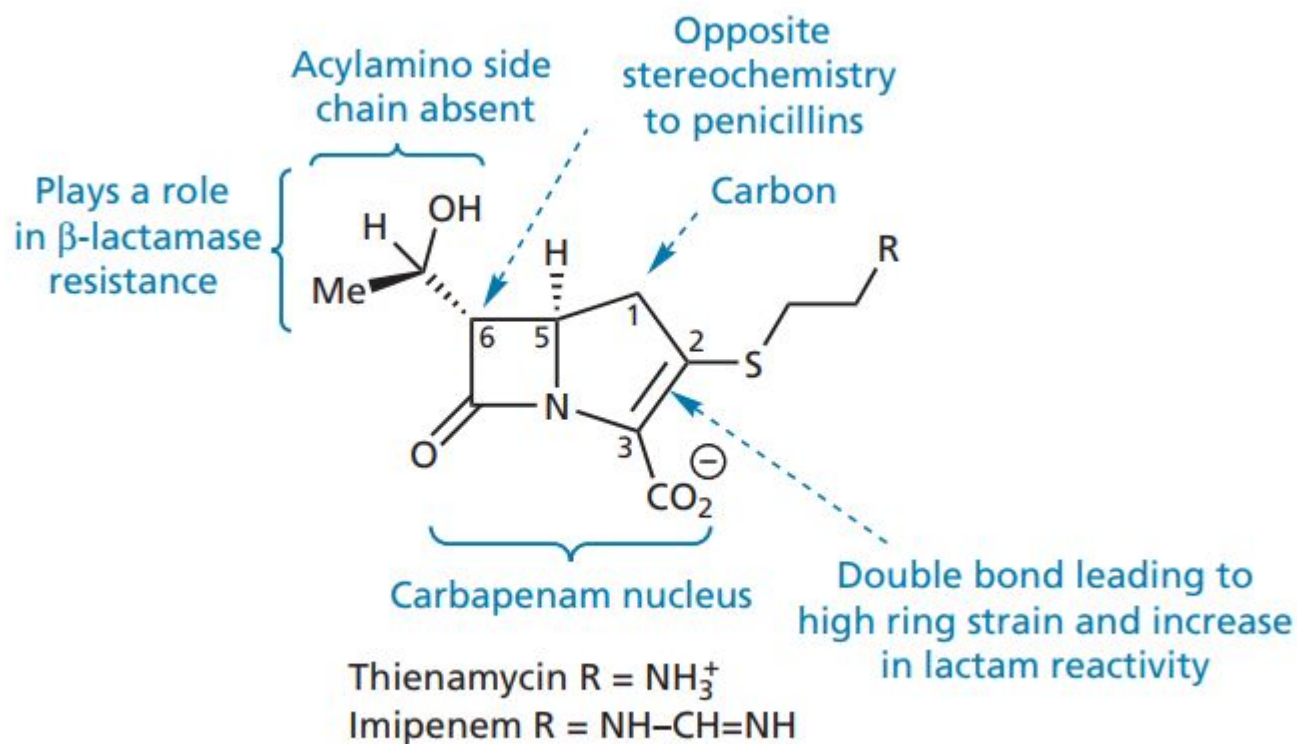
Ceftaroline; X = H

Ceftaroline fosamil; X = P(=O)(OH)₂

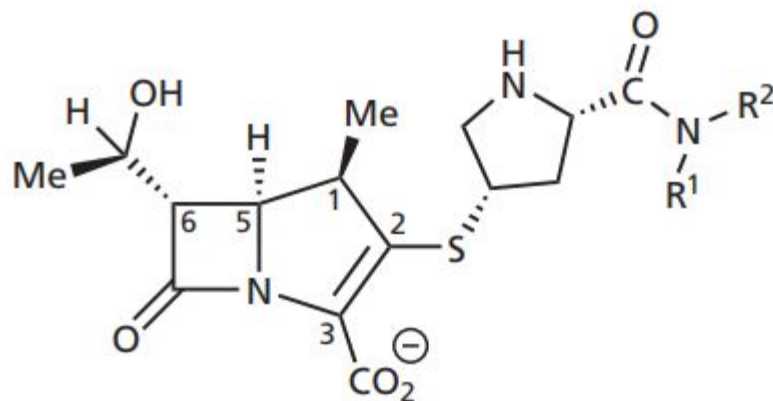


Карбапенемы

Тиенамицин – первый представитель класса, выделенный из *Streptomyces cattleya* в 1976.

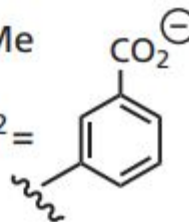


Карбапенемы: примеры



Meropenem; $R^1 = R^2 = \text{Me}$

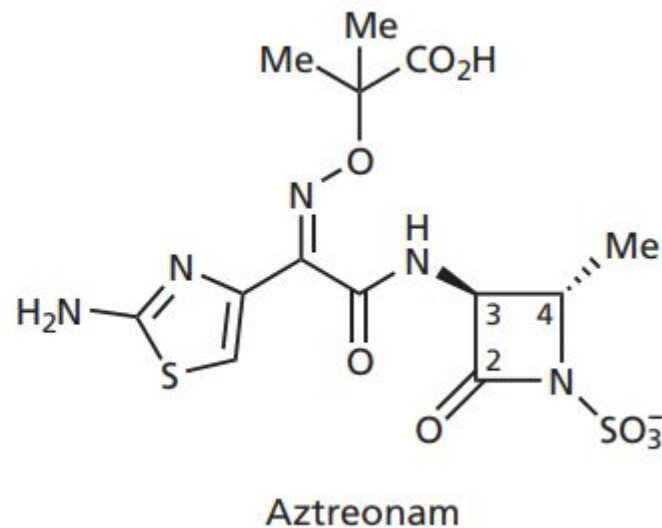
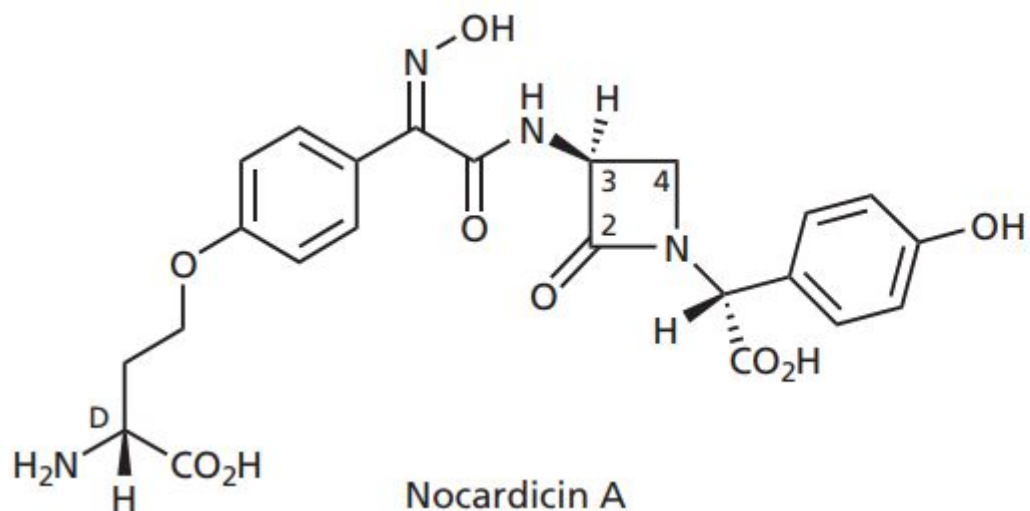
Ertapenem; $R^1 = \text{H}$, $R^2 =$



Низкая токсичность, устойчивость к бета-лактамазам, широкий спектр активности (Г(+)) и Г(-)).



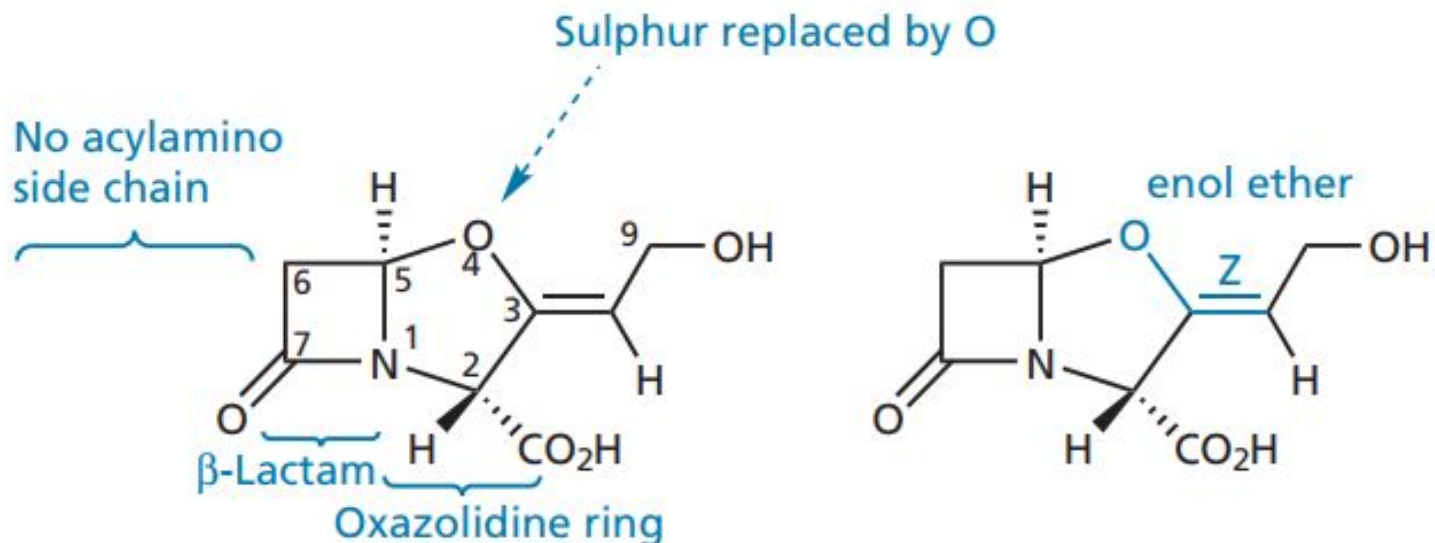
Монобактамы



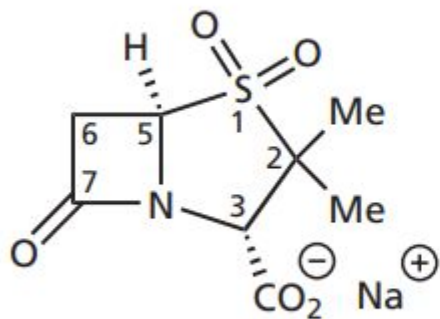
- Спектр активности, отличный от других бета-лактамов (напр., неактивны по отношению к Г(+)).
- Низкая токсичность.
- Механизм действия, возможно, связан с ингибированием других ферментов, вовлеченных в синтез клеточных стенок бактерий.

Ингибиторы бета-лактамазы

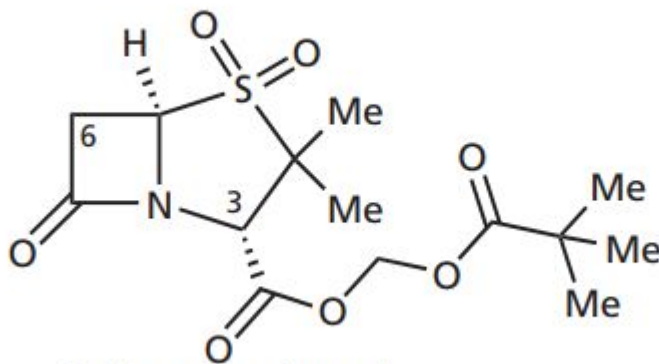
Клавулановая кислота:



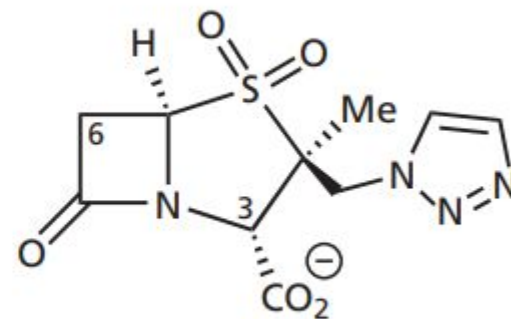
Сульфонь пенициллановой кислоты



Sulbactam



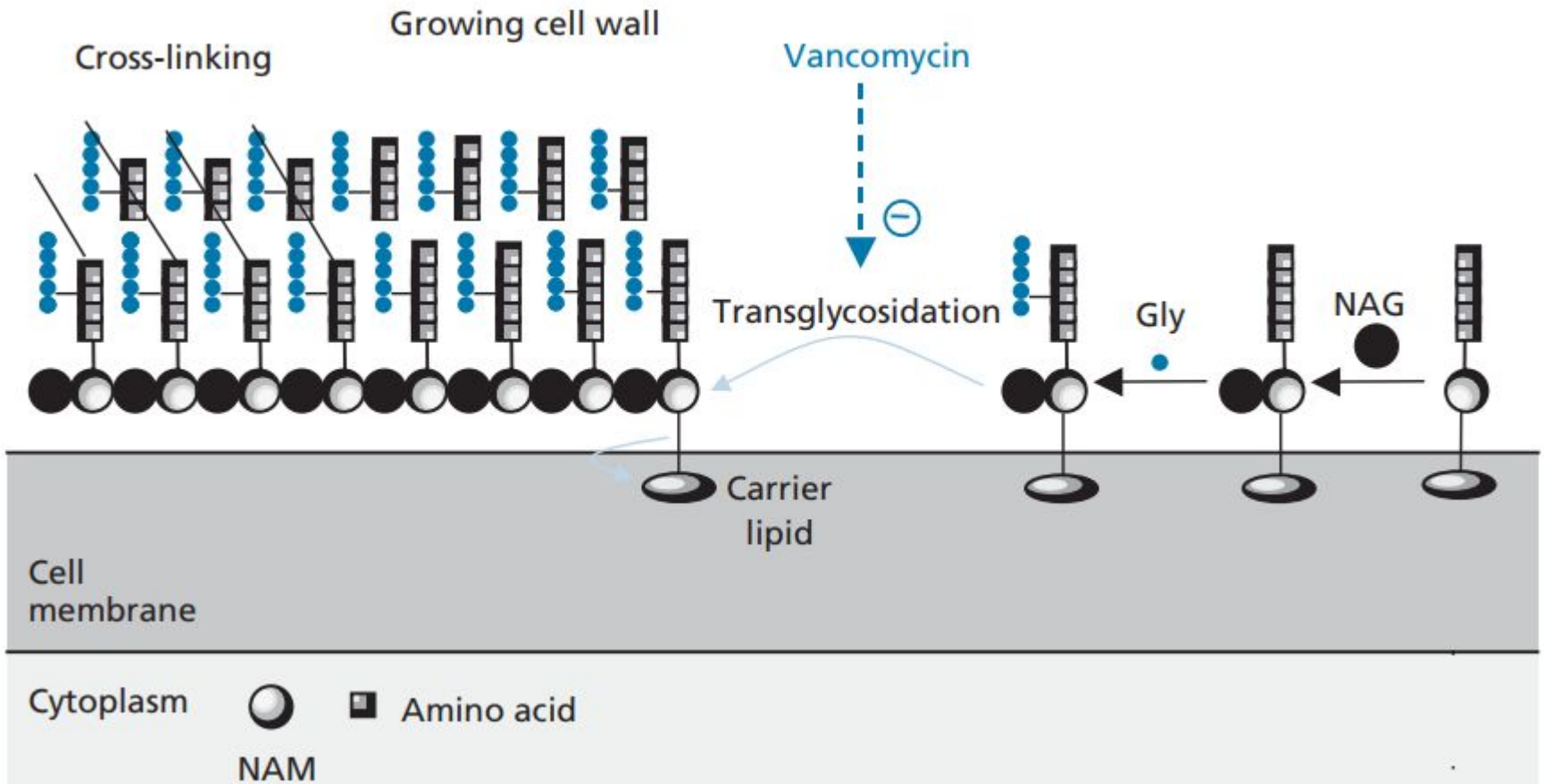
Sulbactam pivoxal



Tazobactam

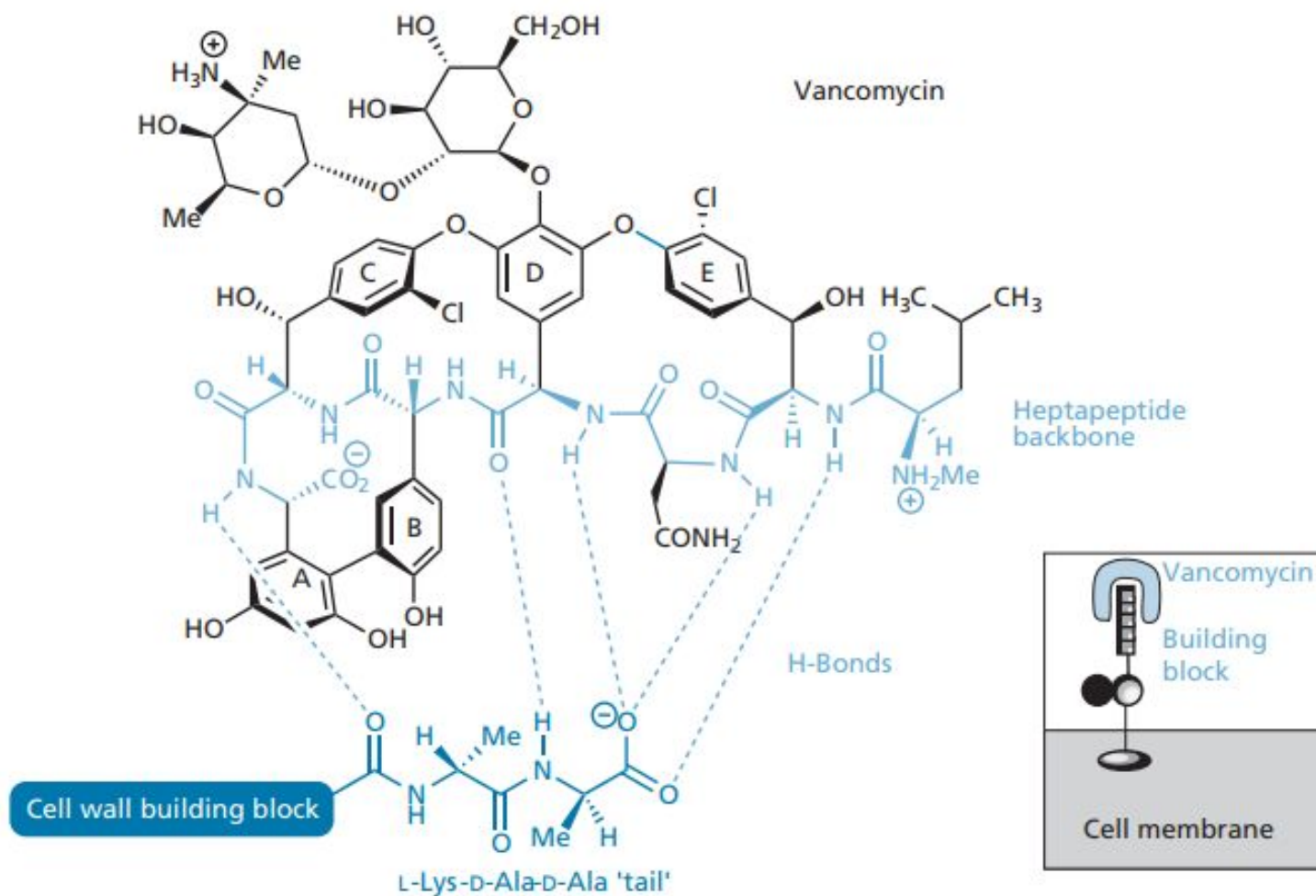
Ванкомицин

Построение клеточной стенки бактерий:



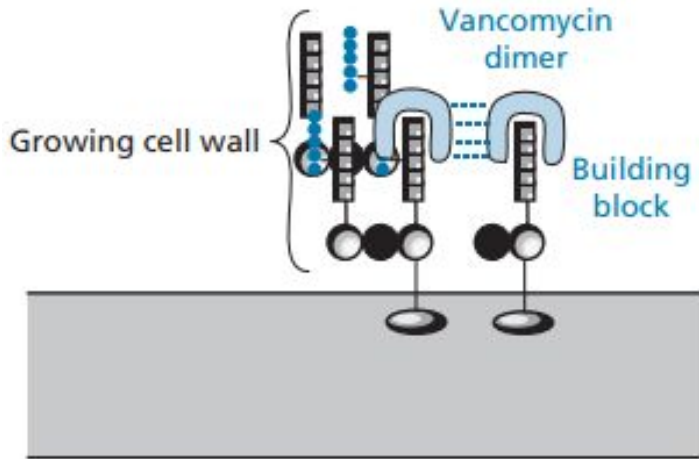
Ванкомицин блокирует один из ключевых этапов построения клеточной стенки бактерий – образование гликозидной связи.

Ванкомицин: механизм

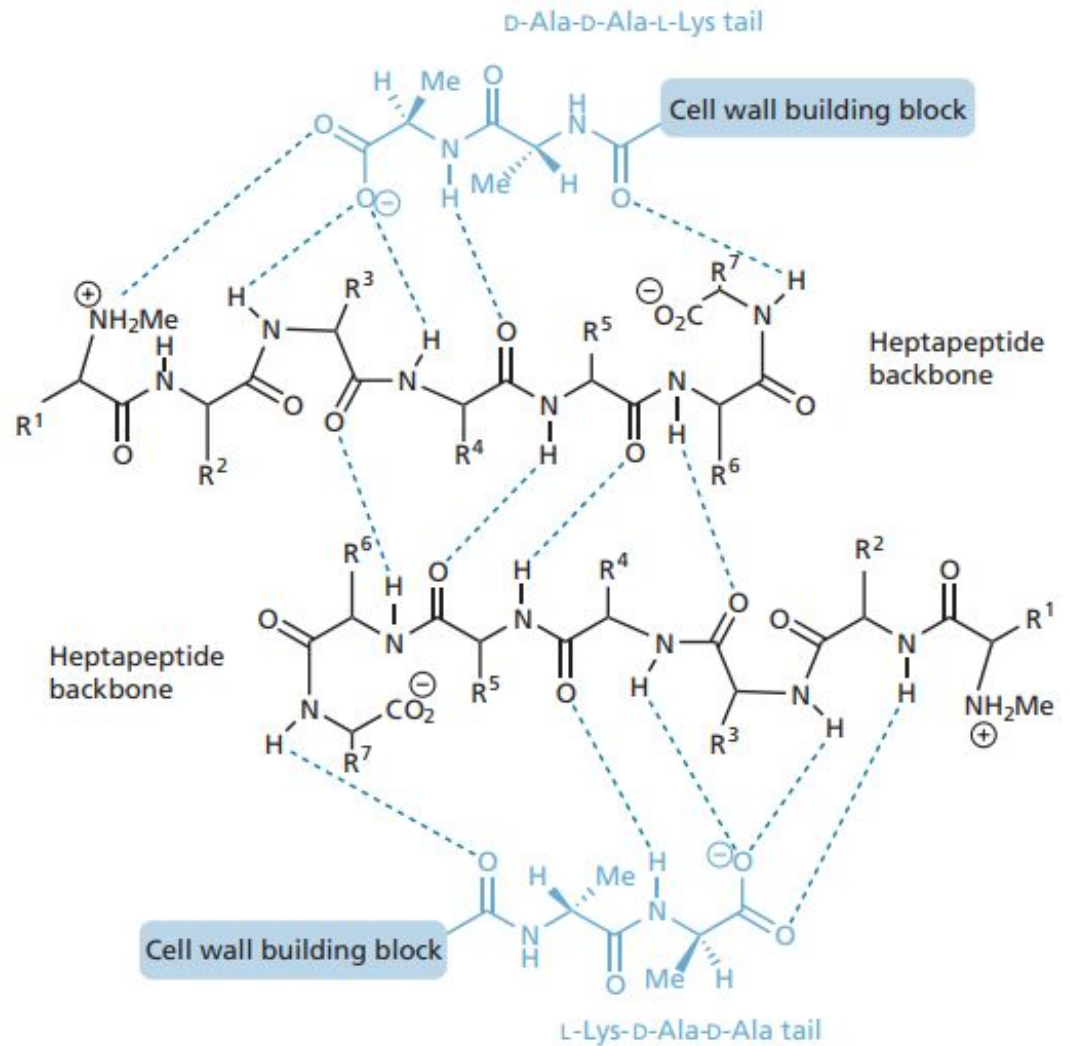


Уникальный механизм действия ванкомицина состоит в специфическом связывании с фрагментом, участвующим в построении клеточной стенки, и, как следствие, его стерическом экранировании.

Ванкомицин: механизм



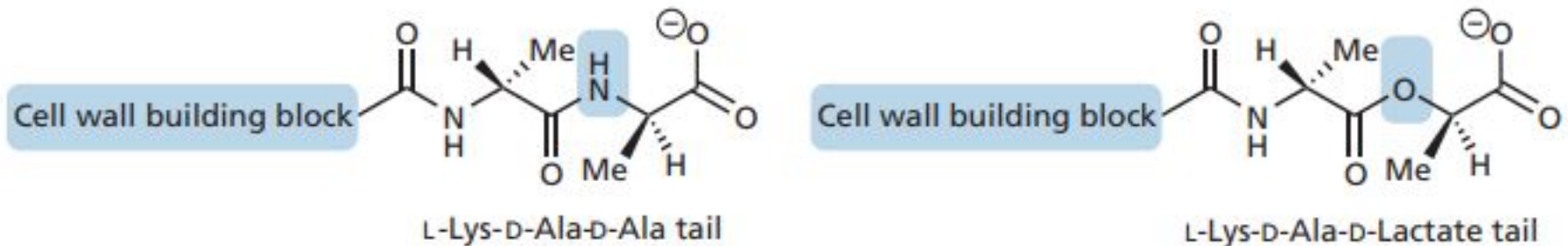
При связывании ванкомицин образует нековалентные димеры за счет образования водородных связей между своими пептидными цепями.



Резистентность к ванкомицину

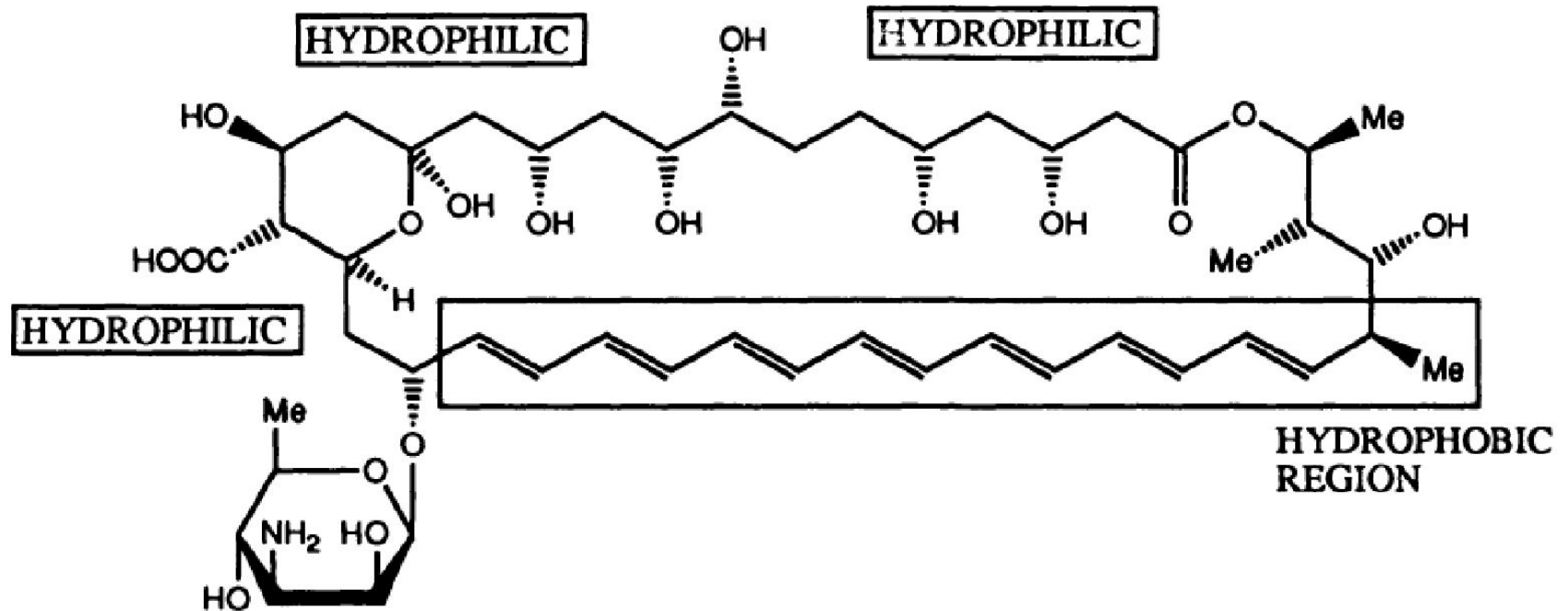
Вырабатывалась медленно, однако в конце 1980-х резистентные штаммы появились.

Механизм резистентности (*S. aureus*) достаточно уникален – NH-O-модификация пептидной цепи растущей клеточной стенки:



В результате этой замены снижается эффективность связывания ванкомицина с пептидной цепью, и активность антибиотика падает.

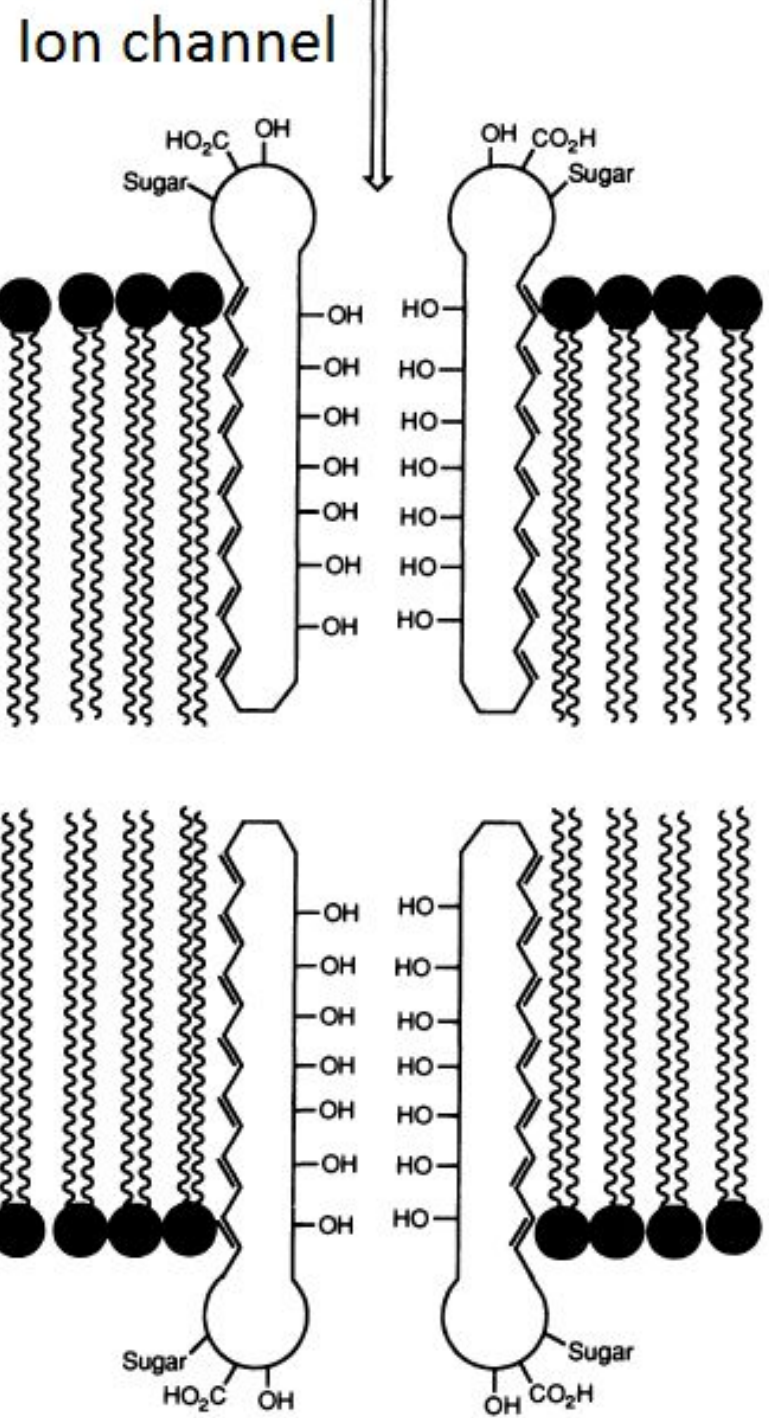
Препараты, взаимодействующие с мембранами. Амфотерицин



Соединение сочетает в своей топологии гидрофильные и гидрофобный регионы. Размеры молекулы соответствуют толщине липидного бислоя грибковых патогенов.

Очень токсично, малое терапевтическое окно (amphoterrible)

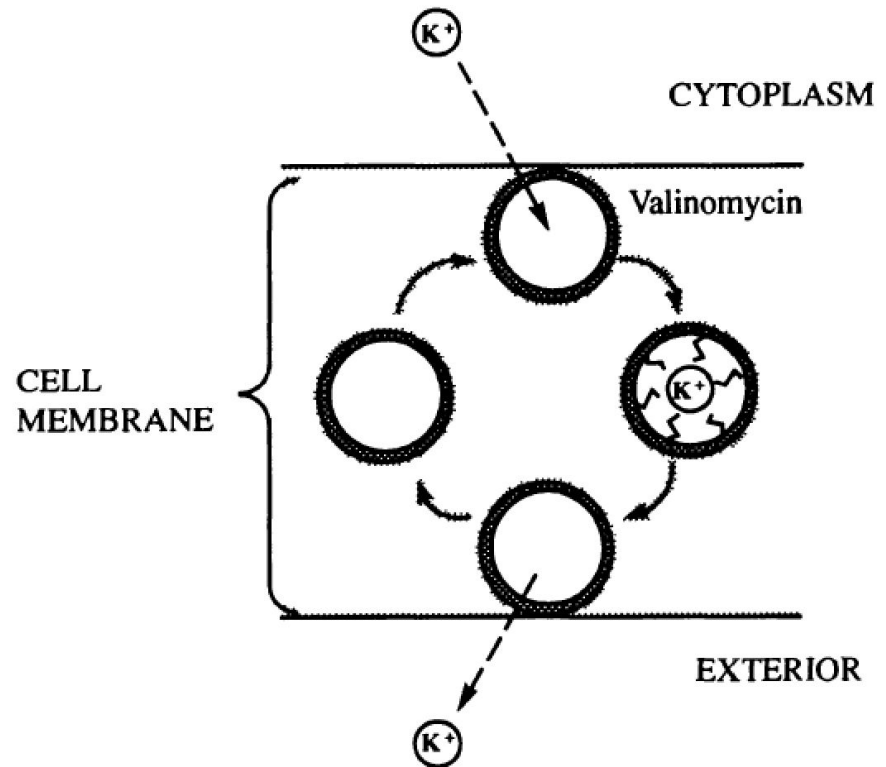
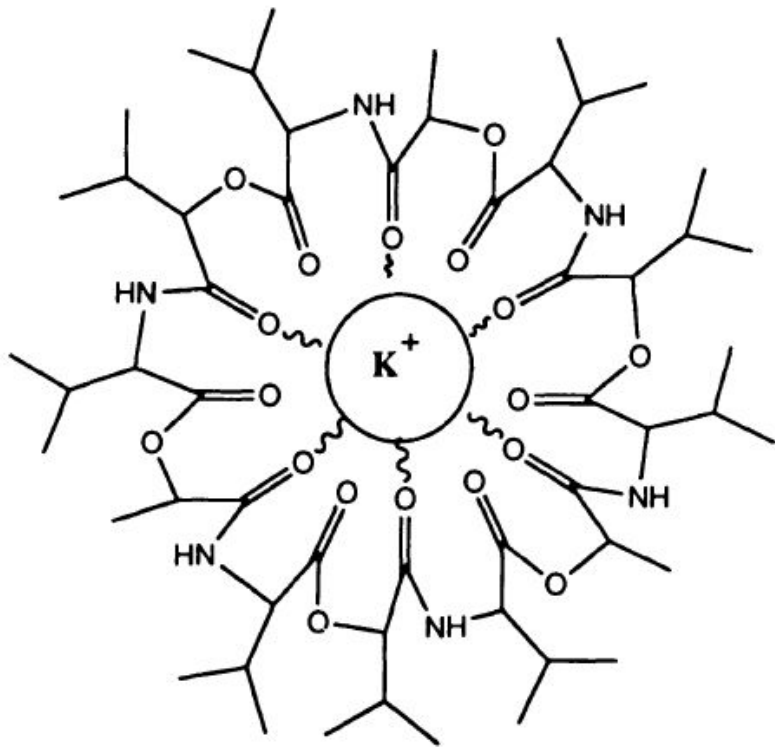
Cell membrane



Амфотерицин: механизм действия

Взаимодействие амфотерицина с клеточными стенками патогена образует канал. В результате происходит разрушение (дезинтеграция) клетки, с гибелью патогена.

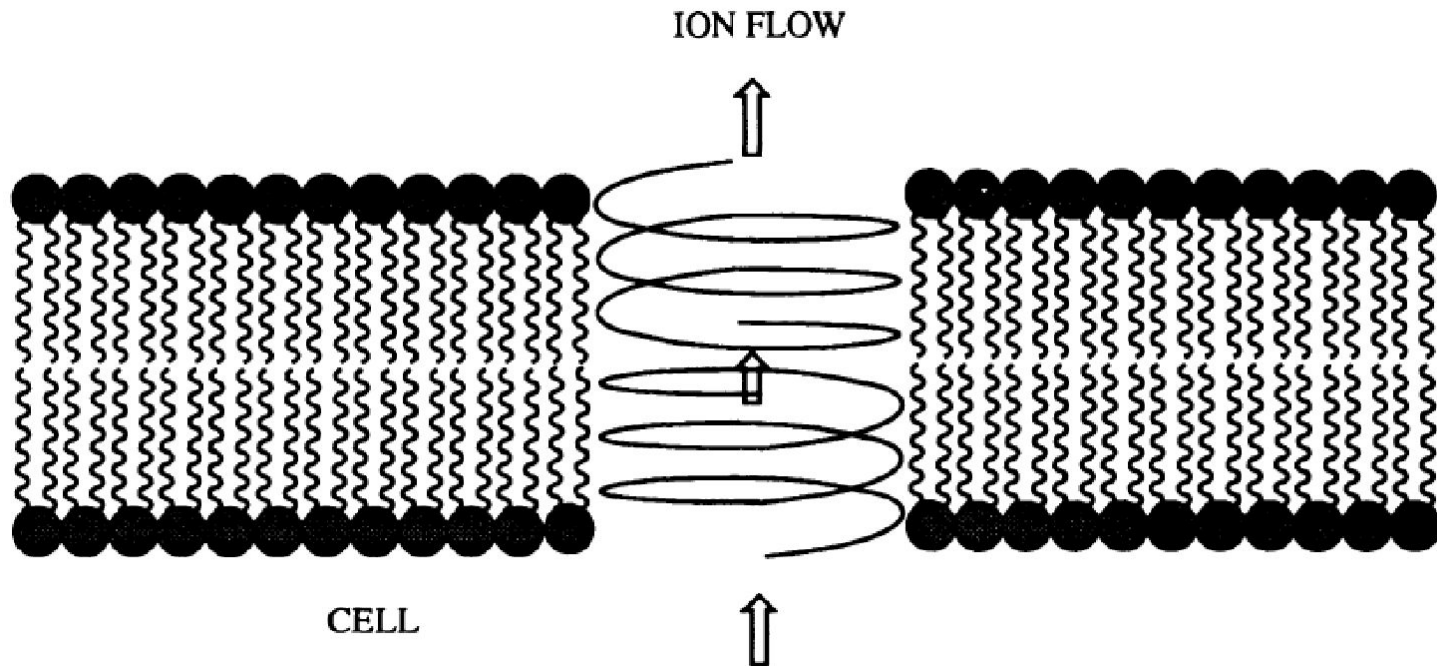
Ионофоры: валиномицин



Молекула валиномицина представляет из себя циклопептид, внешняя поверхность которого является липофильной, а внутренняя способна селективно связывать ионы калия. Равновесие ионов калия играет важную роль в жизнедеятельности клетки. Располагаясь внутри клеточной мембраны, валиномицин осуществляет функцию неконтролируемого клеткой переносчика ионов калия, что способно приводить к гибели клетки бактериального патогена.

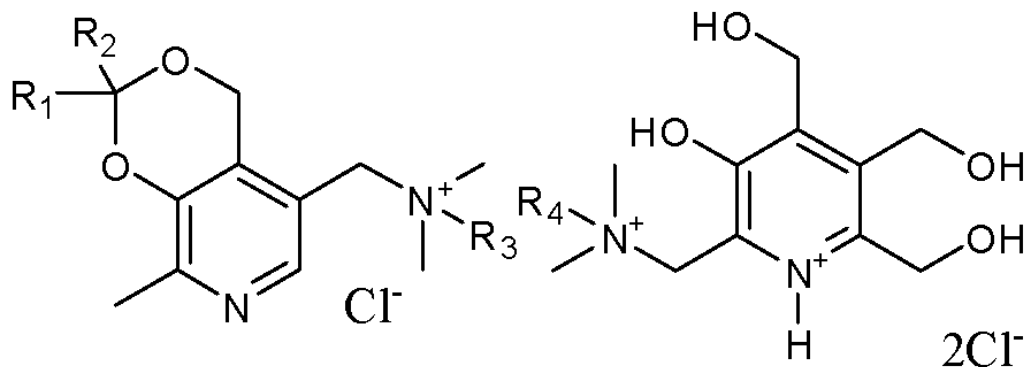
Нанотрубки-киллеры: грамицидин

Val-Gly-Ala-Leu-Ala-Val-Val-Val-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-Leu-Trp-NH-CH₂-CH₂-OH



Две молекулы грамицидина образуют спиральный туннель в клеточной стенке патогена, приводя к разрушению клетки. Происходит это благодаря сочетанию в пептидной цепи грамицидина гидрофобных и гидрофильных групп.

Аммониевые соли пиридоксина

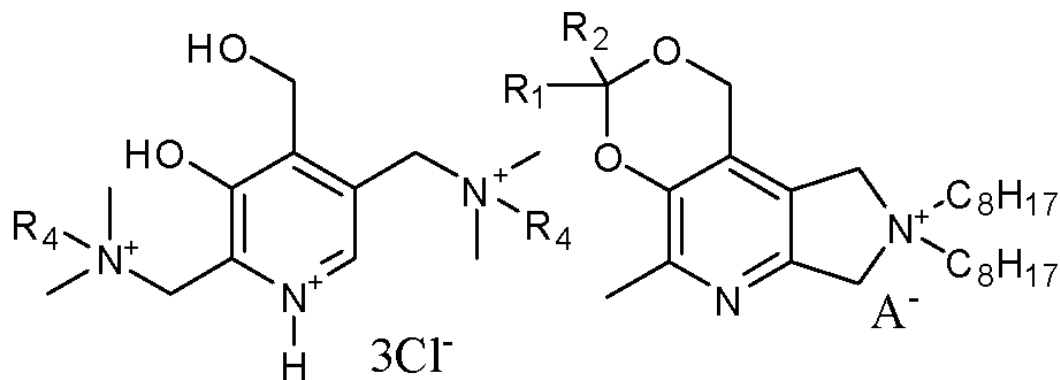


7a-e,h

MIC 2-8 $\mu\text{g/mL}$

10b, 11b

MIC 2-8 $\mu\text{g/mL}$



17a, 18a

MIC 16 $\mu\text{g/mL}$

20-23

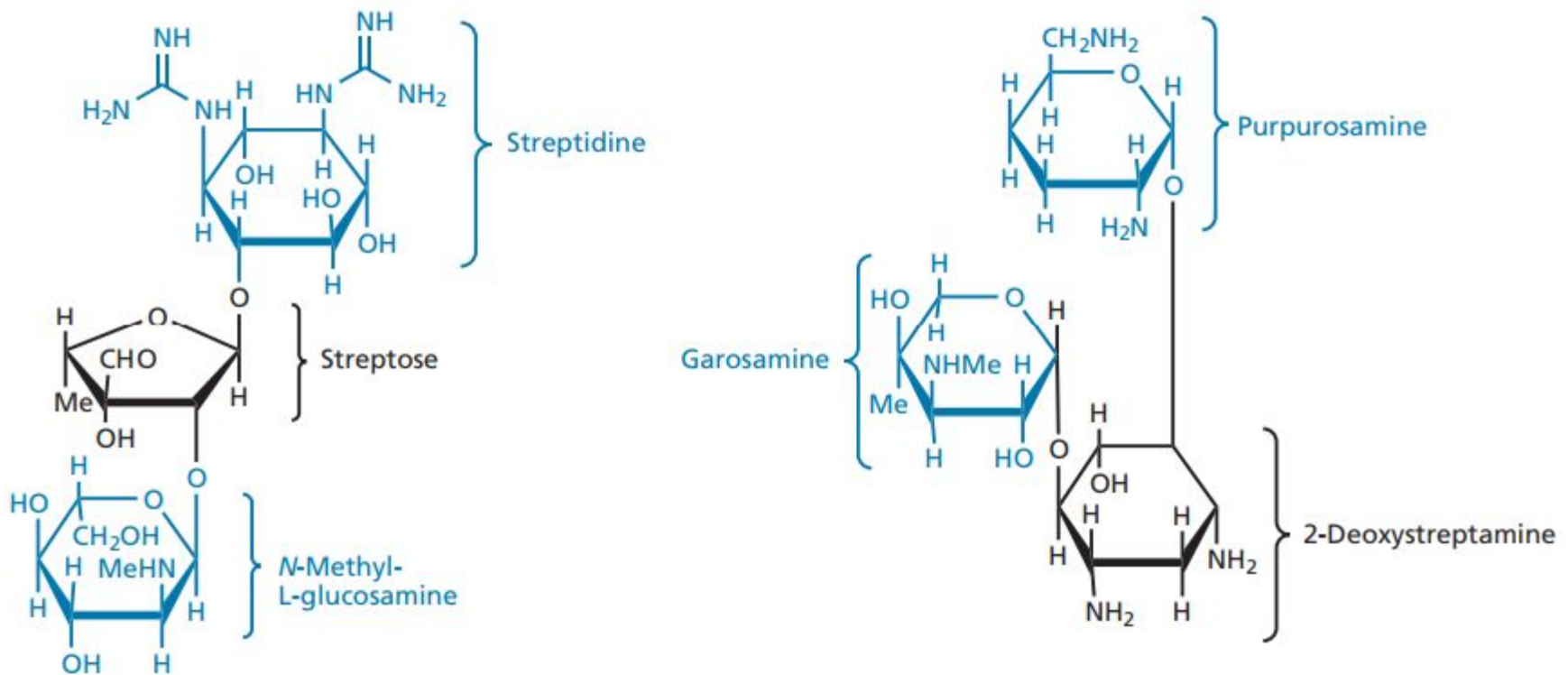
MIC 0.5-4 $\mu\text{g/mL}$

- Высокая активность против G⁺ патогенов, на уровне лучших антибиотиков;
- Приемлемая *in vivo* токсичность;
- Механизм действия – встраивание и разрушение бактериальной мембраны патогена;
- Имеется определенная селективность по отношению к эукариотическим клеткам;
- Возможны внутриклеточные мишени

Shtyrlin N., Shtyrlin Y. et al. Med. Chem. Res, 2017.

(MICs are given for *S. aureus* ATCC29213 strain)

АМИНОГЛИКОЗИДЫ

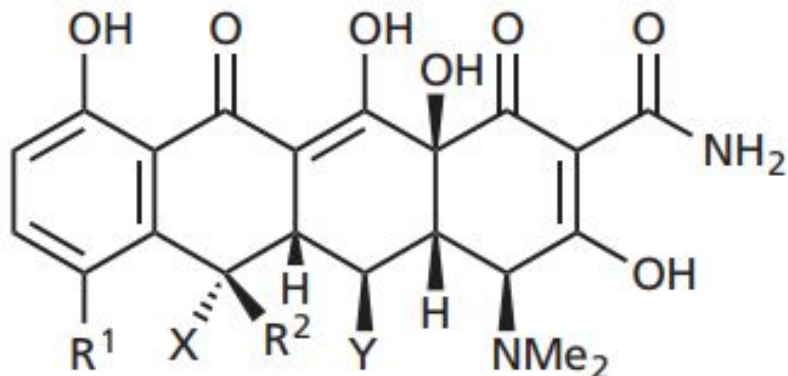


Streptomycin (from *Streptomyces griseus*)

Gentamicin C1a

- Проникают через бактериальные мембраны при помощи активных механизмов и специфически связываются с 30S субъединицей рибосомы бактерий, предотвращая движение рибосомы вдоль мРНК.
- Рибосомы человека существенно отличаются от рибосом бактерий, чем и обусловлена селективность действия.

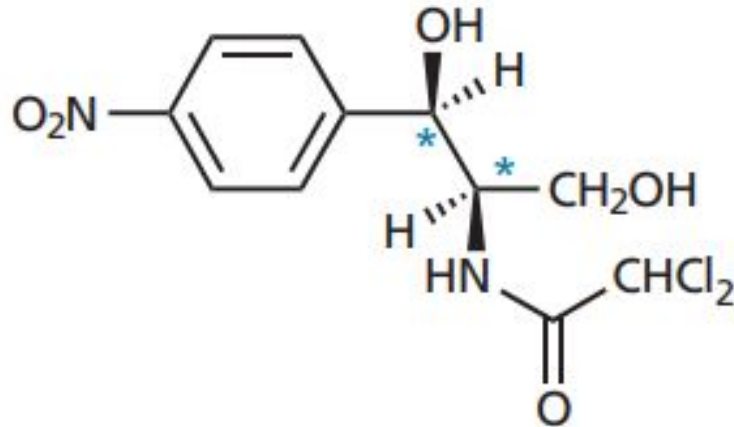
Тетрациклины



Chlortetracycline (Aureomycin) ($R^1 = \text{Cl}$, $R^2 = \text{Me}$, $X = \text{OH}$, $Y = \text{H}$)
Tetracycline ($R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{Me}$, $X = \text{OH}$, $Y = \text{H}$)
Doxycycline (Vibramycin) ($R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{Me}$, $X = \text{H}$, $Y = \text{OH}$)
Demeclocycline ($R^1 = \text{Cl}$, $R^2 = \text{H}$, $X = \text{OH}$, $Y = \text{H}$)

- Широкий спектр активности. Проникают через мембраны при помощи пассивных механизмов, связываются с 30S субъединицей бактериальных рибосом и блокируют ее связывание с аминоацил-тРНК.
- Селективность действия невелика и основана на большей эффективности проникновения в бактериальные мембраны. Тем не менее, для человека тетрациклины весьма токсичны.
- Резистентность к тетрациклинам развита широко.

Хлорамфеникол



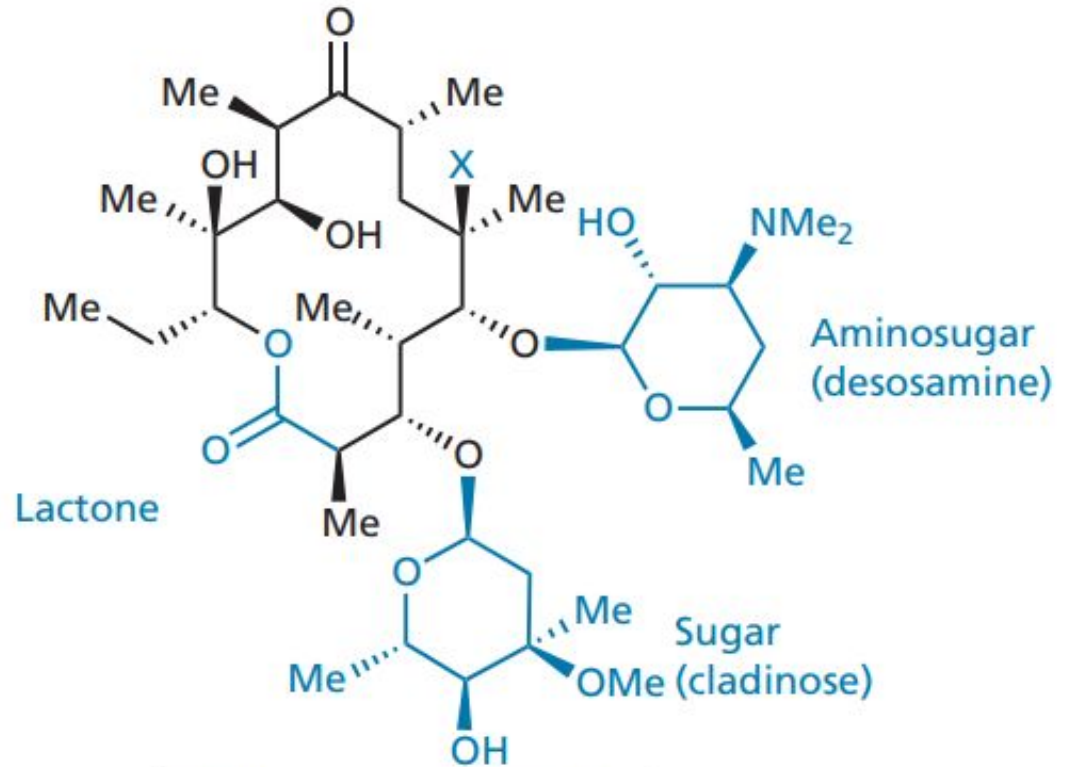
Chloramphenicol

- Выделен из *Streptomyces venezuela* (в окрестностях Каракаса).
- Проникает в клетку, связывается с 50S субъединицей рибосомы и ингибирует движение вдоль мРНК.
- Весьма токсичен для человека.

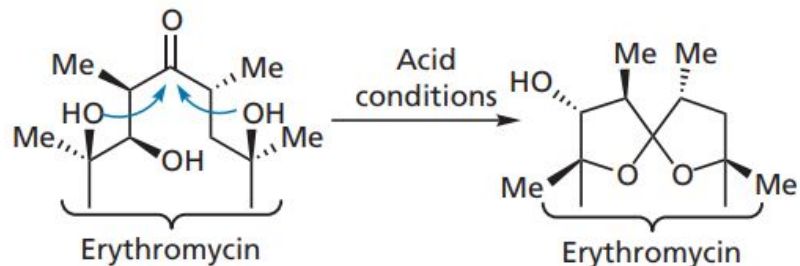


Макролиды

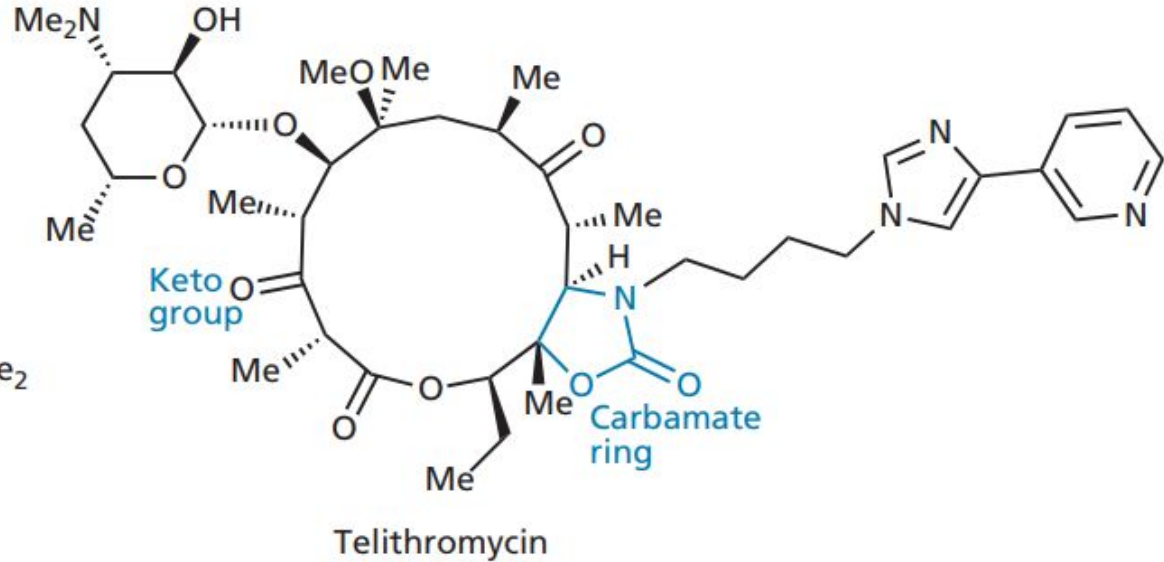
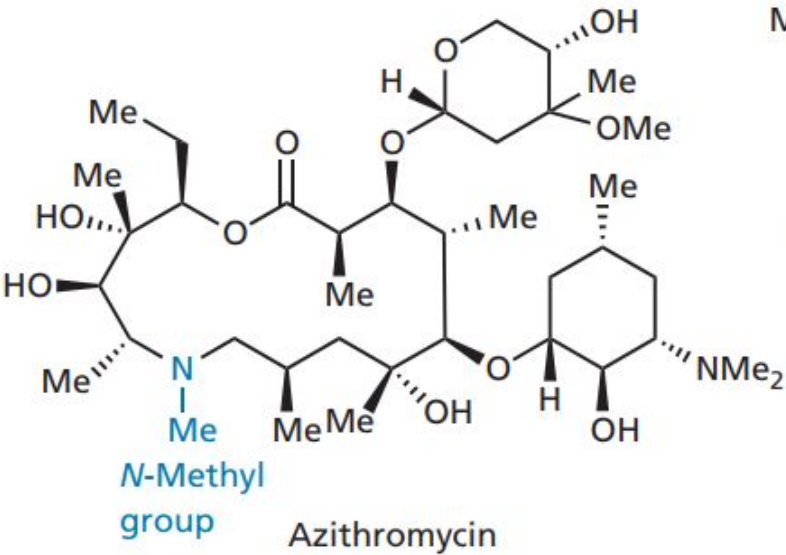
- Впервые выделены из *Streptomyces erythreus* (Филиппины).
- Связываются с 50S субъединицей рибосом, ингибируя транслокацию вдоль мРНК.
- Связывается с тем же сайтом, что и хлорамфеникол, поэтому не применяются совместно.
- Нестабилен в кислых условиях желудка, поэтому принимается орально в таблетках с оболочкой, позволяющих довести препарат до тонкого кишечника.



Erythromycin; X = OH
Clarithromycin; X = OMe

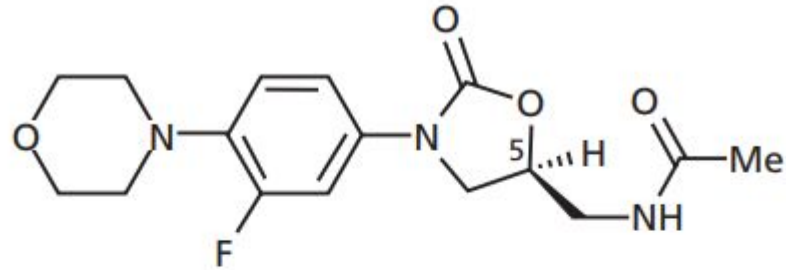


Макролиды

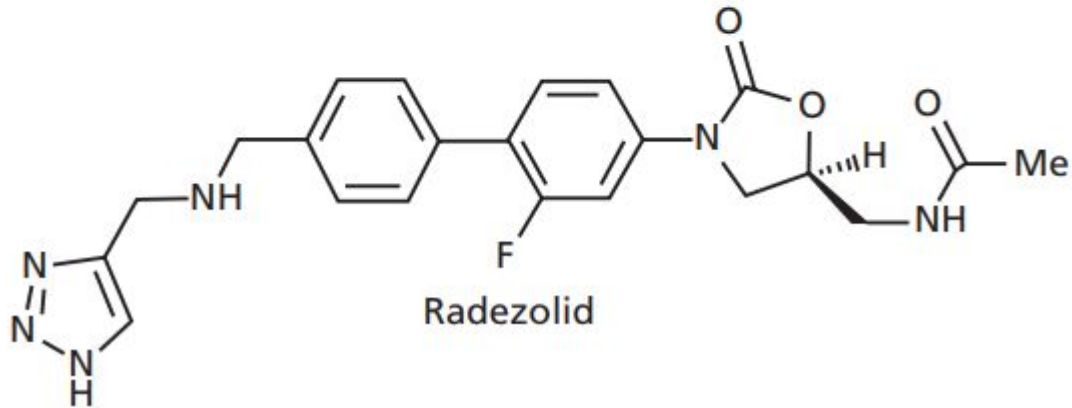


- Расширенные по сравнению с эритромицином пептидные циклы.
- Повышенная химическая устойчивость и эффективность.
- Азитромицин – один из бестселлеров мирового фармрынка.

Оксазолидиноны



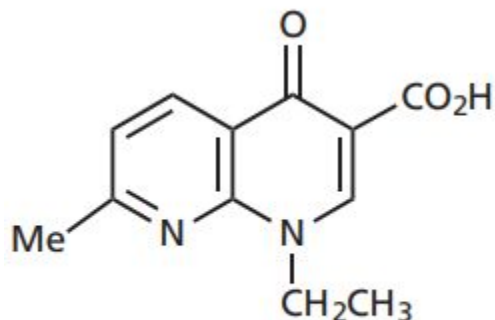
Linezolid



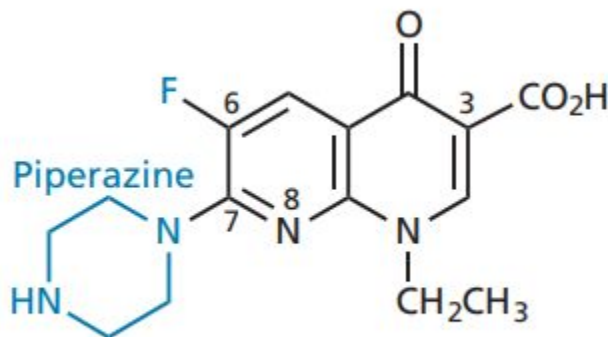
Radezolid

- Связываются с 50S рибосомой и блокируют возможность ее комбинации с 30S рибосомой. Т.е. трансляция даже не имеет возможности начаться.
- Линезолид – первый представитель этого класса, выведенный на рынок в 2000 г. Радезолид – второе поколение, отличающееся гораздо более высокой активностью (в 10 тыс. раз выше).

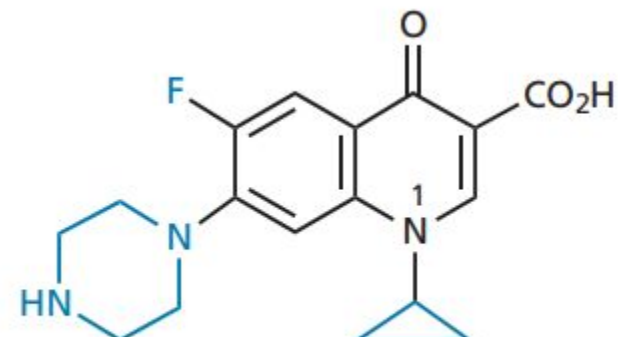
Хинолоны, фторхинолоны



Nalidixic acid



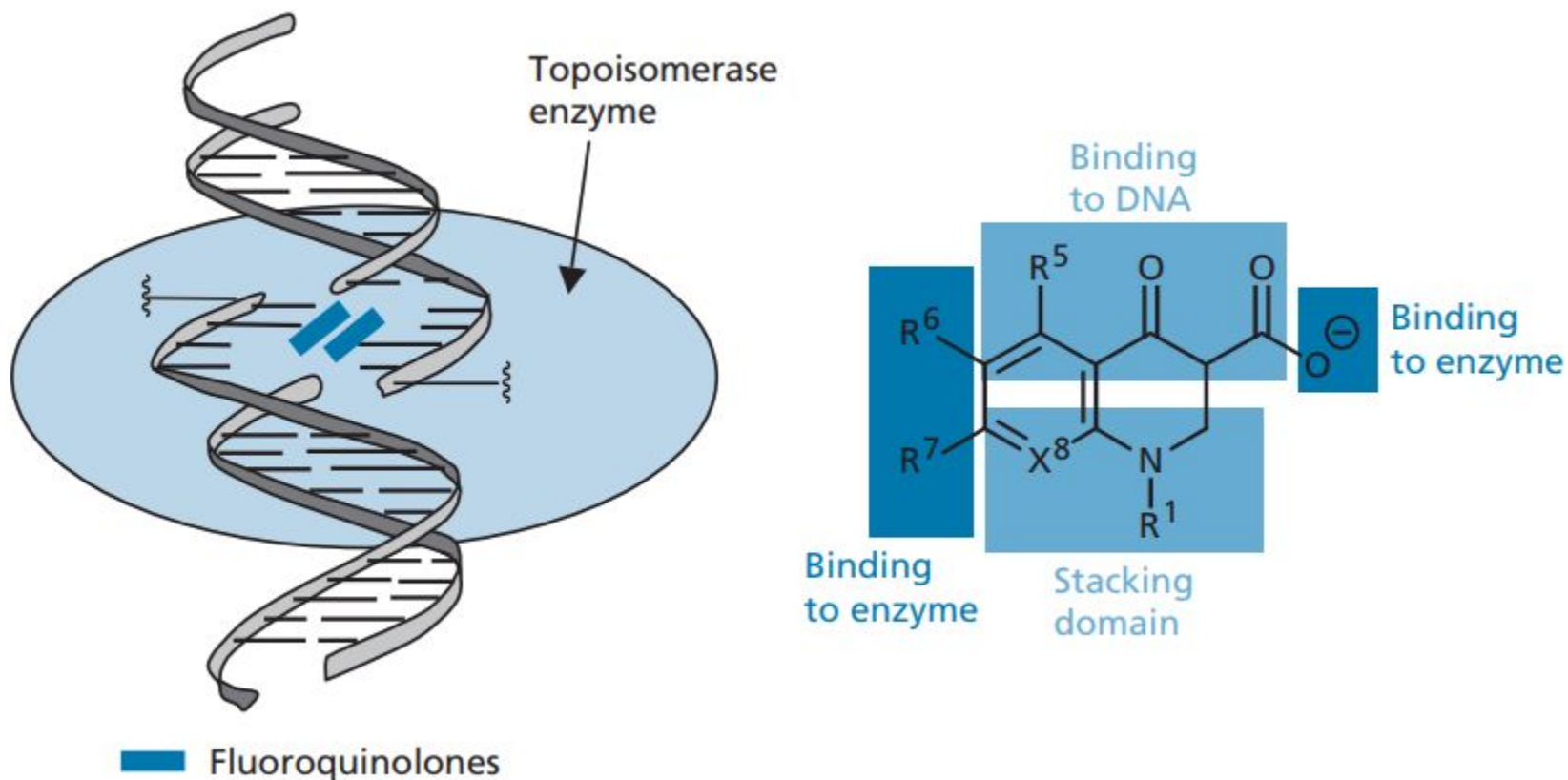
Enoxacin



Ciprofloxacin

- Налидиксовая кислота – первый представитель этого класса, впервые полученный в 1962 г. Коммерческого успеха представители этого ряда не принесли.
- Успех пришел в 1980-х годах с получение Еноксацина, представителя фторхинолонов. Атом фтора в положении 6 резко усилил активность и транспортные способности. Основной пиперазиновый цикл также усилил активность и мембранопроницаемость.
- Ципрофлоксацин – один из самых активных известных препаратов против Г(-) бактерий.

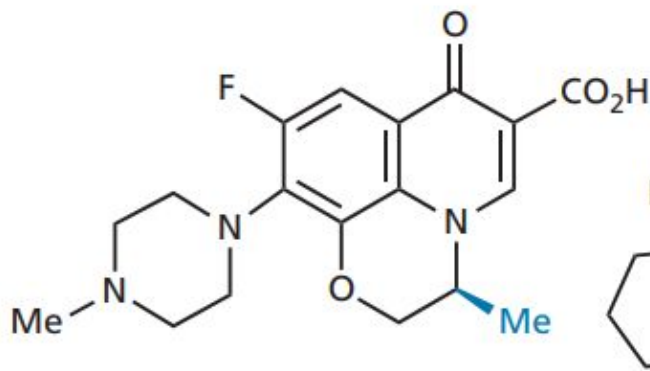
Механизм действия фторхинолонов



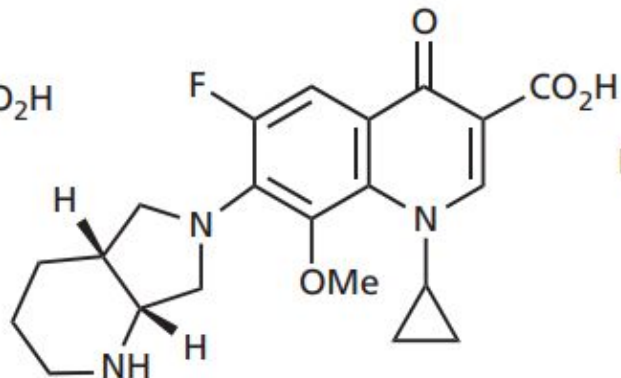
Фторхинолоны ингибируют репликацию и транскрипцию бактериальной ДНК путем стабилизации комплекса между ДНК и бактериальными топоизомеразами. Ингибирование происходит из-за образования комплекса, включающего две молекулы лекарства, фермент и связанную ДНК. Фторхинолоны связываются в тот самый момент, когда фермент разрезает ДНК, образуя стабильный и нефункциональный комплекс.

Фторхинолоны

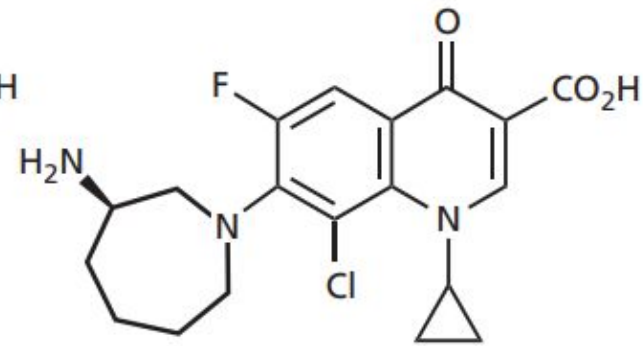
третье и четвертое поколения



Levofloxacin
(Ofloxacin is the racemate)



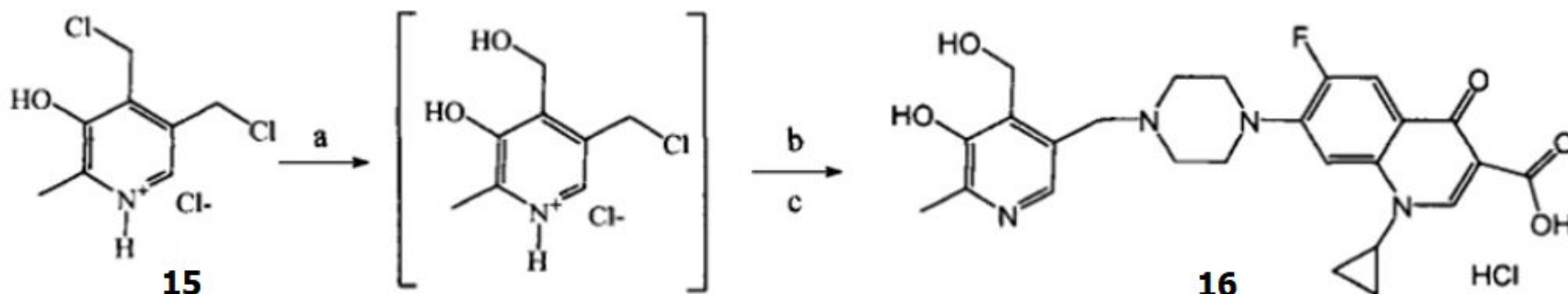
Moxifloxacin



Besifloxacin

Одни из самых активных на сегодняшний день антибиотиков, эффективные даже против резистентных штаммов Г(+) и Г(-) бактерий. Моксифлоксацин называют препаратом последней надежды.

Фторхинолоны следующего поколения

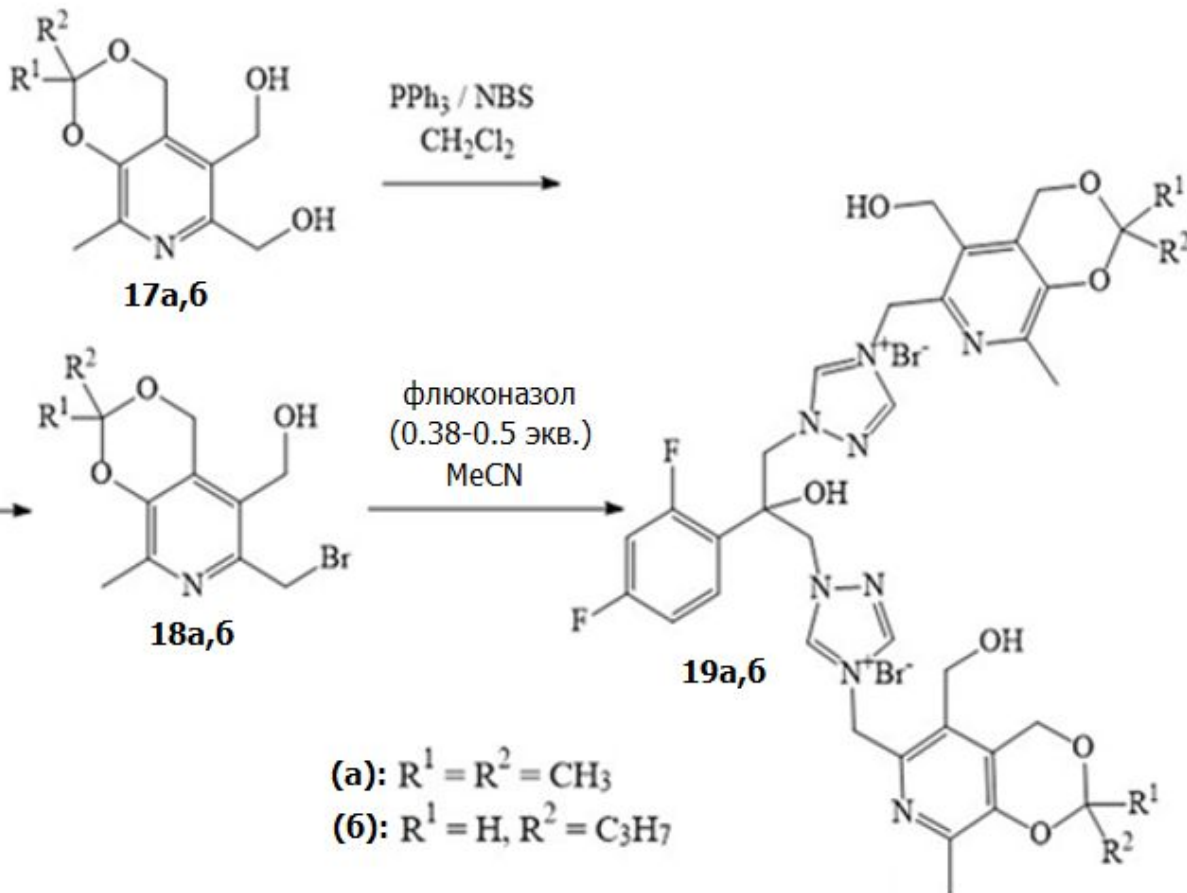


(a) H_2O , 55°C , 3 ч; (b) H_2O , ДМФА, ципрофлоксацин гидрохлорид, KI, NaHCO_3 , 55°C , 6 ч; (c) H_2O , HCl.

- В НОЦ фармацевтики КФУ разработан модифицированный препарат, который может быть отнесен к пятому поколению.
- *Особенности*: повышенная активность против резистентных штаммов Г(+) и Г(-) бактерий, подавляет способность патогенов вырабатывать резистентность.
- Пиридоксиновый фрагмент играет вспомогательную роль, связанную с преодолением резистентности, а также потенциально с улучшением транспортных свойств полученных гибридных конструкций.

Гибридные молекулы

Гарипов и др. НОЦ фармацевтики КФУ.



- Мощные эффекты как на грибковые, так и на бактериальные патогены, в том числе в виде устойчивых к фармакологическому действию пленочных форм.
- По широте и эффективности действия в отношении исследованных штаммов микроорганизмов существенно превосходят препараты сравнения – как противогрибковые (флюконазол, тербинафин), так и антисептические (мирамистин, бензалкония хлорид).



Благодарю за внимание!