

Virulensblockerande antibiotika

Antibakteriella medel med helt ny verkningsmekanism



CHARLOTTA SUNDIN, fil dr i molekylärbiologi, laboratoriechef, Creative Antibiotics AB, Umeå
charlotta.sundin@innate.se
MIKAEL ELOFSSON, professor, kemiska institutionen, Umeå universitet

HANS WOLF-WATZ, professor, molekylärbiologiska institutionen, Umeå universitet
SUNE ROSELL, med dr, professor emeritus, vd, Creative Antibiotics AB, Umeå

Sedan antibiotika började användas på 1940-talet har de räddat livet på miljontals patienter, och behandlingen med antibiotika blev så framgångsrik att man på 1960-talet menade att slaget mot bakteriella infektioner hade vunnits. Trots detta är infektionssjukdomar fortfarande det största hotet mot global hälsa. Överanvändning och felanvändning av antibiotika har lett till spridning av antibiotikaresistenta bakterier, vilket blivit ett så allvarligt problem att man befarar att vi går mot en situation som liknar den innan antibiotika blev tillgängliga. Infektioner med antibiotikaresistenta bakterier är redan den vanligaste dödsorsaken på intensivvårdsavdelningar världen över och är även ett allvarligt problem i Sverige [1, 2].

Nya antibakteriella läkemedel med minskad risk för resistensutveckling måste utvecklas. Dessa läkemedel skulle kunna ersätta eller kombineras med dagens antibiotika. Förbrukningen av dagens antibiotika skulle minska och därmed också spridningen av antibiotikaresistens.

Dagens antibiotika – små variationer på ett tema

Dagens antibiotika är egentligen variationer på ett tema, nämligen att eliminera bakterier med hjälp av läkemedel byggda runt ett fåtal kemiska grundstrukturer. Elimineringen drabbar både sjukdomsframkallande bakterier och den normala mikrofloran i mag-tarmkanalen, luftvägarna och på huden. På grund av det selektionstryck som antibiotika på detta sätt skapar anrikas bakterier som är okänsliga för antibiotika. Resistensgener kan sedan spridas från icke-patogena bakterier till de sjukdomsframkallande genom genöverföring. Läkemedelsbolagens traditionella strategi för att möta detta resistensproblem har varit att förändra existerande antibiotika genom relativt små variationer av de kemiska strukturerna snarare än att utveckla antibiotika med nya verkningsmekanismer.

Arvsmassan för ett stort antal patogena bakterier har sekvenserats de senaste åren, och här såg läkemedelsföretag möjligheter att utveckla nya antibiotika baserade på denna information. Mellan 1996 och 2004 satte 34 företag upp ca 125 sållningsprogram med 60 olika målproteiner. Trots denna kraftsamling synes inga nya antibiotika komma ut på marknaden. Läkemedelsindustrin har tagit konsekvenserna av detta misslyckande och lämnat eller dragit ner på forskning och utveckling inom terapiområdet bakteriella infektioner [3].

Virulenssystem

Under de senaste decennierna har kunskapen om hur bakterier kan orsaka sjukdomar hos djur, människa och växter ökat enormt. Grundforskningen om bakteriers patogenes har resulterat i att man börjat klarlägga mekanismer som skulle

kunna utnyttjas för att med nya läkemedel blockera bakteriers sjukdomsframkallande förmåga, dvs virulens. Virulensblockerande antibiotika skulle därmed skilja sig från klassiska antibiotika, som eliminerar bakterier genom att antingen hämma tillväxten eller döda dem. Patogena bakteriers virulenssystem har till uppgift att bekämpa värdorganismens medfödda immunförsvar och därmed säkerställa bakteriernas spridning och tillväxt i värdorganismen.

Flertalet patogena gramnegativa bakterier har utvecklat ett virulenssystem som benämns typ III-sekretionssystemet (T3SS) som liknar en injektionsspruta med kolv och nål (Figur 1). Med hjälp av sprutan injicerar bakterierna toxiner in i målceller som kan komma från ryggradsdjur, fiskar, insekter eller växter. T3SS, som upptäcktes av svenska forskare i början av 1990-talet [4], har visat sig vara ett betydelsefullt virulenssystem hos ett antal humanpatogena gramnegativa bakterier, t ex *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia* spp, *Chlamydia* spp samt enteropatogena och enteroinvasiva *Escherichia coli* [5]. Trots att bakterierna orsakar vitt skilda sjukdomar med i många fall unika toxiner är injektionssprutans struktur och funktion en gemensam nämnare.

Flagellen är ytterligare ett virulenssystem hos bakterier som de använder för att förflytta sig med och att vidhäfta med. Flagellen är även viktig vid bildandet av biofilm. Dessa förmågor är i många fall nödvändiga för full virulens. Basstrukturerna i T3SS och flagellen är uppbyggda av homologa proteiner, vilket skapar förutsättningar för att ett läkemedel skulle kunna blockera både T3SS och flageller.

Virulensblockerande antibiotika

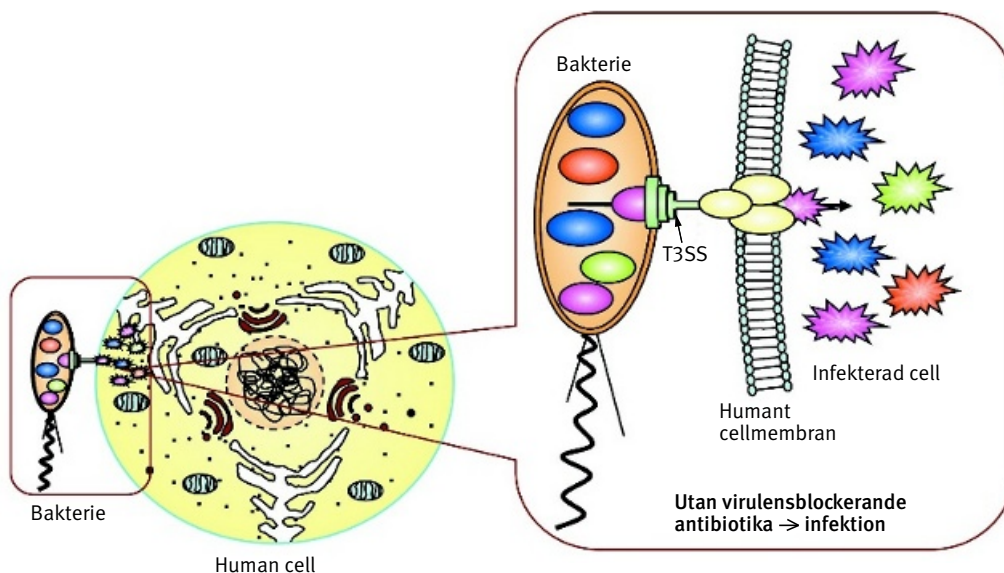
Små syntetiska molekyler som blockerar funktionen hos gramnegativa bakteriers T3SS och flageller beskrevs först av forskare vid Umeå universitet [6] och har därefter även beskrivits av forskare vid andra universitet [7-10]. Substanserna blockerar specifikt bakteriernas sjukdomsframkallande förmåga utan att påverka deras tillväxt; därmed skiljer sig deras verkningsmekanism markant från dagens antibiotika. Efter som substanserna endast hämmar bakterier som bär på virulenssystem kommer bakterierna i normalfloran inte att påverkas och kommer därmed inte vara en källa för spridning av resistens.

Dessa virulensblockerande antibiotika har identifierats genom att sälla fram syntetiska molekyler ur substanssamlingar. I ett nästa steg har även naturprodukter från 300 000 olika

SAMMANFATTAT

Antibiotikaresistenta bakterier är ett av de största hoten mot modern sjukvård.
Virulensblockerande antibiotika är i sann mening en ny klass antibakteriella medel. De blockerar bakteriers sjukdomsframkallande förmåga.

Virulensblockerande antibiotika rubbar inte den normala mikrofloran, och därmed minimeras selektionstrycket som leder till resistensutveckling.



Figur 1. Bakterier som har ett typ III-sekretionssystem (T3SS) angriper kroppens celler genom att injicera gifter genom cellväggen och undkommer på så sätt kroppens immunförsvar.

Illustration: Creative Antibiotics AB

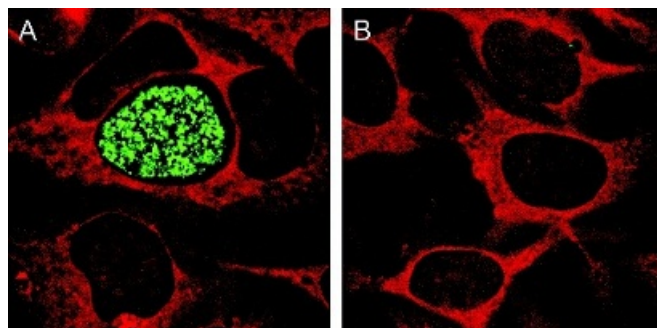
extrakt sållats vid Griffith-universitetet i Australien. De virulensblockerande antibiotika som har identifierats via sållningarna har vidareutvecklats och studerats i en rad cellbaserade infektionsmodeller och har visat sig vara verksamma mot extracellulära bakterier som *Yersinia* spp, *Pseudomonas aeruginosa* och bakterier som förökas intracellulärt, tex *Chlamydia* spp, *Shigella flexneri* och *Salmonella enterica* [6, 11-16].

Virulensblockerande antibiotika har således visats kunna hämma gramnegativa patogena bakteriers sjukdomsframkallande effekter. Det gäller även bakterier som är multiresistenta mot dagens antibiotika. Ex vivo-experiment har visat att virulensblockerande antibiotika är aktiva även mot bakterier som växer i närvaro av exempelvis kloramfenikol. Eftersom många ESBL (extended spectrum beta-lactamases)-producerande bakterier har T3SS och/eller flagell är det sannolikt att virulensblockerande antibiotika är aktiva även mot dessa resistenta och svårbehandlade bakterier. Forskningsresultaten utgör en god grund för att utveckla virulensblockerande antibiotika till en ny klass antibiotika mot infektioner som orsakas av ett brett spektrum gramnegativa bakterier utrustade med T3SS och/eller flagell.

Potentiella medicinska indikationer

Virulensblockerande antibiotika används i dag av forskargrupper i Europa och USA som farmakologiska verktyg för att klarlägga den funktionella betydelsen av bakteriers virulensfaktorer men har ännu inte registrerats som läkemedel. Prekliniska experimentella data ger ledtrådar till infektionssjukdomar som bör kunna behandlas med virulensblockerande antibiotika. Tre indikationer har valts av Creative Antibiotics AB (tidigare namn Innate Pharmaceuticals AB) i Umeå för att utveckla virulensblockerande antibiotika till läkemedel för lokal behandling av diarrésjukdomar, för topiskt skydd mot infektion vid svåra brännskador och för vaginal applikation mot sexuellt överförda sjukdomar.

Diarrésjukdomar beräknas drabba mer än en miljard människor årligen och dödar omkring två miljoner, majoriteten barn, varje år [17]. I USA är diarrésjukdomar årligen orsaken till 1,8 miljoner sjukhusbehandlingar och till över 3 000 dödsfall. Gramnegativa bakterier med T3SS, bla *Shigella* spp, enteropatogena *E coli*, *Salmonella* spp och *Yersinia* spp orsakar



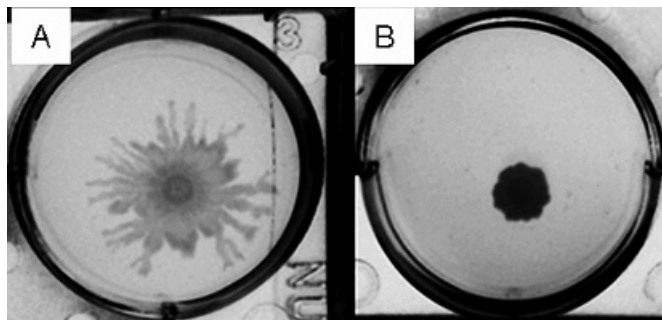
Figur 2. Klamydia bildar sk inklusioner (grön infärgning) i den infekterade cellen (röd infärgning), där bakterien förökar sig (A). Vid tillsats av ett virulensblockerande antibiotikum kan inklusionerna inte längre bildas och bakterierna inte längre föröka sig (B). Publiceras med tillstånd av Patrik Engström, Umeå universitet.

diarré globalt med varierande svårighetsgrad, och sedan mitten av 1980-talet har andelen resistenta isolat av *Shigella* spp ökat.

Sexuellt överförda sjukdomar. Klamydia är den vanligaste könsjukdomen. Bakterien *Chlamydia trachomatis* använder T3SS efter att den tagits upp av värdceller för att skapa förutsättningar för bakterien att föröka sig intracellulärt. Därför ger virulensblockerande antibiotika även en effekt på klamydias tillväxt intracellulärt (Figur 2), men virulensblockerande antibiotika har ingen påverkan på de bakterier som utgör normalfloran i vagina [12, 18].

Svåra brännskador är ett av de värsta tillstånd man kan råka ut för, med långvariga sjukhusvistelser som följd. Infektioner som tillstöter under sjukhusvistelserna är livshotande komplikationer. En av de allvarligaste sjukhusinfektionerna orsakas av *Pseudomonas aeruginosa*, som är en gramnegativ bakterie utrustad med T3SS och flagell. Studier har visat att T3SS har en nyckelfunktion när brännskador infekteras med *P aeruginosa* [19, 20].

När väl en pseudomonasinfektion har etablerats är den mycket svårbehandlad, eftersom bakterien är naturligt resistent mot praktiskt taget alla dagens antibiotika. Virulensblockerande antibiotika hämmar funktionen av T3SS och fla-



Figur 3. *Pseudomonas aeruginosa* rör sig med hjälp av sin flagell på mjuka agarplattor i ett stjärnformat mönster (sk svärmning) (A). Vid tillsats av virulensblockerande antibiotika hämmas denna rörelse (B).
Foto: Creative Antibiotics AB

gell hos *P. aeruginosa* och dessutom uppbyggnad av biofilm runt bakterierna (Figur 3).

Den europeiska läkemedelsmyndigheten EMEA har uppmärksammat behovet av en ny typ av behandling av svåra brännskador genom att klassificera ett av Creative Antibiotics virulensblockerande antibiotika som ett säräkemedel vid behandling av svåra brännskador.

Slutsummering

En helt ny typ av antibakteriella medel som blockerar ett brett spektrum av gramnegativa bakteriers sjukdomsalstrande förmåga, utan att påverka normalfloran, är under utveckling. Den kreativa kliniska forskningen har nu fått en stimulerande utmaning: att bestämma virulensblockerande antibiotikas kliniska betydelse. Det är första gången under det senaste halvsekle av den antibiotiska eran som en ny klass av antibio-

FAKTA 1. ORDLISTA

T3SS – Virulenssystem som bakterien använder för injektion av toxiner in i målceller, detta för att undvika det humana immunförsvaret.

Flagell – Virulenssystem som bakterien använder för att röra sig och för att vidhäfta med.

Biofilm – Aggregat av bakterier som växer tillsammans i grupp på en fast yta, tex sår-yta, implantat eller en kate-ter.

Virulensblockerande antibiotika – Ny klass av antibiotika med låg risk för resistensutveckling.

Syntetiska molekyler – Organiska molekyler som framställts i ett laboratorium.

Naturprodukter – Molekyler som produceras av levande organismer, tex växter, mikroorganismer och djur.

Säräkemedel – En kategori läkemedel med särskilda regler och förordningar, utfärdade av den europeiska läkemedelsmyndigheten, för behandling av sällsynta sjukdomar med färre än 5 fall per 10 000 invånare.

tika med helt ny verkningsmekanism som har gett mycket lovande prekliniska data.

■ *Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Charlotta Sundin är laboratoriechef och optionsägare, Hans Wolf-Watz är grundare och aktieägare, Mikael Elofsson är aktieägare och konsult, Sune Rosell är grundare, aktieägare och vd; samtliga vid Creative Antibiotics AB, tidigare Innate Pharmaceuticals.*

Kommentera denna artikel på lakartidningen.se

REFERENSER

- Olsen B, Eliasson I, Sjölin J, Cars O, Evengård B, Sandberg T. »Verkningslösa antibiotika dödligt hot även i Sverige«. Dagens Nyheter. DN debatt, 31 dec 2008.
- Strama, Smittskyddsinstitutet. SWEDRES 2008 A report on Swedish Antimicrobial Utilisation and Resistance in Human Medicin. In: Struwe J, Olsson-Liljequist B, eds, 2009.
- Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(1):29-40.
- Rosqvist R, Magnusson KE, Wolf-Watz H. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *Embo J.* 1994;13(4):964-72.
- Keyser P, Elofsson M, Rosell S, Wolf-Watz H. Virulence blockers as alternatives to antibiotics: type III secretion inhibitors against Gram-negative bacteria. *J Intern Med.* 2008;264(1):17-29.
- Kauppi AM, Nordfelth R, Uvell H, Wolf-Watz H, Elofsson M. Targeting bacterial virulence: inhibitors of type III secretion in *Yersinia*. *Chem Biol.* 2003;10(3):241-9.
- Felise HB, Nguyen HV, Pfuetzner RA, Barry KC, Jackson SR, Blanc MP, et al. An inhibitor of gram-negative bacterial virulence protein secretion. *Cell Host Microb.* 2008;4(4):325-36.
- Gauthier A, Robertson ML, Lowden M, Ibarra JA, Puente JL, Finlay BB. Transcriptional inhibitor of virulence factors in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(10):4101-9.
- Iwatsuki M, Uchida R, Yoshijima H, Ui H, Shiomi K, Kim YP, et al. Guadinomines, Type III secretion system inhibitors, produced by *Streptomyces* sp. K01-0509. II: physico-chemical properties and structure elucidation. *J Antibiot (Tokyo).* 2008;61(4):230-6.
- Pan NJ, Brady MJ, Leong JM, Gouguen JD. Targeting type III secretion in *Yersinia pestis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(2):385-92.
- Muschiol S, Bailey L, Gylfe A, Sundin C, Hulthenby K, Bergstrom S, et al. A small-molecule inhibitor of type III secretion inhibits different stages of the infectious cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(39):14566-71.
- Slepenkin A, Enquist PA, Hägglund U, de la Maza LM, Elofsson M, Peterson EM. Reversal of the anti-chlamydial activity of putative type III secretion inhibitors by iron. *Infect Immun.* 2007;75(7):3478-89.
- Veenendaal AK, Sundin C, Blocker AJ. Small molecule T3SS inhibitors block assembly of the *Shigella* type III secretion. *J Bacteriol.* 2009;191(2):563-70.
- Negrea A, Bjur E, Ygberg SE, Elofsson M, Wolf-Watz H, Rhen M. Salicylidene acylhydrazides that affect type III protein secretion in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(8):2867-76.
- Bailey L, Gylfe A, Sundin C, Muschiol S, Elofsson M, Nordstrom P, et al. Small molecule inhibitors of type III secretion in *Yersinia* block the *Chlamydia pneumoniae* infection cycle. *FEBS Lett.* 2007;581(4):587-95.
- Hudson DL, Layton AN, Field TR, Bowen AJ, Wolf-Watz H, Elofsson M, et al. Inhibition of type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by small-molecule inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(7):2631-5.
- WHO. Fact sheet No 310/November 2008; The top ten causes of death, 2008.
- Slepenkin A, Chu H, Motin V, Keyser P, Elofsson M, de la Maza LM, et al. Identification and characterization of potential vaginal microbicides. In: 108th General Meeting, American Society for Microbiology. Boston, MA, 2008.
- Holder IA, Neely AN, Frank DW. Type III secretion/intoxication system important in virulence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in burns. *Burns.* 2001;27(2):129-30.
- Neely AN, Holder IA, Wiener-Kronish JP, Sawa T. Passive anti-PcrV treatment protects burned mice against *Pseudomonas aeruginosa* challenge. *Burns.* 2005;31(2):153-8.