

Szili Petra Éva

**A kettős hatásmechanizmusú antibiotikumok
elleni rezisztencia feltérképezése**



Témavezető: Dr. Pál Csaba

Szintetikus- és Rendszerbiológiai Egység

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar

Orvosi Biokémia Intézet

Szeged

2023.

Az antibiotikumok felfedezése óta eltelt 90 évben ez a gyógyszercsoport robbanásszerű fejlődést mutatott, és napjainkban elterjedten használunk antibiotikumokat az egészségügyben és a mezőgazdaságban. Azonban más gyógyszerekkel ellentétben az antibiotikumok idővel hatásukat veszítik az antibiotikum-rezisztencia terjedése miatt. Egyre gyakoribbá válnak az úgynevezett multidrog-rezisztens (MDR) kórokozók, amik többféle antibiotikumcsalád ellen is rezisztens fenotípust mutatnak, ezek ellen pedig a hatékony kezelési módok igen korlátozottak. A rezisztens baktériumfertőzések jelenleg évi 700.000 halálesetért felelősek világszerte. Ez a szám az előrejelzések szerint akár 10 millióra is növekedhet 2050-ig, ebben az esetben pedig ez a jelenség válhat a vezető halálokká világszerte. (O'Neill, 2016)

Az antibiotikum-rezisztencia megjelenését és terjedését olyan evolúciós folyamatok segítik, amelyek évmilliók óta biztosítják a baktériumok számára egyedülálló alkalmazkodóképességüket a környezet kihívásaihoz. (Aminov, 2009; D'Costa és m.társai, 2011) A rezisztenciát általánosságban két fő mechanizmus okozza: kromoszómális mutációk megjelenése és a plazmidokon található horizontális géntranszferrel terjedő elemek. A két mechanizmus eltérő mértékben járul hozzá rezisztencia kialakulásához különböző baktériumfajokban, illetve különböző antibiotikumok ellen. (Hughes és Andersson, 2015) Ez a munka főleg a Topoizomeráz-giráz komplexet gátló antibiotikumokra fókuszál, amik ellen a plazmid-mediált rezisztencia jelentősége jóval alacsonyabb. Ennek megfelelően, a kromoszómális rezisztencia mutációkra fogunk fókuszálni.

A rezisztens baktériumok megjelenése rendkívül megnehezíti hatékony új antibiotikumok fejlesztését. A fejlesztési költségek, amik 400-800 millió dollár között mozognak piacra kerülő gyógyszerenként, jelentős akadályt jelentenek bármilyen új gyógyszer bevezetésével szemben, csakúgy mint a sikertelenség 95%-os esélye. (Payne és m.társai, 2007; Spellberg és m.társai, 2004) Emellett a rezisztencia megjelenésének kockázata az antibiotikumok kereskedelmi sikerét különösen bizonytalanná teszi. Paradox módon, amikor a legnagyobb szükség lenne új antibiotikumokra, a nagy gyógyszercégek többsége kivonult a piacról. A jelenleg fejlesztés alatt álló 42 antibiotikum közül csak 4 mögött állnak nagy gyógyszercégek. (Pew Charitable Trust, 2020; Jackson és m.társai, 2018)

Ezek következtében, az antibiotikum-fejlesztés legnépszerűbb iránya jelenleg a „rezisztenciabiztos” antibiotikumok fejlesztése. Elméletileg egy antibiotikum

rezisztenciabiztosnak nevezhető, ha ellene nem alakulhat ki rezisztencia, mert az azt okozó mutációk megjelenésének esélye rendkívül csekély. (Bell és MacLean, 2018) Az egyik lehetőség ennek elérésére a többszörös hatásmechanizmusú antibiotikumok alkalmazása. Többféle olyan mechanizmus van, amivel az antibiotikumok képesek lehetnek egyszerre több célpontot gátolni a baktériumokban. (Silver, 2007) A hibrid antibiotikumok esetében két különböző célponttal rendelkező kismolekulát kovalens kötés kapcsol össze úgy, hogy egy molekula jöjjön létre. (Domalaon és m.társai, 2018. Klahn és Brönstrup, 2017) Más antibiotikumok képesek egyidejűleg gátolni két vagy több nem átfedő régiót a baktérium egy vagy több fehérjében. (Oldfield és Feng, 2014; Silver, 2007) Bár jelenleg nagy figyelem irányul a gyógyszerfejlesztésben a rezisztenciabiztos antibiotikumokra, ezek fejlesztése nehézségekbe ütközik. Alig néhány olyan antibiotikum-jelöltet ismerünk, ami egyforma hatékonysággal képes gátolni több célpontot is. (Ince és m.társai, 2002; Strahilevitz és Hooper, 2005; Tari és m.társai, 2013) Továbbá, a várható rezisztenciára vonatkozó hiányos adatok miatt jelenleg nagyon kevés ismerettel rendelkezünk arról, hogy a többszörös hatásmechanizmusú antibiotikumok valóban rezisztenciabiztosnak tekinthetők-e, ellenük milyen módon és sebességgel alakul ki rezisztencia.

Ahhoz, hogy megállapítsuk, egy antibiotikum rezisztenciabiztos-e, szükséges, hogy a fejlesztés minél korábbi szakaszában meg tudjuk pontosan becsülni a rezisztencia kialakulásának sebességét. A hagyományos mikrobiológiai módszerek azonban gyakran lassúak, vagy túlságosan alacsony az általuk lefedett mutációk száma, és így nem képesek pontosan előrejelezni a rezisztencia mutációkat. Ez különösen nagy problémát jelent a többszörös hatásmechanizmusú antibiotikumok esetén, ahol a magas szintű rezisztencia eléréséhez több, ritka mutáció egyidejű megjelenése szükséges, amik önmagukban gyakran minimális hatással rendelkeznek.

Az általunk kidolgozott genommérnöki módszer, a „Directed evolution with random genomic mutations” (DIvERGE), számos fentebb részletezett hiányosságát kiküszöböli a korábbi *in vivo* mutagenézis módszereknek. (Nyerges és m.társai, 2018) A DIvERGE lehetővé teszi előre meghatározott, hosszú genomi régiók mutációs összetételének finomszabályozását minden egyes pozícióban. A módszerrel magas mutációs ráták érhetőek el a célszekvencián, több körös mutagenézis és szelekció is lehetséges, és több baktériumfajban is alkalmazható előzetes genomi módosítások nélkül. A DIvERGE egyes szálú DNS oligonukleotidok felhasználásán alapul, és a hosszú genomi régiók mutagenézisét részben átfedő rövid oligonukleotidok biztosítják. A

randomizált oligonukleotidok teljesen lefedik a célszekvenciát, és a beépülésükkor mutációk jönnek létre. A korábbi módszerekhez hasonlóan a DIvERGE folyamata a sejtnövekedés, oligonukleotidok sejtbe jutása és beépülése és mutagenézis lépéseken halad keresztül, ami a populáció rendkívül nagy genetikai változatosságát eredményezi.

A DNS giráz és Topoizomeráz IV komplexek különösen alkalmas célpontok a többszörös hatásmechanizmusú antibiotikumok fejlesztésére, mivel a komplexek tagjai között jelentős homológia van, és három dimenziós szerkezetükben is nagy az átfedés. (Bisacchi és Manchester, 2015; Collin és m.társai, 2011) A DNS giráz és Topoizomeráz IV II-es típusú topoizomerázok. Prokariótákban heterotetramereket hoznak létre, amik két alegységből állnak, a GyrA-GyrB és ParC-ParE fehérjékből. Általánosságban véve a GyrA (ParC) alegység felelős a komplex DNS-hez való kötődéséért, a benne található aktív centrum tirozinja a DNS hasításáért, a B alegység pedig az ATP-áz aktivitást biztosítja. (Champoux, 2001) A DNS giráz – Topoizomeráz IV a kettős szálú DNS hasítását és újraegyesítését végzi, így meghatározza a DNS felépítésének változásait a replikáció során.

A tézis két fő tudományos publikáción alapul. Mindkettőben a többszörös hatásmechanizmusú antibiotikumok ellen kialakuló rezisztenciára fókuszáltunk hagyományos mikrobiológiai módszerek és DIvERGE segítségével. Az első publikációban sikerrel írtunk le rezisztenciát egy új topoizomeráz inhibitor, a gepotidacin ellen. (Szili és m.társai, 2019) Az ebben a munkában szerzett tapasztalatokat felhasználtuk a második publikációhoz, amiben új, többszörös hatásmechanizmusú antibiotikum-jelöltek korai fejlesztésére fókuszáltunk. (Nyerges és m.társai, 2020)

A gepotidacin (GSK2140944) egy kivételes jelölt a többszörös hatásmechanizmusú antibiotikumok elleni rezisztencia tanulmányozására. (Biedenbach és m.társai, 2016; Flamm és m.társai, 2017) Ez egy új típusú, triazacenaftilén típusú antibiotikumjelölt, ami jelenleg klinikai III. stádiumban van, és néhány éven belül piacra kerül. (Scangarella-Oman és m.társai, 2020; Taylor, Morris, és m.társai, 2018) A molekula újszerű hatásmechanizmussal gátolja a DNS giráz – Topoizomeráz IV komplex aktivitását. Hagományos mikrobiológiai módszerek segítségével korábban nem sikerült rezisztencia mutációkat azonosítani *Neisseria gonorrhoeae* és *Escherichia coli* fajokban. Ez az eredmény arra utal, hogy egyedi mutációk nem elégségesek a magas szintű rezisztencia eléréséhez. (Farrell és m.társai, 2017; Nyerges és m.társai, 2018) A munkánkban ezzel

szemben bebizonyítottuk, hogy a baktériumok gyorsan képesek ellenállóvá válni gepotidacin ellen, és a korábbi kísérletek a módszerek limitációi miatt nem tudták kimutatni a rezisztenciát.

A második publikációban egy nemzetközi kollaboráció keretein belül készült, racionálisan tervezett antibiotikum-jelöltekkel dolgoztunk. A fejlesztés célja az volt, hogy a molekulák kiegyensúlyozott gátló hatást fejtsenek ki mind a DNS giráz B alegysége (GyrB), mind a Topoizomeráz IV E alegysége (ParE) irányába. Munkánk során karakterizáltuk a két legígéretesebb molekula, az ULD1 és ULD2 antibakteriális tulajdonságait, az ellenük kialakuló rezisztenciát és az *in vivo* hatékonyságukat.

A korábbi kutatások bebizonyították, hogy a gepotidacin újszerű mechanizmuson keresztül szelektíven képes gátolni a bakteriális DNS giráz és Topoizomeráz IV működését. Ezért a négy lehetséges target gént egy ciklus DiVERGE mutagenézisnek vetettük alá a klinikailag rendkívül releváns kórokozó fajban, a *Klebsiella pneumoniae*-ben. A GyrA fehérje 82. aminosava és a ParC fehérje 79. aminosava mutációt tartalmazott minden izolált klónban, más mutációt viszont egyik sem tartalmazott. Több egymást követő ciklussal végzett telítési mutagenézisünk ebben a két pozícióban bebizonyította, hogy a legmagasabb rezisztenciáért két specifikus mutáció kombinációja felelős (GyrA D82N és ParC D79N). A két mutáció együttes jelenléte 2080-szoros növekedést okozott az ellenálló képességben a vad típushoz képest. Ezzel szemben ugyanezek a mutációk egymagukban nem okoztak jelentős változást a rezisztenciában. Ezek az eredmények egybevágóak azzal, hogy a korábbi kísérletek, amik egyszeres mutánsok kimutatására alkalmasak, nem találtak jelentős rezisztenciát.

Az antibiotikum rezisztencia megjelenése általában fitnessz költséggel jár együtt, csökkent növekedési ráta formájában, ez a költség pedig befolyásolja a rezisztens populációk hosszú távú stabilitását. Ezért megvizsgáltuk a gepotidacin rezisztencia fitnessz hatásait *K. pneumoniae*-ben páros kompetíciós assay segítségével a vad típusú és rezisztens populációk között antibiotikummentes Mueller-Hinton II tápban, 37 °C-on. A GyrA D82N és ParC D79N mutációs kombináció jelentősen csökkentette a baktériumok életképességét a vad típusú *K. pneumoniae*-hez képest. Ez a költség azonban kisebb a gepotidacin-rezisztenciát mutató mutánsok esetén, mint a kontroll antibiotikumként használt fluoroquinolonok ellen megjelenő rezisztencia mutációké, amik jelen vannak a klinikumban. Lényeges módon azonban a ParC D79N mutáció önmagában nem járt kimutatható fitnessz költséggel. Azt is megvizsgáltuk, hogy a rezisztens mutánsok *in vivo*

virulenciája változott egér combszöveti fertőzési modellben. A vizsgálat nem mutatott ki szignifikáns különbséget az *in vivo* virulenciában a mutánsok és a vad típus között.

Számos korábbi kutatás bebizonyította, hogy a rezisztenciát okozó mutációk már jóval azelőtt jelen lehetnek egy populációban, mielőtt a baktériumokat kitennék az adott antibiotikumnak. Ennek a tudásnak a birtokában azt a hipotézist állítottuk fel, hogy az antibiotikumok elterjedt használata szelektálhat olyan mutációkat, amik később elősegítik a rezisztencia kialakulását gepotidacin ellen. A legvalószínűbb antibiotikumcsalád ennek a jelenségnek az előidézésre a fluorokinolonok, amik szintén a DNS giráz – Topoizomeráz IV komplexet gátolják, és hosszú ideje elterjedten használják őket a klinikai gyakorlatban. A kísérleteinkhez a ciprofloxacint választottuk, ami egy nagyon jól karakterizált, és széles körben használt fluorokinolon. Számos ciprofloxacin ellen rezisztenciát okozó mutációt és mutáció-kombinációt teszteltünk, ami már megjelent klinikai izolátumokban, de ezek nem okoznak jelentős keresztrezisztenciát gepotidacin ellen. Ezzel szemben kimutattuk, hogy a gepotidacin rezisztenciát okozó egyszerű mutáns, a GyrA D82N, több, mint 16-szoros rezisztenciát okoz ciprofloxacin ellen a vad típusú *K. pneumoniae* ATCC 10031 törzsben. Érdekes módon ugyanez a mutáció gepotidacin ellen csak kétszeres növekedést okoz a MIC szintjében. Ahogy ez alapján az eredmény alapján számíthatunk rá, a GyrA D82N és ParC D79N kétszeres mutáció szintén jelentős növekedést okoz a ciprofloxacin rezisztenciában. Ez alapján lehetségesnek tűnt, hogy a GyrA D82N mutáció már jelen van azokban a klinikai populációkban, amiket korábban fluorokinolonoknak tettek ki, ezáltal pedig megnő az esélye a gepotidacin bevezetésekor a kettős mutánsok megjelenésének. Valóban, vizsgálatunk, amiben ezt a mutációt próbáltuk kimutatni online adatbázisokban elérhető szekvenciákból, a keresés számos Gram-negatív és Gram-pozitív fajban kimutatta a GyrA D82N jelenlétét, többek között fluorokinolon-rezisztens *E. coli* izolátumokban, és más fajokban is a *Salmonella*, *Mycoplasma*, *Clostridium*, *Citrobacter*, *Streptococcus*, és *Neisseria* nemzetségekben. A *Neisseria* és *Streptococcus* fajokban jelen lévő mutációk különösen aggasztóak a klinikai felhasználás szempontjából, mivel elsősorban ezeknek a kórokozónak a kezelésére irányulnak a gepotidacin klinikai tesztjei.

Hogy tovább bizonyítsuk a kapcsolatot a korábbi ciprofloxacín kezelések és a gepotidacin között, adaptív laboratóriumi evolúciót végeztünk ciprofloxacín ellen vad típusú *K. pneumoniae* ATCC 10031 törzssel, valamint vad típusú és *AmutS* hipermutátor *E. coli* K-12 MG1655

vonallal. A korábbi eredményekkel egybevágóan a ciprofloxacín rezisztencia gyorsan kialakult az összes vonalban, különösen a hipermutátor vonalakban. Minden törzs esetén három-három véletlenszerűen választott ciprofloxacín-rezisztens vonal MIC értékeit gepotidacín ellen is. Minden vizsgált vonal növekedett gepotidacín rezisztenciát mutatott, ez a növekedés pedig a kontrollhoz képest 64-1058-szoros volt. Ezeket a vonalakat a vad típusú kiindulási törzsek esetében, egészen pontosan 2 törzset *E. coli* K-12 MG1655 esetében és 3 törzset *K. pneumoniae* ATCC 10031 esetében, teljes genom szekvenálásra küldtük. Bár ezek a vonalak mind gepotidacín rezisztenciát mutattak, nem tudtuk kimutatni bennük a GyrA D82 vagy ParC D79 pozíciók mutációját, ami arra utal, hogy más gének mutációi is nagymértékben hozzájárulhatnak a gepotidacín rezisztencia kialakulásához. Valóban, a szekvenálási eredmények alapján elmondhatjuk, hogy ezek a ciprofloxacín ellen adaptált vonalak számos más gén mutációját tartalmazzák, amik hozzájárulhatnak a gepotidacín rezisztenciához is, amik a membrán effluxban (*acrR*, *soxR*, and *marR*) és az általános stressztoleranciában (*cusS* and *rpoB*) játszanak szerepet. Összességében, ezek az eredmények azt sugallják, hogy a hosszú távú ciprofloxacín kitétség elősegíti a gepotidacín-rezisztencia kialakulását.

A doktori program második felében egy új, többszörös aktivitású antibiotikumjelölt korai fejlesztésén dolgoztunk. (Nyerges és m.társai, 2020) Nemzetközi kollaborációs partnerünk (Peterlin labor, Ljubljana Egyetem) a közelmúltban kifejlesztette egy új osztályba tartozó DNS giráz-gátlók sorozatát, amik a pirrolamidobenzotiazol vázzal rendelkező természetes vegyület, az oroidin ihletett. (Gross és m.társai, 2003; Tomašič és m.társai, 2015) Hogy ezekből a kiindulási molekulákból hatékony antibiotikumok készülhessenek, számos módosítást hajtottak végre az alapvázon, a DNS giráz B alegységével együtt készült kristályszerkezet és a molekuláris dinamikai (MD) szimulációk alapján. A módosítások célja az volt, hogy olyan molekulák jöjjenek létre, amik egyenlő mértékben kötődnek a DNS giráz B alegységéhez (GyrB) és a Topoizomeráz IV. E alegységéhez (ParE). Ezek a módosítások két különösen ígéretes molekulát eredményeztek, amiket ULD1-nek és ULD2-nek nevezünk el.

Az ULD1 és ULD2 antibakteriális aktivitásának feltérképezésekor először lemértük az antibiotikumok MIC értékeit számos Gram-negatív és Gram-pozitív klinikai kórokozó ellen. A két antibiotikumjelölt jelentős antibakteriális aktivitást mutatott az ESKAPE patogéncsoport tagjai ellen (*S. aureus*, *Enterococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*,

Acinetobacter baumannii), valamint *Streptococcus* fajok és *Clostridium difficile* ellen. Az MIC értékek az összes tesztelt multidrog-rezisztens *Staphylococcus*, *Enterococcus*, és *Streptococcus* izolátum esetén 2 µg/mL alatt volt. Az ULD1 és ULD2 hatásos volt az összes methicillin-rezisztens és vankomicin-rezisztens *S. aureus* (MRSA, illetve VRSA), és vankomicin-rezisztens *Enterococcus* (VRE) izolátum esetében, ezek a törzsek pedig gyakori okozói súlyos bőr- és légyszöveti fertőzéseknek. (Ramakrishnan és m.társai, 2015) Az elméleti lehetősége fennáll annak is, hogy a jövőben kémiai módosítások segítségével az ULD1/ULD2 aktivitás Gram-negatív fajok ellen tovább növelhető. Az MRSA és VRSA izolátumokon mutatott kiváló aktivitás miatt egy közel száz, genetikailag és földrajzilag is változatos *Staphylococcus aureus* izolátumot tartalmazó gyűjteményen is teszteltük az bioaktivitását. A vizsgált törzsek köre 56 MRSA és 28 vankomicin-rezisztens izolátumot tartalmazott, közöttük a közelmúltban izolált kórokozókat is. Ezeknek az az izolátumoknak jelentős része rezisztens volt több klinikai forgalomban lévő kontroll antibiotikumra is. Ezekkel a *Staphylococcus* fertőzések kezelésére elterjedten használt antibiotikumokkal ellentétben ULD1 és ULD2 kis mennyiségben gátolta minden vizsgált izolátum növekedését ($MIC \leq 1 \mu\text{g/mL}$).

Hogy feltérképezzük az ULD1 és ULD2 elleni lehetséges rezisztencia mechanizmusokat, először meghatároztuk a spontán megjelenő rezisztencia mutációkat *S. aureus* esetében. A novobiocin, egy korábban klinikai forgalomban használt antibiotikum szolgált kísérleteink kontroll antibiotikumjaként. A novobiocin fő célpontja a DNS giráz B alegysége, de másodlagos mutációk alkalmanként megjelennek a Topoizomeráz IV E alegységén is. (Fujimoto-Nakamura és m.társai, 2005) Egy elfogadott protokollt követve a spontán rezisztencia gyakoriságának megállapításához (Bell és MacLean, 2018; Ling és m.társai, 2015), 10^{10} - 10^{12} baktériumot szélesztettünk ki állandó fázisú kultúrákból különböző koncentrációban ULD1-et, ULD2-öt és novobiocint tartalmazó lemezekre. A kísérletekhez két referencia törzset használtunk: *S. aureus* ATCC 700699 (VISA – vankomicin ellen gyengén rezisztens) és *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA – methicillin rezisztens). Kiszámítottuk a megfigyelt rezisztencia gyakoriságát és a mutáció megelőző koncentrációt (mutant prevention concentration, MPC) mind a három antibiotikumra. A mutáció megelőző koncentráció az az antibiotikummenyiség, aminek a jelenlétében rezisztens mutánsok már nem tudnak szaporodni (azaz az a koncentráció, ami adott kísérleti körülmények között az egyszeres mutánsok szaporodását megakadályozza). (Bell és MacLean, 2018) A korábbi tanulmányokhoz és a klinikai tapasztalatokhoz hasonlóan a rezisztencia gyakorisága novobiocin ellen relatív magas volt, és 120-

szoros MIC növekedést tapasztaltunk az izolált *S. aureus* mutáns vonalakban. (Fujimoto-Nakamura és m.társai, 2005; Vickers és m.társai, 2007) Ezzel éles ellentétben nem találtunk rezisztens mutánsokat *S. aureusban* ULD1 ellen már az eredeti vad típusú törzs MIC értékének nyolcszorosán sem, továbbá az alacsonyabb koncentrációkon izolált mutánsok csak minimális eltérést mutattak az ULD1-gyel szembeni érzékenységükben.

Hogy megvizsgáljuk az ULD1-rezisztencia molekuláris hátterét, 400 ULD1 rezisztens baktériumtelepet izoláltunk az előző kísérletből, és megszekvenáltuk a *gyrB* és *parE* génjeiket Pacific Biosciences single-molecule real-time (SMRT) szekvenálási módszerrel. Az így nyert szekvenciák analíziséből megtudtuk, hogy az ULD1-rezisztens mutánsokban missense mutációk találhatóak a *gyrB* génen. Az ULD1-kötő zseb négy aminosav pozíciója (R144, G85, I175, T173) mutálódott rendszeresen. Minden mutálódott aminosav *S. aureusban* a GyrB fehérje antibiotikumkötő zsebébe térképeződött és erőteljes másodlagos kötődéseket hozott létre az ULD1 molekulával.

Mivel az ULD2 antibiotikum erősebben kötődik mindkét célfehérjéhez és rendkívül kiegyensúlyozott kettős aktivitást mutat, azt feltételeztük, hogy a mutációs gyakoriság ULD2 ellen igen alacsony lehet. Figyelemre méltó módon, nem tudtunk kimutatni rezisztens mutánsokat ULD2 ellen ha 4×10^{12} *S. aureus* ATCC 700699 (VISA) sejtet a vad típusú ULD2 MIC négyszeresének tettünk ki. A méréseink alapján az MPC rendkívül alacsony, mindössze 0.16 $\mu\text{g/mL}$ ULD1 és 0.08 $\mu\text{g/mL}$ ULD2 esetén *S. aureus* ATCC 700699 (VISA) törzsben.

Míg ezek az eredmények rendkívül ígéretesek voltak, korábban a gepotidacinnal szerzett tapasztalataink arra utaltak, hogy több, specifikus mutáció az antibiotikum különböző targetjein hosszú távon rezisztencia kialakulásához vezethet még a kiegyensúlyozott többszörös aktivitású antibiotikumok ellen is. (Szili és m.társai, 2019) Hogy vizsgáljuk ezt a lehetőséget, megismételtük a spontán rezisztencia gyakoriság kísérletet két ULD1-rezisztens *S. aureus* VISA izolátummal, mindkettő egy-egy GyrB mutációt hordozott az ULD/ULD2 elsődleges targetén. Ezek a mutációk —GyrB R144I és I175T— gyakori egyszeres mutációk voltak és alacsony szintű rezisztenciát biztosítottak ULD1 ellen. Ezen egyszeres mutánsokból származtatott populációkat a kísérletben növekvő ULD1 és ULD2 koncentrációkkal kezeltünk. A rezisztens mutánsok spontán megjelenése 10^{-8} – 10^{-11} gyakorisággal történt. Az izolált kettős mutánsok növekedett rezisztenciát mutattak, de növekedésük 1 $\mu\text{g/mL}$ of ULD2-vel gátolható volt. A szekvenálási eredmények alapján a második

mutáció minden esetben a ParE fehérje szerkezetét módosította, ami az ULD1/ULD2 másik targetje, és a mutációk a GyrB-ben megfigyelt kötődési helyek homológjait érintették. Összességében a megfigyelt mutációk bizonyítékot szolgáltatnak az ULD1 és ULD2 kettős hatásmechanizmusára.

Azt is vizsgáltuk, hogy a hosszú távú kitettség ULD1 és ULD2 antibiotikumoknak vezethet-e magas szintű rezisztenciához. E célból adaptív laboratóriumi evolúciót végeztünk a VISA törzssel ULD1, ULD2 és novobiocin jelenlétében. Hogy pontosan feltérképezzük a lehetséges rezisztencia mechanizmusokat, 10 párhuzamosan adaptálódó populációt tettünk ki egyre növekvő antibiotikum-koncentrációknak. Az evolúciós kísérletet követően minden populációból egy-egy telepet izoláltunk és rezisztencia-méréseknek vetettünk alá. A korábbi klinikai tapasztalathoz és publikált laboratóriumi adatokhoz hasonlóan (Bisacchi és Manchester, 2015; Vickers és társai, 2007), a magas szintű novobiocin-rezisztencia rendkívül gyorsan megjelent ezekben a populációkban. A novobiocin-adaptált vonalakban akár 320-szoros MIC-növekedést (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) is megfigyeltünk a vad típushoz képest. Ezzel szemben ULD1 és ULD2 ellen csak mérsékelt, maximum 25-szörös MIC növekedést tapasztaltunk (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ULD1 és 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ULD2 esetében). Azért, hogy feltérképezzük a rezisztencia háttérében álló molekuláris mechanizmusokat, 5 ULD2-adaptált törzs teljes genom szekvenálását is elvégeztük. Az elemzésben azokra a de novo genomi mutációkra összepontosítottunk, amelyek legalább két párhuzamosan adaptált vonalban egymástól függetlenül megjelentek. Ilyen mutációkat találtunk a target fehérjék szekvenciáiban (GyrB, ParE), valamint a purin bioszintézist reguláló PurR fehérje és az uridin-difoszfát (URD) bioszintézisében részt vevő PyrH fehérje szekvenciáiban. Az, hogy ez utóbbi fehérjék milyen szerepet játszanak a rezisztencia kialakulásában, további vizsgálatokra szorul.

Hogy megvizsgáljuk a rezisztencia kialakulásának esetleges negatív következményeit, megvizsgáltuk az ULD1/ULD2 adaptált *S. aureus* VISA vonalak növekedési fenotípusát. A fitness becslésére a 600 nm-en mért optikai denzitás (OD_{600}) értékét használtuk, amit 48 órán keresztül rögzítettünk, miközben a sejtek antibiotikummentes gazdag tápban nőttek. Az ULD1/ULD2 rezisztens vonalak növekedése szignifikánsan csökkent a vad típushoz képest, és agar lemezeken kis méretű, lassan növekedő kolóniákat hozott létre. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a hosszú távú ULD1 és ULD2 kitettség olyan mutációkat okoz, amik kis mértékben növelik a rezisztenciát és antibiotikummentes környezetben nagymértékű fitnesscsökkenéssel járnak.

A ciprofloxacín és gepotidacín antibiotikumok között korábban tapasztalt kapcsolat alapján logikus felvetésnek tűnt, hogy a korábban kialakult novobiocin-rezisztencia a klinikai izolátumokban hatással lehet az ULD1/ULD2 hatékonyságára is. A lehetséges keresztrezisztenciát úgy vizsgáltuk, hogy kilenc novobiocin-adaptált vonal rezisztenciáját mértük ULD1 és ULD2 ellen. Ezek a vonalak nem mutattak keresztrezisztenciát ULD2 ellen, és csupán szerény, hatszoros MIC-növekedést tapasztaltunk ULD1 ellen a vad típusú törzshöz hasonlítva.

Végül az ULD1 és ULD2 ígéretes antibakteriális aktivitását *in vivo* egér fertőzési modellekben is megvizsgáltuk *S. aureus* törzsek ellen. Első *in vivo* kísérletünkben egy egér bőr- és légyszöveti fertőzés modellt használtunk. Ezt a modellt gyakran használják preklinikai vizsgálatokban új Staphylococcus-ellenes antibiotikumok farmakokinetikájának és-dinamikájának tesztelésére, valamint az antibiotikumok klinikai relevanciájának megítélésére. (Kugelberg és m.társai, 2005; Ling és m.társai, 2015; Vingsbo Lundberg és Frimodt-Møller, 2013) A kísérletben bőrfelszíni ULD1 és ULD2 kezelést alkalmaztunk kenőcs formájában *S. aureus* USA300 MRSA (BAA1556), vakomicinre gyengén rezisztens (VISA) és vankomicin-rezisztens (VRSA) klinikai izolátumok ellen. Ez a három törzs együttevén ellenálló volt legalább 9 különböző kémiai családba tartozó antibiotikum ellen, beleértve a mupirocin nevű, súlyos bőr- és légyszöveti multidrog-rezisztens *S. aureus* fertőzések kezelésére használt antibiotikumot. Az ULD1 és ULD2 bőrfelszíni alkalmazás során ígéretes antimikrobiális aktivitást mutatott, hatékonyságuk a mupirocinhoz hasonló volt. A farmakokinetikai elemzés kimutatta, hogy mindkét antibiotikum hatékonyan szívódik fel a bőrfelszínen keresztül, koncentrációjuk a környező szövetekben akár a vizsgált *S. aureus* VISA törzs MIC-jának háromszázszorosát is elérheti.

Az ULD1 hatékonyságát neutropéniás egér combszöveti modellben is vizsgáltuk. Intravénás bejuttatás esetében az antibiotikum ígéretes aktivitást mutatott *S. aureus* VISA fertőzés ellen. Figyelemreméltó módon az ULD1 kezelés hatékonysága hasonló volt a linezolidhoz, ami jelenleg rendkívül elterjedten használt antibiotikum szisztémás MRSA fertőzések kezelésében. (Watkins és m.társai, 2012) Ezeket az eredményeket egybevetve az *in vivo* kísérletek az ULD molekulák hatékonyságát bizonyítják bőrfelszíni és szisztémás *S. aureus* fertőzések ellen, és ígéretes kiindulási molekulák lehetnek jövőbeli antibiotikumfejlesztési programok számára.

Összefoglalásként, az itt bemutatott munkában kritikus szemlélettel vizsgáltuk a többszörös hatásmechanizmusú molekulákat, mint lehetséges fejlesztési irányt rezisztenciabiztos

antibiotikumok eléréséhez. Bemutattuk, hogy hiába képes egy antibiotikum több fehérjéhez is hasonló affinitással kötődni, a rezisztencia mégis könnyedén kialakulhat, ha a molekula ezeken a célpontokon csak néhány kulcsamínosavval lép kapcsolatba. Továbbá munkánk az adaptív laboratóriumi evolúció és a klinikai adatok alapján azt veti fel, hogy a fluorokinolon antibiotikumok túlhasználata, és az emiatt felhalmozódott mutációk növelik a rezisztencia kialakulásának esélyét új alapvázal rendelkező topoizomeráz-gátló antibiotikumok ellen is, ahogy azt a gepotidacin példáján láthattuk. Ez a következtetés nem feltétlenül igaz az ULD molekulákra, amiknek nem használják a klinikumban azonos célpontot támadó antibiotikum elődjét. Ezek alapján az eredmények alapján a többszörös hatásmechanizmusú antibiotikumok tervezése kedvező fejlesztési stratégia lehet, amennyiben legalább az egyik célpontja az antibiotikumnak teljesen újszerű. Ezt az esetet azonban megfelelő antibiotikumok példáján a jövőben tovább kell vizsgálni.

Ezek az eredmények jelentősek lehetnek más, jelenleg fejlesztés alatt álló antibiotikumok szempontjából is. Az egyik ilyen antibiotikum a zoliflodacin (ETX0914), ami a gepotidacinhoz hasonlóan egy új kémiai szerkezettel rendelkező topoizomeráz-giráz gátló antibiotikum jelenleg klinikai tesztelésben. Ígéretes aktivitást mutat multidrog-rezisztens fertőzések ellen, elsősorban *N. gonorrhoeae* esetében. (Basarab és m.társai, 2015; Taylor, Marrazzo, és m.társai, 2018) Azonban a rendelkezésre álló adatok alapján elmondható, hogy a gyrB gén mutációi jelentős zoliflodacin-rezisztenciát eredményeznek. Az egyik ilyen zoliflodacin-rezisztens mutáció (D429N) megtalálható a baktériumok klinikai populációiban, és a természetesen előforduló zoliflodacin-rezisztens baktériumok magas rezisztenciát mutatnak fluorokinolonok ellen is. (Damião Gouveia és m.társai, 2018; Foerster és m.társai, 2015) Egy másik példa a topoizomeráz-giráz gátló antibiotikumokon túl az SCH79797 és a belőle leszármaztatott Irresistin-16. Az SCH79797 egy újr felhasznált gyógyszer, ami a közelmúltban publikált adatok alapján antimikrobiális hatással is rendelkezik. Ez utóbbinak a mechanizmusa rendkívül egyedi, mivel egyszerre támadja a folsav anyagcserét és a sejtmembrán integritását. Ennek megfelelően a rezisztencia gyakorisága rendkívül alacsony volt az első kísérletekben. SCH79797 rezisztencia nem alakult ki, akkor sem, ha a baktériumokat hosszabb ideig tartották fent az antibiotikum szubletális koncentrációján. (Martin és m.társai, 2020) Az ebben a munkában bemutatott tapasztalataink alapján azonban ezeket az eredményeket érdemes lehet felülvizsgálni, akár más baktériumfajokban, akár más technikák felhasználásával.

References:

- Jim O'Neill: *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations* (2016). Retrieved 6 January 2021, from https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
- Aminov, R. I. (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology*, *11*(12), 2970–2988. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01972.x>
- Antibiotic Hybrids: The Next Generation of Agents and Adjuvants against Gram-Negative Pathogens?* | *Clinical Microbiology Reviews*. (n.d.). Retrieved 7 January 2021, from <https://cmr.asm.org/content/31/2/e00077-17>
- Antibiotics Currently in Global Clinical Development*. (n.d.). Retrieved 6 January 2021, from <http://pew.org/1YkUFkT>
- Basarab, G. S., Kern, G. H., McNulty, J., Mueller, J. P., Lawrence, K., Vishwanathan, K., Alm, R. A., Barvian, K., Doig, P., Galullo, V., Gardner, H., Gowravaram, M., Huband, M., Kimzey, A., Morningstar, M., Kutschke, A., Lahiri, S. D., Perros, M., Singh, R., ... Newman, J. V. (2015). Responding to the challenge of untreatable gonorrhea: ETX0914, a first-in-class agent with a distinct mechanism-of-action against bacterial Type II topoisomerases. *Scientific Reports*, *5*(1), 11827. <https://doi.org/10.1038/srep11827>
- Bell, G., & MacLean, C. (2018). The Search for ‘Evolution-Proof’ Antibiotics. *Trends in Microbiology*, *26*(6), 471–483. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.005>
- Biedenbach, D. J., Bouchillon, S. K., Hackel, M., Miller, L. A., Scangarella-Oman, N. E., Jakielaszek, C., & Sahn, D. F. (2016). In Vitro Activity of Gepotidacin, a Novel Triazaacenaphthylene Bacterial Topoisomerase Inhibitor, against a Broad Spectrum of Bacterial Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(3), 1918–1923. <https://doi.org/10.1128/AAC.02820-15>
- Bisacchi, G. S., & Manchester, J. I. (2015). A New-Class Antibacterial—Almost. Lessons in Drug Discovery and Development: A Critical Analysis of More than 50 Years of Effort toward ATPase Inhibitors of DNA Gyrase and Topoisomerase IV. *ACS Infectious Diseases*, *1*(1), 4–41. <https://doi.org/10.1021/id500013t>
- Champoux, J. J. (2001). DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. *Annual Review of Biochemistry*, *70*(1), 369–413. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.369>
- Collin, F., Karkare, S., & Maxwell, A. (2011). Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *92*(3), 479–497. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3557-z>
- Damião Gouveia, A. C., Unemo, M., & Jensen, J. S. (2018). In vitro activity of zoliflodacin (ETX0914) against macrolide-resistant, fluoroquinolone-resistant and antimicrobial-susceptible *Mycoplasma genitalium* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*(5), 1291–1294. <https://doi.org/10.1093/jac/dky022>
- D’Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, *477*(7365), 457–461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>
- Farrell, D. J., Sader, H. S., Rhomberg, P. R., Scangarella-Oman, N. E., & Flamm, R. K. (2017). In Vitro Activity of Gepotidacin (GSK2140944) against Neisseria gonorrhoeae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(3). <https://doi.org/10.1128/AAC.02047-16>
- Flamm, R. K., Farrell, D. J., Rhomberg, P. R., Scangarella-Oman, N. E., & Sader, H. S. (2017). Gepotidacin (GSK2140944) In Vitro Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(7). <https://doi.org/10.1128/AAC.00468-17>
- Foerster, S., Golparian, D., Jacobsson, S., Hathaway, L. J., Low, N., Shafer, W. M., Althaus, C. L., & Unemo, M. (2015). Genetic Resistance Determinants, In Vitro Time-Kill Curve Analysis and Pharmacodynamic Functions for the Novel Topoisomerase II Inhibitor ETX0914 (AZD0914) in *Neisseria gonorrhoeae*. *Frontiers in Microbiology*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01377>
- Fujimoto-Nakamura, M., Ito, H., Oyamada, Y., Nishino, T., & Yamagishi, J. (2005). Accumulation of Mutations in both *gyrB* and *parE* Genes Is Associated with High-Level Resistance to Novobiocin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(9), 3810–3815. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.9.3810-3815.2005>
- Gross, C. H., Parsons, J. D., Grossman, T. H., Charifson, P. S., Bellon, S., Jernee, J., Dwyer, M., Chambers, S. P., Markland, W., Botfield, M., & Raybuck, S. A. (2003). Active-Site Residues of *Escherichia coli* DNA Gyrase Required in Coupling ATP Hydrolysis to DNA Supercoiling and Amino Acid Substitutions Leading to Novobiocin Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *47*(3), 1037–1046. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.1037-1046.2003>

- Hughes, D., & Andersson, D. I. (2015). Evolutionary consequences of drug resistance: Shared principles across diverse targets and organisms. *Nature Reviews Genetics*, *16*(8), 459–471. <https://doi.org/10.1038/nrg3922>
- Ince, D., Zhang, X., Silver, L. C., & Hooper, D. C. (2002). Dual Targeting of DNA Gyrase and Topoisomerase IV: Target Interactions of Garenoxacin (BMS-284756, T-3811ME), a New Desfluoroquinolone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(11), 3370–3380. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3370-3380.2002>
- Jackson, N., Czaplewski, L., & Piddock, L. J. V. (2018). Discovery and development of new antibacterial drugs: Learning from experience? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*(6), 1452–1459. <https://doi.org/10.1093/jac/dky019>
- Klahn, P., & Brönstrup, M. (2017). Bifunctional antimicrobial conjugates and hybrid antimicrobials. *Natural Product Reports*, *34*(7), 832–885. <https://doi.org/10.1039/C7NP00006E>
- Kugelberg, E., Norström, T., Petersen, T. K., Duvold, T., Andersson, D. I., & Hughes, D. (2005). Establishment of a Superficial Skin Infection Model in Mice by Using *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(8), 3435–3441. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3435-3441.2005>
- Ling, L. L., Schneider, T., Peoples, A. J., Spoering, A. L., Engels, I., Conlon, B. P., Mueller, A., Schäberle, T. F., Hughes, D. E., Epstein, S., Jones, M., Lazarides, L., Steadman, V. A., Cohen, D. R., Felix, C. R., Fetterman, K. A., Millett, W. P., Nitti, A. G., Zullo, A. M., ... Lewis, K. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, *517*(7535), 455–459. <https://doi.org/10.1038/nature14098>
- Martin, J. K., Sheehan, J. P., Bratton, B. P., Moore, G. M., Mateus, A., Li, S. H.-J., Kim, H., Rabinowitz, J. D., Typas, A., Savitski, M. M., Wilson, M. Z., & Gitai, Z. (2020). A Dual-Mechanism Antibiotic Kills Gram-Negative Bacteria and Avoids Drug Resistance. *Cell*, *181*(7), 1518–1532.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.005>
- Nyerges, Á., Csörgő, B., Draskovits, G., Kintsés, B., Szili, P., Ferenc, G., Rév&z, T., Ari, E., Nagy, I., Bálint, B., Vászrhelyi, B. M., Bihari, P., Számel, M., Balogh, D., Papp, H., Kalapis, D., Papp, B., & Pál, C. (2018). Directed evolution of multiple genomic loci allows the prediction of antibiotic resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(25), E5726–E5735. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801646115>
- Nyerges, A., Tomašič, T., Durcik, M., Revesz, T., Szili, P., Draskovits, G., Bogar, F., Skok, Ž., Zidar, N., Ilaš, J., Zega, A., Kikelj, D., Daruka, L., Kintsés, B., Vasarhelyi, B., Foldesi, I., Kata, D., Welin, M., Kimbung, R., ... Pal, C. (2020). Rational design of balanced dual-targeting antibiotics with limited resistance. *PLOS Biology*, *18*(10), e3000819. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000819>
- Oldfield, E., & Feng, X. (2014). Resistance-resistant antibiotics. *Trends in Pharmacological Sciences*, *35*(12), 664–674. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.10.007>
- Payne, D., Gwynn, M., Holmes, D., & Pompliano, D. (2007). Drugs for Bad Bugs: Confronting the Challenges of Antibacterial Discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *6*, 29–40. <https://doi.org/10.1038/nrd2201>
- Ramakrishnan, K., Salinas, R. C., & Higuaita, N. I. A. (2015). Skin and Soft Tissue Infections. *American Family Physician*, *92*(6), 474–483.
- Scangarella-Oman, N. E., Ingraham, K. A., Tiffany, C. A., Tomsho, L., Horn, S. F. V., Mayhew, D. N., Perry, C. R., Ashton, T. C., Dumont, E. F., Huang, J., Brown, J. R., & Miller, L. A. (2020). In Vitro Activity and Microbiological Efficacy of Gepotidacin from a Phase 2, Randomized, Multicenter, Dose-Ranging Study in Patients with Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *64*(3). <https://doi.org/10.1128/AAC.01302-19>
- Silver, L. L. (2007). Multi-targeting by monotherapeutic antibacterials. *Nature Reviews Drug Discovery*, *6*(1), 41–55. <https://doi.org/10.1038/nrd2202>
- Spellberg, B., Powers, J. H., Brass, E. P., Miller, L. G., & Edwards, J. E., Jr. (2004). Trends in Antimicrobial Drug Development: Implications for the Future. *Clinical Infectious Diseases*, *38*(9), 1279–1286. <https://doi.org/10.1086/420937>
- Strahilevitz, J., & Hooper, D. C. (2005). Dual Targeting of Topoisomerase IV and Gyrase To Reduce Mutant Selection: Direct Testing of the Paradigm by Using WCK-1734, a New Fluoroquinolone, and Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(5), 1949–1956. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1949-1956.2005>
- Szili, P., Draskovits, G., Rév&z, T., Bogár, F., Balogh, D., Martinek, T., Daruka, L., Spohn, R., Vászrhelyi, B. M., Czikkely, M., Kintsés, B., Grézal, G., Ferenc, G., Pál, C., & Nyerges, Á. (2019). Rapid Evolution of Reduced Susceptibility against a Balanced Dual-Targeting Antibiotic through Stepping-Stone Mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *63*(9). <https://doi.org/10.1128/AAC.00207-19>
- Tari, L. W., Li, X., Trzoss, M., Bensen, D. C., Chen, Z., Lam, T., Zhang, J., Lee, S. J., Hough, G., Phillipson, D., Akers-Rodriguez, S., Cunningham, M. L., Kwan, B. P., Nelson, K. J., Castellano, A., Locke, J. B., Brown-

- Driver, V., Murphy, T. M., Ong, V. S., ... Finn, J. (2013). Tricyclic GyrB/ParE (TriBE) inhibitors: A new class of broad-spectrum dual-targeting antibacterial agents. *PloS One*, 8(12), e84409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084409>
- Taylor, S. N., Marrazzo, J., Batteiger, B. E., Edward W. Hook, I. I. I., Seña, A. C., Long, J., Wierzbicki, M. R., Kwak, H., Johnson, S. M., Lawrence, K., & Mueller, J. (2018). Single-Dose Zoliflodacin (ETX0914) for Treatment of Urogenital Gonorrhea. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706988>
- Taylor, S. N., Morris, D. H., Avery, A. K., Workowski, K. A., Batteiger, B. E., Tiffany, C. A., Perry, C. R., Raychaudhuri, A., Scangarella-Oman, N. E., Hossain, M., & Dumont, E. F. (2018). Gepotidacin for the Treatment of Uncomplicated Urogenital Gonorrhea: A Phase 2, Randomized, Dose-Ranging, Single-Oral Dose Evaluation. *Clinical Infectious Diseases*, 67(4), 504–512. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy145>
- Tomašič, T., Katsamakos, S., Hodnik, Ž., Ilaš, J., Brvar, M., Solmajer, T., Montalvão, S., Tammela, P., Banjanac, M., Ergović, G., Anderluh, M., Mašič, L. P., & Kikelj, D. (2015). Discovery of 4,5,6,7-Tetrahydrobenzo[1,2-d]thiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors Targeting the ATP-Binding Site. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(14), 5501–5521. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00489>
- Vickers, A. A., O'Neill, A. J., & Chopra, I. (2007). Emergence and maintenance of resistance to fluoroquinolones and coumarins in *Staphylococcus aureus*: Predictions from in vitro studies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(2), 269–273. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm191>
- Vingsbo Lundberg, C., & Frimodt-Møller, N. (2013). Efficacy of topical and systemic antibiotic treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a murine superficial skin wound infection model. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42(3), 272–275. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.05.008>
- Watkins, R. R., Lemonovich, T. L., & File, T. M. (2012). An evidence-based review of linezolid for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Place in therapy. *Core Evidence*, 7, 131–143. <https://doi.org/10.2147/CE.S33430>