

Synthese und Immobilisierung von Lugdunin-Cyclopeptiden

als antimikrobielle Wirkstoffe

sowie

Screening ausgewählter *Actinomyceten*-Stämme

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Julian S. Saur (M.Sc.)

aus Freudenstadt

Tübingen

2023

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation: 15.12.2023

Dekan: Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Stephanie Grond

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Günter Lorenz

Die vorliegende Arbeit wurde in den Laboratorien am Institut für Organische Chemie der Eberhard Karls Universität Tübingen unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Stephanie Grond in der Zeit von Dezember 2016 bis Oktober 2020 angefertigt.

„Was heißt Holozän! Die Natur braucht keine Namen. Das weiß Herr Geiser.

Die Steine brauchen sein Gedächtnis nicht.“

Max Frisch, *Der Mensch erscheint im Holozän*, 1979

*„Nicht der Sieg der Wissenschaften ist das, was unser 19. Jahrhundert auszeichnet,
sondern der Sieg der Methode über die Wissenschaft.“*

Friedrich Nietzsche, *Der Willen zur Macht*, 1885

„Als eine Gestalt der Wahrheit gründet die Technik in der Geschichte der Metaphysik.“

Martin Heidegger, *Brief über den Humanismus*, 1946

Inhaltsverzeichnis

1) Spannungsfelder moderner Antibiotikaforschung – ein Überblick	Seite 1
2) Das Cyclopeptid Lugdunin (6) - Synthese, Struktur-Wirkungsbeziehungen und molekularer Wirkungsmechanismus	
2.1 Einleitung zum Lugdunin-Cyclopeptid (6)	Seite 11
2.2 Synthese, Struktur-Wirkungsbeziehungen sowie Evaluation des molekularen Wirkungsmechanismus von (6) – <i>Angewandte Chemie</i>	Seite 17
2.3 Sekretion und Eigenresistenzentwicklung von (6) durch spezifische ABC-Reporter – <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i>	Seite 19
2.4 Neue Festphasen-Peptidsyntheseroute (SPPS) sowie Struktur-Wirkungs-Beziehungen von (6) – <i>Journal of Medicinal Chemistry</i>	Seite 21
2.5 Flüssigphasen Peptidsynthese (LPPS) von (6)	
2.5.1 Allgemeiner Teil zur LPPS von (6)	Seite 24
2.5.2 Experimenteller Teil zur LPPS von (6)	Seite 33
2.6 Literaturverzeichnis zum Lugdunin-Cyclopeptid (6)	Seite 38
3) Kovalente und nicht-kovalente Oberflächen-Immobilisierung von Lugdunin (6) in Kooperationsprojekten	
3.1 Einleitung zur Immobilisierung von Lugdunin-Cyclopeptiden	Seite 40
3.2 Kovalente Immobilisierung eines Lugdunin-Click Derivates auf Silan-modifizierten EP(D)M Kautschuk-Formulierungen	Seite 44
3.3 Nicht-kovalente Immobilisierung von Lugdunin-Cyclopeptiden auf <i>Poly(lactid-co-glycolid)</i> (PLGA) Mikrosphärulen	
3.3.1 Allgemeiner Teil zu Lugdunin-beladenen PLGA-Mikrosphärulen	Seite 45
3.3.2 Experimenteller Teil zu Lugdunin-beladenen PLGA-Mikrosphärulen	Seite 53
3.4 Literaturverzeichnis zur Immobilisierung von Lugdunin-Cyclopeptiden	Seite 56

4) Entwicklung und Anwendung einer biologisch-chemischen Screening-Methodik mit Wirkortermittlung und Dereplikation in Zusammenarbeit mit H. Brötz-Oesterhelt et al.

- 4.1 Einleitung zum Naturstoff-Screening Seite 59
- 4.2 Wirkort-basiertes Screening durch Bioreporter und chemische Dereplikation der aktiven Naturstoffe – *Cell Chemical Biology* Seite 62
- 4.3 Literaturverzeichnis zum Naturstoff-Screening Seite 65

5) Zusammenfassung und Ausblick

- 5.1 Zusammenfassung Seite 67
- 5.2 Summary Seite 70
- 5.3 Ausblick Seite 72

6) Literaturverzeichnis zur allgemeinen Einleitung „Spannungsfelder moderner Antibiotikaforschung – ein Überblick“ Seite 74

7) Epilog

- 7.1 Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Journalen Seite 78
- 7.2 Abkürzungsverzeichnis Seite 79
- 7.3 Danksagung Seite 81
- 7.4 Lebenslauf Seite 82
- 7.5 Eidesstattliche Erklärung Seite 83

1) Spannungsfelder moderner Antibiotikaforschung – ein Überblick

Der Bedarf an neuen Antibiotika-Klassen

Die gegenwärtige Lage bezüglich antibiotikaresistenter Keime ist seit mittlerweile zwei Jahrzehnten angespannt.^[1] Generell brachen nach der Hochphase der Antibiotika-Entwicklung zwischen 1950 und 1970 die Forschungs- und Entwicklungsaktivitäten für neue Antibiotikaklassen und Leitstrukturen innerhalb der pharmazeutischen Industrie ein. Die mit potenziellen, neuentwickelten Antibiotikakandidaten verbundenen schlechten Gewinnaussichten und hohe Entwicklungskosten haben Neuentwicklungen bis heute unrentabel und damit unattraktiv für die pharmazeutische Industrie gemacht. Die Folgen dieser Entwicklung sind eine stark verengte Antibiotika-Pipeline und ein Mangel an neuen Wirkstoff- und Leitstrukturkandidaten.^[2] Das defizitäre Pipeline-Angebot wird deutlich beim Betrachten der Zahlen für neu zugelassene Antibiotika durch die US-amerikanische Zulassungsbehörde Federal Drug Administration (FDA) zwischen 1980 und 2010: Wurden in den Jahren 1983 - 1987 noch 16 neue Substanzen zugelassen, so waren es zwischen 2008 und 2012 lediglich zwei.^[3]

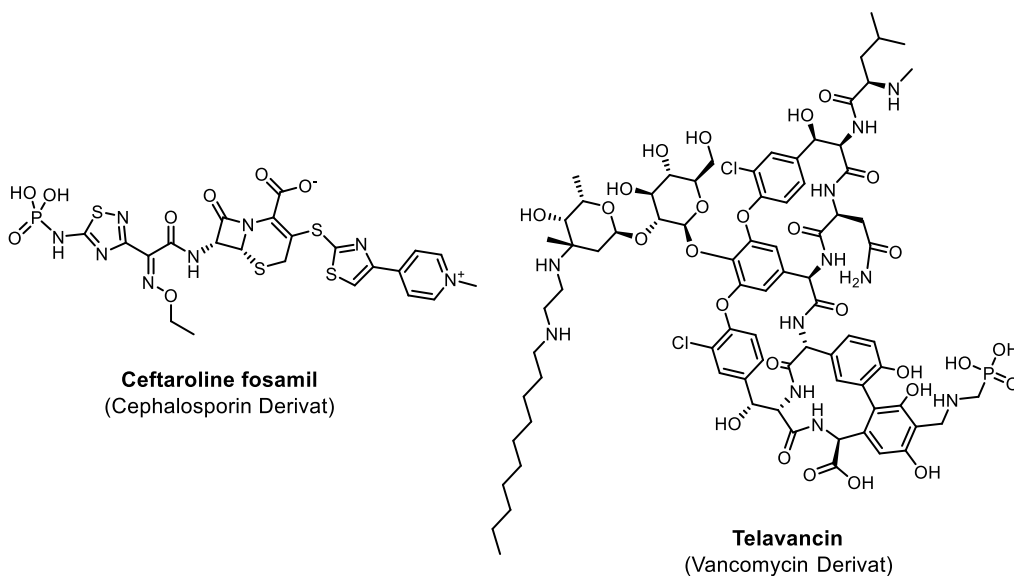


Abbildung 1: Neu durch die FDA zugelassene Antibiotika in den Jahren 2008 – 2012: Telavancin (2009) und Ceftaroline fosamil (2010).^[3]

Parallel zu dieser Entwicklung stieg durch die unsachgemäße Anwendung von Antibiotika die Zahl (multi-) resistenter Keime weltweit stark an.^[4] Der unsachgemäße Einsatz von Antibiotika findet u.a. in der Landwirtschaft durch Gabe von Reserveantibiotika zur Kontrolle der Keimbelastung in Tiermastbetrieben sowie bei der Verschreibung von Antibiotika ohne Überprüfung der antibiotischen Suszeptibilität des Patienten statt.^[5,6] Als Folgen dieser Entwicklung deklarierte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Jahr 2001 das Problem der antimikrobiellen Resistenzbildung als ein „weltweites Besorgnis im Bereich der öffentlichen Gesundheit“. ^[7-9] Im weiteren Verlauf dieser Entwicklung trat im Jahr 2017 zum ersten Mal ein Keim (*Klebsiella pneumoniae* Spezies) auf, der gegen alle gängigen, kommerziell erhältlichen Antibiotikaklassen resistent war (sogenannter „Superbug“).^[10,11] Schätzungen der WHO besagen, dass im Jahr 2050 10 Millionen Todesfälle durch antibiotikaresistente

Keim verursacht werden, sodass in den nächsten Jahrzehnten ein erhöhter finanzieller und methodischer Handlungsbedarf in den Bereichen Forschung und Entwicklung in diesem Feld gegeben ist. Das weitreichende Problem der „stillen Pandemie“^[12] wird mittlerweile von den zuständigen staatlichen Institutionen erkannt und durch Förderprogramme der öffentlichen Hand finanziell unterstützt (z.B. GUARD der G7 Länder oder JPI-AMR der EU).^[13]

Grundlegende Konzepte in der Antibiotika-Forschung

Alle klinisch relevanten Antibiotikaklassen wirken über eine selektive Inhibition an bestimmten zellulären Wirkorten („Targets“), was allgemein als deren zugrundeliegender Wirkungsmechanismus (engl. mechanism of action, MOA) bezeichnet wird. Mögliche Mechanismen beinhalten die Hemmung des bakteriellen Wachstums, das Unterbinden der Replikation oder die Zerstörung der Zellwandintegrität.^[14,15] Die wichtigsten zellulären Wirkorte und deren Mechanismen sind:

- Zerstörung und/oder Inhibition der Zellwandbiosynthese (z.B. β -Laktame, Vancomycin)^[16]
- Inhibition der Proteinbiosynthese (z.B. Tetracycline, Makrolide, Aminoglycoside)^[17-19]
- RNA-Polymerase (z.B. Rifamycine)^[20]
- DNA-Synthese (z.B. Quinolone)^[21]
- Folat-Biosynthese (z.B. Sulfonamide)^[22]
- Zerstörung der Zellmembran (z.B. Polymyxine)^[22]

Die Entwicklung von Resistenzen fußt auf der schnellen Adaptionsfähigkeit, die Bakterien besitzen, um sich an veränderte Umweltbedingungen anzupassen.^[23,24] Wichtige Anpassungsmerkmale gegenüber antibiotisch wirksamen Substanzen sind das aktiv-eliminierende Ausschleusen von Xenobiotika mittels Efflux-Pumpen, die Inaktivierung des Wirkstoffs, das Vorhandensein einer doppelten Membran bei gramnegativen Bakterien zur Permeationssuppression von kleinen organischen Molekülen sowie das Einfügen struktureller Abwandlungen an der Bindungsstelle zwischen Wirkstoff und Protein-Target z.B. an der Bindungsstelle zwischen DNA-Gyrase und Fluorquinolon-Antibiotikum.^[25,26]

Der systematisierte Entwicklungsprozess eines neuen Arzneimittels bis zur Zulassung (Abbildung 4) beinhaltet zu Beginn des gesamten Entwicklungsprozesses die Auswahl eines klinisch relevanten Krankheitsbildes, für das ein entsprechender Wirkstoff entwickelt werden soll. Im Rahmen von „Druggability“-Studien wird mithilfe genomischer, proteomischer, metabolomischer und bioinformatischer Analysemethoden ein molekularer Wirkort ermittelt, der adressiert werden soll. Für die sich anschließenden Studien zur „Assayability“ wird ein *in-vitro* Assay des molekularen Wirkorts ausgearbeitet, durch den ein schnelles und effizientes Screening einer großen Anzahl verschiedener Substanzen möglich gemacht wird (siehe Abbildung 2; Small Molecules, Macromolecules, Biologicals/Proteins im High-throughput Screening Verfahren).^[27-29] Unter dem Gesichtspunkt der Arzneimittelsicherheit ist es bereits im Frühstadium der Antibiotika-Entwicklung unerlässlich, die neue Substanz auf humantoxische Nebenwirkungseffekte zu untersuchen.^[30] Die Herausforderung wird hauptsächlich in der Frage wiedergespiegelt: Aus welchen Quellen können heute neue Strukturideen gewonnen werden?

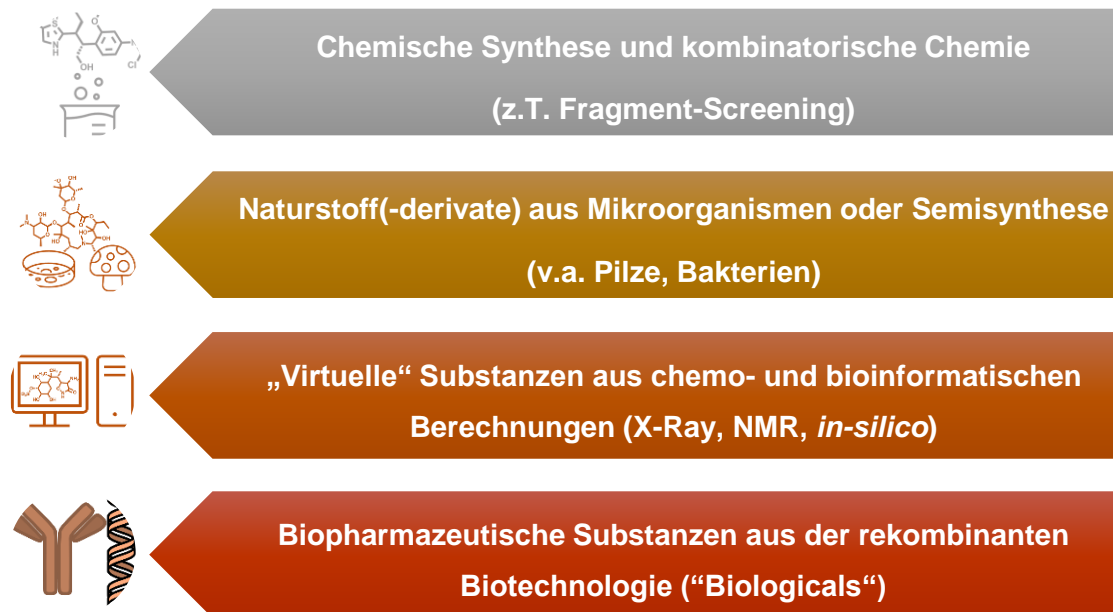


Abbildung 2: Verschiedene Verfahren zur Gewinnung von Screening-Kandidaten.^[27-33]

Im Rahmen des durchgeführten biologisch-pharmazeutischen Screening-Prozesses werden wirksame Substanzen (sogenannte „Hits“) herausgefiltert, die als Leitstrukturkandidaten („Leads“) im fortgeführten Optimierungsprozess weiterentwickelt werden können („Hit-to-Lead optimization“, dt. „Leitstrukturoptimierung“). Zunächst stehen Affinitäts- und Selektivitätsstudien mit dem molekularen Wirkort im Vordergrund sowie parallel eine weitere Verfeinerung der chemischen Struktur der Leitsubstanz.^[31-34] Diese Entwicklung wird fortgeführt durch chemisch-synthetische Molekülstruktur-Modifikationen der besten Wirkstoffkandidaten (sogenannte SAR-Studien). Durch Abänderung der molekularen Strukturen des Wirkstoffes und Aktivitätskorrelation mit dessen molekularem Wirkort werden Versuche unternommen, um die Wirksamkeit zu maximieren. Zusätzlich werden innerhalb der Hit-to-Lead Optimierung *in-silico* Berechnungen mit molekularem Wirkstoff-Docking realisiert.^[35-37] Strukturelle Optimierungen gegenüber der Ausgangsstruktur können beispielsweise erreicht werden durch die Erhöhung des elektrostatischen Wechselwirkungspotentials, eine Verringerung der Rotationsbarriere sowie die Erhöhung der physiologischen Stabilität (s. Abbildung 3).

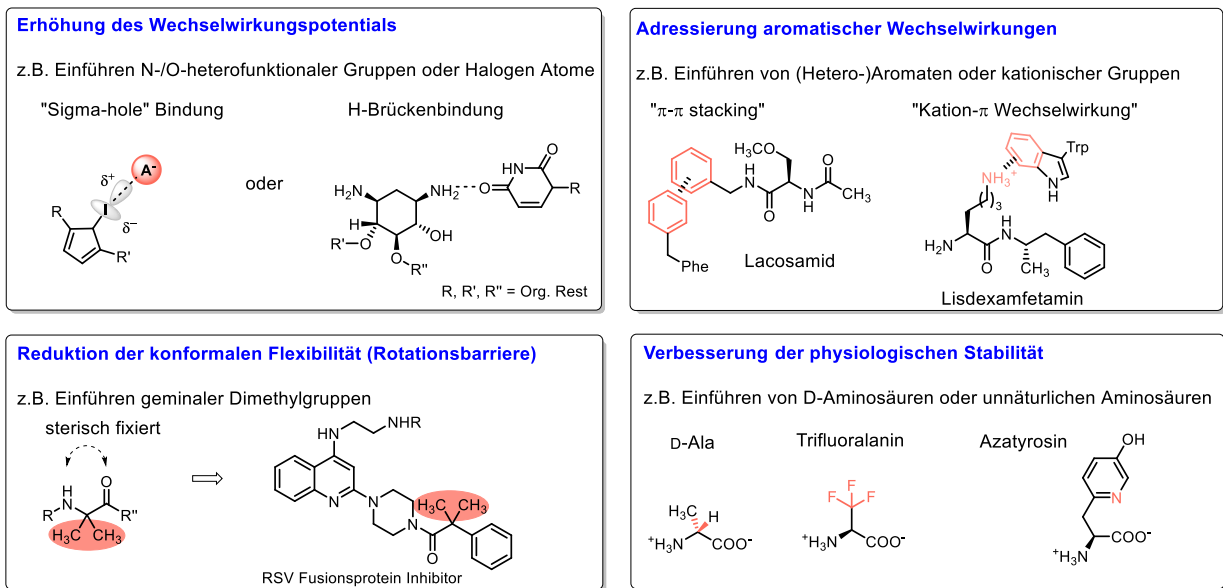


Abbildung 3: Beispiele für medizinal-chemische Modifikationen im Rahmen der Hit-to-Lead Optimierung.^[38-42]

Ansatzpunkte zur Verbesserung der Wirkstofflöslichkeit

Die Löslichkeit als eine zentrale Stoffeigenschaft spielt im Optimierungsprozess eine wichtige Rolle, zu deren Verbesserung verschiedene Wirkstoffsalze hergestellt werden können.^[43] Außerdem kann das Prodrug-Konzept angewendet werden: Dabei wird der Wirkstoff mit einer gut wasserlöslichen Gruppe (z.B. Phosphonat, Carbonat, Ester) konjugiert, die nach Aufnahme in den Organismus enzymatisch oder spontan abgespalten werden kann.^[44-46] Eine grobe Abschätzung zur oralen Verfügbarkeit einer Substanz durch passive Diffusion liefern die von C. Lipinski aufgestellten Regeln („Lipinski's rules“). Diese besagen, dass es hinsichtlich der chemischen Struktur bestimmte Obergrenzen für das molekulare Gewicht, die Lipophilie der Substanz, die Oberflächenpolarität sowie die Summe von Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren für die Verfügbarkeit durch passive Diffusion gibt.^[47-49] Neben der chemischen Strukturoptimierung der Leitsubstanz selbst werden in dieser Phase zusätzlich prozesschemische Scale-up Experimente durchgeführt, um größere Wirkstoffmenge im multi-Kilogramm Maßstab für ein erweitertes Panel an *in-vitro* und später *in-vivo* Studien verfügbar zu machen.^[50]

Vom Labor in die Klinik: Präklinische und klinische Phasen I - III

Im nächsten Entwicklungsschritt, der präklinischen Phase, werden *In-vivo* Studien im Tiermodell durchgeführt, um Informationen hinsichtlich des Verhaltens der Wirksubstanz im lebenden Organismus zu erhalten (s. Abbildung 4). Hierbei rücken vor allem die wichtigen pharmakologischen Parameter wie Absorption, Distribution, Metabolisierung sowie Ausscheidung (Exkretion) in den Fokus (ADME-System). Außerdem wird ein umfassendes Toxizitätsprofil vom Wirkstoff und seinen Abbauprodukten (Metaboliten) im Tierorganismus erstellt. Auch pharmakokinetische Studien wie die Bestimmung der

Halbwertszeit unter Dosiskorrelation stehen in diesem Entwicklungsstadium im Vordergrund. Parallel hierzu muss die Konzeption der späteren Darreichungsform (Wirkstoffformulierungen) vorgenommen werden.^[51]

An die beschriebene präklinische Phase schließen sich die klinische Phasen I bis III an. In der klinischen Phase I erfolgt die Prüfung der Pharmakokinetik (Resorption, Metabolisierung, Ausscheidung), Verträglichkeit und Sicherheit erstmalig an einer begrenzten Anzahl von freiwilligen und gesunden Personen (10-50 Probanden, „First-in-Man“-Studie). Bei Medikamenten mit signifikanter Nebenwirkungserwartung wie z.B. Krebsmedikamenten werden in der klinischen Phase I Probanden mit der entsprechenden Erkrankung herangezogen. Die sich anschließende klinische Phase II dient der Dosisfindung sowie dem Nachweis der Wirksamkeit durch ein physiologisches Signal. Im Regelfall umfasst die Probanden-Kohorte 100 bis 500 Personen.^[52] Die Prüfung der Wirksamkeit wird unter Einbeziehen einer Kontrollgruppe, oft als Doppelblindstudie, realisiert, bei der weder Arzt noch Patient wissen, ob der Wirkstoff oder die Kontrollsubstanz verabreicht werden. In der klinischen Phase III wird die klinische Wirksamkeit und Sicherheit an einer größeren Anzahl von PatientInnen mit der entsprechenden Erkrankung in Doppelblindstudien durchgeführt. Die Patientenzahl erfolgt in Abhängigkeit der Indikation, um die Wirksamkeit und seltene Nebenwirkungen erfassen zu können. Der Behandlungszeitraum orientiert sich an der Erkrankung und dem Krankheitsverlauf und kann u.U. mehrere Jahre bei chronischen Erkrankungen betragen. Phase III-Studien werden multizentrisch und multinational durchgeführt, um die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit an einer möglichst breit diversifizierten Patientengruppe zu verifizieren.^[53] Nach Abschluss der klinischen Phase III kann ein Antrag auf Zulassung bei der zuständigen Zulassungsbehörde (USA = U.S. Food and Drug Administration (FDA), EU = European Medicines Agency (EMA), China = National Medical Products Administration (NMPA)) eingereicht werden. Nach Zulassungserteilung wird das neue Medikament großtechnisch und prozessoptimiert unter Einhaltung der Good manufacturing practice (GMP)-Auflagen hergestellt und entsprechend den Zulassungsrichtlinien vermarktet. Zum weiteren Monitoring der Neuzulassung werden in der klinischen Anwendung nach Markteinführung in einer sogenannten Phase IV fortlaufend Daten bezüglich der therapeutischen Verwendung, sehr selten auftretender Nebenwirkungen sowie auftretender Langzeitfolgen im therapeutischen Einsatz erhoben.^[54]

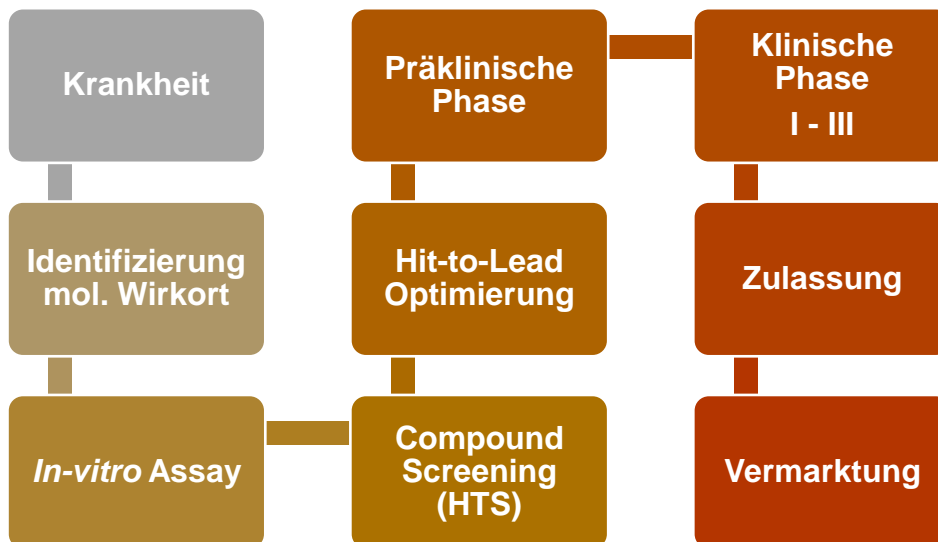


Abbildung 4: Übersicht über den Drug Discovery Prozess eines neuen Wirkstoffs sowie die einzelnen Stufen bis zur Zulassung und Vermarktung des Arzneimittels.

Die Erweiterung des Methodenspektrums in der Antibiotika-Forschung

Um neu angepasste Strategien im Kampf gegen das zunehmende Infektionsgeschehen u.a. mit multiresistenten gramnegativen Problemkeimen erarbeiten zu können, sind alternative Ansätze erforderlich, die die bisher angesetzten Maßstäbe hinter sich lassen und neue Wege der Infektionsbekämpfung aufzeigen („Out-of-Box Thinking“).^[55-57] Innerhalb des Drug Discovery Prozesses für neue Antibiotika kommt dabei dem Screening als Schlüsselschritt eine besondere Rolle zu. Da viele Antibiotika mit ihren chemischen Leitstrukturmotiven von Naturstoffen (z.B. Betalaktame oder Makrolide), die von Bakterien und Pilzen gebildet werden, abgeleitet sind, wird heute das Augenmerk verstärkt auf bis dato nicht kultivierbare Mikroorganismen und deren gebildete Naturstoffe gelegt. Eine Vorreiterrolle spielt dabei das von Slave S. Epstein et al. entwickelte Kultivierungssystem iChip, das es ermöglicht, in einer Diffusionskammer den natürlichen Lebensraum der Mikroorganismen nachzubilden. Die Kultivierung der Bakterien erfolgt dabei zwischen einer atmungsaktiven Membran mit Poren, die groß genug sind, um eine Nährstoffzirkulation aufrecht zu erhalten. Das System ermöglicht in seiner optimierten Variante die Isolierung einzelner Bakterienkolonien im Hochdurchsatzverfahren. Als Beispiel dient das mit diesem Screeningsystem gefundene Antibiotikum Lassomycin (**1**) (Abbildung 5).^[58-60]

Gramnegative Bakterien besitzen eine Zellwand, die aus zwei Membranen (innere- und äußere Membran) aufgebaut ist und eine zusätzliche Barriere für antibiotische Wirkstoffe darstellt. Da der eigentliche Wirkort der meisten Antibiotikaklassen im Inneren des gramnegativen Bakteriums liegt, muss die Permeation über die gramnegative Zellhülle, vor allem auch über die äußere Membran (OM), sichergestellt werden. In den letzten Jahren wurden verstärkt Bemühungen unternommen, für diesen Transportvorgang Regeln anhand der Molekülstruktur bereits etablierter Wirkstoffe abzuleiten, die die Translokation über die gramnegative Zellwand hinweg begünstigen. Als Schlüsselfaktoren, die diesen

Prozess beeinflussen, konnten die Polarität sowie das Molekulargewicht der Wirksubstanz identifiziert werden. Wie unterstützende molekulardynamische Simulationen und Berechnungen zur freien Energie während des Permeationsprozess zeigen, sind primäre Amine förderlich für die Überwindung der äußeren Membran in gramnegativen Bakterien. Als weitere vorteilhafte Merkmale wurden ein amphiphiler Charakter, eine möglichst starre Molekülgeometrie sowie eine geringe kugelhafte Oberflächengestalt herausgearbeitet.^[61-64]

Das Potential von „Hybrid“-Strategien

Eine weitere Möglichkeit den chemischen Strukturraum antimikrobieller Substanzen zu erweitern, stellen sogenannte „Hybrid-Strategien“ dar, bei denen Konjugate aus etablierten Antibiotika und einer Sekundärkomponente hergestellt werden. Im Fall chemisch-synthetischer „trojanischer Pferde“ wird der eigentliche Wirkstoff mit einem Siderophor verknüpft. Siderophore sind kleine organische Moleküle, die vom Bakterium ausgeschieden werden und Chelatkomplexe mit Eisenionen bilden. Der entstandene Eisenkomplex kann vom Bakterium über spezifische Transportsysteme gezielt aufgenommen werden und stellt auf diese Art und Weise den essenziellen Eisenbedarf des Bakteriums sicher. Durch die Kopplung von lebensnotwendiger Eisenaufnahme und antimikrobiellem Wirkstoff wird das Antibiotikum in den Keim eingeschleust und gelangt damit an seinen Wirkort im Inneren des Bakteriums. Ein Beispiel ist das Konjugat **(2)** aus dem Lipopeptid-Antibiotikum Daptomycin und einem Siderophor, verknüpft über einen längeren Linker (Abbildung 5).^[65-69] In eine ähnliche Richtung zielt das „Duale Targeting“, bei dem zwei Antibiotika mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen chemisch ligiert werden, um eine potenzierte Wirksamkeit infolge synergetischer Effekte zu erreichen. Als Beispiel ist das Fluorquinolon-Tetracyclin Hybrid **(3)** in Abbildung 5 dargestellt.^[70,71] Zusätzlich rücken neue molekulare Wirkorte in der inneren und äußeren Membran gramnegativer Keime in den Fokus. So ist Murepavadin **(4)** ein neues peptidomimetisches Antibiotikum, dessen Wirkort das LPS Transport-Protein D (LptD) ist und das damit zur Klasse der Outer Membran Protein Targeting Antibiotics (OMPTA) gehört. Murepavadin **(4)** wirkt durch Inhibition des Transportproteins von Lipopolysaccharid (LPS) in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, was zu induzierten Membranveränderungen führt und schlussendlich das Absterben des Pathogens bewirkt.^[72-75]

Auf der Suche nach neuen antimikrobiellen Naturstoffen wird vermehrt auf bioinformatische- in Kombination mit metabolomischen Ansätzen zurückgegriffen (Metagenomics, -bolomics). Da nicht alle Mikroorganismen unter Laborbedingungen kultivierbar sind oder alle im Genom vorliegenden Naturstoffe im zur Kultivierung eingesetzten Nährmedium vom Mikroorganismus produziert werden, wird mittels Genomsequenzierung und Sequenzalignment nach neuen, bisher nicht identifizierten Naturstoffen gesucht („Genomic Mining“).^[76-78] Beispielsweise werden Sequenzdaten von *Actinomyceten*-Bibliotheken gezielt auf bisher verborgene Gencluster, die Naturstoffe codieren, untersucht, um diese als neue Wirkstoffkandidaten in das Screening einzubinden. Genetisch gesehen, handelt es sich dabei vor allem um die klassische Enzymaschinerie einer nicht-ribosomalen Peptidesynthetase (NRPS) und Polyketidsynthetasen (PKS) sowie Hybriden aus beiden Klassen (PKS-NRPS Hybrid).^[79-81] Zusätzlich können, basierend auf der genetischen Sequenzierung,

Von den in Tabelle 1 aufgelisteten Antibiotika Kandidaten besitzt lediglich jeder fünfte (20%) einen neuen Wirkort und begründet eine neue Antibiotika Substanzklasse (Auswahl in Abbildung 6). Die meisten Kandidaten (80%) sind Abkömmlinge bekannter und etablierter Substanzklassen mit gut charakterisiertem Wirkort. Aufgeschlüsselt nach den einzelnen Antibiotika Klassen ergibt sich folgendes Bild: Die überwiegende Mehrheit der Entwicklungen leitet sich von β -Laktam Antibiotika ($n = 15 \approx 35\%$) ab. Danach folgen mit deutlichem Abstand Quinolon-, Tetracyclin- und Polymyxin-Antibiotika (jeweils $n = 3 \approx 7\%$). Weitere Klassen sind Makrolide und Oxazolidinone (jeweils $n = 2 \approx 4.5\%$) sowie Aminoglycoside und Ansamycine (jeweils $n = 1 \approx 2\%$). Hybridmoleküle, die sich aus zwei unterschiedlichen Antibiotika-Klassen zusammensetzen, nehmen eine untergeordnete Rolle ein ($n = 3 \approx 7\%$). Die verbleibenden Wirkstoffkandidaten ($n = 10 \approx 23\%$) bilden eine strukturell uneinheitliche Untergruppe. Bei den Wirkorten steht das Penicillin-bindende Protein an erster Stelle (PBP, $n = 15 \approx 35\%$). Dem folgen die bakteriellen Ribosomen (30S/50S Untereinheiten) sowie die DNA-Synthesemaschinerie (Gyrase, Topoisomerase und DNA-Polymerase) mit jeweils 9 Wirkstoffkandidaten (21%). Eine untergeordnete Rolle als zellulärer Wirkort spielt die Fettsäurebiosynthese (FabI-Protein) mit 2 Wirkstoffentwicklungen (5%).

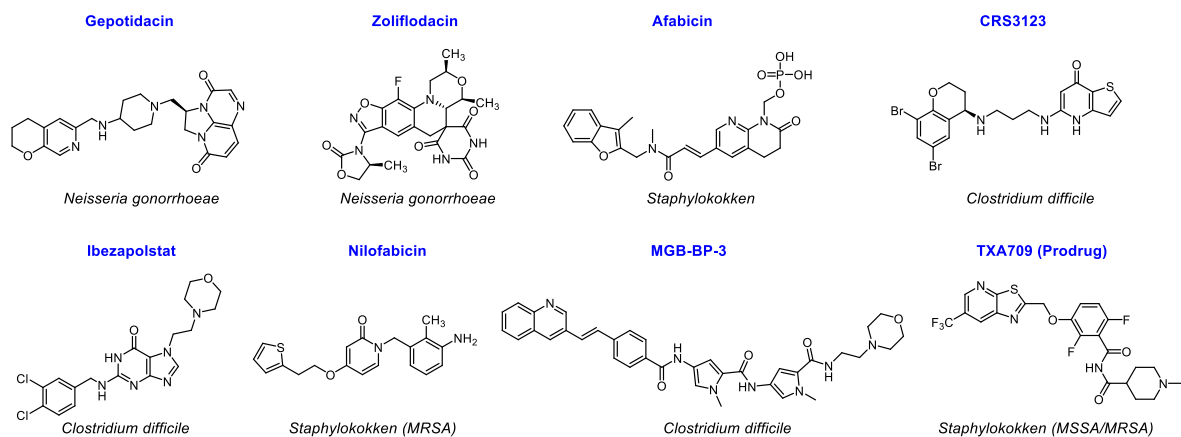


Abbildung 6: Substanzname und -Struktur ausgewählter Antibiotika-Kandidaten mit neuer Leitstruktur und neuem Wirkort zur Behandlung des indizierten Problemkeims (aus Tabelle 1, grau hinterlegt).

Auffällig ist außerdem, dass die Entwicklung neuer Antibiotika heute vornehmlich in der Hand kleiner Unternehmen liegt, wohingegen sich die einst auf diesem Gebiet führenden Pharma-Großkonzerne nahezu vollständig zurückgezogen haben. Angesichts der Unvermeidlichkeit, dass einige dieser Antibiotika-Kandidaten keine Zulassung erhalten werden oder sich im Verlauf Resistenzen etablieren, ist offensichtlich, dass sich insgesamt zu wenige Anwärter in der Antibiotika-Entwicklungspipeline befinden.

Tabelle 1: Kommerzielle Antibiotika-Entwicklungspipeline nach „PEW Charitable Trust“ (Stand: 31.12.2020)^[84]

n = nein; j = ja; Grau: Antibiotika-Kandidaten mit neuer Leitstruktur und neuem Wirkort (Abbildung 6).

Antibiotika Kandidat	Phase	Unternehmen	Substanzklasse	Neue Substanz?	Wirkort	Neuer Wirkort?
Contezolid (MRX1)/ Contezolid Acefosamil (MRX-4)	Neuapplikation (China NMPA)	MicRx Pharmaceuticals Inc.	Oxazolidinon	n	50S Untereinheit	n
Sulopenem/Sulopenem Etzadroxil-probenecid	Neuapplikation (US FDA)	Iterum Therapeutics PLC	β -Laktam (Thiopenem)	n	PBP	n
Benapenem	Phase 3	Sihuan Pharmaceutical Co. Ltd.	Carbapenem	n	PBP	n
Cefepim + Taniborbactam	Phase 3	Venatorx Pharmaceuticals Inc.	β -Laktam (Cephalosporin) + β -Laktamase Inhibitor	n	PBP + β -Laktamase	n
Cefilavancin	Phase 3	R-Pharm	Glykopeptide- β -Laktam (Cephalosporin) Hybrid	n	Peptidoglykan Ligation + PBP	n
EMROK/EMROK O	Phase 3	Wockhardt Ltd.	Fluorquinolon	n	Bakt. Typ II Topoisomerase	n
Exblifep (Cefepim + Enmetazobactam)	Phase 3	Allegra Therapeutics GmbH	β -Laktam (Cephalosporin) + β -Laktamase Inhibitor	n	PBP + β -Laktamase	n
Gepotidacin (GSK2140944)	Phase 3	GlaxoSmithKline PLC	Triazaacenaphthylen	j	Bakt. Typ II Topoisomerase	j
Ridnilazol	Phase 3	Summit Therapeutics Inc.	Bis-benzimidazol	j	Inhibition der Zellteilung und Toxin Produktion	n
Sulbactam + Durlobactam	Phase 3	Entasis Therapeutics Inc.	β -Laktam (Sulbactam) + β - Laktamase Inhibitor	n	PBP + β -Laktamase	n
T-4288 (Solithromycin)	Phase 3	Toyama Chemical Co. Ltd.	Makrolid	n	50S Untereinheit	n
Tebipenem/Tebipenem Pivoxil Hydrobromid	Phase 3	Spero Therapeutics Inc.	β -Laktam (Carbapenem)	n	PBP	n
WCK 5222 (Cefepim + Zidebactam)	Phase 3	Wockhardt Ltd.	β -Laktam (Cephalosporin) + β -Laktamase Inhibitor	n	PBP + β -Laktamase	n
Zevtera (Ceftobiprol)	Phase 3	Basilea Pharmaceutica International Ltd.	β -Laktam (Cephalosporin)	n	PBP	n
Zoliflodacin (ETX0914)	Phase 3	Entasis Therapeutics Inc.	Spiropyrimidinetrion	j	Bakt. Typ II Topoisomerase (GyrB)	j
Afabicin (Debio 1450)	Phase 2	Debiopharm International SA	Benzofuran naphthyridin	j	FabI	j
ARV-1801 (Natrium- Fusidat)	Phase 2	Arreus Inc.	Fusidan	n	Elongationsfaktor G	n
BOS-228	Phase 2	Boston Pharmaceuticals Inc. Innovation Pharmaceuticals Inc.	β -Laktam (Monobactam)	n	PBP	n
Brilacidin	Phase 2		Defensin Mimetika	j	Zellmembran	n
CRS3123	Phase 2	Crestone Inc.	Diaryldiamin	j	Methionyl-tRNA Synthetase	j
Delpazolid (LCB01-0371)	Phase 2	LegoChem Biosciences Inc./Nawei Biotechnology	Oxazolidinon	n	50S Untereinheit	n
DNV3837/DNV3681	Phase 2	Deinove SA	Oxazolidinon-quinolon Hybrid	n	50S Untereinheit + Bakt. Typ II Topoisomerase	n
Finafloxacin	Phase 2	MerLion Pharmaceuticals GmbH	Fluorquinolon	n	Bakt. Typ II Topoisomerase	n
Ibezapolstat	Phase 2	Acurx Pharmaceuticals LLC	DCBG ([dichlorobenzyl] guanin)	j	DNA Pol IIIC <i>Clostridium difficile</i>	j
MGB-BP-3	Phase 2	MGB Biopharma Ltd.	Distamycin	j	DNA kl. Furche	j
Nafithromycin (WCK 4873)	Phase 2	Wockhardt Ltd.	Makrolid	n	50S Untereinheit	n
Taigexyn (Nemonoxacin)	Phase 2	TaiGen Biotechnology Co.	Quinolon	n	Bakt. Typ II Topoisomerase RNA Polymerase, DNA Gyrase, DNA Topoisomerase IV	n
TNP-2092	Phase 2	TenNor Therapeutics Ltd.	Rifamycin-quinolon Hybrid	n	30S Untereinheit	n
Apramycin (EBL-1003)	Phase 1	Juvis AG	Aminoglykosid	n	DNA-abhängige RNA Polymerase	n
BV100	Phase 1	BioVersys AG	Ansamycin	n		n
Nilofabacin (CG-549)	Phase 1	CrystalGenomics Inc.	Benzyl-pyridinon	j	FabI	j
ETX0282CPDP/ ETX1317	Phase 1	Entasis Therapeutics Inc.	β -Laktam (Cephalosporin) + β -Laktamase Inhibitor	n	PBP + β -Laktamase	n
Imipenem/Cilastatin + XNW4107	Phase 1	Suzhou Sinovent Pharmaceutical Tech. Co. Ltd.	β -Laktam + β -Laktamase Inhibitor	n	PBP + β -Laktamase	n
KBP-7072	Phase 1	KBP BioSciences Pharmaceutical Tech. Ltd.	Tetrazyklin	n	30S Untereinheit	n
MRX-8	Phase 1	MicRx Pharmaceuticals Inc.	Polymyxin	n	Äußere Membran	n
Nacubactam (OP0595)	Phase 1	Meiji Seika Pharma Co. Ltd.	β -Laktam + β -Laktamase Inhibitor	n	PBP + β -Laktamase/ PBP2	n
OMNivance (QPX7728)	Phase 1	Qpex Biopharma	β -Laktam + β -Laktamase Inhibitor	n	PBP + β -Laktamase	n
SPR206	Phase 1	Spero Therapeutics Inc./Everest Medicines	Polymyxin	n	Äußere Membran	n
SPR741	Phase 1	Northern Antibiotics	Polymyxin	n	Äußere Membran	n
TP-271	Phase 1	La Jolla Pharmaceutical Comp.	Tetrazyklin	n	30S Untereinheit	n
TP-6076	Phase 1	La Jolla Pharmaceutical Comp.	Tetrazyklin	n	30S Untereinheit	n
TXA709/TXA707	Phase 1	Taxis Pharmaceuticals Inc.	Benzamid	j	FtsZ	j
VNRX-7145 + Ceftibuten	Phase 1	Venatorx Pharmaceuticals Inc.	β -Laktam (Cephalosporin) + β -Laktamase Inhibitor	n	PBP + β -Laktamase	n

2) Das Cyclopeptid Lugdunin (6) - Synthese, Struktur-Wirkungsbeziehungen und molekularer Wirkungsmechanismus

2.1 Einleitung zum Lugdunin-Cyclopeptid (6)

Mögliche Einsatzgebiete von therapeutischen Peptiden

Therapeutische Peptide werden aktuell innerhalb eines bedeutenden klinischen Behandlungsspektrums eingesetzt. Eine Indikationsübersicht mit funktionalem Peptidwirkstoff ist in Tabelle 2 dargestellt. Die Wirkstoffanaloge haben ihren Ursprung als Abkömmlinge human-physiologischer Funktionspeptide oder entstammen dem chemischen Raum der von Mikroorganismen produzierten Naturstoffe.^[1-2]

Therapeutische Peptide finden bei einem breiten Spektrum an Krankheitsbildern wie z.B. als Antiinfektiva, bei metabolischen- und endokrinologischen Erkrankungen sowie in der Krebstherapie Anwendung in der modernen Medizin. Seit dem ersten eingesetzten therapeutischen Peptid im Jahr 1921 (Insulin) erfolgten bis zum Jahr 2022 insgesamt ca. 80 Zulassungen in dieser Substanzklasse, die Hälfte zwischen 1950 und 1990. Insgesamt sind im Jahr 2022 ~170 therapeutische Peptide in der direkten klinischen Entwicklung.^[3-4]

Tabelle 2: Ausgewählte therapeutische Peptide mit Indikation, peptidischem Wirkstoff und Molekülmasse. Bis 10.000 Da werden Aminosäureoligomere als Polypeptide (Peptide) bezeichnet, darüber Proteine.^[5]

Indikation	Peptid Name (Wirkstoff)	M _r [Da]
Immunsuppressiva	Cyclosporin	1202
Antibiotika	Daptomycin, Nisin, Polymyxin	1621, 3368, 1155
Diabetes mellitus	Insulin, GLP-1, GLP-2, Liraglutid	5800, 3298, 3751
Wachstumshormone	Human Growth Hormon (Somatotropin Analoga: Octreotid, Lanreotid)	1019, 1096
Zytostatika	Mifamurtid, Abarelix	1237, 1416
Geburtseinleitung	Oxytocin	1007
Septischer Schock	Vasopressin, Angiotensin II	1084, 1046
HIV-Behandlung	Fusionsinhibitor (Enfuvirtid)	4492
Chronische Schmerzen	Ziconotid	2639
Sexualhormon Regulation	Gonadotropin-releasing hormon (GnRH), Leuprorelin, Goserelin	1209, 1269
Osteoporose	Teriparatid, Abaloparatid	4117, 3959

Therapeutische Peptide zeichnen sich unter pharmakologischen Gesichtspunkten durch ihr hohes Maß an physiologischer Toleranz und Sicherheit aus. Des Weiteren weisen sie eine hohe Selektivität in ihrer Wirksamkeit auf. Ihr Abbaumechanismus ist eindeutig und ihr zeitlicher Wirksamkeitsverlust ist gering. Dem stehen mögliche Schwächen wie eine erhöhte chemische und physikalische Instabilität (u.a. durch Hydrolyse und Oxidation), die Tendenz zur Aggregation, kurze Plasmahalbwertszeiten und verfrühte Elimination sowie eine verminderte orale Verfügbarkeit gegenüber.^[6]

Die Biosynthese von Proteinen und Peptiden bei Pro- und Eukaryoten

In eukaryotischen und prokaryotischen Organismen erfolgt die Protein- bzw. Peptidbiosynthese an den Ribosomen. Im Rahmen der ribosomalen Proteinelongation wird das wachsende Aminosäureoligomer an den E-P-A Stellen der ribosomalen Untereinheit aufgebaut. Die Aminosäuresequenz des Proteins wird dabei durch die mRNA-Sequenz determiniert. Mittels Basenpaarung zwischen mRNA und Aminosäure-beladener tRNA (Aminoacyl-tRNA) im Bereich der Anticodonschleife wird die korrekte Sequenzerstellung gesichert. Die Ausbildung der Amidbindung erfolgt durch nucleophilen Angriff der tRNA-gebundenen Aminosäure auf den C-terminalen Aktivester der wachsenden Peptidkette.^[7]

Nicht-ribosomale Peptidsynthese (NRPS), ribosomal-synthetisierte und post-translational modifizierte Peptide (RiPPs) und rekombinante Expression von Proteinen

Neben der klassischen ribosomalen Peptidsynthese steht manchen Organismen die Nicht-ribosomale Peptidsynthese (NRPS), die hauptsächlich zur Synthese komplexer Peptide genutzt wird, zur Verfügung. Enzymatische NRPS-Systeme besitzen neben der regulären Funktionalität zum Aufbau von Peptidbindungen zumeist weitere enzymatische Instrumente zur Strukturmodifikation. Dabei handelt es sich u.a. um den Einbau von nicht-proteinogenen Aminosäuren in die Sequenz oder die Herstellung von D-Aminosäuren durch Epimerase-Aktivität. Weitere Prozessierungsmöglichkeiten (Post-NRPS Modifikationen) stellen u.a. Heterozyklisierungsreaktionen, Makrozyklisierungen, Methylierungen, C-C-Bindungsknüpfungen, Hydroxylierungen, Epoxydierungen, Halogenierungen und Glykosylierungen dar. Strukturell sind Nicht-ribosomale Peptid-Synthetasen aus einzelnen enzymatischen Domänen aufgebaut, die hintereinandergeschaltet die Synthese von Peptiden ermöglichen (modularer Aufbau). Die bedeutendsten Module stellen Adenylierungs-Domänen (A-Domäne) zur Aminosäureaktivierung, Thiolierungs-Domänen (T-Domäne) zur Ausbildung des enzymgebundenen Aktivesters und Kondensationsdomänen (C-Domäne) zur Synthese der Peptidbindung dar.^[8-10]

Demgegenüber stellen ribosomal-synthetisierte und post-translational modifizierte Peptide (RiPPs) eine eigene, diverse Klasse an Peptiden dar, bei denen das Polypeptid einen ribosomalen Ursprung besitzt (unmodified core peptide, UCP) und über unabhängige, post-translational modifizierende Enzyme biosynthetisch weiterprozessiert wird (modified core peptide, MCP). Dem modifizierten Peptid werden häufig, bevor das reife (mature) RiPP aus dem Organismus ausgeschleust werden kann, Signal- und Erkennungssequenzen proteolytisch entfernt.^[11]

Die Herstellung größerer Peptide und Proteine wird molekularbiologisch, unter Verwendung geeignet rekombinanter Methoden, realisiert. Das Zielprotein wird dabei von einem genetisch veränderten Wirtsorganismus hergestellt (z.B. Bakterium, Zellkultur) und im sich anschließenden Downstream-Prozess aufgereinigt und isoliert.^[12]

Chemische Peptidsynthese mittels Fest- und Flüssigphasen-Peptidsynthese (SPPS, LPPS)

Für die chemische Synthese von Peptiden und kleinen Proteinen steht die Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) und die Flüssigphasen-Peptidsynthese (LPPS) zur Verfügung (s. Abb. 7A).

Die Methodik der Festphasen-Peptidsynthese wurde von R. B. Merrifield entwickelt, der dafür 1984 den Nobelpreis für Chemie erhielt. Grundlage für die Reaktionsführung ist ein quellfähiges Polymerharz, auf dessen Oberfläche die einzelnen Reaktionsschritte durchgeführt werden. Die initiale, *N*-terminal geschützte Aminosäure wird dabei im einleitenden Schritt, zumeist durch nucleophile Substitution, kovalent auf der Polymeroberfläche immobilisiert. Die anschließende Peptidpropagierung kann in wiederkehrenden Reaktions- und Waschzyklen realisiert werden (Abbildung 7 A). Diese bestehen aus

- A) Abspaltung der *N*-terminalen Schutzgruppe (standardmäßig Fmoc- oder Boc-Schutzgruppe).
- B) Auswaschen der Beiprodukte mit organischen Lösungsmitteln.
- C) Anknüpfung der neuen, *N*-terminal geschützten Aminosäure mittels C-terminalem Aktivierungsreagenz (Kupplungsreagenz) und Racemisierungssuppressor. Als Kupplungsreagenzien werden heutzutage hauptsächlich Vertreter der Klassen Carbodiimide, Anhydride, Acylazole, Säurehalogenide sowie Phosphonium- und Uronium-Salze eingesetzt. Als Racemisierungssuppressoren kommen bevorzugt HOBt und Oxyma Pure zum Einsatz.
- D) Auswaschen der Beiprodukte mit organischen Lösungsmitteln.^[13-20]

Mögliche Schwachstellen dieser Methode sind der hohe Lösungsmittelverbrauch, der hohe und damit kostenintensive Überschuss an Kupplungsreagenzien, auftretende Fehlsequenzen, Racemisierung der Aminosäuren, lange Kopplungszeiten, indirektes Reaktionsmonitoring und Nichtlinearität bei Vergrößerung des Reaktionsansatzes (Scale-up).

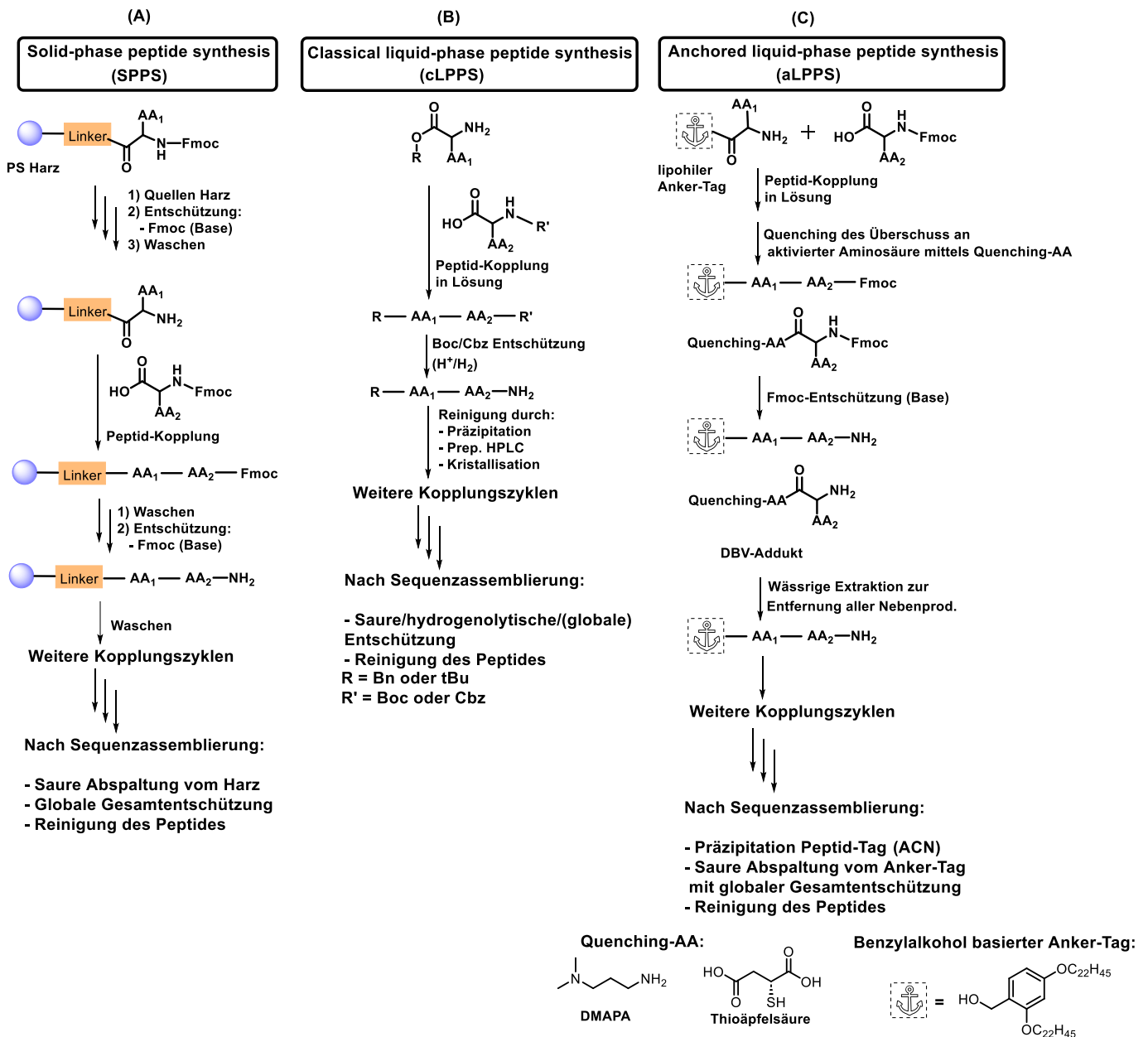


Abbildung 7: Methoden der Fest- und Flüssigphasen-Peptidsynthese. (A) Fmoc-SPPS auf einem Polystyrol (PS) Harz mit Spacer-Linker. (B) Varianten der klassischen Flüssigphasen-Peptidsynthese (cLPPS) unter Amidierung in Lösung. (C) Neuere Peptidsynthesetechnik mittels lyophilem Anker-Tag mit wässrigen Extraktionszyklen zur Beseitigung von Nebenprodukten und Reagenzien (aLPPS). DBV = Dibenzofulvalen.

Bei der klassischen Flüssigphasen-Peptidsynthese (cLPPS) werden die C- oder N-terminal geschützten Aminosäuren in Lösung verknüpft (Abbildung 7 B). Die eingesetzten Schutzgruppen sind häufig eine orthogonale Kombination aus säure- und wasserstofflabilen Gruppen (Bn/Boc oder tBu/Cbz). Die Reaktion verläuft dabei schnell, kontrolliert und in guten Ausbeuten ab. Die Ansätze sind leicht zu vergrößern. Nachteilig erweist sich, dass nach jeder Kopplung ein oder mehrere Aufreinigungsschritte durchgeführt werden müssen, die präzipitativ oder chromatographisch vorgenommen werden können.^[21-23]

Neuere LPPS-Methoden mit C-terminalem „Anker-Tag“

Zur Eliminierung der zuvor beschriebenen Nachteile wurden Verfahren entwickelt, bei denen das wachsende Peptid über alle Synthesestufen hinweg durch eine lipophile, C-terminale Schutzgruppe in der organischen Phase gehalten wird („Anker-Tag“, Abbildung 7 C). Die wichtigsten Verfahren in diesem Gebiet sind:

- Diosynth Rapid Solution Synthesis of Peptides (DioRaSSP[®], Niederlande), Ethylacetat-Phase^[24-28]
- Ajiphase[®] (Ajinomoto-Bio-Pharma Services, Japan), Fluoren- und Diphenylmethan-basierte Anker-Tags^[29-32]
- Molecular Hiving[®] (Jitsubo, Japan); Benzylalkohol-basierter Anker-Tags^[33-40]

Dabei können alle auftretenden Nebenprodukte und eingesetzten Reagenzien mittels wässriger Extraktionen vollständig aus jeder Synthesestufe entfernt werden. Analog zur SPPS wird eine Fmoc-basierte Schutzgruppenstrategie gewählt. Der Aktivester der im Überschuss zugesetzten, aktivierten Aminosäure muss mit einer Hilfsaminosäure, die polare Gruppen besitzt (z.B. DMAPA oder Thioäpfelsäure), abgefangen werden, um Fehlsequenzen und Nebenreaktionen auszuschließen (siehe zusätzlich Kapitel 2.6). Die Fmoc-Entschützung erfolgt ebenso wie die C-terminale Abspaltung des Anker-Tags in Analogie zur SPPS mittels Base bzw. starker Säure. Das gebildete Nebenprodukt der Fmoc-Entschützung (Dibenzofulvalen-Addukt) kann im nachfolgenden wässrigen Extraktionsschritt ohne chromatographische Prozessierung vollständig aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden. Als generelle Nachteile sind die Abnahme der Löslichkeit bis hin zur Präzipitation des Peptids in der organischen Phase mit steigender Aminosäureanzahl (>20-30 Aminosäuren) und eine mögliche Verschlechterung der Phasentrennung anzusehen.^[41-42]

Lugdunin (6) als Stellvertreter der Cyclopeptid-Klasse

Cyclopeptide zeichnen sich gegenüber linearen Peptiden durch ein einzigartiges pharmakokinetisches Profil aus. Im Rahmen der Zyklisierungen wird die Ladung an N- und C-Terminus eliminiert, so dass die Permeation über biologische Membranen hinweg begünstigt wird. Ebenso verbessert sich durch Zyklisierung die metabolische Stabilität der Peptide, da metabolische Proteaseaktivität erschwert ausgeübt werden kann. Ferner kommt es infolge der Zyklisierung zu einer Einschränkung der Freiheitsgrade möglicher einnehmbarer Konformationen.^[43]

Lugdunin (6) ist ein relativ hydrophobes Cyclopeptid, das aus *Staphylococcus lugdunensis* isoliert und 2016 veröffentlicht wurde (Abbildung 8). *S. lugdunensis* ist ein ubiquitärer bakterieller Siedler auf der humanen Hautflora. Die Entdeckung von (6) gelang innerhalb eines Screenings nasaler Isolate von *S. lugdunensis*. Dabei fiel Stamm *S. lugdunensis* IVK28 auf, der in hohem Maß das Wachstum von *S. aureus* USA300 hemmt. Nach Substanzisolierung zeigt (6) signifikante antibiotische Aktivität im niederen einstelligen mikromolaren Bereich gegen grampositive Keime ($1.9 \mu\text{M} \approx 1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$), bevorzugt *S. aureus* USA300 (MRSA), jedoch nicht gegen gramnegative Pathogene. Die chemische Struktur enthält einen Thiazolidin-Heterozyklus (hervorgehoben in Abbildung 8 A) sowie eine

alternierende D/L-Stereokonfiguration (Abbildung 8 B). Die Biosynthese von **(6)** wird von einer Nicht-ribosomalen Peptid-Synthetase (NRPS) katalysiert, an deren Ende unter reduktiver Freisetzung des Peptidylaldehyds und anschließender spontaner Zyklisierung der aktive Naturstoff gebildet wird (Abbildung 8 C).^[44]

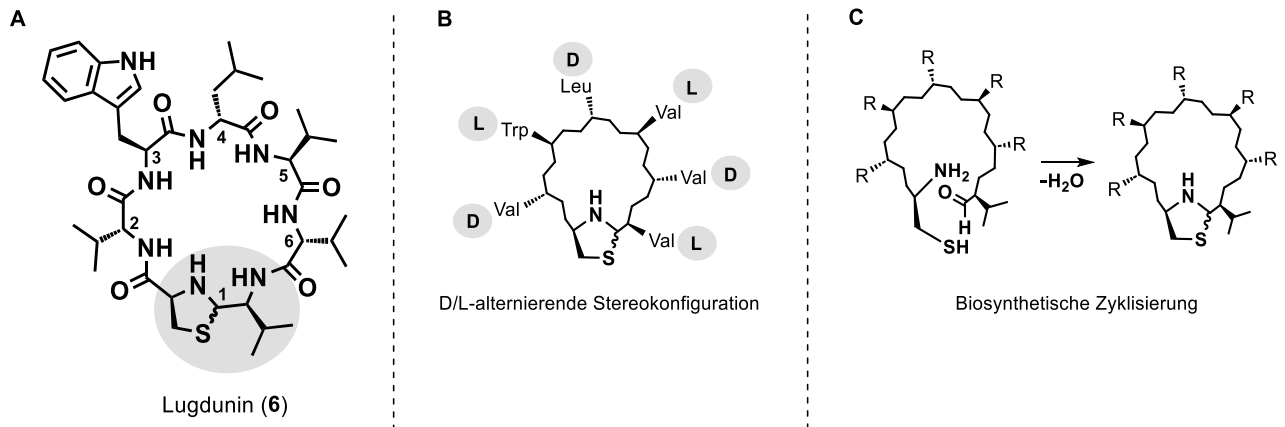


Abbildung 8: (A) Chemische Struktur des Cyclopeptid-Antibiotikums Lugdunin **(6)**. Die Lugdunin-Sequenz besteht im Uhrzeigersinn, ausgehend vom hervorgehoben 2-Amino-3-Methylpropyl-substituierten Thiazolidin-Heterozyklus, aus den Aminosäuren D-Valin, L-Tryptophan, D-Leucin sowie L- und D-Valin. Es liegt ein alternierende Stereokonfiguration vor (B). Die biosynthetische Zyklisierung erfolgt durch Kondensation von L-Cystein mit dem entsprechenden, von L-Valin abgeleiteten, Aldehyd (C).

2.2 Synthese, Struktur-Wirkungsbeziehungen sowie Evaluation des molekularen Wirkungsmechanismus von (6) – *Angewandte Chemie*

Titel:

“Synthetic Lugdunin Analogues Reveal Essential Structural Motifs for Antimicrobial Action and Proton Translocation Capability”

Autoren:

N. A. Schilling, A. Berscheid, J. Schumacher, **J. S. Saur**, M. C. Konnerth, S. N. Wirtz, J. M. Beltrán-Beleña, A. Zipperer, B. Krismer, A. Peschel, H. Kalbacher, H. Brötz-Oesterhelt, C. Steinem, S. Grond.

Journal:

Angew. Chem. Int. Ed. **2019**, *58*, 9234–9238.

Digital Object Identifier:

DOI: 10.1002/anie.201901589.

Keywords:

Aldehyd-basierte Peptidsynthese • Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* • Protonen Translokation • Synthetische Membranvesikel • Thiazolidin-Antibiotika

Zusammenfassung:

Die ausgearbeitete Publikation beinhaltet eine umfangreiche Struktur-Wirkungs-Beziehungsstudie (engl. SAR) zur antibiotischen Wirksamkeit des Lugdunin-Cyclopeptids. Die benötigten Derivate wurden mittels Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) an einem Aldehyd-freisetzenden Spezialharz hergestellt und die antibiotische Aktivität im Bioassay gegen den Methicillin-resistenten Keim *S. aureus* (USA300) bestimmt. Mein Beitrag zur Studie war die Synthese, massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Auswertung der Derivate D-Trp⁶-Lugdunin (**6b**) und D-Pra²-D-Trp⁶-Lugdunin (**6c**) sowie Beiträge zur Publikation in Text- und Abbildungsform.

Im Rahmen der SAR-Studie wurde im ersten Schritt ein Alanin-Scan durchgeführt, bei dem die einzelnen Aminosäuren im Lugdunin systematisch durch die neutrale Aminosäure Alanin substituiert wurden. Dabei wurde festgestellt, dass sowohl die Thiazolidin-Untereinheit als auch die Aminosäuren L-Tryptophan und D-Leucin essenziell für die Aufrechterhaltung der antibiotischen Aktivität sind. Durch Methylierung und Acetylierung des sekundären Amins im Thiazolidin-Ring konnte gezeigt werden, dass dessen NH-Proton ebenfalls essenzielle Bedeutung für die Aktivität zugerechnet werden muss. In einer weiteren Substitutionsrunde wurde ein Stereo-Scan durchgeführt, bei dem jede einzelne Aminosäure der Lugdunin-Sequenz durch die entsprechenden enantiomeren Aminosäuren ersetzt wurden. Dabei führt die auf diese Weise erreichte Inversion der stereogenen Zentren in allen Fällen zu einem Aktivitätsverlust, was die Unabdingbarkeit der Einhaltung der Stereochemie untermauert. Dem

gegenüber zeigte das Enantiomer von Lugdunin (**6a**) dieselbe antibiotische Aktivität wie die Muttersubstanz Lugdunin. Dieser Umstand deutet auf einen nicht stereospezifischen, nicht Rezeptor-Liganden vermittelten Wirkungsmechanismus hin. Eine zweifache Aktivitätssteigerung konnte durch Substitution von D-Valin durch D-Tryptophan auf der Ostseite des Moleküls erreicht werden.

Untersuchungen zum molekularen Wirkungsmechanismus von (**6**) wurden an synthetischen Membranvesikeln mittels Fluoreszenzfarbstoff durchgeführt. Diese zeigten, dass Lugdunin selbst nicht die Membran destabilisiert, sondern Ionen über die Membran hinweg transloziert. Dabei werden von Lugdunin neben anderen Kationen hauptsächlich Protonen über die vesikuläre Membran transportiert (Protonophor). Dadurch wird, übertragen auf den Bakterienorganismus, eine Vitalitätsminderung durch Membrandepolarisation erreicht, wobei die Thiazolidin-Untereinheit als Protonenakzeptor fungiert.

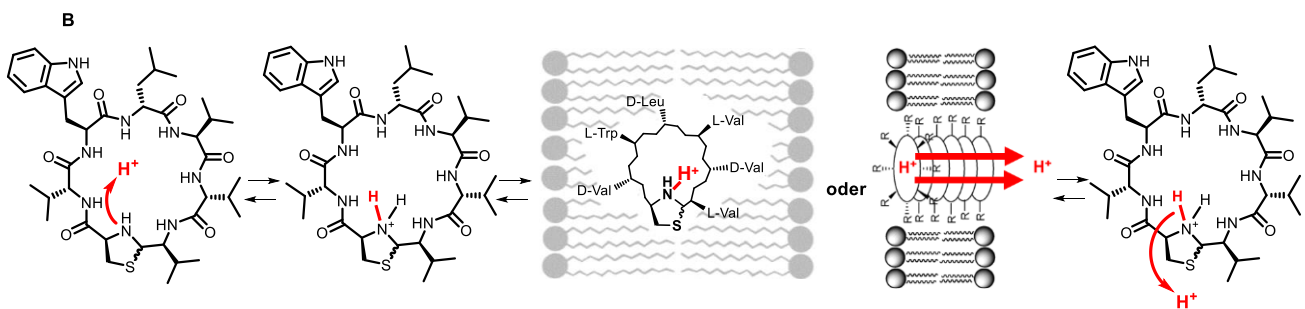
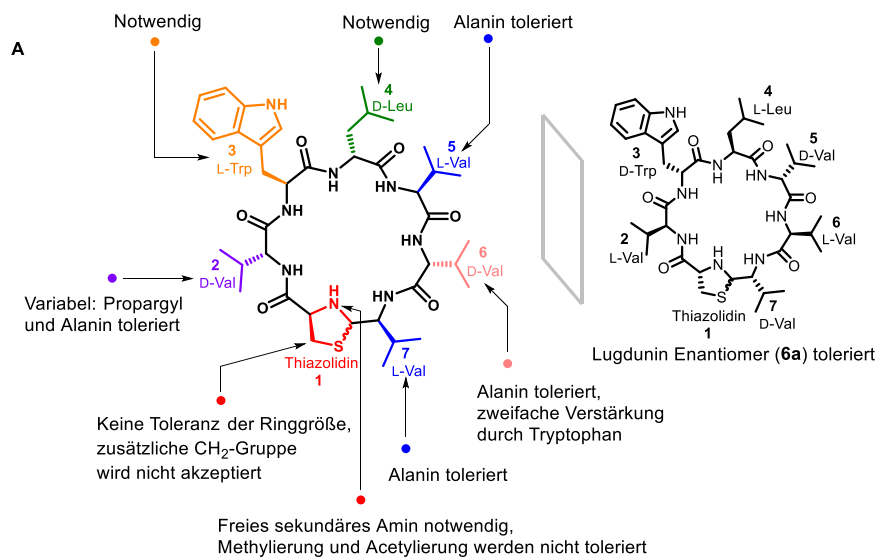


Abbildung 9: (A) Zusammenfassung der in der Publikation ausgearbeiteten Struktur-Wirkungsbeziehungen im Lugdunin Molekül. (B) Spekulativer molekularer Wirkungsmechanismus von Lugdunin: Der Protonentransport könnte entweder durch single Carrier-Aktivität oder molekular-transmembrane Stapelung erfolgen.

2.3 Sekretion und Eigenresistenzentwicklung von (6) durch spezifische ABC-Reporter – *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*

Titel:

“Secretion of and Self-Resistance to the Novel Fibuopeptide Antimicrobial Lugdunin by Distinct ABC Transporters in *Staphylococcus lugdunensis*”

Autoren:

S. Krauss, A. Zipperer, S. N. Wirtz, **J. S. Saur**, M. C. Konnerth, S. Heilbronner, B. O. Torres Salazar, S. Grond, B. Krismer, A. Peschel.

Journal:

Antimicrob Agents Chemother **2021**, 65:e01734–20.

Digital Object Identifier:

DOI: 10.1128/AAC.01734-20.

Keywords:

ABC-Transporter • *Staphylococcus aureus* (MRSA) • Bakterielle Resistenzmechanismen • Antimikrobielle Naturstoffe

Zusammenfassung:

Die erstellte Studie adressiert die Freisetzung von (6) aus dem Produzentenorganismus *S. lugdunensis* sowie dessen Eigenresistenzmechanismus gegenüber dem antimikrobiellen Peptid. Mein Beitrag zur Studie war die Synthese, massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Auswertung von Lugdunin (6) und dem Derivat D-Trp⁶-Lugdunin (6b) sowie die Abbildung der Daten in der Publikation. Das Lugdunin-Gencluster enthält 13 Gene, deren Genprodukte sich in die Untergruppen Transporter, Regulatoren, NRPS Enzyme und modifizierende Enzyme unterteilen lassen. Die Gene der ABC-Transporter des Lugdunin-Operons (LugEFGH) wurden für die Sekretion von Lugdunin (6) und die Eigenresistenzentwicklung in Betracht gezogen und innerhalb der vorliegenden Studie untersucht. Hierfür wurden verschiedene Kombinationen an Deletionsmutanten der Transportergene LugEFGH im Lugdunin-Gencluster erstellt und auf antibiotische Aktivität gegen *S. aureus* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die im Lugdunin-Gencluster codierten ABC-Transporterproteine LugEFGH den Lugdunin-Transport und die Eigenresistenz vermitteln. Hinsichtlich der Funktion überlappen sich LugEF und LugGH beim Lugdunin-Export und der Eigenresistenzentwicklung. Hervorzuheben ist die dominante Rolle von LugGH bei der Eigenresistenzentwicklung, die durch LugI verstärkt wird. Die ABC-Reporter vermittelte Eigenresistenz weist eine hohe Spezifität für Lugdunin auf. Dem gegenüber ist LugEF hauptsächlich für die Lugdunin-Freisetzung verantwortlich, wobei es vermutlich Lugdunin im Cytoplasma nach dessen NRPS-Synthese aufnimmt und nach außen transportiert. LugEF wirkt eigenresistenzfördernd, indem es überschüssiges Lugdunin aus dem Zytoplasma ausschleusend

eliminiert. Die konkrete Rolle von Lugal im Prozess der Lugdunin-Sekretion und Eigenresistenzentwicklung bleibt unklar, allerdings kann davon ausgegangen werden, dass die Funktion von Lugal nur im Zusammenspiel mit LugalEF und LugalGH möglich ist. Gegenüber chemisch abgewandelten Lugdunin-Analoga sind die ABC-Transporter LugalEFGH von *S. lugdunensis* äußerst selektiv. Alle vier intakten Genprodukte von LugalEFGH werden für eine vollständige Lugdunin-Resistenz benötigt.

2.4 Neue Festphasen-Peptidsyntheseroute (SPPS) sowie Struktur-Wirkungs-Beziehungen von (6) – *Journal of Medicinal Chemistry*

Titel:

“Distinct Lugdunins from a New Efficient Synthesis and Broad Exploitation of Its MRSA-Antimicrobial Structure”

Autoren:

J. S. Saur, S. N. Wirtz, N. A. Schilling, B. Krismer, A. Peschel, S. Grond.

Journal:

Journal of Medicinal Chemistry **2021**, 64 (7), 4034–4058.

Digital Object Identifier:

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c02170.

Keywords:

Lugdunin • Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* • Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) • Cyclopeptide • Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR) • Thiazolidin • Unnatürliche Aminosäuren

Zusammenfassung:

Die Publikation umfasst eine neu ausgearbeitete Syntheseroute des antibiotisch wirksamen Cyclopeptides Lugdunin (6) mit umfangreicher Struktur-Wirkungs-Beziehungsstudie. Mein Anteil an der vorliegenden Studie umfasst die theoretische und praktische Koordination und Konzeption, die selbstständige Ausarbeitung der neuen Syntheseroute von (6), die Anwendung der neuen Syntheseroute zur Herstellung von 35 der 50 Wirkstoffanaloge sowie das Verfassen der Publikation.

Die hier erstmals etablierte Syntheseroute beinhaltet den in drei Stufen vorab hergestellten Thiazolidin-Baustein, der in die standardisierte Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) eingebracht wird. Nach vollständiger Assemblierung der linearen Aminosäure-Sequenz auf dem Polymerharz und Abspaltung des linearen Peptids wird dieses mittels Makroamidierung in stark verdünnter Lösung zum Produkt zyklisiert. Das Cyclopeptid wird im Multimilligramm-Upscale (3 bis 12 mg) in Ausbeuten zwischen 30-70% in einer Reinheit von 70-95% ohne chromatographische Aufreinigung erhalten. Die groß angelegte Struktur-Wirkungs-Beziehungsstudie mit 50 Lugdunin-Analoga konzentriert sich vornehmlich auf die Aminosäuren D-Val², L-Trp³, D-Leu⁴ und D-Val⁶ (s. Abb. 10). Für aliphatische und aromatische Aminosäuren wurden Analoga mit geringen Polaritäts- und Strukturunterschieden relativ zur Ursprungssubstanz konstruiert, um das strukturelle Abtasten der Aktivität möglichst präzise zu gestalten. Dabei zielen die einzelnen Modifikationen vornehmlich auf das aliphatische Verzweigungsmuster (z.B. D-Tle²- oder D-Ile²-Lugdunin), den Sättigungsgrad in der Reihe Propyl, Allyl, Propargyl an Position zwei, die aromatische Ringgröße an Position drei (5-Ringe und 6-Ringe), den Annelierungsgrad an Position drei (Naphthyl/Bi-/Diphenyl und Anthracenyl) und die Halogenierung

einzelner Atome (z.B. L-Phe(4-chloro)³-Lugdunin) ab. Es wurde festgestellt, dass die Toleranz gegenüber strukturellen Variationen, wie die Änderung der Alkylkettenverzweigung und -länge, gering ist und zu deutlichen Aktivitätsverlusten führt. Die Einführung von polaren Gruppen zur Löslichkeitssteigerung bewirkt einen vollständigen Aktivitätsverlust. So ist beispielsweise das Einfügen von H-Brücken-bildenden Gruppen wie beispielsweise Hydroxy- oder Aminogruppen nicht ohne sehr starken oder totalen Aktivitätsverlust möglich (z.B. L-DOPA³, L-Tyr³, L-His³-Lugdunin). Mehrfachsubstitutionen, die bei Monosubstitution eine Verbesserung der Aktivität auslösen, führen in Summe nicht zu einer potenzierten, synergistischen Aktivitätsteigerung (D-*allo*-Ile²-L-Ala(9-anth)³-D-Trp⁶-Lugdunin). Dem gegenüber erreicht das *retro*-sequenziell angeordnete Lugdunin eine an den Naturstoff heranreichende Aktivität (L-Val³-D-Val⁴-L-Leu⁵-D-Trp⁶-Lugdunin).

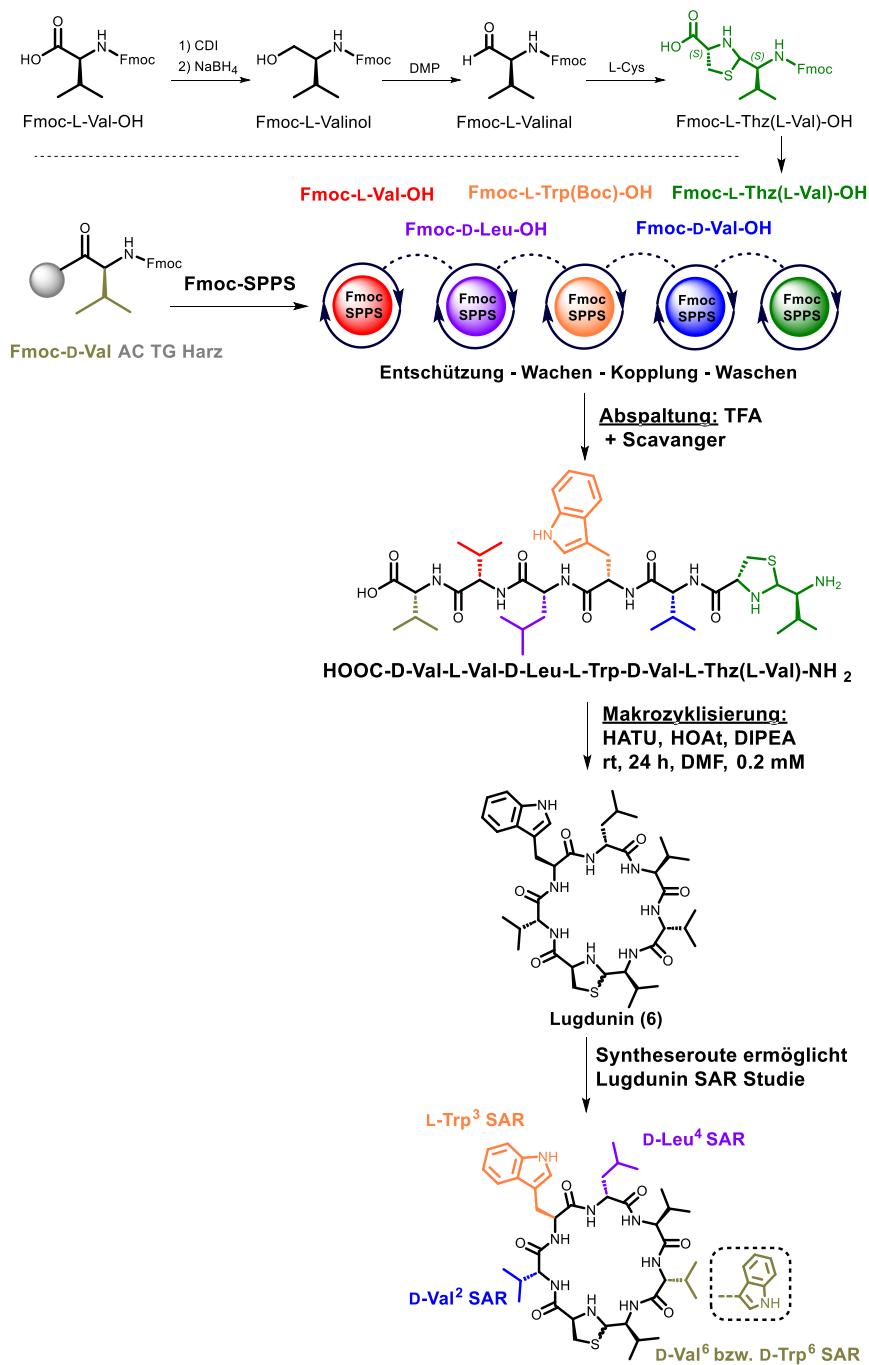


Abbildung 10: Zusammenfassende Übersicht der neuen, publizierten Syntheseroute von (6) mit Markierung der Reste, die in der Struktur-Wirkungs-Beziehungsstudie (SAR-Studie) untersucht wurden. Zur detaillierten Diskussion der Derivate und Struktur-Wirkungs-Beziehung muss die Originalpublikation herangezogen werden.

2.5 Flüssigphasen-Peptidsynthese (LPPS) von (6)

2.5.1 Allgemeiner Teil zur LPPS von (6)

Für das Immobilisierungsvorhaben von Lugdunin (6) in PLGA-Mikrosphärulen mit *in-vivo* Experimenten (siehe Kapitel 3) musste der Zugang zu einer größeren Substanzmenge von ca. 1g des Cyclopeptides und relevanter Analoga in den Fokus gerückt werden. Aus diesem Grund wurde eine Flüssigphasen-Peptidsyntheseroute ausgearbeitet, mit der ein Scale-up leicht möglich gewesen wäre. Ein Ziel beim Erstellen der LPPS-Route war es, die gewünschte Menge an (6) ohne intermediäre chromatographische Aufreinigungsschritte auszukommen und alle gebildeten Nebenprodukte und Reagenzien durch wässrige Extraktionsschritte aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen. Dafür wurden die Publikationen und Patente der neueren LPPS-Methoden mit C-terminalem "Anker-Tag" eingängig studiert (Literaturstellen 24 bis 40) und die darin beschriebene Reaktionsführung und eingesetzten Reagenzien zur in Abbildung 11 dargestellten Syntheseroute kombiniert.^[24-40]

Als C-terminale Schutzgruppe wurde ein *tert*-Butyl (tBu) Gruppe gewählt, um diese im letzten Schritt unter den aus der Festphasen-Peptidsynthese bekannten sauren Bedingungen (TFA und Scavenger) abspalten zu können. Die Startaminosäure der Synthese (D-Val⁶) wurde ebenfalls analog zur SPPS-Route gewählt, so dass der Thiazolidin-Baustein die letzte Kopplung darstellt und dadurch das sekundäre Amin des Bausteins nicht geschützt werden musste. Auch die N-terminale Fmoc-Schutzgruppenstrategie wurde von der SPPS übernommen. Als Kopplungsreagenz wurde das wasserlösliche und robuste Carbodiimid-Reagenz Ethyl-dimethylamniopropyl-Carbodiimid als Hydrochlorid (EDC·HCl) gewählt. 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) wurde in stöchiometrischen Mengen als Accelerator und Racemisierungssupressor eingesetzt, N-Methylmorpholin (NMM) als entsprechende Base. Nach vollständiger Umsetzung der Aminosäure (TLC-Monitoring) wurde der im Überschuss vorhandenen Aktivester der aktivierten Aminosäure mit 3-Aminopropyl-dimethylamin (DMAPA) abgefangen (Abbildung 12). Das DMAPA-Aminosäure-Addukt wurde nach der sich direkt anschließenden Fmoc-Entschützung durch sauer-wässrige Extraktion entfernt. Die Fmoc-Entschützung wurde mit Diazabicycloundecen (DBU) und Tris(2-aminoethyl)amin (TAEA) durchgeführt. Dabei diente TAEA zum Abfangen des bei der Fmoc-Entschützung freiwerdenden Dibenzofulvalen (DBV). Das gebildete TAEA-DBV Addukt wurde ebenfalls im sauren-wässrigen Extraktionsschritt entfernt, ebenso die polaren Reagenzien EDC, HOBt, DBU, NMM, DMAPA, TAEA (Retentionszeit LC-MS: 1 bis 3 min) (Abbildung 11). Nach finaler Fmoc-Entschützung des linearen Präkursors wurden die säurelabilen Schutzgruppen (tBu, Boc) mit Trifluoressigsäure (TFA) unter Scavengerzusatz (Triisopropylsilan/TIPS, Wasser) abgenommen. Die Makrozyklisierung (Makroamidierung) wurde, analog zu den bekannten SPPS-Bedingungen, mit dem Uronium-Kopplungsreagenz HATU in einer stark verdünnten DMF-Lösung mit einer Reaktionszeit von 24 h durchgeführt. Die finale Aufreinigung des Cyclopeptides erfolgte säulenchromatographisch mittels medium-pressure liquid chromatography (MPLC).

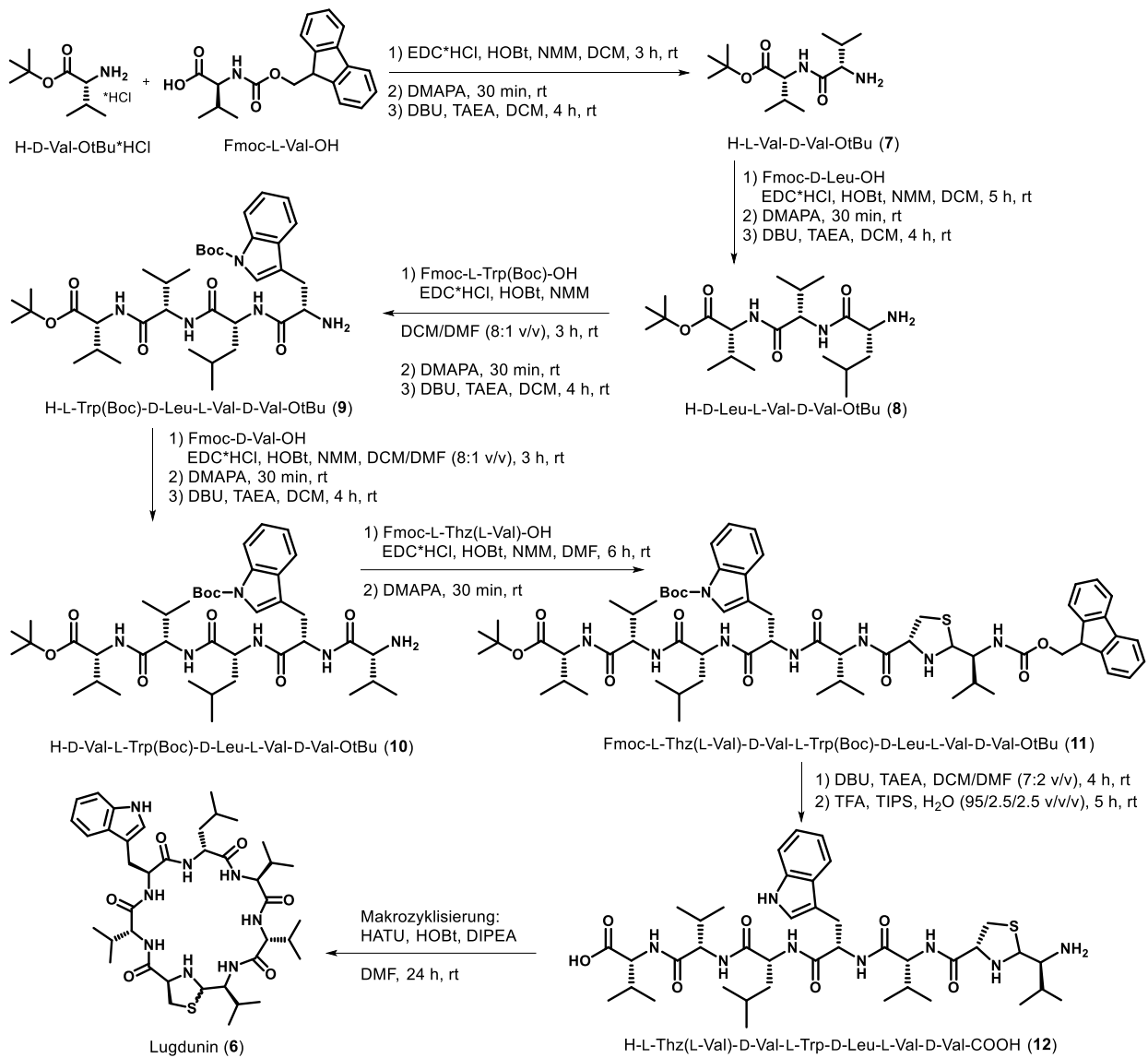


Abbildung 11: Übersicht über die Flüssigphasen-Peptidsynthese von Lugdunin (6).

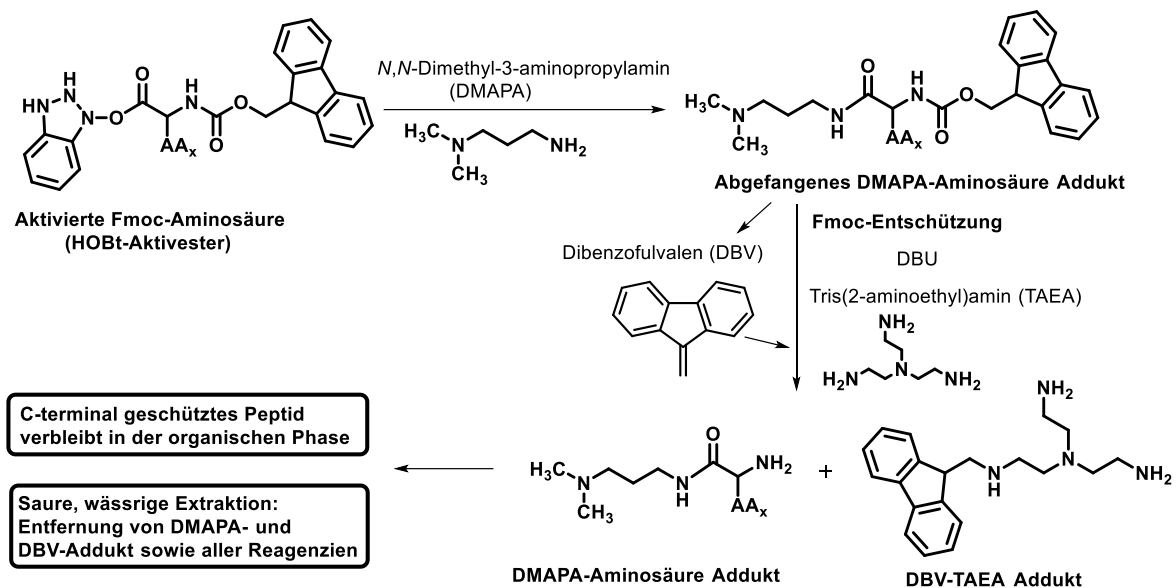


Abbildung 12: Reaktionsschritte und Reagenzien zum Abfangen der im Überschuss zugesetzten aktivierten Aminosäure mit DMAPA und anschließender Fmoc-Entschützung mit DBU/TAEA.

Alle fünf Amidierungsschritte lieferten innerhalb von 2-4 h Stunden unter vollständiger Konversion die jeweiligen Produkte (DC-Kontrolle). Die vollständige Löslichkeit des total-geschützten Kopplungsprodukts in der organischen Phase war jeweils mit geringen Lösungsmittelvolumina leicht zu erreichen. Unter Entfernung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe nimmt die Löslichkeit des Peptides in der organischen Phase ab. Nach der ersten Amidierung zum Dipeptid H-L-Val-D-Val-OtBu erwies sich das Dimer als gut wasserlöslich, so dass im sauer-wässrigen Waschgang ca. 50% des Dipeptids in der wässrigen Phase zurückblieben. Das in der wässrigen Waschphase verbliebene Produkt wurde durch dreimalige Rückextraktion mit DCM nahezu vollständig zurückgewonnen. Im weiteren Verlauf der Syntheseroute traten bei den wässrigen Waschrufen wiederholt Probleme durch starke Emulsionsbildung nach Fmoc-Entschützung auf. Dieses Phänomen wurde auf den amphiphilen Charakter des gebildeten DBV-TAEA Addukts zurückgeführt, welches aromatisch-unpolare Eigenschaften mit positiv geladenen Aminen in einem Molekül verbindet und dadurch, wie ein Emulgator wirkt. Außerdem fiel das DBV-Addukt partiell in der organischen Phase aus und konnte durch Filtration entfernt werden. Der Emulsionsbildung wurde entgegengewirkt, indem generell die Lösungsmittelvolumina vergrößert oder Salze (bevorzugt NaCl) der wässrigen Phase, zur Erhöhung der Polarität, zugesetzt wurden.

Nachfolgend sind die mittels HR-LC-MS gemessenen Base Peak Chromatogramme (BPCs) der einzelnen Reaktionsstufen abgebildet. Im Base Peak Chromatogramm sind in einem gegebenen Massenspektrum die Signale der intensivsten Massen aufgetragen gegen die Zeit. Demgegenüber würden in einem Total Ion Chromatogramm (TIC) die Summe der Signale aller Massen dargestellt werden. Zur Auswertung und Abbildung der einzelnen Synthesestufen wurde das Base Peak Chromatogramm ausgewählt, da dieses gegenüber dem Total Ion Chromatogramm weniger Hintergrundrauschen aufweist. Im Abbildungsteil A (Abbildung 13 bis 17) ist jeweils das Ergebnis der Kopplung zu sehen. Die Kopplungsreaktionen lieferten jeweils das Kopplungsprodukt und das DMAPA-Addukt der

abgefangenen Aminosäure. Alle Kopplungen verliefen nebenproduktarm. In Abbildungsteil B (Abbildung 13 - 17) ist die jeweilige Verbindung nach Fmoc-Entschützung und saurer, wässriger Extraktion zur Entfernung der Nebenprodukte und Reagenzien dargestellt. Alle Nebenprodukte und Reagenzien wurden effektiv durch die wässrige Extraktion entfernt.

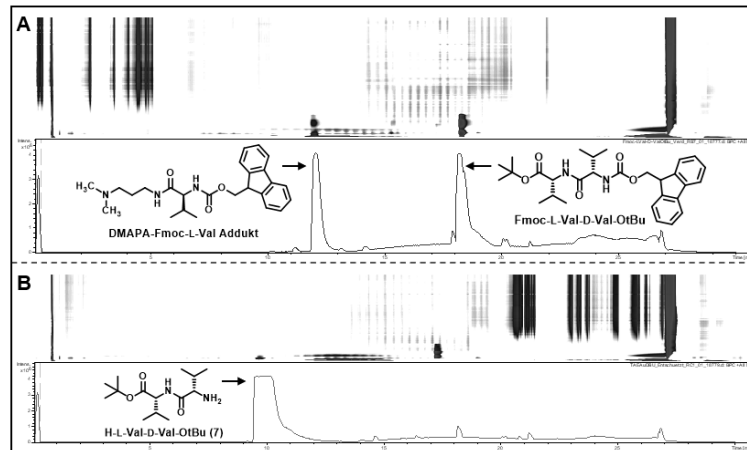


Abbildung 13: (A) Vollgeschütztes Dipeptid im 3-D UV-Vis Plot und Base Peak Chromatogram (BPC).
(B) Fmoc-entschütztes Dipeptid (7) im 3-D UV-Vis Plot und Base Peak Chromatogram.

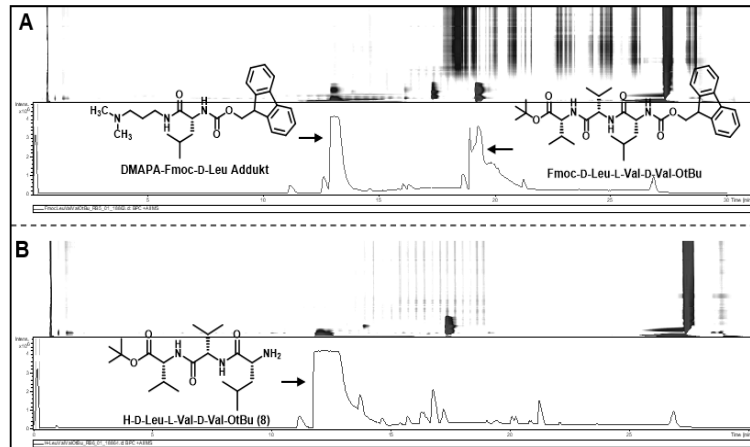


Abbildung 14: (A) Vollgeschütztes Tripeptid im 3-D UV-Vis Plot und Base Peak Chromatogram (BPC).
(B) Fmoc-entschütztes Tripeptid (8) im 3-D UV-Vis Plot und Base Peak Chromatogram.

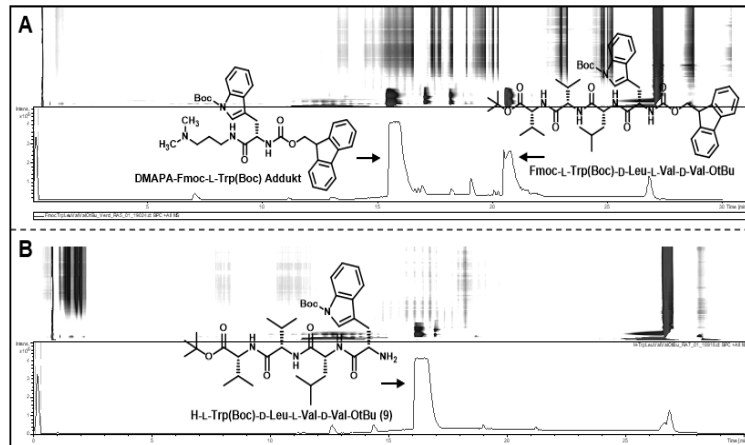


Abbildung 15: (A) Vollgeschütztes Tetrapeptid im 3-D UV-Vis Plot und Base Peak Chromatogram (BPC). (B) Fmoc-entschütztes Tetrapeptid (9) im 3-D UV-Vis Plot und Base Peak Chromatogram.

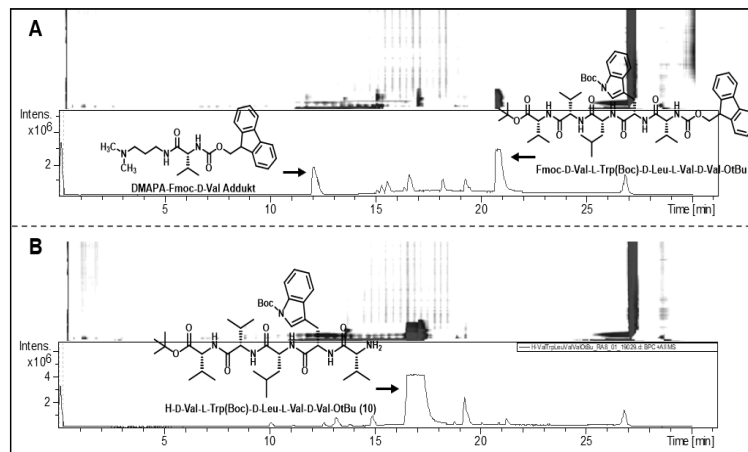


Abbildung 16: (A) Vollgeschütztes Pentapeptid im 3-D UV-Vis Plot und Base Peak Chromatogram (BPC). (B) Fmoc-entschütztes Pentapeptid (10) im 3-D UV-Vis Plot und Base Peak Chromatogram.

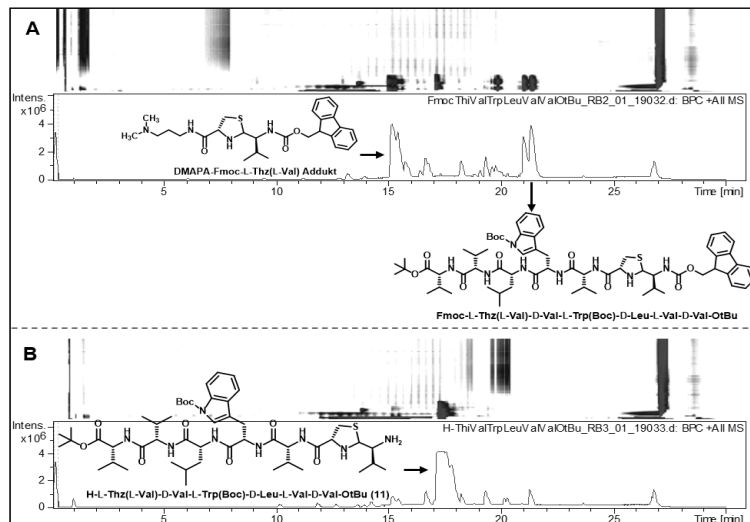


Abbildung 17: (A) Vollgeschütztes Hexapeptid im 3-D UV-Vis Plot und Base Peak Chromatogram (BPC). (B) Fmoc-entschütztes Hexapeptid (**11**) im 3-D UV-Vis Plot und Base Peak Chromatogram.

Nach Abschluss aller Kopplungsschritte und finaler Fmoc-Entschützung wurde die C-terminale *tert*-Butyl-Schutzgruppe und die Boc-Schutzgruppe des Tryptophans mittels starker Säure (TFA) abgespalten. Die LC-MS Analytik ist in Abbildung 18 dargestellt. Es sind viele Signale im Base Peak Chromatogramm zu erkennen. Für Lugdunin (**6**) üblich sind zwei Signale, wie es im darunterliegenden, Extracted Ion Chromatogram (EIC) zu sehen ist. Das Auftreten mehrerer Signale legt eine strukturelle Veränderung des Thiazolidin-Heterozyklus unter den angewendeten Reaktionsbedingungen nahe. Der Thiazolidin-Heterozyklus bildet von Natur aus zwei Signale (Diastereomere). Warum es zu einer Vervielfachung der Signale gekommen ist, kann nicht erklärt werden. Der optimierte Einsatz milderer Reaktionsbedingungen für die saure Entschützung wäre vorteilhaft, um die Nebenproduktbildung besser kontrollieren und vermeiden zu können. Eine exakte Bestimmung der gebildeten Nebenprodukte war mittels LC-MS Bedingungen nicht möglich. Für die strukturelle Bestimmung der Nebenprodukte wäre eine Aufreinigung der Substanzen und anschließende NMR-Analytik notwendig gewesen. Die Substanz wurde direkt in der Makrozyklisierung zu (**6**) umgesetzt, da davon ausgegangen wurde, dass die gebildeten Nebenprodukte nach der finalen wässrigen Extraktion und chromatographischer Reinigung entfernt werden würden.

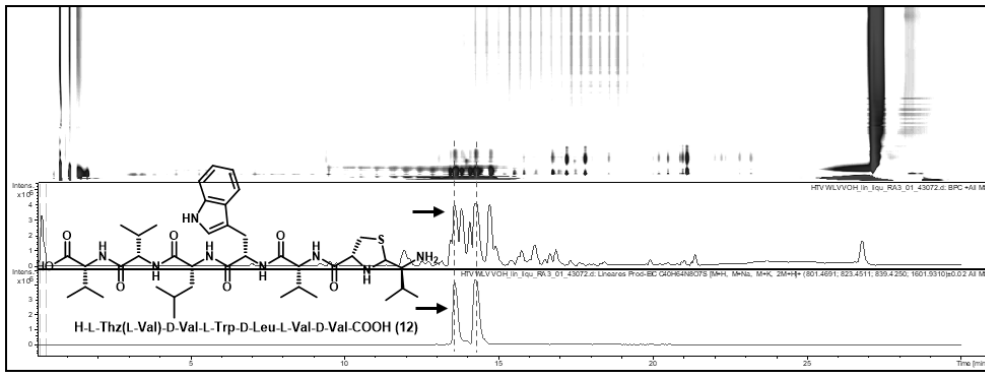


Abbildung 18: Vollständig entschütztes lineares Hexapetid (**12**) im 3-D UV-Vis Plot (oben), Base Peak Chromatogram (BPC, Mitte) und Extracted Ion Chromatogram (EIC unten).

Die HPLC-MS Analyse des Produktes der Makrozyklisierung (Abbildung 19) zeigt, dass das angestrebte Produkt gebildet wurde. Es treten die aus der vorangehenden Stufe bekannten Nebenprodukte auf. Zur Beseitigung der aufgetretenen Nebenprodukte sollte eine normalphasige medium-pressure liquid chromatography (MPLC) ausgearbeitet werden. Dafür wurden mittels Dünnschichtchromatographie nach einem geeigneten Lösungsmittelgemisch und Gradienten zur Auftrennung des Gemischs gesucht (s. Abbildung 20). Die dünnschichtchromatographische Auftrennung gelang mit dem Lösungsmittelgemisch Chloroform/Methanol im Verhältnis 92:8. Das Produkt der Flüssigphasen-Peptidsynthese (LPPS-Produkt) wies eine breite Verteilung über einen großen Bereich der Lauffläche auf, es ist keine klare Trennung möglich. Ein sehr schwaches Lugdunin-Signal ist inmitten der Bande erkennbar. Bessere Bedingungen hinsichtlich der Auftrennung des Gemischs wurden mit der Methode der Dünnschichtchromatographie nicht gefunden.

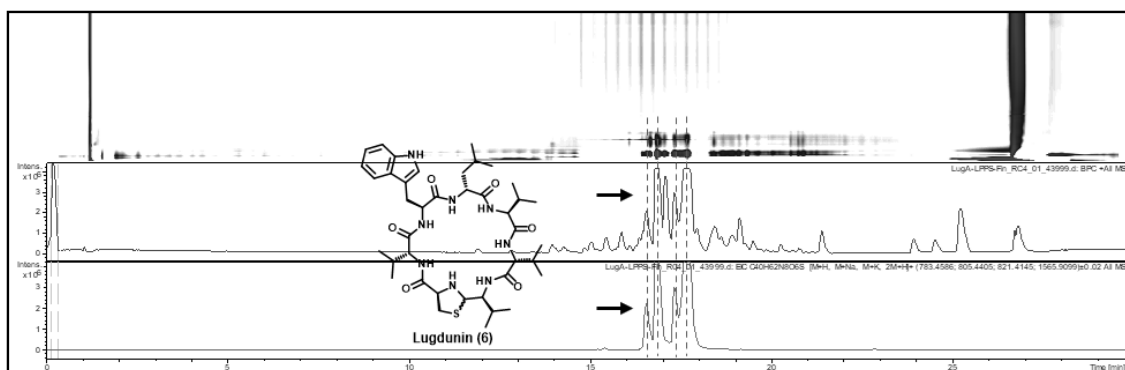


Abbildung 19: Lugdunin (**6**) nach Makrozyklisierung im 3-D UV-Vis Plot (oben), Base Peak Chromatogram (BPC, Mitte) und Extracted Ion Chromatogram (EIC, unten).

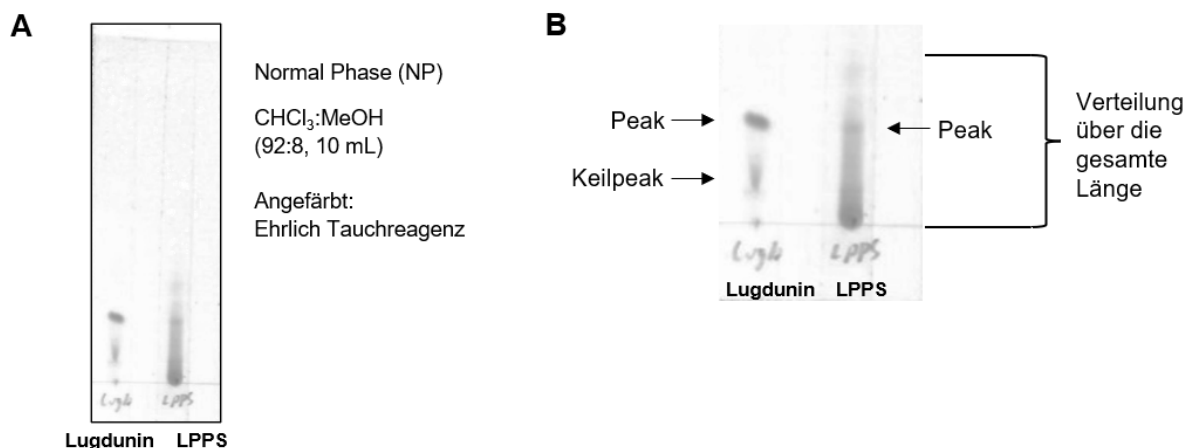


Abbildung 20: (A) Normal-Phasen Dünnschicht-Chromatogramme (NP-DC) zur Verbreitung der MPLC und Ausarbeitung des Gradienten zur Auftrennung der Probe. (B) Detailansicht der Lauffläche und Zuordnung der Signale zu den beiden auftretenden Diastereomeren. Die zu trennende Probe erstreckt sich über eine sehr große Länge, eine detaillierte Auftrennung in einzelne Komponenten ist mittels Dünnschichtchromatographie nicht gelungen.

Die LC-MS Analyse der MPLC-Chromatographie (Abbildung 21) zeigt, dass alle Fraktionen Lugdunin (6) enthalten. Die Probe wurde nicht in die einzelnen Bestandteile aufgetrennt. Dies ist beispielhaft in den Fraktionen 22 bis 60 (Abbildung 21) zu sehen. Im Verlauf der Chromatographie trat hoher Druck auf, was auf eine starke Verdichtung und Verklebung der Säule durch die Probe schließen lässt. Die maximale Kapazität zur Beladung der Säule wurde beim Bestücken bei weitem nicht erreicht. Weitere chromatographische Versuche zur Aufreinigung des Peptides konnten aufgrund von Zeitmangel nicht durchgeführt werden. Zur Lösung des Problems müssten chromatographische Methoden mit stärkerer Trennleistung wie z.B. Up-Scale HPLC eingesetzt und ggf. die Säulentemperatur erhöht werden. Neben Reverse Phase (RP)- und Normalphase (NP)-Säulen können auch andere Säulenmaterialien wie Größenausschlussmethoden (Sephadex), Hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) oder Ionentauschermaterialien als Stationäre Phase in Erwägung gezogen werden. Die Variation des pH-Werts als weiteren Einflussparameter auf die Chromatographie von Lugdunin, könnte zusätzlich experimentell untersucht werden.

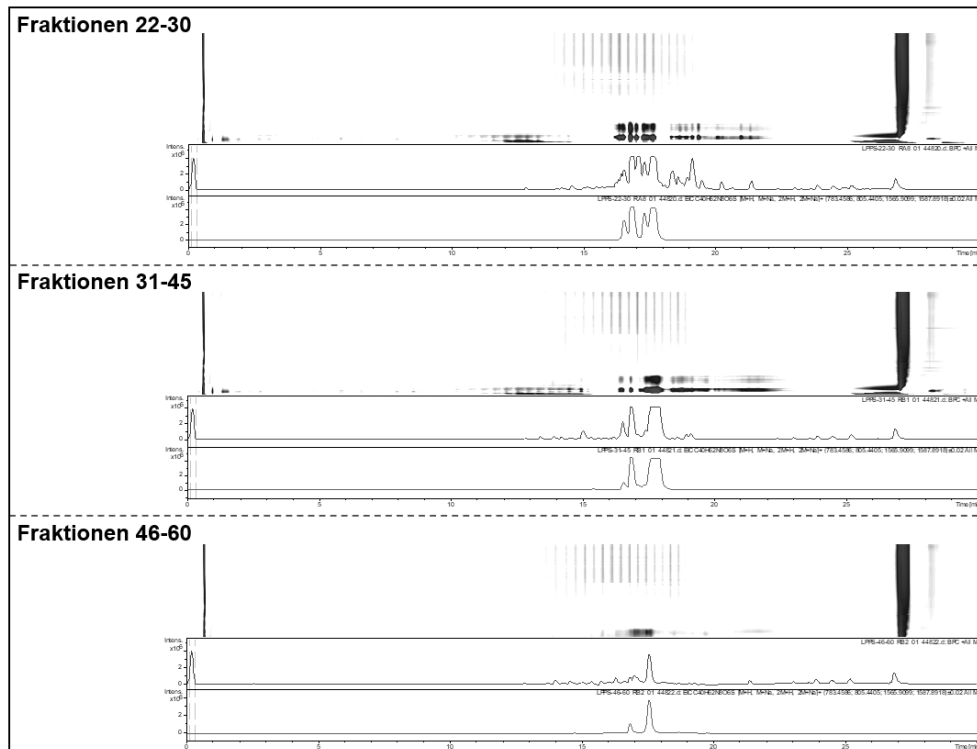


Abbildung 21: LC-MS Daten (oben: 3-D UV-Vis Plot, Mitte: Base Peak Chromatogram BPC, unten: Extracted Ion Chromatogram EIC) des LPPS-Synthese-Rohprodukts von Lugdunin (**6**) der Hauptfraktionen nach Auftrennung der Probe mittels medium-pressure liquid chromatography (MPLC).

Die standardmäßige Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) des Synthese-Rohprodukts von Lugdunin (**6**) gegenüber *S. aureus* USA300^[44] betrug $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Tabelle 3). Die MHK ist, gegenüber dem aus *S. lugdunensis* isolierten Lugdunin mit $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, deutlich erhöht. Begründbar ist die verschlechterte Aktivität mit den während der Flüssigphasen-Peptidsynthese aufgetretenen Nebenprodukte nach der sauren Entschützung. Die Nebenprodukte konnten, wie zuvor beschrieben, nicht im Rahmen der chromatographischen Aufreinigung abgetrennt werden. Diese Nebenprodukte sorgen im biologischen Assay als inaktiver Probenanteil für eine verringerte Aktivität.

Tabelle 3: Vergleich der antibiotischen Aktivität gegen *S. aureus* USA300 zwischen den Rohprodukten der Flüssigphasen- und Festphasen-Peptidsynthese sowie isoliertem Lugdunin aus der Fermentation von *S. lugdunensis*. Bestimmter Konzentrationsbereich: $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $0.781 \mu\text{g mL}^{-1}$. Absorptionswerte entsprechen der OD_{600} .

	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.563	0.781
LPPS-Rohprodukt	-0.014	-0.003	0.597	0.728	0.688	0.73	0.7	1.032
SPPS-Rohprodukt	0.006	0.018	0.013	0.023	0.01	0.022	0.228	0.747
Isolation <i>S. lugdunensis</i>	0.004	0.063	0.015	0.007	0.009	0.019	0.066	0.555

2.5.2 Experimenteller Teil zur LPPS von (6)

Allgemeine Arbeitsvorschriften:

Alle Reaktionen wurden ohne Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Die Lösungsmittel der Reaktionsstufen wurden in HPLC-Reinheitsstufe eingesetzt. Die Aminosäuren wurden von Carbolution bezogen, alle weiteren Reagenzien bei Sigma Aldrich und Alfa Aeser. Alle Startmaterialien und Reagenzien wurden in der vom Hersteller gelieferten Qualität ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Die Intermediate wurden bei -20 °C im Tiefkühlfach gelagert und vor Gebrauch auf Raumtemperatur aufgetaut.

Analytische Methoden:

Für die Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie wurden Platten mit Kieselgel 60 mit Fluoreszenz-Indikator F254 verwendet (Merck, Darmstadt). Die Substanzen wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert. Die fünf Amidierungsschritte wurde mittels Normalphasen-DC und einem Lösungsmittelgemisch aus EtOAc/n-Hexan (3:2 v/v, 5 mL) mit 2% HAc Zusatz überwacht. Lugdunin (6) wurde mit Ehrlich-Tauchreagenz, besteht aus 1.0 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd in 37%iger Salzsäure und Ethanol (50:50 v/v, 100 mL) angefärbt.

Die LC-MS Daten wurden mit einem Bruker MaXis 4G ESI-QTOF mit Dionex Ultimate 3000 HPLC Anlage (Thermo Fisher) gemessen. HPLC-Instrumentenaufbau: Säule: Macherey-Nagel Nucleoshell EC RP-C₁₈ (150/2 RP₁₈, 2.7 µm); Flussrate: 0.3 mL min⁻¹; Laufmittel: Methanol (System B, enthält 0.06 % Ameisensäure) und H₂O (System A, enthält 0.1 % Ameisensäure); Gradient: 0 min (10 % B), 20 min (100 % B), 25 min (100 % B), 26 min (10 % B), 30 min (10 % B). Massenspektrometer Spezifikationen: Elektrospray-Ionisations-Massenspektren (positiv und negative Ionen) wurden im Bereich von 100 bis 1250 Da aufgezeichnet. Natriumformiat-Lösung wurde als interner Kalibrant verwendet. Der Zerstäubendruck der ESI-Quelle wurde auf 0.4 bar eingestellt bei einem Trockengasfluss von 4.0 L min⁻¹ und einer Trockengastemperatur von 200 Grad. Die Endplattenspannung betrug 500 V, die Kapillarspannung 3000 V.

Für die medium-pressure liquid chromatography (MPLC) wurde das Flash Purification System 971-FP (Varian) mit IntelliFlash Software verwendet. Die eingesetzten Säulen wurden bei Agilent Tech. bezogen.

Der antimikrobielle Assay gegen *S. auerus* USA300 wurde entsprechend den unter Kapitel 2.2 und 2.4 aufgeführten Publikationen (Supporting Information) angewendet.

Synthese von H-L-Val-D-Val-OtBu (7):

In einem 100 mL-Kolben wurde H-D-Val-otBu·HCl (3.0 g, 14.3 mmol) in DCM (60 mL) gelöst und mit NMM (1.1 eq, 15.7 mmol, 1.44 mL) neutralisiert. Zum Gemisch wurden HOBt (1.2 eq, 17.2 mmol, 2.3 g), Fmoc-L-Val-OH (1.2 eq, 17.2 mmol, 5.8 g), NMM (1.3 eq, 18.6 mmol, 1.7 mL) und EDC·HCl (1.2 eq, 17.2 mmol, 3.3 g) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 3 h bei rt gerührt und der Fortschritt

der Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. DMAPA (0.5 eq, 889 μ L) wurde nach vollständiger Umsetzung zugegeben und die Reaktionsmischung für 30 min bei rt gerührt. Die Reaktionsmischung wurde filtriert, mit DCM (30 mL) verdünnt und die org. Phase mit Na₂CO₃ 10% (1x, 100 mL), KHSO₄ 10% (6x, 100 mL), Na₂CO₃ 10% (3x, 100 mL) und ges. NaCl (3x, 100 mL) gewaschen. Die org. Phase wurde für 30 min über Na₂SO₄ getrocknet und auf ~50 mL im Vakuum eingeeengt. Die Lösung wurde mit DBU (2.0 eq, 28 mmol, 4.3 mL) und TAEA (3.0 eq, 42 mmol, 6.0 mL) versetzt und für 4 h bei rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit DCM (100 mL) verdünnt, filtriert und die org. Phase mit ges. NaCl (3x, 150 mL), Phosphat-Puffer (3x, 150 mL, pH = 7.2) und ges. NaCl (3x, 150 mL) gewaschen. Die org. Phase wurde für 30 min über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. (**7**) wurde als beige-glasiger Schaum erhalten (3.8 g, 14.0 mmol, 98% Ausbeute).

HRMS (ESI) m/z berechnet für C₁₄H₂₉N₂O₃ [M+H]⁺ 273.2173, gefunden 273.2178. Berechnet für C₂₈H₅₇N₄O₆ [2M+H]⁺ 545.4262, gefunden 545.4278. **MS/MS** (Hauptfragment) m/z berechnet für C₁₀H₂₁N₂O₃ [M+H]⁺ 217.1547, gefunden 217.1552. t_r (min) = 9.78 min.

Synthese von H-D-Leu-L-Val-D-Val-OtBu (**8**):

In einem 100 mL-Kolben wurde (**7**) (3.8 g, 14.0 mmol) in DCM (80 mL) gelöst und mit HOBt (1.2 eq, 16.8 mmol, 2.27 g), Fmoc-D-Leu-OH (1.2 eq, 16.8 mmol, 5.9 g), NMM (1.3 eq, 18.2 mmol, 2.0 mL) und EDC·HCl (1.2 eq, 16.8 mmol, 3.22 g) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 5 h bei rt gerührt und der Fortschritt der Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. DMAPA (0.5 eq, 7.0 mmol, ~800 μ L) wurde nach vollständiger Umsetzung zugegeben und die Reaktionsmischung für 30 min bei rt gerührt. Die Reaktionsmischung wurde filtriert, mit DCM (70 mL) verdünnt und die org. Phase mit Na₂CO₃ 10% (1x, 150 mL), KHSO₄ 10% (6x, 150 mL), Na₂CO₃ 10% (3x, 150 mL) und ges. NaCl (3x, 150 mL) gewaschen. Die org. Phase wurde für 30 min über Na₂SO₄ getrocknet und auf ~50 mL im Vakuum eingeeengt. Die Lösung wurde mit DBU (2.0 eq, 24 mmol, 3.6 mL) und TAEA (3.0 eq, 36 mmol, 5.4 mL) versetzt und für 4 h bei rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit DCM (100 mL) verdünnt, filtriert und die org. Phase mit ges. NaCl (3x, 150 mL), Phosphat-Puffer (3x, 150 mL, pH = 7.2) und ges. NaCl (3x, 150 mL) gewaschen. Die org. Phase wurde für 30 min über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. (**8**) wurde als beige-glasiger Schaum erhalten (4.6 g, 12 mmol, 86% Ausbeute).

HRMS (ESI) m/z berechnet für C₂₀H₄₀N₃O₄ [M+H]⁺ 386.3013, gefunden 386.3020. Berechnet für C₂₀H₃₉N₃NaO₄ [M+Na]⁺ 408.2833, gefunden 408.2840. Berechnet für C₄₀H₇₈N₆O₈ [2M+Na]⁺ 793.5768, gefunden 793.5784. **MS/MS** (Hauptfragment) m/z berechnet für C₁₆H₃₂N₃O₄ [M+H]⁺ 330.2387, gefunden 330.2394. t_r (min) = 11.69 min.

Synthese von H-L-Trp(Boc)-D-Leu-L-Val-D-Val-OtBu (**9**):

In einem 100 mL-Kolben wurde (**8**) (4.6 g, 12.0 mmol) in DCM/DMF (80 mL/10 mL) gelöst und mit HOBt (1.2 eq, 13.2 mmol, 1.8 g), Fmoc-L-Trp(Boc)-OH (1.2 eq, 13.2 mmol, 6.9 g), NMM (1.3 eq, 14.3 mmol, 1.6 mL) und EDC·HCl (1.2 eq, 13.2 mmol, 2.5 g) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 3 h bei rt gerührt und der Fortschritt der Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. DMAPA (0.5 eq, 5.5 mmol, 685 μ L) wurde nach vollständiger Umsetzung zugegeben und die Reaktionsmischung für

30 min bei rt gerührt. Die Reaktionsmischung wurde filtriert, mit DCM (60 mL) verdünnt und die org. Phase mit Na₂CO₃ 10% (1x, 150 mL), KHSO₄ 10% (6x, 150 mL), Na₂CO₃ 10% (3x, 150 mL) und ges. NaCl (3x, 150 mL) gewaschen. Die org. Phase wurde für 30 min über Na₂SO₄ getrocknet und auf ~50 mL im Vakuum eingeeengt. Die Lösung wurde mit DBU (2.0 eq, 18 mmol, 2.7 mL) und TAEA (3.0 eq, 27 mmol, 4 mL) versetzt und für 4 h bei rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit DCM (100 mL) verdünnt, filtriert und die org. Phase mit ges. NaCl (3x, 150 mL), Phosphat-Puffer (3x, 150 mL, pH = 7.2) und ges. NaCl (3x, 150 mL) gewaschen. Die org. Phase wurde für 30 min über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. (**9**) wurde als beige-glasiger Schaum erhalten (6.2 g, 9.2 mmol, 77% Ausbeute).

HRMS (ESI) *m/z* berechnet für C₃₆H₅₈N₅O₇ [M+H]⁺ 672.4331, gefunden 672.4331. Berechnet für C₃₆H₅₇N₅NaO₇ [M+Na]⁺ 694.4150, gefunden 694.4144. **MS/MS** (Hauptfragmente) *m/z* berechnet für C₃₂H₅₀N₅O₇ [M+H]⁺ 616.3705, gefunden 616.3717. Berechnet für C₂₈H₄₂N₅O₇ [M+H]⁺ 560.3079, gefunden 560.3091. *t_r* (min) = 16.05 min.

Synthese von H-D-Val-L-Trp(Boc)-D-Leu-L-Val-D-Val-OtBu (**10**):

In einem 100 mL-Kolben wurde (**9**) (6.2 g, 9.2 mmol) in DCM/DMF (80 mL/10 mL) gelöst und mit HOBt (1.2 eq, 10.0 mmol, 1.5 g), Fmoc-D-Val-OH (1.2 eq, 10.0 mmol, 3.4 g), NMM (1.3 eq, 11.0 mmol, 1.2 mL) und EDC·HCl (1.2 eq, 10.0 mmol, 1.9 g) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 3 h bei rt gerührt und der Fortschritt der Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. DMAPA (0.5 eq, 528 µL) wurde nach vollständiger Umsetzung zugegeben und die Reaktionsmischung für 30 min bei rt gerührt. Die Reaktionsmischung wurde filtriert, mit DCM (60 mL) verdünnt und die org. Phase mit Na₂CO₃ 10% (1x, 150 mL), KHSO₄ 10% (6x, 150 mL), Na₂CO₃ 10% (3x, 150 mL) und ges. NaCl (3x, 150 mL) gewaschen. Die org. Phase wurde für 30 min über Na₂SO₄ getrocknet und auf ~50 mL im Vakuum eingeeengt. Die Lösung wurde mit DBU (2.0 eq, 6.8 mmol, 2.0 mL) und TAEA (3.0 eq, 10.2 mmol, 1.5 mL) versetzt und für 4 h bei rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit DCM (100 mL) verdünnt, filtriert und die org. Phase mit ges. NaCl (3x, 150 mL), Phosphat-Puffer (3x, 150 mL, pH = 7.2) und ges. NaCl (3x, 150 mL) gewaschen. Die org. Phase wurde für 30 min über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. (**10**) wurde als beige-glasiger Schaum erhalten (2.6 g, 3.4 mmol, 37% Ausbeute).

HRMS (ESI) *m/z* berechnet für C₄₁H₆₇N₆O₈ [M+H]⁺ 771.5015, gefunden 771.5016. Berechnet für C₄₁H₆₆N₆NaO₈ [M+Na]⁺ 793.4834, gefunden 793.4823. **MS/MS** (Hauptfragmente) *m/z* berechnet für C₃₇H₅₉N₆O₈ [M+H]⁺ 715.4389, gefunden 715.4376. Berechnet für C₃₃H₅₁N₆O₈ [M+H]⁺ 659.3763, gefunden 659.3751. Berechnet für C₃₂H₄₈N₅O₆ [M+H]⁺ 598.3599, gefunden 598.3592. Berechnet für C₂₇H₃₉N₄O₅ [M+H]⁺ 499.2915, gefunden 499.2908. *t_r* (min) = 17.37 min.

Synthese von H-L-Thz(L-Val)-D-Val-L-Trp(Boc)-D-Leu-L-Val-D-Val-OtBu (**11**):

In einem 100 mL-Kolben wurde (**10**) (2.6 g, 3.4 mmol) in DMF (60 mL) gelöst und mit HOBt (1.2 eq, 3.1 mmol, 477 mg), Fmoc-L-Thz(L-Val)-OH (1.2 eq, 3.1 mmol, 1.3 g), NMM (1.3 eq, 3.4 mmol, 375 mL) und EDC·HCl (1.2 eq, 3.1 mmol, 600 mg) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 6 h bei rt gerührt und der Fortschritt der Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. DMAPA (0.5 eq, 162 µL)

wurde nach vollständiger Umsetzung zugegeben und die Reaktionsmischung für 30 min bei rt gerührt. DMF wurde im Vakuum bei 37°C auf ~10 mL eingengt und mit 140 mL DCM versetzt. Die org. Phase wurde filtriert und mit Na₂CO₃ 10% (1x, 150 mL), KHSO₄ 10% (6x, 150 mL), Na₂CO₃ 10% (3x, 150 mL) und ges. NaCl (3x, 150 mL) gewaschen. Die org. Phase wurde für 30 min über Na₂SO₄ getrocknet und auf ~50 mL im Vakuum eingengt. Die Lösung wurde mit DBU (2.0 eq, 4.5 mmol, 670 µL) und TAEA (3.0 eq, 6.7 mmol, 1.5 mL) versetzt und für 4 h bei rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit DCM (100 mL) verdünnt, filtriert und die org. Phase mit ges. NaCl (3x, 150 mL), Phosphat-Puffer (3x, 150 mL, pH = 7.2) und ges. NaCl (3x, 150 mL) gewaschen. Die org. Phase wurde für 30 min über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. (**11**) wurde als beige-glasiger Schaum erhalten (1.6 g, 1.7 mmol, 50% Ausbeute).

HRMS (ESI) *m/z* berechnet für C₄₉H₈₁N₈O₉S [M+H]⁺ 957.5842, gefunden 957.5826. Berechnet für C₄₉H₈₀N₈NaO₉S [M+Na]⁺ 979.5661, gefunden 979.5637. **MS/MS** (Hauptfragmente) *m/z* berechnet für C₄₅H₇₃N₈O₉S [M+H]⁺ 901.5216, gefunden 901.5222. Berechnet für C₄₅H₇₀N₇O₉S [M+H]⁺ 884.4950, gefunden 884.4960. Berechnet für C₄₁H₆₅N₈O₉S [M+H]⁺ 845.4590, gefunden 845.4593. Berechnet für C₄₁H₆₂N₇O₉S [M+H]⁺ 828.4324, gefunden 828.4332. *t_r* (min) = 17.19 min.

Synthese von H-L-Thz(L-Val)-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Val-D-Val-COOH (**12**):

In einem 100 mL-Kolben wurde (**11**) (1.6 g, 1.7 mmol) mit TFA (30 mL), TIPS (750 µL), H₂O (750 µL) im Verhältnis 95:2.5:2.5 (v/v/v) versetzt und für 5 h bei rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum vollständig bei 35 °C entfernt und der Rückstand jeweils in MeOH (2x 30 mL), Toluol (2 x 30 mL), DCM (2x 30 mL) resuspendiert, das Lösungsmittel nach Resuspension im Vakuum entfernt und der Feststoff über Nacht im Hochvakuum getrocknet. (**12**) wurde als beige-glasiger Schaum erhalten (1.8 g, 2.2 mmol, 129% Ausbeute).

HRMS (ESI) *m/z* berechnet für C₄₀H₆₅N₈O₇S [M+H]⁺ 801.4691, gefunden 801.4692. **MS/MS** (Hauptfragmente) siehe Supporting Information, Kapitel 2.4. *t_r* (min) = 13.58 min.

Synthese von Lugdunin (**6**) durch Makrozyklisierung:

In einem 500 mL-Kolben wurde (**12**) (1.8 g, 2.2 mmol) in DMF (350 mL, C_{Peptid} = ~4.5 mmol) gelöst und mit HOBt (6.0 eq, 10.4 mmol, 1.6 g), DIPEA (8.0 eq, 13.9 mmol, 2.4 mL) und HATU (4.0 eq, 7.0 mmol, 2.7 g; gelöst in DMF/20 mL) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 24 h bei rt gerührt. DMF wurde im Vakuum bei 37°C auf ~10 mL eingengt und mit 140 mL CHCl₃ und nBuOH (40 mL) versetzt. Die org. Phase wurde filtriert und mit ges. NaCl (1x, 200 mL), KHSO₄ 10% (5x, 200 mL), Na₂CO₃ 10% (3x, 200mL), H₂O (3x, 200 mL) und ges. NaCl (3x, 200 mL) gewaschen. Die org. Phase wurde für 30 min über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel vollständig im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 30 mL AcOH gelöst und für 2 h bei rt gerührt. Die Lösung wurde mit 10% NaCl in Wasser (200 mL) übergossen, für 1 h bei rt gerührt und über Nacht bei 4°C gekühlt. Es bildet sich ein Niederschlag. Die Suspension wurde zentrifugiert und der isolierte Niederschlag im Vakuum getrocknet. Der Rückstand wurde dreimal mit CHCl₃/Toluol/Pentan (1:1:3 v/v/v, 20 ml) gewaschen und im Vakuum getrocknet. (**6**) wurde als hellrotes Pulver erhalten (830 mg, 1.1 mmol, 48% Ausbeute).

HRMS (ESI), **MS/MS** (Hauptfragmente) und **t_r** (min): siehe Supporting Information der Publikationen aus Kapitel 2.4.

Chromatographische Aufreinigung von Rohprodukt-Lugdunin mittels MPLC:

Das Rohprodukt-Lugdunin (0.83 g) wurde in MeOH (70 mL) gelöst, mit Kieselgel (1.7 g, 2-fache Menge, hochrein) versetzt und im Vakuum eingetrocknet. Das Pulver wurde in eine Kartusche überführt und komprimiert. Für die Chromatographie wurde ein Lösungsmittelgemisch aus MeOH/CHCl₃ mit einem Gradienten von 0% → 12% MeOH über 60 min gewählt. Säulen Volumen: 45 mL/25 g, Fluss: 15 mL/min, Druck max: 100 psi, Fraktionen: 60 mit 4 Spülfractionen (100% MeOH). Die Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie und HR-LC-MS auf ihren Gehalt an **(6)** überprüft.

2.6 Literaturverzeichnis zum Lugdunin-Cyclopeptid (6)

- [1] A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design, A. C.-L. Lee, J. L. Harris, K. K. Khanna, J.-H. Hong, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20, 2383–2404.
- [2] Bioactive Peptide Natural Products as Lead Structures for Medicinal Use, T. Dang, R. D. Süßmuth, *Acc. Chem. Res.* **2017**, 50, 1566–1576.
- [3] Therapeutic peptides: current applications and future directions, L. Wang, N. Wang, W. Zhang *et al*, *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2022**, 7:48.
- [4] The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future? A. Henninot, J. C. Collins, J. M. Nuss, *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 1382–1414.
- [5] Eigene Zusammenstellung
- [6] Peptide therapeutics: current status and future directions, K. Fosgerau, T. Hoffmann, *Drug Discovery Today* **2015**, 20, 1, 122–128.
- [7] Lehninger Biochemie, D. Nelson, M. Cox, Springer Verlag **2008**, 4. Auflage.
- [8] Nonribosomal Peptide Synthesis-Principles and Prospects, R. D. Süßmuth, A. Mainz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 3770–3821.
- [9] Refining and expanding nonribosomal peptide synthetase function and mechanism, M. McErlean, J. Overbay, S. Van Lanen, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2019**, 46, 493–513.
- [10] Complex peptide natural products: Biosynthetic principles, challenges and opportunities for pathway engineering, S. L. Wenski, S. Thiengmag, E. J. N. Helfrich, *Synthetic and Systems Biotechnology* **2022**, 7, 631–647.
- [11] Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature, P. G. Arnison, M. J. Bibb, G. Bierbaum *et al.*, *Nat. Prod. Rep.*, **2013**, 108–160.
- [12] Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics und Proteinbiochemie/Proteomics, C. Mülhardt, H. Rehm, T. Letzel, Spektrum Akademischer Verlag, 6. Auflage, **2008**.
- [13] Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides, J. M. Palomo, *RSC Adv.* **2014**, 4, 32658–32672.
- [14] N-Butylpyrrolidinone as Alternative Solvent for Solid-Phase Peptide Synthesis, J. Lopez, S. Pletscher, A. Aemissegger, C. Bucher, F. Gallou, *Org. Process Res. Dev.* **2018**, 22, 4, 494–503.
- [15] Towards cleaner PolarClean: efficient synthesis and extended applications of the polar aprotic solvent methyl 5-(dimethylamino)-2-methyl-5-oxopentanoate, L. Cseri, G. Szekely, *Green Chem.* **2019**, 21, 4178–4188.
- [16] Green Solid-Phase Peptide Synthesis (GSPPS) 3. Green Solvents for Fmoc Removal in Peptide Chemistry, Y. E. Jad, T. Govender, H. G. Kruger *et al*, *Org. Process Res. Dev.* **2017**, 21, 3, 365–369.
- [17] Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup, A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2011**, 111, 6557–6602.
- [18] Large-Scale Applications of Amide Coupling Reagents for the Synthesis of Pharmaceuticals, J. R. Dunetz, J. Magano, G. A. Weisenburger, *Org. Process Res. Dev.* **2016**, 20, 2, 140–177.
- [19] Choosing the Right Coupling Reagent for Peptides: A Twenty-Five-Year Journey, F. Albericio, A. El-Faham, *Org. Process Res. Dev.* **2018**, 22, 7, 760–772.
- [20] Thermal Stability Assessment of Peptide Coupling Reagents Commonly Used in Pharmaceutical Manufacturing, J. B. Sperry, C. J. Minter, J. Tao *et al*, *Org. Process Res. Dev.* **2018**, 22, 9, 1262–1275.
- [21] Rapid, Continuous Solution-Phase Peptide Synthesis: Application to Peptides of Pharmaceutical Interest, L. A. Carpino, S. Ghassemi, D. Ionescu *et al*, *Organic Process Research & Development* **2003**, 7, 28–37.
- [22] Solution-phase total synthesis of teixobactin, B. Gao, S. Chen, Y. N. Hou, Y. J. Zhao, T. Ye, Z. Xu, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, 17, 1141–1153.
- [23] Combined Solid Phase and Solution Synthesis of the Fully Protected Segment 74-99 of HIV 1-Protease with the Application of a New Trityl-Linker, B. Henkel, L. Zhang, C. Goldammer, E. Bayer, *Zeitschrift für Naturforschung B* **1996**, 51, 9, 1339–1346.

- [24] DioRaSSP: Diosynth Rapid Solution Synthesis of Peptides, I. F. Eggen, F. T. Bakelaar, A. Petersen, P. B. W. Ten Kortenaar, *Organic Process Research & Development* **2005**, 9, 1, 98–101.
- [25] A novel method for repetitive peptide synthesis in solution without isolation of intermediates, I. F. Eggen, F. T. Bakelaar, A. Petersen *et al*, *J. Peptide Sci.* **2005**, 11, 633–641.
- [26] Verfahren zur schnellen Synthese von Peptiden in Lösung, I. F. Eggen, T. Kortenaar, P. B. Wilhelmus, C. A. Cruson, Akzo Nobel, Arnheim (NL), Patent No.: DE 60205693T2, **2006**.
- [27] Erste Totalsynthese des antiviralen Antibiotikums Feglymycin und Synthesestudien zur Darstellung von Complestatin-Analoga an fester Phase, F. G. Dettner, Dissertation TU Berlin, **2008**.
- [28] Application of substituted 2-(trimethylsilyl)ethyl esters to suppress diketopiperazine formation, K. Borsuk, F. L. van Delft, I. F. Eggen *et al*, *Tetrahedron Letters* **2004**, 45, 3585–3588.
- [29] Novel diphenylmethyl-Derived Amide Protecting Group for Efficient Liquid-Phase Peptide Synthesis: AJIPHASE, D. Takahashi, T. Yano, T. Fukui, *Org. Lett.* **2012**, 14, 17, 4514–4517.
- [30] Development of an efficient liquid-phase peptide synthesis protocol using a novel fluorene-derived anchor support compound with Fmoc chemistry; AJIPHASE®, D. Takahashi, T. Yamamoto, *Tetrahedron Letters* **2012**, 53, 1936–1939.
- [31] AJIPHASE®: A Highly Efficient Synthetic Method for One-Pot Peptide Elongation in the Solution Phase by an Fmoc Strategy, D. Takahashi, T. Inomata, T. Fukui, *Angew. Chem.* **2017**, 129, 7911–7915.
- [32] Method for producing peptide, D. Takahashi, AJINOMOTO Inc., Patent No.: US 009,353,148 B2, **2016**.
- [33] Total Synthesis of Elastin Peptide Using High Pressure-Liquid Phase Synthesis Assisted by a Soluble Tag Strategy, Y. Okada, S. Hosoya, H. Suzuki, K. Chiba, *Org. Lett.* **2014**, 16, 6448–6451.
- [34] Hydrophobic tag-assisted liquid-phase synthesis of a growth hormone-inhibiting peptide somatostatin, S. Kitada, S. Fujita, Y. Okada, S. Kim, K. Chiba, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, 21, 4476–4479.
- [35] Soluble Tag-Assisted Peptide Head-to-Tail Cyclization: Total Synthesis of Mahafacyclin B, Y. Fujita, S. Fujita, Y. Okada, K. Chiba, *Org. Lett.* **2013**, 15, 6, 1155–1157.
- [36] Tag-Assisted Liquid-Phase Peptide Synthesis Using Hydrophobic Benzyl Alcohols as Supports, Y. Okada, H. Suzuki, T. Nakae *et al*, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 320–327.
- [37] Total synthesis of α -conotoxin MII using a soluble-tag-assisted Method, S. Kitada, S. Fujita, Y. Okada, S. Kim, K. Chiba, *Tetrahedron* **2013**, 69, 2555–2559.
- [38] A practical solution-phase synthesis of an antagonistic peptide of TNF- α based on hydrophobic tag strategy, G. Tana, S. Kitada, S. Fujita *et al*, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 8219–8221.
- [39] Synthesis of hydrophobic phase-tagged prolyl peptides featuring rapid reaction/separation, K. Chiba, M. Sugihara, K. Yoshida, Y. Mikami, S. Kim, *Tetrahedron* **2009**, 65, 8014–8020.
- [40] Total Synthesis of Elastin Peptide Using High Pressure-Liquid Phase Synthesis Assisted by a Soluble Tag Strategy, Y. Okada, S. Hosoya, H. Suzuki, K. Chiba, *Org. Lett.* **2014**, 16, 6448–6451. Europäische Patente: EP 1927584 A1 (**2008**), EP 3266792 A1 (**2018**), EP 3778621 A1 (**2021**).
- [41] Greening the synthesis of peptide therapeutics: an industrial perspective, V. Martin, P. H. G. Egelund, H. Johansson, S. T. Le Quement, F. Wojcik, D. S. Pedersen, *RSC Adv.* **2020**, 10, 42457–42492.
- [42] Bachem - Insights into Innovative and Sustainable Peptide Chemistry and Technology by the Leading Independent Manufacturer of TIDES, S. Jadhav, W. Seufert, C. Lechner, R. Schönleber, *Chimia* **2021**, 75, 6, 476–479.
- [43] Form and Function in Cyclic Peptide Natural Products: A Pharmacokinetic Perspective, A. T. Bockus, C. M. McEwen, R. S. Lokey, *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2013**, 13, 821–836.
- [44] Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization, A. Zipperer, M. C. Konnerth, C. Laux *et al*, *Nature* **2016**, 535, 511–516.

3) Kovalente und nicht-kovalente Oberflächen-Immobilisierung von Lugdunin (6) in Kooperationsprojekten

3.1 Einleitung zur Immobilisierung von Lugdunin-Cyclopeptiden

Postoperatives Infektionsgeschehen bei Implantaten und Prothesen

Implantate wie Katheder, künstliche Prothesen oder alle anderen Arten von körperfremden, operativ-fixierten Vorrichtungen sind ein zentraler Pfeiler im Spektrum moderner klinischer Behandlungsmöglichkeiten. Nach dem operativen Einbau eines Fremdkörpers kommt es zunächst zur Interaktion mit dem umgebenden körpereigenen Gewebe sowie einer Reaktion des Immunsystems, bei der pro-inflammatorische Prozesse ausgelöst werden können.^[1]

Mit dem Einbau eines körperfremden Bauteils ist ein erhöhtes Infektionsrisiko assoziiert.^[2] Bei der Besiedlung der für den Körper unbekanntes Oberflächenstruktur treten körpereigene Zellen und Bakterien in Konkurrenz zueinander. Die Adhäsion der Bakterien auf der Oberfläche bildet dabei den initialen Schritt für die infektiöse Kolonialisierung des Implantates. Das zugrunde liegende Konzept wurde zum ersten Mal vor drei Jahrzehnten von Anthony Gristina unter dem Titel „The race for the surface“ vorgestellt.^[3] Der Fremdkörper bietet dabei Adhäsionsmöglichkeiten für Pathogene, die im schlimmsten Fall einen Biofilm auf dem Implantat ausbilden können, der eine sehr große Widerstandsfähigkeit gegen eine Reaktion des Immunsystems und systemische Antibiotikabehandlung aufweist. Im Verlauf der Eingliederung des Implantates in bestehende Körperstrukturen kommt es zu pro-inflammatorischen Reaktionen, die eine körpereigene Infektionsbekämpfung zusätzlich unterdrücken können.^[4-8] Bei der Besiedelung von künstlichen Vorrichtungen spielen vor allem Gram-positive Pathogene wie *S. aureus*, *S. epidermidis* und *Enterokokken* eine Rolle, häufig sind die infektionsauslösenden Bakterien Teil der regulären Mikrofauna des Patienten. Gramnegative Bakterien und Anaerobier treten äußerst selten im Rahmen des beschriebenen Infektionsgeschehens auf.^[9] Implantat-assoziierte postoperative Infektionen stellen den Hauptgrund dar, weshalb der Einbau eines medizinisch notwendigen, körperfremden Bauteils nicht nachhaltig erfolgreich verläuft. Bei ausbleibendem oder minimiertem Behandlungserfolg können hohe Kosten für das Gesundheitssystem entstehen.^[10-11]

Infektionsprävention von Implantaten

Zum Schutz des Implantates vor einer initialen Besiedelung mit infektiösen Pathogenen kann eine antimikrobielle Oberflächenbeschichtung aufgebracht werden. Unterschiedliche Strategien zur antimikrobiellen Oberflächenbeschichtung von Implantaten sind in Abbildung 22 dargestellt.^[12-13] Passive Oberflächenmodifikationen zielen darauf ab, ohne pharmakologisch aktive Substanz eine verringerte oder gar keine bakterielle Adhäsion zu erreichen. Dies wird durch entsprechende Modifikationen der Oberflächenchemie und -Struktur erreicht. Es werden klassische physikalische

Oberflächenparameter wie Rauigkeit, Hydrophilie, Oberflächenenergie/-potential und Oberflächenleitfähigkeit adressiert, die eine entscheidende Rolle bei der bakteriellen Adhäsion und Biofilmbildung spielen.^[14-18] Aktive Oberflächenmodifikationen nutzen pharmakologisch aktive, vorab aufgebrauchte Substanzen (Antibiotika, Antiseptika, Metallionen, organische Verbindungen), die die initiale Besiedelung des Implantates verhindern sollen. Als weitere Untergruppen werden anorganische-, organische- und synthetisch-kombinatorische Oberflächenmodifikationen klassifiziert, die sich weiter in das sog. „contact killing“ (z.B. Silber-Ionen oder Iod) und die aktive Wirkstofffreisetzung (z.B. eines Antibiotikums) sowie biologische Abbaubarkeit der Beschichtung unterteilen lassen (Carrier-Beschichtungen).^[19-23] Aktiv vermarktet werden zurzeit Produkte mit Silberionen-Beschichtung, Antibiotika-Beschichtung und PMMA-Antibiotika-Beschichtung (PMMA: Polymethylmethacrylat) sowie Antibiotika-beladener Knochenzement und Antibiotika-beladene Hydrogele. Alle anderen Verfahren zum Infektionsschutz von Implantaten befinden sich im Moment in der präklinischen- oder klinischen Entwicklungsphase. Für Beschichtungsverfahren, die mit dem Einsatz von pharmakologisch aktiven Substanzen verbunden sind, müssen höhere regulatorische Vorschriften und Standards eingehalten werden gegenüber wirkstofffreien Techniken. ^[12,13]

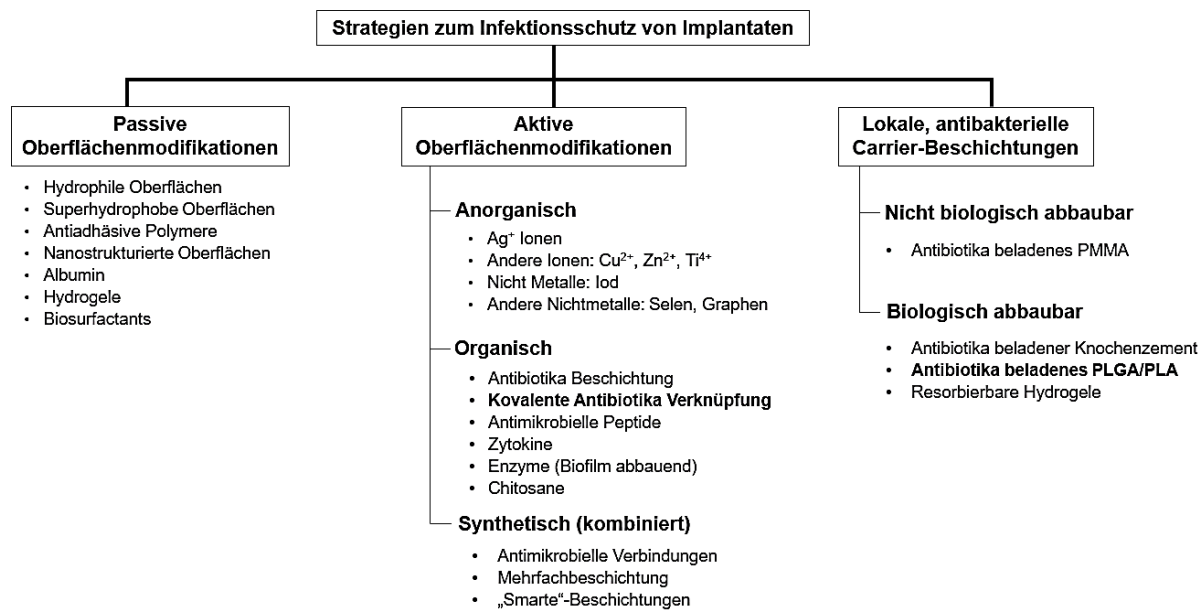


Abbildung 22: Übersicht möglicher Verfahren zum Infektionsschutz von Implantaten mittels Oberflächenmodifikationen. Fett: eingesetzte Methoden innerhalb der Dissertation.

PLGA als biologisch abbaubares Polymer

Poly(lactid-co-glycolid) Copolymer, kurz PLGA, ist ein aus den beiden monomeren Lactid (3,6-Dimethyl-1,4-dioxan-2,5-dion) und Glycolid (1,4-Dioxan-2,5-dion) synthetisiertes Copolymer, das als linearer Polyester vorliegt. Das sehr gut charakterisierte Biomaterial mit hoher Biokompatibilität kann im menschlichen Körper hydrolytisch abgebaut und verstoffwechselt werden. Diese Eigenschaft wird ausgenutzt, um PLGA-Fäden als chirurgisches Nähmaterial einzusetzen. Weitere Anwendung findet PLGA als Hilfsstoff bei der Herstellung von Depotarzneiformen und Beschichtungen.^[24]

Die Synthese von PLGA erfolgt durch Verknüpfung der zyclischen Dimere von racemischer Milchsäure und Glycolsäure mittels Ringöffnungspolymerisation (ROP, Abbildung 23). Diese werden mit den entsprechenden Zinn(II)- und Aluminium-Katalysatoren zum Polyester umgesetzt. Bei der Polymerisation entstehen je nach Wahl der Bedingungen statistisch verteilt, ungeordnete Copolymere oder Block-Copolymere, bei denen sich Gruppen von Milchsäure- und Glycolpolymer-blockweise abwechseln.^[25]

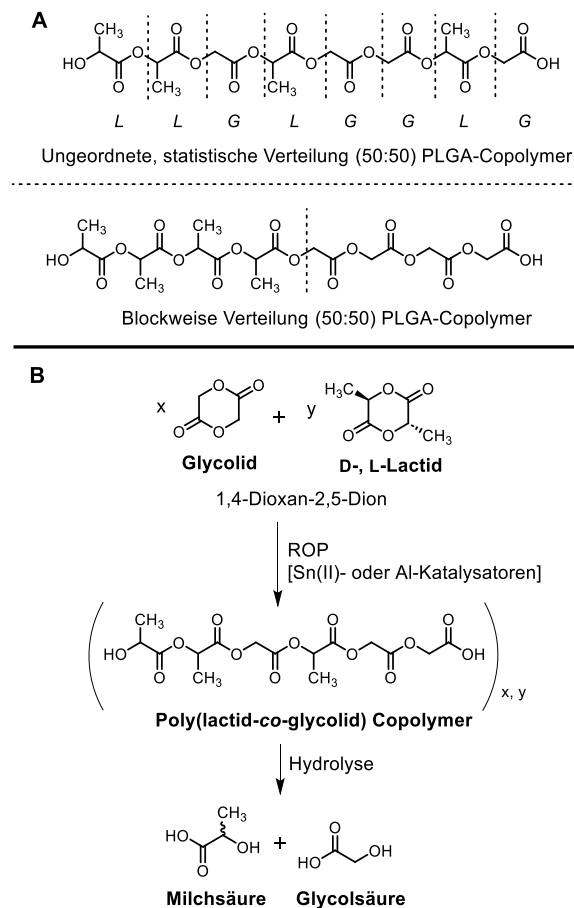


Abbildung 23: (A) Struktur von PLGA mit ungeordneter- und blockweiser Verteilung, L = Lactid, G = Glycolid. (B) Chemische Synthese und physiologische Hydrolyse von PLGA in die Monomere.

Der Polymerabbau (Degradation) erfolgt unter physiologischen Bedingungen durch spontane Hydrolyse der Esterbindungen im Polymerrückgrat. Die Anwesenheit von Enzymen kann den Prozess beschleunigen. Weitere Beschleunigungsfaktoren sind ein sinkendes Molekulargewicht des Polymers, die Erhöhung der Temperatur oder der Glycolidanteile sowie das Verlassen des neutralen pH-Bereichs. Die gebildeten Monomere werden in die regulären physiologischen Stoffwechselwege (z.B. Citratzyklus) eingeschleust oder renal ausgeschieden.^[26,27] Die Erosion größerer PLGA-Partikel wird als Bulk- oder Polymererosion bezeichnet. Dabei spielt nicht nur das Hydrolyseverhalten eine Rolle, sondern auch die Quelleigenschaften, die Diffusionsfähigkeit von Wasser in die Bulkstruktur, die Porosität der Partikel sowie die Diffusionseigenschaften der abgebauten Monomere. Die erosiven Prozesse können in die Oberflächenerosion und die Bulkerosion unterteilt werden: Bei der Oberflächenerosion werden die

Partikel von außen Schicht für Schicht abgebaut, wohingegen bei der Bulkerosion die Partikel im Ganzen nach und nach in ihrer Dichtestruktur minimiert und aufgelöst werden. Dementsprechend kann die Freisetzung von Arzneistoffen aus PLGA-Partikeln erosionskontrolliert verlaufen. Daneben sind eine diffusionskontrollierte- oder quellungskontrollierte Freisetzung möglich.^[28] Antibiotika beladene PLGA-Partikel konnten mit Ciprofloxacin^[29], Gentamicin^[30-32], Rifampicin^[33], Tobramycin^[34], Vancomycin^[35] sowie Antimikrobiellen Peptiden (AMPs)^[36,37] hergestellt werden. Neben Antibiotika-beladenen PLGA-Nanopartikeln wurden Zytostatika-beladene Nanopartikel und Insulin-beladene PLGA-Nanopartikel als Depotarzneimittelform hergestellt.^[38,39] Ein ausgewähltes vermarktetes Produkt im Bereich Antibiotika-beschichteter PLGA-Devices ist das von Medtronic PLC entwickelte antibakterielle, absorbierbare Hüllennetz „TYRX“. Das biologisch abbaubare Netz ist mit Minocyclin/Rifampin beschichtet und umhüllt elektrische Implantate wie Herzschrittmacher und Defibrillatoren. Das körperfremde elektronische Bauteil wird dadurch vor postoperativen, Aggregat assoziierten Infektionen präventiv geschützt.^[40]

Strategien zur kovalenten Immobilisierung

Alternativ zu der beschriebenen Freisetzungsstrategie von Antibiotika aus abbaubaren PLGA-Beschichtungen können kovalente Immobilisierungsstrategien gewählt werden. Neben den Mitgliedern klassischer Antibiotikagruppen werden in diesem Zusammenhang vermehrt Antimikrobielle Peptide (AMPs) eingesetzt. Diese weisen gegenüber klassischen Antibiotika meist einen andersartigen Wirkungsmechanismus auf und können dadurch die Ausbildung von Antibiotika-Resistenzen herabsetzen.^[41,42] Die kovalente Immobilisierung von Peptiden kann durch selektive und nicht-selektive chemische Ligation vorgenommen werden: Die selektiv-kontrollierte kovalente Immobilisierung wird über eine kovalente, nicht natürlich vorkommende Bindung zwischen Peptid und Oberfläche hergestellt, bei der selektiv eine reaktive funktionelle Gruppe in der Peptidsequenz zur Bindungsknüpfung ausgenutzt wird. Dem gegenüber steht die nicht-selektive kovalente Immobilisierung, bei der eine reaktive Gruppe (z.B. *N*-Hydroxysuccinimid, Aldehyd) auf die Oberfläche aufgebracht wird, welche mit den Funktionalitäten der Aminosäuren des Peptides reagiert. Hierzu können Peptide ohne vorherige chemische Sequenzmodifikationen genutzt werden. Das Peptid wird bei dieser Methode in unterschiedlichen räumlichen Orientierungen und Verknüpfungen immobilisiert.^[43]

Die selektive kovalente Verknüpfung zwischen Polymeroberfläche und Peptid kann durch eine dipolare Cycloaddition, die als „Click-Reaktion“ bezeichnet wird, hergestellt werden. Im Rahmen der Click-Reaktion wird ein Triazol-Isomerengemisch gebildet, dessen Edukte ein Azid und ein Alkin darstellen. Die Click-Reaktion wird mittels Cu(I)-Katalysator unter milden Bedingungen durchgeführt und bietet eine einfache und gut charakterisierte Möglichkeit zur Bindungsknüpfung von Substraten an Oberflächen.^[44-46]

Als polymere Oberflächen zur kovalenten Peptidimmobilisierung wurde eine Vielzahl von Materialien wie Glas, Titanoxid und Silicon eingesetzt. Alternativ dazu kann Synthetikgummi eingesetzt werden. So zeichnet sich Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk (EP(D)M-Kautschuk, Terpolymer) als sehr haltbares und widerstandsfähiges Material aus. Die vulkanisierte Kautschukformulierung fand bereits Anwendung in Bereichen, in denen Bakterienwachstum ein potenzielles Problem darstellt.^[47-49]

3.2 Kovalente Immobilisierung eines Lugdunin-Click Derivates auf Silan-modifizierten EP(D)M Kautschuk-Formulierungen

Im Rahmen des Kooperationsprojekts wurden von Tim Bäuerle (FH Reutlingen, Fachbereich Angewandte Chemie) eine Peroxid-initiierte, freie radikalische Grafting-Reaktion von EP(D)M-Kautschuk mit Vinyltrimethoxysilan (VTMS) realisiert (Abbildung 24). „Grafting“, auch als „Pfropfcopolymerisation“ bezeichnet, ist das Anknüpfen eines Polymeren anderen Typs an eine Polymerhauptkette. Weiter wurde von Tim Bäuerle durch saure hydrolytische Kondensation ein Trioxysilan mit Azidfunktionalität als Linker an den VTMS-gegrafteten EP(D)M-Kautschuk angebracht. Dadurch wurde die Möglichkeit geschaffen, das antimikrobielle Peptid Lugdunin als Propargylderivat D-Pra²-D-Trp⁶-Lugdunin (**6c**) kovalent an die Kautschukformulierung anzubinden. Das Peptid wurde im Rahmen dieser Dissertation von Julian S. Saur nach der veröffentlichten SPPS-Syntheseroute hergestellt (vgl. Kap. 2.4). Es wurden 20 mg lyophilisiertes Peptid an Tim Bäuerle für die abschließende kovalente Anknüpfung mittels Kupfer-katalysierte Click-Reaktion (CuAAC) übergeben. Das propargylierte Lugdunin-Derivat wurde aufgrund seiner potenten antimikrobiellen Aktivität (MIC = 3.1 µg mL⁻¹) gegen *S. aureus* (MRSA, USA300) für die Immobilisierung ausgewählt.

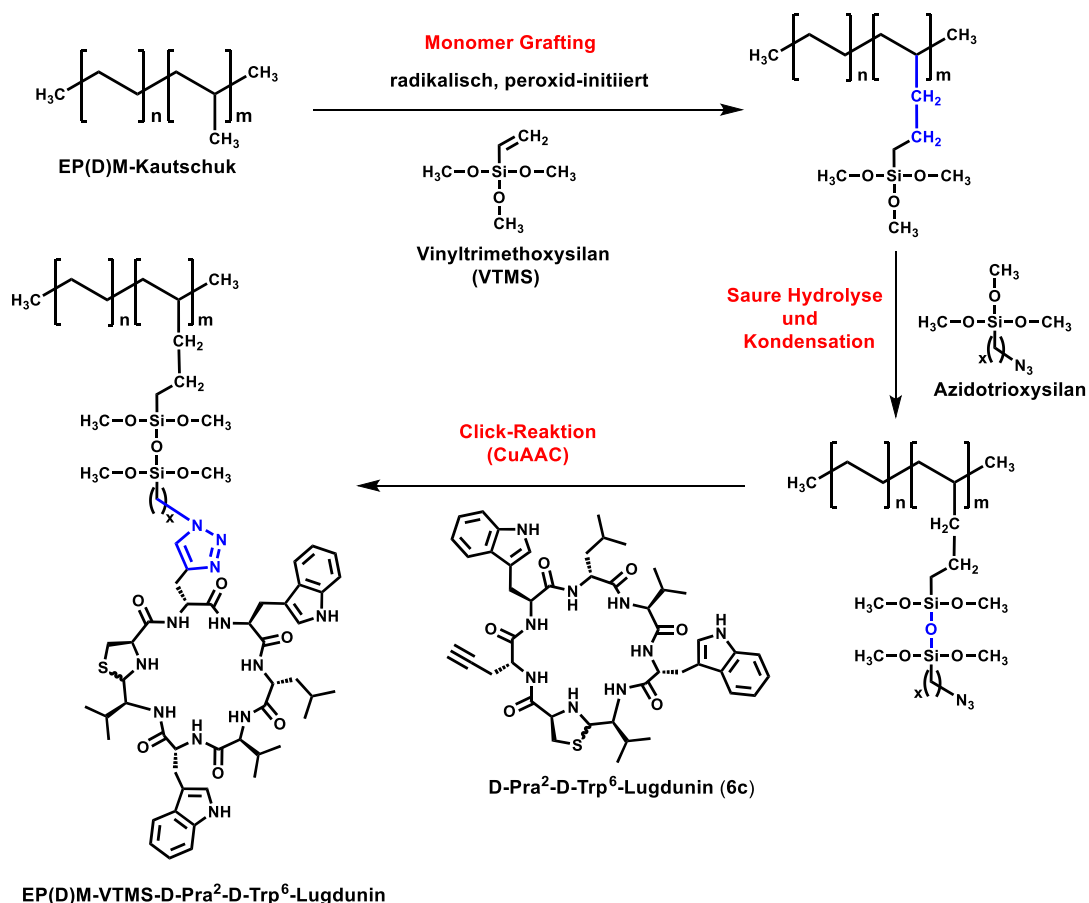


Abbildung 24: Chemische Reaktionen zur kovalenten Immobilisierung eines propargylierten Lugdunin-Derivates auf EP(D)M-Kautschukformulierungen (Projektübersicht). Das Zylopeptid wurde anhand der publizierten Syntheseroute von Julian S. Saur hergestellt und dem Projektpartner Tim Bäuerle (FH Reutlingen, Fachbereich Angewandte Chemie) zur Verfügung gestellt.

3.3 Nicht-kovalente Immobilisierung von Lugdunin-Cyclopeptiden auf Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) Mikrosphärulen

3.3.1 Allgemeiner Teil zu Lugdunin-beladenen PLGA-Mikrosphärulen

Die allgemeine Zielsetzung des Projekts sah vor, das Antibiotikum Lugdunin (**6**, MHK: 3.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) und das aktivitätsgesteigerte Derivat D-Trp⁶-Lugdunin (**6b**, MHK: 1.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in PLGA-Mikrosphärulen zu immobilisieren. Die Lugdunin beladenen PLGA-Mikrosphärulen sollten in einem etablierten *in-vivo* Tiermodell, dem Endokarditismodell, eingesetzt werden.

In-vivo Endokarditismodell

Beim Endokarditismodell wird Ratten oder Kaninchen operativ ein Katheder über die *Arteria carotis* in den Herzventrikel eingeführt. Dieser Katheder repräsentiert einen Fremdkörper analog zu einem chirurgischen Bauteil (künstliche Herzklappe, künstlicher Aortenbogen etc.), auf dessen Oberfläche sich Pathogene ansiedeln und Infektionen auslösen können. Nach erfolgreicher Implantation des Katheders wird eine Infektion provoziert (z.B. mit *S. aureus* MRSA), indem über die Schwanzvene eine definierte Bakterienkonzentration appliziert wird. Das Versuchstier wird nach einem entsprechenden Zeitraum euthanasiert, das Herz chirurgisch geöffnet und der Katheder auf bakterielle Besiedelung überprüft. Um die Wirksamkeit einer Antibiotikatherapie zu untersuchen, kann nach der Infektion ein systemisches Antibiotikaregime angewendet werden. Eine andere Möglichkeit der Infektionsprävention stellt die Beschichtung des Katheders vor dem operativen Einsetzen mit Antibiotika dar. Das Endokarditis-Tiermodell liefert sehr gut reproduzierbare Ergebnisse.^[50-52] Die Hauptpathogene einer infektiösen Endokarditis (IE) sind grampositive Pathogene der Gattungen *Staphylokokken*, *Streptokokken* und *Enterokokken*.^[53] Die Behandlung scheidet oftmals, da Vancomycin, Linezolid sowie Daptomycin keine ausreichende Wirksamkeit gegen multiresistente *S. aureus* Keime aufweisen, die für die infektiöse Endokarditis ursächlich sind.^[54,55] Lugdunin (**6**) adressiert mit seinem Wirkungsspektrum grampositive Pathogene, insbesondere *S. aureus* MRSA, weshalb es einen geeigneten Kandidaten zur Infektionsbekämpfung durch Oberflächenimmobilisierung einer infektiösen Endokarditis darstellt und im Rahmen einer Drug-release Strategie eingesetzt werden könnte.

Zellviabilitätsassay (Vorversuche)

Im ersten Schritt wurden die beiden zu Beginn des Abschnitts genannten Peptid-Antibiotika (**6**, **6b**) mittels der publizierten Festphasen-Peptidsynthese (s. Kap. 2.4) in ausreichendem Maßstab hergestellt (jeweils 25 mg). Die beiden Substanzen wurden zunächst vom Arbeitskreis Prof. Wendel und Prof. Krajewski (UKT Tübingen) im Viabilitätsassay auf Zytotoxizität gegenüber „humane koronare arterielle Endothelzellen“ (HCAECs) und „humane adulte Kardiomyozyten“ (HACM AC16) untersucht. Bei dem eingesetzten Assay zur Bestimmung der Zellviabilität wird ein Farbstoff (Resazurin) durch metabolisch reduktive Vorgänge lebender Zellen und Farbumschlag detektionsfähig gemacht. Der Farbstoff kann

anschließend mittels Fluoreszenz- und Absorptionsmessung quantitativ nachgewiesen werden und liefert den Anteil vitaler Zellen in der Lösung bzw. invertiert die Zytotoxizität.

Im Viabilitätsassays wurde als Negativkontrolle DMSO eingesetzt, das auf HCAEC-Zellen in höheren Konzentrationen zytotoxisch wirkt. Gegenüber den robusten HACM-Zellen zeigt DMSO keinen negativen Effekt. Als positive Kontrolle wurde Gentamycin eingesetzt, das keinerlei zytotoxische Effekte gegenüber HCAEC- und HACM-Zellen aufweist. Lugdunin (**6**) und das eingesetzte Derivat D-Trp⁶-Lugdunin (**6b**) wurden in reinem DMSO (20 mg mL⁻¹) gelöst, da nur in diesem Lösungsmittel eine ausreichende Peptidkonzentration zur Durchführung des standardisierten Assayprotokolls erreicht werden konnte. Die Ergebnisse des Viabilitätsassay zeigen, dass Lugdunin (**6**) als auch (**6b**) in höheren Konzentrationen über 1 µg mL⁻¹ auf die beiden Zelllinien zytotoxisch wirken (Abb. 25). Unklar ist, ob der Effekt vom eingesetzten Lösungsmittel DMSO oder vom Peptid selbst verursacht wird („DMSO-Effekt“). Andere organische Lösungsmittel konnten aufgrund der schlechten Löslichkeit gegenüber den Peptiden (z.B. Ethylacetat) oder zu starker Zytotoxizität gegenüber den beiden Zelllinien (z.B. Dimethylformamid) nicht eingesetzt werden. Es wurde angestrebt, die beiden Assays zu einem späteren Zeitpunkt unter optimierten Bedingungen mit geringeren DMSO-Konzentrationen erneut durchzuführen. Für das Beschichtungsvorhaben wurde beschlossen, Lugdunin (**6**) und das Tryptophan-Derivat (**6b**) zunächst in geringen Beladungskonzentrationen zu immobilisieren, um zytotoxische Effekte vorzubeugen bzw. diese abzuschwächen.

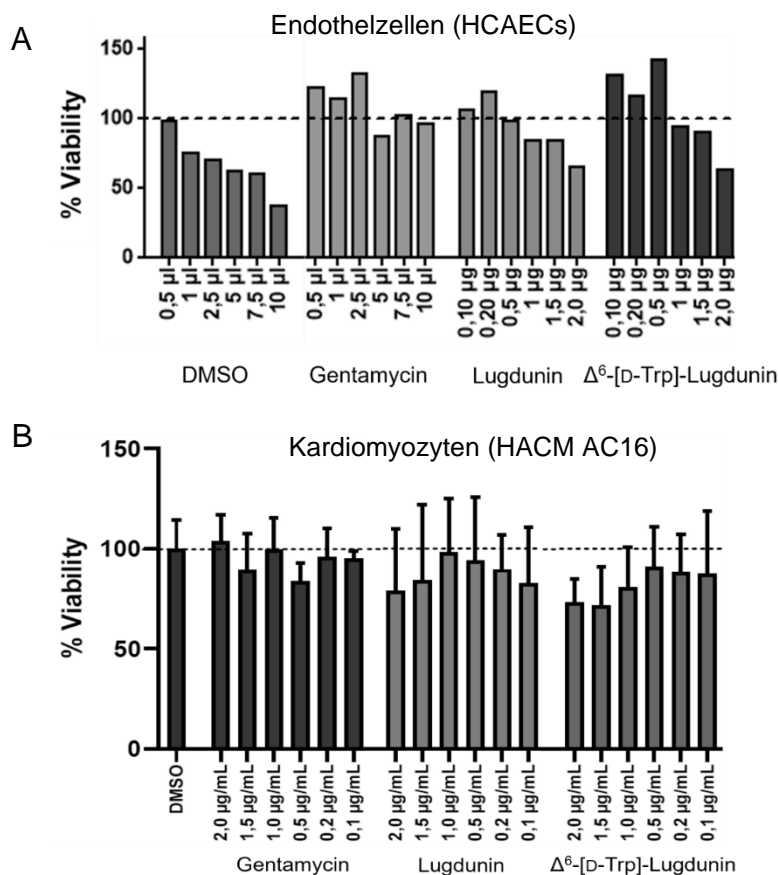


Abbildung 25: (A) Viabilität von humanen koronaren arteriellen Endothelzellen (HCAECs). (B) Humane adulte Kardiomyozyten (HACM AC16) gegenüber DMSO (negativ Kontrolle), Gentamycin (positive

Kontrolle), synthetischem Lugdunin (**6**) und D-Trp⁶-Lugdunin (**6b**). Die Bestimmung der Viabilität erfolgte mittels PrestoBlue™ Cell Viability Reagent. Die Viabilität unbehandelter Zellen dient als Referenzpunkt (100%). Die Daten wurden vom Arbeitskreis Prof. Dr. S. Krajewski zur Verfügung gestellt.

Herstellung von Polymermikropartikeln (Polymermikrosphärulen)

Laut IUPAC-Definition umfassen Polymermikropartikel alle Polymerpartikel, die einen Partikeldurchmesser zwischen 0.1 µm und 100 µm aufweisen. Die Gestalt der Partikel wird dabei nicht berücksichtigt. Als Untergruppe werden Polymermikrosphärulen (englisch: polymer microspheres) definiert, die eine sphärisch geformte Mikropartikelgestalt besitzen. Werden diese Partikel zusätzlich mit einem Wirkstoff beladen, so werde sie als „Mikromatrices“ bezeichnet.^[56,57]

Die allgemeine Herstellung von Mikrosphärulen erfolgt durch Lösungsmittlextraktions- und Evaporationsverfahren. Dabei umfasst die disperse Phase (DP) Emulsionströpfchen einer organischen Phase bestehend aus Polymer und Wirkstoff. Je nach Löslichkeitseigenschaften des Wirkstoffes kann dieser in der dispersen organischen Phase gelöst, fein pulverisiert dispergiert oder als wässrige Lösung (Kontinuierliche Phase; CP) emulgiert werden. Die disperse Phase wird anschließend in eine wässrige Phase eingebracht, mit der das organische Lösungsmittel bis zu einem gewissen Anteil mischbar ist. Als organische Lösungsmittel eignen sich Ethylacetat und Dichlormethan. Das organische Lösungsmittel wird aus den Emulsionströpfchen mit der Zeit in die wässrige Phase extrahiert. Während dieses Prozesses härten die Polymer-Mikrosphärulen immer weiter aus (Evaporation). Die gebildeten Mikrosphärulen können durch Zentrifugation isoliert werden.^[58]

Für den Herstellungsprozess Lugdunin-beladener PLGA Mikrosphärulen wurden Methodenprotokolle von anderen Wirkstoffen angepasst.^[59-62] Eine Übersicht zeigt Abbildung 26. Der Wirkstoff Lugdunin (**6**) wurde in der dispersen Phase (Ethylacetat) dispergiert und mit dem im Ethylacetat suspendierten Polymer PLGA gemischt, sodass eine Wirkstoff-Polymer S/O-Suspension entstand. Für die kontinuierliche Phase wurde eine Lösung aus NaCl und Polyvinylalkohol (Emulgator) in Wasser hergestellt, die zum vollständigen Lösen aller Komponenten einmalig erhitzt und anschließend wieder abgekühlt wurde. Die Bildung der Mikrosphärulen wurde durch langsame Zugabe der dispersen Phase zur Kontinuierlichen Phase unter starkem Mischen initiiert. Es bildete sich eine S/O/W-Emulsion, die, über Nacht gerührt, zur Aushärtung der Mikrosphärulen führte. Nach Zentrifugation und mehrmaligem Waschen wurden die Lugdunin beladenen PLGA-Mikrosphärulen durch Gefriertrocknung als Pulver erhalten. Die theoretische Beladung mit dem Wirkstoff Lugdunin sollte 20% (w/w) betragen. Neben Lugdunin (**6**) und D-Trp⁶-Lugdunin (**6b**) beladenen PLGA-Mikrosphärulen wurden zur Kontrolle unbeladene Mikrosphärulen ohne Wirkstoffbeimischung in die Dispersen Phase auf analoge Art und Weise hergestellt.

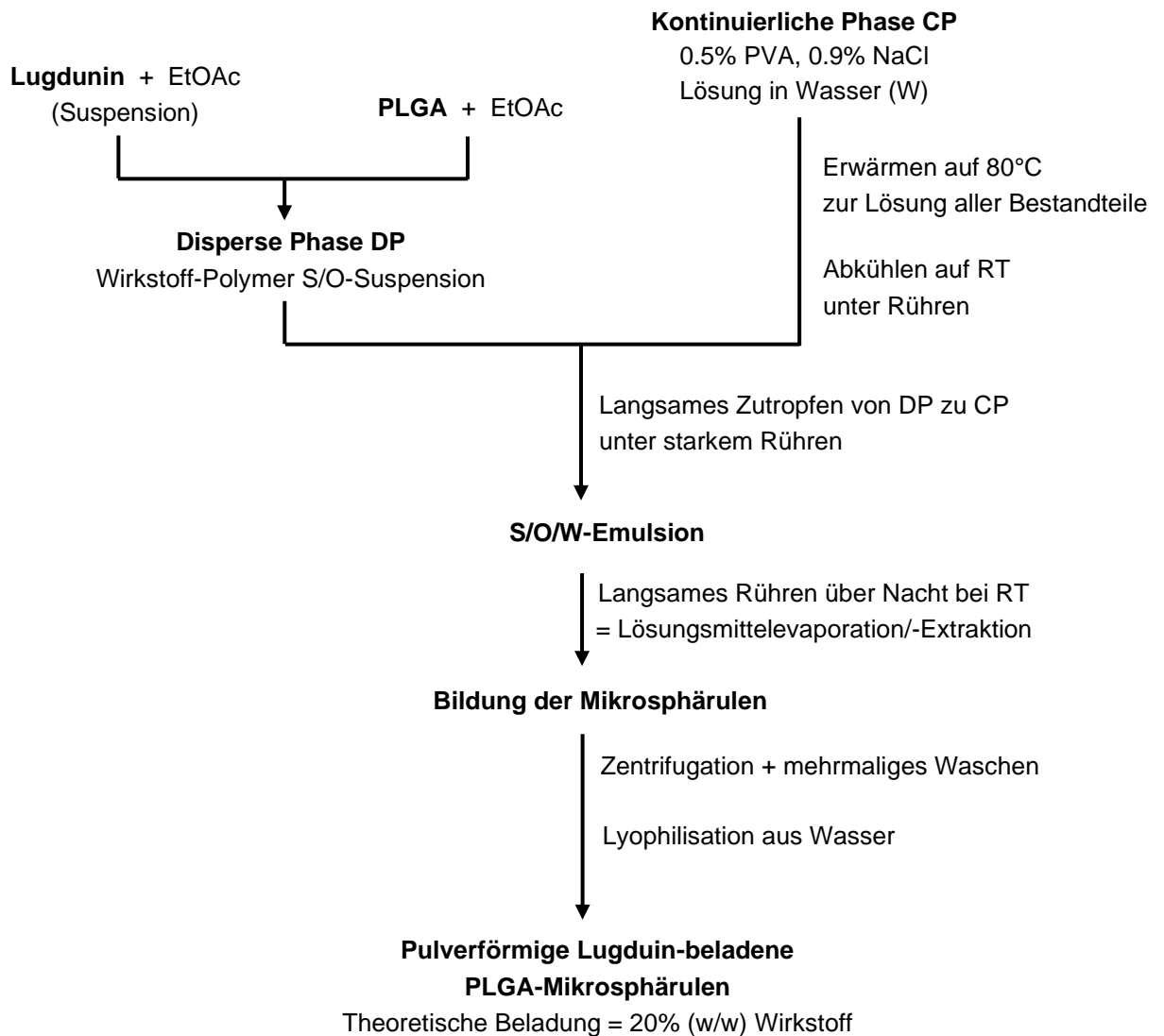


Abbildung 26: Herstellungsprozess Lugdunin-beladener PLGA-Mikrosphärulen mittels S/O/W-Emulsion. S = solid, W = water, O = organic, PVA = Polyvinylalkohol, EtOAc = Ethylacetat.

Analytik der Wirkstoffbeladung

Zur Überprüfung der erfolgreichen Wirkstoffbeladung wurden 0.5 mg der hergestellten Mikrosphärulen mit DMSO ausgewaschen. Dafür wurden die beladenen Mikrosphärulen in DMSO suspendiert und im Ultraschallbad extrahiert. Der Extrakt wurde anschließend im Agardiffusionstest, durchgeführt von Herrn B. Krismer (AK Peschel), auf antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* (USA300) getestet (Abbildung 27). Der Agardiffusionstest zeigt eine eindeutige Inhibitionszone (Hemmhof) für die mit Lugdunin (**6**) und dem Derivat D-Trp⁶-Lugdunin (**6b**) beladenen PLGA-Mikrosphärulen. Der Wirkstoff ist in der Probe der ausgewaschenen PLGA-Mikrosphärulen enthalten.

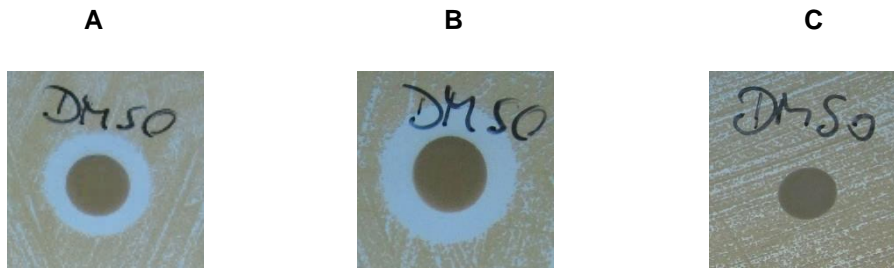


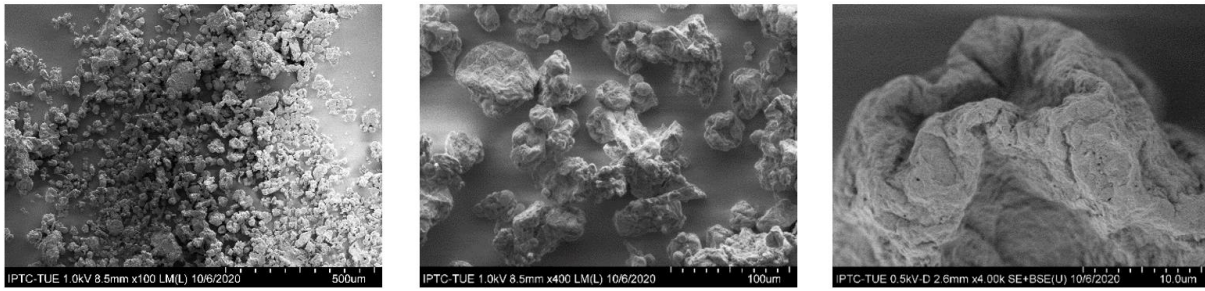
Abbildung 27: Agardiffusionstest der mit DMSO-Lösung ausgewaschenen Lugdunin (**6**): (A) und D-Trp⁶-Lugdunin (**6b**). (B) beladenen PLGA Mikrosphärulen gegen *S. aureus* (USA300). (C) Negativkontrolle der nicht mit Wirkstoff beladenen PLGA-Mikrosphärulen.

Zur Charakterisierung der sphärischen Gestalt, Morphologie und Oberflächenbeschaffenheit der PLGA-Mikrosphärulen wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen mittels Scanning Electron Microscope (SEM) angefertigt. Die Messungen von Lugdunin-, D-Trp⁶-Lugdunin-beladene und Wirkstoff-unbeladene PLGA-Mikrosphärulen wurden von Frau Nadler (IPTC Uni Tübingen) durchgeführt (Abbildung 28). Die Interpretation und Diskussion der Ergebnisse wurde zusammen mit Frau Nadler besprochen.

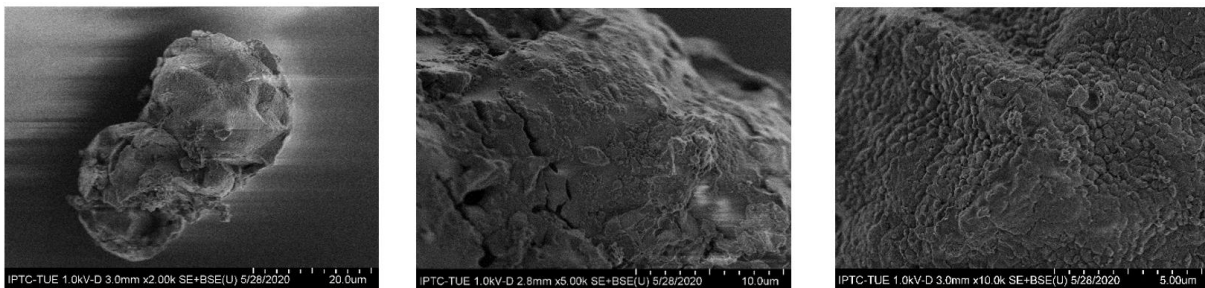
Die Oberfläche der Lugdunin (**6**) und D-Trp⁶-Lugdunin (**6b**) beladenen Mikrosphärulen (Abb. 28 A und B) ist stark verklebt und unporös. Die Mikropartikel sind stark miteinander agglomeriert, nicht sphärisch geformt und weisen eine inhomogene Größenverteilung auf. Die Mikrosphärulen des Derivates (**6b**) (Abb. 28 B) weisen einen stärkeren Verklebungseffekt gegenüber den mit Lugduin beladenen Mikrosphärulen auf. Dabei wirken die Peptide wie ein Klebstoff, der die Partikel aneinanderhaften lässt. Eine Hypothese könnte sein, dass dieser Effekt durch die Wechselwirkungen zwischen den Peptiden untereinander und mit den PLGA-Polymeren zustande kommt. Die starke Verklebung kann durch den Trocknungsprozess, insbesondere während des Gefriertrocknens, hervorgerufen worden sein, da sich die Peptide durch Wasserentzug verstärkt zusammenlagern und agglomerieren. Dem gegenüber weisen die unbeladenen Mikrosphärulen (Abb. 28 C) eine weniger raue und weniger zerklüftete Oberfläche, im Vergleich zu den beladenen Mikrosphärulen, auf. Sie sind stärker sphärisch geformt, homogener in ihrer Größenverteilung und schwächer agglomeriert als die beladenen Mikrosphärulen.

Ein Grund für das Zusammenkleben kann eine zu hohe Beladung mit Peptid (20% w/w) gewesen sein. Möglicherweise ist eine geringe Beladung ausreichend, um eine antimikrobielle Aktivität zu gewährleisten und die Verklebung zu minimieren. Generell muss der Herstellungsprozess überarbeitet und optimiert werden, um Verbesserungen hinsichtlich Morphologie, Oberflächenbeschaffen und Porosität der Wirkstoff-beladenen Mikrosphärulen zu erreichen und diese mittels SEM-Bildgebung zu bestätigen.

A Lugdunin (6)



B D-Trp⁶-Lugdunin (6b)



C Keine Beladung

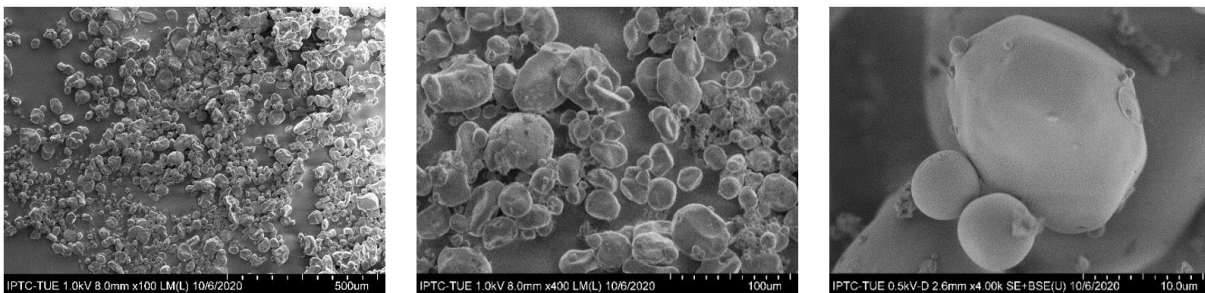


Abbildung 28: Aufnahmen eines Scanning Electron Microscope (SEM) der hergestellten, beladenen und unbeladenen PLGA-Mikrosphärulen. Beladungen der PLGA-Mikrosphärulen mit (A) Lugdunin (6), (B) D-Trp⁶-Lugdunin (6b), (C) Keine (unbeladen).

Ein Vergleich mit bereits publizierten, Antibiotika-beladenen PLGA-Mikrosphärulen^[63] (Abbildung 29) zeigt, dass diese voneinander abgegrenzt, gleichförmig sphärisch vorliegen und eine glatte Oberflächenbeschaffenheit aufweisen. Hinsichtlich Oberflächenporosität weisen die publizierten, Antibiotika-beladenen Moxifloxacin PLGA-Mikrosphärulen definierte Kavitäten auf (Abbildung 29, B). Diese Eigenschaft ist bei den Lugdunin-beladenen Mikrosphärulen unterrepräsentiert. Der für die Lugdunin-beladenen PLGA-Mikrosphärulen beschriebene Verklebungseffekt tritt sowohl bei den Rifampicin/Moxifloxacin-beladene PLGA Mikrosphärulen als auch bei den Moxifloxacin-beladene PLGA-Mikrosphärulen nicht auf. Wie bereits zuvor benannt wurde, wäre eine Überarbeitung der Synthese mit optimierten Herstellungsparametern und verifizierender SEM-Bildgebung notwendig.

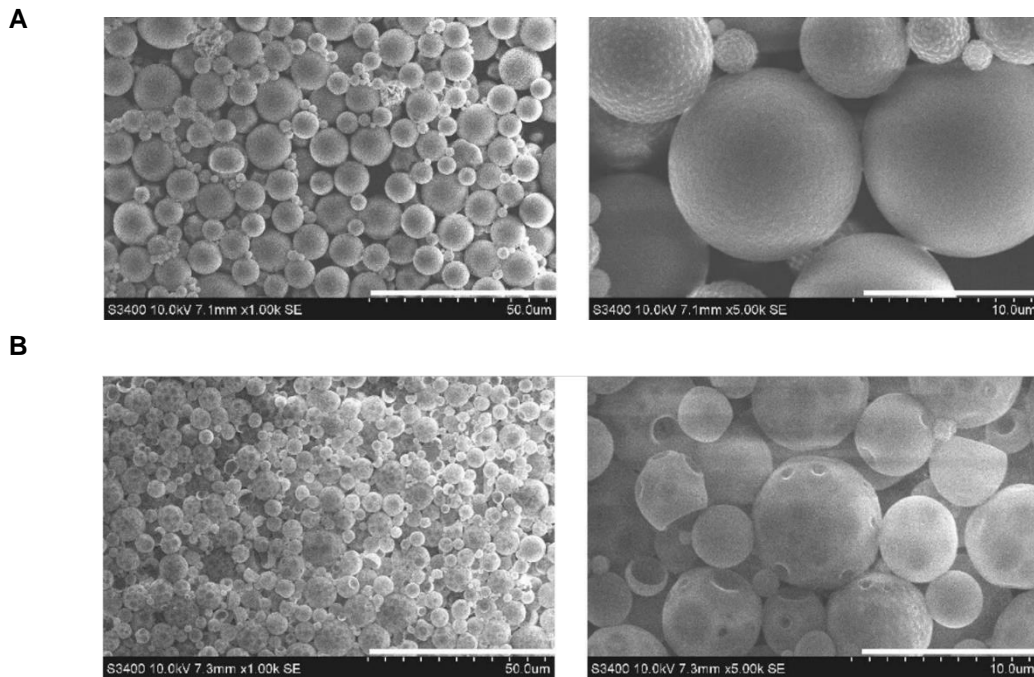


Abbildung 29: SEM-Aufnahmen von Antibiotika-beladenen PLGA-Mikrosphärulen zum Vergleich: Beladung mit (A) Rifampicin/Moxifloxacin und (B) Moxifloxacin. Abbildung entnommen von Z. Wen Qiao, Z. Yuan, W. Zhang, D. Wei, N. Hu, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2019**, 47, 1, 790–798.^[63]

Um die Freisetzung in physiologischer Umgebung nachzubilden, wurden die mit Lugdunin (**6**) beladenen PLGA-Mikrosphärulen in PBS Puffer (pH = 7.0) bei 37°C über einen Zeitraum von 45 Tagen inkubiert und dadurch hydrolysiert. Die Quantifizierung von Lugdunin (**6**) erfolgte mittels HR-LC-MS (Extracted Ion Chromatogram; EIC) und vorab erstellter Kalibrationsgerade der Reinsubstanz. Zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität wurden Agardiffusionstests angefertigt.

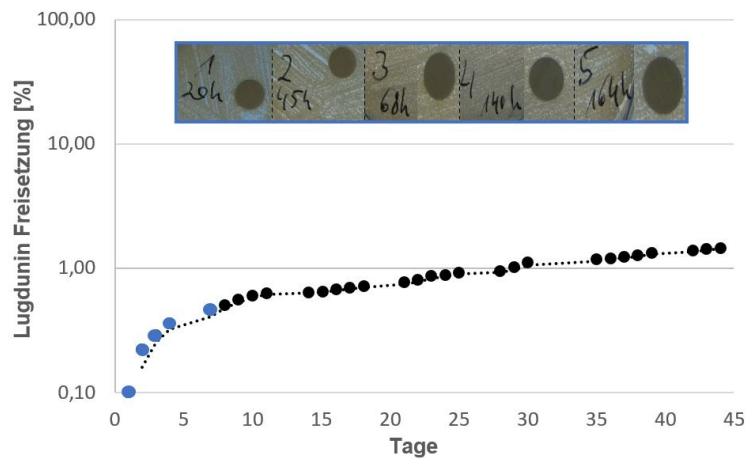
Die Freisetzungskinetik wurde mittels LC-MS Quantifizierung von (**6**) durch Hydrolyse über 45 Tagen in PBS-Puffer ermittelt (Abbildung 30 A). Daneben wurde der Lugdunin-Gehalt zum Endpunkt der Hydrolyse nach 45 Tagen bestimmt (Abbildung 30 B). Der freigesetzte Lugdunin-Gehalt ist mit 1.9 % gering, 97.6 % des Wirkstoffs sind nach 45-tägiger Hydrolyse noch immer in den Partikeln enthalten. Die freigesetzte Wirkstoffmenge ist zu gering, um eine bakterizide Wirkung mit Hemmhofbildung zu erreichen. Die Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse über die ersten fünf Messzeitpunkte (1 bis 5) wiesen ebenfalls keine antimikrobielle Aktivität auf.

Lugdunin (**6**) wurde in PBS-Puffer nicht effektiv aus den Mikrosphärulen freigesetzt, es erfolgte keine Hydrolyse der Mikropartikel, da angenommen wird, dass die Oberfläche durch die starke Verklebung nicht erodiert werden konnte. Dabei fand vermutlich keine hydrolytische Partikelerosion und Wirkstofffreisetzung aus dem Innern der Mikrosphärulen statt, es wurde lediglich das auf der Oberfläche anhaftende Lugdunin von den Partikeln abgelöst bzw. abgewaschen. Dieser Abwaschprozess entspricht quantitativ der Anfangsphase der Hydrolyse (blaue Punkte). Die Logarithmusfunktion der

Freisetzung nähert sich im weiteren Verlauf einer asymptotischen Kapazitätsgrenze an, da das gesamte Lugdunin (6) von der Oberfläche abgewaschen worden war.

Die Interpretation der Ergebnisse steht in Einklang mit den aufgenommenen Bildern des Elektronenmikroskops, bei denen die sichtbare starke Verklebung der Oberfläche und Agglomeration der Partikel beschrieben wurde.

A



B

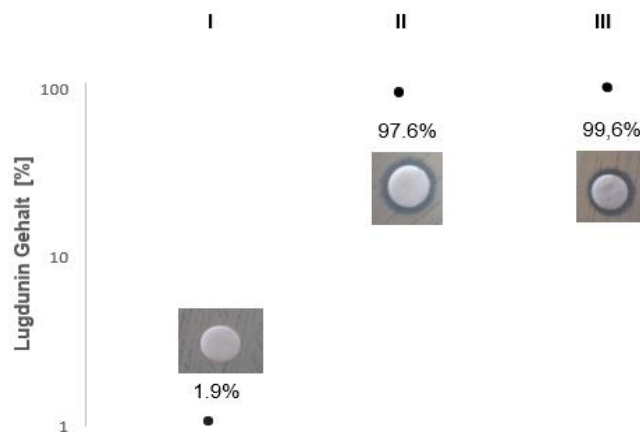


Abbildung 30: (A) Freisetzungskinetik von Lugdunin (6) über 45 Tage aus den Wirkstoff-beladenen PLGA-Mikrosphärülen mit biologischer Aktivitätsbestimmung der ersten sieben Tage (blaue Punkte, Messzeitpunkten nach 20h, 45h, 68h, 140h und 164h). (B) Prozentual freigesetztes Lugdunin mit dazugehöriger biologischer Aktivität zum Endpunkt der Hydrolyse nach 45 Tagen. (I) Freigesetztes Lugdunin über 45 Tage, (II) Lugdunin-Restgehalt nach 45 Tagen (ausgewaschen mit DMSO), (III) nicht hydrolysierte, mit DMSO ausgewaschene beladene Mikrosphärülen zur Kontrolle. Jeweils logarithmische Skala. Die Quantifizierung erfolgte mittels HR-LC-MS unter Integration des Extracted Ion Chromatogram (EIC) und Kalibrierung durch die Reinsubstanz.

3.3.2 Experimenteller Teil zu Lugdunin-beladenen PLGA-Mikrosphären

Viabilitätsassay

Der Assay wurde vom Arbeitskreis Prof. Krajewski/Prof. Wendel in diesem Kooperationsprojekt durchgeführt. Um die zytotoxische Wirkung von Lugdunin (**6**) und D-Trp⁶-Lugdunin (**6b**) zu testen, wurden primäre Humane Coronare-Arterien-Endothel-Zellen (HCAECs) für 24 Stunden mit Lugdunin (**6**) und (**6b**) inkubiert. Hierfür wurden 15.000 Zellen pro Well in eine 48-well Platte ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen von Lugdunin behandelt. Nach 24 Stunden wurde ein Viabilitätsassay durchgeführt (Presto Blue). Lugdunin (**6**) wurde in folgenden Mengen auf die Zellen gegeben: 0.1 µg, 0.2 µg, 0.5 µg, 1.0 µg, 1.5 µg, 2.0 µg pro 15.000 Zellen. Als Kontrolle wurden DMSO (Lösungsmittel für Lugdunin) und Gentamycin genutzt. Für die Kontrolle wurden die entsprechenden Mengen an DMSO bzw. Gentamycin eingesetzt, die dem ansteigenden Volumen der Lugduninlösung entsprachen. Die Ergebnisse wurden im Verhältnis zu unbehandelten Zellen dargestellt, deren Viabilität als 100% angenommen wurde.

Herstellung Lugdunin-beladener PLGA Mikrosphären

Schritt 1: Herstellung der Kontinuierlichen Phase (CP):

In einem 500 mL-Becherglas wurde NaCl (2.7 g) eingewogen und in deionisiertem MilliQ-Wasser (300 mL) vollständig gelöst (0.9%ige NaCl Lösung). Zur Lösung wurden Polyvinylalkohol (1.5 g, 0.5%, PVA Mowiol® 4-88, MW = 31.000, Sigma Aldrich, CAS: 9002-89-5) gegeben und mit 500-600 rpm gerührt. Die Lösung wurde für 5 min auf 80 °C erwärmt und anschließend unter fortwährendem Rühren über 1.5 h auf Raumtemperatur (25-30 °C) abgekühlt. Die klare Lösung wurde filtriert und ein eventueller Wasserverlust ausgeglichen.

Schritt 2: Herstellung der Dispersen Phase (DP):

Lugdunin (**6**) oder (**6b**) (je 25 mg) wurde in einem Falcon Tube (15 mL) eingewogen und in Ethylacetat (13 mL) suspendieren. Zur Suspension wurde PLGA (100 mg, Resomer® RG 502H, Poly(D-, L-Lactid-co-Glycolid, acid terminated, MW 7.000-17.000, Sigma Aldrich, CAS: 26780-50-7) hinzugefügt. Es wurde eine gesättigte Lösung BrijA® L23 (150 µL, ABCR, AB 114091, CAS: 9002-92-0) in EtOAc hergestellt und zur Suspension hinzugegeben. Die hergestellte Mischung wurde für 2 min stark im Schüttler durchmischt. Es bildete sich eine stabile Emulsion.

Schritt 3: Zusammenführen von Disperser- und Kontinuierlicher Phase:

Die Kontinuierliche Phase (300 mL) wurde in einen 500 mL-Rundkolben mit Magnetrührung überführt und mit maximaler Geschwindigkeit gerührt (1200 rpm). Die Disperse Phase wurde erneut stark durchmischt und in eine Spritze mit Kanüle (20 mL) aufgezogen und anschließend über einen Zeitraum von 5 Minuten zur Kontinuierlichen Phase zugetropft. Nach vollständigem Zutropfen wurde weiterhin 1 min bei maximaler Geschwindigkeit gerührt und danach für 3 min bei halber Geschwindigkeit

(600 rpm). Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur mit geringer Geschwindigkeit (300 rpm) gerührt. Es bildet sich eine milchig-trübe Suspension.

Schritt 4: Aufarbeitung der gebildeten Mikrosphärulen:

Die Suspension (300 mL) wurde auf Falcon Tubes (6 x 50 mL) verteilt und zentrifugiert (5 min, maximal rpm). Es bildete sich ein weißes Pellet. Die Pellets wurden in einem Falcon Tube (50 mL) und in deionisiertem Wasser (35 mL) resuspendiert, stark durchmischt und erneut zentrifugiert. Der Waschschrift wurde zwei Mal wiederholt. Das Pellet wurde in einen Kolben (25 mL) überführt, mit deionisiertem Wasser (15 mL) aufgeschlämmt und im Ultraschallbad feinkörnig suspendiert. Es bildet sich eine milchige Suspension, die gefriergetrocknet (lyophilisiert) wurde. Das Produkt wurde als feinkörniges, weißes Pulver erhalten. Ausbeute: 105 mg (85% w/w), Theoretische Wirkstoffbeladung: 20% (w/w).

Die Herstellung unbeladener Mikrosphärulen erfolgte nach der beschriebenen Vorgehensweise ohne Wirkstoffzugabe zur Dispersen Phase in Schritt 2.

Nachweis der Beladung

Die beladenen PLGA-Mikrosphärulen (**6** und **6b**, je 10 mg) wurden in ein Reaktionsgefäß (2 mL) einwogen. Es wurde DMSO (250 µL) zugegeben und die Suspension für eine Stunde im Ultraschallbad extrahiert. Zur Lösung wurde Methanol (1.5 mL) zugegeben und die Mischung für 10 min zentrifugiert (max. rpm). Der Überstand wurde abgenommen und in einen Kolben (5 mL) überführt. Das Methanol wurde vollständig im Vakuum entfernt und das Pulver über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Für den Agardiffusionstest wurde die Probe in DMSO (100 µL) resuspendiert und 10 µL der DMSO-Lösung im Agardiffusionstest von Bernhard Krismer (AK Peschel, Universität Tübingen) gegen *S. aureus* (USA 300 LAC) eingesetzt.

Elektronenmikroskopische (SEM) Charakterisierung der Lugdunin-beladenen PLGA Mikrosphärulen

Die Messungen wurden von Frau Nadler (AK Scheele, IPTC Uni Tübingen) durchgeführt. Zur Vorbereitung der Probe wurde ein schwarzes C-Tape (conductive carbon adhesive tape) auf einen gut gereinigten, runden Aluminium-Probenblock geklebt. Die pulverförmigen Lugdunin-beladenen Mikrosphärulen (**6** und **6b**) wurden mit einem feinen Spatel einschichtig auf das schwarze C-Tape aufgebracht und leicht angedrückt.

Hydrolyse- und Freisetzungsexperiment der Lugdunin-beladenen PLGA Mikrosphärulen

Die Lugdunin-beladenen PLGA-Mikrosphärulen (**6**, 10 mg) wurden in ein Reaktionsgefäß (1.5 mL) eingewogen und mit einer Lösung bestehend aus PBS-Puffer (1 mL, pH = 7.4) und TWEEN 40 (1% v/v) versetzt. Die Suspension wurde bei 37 °C im Schüttler (600 rpm) für 24 h inkubiert. Zur Probenentnahme

wurde die Probe zentrifugiert (10 min, max. rpm) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde erneut in der Hydrolyse-Mischung aus PBS-Puffer und TWEEN 40 resuspendiert und für weitere 24 h inkubiert. Die Probenentnahme fand an fünf Tagen/Woche statt. Die entnommene Probe wurden gefriergetrocknet, in LC-MS Methanol (100 µL) resuspendiert und mittels HR-LC-MS vermessen. Zur Quantifizierung der Lugdunin-Menge wurden die Signale des Extracted Ion Chromatograms (EIC) der beiden auftretenden Lugdunin-Diastereomere integriert, die beide Werte addiert und anhand der vorab bestimmten linearen Kalibrierung der Reinsubstanz ($R^2 = 0,9996$) die Konzentration ermittelt. Für den Agardiffusionstest der ersten sieben Tage wurden die unverdünnten PBS-Hydrolysate (20 µL) direkt auf den Filter pipettiert.

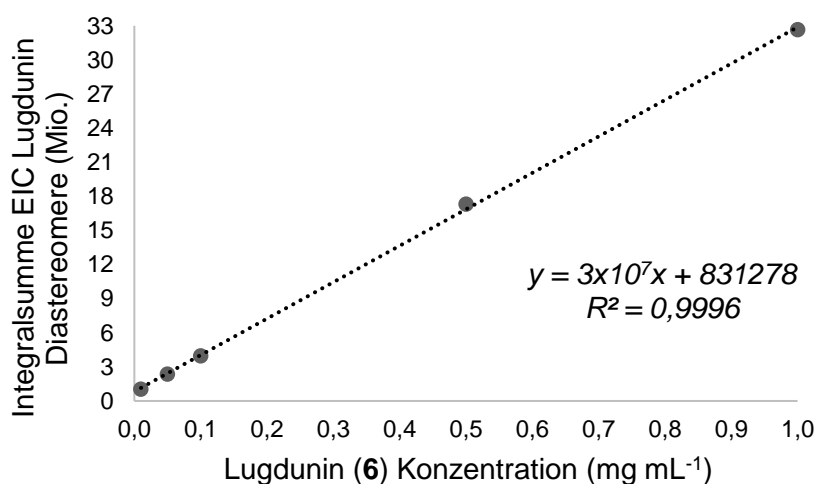


Abbildung 31: Die HPLC-MS Kalibrierung zur Konzentrationsbestimmung von Lugdunin (6) wurde methodisch durch Integration der Signale des Extracted Ion Chromatograms (EIC) der beiden Lugdunin-Diastereomere realisiert. Die Messreihe wurde von J. M. Beltrán-Beleña durchgeführt und die Daten dem Projekt zur Verfügung gestellt.

Tabelle 4: Integralliste der HPLC-MS Kalibrierung zur Konzentrationsbestimmung von Lugdunin (6).

Konzentration mg mL ⁻¹	Integralsumme EIC Diastereomere (Mio.)
1,0	32.653.584
0,5	17.319.339
0,1	3.967.708
0,05	2.370.389
0,01	1.038.746

3.4 Literaturverzeichnis zur Immobilisierung von Lugdunin-Cyclopeptiden

- [1] The prospects of antimicrobial coated medical implants, A. Shahid, B. Aslam, S. Muzammil *et al*, *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials* **2021**, DOI:10.1177/22808000211040304.
- [2] J. R. Lentino, Prosthetic joint infections: Bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clin. Infect. Dis.* **2003**, 36, 1157–1161.
- [3] A. G. Gristina, P. Naylor, Q. Myrvik, Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. *Med Prog Technol.* **1988**, 14, 205–224.
- [4] Antibacterial infection and immune-evasive coating for orthopedic implants, C. Koyomin, W. Y. Jang, K. Park *et al*, *Science Advances* **2020**, 6, 44, eabb0025.
- [5] Surface treatment strategies to combat implant-related infection from the beginning, M. Wang, T. Tang, *Journal of Orthopaedic Translation* **2019**, 17, 42–54.
- [6] Future challenges in the in vitro and in vivo evaluation of biomaterial biocompatibility, J. M. Anderson, *Regen Biomater* **2016**, 3, 73–77.
- [7] Chronic implant-related bone infections-can immune modulation be a therapeutic strategy? E. Seebach, K. F. Kubatzky, *Front Immunol* **2019**, 10, 1724.
- [8] Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion, C. R. Arciola, D. Campoccia, L. Montanaro, *Nat Rev Microbiol* **2018**, 16, 397–409.
- [9] Prosthetic joint infection: diagnosis and management, J. Cobo, J. L. Del Pozo, *Expert Rev Anti Infect Ther* **2011**, 9, 787–802.
- [10] Economic impact of infected total knee arthroplasty, M. Haenle, C. Skripitz, W. Mittelmeier, R. Skripitz, *ScientificWorldJournal* **2012**, 2012:196515.
- [11] Reduction of treatment duration in periprosthetic infection with a fast-track concept is economically not feasible, E. Lieb, T. Hanstein, M. Schuerings, A. Trampuz, C. Perka, *Z. Orthop. Unfall.* **2015**, 153, 618–623.
- [12] Antibacterial coatings of implants: are we missing something? C. L. Romanò, H. Tsuchiya, I. Morelli, A. G. Battaglia, L. Drago, *Bone Joint Res* **2019**, 8, 199–206.
- [13] Antimicrobial coatings of implants in orthopaedics and trauma: a classification proposal in an evolving panorama, C. L. Romanò, S. Scarponi, E. Gallazzi *et al*, *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* **2015**, 10, 157–168.
- [14] Photocatalytic activity, antibacterial effect, and photoinduced hydrophilicity of TiO₂ films coated on a stainless steel substrate, J. C. Yu, W. Ho, J. Lin, H. Yip, P. K. Wong, *Environ Sci Technol.* **2003**, 37:2296e301.
- [15] Decreased bacterial adhesion to surface-treated titanium, B. Del Curto, M. F. Brunella, C. Giordano *et al*, *Int. J. Artif. Organs.* **2005**, 28:718e30.
- [16] *Staphylococcus aureus* adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(L-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers, L. G. Harris, S. Tosatti, M. Wieland, M. Textor, R. G. Richards, *Biomaterials* **2004**, 25, 4135–48.
- [17] Adhesion behaviors on superhydrophobic surfaces, H. Zhu, Z. Guo, W. Liu, *Chem Commun (Camb).* **2014**, 18, 3900–3913.
- [18] *Staphylococcal* biofilm growth on smooth and porous titanium coatings for biomedical applications, A. Braem, L. van Mellaert, T. Matheys *et al*, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2013**, doi:10.1002/jbm.a.34688.
- [19] A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces, A. Campoccia, L. Montanaro, C. R. Arciola, *Biomaterials* **2013**, 34, 8533–8554.
- [20] Biosurfactants: potential applications in medicine, L. Rodrigues, I. M. Banat, J. Teixeira, R. J. Oliveira, *Antimicrob Chemother.* **2006**, 57, 609–618.
- [21] Hard implant coatings with antimicrobial properties, C. Moseke, U. Gbureck, P. Elter, P. Drechsler, A. Zoll, R. Thull *et al*, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2011**, 22, 2711–2720.
- [22] Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. G. Schmidmaier, M. Lucke, B. Wildemann, N. P. Haas, M. Raschke, *Injury.* **2006**, 37, 105–112.

- [23] Multilayer, degradable coating as a carrier for the sustained release of antibiotics: preparation and antimicrobial efficacy in vitro, O. Guillaume, X. Garric, J. P. Lavigne, H. Van Den Berghe, J. J. Coudane, *Control Release* **2012**, 162, 492–501.
- [24] PLGA: a unique polymer for drug delivery, D. N. Kapoor, A. Bhatia, R. Kaur, R. Sharma, G. Kaur, S. Dhawan, *Ther. Deliv.* **2015**, 6, 1, 41–58.
- [25] Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery, J. Nicolas, S. Mura, D. Brambilla, N. Mackiewicz, P. Couvreur, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 1147–1235.
- [26] Polymer degradation and drug delivery in PLGA-based drug-polymer applications: A review of experiments and theories, Y. Xu, C.-S. Kim, D. M. Saylor, D. Koo, *J. Biomed. Mater. Res. Part B* **2017**, 105B, 1692–1716.
- [27] Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) micro and nanoparticles, E. M. Elmowafy, M. Tiboni, M. E. Soliman, *J. Pharm. Investig.* **2019**, 49, 347–380.
- [28] Oberflächenmodifizierte Proteinbeladene Mikropartikel für das Targeting Dendritischer Zellen, Christian Wischke, Dissertation, FU Berlin, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, **2006**.
- [29] Ciprofloxacin-loaded PLGA nanoparticles against cystic fibrosis *P. aeruginosa* lung infections, N. G. Türeli, A. Torge, J. Juntke *et al*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2017**, 117, 363–371.
- [30] A protein/antibiotic releasing poly(lactic-co-glycolic acid)/lecithin scaffold for bone repair applications, X. Shia, Y. Wang, L. Rena, W. Huang, D.-A. Wang, *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, 373, 85–92.
- [31] Gentamicin loaded PLGA nanoparticles as local drug delivery system for the osteomyelitis treatment, U. Posadowska, M. Brzychczy-Wloch, E. Pamula, *Acta of Bioengineering and Biomechanics* **2015**, 17, 3, 41–48.
- [32] The impact of storage conditions upon gentamicin coated antimicrobial implants, N. D. Mullinsa, B. J. Deadman *et al*, *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2016**, 6, 374–381.
- [33] Poly(lactic-co-glycolic) Acid-Lipid Hybrid Microparticles Enhance the Intracellular Uptake and Antibacterial Activity of Rifampicin, S. Maghrebi, P. Joyce, M. Jambhrunkar, N. Thomas, C. A. Prestidge, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, 12, 8030–8039.
- [34] Dry powders based on PLGA nanoparticles for pulmonary delivery of antibiotics: Modulation of encapsulation efficiency, release rate and lung deposition pattern by hydrophilic polymers, F. Ungaro, I. d'Angelo, C. Coletta *et al*, *Journal of Controlled Release* **2012**, 157, 149–159.
- [35] Efficacy of vancomycin-releasing biodegradable poly(lactide-co-glycolide) antibiotics beads for treatment of experimental bone infection due to *Staphylococcus aureus*, S. W. N. Ueng, S.-S. Lin, I.-C. Wang *et al*, *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* **2016**, 11:52.
- [36] Preparation of bioactive and antimicrobial PLGA membranes by magainin II/EGF functionalization, E. Yüksela, A. Karakec, T. T. Demirtas, M. Gümüş, *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, 86, 162–168.
- [37] Antimicrobial Peptides in Biomedical Device Manufacturing, M. Riool, A. de Breij, J. W. Drijfhout, P. H. Nibbering, S. A. J. Zaat, *Front. Chem.* **2017**, 5:63.
- [38] Investigation of antitumor activities of trastuzumab delivered by PLGA nanoparticles, B. Colzani, L. Pandolfi, A. Hoti *et al*, *International Journal of Nanomedicine* **2018**, 13, 957–973.
- [39] Old Dog New Tricks: PLGA Microparticles as an Adjuvant for Insulin Peptide Fragment-Induced Immune Tolerance against Type 1 Diabetes, M. Liu, D. Feng, X. Liang *et al*, *Mol. Pharmaceutics* **2020**, 17, 3513–3525.
- [40] Cost-effectiveness of TYRX absorbable antibacterial envelope for prevention of cardiovascular implantable electronic device infection, G. Kay, E. L. Eby, B. Brown, J. Lyon, S. Eggington, G. Kumar, E. Fenwick, M. Rizwan Sohail, D. J. Wright, *Journal of Medical Economics* **2018**, 21, 3, 294–300.
- [41] Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces, F. Costa, I. F. Carvalho, R. C. Montelaro *et al*, *Acta Biomaterialia* **2011**, 7, 1431–1440.

- [42] Strategies for Antimicrobial Peptides Immobilization on Surfaces to Prevent Biofilm Growth on Biomedical Devices, M. Nicolas, B. Beito, M. Oliveira *et al*, *Antibiotics* **2022**, 11(1), 13.
- [43] Identification of Antimicrobial Peptides and Immobilization Strategy Suitable for a Covalent Surface Coating with Biocompatible Properties, K. Rapsch, F. F. Bier, M. Tadros, M. von Nickisch-Rosenegk, *Bioconjugate Chem.* **2014**, 25, 308–319.
- [44] Immobilization of an antimicrobial peptide on silicon surface with stable activity by click chemistry, J. He, J. Chen, G. Hu *et al*, *J. Mater. Chem. B* **2018**, 6, 68.
- [45] Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Click Chemistry for Bioconjugation, S. I. Presolski, V. P. Hong, M. G. Finn, *Current Protocols in Chemical Biology* **2011**, 3, 153–162.
- [46] Design, synthesis and biological evaluation of ciprofloxacin tethered bis-1,2,3-triazole conjugates as potent antibacterial agents, R. Kant, V. Singh, G. Nath, S. K. Awasthi, A. Agarwal, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, 124, 218–228.
- [47] Clickable Periodic Mesoporous Organosilicas: Synthesis, Click Reactions, and Adsorption of Antibiotics, J. Gao, X. Zhang, S. Xu *et al*, *J. Eur. Chem.* **2014**, 20, 1957–1963.
- [48] Antibacterial ethylene propylene rubber impregnated with silver nanopowder: AgNP@EPR, M. Miranzadeha, M. Z. Kassaeia, L. Sadeghi, M. Sadroddini *et al*, *Nano. Chem. Res.* **2016**, 1, 1–8.
- [49] Antimicrobial vulcanized EPDM rubber articles, J. G. Lever, G. R. Haas, B. Patel, Patent US 2003/0008937 A1, **2003**.
- [50] Experimental Endocarditis Model of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Rat, W. A. Hady, A. S. Bayer, Y. Q. Xiong, *J. Vis. Exp.* **2012**, 64, e3863.
- [51] MRI Visualization of *Staphylococcus aureus*-Induced Infective Endocarditis in Mice, J. Ring, V. Hoerr, L. Tuchscher, M. T. Kuhlmann, B. Löffler *et al*, *PLoS ONE* **2014**, 9(9):e107179.
- [52] A rabbit model of right-sided *Staphylococcus aureus* endocarditis created with echocardiographic guidance, M.-L. Wang, Y. Zhang, M. Fan *et al*, *Cardiovascular Ultrasound* **2013**, 11:3.
- [53] Development of a Mouse Model of Induced *Staphylococcus aureus* Infective Endocarditis, G. W. Gibson, S. C. Kreuser, J. M. Riley *et al*, *Comperative Medicine* **2007**, 57, 6, 563–569.
- [54] Safety and clinical outcomes when utilizing high-dose (> or = 8 mg/kg) daptomycin therapy, P. A. Moise, E. Hershberger, M. I. Amodio-Groton, K. C. Lamp, *Ann. Pharmacother.* **2009**, 43, 1211.
- [55] Clinical outcomes of patients receiving daptomycin for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections and assessment of clinical factors for daptomycin failure: a retrospective cohort study utilizing the Cubicin Outcomes Registry and Experience, G. Sakoulas, J. Brown, K. C. Lamp, L. V. Friedrich, K. C. Lindfield, *Clin. Ther.* **2009**, 31, 1936–1945.
- [56] IUPAC Division IV (Polymer), Project 2002-017-1-400 - Polymerization processes and polymers in dispersed systems.
- [57] Microsphere Technology and Application, D. J. Burgess, A. J. Hickey, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology **2002**, Marcel Dekker Inc. New York, 1783–1794.
- [58] Moderne Pharmazeutische Technologie, C. M. Keck, R. H. Müller, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft* **2009**, Kapitel 1.7 „Polymermikropartikel“, Stefan Scheler (Sandoz AG).
- [59] Biodegradable rifampicin-releasing coating of surgical meshes for the prevention of bacterial infections, J. Reinbold, T. Hierlemann, L. Urich *et al*, *Drug Design, Development and Therapy* **2017**, 11, 2753–2762.
- [60] Development and *in vitro* characterization of poly(lactide-co-glycolide) microspheres loaded with an antibacterial natural drug for the treatment of long-term bacterial infections, J. Reinbold, T. Hierlemann, H. Hinkel *et al*, *Drug Design, Development and Therapy* **2016**, 10, 2823–2832.
- [61] Preparation of Peptide loaded PLGA Microspheres with controlled release characteristics, E. Karavas, E. Koutris, K. Minioti, S. Chaitidou, G. Papanikolaou, T. Mantourlias, Patent US 2017/0281547A1, **2017**.
- [62] Bedienungsanleitung zur Mikropartikel Herstellung, Praktikumsskript Studiengang Pharmatechnik der Hochschule Albstadt-Sigmaringen, **2018**.
- [63] Preparation, *in vitro* release and antibacterial activity evaluation of rifampicin and moxifloxacin-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres, Z. Wen Qiao, Z. Yuan, W. Zhang, D. Wei, N. Hu, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2019**, 47, 1, 790–798.

4) Entwicklung und Anwendung einer biologisch-chemischen Screening-Methodik mit Wirkortermittlung und Dereplikation in Zusammenarbeit mit H. Brötz-Oesterhelt et al.

4.1 Einleitung zum Naturstoff-Screening

Auf der Suche nach neuen antibiotisch wirksamen Substanzen werden gerne, historisch bedingt, Bakterien der Gattung *Streptomyces* (*Actinobakterien*) als Naturstoffproduzenten ausgewählt.^[1] Bei *Streptomyces* handelt es sich hauptsächlich um im Boden lebende Bakterien, die sich durch ihre elaborierten enzymatischen Naturstoffproduktionsmöglichkeiten auszeichnen.^[2] Um sich möglicherweise gegen andere Mikroorganismen ihren Platz in der Mikrofauna zu sichern, sekretieren *Streptomyces* antimikrobielle Naturstoffe in ihre Umgebung. Diese Naturstoffe können unter geeigneten Laborbedingungen gezielt in größerem Maßstab von den Mikroorganismen fermentativ hergestellt werden, um diese anschließend chemisch zu charakterisieren und biologischen Aktivitätsassays zu unterziehen, was im Allgemeinen als „chemisch-biologisches *Streptomyces*-Screening“ bezeichnet wird. Beispiele für wichtige Antibiotika, die ihren Ursprung in Bakterien der Gattung *Streptomyces* haben und auf diesem Weg entdeckt wurden, sind u.a. Cephalosporine (*S. clavuligerus*), Tetracycline (*S. aureofaciens*), Streptomycin (*S. griseus*) und Vancomycin (*S. orientalis*). Diese werden heute größtenteils als Breitbandantibiotika vermarktet und sind damit aus dem klinischen Alltag nicht mehr wegzudenken.^[3]

Am Anfang des Screening-Prozesses steht die Isolierung und Kultivierung der *Streptomyces*-Stämme (s. Abbildung 31). Diese müssen von anderen, ebenfalls im Boden lebenden Mikroorganismen wie Pilzen und gramnegativen Bakterien separiert werden. Für die Selektion der einzelnen Stämme werden unterschiedliche Selektionsmethoden wie Antibiotika-, Filter-, und Nährmedienselektion angewendet. Die vereinzelt Kolonien können nun auf ihr Naturstoff- und Metabolitenspektrum untersucht werden. Die Produktion erfolgt dafür in unterschiedlichen Nährmedien, um Varianz im Metaboliten-Spektrum der sekretierten Naturstoffe zu erhöhen.^[4-8]

Nach erfolgreicher Extraktion der Metaboliten und Naturstoffe aus dem Nährmedium können diese in im biologischen Assay auf Aktivität gegenüber der bevorzugten Indikation z.B. als Antiinfektiva oder Zytostatika untersucht werden. Im Screening-Fokus für neue Antibiotika-Klassen stehen die sogenannten ESKAPE-Pathogene, da diese durch ihre besonders ausgeprägte Neigung zur Resistenzentwicklung schlecht behandelbar sind und schwerwiegende Infektionsverläufe verursachen können. Das Akronym „ESKAPE“ steht dabei für die überwiegend gramnegativen Keime *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter* Spezies. ESKAPE-Pathogene weisen eine breite, vielseitige und effektive Palette an zellulären Abwehrmechanismen auf, die eine gewöhnliche antiinfektive Therapie oft ins Leere

laufen lassen. Außerdem besitzen sie die Fähigkeit Biofilme auszubilden, mit denen sie die Wirksamkeit einer antiinfektiven Antibiotikatherapie oder einer Immunantwort des Körpers herabsetzen.^[9,10]

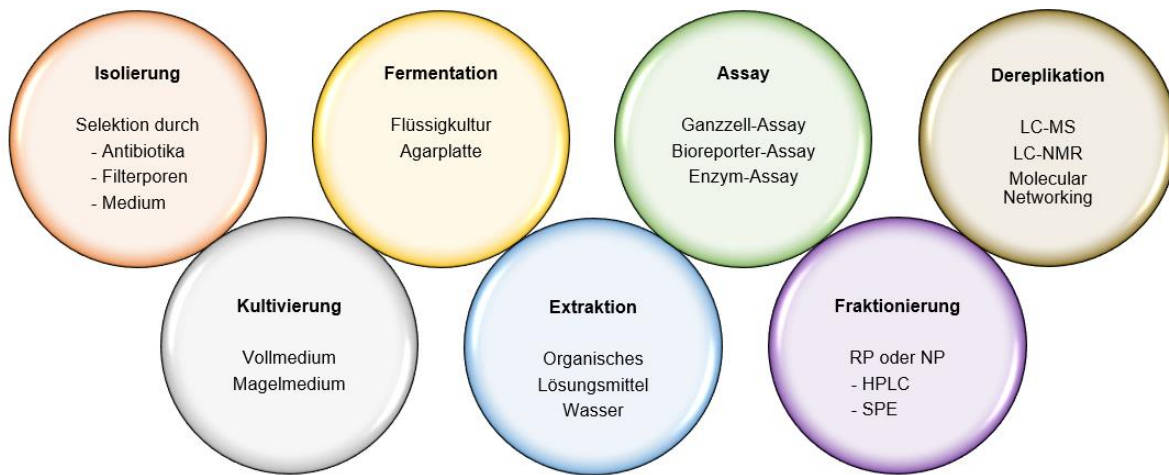


Abbildung 32: Strukturierter Ablauf des *Streptomyces*-Screenings beginnend mit der Isolierung des Bodenbakteriums (links) bis hin zur Identifikation der aktivitäts-auslösenden Extraktkomponente mittels Dereplikation oder Strukturaufklärung (rechts).

Grundsätzlich wird im Rahmen des biologischen Screenings die antimikrobielle Aktivität des Extrakts mit Hilfe eines Ganzzell-Assays auf bakterizide oder bakteriostatische Wirksamkeit, z.B. gegen die zuvor beschriebenen ESKAPE-Keime, untersucht. Daraus folgend kann zur Untersuchung des zellulären Wirkungsmechanismus einer Extraktkomponente ein Bioreporter-Assay (cellular antibiotic biosensors assay) angewendet werden. Für die Etablierung des Assays wurde zu Beginn ein Gesamtgenom-mRNA-Profilierung von *B. subtilis* nach dessen Behandlung mit einer breiten Antibiotikapalette erstellt. Dabei wurden bestimmte Gene und deren Promotoren identifiziert, die besonders sensibel auf DNA-, RNA-, Proteinbiosynthese- oder Zellwand Schädigungen reagieren („Biosensoren“). So zeigt das Gen *yorB* Störungen der DNA-Struktur und -funktion an. Weitere Bioreporter-Gene sind *bmrC*, welches einen Abbruch der ribosomalen Translation (Translationsarrest) anzeigt, *ypuA* und *lial*, die auf verschiedene Arten von Stress auf die Zellwandbiosynthese reagieren und *yppS*, welches eine Störung der RNA-Struktur und -funktion anzeigt. Den ausgewählten bakteriellen Biosensoren-Genen wurde das Reporter-Gen der β -Galaktosidase zur Expression in der Promotorregion vorgeschaltet, um die Aktivität der zuvor genannten Bioreporter-Gene detektierbar zu machen.^[11,13]

Im Falle einer vorliegenden Aktivität im antimikrobiellen Testassay muss die aktivitätsauslösende Substanz im komplexen Extraktionsgemisch einer Bakterienkultur chemisch identifiziert werden. Viele Naturstoffe und Metaboliten sind bereits umfangreich chemisch-analytisch charakterisiert und die gesammelten Daten können in Datenbanken abrufen werden. Der analytische Auswertungs- und Abgleichungsprozess wird dabei als „Dereplikation“ bezeichnet. Falls keine bekannte Substanz im Verlauf der Dereplikation gefunden wird, kann vorerst von einer neuen Substanz ausgegangen werden.

Der Dereplikationsprozess sollte gegenüber einer vollständigen Strukturaufklärung der Substanz eine umfangreiche Zeitersparnis, verknüpft mit einem hohem Probendurchsatz, ermöglichen und eine valide Aussage zur aktivitätsauslösenden Extraktkomponente liefern.^[14-17]

Um die komplexen Gemische von bakteriellen Extrakten analytisch zu vereinfachen, werden diese zunächst im Rahmen einer Vorfraktionierung chromatographisch grob in kleinere Einheiten unterteilt. Die Vorfraktionierung, auch Mikrofraktionierung genannt, kann mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) oder Solid-phase extraction (SPE) realisiert werden. Die Vorfraktionierung erfolgt zumeist in Mikrotiterplatten (MTP) mit einer Lochung von 48-, 96- oder 192- Wells. Als feste Phase der Chromatographie können sowohl normalphasige- (NP) als auch reversphasige (RP)-Materialien eingesetzt werden.^[18-22]

Nach erneuter biologischer Testung werden die aktiven Fraktionen der MTP mittels chemischer Analytik auf die aktivitätsauslösende Substanz(en) untersucht. Dabei stellt die hochauflösende, HPLC-gekoppelte Massenspektrometrie (HR-LC-MS) als schnelle, hochpräzise Methode mit hohem Probendurchsatz die bevorzugte Analysemethode dar. Die wichtigsten analytischen Kriterien zur Substanzidentifikation sind dabei das UV-VIS Spektrum, das hochauflösende Massenspektrum u.a. zur Ermittlung von Summenformel sowie der MS-MS Fingerprint. Die Identifikation einer Substanz erfolgt durch Abgleich der gemessenen spektralen und spektrometrischen Daten mit Datenbankeinträgen bereits verifizierter Substanzen (*in-house* oder *web-based*).^[23-29] Neben der hochauflösenden Massenspektrometrie kommt auch die HPLC-gekoppelte NMR-Spektroskopie zur Identifikation von Metaboliten und Naturstoffen in bakteriellen Extrakten vermehrt zum Einsatz. Die Vorteile dieser Methode sind: Erhalt struktureller Informationen, keine Probenzerstörung, Quantifikation der Komponente ist möglich, verhältnismäßig einfache Probenvorbereitung. Als nachteilig erweist sich die geringere Auflösung und verminderte Sensitivität, die eine größere Menge an Probenmaterial voraussetzt.^[30-34]

Neuartige bioinformatische Ansätze wie Molecular Networking (MN) und *In-silico*-Fragmentierung ermöglichen es, massenspektrometrische MS-MS Fragmentierungsdatensätze von Extrakten zu analysieren und die Daten visuell aufzubereiten, um Beziehungen innerhalb der Fragmentierungsmuster darzustellen. Dazu werden die Fragmentionen eines gesamten Extrakts mit online verfügbaren Substanz-Datenbanken abgeglichen und nach ihren fragmentativen Übereinstimmungen hin gruppiert. Da das MS-MS-Spektrum mit der chemischen Struktur des Naturstoffs oder Metaboliten direkt verknüpft ist, kann mittels Molecular Networking eine Gruppierung der Moleküle nach struktureller Ähnlichkeit erfolgen. Neben der Möglichkeit, MS-MS-Spektren zu gruppieren, kann Molecular Networking auch zur Dereplikation eingesetzt werden. Im fragmentativen *in-silico* Ionen-Cluster können Knotenpunkte und potenzielle Nachbarn ermittelt werden, die chemisch gesehen strukturelle Analoga (Derivate) darstellen. Wird ein ganzes Netzwerk an Fragment-Ionen eines Naturstoffs und seiner Derivate im Extrakt nachgewiesen, so ist mit hoher Wahrscheinlichkeit der Naturstoff im Extrakt identifiziert.^[35-38]

4.2 Wirkort-basiertes Screening durch Bioreporter und chemische Dereplikation der aktiven Naturstoffe – *Cell Chemical Biology*

Titel:

“Bioreporters for direct mode of action-informed screening of antibiotic producer strains”

Autoren:

K. W. Wex, **J. S. Saur**, F. Handel, N. Ortlieb, V. Mokeev, A. Kulik, T. H. J. Niedermeyer, Y. Mast, S. Grond, A. Berscheid, H. Brötz-Oesterhelt.

Journal:

Cell Chemical Biology **2021**, 28 (8), 1242–1252.

Digital Object Identifier:

DOI: 10.1016/j.chembiol.2021.02.022.

Keywords:

Biomarker • Aktivitätsgesteuertes Bioreporter Screening • Antibiotika • Naturstoffe • Antibiotika produzierende Stämme (*Actinomyceten*) • Hochauflösende Massenspektrometrie • Dereplikation

Zusammenfassung:

Bedeutung der indikativen Bioreporter in B. subtilis

Im Rahmen der Studie wurden zunächst von K. Wex, A. Berscheid und H. Brötz-Oesterhelt *et al.* genetische Biomarker verifiziert, die gegenüber dem Einfluss von Antibiotika eine Stressempfindlichkeit aufweisen. Als Modellorganismus wurde dafür das grampositive Bakterium *B. subtilis* eingesetzt, das sich durch seinen besonders gute Antibiotika-Suszeptibilität und die damit verbundene hohe Detektionssensitivität auszeichnet. Die indikativen Gene (bezeichnet als „Biosensoren“ oder „Bioreporter“) adressieren dabei die wichtigsten molekularen Wirkorte im Bakterium. So spiegelt die Expression des *yorB*-Gens den Einfluss auf die DNA-Synthese und -Struktur wider. Weitere indikative Gene und deren Promotoren sind das *bmrC*-Gen (Translationsarrest), *ypuA* und *liaI* (Zellwand Stress) sowie *yppS* (RNA Polymerase Inhibition). Die fünf genannten Gene wurden in deren Promotorregionen mit dem *lacZ*-Gen (β -Galaktosidase Gen) fusioniert und in den *amyE*-Lokus von *B. subtilis* 1S34 integriert.

Das Bioreporter-Panel wurde zur Methodvalidierung von K. Wex *et al.* mit 90 reinen antibakteriellen Substanzen versetzt. Alle fünf Bioreporter zeigten dabei selektive Induktion, die als blau-gefärbter Ring detektiert wurde. Zur weiteren Validierung wurde im Rahmen einer Verdünnungsreihe die reinstoffbezogene, minimale Sensitivität bestimmt. Dabei lösen bereits subinhibitorische Antibiotika-Konzentrationen eine Induktion der Bioreporter aus. Im nächsten Schritt der Validierungskampagne

wurden sechs bekannte *Actinomyceten*-Stämme („Produzentenstämme“) mit eindeutig charakterisierter Antibiotikaproduktion auf Agarplatten kultiviert und direkt nach deren Sporulation gegen das Bioreporter-Panel getestet. Alle Produzentenstämme zeigten die erwartete Aktivität mit Promotorinduktion.

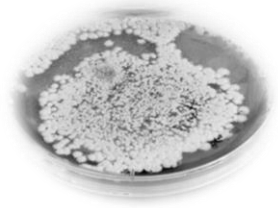
Screening und Dereplikation

Das Screening zielte darauf ab, uncharakterisierte, nicht angereicherte oder fraktionierte *Actinomyceten*-Stämme (~500) aus der Tübinger- und Göttinger Stammsammlung im Bioreporter-Assay zu analysieren, wobei ca. 230 Stämme von J. S. Saur bearbeitet wurden. Alle *Actinomyceten*-Stämme wurden in zwei Nährmedien angezogen und zunächst auf Wachstumshemmung im Ganzzellassay gegenüber *B. subtilis* 1S43-Wildtyp und *E. coli* ATCC25922 getestet. Von den getesteten 500 Stämmen zeigten 270 Aktivität gegen *B. subtilis* 1S34, wobei alle Stämme, die gegen *E. coli* ATCC25922 Aktivität aufwiesen, auch Aktivität gegenüber *B. subtilis* zeigten. Die aktiven Stämme wurden gegen das gesamte Bioreporter-Panel getestet. 94 Stämme (36%) zeigten dabei eine reproduzierbare Induktion von mindestens einem Bioreporter. Eine beobachtete Mehrfachinduktion deutet entweder auf die Produktion mehrerer Substanzen oder einen dualen Wirkungsmechanismus der produzierten Substanz hin. Die erhaltenen Kandidaten wurde anschließend in größerem Maßstab kultiviert, extrahiert, fraktioniert und mittels HR-LC-MS analysiert (Dereplikation). Im Falle einer dereplizierten Substanz wurde die bekannte Verbindung und ihre literaturbekannten Eigenschaften mit dem erwarteten Bioreporter-Signal abgeglichen, sodass das Ergebnis von zwei voneinander unabhängigen Methoden (chemische Analytik und biologischer Aktivitäts- und Wirkort-Assay) verifiziert wurde. Die Dereplikation mittels HPLC-MS wurde von J. S. Saur durchgeführt. Insgesamt wurden 28 Stämme und deren antimikrobielle Substanzen übereinstimmend derepliziert, zu denen u. a. das Thiocyclopeptid Berninamycin, das aromatische Polyketidantibiotikum FD-594, der tRNA Syntheseinhibitor Albomycin δ_1 , die Ionophore Monactin, Boromycin und Omomycin sowie eine bisher schlecht charakterisiert Antibiotikagruppe bestehend aus Lobophorin A und E sowie Griseorhodin A gehören. Neben antibakteriell wirksamen Substanzen wurden *Actinomyceten*-typische Sekundärmetabolite gefunden, die aber keine Induktion der fünf Bioreporter zeigten.

Neben der Dereplikation wurden die Bioreporter von K. Wex zur Untersuchung der divergierenden Antibiotikaproduktion in verschiedenen Medien eingesetzt. Es zeigte sich beispielsweise, dass Stamm Tü2401 auf Agarplatte kultiviert, Lindamycin produzierte, wohingegen in Flüssigkultur Albomycin δ_1 gebildet wurde. Außerdem wurde eine konzentrationsabhängige Mehrfachinduktion durch das Antibiotikum Chartreusin bei Stamm Gö/K16/4 entdeckt (Polypharmakologie). Abschließend wurde gezeigt, dass die Bioreporter-Toolbox zur Detektion synergistischer Effekte zweier Antibiotika geeignet ist, was im Rahmen von Co-Kultivierungsexperimenten angewendet werden könnte.

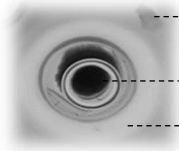
Isolierte *Actinomyceten*-Stämme auf Agarplatte:

- 1) Kultivierung von ca. 500 Stämme aus der Tübinger und Göttinger Stammsammlung auf zwei Nährmedien.
- 2) Es wurde ein ca. 1 Cent großer Agarblock aus der bewachsenen Agarplatte ausgestanzt.



Durchführung des Ganzzell- und Bioreporter-Assay:

- 1) Schematischer Aufbau des Bioreporter-Assays.



----- *B. subtilis* 1S43-Wildtyp und *E. coli* ATCC25922 als Testkeime.

----- Ausgestanzter Agarblock in der Mitte.

----- Inhibitionszone um den Agarblock bei vorhandener Aktivität.

- 2) *Actinomyceten*-Stämme mit antimikrobieller Aktivität:
 - 270 aktive Stämme, davon 94 Stämme mit reproduzierbarer Induktion.
 - 230 inaktive Stämme wurden vom Screening ausgeschlossen.



Scale-up Fermentation und Aufarbeitung der Extrakte der 94 selektierten Screening-Kandidat.



Erneuter biologischer Aktivitätstest des organischen Vollextraktes:

Aktivität vorhanden: Erfolgreiche Extraktion, fortfahren mit der Identifikation der aktiven Komponente.

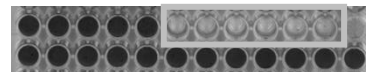
Falls keine Aktivität ist: Erneute Extraktion mit Wasser, um polare Substanz nicht zu übersehen.



NP SPE Fraktionierung (96-Well Platte) des aktiven organischen Vollextraktes.

- 1) Identifikation der aktiven Fraktionen durch erneuten Aktivitätstest.
- 2) Anfertigen eines 96-Well Duplikates für die LC-MS Analytik.

Aktive Fraktionen



Dereplikation

- 1) HR-LC-MS Messung der aktiven Fraktionen (Duplikat) und des organischen Vollextraktes.
- 2) Manuelle Dereplikation gegen Datenbanken - Suchkriterien:
 - UV-VIS Spektrum und Retentionszeit.
 - Massenspektrum, Summenformel und Isotopenmuster.
 - MS-MS Fragmentierungsmuster.



Valide Identifikation der aktivitätsauslösenden Substanz im Extrakt von 28 Stämmen anhand zweier voneinander unabhängiger Methoden.

Abbildung 33: Übersicht zum *Actinomyceten*-Screening unter Kombination zweier Methoden: 1) Bioreporter-Assay zur Bestimmung des molekularen Wirkungsmechanismus und 2) chemische Dereplikation (Extraktion, Fraktionierung und LC-MS Analytik mit Datenbankabgleich).

4.3 Literaturverzeichnis zum Naturstoff-Screening

- [1] Renaissance in antibacterial discovery from *actinomycetes*, R. H. Baltz, *Current Opinion in Pharmacology* **2008**, *8*, 557–563.
- [2] Diversity of nonribosomal peptide synthetase and polyketide synthase gene clusters among taxonomically close *Streptomyces* strains, H. Komaki, K. Sakurai, A. Hosoyama *et al.*, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 6888.
- [3] Antibiotics produced by *Streptomyces*, R. Emerson de Lima Procópioa, I. Reis da Silva, M. Kassawara Martinsa, J. Lúcio de Azevedoa, J. Magali de Araújo, *Braz. J. infect. dis.* **2012**, *5*, 16, 466–471.
- [4] Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity, H.B. Bode, B. Bethe, R. Höfs, A. Zeeck, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 619–627.
- [5] Isolation, identification, and characterization of *Streptomyces* metabolites as a potential bioherbicide, A. B. Bo, J. D. Kim, Y. S. Kim, H. T. Sin, H. J. Kim, B. Khaitov *et al.*, *PLoS ONE* **2019**, *9*, 14, e0222933.
- [6] Screening and identification of novel isolate *Streptomyces sp.*, NLKPB45 from Nellore coastal region for its biomedical applications, B. Sudha Kalyani, P. S. Krishna, K. Sreenivasulu, *Saudi Journal of Biological Sciences* **2019**, *26*, 7, 1655–1660.
- [7] Screening and Isolation of a Novel Polyene-Producing *Streptomyces* Strain Inhibiting Phytopathogenic Fungi in the Soil Environment, P. Heung-Soon, N. Hee-Ju, K. Seung-Hoon, C. Si-Sun, K. Eung-Soo, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2021**, *9*, 692340.
- [8] Isolation, Screening, and Identification of Novel Isolates of *Actinomycetes* from India for Antimicrobial Applications, S. Vineeta, H. Shafiul, S. Harshita, V. Jyoti, V. Kumari, S. Rajbir, J. Arshad, C. K. M. Tripathi, *Frontiers in Microbiology* **2016**, *7*, 01921.
- [9] Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review, M. S. Mulani, E. E. Kamble, S. N. Kumkar, M. S. Tawre, K. R. Pardesi, *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 539.
- [10] Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens, D. M. P. De Oliveira, B. M. Forde, T. J. Kidd, P. N. A. Harris, M. A. Schembri, S. A. Beatson, D. L. Paterson, M. J. Walker, *Clin. Microbiol. Rev.* **2020** *33*, e00181–19.
- [11] Novel Whole-Cell Antibiotic Biosensors for Compound Discovery, A. Urban, S. Eckermann, B. Fast, S. Metzger, M. Gehling, K. Ziegelbauer, H. Rübsamen-Waigmann, C. Freiberg, *Applied and Environmental Microbiology* **2007**, *73*, 20, 6436–6443.
- [12] Cyclic Cystine-Bridged Peptides from the Marine Sponge *Clathria basilana* Induce Apoptosis in Tumor Cells and Depolarize the Bacterial Cytoplasmic Membrane, A. Mokhesi, F. Stuhldreier, K. W. Wex, A. Berscheid *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2941–2952.
- [13] Rhodomyrton (rom) is a membrane-active compound, J. Saising, M. T. Nguyen, T. Härtner, P. Ebner *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2018**, *5*, 1860, 1114–1124.
- [14] The relevance of chemical dereplication in microbial natural product screening, L. Carrano, F. Marinelli, *Journal Applied Bioanalysis* **2015**, *1*, 2, 55–67.
- [15] Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? J. Hubert, J.-M. Nuzillard, J.-H. Renault, *Phytochemistry Reviews* **2017**, *16*, 1, 55–95.
- [16] Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process, S. P. Gaudencio, F. Pereira, *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 6, 779–810.
- [17] Screening Strategies to Identify New Antibiotics, M. S. Butler, M. A. Cooper, *Current Drug Targets* **2012**, *13*, 373–387.
- [18] Explorative Solid-Phase Extraction (E-SPE) for Accelerated Microbial Natural Product Discovery, Dereplication, and Purification, M. Månsson, R. K. Phipps, L. Gram, M. H. G. Munro, T. O. Larsen, K. F. Nielsen, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1126–1132.
- [19] Normal phase HPLC-based activity profiling of non-polar crude plant extracts-acetylcholinesterase inhibiting guttiferones from *Montrouzieria cauliflora* as a case study, A. Landreau, S. Bertrand, C.

- Simoès-Pires, L. Marcourt *et al.*, *Natural Product Research - Formerly Natural Product Letters* **2016**, *30*, 24, 2754–2759.
- [20] Pre-fractionated Microbial Samples-The Second Generation Natural Products Library at Wyeth, M. M. Wagenaar, *Molecules* **2008**, *13*, 1406–1426.
- [21] A Simple Method for High-Throughput Extract Prefractionation for Biological Screening, D. R. Appleton, A. D. Buss, M. S. Butler, *Chimia* **2007**, *6*, 61, 327–331.
- [22] Bioactivity Profiling Using HPLC/Microtiter-Plate Analysis: Application to a New Zealand Marine Alga-Derived Fungus, *Gliocladium sp.*, G. Lang, M. I. Mitova, G. Ellis *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 621–624.
- [23] A Mass Spectrometry Based Metabolite Profiling Workflow for Selecting Abundant Specific Markers and Their Structurally Related Multi-Component Signatures in Traditional Chinese Medicine Multi-Herb Formulae, J. Houriet, P.-M. Allard, E. F. Queiroz, L. Marcourt *et al.*, *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 578346.
- [24] Dereplicating and Spatial Mapping of Secondary Metabolites from Fungal Cultures *in Situ*, V. P. Sica, H. A. Raja, T. El-Elimat *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1926–1936.
- [25] Target and non-target screening strategies for organic contaminants, residues and illicit substances in food, environmental and human biological samples by UHPLC-QTOF-MS, R. Diaz, M. Ibanez, J. V. Sancho, F. Hernandez, *Anal. Methods* **2012**, *4*, 196–209.
- [26] Identification and dereplication of endophytic Colletotrichum strains by MALDI TOF mass spectrometry and molecular Networking, M. Barthélemy, V. Guérineau, G. Genta-Jouvet *et al.*, *Scientific Reports* **2020**, *10*, 19788.
- [27] Targeted Dereplication of Microbial Natural Products by High-Resolution MS and Predicted LC Retention Time, J. Chervin, M. Stierhof, M. H. Tong *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 1370–1377.
- [28] Combined LC/UV/MS and NMR Strategies for the Dereplication of Marine Natural Products, I. Pérez-Victoria, J. Martín, F. Reyes, *Planta Med* **2016**, *82*, 857–871.
- [29] Strategies for dereplication of natural compounds using high-resolution tandem mass spectrometry, T. Kinda, O. Fiehn, *Phytochemistry Letters* **2017**, *21*, 313–319.
- [30] HSQC–TOCSY Fingerprinting for Prioritization of Polyketide- and Peptide-Producing Microbial Isolates, L. Buedenbender, L. J. Habener, T. Grkovic *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 4, 957–965.
- [31] Efficient identification of fungal antimicrobial principles by tandem MS and NMR database, M.-S. Lee, Y.-L. Yang, C.-Y. Wu *et al.*, *Journal of Food and Drug Analysis* **2019**, *27*, 860–868.
- [32] Combination of Pseudo-LC-NMR and HRMS/MS-Based Molecular Networking for the Rapid Identification of Antimicrobial Metabolites From *Fusarium petroliphilum*, A. Alfattani, L. Marcourt, V. Hofstetter *et al.*, *Front. Mol. Biosci.* **2021**, *8*:725691.
- [33] Accelerating Metabolite Identification in Natural Product Research: Toward an Ideal Combination of Liquid Chromatography-High-Resolution Tandem Mass Spectrometry and NMR Profiling, in Silico Databases, and Chemometrics, J.-L. Wolfender, J.-M. Nuzillard, J. J. van der Hoof, *et al.*, *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 704–742.
- [34] Recent advances and new strategies in the NMR-based identification of natural products, M. Halabalaki, K. Vougianniopoulou, E. Mikros, A. Leandros Skaltsounis, *Current Opinion in Biotechnology* **2014**, *25*, 1–7.
- [35] Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication, P.-M. Allard, T. Pèresse, J. Bisson *et al.*, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 3317–3323.
- [36] Bioactivity-Based Molecular Networking for the Discovery of Drug Leads in Natural Product Bioassay-Guided Fractionation, L-F. Nothias, M. Nothias-Esposito, R. da Silva *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 4, 758–767.
- [37] Molecular Networking as a Dereplication Strategy, J.-Y. Yang, L. M. Sanchez, C. M. Rath *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1686–1699.
- [38] Molecular networking as a dereplication strategy for monitoring metabolites of natural product treated cancer cells, Y.-L. Gao, Y.-J. Wang, H.-H. Chung, K.-C. Chen, T.-L. Shen, C.-C. Hsu, *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2019**, 1–8.

5) Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden von Julian S. Saur die selbständig und unter Mitwirkung in Kooperationsprojekten bearbeiteten und publizierten Ergebnisse zusammenfassend dargestellt. Als Themengebiete umfasst die vorliegende Dissertation die Fest- und Flüssigphasen-Peptidsynthese, eine Struktur-Wirkungs-Beziehungsstudie, die kovalente und nicht-kovalente Wirkstoff-Immobilisierung sowie das antimikrobielle Screening von Naturstoffen.

Im Themenfeld Fest- und Flüssigphasen-Peptidsynthese wurde von Julian S. Saur für das Cyclopeptid Lugdunin (**6**) eine neue Syntheseroute etabliert. Die Synthese umfasste die Vorfertigung des Thiazolidin-Heterozyklus als Aminosäurebaustein, der in die standardisierte Fmoc-Festphasen-Peptidsynthese eingeführt werden konnte. Die neu etablierte, effiziente Syntheseroute wurde zur umfangreichen Lugdunin-Derivatisierung von über 50 Lugdunin-Analoga im multi-milligramm Maßstab eingesetzt, wobei von Julian S. Saur 35 der 50 Analoga synthetisiert wurden. Die verbleibenden 15 Analoga wurden von Nadine A. Schilling und Sebastian N. Wirtz synthetisiert. Die daraus abgeleiteten Struktur-Wirkungs-Beziehungen zeigten, dass sowohl der Thiazolidin-Baustein als auch die Aminosäuren Tryptophan und Leucin essential für die antimikrobielle Aktivität von (**6**) gegen *S. aureus* USA300 (MRSA) sind. Als zusätzlich unabdingbar erwiesen sich der zugrundeliegende D-L Rhythmus sowie die Bewahrung des gesamthydrophoben Charakters von (**6**). Vereinzelt ließ sich das Verzweigungsmuster hydrophober Aminosäuren ohne nennenswerte Einbußen hinsichtlich der antimikrobiellen Aktivität variieren. (**6**) wies gegenüber polaren Modifikationen eine geringe Toleranz auf, da bereits das Einführen von einer H-Brücken-bildenden, polaren Gruppe einen vollständigen Aktivitätsverlust hervorrief. Die Ermittlung der antimikrobiellen Aktivität der synthetischen Analoga wurde in Kooperation mit Dr. Bernhard Krismer (AK Peschel) durchgeführt. Die Ergebnisse der neu etablierten Syntheseroute sowie der SAR-Studie von Lugdunin (**6**) wurden von Julian S. Saur als Hauptautor in einer selbstständig ausgearbeiteten Publikation veröffentlicht.

Für die Sekretion und Eigenresistenzentwicklung von *S. lugdunensis* gegenüber (**6**) wurde für ein Kooperationsprojekt mit dem AK Peschel ein Lugdunin Analoga von Julian S. Saur synthetisiert und dieses analytisch charakterisiert. Im Rahmen dieser Kooperation wurden vom Kooperationspartner spezifische ABC-Transporter (LugIEFGH) identifiziert, deren Gene in direkter Nachbarschaft zum NRPS-Biosynthese-Operon lagen. Dabei spielen die Membranproteine LugEF eine dominante Rolle in der Lugdunin-Sekretion, wohingegen LugGH vornehmlich für die Eigenresistenzentwicklung verantwortlich ist, indem es (**6**) aus der Lipiddoppelschicht aufnimmt. Die Rolle von LugI bleibt unklar. Die Ergebnisse wurden vom Kooperationspartner publiziert, wobei Julian S. Saur als Coautor aufgenommen wurde.

Neben der Festphasen-Peptidsyntheseroute (SPPS) wurde von Julian S. Saur der Versuch zur Ausarbeitung einer alternativen Flüssigphasen-Peptidsyntheseroute (LPPS) für (**6**) unternommen, um dadurch größere Mengen des Cyclopetides herstellen zu können. Der gewählte Reaktionsweg sollte (**6**)

im Up-scale in sieben Stufen mit kurzen Kopplungszeiten liefern und ohne chromatographische Intermediat-Aufreinigung auskommen. Dabei sollten alle Nebenprodukte und Reagenzien durch wässrige Extraktionsschritte entfernt werden. Zuvor sollte die aktivierte Aminosäure und das gebildete Dibenzofulvalen der Fmoc-Entschützung mit wasserlöslichen Hilfsreagenzien abgefangen und dadurch für den wässrigen Extraktionsschritt zugänglich gemacht. (6) konnte nach Abschluss der Reaktionssequenz massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Allerdings traten nach saurer Entschützung produktnahe Kontaminationen auf, die nicht mittels abschließender medium-pressure Chromatographie entfernt werden konnten. (6) konnte von Julian S. Saur über diese Syntheseroute nur in schlechter Reinheit als Rohprodukt erhalten werden.

Die kovalente Immobilisierung von (6) mittels „Click-Chemie“ (1,3-dipolare Cycloaddition) sollte in einem Kooperationsprojekt mit der FH Reutlingen (Bäuerle/Prof. Lorenz) umgesetzt werden. In dem Projekt wurde ein propargyliertes Lugdunin-Analoga von Julian S. Saur hergestellt und dem Kooperationspartner im vergrößerten Maßstab (20 mg) zur Immobilisierung auf VTMS-gecrafteten EP(D)M-Kautschukformulierungen zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse der kovalenten Immobilisierung von (6) konnten nicht im zeitlichen Rahmen der Dissertation erhalten werden.

Für die nicht-kovalenten Immobilisierung von (6) wurde von Julian S. Saur das Konzept der Wirkstofffreisetzung aus biologisch abbaubaren PLGA-Mikropartikel in einem Kooperationsprojekt mit der UKT Tübingen (Prof. Wendel/Prof. Krajewski) realisiert. Zur Validierung der drug-release Strategie im Tier-Modell wurde das *in-vivo* Endokarditis-Modell anvisiert. Vorab durchgeführte toxikologische Untersuchungen im AK Prof. Wendel/Prof. Krajewski an Human-koronaren, arteriellen-Endothelzellen (HCAECs) und humanen, adulten Kardiomyozyten (HACM AC16) zeigten keine toxikologischen Effekte von (6) im Viabilitätsassay. Die Herstellung von Lugdunin-beladenen PLGA-Mikrosphärulen wurde von Julian S. Saur mittels S/O/W-Emulsion und anschließender Lösungsmittelverdunstung/Extraktion realisiert. Die dabei gebildeten Mikrosphärulen wurden von Frau Nadler (IPTC Uni Tübingen) durch elektronenmikroskopische Bildgebung auf deren Partikelmorphologie und Oberflächenstruktur untersucht. Die Partikel wiesen eine inhomogene Größenverteilung mit starker Oberflächenverklebung auf. Die Untersuchung des biologischen Abbaus der beladenen Mikrosphärulen durch Hydrolyse-Experimente unter physiologischen Bedingungen und Wirkstofffreisetzung über 45 Tage wurden von Julian S. Saur durchgeführt und zeigten, dass lediglich ~2% Lugdunin aus den hergestellten PLGA-Mikrosphärulen im untersuchten Zeitraum freigesetzt wurde. Die mit diesem Verfahren hergestellten Lugdunin-beladenen PLGA-Mikrosphärulen wiesen eine starke Oberflächenverklebung auf, wodurch sich der Wirkstoff nicht aus den Mikropartikeln freisetzen ließ.

Das antimikrobielle Naturstoff-Screening von *Actinomyceten*-Stämmen wurde von Julian S. Saur in einer Kooperation mit der Abteilung „Mikrobielle Wirkstoffe“ (K. Wex/Prof. H. Brötz-Oesterhelt) durchgeführt. Im Rahmen des Projekts sollten ein Wirkungsmechanismus-basiertes Reporter-gen-Screening etabliert und potenzielle Kandidaten chemisch mittels HR-LC-MS derepliziert werden. Hierfür wurden von Julian S. Saur ca. 230 *Actinomyceten*-Stämme auf zwei unterschiedlichen Nährmedien kultiviert und von K. Wex mittels direkter Testmethodik gegen *B. subtilis* auf antimikrobielle Aktivität untersucht werden. Potenzielle Stammkandidaten und deren gebildetes Sekundärmetabolitenspektrum wurden von K. Wex gegen die biologischen Reportergene *yorB* (DNA-Synthese-/Struktur), *bmrC*

(Translationsarrest), *ypuA* und *liaI* (Zellwand Stress), *yppS* (RNA Polymerase Inhibition) auf Aktivität untersucht. Von den Stämmen mit aktiver Bioreporter-Induktion wurden von Julian S. Saur organische Extrakte der bewachsenen Agarplatte angefertigt und eine bioactivity-guided Mikrofraktionierung (NP-SPE) durchgeführt. Die Validierung der aktiven Substanz durch Julian S. Saur erfolgte mittels HR-LC-MS durch mindesten vier voneinander unabhängige Parameter (t_R , UV, m/z, MS/MS, Isotopenmuster etc.) gegen Datenbanken. Die abschließende empirische Validierung wurde durch Abgleich des dereplizierten Substanzkandidaten mit dessen, im Bioreporter-Assay gefundenem, molekularen Wirkungsmechanismus in Übereinstimmung mit bereits publiziertem Datenmaterial vorgenommen. Es wurde unter Federführung von K. Wex eine gemeinsame Publikation ausgearbeitet, bei der Julian S. Saur als Zweitautor auftritt.

5.2 Summary

In this thesis, the independent work and the published results of Julian S. Saur as well as his participation in collaborative projects are summarized. The subject areas of this dissertation include solid and liquid phase peptide synthesis, a structure-activity relationship study, covalent and non-covalent drug immobilization, and antimicrobial screening of natural products.

In the field of solid and liquid phase peptide synthesis, Julian S. Saur established a new synthesis route for the cyclopeptide lugdunin (**6**). The synthesis involved the pre-synthesis of the thiazolidine heterocycle as an amino acid building block that could be incorporated into the standard protocol of Fmoc solid-phase peptide synthesis (SPPS). The newly established, efficient synthetic route was used for the large-scale lugdunin derivatization of over 50 lugdunin analogues on a multi-milligram scale, with 35 of the 50 analogues being synthesized by Julian S. Saur. The remaining 15 analogues were synthesized by Nadine A. Schilling and Sebastian N. Wirtz. The derived structure-activity relationships showed that the thiazolidine building block, the amino acids tryptophan and leucine are essential for the antimicrobial activity of (**6**) against *S. aureus* USA300 (MRSA). The underlying D-L rhythm and the preservation of the overall hydrophobic character of (**6**) proved to be additionally indispensable. In isolated cases, the branching pattern of hydrophobic amino acids could be varied without significant losses in terms of antimicrobial activity. (**6**) showed a low tolerance towards polar modifications; the introduction of a polar group that provides hydrogen bonding resulted in a complete loss of activity. The antimicrobial activity of the synthetic analogues was determined in cooperation with Dr. Bernhard Krismer (AK Peschel). The results of the newly established synthesis route and SAR study of lugdunin were published by Julian S. Saur as the main author in an independently prepared publication.

For the secretion and self-resistance development of *S. lugdunensis* towards (**6**), a lugdunin analog was synthesized and analytically characterized by Julian S. Saur for a cooperation project with the group of Prof. Peschel. As part of this cooperation, the cooperation partner identified specific ABC transporters (LugIEFGH) whose genes were in the immediate vicinity of the NRPS biosynthesis operon. The membrane proteins LugEF played a dominant role in lugdunin secretion, whereas LugGH was primarily responsible for the development of self-resistance by taking up (**6**) from the lipid bilayer. The role of LugI remained unclear. The results were published by the cooperation partner, with Julian S. Saur being included as a co-author.

In addition to the solid-phase peptide synthesis (SPPS) route, Julian S. Saur attempted to develop an alternative liquid-phase peptide synthesis (LPPS) route for (**6**) to be able to produce larger amounts of the cyclopeptide. The chosen reaction pathway should deliver the up-scale of (**6**) in seven steps with short coupling times and without chromatographic intermediate purification. All by-products and reagents should be removed by aqueous extraction steps. Beforehand, the activated amino acid and the formed dibenzofulvalene of the Fmoc deprotection should be trapped with water-soluble auxiliary reagents and thereby made accessible for the aqueous extraction step. (**6**) could be detected by mass spectrometry after completion of the reaction sequence. However, after acidic deprotection, product-related contaminations occurred that could not be removed by subsequent medium-pressure

chromatography. Julian S. Saur could obtain (6) in poor purity as crude product using this synthetic route for (6).

The covalent immobilization of (6) using "click chemistry" (1,3-dipolar cycloaddition) was implemented in a cooperation project with the Reutlingen University (Bäuerle/Prof. Lorenz). In the project, a propargyl analogue of (6) was prepared by Julian S. Saur and made available to the collaborating partner on a larger scale (20 mg) for immobilization on VTMS-crafted EP(D)M rubber formulations. The results of the covalent immobilization of (6) could not be obtained within the time frame of the dissertation.

For the non-covalent immobilization of (6), Julian S. Saur realized the concept of drug release from biodegradable PLGA microparticles in a cooperation project with UKT Tübingen (Prof. Wendel/Prof. Krajewski). To validate the drug-release strategy in the animal model, the *in-vivo* endocarditis model was targeted. Toxicological tests carried out in the working group of Prof. Wendel/Prof. Krajewski on human coronary arterial endothelial cells (HCAECs) and human adult cardiomyocytes (HACM AC16). The results did not show any toxicological effects of (6) in the viability assay. The production of lugdunin-loaded PLGA microspheres was realized by Julian S. Saur using S/O/W emulsion and subsequent solvent evaporation/extraction. The resulting microspheres were examined by Mrs. Nadler (IPTC Uni Tübingen) using electron microscopic imaging (SEM) to get insights into the particle morphology and surface structure. The particles had a non-uniform size distribution with strong surface adhesion. The investigation of the biodegradation of the loaded microspheres was faced by Julian S. by hydrolysis experiments under physiological conditions and drug release over 45 days. The results showed that only ~2% lugdunin was released from the manufactured PLGA microspheres in the investigated period. The lugdunin-loaded PLGA microspheres produced by this method exhibit strong surface adhesion, which means that the active substance cannot be released from the microparticles.

The antimicrobial natural product screening of *actinomycete* strains was carried out by Julian S. Saur in cooperation with the department "Microbial Agents" (K. Wex/Prof. H. Brötz-Oesterhelt). The aim of the project was to establish a mode of action-based reporter gene screening and to chemically dereplicate potential candidates using HR-LC-MS. For this purpose, Julian S. Saur cultivated around 230 *actinomycete* strains on two different culture media. K. Wex examined potential strain candidates for antimicrobial activity using direct test methods against *B. subtilis* and tested their spectrum of secondary metabolites for activity against the biological reporter genes *yorB* (DNA synthesis/structure), *bmrC* (translation arrest), *ypuA* and *lial* (cell wall stress), *yppS* (RNA polymerase inhibition). Julian S. Saur prepared organic extracts from the overgrown agar plate of the strains with active bioreporter induction and performed bioactivity-guided microfractionation (NP-SPE). The active substance was validated by Julian S. Saur using HR-LC-MS and at least four independent parameters (tR, UV, m/z, MS/MS, isotope pattern, etc.) to dereplicate the substance through database search. The final empirical validation was carried out by comparing the dereplicated substance candidate with its molecular mechanism of action found in the bioreporter assay in accordance with previously published data. A joint publication was prepared under the leadership of K. Wex, with Julian S. Saur appearing as second author.

5.3 Ausblick

Synthese und Struktur von Lugdunin (6)

Eine vertiefende SAR-Studie mit einer logisch-sinnvollen Derivatisierung der Thiazolidin-Einheit von Lugdunin (6) könnte einen detaillierten Einblick in deren wichtige Funktionalität aufzeigen. Auch hinsichtlich der beiden observierten diastereomeren Formen, die mutmaßlich ihren Ursprung im Thiazolidin-Heterozyklus haben, wäre ein vollständiges theoretisches Verständnis des Interkonvergenzmechanismus wegweisend. Ebenso bedarf es einer empirischen Abklärung des Membran-translozierenden molekularen Protonentransportmechanismus von (6) und der Frage, ob es sich dabei um einen Carrier- oder Channel-Mechanismus handelt.

Weitere Derivatisierung von Lugdunin (6)

Weitere Versuche der Derivatisierung von Lugdunin (6) könnten durchgeführt werden, um die Wirksamkeit des Cyclopetides auf ein breites Spektrum an Pathogenen auszudehnen. Dabei könnten folgende Konzepte eine wichtige Rolle spielen: Die Konjugation mit einer weiteren Antibiotika Klasse z.B. Fluorquinolon (Dual Targeting), trojanisches Pferd mittels Siderophor-Konjugat zur Adressierung gramnegativer Pathogene oder die Derivatisierung mit einem post-operativ abspaltbaren, photolabilen Linker nach Implantat Einsetzung könnten dabei erweiterte Anwendungsformen des Lugdunin Moleküls als Antibiotikum darstellen.

Flüssigphasen-Peptidsynthese (LPPS) von Lugdunin (6)

Im Bereich der Flüssigphasen-Peptidsynthese von (6) sollten Optimierungen der einzelnen Kopplungsschritte hinsichtlich Kopplungszeit, Lösungsmittelmischung sowie Minimierung der Emulsionsbildung während der wässrigen Extraktion vorgenommen werden. Die saure globale Entschützung bedarf einer grundlegenden Optimierung hinsichtlich kontrollierter Unterdrückung der produktnahen Kontaminationen. Ebenso muss die abschließende chromatographische Trennung mittels MPLC grundsätzlich überarbeitet werden und, wenn möglich, auf eine up-scale präparative HPLC zurückgegriffen werden.

Toxizität von Lugdunin (6)

Zur besseren Einschätzung der Toxizität von (6) müssen ausgeweitete, quantitative Toxizitätsstudien gegenüber eukaryotischen Ziellinien durchgeführt werden. Die Ergebnisse der Toxizitätsstudien könnten genutzt werden, um mögliche Applikationen z.B. in Kosmetika oder medizintechnischen Produkten zu unterstützen.

Immobilisierung von Lugdunin (6)

Die nicht-kovalente Immobilisierung von (6) in PLGA Mikrosphärulen muss in Form einer optimierten Wiederholung mit Überarbeitung und Verbesserung der Mikrosphärulen-Synthese ohne Oberflächenverklebung durchgeführt werden. Eine Qualitätsprüfung muss mittels SEM erfolgen. Ebenso müssen die physiologischen Hydrolyseexperimente überarbeitet werden, da keine Hydrolyse unter den in der Dissertation beschriebenen Bedingungen mit den hergestellten Mikrosphärulen erreicht

wurde. Nach Lösung dieser Problemstellung könnte der Einsatz der Lugdunin-beladenen PLGA Mikrosphärulen im *in-vivo* Endokarditis-Modell erwogen, umgesetzt und publiziert werden.

Actinomyceten-Screening

Im *Streptomyceten*-Screening wäre eine schnellere und automatisierte SPE-Mikrofraktionierung hilfreich, die Fraktionierung erfolgte bisher manuell. Zusätzlich wäre eine automatisierte, leicht bedienbare und robuste Software zur Auswertung und Dereplikation der HR-LC-MS Daten sinnvoll. Zum Abgleich zwischen Spektrum und Datenbank sollten möglichst viele Parameter wie RT, UV, MS, MS/MS, Isotopenmuster, MOA einbezogen werden. Am besten würde sich eine selbst gemessene *in-house* Datenbank anbieten, da die gemessenen Spektren gerätespezifisch sind.

6) Literaturverzeichnis zur allgemeinen Einleitung „Spannungsfelder moderner Antibiotikaforschung – ein Überblick“

- [1] Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations, The Review on Antimicrobial Resistance chaired by J. O'Neill, **2014**, UK Government.
- [2] The Evolving Role of Chemical Synthesis in Antibacterial Drug Discovery, P. M. Wright, I. B. Seiple, A. G. Myers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 8840–8869.
- [3] 10 x '20 Progress-Development of New Drugs Active Against Gram-Negative *Bacilli*: An Update From the Infectious Diseases Society of America, H. W. Boucher, G. H. Talbot, D. K. Benjamin Jr., J. Bradley, R. J. Gidycz, R. N. Jones, B. E. Murray, R. A. Bonomo, D. Gilbert, *Clin. Infect. Dis.* **2013**, 56, 1685–1694.
- [4] A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides, K. Browne, S. Chakraborty, R. Chen, M. D. P. Willcox, D. St. Clair Black, W. R. Walsh, N. Kumar, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 7047.
- [5] Changes in antibiotic resistance in animals, C. E. Moore, *Science* **2019**, 365, 6459, 1251–1252.
- [6] Antibiotika: Falsche Einnahme begünstigt Resistenzen, Pressemeldung des Sächsischen Apothekerverband e.V. vom 01.02.2012.
- [7] Hürden und Aussichten neuer antimikrobieller Konzepte in Forschung und Entwicklung, F. Kloß, S. Gerbach, *Bundesgesundheitsblatt* **2018**, 61, 595–605.
- [8] Bulletin of the World Health Organization (WHO), Genf, **2001**.
- [9] Deutsches Ärzteblatt **2023**, Jg. 120, Heft 11, Ausgabe B, S. 405.
- [10] Multi-institute analysis of carbapenem resistance reveals remarkable diversity, unexplained mechanisms, and limited clonal outbreaks, G. C. Cerqueira, A. M. Earl, C. M. Ernst, Y. H. Grad *et al*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2017**, 114 (5) 1135–1140.
- [11] Notes from the Field: Pan-Resistant New Delhi Metallo-Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* - Washoe County, Nevada, 2016, C. L. R. Todd, J. Kiehlbauch, M. Walters, A. Kallen, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **2017**, 66:33.
- [12] Die stille Pandemie, Interview von Rolf Müller im Deutschland Funk, dazugehöriger online Artikel von Kathrin Baumhöfer vom 21.04.2022, www.deutschlandfunkkultur.de/multiresistente-keime-neue-medikamente-und-antibiotika-100.html, abgerufen am 16.11.2022.
- [13] Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? M. E. A. De Kraker, A. J. Stewardson, S. Harbarth, *PLoS Med* **2016** 13(11): e1002184.
- [14] Recent Progress in Natural-Product-Inspired Programs Aimed to Address Antibiotic Resistance and Tolerance, Y. Abouelhassan, A. T. Garrison, H. Yang, A. Chávez-Riveros, G. M. Burch, R. W. Huigens III, *J. Med. Chem.* **2019**, 62, 17, 7618–7642.
- [15] Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians, G. Kapoor, S. Saigal, A. Elongavan, *J Anaesthesiol Clin Pharmacol.* **2017**, 33(3), 300–305.
- [16] Beta-Lactam Antibiotics, M. Marín, F. Gudiol, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2003**, 21, 42-55. On the Mechanism of Action of Vancomycin: Inhibition of Peptidoglycan Synthesis in *Gaffkya Homari*, W. P. Hammes, F. C. Neuhaus, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1974**, 6, 722–728.
- [17] Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. I. Chopra, M. Roberts, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, 65, 232–260.
- [18] Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications, R. Leclercq, *Clin. Infect. Dis.* **2002**, 34, 482–492.
- [19] Aminoglycosides: Activity and Resistance, M. P. Mingeot-Leclercq, Y. Glupczynski, P. M. Tulkens, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43, 727–737.
- [20] A New Orally Active Rifamycin, N. Maggi, C. R. Pasqualucci, R. Ballotta, P. Sensi, *Rifampicin: Chemotherapy* **2004**, 11, 285–292.
- [21] Mechanism of Action of Quinolone Drugs, M. Palumbo, B. Gatto, G. Zagotto, G. Palú, *On the Trends Microbiol.* **1993**, 1, 232–235.

- [22] Trimethoprim, A Sulphonamide Potentiator, S. R. M. Bushby, G. H. Hitchings, *J. Pharmacol. Chemother.* **1968**, 33, 72–90.
- [23] Generation of Reactive Oxygen Species Mediated by 1-Hydroxyphenazine, a Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*, S. Sinha, X. Shen, F. Gallazzi, Q. Li, J. W. Zmijewski, J. R. Lancaster, K. S. Gates, *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, 28, 175–181.
- [24] Origins and Evolution of Antibiotic Resistance, J. Davies, D. Davies, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, 74, 417–433.
- [25] Multidrug Efflux Pumps: Structure, Function and Regulation, D. Du, X. Wang-Kan, A. Neuberger, H. W. van Veen, K. M. Pos, L. J. V. Piddock, B. F. Luisi, *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, 16, 523–539.
- [26] Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance, A. H. Delcour, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2009**, 1794, 808–816.
- [27] Hang Chu, Vortrag vom 26.07.2017, Gruppenseminar Arbeitskreis P. Baran, La Jolla.
- [28] Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014, D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 3, 629–661.
- [29] Counting on natural products for drug design, T. Rodrigues, D. Reker, P. Schneider, G. Schneider, *Nature Chemistry* **2016**, 8, 531–541.
- [30] Thinking Outside the Bug: Molecular Targets and Strategies to Overcome Antibiotic Resistance, A. Monserrat-Martinez, Y. Gambin, E. Sieracki, *Int J Mol Sci.* **2019**, 20(6), 1255.
- [31] Where Do Recent Small Molecule Clinical Development Candidates Come From? D. G. Brown, J. Boström, *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 21, 9442–9468.
- [32] What makes a good drug target? I. Gashaw, P. Ellinghaus, A. Sommer, K. Asadullah, *Drug Discovery Today* **2011**, 16, 23/24, 1337–1347.
- [33] Biodiversity and natural products based therapeutics in Medicine, Frank Petersen, Novartis, Vortrag im Swiss Biodiversity Forum, gehalten am 15.01.2016 in Bern/Schweiz.
- [34] Medicinal Chemistry: The modern drug discovery process, Erland Stevens, Pearson, **2014** (Buch).
- [35] Principles of early drug discovery, J. P. Hughes, S. Rees, S. B. Kalindjian, K. L. Philpott, *Br J Pharmacol.* **2011**, 6, 162, 1239–1249.
- [36] Using Fragment-Based Approaches to Discover New Antibiotics, B. Lamoree, R. E. Hubbard, *SLAS Discov.* **2018**, 6, 23, 495–510.
- [37] Discovery and preclinical development of new antibiotics, D. Hughes, A. Karlén, *Ups J Med Sci.* **2014**, 2, 119, 162–169.
- [38] The σ and π Holes. The Halogen and Tetrel Bondings: Their Nature, Importance and Chemical, Biological and Medicinal Implications, Á. M. Montaña, *ChemistrySelect* **2017**, 2, 9094.
- [39] Sigma-Hole Interactions in Anion Recognition, J. Y. C. Lim, P. D. Beer, *Chem* **2018**, 4, 4, 731–783.
- [40] The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action, R. B. Silverman, M. W. Holladay, Elsevier, **2014** (Buch).
- [41] Unusual Amino Acids in Medicinal Chemistry, M. A. T. Blaskovich, *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 10807–10836.
- [42] Natural-Products-Inspired Use of the *gem*-Dimethyl Group in Medicinal Chemistry, T. T. Talele, *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 6, 2166–2210.
- [43] Salt formation to improve drug solubility, A. T. M. Serajuddin, *Adv Drug Deliv Rev.* **2007**, 59, 7, 603–616.
- [44] Prodrugs: design and clinical applications, J. Rautio, H. Kumpulainen, T. Heimbach *et al*, *Nat Rev Drug Discov* **2008**, 7, 255–270.
- [45] Prodrug approach: An overview of recent cases, V. Abet, F. Filace, J. Recio, J. Alvarez-Builla, C. Burgos, *Eur J Med Chem.* **2017**, 127, 810–827.
- [46] The Prodrug Approach: A Successful Tool for Improving Drug Solubility, D. Hartmann Jornada, G. F. dos Santos Fernandes, D. E. Chiba, T. R. Ferreira de Melo, J. L. dos Santos, M. C. Chung, *Molecules* **2016**, 1, 21, 42–73.
- [47] Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv Drug Deliv Rev.* **2001**, 46, 3–26.

- [48] Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution, C. A. Lipinski, *Drug Discov Today Technol.* **2004**, *4*, 337–41.
- [49] Re-assessing the rule of 5, two decades on, A. Mullard, *Nat Rev Drug Discov* **2018**, *17*, 777.
- [50] Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics, M. Miethke, M. Pieroni, T. Weber, R. Müller *et al*, *Nat Rev Chem* **2021**, *5*, 726–749.
- [51] U.S. Food & Drug Administration (FDA), www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/drug-development-process, abgerufen am 22.02.2022.
- [52] Klinische Studien: Was muss ich wissen?, dkfz. Krebsinformationsdienst, Deutsches Krebsforschungszentrum in der Helmholtz-Gemeinschaft. www.krebsinformationsdienst.de/service/iblatt/iblatt-klinischestudien.pdf, abgerufen am 17.11.2022.
- [53] Factsheet klinische Studien – Phasen der klinischen Forschung, FOPI. Forum der pharmazeutischen Industrie in Österreich. www.fopi.at/_v3/wp-content/uploads/2019/02/Factsheet-Phasen-der-klinischen-Forschung.pdf, abgerufen am 17.11.2022.
- [54] Key Concepts of Clinical Trials: A Narrative Review, C. A. Umscheid, D. J. Margolis, C. E. Grossman, *Postgraduate Medicine* **2011**, *5*, 123, 194–204.
- [55] Thinking Outside the Box-Novel Antibacterials To Tackle the Resistance Crisis, M. Lakemeyer, W. Zhao, F. A. Mandl, P. Hammann, S. A. Sieber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 14440.
- [56] Insights into Newer Antimicrobial Agents Against Gram-negative Bacteria, N. Taneja, H. Kaur, *Microbiology Insights* **2016**, *9*, 9–19.
- [57] Evolving medicinal chemistry strategies in antibiotic discovery, A. C. Pawlowski, J. W. Johnson, G. D. Wright, *Current Opinion in Biotechnology* **2016**, *42*, 108–117.
- [58] Isolating “Uncultivable” Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment, T. Kaeberlein, K. Lewis, S. S. Epstein, *Science* **2002**, *296*, 1127.
- [59] Microbial Scout Hypothesis and Microbial Discovery, S. Buerger, A. Spoering, E. Gavrish, C. Leslin, L. Ling, S. S. Epstein, *Applied and Environmental Microbiology* **2012**, *78*(9), 3229–3233.
- [60] Growing Unculturable Bacteria, E. J. Stewart, *Journal of Bacteriology* **2012**, *194*(16), 4151–4160.
- [61] Rationalizing the generation of broad spectrum antibiotics with the addition of a positive charge, N. Haloi, A. K. Vasan, E. J. Geddes, A. Prasanna, P.-C. Wen, W. W. Metcalf, P. J. Hergenrother, E. Tajkhorshid, *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 15028–15044.
- [62] Predictive compound accumulation rules yield a broad-spectrum antibiotic, M. Richter, B. Drown, A. Riley *et al*, *Nature* **2017**, *545*, 299–304.
- [63] How to Enter a Bacterium: Bacterial Porins and the Permeation of Antibiotics, J. D. Prajapati, U. Kleinekathöfer, M. Winterhalter, *Chemical Reviews* **2021**, *121* (9), 5158–5192.
- [64] Permeability rules for antibiotic design, S. Jones, *Nat Biotechnol* **2017**, *35*, 639.
- [65] A Synthetic Dual Drug Sideromycin Induces Gram-Negative Bacteria To Commit Suicide with a Gram-Positive Antibiotic, R. Liu, P. A. Miller, S. B. Vakulenko, N. K. Stewart, W. C. Boggess, M. J. Miller, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 9, 3845–3854.
- [66] A Trojan-Horse Strategy Including a Bacterial Suicide Action for the Efficient Use of a Specific Gram-Positive Antibiotic on Gram-Negative Bacteria, I. J. Schalk, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 9, 3842–3844.
- [67] Siderophore-antibiotic conjugates: exploiting iron uptake to deliver drugs into bacteria, I. J. Schalk, *Clinical Microbiology and Infection* **2018**, *24*, 801–802.
- [68] Bacterial Iron Uptake Pathways: Gates for the Import of Bactericide Compounds, I. J. Schalk, G. L. A. Mislin, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 4573–4576.
- [69] Targeted Antibiotic Delivery: Selective Siderophore Conjugation with Daptomycin Confers Potent Activity against Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii* Both in Vitro and in Vivo, M. Ghosh, P. A. Miller, U. Möllmann *et al*, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 4577–4583.
- [70] Bifunctional antimicrobial conjugates and hybrid antimicrobials, P. Klahn, M. Brönstrup, *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34*, 832.

- [71] Antibiotic Hybrids: The Next Generation of Agents and Adjuvants against Gram-Negative Pathogens? R. Domalaon, T. Idowu, G. G. Zhanel, F. Schweizer, *Clin Microbiol Rev* **2018**, 2, 31, 77–117.
- [72] Murepavadin antimicrobial activity against and resistance development in cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates, M. Díez-Aguilar, M. Hernández-García, M. I. Morosini *et al*, *Antimicrob Chemother.* **2021**, 76(4):984–992.
- [73] Murepavadin: a new antibiotic class in the pipeline, I. Martin-Loeches, G. E. Dale, A. Torres, *Expert Rev Anti Infect Ther* **2018**, 16, 259–268.
- [74] Folded synthetic peptides and other molecules targeting outer membrane protein complexes in Gram-negative bacteria, J. A. Robinson, *Front Chem* **2019**, 7, 45.
- [75] Drug discovery strategies to outer membrane targets in Gram-negative pathogens, D. G. Brown, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2016**, 24, 6320–6331.
- [76] Comparative Metagenomics of Microbial Communities, S. G. Tringe, C. von Mering, A. Kobayashi *et al*, *Science* **2005**, 308, 554.
- [77] Cloning large natural product gene clusters from the environment: piecing environmental DNA gene clusters back together with TAR, J. H. Kim Z. Feng, J. D. Bauer *et al*, *Biopolymers* **2010**, 93, 833.
- [78] Antibacterial drug discovery in the resistance era, E. D. Brown, G. D. Wright, *Nature* **2016**, 529, 336.
- [79] A roadmap for natural product discovery based on large-scale genomics and metabolomics, J. R. Doroghazi, J. C. Albright, A. W. Goering *et al*, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10, 963.
- [80] A chemocentric view of the natural product inventory, C. T. Walsh, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, 11, 620.
- [81] Assembly and clustering of natural antibiotics guides target identification, C. W. Johnston, M. A. Skinnider, C. A. Dejong *et al*, *Nat. Chem. Biol.* **2016**, 12, 233.
- [82] An automated Genomes-to-Natural Products platform (GNP) for the discovery of modular natural products, C. W. Johnston, M. A. Skinnider, M. Wyatt *et al*, *Nat Commun* **2015**, 6, 8421.
- [83] 2020 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis, World Health Organization (WHO), Genf, **2021**.
- [84] The PEW Charitable Trust, NGO, Philadelphia, **2021**, www.pewtrusts.org/en/topics/antibiotics.
- [85] Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. D. M. P. De Oliveira, B. M. Forde, T. J. Kidd, P. N. A. Harris, M. A. Schembri, S. A. Beatson, D. L. Paterson, M. J. Walker, *Clin Microbiol Rev* **2020**, 33, 181–219.

7) Epilog

7.1 Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Journalen

Synthetic Lugdunin Analogues Reveal Essential Structural Motifs for Antimicrobial Action and Proton Translocation Capability

N. A. Schilling, A. Berscheid, J. Schumacher, J. S. Saur, M. C. Konnerth, S. N. Wirtz, J. M. Beltrán-Beleña, A. Zipperer, B. Krismer, A. Peschel, H. Kalbacher, H. Brötz-Oesterhelt, C. Steinem, S. Grond, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 9234–9238. DOI: 10.1002/anie.201901589.

Secretion of and Self-Resistance to the Novel Fibupeptide Antimicrobial Lugdunin by Distinct ABC Transporters in *Staphylococcus lugdunensis*

S. Krauss, A. Zipperer, S. N. Wirtz, J. S. Saur, M. C. Konnerth, S. Heilbronner, B. O. Torres Salazar, S. Grond, B. Krismer, A. Peschel, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2021**, *65*:e01734–20. DOI: 10.1128/AAC.01734-20.

Distinct Lugdunins from a New Efficient Synthesis and Broad Exploitation of Its MRSA-Antimicrobial Structure

J. S. Saur, S. N. Wirtz, N. A. Schilling, B. Krismer, A. Peschel, S. Grond, *Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, *64* (7), 4034–4058. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c02170.

Bioreporters for direct mode of action-informed screening of antibiotic producer strains

K. W. Wex, J. S. Saur, F. Handel, N. Ortlieb, V. Mokeev, A. Kulik, T. H. J. Niedermeyer, Y. Mast, S. Grond, A. Berscheid, H. Brötz-Oesterhelt, *Cell Chemical Biology* **2021**, *28* (8), 1242–1252. DOI: 10.1016/j.chembiol.2021.02.022.

Ψ-footprinting approach for the identification of protein synthesis inhibitor producers

F. Handel, A. Kulik, K. W. Wex, A. Berscheid, J. S. Saur, A. Winkler, D. Wibberg, J. Kalinowski, H. Brötz-Oesterhelt, Y. Mast, *NAR Genomics and Bioinformatics* **2022**, *4* (3), 1–15. DOI: 10.1093/nargab/lqac055.

Neue zyklische Verbindungen, Verfahren zu deren Herstellung und die Verwendung dieser zyklischen Verbindungen in kosmetischen Zubereitungen (Patent)

S. N. Wirtz, J. S. Saur, B. Krismer, S. Grond, **2022**, EP 4 001 296 A1 und WO 2022/106667 A1.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

MeCN	Acetonitril
Äquiv.	Äquivalent
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BPC	Base peak chromatogram
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CP	continuous phase
CuAAC	copper catalyzed alkyne-azide cycloaddition
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DBV	Dibenzofulvalen
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAPA	3-Aminopropyldimethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	disperse phase
EDC·HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid
EIC	Extracted ion chromatogram
EP(D)M	Ethylen-propylen-dien-Kautschuk
ESI	Elektronenspray Ionisation
EtOAc	Ethylacetat
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FtsZ	Bakterielles zytoskelettäres Protein
HACM	human adult cardiac myocytes
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HCAEC	human coronary artery endothelial cells
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high resolution mass spectrometry

IM	inner membran
LPPS	liquid phase peptide synthesis
LPS	Lipopolysaccharid
MeOH	Methanol
MOA	mechanism of action
MPLC	medium-pressure liquid chromatography
MTP	Mikrotiterplatte
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NRPS	nonribosomal peptides synthetases
OM	outer membrane
PKS	polyketide synthases
PLA	poly lactic acid
PLGA	poly(lactic-glycolic) acid
PMMA	Polymethylmethacrylat
Prep. HPLC	preparative HPLC
PS	Polystyrol
R&D	research and development
RP	reversed phase
ROP	ring opening polymerization
rt	Raumtemperatur
SAR	Structure-activity relationship
SEM	single electron microscopy
S/O/W	solid/organic/water emulsion
SPPS	solid-phase peptide synthesis
TAEA	Tris(2-aminoethyl)amin
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	Trifluoessigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Thz	Thiazolidin
TIPS	Triisopropylsilan
t _r	Retentionszeit
VTMS	Vinyltrimethylsilan

7.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Stephanie Grond für die gute Betreuung, die Freiheiten in der wissenschaftlichen Arbeit sowie die hilfreichen Diskussionen.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei allen anderen Doktoranden, Masteranden, Bacheloranden für das gute, angenehm-unterhaltsame Klima im Arbeitskreis. Besonderer Dank gilt Nadine, Patrik und Martin, die mich schon in meiner Zeit als Master Praktikant sehr gut bereut haben. Vielen Dank an Pascal für die NMR-Messungen, Sebastian für die gute Zusammenarbeit und Büronachbarschaft, Chema für seine Dienste im Labor und am Massenspektrometer sowie den Bacheloraden Florian, Hannes, Max und Daniele für ihre Unterstützung.

Im Weiteren möchte ich mich bei Frau Nadler für die elektronenmikroskopischen Messungen, bei Markus Kramer und Priska Kolb für die NMR Messungen sowie Frau Bettina Kappler im PC-Sekretariat für die Unterstützung bei verwaltungstechnischen Fragen im Promotionskolleg bedanken.

Besonderer Dank gilt Katharina für die hervorragende Kooperation und die gemeinsam publizierten Ergebnisse sowie Bernhard Krismer für das Durchführen der biologischen Assays und die Diskussion der Resultate.

Ein großes Dankeschön gilt ebenso dem Promotionskolleg Tübingen - Reutlingen für die gemeinsamen Seminare und die großartige abgehaltene Winterschool auf der Insel Reichenau sowie die Kooperation mit Tim Bäuerle und Günter Lorenz.

Zuletzt möchte ich mich bei Herrn Prof. Wendel und Frau Prof. Krajewski für die aufgebaute Kooperation bedanken.

7.4 Lebenslauf

7.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Julian Siegfried Saur, geboren am 11.09.1990 in Freudenstadt an Eides statt,

- dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe verfasst, andere als die in ihr angegebene Literatur nicht benutzt und dass ich alle ganz oder annähernd übernommenen Textstellen sowie verwendete Grafiken, Tabellen und Auswertungsprogramme kenntlich gemacht habe. Außerdem versichere ich, dass die vorgelegte elektronische mit der schriftlichen Version der Dissertation übereinstimmt und die Abhandlung in dieser oder ähnlicher Form noch nicht anderweitig als Promotionsleistung vorgelegt und bewertet wurde.

Esslingen am Neckar, den 01.05.2023

————— (Julian S. Saur)