

Activité *in vitro* de NXL104 sur CTX-M-15 et KPC-2 : un nouvel inhibiteur de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et de carbapénèmases de classe A

M.C. PECHEREAU, M. CLAUDON, M.T. BLACK, P. LEVASSEUR, A.M. GIRARD, J.M. BRUNEAU, C. MIOSSÉC et T. STACHYRA - Novexel S.A., Romainville, France



Contact : info@novexel.com

INTRODUCTION

Le composé NXL104, actuellement en phase II de développement clinique, est issu d'une nouvelle série chimique distincte des β -lactamines (Fig.1); il inhibe les β -lactamases de classe A et de classe C (1). NXL104 n'a pas d'activité antibactérienne intrinsèque, mais il protège efficacement les β -lactamines de l'hydrolyse par les β -lactamases dans des souches productrices d'enzymes de classe A ou de classe C (2).

Objectifs

- Évaluer l'activité *in vitro* du NXL104 sur les enzymes purifiées CTX-M-15 et KPC-2.
- Déterminer l'activité antibactérienne de l'association ceftazidime/NXL104 vis à vis de souches exprimant au moins des β -lactamases de la famille des CTX-M et KPC.

Méthodes

Détermination de l'inhibition des enzymes CTX-M-15 et KPC-2 purifiées par mesure de l'IC₅₀ (substrat nitrocéfine) par NXL104, acide clavulanique et tazobactame. Mesure des concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour évaluer la sensibilité d'isolats cliniques d'entérobactéries (9 souches KPC et 10 souches CTX-M) à différentes β -lactamines et à l'association ceftazidime/NXL104.

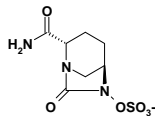


Figure 1. Structure chimique de NXL104

METHODES

• β -lactamases purifiées

La protéine CTX-M-15 a été clonée sous sa forme entière (avec le peptide signal) dans le vecteur pET29a et exprimée dans *E. coli* BL21 (DE3). Après fermentation, la protéine mature a été extraite du périplasm bactérien et purifiée au moyen de deux étapes de chromatographie d'échange d'ions puis d'une gel filtration sur Superdex75, aboutissant à une pureté estimée à 98%. La β -lactamase KPC-2 a été fournie par S. Petrella et W. Sougakoff (3) (Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, Paris).

• Activités enzymatiques

L'activité inhibitrice du NXL104 contre CTX-M-15 et KPC-2 purifiées a été déterminée par mesure de l'IC₅₀ (concentration d'inhibiteur nécessaire pour réduire de 50% la vitesse initiale d'hydrolyse en condition saturante de nitrocéfine). L'inhibition de l'activité β -lactamase a été déterminée à 37°C, après 5 min de pré-incubation inhibiteur/CTX-M-15 et 30 min inhibiteur/KPC-2. Le volume réactionnel de 200 μ L contenait CTX-M-15 (0,35 nM) ou KPC-2 (3 nM), de la nitrocéfine (100 μ M, $\epsilon_{M, 485nm} = 20500 M^{-1}cm^{-1}$), du tampon phosphate (50 mM, pH7), de la serum albumine bovine (0,1 mg/mL). La réaction d'hydrolyse a été suivie pendant 5 min à 485 nm sur un lecteur de microplaques (Molecular Devices SpectraMaxPlus). Les IC₅₀ ont été calculées 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 du CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute).

• Composés testés

Les antibiotiques suivants ont été utilisés : ceftazidime pentahydrate (CAZ), pipéracilline (PIP), céfotaxime (CTX), céftriaxone (CRO), céfépime (FEP), ciprofloxacine (CIP) et imipénème (IPM). Les inhibiteurs de β -lactamases suivants ont été testés : NXL104, clavulanate de lithium (CLA) et tazobactame (TAZ).

RESULTATS

Discussion

NXL104 a une excellente activité inhibitrice sur les 2 enzymes CTX-M-15 et KPC-2 (IC₅₀ de l'ordre du nM). CLA et TAZ sont également actifs sur CTX-M-15 avec des valeurs d'IC₅₀ équivalentes à celles du NXL104 et voisines de celles obtenues dans la littérature (4). En revanche, l'activité de CLA et de TAZ est beaucoup moins efficace que NXL104 sur KPC-2 (~ 200 fois).

Les souches productrices d'enzymes CTX-M sont résistantes aux céphalosporines testées et présentent une susceptibilité variable à la pipéracilline, alors que l'association ceftazidime/NXL104 est très active (CMI de 0,25 à 4 μ g/mL). Les souches productrices d'enzymes KPC sont résistantes à toutes les β -lactamines testées, y compris l'imipénème, mais sont sensibles à la combinaison ceftazidime/NXL104 (CMI de 0,25 à 8 μ g/mL).

Tableau 1. Activité inhibitrice du NXL104 sur deux β -lactamases purifiées comparée à celle du tazobactame et de l'acide clavulanique

Inhibiteurs de β -lactamase	IC ₅₀ (nM) *	
	KPC-2	CTX-M-15
NXL104	37,5 \pm 2,6	4,5 \pm 0,9
Acide clavulanique	6500 \pm 400	12,5 \pm 2,8
Tazobactame	9200 \pm 4100	5,8 \pm 2,7

* Les IC₅₀ sont des valeurs moyennes obtenues au minimum sur 3 expériences indépendantes.

Tableau 2. Activité *in vitro* de la ceftazidime, seule ou associée à NXL104 à la concentration de 4 μ g/mL, et des antibiotiques de références (CMI en μ g/mL)

Espèces	Souches ID	Enzyme	CIP	CTX	CRO	FEP	PIP/TAZ 4 μ g/mL	IPM	CAZ	CAZ + NXL104 4 μ g/mL
<i>E. cloacae</i>	7506	KPC-2, Chromosomal C	16	>128	>128	>128	>128	32	>128	8
<i>E. cloacae</i>	MAC	KPC-3, TEM-1, Chromosomal C, OXA-9	64	>128	>128	128	>128	64	>128	4
<i>E. coli</i>	2138	KPC-2	16	16	64	16	128	16	64	0,25
<i>K. pneumoniae</i>	283K87	KPC-2	128	>128	>128	>128	>128	32	>128	1
<i>K. pneumoniae</i>	VAKP	KPC-2	128	64	64	64	>128	16	>128	0,5
<i>K. pneumoniae</i>	VA8	KPC-3	0,25	64	64	8	128	0,25	>128	0,5
<i>K. pneumoniae</i>	CL-5761	KPC-3	16	>128	>128	128	>128	128	>128	4
<i>K. pneumoniae</i>	CL-5762	KPC-3	8	>128	>128	128	>128	16	>128	0,5
<i>K. pneumoniae</i>	CL-5763	KPC-3	64	>128	>128	>128	>128	64	>128	8
<i>E. coli</i>	250TN03	CTX-M-15, TEM-1, OXA-1	64	128	>128	32	2	\leq 0,12	128	0,25
<i>E. coli</i>	Tunisie clone E4	CTX-M-16, TEM1	\leq 0,12	>128	>128	>128	8	\leq 0,12	>128	1
<i>E. coli</i>	TN06	CTX-M-2, TEM-1	128	>128	>128	>128	16	\leq 0,12	32	0,5
<i>K. pneumoniae</i>	465	TEM-1B, CTX-M-2	32	>128	>128	128	>128	0,25	128	2
<i>K. pneumoniae</i>	KP04	CTX-M-14	64	>128	>128	128	16	1	16	1
<i>K. pneumoniae</i>	Tunisie clone K4	CTX-M-15, TEM-1, OXA-1	>128	>128	>128	>128	>128	\leq 0,12	>128	2
<i>K. pneumoniae</i>	Tunisie clone K1	CTX-M-16, OXA-1	\leq 0,12	>128	>128	>128	>128	\leq 0,12	>128	1
<i>K. pneumoniae</i>	427	SHV-1, TEM-1B, CTX-M-3	1	32	64	16	>128	\leq 0,12	>128	2
<i>K. pneumoniae</i>	238	SHV-2, TEM-12, CTX-M-2	\leq 0,12	8	128	4	>128	0,25	>128	4
<i>K. pneumoniae</i>	253	SHV-5, TEM-12, CTX-M-2	\leq 0,12	128	>128	32	>128	\leq 0,12	>128	2

REFERENCES

- 1- A. Bonnefoy, C. Dupuis-Hamelin, V. Steier, C. Delachaux, C. Seys, T. Stachyra, M. Fairley, M. Guillon, et M. Lampilas, 2004. *In vitro* activity of AVE1330A, an innovative broad spectrum non- β -lactam β -lactamase inhibitor. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54,410-417.
- 2- DM. Livermore, S. Muehtag, M. Warner, C. Miossec and N. Woodford, 2008. NXL104 combinations versus Enterobacteriaceae with CTX-M extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62, 1053-1056.
- 3- S. Petrella, N. Ziental-Gelus, C. Mayer, M. Renard, V. Jarlier and W. Sougakoff, 2008. Genetic and Structural Insights into the Dissemination Potential of the Extremely Broad-Spectrum Class A β -Lactamase KPC-2 Identified in an *Escherichia coli* Strain and an *Enterobacter cloacae* Strain Isolated from the Same Patient in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 3725-3736.
- 4- L. Poiré, M. Gniadkowski and P. Nordmann, 2002. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β -lactamase CTX-M-3. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 1031-1034.

CONCLUSION

Cette étude confirme la capacité du NXL104 à inhiber puissamment différentes familles de BLSE de classe A, protégeant ainsi la ceftazidime de l'hydrolyse dans les entérobactéries. C'est le seul composé actif à la fois contre les β -lactamases de classe A et de classe C, et le seul inhibiteur des carbapénèmases KPC.