

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/138734> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Hajmohammadebrahimtehrani, K.

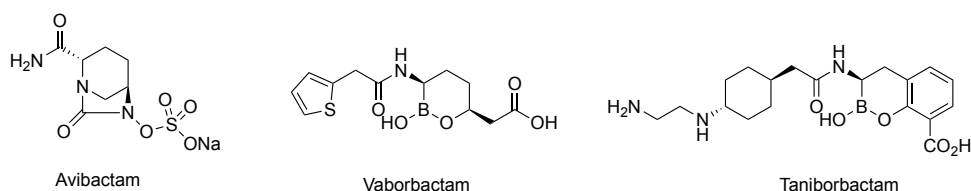
Title: Small-molecule inhibitors of bacterial metallo- β -lactamases

Issue Date: 2020-12-16

Samenvatting

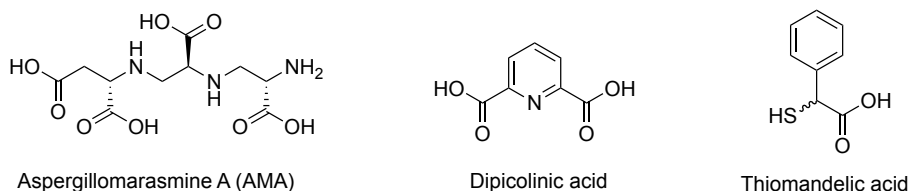
Als de antibioticaresistentie niet wordt aangepakt zal dat in de 21e eeuw een wereldwijde catastrofe tot gevolg hebben. β -Lactammen zijn de meest voorgeschreven groep antibiotic. β -Lactammantibiotika maken de moderne geneeskunde en vele chirurgische ingrepen mogelijk. Echter, infecties, vooral die veroorzaakt door gram-negatieve ziekteverwekkers, worden steeds moeilijker te behandelen, vooral door de aanwezigheid van β -lactamasen. In de afgelopen decennia is een aantal innovatieve geneesmiddelen ontwikkeld om de werkzaamheid van β -lactammen te herstellen bij de behandeling van β -lactamase-producerende bacteriële infecties. Deze middelen blokkeren echter alleen serine-type β -lactamasen (SBL's, Ambler klasse A, C en D). Dit maakt β -lactammen, inclusief de last-resort carbapenems, klinisch ineffectief tegen de infecties die worden veroorzaakt door de bacteriën die de snel opkomende metallo- β -lactamasen aanmaken (MBL's, Ambler klasse B). Er is een on vervulde en dringende behoefte naar remmers die gericht zijn op MBL's toe te voegen aan ons antibiotica-arsenaal.

De β -lactamase-remmers die zijn goedgekeurd door de FDA of die worden geëvalueerd in klinische trials, worden beschreven in **hoofdstuk 1**. Eerdere generaties SBL-remmers zoals clavulaanzuur, sulbactam en tazobactam waren allemaal β -lactamderivaten. De ontdekking van avibactam (een diazabicyclooctaan) en vaborbactam (een cyclisch boronaat) hebben de beschikbare chemische ruimte voor de ontwikkeling van krachtige en breed-spectrum β -lactamaseremmers verruimd. Interessant is dat meerdere studies hebben aangetoond dat bepaalde cyclische boronaten de tussenproducten kunnen nabootsen die gevormd worden wanneer β -lactammen worden aangevallen door zowel SBL's als MBL's. Dit biedt een waardevolle kans in het streven naar een 'pan-spectrum' β -lactamaseremmer. Taniborbactam dat zich momenteel in een fase III klinische studie bevindt, is een cyclisch boronaat dat geoptimaliseerd is om klinisch relevante β -lactamasen te remmen van alle 4 Ambler klassen (figuur 1). MBL's zijn een diverse groep van zinkafhankelijke enzymen die in staat zijn om



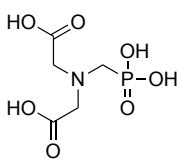
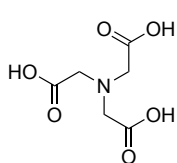
Figuur 1. Structuur van de goedgekeurde SBL-remmers avibactam, en vaborbactam, en de SBL-MBL-remmer taniborbactam.

penicillines, cefalosporines en ook carbapenems te hydrolyseren. De meerderheid van de gerapporteerde MBL-remmers werken door zink-sequestratie of door het binden van zink in de active site waarbij een ternair complex vormt. Aangezien zink essentieel is voor de hydrolytische activiteit van MBL's, worden voor fenotypische screening en biochemische karakterisering van β -lactamresistente bacteriële isolaten vaak chelatoren gebruikt. Andere remmers die een zinkbindend motief bevatten zijn onder andere thiolen, dizuren en picolinezuurderivaten (figuur 2). De volgende 4 hoofdstukken beschrijven onze inspanningen om nieuwe verbindingen te identificeren met het vermogen om *a.* klinisch relevante MBL's van de NDM, VIM en IMP-families te remmen, en *b.* de activiteit van β -lactamantibiotica in fenotypische cel assays te herstellen. Dit werd opgevolgd door onze pogingen om een prodrugsbenadering te gebruiken om de medicijneigenschappen van de MBL-remmers te verbeteren.



Figuur 2. Zink-chelatoren, picolinezuurderivaten en thiolen vertegenwoordigd door respectievelijk AMA, dipicolinezuur en thiomandelzuur.

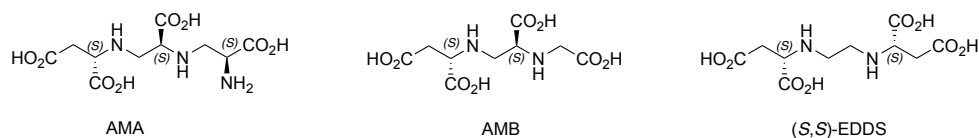
In **hoofdstuk 2** beschrijven we onze studie die heeft geleid tot de identificatie van *N*-(fosfonomethyl)iminodiazijnzuur (PMIDA) en nitrilotriazijnzuur (NTA) als krachtige remmers van NDM-1 (figuur 3). We hebben een grotere groep buffers gescreend waarvan bekend is dat ze metaalbindende eigenschappen hebben. Van de geteste verbindingen waren PMIDA en NTA het meest actief tegen gezuiverde NDM-1 en VIM-2, met een matige tot zwakke activiteit tegen IMP-28. De resultaten van Zn-afhankelijkheid studies en isothermische titratie calorimetrie (ITC) analyses werpen licht op het remmende mechanisme van de meest krachtige verbindingen, waaruit blijkt dat ze vooral werken door de zinkionen te cheleren die cruciaal zijn voor de katalytische activiteit van de MBLs. Ons onderzoek wijst er niet op dat de remmers een complex vormen met het metallo-enzym zelf. Fenotypische screenings onthulden de sterke synergetische relatie tussen PMIDA/NTA en meropenem wanneer ze werden getest tegen een groot aantal van carbapenem-resistente gram-negatieve klinische isolaten. Wij stellen voor dat dergelijke direct beschikbare kleine moleculen kunnen dienen als hulpmiddelen voor enzymatische en

		
	PMIDA	NTA
IC ₅₀ (μM) tegen NDM-1	0.91	1.3
Zn dissociatie constante (K _d , nM)	56	121

Figuur 3. PMIDA en NTA zijn krachtige NDM-1-remmers en sterke zinkbinders.

fenotypische studies van MBL's en dat ze ook kunnen dienen als startpunt voor verdere optimalisatie op weg naar klinische ontwikkeling.

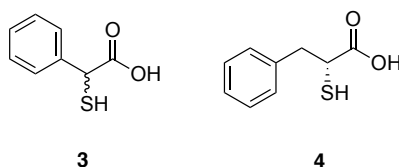
In **hoofdstuk 3** wordt beschreven hoe om MBL-remmers geïdentificeerd kunnen worden door middel van het screenen van kleine molecuul aminocarbonsuren. Deze aminocarbonsuren zijn verwant aan secundaire metabolieten die door *Aspergillus* spp. worden geproduceerd, waaronder aspergillomarasmine A (AMA), aspergillomarasmine B (AMB), en de chelaatvormer ethyleendiamine-*N,N'*-disuccinezuur (EDDS, figuur 4). De verschillende in de groep van Prof. Gerrit Poelarends gesynthetiseerde, analogen werden eerst getest op inhibitie van het NDM-1 enzym. De veelbelovende IC₅₀-waarden van sommige van de analogen hebben ons ertoe aangezet hun Zn-bindende eigenschappen te evalueren met behulp van ITC. Er was een duidelijke correlatie tussen de Zn-binding en de remmende activiteit van de aminocarbonsuren. Met name de 2 methyleen eenheden tussen de asparaatfragmenten van EDDS bleken de optimale lengte te zijn voor maximale zinkbinding en NDM-1 remming. Interessant is dat sommige van de geïdentificeerde krachtige remmers geen synergie met meropenem vertoonden toen ze getest werden tegen een NDM-1 producerend *E. coli* isolaat, hoogstwaarschijnlijk als gevolg van onvoldoende cellulaire accumulatie. Desalniettemin behoorden een methyl gesubstitueerde



Figuur 4. Eerder gerapporteerde aminocarbonsuren als krachtige NDM-1-remmers.

EDDS en een methyleenhomoloog van AMB tot de meest krachtige synergisten voor het herstellen van de activiteit van meropenem.

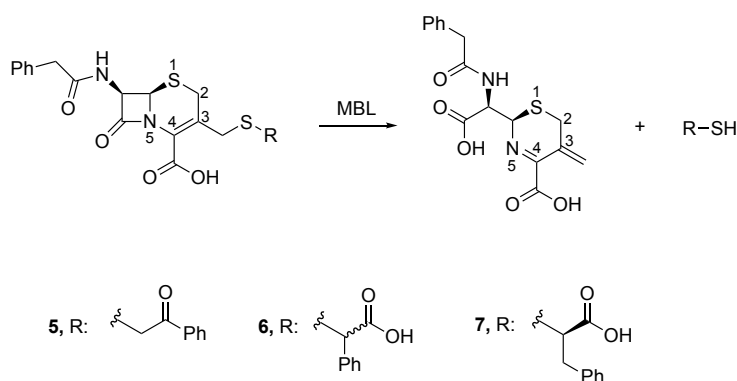
In **hoofdstuk 4** werd een andere groep van kleine moleculaire MBL-remmers (d.w.z. thiolen) geëvalueerd. De focus lag op een reeks eerder gerapporteerde thiol-bevattende MBL-remmers. Hier hebben we de eerste checkerboard-synergieanalyses met betrekking tot zinkbinding uitgevoerd en de chemische stabiliteit van deze verbindingen getest. Thio-amandelzuur en 2-mercapto-3-fenylpropionzuur (respectievelijk genummerd **3** en **4** in hoofdstuk 4, figuur 5) verlaagden de MIC van meropenem en cefoperazone wanneer ze werden getest tegen een panel van MBL-producerende gram-negatieve klinische isolaten. Het gebrek aan synergie met KPC- en OXA-producerende isolaten geeft aan dat de activiteit van de thiolen MBL-specifiek is. Ondanks de sterk synergistische activiteit en zinkbindende eigenschappen, waren de thiolen **3** en **4** slechts beperkt stabiel in het testmedium. Met een halfwaardetijd van *ca.* 5 uur oxideren ze tot de overeenkomstige disulfiden, die geen of matige synergetische activiteit vertonen.



Figuur 5. Thio-amandelzuur (**3**) en 2-mercapto-3-fenylpropionzuur (**4**).

In **hoofdstuk 5** wordt de synthese en bioactiviteitsevaluatie beschreven van een reeks cefalosporine-thiolconjugaten die zijn ontworpen als prodrugs van de in hoofdstuk 4 beschreven thiolen. Naar aanleiding van onze bevindingen over de slechte stabiliteit en specificiteit van de thiolen beschreven in hoofdstuk 4 en gezien het bekende hydrolysemechanisme van cefalosporinen, hebben we een kleine groep cefalosporine-thiolconjugaten ontworpen en gesynthetiseerd (genummerd **5-7** in hoofdstuk 5, figuur 6). De IC₅₀-testen tegen IMP-1, IMP-28, NDM-1 en VIM-2 onthulden sterke activiteit van verbindingen **6** en **7** met selectiviteit voor IMP-enzymen. Dezelfde trend werd waargenomen in de synergietests tegen MBL-producerende gram-negatieve bacteriële isolaten, waarbij **6** en **7** de MIC van meropenem tegen de IMP-producerende bacteriën grotendeels verminderden. Ondanks de veelbelovende activiteitsresultaten van deze stoffen duiden mechanistische studies met behulp van ¹H-NMR en LC-MS erop dat blootstelling van de cefalosporineconjugaten aan IMP-28 niet leidt tot het verwachte vrijkomen van de kleine-molecuul thiolen. Dit heeft ons ertoe aangezet de werkingwijze van de

cefalosporineconjugaten te bepalen. Er werd een structuur-activiteitsanalyse van verbinding **6** uitgevoerd door een reeks structurele varianten te synthetiseren en te testen. De verkregen activiteitsresultaten wezen op de bijdrage van zowel fenyl- als carboxylgroepen van verbinding **6** aan de potentie. Ten tweede hebben we de kinetische parameters van de MBL-gemedieerde hydrolyse van de gesynthetiseerde cefalosporines bepaald. De berekende katalytische efficiëntie suggereerde een trage omzetting van het substraat als het remmende mechanisme van de verbindingen **6** en **7**. Ten slotte heeft de activiteitsevaluatie van de gedeeltelijk gehydrolyseerde producten van **6** en **7** aangetoond dat deze verbindingen de IMP-enzymen kunnen blokkeren als substraten en als hydrolyseproducten.



Figuur 6. De cefalosporine conjugaten verondersteld om de thiol MBL-remmers vrij te geven na MBL-gemedieerde hydrolyse.

Hoofdstuk 6 is het resultaat van een samenwerkingsproject met dr. Mike Brouwers van Wageningen Bioveterinary Research naar de enzymatische activiteit van een nieuw ontdekte klasse A carbapenemase. Het enzym, genaamd FLC-1 (FRI-achtige carbapenemase-1), werd oorspronkelijk geïdentificeerd in *E. Cloacae* geïsoleerd uit naar Nederland geïmporteerde voedingsmiddelen. Na transformatie van *E. coli* met het FLC-1 plasmide en arabinose-geïnduceerde over-expressie werd de eiwitfractie van de bacteriecultuur gebruikt voor de bepaling van kinetische parameters. De FLC-1 veroorzaakte selectieve hydrolyse van de geteste carbapenems. De voorkeur voor carbapenems komt overeen met de resultaten van de eerder uitgevoerde MIC-assays. De getransformeerde *E. coli* was in hogere mate resistent tegen carbapenems dan tegen derde generatie cefalosporines. We vonden ook dat FLC-1 wordt geremd door clavulaanzuur ($IC_{50} = 1.97 \mu M$).