

## Антибактериальные препараты, снижающие риск развития резистентности

Зигангирова Н.А.<sup>1</sup>, Лубенец Н.Л.<sup>1</sup>, Зайцев А.В.<sup>2</sup>, Пушкарь Д.Ю.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Россия

### Контактный адрес:

Наиля Ахатовна Зигангирова  
Эл. почта: zigangirova@mail.ru

Ключевые слова: факторы вирулентности, хронические инфекции, терапия, профилактика, антивирулентные препараты.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Ближайшие десятилетия важнейшей задачей медицинской микробиологии в области терапии инфекционных заболеваний станет создание антибактериальных препаратов, эффективных в отношении антибиотикорезистентных патогенов и снижающих риск развития резистентности. В связи с этим наряду с поиском новых антибиотиков, необходимо разрабатывать альтернативные стратегии, направленные на снижение селективного давления препаратов на патогены в результате подавления вирулентности без влияния на жизнеспособность. В качестве мишеней для подавления выбираются факторы вирулентности, определяющие ключевые этапы как острого, так и хронического инфекционного процесса: адгезины, токсины, система коммуникации бактерий, секреторные системы. Антивирулентные препараты могут быть эффективны при лечении нозокомиальных, осложненных и хронических инфекций в составе комплексной терапии и для профилактики. В обзоре приведены результаты исследований препаратов, которые либо показали эффективность на модельных инфекциях у животных, либо перешли на стадию клинических исследований, либо уже зарегистрированы. Разработка эффективных схем комбинированной терапии позволит минимизировать риски приобретения резистентности.

### Review

## Antibacterial agents reducing the risk of resistance development

Zigangirova N.A.<sup>1</sup>, Lubenec N.L.<sup>1</sup>, Zaitsev A.V.<sup>2</sup>, Pushkar D.Yu.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

### Contacts:

Nailya A. Zigangirova  
E-mail: zigangirova@mail.ru

Key words: virulence factors, chronic infections, therapy, prevention, antivirulence drug.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

The most important goal of medical microbiology in terms of treating infectious diseases nowadays and in the coming decades will be the development of antibacterial agents that are effective against resistant pathogens and reduce the selection of antimicrobial resistance. In this regard, along with the search for new classic antibiotics, it is necessary to develop alternative strategies. Virulence factors that determine the key stages of the infection process, both acute and chronic, including adhesins, toxins, bacterial quorum sensing, secretory systems, could be potential targets. The strategy for the development of antivirulence drugs is already showing its potential in the treatment of nosocomial, complicated and chronic infections as part of complex therapy and for prevention. The review presents the results of studies of drugs that have already shown efficacy in model infections in animals or have either passed to the stage of clinical trials or have already been registered. The development of effective combination therapy regimens will minimize the risks of acquiring resistance.

### Введение

В силу механизма действия классические антимикробные препараты (АМП), вызывая гибель микробов, оказывают жесткое селективное давление и отбор резистентных вариантов. В результате этого уже буквально через 1–2 года после начала клинического применения новых АМП развивается генетически обусловленная резистентность, детерминанты которой стремительно распространяются и накапливаются как в составе па-

тогенной, так и резидентной флоры. Главный вывод из многолетнего опыта борьбы с антибиотикорезистентностью – необходимо снизить селективное давление препаратов на патогены, т.е. изменить парадигму лечения инфекций: «Лекарство должно не убивать бактерии, а подавлять вирулентность» [1, 2]. Такой подход принципиально снизит риск развития резистентности, при этом подавление вирулентности позволит ограничить прояв-

ление симптомокомплекса заболевания и даст возможность иммунной системе справиться с маловирулентным микробом [3, 4]. Эта парадигма распространяется на лечение как острых, так и хронических инфекций, поскольку для последних низкая эффективность антибиотикотерапии представляет серьезную проблему. Таким образом, наряду с поиском новых АМП, все большее значение приобретает альтернативный подход, направленный на разработку принципиально нового класса АМП, не действующих на жизнеспособность, мишенями которых являются факторы патогенности, значимые для развития инфекции и персистенции [5]. Такие препараты будут эффективны вне зависимости от приобретенной патогенами резистентности и смогут применяться как самостоятельно, так и в составе комбинированной терапии [6]. Подавление вирулентности дает основание прогнозировать снижение или отсутствие селективного давления и отбора резистентных штаммов бактерий. В том случае, если будет индуцироваться резистентность к этим новым препаратам, то их специфичность в отношении конкретных патогенов не приведет к распространению и накоплению детерминант резистентности среди другой микрофлоры. Для каждого заболевания следует учитывать особенности вирулентности возбудителя и применять такую комбинированную терапию, которая позволит минимизировать эволюцию бактерий в приобретении резистентности [6].

Среди известных мишеней для разработки антивирулентных препаратов выбираются различные факторы патогенности: токсины, секреторные системы, факторы адгезии, молекулы системы «quorum sensing», факторы образования биопленок. Разработка таких АМП – перспективное направление, которое в настоящее время очень активно развивается в различных научных центрах и фармацевтических компаниях [7, 8]. Количество публикаций, посвященных этой проблеме, имеет выраженную тенденцию к росту: по данным Web of Science, в 2019 г. их число составило 1033, тогда как в 2000 г. насчитывалось всего 176 публикаций. Однако на сегодняшний день многие выбранные ингибиторы находятся на стадии научных разработок или доклинических испытаний (ДКИ); лишь несколько проходят клинические исследования (КИ) и только единицы зарегистрированы Управлением США по контролю за продуктами питания и лекарственными препаратами (FDA) [8, 9].

Данный обзор посвящен наиболее значимым результатам в области создания препаратов с альтернативным механизмом действия для лечения инфекций мочевых путей (ИМП), вызванных антибиотикорезистентными бактериями. Важно отметить, что в большинстве стран мира ИМП являются актуальной проблемой здравоохранения [10]. Наиболее распространенными возбудителями ИМП выступают *Escherichia coli* и другие энтеробактерии, при осложненных ИМП определенное значение имеют также стафилококки, энтерококки и *Pseudomonas aeruginosa* [11]. В статье мы рассмотрим наиболее перспективные мишени для подавления антивирулентными препаратами, для которых ингибиторы либо показали свою эффективность на модельных ин-

фекциях у животных, либо перешли на стадию клинических исследований, либо уже зарегистрированы.

## 1. Поверхностные структуры бактерий, обеспечивающие адгезию

Уропатогенная кишечная палочка (УРЕС) – основной возбудитель ИМП, при которой проводимая антибактериальная терапия очень часто приводит к развитию антибиотикорезистентности. Адгезия как первый этап колонизации эпителия мочевого пузыря и прикрепление к абиотическим поверхностям, например к поверхности катетеров, является важным звеном патогенеза ИМП, а, значит, и перспективной мишенью для подавления антивирулентными препаратами. Адгезия *E. coli* происходит при участии пилей, на конце которых находятся молекулы белка-адгезина FimH, взаимодействующие с остатками маннозы на поверхности эпителиальных клеток [12]. Благодаря прикреплению к эпителию клетки бактерий не удаляются из организма с мочой.

Для блокирования адгезии существует несколько стратегий. В первую очередь поиск аналогов маннозы, препятствующих связыванию белка FimH с клеточными рецепторами и тем самым подавляющих адгезию УРЕС [13–15]. Низкомолекулярное соединение маннозид, агонист FimH, в результате специфического связывания с маннозо-связывающим лектиновым доменом FimH подавляло его функцию и блокировало связывание патогена с уроэпителием мочевого пузыря (Fimbrion).

В другом исследовании на основе методов молекулярного докинга были выбраны соединения класса N-ацетилгалактозаминозидов, которые конкурентно ингибировали белок FimH пилей УРЕС *in vitro* и подавляли ИМП на модели у мышей [16]. Публикаций о дальнейших разработках этих ингибиторов не найдено.

Известно, что резервуаром УРЕС служит кишечник, колонизация эпителия которого происходит также при участии пилей. Для подавления адгезина FimH было получено новое низкомолекулярное соединение EB8018 (Enterome), которое после перорального приема распределялось исключительно в кишечнике и селективно подавляло вирулентность *Enterobacteriaceae* (адгезивные/инвазивные *E. coli*), не нарушая при этом микробиом кишечника. Соединение EB8018 ингибировало связывание патогенных бактерий с рецепторами эпителия кишечника и подавляло воспаление. После успешного проведенных КИ фазы I, в которых был показан благоприятный профиль переносимости, фирма Enterome начала исследования фазы II этого препарата для лечения пациентов с болезнью Крона (Enterome NCT03709628).

Вирулентность ряда грамположительных бактерий определяется наличием мембраноассоциированного фермента с транспептидазной активностью, сортазой A (SrtA), которая участвует в процессе расщепления и ковалентного связывания до 25 белков клеточной стенки с пептидогликаном. У *S. aureus* большая часть таких белков является значимыми факторами вирулентности, обеспечивающими адгезию, предотвращение фагоцитоза и взаимодействие с иммунной системой. Мутации

в гене *srtA* приводят к значительному снижению вирулентности и элиминации патогена из зараженного организма. Сортаза А рассматривается в качестве очень перспективной мишени для подавления инфекций, вызванных грамположительными бактериями, во-первых, в силу того, что поверхностные структуры могут быть более доступны для ингибиторов по сравнению с внутриклеточными мишенями, а во-вторых, подавление активности сортазы А не приводит к гибели бактерий, что соответствует принципу действия антивирулентных препаратов [17]. К настоящему времени известно несколько классов ингибиторов сортазы А *S. aureus*, среди которых пептиды, растительные экстракты, низкомолекулярные соединения [18]. Так, препарат триазолотиадиазол, отобранный в результате скрининга библиотеки низкомолекулярных соединений, на экспериментальной модели сепсиса, вызванного *S. aureus*, показал повышение выживаемости мышей [18]. Более того, для триазолотиадиазола было выявлено перекрестное взаимодействие с другими патогенными бактериями, что позволит разработать препарат широкого спектра действия.

Среди растительных препаратов хорошую активность показало природное соединение класса флавоноидов – акацетин, который ингибирует активность SrtA *S. aureus*. С использованием метода молекулярного динамического моделирования было показано, что молекула акацетина стерически соответствует карману белка SrtA между двумя аминокислотными остатками Arg-139 и Lys-140, что обеспечивает конформационное связывание [19]. На модели у животных акацетин защищал мышей от образования почечных абсцессов, вызванных *S. aureus*, и значительно повышал выживаемость. Таким образом, акацетин представляет собой перспективную молекулу для разработки препарата для лечения стафилококковых инфекций, в том числе вызванных метициллинорезистентными штаммами золотистого стафилококка (MRSA).

## 2. Бактериальные токсины

Бактериальные токсины определяют симптомокомплекс заболевания и являются очевидной мишенью для подавления и для блокирования антителами (АТ). Уже известны одобренные FDA для клинического применения АТ против токсинов *Clostridium botulinum*, *Bacillus anthracis* и *Clostridioides difficile*. Так, человеческие моноклональные антитела (мАТ) – безлтоксумаб (Merck), связывающиеся с токсином В *C. difficile*, показали эффективность при профилактике рецидивирующих кишечных инфекций клостридиальной этиологии у групп высокого риска [8]. В данном обзоре мы подробно рассмотрим иммунобиологические препараты, ингибирующие токсины *S. aureus*.

Вирулентность *S. aureus*, в том числе MRSA, во многом обусловлена продукцией  $\alpha$ -токсина ( $\alpha$ -гемолизина IIa).  $\alpha$ -Токсин – высококонсервативный белок, обладающий мембраноповреждающим действием, который вызывает тканевую деструкцию, апоптоз лейкоцитов и эндотелиальных клеток, что способствует бактери-

альной диссеминации и нарушению иммунного ответа. Следовательно, нейтрализация  $\alpha$ -токсина потенциально способна предупредить повреждение тканей и ограничить диссеминацию инфекции [20].

Были получены мАТ, связывающиеся с высокой аффинностью с консервативной областью  $\alpha$ -токсина, которая характерна более чем для 97% клинических изолятов *S. aureus*. Нейтрализация  $\alpha$ -токсина, обусловленная двумя механизмами – стерическим блокированием связывания  $\alpha$ -токсина с его клеточным рецептором и блокированием образования гептамерной конформации токсина, определяющей его литические свойства, приводила к подавлению летальной пневмонии у мышей. Разработанный на основе мАТ препарат MEDI4893 (Medimmune) в доклинических исследованиях показал протективные свойства на различных моделях у животных при его профилактическом применении [21].

Важно отметить, что полученные АТ нейтрализуют все 12 генотипических вариантов  $\alpha$ -токсина различных клинических изолятов *S. aureus*. В рамках успешно завершённой I фазы КИ было показано, что после однократного внутривенного введения MEDI4893 здоровым добровольцам 2250 и 5000 мг нейтрализующие  $\alpha$ -токсин АТ в высоких титрах выявлялись в сыворотке и слизистой носоглотки до 121 дня, что предполагает создание при таком режиме введения профилактического эффекта против системной стафилококковой инфекции как минимум в течение 2 мес. [22].

В 2018 г. были завершены КИ II фазы этого препарата для профилактики вентилятор-ассоциированной пневмонии (ВАП), вызванной *S. aureus* [23]. В исследование было включено 285 пациентов с высоким риском развития стафилококковой инфекции в условиях длительной интубации и искусственной вентиляции легких. Первичной конечной точкой эффективности являлось развитие клинических симптомов пневмонии или других заболеваний, связанных с инфицированием *S. aureus*, при наблюдении в течение 361 дня. В настоящее время продолжается наблюдение за включенными пациентами.

Другая фармацевтическая компания, Aridis, используя аналогичную стратегию по нейтрализации  $\alpha$ -токсина *S. aureus*, разработала препарат на основе гуманизированных мАТ – AR-301 (Salvecin), который позиционируется для лечения в составе комбинированной антибактериальной терапии (АМТ) нозокомиальной пневмонии (НП) и ВАП, вызванных как MRSA, так и MSSA [24].

Проведенные КИ фазы IIa показали, что пациенты, получавшие препарат AR-301, меньшее время находились на ИВЛ и демонстрировали более эффективную эрадикацию *S. aureus* в сравнении с пациентами на стандартной АМТ. Препарат показал хороший профиль переносимости и в настоящее время проходит расширенные КИ фазы III [22].

Препарат ASN-1 (Arsanis) разработан на основе «коктейля» АТ, которые нейтрализуют не только  $\alpha$ -токсин, но и 3 других представителя семейства лейкоцинов *S. aureus*. Этот препарат показал эффективное нейтрализующее действие в отношении всех четырех токсинов и снижал летальность у животных в моделях

пневмонии и сепсиса, вызванных *S. aureus*. Однако другой препарат мАТ, ASN-100, блокирующий 5 белков *S. aureus* ( $\alpha$ -токсин, PVL, LukED, LukGH,  $\gamma$ -гемолизин), не показал эффективность в КИ фазы II.

### 3. Система quorum sensing и биопленки

Бактериальные системы коммуникации или регуляторные системы типа quorum sensing (QS) играют ключевую роль во многих процессах бактериальной клетки и популяции в целом. Они участвуют в регуляции вирулентности бактерий; формировании биопленок; контроле экспрессии генов, связанных с синтезом токсинов и различных ферментов; во взаимодействии с клеткой хозяина и т.д. Скоординированные действия бактерий способствуют эффективному проявлению вирулентных свойств, развитию лекарственной устойчивости и успешному преодолению ими иммунного ответа инфицированного организма [25]. Именно эта глобальная система регуляции вирулентности привлекает огромное внимание исследователей в качестве мишени для подавления как вирулентности, так и формирования биопленок, чрезвычайно усложняющих лечение инфекций [26, 27]. Такой интерес объясняется, во-первых, консервативностью этой регуляторной системы среди бактерий различных таксономических групп; во-вторых, патогенетическим значением и участием во многих процессах, обеспечивающих вирулентность патогенов и, в-третьих, достаточно детальным пониманием молекулярных механизмов QS-системы, а значит, возможностью очень направленно выбирать ингибиторы к конкретным мишеням – белкам и их активным доменам [8, 28, 29].

QS-система как сложно устроенная регуляторная сеть в самом упрощенном виде состоит из нескольких обязательных компонентов: низкомолекулярных сигнальных молекул – аутоиндукторов, рецепторных белков, с которыми аутоиндукторы связываются, и факторов регуляции транскрипции. При повышении популяции бактерий до критического уровня количество аутоиндукторов увеличивается, они взаимодействуют с рецепторными белками, комплексы рецепторный белок – аутоиндуктор связываются с промоторными областями генов-мишеней, в результате чего происходит активация экспрессии специфических генов, значимых для вирулентности [30].

За последние годы было идентифицировано большое количество молекул природного и синтетического происхождения, а также ферменты и АТ, подавляющие QS. Эти соединения действуют на различные звенья системы регуляции QS по разным механизмам, среди которых инактивация рецепторов QS, ингибирование синтеза аутоиндукторов, их ферментативная деградация или связывание АТ [31–34].

Для многих выбранных соединений показана эффективность на моделях инфекций у животных как при монотерапии, так и при комбинированном использовании с АМП, однако еще не получено достаточное количество данных об успешности таких препаратов при лечении заболеваний у людей [35]. Несмотря на то что для

ряда таких ингибиторов показана токсичность и неблагоприятный фармакокинетический профиль, что ограничивает возможность их дальнейшей разработки, исследования в этой области активно продолжаются [26, 36].

Наибольшее внимание уделяется скринингу и изучению соединений, инактивирующих рецепторы, и прежде всего – по механизму конкурентного ингибирования благодаря структурному сходству с аутоиндукторами. Среди них – природные антагонисты QS-аутоиндукторов: флавоноиды, синтетические молекулы, структурные аналоги аутоиндукторов грамотрицательных бактерий, N-ацилгомосеринлактонов [37].

Для некоторых антагонистов рецепторов показано, что они подавляли экспрессию факторов вирулентности *Pseudomonas aeruginosa*, что позволяло снизить терапевтическую дозу АМП при лечении модельных синегнойных инфекций. Были получены синтетические лиганды к различным рецепторам системы QS – LuxR, TraR, и LasR у *Vibrio fischeri*, *Agrobacterium tumefaciens* и *P. aeruginosa*, подавляющие вирулентность *in vitro* и *in vivo* [38]. Однако применение ингибиторов рецепторов QS для лечения бактериальных инфекций у человека до настоящего времени не показало эффективности, в том числе из-за нестабильности и быстрой деградации молекул ингибиторов.

При поиске антивирулентных препаратов к конкретным мишеням известен подход, который направлен на скрининг уже используемых в клинической практике препаратов с целью выявления у них новых активностей. Так, азитромицин в субингибирующих концентрациях подавляет синтез аутоиндуктора *P. aeruginosa* [39]. Практически только для азитромицина как ингибитора системы QS были проведены клинические исследования на небольшой популяции пациентов, у которых было продемонстрировано снижение экспрессии генов, регулируемых при участии QS. Однако КИ фазы II по изучению эффективности азитромицина как ингибитора системы QS при лечении ВАП с участием 92 пациентов не показали эффективности и были остановлены.

В другом исследовании в качестве мишени для поиска ингибиторов среди лекарственных средств, одобренных FDA, был выбран глобальный транскрипционный фактор QS-системы PqsR *P. aeruginosa*. В результате скрининга более 1600 препаратов были выбраны два фунгицидных препарата, клотримазол и миконазол, а также АМП, эффективный в отношении грамположительной флоры, – клофоктал [40].

Последний препарат проявлял наилучшую активность, специфически ингибируя активность генов вирулентности, находящихся под контролем *pqs*-оперона, что приводило к подавлению продукции пиоцианина и сидерофоров, блокированию подвижности псевдомонад и образования биопленки. Важно отметить, что ингибирование экспрессии гена *pqs* QS-системы было показано и для клинических изолятов, полученных от больных муковисцидозом при хронической синегнойной инфекции.

Изучение молекулярной структуры отдельных белков регуляторного каскада QS, получение их 3D структур позволяет использовать методы компьютерного дизайна,

что существенно ускоряет процесс поиска специфических ингибиторов [41]. Среди успешных в этом направлении работ можно отметить выбор низкомолекулярного ингибитора транскрипционного регулятора AggA *S. aureus*. Ингибитор савирин эффективно блокировал Agg-зависимую экспрессию генов у *S. aureus* всех генотипов и показал защиту от дерматонекротических поражений, вызванных *S. aureus* [42]. Более того, не наблюдали ингибирующего действия Agg на экспрессию генов *Staphylococcus epidermidis* – представителя нормальной микробиоты кожи человека.

Среди препаратов природного происхождения, для которых показано наличие действия на биопленки, перспективным представляется соединение байкалин (Baicalin) – экстракт Шлемника байкальского, растения, которое хорошо известно в китайской медицине. Для байкалина было показано, что он подавляет образование биопленок *P. aeruginosa*, а также усиливает действие различных АМП на биопленки *in vitro*. Байкалин оказывал ингибирующее действие на многие факторы вирулентности псевдомонад, которые регулируются системой QS [43]. Изучение механизма действия этого соединения показало, что байкалин подавляет экспрессию регуляторных генов QS, ответственных за продукцию сигнальных молекул обеих QS-систем *P. aeruginosa*, LasI LasR и RhII RhIR. Байкалин в эксперименте ингибировал продукцию аутоиндуктора N-3(оксодеканоил)-гомосеринлактона (3OC12-HSL), который регулирует синтез факторов вирулентности, ответственных за разрушение тканей организма при инфекции *P. aeruginosa*, а также инактивировал вторую QS-систему *P. aeruginosa*. RhII-синтаза определяет продукцию второго аутоиндуктора этой бактерии – N-бутирил-гомосеринлактона (C4-HSL), принимающего участие в контроле экспрессии нескольких генов, важных для вирулентности бактерий и их выживания в природных условиях. На моделях *in vivo* при заражении нематод *Caenorhabditis elegans* и мышей наблюдали антибактериальную эффективность этого соединения. Изучение уровня цитокинов у зараженных псевдомонадами мышей показало, что на фоне лечения байкалином снижается уровень ИЛ-4, а продукция интерферона гамма (IFN- $\gamma$ ) повышается. Такое изменение цитокинового профиля свидетельствует об активации Th1-опосредованного иммунного ответа, ответственного за эрадикацию бактериальных патогенов. Таким образом, байкалин, для которого охарактеризована химическая структура и показан молекулярный механизм действия, может служить перспективным соединением для разработки антивирулентных препаратов и проведения клинических исследований. Более того, уже известны препараты, содержащие байкалин, которые используются в традиционной китайской медицине как адьювантные при лечении инфекционных заболеваний и показавшие безопасность. К тому же, FDA активно поддерживает разработку препаратов на основе природных соединений, в том числе тех, которые используются в китайской медицинской практике.

Как уже упоминалось, регуляция социального поведения бактерий непосредственно связана с форми-

рованием биопленок. Способность патогенных бактерий формировать биопленки серьезно осложняет течение ИМП и лежит в основе инфекций, распространяемых посредством медицинского оборудования. Биопленки принципиально затрудняют АМТ, при которой необходимо использовать значительно более высокие дозы АМП и комбинировать несколько препаратов. Среди стратегий по борьбе с бактериями в составе биопленок можно выделить следующие: предотвращение адгезии, блокирование биосинтеза полисахаридов и белковых компонентов матрикса биопленки, разрушение матрикса и подавление системы регуляции QS [44, 45].

Среди наиболее успешных разработок – АТ против альгината *P. aeruginosa*, матриксного полисахарида, обеспечивающего адгезию бактерий, образование биопленок, защиту от АМП и факторов иммунитета [46]. Для препарата AR-105 (Aerucin) на основе человеческих мАТ показано ингибирование формирования биопленок у широкого круга клинических изолятов псевдомонад в силу консервативности структуры мишени – молекулы альгината. Препарат показал эффективность в снижении летальности на моделях синегнойной пневмонии и бактериемии у мышей, а также при комбинированной с АМП терапии в модельных инфекциях.

Для этого препарата была разрешена ускоренная процедура рассмотрения FDA для проведения клинических исследований и включения его в стандартную схему АМТ в качестве дополнительной терапии. В рамках I фазы КИ у 16 здоровых добровольцев была показана безопасность для достаточно высоких доз, вплоть до 20 мг/кг. В конце 2019 г. были завершены многоцентровые КИ фазы II по изучению эффективности препарата AR-105 (Aerucin) в качестве дополнения к стандартной схеме АМТ для лечения пневмонии, вызванной *P. aeruginosa*, которые проводились в 100 клинических центрах 17 стран с включением 158 пациентов. Результаты этого исследования на сайте Clinicaltrials.gov еще не представлены.

В целом за последнее время получено большое количество ингибиторов системы QS, которые очень эффективны в подавлении вирулентности бактерий и снижают патологические изменения в организме инфицированных лабораторных животных. Для многих показан специфический эффект в отношении конкретных сигнальных путей, регулирующих вирулентность бактерий, а, значит, не влияющих на жизнеспособность и снижающих риск развития резистентности. Однако большинство ингибиторов QS пока находятся на стадии доклинической разработки, и требуется еще подтверждение их безопасности и обоснованности использования в КИ. На основании пока еще небольшого количества данных по применению стратегии подавления системы коммуникации бактерий для лечения инфекций, вызванных резистентными патогенами, полученных как на моделях инфекций у животных, так и у людей, становится понятным, что в настоящий момент наиболее обоснованным подходом является комбинированная терапия на основе ингибиторов QS и АМП [27].

#### 4. Секреторные системы бактерий

Бактерии вооружены секреторными системами – эффективными средствами доставки своих макромолекул, многие из которых являются токсинами и ферментами, необходимыми для проявления патогенеза и обеспечения выживания в различных тканях. В настоящее время известно 8 секреторных систем, которые отличаются по своей структуре, таксономической принадлежности и функциональной активности. Играя фундаментальную роль в реализации вирулентности, они представляют собой потенциальные мишени для подавления. Наибольший интерес в этом отношении вызывает система секреции III типа (ССТТ), которая хорошо известна тем, что именно она определяет вирулентность широкого круга грамотрицательных бактерий с разным характером паразитирования и крайне необходима для проявления патогенеза целого спектра вызываемых ими заболеваний. ССТТ присутствует только у патогенных микробов, т.е. отсутствует у представителей нормальной микрофлоры [47]. Главным отличием ССТТ от других систем секреции является то, что она секретирует факторы патогенности непосредственно в цитоплазму эукариотической клетки после контакта с клеткой и формирования поры в мембране, что обеспечивает крайне эффективное действие бактериальных белков-эффекторов на сигнальные пути клетки-мишени. Это позволяет очень эффективно подавлять защиту хозяина, убивая клетки врожденного иммунитета, способствуя установлению инфекции и дальнейшей диссеминации [48]. Секреция факторов патогенности важна для всех этапов инфекционного процесса – как острого, так и хронического. Таким образом, ССТТ – очень перспективная мишень для подавления ключевых звеньев патогенеза, но без подавления жизнеспособности, а ее консервативность дает основание разработать препарат широкого спектра действия [49, 50].

На сегодняшний день идентифицировано несколько классов низкомолекулярных веществ, специфически ингибирующих ССТТ грамотрицательных бактерий. Помимо низкомолекулярных соединений, ингибиторы ССТТ также представлены полимерами, белками, полипептидами-миметиками, полисахаридами. Для нескольких ингибиторов были выявлены конкретные мишени в ССТТ, но большинство молекулярных мишеней для ингибиторов ССТТ еще предстоит идентифицировать или охарактеризовать [49, 51, 52].

По механизму воздействия на ССТТ ингибиторы могут быть разделены на следующие группы:

- действующие на генетическую регуляцию СССТ (гидразоны салицилового альдегида, N-гидроксибензимидазолы, растительные фенольные соединения);
- действующие на функционирование аппарата ССТТ (гидроксихинолины, тиазолидиноны, фенилацетамиды, тиadiaзины, PcrV-антитела, PcrV/Psl-антитела);
- действующие на эффекторные белки ССТТ (экзоцин, арильные сульфаниламиды, псевдолипаза А).

Одними из первых хорошо описанных ингибиторов ССТТ являются соединения класса гидразонов салицилового альдегида, активные в отношении широкого круга бактерий, таких как *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella enterica* серовар Typhimurium, *Shigella* spp., *Chlamydia* spp., *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa* и растительного патогена *Erwinia amylovora* [52, 53]. Возможным механизмом действия ингибиторов является подавление транскрипции оперона, кодирующего ССТТ *P. aeruginosa*. Результаты исследований на моделях у животных демонстрировали снижение клинических симптомов инфекций, вызванных *S. enterica* серовар Typhimurium и *Citrobacter rodentium*, после терапии гидразонами салицилового альдегида [54]. Действие наиболее эффективного ингибитора этого класса, INP0341, на *P. aeruginosa* было показано на модели ожоговой инфекции у мышей. Аппликационная терапия INP0341 достоверно повышала продолжительность жизни у животных в группе лечения, однако не предотвращала системное распространение инфекции и гибель мышей [54].

К недостаткам соединения INP0341 можно отнести неудовлетворительные фармакокинетические параметры, не позволяющие достигать высоких концентраций в плазме крови, а также короткий период полувыведения этого вещества. Таким образом, гидразоны салицилового альдегида могут рассматриваться как перспективные препараты на основе специфических ингибиторов ССТТ широкого круга грамотрицательных бактерий.

Гидроксихинолины, ингибиторы функционирования аппарата ССТТ, были получены путем скрининга библиотеки из 17500 низкомолекулярных органических соединений. Было показано, что гидроксихинолин INP1855 подавлял секрецию отрицательного регулятора транскрипции ExsE, эффекторного белка ExoS и белка FliC, компонента жгутика *P. aeruginosa*, и это дало основание предположить, что у гидроксихинолинов в ССТТ и во флагелле может быть общая мишень. Исследование механизма действия указывают на то, что такой мишенью INP1855 может быть АТФаза ССТТ и жгутика [55].

Препарат INP1855 на модели острой синегнойной пневмонии у мышей уменьшал повреждение легких и снижал бактериальную нагрузку, а также ограничивал диссеминацию бактерий. При этом было показано уменьшение притока нейтрофилов и макрофагов в очаг инфекции, а также значительное уменьшение уровня ИЛ-1 $\beta$  и повышение уровня ИЛ-17 в бронхоальвеолярном лаваже, что говорит о купировании острого воспаления. Работа с гидроксихинолинами продолжается, однако данных о переходе разработок на стадию КИ в литературе пока не найдено [55].

Среди ингибиторов, подавляющих функционирование ССТТ, отдельно можно выделить препараты на основе специфических АТ. Одним из таких препаратов на основе АТ сразу к двум мишеням является MEDI3902 (MedImmune). MEDI3902 – это гуманизированные бивалентные биспецифические мАТ, действие которых направлено на инактивацию белка «кончика иглы» ССТТ PcrV *P. aeruginosa* и на связывание экзополисахарида

Таблица 1. Антивирулентные препараты, для которых проводятся КИ (по данным www.Clinicaltrials.gov)

Название, компания	Фаза КИ	Мишень действия	Препарат	Назначение
MEDI 4893 Medimmune	II фаза	$\alpha$ -токсин Hla <i>S. aureus</i>	мАТ	Профилактика <i>S. aureus</i> инфекций, ассоциированных с ИВЛ
AR-301 Aridis	III фаза	$\alpha$ -токсин Hla <i>S. aureus</i>	мАТ	В составе комплексной терапии <i>S. aureus</i> инфекций, ассоциированных с ИВЛ
MEDI 3902 Medimmune	II фаза	<i>P. aeruginosa</i> PcrV (система секреции) + Psl (экзополисахарид)	Биспецифические мАТ	Профилактика <i>P. aeruginosa</i> инфекций, ассоциированных с ИВЛ
AR-105 Aridis	II фаза	Альгинат (компонент биопленок) <i>P. aeruginosa</i>	мАТ	В составе комплексной терапии <i>P. aeruginosa</i> инфекций, ассоциированных с ИВЛ
514G3 XBiotech	I/II фаза	Белок SpA <i>S. aureus</i>	мАТ	В составе комплексной терапии бактериемий, вызванных <i>S. aureus</i>
ASN-100 Arsanis	II фаза	$\alpha$ -токсин Hla <i>S. aureus</i> + лейкоцидины	мАТ	Лечение <i>S. aureus</i> инфекций, ассоциированных с ИВЛ – остановлены
EB8018 Enterome	I фаза	Адгезин FimH UPEC	Низкомолекулярное соединение для перорального применения	В составе комплексной терапии болезни Крона
Фтортиазинон ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России	II фаза	ССТТ <i>P. aeruginosa</i> , <i>Chlamydia</i> spp., <i>Salmonella</i> spp., <i>Burkholderia</i> <i>cenoseptica</i>	Низкомолекулярное соединение для перорального применения	В составе комплексной терапии осложненных ИМП

Psl. Препарат MEDI3902 снижал цитотоксичность клинических изолятов, экспрессирующих PcrV и Psl [56].

Согласно результатам проведенных ДКИ, MEDI3902 оказывал протективный эффект на модели острой летальной пневмонии, вызванной *P. aeruginosa*, а также на модели бактериемии и ожоговой инфекции [57]. Было выявлено, что MEDI3902 защищает от повреждений ткань легкого, снижает бактериальную нагрузку и предотвращает распространение патогена в селезенку и почки. MEDI3902 прошел I фазу КИ, а в конце 2019 г. завершил II фазу КИ у пациентов на ИВЛ с нозокомиальной синегнойной инфекцией.

В ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России был разработан новый низкомолекулярный ингибитор ССТТ, относящийся к классу 2,4-дизамещенных-4Н- [1,3,4]-тиадиазин-5-онов. Соединение было получено в результате экспериментального скрининга низкомолекулярных соединений различных классов и модифицировано с целью улучшения физико-химических свойств, таких как растворимость, стабильность и токсичность для эукариотических клеток [58]. Механизм действия, связанный с подавлением функционирования ССТТ, был продемонстрирован *in vitro* для псевдомонад, хламидий и сальмонелл, что приводило к блокированию токсичности в отношении клеток хозяина и ингибированию внутриклеточного выживания патогенов, при этом не наблюдали прямого антибактериального действия *in vitro*. Кроме того, было показано, что ингибитор подавлял формирование биопленок *P. aeruginosa* и *Burkholderia cenoseptica* на поверхности эукариоти-

ческих клеток. Проведенные исследования возможности формирования устойчивости показали, что в отличие от АМП чувствительность к препарату не менялась в условиях длительного пассирования в присутствии препарата, что было продемонстрировано *in vitro* и на модельных инфекциях у животных.

Терапевтическая эффективность ингибитора была показана на моделях септической инфекции, вызванной синегнойной палочкой и сальмонеллами, на модели синегнойной пневмонии и ожоговой инфекции, на модели хронической урогенитальной хламидийной инфекции [59–62]. Лечение ингибитором приводило к увеличению выживаемости животных, эрадикации возбудителей из крови и тканей. На модели пневмонии и ожоговой инфекции снижалась частота развития бактериемии, характерной для этих инфекций. Препарат демонстрировал равную эффективность с АМП в отношении подавления острого инфекционного процесса и эрадикации возбудителя из организма животных в сопоставимых с АМП дозах. Была показана эффективность профилактического применения и подавление хронического инфекционного процесса. Применение препарата на животных не оказывало негативного действия на кишечную микрофлору.

Разработанный лекарственный препарат на основе полученного ингибитора в виде таблеток Фтортиазинон, 300 мг, завершил ДКИ и I фазу КИ, что позволило продемонстрировать благоприятный профиль переносимости. С 2018 г. проводятся КИ II фазы «Многоцентровое плацебо-контролируемое исследование безопасности и эф-

фективности препарата фтортиазинон при лечении пациентов с осложненными ИМП, вызванными *P. aeruginosa* и прочими патогенами», в которое будет включено 780 пациентов. Все пациенты в качестве базовой терапии получают парентерально цефепим. Завершенный к настоящему времени 1 этап исследования с включением 240 пациентов показал, что общая частота нежелательных явлений в группе лечения была статистически значимо ниже в сравнении с группой плацебо на 27,7% ( $p = 0,003$ ). Оценка эффективности фтортиазинона по первичной конечной точке эффективности у пациентов, имевших выделенный патоген *P. aeruginosa* на исходном уровне в моче, показала выраженную тенденцию к лучшим показателям доли пациентов, имеющих устойчивое клиническое излечение и устойчивую микробиологическую эрадикацию, в группе лечения фтортиазином в дозе 600 мг/сут в комбинации с цефепимом (2 г/сут парентерально) по сравнению с группой плацебо в комбинации с цефепимом (78,6% и 53,8% соответственно).

Таким образом, на примере секреторной системы бактерий в качестве мишени для разработки антивирулентных препаратов удалось продемонстрировать, что препараты, которые не влияют на размножение бактерий, подавляют инфекционный процесс и элиминируют возбудитель из организма при использовании в сопоставимых с АМП концентрациях [59, 60, 62].

## Заключение

Разработка новых эффективных АМП – не только важная научная, но и социальная задача, поскольку население нашей планеты стало антибиотикозависимым за короткое время – за 70 лет со дня открытия АМП.

Полученный к настоящему времени опыт разработки и клинических исследований препаратов с принципиально новым механизмом действия дает основание сделать предварительные выводы.

Для терапии антивирулентными препаратами наиболее востребованными нозологиями могут быть вну-

трибольничные инфекции, ВАП, осложненные ИМП и инфекции мягких тканей, для которых в наибольшей степени актуальна проблема антибиотикорезистентности. На первых этапах исследований и применения антивирулентной терапии новые препараты должны быть использованы в составе комплексной терапии. Разработка эффективных схем комбинированной терапии позволит минимизировать риски приобретения резистентности. В дальнейшем при доказательстве высокой эффективности антивирулентной терапии полученные препараты, возможно, смогут использоваться самостоятельно, что позволит снизить количество применяемых АМП. Кроме того, специфичность действия препаратов в отношении конкретных факторов вирулентности обеспечит отсутствие побочных эффектов и повреждающего действия на нормальную микрофлору.

В целом ряде работ была продемонстрирована эффективность профилактического использования препаратов как на основе АТ, так и низкомолекулярных ингибиторов различных этапов взаимодействия патогена с организмом хозяина, среди которых значимые для персистенции бактерий, что крайне актуально для профилактики хронических рецидивирующих инфекций. Совершенно очевидно, что потребность в препаратах для лечения хронических инфекций охватывает значительный контингент больных, недополучающих необходимое эффективное лечение, что определяет перспективы, в том числе экономические, для разработки новых лекарственных препаратов.

Применение антивирулентных препаратов основано на понимании патогенеза заболеваний, вызванных конкретными возбудителями, что потребует разработки быстрой и точной диагностики, позволяющей также более эффективно и обоснованно применять АМП и в целом совершенствовать и персонализировать лечение.

## Благодарность

Выражаем благодарность академику Гинцбургу А.Л. за консультации при подготовке обзора.

## Литература

1. Clatworthy A.E., Pierson E., Hung D.T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat Chem Biol.* 2007;3:541-548. DOI: 10.1038/nchembio.2007.24
2. Czaplewski L., Bax R., Clokie M., Dawson M., Fairhead H., Fischetti V. A. Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(2):239-251. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00466-1
3. Munguia J., Nizet V. Pharmacological targeting of the host-pathogen interaction: alternatives to classical antibiotics to combat drug-resistant superbugs. *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38:473-488. DOI: 10.1016/j.tips.2017.02.003
4. Allen R.C., Popat R., Diggle S.P., Brown S.P. Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? *Nat Rev Microbiol.* 2014;12:300-308. DOI: 10.1038/nrmicro3232
5. Payne D.J., Gwynn M. N., Holmes D.J., Pompliano D.L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6:29-40. DOI: 10.1038/nrd2201
6. Theuretzbacher U., Piddock L.J.V. Non-traditional antibacterial therapeutic options and challenges. *Cell Host Microbe.* 2019;26:61-72. DOI: 10.1016/j.chom.2019.06.004
7. Totsika M. Benefits and challenges of antivirulence



- antimicrobials at the dawn of the post-antibiotic era. *Curr Medicin Chem.* 2016;6:30-37. DOI: 10.2174/2210303106666160506120057
8. Dickey S.W., Cheung G.Y.C., Otto M. Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(7):457-471. DOI: 10.1038/nrd.2017.23, 457
  9. Rasko D.A., Sperandio V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(2):117-128. DOI: 10.1038/nrd3013
  10. Korneev I.A., Alekseeva T.A., Kogan M.I., Pushkar' D.Y. Epidemiology of urinary disorders in men in the Russian Federation. *Urologiia.* 2016;(2 Suppl 2):70-75. Russian. (Корнеев И.А., Алексеева Т.А., Коган М.И., Пушкарь Д.Ю. Эпидемиология расстройств мочеиспускания у мужчин Российской Федерации. *Урология.* 2016;(2 Приложение 2):70-75.)
  11. Flores-Mireles A.L., Walker J. N., Caparon M., Hultgren S.J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(5):269-284. DOI: 10.1038/nrmicro3432
  12. Spaulding C.N., Hultgren S.J. Adhesive pili in UTI pathogenesis and drug development. *Pathogens.* 2016;5(1):30. DOI: 10.3390/pathogens5010030
  13. Han Z., Pinkner J.S., Ford B., Obermann R., Nolan W., Wildman S.A., et al. Structure-based drug design and optimization of mannoside bacterial FimH antagonists. *J Med Chem.* 2010;53(12):4779-4792. DOI: 10.1021/jm100438s
  14. Totsika M., Kostakioti M., Hannan T.J., Upton M., Beatson S.A., Janetka J.W., et al. A FimH inhibitor prevents acute bladder infection and treats chronic cystitis caused by multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* ST131. *J Infect Dis.* 2013;208(6):921-928. DOI: 10.1093/infdis/jit245
  15. Maddirala A.R., Klein R., Pinkner J.S., Kalas V., Hultgren S.J., Janetka J.W. Biphenyl Gal and GalNAc FmlH lectin antagonists of uropathogenic *E. coli* (UPEC): optimization through iterative rational drug design. *J Med Chem.* 2019;62:467-479. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01561
  16. Kalas V., Hibbing M.E., Maddirala A.R., Chugani R., Pinkner J.S., Mydock-McGrane L.K., et al. Structure-based discovery of glycomimetic FmlH ligands as inhibitors of bacterial adhesion during urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115(12):E2819-E2828. DOI: 10.1073/pnas.1720140115
  17. Cascioferro S., Totsika M., Schillaci D. Sortase A. An ideal target for anti-virulence drug development. *Microb Pathog.* 2014;77:105-112. DOI: 10.1016/j.micpath.2014.10.007
  18. Zhang J., Liu H., Zhu K., Gong S., Dramsi S., Wang Y.T., et al. Antiinfective therapy with a small molecule inhibitor of *Staphylococcus aureus* sortase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(37):13517-13522. DOI: 10.1073/pnas.1408601111
  19. Bi C., Dong X., Zhong X., Cai H., Wang D., Wang L. Acacetin protects mice from *Staphylococcus aureus* bloodstream infection by inhibiting the activity of sortase A. *Molecules.* 2016;21:1285-1296. DOI: 10.3390/molecules21101285
  20. Kong C., Neoh H.M., Nathan S. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: a potential form of anti-virulence therapy. *Toxins.* 2016;8:72. DOI: 10.3390/toxins8030072
  21. Sharma-Kuinkel B.K., Wu Y., Tabor D.E., Mok H., Sellman B.R., Jenkins A., et al. Characterization of alpha-toxin hla gene variants, alpha-toxin expression levels, and levels of antibody to alpha-toxin in hemodialysis and postsurgical patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Clin Microbiol.* 2015;53(1):227-236. DOI: 10.1128/JCM.02023-14
  22. Yu X.Q., Robbie G.J., Wu Y., Esser M.T., Jensen K., Schwartz H.I., et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of MEDI4893, an investigational, extended-half-life, anti-*Staphylococcus aureus* alpha-toxin human monoclonal antibody, in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(1):e01020-16. DOI: 10.1128/AAC.01020-16
  23. Ruzin A., Wu Y., Yu L., Yu X-Q., Tabor D.E., Mok H., et al. Characterisation of anti-alpha toxin antibody levels and colonisation status after administration of an investigational human monoclonal antibody, MEDI4893, against *Staphylococcus aureus* alpha toxin. *Clin Transl Immunology.* 2018;e1009. DOI: 10.1002/cti2.1009
  24. Rouha H., Badarau A., Visram Z.C., Battles M.B., Prinz B., Magyarics Z., et al. Five birds, one stone: neutralization of alpha-hemolysin and 4 bi-component leukocidins of *Staphylococcus aureus* with a single human monoclonal antibody. *MAbs.* 2015;7(1):243-254. DOI: 10.4161/19420862.2014.985132
  25. Smith R.S., Iglewski B.H. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol.* 2003;6(1):56-60. DOI: 10.1016/s1369-5274(03)00008-0
  26. Martínez O.F., Cardoso M.H., Ribeiro S.M., Franco O.L. Recent advances in anti-virulence therapeutic strategies with a focus on dismantling bacterial membrane microdomains, toxin neutralization, quorum-sensing interference and biofilm inhibition. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:74. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00074
  27. Jiang Q., Chen J., Yang C., Yin Y., Yao K. Quorum sensing: a prospective therapeutic target for bacterial diseases. *Biomed Res Int.* 2019;2019:2015978. DOI: 10.1155/2019/2015978
  28. Amara N., Gregor R., Rayo J., Dandela R., Daniel E., Liubin N., et al. Fine-tuning covalent inhibition of bacterial quorum sensing. *Chembiochem.* 2016;17:825-835. DOI: 10.1002/cbic.201500676
  29. Defoirdt T. Quorum-sensing systems as targets for antivirulence therapy. *Trends Microbiol.* 2017;26:313-328. DOI: 10.1016/j.tim.2017.10.005
  30. Eickhoff M.J., Bassler B.L. SnapShot: bacterial quorum sensing. *Cell.* 2018;174(5):1328-1328.e1. DOI: 10.1016/j.cell.2018.08.003
  31. Bjarnsholt T., Jensen P.Ø., Rasmussen T. B., Christophersen L., Calum H., Hentzer M., et al. Garlic blocks quorum sensing

- and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology*. 2005;151:3873-3880. DOI: 10.1099/mic.0.27955-0
32. Kalia V.C. Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnol Adv*. 201;31:224-245. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.10.004
  33. Hraiech S., Hiblot J., Lafleur J., Lepidi H., Papazian L., Rolain J.-M., et al. Inhaled lactonase reduces *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and mortality in rat pneumonia. *PLoS One*. 2014;9:e107125. DOI: 10.1371/journal.pone.0107125
  34. Praneenararat T., Palmer A.G., Blackwell H.E. Chemical methods to interrogate bacterial quorum sensing pathways. *Org Biomol Chem*. 2012;10(41):8189-8199. DOI: 10.1039/c2ob26353j
  35. Furiga A., Lajoie B., Hage S.El, Baziard G., Roques C. Impairment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to antibiotics by combining the drugs with a new quorum-sensing inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;60(3):1676-86. DOI: 10.1128/AAC.02533-15
  36. Soheili V., Tajani A.S., Ghodsi R., Bazzaz B.S.F. Anti-PqsR compounds as next-generation antibacterial agents against *Pseudomonas aeruginosa*: a review. *Eur J Med Chem*. 2019;172:26-35. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.03.049
  37. Paczkowski E., Mukherjee S., McCready A.R., Cong J.P., Aquino C.J., Kim H., et al. Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing receptors. *J Biol Chem*. 2017;292(10):4064-4076. DOI: 10.1074/jbc.M116.770552
  38. Geske G.D., O'Neill J.C., Miller D.M., Mattmann M.E., Blackwell H.E. Modulation of bacterial quorum sensing with synthetic ligands: systematic evaluation of N-acylated homoserine lactones in multiple species and new insights into their mechanisms of action. *J Am Chem Soc*. 2007;129(44):13613-13625. DOI: 10.1021/ja074135h
  39. Kai T., Tateda K., Kimura S., Ishii Y., Ito H., Yoshida H., et al. A low concentration of azithromycin inhibits the mRNA expression of N-acyl homoserine lactone synthesis enzymes, upstream of lasI or rhII, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Pulm Pharmacol*. 2009;22(6):483-486. DOI: 10.1016/j.pupt.2009.04.004
  40. D'Angelo F., Baldelli V., Halliday N., Pantalone P., Polticelli F., Fiscarelli E., et al. Identification of FDA-approved drugs as antivirulence agents targeting the pqs quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(11). pii: e01296-18. DOI: 10.1128/AAC.01296-18
  41. Starkey M., Lepine F., Maura D., Bandyopadhyaya A., Lesic B., He J., et al. Identification of anti-virulence compounds that disrupt quorum-sensing regulated acute and persistent pathogenicity. *PLoS Pathog*. 2014;10(8):e1004321. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004321
  42. Sully E.K., Malachowa N., Elmore B.O., Alexander S.M., Femling J.K., Gray B.M., et al. Selective chemical inhibition of agr quorum sensing in *Staphylococcus aureus* promotes host defense with minimal impact on resistance. *PLoS Pathog*. 2014;10(6):e1004174. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004174
  43. Luo J., Dong B., Wang K., Cai S., Liu T., Cheng X., et al. Baicalin inhibits biofilm formation, attenuates the quorum sensing-controlled virulence and enhances *Pseudomonas aeruginosa* clearance in a mouse peritoneal implant infection model. *PLoS One*. 2017;12(4):e0176883. DOI: 10.1371/journal.pone.0176883
  44. Qvortrup K., Hultqvist L.D., Nilsson M., Jakobsen T.H., Jansen C.U., Uhd J., et al. Small molecule anti-biofilm agents developed on the basis of mechanistic understanding of biofilm formation. *Front Chem*. 2019;7:742. DOI: 10.3389/fchem.2019.00742
  45. Skariyachan S., Sridhar V.S., Packirisamy S., Kumargowda S.T., Challapilli S.B. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia Microbiol (Praha)*. 2018;63(4):413-432. DOI: 10.1007/s12223-018-0585
  46. Maunders E., Welch M. Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*. 2017;364(13):fmx120. DOI: 10.1093/femsle/fmx120
  47. Deng W., Marshall N.C., Rowland J.L., McCoy J.M., Worrall L.J., Santos A.S., et al. Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(6):323-337. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.20
  48. Galan J.E., Lara-Tejero M., Marlovits T.C., Wagner S. Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annu Rev Microbiol*. 2014;68:415-438. DOI: 10.1146/annurev-micro-092412-155725
  49. Fasciano A.C., Shaban L., Mecsas J. Promises and challenges of the type three secretion system injectisome as an antivirulence target. *EcoSal Plus*. 2019;8(2). DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0032-2018
  50. Charro N., Mota L.J. Approaches targeting the type III secretion system to treat or prevent bacterial infections. *Expert Opin Drug Discov*. 2015;10(4):373-387. DOI: 10.1517/17460441.2015.1019860
  51. Duncan M.C., Lington R.G., Auerbuch V. Chemical inhibitors of the type three secretion system: disarming bacterial pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(11):5433-5441. DOI: 10.1128/AAC.00975-12
  52. Kauppi A.M., Nordfelth R., Uvell H., Wolf-Watz H., Elofsson M. Targeting bacterial virulence: inhibitors of type III secretion in *Yersinia*. *Chem Biol*. 2003;10(3):241-249. DOI: 10.1016/s1074-5521(03)00046-2
  53. Anantharajah A., Buyck J.M., Sundin C., Tulkens P.M., Mingeot-Leclercq M.P., Van Bambeke F. Salicylidene acylhydrazides and hydroxyquinolines act as inhibitors of type three secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa* by distinct mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(6). pii: e02566-16. DOI: 10.1128/AAC.02566-16
  54. Usitalo P., Hägglund U., Rhöös E., Scherman Norberg H., Elofsson M., Sundin C. The salicylidene acylhydrazide

- INP0341 attenuates *Pseudomonas aeruginosa* virulence *in vitro* and *in vivo*. *J Antibiot* (Tokyo). 2017;70(9):937-943. DOI: 10.1038/ja.2017.64
55. Anantharajah A., Faure E., Buyck J.M., Sundin C., Lindmark T., Mecsas J., et al. Inhibition of the injectisome and flagellar type iii secretion systems by INP1855 impairs *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity and inflammasome activation. *J Infect Dis*. 2016;214(7):1105-1116. DOI: 10.1093/infdis/jiw295
56. DiGiandomenico A., Keller A.K., Gao C., Rainey G.J., Warren P., Camara M.M., et al. A multifunctional bispecific antibody protects against *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Transl Med*. 2014;6(262):262ra155. DOI: 10.1126/scitranslmed.3009655
57. Le H.N., Tran V.G., Vu T.T., Gras E., Le V.T.M., Pinheiro M.G., et al. Treatment efficacy of MEDI3902 in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection and acute pneumonia rabbit models. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(8). pii: e00710-19. DOI: 10.1128/AAC.00710-19
58. Zigangirova N.A., Zayakin E.S., Kapotina L.N., Kost E.A., Didenko L.V., Davydova D.Y., et al. Development of chlamydial type III secretion system inhibitors for suppression of acute and chronic forms of chlamydial infection. *Acta Naturae*. 2012;4(2):87-97. PMID: 22880162
59. Sheremet A.B., Zigangirova N.A., Zayakin E.S., Luyksaar S.I., Nesterenko L.N., Gintzburg A.L., et al. Small molecule inhibitor of type three secretion system belonging to a class 2, 4-disubstituted-4H-[1, 3, 4]-thiadiazine-5-ones improves survival and decreases bacterial loads in an airway *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Biomed Res Int*. 2018;2018:5810767. DOI: 10.1155/2018/5810767
60. Koroleva E.A., Kobets N.V., Zayakin E.S., Luyksaar S.I., Zigangirova N.A. Small molecule inhibitor of type three secretion suppresses acute and chronic *Chlamydia trachomatis* infection in a novel urogenital chlamydia model. *Biomed Res Int*. 2015;484853. DOI: 10.1155/2015/484853
61. Zigangirova N.A., Kost E.A., Didenko L.V., Kapotina L.N., Zayakin E.S., Luyksaar S.I., et al. A small-molecule compound belonging to a class of 2,4-disubstituted 1,3,4-thiadiazine-5-ones inhibits intracellular growth and persistence of *Chlamydia trachomatis*. *J Med Microbiol*. 2016;65(1):91-98. DOI: 10.1099/jmm.0.000189
62. Nesterenko L.N., Zigangirova N.A., Zayakin E.S., Luyksaar S.I., Kobets N.V., Balunets D.V., et al. A small-molecule compound belonging to a class of 2,4-disubstituted 1,3,4-thiadiazine-5-ones suppresses *Salmonella* infection *in vivo*. *J Antibiot* (Tokyo). 2016;69(6):422-427. DOI: 10.1038/ja.2015.131