

## **Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej nowych związków z grupy pochodnych boraheterocyklicznych i kwasów aryloboronowych**

### **Streszczenie**

---

**Słowa kluczowe:** antybiotykooporność, benzosiloksaborole, kwasy aryloboronowe, aktywność przeciwdrobnoustrojowa, inhibitory  $\beta$ -laktamaz, selekcja opornych mutantów, MPC, MSW

Narastająca wielolekooporność wśród szczepów drobnoustrojów sprawiła, że w leczeniu pilnie potrzebne są kolejne, oryginalne leki aktywne wobec patogenów, głównie wobec tzw. patogenów priorytetowych, dla których dostępnych jest niepokojąco mało opcji terapeutycznych. W opinii WHO, liczba takich leków wprowadzonych w ostatnich latach do obrotu oraz aktualnie przechodzących badania kliniczne jest niewystarczająca. Jednocześnie, w badaniach przedklinicznych znajduje się wiele substancji o obiecującej aktywności wobec bakterii i grzybów. Brakuje jednak parametrów *in vitro* pozwalających na tym etapie precyzyjnie przewidzieć zakres stężeń, w którym może dochodzić do selekcji opornych mutantów w warunkach *in vivo* (ang. *mutant selection window* – MSW). Wartość MPC (ang. *mutant prevention concentration*) wyznaczająca górną granicę MSW często przekracza próg toksyczności leków, a także charakteryzuje się niedostateczną powtarzalnością *in vitro* oraz słabą odtwarzalnością *in vivo*. Utrudnia to wskazywanie do dalszych etapów prac badawczo-rozwojowych związków o najmniejszym potencjale selekcjonowania oporności szczepów bakteryjnych *in vivo* oraz opracowanie nowych, ograniczających narastanie oporności schematów dawkowania.

Celami niniejszej pracy było: (I) poszukiwanie wśród nowych pochodnych boraheterocyklicznych i kwasów aryloboronowych substancji aktywnych wobec bakterii i grzybów drożdżopodobnych oraz (II) opracowanie nowego podejścia do oceny potencjału selekcjonowania oporności wśród szczepów bakteryjnych przez związki przeciwbakteryjne, możliwego do zastosowania na wczesnym etapie przedklinicznych badań *in vitro*.

Realizując cel I prowadzono szerokie badania mikrobiologiczne 44 benzosiloksaboroli oraz 33 kwasów aryloboronowych, głównie di- oraz triboronowych. W pracy zbadano: (A) ich bezpośrednią aktywność wobec bakterii i grzybów drożdżopodobnych (wyznaczając wartości MIC, MBC i MFC dla szczepów wzorcowych i klinicznych); (B) udział błonowych pomp MDR (ang. *multidrug-resistant*) bakterii Gram-ujemnych w aktywnym usuwaniu związków z komórki (wyznaczając wartości MIC w obecności inhibitora pomp), (C) zdolność związków do inhibicji  $\beta$ -laktamaz (krążkowymi testami kombinowanymi, wyznaczając wartości MIC

$\beta$ -laktamów w obecności badanych związków dla szczepów KPC-, AmpC- oraz VIM-dodatnich, oraz potwierdzając cel molekularny metodami mikrobiologicznymi i biochemicznymi) oraz (D) zależność struktura – siła synergistycznego oddziaływania kwasów aryloboronowych z  $\beta$ -laktamami (wyznaczając metodą szachownicy wartości FICI i określając rodzaj interakcji, a także przeprowadzając analizę statystyczną).

W pracy stwierdzono wysoką aktywność przeciwgronkowcową, 18 benzosiloksaboroli benzenosulfonianowych i sulfonamidowych (wartości MIC 0,39-6,25 mg/l) oraz wysoką aktywność przeciwentero kokową 3 benzosiloksaboroli benzenosulfonianowych (wartości MIC 6,25 mg/l). Wykazano zdolność do inhibicji  $\beta$ -laktamaz typu KPC/AmpC 25 związków w wysokich stężeniach (30-300  $\mu$ g/krażek), a 17 kwasów aryloboronowych także w niskich stężeniach (4–16 mg/l). Kwas *orto*-fenylenodiboronowy najefektywniej przywracał wrażliwość na karbapenemy szczepom *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* KPC-dodatnim (powodując nawet 64-krotne redukcje wartości MIC karbapenemów) oraz umiarkowanie zwiększał aktywność ceftazydymu wobec szczepów *E. coli* i *Pseudomonas aeruginosa* AmpC-dodatnich, nie przywracając wrażliwości tym szczepom. Kwasy *para*-fenylenodiboronowe przywracały wrażliwość na karbapenemy szczepom KPC-dodatnim i na ceftazydym szczepom AmpC-dodatnim, natomiast kwasy *meta*-fenylenodiboronowe przywracały wrażliwość na ceftazydym szczepowi *E. coli* CMY-2-dodatniemu. Badania z wykorzystaniem całych komórek oraz wyizolowanych białek całkowitych transformanta *E. coli* DH5 $\alpha$  niosącego gen *bla*<sub>KPC-3</sub> potwierdziły, że enzymy typu KPC są punktem uchwytu kwasów *orto*- i *para*- ale nie *meta*-fenylenodiboronowych. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że obecność dwóch grup boronowych w pozycji *orto* istotnie nasila synergję kwasów fenylenodiboronowych z karbapenemami ( $p=0,0001$ ) ale osłabia ich synergję z ceftazydymem ( $p=0,04$ ). Z kolei obecność fluoru w cząsteczce osłabia synergję tych kwasów z karbapenemami ( $p=0,036$ ) ale nasila synergję z ceftazydymem ( $p=0,005$ ). Nie wykryto natomiast istotnego udziału błonowych pomp MDR w aktywnym usuwaniu badanych związków z komórek bakteryjnych.

Realizując cel II opracowano: (A) nowe parametry *in vitro* do wyznaczania górnej granicy zakresu MSW, tj. parametr MPC-D (odnoszący się do tzw. dominujących mutantów o wysokim potencjale selekcjonowania także *in vivo*) oraz parametr MPC-F (odnoszący się do mutantów o obniżonej sprawności), (B) nową metodę rozcieńczeń w bulionie do wyznaczania wartości

MPC-D i MPC-F oraz (C) nową, wielostopniową metodę otrzymywania inokulum bakteryjnego o wysokiej gęstości ( $>10^{11}$  CFU/ml), zwiększającego precyzję wyznaczania zaproponowanych parametrów. Nowością pracy jest także powiązanie wartości klasycznego MPC z częstością selekcji opornych mutantów w metodzie rozcieńczeń w agarze, co ma miejsce w opracowanej metodyce wyznaczania wartości nowego parametru MPC-D. Badania prowadzono na szczepie *S. aureus* ATCC 29213 dla 3 związków będących przedstawicielami różnych grup o działaniu przeciwbakteryjnym, tj. cyprofloksacyny, linezolidu i benzosiloksaborolu No37. Metodą rozcieńczeń w agarze wyznaczono wartości MPC i MPC-D, a metodą rozcieńczeń w bulionie wartości MPC-D i MPC-F. Wyjściowe inokula bakterii, uzyskane nową metodą miały gęstości  $5-7,5 \times 10^{11}$  CFU/ml, co jest kluczowe przy wyznaczaniu parametrów MPC. W przypadku linezolidu i benzosiloksaborolu No37 wszystkie wyznaczone parametry miały taką samą wartość. W przypadku cyprofloksacyny uzyskano wynik: MPC-D < MPC-F < MPC. Jej wartości MPC-D wyznaczone obiema metodami były porównywalne. W pracy wykazano zatem, iż: (I) MPC-D może być w przypadku niektórych związków przeciwbakteryjnych niższe niż MPC, przez co bardziej akceptowalne klinicznie jako podstawa schematów dawkowania, (II) powiązanie wartości MPC-D z częstością selekcji opornych mutantów jest kluczowe dla zwiększenia powtarzalności *in vitro* parametru MPC-D w porównaniu do parametru MPC oraz (III) zaproponowana metoda rozcieńczeń w bulionie pozwala na zróżnicowanie mutantów powstających *in vitro* na mutanty dominujące oraz mutanty o obniżonej sprawności, przez co parametr MPC-D ma szansę być lepiej odtwarzalny *in vivo* w porównaniu do parametru MPC.

Uzyskane w pracy wyniki aktywności przeciwdrobnoustrojowej badanych związków boroorganicznych w połączeniu z brakiem ich cytotoksyczności pozwalają stwierdzić, że (I) benzosiloksaborole benzenosulfonianowe i sulfonamidowe mogą być postrzegane jako potencjalne źródło nowych leków aktywnych wobec priorytetowych ziarenkowców Gram-dodatnich oraz (II) kwasy fenylenodiboronowe są interesującymi strukturami wyjściowymi do syntezy nowych inhibitorów  $\beta$ -laktamaz typu KPC/AmpC. Wykazano także, iż wartości zaproponowanego parametru MPC-D mogą być niższe, bardziej powtarzalne *in vitro* i lepiej odtwarzalne *in vivo* niż wartości MPC, co może usprawnić badania przedkliniczne kandydatów na nowe leki przeciwdrobnoustrojowe oraz ułatwić opracowanie nowych, ograniczających narastanie oporności schematów dawkowania.