

Aspergillomarasmin A, ein Inhibitor bakterieller Metallo- β -Lactamasen vom bla_{NDM} - und bla_{VIM} -Resistenztyp**

Franz von Nussbaum* und Guido Schiffer*

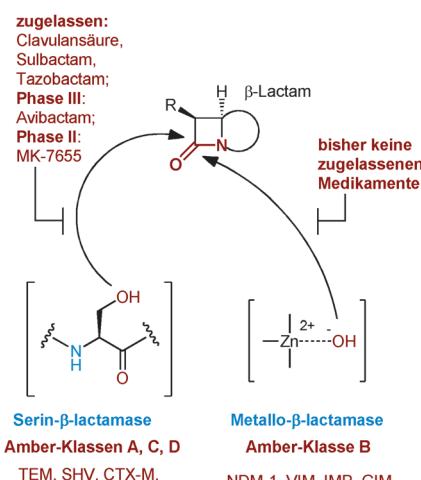
Aminosäuren · Antibiotika · Lactame · Naturstoffe ·

Zink

Stehen wir vor einem post-antibiotischen Zeitalter?^[1] Die WHO ist davon überzeugt, dass die Bedrohung durch antimikrobielle Resistzenzen keine Zukunftsprognose mehr ist, sondern eine Realität, die schon heute jede Region der Welt betrifft und das Potenzial hat, einen jeden zu ereilen.^[2] Hieraus ergibt sich eine wichtige Verpflichtung für die wissenschaftliche Gemeinschaft: Der bakteriellen Resistenz muss eine Kampfansage gemacht werden, mit neuen biologischen Targets und neuen antibiotischen Chemotypen.^[3] Geschieht dies nicht schnell, riskieren wir ein post-antibiotisches Zeitalter mit absehbar katastrophalen Folgen.

Auch sieben Jahrzehnte nach der Einführung von Penicillin G sind β -Lactam-Antibiotika immer noch der Eckpfeiler für die Behandlung von schweren Infektionen durch zunehmend multiresistente Gram-negative Pathogene wie Enterobacteriaceen und nicht-fermentierende Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii*. Die über Jahrzehnte weitverbreitete medizinische Anwendung von β -Lactamen hat zur Entstehung von verschiedenen Resistenzmechanismen beigetragen. Hierbei spielen verstärkter Efflux, verminderte Permeabilität, veränderte Transpeptidase-Enzyme und die chemische Inaktivierung von β -Lactamen durch über Tausend β -Lactamasen eine zentrale Rolle (Schema 1). Insbesondere die weltweite Verbreitung von Extended-Spectrum- β -Lactamasen (ESBLs) beförderte die vermehrte Anwendung von modernen – ESBL-inerten – Carbapenemen, die als Breitband-Antibiotika gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien wirksam sind. Dies wiederum leitete die Evolution von „Killerbakterien“ ein, die sogar Carbapenem-abbauende β -Lactamasen exprimieren (Carbapenemasen).

Serin- β -Lactamasen katalysieren die Hydrolyse der Amidbindung im β -Lactamring über ein kovalentes Serin gebundenes Acyl-Intermediat (Amber-Klasse A, C und D). Dies führt zu inaktiven, offenkettigen Produkten. Nur wenige



Schema 1. Klassifizierung von β -Lactamasen.

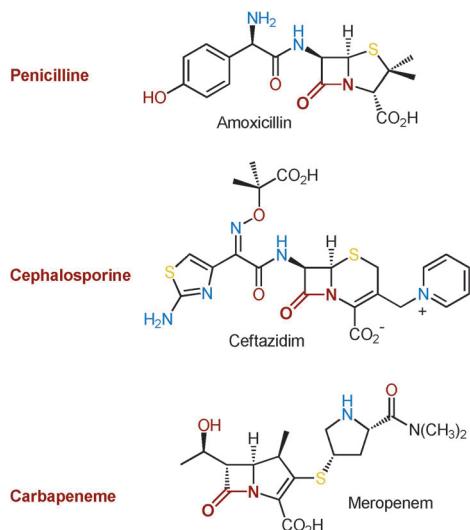
Inhibitoren der Serin- β -Lactamasen haben Anwendung am Patienten gefunden (Schema 1).^[4]

Metallo- β -Lactamasen (MBLs) hingegen benötigen für ihre Aktivität Zink, und die Katalyse erfolgt nicht über ein kovalentes Intermediat, sondern durch den nucleophilen Angriff eines OH-Anions. Dieses ist durch Zink im aktiven Zentrum stabilisiert (Klasse B).^[5] Organismen, die MBLs produzieren, sind resistent gegen nahezu sämtliche klinisch eingesetzten β -Lactam-Antibiotika (Schema 2). Der medizinische Bedarf auf diesem Gebiet ist besonders hoch, da bisher kein einziger Wirkstoff gegen MBLs zugelassen ist.

MBL-Enzyme wurden vor fünf Jahrzehnten entdeckt.^[6] Anfänglich sah man sie nicht als schwerwiegendes Problem an, da sie nur chromosomal kodiert in nicht-pathogenen Organismen vorkamen. In den 1990er Jahren änderte sich die Situation mit der Ausbreitung von MBLs des IMP-^[7] und VIM-Typs^[8] in Gram-negativen Pathogenen. Heutzutage kommen die Gene des IMP- und VIM-Typs zusammen mit anderen Resistenzgenen in genetisch mobilen Integronen vor, die sich in das bakterielle Chromosom oder aber in Plasmide integrieren können.^[9] Integronen sind hochflexible Vehikel, die den genetischen Transfer von Resistenzdeterminanten zwischen verschiedenen Bakterienstämmen forcieren.

[*] Dr. F. von Nussbaum, Dr. G. Schiffer
Global Drug Discovery, Bayer HealthCare
E-Mail: franz.nussbaum@bayer.com
guido.schiffer@bayer.com

[**] Wir danken U. Egner für eine Analyse publizierter NDM-Strukturen und D. Sülzle für die Berechnung des AMA-Zn-Komplexes.



Schema 2. β -Lactam-Antibiotikaklassen, die durch MBLs inaktiviert werden.

Das erst in letzter Zeit entdeckte NDM-1-Enzym (Neu-Delhi Metallo- β -Lactamase 1) stellt ein alarmierendes Beispiel für die Verbreitung von MBLs dar. NDM-1 wurde 2008 in einem *Klebsiella-pneumoniae*-Stamm entdeckt, der von einem schwedischen Patienten stammte, der nach Neu Delhi gereist war, wo er sich eine Harnwegsinfektion zuzog.^[10] Der ursprüngliche Erreger erwies sich als resistent gegenüber allen getesteten Antibiotika mit Ausnahme von Colistin. Detaillierte Untersuchungen bekräftigten die bemerkenswerte Promiskuität von *bla*_{NDM-1}-Plasmiden.^[11] Seitdem breitet sich *bla*_{NDM-1} rapide auf globaler Ebene aus. Darüber hinaus ist NDM-1 in nahezu allen klinisch relevanten Spezies von Enterobacteriaceen, in *A. baumannii* und *Pseudomonas* spp. gefunden worden, was die Leichtigkeit belegt, mit der *bla*_{NDM-1}-tragende Plasmide sogar die Grenzen von Familien überschreiten.^[11] Durch Sequenzierung von *bla*_{NDM-1}-Plasmiden sind bis zu 14 andere Antibiotika-Resistenzgene identifiziert worden, sodass *bla*_{NDM-1}-tragende Erreger nur noch auf Tigecyclin und Colistin ansprechen.^[11] Zusammenfassend stellt der multiresistente (MDR-)Phänotyp, der durch die rapide Ausbreitung der *bla*_{NDM-1}-Plasmide hervorgerufen wird, eine schwerwiegende Bedrohung für das Gesundheitssystem dar.

Alle MBLs sind Zink-tragende Enzyme. Das aktive Zentrum enthält ein oder zwei Zinkatome. Es wird vermutet, dass ein Zn²⁺-gebundenes OH-Anion den β -Lactam Ring durch nucleophilen Angriff spaltet. MBLs werden in die drei Subklassen B1, B2 und B3 unterteilt. Innerhalb dieser Subklassen ist die Sequenzübereinstimmung hoch, zwischen den Subklassen ist sie niedrig (< 20%). Die Subklasse B1 enthält die bekanntesten MBLs (unter anderem IMP, VIM und NDM). Alle Enzyme aus B1 zeichnen sich durch ein zweikerniges aktives Zink-Zentrum aus. Für optimalen Enzym-Umsatz müssen beide Zink-Positionen besetzt sein, wobei die erste durch drei His-Seitenketten und die zweite durch eine Asp-Cys-His-Triade koordiniert wird (Abbildung 1).

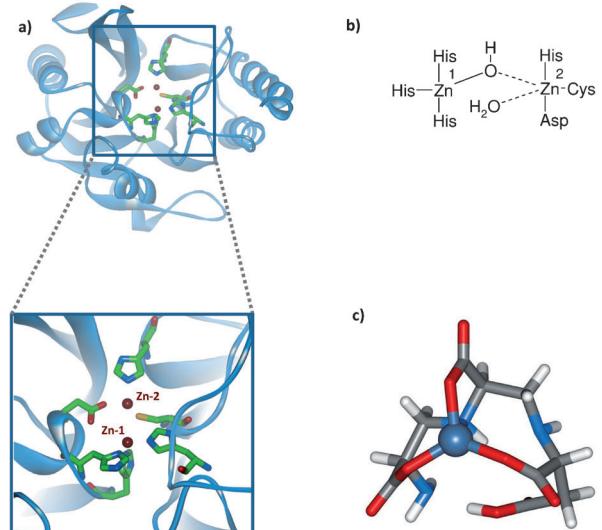


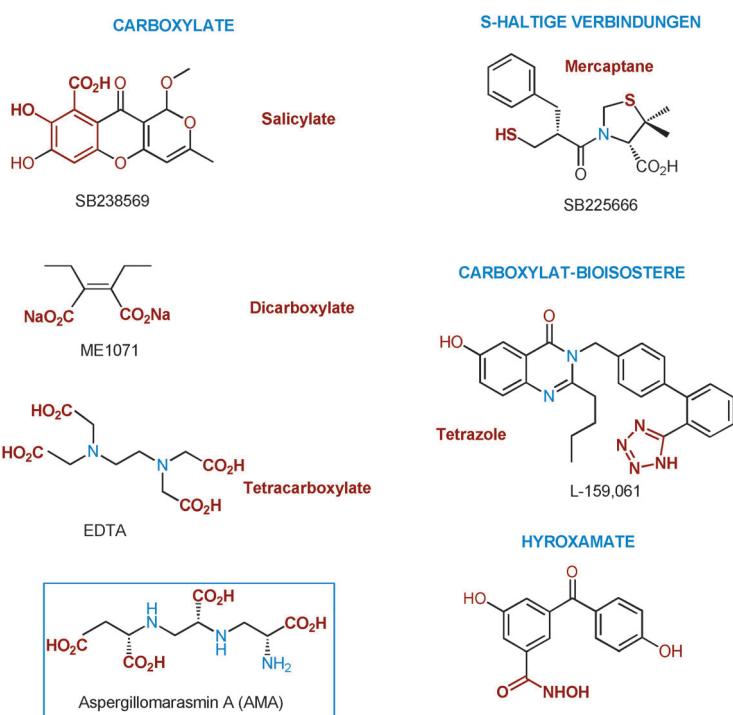
Abbildung 1. Apo-Struktur^[12] von NDM-1 mit beiden Zn²⁺-Kationen:
a) Bändermodell ohne Wassermoleküle und Hydroxidionen; b) aktives Zentrum (schematisch); c) modellierter anionischer Komplex von Zn²⁺ mit Aspergillomarasinat A (Energie-minimiert, DFT B3LYP/6-31 + G**).

Obwohl die Suche nach MBL-Inhibitoren schon über zehn Jahre läuft, war sie leider nicht überaus erfolgreich. Überzeugende In-vivo-Wirkung in relevanten Modellen konnte nur in wenigen Fällen gezeigt werden. Allein das Dicarboxylat ME-1071 hat es in die frühe klinische Testung geschafft, wo es bis zur Phase I als parenteraler Wirkstoff gegen MBL produzierende Bakterien entwickelt wurde.

Alle bisher bekannten MBL-Antagonisten adressieren die Enzym-Bindungstasche mit unterschiedlichen Zink-bindenden Strukturmotiven.^[13] Hierbei findet man typischerweise Carboxylate und Schwefel-haltige Gruppen (Schema 3). Wie Röntgenstrukturuntersuchungen zeigen, sind diese funktionellen Gruppen in der Lage, Wasser zu verdrängen und die beiden Zink-Atome des aktiven Zentrums zu verbrücken.

Selektive und verträgliche NDM-1-Inhibitoren sollten sich nicht nur auf eine Wechselwirkung mit den funktionalen Zink-Atomen beschränken. Darüber hinaus sollten auch benachbarte Aminosäuren spezifisch adressiert werden, da diese sich innerhalb Zink-bindender Enzyme zum Teil erheblich unterscheiden. Allerdings ist zu beachten, dass Selektivität für spezifische Zink-bindende Enzyme nicht zum Nulltarif zu haben ist. Je selektiver und verträglicher ein solcher Inhibitor ist, desto weniger wahrscheinlich wird sein Einsatz als „Breitspektrum“-MBL-Wirkstoff.

In einer aktuellen Arbeit^[11] der Zeitschrift *Nature* beschreiben King et al., wie sie Aspergillomarasin A (AMA) als „Inaktivator“ von NDM-1 und VIM-2 innerhalb einer Naturstoffsammlung durch einen zellulären Screen entdeckt haben. Um den Testorganismus herzustellen, wurde das Meropenemresistenz-vermittelnde *bla*_{NDM-1}- β -Lactamase-Gen in einen *Escherichia coli*-Stamm mit erhöhter Permeabilität und erniedrigtem Efflux gebracht. Anschließend wurde die Empfindlichkeit des *E. coli*-Stammes gegen Meropenem



Schema 3. Auswahl von MBL-Inhibitoren.

in Gegenwart der Testverbindungen bestimmt. Nur ein Naturstoffextrakt (der aus *Aspergillus versicolor* stammte) konnte die antibiotische Aktivität von Meropenem gegen den resistenten *E.-coli*-Stamm wiederherstellen. Eine Aufreinigung des Extraks nach dieser Aktivität lieferte den bekannten Naturstoff AMA, der allerdings zuvor noch nicht als MBL-Inhibitor beschrieben worden war. AMA inhibierte die biochemische Aktivität von NDM-1 und VIM-2 um 50% im einstelligen μM Konzentrationsbereich. Umfangreiche Untersuchungen zum Wirkmechanismus ließen darauf schließen, dass AMA das NDM-gebundene Zink direkt beeinflusst. Obwohl AMA einen potenziell unspezifischen (Zink-entfernenden) Inaktivierungsmechanismus zeigte, wie man ihn für EDTA^[14] erwarten würde, wurde hohe Aktivität ausschließlich gegen bestimmte Vertreter der B1-Subklasse wie NDM-1 und VIM-2 beobachtet. So wurde nur eine geringe Potenzierung der Carbapenem-Wirkung bei Gram-negativen Krankheitserregern beobachtet, die andere MBL-Subklassen – wie SPM-1 und IMP – exprimierten.

Bei In-vitro-Untersuchungen war Meropenem praktisch unwirksam gegen Carbapenem-resistente Keime (Tabelle 1). Allerdings konnte die Aktivität von Meropenem in Gegenwart von AMA gegen *bla_{VIM}*- und *bla_{NDM}*-tragende *Pseu-*

domonas spp., *Actinobacter* spp. und Enterobacteriaceen weitestgehend wiederhergestellt werden.

Erfreulicherweise übersetzte sich diese In-vitro-Aktivität in eine Wirksamkeit im Tierversuch. Erwartungsgemäß konnte eine letale – NDM-1-positive – *K.-pneumoniae*-Infektion nicht durch Einzelgaben von Meropenem oder AMA behandelt werden. Fast alle infizierten Tiere (> 90%) überlebten aber über vier Tage nach einer Kombinationstherapie durch subkutane Gabe von Meropenem (10 mg kg^{-1}) und AMA (30 mg kg^{-1}).

AMA ist ein neuer Chemotyp auf dem schwierigen Weg zu klinisch relevanten MBL-Inhibitoren. Sicherlich limitiert die ausgeprägte Selektivität für NDM-1 und VIM-2 den Wert von AMA als übergreifende Leitstruktur für die gesamte MBL-Enzymklasse. Auf der anderen Seite deutet sich dabei eine (in Grenzen) spezifischere Enzym-Bindung an, die möglicherweise nicht ausschließlich auf indirekter Metallchelatisierung beruht, so wie man es z. B. für EDTA erwarten würde. So zeigte AMA eine – gegenüber EDTA – etwas geringere akute Toxizität in Mäusen.

Bei Wirkmechanismen, die im Zusammenhang mit einer Metallchelatisierung stehen, muss schon früh über mögliche unerwünschte Nebenwirkungen nachgedacht werden. Wie quantenmechanisches Modeling zeigt, wäre auch eine direkte Komplexierung von Zn^{2+} durch AMA grundsätzlich denkbar (Abbildung 1). AMA ist biochemisch äquipotent gegen das Target NDM-1 ($\text{IC}_{50} = 4.0 \mu\text{M}$) und Zink-bindende „off-targets“ wie das Endothelin-konvertierende Enzym ($\text{IC}_{50} = 3.4 \mu\text{M}$) oder aber das Angiotensin-konvertierende Enzym ($\text{IC}_{50} = 1.2 \mu\text{M}$).^[15] Weitere Untersuchungen zur Selektivität von AMA werden wichtig sein. Nahe Strukturanaloga sollten synthetisiert werden, um eine Struktur-Wirkungs-Beziehung zu etablieren.

Bisher sind vergleichsweise hohe Dosierungen von AMA erforderlich, um *in vivo* die Carbapenem-Resistenz zu revertieren. Ob pharmakokinetische Limitationen des hoch polaren und amphoteren AMA-Moleküls (ber. $\text{Log}D_{7.5} \approx -4$) hier eine Rolle spielen, ist zu diesem Zeitpunkt noch unklar.

King et al.^[1] haben die Antibiotika-Forschung um eine wichtige und experimentell sehr gewissenhafte Arbeit bereichert, die motivieren sollte, das gravierende MBL-Resistenz-Problem mit neuen Screens und neuen Leitstrukturen anzugehen.

Eingegangen am 4. August 2014
Online veröffentlicht am 24. September 2014

Tabelle 1: AMA revertiert die Meropenem-Resistenz in NDM-1-produzierenden Bakterien.

Antibiotikum	MIC [$\mu\text{g mL}^{-1}$] ^[a]	Effekt
Meropenem	32	nicht aktiv
AMA	>128	nicht aktiv
Meropenem @ 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AMA	1	„reversed resistance“

[a] Minimale Inhibitionskonzentration gegen den NDM-1-positiven *K.-pneumoniae*-N11-2218-Stamm.^[1]

[1] A. M. King, S. A. Reid-Yu, W. Wang, D. T. King, G. De Pascale, N. C. Strynadka, T. R. Walsh, B. K. Coombes, G. D. Wright, *Nature* **2014**, *510*, 503–506.

[2] WHO **2014**, <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>.

[3] a) P. M. Wright, I. B. Seiple, A. G. Myers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8840–8869; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 8984–9014; b) F. von Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Häbich,

- Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5072–5129; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5194–5254.
- [4] a) S. M. Drawz, R. A. Bonomo, *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 160–201; b) J. Spencer, T. R. Walsh, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1022–1026; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1038–1042.
- [5] T. Palzkill, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2013**, *1277*, 91–104.
- [6] L. D. Sabath, E. P. Abraham, *Biochem. J.* **1966**, *98*, 11C–13C.
- [7] N. Laraki, M. Galleni, I. Thamm, M. L. Riccio, G. Amicosante, J.-M. Frère, G. M. Rossolini, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 890–901.
- [8] L. Lauretti, M. L. Riccio, A. Mazzariol, G. Cornaglia, G. Amicosante, R. Fontana, G. M. Rossolini, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1584–1590.
- [9] G. Cornaglia, H. Gimarellou, G. M. Rossolini, *Lancet Infect. Dis.* **2011**, *11*, 381–393.
- [10] D. Yong, M. A. Toloman, C. G. Giske, H. S. Cho, K. Sundman, K. Lee, T. R. Walsh, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 5046–5054.
- [11] T. R. Walsh, M. A. Toloman, *Expert Rev. Anti-infect. Ther.* **2011**, *9*, 137–141.
- [12] D. King, N. Strynadka, *Protein Sci.* **2011**, *20*, 1484–1491.
- [13] W. Fast, L. D. Sutton, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2013**, *1834*, 1648–1659.
- [14] A. Yoshizumi, Y. Ishii, D. M. Livermore, N. Woodford, S. Kimura, T. Saga, S. Harada, K. Yamaguchi, K. Tateda, *J. Infect. Chemother.* **2013**, *19*, 992–995.
- [15] a) Y. Mikami, T. Suzuki, *Agric. Biol. Chem.* **1983**, *47*, 2693–2695; b) A. Matsuura, H. Okumura, R. Asakura, N. Ashizawa, M. Takahashi, F. Kobayashi, N. Ashikawa, K. Arai, *Jpn. J. Pharmacol.* **1993**, *63*, 187–193.