



УДК 579.25:579.873.71

СУЧАСНИЙ СТАН І ПЕРСПЕКТИВИ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ВИРОБНИЦТВА АНТИБІОТИКІВ

Т. С. Тодосійчук¹, Т. І. Іздебська¹, О. М. Громико², В. О. Федоренко²

¹Національний технічний університет України „Київський політехнічний інститут”
просп. Перемоги, 37, корпус 4, Київ-56, Україна
e-mail: biotech@ntu-kpi.kiev.ua

²Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua

В огляді проаналізовано сучасний стан і тенденції розвитку біотехнології антибіотиків. Висвітлено причини, які визначають потребу в пошуку нових антибіотичних сполук і вдосконаленні відомих препаратів. Охарактеризовано сучасні стратегії досліджень, спрямованих на збільшення ефективності пошуку нових антибіотиків, оптимізацію умов біосинтезу антибіотиків, а також генетичні та генно-інженерні методи конструювання продуцентів антибіотиків. Наведено дані про біотехнологічне виробництво антибіотиків і їхнє практичне використання у світі й Україні.

Ключові слова: біотехнологія, антибіотики, резистентність до антибіотиків, комбінаторний біосинтез.

ВСТУП

Історія виробництва і застосування антибіотиків налічує більш ніж півстоліття. З моменту відкриття А. Флемінгом 1929 року продуцента пеніциліну *Penicillium notatum* у розвитку біотехнології як науки та галузі промисловості почалася ера антибіотиків. Антибіотики стали одними з перших біологічно активних продуктів біотехнології, виробництво яких було налагоджено.

Терміном „антибіотик” прийнято називати речовини мікробного, рослинного або тваринного походження, що здатні пригнічувати розвиток організмів або викликати їхню загибель. На відміну від цього, синтетичні та напівсинтетичні речовини, що виявляють протимікробну активність, називають „антибактеріальні хіміопрепарати”. Представниками останніх є сульфаніламід, фторхінолони, четвертинні солі амонію та інші [9]. Відкрито більше 25 тисяч антибіотичних сполук, які синтезуються рослинами, тваринами, грибами і бактеріями [21]. Однак практичне застосування у медицині, ветеринарії та сільському господарстві знайшли тільки близько 150 сполук.

Тимчасом у медичній практиці загострилися проблеми, що виникають при застосуванні антибіотиків і хіміопрепаратів. Основними з них є швидкий розвиток резистентності до антисептиків, лікарняні інфекції та явище формування біоплівки мікробними патогенами на поверхнях інструментарію, імплантантів тощо [19, 48].

Дослідженнями встановлено, що мікробні біоплівки відповідальні за етіологію та патогенез багатьох гострих і особливо хронічних бактеріальних інфекцій у людини. При цьому інфекційні захворювання, етіологічними агентами яких є біоплівки, можуть бути викликані як представником одного виду, так і суцесією видів бактерій. До них належать, наприклад, пародонтит, карієс, запалення середнього вуха, інфекції дихальних шляхів, що виникають при муковісцидозі, бактеріальний простатит, інфекційний ендокардит тощо [48].

Групою ж хвороб, що становлять особливу небезпеку, є нозокоміальні (лікарняні) інфекції, розвиток яких становить одну з найбільших проблем при довготривалому лікуванні хворих у стаціонарному відділенні лікарень. Так, приблизно із 5 млн випадків інфекційних захворювань, які щорічно діагностують у лікарнях США, близько 40% набуті в лікарнях (госпітальні інфекційні хвороби) [7, 28].

Вирішення вказаних проблем лежить у сфері використання комбінованої терапії, призначення антибіотиків лише після встановлення виду збудника та раціонального використання хіміотерапевтичних засобів [3, 17].

Аналіз літератури дає підстави стверджувати, що потенціал мікроорганізмів як джерела нових антибіотиків ще не вичерпаний. Окрім цього, використання можливостей генної інженерії та молекулярної біотехнології дає змогу сподіватися на отримання надпродуцентів нових антибіотиків, що виправдовуватимуть необхідні інвестиції у біотехнологічну промисловість [2]. Метою цього огляду було показати потенціал мікроорганізмів як продуцентів нових антибіотиків і проблеми та перспективи біотехнологічного виробництва антибіотиків у світі й Україні зокрема.

I. СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ПОШУКУ ТА КОНСТРУЮВАННЯ МІКРОБНИХ ПРОДУЦЕНТІВ АНТИБІОТИКІВ

На сьогодні відомо більше 1 млн природних сполук. Більшість із них (50–60%) виділено з рослин, а 5% мають мікробне походження. За сучасними оцінками, від 25 до 30 тис. природних сполук виявляють антибіотичну активність. Виділено понад 13 тис. антимікробних, протипухлинних і антивірусних сполук рослинного походження, а також близько 7 000 антибіотичних сполук, які утворюють різні тваринні організми, насамперед морські (губки, кишковопорожнинні, покритники, молюски тощо). Близько 1 700 природних сполук мікробного походження виявляють антибіотичну активність. Актиноміцети утворюють 45% біоактивних мікробних сполук, гриби – 38%, а бактерії – 17%. Найбільше відомих мікробних антибіотиків також продукуються актиноміцетами, насамперед представниками роду *Streptomyces*. Антибіотики актиноміцетного походження становлять більшість і серед тих, що використовуються у медицині, ветеринарії та сільсько-му господарстві (див. таблицю) [10, 21, 28, 29].

Секвенування геномів мікроорганізмів свідчить, що вони здатні синтезувати у 5–10 разів більше вторинних метаболітів, ніж це виявлено у ході традиційного скринінгу. Наприклад, у кожному зі секвенованих геномів актиноміцетів виявлено

більше 20 кластерів генів синтезу вторинних метаболітів, більшість яких є мовчазними [22, 38]. Отже, структурна різноманітність природних речовин залишається далеко не вичерпаною, а розуміння механізмів еволюції цієї різноманітності, її експериментальне моделювання мають неабияке теоретичне та практичне значення.

Кількість антибіотичних сполук, які продукують різні мікроорганізми [21]
Number of antibiotics produced by different microorganisms [21]

Джерело	Загальна кількість	Кількість антибіотиків, що використовуються на практиці (у тому числі тих, що використовуються для терапії людини)
Бактерії	2900	10–12 (8–10)
Еубактерії	2170	
<i>Bacillus</i> sp.	795	
<i>Pseudomonas</i> sp.	610	
Міксобактерії	400	
Ціанобактерії	300	100–120 (70–75)
Актиноміцети	8700	
<i>Streptomyces</i> sp.	6550	
Рідкісні актиноміцети	2250	30–35 (13–15)
Гриби	4900	
Мікроскопічні гриби	3770	
<i>Penicillium/ Aspergillus</i>	1000	
Базидіоміцети	1050	
Дріжджі	105	

Вищезгадані мікроорганізми і на сьогодні залишаються основними об'єктами для розробників нових і модифікованих антибіотиків. Аналізуючи літературу останнього десятиліття, можна виділити декілька пріоритетних напрямів досліджень і розробок, за якими відбувається найбільш активна робота:

- пошук продуцентів нових антибіотиків;
- відбір антибіотиків для вирішення специфічних проблем (проблеми утворення біоплівки мікробними патогенами, внутрішньолікарняні інфекції тощо);
- оптимізація умов біосинтезу антибіотиків відомими мікробними продуцентами;
- генетичне та генно-інженерне конструювання продуцентів із новими властивостями.

Оптимізація умов біосинтезу дає змогу підвищити вихід продукту і зробити його виробництво ефективним. Так, при дослідженні особливостей біосинтезу рибавірини культурою *Bacillus subtilis* отримано дані про визначальний вплив температурного режиму на вихід продукту [41]. Підтримання температури перші 24 год на рівні 36°C і поступове її підвищення через кожні 6 год на 2°C дало змогу отримати максимум продукту на 60-ту годину культивування. Внесення 0,5% Твіну-80

є додатковим чинником оптимізації біосинтезу рибавірину. Про визначальний, але зворотний вплив температури на біосинтез бактеріоцину у *Vacillus cereus* свідчать і результати інших дослідників [25]. Виявилось, що оптимальною температурою для цього продуцента є 25–30°C, а критичне зниження рівня синтезу продукту відзначено при підвищенні температури понад 37°C.

Низькі культур мікроорганізмів властиве значне зростання рівня синтезу антибіотиків або зміна спрямованості синтезу за умов стресу, викликаного складниками поживного середовища. Так, критичне підвищення концентрації мінеральних солей у середовищі культивування *Streptomyces coelicolor* викликає зміну у співвідношенні рівнів синтезу двох антибіотиків – актинородину й ундецилпродигіоцину, що зумовлене експресією різних генів за таких умов [47]. При „голодуванні” іншого стрептоміцета *Streptomyces parvullus* підвищується синтез актиноміцину D [26, 50]. Окрім цього, під час оптимізації процесу біосинтезу запропоновано використовувати культуру цього штаму, іммобілізовану в альгінаті кальцію, та проводити її напівперіодичне культивування, що виключає постійну підготовку посівного матеріалу та підвищує загальну ефективність виробництва.

Перемішування й аерація є визначальними факторами біосинтезу антибіотиків багатьма культурами. На прикладі продуцента протимікробного та противірусного антибіотика *Xenorhabdus nematophila* доведено, що оптимізація цих параметрів дає можливість значно підвищити вихід продукту [52]. Виділено три фази впродовж культивування, у ході яких потрібна зміна рівня аерації та перемішування в межах 30%.

Деякі дослідження присвячено оптимізації біосинтезу тейкопланіну культурою *Actinoplanes teicomyceticus* [35, 36]. Цей антибіотик викликає значний інтерес дослідників з огляду на спектр дії й активність. Опрацювання технології його синтезу на лабораторній (7 літрів) та пілотній (300-літровий ферментер) установках дало змогу встановити відповідність основних параметрів, а отже, можливість масштабування процесу [35]. Критичними факторами для біосинтезу тейкопланіну виявилися: температура, рН і концентрація розчиненого кисню, що мають бути на рівні 34°C, рН 7,0 та 20–30% насичення киснем відповідно. За цих умов накопичується до 2,9 г/л антибіотика.

Узагальнюючи дані щодо напрямів оптимізації умов біосинтезу антибіотиків, можна відзначити загальну особливість – необхідність градієнтної зміни більшості факторів (температури, аерації та інших) упродовж різних етапів розвитку культур для отримання максимуму продукту.

Сьогодні загально визнаною є ідея, що кардинально підвищити ефективність антибіотикотерапії можна, лише впровадивши у клініку нові антибіотики тих класів, які раніше не використовувалися, або тих, що використовувалися дуже рідко. Тому пошук нових антибіотиків і модифікація відомих з метою їх удосконалення є одним із головних напрямів сучасної біотехнології.

Від початку ери антибіотикотерапії і донині скринінг бактерій, виділених із різних екоотопів, був основним джерелом нових біоактивних речовин, зокрема, антибіотиків. Однак відкриття у наш час антибіотика, що належить до нового хімічного класу або ж є покращеним варіантом уже відомої сполуки, – надзвичайно рідкісна подія. Очевидною є потреба у зміні підходів до пошуку нових природних сполук.

Опрацьовано низку стратегій, спрямованих на оптимізацію пошуку нових антибіотиків. По-перше, це виділення продуцентів антибіотиків з екзотичних

і малодосліджених екоотопів (наприклад, ендосимбіонтів рослин і тварин, тих, що знайдені у ризосфері рідкісних рослин, у зразках осадових порід морського дна тощо), а також скринінг нових мікробних таксонів щодо синтезу біоактивних сполук. Прикладом успішного використання такого підходу є відкриття нового хімічного класу антибіотиків – абісоміцинів із нового морського актиноміцета роду *Verruscosispora* [24].

Інша стратегія – це застосування скринінгових програм із підвищеною чутливістю. Така висока чутливість властива скринінгові, що ґрунтується на антисенс-технологіях. Коли внутрішньоклітинний рівень мішені, на яку діє шуканий антибіотик, знижений унаслідок дії відповідних антисенс-РНК, тест-штами стають більш чутливими до цього антибіотика. Таким чином можна виявити сполуки, які за стандартних умов не пригнічують ріст тест-штамів дикого типу. За допомогою цього методу виявлено новий клас антибіотиків, до яких належить платенсиміцин, що продукує штам *Streptomyces platensis* [49].

Іншим прикладом є сенсорна система для експрес-виявлення три-, пента- і гексаглікозильованих ландоміцинів, які виявляють високу протипухлинну активність [15]. У ній використовують штам *Streptomyces albus*, що несе плазмиду з репортерним геном стійкості до неоміцину і канаміцину *neo*. Він перебуває під транскрипційним контролем промотора P_{lanK-J} і гена *lanK*, які походять з кластера генів біосинтезу ландоміцину *A. S. cyanogenus* S136 [42]. Ген *lanK* кодує репресорний білок, який за відсутності у клітині поліглікозильованих ландоміцинів зв'язується з промотором P_{lanK-J} і пригнічує експресію генів, що транскрибуються з нього. Коли три-, пента- і гексаглікозильовані ландоміцини нагромаджуються у клітині вище певного порогового рівня, вони зв'язуються з репресором і позбавляють його здатності взаємодіяти з P_{lanK-J} . За таких умов запускається транскрипція з цього промотора. Оскільки у клітинах тестерного штаму ген *neo* перебуває під промотором P_{lanK-J} то за відсутності поліглікозильованих ландоміцинів він не росте на середовищі з канаміцином. Коли ж серед метаболітів досліджуваного штаму присутні такі ландоміцини, то включається транскрипція гена *neo* і тестерний штам *S. albus* росте на середовищі з канаміцином. Отже, у цій сенсорній системі пошуку ландоміцинів використовується здатність ландоміцинів слугувати ефекторними молекулами у регуляції власного біосинтезу [43].

Секвенування геномів мікроорганізмів-продуцентів антибіотиків і вивчення механізмів генетичного контролю синтезу цих сполук відкрило широкі можливості для конструювання продуцентів нових антибіотиків або модифікації відомих. Об'єктами вивчення та генно-інженерного конструювання надпродуцентів антибіотиків найчастіше є представники роду *Streptomyces*. На сьогодні клоновано і секвеновано гени біосинтезу всіх основних класів антибіотиків [22, 37]. Зазвичай усі гени, що контролюють продукування певного антибіотика, зібрані у хромосомах штамів-продуцентів у кластери, що за розмірами варіюють від 15 до 100 т.п.н. Крім генів, які контролюють ензими біосинтезу сполуки, у цих кластерах часто розміщені гени стійкості продуцента до власного антибіотика, гени, що контролюють його транспортування, а також регуляторні гени, специфічні для даного шляху біосинтезу (англ. *pathway-specific regulatory genes*) [22, 23, 34, 37, 39, 46]. Така організація генів біосинтезу антибіотиків дуже полегшує їх виділення й аналіз. Це створило підґрунтя для активного розвитку досліджень із комбінаторного біосинтезу антибіотиків, спрямованих на отримання колекцій сполук –

похідних певного антибіотика і пошук серед них тих, які мають змінені біологічні властивості або можуть слугувати вихідним матеріалом для створення напівсинтетичних препаратів тощо. Головні методи, що використовуються при цьому, – спрямована інактивація (нокаут) певних генів біосинтезу, їх надекспресія або гетерологічна експресія у клітинах інших видів [4, 32, 44]. Прикладом вдалого застосування цієї технології є отримання шляхом комбінаторного біосинтезу більше 50 нових ароматичних полікетидних сполук ландоміцинів і урдаміцинів, що відрізняються за будовою, а також протипухлинною й антибактерійною активністю від ландоміцину А, ландоміцину Е та урдаміцину А, які є головними природними вторинними метаболітами *S. cyanogenus* S136, *S. globisporus* 1912 і *S. fradiae* Tu2717 [45]. За допомогою гетерологічної експресії генів можна створити „гібридні” шляхи біосинтезу вторинних метаболітів. Наприклад, клонування гена *urdGT2* глікозилтрансферази, що каталізує С9-глікозилювання (приєднання залишку D-оливози) під час біосинтезу урдаміцину у *S. fradiae* Tu2717 у клітинах мутанта *S. globisporus* 1912 Δ *IndE* зумовлює синтез нових, раніше не описаних сполук – прежадоміцин С-глікозидів [20].

У результаті стрімкого розвитку генетичної інженерії не тільки нагромаджено великий обсяг інформації про структуру та функції генів і геномів, але й створено методи маніпулювання з великими молекулами ДНК, а також цілими хромосомами, що ґрунтуються на процесах гомологічної та сайт-специфічної рекомбінації [12]. Ці методи активно використовуються для маніпуляцій із геномами бактерій-продуцентів антибіотиків. Зокрема, конструюються штами-„супергосподарі” для клонування цілих кластерів генів біосинтезу антибіотиків із різних видів актиноміцетів. У майбутньому планують використовувати такі штами як універсальні біотехнологічні продуценти різних антибіотиків. Проводять „оптимізацію” геномів таких штамів, видаляючи з них геномні острови, які, зазвичай, містять гени, не обов’язкові для існування бактерії за відносно стабільних умов промислового ферментера, а також мобільні генетичні елементи [38]. Маючи на меті використати модельний об’єкт генетики актиноміцетів – *S. coelicolor* – для гетерологічної експресії генних кластерів біосинтезу вторинних метаболітів, з його геному видалено два найбільших геномних острови, а також ліву термінальну ділянку хромосоми *S. coelicolor* M145 загальним розміром 300 тисяч пар нуклеотидів [6]. Автори іншого дослідження видалили з геному *S. coelicolor* M145 чотири кластери генів синтезу власних антибіотиків – актинородину, продигініну, СРК і СДА. Крім того, в його геном уведено точкові мутації в гени *rpoB* (кодує β -субодиницю РНК-полімерази, мутація зумовлює стійкість до рифампіцину) і *rpsL* (кодує білок S12 30S субодиниці рибосоми, а мутація визначає стійкість до стрептоміцину). Ці мутації виявляють плейотропний ефект на синтез антибіотиків, значно активуючи його [51]. Після перенесення у цей штам „рідного” кластера генів біосинтезу актинородину, а також кластерів генів біосинтезу хлорамфеніколу з *S. venezuelae* і конгоцидину з *S. ambofaciens* спостерігали значне зростання синтезу цих антибіотиків порівняно з вихідним штамом M145 [31].

Очевидно, що створення штамів-надпродуцентів антибіотиків неможливе без суттєвих змін у процесах регулювання біосинтезу антибіотиків. Продукція антибіотиків зазвичай розпочинається на початку стаціонарної фази росту в рідкій культурі та збігається з початком морфологічної диференціації в культурі, що росте на агаризованому середовищі [23]. Тепер відомо, що гени регуляції біосин-

тезу вторинних метаболітів формують ієрархічну систему, котра включає як плеїотропні гени глобальної регуляції, що впливають на біосинтез багатьох антибіотиків, так і гени, що специфічно регулюють шлях біосинтезу певного антибіотика. Останні відіграють найважливішу роль в ініціюванні синтезу цього антибіотика, а їхні мутації можуть повністю його зупиняти. Навпаки, їх надекспресія зумовлює підвищення рівня біосинтезу антибіотиків [34, 46]. Крім того, доведено, що для досягнення високого рівня продукції антибіотиків доцільно маніпулювати також із генами глобальної регуляції, наприклад, такими, як *relA* (контролює синтез внутрішньоклітинної сигнальної молекули (p)ppGpp), або *bldA* (кодує tРНК, яка транслює лейциновий кодон UUA, наявний у багатьох шлях-специфічних регуляторних генах) [30, 40].

Усе сказане вище свідчить про те, що розвиток генетики і геноміки промислових мікроорганізмів, а також удосконалення методів генетичної інженерії зумовили піднесення на якісно новий рівень конструювання біотехнологічних продуцентів антибіотиків.

II. ПРОБЛЕМИ І ПЕРСПЕКТИВИ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ВИРОБНИЦТВА АНТИБІОТИКІВ

Обсяг біотехнологічного сектору світового ринку останні роки щорічно зростає на 10–15%, а у 2009 р. він становив 810 млрд дол. США. Значна частина у структурі світового біотехнологічного сектору припадає на виробництво фармацевтичних препаратів. Так, у 2005 р. світовий обсяг продажів фармацевтичних препаратів становив 602 млрд дол. США, в тому числі біотехнологічного походження – 52 млрд [16].

На сьогодні лідером біотехнологічної фармакологічної індустрії є США, де випускається майже 50% світової продукції цієї галузі. Саме американський ринок є головним плацдармом для впровадження нових біофармацевтичних продуктів. Цьому сприяє менш суворе законодавство США з реєстрації продуктів біофармацевтики, розуміння суттєвих переваг засобів, створених на основі біотехнологій порівняно з традиційними лікарськими засобами. Визначальним є також суттєве (майже у 5 разів) збільшення фінансування біотехнологічної галузі за останні 10 років [8, 16].

Найбільший сегмент ринку біотехнологічних препаратів у світі – це антибіотики для лікування захворювань людини і тварин, а також для кормових добавок і преміксів. У 2009 році вартість продажів антибіотиків у світі становила 42 млрд доларів США, що становить 46% від ринку антиінфекційних агентів, який включає противірусні ліки і вакцини, а також 5% глобального фармацевтичного ринку. За останні п'ять років ринок антибіотиків зростав у середньому на 4%, порівняно з ростом на 16,7 і 16,4% ринку противірусних препаратів і вакцин, відповідно. Найбільша частка ринку антибіотиків (28%, 11,9 млрд доларів у 2009 р.) припадає на цефалоспорины, значною мірою завдяки широкому використанню найновішого покоління ліків цього класу – цефкапену (фломоксу, Shionogi), цефтриаксону (роцефіну, Roche) і цефуроксиму (зіннату, GlaxoSmithKline). На другому місці за обсягом продажів (19%, 7,9 млрд доларів) є ринок пеніцилінів широкого спектра дії, а на третьому – фторхінолонів (17%, 7,1 млрд доларів). У 2005–2009 рр. спостерігалося зростання ринку згаданих вище класів антибіотиків, однак ринок четвертого за

обсягом класу – макролідів (4,8 млрд доларів) скоротився на 5%. Якщо говорити про використання антибіотиків, то найбільш вживаними антибіотиками є також згадані вище чотири класи сполук. Цікаво, що у деяких країнах спостерігається позитивна тенденція до скорочення вживання антибіотиків. Зокрема, у Франції та Японії за період 2000–2009 рр. використання антибіотиків скоротилося на 21 і 15% відповідно. Головною причиною є намагання боротися з розповсюдженням мультирезистентних збудників інфекцій шляхом раціональнішого використання антибіотиків – тільки після того, як ці збудники виділені та перевірені щодо антибіотичної чутливості або резистентності [33].

Лідерами за обсягом витрат у галузі біотехнології антибіотиків є компанія „Pfizer” (обсяг продажів має постійну тенденцію до зростання і за період 2004–2006 рр. становив 36,1–56,0 млрд дол.) та корпорація „Johnson&Johnson” (частка цієї компанії на ринку – 10–11%). Динаміка фінансування за 2001–2007 рр. свідчить про сталий приріст і зростання рівня зацікавленості різноманітних інвесторів до галузі [45, 46]. Між цими компаніями існує жорстока конкуренція за місце на фармакологічному ринку США та світу.

В Україні розвиток сучасних біотехнологій і застосування їх у фармації тільки починається, хоча традиційні біотехнології використовуються у виробництві лікарських препаратів більше 20 років. У даний час із 418 обов'язкових імунобіотехнологічних препаратів вітчизняні підприємства виробляють лише близько 40 (9%), а з 62 препаратів мікробного походження, що належать до першочергових лікарських засобів, виробляють тільки 10–12 найменувань (19%) [11, 13, 16].

Структура фармацевтичного біотехнологічного ринку України відрізняється від структури світового ринку. Так, найбільшими сегментами ринку в нас є препарати-пробіотики, вакцини та сироватки. На сьогодні на українському ринку лікарських засобів переважають імпорتنі пробіотики. Іноземні фірми займають понад 70% нашого фармацевтичного ринку в цій ділянці. І лише близько 20–30% його припадає на українського виробника.

В Україні достатньо велика кількість підприємств випускає фармацевтичну біотехнологічну продукцію: „Ензим” (Ладизжин), „Дніпрофарм” (Дніпропетровськ), „Біолік” (Харків), НПК „Фармбіотек” (Київ), „Біостимулятор” (Одеса), „Індар” (Київ), „Біофарма” (Київ). Провідними серед них є „Індар” (Київ), який спеціалізується на випуску інсулінів, „Біолік” (Харків) і „Біофарма” (Київ), які випускають препарати-нормобіотики, білки крові людини, вакцини та сироватки, для профілактики і лікування багатьох захворювань, а також різні діагностикуми [8, 11, 16].

Біотехнологічне виробництво антибіотиків немедичного призначення реалізується на таких українських підприємствах, як Новоград-Волинський завод кормових добавок, ЗАТ „Запоріжбіосинтез”, Запорізький дослідний біохімічний завод концерну „Укрмедпром”. Очевидно, вказані підприємства мають потенціал для виробництва субстанцій антибіотиків медичного призначення, які можуть бути сировиною для вітчизняних фармацевтичних компаній, що закуповують нині відповідні субстанції закордонного виробництва.

Згідно з дослідженням 2008 р., щорічно більше ніж 25 тис. пацієнтів у Європейському Союзі помирають від інфекцій, викликаних бактеріями, які мають множинну медикаментозну стійкість, а додаткові витрати на медичну допомогу і відшкодування збитків, пов'язаних із втратою працездатності, становлять, щонайменше, 1,5 млрд євро. Тому це, здавалося б, має стати поштовхом до розробки

нових технологій і препаратів антибіотиків. Однак за останні роки великі фармацевтичні компанії не виявляли інтересу до розробки антибіотиків, а кількість нових схвалених антибіотиків зменшується, починаючи з 80-х років минулого століття. За останні 30 років лише два цілком нових класи антибіотиків були впроваджені у клініку: оксазолідинон лінезолід (Zyvox, Pfizer) у 2001 р. та циклічний ліпопептид даптоміцин (Cubicin, Cubist) у 2003 р. На сьогодні більше ніж 150 антибіотичних сполук проходять передклінічні випробування. Однак у III фазі випробувань є лише 7 сполук, а у II – 17. Це, насамперед, препарати, активні проти метицилін-резистентних штамів *Staphylococcus aureus* – цефтобіпрол (цефалоспорин), дальбаванцин (глікопептид), іклаприм (інгібітор дигідрофолатредуктази), оритаванцин (глікопептид). Однак на стадії випробування дуже мало нових антибіотиків, що активні проти таких небезпечних патогенів, як *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* і *Pseudomonas aeruginosa*. Серед них жоден не перебуває у III фазі випробувань. З усіх можливостей протимікробного ринку великі компанії вибирають противірусні препарати, зокрема, розробку препаратів проти ВІЛ та вірусу гепатиту С [1, 5, 14, 33].

Існує безліч причин, які перешкоджають розробці нових антибіотиків. Одна з них – це складність і висока вартість наукових розробок зі створення нових лікарських засобів з принципово новими механізмами дії. Друга причина – комерційна. Інвестиції в розробку антибактеріальних препаратів приносять невисокий прибуток, оскільки вони призначені для короткострокового лікування певних гострих захворювань. Лікарські засоби для терапії хронічних захворювань, наприклад, артеріальної гіпертензії, призначають пацієнтам довічно. З огляду на це, більшість великих фармацевтичних компаній віддає перевагу розвитку ринку більш прибуткових препаратів для лікування хронічної патології. У результаті комерційні перспективи нового антибіотичного препарату виглядають не дуже привабливо.

Відсутність матеріальних стимулів призвела до того, що багато компаній узагалі припинили розробку протимікробних препаратів. За даним статті, опублікованої в січні 2009 р. у журналі „Clinical Infectious Diseases”, у 2008 р. лише п'ять найбільших фармацевтичних компаній – „GlaxoSmithKline”, „Novartis”, „AstraZeneca”, „Merck” і „Pfizer” – все ще реалізували програми з розробки антибактеріальних лікарських засобів.

Останніми роками відзначається відчутне зростання стафілококових і стрептококових інфекцій, викликаних штамми, стійкими до всіх β -лактамних антибіотиків (пеніцилінів, цефалоспоринів, монобактамів і карбапенемів), а також до макролідів, аміноглікозидів, тетрациклінів та інших антибактеріальних препаратів. Такою полірезистентністю характеризуються так звані метицилінрезистентні (або оксацилінрезистентні) стафілококи (MRS) *S. aureus*, в тому числі коагулазонегативні (CNS) *S. epidermidis*, пеніцилін-резистентні стрептококи *Streptococcus pneumoniae*, *S. viridans*, полірезистентні ентерококи *Enterococcus faecalis* і *E. faecium*. У клінічній практиці це означає, що ціла низка відомих захворювань, викликаних такими збудниками, не піддається традиційним схемам лікування [27–29, 33].

Поява таких „супермікробів” свідчить про повернення „доантибіотикової ери”. Бактерії дуже швидко набувають резистентності до нових антибіотиків: не минуло й року з моменту появи препарату лінезолід компанії „Pfizer”, як були виявлені

штами *Enterococcus*, стійкі до нього [48]. Це зумовило різке зростання інтересу і потреби в антибіотиках-глікопептидах, високоактивних щодо названих проблемних мікроорганізмів [1].

До глікопептидів належать природні антибіотики – ванкоміцин і тейкопланін. Ванкоміцин застосовується у клінічній практиці з 1958 р., тейкопланін – зі середини 80-х. Спектри антимікробної активності ванкоміцину і тейкопланіну подібні. Однак тейкопланін проявляє *in vitro* більш високу активність щодо золотистого стафілокока (у тому числі штамів, резистентних до метициліну), різних видів стрептококів (включаючи *S. pneumoniae*) та ентерококів. Ванкоміцин *in vitro* більш активний щодо коагулазонегативних стафілококів. Активність препаратів однакова щодо анаеробних коків і клостридій. Тейкопланін – порівняно недавно розроблений глікопептидний антибіотик, який може використовуватись як альтернатива ванкоміцину при лікуванні інфекцій, викликаних грампозитивними бактеріями. На противагу ванкоміцину, він сильніше зв'язується з білками сироватки крові (понад 70%) і має досить тривалий період напіврозпаду в сироватці (більше 50 год). Набута резистентність до глікопептидів у грампозитивних бактерій розвивається рідко [1].

На території України зареєстровані такі препарати, що містять у своєму складі діючу речовину тейкопланін [13]: Тейнін (Швейцарія, Італія), Нортейк-здоров'я (Україна), Тейко (Індія), Таргоцид (Італія), Нортейк (Індія).

За підсумками 2010 р. обсяг українського фармацевтичного ринку в цінах виробника, розрахований за формулою „імпорт + виробництво – експорт”, становив 22,4 млрд грн, левову частку з якого за підсумками 2010 р. акумулює сегмент імпорту – 17 млрд грн [14, 18]. Таким чином, вітчизняний фармацевтичний ринок залишається імпортозалежним.

Обсяг імпорту готових лікарських засобів в Україні за підсумками 2010 р. становив 17 млрд грн. Слід зазначити, що згубний вплив економічної кризи і до цього дня дає про себе знати, незважаючи на високу динаміку розвитку ринку в національній валюті, у вагових одиницях і доларовому еквіваленті, обсяг імпорту готових лікарських засобів в Україні до цих пір не відновився до рівня 2008 р. [14, 18].

Обсяг українського експорту готових лікарських засобів за підсумками 2010 р. становив 1,4 млрд грн. Основними експортними напрямками для українських виробників готових лікарських засобів традиційно виступають країни пострадянського простору. До топ-5 країн-одержувачів українських готових лікарських засобів у грошовому виразі також належать Узбекистан, Росія, Казахстан, Білорусь і Молдова. Звертає на себе увагу той факт, що на 7 позицію вийшла Німеччина.

За підсумками 2007 р. загальний обсяг продажів антибактеріальних засобів в Україні становив 618,5 млн грн. У структурі продажів антибактеріальних засобів у грошовому виразі переважають зарубіжні препарати [5, 14, 18].

Наведені цифри щодо вартісної ємності ринку протимікробних засобів (у тому числі антибіотиків), співвідношення імпорт/експорт і виробничий потенціал вітчизняних підприємств свідчать про високий рівень конкуренції та необхідність великих інвестицій для розробки і впровадження нового продукту. Очевидно, що конкурувати на ринку даних препаратів можуть лише великі фармацевтичні фірми або підприємства, що отримують вагому державну підтримку.

Розвиток біотехнології в Україні задекларований як один із визначальних напрямів інноваційного руху країни [8]. У цих рамках мають бути здійснені основні необхідні заходи для розвитку біотехнологічного сектору: впровадження пільгового режиму в біотехнологічній (науковій та виробничій) галузі, надання довгострокових кредитів для впровадження нових технологій, визначення джерел державного та приватного фінансування пріоритетних напрямів розвитку біотехнології. Лише це може стати основою для реалізації наукового та промислового потенціалу будь-якої країни (зокрема України) в галузі біотехнології та дасть змогу зайняти гідне місце серед розвинених держав світу.

1. *Белобродова Н.В.* Гликопептиды (ванкомицин, тейкопланин) – место в антибактериальной терапии пациентов группы высокого риска. **Анестезиология и реаниматология**, 1998; 4 : 23–27.
2. *Дебабов В.Г.* Селекция микроорганизмов на заре XXI века. **Биотехнология**, 2005; 4: 3–19.
3. *Дідик В.С.* Мікробіологічне обґрунтування сумісного використання антибіотиків з антисептиками групи четвертинного амонію. Автореферат дис... канд. мед. наук: 03.00.22. Харків, 2003. 20 с.
4. *Дубицька Л.П.* Конструювання та селекція штаму *Streptomyces peucetius subsp. ceasius* – продуцента даунорубіцину та доксорубіцину. Автореф. дис... канд. біол. наук: 03.00.15. Київ, 2002. 17 с.
5. *Кармалита Е.Е., Юрьев К.Л.* Амбулаторное потребление антибактериальных средств в Украине. **Укр. мед. часопис**, 2008; 1(63): 105–110.
6. *Кобилянський А.М.* Гени актиноміцетів, що контролюють етапи відновлення, окиснення та глікозилювання у біосинтезі ангуциклінових антибіотиків. Автореф. дис... канд. біол. наук: 03.00.22. Київ, 2011. 20 с.
7. *Козлов Р.С.* Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, профилактика, контроль. **Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия**, 2000; 2(1): 16–30.
8. *Костюк Р.В.* Розвиток інноваційної діяльності біотехнологічних підприємств у сучасних умовах. **Актуальні проблеми економіки**, 2009; 8(98): 79–84.
9. *Ланчини Д., Паренти Ф.* Антибиотики. Москва: Мир, 1991. 270 с.
10. *Мацелюх А.Б.* Стрептоміцети – продуценти антибіотиків. **Мікробіол. журн**, 2003; 65(1–2): 168–181.
11. *Новіков В., Сидоров Ю., Швед О.* Тенденції розвитку комерційної біотехнології. **Вісн. НАН України**, 2008; 2: 25–39.
12. *Осташ Б.* Сайт-специфічні рекомбінази у генетичній інженерії: новітні технології *in vivo*. **Цитология и генетика**, 2010; 44(4): 61–69.
13. **Реєстр ЛЗ на території України.** <http://mozdocs.kiev.ua/>
14. *Сергиенко О.* Ралли на фармрынке! Аптечные продажи лекарств в Украине: итоги 2010 г. Часть I. **Аптека.ua Online**, 2011; 4. <http://www.apteka.ua/article/70328>
15. **Спосіб експрес-виявлення антибіотиків групи ландоміцинів.** Пат. 88383 України. *Осташ Б. О. Осташ І.С., Федоренко В.О.* та ін.; заявл. 8.01.2008; опубл. 12.10.2009, Бюл. № 19.
16. *Стрельников Л.С., Стрилец О. П., Щербак О. В.* и др. Перспективы и пути развития производства биотехнологических лекарственных препаратов в Украине. **Annals of Mechnikov Institute**, 2006; 4: 3–8.
17. *Тец Г. В., Артеменко К. Л.* Совместное действие антибиотиков и дезоксирибонуклеазы на бактерии. **Антибиотики и химиотерапия**, 2006; 6: 11–14.

18. Шубаева А. Путешествия лекарств, или импорт–экспорт, производство готовых лекарственных средств: итоги 2010 г. **Аптека.ua Online**. 2011; 4: <http://www.apteka.ua/article/69550>
19. Aiello A.E., Larson E. Antibacterial cleaning and hygiene products as an emerging risk factor for antibiotic resistance in the community. **Lancet Infect. Dis**, 2003, 3(8): 501–506.
20. Baig I., Kharel M., Kobylansky A. et al. About the acceptor substrate of C-glycosyltransferase UrdGT2: three novel prejadomycin C-glycosides from an engineered mutant of the landomycin E-producer, *Streptomyces globisporus* 1912 Δ IndE(urdM). **Angew. Chem. Int. Ed**, 2006; 45: 7842–7846.
21. Berdy J. Bioactive microbial metabolites. **J. Antibiot**, 2005; 58(1): 1–26.
22. Bentley S.D., Chater K.F., Cerden-o-Tarraga A.M. et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**, 2002; 417: 141–147.
23. Bibb M.J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. **Curr Opin Microbiol**, 2005; 8(2): 208–215.
24. Bister B., Bischoff D., Ströbele M. et al. Abyssomicin C—a polycyclic antibiotic from a marine *Verrucosipora* strain as an inhibitor of the p-aminobenzoic acid/tetrahydrofolate biosynthesis pathway. **Angew. Chem. Int. Ed**, 2004; 43: 2574–2576.
25. Bizani D., Brandelli A. Influence of media and temperature on bacteriocin production by *Bacillus cereus* 8A drying bath cultivation. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 2004; 65: 158–162.
26. Dalili M., Pao C. Production of actinomycin D with immobilized *Streptomyces parvullus* under nitrogen and carbon starvation conditions. **Biotechnology Letters**, 1988; 10(5): 331–336.
27. Demain A.L., Elander R.P.. The β -lactam antibiotics: past, present and future. **Antonie van Leeuwenboek**, 1999; 75: 5–19.
28. Demain A.L., Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **J. Antibiotics**, 2009; 62: 1–12.
29. Donadio S., Maffioli S., Monciardini P. et al. Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. **J. Antibiotics**, 2010; 63: 423–430.
30. Gomez-Escribano J.P., Martin J.F., Hesketh A. et al. *Streptomyces clavuligerus* relA-null mutants overproduce clavulanic acid and cephamycin C: negative regulation of secondary metabolism by (p)ppGpp. **Microbiology**, 2008;154(3): 744–55.
31. Gomez-Escribano J.P., Bibb M.J. Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. **Microbial Biotechnology**, 2011; 4(2): 207–215.
32. Gromyko O., Rebets Y., Ostash B. et al. Generation of *Streptomyces globisporus* SMY622 strain with increased landomycin E production and it's initial characterization. **J. Antibiot**, 2004; 57(6): 383–389.
33. Hamad B. The antibiotics market. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2010; 9: 675–676.
34. Horbal L., Rebets Y., Rabyk M. et al. Characterization and analysis of the regulatory network involved in control of lipomycin biosynthesis in *Streptomyces aureofaciens* Tu117. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 2010; 85(4): 1069–1079.
35. Hyung-Moo Jung, Sang-Uong Kim, Ponnandy P. et al. Optimization of culture conditions and scale-up to plant scale for teicoplanin production by *Actinoplanes teichomyceticus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 2000; 80: 21–27.
36. Hyung-Moo Jung, Marimuthu J., Sang-Uong Kim et al. Biosynthesis, biotechnological production and application of teicoplanin: current state and perspectives. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 2009; 84: 417–428.
37. Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A. et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. **Nat. Biotechnol**, 2003; 21: 526–531.
38. Komatsu M., Uchiyama T., Omura S. et al. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2010; 107(6): 2646–2651.

39. Liras P., Juan P., Gomez-Escribano J.P., Santamarta I. Regulatory mechanisms controlling antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, 2008; 35: 667–676.
40. Makitrynskiy R., Rebets Y., Ostash B. et al. Genetics factors that influence moenomycin production in streptomycetes. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, 2010; 37(6): 599–566.
41. Ning Chen, Chen-Guang Xing, Xi-Xian, Qing-Yang Xu. Optimization of technical conditions of producing ribavirin by *Bacillus subtilis*. **Annals of Microbiology**, 2009; 59: 525–530.
42. Ostash I., Ostash B., Luzhetskyy A. et al. Coordination of export and glycosilation of landomycins in *Streptomyces cyanogenus* S136. **FEMS Microbiol. Lett**, 2008; 285(2): 195–202.
43. Ostash B., Ostash I., Zhu L. et al. Properties of *lanK*-based regulatory circuit involved in landomycin biosynthesis in *Streptomyces cyanogenus* S136. **Russian Journal of Genetics**, 2010; 46(5): 530–535.
44. Ostash B., Yan X., Fedorenko V., Bechthold A. Chemoenzymatic and bioenzymatic synthesis of carbohydrate containing natural products. **Top. Curr. Chem. „Natural Products via enzymatic Reactions”**. Ed. J. Piel. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2010; 297: 105–148.
45. Ostash B., Korynevskaya A., Stoika R., Fedorenko V. Chemistry and biology of landomycins, an expanding family of polyketide natural products. **Mini-Rev. Med. Chem**, 2009; 9(9): 1040–1051.
46. Rebets Yu., Ostash B., Luzhetskyy A. et al. DNA-binding activity of LndI protein and temporal expression of the gene that upregulates landomycin E production in *Streptomyces globisporus* 1912. **Microbiology**, 2005; 151(1): 281–290.
47. Sevcikova B., Kormanec J. Differential production of two antibiotics of *Streptomyces coelicolor* A3 (2), actinorhodin and undecylprodigiosin, upon salt stress conditions. **Arch. Microbiol**, 2004; 181: 384–389.
48. Stewart P.S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **Int. J. Med. Microbiol**, 2002; 292: 107–113.
49. Singh, S.B., Phillips, J.W., Wang, J. Highly sensitive target-based whole-cell antibacterial discovery strategy by antisense RNA silencing. **Curr. Opin. Drug Discov. Devel**, 2007; 10: 160–166.
50. Singh V., Khan M., Khan S., Tripathi C.K.M. Optimization of actinomycin V production by *Streptomyces triostinicus* using artificial neural network and genetic algorithm. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 2009; 82: 379–385.
51. Wang G., Hosaka T., Ochi K. Dramatic activation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by cumulative drug resistance mutations. **Appl. Environ. Microbiol**, 2008; 74(9): 2834–2840.
52. Young-Hong Wang, Xing Zhang. Influence of agitation and aeration on growth and antibiotic production by *Xenorhabdus nematophila*. **World J. Microbiol. Biotechnol**, 2007; 23: 221–227.

CURRENT STATE AND PERSPECTIVES OF BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF ANTIBIOTICS

T. S. Todosiychuk¹, T. I. Izdebska¹, O. M. Gromyko², V. O. Fedorenko²

¹National Technical University of Ukraine „Kyiv Polytechnic Institute”
37, Peremohy Ave., build. 4, Kyiv-56, Ukraine
e-mail: biotech@ntu-kpi.kiev.ua

²Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua

In this review, current state and development at trends in antibiotic biotechnology have been analyzed. Reasons prompting the search of novel and improvement of exis-

ting antibiotics have been elucidated. Current strategies of investigations are discussed, particularly those that are aimed to increase the efficiency of screening of novel antibiotics, optimization of conditions of antibiotic biosynthesis as well as genetic and gene engineering methods of construction of antibiotic producers. Data are presented on biotechnological production of antibiotics and their practical use in the world and Ukraine.

Key words: biotechnology, antibiotics, antibiotic resistance, combinatorial biosynthesis.

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА АНТИБИОТИКОВ

Т. С. Тодосійчук¹, Т. І. Издебская¹, А. Н. Громыко², В. А. Федоренко²

¹Національний технічний університет України „Київський політехнічний інститут”
просп. Перемоги, 37, корпус 4, Київ-56, Україна
e-mail: biotech@ntu-kpi.kiev.ua

²Львівський національний університет імені Івана Франка
ул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua

В обзоре проанализированы современное состояние и тенденции развития биотехнологии антибиотиков. Освещены причины, обуславливающие необходимость поиска новых антибиотических соединений и усовершенствование известных препаратов. Охарактеризованы современные стратегии исследований, направленных на повышение эффективности поиска новых антибиотиков, оптимизацию условий биосинтеза антибиотиков, а также генетические и генно-инженерные методы конструирования продуцентов антибиотиков. Приведены и проанализированы данные о биотехнологическом производстве антибиотиков и их практическом применении в мире и Украине.

Ключевые слова: биотехнология, антибиотики, резистентность к антибиотикам, комбинаторный биосинтез.

Одержано: 13.01.2011