

# Activité *in vitro* de NXL104 sur SHV-4: un nouvel inhibiteur des $\beta$ -lactamases à spectre étendu

M.C. PECHEREAU, M. CLAUDON, M.T. BLACK, P. LEVASSEUR, J.E. HODGSON, C. MIOSSEC et T. STACHYRA  
Novoxel S.A., Romainville, France



Contact: info@novoxel.com

## INTRODUCTION

Les résistances émergentes aux  $\beta$ -lactamines suscitent une inquiétude croissante quant à l'efficacité de cette classe d'antibiotique. Le composé NXL104 est un nouvel inhibiteur de  $\beta$ -lactamases, qui est issu d'une nouvelle série chimique distincte des  $\beta$ -lactamines (Fig.1) ; il inhibe les  $\beta$ -lactamases de classe A et de classe C. Ses caractéristiques cinétiques ont jusqu'à présent été étudiées avec les enzymes TEM-1 et P99 : son  $IC_{50}$  est basse (10-100 nM), le turnover est faible (2-5 moles de NXL104 sont nécessaires pour inhiber 1 mole d'enzyme en un temps donné), et l'intermédiaire covalent a une longue  $\frac{1}{2}$  vie (7 jours) <sup>1</sup>.

NXL104 n'a pas d'activité antibactérienne intrinsèque ; en revanche, il protège efficacement les  $\beta$ -lactamines de l'hydrolyse par les  $\beta$ -lactamases dans des souches productrices d'enzymes de classe A ou de classe C <sup>2-3</sup>. Cette activité a également été démontrée *in vivo* dans les modèles de septicémie et de pneumonie <sup>4</sup>.

Parmi les  $\beta$ -lactamases de classe A à spectre étendu (BLSE), la famille des SHV confère des résistances aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération. Nous avons choisi d'étudier le mutant SHV-4 qui diffère de SHV-1 par substitution de 5 acides aminés et par une vitesse d'hydrolyse de la ceftazidime beaucoup plus élevée<sup>5</sup>. L'objectif de cette étude est donc de définir les paramètres cinétiques de la réaction catalysée par SHV-4 et d'évaluer l'activité *in vitro* du NXL104 sur l'enzyme purifiée. L'activité antibactérienne de l'association ceftazidime/NXL104 est déterminée vis-à-vis de souches exprimant SHV-4.

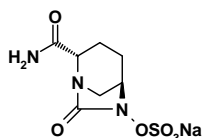


Figure 1. Structure chimique de NXL104

## METHODES

### • $\beta$ -lactamases purifiées

La protéine SHV-4 a été clonée sous sa forme mature (sans peptide signal), dans le vecteur pET29a avec un tag 6xHis à l'extrémité C-terminale de la protéine, et exprimée dans *E. coli* BL21(DE3). Après fermentation et lyse bactérienne, l'extrait soluble a été purifié sur colonne d'affinité His-Trap. La  $\beta$ -lactamase P99 d'*Enterobacter cloacae* a été préparée à partir d'un extrait brut obtenu après lyse par la presse de French, puis purifiée sur colonne d'affinité phenyl acide boronique. La  $\beta$ -lactamase TEM-1 a été fournie par S. Mobashery (Wayne State University, Detroit, MI, USA).

### • Activités enzymatiques

L'activité inhibitrice du NXL104 contre SHV-4 purifiée est déterminée par mesure de l' $IC_{50}$  (concentration d'inhibiteur nécessaire pour réduire de 50% la vitesse initiale d'hydrolyse). L'inhibition de l'activité  $\beta$ -lactamase est déterminée à 37°C, après 5 min de pré-incubation inhibiteur/enzyme. Le volume réactionnel de 200  $\mu$ l contient 6 nM de SHV-4, 100  $\mu$ M de nitrocéfine (epsilon molaire = 20500 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>), 50 mM de tampon phosphate, 2% de glycérol et 0,1 mg/ml de sérum albumine bovine. La réaction d'hydrolyse est suivie pendant 5 min à 485 nm sur un lecteur de microplaques (Molecular Devices SpectraMaxPlus). L'inhibition a été comparée à celle obtenue sur les enzymes purifiées TEM-1 et P99 aux concentrations respectives de 1 et 0,4 nM.

Les paramètres cinétiques ont été préalablement déterminés sur SHV-4 avec la nitrocéfine comme substrat (Fig. 2).  $K_{cat}$ , Km et  $IC_{50}$  sont calculés à l'aide du logiciel GraFit Erithacus.

### • Détermination des CMI

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées en milieu Mueller-Hinton selon les méthodes CLSI (NCCLS). La CMI correspond à la concentration minimale d'antibactérien nécessaire pour inhiber entièrement la croissance bactérienne.

### • Composés testés

Les antibiotiques suivants ont été utilisés: Ceftazidime pentahydrate (CAZ), Pipéracilline (PIP) et Amoxicilline (AMX). Les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases suivants ont été testés : NXL104, Clavulanate de lithium (CLA) et Tazobactam (TAZO).

## RESULTATS

### • Etude enzymatique de SHV-4

Paramètres	Valeurs moyennes obtenues
Km	3 $\mu$ M
Kcat	24 s <sup>-1</sup>

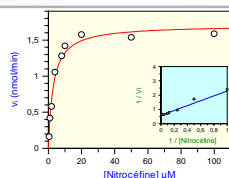


Figure 2. Paramètres cinétiques de la réaction d'hydrolyse catalysée par SHV-4 et la nitrocéfine comme substrat.

### • Activité de NXL104 sur l'enzyme SHV-4 purifiée

NXL104 montre une excellente activité inhibitrice sur l'enzyme SHV-4 avec une  $IC_{50}$  de l'ordre du nM. Les inhibiteurs de référence sont actifs sur SHV-4, mais avec une  $IC_{50}$  plus élevée (Fig. 3 et Tab. 1).

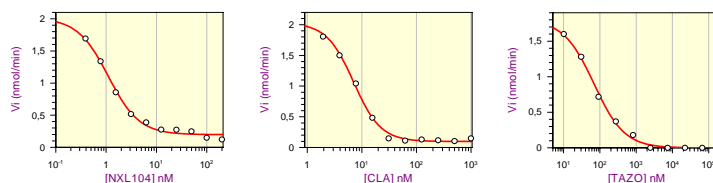


Figure 3.  $IC_{50}$  de trois inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases sur SHV-4.

Les valeurs moyennes obtenues sur 3 expériences figurent dans le Tab. 1.

Inhibiteurs de $\beta$ -lactamase	$IC_{50}$ (nM)		
	SHV-4	Tem-1	P99
NXL104	1,5	8	80
Acide clavulanique	5	130	1 x 10 <sup>6</sup>
Tazobactam	120	40	5000

Tableau 1. Activité inhibitrice du NXL104 sur trois  $\beta$ -lactamases purifiées comparée à celle du tazobactam et de l'acide clavulanique.

### • Activité de l'association ceftazidime + NXL104 sur des souches bactériennes productrices de SHV-4

4 souches d'entérobactéries produisant SHV-4 (gène entièrement séquencé) ont été sélectionnées pour cette étude : 2 souches d'*Escherichia coli* et 2 souches de *Klebsiella pneumoniae*. Ces souches résistantes à la ceftazidime ont été testées pour leur sensibilité à l'association ceftazidime/NXL104 par mesure des CMI. En protégeant la ceftazidime de l'hydrolyse dans les entérobactéries exprimant SHV-4, NXL104 restaure son activité antibactérienne (Tab. 2).

	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
	250CF6	250Be1	283IP13	283IP18
CAZ	32	>128	>128	>128
CAZ / NXL104 (4:1)	1	4	2	2
CAZ / NXL104 4 $\mu$ g/ml	0,5	0,5	1	1
CAZ / TAZO 4 $\mu$ g/ml	0,25	1	>128	>128
CAZ / CLA 4 $\mu$ g/ml	0,25	0,5	1	0,5
PIP / TAZO 4 $\mu$ g/ml	8	32	>128	>128
AMX / CLA 4 $\mu$ g/ml	8	16	32	16

Tableau 2. Activité *in vitro* de la ceftazidime, seule ou associée à différents inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, et des combinaisons de référence (CMI en  $\mu$ g/ml).

NXL104 a été combiné à la ceftazidime, soit au ratio fixe CAZ/NXL104 de 4/1 (m/m), soit à la concentration fixe de 4  $\mu$ g/ml ; les inhibiteurs de référence ont été utilisés à la concentration fixe de 4  $\mu$ g/ml.

## CONCLUSION

- Cette étude confirme la capacité du NXL104 à inhiber puissamment différentes familles de  $\beta$ -lactamases de classe A (TEM-1 et SHV-4). Il est aussi actif sur les  $\beta$ -lactamases de classe C (P99).
- NXL104 restaure l'activité antibiotique des  $\beta$ -lactamines dans des entérobactéries productrices de SHV-4.

## REFERENCES

- 1- A. Bonnefoy, C. Dupuis-Hamelin, V. Steier, C. Delachaux, C. Seys, T. Stachyra, M. Fairley, M. Guitton, et M. Lampilas, 2004. *In vitro* activity of AVE1330A, an innovative broad spectrum non- $\beta$ -lactam  $\beta$ -lactamase inhibitor. Journal of antimicrobial chemotherapy, 54, 410-417.
- 2- J. Shackcloth, L. Williams, J. Northwood, A. Bryskier, D. Felmingham, 2005. *In vitro* activity of AVE1330A, a novel  $\beta$ -lactamase inhibitor, in combination with aztreonam or ceftazidime against ceftazidime-resistant isolates of species of the *Enterobacteriaceae*. 15<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, Denmark, P-1571.
- 3- P. Levasseur, AM. Girard, C. Delachaux, C. Miossec, M. Claudon, J. Lowther, J. Hodgson, 2006. NXL104, a Novel  $\beta$ -lactamase Inhibitor, Restores the Bactericidal Activity of Ceftazidime Against ESBL and AmpC Producing Strains of *Enterobacteriaceae*. 46<sup>th</sup> ICAAC, San Francisco, USA, F-0127.
- 4- P. Levasseur, AM. Girard, C. Miossec, J. Lowther, M. Rangaraju, J. Hodgson, 2005. Efficacy of NXL104 (Previously AVE1330A), a Novel Broad Spectrum  $\beta$ -lactamase Inhibitor, in combination with Ceftazidime (CAZ) in Murine Septicaemia and Pneumonia. 45<sup>th</sup> ICAAC, Washington, USA, F-1164.
- 5- J. Péduzzi, M. Barthélémy, K. Tiwari, D. Mattioni et R. Labia, 1989. Structural features related to hydrolytic activity against ceftazidime of plasmid-mediated SHV-type CAZ-5  $\beta$ -lactamase. Antimicrob. Agents Chemother., 33, 2160-2163.

### • Financement

Ce travail a été partiellement financé par OSEO ANVAR.