

Sachbericht zum Verbundprojekt

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

Institute of Structural Biology Helmholtz Zentrum München Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH) Ingolstädter Landstr. 1, 85764, Neuherberg	Förderkennzeichen 16GW0217
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. Der HMGU-Teil des ADVANCE-Projekts bestand aus Strukturuntersuchungen, orthogonalen Tests und der Entwicklung von

Verbindungen. Die TUM hat für das Projektmanagement und die Erstellung von Wirkstoffprofilen, 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 Carbapenemase 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 Carbapenemase 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 Carbapenemase 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“**

Institute of Structural Biology Helmholtz Zentrum München Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH) Ingolstädter Landstr. 1, 85764, Neuherberg	Förderkennzeichen 16GW0217
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 (HMGU)**AP 2 Compound design (HMGU)**

Structure guided compound design from initial compounds obtained in the project suffered from several drawbacks preventing efficient structural investigations (see previous reports). Typically, the obtained density showed ligand presence but were “blurred” indicating significant level of ligand motility within active site. This motility was seen as a beneficial feature enabling the inhibitor to adjust to diverse MBLs. However, it prevented obtaining clear binding data. We

have, therefore, used an improved scaffold derivative of much better physicochemical parameters. This derivative proved amenable to crystallization and NMR studies. Initially, the refined structure of GP-03-03-1 fragment provided structural motifs to design molecule based on salicylic acid ring core that mimics interaction carried by antibiotic pharmacophore. We have designed an NMR-based assay allowing for screening of target protein dynamics. Tested, available compounds in an NMR based assay showed significant binding and good physicochemical properties. The compounds were used for co-crystallization through mixing fragments with protein prior to crystallization screening. The diffraction experiments yielded several high-quality structures revealing critical molecular recognition motifs. This allowed rational merging with the GP-03-03-1 fragment. The designed compounds were produced by HZI and assayed. In the reporting period we have obtained five new crystal structures of these derivatives with IMP-13 protein. We have determined that the presence of deeply-buried carboxy-group and a halogen bond is responsible for the natural fragment binding.

Over last project months, an artificial intelligence tool for compound optimization has become available at HMGU (internal development project). This tool allows translation of protein structural information into suggestions for ligand optimization. It has been trained on over 20,000 experimental protein-ligand complex structures and proven accurate in several validation experiments. We have used this tool to design a next generation of optimized compounds. The compounds showed improved inhibitory activity over selected enzymes, however, we were not able to provide pan-lactamase activity as desired. The compound optimization phase was carried out with consultancy by Dr. Peter Sennhenn (transMedChem). Final rounds of design were focused on support in chemical optimization, synthesis support and quantitative SAR analysis.

AP 5 Structure and dynamics of ligand placement. Molecular recognition characterization (HMGU)

Molecular recognition assays for flexible natural product derivatives were based on an extensive crystallographic evaluation on the interface and obtained important information on molecular recognition (AP2). The focus has been placed on the IMP-13, NDM-1, KPC-2 and GES-5. This was due to their optimal technical properties (expression, purification and crystallization). Altogether seven structures of these proteins have been solved during the reporting period. The new fragments obtained in NMR-based screen were based on salicyl core and were yielding good electron density data and allowed for easy placement and extension. In addition, an NMR assay was established to trace the dynamics of a “lead” fragment of metallo-beta-lactamases. This information allowed to merge the previously seen binding mode of GP-03-03-1 (the natural product) at the rim of the active site with new salicyl element in proximity of the active site. This extended molecular recognition principle was further explored as new compound modifications. Simultaneously, availability of a new, artificial intelligence-based tool for structure-based ligand design (HMGU proprietary software) allowed us to prepare a new set of compounds. These compounds were produced in the last months of the project. Improvement of inhibitory activity was observed for selected enzymes. However, we were not able to achieve pan-inhibitory activity.

To be able to observe the interaction of inhibitors within the active site without the need for crystallization, we have establishment of a routine set of PRE and PCS experiments enabling detailed binding mode analysis. The lanthanide induced chemical shifts assays are available for (Dy³⁺, Tm³⁺, Yb³⁺) relative to the diamagnetic reference (Lu³⁺). Using this information, pseudo contact shift and residual dipolar coupling tensors were calculated for each paramagnetic ion, for use in future ligand positioning. However, this assay has been superseded now by very efficient crystallization protocol. Our crystallization effort for IMP-13 molecules has been satisfactory to provide the project with sufficient structural data. Therefore, the PCS experiments were kept on standby in case of need.

We have obtained structure of natural product derivative GP-03 as well as four structures of different salicin derivatives. The binding mode has been validated by the NMR experiments. NMR was used for measurements of binding versus inhibitory activity of selected molecules.

The natural product-derived fragment as well as newly identified salicin derivatives show significant binding but relatively limited inhibitory potency. This is because their interaction site is located at the rim of the protein active site. We have determined a rich set of molecular recognition features that cause this mode of binding. Future inhibitor development will use this crucial data.

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* (TUM). 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
Personalkosten	162.800,00	237.800,00	46.856,67	55.799,17	32.811,50	65.227,48	42.786,55	243.481,37
Materialkosten	30.000,00	30.000,00	0,00	2.272,98	1.378,20	3.674,73	2.078,05	9.403,96
FE-Fremdleistungen	153.900,00	78.900,00	0,00	55.504,58	17.985,00	3.412,50	50,23	76.952,31
Reisekosten	900,00	900,00	608,93	0,00	0,00	0,00	0,00	608,93
Transportkosten	-	-	0,00	1.005,55	680,81	0,00	0,00	1.686,36
Publikationskosten	-	-	0,00	3.641,80	0,00	0,00	0,00	3.641,80
Verwaltungskosten	25.801,00	25.801,00	6.597,72	10.025,75	5.953,85	8.833,26	5.751,64	37.162,23
Gesamt	373.401,00	373.401,00	54.063,32	128.249,83	58.809,36	81.147,97	50.666,47	372.936,96

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.

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, Mejd-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.