

MEDICINAL CHEMISTRY APPROACHES TO DEVELOP β -LACTAMASE INHIBITORS

Rezumat

Această teză prezintă câteva aspecte ale activității desfășurată în perioada petrecută la Universitatea Oxford în scopul de a dezvolta inhibitori ai β -lactamazelor.

Antibioticele β -lactamice rămân, probabil, cea mai importantă clasă de medicamente antibacteriene, dar utilizarea lor este din ce în ce mai problematică datorită rezistenței la serin- și metalo- β -lactamaze în special. Deși inhibitorii cu structură β -lactamică și non- β -lactamică, care formează complexe acil-enzimatice stabile cu serin β -lactamaze nucleofile (SBL), sunt utilizați pe scară largă, aceștia sunt din ce în ce mai susceptibili la SBL-urile evoluate și nu inhibă metalo- β -lactamazele (MBL). Primele trei capitole ale tezei descriu cercetările legate de inhibitorii SBL (SBLi), capitolul patru se concentrează pe o gamă largă de SBLi și inhibitori ai MBL (MBLi), iar ultimele patru capitole prezintă metodele avansate utilizate în dezvoltarea MBLi.

Capitolul 1 prezintă investigațiile structurale ale SBLi prin intermediul diazabicyclooctanilor (DBO) utilizați clinic/în stadiu clinic, cum ar fi avibactam, relebactam, nacubactam și zidectam. Sunt prezentate în mod detaliat studiile cinetice și structurale, inclusiv patru structuri cristaline de înaltă rezoluție, care demonstrează că durata de viață a complexului carbamoilat ar trebui luată în considerare în scopul dezvoltării în viitor a SBLi pe bază de DBO.

Capitolul 2 prezintă eficiența clinică potențială *in vitro* a unor noi combinații de β -lactamă/inhibitor de β -lactamază - inclusiv imipenem-relebactam (IPM-REL) și cefepim-AAI101 (enmetazobactam) (FEP-AAI) - împotriva unei colecții actuale de tulpini de *Enterobacteriaceae* multirezistente (MDR) ($n = 264$). Studiul nu numai că descrie partea de microbiologie clinică, dar este realizată și o corelare cu analiza cinetică detaliată a inhibitorilor împotriva proteinelor recombinante. Studiul definește terapii combinate

alternative care implică REL și AAI pentru a potența utilizarea medicamentelor β -lactamice împotriva unor bacterii Gram-negative izolate clinic care exprimă o varietate de β -lactamaze. Studiul evidențiază potențialul unor combinații noi pentru combaterea acelor tulpini bacteriene care sunt imune la terapiile existente.

Capitolul 3 prezintă o nouă investigație a mecanismelor penam sulfonelor utilizate clinic, prin spectrometrie de masă în condiții denaturante și nendenaturante, cristalografie cu raze X și spectroscopie RMN. Studiul arată că fragmentarea extinsă majoră raportată a complexelor acil-enzimă derivate din penam sulfonă nu contribuie substanțial la inhibarea SBL. Inhibarea prelungită a penam sulfonelor cu SBL poate induce deshidratarea restului nucleofil de serină cu formarea unui rest de dehidroalanină care va fi apoi reticulată de lizinoalanină, fenomen care nu a fost observat anterior. Rezultatele studiului contribuie la clarificarea mecanismelor de acțiune ale SBL-urilor utilizate clinic pe scară largă, atrăgând în același timp atenția asupra unor limitări ale interpretării studiilor de spectrometrie de masă în studiul mecanismelor SBL.

În **capitolul 4** sunt prezentate analizele biochimice și biofizice efectuate pentru a demonstra faptul că boronații ciclici inhibă puternic atât serina nucleofilă, cât și β -lactamazele dependente de zinc (SBL și MBL) printr-un mecanism care implică imitarea intermediarului tetraedric comun. Boronații ciclici acționează ca inhibitori „analogi ai stării de tranziție” și inhibă de asemenea puternic proteina PBP 5 care leagă penicilina prin același mecanism de acțiune. Rezultatele deschid o nouă direcție de dezvoltare a unor inhibitori cu acțiune dublă, eficienți atât împotriva serin-, cât și împotriva metalo- β -lactamazelor și care ar putea avea de asemenea, activitate antimicrobiană prin inhibarea PBP-urilor.

Capitolul 5 prezintă studiile biofizice și cinetice efectuate pentru MBL-São Paulo (SPM-1) și evidențiază utilizarea ionilor de $Zn(II)$, respectiv mecanismul său de acțiune ca fiind caracteristic subfamiliei de MBL-B1 dependente de $di-Zn(II)$ cu importanță clinică. Analizele cristalografice prin difracție de raze X pe proteine, ^{19}F -RMN dinamic și spectrometria de masă arată însă că SPM-1 posedă regiuni cu bucle și elemente mobile caracteristice B2-MBL-urilor. Acestea includ o regiune $\alpha 3$ mobilă, importantă în cataliză și prin urmare acestea determină selectivitatea inhibitorilor. Prin urmare, SPM-1 pare a fi

un MBL hibrid B1/B2. Rezultatele au implicații majore pentru evoluția MBL și design-ul inhibitorilor.

Capitolul 6 conține analize cristalografică ale MBL-ului VIM-5 cu inhibitori izochinolinici și evidențiază anumite moduri de legare care nu implică ionii de zinc, ci sunt realizate prin interacțiunea cu reziduurile L3 și L10 ale substratului relevante catalitic. Prin utilizarea designului pe baza structurii medicamentului, prin comparare cu alte structuri MBLi, și adăugarea unui motiv tiolic capabil să lege zincul, a fost apoi posibilă identificarea unor inhibitori B1-MBLi eficienți, care au potențat activitatea meropenemului împotriva bacteriilor izolate clinic care conțin MBL. Deoarece acești compuși pot fi preparați cu ușurință, ei reprezintă un punct de plecare corespunzător pentru optimizări ulterioare.

În **Capitolul 7** este prezentat modul în care prin intermediul designului molecular *in silico*, utilizând ancorarea metalică mediată de restul tiolic, pot fi obținute MBLi puternice. Acești inhibitori noi prezintă o inhibare puternică a MBL din subfamilia B1 de importanță clinică, inclusiv enzimele NDM-1, IMP-1 și VIM-2, răspândite pe scară largă. În mod neașteptat, deși potențialul acestora este redus, unii dintre ei inhibă și serin- β -lactamazele din clasa A și D relevante clinic. Inhibitorii prezintă selectivitate pentru enzimele MBL bacteriene în comparație cu cea pentru nucleazele pliate MBL umane. Co-cristalizarea unui inhibitor, care demonstrează potențarea activității Meropenemului împotriva tulpinilor de *Enterobacteriaceae* care exprimă MBL, cu VIM-2 susține un mod de legare neașteptat, care implică interacțiuni cu reziduurile din buclele conservate care mărginesc situsul activ.

Capitolul 8 prezintă studiile intense efectuate prin două parteneriate public-private (cu peste 20 de parteneri), European Lead Factory și proiectul Oxford MBLi din cadrul *European Gram-negative Antibacterial Engine (ENABLE)*, care au permis identificarea și optimizarea unor indol-carboxilați (InC) ca MBLi cu spectru larg. InC leagă MBL într-o manieră încă necunoscută, în contrast cu alți MBLi bidentati aflați în diferite stadii de dezvoltare. InC reprezintă un nou tip de inhibitori ai metaloenzimelor care funcționează printr-un mecanism de acțiune diferit prin blocarea unui hidroxidul complexat de zinc în loc să-l deplaseze. Important este că, în comparație cu majoritatea MBLi raportați, InC sunt chelatori relativ slabi ai ionilor metalici. Mecanismul de acțiune manifestat de InC pentru inhibarea MBL (prin captarea hidroxi- metal) poate fi util și pentru dezvoltarea de

inhibitori ai altor clase de hidrolaze pliate care sunt obiective importante al chimiei medicală și, pentru inhibarea metalo-hidrolazelor. Sunt descrise studii SAR detaliate care includ optimizarea penetrării celulare și a proprietăților de eflux potențial. InC sunt bine tolerate de șoareci și, atunci când sunt combinate cu meropenem, prezintă eficiență semnificativă *in vivo* în stările de peritonită/sepsis multiple și pe modele țesut infectat cu tulpini XDR rezistente la carbapenem. Aceste rezultate evidențiază faptul că InCe au un potențial clinic ridicat de dezvoltare în combinație cu antibioticele β -lactamice.

