



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Search and rescue: tackling antibiotic resistance with chemistry

Wade, N.

Citation

Wade, N. (2024, January 17). *Search and rescue: tackling antibiotic resistance with chemistry*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3713759>

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/1887/3713759>

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

Appendices

Nederlandse samenvatting

List of Publications

CV

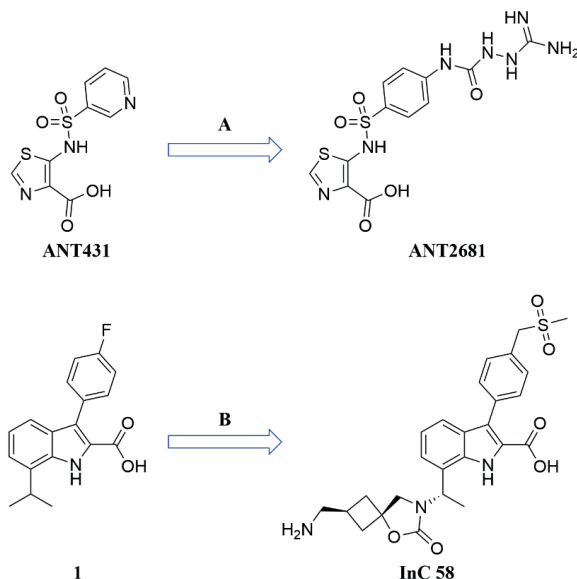
Nederlandse samenvatting

Met de opkomst van multiresistente bacteriële pathogenen wordt de mogelijkheid van een post-antibiotische wereld snel werkelijkheid. Het is daarom van cruciaal belang dat onderzoek zich richt op het overwinnen van de meest uitdagende bacteriële resistentiemechanismen. Het doel van het in dit proefschrift beschreven werk is de ontwikkeling van nieuwe strategieën om resistente bacteriën te bestrijden, met bijzondere aandacht voor de dreiging die uitgaat van gram-negatieve bacteriën.

Hoofdstuk 1 bespreekt het algemene probleem van antibioticaresistentie en de methoden die dit proefschrift beschrijft om deze aan te pakken. Het natuurlijke fenomeen waardoor bacteriën resistent worden tegen antibiotica is al bekend sinds de eerste ontdekking van antibiotica, maar het is pas de afgelopen decennia dat het aantal sterfgevallen dat verband houdt met antimicrobiële resistentie significant is gestegen. Dit is een direct gevolg van het overmatig gebruik en misbruik van antibiotica, waardoor we in de richting van een post-antibioticatijdperk zijn gestuwd. Er kunnen verschillende strategieën worden gebruikt om deze problemen aan te pakken, waarvan er twee in dit hoofdstuk worden beschreven. De eerste betreft het herstellen van de activiteit van klinisch belangrijke antibiotica, zoals β -lactams, door remmers te ontwikkelen tegen resistentie-enzymen die deze klasse antibiotica inactiveren. Naast deze strategie kunnen nieuwe antimicrobiële moleculen worden ontwikkeld tegen vitale, ongebruikte bacteriële routes. Voorbeelden zijn onder meer het mechanisme van vouwing van β -barrel-buitenmembraaneiwitten en de lipoproteïneverwerkingsroute. Beide routes bevatten essentiële enzymen, die, indien geremd, fataal zouden zijn voor de bacteriële cel. Deze strategieën vormen de basis van het werk dat in dit proefschrift wordt ondernomen om antimicrobiële resistentie aan te pakken.

Hoofdstuk 2 beschrijft mechanistische onderzoeken die zijn uitgevoerd om een panel van verbindingen te vergelijken die gerapporteerd zijn als remmers van de bacteriële resistentie-enzymen die bekend staan als metallo- β -lactamasen (MBL's). MBL's zijn waarschijnlijk een van de meest destructieve resistentiemechanismen en katalyseren de afbraak van β -lactams, een belangrijke klasse antibiotica die bij de meeste behandelingen van bacteriële infecties wordt gebruikt. MBL's bevatten zink-ionen die een watermolecuul activeren om de β -lactamring te hydrolyseren. Imipenemase-1 (IMP-1) en New Delhi metallo- β -lactamase (NDM) zijn twee klinisch verwoestende leden van de MBL-familie, omdat ze de carbapenemklasse van β -lactams kunnen inactiveren, die gereserveerd zijn als laatste redmiddelbehandeling.

Het panel van voor evaluatie geselecteerde verbindingen omvat een grote verscheidenheid aan structuren en hun remmingsprofielen van MBL's werden allemaal afzonderlijk gerapporteerd. Het werk in dit hoofdstuk was bedoeld om een eerlijke en robuuste vergelijking te geven van hun MBL-remmingsactiviteit door middel van een reeks mechanistische onderzoeken. Voor elke verbinding werd de halfmaximale remmingsconstante (IC_{50}) bepaald ten opzichte van IMP-1 en NDM-1 in dezelfde biochemische test. Bovendien werd de bindingsaffiniteit van elke MBL-remmer voor verschillende tweewaardige kationen gemeten. Ten slotte werd ook hun vermogen om de activiteit van meropenem tegen carbapenem-resistente bacteriën te redden beoordeeld. Als we de resultaten vergelijken, valt één MBL-remmer op die zich onderscheidt van de rest: het indoolcarboxylaat (InC)-derivaat ontwikkeld door Schofield en collega's aan de Universiteit van Oxford.¹ Ondanks dat het geen merkbare binding aan een van de geteste tweewaardige kationen vertoonde, was **1** een krachtige remmer van beide MBL-enzymen die zijn getest en maken bacteriën die MBL tot expressie brengen effectief opnieuw vatbaar voor bestrijding met meropenem (**Figuur 1**). Het werk werd afgesloten met de suggestie dat de Oxford-verbinding en analogen daarvan veelbelovende kandidaten kunnen zijn voor verdere inspanningen voor de ontwikkeling van geneesmiddelen gericht op het overwinnen van pathogenen die MBL tot expressie brengen.



Figuur 1. De structuren van de twee oorspronkelijke MBL-remmers die zijn ontwikkeld als resultaat van high-throughput screening die zijn opgenomen in het remmerpanel van **hoofdstuk 2**, worden links weergegeven. De nieuwe hoofdverbindingen, rechts weergegeven,

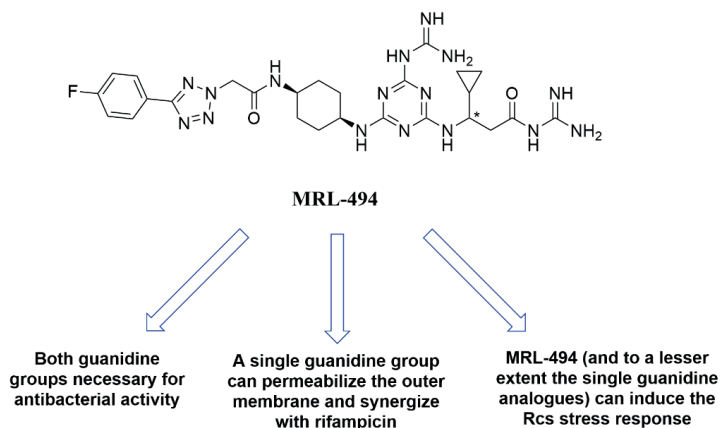
zijn het resultaat van verdere structurele ontwikkeling om de potentie en farmacokinetische eigenschappen van de verbindingen te vergroten.

Sinds de publicatie van het werk weergegeven in **hoofdstuk 2**, waarin werd geconcludeerd dat sterke zinkbinding niet noodzakelijk was voor MBL-remming, hebben er veel interessante ontwikkelingen plaatsgevonden op het gebied van MBL-remmers. Het biofarmaceutische bedrijf Antabio heeft zijn belangrijkste optimalisatiecampagne voltooid om een preklinische kandidaat te produceren, ANT2681.² Deze verbinding heeft verbeterde activiteit en fysiochemische eigenschappen ten opzichte van hun vorige hoofdverbinding ANT431, die was opgenomen in het MBL-remmerpanel van hoofdstuk 2.³ De Oxford-groep heeft ook meer werk verricht aan hun InC-derivaten. Ze hebben onlangs hun werk over de ontwikkeling van InC-remmers gepubliceerd en hebben verbindingen, zoals InC 58, geïdentificeerd met een grotere potentie dan verbinding 1.⁴ Ze zijn actief bezig met het testen van enkele van de InC-derivaten in klinisch onderzoek (Figuur 1).

Hoofdstuk 3 beschrijft de synthese en evaluatie van MRL-494, een β -barrel opbouwmechanisme (BAM)-complex remmer, oorspronkelijk gerapporteerd door onderzoekers van Merck. Een synthetische route voor MRL-494 werd in de oorspronkelijke publicatie niet bekendgemaakt, omdat het een onbedoeld bijproduct was van een reactie die werd geïsoleerd en opgeslagen voor screeningsdoeleinden.⁵ Daarom ontwikkelden we een robuuste en modulaire synthetische route naar MRL-494 die ook de bereiding van analogen mogelijk maakt om de structuur-activiteitsrelatie van de verschillende functionele groepen aanwezig in MRL-494 te onderzoeken. De twee guanidinegroepen in de structuur werden systematisch vervangen door een eenvoudige primaire amine- of amide-functionele groep om de permanente positieve lading te verwijderen. Daarbij werden drie nieuwe analogen geproduceerd, waarvan er twee één guanidinegroep bevatten en de derde beide miste. Er zijn tests met minimale remmende concentratie (MIC) uitgevoerd voor MRL-494 en de drie analogen op verschillende klinisch geïsoleerde gram-negatieve bacteriën. Hieruit bleek dat alleen de moederverbinding, MRL-494, dodelijk was voor bacteriën. Synergietesten met rifampicine gaven echter aan dat slechts één guanidinegroep nodig is voor krachtige synergetische effecten. Dit kan worden verklaard door de bevindingen van een permeabilisatie-experiment voor het buitenmembraan, waaruit bleek dat MRL-494 en afzonderlijke guanidine-analogen ook het buitenmembraan kunnen verstoren. Ten slotte werden alle verbindingen onderworpen aan een stressrespons-test die de regulatie van de kapselpolysaccharidesynthese (Rcs) volgde. Deze reactie is bijzonder gevoelig

voor een verminderde werking van het BAM-complex, en er zijn aanwijzingen dat MRL-494 deze specifieke stressreactie induceert.

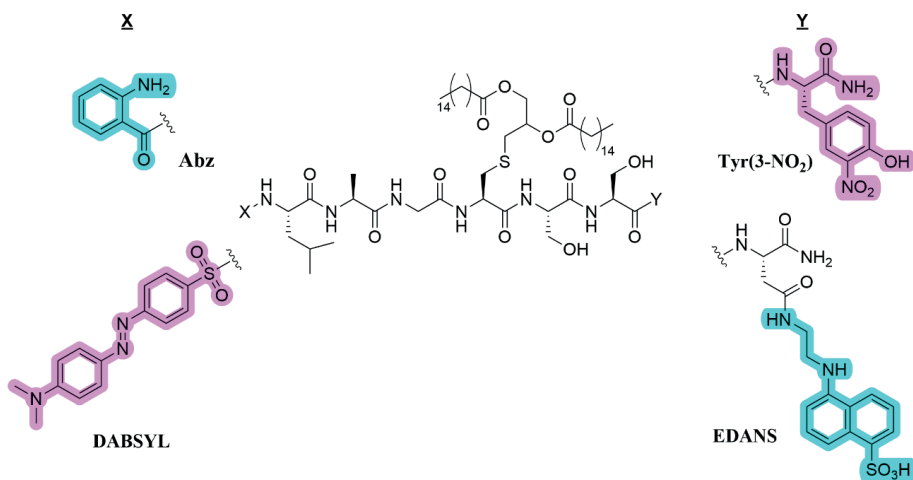
Het werk gerapporteerd in **hoofdstuk 3 (Figuur 2)** zal waarschijnlijk van waarde zijn in toekomstige studies gericht op het identificeren van de bindingsmodus van MRL-494 aan het BAM-complex. De synthetische route die we naar MRL-494 hebben ontwikkeld, opent ook de deur voor toekomstig onderzoek met de verbinding. Dit werk benadrukt ook de noodzaak van zowel guanidinegroepen voor antibacteriële activiteit als het vermogen van MRL-494 om de Rcs-stressreactie te activeren, bevindingen die verder onderzoek naar het werkingsmechanisme van MRL-494 zouden moeten helpen begeleiden.



Figuur 2. De belangrijkste bevindingen uit **Hoofdstuk 3** met betrekking tot MRL-494.

Hoofdstuk 4 documenteert de implementatie van een test voor het monitoren van de activiteit van het bacteriële binnenmembraaneiwit, LspA, evenals de synthese van het FRET-substraat voor dit enzym. Voor het eerst beschreven door Olatunji et al.⁶ is de FRET-test die wordt gebruikt om de activiteit van LspA te karakteriseren gebaseerd op het principe van Förster-resonantie-energieoverdracht (FRET) door gebruik te maken van een fluorofoor en quencher aan de N- en C-terminus van het peptidesubstraat. Als het enzym actief is, wordt het substraat gesplitst, waardoor een meetbare toename van de fluorescentie ontstaat bij de emissiegolflengte van de fluorofoor. Omgekeerd zal, als het enzym wordt geremd, geen fluorescentie bij deze golflengte worden waargenomen. Het originele substraat voor de FRET-test bevatte een aminobenzyl (Abz) en 3-nitrotryosine (Tyr(3-NO₂)) FRET-paar, dat excitatie- en emissiegolflengten heeft van respectievelijk 320 nm en 420 nm. Het werk in dit hoofdstuk bouwt voort op de oorspronkelijke test door een nieuw substraat te produceren, waarbij gebruik wordt gemaakt van het EDANS/DABSYL FRET-paar met excitatie- en emissiegolflengten van

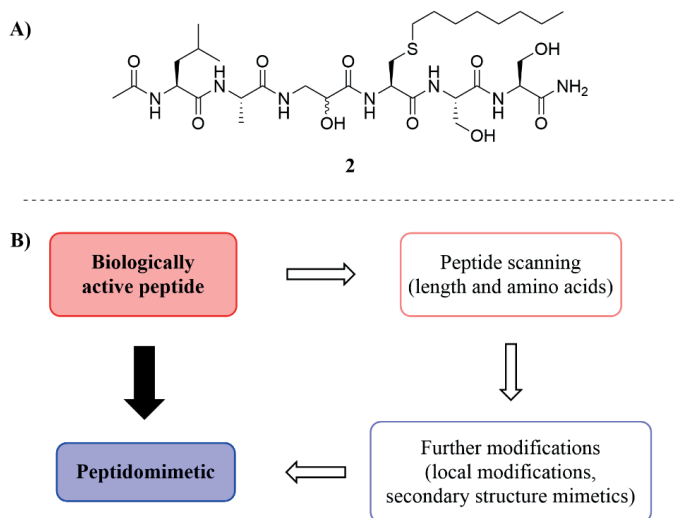
respectievelijk 360 nm en 490 nm (Figuur 3). Uit validatiestudies bleek dat zowel het originele als het nieuwe FRET-substraat werd herkend door LspA, waarna beide substraten vervolgens werden gebruikt bij het bepalen van de IC₅₀ van een bekende pan-aspartylproteaseremmer, pepstatine A. Opmerkelijk is dat toegang tot deze twee verschillende FRET-substraat paren naar verwachting van waarde zijn bij het screenen van microbiële extracten op nieuwe LspA-remmers, omdat het mogelijk is dat sommige extracten verbindingen kunnen bevatten die de fluorescentie-uitleiding van het ene of het andere FRET-substraat verstoren.



Figuur 3. Een afbeelding van de LspA-substraten gesynthetiseerd in **hoofdstuk 4**. De 6-meer aminozuurkern wordt geflankeerd door een fluorofoor- en quencher-paar. Fluorofoorcomponenten zijn blauw gemarkeerd en de quenchers zijn roze gemarkeerd.

Hoofdstuk 5 beschrijft het gebruik van de FRET-test beschreven in **hoofdstuk 4** om de remmingsactiviteit te karakteriseren van een panel van nieuwe peptidomimetische LspA-remmers die zijn ontwikkeld in onze groep. De verbindingen zijn ontworpen om het natuurlijke substraat van LspA na te bootsen, dat een cruciale rol speelt in de verwerkingsroute van lipoproteïnen. De peptidomimetica bevatten dezelfde aminozuren aan weerszijden van de splitsingsplaats die in het natuurlijke substraat worden aangetroffen, samen met niet-splitsbare delen op de splitsingsplaats. Deze nabootsers zouden de actieve plaats van LspA voor het natuurlijke substraat moeten blokkeren, waardoor de functie van het enzym wordt geremd, wat op zijn beurt dodelijk is voor gram-negatieve bacteriën. Bij de ontwikkeling van remmers van aspartylprotease-enzymen zijn veel niet-splitsbare motieven gebruikt, waarvan er verschillende voor ons eerste onderzoek zijn gekozen. De gereduceerde amide-, difluoralcohol-,

hydroxymethylcarbonyl- (HMC) en statinemotieven werden in de peptidesequentie opgenomen, ter vervanging van het glycineresidu dat op de splitsingsplaats wordt aangetroffen. Bovendien werd een eenvoudiger hydrofoob deel (een octylketen of benzylgroep) toegevoegd aan de zijketen van het Cys-residu dat in het LspA-substraat wordt aangetroffen in plaats van de meer complexe diacylglycerolgroep. Er werd een eerste experiment met een enkele concentratie uitgevoerd om te bepalen of een van de peptidomimetica LspA kon remmen en het percentage remming werd berekend in verhouding tot de bekende LspA-remmer, globomycine. De meeste verbindingen remden LspA matig, maar het opvallende resultaat kwam van verbinding **2** die het niet-splitsbare HMC-motief en het hydrofobe deel van de octylketen bevatte (Figuur 4). Verbinding **2** vertoonde een hoge remming van LspA bij de enkele geteste concentratie en daarom werd een volledig half-maximaal remmend concentratie-experiment (IC₅₀) uitgevoerd. Er werd vastgesteld dat de IC₅₀-waarde van **2** tegen LspA 181 μM was, waardoor dit de beste kandidaat is voor verdere modificatie om de remmingsactiviteit tegen LspA verder te verbeteren en de farmacokinetische eigenschappen te verbeteren. Er wordt verwacht dat het werk beschreven in de **hoofdstukken 4** en **5** zal helpen leiden tot de ontwikkeling van een geheel nieuwe klasse antibiotica, aspartylproteaseremmers. Met behulp van de FRET-test beschreven in **hoofdstuk 4** kunnen microbiële extractbibliotheken ook worden gescreend op natuurlijke producten die de LspA-activiteit kunnen remmen. Uit **hoofdstuk 5** is peptidomimetisch **2** een kandidaat voor verdere optimalisatie en onderzoek, bijvoorbeeld door middel van afknotting of alanine/D-aminozuurscaans om het remmingsprofiel te verbeteren. Andere modificaties, zoals het vervangen van de octylketen door andere ketens of hydrofobe delen, kunnen ook de remming verbeteren (Figuur 4). Dit zou leiden tot een eerste klas peptidomimetische remmer voor het bacteriële aspartylprotease-enzym LspA.



Figuur 4. De workflow die wordt gebruikt om een peptidomimetische verbinding te produceren uit een biologisch actief peptide.

References

- 1 WO/2017/093727, 2017, 171.
- 2 D. T. Davies, S. Leiris, N. Sprynski, J. Castandet, C. Lozano, J. Bousquet, M. Zalacain, S. Vasa, P. K. Dasari, R. Pattipati, N. Vempala, S. Gujjewar, S. K. Godi, R. Jallala, R. R. Sathyap, N. A. Darshanoju, V. R. Ravu, R. R. Juventhala, N. Pottabathini, S. Sharma, S. Pothukanuri, K. Holden, P. Warn, F. Marcoccia, M. Benvenuti, C. Pozzi, S. Mangani, J. D. Docquier, M. Lemonnier and M. Everett, *ACS Infect. Dis.*, 2020, **6**, 2419–2430.
- 3 S. Leiris, A. Coelho, J. Castandet, M. Bayet, C. Lozano, J. Bougnon, J. Bousquet, M. Everett, M. Lemonnier, N. Sprynski, M. Zalacain, T. D. Pallin, M. C. Cramp, N. Jennings, G. Raphy, M. W. Jones, R. Pattipati, B. Shankar, R. Sivasubrahmanyam, A. K. Soodhagani, R. R. Juventhala, N. Pottabathini, S. Pothukanuri, M. Benvenuti, C. Pozzi, S. Mangani, F. De Luca, G. Cerboni, J. D. Docquier and D. T. Davies, *ACS Infect. Dis.*, 2019, **5**, 131–140.
- 4 J. Brem, T. Panduwawala, J. U. Hansen, J. Hewitt, E. Liepins, P. Donets, L. Espina, A. J. M. Farley, K. Shubin, G. G. Campillos, P. Kiuru, S. Shishodia, D. Krahn, R. K. Leśniak, J. Schmidt (Adrian), K. Calvopiña, M. C. Turrientes, M. E. Kavanagh, D. Lubriks, P. Hinchliffe, G. W. Langley, A. F. Aboklaish, A. Eneroth, M. Backlund, A. G. Baran, E. I. Nielsen, M. Speake, J. Kuka, J. Robinson, S. Grinberga, L. Robinson,

- M. A. McDonough, A. M. Rydzik, T. M. Leissing, J. C. Jimenez-Castellanos, M. B. Avison, S. Da Silva Pinto, A. D. Pannifer, M. Martjuga, E. Widlake, M. Priede, I. Hopkins Navratilova, M. Gniadkowski, A. K. Belfrage, P. Brandt, J. Yli-Kauhaluoma, E. Bacque, M. G. P. Page, F. Björkling, J. M. Tyrrell, J. Spencer, P. A. Lang, P. Baranczewski, R. Cantón, S. P. McElroy, P. S. Jones, F. Baquero, E. Suna, A. Morrison, T. R. Walsh and C. J. Schofield, *Nat. Chem.*, 2022, **14**, 15–24.
- 5 E. M. Hart, A. M. Mitchell, A. Konovalova, M. Grabowicz, J. Sheng, X. Han, F. P. Rodriguez-Rivera, A. G. Schwaid, J. C. Malinverni, C. J. Balibar, S. Bodea, Q. Si, H. Wang, M. F. Homsher, R. E. Painter, A. K. Ogawa, H. Sutterlin, T. Roemer, T. A. Black, D. M. Rothman, S. S. Walker and T. J. Silhavy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2019, **116**, 21748–21757.
- 6 S. Olatunji, X. Yu, J. Bailey, C. Y. Huang, M. Zapotoczna, K. Bowen, M. Remškar, R. Müller, E. M. Scanlan, J. A. Geoghegan, V. Olieric and M. Caffrey, *Nat. Commun.*, 2020, **11**, 1–11.