

### **Diglycinierung von Antibiotika-Prodrogen erhöht deren Wirksamkeit**

**Die weltweit zunehmenden Antibiotika-Resistenzen verlangen nach neuen Ansätzen, um die Effizienz von antibakteriell wirksamen Substanzen zu verbessern. Jetzt wurde entdeckt, dass die Konjugation von Antibiotika-Prodrogen mit Diglycin deren Wirksamkeit drastisch steigert. Bei Chloramphenicolsuccinat erhöht das Anfügen von Diglycin die Effizienz der Prodroge um das zehnfache. Dabei wird das von den Bakterien aufgenommene Konjugat in den Zellen durch Esterasen schnell zu dem aktiven Antibiotikum Chloramphenicol hydrolysiert. Darüber hinaus zeigte das Konjugat im Vergleich zum Chloramphenicol eine stark reduzierte Cytotoxizität gegenüber Knochenmarkzellen. Auch bei anderen Prodrogen erwies sich die Diglycinierung als effektive Strategie zur Verbesserung der antibakteriellen Wirksamkeit von Antibiotika.**

Antibiotikaresistenzen sind ein zunehmendes Problem bei der Behandlung von zahlreichen bakteriellen Infektionen. Bedauerlicherweise kann die Entwicklung neuer Antibiotika mit dem Auftreten neuer Antibiotika-resistenter Bakterien nicht Schritt halten. Aus diesem Grund sind alternative Vorgehensweisen zur Bekämpfung multiresistenter Erreger nötig. Eine Möglichkeit ist die Verbesserung der Wirksamkeit und Sicherheit bekannter Medikamente, beispielsweise durch Modifizierung der Wirkstoffe in Form von Prodrogen. Eine Prodroge ist ein Arzneimittel ohne eigene biologische Aktivität, das im Körper durch chemische oder enzymatische Reaktionen in den aktiven Wirkstoff umgewandelt wird. Durch das Prodrogen-Konzept können die physikochemischen, biopharmazeutischen und pharmakokinetischen Eigenschaften eines Wirkstoffs verbessert werden. Dadurch können zum Beispiel Wasserlöslichkeit und Stabilität erhöht oder Nebenwirkungen und Toxizität reduziert werden. Ferner kann mithilfe einer Prodroge eine gezielte Anreicherung eines Wirkstoffes in Geweben oder Erregern bewirkt werden.

Jetzt ist es Forschern von der Brandeis University (Massachusetts, USA) gelungen, das Breitbandantibiotikum Chloramphenicol (Abb. 1a) in eine neuartige Prodroge umzuwandeln, die von Gram-negativen Bakterien intrazellulär schnell zu aktivem Chloramphenicol hydrolysiert wird. Chloramphenicol ist sehr wirksam gegen Bakterien, allerdings ist der klinische Einsatz des Antibiotikums aufgrund von Nebenwirkungen stark eingeschränkt. So kann Chloramphenicol eine Knochenmarkdepression (Knochenmarkversagen mit Verringerung aller Zellen des Blutes) hervorrufen. Aus diesem Grund wurde schon früher das lipophile Chloramphenicol in eine wasserlösliche, inaktive Prodroge durch Veresterung mit Bernsteinsäure umgewandelt. Zwar führt das so erhaltene Chloramphenicolsuccinat nicht mehr zur Knochenmarkdepression, das Derivat ist allerdings weniger wirksam, da es von Bakterien schlecht aufgenommen wird und daher im menschlichen Körper zum aktiven Wirkstoff hydrolysiert werden muss. Die Hydrolyse von Chloramphenicolsuccinat ist aber oft unvollständig und zudem wird die Prodroge schnell über die Niere ausgeschieden.

Um die Aufnahme und Retention der Prodroge in Bakterien zu verbessern, konjugierten die Forscher Chloramphenicolsuccinat mit Diglycin (Abb 1a). Hinter diesem Ansatz steckte der Grundgedanke, dass Gram-negative Bakterien Oligopeptid-Transporter zur Aufnahme von Di- und Tripeptiden exprimieren. Im Test mit *Escherichia coli* zeigte das Diglycin-Konjugat eine zehnfach höhere antibakterielle Aktivität als unkonjugiertes Chloramphenicolsuccinat. So war die minimale Hemm-Konzentration (MHK) des Diglycin-Konjugats mit 20 µM identisch mit der von Chloramphenicol. Im Gegensatz dazu betrug die MHK von Chloramphenicolsuccinat mehr als 200 µM. Im Gegensatz zu Chloramphenicol zeigte das Diglycin-Konjugat bemerkenswerterweise keine Cytotoxizität gegenüber Knochenmarks-Stromazellen (Zelllinie HS-S) und die Cytotoxizität gegenüber Leberzellen (Zelllinie HepG2) und Nierenzellen (Zelllinie HEK293) waren geringfügig reduziert. Weitere Untersuchungen zeigten, dass mindesten zwei Glycin-Reste nötig sind, um Chloramphenicolsuccinat in eine aktive Prodroge umzuwandeln, denn das Monoglycin-Derivat hatte ebenfalls einen MHK von >200 µM. Die Einführung eines dritten Glycin-Restes verbesserte die Aktivität jedoch nicht, die MHK blieb bei 20 µM.

Die Ausgangsüberlegung, dass das Diglycin-Konjugat mittels Oligopeptid-Transporter in Bakterienzellen gelangt, erwies sich allerdings als unzutreffend. Mutanten, bei denen das Gen für den Protonen-gekoppelten Oligopeptid-Transporter YgdR der inneren Membran entfernt worden war, zeigten nur eine gering erhöhte Vitalität (10%) im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. Hingegen führte die Deletion des Gens für den Siderophor-Transporter FepA der äußeren Membran zu einer deutlich erhöhten Vitalität (50%). Die Ergebnisse dieser Versuche deuten darauf hin, dass das Diglycin-Konjugat auf verschiedenen Wegen, einschließlich Diffusion, in Bakterien gelangt.

Innerhalb der Bakterienzelle wird das Diglycin-Konjugat schnell durch zahlreiche Esterasen zu aktivem Chloramphenicol hydrolysiert. Die Inkubation mit einem *E. coli* Zell-Lysat führte innerhalb von zwei Stunden zur vollständigen Hydrolyse der Prodroge. Im Gegensatz dazu wurde Chloramphenicolsuccinat nur zu 20% innerhalb von 24 Stunden hydrolysiert, was seine schlechte klinische Wirksamkeit erklärt. Weitere Untersuchungen mit Mutanten zeigten schließlich, dass die beiden Esterasen BioH und YjF eine wichtige Rolle bei der Hydrolyse des Diglycin-Konjugats spielen. Deren Überexpression führte zu einer erhöhten Empfänglichkeit der Bakterien für Diglycin-konjugierte Antibiotika.

Die Strategie der Diglycinierung konnte auch erfolgreich auf andere Antibiotika und Prodrogen angewendet werden. Die Substitution von Bernsteinsäure durch Cyclohexan-1,2-dicarbonsäure liefert eine Chloramphenicol-Prodroge (Abb. 1a) mit geringer Aktivität (MHK >200 µM). Auch bei dieser führte die Konjugation mit Diglycin zu einer neuen Prodroge (Abb 1a) mit deutlich erhöhter Aktivität (MHK = 50 µM). Auch die Diglycinierung des succinylierten Antibiotikums Ciprofloaxin (Abb. 1b) lieferte eine neue Prodroge (Abb. 1b), die mit einer MHK von 0.5 µM eine zweifach höhere Aktivität zeigte als die Ausgangsverbindung (MHK 1 µM).

Die Studie hat gezeigt, dass die Konjugation von Antibiotika-Prodrogen mit Diglycin ihre Wirksamkeit und Sicherheit verbessert. Im Gegensatz zum ursprünglichen Grundgedanken, die Aufnahme von Prodrogen durch Diglycinierung zu verbessern, zeigte sich jedoch, dass wohl die schnelle intrazelluläre Hydrolyse der entscheidende Faktor für die erhöhte Wirksamkeit einer diglycinierten Prodroge ist (Abb. 2). Die Diglycinierung scheint demnach ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung neuer Antibiotika zu sein. Ob sich die hohen Erwartungen an diese Substanzen wirklich erfüllen, müssen zukünftige klinische Studien zeigen.

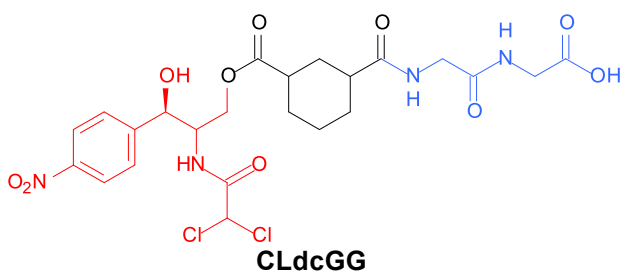
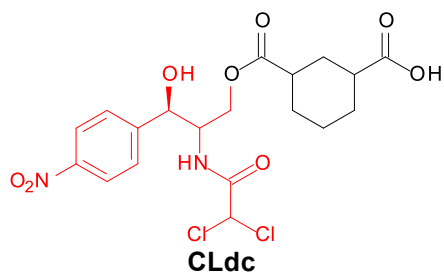
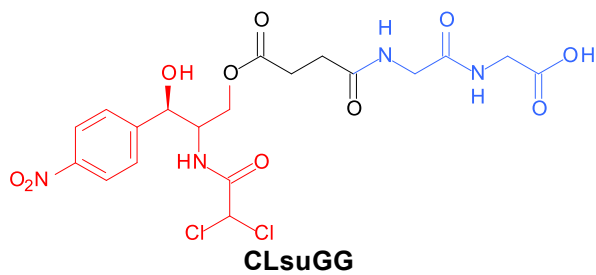
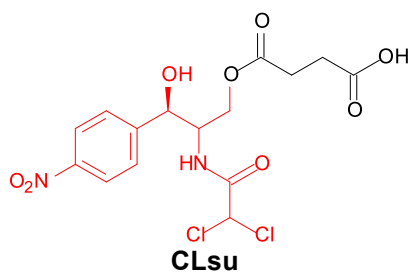
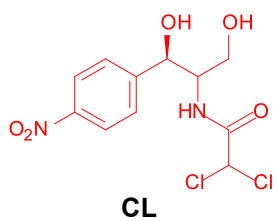
[J. Wang et al., *Angew. Chem.* **131**, 10741 (2019)]

*Priv.-Doz. Dr. Dietmar Steverding, Norwich, Großbritannien*

**Abb. 1.** Chemische Strukturen von Chloramphenicol (CL) und der Chloramphenicol-Prodrogen Chloramphenicolsuccinat (CLsu) mit dem diglycinierten Konjugat (CLsuGG) und Chloramphenicol-Cyclohexan-1,2-dicarbonsäure-Ester (CLdc) mit dem diglycinierten Konjugat CLdcGG (**a**) sowie die Ciprofloxacin-Prodrogen Ciprofloxacinsuccinat (CIPsu) mit dem diglycinierten Konjugat (CIPsuGG) (**b**). Das aktive Antibiotikum ist rot, Bernsteinsäure bzw. Cyclohexan-1,2-dicarbonsäure sind schwarz und Diglycin ist blau dargestellt. Andere Verbindungsstrukturen sind grau dargestellt.

**Abb. 2.** Aktivierung der Chloramphenicol-Prodroge Chloramphenicol (CLsu) im Vergleich mit dem Diglycin-Konjugat (CLsuGG). Nachdem die Prodrogen auf verschiedenen Wegen in die Bakterienzelle gelangt sind, setzen Esterasen durch Hydrolyse die aktive Form des Antibiotikums frei. CLsu wird nur langsam hydrolysiert, sodass nur wenige Moleküle des aktiven Antibiotikums Chloramphenicol (CL) in der Bakterienzelle entstehen. Im Gegensatz dazu wird CLsuGG sehr schnell gespalten, sodass sehr viel mehr aktives Chloramphenicol gebildet wird. FepA = Siderophor-Transporter, YdgR = Oligopeptid-Transporter, LPS = Lipopolysaccharid, AM = äußere Membran, IM = innere Membran, CYT = Cytosol. Schema: D. Steverding verändert nach Wang et al. 2019.

a



b

