

Sachbericht zum Verbundprojekt

„ADvANCE“**zur BMBF Ausschreibung****„Wirkstoffentwicklung auf Basis von Naturstoffen zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten“**

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene Technische Universität München Trogerstraße 30 81675 München	Förderkennzeichen 16GW0215K
Vorhabenbezeichnung: ADMET und DMPK Optimierung von Naturstoff-basierten Carbapenemase Inhibitoren	
Laufzeit des Vorhabens und Berichtszeitraum: 01.04.2019 bis 31.03.2023	

Teil I: Kurzbericht**Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen**

Die alarmierende Ausbreitung von Antibiotika Resistenzen stellt eine zunehmende Bedrohung für die Gesundheit und das Leben der Menschen dar. Infektionen mit Gram negativen, Carbapenem resistenten Erregern sind hierbei eine besondere Herausforderung, weil die verbleibenden Behandlungsmöglichkeiten besonders stark eingeschränkt sind und die wichtigste und am häufigsten eingesetzte Klasse von Antibiotika (β -Lactame) vollständig ihre Wirksamkeit verliert. Die WHO Liste der Prioritätspathogene unterstreicht den dringenden Bedarf neuer Therapien gegen diese Infektionen, da die genannten Pathogenen in der höchsten Dringlichkeitsklasse zu finden sind (kritisch).

Wir begegnen diesem Bedarf, indem wir einen neue Inhibitor Klasse gegen die Carbapenemase Klassen entwickeln und damit die Wirksamkeit dieser besonders gut verträglichen und breit wirksamen Reserve β -Lactame erhalten.

In unseren Vorarbeiten hatten wir zwei Fragment Klassen identifiziert, die eine inhibitorische Wirkung gegen Carbapenemasen haben. Eine Klasse stammt aus der Fragment Bibliothek der HMGU und hemmt sowohl die Serin- wie auch die metallo-Carbapenemasen (Serin- β -Lactamasen SBL und metallo- β -Lactamasen MBL). Diese breite Wirksamkeit ist außergewöhnlich, da beide Enzymklassen strukturell und mechanistisch völlig verschieden sind. Die zweite Fragment Klasse stammt von einem Naturprodukt ab und zeigt eine deutliche Hemmung verschiedener MBL Enzyme.

Unser Projekt hatte zum Ziel, eine von einem Naturstoff abgeleitete Fragment Klasse entweder selbst oder in Verbindung mit einer anderen bereits identifizierten Fragment Klasse in Bezug auf Wirksamkeit, Stabilität und Verträglichkeit zu verbessern. Im Teilprojekt an der TUM haben wir neben der Projektkoordination die Untersuchungen zur Wirksamkeit in biochemischen und

biologischen Assays durchgeführt und die externen Projektarbeiten zu chemischen Auftragssynthese und ADME-Tox Untersuchungen koordiniert.

In unseren Arbeiten haben wir durch chemische Modifikation die inhibitorische Aktivität gegen einzelne Carbapenemasen verbessert. Hierbei wurden beim Design der neuen Derivate zum Teil KI-basierte Ansätze eingebracht, die auf den Röntgenstrukturanalysen der Ko-Kristalle eines Fragments mit IMP-13 und den quantenmechanischen Bindungsstudien beruhen. Hier haben wir eine vom HMGU patentierte Technologie eingesetzt, die eine chemische Modifikation eines Leitmoleküls empfiehlt. Das KI-System lernt aus 20 000 Protein-Inhibitor-Strukturen und Milliarden von Datenpunkten darin. Diese bereits patentierte und auslizenzierte Technologie hat sich bei der Optimierung der medizinischen Chemie als überlegen erwiesen. Allerdings zeigt keines der neu entwickelten Derivate eine stark verbesserte Aktivität gegen alle getesteten Carbapenemase Klassen. Die Fusion mit dem naturstoff-basierten Fragment Klasse hat dabei leider keine verbesserte Wirksamkeit erbracht. Dennoch konnten wir die Hemmung einzelner Carbapenemasen deutlich verbessern. Dies konnte nicht nur in biochemischen gezeigt werden, sondern auch in biologischen Wachstumsassays validiert werden.

Unsere biologischen Assays zeigten zusätzlich zur Hemmung der Carbapenemasen eine eigenständige antibiotische Aktivität der nicht vom Naturstoff abgeleiteten Fragment Klasse. Diese direkte antibiotische Aktivität war dosis-abhängig gegen klinische Isolate aller WHO I Pathogene nachweisbar. Die Kombination aus Carbapenemase Hemmung und direkter Antibiotischer Aktivität ist bisher in keinem anderen Molekül beschrieben und könnte der Ausgangspunkt für eine neue Klasse von neuen antibakteriellen Wirkstoffen mit einem doppelten Wirkmechanismus (Schutz der Reserve β -Lactame und zusätzliche antibiotische Wirksamkeit darstellen.

In den weiteren Arbeiten und mit Unterstützung aus den Förderprogrammen m4 Award und GO-Bio *initial* haben wir die antibiotische Aktivität gegen *A. baumannii* und *E. coli*, aber nicht gegen *P. aeruginosa* oder *K. pneumoniae* bis zum Hit Niveau (Minimale Hemmkonzentration im einstelligen mg/L Bereich) verbessert (TUM). Weiterhin zeigt die Fragment Klasse ebenfalls antibiotische Aktivität gegen *S. aureus* und (teilweise) *E. faecium*. Diese Fragment Serie zeigt sehr gute physico-chemische Eigenschaften und stellt damit einen besonders guten Ausgangspunkt für die Entwicklung einer neuen und einfach zu synthetisierenden Antibiotika-Klasse dar. Dabei werden die nächsten Schritte die Aufklärung des Wirkmechanismus und die Verbesserung der Stabilität und Toxizität sein.

Sachbericht zum Verbundprojekt

„ADvANCE“**zur BMBF Ausschreibung****„Wirkstoffentwicklung auf Basis von Naturstoffen zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten“**

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene Technische Universität München Trogerstraße 30 81675 München	Förderkennzeichen 16GW0215K
Vorhabenbezeichnung: ADMET und DMPK Optimierung von Naturstoff-basierten Carbapenemase Inhibitoren	
Laufzeit des Vorhabens und Berichtszeitraum: 01.04.2019 bis 31.03.2023	

Teil II: Eingehende Darstellung

The alarming spread of antibiotic resistances is a growing threat to the health and lives of the population. Infections with Gram-negative, Carbapenem resistant pathogens pose an exceptional challenge, as antibiotic treatment options are particularly limited. The WHO list of priority pathogens underlines the urgent need for novel therapies against these infections, as these pathogens are listed in the highest priority class (critical).

We answer this need by developing novel inhibitors against all classes of carbapenemases, which will protect the efficacy of the widely used and well-tolerated, and efficacious reserve β -Lactams. In this project we aim to optimize our natural product-based inhibitors with respect to their applicability in terms of solubility, stability, and toxicity. In our subproject at TUM we will monitor the efficacy of all newly synthesized inhibitory compounds in our biochemical and biological assays. Moreover, we will coordinate, monitor, and evaluate all externally conducted tests on solubility, stability, and toxicity.

Due to their strong and broad inhibitory activity against all classes of carbapenemases, and novel chemical structure, our inhibitors are distinct from other candidates in the field, especially, as there are no such inhibitors approved so far.

1. Darstellung der erzielten Ergebnisse (TUM)**AP 1 Project Lead (TUM)**

Project coordination tasks were conducted by Dr. Hannelore Meyer (TUM) for the entire consortium. This included preparation of the Consortium Agreement, organization of regular project meetings (either virtual on a biweekly schedule or in person at least once per year) with

all PIs, PostDocs and our industry mentor Dr. Peter Sennhenn. Additional telephone conferences and meetings were held whenever appropriate.

Furthermore, the results of our work were presented on various conference (e.g. ESCMID conference, AMR Biocom Conference, and DZIF annual meetings) and the Vernetzungstreffen Wirkstoffinitiative as well as CARB-X /CLSI.

For subcontracting of chemical compound synthesis, quantum mechanical binding studies and preliminary ADME-Tox studies, all tender procedures were performed according to the regulations (including request of three quotes; Vergabevermerk and Auszug aus dem Wettbewerbsregister were obtained) Contract Service Agreements and Non-Disclosure Agreements were prepared and signed. Timelines and appropriate delivery of services, compounds and data were monitored and ensured.

AP 4 Activity and selectivity profiling (TUM)

The inhibitory activity of the test compounds towards β -lactamase enzymes (BLI activity) were analysed in biochemical assays. Therefore, the respective β -lactamase enzymes (twelve) were recombinantly produced and purified. This included cloning, production, and assay validation for four novel β -lactamases (CphA, L1, OXA-23 and OXA-48).

The inhibitory activity was monitored via a shift in the absorbance of the respective β -lactam substrates. Here we mostly used meropenem an imipenem as clinically relevant carbapenem (last line β -lactam substrates) in order to closely reflect the therapeutic situation. However, due to the high absorbance of the test compounds exactly at the same wavelength, at which meropenem /imipenem hydrolysis indicating enzyme activity is monitored, we needed to adapt the biochemical assays to lower substrate concentrations in order to avoid absorbance saturating effects.

Overall, 200 compounds, including 14 compounds, which were designed by a novel AI algorithm by our HMGU project partners (synthesized by the CRO (Enamine) for chemical compound synthesis) were analysed for their β -lactamase inhibitory activity. In the primary screen compounds were tested against three Metallo- β -lactamases (MBL: IMP-13, NDM-1, and VIM-1) and two Serine- β -lactamases (SBL: GES-5 and KPC-2).

Combining the initially identified natural product derived fragment with the fragment derived from the HMGU fragment library did not result in an improved inhibitory activity against β -lactamase tested. However, individual derivatives of the HMGU library fragment were identified with improved activity against KPC-2 or NDM-1 (IC_{50} values in the double digit micromolar range).

In our attempts to improve compound activity in terms of carbapenemase inhibition, we identified a new derivative series with pronounced activity towards individual enzymes (primarily NDM-1, IMP-13, and VIM-1; all MBL class enzymes). This was achieved by combining fragment series B (HMGU derived) with another fragment class, which was designed to inhibit the movement of the protein loop of MBL enzymes, which opens and closes the enzyme active site during the cycle of β -lactam hydrolysis (substrate / product exchange). In an AI based attempt to improve compound activity of the compounds consisting of the HMGU library derived fragment and the fragment demonstrated to inhibit the movement of the loop, which closes the active site in MBL enzymes, exploiting the co-crystal structure of this compound series with IMP-13 (see report HMGU), 18 compounds were designed. These newly designed compounds are expected to undergo additional interactions with the target enzyme

and, thus show improved activity. However, both solubility and inhibitory activity of these compounds was limited.

Off-target activity against eukaryotic enzymes, which are highly related to MBL β -lactamase were performed with selected compounds with improved activity against MBL enzymes (NDM-1 and VIM-1). Biochemical activity assays against Glyoxylase II and Angiotensin converting Enzyme did not reveal off-target activity, which mitigates the risk of toxicity.

Complementing the biochemical assays for monitoring the inhibitory activity of the compound series, we determined the β -lactamase inhibitory activity in bacterial growth assays. For this we established checkerboard assays in which the β -lactam substrate (meropenem) is titrated along the x-axis, and the test compound is titrated along the y axis. This set up allows us to monitor the protection of meropenem (by compound mediated inhibition of the β -lactamase) as the minimal inhibitory concentration for meropenem decreases. These experiments were performed in isogenic *E. coli* $\Delta_{bamb}\Delta_{tolC}$ strains with or without expression of NDM-1. For most of the compounds we were able to confirm the inhibitory activity, which we observed in the biochemical assays. Other compounds showed only a very weak effect at high compound concentrations, which indicates poor compound uptake into bacterial cells.

To our surprise, we identified a direct acting antibiotic activity of selected compound derivative, which was independent of the β -lactamase inhibition and independent of the addition of any β -lactam antibiotic. The antibiotic activity was also observed in *E. coli* $\Delta_{bamb}\Delta_{tolC}$ strains, which do not express any β -lactamase. Some compounds show a dual activity (inhibition of β -lactamase targets in combination of the antibacterial activity). Of course, these compounds caught our attention as these derivatives series offer a dual mode of action activity, which might allow lower therapeutic doses and slower resistance formation. The antibiotic activity was also observed in *E. coli* $\Delta_{bamb}\Delta_{tolC}$ strains, which do not express any β -lactamase. Furthermore, we confirmed the direct antibacterial activity in a dose-dependent manner in clinical isolates of all major WHO class I pathogens.

This exciting observation laid the grounds for two successful grant applications, in which we analysed this antibacterial activity in *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* (m4 Award, TUM) and *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* (GO-Bio initial; TUM) So far, we improved the antibacterial activity in *E. coli* and *A. baumannii* to minimal inhibitory concentrations of 8 mg/L and currently analyse the Mode-of-Action.

AP6 ADMET, DMPK & PoC profiling (TUM)

As most the inhibitory activity of this compound series was only for individual target enzymes and none of the compounds showed a broad-spectrum pan activity against all β -lactamase classes, we decided to analyze the physico-chemical and *in vitro* ADME-Tox properties only for a small number of selected compounds. This information is valuable for potential further optimization, particularly with respect to the direct antibacterial activity of this series.

These studies confirmed excellent physico-chemical properties with respect to solubility, LogD / logP, molecular weight, good plasma protein binding and CYP inhibition, but issues with stability (mouse plasma and mouse microsomes) and toxicity (HepG2, hERG), as well as limited Caco-2 permeability.

Summary

In summary, we succeeded in improving the BLI activity of our fragment series against individual BLI enzymes. However, improving the BLI activity against both SBL and MBL

enzyme groups simultaneously was not possible. Furthermore, incorporation of the natural product derived fragment did not improve BLI activity.

Apart from our work on the BLI activity of the compound series, we observed a direct acting antibiotic activity of the fragment series. The combination of weak, but broad spectrum BLI activity and this direct acting antibiotic activity is outstanding and so far according to our knowledge not described for any other compound class. In contrast to BLI activity, we succeeded to improve the antibiotic activity of the fragment series up to MIC values in single digit mg/L range against *A. baumannii* and *E. coli*, but not for *P. aeruginosa* or *K. pneumoniae*. Furthermore, the fragment also showed Hit like activity against *S. aureus* and (in part) *E. faecium*). Therefore, the fragment series with its excellent physico-chemical properties is a promising starting point for the development of an entirely new class of antibiotics.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Eine Zusammenfassung der projektausgaben (ohne Projektpauschale) ist in folgender Tabelle aufgelistet:

ADvANCE 16GW0215K	Bewilligung ursprünglich	nach Umwidmung	Ausgaben IST 2019	Ausgaben IST 2020	Ausgaben IST 2021	Ausgaben IST 2022	Ausgaben IST 2023	Gesamtsumme Ausgaben
E13	132.462,24	139.461,00	0,00	26.917,98	16.470,53	75.160,75	18.082,29	136.631,55
E9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Aufträge	362.800,00	325.800,00	0,00	61.707,76	124.245,40	17.850,00	104.720,00	308.523,16
Verwaltungsausgaben	38.000,00	38.000,00	5.149,32	8.940,33	10.519,84	12.689,56	7.693,63	44.992,68
Reisen	7.000,00	6.900,00	834,78	1.680,69	0,00	3.744,77	1.041,03	7.301,27
Investitionen	43.709,00	73.709,00	38.640,49	0,00	33.164,63	0,00	0,00	71.805,12
	583.971,24	583.870,00	44.624,59	99.246,76	184.400,40	109.445,08	131.536,95	569.253,78

Weitere Details, s. zahlenmäßiger Verwendungsnachweis.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Die Synthese der Fragment Derivate wurde zum einen bei unseren Partnern am HZI durchgeführt. Zum anderen haben wir einen Großteil der Derivate von einem CRO (Enamine) erhalten. Diese Unteraufträge waren sinnvoll und notwendig, da in keinem akademischen Labor eine ausreichende Synthesekapazität vorhanden ist, um ein so synthese-intensives Projekt zu begleiten und sinnvoll voranzubringen.

Alle synthetisierten Substanzen (sowohl vom HZI, wie auch von unserem Dienstleister Enamine) wurden in biochemischen Assays und orthogonalen bakteriellen Wachstumsassays eingesetzt, um deren BLI und antibiotische Aktivität zu ermitteln und zu validieren. Diese Arbeiten waren notwendig, um die Struktur-Aktivitätsbeziehung in Bezug auf beide Aktivitäten aufzubauen und somit eine Grundlage für eine rationale Optimierung der Compounds zu legen. In diesem Bereich sind auch die quantenmechanischen Studien angesiedelt, die uns zusätzlich zu den Röntgenstrukturdaten unserer Partner am HMGU Informationen zu dem Bindungsmodus der Fragmente an die jeweilige Ziel- β -Lactamase gegeben hat.

Die Bindung der wichtigsten Derivate wurde in NMR-basierten Interaktionstests getestet. Hier verwendeten wir isotopisch markierte MBL und SBL und beobachteten spektrale Veränderungen bei der Bindung des Inhibitors. Diese Daten wurden verwendet, um die Interaktion an der Bindungsstelle zu bestätigen. Wir haben auch versucht, die Inhibitoren im Komplex mit MBL/SBL zu ko-kristallisieren. Dies führte zu einer Reihe von Strukturen. Die

Elektronendichte des Fragments war jedoch nur schwach sichtbar und chemisch schwer zu interpretieren. Dennoch wurde diese Information in den nachfolgenden Optimierungsrunden genutzt. (HMGU).

Die ersten Studien zu den physico-chemischen ADME-Tox Eigenschaften der Fragment Klasse geben einen ersten Anhaltspunkt und Orientierung für die Weiterentwicklung in Bezug auf die antibiotische Wirksamkeit. Diese Ergebnisse sind – neben der Aktivitätsbestimmung – eine wertvolle Grundlage, um sowohl die Auswahl der Derivate zu treffen, die für eine Weiterentwicklung in Frage kommen. Darüber hinaus haben wir so Hinweise erhalten, welche Eigenschaften verbessert werden müssen, bzw. in Zukunft weiter im Blick behalten werden müssen.

4. Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

BLI Aktivität konnte nur in geringem Maß und auch nur gegen einzelne Enzyme verbessert werden. Zusätzlich haben mit der Einführung der Boronate als breit wirksame BLI Klasse zwei neue Substanzen (Taniborbactam und QPX7728) beeindruckenden Daten in diesem Bereich gezeigt. Beide Substanzen befinden sich bereits in klinischer Prüfung. Somit hat sich das Interesse des Felds stark in Richtung neuer direkt wirksamer Antibiotika entwickelt. In Gesprächen mit Experten im Feld wurde immer wieder darauf hingewiesen, dass das Interesse der Firmen und Investoren in diesem Bereich der BLI stark nachgelassen hat.

Aus diesen Gründen haben wir im Lauf des Projektes unseren Fokus zunehmend auf die antibiotische Aktivität gelegt, da diese Fragment Klasse bisher nach ersten Analysen im Rahmen einer anderen Förderung (Freedom-to-Operate) hat.

Die Ergebnisse aus dem Advance Projekt haben es uns weiterhin ermöglicht, zwei neue Förderprojekte erfolgreich einzuwerben (m4 Award und GO.-Bio *initial*; TUM), mit denen wir die antibiotische Aktivität gegen *E. coli* und *K. pneumoniae*, bzw. *A. baumannii* und *P. aeruginosa* verbessern. Neben dem weiteren Projektfortschritt ist diese Unterstützung sehr wertvoll, um das Team zu finanzieren und somit die Expertise und Erfahrung zu halten. Dies ist für die Weiterentwicklung der Fragment Klasse äußerst wertvoll.

Durch die Förderung und Sichtbarkeit über die oben genannten Programme m4 Award und GO.-Bio *initial* haben wir Kontakt zu INCATE und ENABLE-2 bekommen, die in Bezug auf Diskussion und strategische Planung wertvollen Input gegeben haben. Zusätzlich haben wir Kontakte zu verschiedenen Investoren geknüpft, die uns bei einer erfolgreichen Weiterentwicklung gegebenenfalls behilflich sind, eine eigene Ausgründung zu finanzieren.

5. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Wie oben bereits beschrieben, sind während der Projektlaufzeit signifikante Fortschritte bei der Entwicklung von breit wirksamen BLI Molekülen beschrieben worden. So haben sowohl VenatorX als auch Qpex jeweils ein Boronat (VNRX5133 = Taniborbactam und QPX7728) beschrieben, die sowohl inhibitorische Aktivität gegen SBL wie auch MBL Carbapenemasen zeigt. Diese Boronate binden kovalent an die jeweiligen Zielstrukturen und inhibieren deren Aktivität entsprechend gut. Beide Substanzen befinden sich in klinischer Prüfung in Phase I, bzw. III (FDA Acceptance and Priority Review of New Drug Application for Cefepime-

Taniborbactam 15.08.2023). Daher wird derzeit der Bedarf an weiteren Carbapenemase Inhibitoren als gering eingeschätzt. Das Interesse an weiteren Compounds mit diesem Aktivitätsspektrum hat im Feld merklich nachgelassen.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Ein erster Teil der Ergebnisse wurde folgender Publikation veröffentlicht:

Structure and Molecular Recognition Mechanism of IMP-13 Metallo- β -Lactamase.

Softley CA, Zak KM, Bostock MJ, Fino R, Zhou RX, Kolonko M, Mejdi-Nitiu R, Meyer H, Sattler M, Popowicz GM. Antimicrob Agents Chemother. 2020 May 21;64(6):e00123-20. doi: 10.1128/AAC.00123-20. Print 2020 May 21.

Weiterhin bereiten wir eine Patentanmeldung für eine Klasse von breit wirksamen BLI Fragmenten vor. Sobald die Patentanmeldung eingereicht ist, werden wir eine entsprechende Publikation vorbereiten.