

## **ПЕРСПЕКТИВЫ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

УДК 612.017.2, 577.1

©Ли, Ведерас

### **СОЗДАНИЕ ЛЕКАРСТВ И ПРИРОДНЫЕ ПРОДУКТЫ: КОНЕЦ ЭРЫ ИЛИ НЕДОСТИЖИМЫЕ РУБЕЖИ?**

*Дж.В.-Х. Ли, Дж.С. Ведерас\**

Отдел химии, Университет Альберта, Эдмонтон, Канада  
(Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta T6G 2G2, Canada,  
эл. почта: john.vederas@ualberta.ca

(опубликовано в Science, 2009, 325 (5937), 161-165: Jesse W.-H. Li, J.C. Vederas.  
Drug discovery and natural products: end of era or an endless frontier?  
Перевод печатается с разрешения авторов и журнала Science)

Исторически большинство новых лекарств разрабатывалось из природных продуктов (или их вторичных метаболитов) и из полученных из них соединений. В течение последних 15 лет исследования фармацевтической индустрии в области природных веществ заметно снизились, и одной из причин этого можно считать особое внимание к высоко производительному скринингу библиотек синтетических соединений. В настоящее время отмечается существенное снижение количества новых одобренных соответствующими инстанциями лекарств, а также потеря патентной защиты у ряда важных препаратов. Однако не иссякающие биологические источники, методы быстрого скрининга, процедуры роботизированного выделения со структурным анализом, метаболическое конструирование и синтетическая биология открывают перспективные технологические возможности для создания лекарств на основе новых природных соединений. Достижения в быстром генетическом секвенировании, в сочетании с комбинированным использованием биосинтетических путей, могут обеспечить обширный ресурс для создания новых фармакологических агентов в будущем.

**Ключевые слова:** новые лекарства, природные соединения, библиотеки синтетических соединений, скрининг биологической активности, генетическое секвенирование, синтетическая биология.

Около 200 лет назад 21-летний фармацевт Фридрих Сертюмер выделил первое биологически активное соединение из растения: морфин из опиума, вырабатываемого семенами мака, *Papaver somniferum* [1]. С этого момента началась эра получения из растений лекарств, которые после выделения и изучения свойств вводили в определённых дозах, не зависящих от источника или возраста материала. После Второй Мировой Войны, в связи с открытием пенициллина, фармацевтические исследования расширились, включив массивный скрининг микроорганизмов для поиска новых антибиотиков. К 1990 г. около 80% лекарств были или природными веществами, или их аналогами. Антибиотики (например, пенициллин, тетрациклин, эритромицин), антипаразитарные лекарства (авермектин), антималярийные (хинин, артемизинин), контролирующие уровень липидов агенты (ловастин и его аналоги), иммуно-супрессанты для трансплантации органов (например, циклоспорин, рапамицины), противораковые

\* - адресат для переписки

## СОЗДАНИЕ ЛЕКАРСТВ И ПРИРОДНЫЕ ПРОДУКТЫ

вещества (например, таксол, доксорубин) революционизировали медицину. Продолжительность жизни выросла от 40 лет в начале XX века до более 77 лет на сегодняшний день. Хотя экспансия синтетической медицинской химии привела к 1990 г к падению доли новых лекарств, полученных на основе природных веществ, до 50% (рис. 1), в 2005-2007 г.г. в США было одобрено 13 лекарств на основе природных соединений, при этом 5 из них относились к новым классам веществ [2].

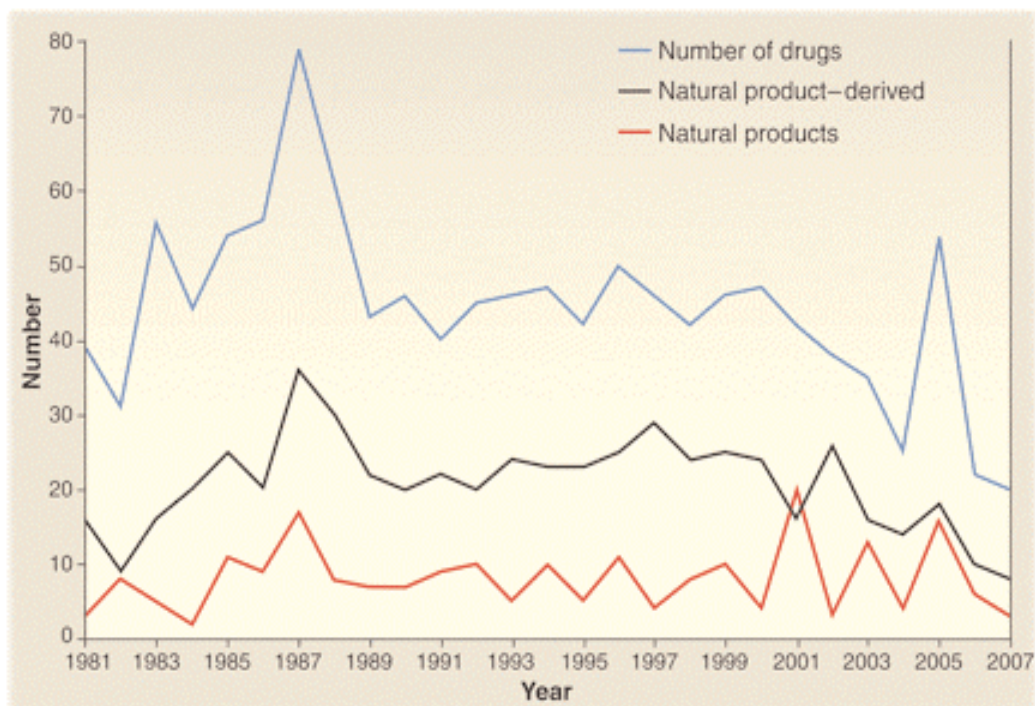


Рисунок 1.

Количество новых лекарств, одобренных в США в период с 1981 по 2007 г.г.

При таком успешном развитии, можно было ожидать, что идентификация новых метаболитов из живых организмов послужит основой для новых фармацевтических разработок. Однако в последнее десятилетие многие фармацевтические фирмы прекратили исследования в области природных веществ. Хотя в 2008 г. клинические испытания проходили более 100 лекарств на основе природных веществ, это на 30% ниже по сравнению с 2002 годом. Означает ли это конец эры открытия новых лекарств из природных источников?

### Каковы задачи в создании лекарств из природных веществ?

Основные трудности современного этапа могут быть разделены на две категории: преобладание крупных фармацевтических компаний в создании лекарств и технические ограничения в идентификации новых соединений с желаемой активностью.

**Фармацевтические компании.** Годовой двузначный рост продаж, удовлетворявший лекарственные компании в течение почти 10 лет, привёл к нереально завышенным ожиданиям акционеров и большому соблазну производить “блок-бастерные лекарства”, которые бы обеспечивали ежегодный объём продаж, превышающий миллиард долларов США. [3]. В “блок-бастерной” модели всего несколько лекарств могут обеспечить основную прибыль. Например,

в 2007 г. всего 8 лекарств составили 58% от годового мирового объёма продаж фирмы Pfizer (в 44 миллиарда долларов США). Когда такие лекарства теряют патентную защиту, уровень их продаж может упасть на 80%. Отмечается, что в течение 4 лет около 25% лекарств современного лекарственного рынка США потеряют патентную защиту [4]. В 2014 г. это уменьшит ежегодный доход фармацевтических компаний более чем на 63 миллиарда долларов. Кроме того, около 67% от всех выписываемых лекарств в США составляют конкуренцию с производителями генериков, не участвовавших в разработке лекарств, что поддерживается агентствами здравоохранения с целью снижения их стоимости.

Финансовый обзор фирм, занимающихся созданием лекарств, затруднён законодательными и юридическими правилами, стоимостью конкурирующего маркетинга и растущими требованиями безопасности лекарств как со стороны общественных, так и административных агентств, таких как FDA (в США). Количество одобренных FDA новых лекарств в 2007 г. опустилось до уровня 24-летней давности, а лекарства, одобренные в Европе, этим агентством были отклонены. Примером затрат, связанных с законодательством, могут служить затраты компании Merck после удаления с рынка противовоспалительного лекарства Vioxx из-за возможного возрастания риска острых состояний при сердечнососудистых заболеваниях или инсульта: в 2007 году Merck должен был оплатить 970 млн долларов за законодательные расходы и 4,85 миллиарда долларов по американским юридическим искам [5]. Один из способов приспособления к возрастающим ценам и истощению потока новых лекарств – это покупка других компаний, обладающих такими ресурсами. Примеры этого – покупка Wyeth компанией Pfizer за 68 миллиардов долларов и приобретение фирмой Merck компании Shering-Plough за 41 миллиард долларов [6]. Такие большие суммы повлияли на путь создания лекарств: фирмы, включённые в создание лекарств, должны продвигать новое лекарство не только тщательно, но и очень быстро и очень выгодно. Однако, по причинам, рассмотренным ниже, проблемы с источниками природных веществ в настоящее время не очень благоприятствуют их быстрому высокопроизводительному скринингу (HTS, *High-Throughput Screening*\*) на предмет выявления желаемой лекарственной активности [7]. В противоположность библиотекам синтетических веществ, наиболее перспективные вещества из природных источников имеют как правило сложные структуры, с многочисленными кислород-содержащими заместителями и множеством центров стереохимии [8]. Это замедляет процесс идентификации и усложняет их поставку и производство.

**Трудности в открытии и разработке лекарств-кандидатов из природных продуктов.** Исторически, скрининг природных веществ на биологическую активность хорошо разработан. Например, только в ряду метаболитов поликетидов\*\* более 7000 известных структур привели к созданию более чем

Примечания переводчика.

\* *High-Throughput Screening (HTS, высокопроизводительный скрининг)* – скрининг веществ с использованием современных приборов и чувствительных детекторов, позволяющий быстро проводить множество биохимических, генетических или фармакологических тестов. Этот процесс позволяет быстро идентифицировать активные соединения, антитела или гены, воздействующие на биомолекулярные пути. Результаты могут служить исходной точкой для дизайна лекарств, с учётом их роли в конкретном биохимическом процессе (PubMed, MeSH Database).

\*\* *Поликетиды* — вторичные метаболиты, образующиеся в клетках бактерий, грибов, животных и растений. Могут содержать несколько десятков углеродных атомов; образуются путем удлинения цепей и оксигенирования, с формированием тетрагидрофурановых и лактоновых колец, иногда с гликозилированием. Обладают различными биологическими активностями. К ним относятся макролиды, включая антибиотики, токсины (PubMed, MeSH Database).

## СОЗДАНИЕ ЛЕКАРСТВ И ПРИРОДНЫЕ ПРОДУКТЫ

20 коммерческих лекарств с величиной показателя *hit rate*\* 0,3%, что много лучше, чем значения того же показателя для лекарств из HTS библиотек синтетических соединений (<0,001%) [9]. Хотя сейчас на полезную информацию из библиотек нефокусированной комбинаторной химии возлагается мало надежды, фармацевтические усилия предпочтительно направлены на HTS массивных библиотек чистых синтетических соединений. Выход оказывается крайне низким, но любые распространённые лекарства обычно легко сделать и модифицировать простой химией. Библиотеки чистых соединений представленных в известных количествах, также дают возможность за короткое время проверить большое количество молекул. Такие библиотеки предоставляют ограниченные возможности, поэтому стремление производить более сложные молекулы с большей вероятностью выявления желаемой биоактивности повышает интерес к “разнообразно-ориентированному синтезу” (“*diversity oriented synthesis*”) и библиотекам “преимуществовых структур” (“*privileged structures*”), (часто основанным на известных лекарствах или природных соединениях) [10].

HTS природных источников также сопряжён с рядом трудностей. Проблемы реального доступа и поставки, особенно в отношении высших растений и морских организмов, сопряжены с интеллектуальной собственностью в отношении местных правительств и с Конвенцией по биологическому разнообразию (*Rio Convention on Biodiversity*) [11]. На первоначальную детекцию и выявление активных соединений могут влиять вариации в составе живых организмов, связанные с сезонными изменениями или изменениями в окружающей среде, а также последующие повторения процедур определения или выделения веществ. Возможна также потеря природного источника. Вычислено, что скорость исчезновения природных веществ из высших растений в 100-1000 раз выше, чем их природной основы (т.е. растений, из которых производится выделение) [12]. При этом из 50000-70000 медицинских растений 15000 считают находящимися под угрозой вымирания [12]. Даже в случае лёгкой и гарантированной поставки исходный экстракт природного материала обычно представляет собой сложную смесь. Он может содержать лишь очень малые количества биоактивного вещества, часто в смеси со структурно родственными молекулами. Исходная концентрация интересующего соединения может быть слишком низкой для детекции в ходе HTS. Определение может быть затруднено плохой растворимостью, флуоресцентными или окрашенными примесями. Ключевое соединение может быть неустойчиво в смеси. Другой сложностью может быть синергизм (или антагонизм) активностей двух компонентов, который может затем снизиться или исчезнуть при разделении. Например, для проявления полной активности ряд бактериоцинов (антимикробных пептидов из бактерий) должен функционировать в виде двух-компонентных систем [13]. Наконец, чтобы определить, не является ли эта молекула уже известной, требуется длительное время для завершения структурной характеристики соединения.

Во многих фармацевтических организациях превалирует настроение, что скрининг источников природных активных веществ представляет собой большой труд с высокой вероятностью дубликации, т.е. результатом может оказаться известное соединение, которое не может быть запатентовано. При этом легко культивируются менее 1% микроорганизмов, и, возможно, менее 15% высших растений проверены на биоактивность [14]. Ряд насекомых и других видов животных были объектами для поиска специфических биоактивностей, таких как токсины [15], но они как правило не подвергались HTS. Ясно, что в них ещё есть биологический ресурс, но возможности его проверки проблематичны, особенно в условиях относительно кратковременного создания новых ведущих продуктов.

---

### Примечания переводчика.

\* *Hit rate* - принятый в бизнесе показатель продаж, выражающий процент клиентов, совершивших покупку данного товара, от общего числа покупателей (<http://forum.perfect-trade.com/viewtopic.php?t=279&start=10>).

**Что необходимо сделать, чтобы повысить и ускорить открытие и создание лекарств из природных источников ?**

В исследовании природных ресурсов рассматривают несколько взаимосвязанных фаз: доступ к биологическому ресурсу, соответствующий скрининг этого ресурса в плане выявления нужной активности, анализ структуры ключевых соединений, генерация аналогов для получения оптимальной активности и производство нужного лекарства.

**Биологические ресурсы.** Традиционно, главным источником открытия и разработки лекарств были почвенные бактерии (особенно актиномицеты), грибы и высшие растения. После 1990 года, из-за снижения скоростей продвижения лекарств на рынке, фармацевтические фирмы очень активно расширяли скрининг микроорганизмов. Общеизвестные антибиотики, такие как стрептомицин, обнаруживались ~ в 1% почвенных актиномицетов и при испытаниях проявляли активность. Эта активность маскирует интересующие новые антимикробные агенты, которые могут быть обнаружены с частотой менее 1 на 10 миллионов ферментаций. Решение, принятое фирмой Cubist Pharmaceutical, заключается в массивном увеличении числа ферментаций (до миллионов в год) при миниатюризации размера, с использованием в качестве контейнеров подложек из альгината кальция [16]. Такой подход сопряжён с определением активности путём использования геноинженерных штаммов *Escherichia coli*, устойчивых к хорошо известным антибиотикам. Однако, несмотря на острую необходимость найти новые антибиотики, эффективные против опасных для жизни микроорганизмов, устойчивых к современной терапии, многие фармацевтические фирмы не развивают такие лекарства. Продажи и “блок-бастерный потенциал” ограничиваются короткими курсами лечения антибиотиками по сравнению с лечением другими лекарствами, такими как холестерин-понижающими или гипотензивными, которые принимаются ежедневно в течение длительных периодов и скорее облегчают симптомы, чем обеспечивают лечение. Тем не менее, порядок разработки цен, стандартов для безопасности и требования к ограничению побочных эффектов – одни и те же, как для антибиотиков, так и для лекарств длительного действия.

Растения остаются главными источниками новых лекарств, 91 из которых в 2007 году находились в стадии клинических испытаний. Наряду с этим в последнее десятилетие активно исследовались цианобактерии [17] и морские организмы [18], особенно в плане поиска нейротоксических и цитотоксических соединений. В 2004 г. был одобрен **циконотид** (Prialt) – пептидный токсин из улитки (рис. 2А) - для лечения хронических болей, вызванных повреждением спинного мозга. Из тропической морской асцидии (*see squirt*) было выделено цитотоксическое вещество трабектедин (Yondelis) (рис. 2В), которое с 2007 г. одобрено в Европе для лечения распространённой саркомы мягких тканей [19]. Полезные организмы могут существовать в экстремальной внешней среде, например, на большой морской глубине [20], в термальных источниках или в солевых озёрах. Примером может быть идентификация галодурацина (haloduracin) - двухкомпонентного лантибиотика (пептидный антибиотик, содержащий лантионин\*) из *Bacillus halodurans*, растущего при экстремальном pH > 9,0 [21]. Хорошо известный лантибиотик – **низин А**, который используется для консервирования пищи и является очень активным против грамм-положительных бактерий, устойчивых к обычным антибиотикам. Однако терапевтический потенциал низина А блокируется его нестабильностью при нейтральном pH или выше. Van der Donk с соавт. пришли к выводу, что щелочеустойчивые антибиотики могут продуцироваться бактериями, растущими в щелочной среде [21]. Используя биоинформатику, они нашли галодурацин, который может переносить интервалы pH, значительно большие, чем сыворотка крови человека. Хотя его растворимость ограничена, это вещество может стать основой для развития новых лекарственных антибиотиков с лекарственным потенциалом.

Примечание переводчика

\* лантионин – редко встречающаяся в природе аминокислота.

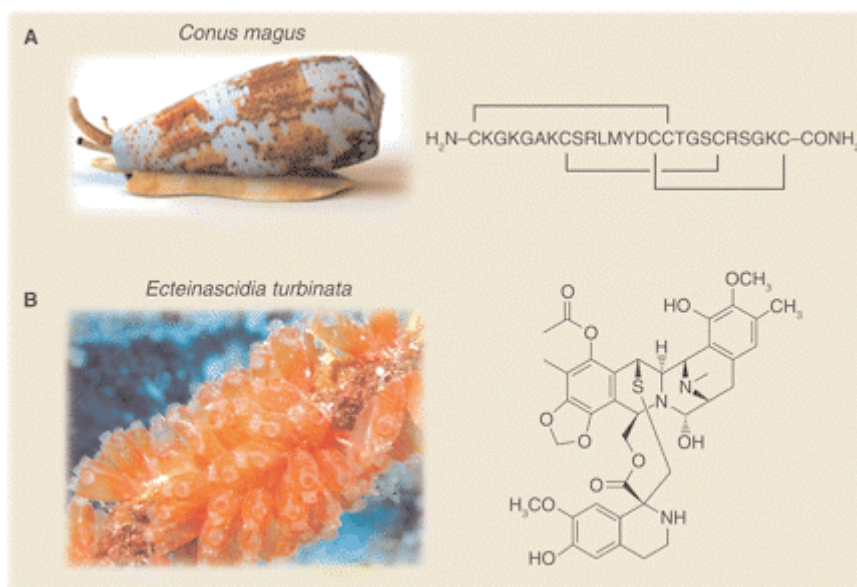


Рисунок 2.

Морские источники лекарств.

А - циконотид (Prialt) из *Conus magus*. В - трабектедин (Yondelis) из *Ecteinascidia turbinata*.

Может создаться впечатление, что для поиска природных источников лекарственных кандидатов осталось мало неисследованных областей, но в действительности ещё не исследовано огромное количество видов. Отмечается, что более 99% всех бактерий не подлежат культивированию, и в морской среде может быть  $3,7 \times 10^{30}$  микроорганизмов, способных продуцировать ценные природные вещества, которые могут быть лекарствами-кандидатами [22]. Это подтверждается выдвинутой в 1998 г. концепцией **метагеномики** - для анализа генов и их функций в образцах, полученных непосредственно из окружающей среды [23]. Эта область начинает активно развиваться, поскольку становится доступным более быстрое и дешёвое геномное секвенирование [24], в сочетании с возможностью быстрой сортировки клеток из среды и эффективного клонирования генов с улучшенными векторами [25]. Вместе с методами автоматического скрининга, метагеномный подход может дать доступ к 99% неисследованных микроорганизмов. Однако, в настоящее время большинство фармацевтических фирм не предпринимают усилий в этом направлении открытия и создания лекарств.

**Соответствующий скрининг (Appropriate screening).** Очевидно, что природные вещества представляют собой “привилегированные” структуры для создания лекарств. Это предположение подтверждается тем фактом, что известно лишь ограниченное число вариантов белкового фолдинга, и что природные вещества должны связываться с некоторыми из ориентированных такими способами белков для обеспечения биосинтеза и выполнения присущих им функций в продуцирующих организмах. Следовательно, многие из этих веществ могут быть структурно предпочтительны для связывания с ферментами или белковыми рецепторами. Однако, как отмечено выше, сложность состава исходных природных экстрактов затрудняет их HTS. Идеальным подходом к преодолению этого препятствия было бы автоматическое разделение всех компонентов организма до индивидуальных соединений, сопряженное с полной спектроскопической идентификацией перед проведением HTS. Хотя это ещё пока не достижимо, Ireland с соавт. [26] недавно автоматизировали фракционирование грубых экстрактов природных материалов из морских источников, используя обессоливание с последующей ВЭЖХ на высоко эффективных монолитных (*monolithic*) колонках. Эта установка была в свою очередь сопряжена с масс-спектрометрическим анализом и сбором фракций на HTS-планшетах. Процесс даёт высоко очищенные образцы в 96-луночных планшетах, которые

генерируются как репликаты для начального скрининга и для архива материалов. Показано, что обычно наблюдается только 3 соединения на лунку [26]. Тестирование 15360 веществ из библиотеки такого типа на линии клеток хомячка дало возможность идентификации новых соединений с антиопухолевым потенциалом, селективных для рака молочной железы, несмотря то, что в одном и том же экстракте одновременно присутствовали сходные цитотоксины.

Эффективность HTS может быть существенно повышена использованием лучшей мишени позволяющей достичь “смарт-скрининга” (“*smart screening*”). Один подход, упоминавшийся выше, заключается в использовании организмов, резистентных к общеизвестным антибиотикам, что делала фирма Cubist. Для идентификации антибиотиков широкого спектра действия фирмой Merck была предложена инновационная альтернатива (рис. 3) [27]. Она предусматривает использование 2-х пластин, на одну из которых нанесены клетки *Staphylococcus aureus*, несущие плазмиды, продуцирующие антисенс-РНК для торможения синтазы жирных кислот (например, FabF), а другая – контрольная пластинка с *S. aureus*, не способной продуцировать антисенс-РНК. Антисенс-РНК вызывает деградацию мРНК с 5'-конца, тем самым повышая чувствительность организма к ингибиторам конкретного белкового катализатора. Такой подход даёт возможность более чувствительной детекции активности и также позволяет идентифицировать индивидуальные мишени в сложных системах через параллельный скрининг с различными антисенс-РНК. Степень “попадания” при таком скрининге более чем 250000 экстрактов природных продуктов была довольно высокой (0,3%). Однако важнее то, что с его помощью была идентифицирована новая мишень, бактериальный синтез жирных кислот, а также новые антибиотики, платенсимицин А и платенцин.

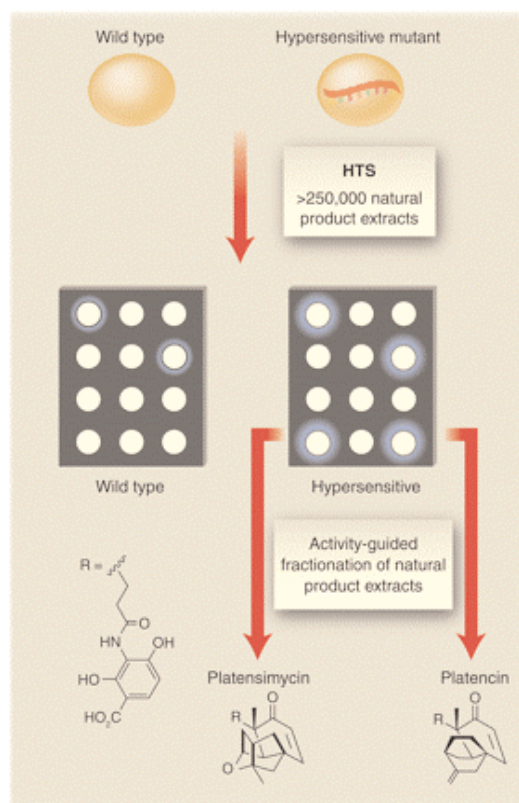


Рисунок 3.

Схема высокопроизводительного скрининга (HTS), использующего двухпланшетную диффузию клеток в агаре (система определения платенсимицина фирмы Merck). Использовался штамм, экспрессирующий антисенс-РНК к FabH или FabF ферментам биосинтеза жирных кислот и обладающий повышенной чувствительностью к ингибиторам этих белков. С помощью такого подхода было идентифицировано два новых антибиотика - платенсимицин и платенцин.

С использованием клеток исследуется всё большее число мишеней. Интересный пример этого - единично-клеточный скрининг (*single-cell screening*) сигнальных путей ингибиторов фосфорилирования (киназы) с использованием проточной цитометрии [28]. Эта фосфоспецифичная проточная цитометрия (фосфопроточная, *phosphoflow*) позволяет проводить множественные количественные измерения уровней фосфорилирования различных сигнальных белков путём измерения специфических флуоресцентно меченых антител, которые узнают свои мишени после присоединения к ним фосфата. На единичных клетках может быть быстро и количественно измерено влияние библиотек природных продуктов. Такое основанное на клетках определение было недавно использовано для поиска аналогов рипамицина, не проявляющих свойственную этому лекарству иммуносупрессивную активность, но защищающих нервные клетки в моделях инфаркта [29].

**Анализ структуры активных соединений.** Установлению структуры на малых количествах материала в большой степени способствуют масс-спектрометрия и мультимерная ЯМР-спектроскопия. В задачи настоящего обзора не входит обсуждение деталей этих методов. Однако автоматическое сопряжение с МС для разделения с помощью ВЭЖХ и создание библиотек HTS заметно ускорило идентификацию известных соединений, в том числе возможных “попаданий”. Использование криопроб (*cryoprobes*) для ЯМР сильно повысило чувствительность и заметно снизило количество материала, требуемого для анализа; для низкомолекулярных соединений (м. в. 200) получение информативного протонного спектра (*useful proton spectra*) требует 2 мкг материала, а углерод-корреляционный спектр (*carbon correlation spectra*) может быть получен на 0,2 мг [30]. Сравнение положения сигналов ЯМР с соответствующей базой данных по известным соединениям даёт возможность идентификации. Усилия также направлены на то, чтобы автоматически отбирать вещества после ВЭЖХ путём твёрдо-фазной (*solid-phase*) экстракции и затем элюировать непосредственно в ЯМР-криопробу для анализа.

**Генерация аналогов.** Традиционно, соотношения между структурой и активностью природных соединений изучались путём простых химических трансформаций. Например, метилирование боковой цепи холестерина-понижающего агента ловастатина даёт симвастатин (Зокор) – улучшенное лекарство, продажа которого в 2006 году (до потери патентной защиты) составила 4,3 миллиарда долларов. Развитие понимания биогенеза вторичных метаболитов позволяет использовать для генерации лекарственных производных биосинтетические ферменты или генетически изменённые микроорганизмы. Tang с соавт (2008) использовали эстеразу, атакующую боковую цепь ловастатина (LovD), для получения ряда аналогов, включая симвастатин [31]. Эстераза обычно использует 2-метилбутират, присоединённый к большому белку в виде тиоэфира в качестве ацилирующего агента для получения соответствующего спирта. Однако, он мог бы быть замещён рядом простых тиоэфиров, с эффективным превращением во многие аналоги.

Многообещающими считают комбинаторные биосинтезы, особенно с использованием поликетид-синтаз (PKS) и нерибосомальных пептид-синтаз (NRPS). PKS и NRPS представляют собой большие мультидоменные ферменты, которые последовательно конденсируют, соответственно, короткие жирные кислоты и  $\alpha$ -аминокислоты [32]. Эти реакции напоминают пути образования метаболитов через удлинение цепи или трансформацию функциональных групп и могут быть изменены, позволяя получать новые соединения. Однако, результаты мутаций часто непредсказуемы, и степень образования нужных продуктов может быть очень низкой. Растущее понимание значения линкеров между индивидуальными доменами этих белков, а также белок-белковых взаимодействий между доменами поможет решить эту проблему. Один подход в преодолении трудностей, возникающих из-за введения модифицированных доменов,



это направленная эволюция увеличения производства химер. Так, для существенного улучшения продукции изолейцин-содержащего аналога андримида (рис. 4), обладающего свойствами антибиотиков, было достаточно только 3-х циклов мутагенеза и скрининга средних библиотек (от  $10^3$  до  $10^4$  клонов) доменов NRPS [33]. В другом примере, прямая мутация PKS-домена, соединённая с инактивацией гена, ответственного за окисление после сборки (т.н. “*post-assembly oxidation*”), приводила к образованию аналогов нистатина (рис. 4) с улучшенными противогрибковыми свойствами и меньшей токсичностью [34]. Инактивация post-PKS P450, который окисляет метильную группу в нистатине до карбоксильной (по C16), сопряжённая с мутацией еноил-редуктазной активности в NysC PKS модуле, приводила к образованию метильного производного с конъюгированной гептаеновой частью (в противоположность прерванному гексаену). Эти соединения оказались более эффективными против диссеминированного кандидоза в мышинной модели и значительно менее токсичными, чем амфотерицин В. Однако такая генерация новых аналогов с использованием комбинаторного биосинтеза может потребовать много времени и усилий, и в настоящее время она не отвечает требованиям HTS.

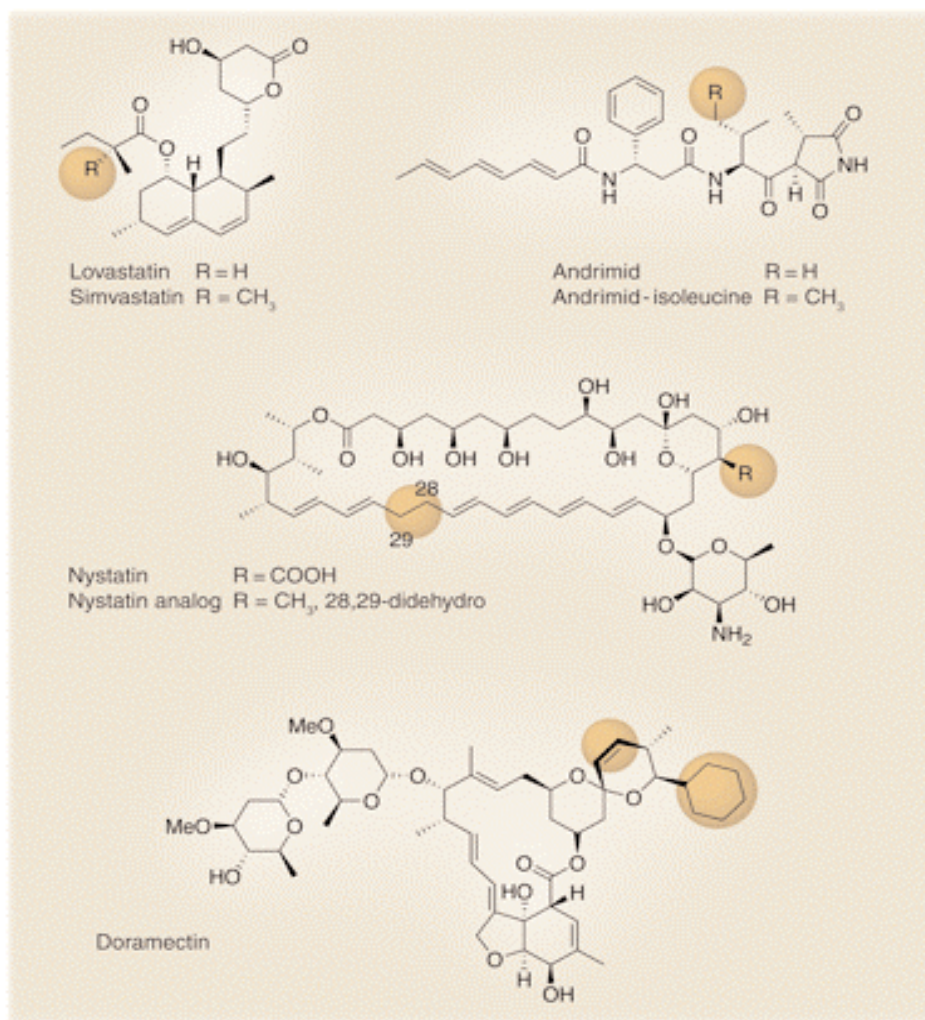


Рисунок 4.

Аналоги лекарств, продуцируемые путём модификации генов, включённых в биосинтез. Затемнённые области указывают участки с изменённой структурой; Me - метил.

**Продукция соединений-мишеней.** Традиционным подходом в оптимальной продукции лекарств микроорганизмами, являются “мутация и скрининг” - до достижения улучшения штамма, как это было сделано в 1940 г для пенициллина. Эта методология может действительно повысить продукцию лекарства на 2-3 порядка, а в некоторых случаях и на 5 порядков [35]. В настоящее время эту тактику трудно превзойти, и молекулярно-биологические манипуляции оказывались более успешными лишь в отдельных случаях. Интересный пример - улучшение продукции дорамектина (Dectomax) (рис. 4) - антипаразитарного средства из семейства авермектинов [36]. Первоначальным продуцирующим штаммом был мутант *Streptomyces avermitilis*, с недостаточностью дегидрогеназы и O-метилтрансферазы. Штамм мог питаться циклогексанкарбоновой кислотой как инициатором, дающим дорамектин и соединение, содержащее гидроксильную группу вместо двойной связи при при C-23. Модификация гена *aveC* и скрининг дали новый ген, который кодирует мутации 10 аминокислот и снижает нежелательные примеси, что дало общее улучшение продукции конечного продукта в 23 раза. Природные продукты, включая выделяемые из бактерий, можно безусловно получить или улучшить синтетически. Например, много усилий было затрачено в этом плане на синтетический аналог **эпотилона В**, многообещающего противоопухолевого лекарства [37].

Получение лекарств со сложными структурами, существующих в низких концентрациях в высших растениях, представляет особенно трудную задачу. Примером может служить таксол (паклитаксель), который встречается в коре дерева *Taxus brevifolia* [38]. Первоначально предсказывалось, что его применение в США для лечения рака яичников и меланомы потребует ежегодного уничтожения более 360000 деревьев. Однако затем был создан полусинтетический путь получения таксола из 10-деацетилбаккатина, выделяемого, в свою очередь, из иголок Европейского *T. baccata*, что предотвратило уничтожение деревьев.

В последнее десятилетие таксол коммерчески производится фирмой Bristol-Myers Squibb путём технологии ферментации растительных клеток (PCF, plant cell fermentation). Однако получение ряда других лекарств с помощью PCF сопряжено со значительными трудностями. [39]. Альтернативный подход заключается в гетерологичной (*heterologous*) экспрессии биосинтетического пути у дрожжей или бактерий, часто с генной модификацией для оптимизации продукции (синтетическая биология). Хорошо известный пример этого – разработка продуцирования антималярийного лекарства **артемизинина** в *E. coli* и в дрожжах [40]. Артемизинин из *Artemisia annua* – это сесквитерпеноид, эффективный против резистентного ко многим лекарствам вида *Plasmodium*, но очень дорогой для трети пациентов в мире. Группа Keasling [40] получила штамм *E. coli*, продуцирующий его предшественник, артемизиновую кислоту, в концентрации более 300 мг/л [40]. Это потребовало интенсивной работы, включая конструирование мевалонатного пути для продуцирования достаточных количеств предшественника изопреноидного синтеза, оптимизации экспрессии аморфадиев синтазы (ключевая циклаза терпенов) и включения модифицированной версии аморфадиев оксидазы (P450, превращающий аморфадиев в артемизиновую кислоту). Работа показывает, что многие сложные природные продукты из растений могут быть получены инженерным способом в гетерологичных организмах-хозяевах путём ферментативной наработки.

#### **Каковы дальнейшие перспективы лекарств на основе природных веществ?**

В связи с трудностями HTS в основных фармацевтических компаниях и с растущими правительственными ограничениями на одобрения лекарств, возможно, что число новых лекарств на основе природных веществ будет стремиться к нулю. Однако, это, вероятно, произойдёт не скоро, так как потенциал для новых разработок в течение длительного времени остаётся огромным. Доступ к быстрым и недорогим методам секвенирования геномов (т.н. *454 sequencing* [41], или *single molecule real-time, SMRT*) [42]) дадут возможность проведения

метагеномных разработок на культивируемых организмах. Будут выявлены новые, так называемые “молчащие” метаболические пути (“*silent pathways*”) в растениях [43], которые обеспечат доступ к новым продуктам и биокатализаторам. Это даст возможность сохранения находящихся под угрозой исчезновения видов, благодаря созданию каталогов их генетических отпечатков, и может позволить восстановить исчезающие организмы. Оценки общего числа живых организмов дают величины от 2 млн до 100 млн, причём 30 млн приходится только на насекомые. Следовательно, количество биосинтетических продуктов и ферментов, ожидающих быть исследованными, огромно. Системная биология может в конце концов картировать вероятный метаболизм для многих видов. Такая библиотека биохимической трансформации могла бы служить отличным инструментом для дизайна и генерации новых продуктов. Синтетики-биологи смогут привлекать широкие ферментные чипы для рационального создания сложных молекул, также как химики-синтетики в настоящее время планируют полные синтезы соединений-мишеней с использованием установленных реагентов и охарактеризованных трансформаций. Непосредственная эволюция и сайт-специфичная мутация позволят оптимизировать требуемую активность таких белков. Быстрое геномное секвенирование отдельного, конкретного пациента будет способствовать развитию персонализированной медицины, а использование индивидуальных последовательностей ДНК послужит основой для выбора лекарства [44]. Это будет способствовать удовлетворению современных ожиданий высокого уровня безопасности путем предсказания побочных эффектов и поможет правильному выбору лекарств. Новые методы картирования гена помогут проведению быстрых диагностических тестов, включая выявление инфекций. Это позволило бы уменьшить неизбирательное использование антибиотиков и, следовательно, снизить развитие бактериальной устойчивости к таким лекарствам.

Для достижения потенциала относительно несложного геномного секвенирования, необходимо создать надёжные платформы для гетерологичной экспрессии генов новых биосинтетических путей. Экспрессия биосинтетических ферментов часто требует значительных усилий. Проблема использования кодона и оптимизации синтеза генов, локализации и модификации белков, а также метаболической токсичности к продуцирующему организму - это лишь небольшая часть всех трудностей. Решения будут включать модификацию уже используемых организмов (например, *E. coli*, *Sacharomyces cerevisiae*). Например, повышение продукции первичного предшественника может быть сопряжено с программируемым контролем промоторов и модификациями, повышающими стабильность чужеродных белков. Потенциально могло бы быть сконструировано активное выведение токсичных метаболитов мишеней с использованием транспортёров лекарственной устойчивости. Вероятно, перед использованием в фармацевтической индустрии такие экспрессионные платформы будут первоначально демонстрироваться в академических лабораториях. Хотя современная индустриальная модель разработки лекарств не отдаёт предпочтения природным веществам, ресурсы последних настолько огромны, что кажутся неограниченными, и эти появляющиеся в перспективе “инструменты” обеспечат многообещающие открытия и разработки, ведущие к новой медицине.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Hamilton G.R., Baskett T.F.* (2000) *Can. J. Anaesth.*, **47**(4), 367-374.
2. *Harvey A.L.* (2008) *Drug Discov. Today*, **13**(19-20), 894-901.
3. *Malik N.N.* (2008) *Drug Discov. Today*, **13**(21-22), 909-912.
4. *Houlton S.* (2009) *Chem. World*, January, 12.
5. *Wolsing J.M.* (2008) *Defense Counsel J.*, July, 209.

## СОЗДАНИЕ ЛЕКАРСТВ И ПРИРОДНЫЕ ПРОДУКТЫ

6. *Jarvis L.M.* (2009) *Chem. Eng. News*, **87**, 5.
7. *Koehn F.E., Carter G.T.* (2005) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**(3), 206-220.
8. *Butler M.S.* (2004) *J. Nat. Prod.*, **67** (12), 2141-2153.
9. *Weissman K.J., Leadlay P.F.* (2005) *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**(12), 925-936.
10. *Newman D.J.* (2008) *J. Med. Chem.*, **51**(9), 2589-2599.
11. *Kirsop B.E.* (1996) *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 505-508.
12. *Brower V.* (2008) *J. Natl. Cancer Inst.*, **100**(12), 838-839.
13. *Garneau S., Martin N.I., Vederas J.C.* (2002) *Biochimie*, **84**(5-6), 577-592.
14. *Saklani A., Kutty S. K.*(2008) *Drug Discov. Today*, **13**(3-4), 161-171.
15. *Mouhat S., Andreotti N., Jouirou B., Sabatier J.M.* (2008) *Curr. Pharm. Des.*, **14**(24), 2503-2518.
16. *Baltz R.H.* (2008) *Curr. Opin. Pharmacol.*, **8**(5), 557-563.
17. *Burja A.M., Dhamwichukorn S., Wright P.C.* (2003) *Trends Biotechnol.*, **21**, 504-511.
18. *Blunt J.W., Copp B.R., Hu W.P., Munro M.H., Northcote P.T., Prinsep M.R.* (2009) *Nat. Prod. Rep.*, **26**(2), 170-244.
19. *Molinski T.F., Dalisay D.S., Lievens S.L., Saludes J.P.* (2009) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **8**, 69-85.
20. *Skropeta D.* (2008) *Nat. Prod. Rep.*, **25**, 1131-1166.
21. *Cooper L.E., McClerren A.L., Chary A., van der Donk W.A.* (2008) *Chem. Biol.*, **15**, 1035-1045.
22. *Kennedy J., Marchesi J., Dobson A.D.W.* (2008) *Microb. Cell Fact.*, **7**, 27-31.
23. *Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., Clardy J., Goodman R.M.* (1998) *Chem. Biol.*, **5**, R245-R249.
24. *Blow N.* (2008) *Nature*, **453**, 687-690.
25. *Hugenholtz P., Tyson G.W.* (2008) *Nature*, **455**, 481-483.
26. *Bugni T.S., Richards B., Bhoite L., Cimbora D., Harper M.K., Ireland C.M.* (2008) *J. Nat. Prod.*, **71**(6), 1095-1098.
27. *Jayasuriya H. et al.* (2007) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 4684.
28. *Krutzik P.O., Crane J.M., Clutter M.R., Nolan G.P.* (2008) *Nat. Chem. Biol.*, **4**(2), 132-142.
29. *Ruan B., Pong K., Jow F., Bowlby M., Crozier R.A., Liu D., Liang S., Chen Y., Mercado M.L., Feng X., Bennett F., von Schack D., McDonald L., Zaleska M.M., Wood A., Reinhart P.H., Magolda R.L., Skotnicki J., Pangalos M.N., Koehn F.E., Carter G.T., Abou-Gharbia M., Graziani E.I.* (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**(1), 33-38.
30. *Lang G., Mayhudin N.A., Mitova M.I., Sun L., van der Sar S., Blunt J.W., Cole A.L., Ellis G., Laatsch H., Munro M.H.* (2008) *J. Nat. Prod.*, **71**(9), 1595-1599.
31. *Zhou H., Xie X., Tang Y.* (2008) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **19**, 590-596.
32. *Weissman K.J., Møller R.* (2008) *Chembiochem.*, **9**(6), 826-848.
33. *Fischbach M.A., Lai J.R., Roche E.D., Walsh C.T., Liu D.R.* (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 11951-11956.
34. *Brautaset T., Sletta H., Nedal A., Borgos S.E., Degnes K.F., Bakke I., Volokhan O., Sekurova O.N., Treshalin I.D., Mirchink E.P., Dikiy A., Ellingsen T.E., Zotchev S.B.* (2008) *Chem. Biol.*, **15**, 1198-1206.
35. *Olano C., Lombo F., Mendez C., Salas J.A.* (2008) *Metab. Eng.*, **10**(5), 281-292.
36. *Stutzman-Engwall K., Conlon S., Fedechko R., McArthur H., Pekrun K., Chen Y., Jenne S., La C., Trinh N., Kim S., Zhang Y.X., Fox R., Gustafsson C., Krebber A.* (2005) *Metab. Eng.*, **7**, 27-31.
37. *Mulzer J., Altmann K.H., Höfle G., Müller R., Prantz K.* (2008) *C. R. Chim.*, **11**, 1336.
38. [www.epa.gov/greenchemistry/pubs/pgcc/winners/gspa04.html](http://www.epa.gov/greenchemistry/pubs/pgcc/winners/gspa04.html)
39. *Roberts S.C.* (2007) *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 387-395.
40. *Keasling J.D.* (2008) *ACS Chem. Biol.*, **3**(1), 64-76.
41. *Rothberg J.M., Leamon J.H.* (2008) *Nat. Biotechnol.*, **26**, 1117-1124.

- 
42. *Eid J., Fehr A., Gray J., Luong K., Lyle J., Otto G., Peluso P., Rank D., Baybayan P., Bettman B., Bibillo A., Bjornson K., Chaudhuri B., Christians F., Cicero R., Clark S., Dalal R., Dewinter A., Dixon J., Foquet M., Gaertner A., Hardenbol P., Heiner C., Hester K., Holden D., Kearns G., Kong X., Kuse R., Lacroix Y., Lin S., Lundquist P., Ma C., Marks P., Maxham M., Murphy D., Park I., Pham T., Phillips M., Roy J., Sebra R., Shen G., Sorenson J., Tomaney A., Travers K., Trulson M., Vieceli J., Wegener J., Wu D., Yang A., Zaccarin D., Zhao P., Zhong F., Kurlach J., Turner S.* (2009) *Science*, **323**(5910), 133-138.
43. *Lewinsohn E., Gijzen M.* (2009) *Plant Sci.*, **176**, 161-165.
44. *Lee S.S.-J., Mudaliar A.* (2009) *Science*, **323**(5912), 342-347.

Поступила: 07. 12. 2010.