

Deutsche Bundesstiftung für Umwelt
Programm „Nachhaltige Pharmazie“

Abschlussbericht 2018

„Entwicklung eines umweltverträglichen
Antibiotikums“
AZ 30839/01

Dr. Christoph Leder

M.Sc. Morten Suk

M.Sc. Stefanie Lorenz

Prof. Dr. Klaus Kümmerer

Institut für Nachhaltige Chemie und Umweltchemie
Leuphana Universität Lüneburg

12.11.2018

Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen des Projektes wurden mit Hilfe von computergestützten Methoden, durch gezielte molekulare Strukturveränderungen in Kombination mit experimentellen Methoden, umweltfreundlichere Varianten von Ciprofloxacin und seiner Grundstruktur entwickelt. Die ersten ausgewählten Kandidaten wurden systematisch am Computer optimiert. Dafür wurde die bereits aufgebaute Biomolekülbibliothek signifikant erweitert (auf ca. 400 Naturstoffe). So konnten großangelegte Screeningansätze durchgeführt werden.

Mehrere Varianten konnten erfolgreich synthetisiert werden. Zwei der Varianten Cipro-Hemi und CG008-Hemi, die sich nach mehreren Verbesserungszyklen ergaben, sind gegenüber ausgewählten pathogenen Bakterien *in vitro* wirksam. Die antibiotische Wirksamkeit in den üblichen Testsystemen gegenüber ausgewählten und typischen pathogenen Bakterien ist etwas geringer als die des Ciprofloxacins. Bezüglich Absorption, Distribution, Metabolismus und Toxizität (ADMET) sind sie nach ersten Untersuchungen jedoch geeignete Kandidaten für neue Arzneimittel. In der Umwelt wird der eine Wirkstoff teilweise abgebaut und deaktiviert. Der andere zerfällt bei der Ausscheidung (in der Blase) in zwei inaktive Teile, wobei der eine schnell und vollständig biologisch in der Umwelt abbaubar ist. Die verbleibenden Fragmente sind im ausgewählten Testsystem (Algen) nicht toxisch. Die beiden Substanzen wurden zum Patent angemeldet, um einerseits die Forschungsarbeiten weiterführen zu können und die Substanzen für pharmazeutische Unternehmen interessant zu machen und die Chance zu wahren, dass sie zu Arzneimitteln weiterentwickelt werden können. Die Patenteinreichung ist auch Voraussetzung um einen Antrag zur Förderung weiterer Arbeiten, für weitere Strukturvarianten und Erzeugung weiterer relevanter Daten beim BMBF einreichen zu können. Ein solcher Antrag ist in Vorbereitung und wird zeitnah beim BMBF eingereicht werden.

Neben den eigentlichen Wirkstoffen wurden Varianten des Grundgerüsts bzw. der beim Zerfall/Abbau in der Umwelt entstehenden Fragmente synthetisiert und untersucht, was zu einem besseren Verständnis der Gründe für die Stabilität des Grundgerüsts bzw. der gebildeten Fragmente in der Umwelt führte.

Neben den genannten Arbeiten entstand eine Masterarbeit. Einige Arbeiten werden im Rahmen von zwei Dissertationen fortgeführt, für die Stipendien eingeworben werden konnten.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Das Projekt wurde von Anfang an durch intensive Öffentlichkeitsarbeit (Presse, Rundfunk, Fernsehen) auch durch die DBU begleitet, nicht zuletzt war auch die Patenteinreichung ein Anlass dafür. Es gab vielfältige nationale und internationale, zum Teil bis jetzt anhaltende Resonanz, das nicht zuletzt zu vermehrtem Interesse und Kontakten mit pharmazeutischen Unternehmen führte, die mehr über die Wirkstoffe und das Konzept an sich wissen wollten. In einigen Fällen wurden in den Unternehmen Vorträge vor Mitarbeitern der Arzneimittelentwicklung gehalten, die dadurch zum Teil erstmals mit den Themen Arzneimittel in der Umwelt und Nachhaltige Pharmazie in Kontakt kamen. Das Konzept als solches sowie u.a. die laufenden Arbeiten (um die Patentanmeldung nicht zu gefährden nur andeutend) wurden auf einer Vielzahl nationaler und internationaler Tagungen, meist eingeladene Vorträge, der Fachöffentlichkeit vorgestellt. Es traf auf großes Interesse.

Leder, C.; Rastogi, T.; Kümmerer, K. (2015) Putting benign by design into practice-novel concepts for green and sustainable pharmacy: Designing green drug derivatives by non-targeted synthesis and screening for biodegradability. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2, 31–36.

In diesem Artikel werden neue Ideen und Konzepte zur Entwicklung umweltfreundlicher Medikamente vorgestellt. Das Förderprogramm „Nachhaltige Pharmazie“ der DBU findet hier besondere Erwähnung. Außerdem wurde die Förderung durch die DBU in der Danksagung anerkannt.

Ein Manuskript zur Veröffentlichung der Ergebnisse ist erstellt, soll aber erst zur Veröffentlichung eingereicht werden, wenn die Patente erteilt oder endgültig verwehrt wurden.

Fazit

Insgesamt konnte erfolgreich demonstriert werden, dass sich verbesserte Umweltfreundlichkeit und pharmazeutische Wirksamkeit nicht grundsätzlich ausschließen. Mit der Anmeldung zweier Stoffe zum Patent hat sich auch die Haltung der Industrie gegenüber diesem Ansatz deutlich geändert. Sie spricht nicht mehr kategorisch davon, dass dies nicht möglich wäre, sondern lediglich, dass es noch viel Zeit benötige.

Danksagung

Die DBU hat das Projekt trotz schon von Beginn an klarer und großer Herausforderungen gefördert. Dies ist in der heutigen Förderlandschaft nicht mehr selbstverständlich. Letztlich hat diese Förderung die Grundlage für mögliche Innovationen und in die Zukunft gerichtetes Denken bei Arzneimittelherstellern angestoßen. Dadurch, dass wir im Projekt die Machbarkeit des Konzepts Benign by Design mit patentierten Praxisbeispielen belegen konnten, hat die DBU damit auch einen wesentlichen Beitrag zu einem veränderten Umgang mit Arzneimitteln und Alternativen zu von End of the Pipe-Technologien für die Reduktion des Eintrags von Spurenstoffen in die aquatische Umwelt geleistet. Daher möchten wir der DBU für die Förderung des Projekts wie auch die kritisch-konstruktive Begleitung sehr herzlich danken.

Für wertvolle Diskussionen, die ebenfalls zum Gelingen des Projekts beigetragen haben, danken wir herzlich dem Projektbeirat bestehend aus Prof. Dr. Manfred Kietzmann (Tierärztliche Hochschule Hannover), Dr. Axel Pahl (Max-Planck-Institut Dortmund) und Prof. Dr. Christian Peifer (Christian Albrechts Universität Kiel).

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einführung/Motivation.....	2
3. Methodik/Vorgehensweise/Projekttablauf.....	4
4. Projektergebnisse.....	6
4.1. Cip-Pro und Cip-P2C.....	6
4.2. Hemi	9
4.3. CG008-Hemi	19
4.4. Cip-TH.....	21
4.5. Cipro-Homo.....	22
5. Öffentlichkeitsarbeit/Veröffentlichungen/Vorträge	24
6. Fazit	25
7. Literatur	25

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vorgehensweise für die Entwicklung eines umweltfreundlichen Antibiotikums..	4
Abbildung 2: Verfolgte Derivatisierungsansätze	5
Abbildung 3: Cyclopropylsubstitution mit einem Hemiaminal-Linker	5
Abbildung 4: Rückgrat-Variante mit Morpholin-Rest	6
Abbildung 5: Strukturen von Cipro-P2C (Cip-P2C) (a) und Cipro-Prolin (Cip-Pro) (b).....	7
Abbildung 6: Abiotische Hydrolyse von Cipro-P2C und Cipro-Prolin im Vergleich zu Ciprofloxacin und der Grundstruktur Cipro-NH ₂ bei pH 7,4 (a), pH 4 (b) und pH 9,4 (c)	8
Abbildung 7: Inkubation von Cipro-P2C und Cipro-Prolin mit humanen intestinalen Mikrosomen.....	9
Abbildung 8: Inkubation von Cipro-P2C und Cipro-Prolin mit humanen Lebermikrosomen....	9
Abbildung 9: MHK von Hemi im Vergleich zur Grundstruktur Cip-D-CP in verschiedenen pathogenen Bakterien (Kollaborationspartner UK Freiburg)	10
Abbildung 10: Wachstumshemmung von <i>E. coli</i> Bakterien durch Hemi im Vergleich zur Grundstruktur Cip-D-CP	12
Abbildung 11: Leuchthemmung von <i>V. fischeri</i> Bakterien durch Hemi im Vergleich zur Grundstruktur Cip-D-CP	12
Abbildung 12: Abiotische Hydrolyse von Hemi (a) und der Grundstruktur Cip-D-CP (b) im Vergleich zu Ciprofloxacin (c) bei pH 6, pH 7,4 und pH 9	13
Abbildung 13: Inkubation von Hemi (a) und Cip-D-CP (b) mit humanen Lebermikrosomen (HLM)	14
Abbildung 14: Inkubation von Hemi (a) und Cip-D-CP (b) mit humanen intestinalen Mikrosomen (HIM).....	14
Abbildung 15: Plasmastabilitätstest mit humanem Plasma von Hemi (a) im Vergleich zu Cip-D-CP (b).....	15
Abbildung 16: UmuC-Test von Hemi und Cip-D-CP im Vergleich zu Ciprofloxacin ohne S9-Inkubation.....	16
Abbildung 17: UmuC-Test von Hemi und Cip-D-CP im Vergleich zu Ciprofloxacin mit S9-Inkubation.....	16
Abbildung 18: Ames-Test von Hemi und Cip-D-CP im Vergleich zu Ciprofloxacin ohne S9-Inkubation.....	17
Abbildung 19: Ames-Test von Hemi und Cip-D-CP im Vergleich zu Ciprofloxacin mit S9-Inkubation.....	18
Abbildung 20: HPLC-Analyse von Hemi im geschlossenen Flaschentest (CBT): Hemi (1), Cip-D-CP (2) an Tag 0 und Tag 28.....	18
Abbildung 21: Abbaubarkeit von γ -Butyrolacton im geschlossenen Flaschentest (CBT).....	19
Abbildung 22: Wachstumshemmung von <i>E. coli</i> Bakterien durch CG008-Hemi im Vergleich zur Grundstruktur CG008	20
Abbildung 23: Leuchthemmung von <i>V. fischeri</i> Bakterien durch CG008-Hemi im Vergleich zur Grundstruktur CG008	20
Abbildung 24: Abiotische Hydrolyse von CG008-Hemi bei pH 6, pH 7,4 und pH 9	21
Abbildung 25: Wachstumshemmung von <i>E. coli</i> Bakterien durch Cipro-TH im Vergleich zur Grundstruktur Cip-D-CP	22
Abbildung 26: Wachstumshemmung von <i>E. coli</i> Bakterien durch Cipro-Homo im Vergleich zur Grundstruktur Cip-D-CP	23
Abbildung 27: Leuchthemmung von <i>V. fischeri</i> Bakterien durch Cipro-Homo im Vergleich zur Grundstruktur Cipro-D-CP	23
Abbildung 28: Abiotische Hydrolyse von Cipro-Homo bei pH 6, pH 7,4 und pH 9.....	24

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: MHK von Hemi im Vergleich zur Grundstruktur Cip-D-CP in verschiedenen pathogenen Bakterien (Kollaborationspartner CO-ADD, Australien)	10
Tabelle 2: Ökotoxizität von Hemi und Cip-D-CP in <i>P. subcapitata</i>	19

Abkürzungen

<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
CBT	Geschlossener Flaschentest (Closed Bottle Test)
Cip, Cipro	Ciprofloxacin
DBU	Deutsche Bundesstiftung für Umwelt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
FDA	Food and drug administration
HEK	Human embryonic kidney cells
HIM	Humane intestinale Mikrosomen
HLM	Humane Lebermikrosomen
HPLC	High performance liquid chromatography
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MDR	Multiple Drug Resistance
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. subcapitata</i>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
pH	<i>Potentia Hydrogenii</i>
Pro	L-Prolin
P2C	Piperazin-2-Carboxylsäure
QSAR	Quantitative structure activity relationship
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>V. fischeri</i>	<i>Vibrio fischeri</i>

1. Zusammenfassung

Am Institut für Nachhaltige Chemie und Umweltchemie an der Leuphana Universität Lüneburg wurden im Rahmen des von der DBU geförderten Projektes Az 30839 mithilfe von computergestützten Methoden, in Kombination mit experimentellen Untersuchungen, durch gezielte molekulare Strukturveränderungen umweltfreundlichere Varianten des Antibiotikums Ciprofloxacin, aus der Substanzklasse der Fluorchinolone, entwickelt. Damit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass entgegen landläufiger Annahme die gezielt eingebaute biologische Abbaubarkeit in der Umwelt einerseits und die notwendige Stabilität und Wirksamkeit für die Anwendung andererseits keinen grundsätzlichen Widerspruch darstellen. Damit können die nachfolgend durch Antibiotika verursachten Risiken für die Wasserqualität reduziert oder gar vollständig vermieden werden, indem ihre biologische Abbaubarkeit in der Umwelt verbessert und/oder die Toxizität und die antibiotische Aktivität von nicht-abbaubaren Metaboliten und Abbauprodukten reduziert werden.

Zum Einsatz kamen einerseits Computermodelle, die anhand der Struktur bestimmte Eigenschaften des Moleküls vorhersagen (QSAR, quantitative Struktur-Aktivität-Beziehungen) und andererseits Computerprogramme, die die Bindung an die Zielstruktur des Pharmazeutikums simulieren und berechnen. Außerdem wurden die Substanzen in etablierten pharmakologischen und toxikologischen *in vitro* Assays sowie in ökotoxikologischen Tests untersucht. Zusätzlich wurden in verschiedenen Abbautests Erkenntnisse zur Abbaubarkeit der Fluorchinolon-Grundstruktur und verschiedener Derivate gewonnen. Diese Vorgehensweise ermöglichte auch eine Kategorisierung von bereits vorhandenen Wirkstoffen unter Umweltgesichtspunkten und führte vor allem zu neuen schutzrechtlich abgesicherten Antibiotika-Kandidaten, die in der Umwelt biologisch inaktiviert und zu unbedenklichen Fragmenten abgebaut werden könnten.

Nach einem Screening verschiedener zugelassener Fluorchinolone und Chinolone im Closed Bottle Test (mod. 301D OECD) sowie im manometrischen Respirationstest (301F OECD) in der ersten Projektphase zeigte sich, dass keines der getesteten Strukturen biologisch abbaubar war. Im Projekt wurde folgend die Substitution am C₇ und am N₁ der Fluorchinolonstruktur in Kombination mit einem Softdrug-Design verfolgt, bei dem das Pharmazeutikum durch abiotische und biotische Prozesse deaktiviert wird.

Bei der Substitution am C₇ wurden verschiedene Prototypen mit amidisch gebundenen Aminosäuren und einer Piperazinstruktur entwickelt. Durch Anwendung verschiedener *in silico* Methoden wurden die Moleküle Cipro-Prolin und Cipro-P2C als potentielle Antibiotika synthetisiert und ihre Aktivität in *in vitro* Tests mit verschiedenen pathogenen Organismen bestätigt. Im Closed Bottle Test wurden die Amidderivate teilweise in das inaktivere Fragment Cipro-NH₂ abgebaut, wobei die freiwerdenden Moleküle teilweise mineralisiert werden konnten. Cipro-NH₂ war hingegen biologisch persistent. Hydrolytische Untersuchungen zeigten wiederum eine hohe Stabilität. *In vitro* Tests zur Stabilität mit humanen Plasma, Leber- und intestinale Mikrosomen bestätigten diese Stabilität.

Ein weiterer Ansatz war die Substitution der Gruppe am N₁ der Fluorchinolonstruktur, da sich in einem parallelen Screening gezeigt hatte, dass eine Struktur mit einem sekundäres Amin im manometrischen Respirationstest vollständig mineralisiert werden konnte. Die Substitution diesesamins mit einem tertiären Amins führte wiederum zu einer biologischen Persistenz. Innerhalb dieses Ansatzes konnten vier verschiedene Antibiotika entwickelt werden,

welche eine ausreichende Stabilität im Menschen aufweisen, unter sauren pH-Werten jedoch in antibiotisch inaktive Fragmente zerfallen (Cipro-Hemi, CG008-Hemi, Cipro-TH, Cipro-Homo). Durch eine Substitution des Piperazinrestes mit Morpholin im Molekül CG008-Hemi konnte das Anwendungsspektrum zudem erweitert werden. Weiterhin könnten mögliche Nebenwirkungen infolge einer GABA-Inhibition, durch das Fehlen der Piperazinstruktur, reduziert werden. In Tests zur antibiotischen Aktivität zeigte sich, dass die Moleküle ein breiteres Anwendungsspektrum sowie eine höhere Aktivität als die Amidderivate aufwiesen. In *in vitro* Tests mit humanen Leber- und intestinale Mikrosomen konnte keine erhöhte Instabilität festgestellt werden.

Abschließend konnten innerhalb des Projektes verschiedene umweltfreundlichere Fluorchinolone entwickelt und patentiert werden, welche nach ihrer Applikation im Menschen in inaktive sowie teilweise abbaubare Fragmente zerfallen. Weiterhin konnte durch das Projekt gezeigt werden, dass ein nachhaltiges Design von Pharmazeutika möglich ist und sich pharmazeutische Aktivität und Umweltfreundlichkeit nicht ausschließen müssen. Da an Arzneimittelwirkstoffe in vielerlei Hinsicht höhere Anforderungen gestellt werden als an Chemikalien, lässt sich die Vorgehensweise ohne weiteres auch auf Chemikalien übertragen. Somit ist auch eine breitere Reduktion der Gegenwart von Spurenstoffen durch Maßnahmen an der Quelle, d.h. an den Stoffen selbst, in der aquatischen Umwelt möglich.

2. Einführung/Motivation

Aufgrund des einsetzenden Umdenkens im Hinblick auf nachhaltige Pharmazie und der verfeinerten Analysemethoden ist das Schicksal einiger besonders verbreiteter Medikamente in der Umwelt in den letzten Jahren umweltwissenschaftlich untersucht worden. Neben vielen anderen Arzneimittelwirkstoffen gelangten in den letzten Jahren nicht zuletzt wegen der Möglichkeit der Selektion resistenter Bakterien immer mehr auch Antibiotika in den Blickwinkel. Gleichzeitig zeigte die Forschung, dass die Verfahren der erweiterten Abwasserreinigung nicht in der Lage sind, alle Wirkstoffe aus dem Abwasser zu entfernen. Bei manchen Verfahren werden sogar neue Stoffe ("Transformationsprodukte") oft unbekannter Struktur und (Öko)toxizität gebildet. Zudem werden nach Angaben von UN-Water nur 20% der Abwässer weltweit überhaupt gereinigt. Maßnahmen an der Quelle, die den Eintrag oder die Präsenz von Arzneimittelwirkstoffen (und Chemikalien) vermeiden oder zumindest reduzieren sind daher dringend notwendig (Kümmerer et al. 2018). Eine Maßnahme an der Quelle setzt bei den Molekülen und ihrer schlechten biologischen Abbaubarkeit in der Umwelt selbst an, indem diese schon vor der Synthese gezielt so geplant werden, dass sie die für die Anwendung notwendigen Eigenschaften aufweisen, aber auch nach ihrem Eintrag in die aquatische Umwelt schnell und möglichst vollständig abgebaut, zumindest aber deaktiviert werden. (Benign by Design, Kümmerer 2006). Praxisbeispiele, die die Machbarkeit eines solchen Ansatzes gezielt belegen, waren bisher nicht bekannt.

Ein in der Umwelt nicht abbaubares und häufig nachgewiesenes Antibiotikum ist Ciprofloxacin. Es gehört zur zweiten Generation der Gruppe der Fluorchinolone und ist ein Breitband-Antibiotikum, das die prokaryonten-spezifische DNA-Gyrase inhibiert. Im Gegensatz zu den leicht hydrolysierbaren Penicillinen ist Ciprofloxacin sehr stabil. Daher ist das Schicksal von Ciprofloxacin in der Umwelt mittlerweile in den Blickpunkt geraten, weil die Substanz im Abwasser, insbesondere von Krankenhäusern, und in Kläranlagen wie auch im Klärschlamm detektiert wurde (Golet et al. 2002; Lindberg et al. 2006). Im Abwasser von Schweizer Kran-

kenhäusern wurden Konzentrationen von 2 bis 83 µg/L gemessen (Hartmann et al. 1998). Im Abwasser von Medikamentenherstellern wurden Konzentrationen von bis zu 31 mg/L gemessen (Larsson et al. 2007). Dadurch wurde in dieser Umgebung die Wirkschwelle um einen Faktor von ca. 1000 überschritten (Larsson et al. 2007). In Kläranlagen wird es teilweise lediglich durch Adsorption an den Klärschlamm entfernt, was zu einer Anreicherung führt. Es wird nicht von Mikroorganismen in Kläranlagen abgebaut (Kümmerer et al. 2000) lediglich durch terrestrische Braunfäulepilze. In dem Kontext ist zu beachten, dass die Wirkschwelle von Ciprofloxacin sehr niedrig ist (MIC *E. coli* C1, C11) < 0,1 µg/mL (Vila et al. 1994), so dass bereits sehr niedrige Konzentrationen die bakterielle Fauna modulieren können. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass biologische Abbauprozesse in Kläranlagen mit hoher Antibiotika-Aufnahme aufgrund der Akkumulation der antibiotischen Aktivität empfindlich gestört werden und Resistenzbildungen gefördert werden (Kümmerer 2001).

Es gibt außerdem vermehrt Hinweise, dass die Exponierung der Umwelt mit subtherapeutischen Konzentrationen von Antibiotika immer noch einen Wachstumsvorteil der mutierten Bakterien bewirkt (Gullberg et al. 2011, Bengtsson-Palme und Larsson 2016). Gullberg und Kollegen haben ermittelt, dass diese sog. minimalen selektiven Konzentrationen (MSK) bis zu einem Faktor von 230 unter den minimalen Hemmkonzentrationen des jeweiligen Antibiotikums liegen können (Gullberg et al. 2011). Für bekannte Mutationen der DNA Gyrase mit Resistenz gegen Fluorchinolone ergibt dies minimale selektive Konzentrationen von nur 0,1 µg/L. Dies ist weit unter gemessenen Werten im Krankenhausabwasser (Hartmann et al. 1998), in Kläranlagen (Ferrando-Climent et al. 2014) und in einigen Umweltkompartimenten, wie z.B. Flüssen mit Verbindungen zu pharmazeutischen Herstellern (Bengtsson-Palme und Larsson, 2016). Das bedeutet, dass in diesen Bereichen die Antibiotika-Konzentrationen oft ausreichen, um einen konstanten Wachstumsvorteil der resistenten Keime zu bewirken, was die Verbreitung resistenter Bakterien begünstigt. Diese Schlussfolgerung kann bereits durch die Beobachtung unterstützt werden, dass der Anteil an resistenten Keimen nach dem Klärprozess oft höher ist als im einfließenden Abwasser (Ferreira da Silva et al. 2007). Zusätzliche Hinweise, dass Umweltkompartimente eine Rolle bei der Verbreitung resistenter Keime spielen könnten, lieferten Pal und Kollegen, indem sie zeigten, dass Fluorchinolon-resistente Bakterien in größerem Maße in verschiedenen Umweltkompartimenten als im Menschen gefunden wurden (Pal et al. 2016). Zusammengefasst lässt sich daraus schließen, dass sich durch Verringerung der Persistenz des aktiven Antibiotikums in der Umwelt ermöglichen ließe, diesen vermeidbaren Weg der Propagation von Resistenzen zu unterbinden. Der Vorteil könnte dann sein, dass ein solches Antibiotikum weniger schnell durch weitverbreitete Resistenz beeinträchtigt würde. Hier würden also Erkenntnisse aus der Umweltforschung ein großes derzeitiges medizinisches Problem positiv beeinflussen.

Ziel war es daher, die Struktur des Antibiotikums so zu verändern, dass es nach Gebrauch abbaubar wird oder zumindest in inaktive Fragmente zerfällt.

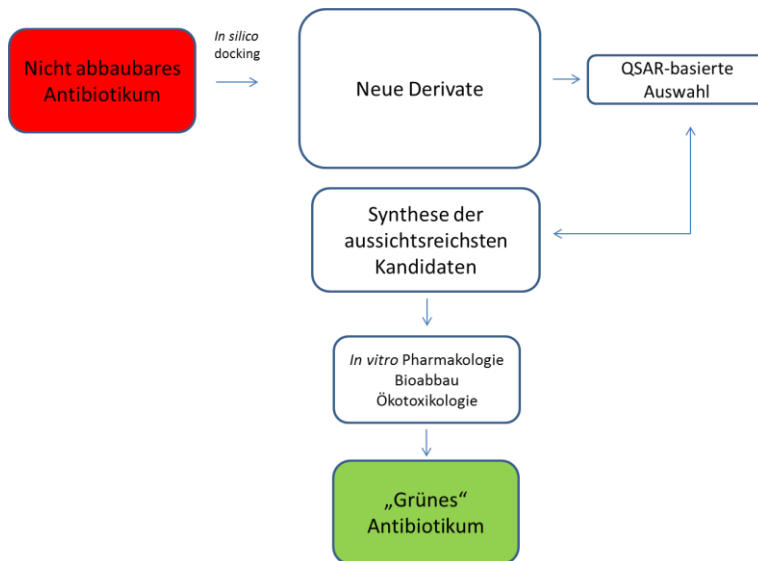
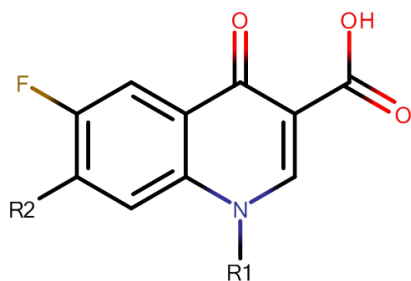


Abbildung 1: Vorgehensweise für die Entwicklung eines umweltfreundlichen Antibiotikums

Ausgehend von dem bekannten Antibiotikum Ciprofloxacin sollten mithilfe von kombinatorischen Bibliotheken Derivate entwickelt werden, die rasch in abbaubare und/oder nicht mehr antibiotisch aktive Fragmente zerfallen. Die Derivate sollten mit computergestützten Modellen (QSAR) untersucht werden und die aussichtsreichsten Kandidaten sollten hergestellt und anschließend im Labor pharmakologisch und umweltwissenschaftlich analysiert werden. Im Folgenden werden die dazu im dritten Projektjahr durchgeführten Arbeiten und ihre Ergebnisse dargestellt.

3. Methodik/Vorgehensweise/Projektlauf

Um das Projektziel, die Entwicklung eines umweltverträglicheren Antibiotikums, zu erreichen wurde die Fluorchinolon-Grundstruktur an zwei verschiedenen Stellen (Abb. 2, R1 und R2) derivatisiert. Die restliche Grundstruktur wurde dabei dicht an den Aufbau des bekannten Antibiotikums Ciprofloxacin angelehnt, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, mit den Derivaten möglichst hohe antibiotische Aktivitäten zu erreichen. An die Positionen R1 und R2 wurden abbaubare bzw. abspaltbare Seitenketten (R1 γ -Butyrolacton-Derivate sowie ein β -Aminoketon und an R2 Aminosäuren und Carbonsäuren über Ester- und Amid-Bindungen) addiert. Damit wurde in beiden Fällen das Ziel verfolgt, dass eine Abspaltung der Seitenketten zu einer Abschwächung der antibiotischen Aktivität führt. Somit würde erreicht, dass ein solches Antibiotikum nach der Anwendung in geringerem Maße in der Umwelt als aktive Substanz persistiert und weniger Selektionsdruck zur Förderung von Resistenzen ausübt.



R1: beta-Amino-Keton, Hemiaminal, derivatisierte Alkyl-Reste

R2: Morpholin, Aminosäuren/Carbonsäuren mit Ester- oder Amid-Bindung

Abbildung 2: Verfolgte Derivatisierungsansätze

Die Arbeiten zur Derivatisierung an R2 und zur Addition eines β -Aminoketons an R1 wurden in den vorherigen Zwischenberichten vorgestellt. Kurz zusammengefasst wurde für das β -Aminoketon gesehen, dass es nur schwach antibiotisch aktiv war (Zwischenbericht 2). Die Derivatisierung von R2 mit Aminosäuren über eine Esterbindung (Zwischenbericht 1) ergab eine zu hohe Instabilität in wässriger Lösung und entsprechend keine Steigerung der antibiotischen Aktivität der ausgewählten Derivate. Höhere Stabilität wurde durch Verwendung einer Amid-Bindung mit Aminosäuren und Carbonsäuren an R2 erreicht (Abb. 5, 6, 7, 8), aber die gemessenen antibiotischen Aktivitäten dieser Derivate (Zwischenbericht 2) lagen nicht signifikant höher als die Aktivität des verbleibenden Fragments. Hier wurden jedoch Substanzen hergestellt, die möglich spezifisch in *E. coli* Bakterien wirken könnten, so dass die Universität sich für die Patentanmeldung auch dieser Substanzen entschied. Da es nicht ausgeschlossen werden kann, dass es unter den natürlichen Aminosäuren geeignetere Seitenketten mit dem Potenzial, die Aktivität deutlich zu steigern, wurden die Ansprüche in der Anmeldung möglichst breit gefasst.

Die Arbeiten zur Addition von γ -Butyrolacton-Derivaten an R1 (Abb. 3 und Abb. 4) werden in dem folgenden Abschlussbericht schwerpunktmäßig vorgestellt.

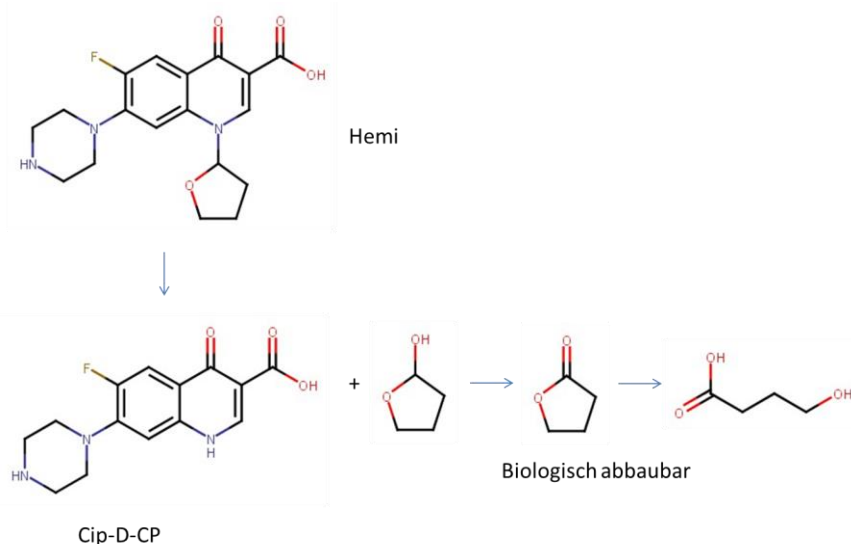


Abbildung 3: Cyclopropylsubstitution mit einem Hemiaminal-Linker

Variation des Rückgrates

Da sich außerdem in eigenen Vorarbeiten gezeigt hatte, dass die Grundstruktur CG008 (Abb. 4) möglicherweise verbessert abbaubar oder besser an Klärschlamm adsorbiert, wurde der Hemiaminal-Linker auf Basis von γ -Butyrolacton mit dieser Grundstruktur kombiniert. Dies ergab die Substanz CG008-Hemi (Abb. 4).

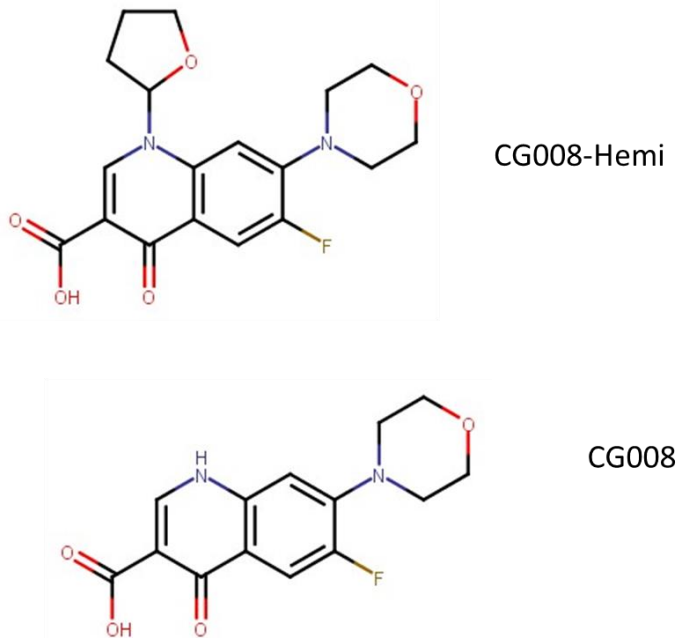


Abbildung 4: Rückgrat-Variante mit Morpholin-Rest

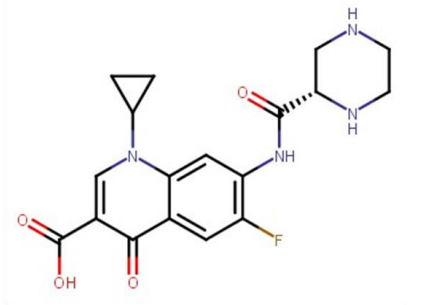
Außerdem wurden die Linker-Varianten Cip-TH und Cipro-Homo hergestellt und getestet. Da für diese beiden Substanzen gegebenenfalls weitergehende schutzrechtliche Absicherung angestrebt werden könnten, werden die Strukturen der beiden Substanzen in diesem Bericht nicht offengelegt.

4. Projektergebnisse

4.1. Cip-Pro und Cip-P2C

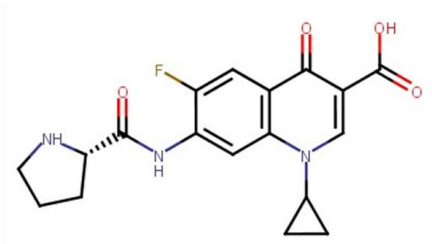
Im dritten Projektjahr wurden abschließende Stabilitätsdaten zu den Derivaten Cip-Pro und Cip-P2C (Abb. 5) generiert. Es wurden abiotische Hydrolysen (Abb. 6) und enzymatische (Abb. 7 und 8) Abbauversuche durchgeführt. Es zeigte sich, dass die beiden Substanzen unter verschiedenen pH-Bedingungen (Abb. 6 a,b,c) instabiler als die Ausgangssubstanz Ciprofloxacin sind. Da die Möglichkeit einer enzymatischen Hydrolyse im menschlichen Organismus durch Amidasen/Esterasen nicht ausgeschlossen werden kann, wurden die Substanzen mit intestinalen und Leber-Mikrosomen inkubiert. Diese Mikrosomen enthalten Esterasen und Amidasen in unterschiedlicher Zusammensetzung. In diesen Assays (Abb. 7 und 8) konnte keine erhöhte Instabilität der Substanzen gemessen werden, so dass hier Hinweise gefunden wurden, dass die Anwendung als humanes Antibiotikum nicht kompromittiert sein könnte.

a



Cip-P2C

b



Cip-Pro

Abbildung 5: Strukturen von Cipro-P2C (Cip-P2C) (a) und Cipro-Prolin (Cip-Pro) (b)

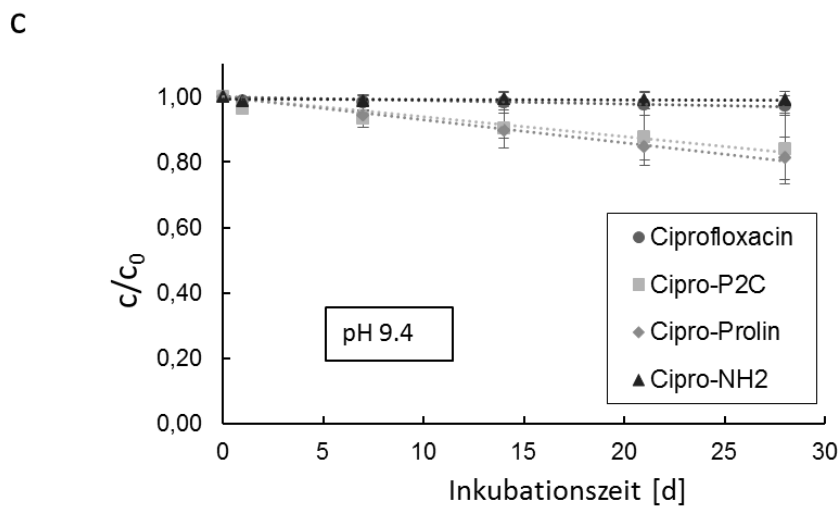
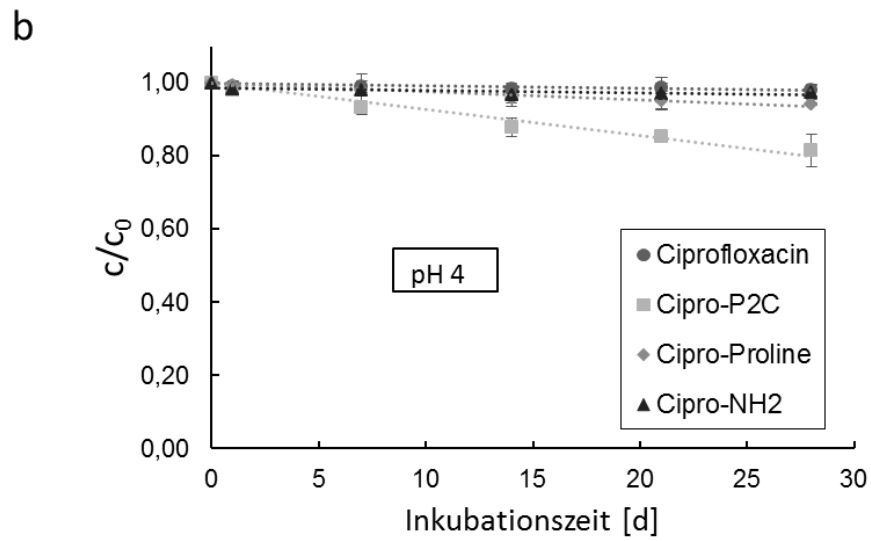
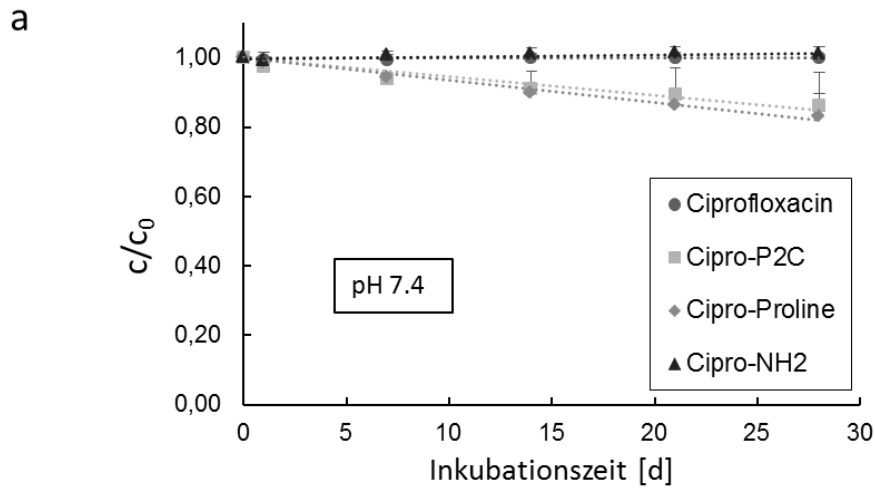


Abbildung 6: Abiotische Hydrolyse von Cipro-P2C und Cipro-Prolin im Vergleich zu Ciprofloxacin und der Grundstruktur Cipro-NH2 bei pH 7,4 (a), pH 4 (b) und pH 9,4 (c)

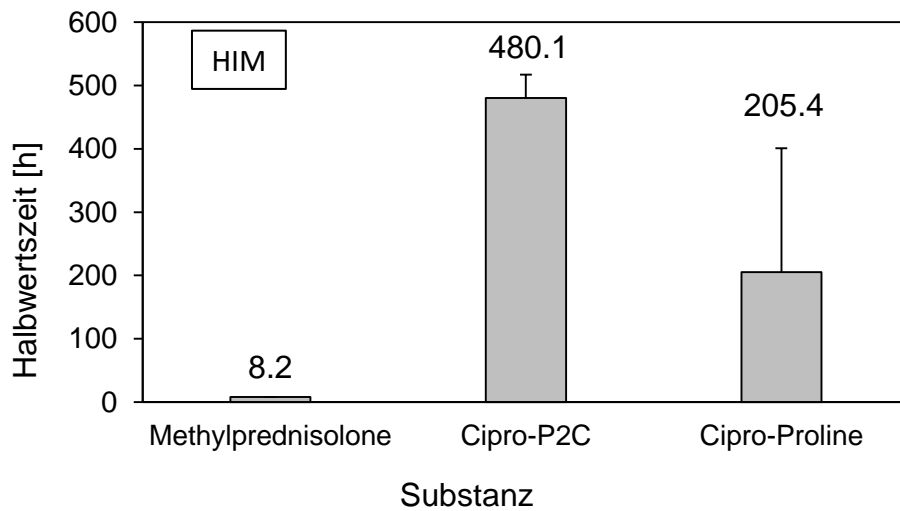


Abbildung 7: Inkubation von Cipro-P2C und Cipro-Prolin mit humanen intestinalen Mikrosomen

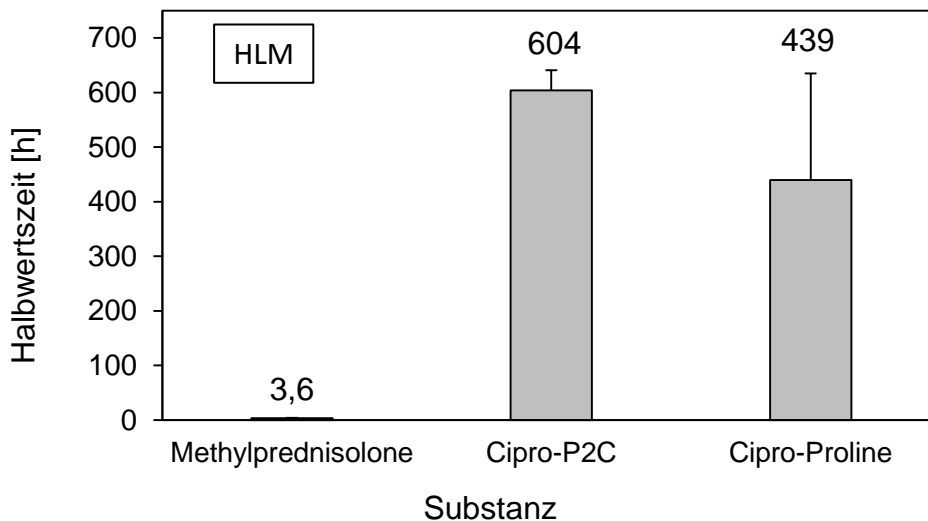


Abbildung 8: Inkubation von Cipro-P2C und Cipro-Prolin mit humanen Lebermikrosomen

4.2. Hemi

Die Daten zur Substanz Hemi (Abb. 3) wurden bereits zum Teil im zweiten Zwischenbericht vorgestellt. Die für die Patentanmeldung und die Veröffentlichung finalisierten Abbildungen sowie einige im dritten Jahr durchgeführte Ergänzungen sollen hier im weiteren Verlauf vorgestellt werden.

Bei dieser Idee wurde der Cyclopropyl-Rest von Ciprofloxacin an R1 durch ein Hemiaminal auf Basis von γ -Butyrolacton (Abb. 3) ersetzt. Vorarbeiten hatten gezeigt (Zwischenbericht 2), dass die Entfernung des Restes an R1 zu einer Abschwächung der antibiotischen Aktivi-

tät führte. Ein Hemiaminal sollte zu einer hinreichenden Stabilität bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der antibiotischen Aktivität vor der Abspaltung führen. Bereits im Rahmen der Arbeiten in Projektjahr 2 konnten dazu ermutigende Hinweise gefunden werden. Daher wurde diese Substanz (Abb. 3, Hemi) für weiterführende pharmakologische und toxikologische Untersuchungen ausgewählt.

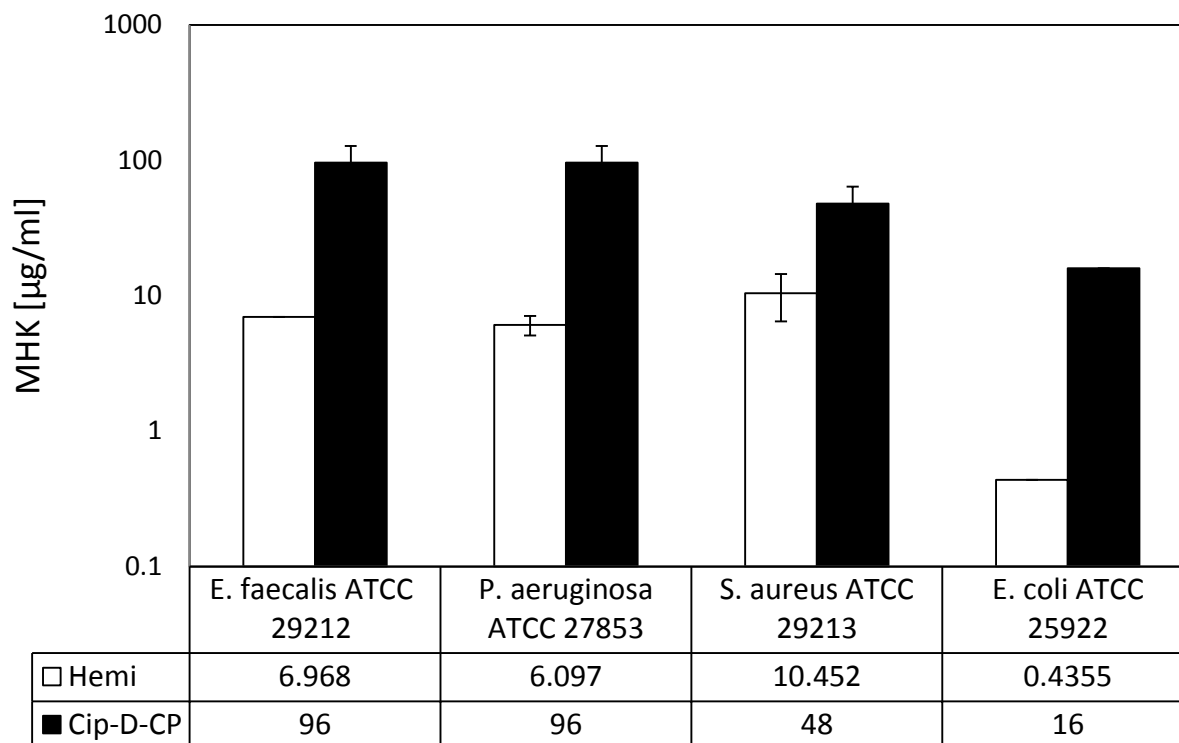


Abbildung 9: MHK von Hemi im Vergleich zur Grundstruktur Cip-D-CP in verschiedenen pathogenen Bakterien (Kollaborationspartner UK Freiburg)

Tabelle 1: MHK von Hemi im Vergleich zur Grundstruktur Cip-D-CP in verschiedenen pathogenen Bakterien (Kollaborationspartner CO-ADD, Australien)

Name	Beschreibung	Stamm	Hemi MHK [µg/ml]	Cip-D-CP MHK [µg/ml]
Staphylococcus aureus	MRSA	ATCC 43300	14	>32
Escherichia coli	FDA control	ATCC 25922	0,87	16
Klebsiella pneumoniae	MDR	ATCC 700603	14	>32
Acinetobacter baumannii	Type strain	ATCC 19606	>32	>32
Pseudomonas aeruginosa	Type strain	ATCC 27853	14	>32
Name	Beschreibung	Stamm	Hemi CC50 [µg/ml]	Cip-D-CP CC50 [µg/ml]
Humane embryonale Nierenzellen	HEK-293	ATCC CRL-1573	>32	>32

MHK: minimale Hemmkonzentration; CC50: Konzentration bei 50% Zytotoxizität

Die Verbindung Hemi (Abb. 3) wurde hinsichtlich ihrer Aktivität getestet (Abb. 9 und 10 und Tabelle 1) und mit dem verbleibenden Fragment Cip-D-CP (Ciprofloxacin delta Cyclopropyl, d.h. das Cipro-Grundgerüst ohne Cyclopropyl an N1) verglichen. Die Aktivität von Hemi liegt in *E. coli* (ATCC 23716) im Bereich der mittelstarken Fluorchinolone (MIC = ca. 0,1-1 µg/ml) (Abb. 10). In anderen pathogenen Bakterien liegt sie über den Chinolonen der ersten Generation, aber unterhalb etablierter Fluorchinolone der zweiten Generation (Abb. 9 und Tabelle 1). Das verbleibende Fragment nach Abspaltung des Linkers (Cip-D-CP) war immer deutlich

schwächer aktiv als die Ausgangssubstanz (Abb. 9 und 10). Auch in dem Umweltbakterium *V. fischeri* zeigte sich dieser Effekt (Abb. 11).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der labile Linker unter physiologischen Bedingungen langsam und bei niedrigem pH schnell abgespalten wird (Abb. 12 a). Weder das verbleibende Fragment (Abb. 12 b) noch die Ausgangssubstanz Ciprofloxacin (Abb. 12 c) waren unter den gewählten pH-Bedingungen instabil.

Die Instabilität bei niedrigen pH-Werten macht eine enterische Formulierung oder intravenöse Applikation des Arzneimittels besonders interessant, um eine Freisetzung im sauren Magenmilieu zu verhindern.

Das Risiko, dass sich gegen diese neuen Antibiotika-Varianten Resistenzen bilden, sollte dadurch verringert sein, dass es nach Ausscheidung zu einer raschen Inaktivierung kommt und somit über die eigentliche Behandlung hinaus kein Selektionsdruck, z.B. auf Bakterien im Abwasser und in der Umwelt, ausgeübt wird. Dadurch wird das Problem gelöst, dass die starke Anwendung von Antibiotika dazu führt, dass die nicht-abbaubaren Antibiotika (z.B. Fluorchinolon-Antibiotika) noch im Abwasser, in der Kläranlage und in der Umwelt aktiv bleiben und daher die Bildung oder Selektion von Resistenzen gefördert würde.

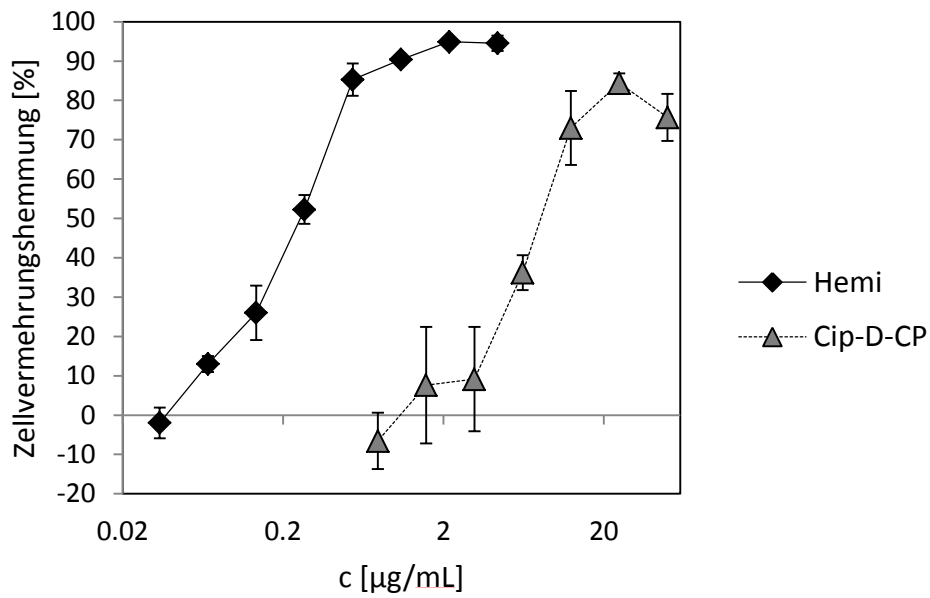


Abbildung 10: Wachstumshemmung von *E. coli* Bakterien durch Hemi im Vergleich zur Grundstruktur Cip-D-CP

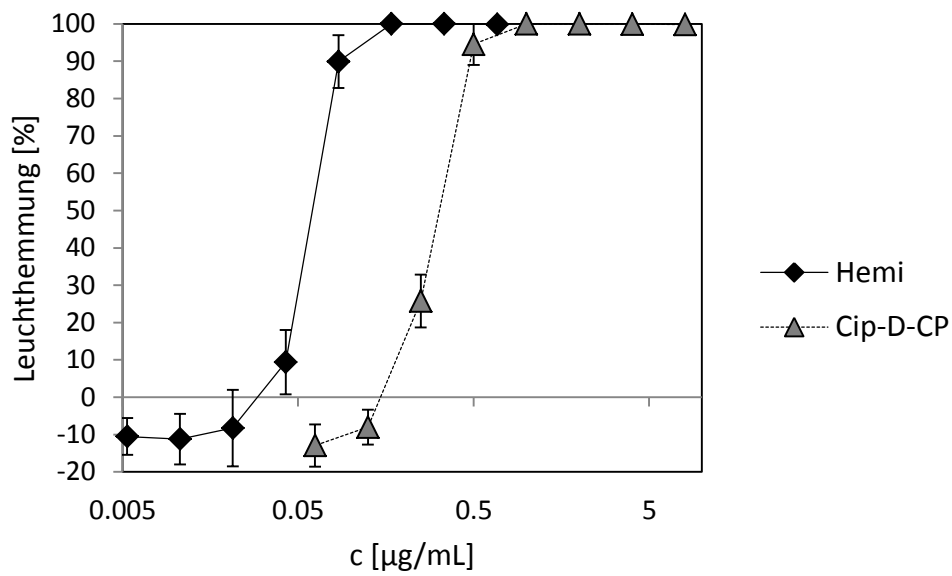


Abbildung 11: Leuchthemmung von *V. fischeri* Bakterien durch Hemi im Vergleich zur Grundstruktur Cip-D-CP

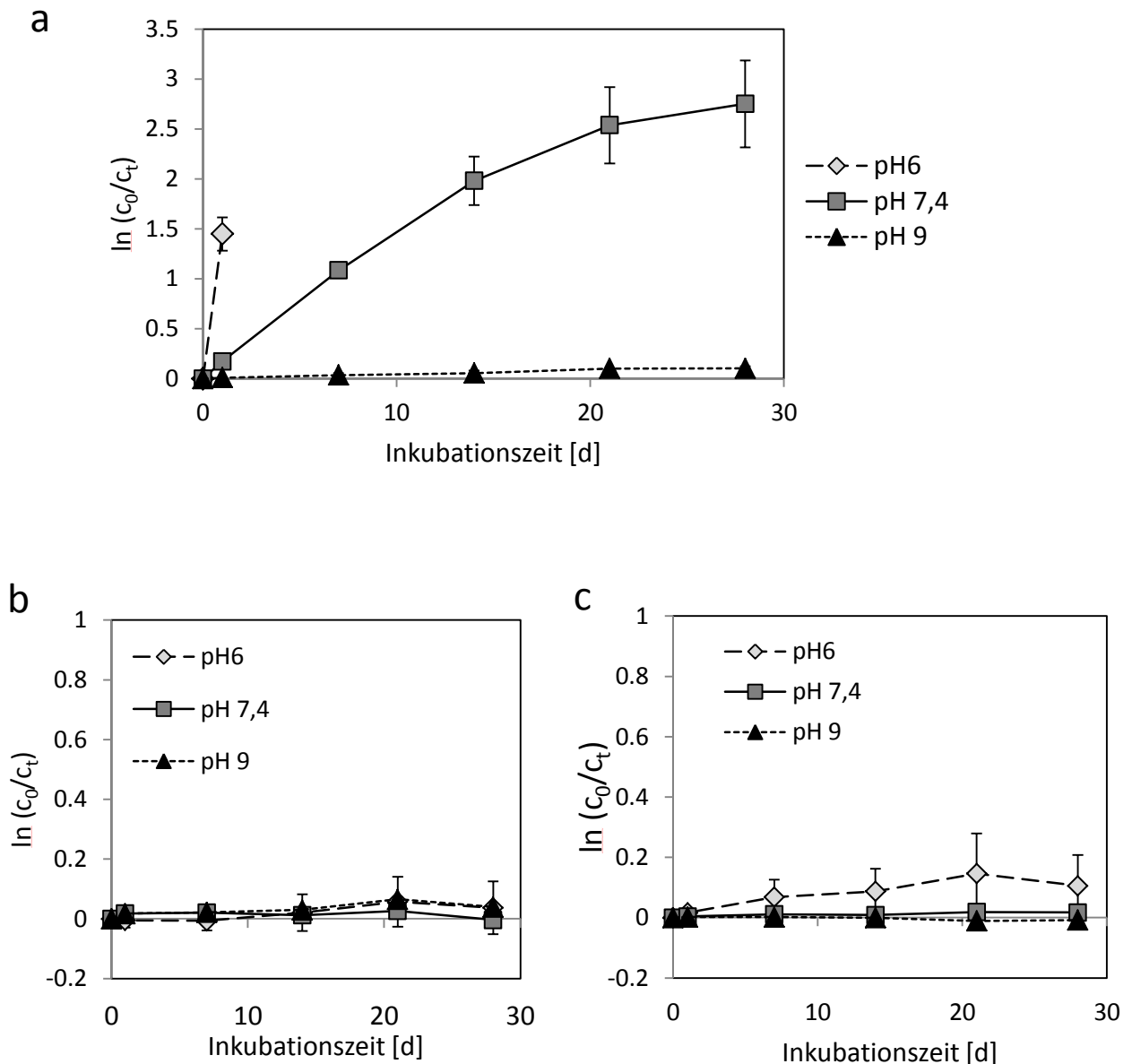


Abbildung 12: Abiotische Hydrolyse von Hemi (a) und der Grundstruktur Cip-D-CP (b) im Vergleich zu Ciprofloxacin (c) bei pH 6, pH 7,4 und pH 9

Zusätzlich zur pH-Abhängigkeit des Zerfalls wurde wiederum die Stabilität unter Einfluss von intestinalen Mikrosomen (Abb. 14) und Leber-Mikrosomen (Abb. 13) untersucht. Weder durch intestinale Mikrosomen noch durch Leber-Mikrosomen kam es hier zu einer erhöhten Instabilität von Hemi (Abb. 13 a und Abb. 14 a). Das verbleibende Fragment Cip-D-CP war unter Einfluss von intestinalen Mikrosomen stabil (Abb. 14 b), während sich Hinweise zeigten, dass die Substanz durch humane Lebermikrosomen zum Teil metabolisiert wird (Abb. 13 b). Die gebildeten Metabolite konnten bisher aber weder durch interne noch durch externe Analyse (Auftragsforschungsfirma Xenogenesis und eigene Arbeiten) aufgeklärt werden. Die Beobachtung macht aber weitere Aufmerksamkeit erforderlich, falls die Substanz Hemi weiterentwickelt werden sollte, da etwaige Metabolite auf Umweltverhalten und Toxizität getestet werden müssten.

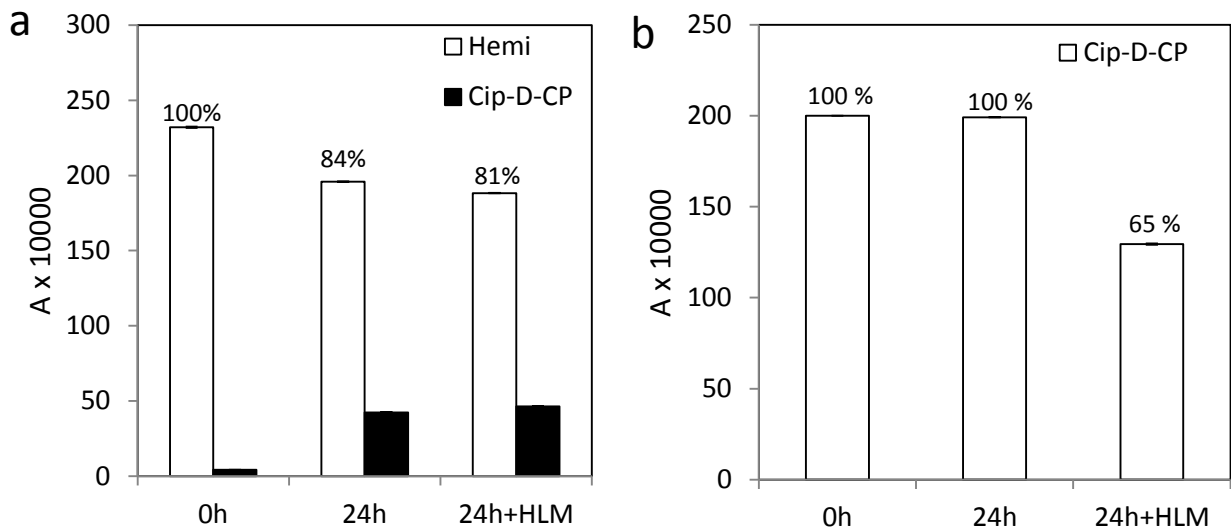


Abbildung 13: Inkubation von Hemi (a) und Cip-D-CP (b) mit humanen Lebermikrosomen (HLM)

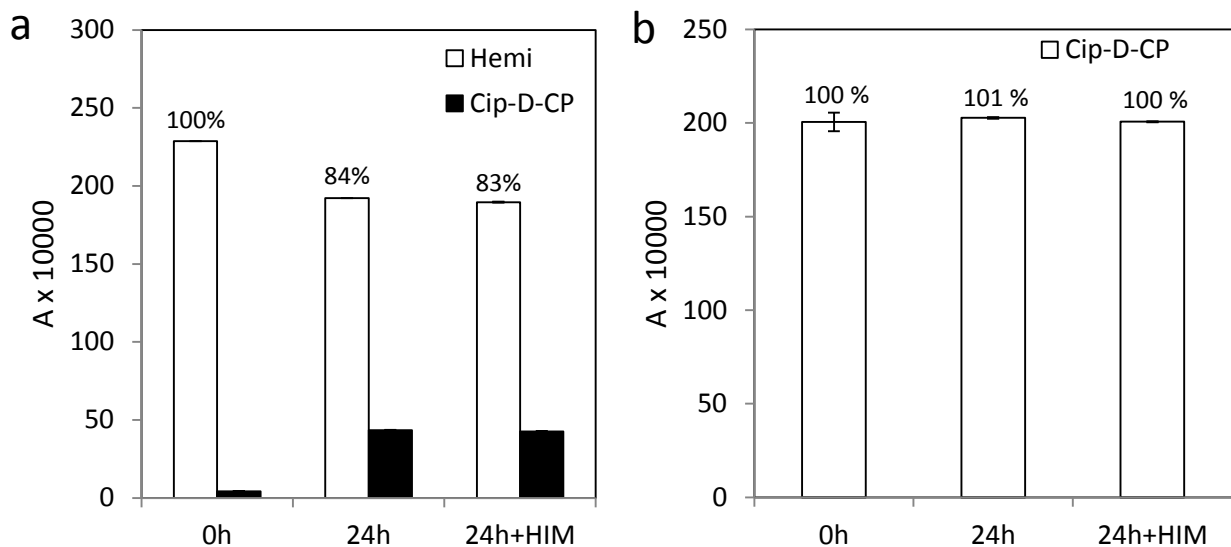


Abbildung 14: Inkubation von Hemi (a) und Cip-D-CP (b) mit humanen intestinalen Mikrosomen (HIM)

Weiterhin wurde Hemi in einem Plasmastabilitätstest mit humanem Blutplasma getestet (Abb. 15). Hier fanden sich keine Hinweise auf eine erhöhte Instabilität von Hemi (Abb. 15 a) oder Cip-D-CP (Abb. 15 b) in humanem Blutplasma. Die Beobachtung, dass Hemi in Anwesenheit des Plasmas sogar etwas stabiler war als in reinem Puffer (Abb. 15 a) war höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Puffer/Plasma-Mischung einen etwas alkalischeren pH-Wert hatte als der reine Puffer (Daten nicht gezeigt). Ein alkalischer pH führt, wie in Abbildung 12 a gezeigt, zu einer Stabilisierung des Hemiamins. Weiterführende Pharmakokinetik-Untersuchungen auch *in vivo* werden hier nötig sein, falls die Substanz weiterentwickelt werden sollte.

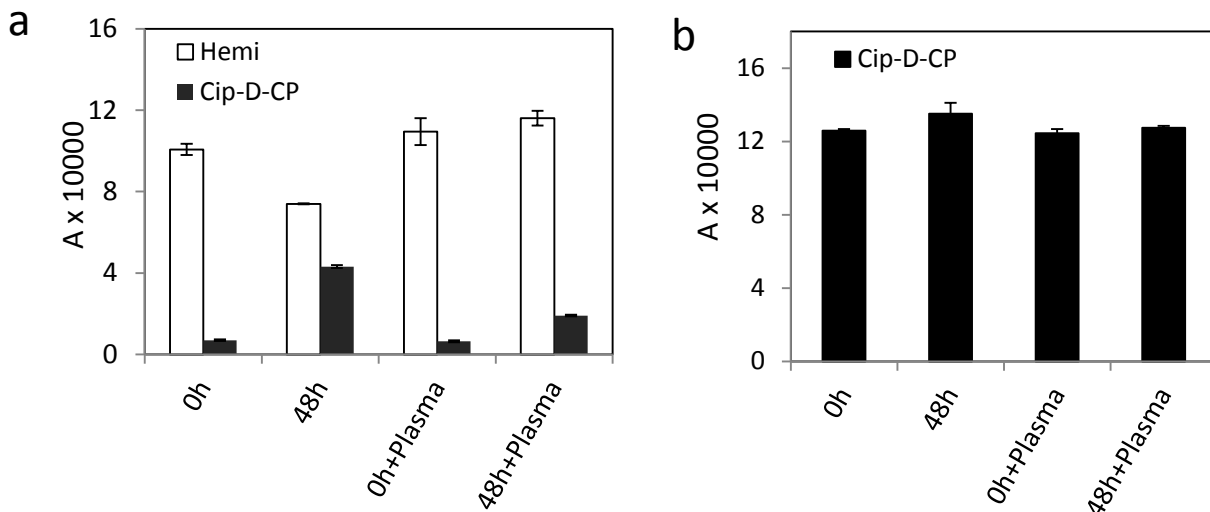


Abbildung 15: Plasmastabilitätstest mit humanem Plasma von Hemi (a) im Vergleich zu Cip-D-CP (b)

Die Toxikologie von Hemi und Cip-D-CP wurde in bakteriellen Mutagenitäts- und Genotoxizitätstests untersucht.

Das Testprinzip des UmuC Tests beruht darauf, dass gentechnisch veränderte Bakterien mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz exponiert werden. Hierbei induzieren genotoxische Substanzen das sogenannte umuC-Gen, das zum SOS-Reparatursystem der Zelle gehört, welches einer Schädigung der bakteriellen Erbsubstanz entgegenwirkt. Durch die Kopplung des umuC-Gens mit dem lacZ-Gen für die β -Galaktosidase kann indirekt die Aktivierung des umuC-Gens über eine Farbstoffbildung nachgewiesen werden. Als Maß für die Genotoxizität wird die Induktionsrate (IR) als Verhältnis der Extinktion bei 420 nm gegenüber der Negativkontrolle angegeben. Der Test wird sowohl mit als auch ohne S9-Extrakt zur metabolischen Aktivierung von Gentoxinen durchgeführt.

Die Substanzen Hemi und Cip-D-CP waren im UmuC Test deutlich weniger genotoxisch als die Ausgangssubstanz Ciprofloxacin (Abb. 16). Das verbleibende Fragment Cip-D-CP war dabei ebenfalls schwächer aktiv als Hemi. Bei der Interpretation dieser Resultate muss beachtet werden, dass das antibiotische Wirkungsprinzip der Fluorchinolone genotoxischen Stress durch Inhibition der DNA-Replikation hervorruft. Die Ergebnisse des UmuC Tests können daher zu einem großen Teil auf dieser „on target“ Wirkung beruhen. Aus diesem Grund wurde zusätzlich der bakterielle Ames-Test durchgeführt (Abb. 18 und 19).

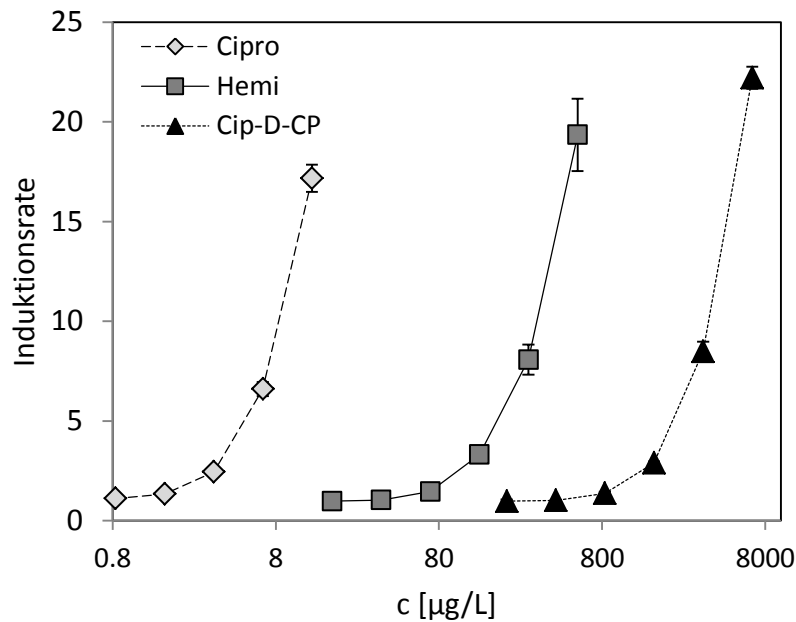


Abbildung 16: UmuC-Test von Hemi und Cip-D-CP im Vergleich zu Ciprofloxacin ohne S9-Inkubation

Der Befund, dass die Präinkubation der Testsubstanzen mit S9-Extrakt in allen Fällen zu einer Abschwächung der genotoxischen Wirkung führte (Abb. 17), muss in dem Kontext daher als Hinweis gewertet werden, dass sowohl Ciprofloxacin als auch Hemi und Cip-D-CP durch die S9-Behandlung in Metabolite mit schwächerer antibiotischer Wirkung überführt werden, so dass sich die durch den Wirkmechanismus induzierte Genotoxizität abschwächt. Dies deckt sich für Cip-D-CP mit der Beobachtung, dass die Inkubation mit Leberenzymen zu einer Umwandlung von Cip-D-CP führte (Abb. 13b). Im Laufe des Projektes wurden daher externe und interne Schritte unternommen, um die Identität dieser Metabolite zu klären. Insbesondere für die Bewertung des verbleibenden Fragments ist die Frage von wichtiger Bedeutung. Am Projektende blieb dieser Punkt jedoch offen. Die Klärung wird wichtig bleiben, falls Hemi oder eine andere Substanz, die in Cip-D-CP zerfällt, weitergehend entwickelt wird.

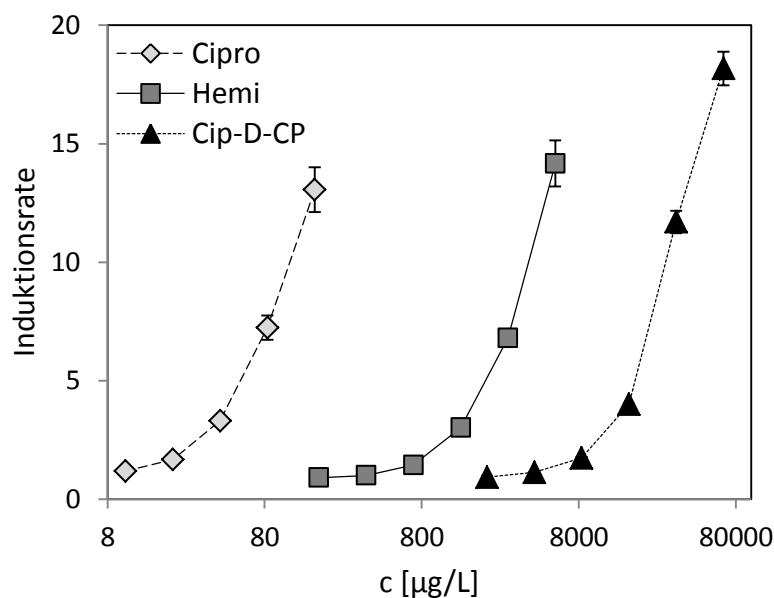


Abbildung 17: UmuC-Test von Hemi und Cip-D-CP im Vergleich zu Ciprofloxacin mit S9-Inkubation

Aus obengenannten Gründen wurde zusätzlich der sog. Ames Test für bakterielle Mutagenität durchgeführt. Das Prinzip beruht darauf, dass Bakterien, die durch Mutation in einem Gen nicht mehr in der Lage sind, eine bestimmte Aminosäure zu synthetisieren, in einem diese Aminosäure nicht enthaltenden Nährmedium inkubiert werden. Da diese Bakterien zur Fortexistenz auf diese Aminosäure angewiesen sind, würden sie absterben bzw. könnten sich nicht in diesem Mangelmedium vermehren. Nun setzt man die Bakterien dem potenziellen Mutagen aus. Kommt es unter Einfluss der Testsubstanz zu einer Rückmutation, so kann das mutierte Bakterium in dem Reaktionsgefäß wieder proliferieren, so dass die Nährstoffe des Mediums verbraucht werden und ein Farbindikatorumschlag erzeugt wird. Dieser Effekt kann konzentrationsabhängig quantifiziert werden und liefert damit Hinweise, dass eine Testsubstanz mutagen sein könnte.

Die Testkonzentration der antibiotisch aktiven Substanzen wurde hier so gewählt, dass lediglich Konzentrationen unterhalb der antibiotischen Wirkschwelle in den Testbakterien verwendet wurden, um falsch negative Resultate durch Inhibition von möglichen Rückmutanten zu verhindern.

Weder mit noch ohne S9-Präinkubation wurden hier Hinweise auf bakterielle Mutagenität von Hemi und Cip-D-CP gefunden (Abb. 18 und 19). Weitere eingehende Untersuchungen müssten sich aber anschließen, falls Hemi oder eine Substanz basierend auf Cip-D-CP für die Anwendung als Antibiotikum weiterentwickelt werden sollte.

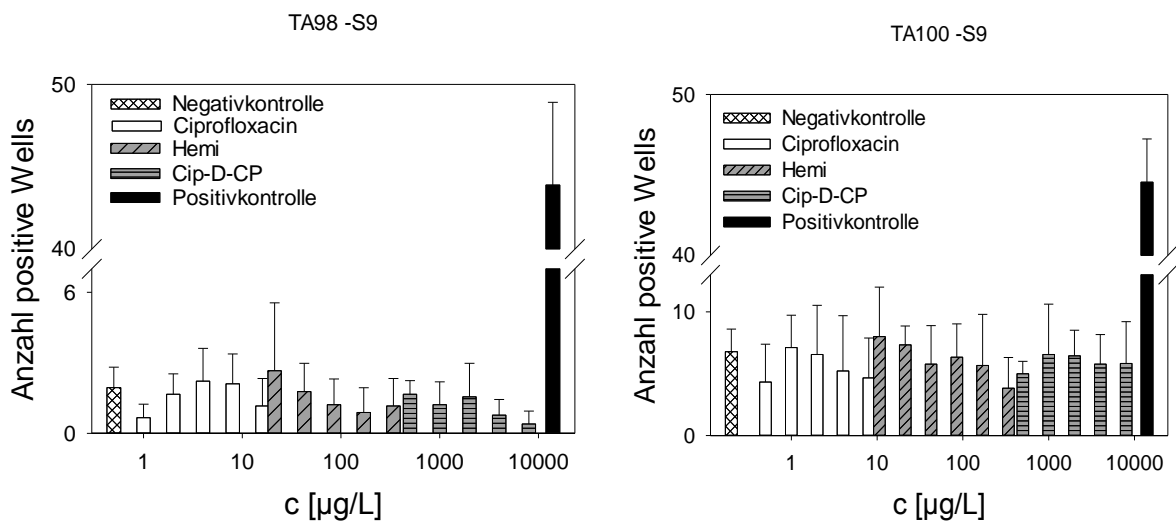


Abbildung 18: Ames-Test von Hemi und Cip-D-CP im Vergleich zu Ciprofloxacin ohne S9-Inkubation

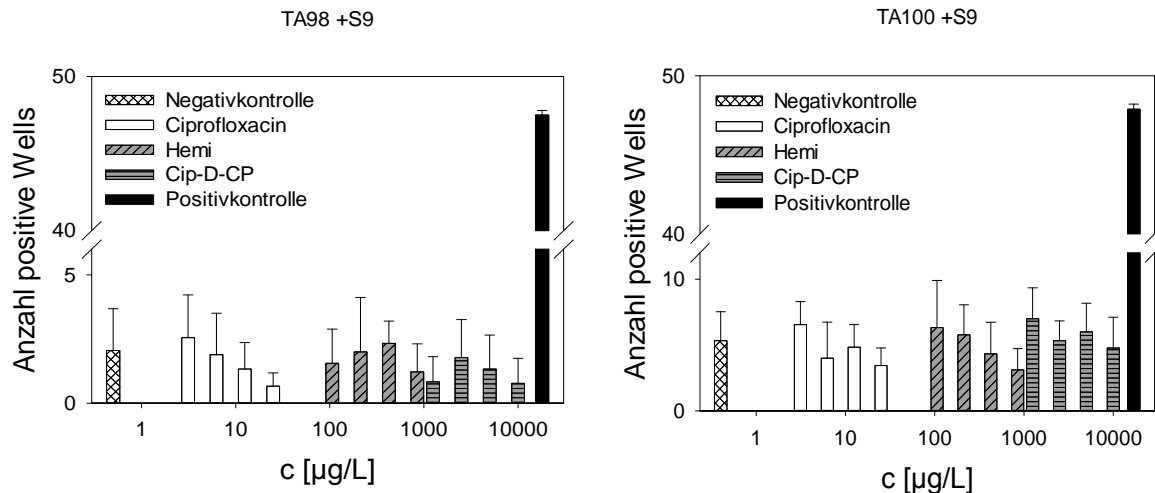


Abbildung 19: Ames-Test von Hemi und Cip-D-CP im Vergleich zu Ciprofloxacin mit S9-Inkubation

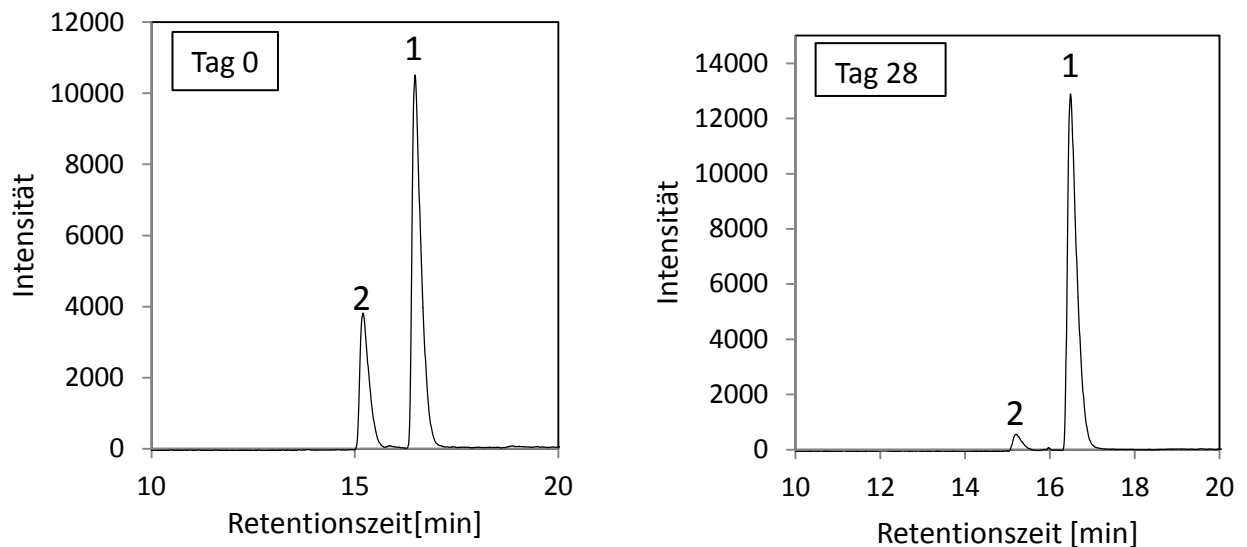


Abbildung 20: HPLC-Analyse von Hemi im geschlossenen Flaschentest (CBT): Hemi (1), Cip-D-CP (2) an Tag 0 und Tag 28

Unter den Testbedingungen des standardisierten Abbautests „geschlossener Flaschentest“ (OECD 301D), der näherungsweise Verhältnisse in Oberflächengewässern simuliert, findet der Zerfall von Hemi in Cip-D-CP statt (Abb. 20). Cip-D-CP war nicht weiter abbaubar. Auf der anderen Seite war der abspaltbare Linker (γ -Butyrolacton) im „geschlossener Flaschentest“ (OECD 301D) sehr gut biologisch abbaubar (Abb. 21).

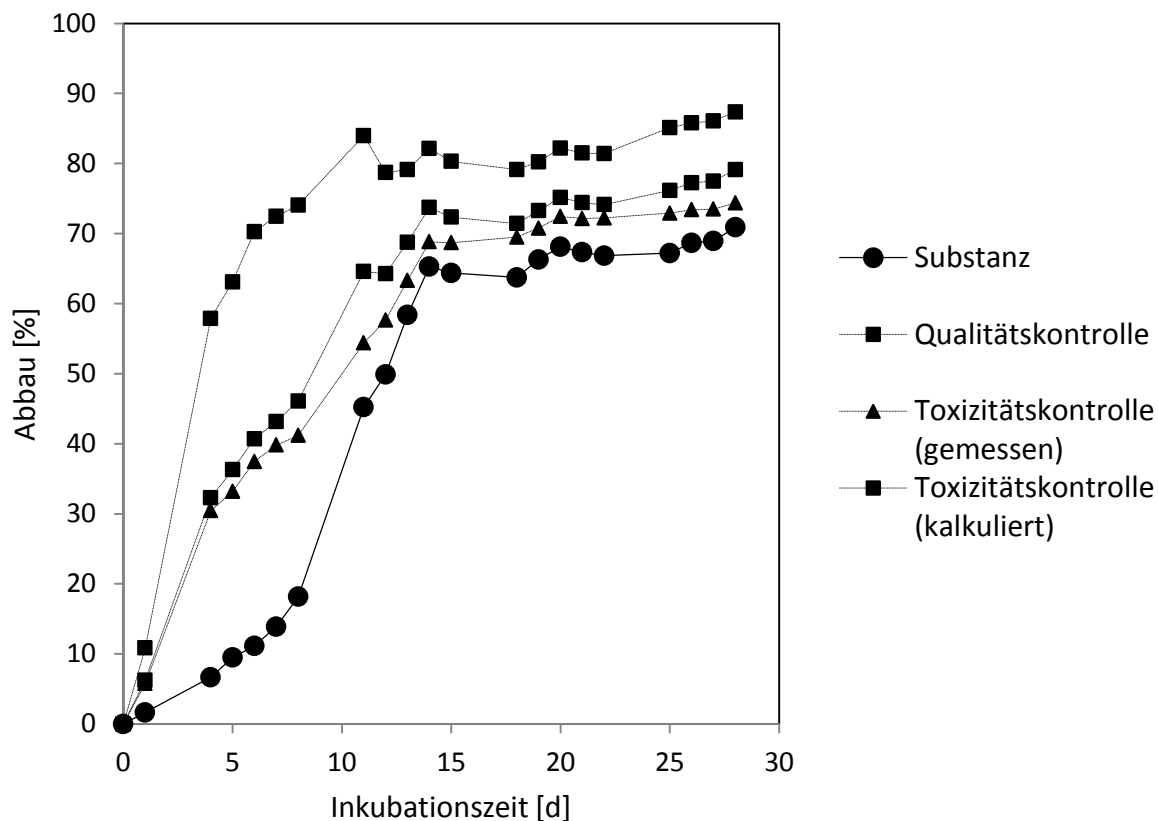


Abbildung 21: Abbaubarkeit von γ -Butyrolacton im geschlossenen Flaschentest (CBT)

Da das verbleibende Fragment Cip-D-CP nach bisherigen Erkenntnissen zwar deutlich an antibiotischer Aktivität verliert, aber stabil bleibt und nicht weiter abgebaut wird, wurde außerdem eine erste ökotoxikologische Abschätzung *in vitro* (Algenwachstumstest in *P. subcapitata*) und *in silico* mit verschiedenen QSAR Modellen durchgeführt.

Hier wurden bisher keine Hinweise auf eine erhöhte Ökotoxizität von Hemi oder dem verbleibenden Fragment Cip-D-CP gefunden. Die EC_{50} -Werte von Hemi und Cip-D-CP (Tabelle 2) lagen am unteren Ende des Bereiches von etablierten Fluorchinolonen (1.1 bis 22.7 mg/L aus Robinson *et al.* 2005). QSAR-Berechnungen mit der Plattform Vega 1.1.3 lieferten ebenfalls keine Hinweise auf eine erhöhte Ökotoxizität im Vergleich zu Ciprofloxacin (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 2: Ökotoxizität von Hemi und Cip-D-CP in *P. subcapitata*

Substanz	EC_{50} [mg/L]
Cip-D-CP	20.4 ± 2.3
Hemi	14.8 ± 2.8

4.3. CG008-Hemi

Die Grundstruktur CG008 mit einem Morpholinrest anstelle des Piperazinrestes hatte in den Arbeiten einer japanischen Gruppe eine modulierte Aktivität mit besonderer Wirkung gegen

S. aureus und des Weiteren weniger Neurotoxizität als das Grundgerüst mit einem Piperazinrest (Araki *et al.* 1993).

Da sich außerdem in eigenen Vorarbeiten gezeigt hatte, dass die Grundstruktur CG008 (Abb. 4) möglicherweise verbessert abbaubar ist oder besser an Klärschlamm adsorbiert, wurde der Hemiaminal-Linker auf Basis von γ -Butyrolacton mit dieser Grundstruktur kombiniert. Dies ergab die Substanz CG008-Hemi (Abb. 4).

CG008-Hemi zeigte bei der Wachstumshemmung in *E. coli* eine MHK zwischen 1 und 2 $\mu\text{g/ml}$ (Abb. 22). Die Wachstumshemmung des verbleibenden Fragments CG008 schwächte sich im Vergleich dazu deutlich ab. Es kommt also wie bei Hemi zu einer Abschwächung der antibiotischen Aktivität nach Abspaltung des Hemiaminal-Linkers.

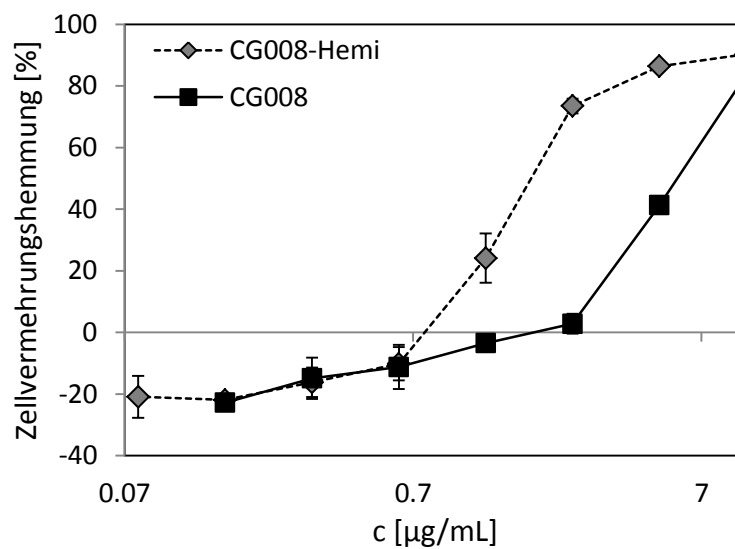


Abbildung 22: Wachstumshemmung von *E. coli* Bakterien durch CG008-Hemi im Vergleich zur Grundstruktur CG008

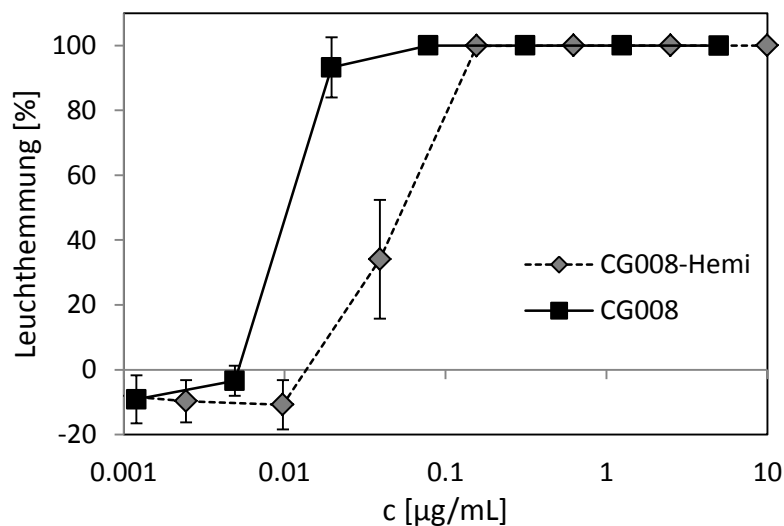


Abbildung 23: Leuchthemmung von *V. fischeri* Bakterien durch CG008-Hemi im Vergleich zur Grundstruktur CG008

Im Gegensatz dazu zeigte sich im Leuchthemmungstest im Umweltbakterium *V. fischeri*, dass die Grundstruktur CG008 hier besonders aktiv war und hier die Wirkung von CG008-Hemi deutlich überschritt (Abb. 23). Somit wurden erste Hinweise gefunden, dass die Ökotoxizität des verbleibenden Fragments CG008 im Vergleich zur Ausgangssubstanz möglicherweise sogar zunimmt. Daher wurde die Substanz für weitere Untersuchungen zunächst niedriger priorisiert als Hemi, um die vorhandenen Mittel für die aussichtsreichsten Substanzen verwenden zu können.

Außerdem wurde der Zerfall von CG008-Hemi unter verschiedenen pH-Bedingungen getestet (Abb. 24). Es konnte gezeigt werden, dass der labile Linker unter physiologischen Bedingungen langsam und bei niedrigem pH schnell abgespalten wird. Die gemessenen Zerfallseigenschaften glichen den Eigenschaften der Substanz Hemi (Abb. 12 a, b, c).

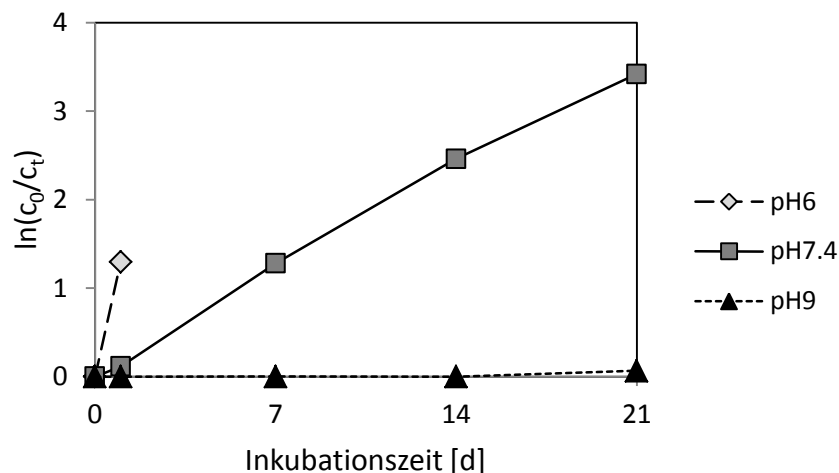


Abbildung 24: Abiotische Hydrolyse von CG008-Hemi bei pH 6, pH 7,4 und pH 9

Eine initiale Messung der antibiotischen Aktivität in verschiedenen pathogenen Bakterien durch unseren Kooperationspartner CO ADD (Australien) ergab erste Hinweise auf antibiotische Aktivitäten in *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* und *A. baumannii* (Daten nicht gezeigt). Weitere eingehendere Untersuchungen müssen hier folgen, um die Befunde zu erhärten. Die Substanz CG008-Hemi ist zusammen mit Hemi schutzrechtlich abgesichert.

4.4. Cip-TH

Um die antibiotische Aktivität basierend auf dem Hemiaminal-Linker zu verbessern, wurden zum Ende des Projektes weitere Derivate mit Linker-Modifikationen hergestellt und getestet. Da es sich um schutzrechtlich unabhängige Weiterentwicklungen handelt, werden die Strukturen im Rahmen dieses Berichtes nicht offengelegt.

Die Substanz Cip-TH zeigte in ersten Experimenten keine Steigerung der Wachstumshemmung von *E. coli* verglichen mit Hemi (Abb. 25 und 10). Es kommt aber wie bei Hemi zu einer messbaren Verstärkung der Wachstumshemmung im Vergleich zu dem verbleibenden Fragment Cip-D-CP.

Weitere Aktivitätsbestimmungen werden darüber Aufschluss bringen, ob Cip-TH dennoch ein attraktives Wirkungsprofil in bestimmten Bakterien hat.

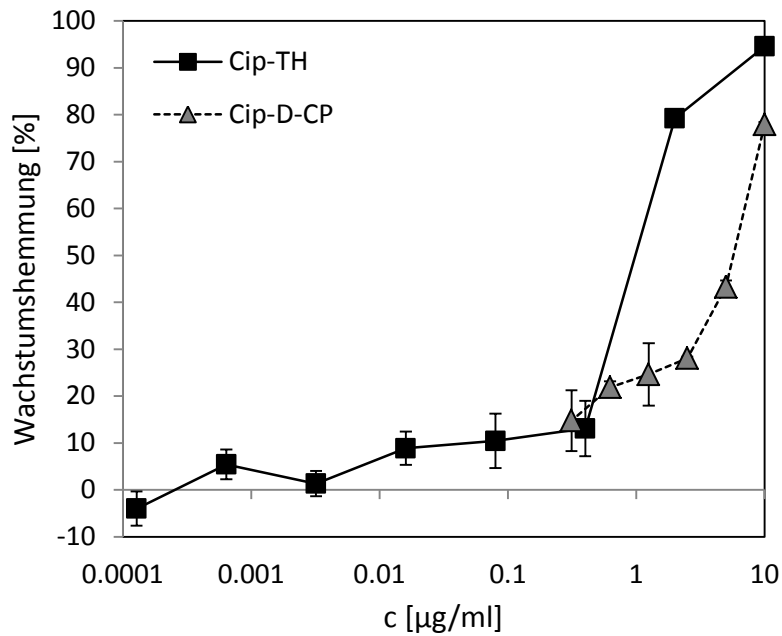


Abbildung 25: Wachstumshemmung von *E. coli* Bakterien durch Cipro-TH im Vergleich zur Grundstruktur Cipro-D-CP

Verglichen mit Hemi und CG008-Hemi zeichnete sich Cipro-TH jedoch durch eine erhöhte Stabilität aus. So betragen die Halbwertszeiten der abiotischen Hydrolyse bei pH 6 4.1d, bei pH 7.4 24d bzw. >1000d bei pH 9.

4.5. Cipro-Homo

Die Substanz Cipro-Homo wurde synthetisiert, da sie im Docking mit *S. aureus* eine vergleichbare Aktivität wie Ciprofloxacin vermuten ließ. Weiterhin ist durch die Modifikation eine geringe Neurotoxizität als bei den bisherigen Derivaten zu erwarten.

Die hohe Aktivität von Cipro-Homo aus den Docking Ergebnissen bestätigte sich in ersten Experimenten mit *E. Coli* jedoch nicht. Allerdings zeigte Cipro-Homo eine antibiotische Aktivität in *E. Coli* mit einem EC_{50} von ca. 2,5 mg/L und ist damit vergleichbar mit CG008-Homo und Cipro-TH (Abb. 26). Da die Docking Ergebnisse auf der Gyrasestruktur von *S. aureus* basierten, sollen weitere Aktivitätsbestimmungen in anderen Bakterien durchgeführt werden, insbesondere in *S. aureus* und verschiedenen MRSA Stämmen.

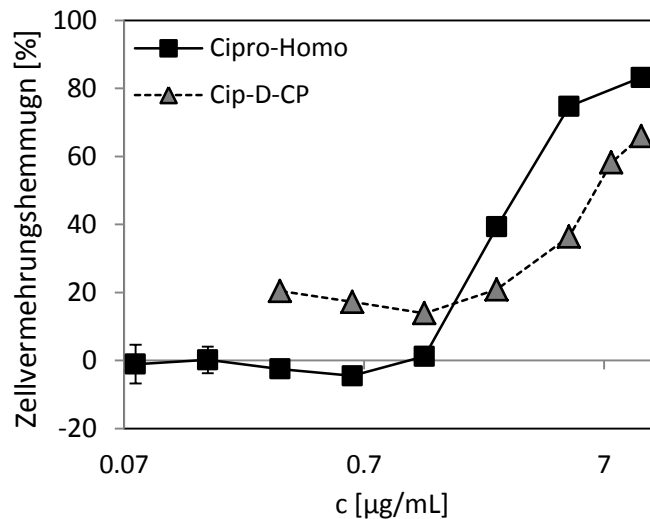


Abbildung 26: Wachstumshemmung von *E. coli* Bakterien durch Cipro-Homo im Vergleich zur Grundstruktur Cip-D-CP

Die Ökotoxizität von Cipro-Homo im Leuchtbakterientest ist mit einem EC_{50} 5 mg/L am geringsten von allen synthetisierten Derivaten. Die Ökotoxizität des Fragmentes Cip-D-CP ist mit einem EC_{50} von 286 µg/L jedoch ca. 17-mal höher (Abb. 27).

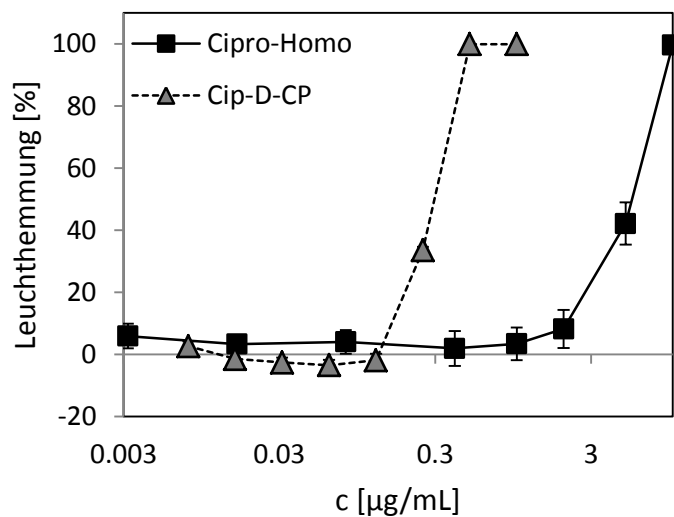


Abbildung 27: Leuchthemmung von *V. fischeri* Bakterien durch Cipro-Homo im Vergleich zur Grundstruktur Cip-D-CP

In den bisherigen Untersuchungen zur Stabilität erwies sich Cipro-Homo als das stabilste Derivat (Abb. 28). Dies äußert sich in einer Halbwertszeit von ca. 37d bei pH 6 bzw. 280d bei pH 7.4. Diese Ergebnisse bestätigten sich in einem ersten Abbauersuch. So wurde Cipro-Homo im geschlossenen Flaschentest sowohl biotisch als auch abiotisch innerhalb der Testdauer von 28 Tagen nicht abgebaut.

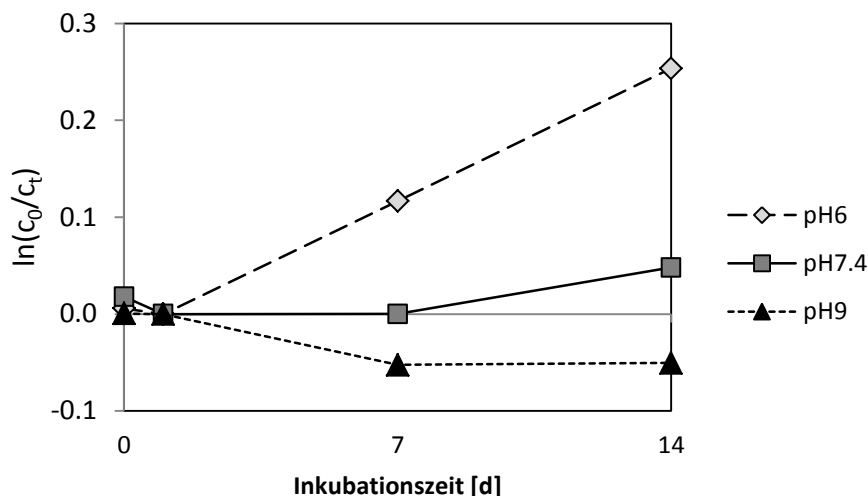


Abbildung 28: Abiotische Hydrolyse von Cipro-Homo bei pH 6, pH 7,4 und pH 9

5. Öffentlichkeitsarbeit/Veröffentlichungen/Vorträge

Patentanmeldung für Cip-Pro und Cip-P2C als neue antibiotische Substanzen. Weitere Patentanmeldung für Hemi und CG008-Hemi als neue antibiotische Substanzen.

Deutsche Patentanmeldung - Anmeldenummer: 10 2017 218 114.1

Anmelder: Leuphana Universität Lüneburg Stiftung Öffentlichen Rechts

Deutsche Patentanmeldung - Anmeldenummer: 10 2017 218 119.2

Anmelder: Leuphana Universität Lüneburg Stiftung Öffentlichen Rechts, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Publikation Hemi

Das Projekt wurde in mehreren Vorträgen erwähnt, ohne vertrauliche Informationen zu präsentieren. Darunter bei:

Pressemitteilung Leuphana

<https://idw-online.de/de/news684921>

Die Pressemitteilung wurde von über 20 Nachrichtenseiten und Zeitungen (darunter Berliner Morgenpost, Hannoversche Allgemeine Zeitung, focus.de, Landeszeitung Lüneburg, Die Tageszeitung (TAZ)) und vom Fernsehen/Radio (NDR, WDR) übernommen und gemeldet.

Startseitenartikel Leuphana

<https://www.leuphana.de/news/meldungen-forschung/ansicht/datum/2017/11/15/institut-fuer-nachhaltige-chemie-und-umweltchemie-forscherteam-entwickelt-umweltvertraeglichere-ant.html>

6. Fazit

Im Rahmen des Projekts wurden wirksame und umweltverträgliche Varianten des Antibiotikums Ciprofloxacin aufbauend auf einer Vielzahl bereits vorliegender eigener Ergebnisse zur Abbaubarkeit von Ciprofloxacin am Computer entwickelt und anschließend synthetisiert und *in vitro* getestet: Ausgehend von dem bekannten Antibiotikum Ciprofloxacin wurden mithilfe von kombinatorischen Bibliotheken Derivate entwickelt werden, die rasch in abbaubare und/oder nicht mehr antibiotisch aktive Fragmente zerfallen.

Mit den synthetisierten Prototypen wurden Wirksamkeitsnachweise *in vitro* bezogen auf Umweltverträglichkeit durch Verbesserung der Abbaubarkeit und auf pharmakologische Aktivität und ausgewählte unerwünschte Nebenwirkungen (Mutagenität, Gentoxizität, Ökotoxizität) erbracht. Außerdem wurde die Stabilität der neuen Prototypen gegenüber verschiedenen pH-Bedingungen, unter Einfluss von humanen intestinalen Enzymen und Leberenzymen, sowie in humanem Blutplasma untersucht. Erfolgreiche Prototypen wurden patentiert und zur Publikation vorbereitet. Das Projekt hat die Vereinbarkeit von Wirkstoffentwicklung mit umweltwissenschaftlichen und Nachhaltigkeitsaspekten demonstriert und damit das Forschungsfeld der nachhaltigen Pharmazie ausgebaut. Für die erfolgreichen Prototypen werden nun Partner zur weiteren präklinischen und klinischen Entwicklung und nachfolgenden Kommerzialisierung gesucht.

7. Literatur

Araki, K; Kuroda, T; Uemori, S; Moriguchi, A; Ikeda, Y; Hirayama F; Yokoyama, Y; Iwao, E; Yakushiji, T (1993) Quinolone Antimicrobial Agents Substituted with Morpholines at the 7-Position. Syntheses and Structure-Activity Relationships. *Journal of Medicinal Chemistry*, 36, 1356–1363.

Bengtsson-Palme, J.; Larsson, D. G. J. (2016) Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environment international*, 86, 140–149.

Domagala, J. M.; Hanna, L. D.; Heifetz C. L.; Hutt, M. P.; Mich, T. F.; Sanchez, J. P.; Solomon, M. (1986) New Structure-Activity Relationships of the Quinolone Antibacterials Using the Target Enzyme. The Development and Application of a DNA Gyrase Assay. *Journal of Medicinal Chemistry*, 29, 395–404.

Ferrando-Climent, L.; Rodriguez-Mozaz, S.; Barceló, D. (2014) Incidence of anticancer drugs in an aquatic urban system: from hospital effluents through urban wastewater to natural environment. *Environmental pollution*, 193, 216–223.

Ferreira da Silva, M.; Vaz-Moreira, I.; Gonzalez-Pajuelo, M.; Nunes, O. C.; Manaia, C. M. (2007) Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS microbiology ecology*, 60, 166–176.

- Golet, E. M.; Strehler, A.; Alder, A. C.; Giger, W. (2002) Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. *Analytical Chemistry*, 74, 5455–5462.
- Gullberg, E.; Cao, S.; Berg, O. G.; Ilbäck, C.; Sandegren, L.; Hughes, D.; Andersson, D. I. (2011) Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS pathogens*, 7, e1002158.
- Hartmann, A.; Alder, A. C.; Koller, T.; Widmer, R. M. (1998): Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 377–382.
- Ikeda, K.; Yoshisue, K.; Matsushima, E.; Nagayama, S.; Kobayashi, K.; Tyson, C.; Chiba, K.; Kawaguchi, Y. (2000) Bioactivation of Tegafur to 5-Fluorouracil Is Catalyzed by Cytochrome P-450 2A6 in Human Liver Microsomes in Vitro. *Clinical Cancer Research*, 6, 4409–4415.
- Kümmerer, K. (2001) Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere*, 45, 957–969.
- Kümmerer, K.; Al-Ahmad, A.; Mersch-Sundermann, V. (2000) Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere*, 40, 701–710.
- Kümmerer, K.; Dionysiou, D.; Olsson, O.; Fatta-Kassinos, D. (2018) A path to clean water. *Science*, 361, 222–224.
- Kümmerer, K. (2006) Vorausschauend Kriterien Nachhaltiger Chemie integrieren: Von Anfang an – rationales Design von Molekülen. In: Angrick, Meinzer, Kümmerer (Hg.): Nachhaltige Chemie Metropolis Marburg.
- Larsson, D. G. J.; de Pedro, C.; Paxeus, N. (2007) Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, 148, 751–755.
- Lindberg, R. H.; Olofsson, U.; Rendahl, P.; Johansson, M. I.; Tysklind, M.; Andersson, B. A. V. (2006) Behavior of fluoroquinolones and trimethoprim during mechanical, chemical, and active sludge treatment of sewage water and digestion of sludge. *Environmental Science & Technology*, 40, 1042–1048.
- Pal, C.; Bengtsson-Palme, J.; Kristiansson, E.; Larsson, D. G. J. (2016) The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes. *Microbiome*, 4, 54–68.
- Rastogi, T.; Leder, C.; Kümmerer, K. (2015) Re-Designing of Existing Pharmaceuticals for Environmental Biodegradability: A Tiered Approach with β -Blocker Propranolol as an Example. *Environmental Science & Technology*, 49, 11756–11763.
- Robinson, A. A.; Belden, J. B.; Lydy, M. J. (2005) Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 423–430.

Simplicio, A. L.; Clancy, J. M.; Gilmer, J. F. (2008) Prodrugs for Amines. *Molecules*, 13, 519–547.

Vila, J.; Ruiz, J.; Marco, F.; Barcelo, A.; Goni, P.; Giralt, E.; Jimenez de Anta, T. (1994) Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 2477–2479.