

Schlussbericht zu Teilprojekt T9a/T9b

2010-2015

Maßgeschneiderte Inhibitoren gegen essentielle bakterielle Targets

Partner:

*AG Prof. M. Gerhard, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie
und Hygiene, TU München*

Priaxon AG, München



Inhalt

1	Einleitung	3
2	Aufgabenstellung.....	3
2.1	Planung und Ablauf des Projektes: Projektpartner und Aufgabenverteilung	4
2.2	Wissenschaftlicher und technischer Stand bei Projektbeginn	4
2.3	Arbeitspakete und Meilensteinplanung	7
2.4	Detaillierter Ablauf der jeweiligen Arbeitspakete	8
2.4.1	Auswahl geeigneter Targets (AP1 Priaxon AG & TUM).....	8
2.4.2	Klonierung und rekombinante Expression der Targetproteine (AP2; TUM).....	10
2.4.3	<i>In vitro</i> Testung der Inhibitoren (AP3; TUM)	11
2.4.4	Chemoinformatik und Generierung erster Hits (AP4; Priaxon AG).....	20
2.4.5	Medizinalchemische Optimierung (AP5; Priaxon AG).....	26
2.4.6	Testung der Inhibitoren <i>in vivo</i> (AP6; TUM).....	29
2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	29
2.6	Verwendete Verfahren und Schutzrechte	30
2.7	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	31
2.8	Fortschritt bei anderen Stellen.....	31
3	Verwertbarkeit	32
4	Veröffentlichung	33

1 Einleitung

Antibiotika haben den Kampf gegen bakterielle Krankheiten revolutioniert, die zuvor oft tödlich endeten. Doch durch übermäßige und oft unsachgemäße Nutzung entwickeln Bakterien und andere Mikroorganismen immer mehr Widerstandskraft gegen antibiotisch wirkende Medikamente. Sie wirken dadurch schlechter oder im Extremfall überhaupt nicht mehr. Jedes Jahr sterben laut WHO rund 700.000 Menschen an den Folgen einer Antibiotikaresistenz, in Deutschland sind es mindestens 10.000. Laut des „Global Reports“ der WHO von April 2014 sind weltweit Maßnahmen notwendig, zu denen u.a. ein leistungsfähiges Netz von Laboren zählt, welches aufkommende Resistenzen rasch erkennt. Gleichzeitig müssen neuartige antibakterielle Wirkstoffe entwickelt werden. Der Markt für Antibiotika wächst und das US Amerikanische Ministerium für Ernährung und Medikamente (Food and Drug Administration) klagt über einen unerfüllten Bedarf für neue Behandlungsmethoden als Konsequenz der ansteigenden Resistenzfaktoren.

2 Aufgabenstellung

Das vorliegende Verbundvorhaben hat zum Ziel, neue Antiinfektiva gegen weit verbreitete bzw. chronische Infektionskrankheiten zu entwickeln und dabei neue Erkenntnisse und Expertisen aus grundlagenorientierter und klinischer Forschung in der Infektiologie und Immunologie umzusetzen. Klassische Ansätze zur Entwicklung von Antibiotika zielen auf zelluläre Komponenten, die für das Überleben von Mikroorganismen notwendig sind, wie z.B. Zellwand-, Protein- oder DNA-Synthese. Da hierdurch unselektiv alle sensitiven Keime abgetötet werden, führt dieser Ansatz zu Nebenwirkungen und zunehmender Resistenzentwicklung, so dass viele in der Klinik relevante bakterielle Infektionen mit den klassischen Antibiotika nicht mehr behandelt werden können. Um diesem Problem zu begegnen, werden neue Medikamente benötigt, die im Idealfall spezifisch gegen einzelne Bakterienstämme gerichtet sind. Optimale und bisher nicht ausreichend adressierte Angriffspunkte sind hierbei bakterielle Proteine, die für die Virulenz der Bakterien und die Etablierung einer Infektion im Menschen essentiell sind. Eine mögliche Funktion dieser bakteriellen Proteine ist dabei die Hemmung der menschlichen Immunantwort, so dass die Infektion nicht vom Immunsystem beseitigt werden kann. Klinisch entstehen aus dieser Situation entweder fulminante, oft fatale Verläufe (Sepsis) oder chronische Infektionskrankheiten.

2.1 Planung und Ablauf des Projektes: Projektpartner und Aufgabenverteilung

Die Arbeitsteilung der Partner in diesem Projekt ist an den jeweiligen Stellen beschrieben. In kurzer Zusammenfassung wird sich der akademische Partner die biologischen Assays und Tiermodelle bis zum Proof of Concept kümmern (Screening, Targetidentifizierung, Expression, Aufreinigung, PoC, biologische Assays, Tiermodelle), der KMU-Partner um die angewandte Forschung (Hit Generierung, medizinisch-chemische Optimierung bis zur Leitstruktur; Chemoinformatik und chemische Synthese). ADME/TOX wird über einen externen CRO abgebildet. In einigen Bereichen (Assays, Aufreinigung) werden die Partner auch gemeinsam zusammenarbeiten, um den Informationsfluss zu optimieren und einen Technologietransfer zu schaffen. Dies soll auch durch intensiven Mitarbeiteraustausch gewährleistet werden.

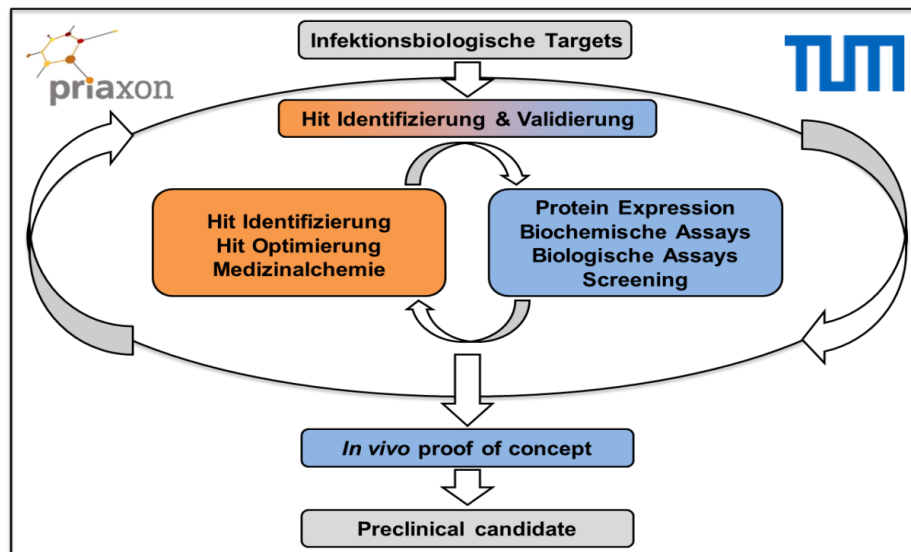


Abbildung 1: Arbeitsablauf und Aufgabenverteilung im Projekt

2.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand bei Projektbeginn

Bakterielle Targets

Das vorliegende Verbundvorhaben hat zum Ziel, neue Antiinfektiva gegen weit verbreitete bzw. chronische Infektionskrankheiten zu entwickeln und dabei neue Erkenntnisse und Expertisen aus grundlagenorientierter und klinischer Forschung in der Infektiologie und Immunologie umzusetzen. Klassische Ansätze zur Entwicklung von Antiinfektiva zielen auf zelluläre Komponenten, die für das Überleben von Mikroorganismen notwendig sind. Dies sind zumeist

generelle Mechanismen der Zellwand- oder DNA Synthese, so dass unselektiv alle sensitiven Keime abgetötet werden, was zu Nebenwirkungen und zunehmender Resistenzentwicklung führt. Viele in der Klinik relevante Bakterien können mit den herkömmlichen oder schon länger auf dem Markt befindlichen Antibiotika nicht mehr abgetötet werden. Um diesem Problem zu begegnen, werden neue Medikamente benötigt, die optimaler Weise **spezifisch** gegen einzelne Bakterienstämme gerichtet sind. Die Identifikation neuer Angriffspunkte ist Voraussetzung für die Entwicklung solcher selektiven Substanzen. Ideale und bisher nicht ausreichend adressierte Angriffspunkte sind hierbei bakterielle Proteine, die für die Virulenz der Bakterien und die Etablierung einer Infektion im Menschen essentiell sind. Eine mögliche Funktion dieser bakteriellen Proteine ist dabei die Hemmung der menschlichen Immunantwort, so dass die Infektion nicht vom Immunsystem beseitigt werden kann. Klinisch entstehen aus dieser Situation entweder fulminante, oft fatale Verläufe (Sepsis) oder chronische Infektionskrankheiten. Somit kann ein gegen diese Proteine gerichteter Ansatz sowohl für die Impfstoffentwicklung, als auch für neue Antiinfektiva genutzt werden.

Die in diesem Verbundprojekt verfolgte Strategie zur Identifizierung neuer antibakterieller hochselektiver Wirkstoffe beruht auf einem innovativen Ansatz, bei dem nicht weit verbreitete Enzyme der DNA- oder Zellwandsynthese adressiert werden, sondern infektionsbiologisch essentielle Proteine, ohne die das Bakterium keine Infektion etablieren kann oder nicht pathogen ist. Hierdurch können hochselektive Substanzen entwickelt werden, die keine Wirkungen auf andere Organismen haben. Der Ansatz virtuellen Designs in Verbindung mit kombinatorischer Chemie ermöglicht uns, hoch diverse, bisher noch nie gegen Bakterien getestete Moleküle zu durchsuchen. Hierdurch ist die Patentierbarkeit dieser neuen Substanzen zu erwarten. Dass ein solcher Ansatz erfolgreich sein kann, ist eindrucksvoll durch das Influenza Medikament Tamiflu (Oseltamivir) gezeigt worden: Tamiflu hemmt die Wirkung des Enzyms Neuraminidase auf der Oberfläche des Virus und verhindert so, dass weitere Zellen infiziert werden. Damit wirkt dieses Medikament hochselektiv gegen ein spezifisches, von außen frei zugängliches Enzym, ohne andere Erreger oder Wirtsproteine zu beeinflussen. Der Umsatz von Tamiflu wird in diesem Jahr die Marke von einer Milliarde Euro überschreiten¹.

Durch an der TUM entwickelte zelluläre Testsysteme konnten neue bakterielle Targets identifiziert werden. Diese Tests beruhen auf der Aktivierung immunologischer Signalwege bzw. Komponenten, die über Reportersysteme (GFP, Luziferase) sichtbar gemacht wird. Solche Reporter werden in der Wissenschaft häufig eingesetzt, allerdings meist als transiente Systeme,

¹ Roche Holding AG, Basel

in denen der Reporter über Transfektion in die jeweiligen Zellen eingebracht wird. Dies führt zu einer großen Schwankungsbreite zwischen einzelnen Experimenten und ist damit nicht hochdurchsatzfähig. Auch müssen zumeist immortalisierte Zelllinien aus Tumoren bzw. Lymphomen eingesetzt werden, die a priori veränderte Signalwege haben. Schließlich spiegeln die eingesetzten Reporter kaum die *in vivo* Situation wider, da meist nur kurze regulatorische Sequenzen benutzt werden. In dem von uns entwickelten System wurden die Reporter in BAC Klone integriert, die alle regulatorischen Sequenzen enthalten, welche zur Steuerung des endogenen Gens beitragen. Die Herstellung von BAC transgenen Mäusen mit diesen Reportern ermöglicht den quasi unlimitierten Zugang zu primären immunologischen Zellen mit identischer Reporteraktivität, was eine hohe Reproduzierbarkeit bei großer Durchsatzfähigkeit ermöglicht. Hierdurch kann der Einfluss bakterieller Faktoren auf B-Zellen, T-Zellen, dendritische Zellen, Macrophagen etc. untersucht werden. Solche Screeningsysteme waren bisher nicht verfügbar und haben es uns ermöglicht, neue bakterielle Virulenzfaktoren zu identifizieren. Gegen diese Faktoren sollen nun Inhibitoren identifiziert und optimiert werden. Das Screening nach neuen Targets ist nicht Bestandteil dieses Verbundvorhabens, wird aber in anderen Projekten weiterhin durchgeführt, so dass ggf. dort neu identifizierte Targets auch in dieses Vorhaben eingebracht werden können. Darüber hinaus werden auch weitere bakterielle Targets in die Auswahl mit einbezogen, die aufgrund der Literatur als infektionsbiologisch essentiell zu bewerten sind.

Drug Discovery

Die überwiegende Mehrheit aller in der industriellen Pharmaforschung betriebenen Leitstrukturfundungs-Projekte nutzen chemische Substanzen als Optimierungsstartpunkt, die mit Hilfe biochemischer oder zellulärer Screening Verfahren aus vorhandenen Substanzbibliotheken identifiziert werden. Die einmal identifizierte Substanz bestimmt aufgrund ihrer strukturellen Charakteristika den Fortgang des sich anschließenden Optimierungsprogrammes. Neben den Hochdurchsatz-Screening Verfahren bieten Naturstoffe oder endogene Liganden valide Startpunkte zur Leitstruktursuche, wobei beide Vorgehensweisen aufgrund der hohen Komplexität der sich anschließenden Synthesechemie nur von untergeordneter Bedeutung sind.

Die Bewertung primärer Hits, z. B. aus einer Screening-Kampagne, unterstützt durch die Kenntnis der zugehörigen Bindungsmodi mit Hilfe hoch-aufgelöster Kristallstrukturen von Protein-Hit-Komplexen, erlaubt bereits bei der Priorisierung mehrerer Hit-Strukturen diejenigen zu favorisieren, die im Kontext des Protein-Komplexes die besten Optimierungsoptionen bieten. Hierbei steht zunächst der Bindungsort im Vordergrund, denn nur strukturell spezifisch bindende

Hit-Strukturen, die beispielsweise im aktiven Zentrum des Zielenzym binden, bieten ausreichend Optimierungspotential für ein folgendes Leitstruktur-Identifizierungsprogramm. Binden mehrere Hit-Strukturen „produktiv“ im aktiven Zentrum, so sind Kriterien wie chemische Machbarkeit im Hinblick auf Bibliothekssynthese, Verfügbarkeit von chemisch diversen Bausteinen und auch Patentierbarkeit für die Priorisierung ausschlaggebend. Im Laufe der Leitstruktur-Identifizierung werden vorrangig die biochemische und zelluläre Aktivität optimiert, indem in iterativen Optimierungszyklen die biologischen Daten wiederholt mit strukturellen Charakteristika der Verbindungen unterschiedlicher Optimierungsgenerationen korreliert werden. Dieser Prozess wird als Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen bezeichnet. Neben den Target-gebundenen Parametern müssen bereits früh im Optimierungsprozess sogenannte Off-Target-Eigenschaften berücksichtigt werden, zu denen neben der Löslichkeit, der chemischen Stabilität und der Permeabilität auch die metabolische Stabilität gehört. Zur Erhebung der entsprechenden Daten müssen die passenden *in-vitro* Assays zur Verfügung stehen. Erfüllen die im Programm synthetisierten Verbindungen die vordefinierten Vorgaben an eine Leitstruktur, geht die Leitstrukturidentifizierung in die Optimierungsphase über. In der Phase der Optimierung stehen Parameter wie orale Bioverfügbarkeit, *in-vivo* Effizienz und Selektivität im Vordergrund, wobei die Endverbindung alle Vorgaben zur Pharmakokinetik und Pharmakodynamik zu erfüllen hat.

2.3 Arbeitspakete und Meilensteinplanung

AP1: Auswahl und Validierung geeigneter Targets (TUM & Priaxon)

MS1 ‚Auswahl und Validierung von vier Targets‘
Abschluss Q4/2010; wurde in Plan erreicht

AP2: Klonierung und rekombinante Expression der Targets (TUM)

MS2 ‚Erfolgreiche Aufreinigung (>90%) Reinheit von mindestens 3 neuen Targets, Strukturauflösung von 2 Proteinen‘
Abschluss Q4/2011; wurde in Plan erreicht

AP3: In vitro Assays zur Testung der Inhibitoren (TUM)

MS3a ‚Biochemische und zelluläre Assays für zwei Targets etabliert‘
Abschluss Q2/2013; wurde in Q4/2012 erfüllt

MS3b ‚Zelluläre Assay oder Co-Kulturmodell für ein weiteres Target etabliert‘
Abschluss Q2/2014; wurde für die NDM-1 zurückgestellt, da die Etablierung und Validierung des biochemischen Meropenem Assays vorrangig bearbeitet wurde.

AP4: Hit Identifizierung und Verifikation (Priaxon AG)

MS4a ‚Implementierung des ‚shape‘-Deskriptorsystems abgeschlossen, erste verwertbare Hits für ein Target vorhanden‘

Abschluss Q2/2011; wurde in Plan erreicht

MS4b ‚Validierte Hits, erste Struktur-Aktivitätsbeziehung (SAR) für mindestens zwei Targets vorhanden‘

Abschluss Q2/2013; ist für drei Substanzklassen für die HpgGT erfüllt

MS4c ‚Auswahl von 3 Strukturklassen für 2 Targets für die medizinalchemische Optimierung abgeschlossen‘

Abschluss Q4/2013; für die HpgGT erfüllt. Für die NDM-1 nicht bestätigt.

AP5: Medizinalchemische Optimierung (Priaxon AG)

MS5a Nachweis der prinzipiellen Optimierbarkeit für mindestens eine Substanzklasse von Wirkstoffen erbracht

Abschluss Q2/2012; wurde erfüllt.

MS5b ‚medizinalchemische Optimierung für mindestens zwei Strukturklassen von Wirkstoffen auf mindestens zwei Targets abgeschlossen‘

Abschluss Q4/2014; für HpgGT erfüllt.

AP6: Testung von Inhibitoren *in vivo* (TUM)

MS6 ‚*in vivo* proof of concept‘ für mindestens eine Strukturklasse von Wirkstoffen,

Abschluss Q1/2015; wurde aufgrund der Verzögerungen in AP4/5 innerhalb der Förderperiode nicht mehr erreicht.

2.4 Detaillierter Ablauf der jeweiligen Arbeitspakete**2.4.1 Auswahl geeigneter Targets (AP1 Priaxon AG & TUM)**

Entsprechend der Arbeitsplanung wurden zu Projektbeginn folgende Zielproteine entsprechend der genannten Kriterien ausgewählt (MS1):

- γ -Glutamyltranspeptidase von *Helicobacter pylori* = HpgGT (Immunevasionsfaktor)

Helicobacter pylori ist ein humanpathogener Keim, der in über 50% der Weltbevölkerung zu finden ist und im Magen zu Gastritis führt und als primärer Risikofaktor für Magenkarzinom gilt. Die

lebenslange Persistenz des Keimes beruht auf der Fähigkeit von *H. pylori* das Immunsystem des Patienten zu hemmen. Die γ -Glutamyltranspeptidase (gGT) wird von allen *H. pylori* Stämmen exprimiert und ist für diese Immunevasion mit verantwortlich².

- New-Delhi-Metallo- β -Lactamase = NDM-1 (Antibiotika-Resistenz)

NDM-1 ist eine neue, 2008 zum ersten Mal aus einem Patienten isolierte Metallo- β -Lactamase, die sich zum einen sehr schnell über den ganzen Globus, wie auch über verschiedene Erregerspezies verbreitet. Neben der schnellen horizontalen Genübertragung zwischen verschiedenen Erregern ist vor allem die breite Wirksamkeit bezüglich der Spaltung fast aller gängigen β -Lactamantibiotika, die die wichtigste Antibiotikaklasse (gemessen in verschriebenen Tagesdosen und in Verkaufszahlen) darstellt³, besorgniserregend. Besonders bedenklich dabei ist, dass die NDM-1 auch die Reserve- β -Lactam-Antibiotika (sogenannte Carbapeneme) inaktiviert, die nur bei besonders schweren und kaum zu therapierenden Infektionen als letzte Therapieoption eingesetzt werden. Darüber hinaus sind die Behandlungsmöglichkeiten von NDM-1 positiven Infektionen durch Resistenz gegen fast alle anderen Antibiotikaklassen zusätzlich erheblich eingeschränkt, so dass teilweise gar keine Therapieoptionen zur Verfügung stehen. Inhibitoren der NDM-1 sollen in Kombination mit Reserve- β -Lactamen die Therapiemöglichkeiten erweitern.

- Sortase A von *Staphylococcus aureus* (Virulenzfaktor)

Staphylococcus aureus ist ein Gram-positives Bakterium, welches im Menschen Haut- und schwerwiegende systemische Infektionen bis hin zur Sepsis hervorruft. Insbesondere Methicillin-Resistente *S. aureus* (MRSA) Stämme bereiten größte Probleme, da sie auch gegen die meisten anderen Antibiotika resistent sind und sich schnell verbreiten.

Verschiedene bakterielle Oberflächenproteine ermöglichen es dem Pathogen, sich an der Infektionsstelle einzunisten und die Immunantwort des Wirtes zu dämpfen, wodurch eine chronische Infektion begünstigt wird. Die Verankerung der meisten dieser Proteine auf der Bakterienoberfläche wird durch die Sortase A bewerkstelligt. Dieses Enzym erkennt und spaltet

² Chevalier et al. *Mol Microbiol.* **1999**, 31, 1359-72. McGovern et al. *Infect. Immun.* **2001**, 69, 4168-4173. Gong et al. *Gastroenterology* **2010**, 139, 564-73. Oertli et al. *PNAS* **2013**, 110, 3047-3052. Ling et al. *World J Gastroenterol.* **2013**, 19, 8203-10

³ IMS Health: Global pharma market outlook with focus on emerging markets
<http://www.apteka.ua/uploads/2013/09/8-EBeck.pdf>

bestimmte Konsensus-Sequenzen in diesen Oberflächenproteinen und überträgt den extrazellulären Teil der Proteine auf Bausteine der bakteriellen Zellwand. Durch Inaktivierung der Sortase A mittels neuer Antiinfektiva sollte es gelingen, sowohl die Besiedelung, wie auch die Immunevasion von *S. aureus* zu verhindern und somit die Pathogenität des Keimes zu senken.

- Chlamydial Protease/Proteasom-like Activity Factor (CPAF) von *Chlamydia trachomatis* (Virulenzfaktor)

Chlamydia trachomatis ist die Ursache für die meist verbreitete, sexuell übertragene bakterielle Infektion. Dieser obligat intrazelluläre Keim hemmt die Immunantwort des Patienten u.a. durch Sezernierung der CPAF in das Zytosol der infizierten Zelle, wodurch beispielsweise Transkriptionsfaktoren abgebaut werden, die ihrerseits die Expression der MHC Moleküle regulieren. Somit vermittelt CPAF einen Teil der Immunevasion, die eine chronische Infektion mit *C. trachomatis* ermöglicht.

Nachdem während der Projektlaufzeit diese Rolle der CPAF widerlegt wurde⁴, wurden die Arbeiten an diesem Target nicht mehr weiter verfolgt.

2.4.2 **Klonierung und rekombinante Expression der Targetproteine (AP2; TUM)**

Neben der gamma-Glutamyl-Transpeptidase (gGT) aus *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* und *Campylobacter jejunii*, der Sortase A aus *Staphylococcus aureus* und der CPAF aus *Chlamydia trachomatis* wurde die New Delhi metallo-beta-Lactamase aus *Klebsiella pneumoniae*, sowie mehrere N-terminal verkürzte Varianten dieses Enzyms in den Expressionsvektor pET30b+ kloniert. Die komplette NDM-1 erwies sich hierbei im Gegensatz zu allen verkürzten Versionen ohne vorhergesagte Signalsequenz als unlöslich. Für alle weiteren Experimente wurde daher zunächst die verkürzte NDM-1, beginnend mit Glycin 29 (G29), verwendet. Weiterhin wurden für Kontrollexperimente folgende Punktmutanten der NDM-1 hergestellt:

H189A: Mutation der Koordinierungsstelle für das erste katalytisch wirksame Zn²⁺ Ion: enzymatisch inaktive Variante.

D124A: Mutation der Koordinierungsstelle für das zweite katalytisch wirksame Zn²⁺ Ion: enzymatisch inaktive Variante.

K211E: Mutation in der Substratbindungsstelle: partiell aktive Variante der NDM-1.

⁴ Chen et al *PLoS Pathogens* **2012**, 8 (8): e1002842

Basierend darauf wurden alle Targetproteine erfolgreich exprimiert und wurden im Fall der gGT, Sortase A und NDM-1 (G29) in Milligramm-Mengen (über 90% Reinheit) gereinigt. Von der HpgGT wurde eine Kristallstruktur mit dem gebundenem Referenzinhibitor Acivicin erfolgreich gelöst. Darüber hinaus sind von allen Targets Kristallstrukturen in der Literatur veröffentlicht⁵, die als Grundlage für das Design der zu testenden Inhibitorcompounds verwendet wurden. Weiterhin wurden von der partiell aktiven K211E Mutante der NDM-1 eine eigene Kristallstruktur (Abbildung 2) mit einer Auflösung von 2,9 Å gelöst, die zusammen mit den Daten zur Substrat- und Zn²⁺-Abhängigkeit beider Enzymvarianten (Wildtyp und K211E) die Suche nach geeigneten Inhibitoren unterstützen wird.

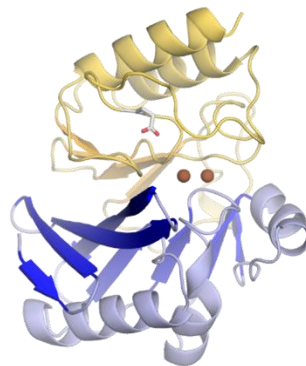


Abbildung 2: Kristallstruktur der NDM-1 K₂₁₁E Mutante

2.4.3 In vitro Testung der Inhibitoren (AP3; TUM)

H. pylori gGT

γ -Glutamyltranspeptidasen (gGTs) werden sowohl in eukaryotischen als auch einigen prokaryotischen Organismen produziert. Bei den prokaryotischen Vertretern finden sich auch pathogene Erreger wie z.B. *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* oder *Francisella tularensis*. Als wichtigste physiologische Substrate der gGT in Säugetieren fungieren Glutathion und dessen Konjugate. Das Enzym katalysiert in einer Transpeptidierungsreaktion die Übertragung einer glutamyl-Gruppe zwischen Substraten wie z.B. Glutathione (GSH) oder dessen S-Konjugate durch Hydrolyse der γ -Glutamyl-Bindung auf Akzeptoren, wie z.B. Aminosäuren, Peptide (Transpeptidierung) oder Wasser (Hydrolyse)⁶. Wie alle Mitglieder der Ntn (N-terminale nukleophile) Familie werden auch die gGTs posttranslational autokatalytisch aktiviert, wodurch

⁵ King et al. *J Am Chem Soc.* **2012**, 134(28):11362-5; Zhang et al. *Structure.* **2004** 12(7):1147-56; Williams et al. *Biochemistry* **2009**, 48: 2459–2467

⁶ Meister et al. *Methods Enzymol.* **1981**;77: 237–253. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6120436>

aus dem inaktiven Vorläufer-Protein (~60 kDa) ein Heterodimer, bestehend aus einer kleinen (~20 kDa) und einer großen (~40 kDa) Untereinheit, entsteht.

Die gGT konnte bislang in allen isolierten *H. pylori*-Stämmen nachgewiesen werden, ist konstitutiv exprimiert und hoch konserviert⁷. Für die enzymatische Katalyse findet, wie bei den bereits erwähnten gGTs anderer Spezies, auch bei der HpgGT im aktiven Zentrum ein nukleophiler Angriff statt (Abbildung 3). Das Thr380 greift hierbei an der γ -glutamyl-Amidbindung an. Dieser Angriff wird durch Thr398, welches eine Thr-Thr-Dyade bildet, stabilisiert. Das daraus resultierende, tetraedrische Intermediat wird durch die Reste Gly472 & Gly473, die ein Oxyanion-Loch bilden, stabilisiert. Im nächsten Schritt kann nun H₂O bzw. der Akzeptor an den γ -Glutamylrest binden und das Produkt wird freigesetzt. Die Funktion von Thr380 als Nukleophil wird erst durch die Autoprozessierung des inaktiven Vorläufer-Proteins am N-Terminus der kleinen Untereinheit erzeugt.

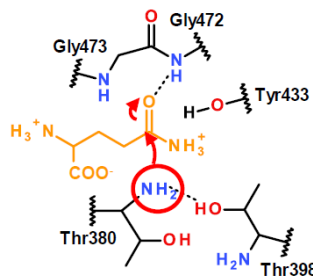


Abbildung 3: Mechanismus des nukleophilen Angriffs im aktiven Zentrum der HpgGT

Physiologisch kann u.a. das Enzym HpgGT durch seine katalytische Aktivität dafür sorgen, dass extrazelluläres Glutamin und Glutathion zu Glutamat umgewandelt wird. Glutamat wird dabei für den Tricarbonsäurezyklus zur Energiegewinnung oder in der Glutaminsynthese zur Weiterverarbeitung benötigt.

Verschiedene Co-Kristallstrukturen mit dem natürlichen Substrat Glutamat oder mit dem irreversiblen Ligand Acivicin (Abbildung 4) wurden bereits veröffentlicht⁸.

⁷ Machino et al. *Helicobacter*. **2010**, 15(3):184-92

⁸ Morrow et al. *Biochemistry* **2007**, 46: 13407-13414. Williams et al. *Biochemistry* **2009**, 48, 2459-2467.

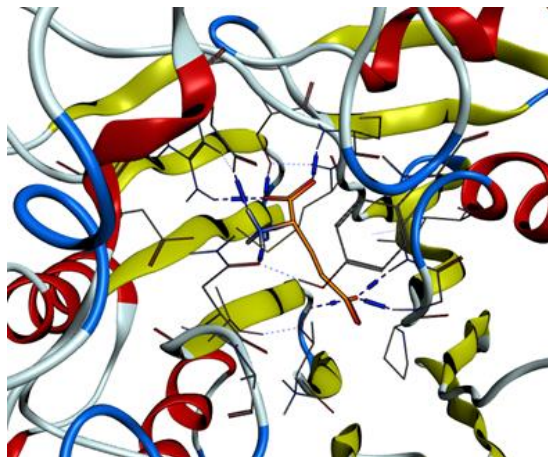


Abbildung 4 HpGGT (25-567) in Komplex mit Glutamat (PDB: 2QM6)

Für die Testung der Compounds wurde der in Abbildung 5 dargestellte Assay⁹ etabliert und nach den Kriterien der European Lead Factory validiert¹⁰. Zusätzlich wurde zur Überprüfung des Wirkmechanismus, bzw. des Angriffsorts der Inhibitoren ein ähnlicher Assay etabliert, der statt des allgemein verwendeten L-gGpNA die D-Form verwendet¹¹. Dieses Substrat kann nach Hydrolyse nicht mehr in die Ausgangsform zurück reagieren und erlaubt damit eine Aktivitätsmessung aufgrund der Substrathydrolyse ohne eine nachfolgende Transpeptidierungsreaktion. Weiterhin wurde für nachfolgende Analysen ein orthogonaler biologischer Assay zur Messung der T-Zellproliferationshemmung auf der Basis einer CellTiterGlow[®] Messung, sowie gGpNA basierte Spezifitätsassays zur Bestimmung der Hemmung der humanen gGT (HsgGT, aus Hep-G2 Zellen gereinigt), der *Escherichia coli* gGT (EcgGT), und der *Campylobacter jejunii* gGT (CjgGT) etabliert. Diese Spezifitätsassays geben Auskunft über die Kreuzreaktivität von Inhibitoren mit der HpgGT nahe verwandten CjgGT, der EcgGT als Vertreter der endogenen Darmflora und der HsgGT. Ziel war es, hier Inhibitoren zu entwickeln, die möglichst spezifisch nur die HpgGT, nicht aber die EcgGT oder die HsgGT hemmen.

⁹ Meister et al. *Methods Enzym.* **1981**;77: 237–253. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6120436>

¹⁰ <https://www.europeanleadfactory.eu/proposals/biological-assays/screening-requirements/>

¹¹ Wickham et al. *Enzyme Inhib Med Chem.* **2012** 27(4): 476–489

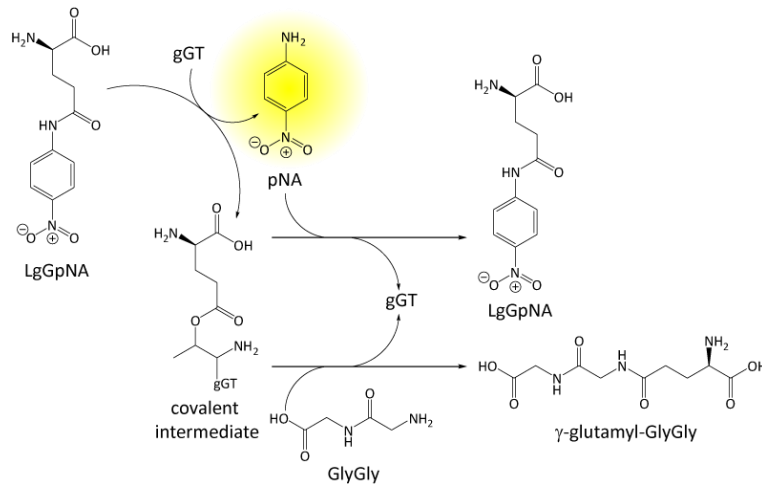


Abbildung 5: Transpeptidierungsassay mit L-γ-glutamyl-p-nitroanilide zur Messung der gGT Aktivität

Die γ-Glutamyleinheit wird abgespalten und pNA wird freigesetzt. Falls kein wirksamer A-Glutamylalzeptor vorhanden ist, wird L-gGpNA regeneriert. Zur Quantifizierung der Reaktion wird GlyGly als Akzeptor eingesetzt und die Menge an pNA über die Absorption bei 405 nm gemessen.

Die von Priaxon bereitgestellten Substanzen wurden zunächst in 15, 30 und 60 μM Konzentration getestet (Einzelmessungen), wobei jeweils Lösungsmittelkontrolle (DMSO) und eine Hintergrundmessung mit 60 μM Substanz, aber ohne Zugabe der HpgGT mitgeführt wurde. Bei einer Hemmung der HpgGT Aktivität von mindestens 20% bei 60 μM wurde die Messung in Triplikaten zusammen mit Hintergrundmessungen bei allen drei Konzentrationen wiederholt.

Insgesamt wurden gegen die HpgGt 442 Substanzen getestet, von denen 277 aus der allgemeinen Priaxon Substanzbibliothek, weitere 102 für die HpgGT maßgeschneidert und weitere 63 Substanzen aus den ursprünglichen ‚Confirmed Actives‘ (IC₅₀ Werte unter 10 μM) abgeleitet waren (Tabelle 1).

	Tailored library	General library
number of compounds tested	102	277
number of initial actives	47	44
confirmed actives	34	41
≥ 90 % inhibition (60 μM)	10	4
≥ 80 % inhibition (60 μM)	8	4
≥ 60 % inhibition (60 μM)	5	19
≥ 40 % inhibition (60 μM)	3	7
≥ 20 % inhibition (60 μM)	8	7
rate of confirmed actives in library	33.33 %	14.80 %

Tabelle 1: Screeningergebnisse der initial getesteten maßgeschneiderten Substanzen und der allgemeinen Substanzbibliothek.

Nach Bestätigung der Hemmung wurden die jeweiligen IC_{50} Werte in 3 unabhängigen Experimenten bestimmt (‘Confirmed Actives’, Tabelle 2, Abbildung 6).

	inhibition [%] at 60 μM	IC_{50} [μM]	R^2 of nonlinear regression
#11	75.78	>60	
#12	94.80	>60	
#13	89.73	2.43 ± 0.32	0.9910
#14	78.23	10.46 ± 9.70	0.9873
#15	86.54	34.16 ± 0.90	0.9822
#16	93.49	13.91 ± 1.24	0.9738
#17	89.41	21.79 ± 1.70	0.9639
#18	90.14	>60	
#19	93.64	4.53 ± 0.31	0.9695
#20	81.47	8.12 ± 2.60	0.9845
#21	95.21	2.75 ± 0.19	0.9846

Tabelle 2: IC_{50} Werte der ‘Confirmed Actives’

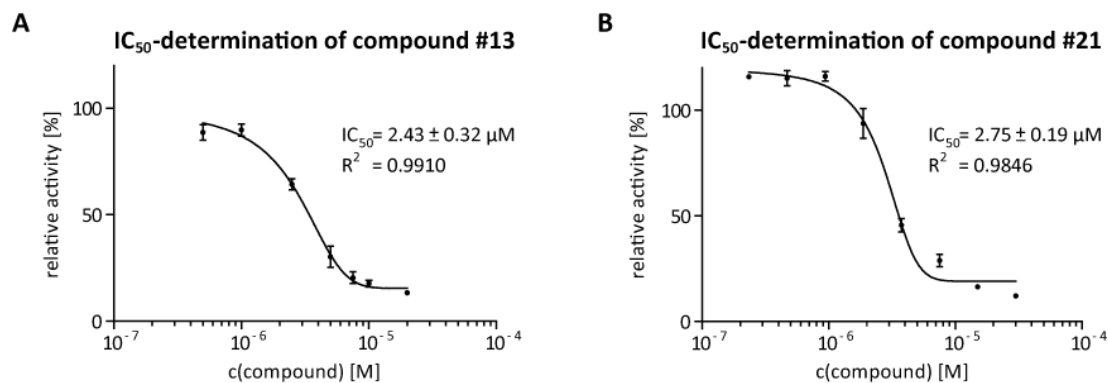


Abbildung 6: IC_{50} Bestimmung der beiden vielversprechendsten Substanzen

Weiterhin wurde die Spezifität der inhibitorischen Wirkung auf die HpgGT mit der Wirkung auf die HsgGT, CjgGT und EcgGT im entsprechenden Konzentrationsbereich verglichen (Tabelle 4, Kapitel 2.4.5. Medizinalchemische Optimierung).

S. aureus Sortase A

Zur Bestimmung der Transpeptidierungsaktivität der Sortase A on *S. aureus* wurde der folgende FRET (Förster Resonanz Energie Transfer) basierte Assay¹² (Abbildung 7) etabliert und mit Hilfe

der publizierten Referenzinhibitoren Rhodanine A und 2-17 (Formel 1) ebenfalls vollständig nach den Kriterien der European Lead Factory validiert. Die publizierten IC_{50} Werte für diese beiden Referenzinhibitoren konnten reproduziert werden (Abbildung 8).

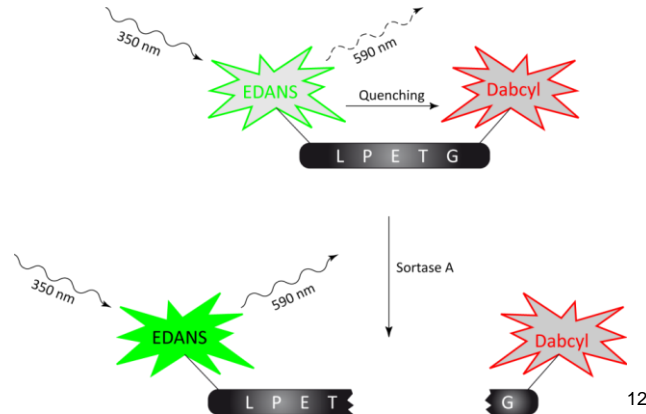
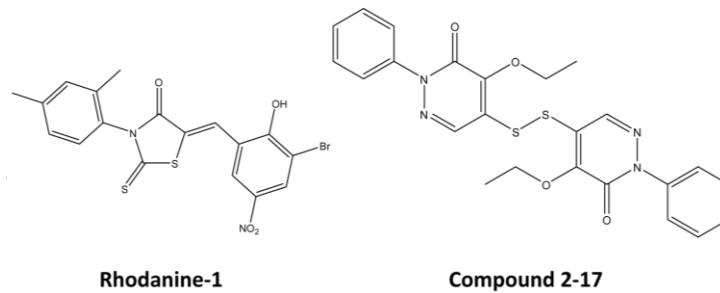


Abbildung 7: FRET basierter Assay zur Bestimmung der Transpeptidierungsaktivität der Sortase A



Formel 1: Publierte Inhibitoren der Sortase A Transpeptidierung

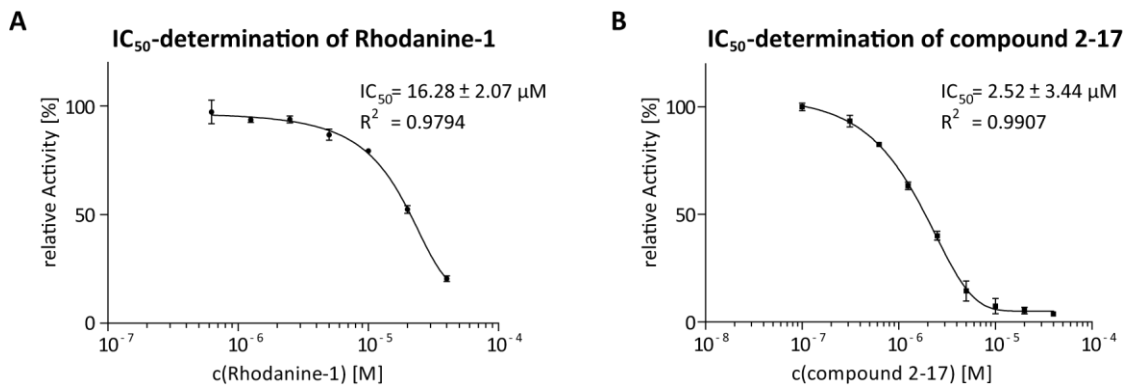


Abbildung 8: IC_{50} Werte für die Referenzinhibitoren der Sortase A

¹² Surree et al. *J Biol Chem.* **2009** 284(36):24465-77

Mit Hilfe des etablierten Assays wurden insgesamt 339 (davon 61 maßgeschneiderte) Substanzen getestet. Abgesehen von einer Substanz, die in der initialen Testung eine schwache, aber nicht reproduzierbare Aktivität zeigte („Primary Active“), konnten hier keine Inhibitoren gefunden werden.

NDM-1

In unseren detaillierten biochemischen Untersuchungen zur Zink- und Substratabhängigkeit haben gezeigt, dass sowohl der Effekt (Aktivierung vs. Hemmung der NDM-1 Aktivität), wie auch der jeweils gemessene IC_{50} Wert für den Referenzinhibitor Captopril sehr stark von den im Assay verwendeten Zink-Konzentrationen und Substraten abhängt (Abbildung 9). Um diesen Beobachtungen Rechnung zu tragen, haben wir bislang zwei unterschiedliche biochemische Assays zur Messung der NDM-1 Aktivität etabliert und vollständig nach den Kriterien der European Lead Factory validiert (Tabelle 3).

Mit Hilfe beider validierter Assays wurden 431 (davon 58 maßgeschneiderte) Substanzen gescreent, wobei vier primäre Hits (Primary Actives, s. z.B. Abbildung 10) aus vier unterschiedlichen Substanzklassen identifiziert wurden. Keiner der Primary Actives konnte anschließend validiert werden.

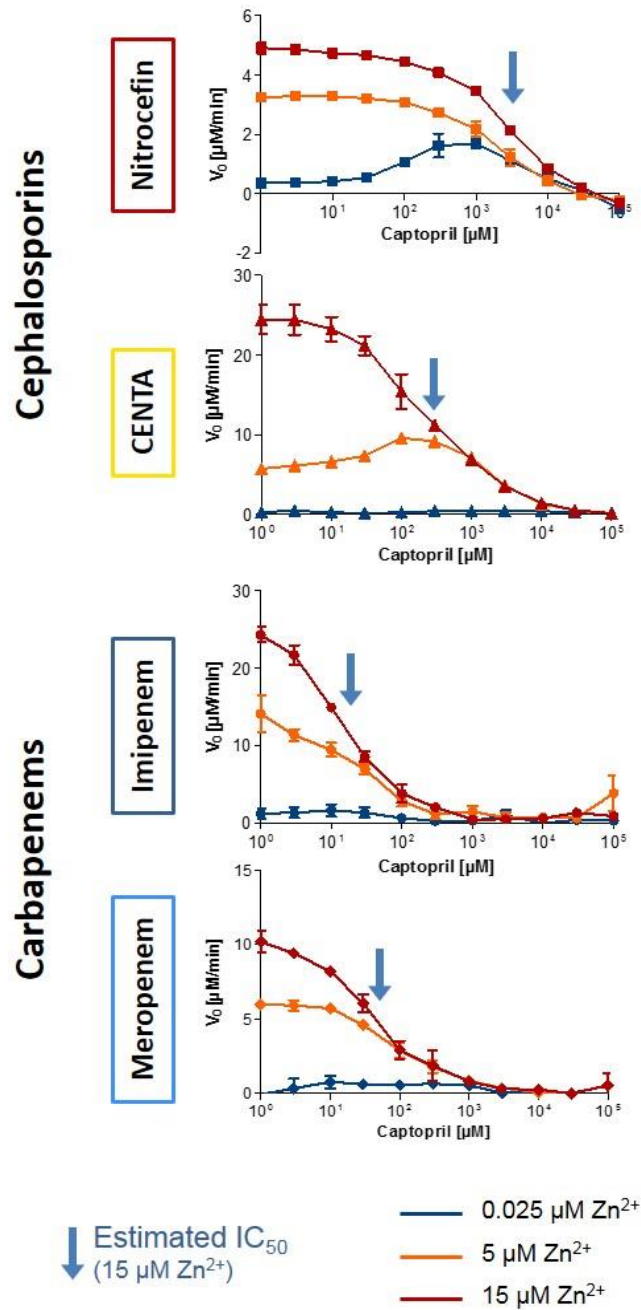


Abbildung 9: Zink- und Substrat-abhängiger Effekt von Captopril auf die Aktivität der NDM-1

Requirement	Nitrocefin	Meropenem
Enzyme purity	✓ >90%	✓ >90%
Protein stability freeze / thaw cycles (5)	✓ CV = 11 % (v ₀ / EP)	✓
Reagent stability >8h	✓ CV = 9 % (v ₀) / 3 % (EP)	✓ CV = 5 % (v ₀) / 3 % (EP)
4h kinetic measurement	✓	✓
Correlation of kinetic and end point measurement	✓	✓
Signal / background >3	✓ 3.4 (v ₀ / EP)	✓ 16.6 (v ₀) / 6.6 (EP)
Z' > 0.6	✓ 0.943 (v ₀) / 0.899 (EP)	✓ 0.896 (v ₀) / 0.859 (EP)
Stability across plate: CV<10%	✓ ± 6% (v ₀) / ± 3% (EP)	✓ ± 3% (v ₀) / ± 5% (EP)
Read out stability >1h	✓ 98 ± 2% @37°	✓ 99 ± 0% @37°
DMSO tolerance (4 %)	✓ CV = 4 (v ₀) / 1 % (EP)	✓ CV = 4 % (v ₀ / EP)

Tabelle 3: Validierungsergebnisse zweier NDM-1 Aktivitätsassays

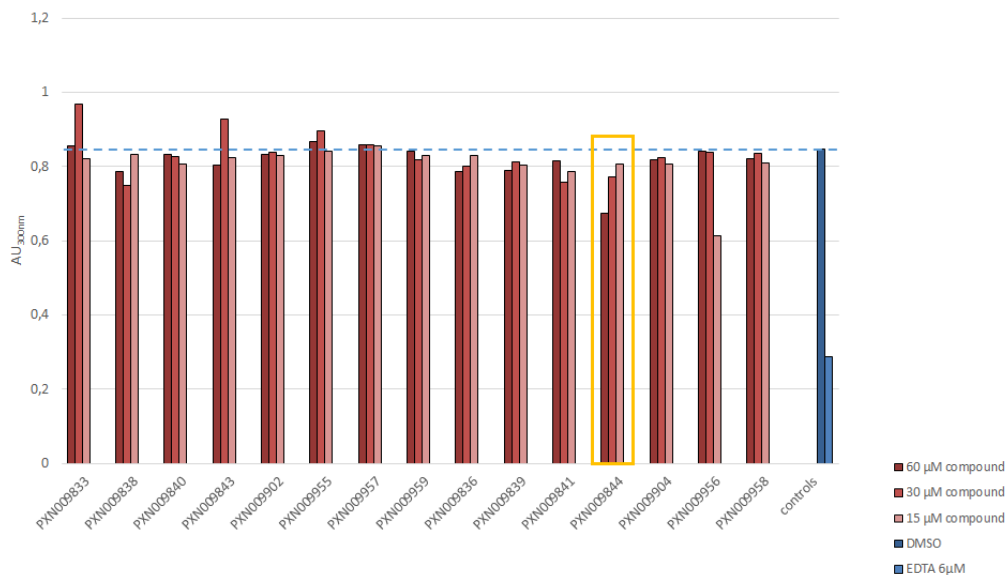


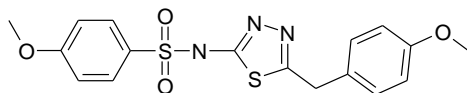
Abbildung 10: Beispiel für ein NDM-1 Compound Screening Ergebnisse

2.4.4 Chemoinformatik und Generierung erster Hits (AP4; Priaxon AG)

H. pylori gGT

Basierend auf diesen Informationen und mit dem Ziel, einen reversiblen „small molecule“ Ligand für die HpgGT zu identifizieren, wurde nach der folgenden Methodologie einen *in silico* Screening Prozess (Abbildung 11) aufgesetzt:

- ✓ Durchführung und Auswertung eines Sequenzalignments zwischen der *Human*- und der *H. pylori* gGT zur Bestimmung konservierter Regionen
- ✓ Ermittlung potenzieller Bindungsmodi mittels 3-dimensionalen Dockings von publizierten und getesteten *Human*-gGT-Inhibitoren, die sowohl eine hohe Selektivität als auch Aktivität bezüglich der bakteriellen gamma-Glutamyltranspeptidase aufweisen (zB. GGT-11, Formel 2)
- ✓ Erstellen eines pharmakologischen Modells für das Durchsuchen der Priaxon MCR-Datenbank
- ✓ Erzeugung virtueller Hits durch einen strukturellen Similaritätsabgleich der Referenzverbindung GGT-10 mit Priaxons MCR-Raum (PriaXplore® Technologie, Abbildung 11)



GGT-10

Formel 2: Referenzinhibitor mit Spezifität für die HpgGT, aber keiner Wirkung auf die HsgGT

- ✓ Selektion der *in silico* erzeugten Moleküle entsprechend ihrer Attraktivität (Docking- und Similaritäts-Score, sowie Plausibilität des Bindungsmodus)

Nach diesem Prozess wurden 31 Verbindungen zur Synthese frei gegeben. Die ausgewählten Verbindungen lassen sich dabei den folgenden Substanzklassen (Scaffolds) zuordnen:

- Amido-Indol-Derivate (A)

- Amido-Oxazol-Derivate (B)
- Amido-Imidazol-Derivate (C)
- α -Aminosäure-Amid-Derivate (D)
- Amido-Pyrrol-Derivate (E)

Die entsprechenden Syntheserouten beruhen auf den Einsatz von Multikomponentenreaktionen und wurden im Laufe der Förderperiode etabliert. Die gewünschten Verbindungen wurden meist mit guten Ausbeuten und hohe Reinheit erhalten.

In einem von unserem Partner entwickelten *in vitro* Assay konnten zwei unterschiedliche Scaffoldserien identifiziert werden, die eine niedrig mikromolare Inhibition der HpGGT aufweisen (MS4a).

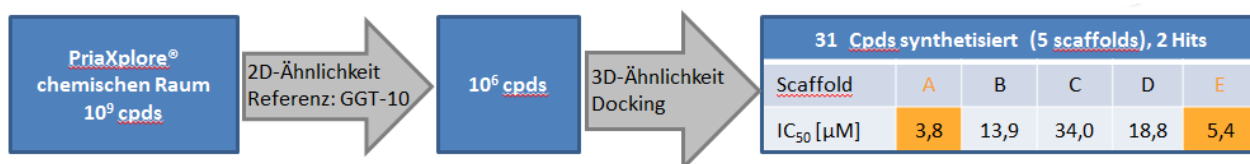


Abbildung 11: PriaXplore®-unterstützter Ligand-basierter *in silico* Screening und Hit Generierung

Die Hits aus dem Scaffold E erwiesen sich als chemisch instabil. Dagegen konnte die vielversprechende Inhibition von Amido-Indol-Derivaten (Scaffold A) bestätigt werden (MS4b). Erste Modifikationen der ursprünglichen Hit-Struktur deuten auf eine klare SAR (Struktur-Aktivität Beziehung). Schließlich zeigten die identifizierten Leitstrukturen eine eindeutige Spezifität für die bakterielle GGT gegenüber der humanen Form (Abbildung12).

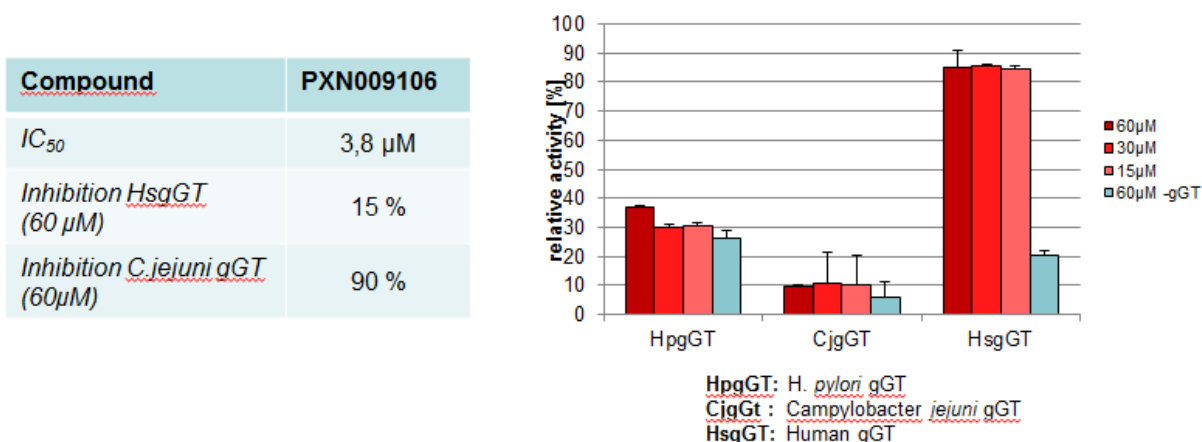


Abbildung 12: Selektivitätsprofil der Verbindung PXN009106 (gemessen von TUM)

Aus diesen Gründen wurden Amido-Indol-Derivaten und zwei weiteren im Laufe der Hit Validierung identifizierten Analogserien für eine medizinalchemische Optimierung rekrutiert (MS4c).

S. aureus Sortase A

Sortasen bilden eine Familie Membran-assoziiertes bakterieller Enzyme und werden der Klasse der Transpeptidasen zugeordnet. Die biologische Funktion der Sortasen besteht darin, sezernierte Proteine in der Peptidoglycanschicht Gram-positiver Bakterien kovalent zu verankern. Daher sind Sortasen in hohem Maße für den strukturellen Aufbau der Zelloberfläche Gram-positiver Bakterien verantwortlich.

Da sich auf der bakteriellen Oberfläche viele Virulenzfaktoren verankert sind, werden Sortasen als mögliches therapeutisches Ziel bei der Behandlung von Infektionskrankheiten betrachtet.

Analog zu den anderen Targets wurden die im Folgenden aufgelisteten Aufgaben ausgeführt:

- ✓ Recherche und Auswertung der vorhandenen oder verfügbaren Datensätze (z.B. Homologiemodelle bekannter Inhibitoren; Proteinstrukturen; QSAR, Patentinformation; Publikationen aus Fachliteratur) bezüglich des Targetproteins *Staphylococcus aureus* Sortase A
- ✓ Erstellen eines pharmakologischen Modells für die MCR-Datenbanksuche
- ✓ Erzeugung virtueller Hits durch einen strukturellen Similaritätsabgleich der Referenzverbindung mit den Scaffolds der Priaxon-MCR-Datenbank (PriaXplore®-Technologie)
- ✓ Selektion der *in silico* erzeugten Moleküle entsprechend ihrer Attraktivität (Docking- und Similaritäts-Score, sowie Plausibilität des Bindungsmodus)

Der hieraus resultierende Satz an 47 Diketopiperazine-Derivaten wurde zur Synthese, Aufreinigung und Charakterisierung freigegeben. Anschließend wurden die rational selektierten Compounds zusammen mit 44 Compounds aus der Priaxon MCR-Substanzbibliothek auf ihre inhibitorische Wirkung gegenüber Sortase A getestet. Jedoch konnte für keine der getesteten Verbindungen eine signifikante Aktivität nachgewiesen werden.

In den nächsten Design- und Syntheserunden wurden sowohl die neuesten Literaturinformationen als auch neue chemoinformatische Softwares eingesetzt, um die strukturbasierte Suche nach

Sortase-A-Inhibitoren voranzutreiben. Doch die *in silico* vorgeschlagenen Hits erwiesen sich nach visueller Inspektion als falsch-positiv und wurden nicht weiter berücksichtigt.

NDM-1

In den letzten Jahren wurde erst durch entsprechenden Kristallstrukturaufklärungen demonstriert, wie NDM-1 als Mitglied der Metallo-beta-Lactamasen durch zwei Zink-Kationen Carbapeneme und andere β -Lactame erkennt und spaltet (Abbildung 13).

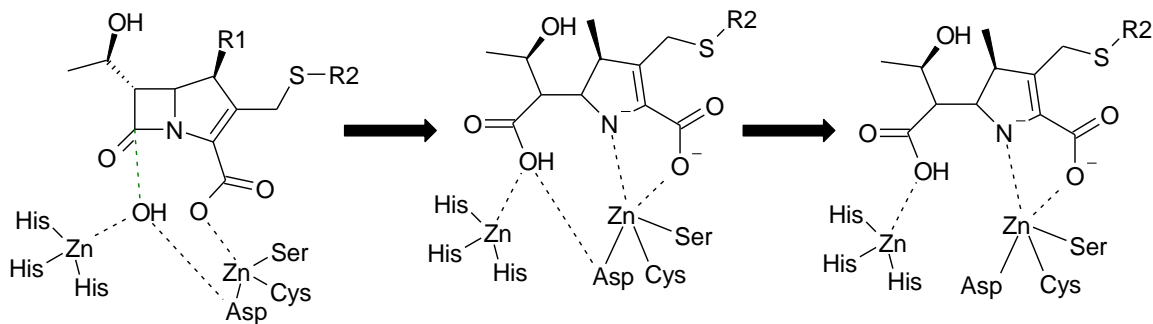


Abbildung 13: Enzymatischer Mechanismus der beta-Lactam-Spaltung durch die NDM-1¹³

Auch der Bindungsmechanismus vom kompetitiven Leitstrukturinhibitor L-Captopril (Abbildung 14) konnte gelöst werden¹⁴. Diese Strukturinformationen eröffnen den Weg für ein rationelles Design von NDM-1 Inhibitoren.

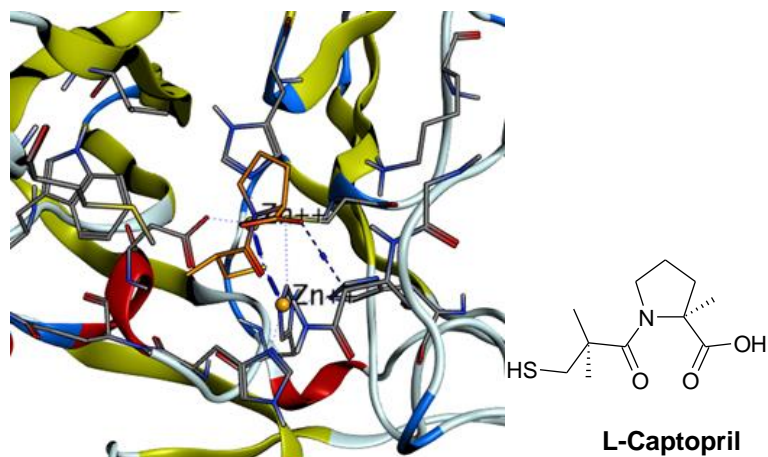


Abbildung 14: NDM-1 in Komplex mit L-Captopril (PDB: 4EXS)

¹³ https://en.wikipedia.org/wiki/Beta-lactamase#/media/File:Lactamase_Application_V.1.svg

¹⁴ King et al *J. Am. Chem. Soc* **2012**, 134, 11362-11365

Initial und mit L-Captopril als Referenzinhibitor wurden 286 Verbindungen aus der internen Priaxon MCR-Substanzbibliothek ausgewählt und deren inhibitorischen Aktivität gegenüber NDM-1 bestimmt.

Basierend auf ihrer *in silico* Screening Plattform konnte die Priaxon aus ihrer MCR-Substanzbibliothek ein erstes Set von 44 Compounds mit möglicher inhibitorischen Wirkung auf NDM-1 selektieren. Jedoch konnte für keine der getesteten Verbindungen eine signifikante Aktivität nachgewiesen werden. Dieses Set wurde danach auf 286 Verbindungen erweitert, ohne jedoch signifikante Fortschritte zu erzielen. Das Compound-Screening wurde mit einem verbesserten Screening Assay unter Verwendung eines klinisch relevantem beta-Lactam-Substrats wiederholt und lieferte das gleiche Ergebnis.

Die so gewonnenen Erkenntnisse wurden zur Optimierung und Verfeinerung der verwendeten „shape“-Deskriptoren und des bestehenden pharmakologischen Modells eingesetzt und bildeten die Grundlage für die zweite Design- und Syntheserunde.

In der zweiten Designrunde wurden unter Verwendung aller publizierter Strukturdaten aus Röntgenstrukturanalysen ein virtueller Inhibitor generiert, der dann als strukturelle Basis für den nachfolgenden Similaritätsabgleich mit den Scaffolds der Priaxon-MCR-Datenbank diente. Insgesamt wurden folgenden Aufgaben ausgeführt:

- ✓ Recherche und Auswertung der vorhandenen oder verfügbaren Datensätze (z.B. bekannte Inhibitoren; Proteinstrukturen; QSAR, Patentinformation; Publikationen aus Fachliteratur) bezüglich des Targetproteins NDM-1
- ✓ Optimierung und Anpassung des pharmakologischen Modells auf Grundlage der experimentell bestimmten inhibitorischen Aktivitäten der Screening-Compounds aus den vorherigen Design- und Syntheserunden
- ✓ Generierung eines virtuell optimierten Inhibitors unter Einbeziehung aller Strukturdaten aus bisher publizierter Kristallstrukturanalysen
- ✓ Ermittlung potenzieller Bindungsmodi mittels 3-dimensionalen Dockings von dem optimierten virtuellen Inhibitor
- ✓ Erzeugung virtueller Hits durch einen strukturellen Similaritätsabgleich des virtuellen Inhibitors mit den Scaffolds der Priaxon-MCR-Datenbank (PriaXplore®-Technologie)

- ✓ Selektion der *in silico* erzeugten Moleküle entsprechend ihrer Attraktivität (Docking- und Similaritätsscore, sowie Plausibilität des Bindungsmodus), welche durch verschiedene 1-dimensionale und 2-dimensionale Filter-Funktionen und anschließendem 3-dimensionalen Docking der Drug-like Moleküle unter Verwendung der PriXplore®-Technologie ermittelt wurde

Anschließend wurden vier neuen Strukturklassen entsprechend ihrer Priorisierung ausgewählt und zur Synthese freigegeben, um auf ihre inhibitorische Aktivität bezüglich NDM-1 getestet zu werden. Die 10 ausgewählten Verbindungen können dabei den folgenden Substanzklassen zugeordnet werden:

- Amido-Isoxazol-Derivate
- Amido-Imidazol-Derivate
- Amido-1,5-Dihydro-pyrrol-2-on-Derivate
- Amido-Lactam-Derivate

Unmittelbar nach Abschluss dieser Designrunde wurde der chemoinformatische Suchprozess nach weiteren NDM-1 Inhibitoren neu aufgesetzt, um Alternativstrukturen (Back-up scaffolds) zu finden. Diese zweite Designrunde wurde durch die neu integrierten MOE-Softwares unterstützt und beruht auf pharmakophor-basierte Ähnlichkeitssuchen. Insgesamt konnten 15 Verbindungen aus zwei Substanzklassen (β -Lactame und Isoxazole) aufgrund vielsprechender Dockingsergebnisse selektiert werden. Eine niedrig mirkomolare Inhibition der NDM-1 Aktivität mittels konnte leider bis Ende der Förderperiode für keinen der selektiven Inhibitoren nachgewiesen werden. Lediglich konnte die Verbindung PXN009844 (β -Lactam Derivat) einen Dosis-abhängig aber sehr schwachen inhibitorischen Effekt im Meropenem-Assay zeigen (Abbildung 10, S. 18). Doch dies reichte nicht, um die Substanzklasse für eine medizinalchemische Optimierung zu rekrutieren.

2.4.5 Medizinalchemische Optimierung (AP5; Priaxon AG)

H. pylori qGT

Die im AP4 verifizierten Hit-Serien (Scaffold A und zwei weiteren chemisch modifizierten Serien) wurden aufgrund der plausibelsten Bindungshypothesen medizinalchemisch variiert und optimiert.

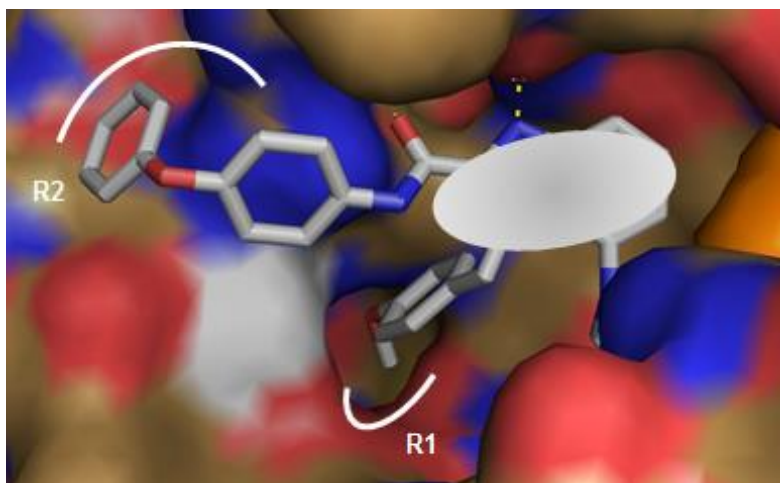


Abbildung 15: Primäre Bindungshypothese für die HpgGT Leitstrukturinhibitoren

Neben den IC_{50} Werten und bakterielle Selektivität (bestimmt von TUM) wurden die physico-chemischen Eigenschaften der jeweiligen Inhibitoren berücksichtigt. Die folgende Tabelle (Tabelle 4) stellt die im Laufe einer SAR-Studie (Struktur-Activity-Relationship = Struktur-Aktivitätsbeziehung) gewonnenen Informationen dar.

R1	R2	IC_{50} [μ M]	inhibition [%] bei 60 μ M compound		
			CjgGT	EcgGT	HsgGT
		2.43 \pm 0.32 (0.9910)	55.92	21.98	inaktiv
		10.46 \pm 9.72 (0.9873)	87.74	/	26.81
		8.34 \pm 0.30 (0.9667)	86.36	inaktiv	inaktiv
		inactive	/	/	/
		inactive	/	/	/

		3.30 ± 0.20 (0.9714)	85.52	inaktiv	inaktiv
		19.12 ± 1.35 (0.9899)	91.61	inaktiv	5.40
		5.26 ± 0.31 (0.9669)	2.60	5.35	inaktiv
		3.40 ± 0.31 (0.9854)	94.98	61.54	inaktiv
		inaktiv	15.19	inaktiv	inaktiv
		inaktiv	/	/	/
		inaktiv	/	/	/
		inaktiv	2.60	5.36	inaktiv
		inaktiv	/	/	/
		7.55 ± 0.94 (0.8764)	54.83	42.09	inaktiv
		2.64 ± 0.17 (0.9563)	76.51	1.06	inaktiv
		4.82 ± 0.36 (0.9933)	inaktiv	inaktiv	inaktiv
		2.70 ± 0.81 (0.9920)	82.23	inaktiv	34.97
		1.28 ± 0.15 (0.9830)	83.79	inaktiv	30.01
		1.10 ± 0.09 (0.9394)	78.70	62.95	35.44

Tabelle 4: SAR-Studie: Einfluss der Substituenten R1/R2 (Scaffold A) auf die HpgGT Inhibition

Aufgrund dieser Erkenntnisse konnte PXN009293 als optimierter Vertreter für die Scaffold A-Serie identifiziert werden. Weitere chemische Modifikationen des Grundcaffolds konnten die physikochemischen Eigenschaften der Leitstrukturen verbessert werden, ohne deren Aktivität oder Selektivität zu beeinträchtigen.

Am Schluss der Optimierungsphase (Ergebnisse s. Tabelle 5) konnten drei vielversprechende Verbindungen (PXN009338, PXN009341, PXN009344) aus 2 von Scaffold A abgeleiteten Substanzklassen identifiziert werden. Neben einer erhöhten Affinität zur HpgGT und einer erhaltenen Selektivität für bakterielle GGT-Proteine gegenüber der HpgGT, weisen die ausgearbeiteten Derivate auch verbesserte physikochemische Eigenschaften gegenüber der ersten Hitstruktur PXN009106 aus (MS5a). Der hydrophobe Charakter der Verbindungen konnte reduziert werden (cLogP) und basische, wasserlösliche Gruppen (s.b. pKa, strongest basic pKa) eingeführt werden.

PXN ID	Scaffold	Beschreibung	MW	IC ₅₀ HpGGT [uM]	clogP	s.b.pKa
009106	A	Validierter Hit	449	3.80	6.52	-3.48
009293	A	Optimierter Hit (SAR)	453	1.20	7.3	-3.5
009338	F	Scaffold Modifikationen	427	4.40	4.31	6.84
009341	F	Scaffold Modifikationen	456	3.16	4.49	8.87
009344	G	Scaffold Modifikationen	539	1.10	6.25	7.05

Tabelle 5: Optimierte HpgGT-Inhibitoren: IC₅₀-Werte und physikochemischen Eigenschaften

Um eine weitere rationelle Verbesserung der inhibitorischen Aktivität unserer Leitstrukturen zu ermöglichen, erwies sich die Erzeugung von Co-Kristallstrukturinformationen zu diesem Zeitpunkt als unabdingbar. Die 4 Derivate konnten bei unseren externen Partner (Proteros Biostructures und Helmholtz Zentrum für Gesundheit und Umwelt, Dr. G. Popowicz) weder in die Kristalle der HpgGt ‚gesoakt‘, noch mit der HpGGT co-kristallisiert werden. Zwar haben sich Kristalle gebildet, jedoch waren unsere entwickelten Verbindungen in den jeweiligen Co-Kristallstrukturen nicht zu erkennen. Lediglich liegt ein kleiner Aminosäurerest (vermutlich Alanin) in der ‚Active site‘. Weitere Versuche, die Bindung der Inhibitoren an die HpgGT nachzuweisen, wurden über NMR (Dr. Popowicz), bzw. Microscale Thermophoresis (NMI Tübingen) unternommen. Aufgrund der

mangelnden Wasserlöslichkeit der Derivate konnte allerdings über keine der genannten Methoden eine Bindung an die HpgGT nachgewiesen werden.

2.4.6 Testung der Inhibitoren *in vivo* (AP6; TUM)

Bislang wurden keine für die *in vivo* Testung geeigneten Inhibitoren identifiziert. Zur Vorbereitung entsprechender Experimente wurde im Berichtszeitraum der von der AG Gerhard gestellte Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens positiv beschieden, so dass nach der Charakterisierung geeigneter Substanzen mit der Etablierung der Tiermodelle (NDM-1 und Sortase A), bzw. mit der Durchführung von Tox- und Dosisfindungsexperimenten (HpgGT, NDM-1 oder Sortase A) begonnen werden kann.

Der Meilenstein 6 ‚*in vivo* proof of concept‘ für mindestens eine Strukturklasse von Wirkstoffen, konnte aufgrund der Verzögerungen in AP4/5 innerhalb der Förderperiode nicht mehr erreicht werden.

2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Während des gesamten Projektverlaufes wurden drei innovative Targets für die Entwicklung neuer Antiinfektiva aus verschiedenen bakteriellen Pathogenen identifiziert und rekombinant hergestellt. Weiterhin wurden für alle 3 Targets biochemische Screening Assays aufgebaut, und nach den Vorgaben, die vom EFPIA Konsortium für die in der ‚European Lead Factory‘ im IMI Programm formuliert worden sind, vollständig validiert.

Mit Hilfe dieser Assays wurden für alle Targets die von Priaxon maßgeschneiderten Substanzen als auch ausgewählte Bibliotheksubstanzen getestet (Tabelle 6), um Inhibitoren zu identifizieren.

Target	Maßgeschneiderte Compounds	Getestete Compounds	Primäre Hits	Aktive Substanzklassen	Validierte Hit Klassen
gGT (<i>H. pylori</i>)	164	442	103	5	3
Sortase A (<i>S. aureus</i>)	61	339	1	1	0
NDM-1	58	431	4	4	0

Tabelle 6: Übersicht aller im Projektverlauf getesteten Substanzen

Für die Targets NDM-1 und Sortase A sind trotz der großen Anzahl an getesteten Compounds und Designarbeit nur falsch-positive oder sehr schwache Hits identifiziert worden, deren rationeller Optimierung nur bedingt möglich ist. Bei beiden Targets haben sowohl rationale, strukturbasierte Designansätze als auch die Testung von Bibliotheksubstanzen nicht zum gewünschten Ziel geführt. Die einzigartige Topologie der beiden ‚active sites‘ mit geladenen Metallatomen erschwert sicherlich den Selektionsprozess.

Für das Target HpgGT konnten mittels Priaxons strukturbasiertem *in silico* Screening Prozesses valide Hits identifiziert werden. Nach medizinisch-chemischer Optimierung zeigen die zwei ausgearbeiteten Compound-Serien eine niedrig mikromolare inhibitorische Aktivität, eine deutliche Selektivität für bakterielle gGT gegenüber der humanen Form und akzeptable physicochemischen Eigenschaften. Co-Kristallstrukturdaten und orthogonale Bindungsassays sind von nun an erforderlich, um weitere Ziele zu erreichen, nämlich die inhibitorische Aktivität in den nanomolaren Bereich zu verbessern und den therapeutischen Effekt unserer Inhibitoren *in vivo* nachzuweisen.

2.6 Verwendete Verfahren und Schutzrechte

Im Zuge der hier durchgeführten Arbeiten wurden keine eigenen Schutzrechte angemeldet. Darüber hinaus wurde auch von keinen Schutzrechten anderer Gebrauch gemacht.

Zwar wurde vor Beginn der Arbeiten für die HpgGT ein Patent aus der AG Gerhard, TUM angemeldet und inzwischen erteilt, welches die unter anderem HpgGT als Zielstruktur für einen Antiinfektiva-Entwicklung abdeckt (EP 2081594 B1). Nachdem sich aber unsere Arbeiten noch deutlich in der Forschungs- und nicht-klinischen Entwicklungsphase befinden, unterliegen sie hier keinerlei schutzrechtsrelevanten Einschränkungen.

Für die Sortase A wurde bereits 2000 ein Patent angemeldet, welches das Sortase A Gen und seine Anwendungen als Drug Target schützt¹⁵. Auch hier ist diese Anmeldung (bisher keine Erteilung) für die hier durchgeführten Arbeiten nicht relevant, da Forschungs- und nicht-klinische Entwicklungen keinen schutzrechtsrelevanten Beschränkungen unterliegen.

¹⁵ [WO002000062804A2](#)

2.7 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Kristallisationen und Röntgenstrukturanalysen (NDM-1 Mutante K₂₁₁E, HpgGT) wurden von Dr. Stefan Steinbacher, Proteros Biostructures und von Dr. Grzegorz Popowicz, Helmholtz Zentrum Neuherberg durchgeführt. Dr. Popowicz hat darüber hinaus auch die NMR-Experimente zur Untersuchung der Bindung von HpgGT Inhibitoren an das Zielenzym durchgeführt. Microscale Thermophorese Analysen zur Bindungsanalysen wurden von Dr. Nicole Schneiderhan-Marra, NMI Tübingen durchgeführt. Für CD-Analysen zur Überprüfung der korrekten Proteinfaltung der NDM-1 Mutanten haben wir von Prof. Andreas Bausch, TU München Unterstützung erhalten.

2.8 Fortschritt bei anderen Stellen

Während der Durchführung des Vorhabens sind für die HpgGT keine anderen Ergebnisse von anderer Seite veröffentlicht worden.

Für die Sortase A wurden seit Projektbeginn verschiedene Inhibitoren veröffentlicht¹⁶ und Patente hierzu eingereicht¹⁷. Diese Vielzahl von Patenteinreichungen spiegelt das große Interesse daran, die Sortase A von *S. aureus* als Zielstruktur für einen antiinfektive Therapie zu nutzen wider und bestätigt unseren Ansatz.

Für NDM-1 Inhibitoren wurden inzwischen insgesamt 9 unabhängige Patente angemeldet, von denen eines bereits erteilt worden ist¹⁸. Weiterhin wurden einige NDM-1 Inhibitoren publiziert¹⁹. Viele dieser angemeldeten Substanzfamilien lassen aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften

¹⁶ Cascioferro et al. *Microb Pathog.* **2014** Dec;77:105-12; Lee et al. *Bioorg Med Chem Lett*, **2010**. 20(23): p. 6882-5; Chenna et al. *Eur J Med Chem*, **2010**. 45(9): p. 3752-61; Uddin et al. *Chem Biol Drug Des*, **2012**. 80(2): p. 300-14

¹⁷ seit Projektbeginn: EP000002875815A1; KR102014130375A; ; vor Projektbeginn: WO002011028492A2 ; WO002009023160A2 ; KR102005096063A)

¹⁸ https://www.google.de/?tbs=pts&gws_rd=ssl#tbs=pts&q=NDM-1+inhibitor

¹⁹ Chen et al. *Anal Chem.* **2013** 85(16):7957-65; King et al. *Nature.* **2014** 510(7506):503-6; Li et al. *Bioorg Med Chem Lett.* **2014** 24(1):386-9; Liu et al. *ACS Med Chem Lett.* **2015** 6(6):660-4; Livermore et al. *J Antimicrob Chemother.* **2013** 68(1):153-8; Thakur et al. *J Nat Sci Biol Med.* **2013** 4(1):51-6; Thomas et al. *Bioorg Med Chem.* **2013** 21(11):3138-46; Thomas et al. *Chembiochem.* **2014** 15(17):2541-8; Wang et al. *PLoS One.* **2015** 10(3):e0118290; Yang et al. *Bioorg Med Chem Lett.* **2013** 23(21):5855-9; Yang et al. *Biochem J.* **2014** 464(2):271-9; Yoshuzumi et al. *J Infect Chemother.* **2013** 19(5):992-5; Zhang et al. *Chem Med Chem.* **2014** 9(11):2445-8;

(Thiolverbindungen, Metallchelatoren) allerdings auf einen unspezifischen Wirkmechanismus schließen, was deren klinische Entwicklung erheblich erschweren könnte²⁰.

3 Verwertbarkeit

TUM

Wie oben beschrieben, wurden für alle Targets geeignete biochemischen Screening Assays etabliert, die alle die Kriterien der European Lead Factory und damit die Standards der Pharma-Industrie erfüllen.

Für die HpgGT wurde darüber hinaus ein weiterer *in vitro* Assay etabliert, der es erlaubt, die Hydrolyse des Substrats von der anschließenden Transpeptidierung zu unterscheiden und somit den Wirkmechanismus von Inhibitoren zu adressieren. Weiterhin wurden biochemische Tests aufgebaut, die es erlauben, die Spezifität der Inhibitoren für die HpgGT im Vergleich zur nahe verwandten CjgGT, der EcgGT (als Vertreter der endogenen Darmflora) und der humanen gGT zu bestimmen. Hierdurch können mögliche Nebenwirkungen der Inhibitoren bereits früh abgeschätzt und vermieden werden. Weiterhin wurde biologische *in vitro* Assays etabliert, die das Wachstum von *H. pylori*, sowie die immunevasive Wirkung der gGT über die Hemmung der T-Zellproliferation abbilden. Zusammen mit dem etablierten *in vivo* Maus-Infektionsmodell wurde für die gGT ein umfassende Assayplattform aufgebaut, mit der einen Großteil der nicht-klinischen Entwicklung von HpgGT Inhibitoren dargestellt werden kann.

Für die NDM-1 wurden verschiedene biochemische Screeningassays aufgebaut und validiert, die den speziellen Einfluss des verwendeten β -Lactam Substrats einerseits und der Zn^{2+} Konzentration andererseits auf die Wirksamkeit der Inhibitoren abbildet. Weiterhin ist die Entwicklung eines biologischen Wachstumsassays für NDM-1 positive *E. coli* bereits weit vorangeschritten. Damit ist es gelungen einen Assayplattform zu etablieren, die die Pathophysiologie der Infektion abbildet und somit rasch zu relevanten Screeningergebnissen führen wird.

Die validierten biochemischen Tests, die Assayplattformen für die NDM-1, die Sortase A und die HpgGT, sowie die Genehmigung für *in vivo* Maus-Infektionsversuche durch die Regierung von Oberbayern stellen insgesamt eine solide Ausgangsbasis für weitere Programme zur

²⁰ Klingler, FM et al. *J Med Chem.* **2015**, 58 (8), 3626-30.

Identifizierung von Inhibitoren dieser Targets dar und können umgehend eingesetzt werden. Entsprechende Förderprogramme für die NDM-1 und die Sortase A sind bereits eingereicht.

Priaxon AG

Für die Priaxon AG konnte die proprietäre PriaXplore® Plattform für eine schnelle Hit Generierung und medizinalchemische Optimierung zur Leitstruktur im Bereich der antibakteriellen Forschung validiert werden.

Die im Rahmen der Förderperiode entwickelten *H. pylori* γ -Glutamyltranspeptidase Inhibitoren mit ihrer vielversprechenden Aktivitäts- und Selektivitätsprofil haben das Potential, von Pharmaunternehmen einlizensiert zu werden. Dafür sprechen die hohe Attraktivität des Targets und der hohe Innovationsgrad des Ansatzes. Es besteht die Möglichkeit, dass beide Projektpartner auf Basis von FTE-Zahlungen an der Weiterentwicklung beteiligt werden.

4 Veröffentlichung

Bisher aus Vertraulichkeitsgründen wurden keine Teilergebnisse aus dieser Arbeit veröffentlicht. Grundlegende Arbeiten zur biochemischen Charakterisierung der NDM-1 wurden bei verschiedenen Konferenzen (Gordon Research Conference, DGHM Jahrestagung) als Poster präsentiert.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht m4 Spitzencluster personalisierte Medizin, Teilprojekt T9	
3. Titel Maßgeschneiderte Inhibitoren gegen essentielle bakterielle Targets		
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Dr.Meyer, Hannelore ^a Prof. Gerhard, Markus ^a Dr. Cédric Kalinski ^b	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.03.2015	6. Veröffentlichungsdatum 30.09.2015
7. Form der Publikation Abschlussbericht		8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) ^a Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene Technische Universität München Trogerstr. 30, 81675 München ^b Priaxon AG Rupert-Mayer-Str. 46, 81379 München
9. Ber. Nr. Durchführende Institution		10. Förderkennzeichen 16EX1022J und 16EX1022I
11. Seitenzahl 33		12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn
13. Literaturangaben 36 (+11 Webverweise)		14. Tabellen 6
15. Abbildungen 15		16. Zusätzliche Angaben Keine
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) VDI/VDE Innovation + Technik GmbH, Steinplatz1, 10623 Berlin 30.09.2015		
18. Kurzfassung Das vorliegende Verbundvorhaben hat zum Ziel, neue Antiinfektiva gegen weit verbreitete bzw. chronische Infektionskrankheiten zu entwickeln und dabei neue Erkenntnisse und Expertisen aus grundlagenorientierter und klinischer Forschung in der Infektiologie und Immunologie umzusetzen. Klassische Ansätze zur Entwicklung von Antibiotika zielen auf zelluläre Komponenten, die für das Überleben von Mikroorganismen notwendig sind, wie z.B. Zellwand-, Protein- oder DNA-Synthese. Da hierdurch unselektiv alle sensitiven Keime abgetötet werden, führt dieser Ansatz zu Nebenwirkungen und zunehmender Resistenzentwicklung, so dass viele in der Klinik relevanten bakterielle Infektionen mit den klassischen Antibiotika nicht mehr behandelt werden können. Um diesem Problem zu begegnen, werden neue Medikamente benötigt, die im Idealfall spezifisch gegen einzelne Bakterienstämme gerichtet sind. Optimale und bisher nicht ausreichend adressierte Angriffspunkte sind hierbei bakterielle Proteine, die für die Virulenz der Bakterien und die Etablierung einer Infektion im Menschen essentiell sind. Eine mögliche Funktion dieser bakteriellen Proteine ist dabei die Hemmung der menschlichen Immunantwort, so dass die Infektion nicht vom Immunsystem beseitigt werden kann. Klinisch entstehen aus dieser Situation entweder fulminante, oft fatale Verläufe (Sepsis) oder chronische Infektionskrankheiten. Diese Zielstrukturen werden in diesem Projekt adressiert und entsprechende Inhibitoren entwickelt, die später als Antiinfektiva in der Klinik eingesetzt werden können.		

19. Schlagwörter
Antibiotikaresistenz, Immunevasion, Carbapenemase, β -Lactamase, Antiinfektiva, *in silico* Screening

20. Verlag

21. Preis

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. type of document (e.g. report, publication) Final report m ⁴ Cluster Personalized Medicine and Targeted Therapies, Project T9	
3. title Tailored inhibitors against essential bacterial virulence factors		
4. author(s) (family name, first name(s)) Dr.Meyer, Hannelore ^a Prof. Gerhard, Markus ^a Dr. Cédric Kalinski ^b	5. end of project 31.03.2015	6. publication date 30.09.2015
	7. form of publication Final Report	
8. performing organization(s) (name, address) ^a Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene Technische Universität München Trogerstr. 30, 81675 München ^b Priaxon AG Rupert-Mayer-Str. 46, 81379 München	9. originator's report no.	
	10. reference no. 16EX1022J and 16EX1022I	
	11. no. of pages 33	
12. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references 36 (+11 web links)	
	14. no. of tables 6	
	15. no. of figures 15	
16. supplementary notes none		
17. presented at (title, place, date) VDI/VDE Innovation + Technik GmbH, Steinplatz1, 10623 Berlin 30.09.2015		
18. abstract The aim of the project is the development of novel agents against chronic infections, employing novel insight and expertise in the field of basic and clinical infection and immunological research. The standard antibiotic development strategies focus on cellular components necessary for the survival of microorganisms, such as the cell wall-, protein- or DNA-synthesis machinery. Due to non-selective killing of all susceptible bacteria, this approach leads to various side-effects and increasing resistance phenomena, as evidenced by failure to treat many relevant clinical strains with standard antibiotics. In order to counter the problem, new medications are required, ideally selectively targeting individual bacterial strains. The optimal and so far not fully exploited targets of such strategies are bacterial virulence factors essential during the initial stages of an infection. One possible function of these proteins is the silencing of the human immune response, the clinical result which is rapid and often fatal (sepsis) or leads to chronic infections. In this project we will identify and develop inhibitors against such virulence factors, which will further on be developed into antiinfective drugs suitable for clinical application.		
19. keywords antibiotic resistance, immune evasion, carbapenemase, β -lactamase, antiinfectives, <i>in silico</i> screening		
20. publisher	21. price	