



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Antibiotic Discovery: from mechanistic studies to target ID

Kotsogianni, A.I.

Citation

Kotsogianni, A. I. (2023, June 20). *Antibiotic Discovery: from mechanistic studies to target ID*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3620917>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3620917>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

Gezien de toenemende dreiging van een post-antibiotisch tijdperk is er momenteel een dringende behoefte aan fundamenteel onderzoek naar antibiotica. Ontdekking van antibiotica is echter een bijzonder uitdagend terrein van medicinaal onderzoek. Het belangrijkste doel van het werk beschreven in deze scriptie is om strategieën te introduceren voor het ontdekken en karakteriseren van unieke medicijn-doelwitcombinaties en het vergemakkelijken van een begrip op moleculair niveau van het werkingsmechanisme van antibiotica.

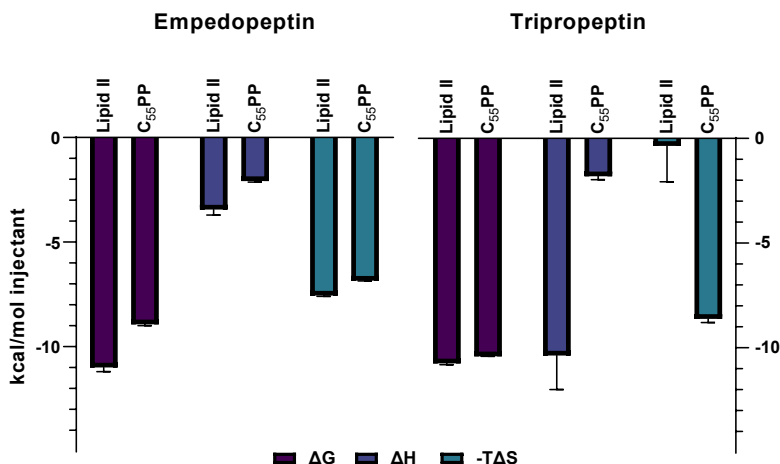
Hoofdstuk 1 benadrukt het belang van antibioticumonderzoek en de dringende behoefte aan nieuwe antibiotica. Bij het vergelijken van de huidige pijlpijn van antibiotica in ontwikkeling met de toenemende incidentie van antimicrobiële resistentie (AMR) wordt duidelijk dat we ons in een wereldwijde gezondheidscrisis bevinden. Naast de wetenschappelijke moeilijkheden die gepaard gaan met het ontdekken en ontwikkelen van antibiotica, moeten er ook tal van regelgevings- en marktgerelateerde kwesties worden aangepakt om de bestaande en toekomstige klinische middelen te beschermen en hun potentiële waarde te maximaliseren.

Al tijdens de ontdekkingsfase zijn er diverse uitdagingen die de ontwikkeling van nieuwe antibacteriële kandidaten kunnen vertragen, voordat deze in medicinale chemieprogramma's en hit-to-lead-optimalisatie kunnen worden opgenomen. Bijvoorbeeld, onzekerheden met betrekking tot het werkingsmechanisme (MoA) en de identificatie van het doelwit kunnen de ontwikkeling van antibiotica belemmeren. In dit opzicht zijn MoA-studies die de optimalisatie van de moleculaire structuur informeren, evenals de fysisch-chemische eigenschappen die kunnen helpen bij het in kaart brengen van de interactie tussen geneesmiddel en doelwit, van groot belang. De opheldering van het werkingsmechanisme van een antibacteriële kandidaat leidt tot een betere beoordeling van de relevantie van het doelwit, helpt de neiging tot resistentie te voorspellen en vergemakkelijkt geïnformeerde beslissingen in het optimalisatieproces.

Hoofdstuk 1 bespreekt ook de bestaande MoA-informatie die klaar staat om te worden benut bij de reeds gevalideerde doelwitten. Een voorbeeld hiervan is het netwerk betrokken bij bacteriële celwandsynthese, en specifiek de unieke bacteriële celwand bouwsteen lipide II. Een aantal recente ontdekkingen worden besproken die dit

gevalideerde doelwit exploiteren bij de ontwikkeling van remmers van de celwandsynthese. Lipide II wordt aangevallen door verschillende antibiotica en vertegenwoordigt de "achilleshiel" van de peptidoglycaansynthese. Mechanistische studies zijn cruciaal bij het verklaren van de effectiviteit van moleculen die zich op lipide II richten en zijn belangrijk bij het verder optimaliseren van de chemische basisstructuur van de antibioticakandidaten, terwijl ze ook de ontdekking en ontwikkeling van nieuwe antibacteriële strategieën ondersteunen.

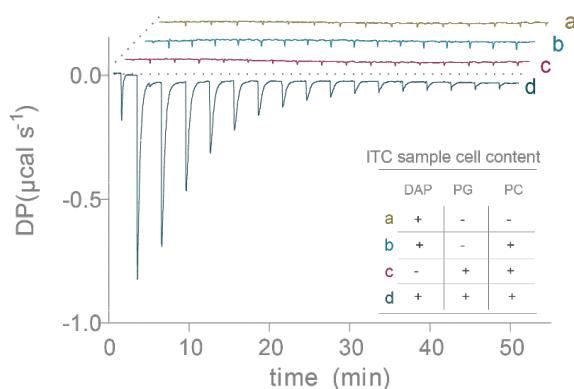
In **Hoofdstuk 2** wordt een kwantitatieve aanpak beschreven voor de karakterisering van antibiotica die zich binden aan bacteriële doelwitten die actief zijn in de celwand. De gepresenteerde gegevens bevestigen de interacties van antimicrobiële peptiden met natuurlijke ondecaprenyl-voorlopers van de celwand en helpen hun daaropvolgende bacteriedodende effect te verklaren. Dit hoofdstuk illustreert specifiek het gebruik van isothermische titratiecalorimetrie (ITC) om een nanomolaire bindingsaffiniteit voor teixobactine te onthullen. Teixobactine is een natuurlijk peptide dat behoort tot een volledig nieuwe antibioticaklasse en veelbelovende eigenschappen heeft wat betreft activiteit, in vivo werkzaamheid en een lage neiging tot ontwikkeling van resistentie. Ook gerapporteerd in **Hoofdstuk 2** is de karakterisering van de binding van lipide II-interacties met een nieuwe generatie semisynthetische lipoglycopeptide-antibiotica. Er wordt aangetoond dat verbinding **C7**, een semisynthetisch vancomycinederivaat dat in ons laboratorium werd ontwikkeld, een verhoogde affiniteit heeft voor lipide II in vergelijking met vancomycine, en ook goed bindt aan lipide II-varianten die geassocieerd worden met vancomycineresistentie. Opmerkelijk is dat deze studies de eerste calorimetrische analyse van vancomycinebinding aan lipide II in een membraanomgeving omvatten. Ten slotte bleek op een vergelijkbare manier empedopeptine, een vermeend lipopeptide dat bindt aan lipide II, stevig te binden aan lipide II in de membraanfase. Het structureel verwante tripropeptine werd bevestigd zijn bindingpartners te delen met empedopeptine. Door de experimentele aanpak was het ook mogelijk om diep in te gaan op de thermodynamische aspecten die ten grondslag liggen aan de doelwitbinding van deze twee lipopeptide-antibiotica. Opmerkelijk leverden de ITC-analyses bewijs voor de rol van calciumionen bij het bevorderen van de interacties van de antibiotica met hun individuele doelwitten. Deze toepassingen hebben een uitgebreid thermodynamisch profiel geleverd voor hun doelwitbindingsmechanisme (**Figuur 1**) en zullen de weg openen voor de karakterisering van verbindingen die unieke doelwitten hebben in de bacteriële celwand.



Figuur 1 | Empedopeptin en tripropeptin delen bindingspartners maar niet de bindingsmechanismen
Thermodynamische handtekening voor empedopeptin (links) en tripropeptin C (rechts) binding aan pyrofosfaat bevattende voorlopers verankerd in neutrale LUVs, in een CaCl₂ bevattende buffer. Hoewel empedopeptin beide voorlopers bindt met een entropische bijdrage, doet tripropeptin dat niet, omdat de binding van Lipid II wordt gedomineerd door enthalpie.

In **Hoofdstuk 3** wordt ITC gebruikt om de structurele kenmerken van het bacteriële fosfolipidedoelwit, fosfatidylglycerol, verder te karakteriseren die de binding van het lipopeptide-antibioticum daptomycine aan bacteriële cellen aandrijft. Daptomycine is het enige klinisch gebruikte calciumafhankelijke lipopeptide-antibioticum en verstoort selectief membranen van grampositieve bacteriën door fosfolipiden te kapen, in tegenstelling tot andere leden van zijn klasse. Door het bestuderen van het daptomycine-fosfoglycerol-Ca²⁺ complex waren we in staat om de affiniteiten van daptomycine voor negatief geladen fosfolipide kopgroepen op te helderen. Hierdoor hebben we aangetoond dat de activiteit van daptomycine specifiek afhankelijk is van de hydroxylfunctionaliteiten die aanwezig zijn in de fosfoglycerol en cardiolipinegroepen. Ook opmerkelijk is onze bevinding dat de binding van calcium door daptomycine sterk afhankelijk is van de aanwezigheid van fosfatidylglycerol (**Figuur 2**). Deze onderzoeken hebben nieuwe inzichten gegeven in de interacties die verantwoordelijk zijn voor de antibacteriële werking van dit klinisch gebruikte antibioticum.

Hoofdstuk 4 rapporteert de ontdekking van een nieuwe klasse kleine moleculen met krachtige antibiotische activiteit tegen klinisch relevante Gram-negatieve bacteriën. Een bacteriële gevoeligheidstest werd gebruikt om een kleine molecuulbibliotheek te



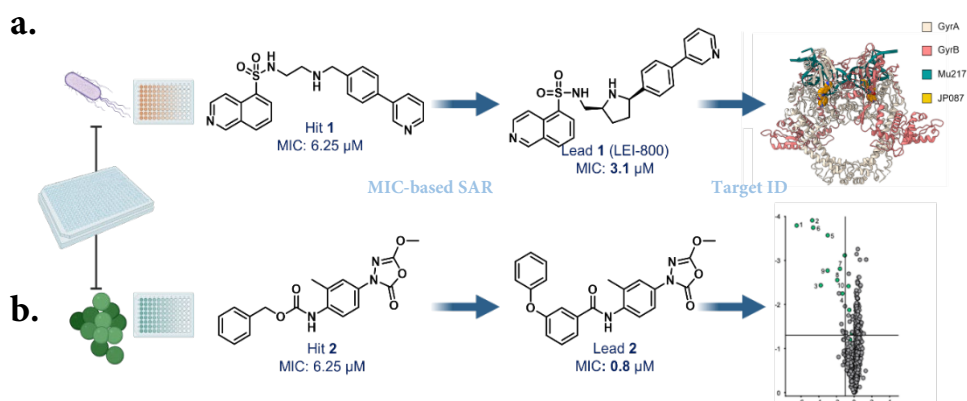
Figuur 2 | Ca^{2+} bindt aan daptomycine in aanwezigheid van PG/PC membraanmodellen De calciumafhankelijkheid van daptomycine wordt onthuld door calciumchloridetitraties in een reeks verschillende preparaten. Geen interactie wordt waargenomen wanneer CaCl_2 wordt getitreerd in: **a**) daptomycine (DAP) oplossing; **b**) daptomycine vooraf gemengd met homogene membraanpreparaten bestaande uit het neutrale diacyl fosfolipide fosfatidylcholine (PC); **c**) gemengde membraanpreparaten bestaande uit het negatief geladen diacyl fosfolipide fosfatidylglycerol (PG) en PC. **d**) Er wordt een exotherm

screenen en structuur-activiteitsrelatie (SAR) vast te stellen voor de isoquinolinesulfonamide **1** (Figuur 3a). Deze onderzoeken leidden tot het rationeel ontwerp van verbinding LEI-800, met een cis-2R,5S-pyrrolidinekern (Figuur 3a), een nieuw molecuul met verbeterde antimicrobiële activiteit tegen *E. coli* en *K. pneumoniae*. **Hoofdstuk 4** beschrijft ook onderzoeken gericht op de opheldering van de MoA en daaropvolgende doelwitidentificatie voor LEI-800 in *E. coli*. Bacteriële cytologische profilering (BCP) in combinatie met whole-genome-sequencing van resistente in vitro isolaten onthulden dat de isoquinolinesulfonamiden DNA-topoisomeraseactiviteit verstoren. Geselecteerde mutaties en biochemische onderzoeken leidden tot de verificatie van DNA-gyrase als het doelwit verantwoordelijk voor hun antimicrobiële activiteit. DNA-gyrase is een goed gevalideerde, essentiële bacteriële topoisomerase die wordt aangevallen door ciprofloxacin (CIP), een fluorchinolon waarvan wijdverspreide resistentie is waargenomen in de kliniek.^{1,2} Belangrijk is dat LEI-800 ook activiteit vertoonde tegen CIP-resistente en multiresistente klinische isolaten. Ook opmerkelijk is dat LEI-800 de supercoiling-activiteit van DNA-gyrase effectiever remde dan CIP (LEI-800 $\text{IC}_{50} = 35 \pm 13 \text{ nM}$; CIP $\text{IC}_{50} = 925 \pm 370 \text{ nM}$), ondanks dat het een lagere antibacteriële activiteit had (LEI-800 MIC = $3,1 \mu\text{M}$ ($1,4 \mu\text{g/mL}$); CIP MIC = 24 nM (8 ng/mL). We vonden later dat deze inconsistentie te wijten is aan het verminderde vermogen van LEI-800 om de Gram-negatieve buitenmembraan (OM) te passeren: zowel genetische als farmacologische verstoring van de complexe lipopolysaccharide

(LPS) laag van de OM verhoogde de werkzaamheid van LEI-800. Structurele studies met behulp van cryo-EM onthulden een ongekennde allosterische bindingswijze voor LEI-800 op een site op DNA-gyrase die verschilt van de bindingsplaats van CIP. Onze ontdekking van de isoquinolinesulfonamiden als allosterische DNA-gyrase-remmers biedt een nieuwe aanpak in de strijd tegen Gram-negatieve bacteriën, die belooft om fluoroquinolon-resistentie tegen te gaan.

Hoofdstuk 5 beschrijft de identificatie van een stof met een oxadiazolon-basisstructuur met activiteit tegen MRSA. Gevoeligheidstesten tegen stammen van *S. aureus*, inclusief een methicilline-resistente (MRSA) klinische isolatie, werden gebruikt om een SAR-kaart te ontwikkelen, wat leidde tot het ontwerp van verbinding **2** (**Figuur 3b**), die submicromolaire minimale remmingsconcentraties vertoont (MIC = 0,8 μ M, 0,3 μ g/mL). Opmerkelijk werd ook een verhouding tussen toxiciteit en antibacteriële activiteit vastgesteld voor **2** ($CC_{50} \geq 10 \times MIC_{MRSA}$, dat wil zeggen 10 keer minder toxisch voor humane celculturen dan voor bacteriële cellen). Verbinding **2** vertoonde antibacteriële activiteit tegen verschillende klinische isolaten van MRSA, inclusief vancomycine-resistente *S. aureus* (VRSA), terwijl stabiele spontane resistente mutanten niet werden geïsoleerd onder laboratoriumomstandigheden. Op basis van deze bevindingen werd ook een activiteitsgebaseerde probe gerelateerd aan verbinding **2** gesynthetiseerd en gebruikt om de polyfarmacologische MoA van de oxadiazolonen te onthullen. Doelwitidentificatie werd uitgevoerd met MS-gebaseerde en gel-gebaseerde competitieve chemische proteomics-protocollen, wat leidde tot de identificatie van 10 proteïne-kandidaten, inclusief een aantal cysteine- en serineproteasen. De proteïnehits werden gevalideerd door farmacologische remming van FabH (het enige essentiële doelwit voor MRSA onder de 10 geïdentificeerde eiwitten) en competitieve labeling van transposonmutanten. Het verschijnen van resistente isolaten werd ook gebruikt om de rol van de proteïnehits te onderzoeken, wat significante verhogingen in de expressie van FphE, AdhE en FabH onthulde, en een significante vermindering van AdhE-activiteit. Hoofdcomponentenanalyse suggereerde AdhE en FphC als doelwitten van de actieve remmers. Interessant genoeg werd het essentiële eiwit FabH ook sterk geremd door oxadiazolonderivaten die geen antibacteriële werking hadden, wat suggereerde dat alleen FabH-remming niet verantwoordelijk is voor het waargenomen antibacteriële effect. Bovendien waren AdhE- en FphC-transposonmutanten gevoelig voor dezelfde inactieve derivaten. Deze gegevens suggereren een polyfarmacologische MoA voor oxadiazolonen en benadrukken FabH, FphC en AdhE als nieuwe, aanvullende doelwitten voor MRSA.

Deze MoA-studie toont verder aan dat chemische proteomics een waardevolle techniek is voor antibioticumgeneesmiddelenonderzoek.



Figuur 3 | Gevoeligheidstests leidden tot de ontdekking van antibioticumverbindingen en hun bacteriële doelwittrajecten
Het workflowproces van hit-to-lead en doelwitidentificatie onthult **a)** de isoquinolinesulfonamiden als krachtige remmers van de DNA-gyrase van *E. coli*, en **b)** oxadiazolon-derivaten die ingrijpen op een reeks essentiële en niet-essentiële enzymen om de groei van MRSA te remmen.

Referenties

1. Bhatnagar, K. & Wong, A. The mutational landscape of quinolone resistance in *Escherichia Coli*. *PLoS One* **14**, e0224650 (2019).
2. Nitiss, J. L. DNA Topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature Reviews Cancer* **9**, 327–337 (2009).