Neu entwickeltes Antibiotikum unterbricht den Transport von Lipopolysaccharid in medikamentenresistenten Bakterien

**Antibiotikaresistente Mikroben sind weltweit auf dem Vormarsch, und deshalb ist die Entwicklung von wirksamen Medikamenten gegen neue Zielmoleküle dringend erforderlich. Jetzt hat ein schweizerisches Forscherteam eine neue Klasse von Antibiotika erschaffen: Ausgehend von dem natürlichen antimikrobiellen Peptid Thanatin wurden analoge Verbindungen mit arzneimittelartigen Eigenschaften synthetisiert. Diese neuartigen Peptide zeigen eine hohe Wirksamkeit gegenüber gramnegative Enterobakterien *in vitro* und *in vivo* und haben eine geringe Tendenz, Resistenzen hervorzurufen. Die Wirkungsweise dieser neuen Antibiotikaklasse beruht auf einer Störung des Lipopolysaccharid-Transports.**

Die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen stellt eine globale Gesundheitsbedrohung dar: Im Jahr 2019 waren schätzungsweise 4,95 Millionen Todesfälle auf medikamentenresistente Krankheitserreger zurückzuführen [1]. Neben den Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Krankenhauskeimen sind vor allem die gramnegativen Bakterien *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* (siehe NR 7/2022) und *Pseudomonas aeruginosa* für die Mehrzahl der Infektionen mit antibiotikaresistenten Erregern verantwortlich. Im schlimmsten Fall können solche Infektionen mit keinem der gängigen Antibiotika mehr behandelt werden. Ein Grund hierfür ist, dass seit über 50 Jahren keine neuen Antibiotika gegen bisher nicht verwendete Zielmoleküle zugelassen wurden. Daher ist die Entwicklung von antibakteriellen Wirkstoffen gegen neue Zielmoleküle dringend erforderlich.

Ausgehend von dem im Darm der Baumwanze *Podisus maculiventris* vorkommenden, mikrobenhemmenden Peptid Thanatin (Abb. 1) hat eine Forschergruppe der Universität Zürich in Zusammenarbeit mit der Firma Spexis AG (Allschwill, Schweiz) eine neue antibakterielle Wirkstoffklasse entwickelt [2]. Thanatin ist ein 21-Aminosäuren-großes zyklisches Peptid mit antimikrobieller Breitband-Aktivität. Basierend auf Ergebnissen früherer Studien wurde vermutet, dass Thanatin mit hoher Spezifität die Interaktion zwischen LptA-LptA und LptC-LptA der Lipopolysaccharid (LPS)-Transport (Lpt)-Maschinerie stört und so den Transfer von LPS von der inneren Membran zur äußeren Membran in gramnegativen Bakterien inhibiert (Abb. 2). Dadurch sammelt sich LPS im Zellinneren an, und das Bakterium stirbt ab. Allerdings ist Thanatin als Medikamentenkandidat ungeeignet, unter anderem weil es schlechte arzneimittelähnliche Eigenschaft hat, zu schwach wirkt und sich rasch Resistenzen dagegen bilden.

Um die Wirksamkeit und die pharmakologischen Eigenschaften des Peptids zu verbessern, wurde die Thanatin-Struktur in mehreren Schritten optimiert (Abb. 1). So führte die Entfernung der fünf N-terminalen Aminosäuren zu Analoga mit erhöhter bakterizider Wirkung. Eine Verkürzung des C-Terminus bewirkte hingegen den völligen Verlust der antimikrobiellen Aktivität. Der Ersatz der Aminosäuren an den Positionen 14 (Arginin) und 19 (Glutamin) durch die kurzkettige kationische Aminosäure L-2,4-Diaminobuttersäure verbesserte die antibakterielle Wirkung gegen Thanatin-resistente *Escherichia coli*- und *K. pneumoniae*-Stämme. Der Austausch der Aminosäure an Position 16 (Glycin) gegen D-2,4-Diaminobuttersäure erhöhte die Wirksamkeit und im Zusammenhang mit der Einfügung von L-Penicillamin anstatt des Cysteinrestes an Position 11 wurde die Blutplasmastabilität gesteigert. Der C-terminale Methioninrest (Position 21) konnte problemlos gegen die aromatische Aminosäure Tyrosin ausgetauscht werden. Diese Modifikation war geboten, denn Methionin oxidiert leicht in Peptiden, was zum Funktionsverlust des Wirkstoffs führen kann. Durch den Ersatz von Prolin an Position 7 durch *trans*-4-Hydroxyprolin und von Isoleucin an Position 9 durch Threonin konnte die Toxizität gegenüber Säugetierzellen verringert werden. Die Anfügung eines Guanidinrests an den N-Terminus erhöhte die Stabilität gegenüber Proteolyse. Diese Modifikationen führten zu einem Peptid (Analogon **7**), das im Vergleich zu Thanatin ein verbessertes pharmakokinetisches Profil und eine potenzierte antimikrobielle Wirkung zeigte.

*In-vitro*-Aktivitätstest gegen 121 Enterobakterien ergaben MHK90-Werte (minimale Hemmkonzentration für 90% der getesteten Stämme) von 8 μg/ml für Thanatin und 0,5 μg/ml für **7**. Während Resistenzen gegen Thanatin bereits nach einem Tag für *E. coli* mit einer spontanen Frequenz von 1,2 × 10-6 beobachtet wurden, traten resistente *E. coli*-Zelllinien gegen **7** erst nach 3-6 Tagen mit einer spontanen Frequenz von 1,3 × 10-7 auf. Die für die Resistenzen verantwortlichen Mutationen wurden mittels Gesamtgenomsequenzierung bestimmt. Sowohl für Thanatin als auch für **7** wurden Mutationen im LptA-Protein am häufigsten beobachtet, wobei der Austausch der Aminosäure Glutamin für Leucin an Position 62 (LptAQ62L) die vorherrschende Mutation war. Obwohl die antimikrobielle Wirkung von **7** gegen LptA-Mutanten verringert war, blieben die MHK-Werte deutlich unter denen von Thanatin (**7**: MHK = 2-4 μg/ml; Thanatin: MHK > 8 μg/ml).

Tierversuche bestätigten, dass **7** auch *in vivo* wirksam ist. So lag beispielsweise die mediane effektive Dosis von **7** zur Behandlung von Mäusen mit einer durch einen Carbapenem-resistenten *K. pneumoniae*-Stamm hervorgerufene Lungeninfektionen bei 3,4 mg/kg/Tag (zweimalige intravenöse Gabe 1 und 13 Stunden nach intranasale Infektion). Verträglichkeitsstudien zeigten zudem, dass **7** von Mäusen gut toleriert wurde und es zu keinen nachteiligen Nebenwirkungen und nachweisbarer Nephrotoxizität kam.

Um den Wirkmechanismus von **7** zu ermitteln, wurden zwei monomere Mutanten des LptA-Proteins verwendet: LptAm mit verkürztem C-Terminus und mLptA mit drei Mutationen im N-Terminus. Somit waren die beiden mutierten LptA-Proteine nur in der Lage, ein Dimer zu bilden (der nicht mutierte N-Terminus von LptAm bindet den nicht mutierten C-Terminus von mLptA). Größenausschlusschromatografie offenbarte, dass der Peak des LptAm-mLptA-Dimers nach Zugabe von **7** verschwindet und zwei neuen Peaks für die monomeren LptAm und mLptA Proteine auftreten. Die Dissoziation des LptAm-mLptA-Dimers durch **7** wurde durch [15N,1H]-*Heteronuclear Single-Quantum Coherence* NMR-Spektroskopie bestätigt. Auch die Bindung von LptA an LptC wurde durch **7** unterbunden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass **7,** wie Thanatin, die LtpA-LptA- und die LtpA-LptC-Interaktionen effektiv stört (Abb. 2). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass **7** ebenfalls in der Lage ist, LptA-Dimere mit dem mutierten LptAQ62L-Protein zu trennen. Dieser Befund erklärt, warum **7** auch gegenüber Thanatin-resistenten Enterobakterien aktiv ist.

Die hier besprochenen Studie beschreibt die Entwicklung einer neuen Klasse von makrozyklischen Peptid-Antibiotika, die den Transport von LPS in gramnegativen Bakterien hemmen. Diese von Thanatin abgeleiteten antibakteriellen Peptide greifen ein Zielmolekül an, gegen das bisher keines der gegenwärtigen Antibiotika gerichtet ist. Zudem beruhen auftretende Resistenzen gegen diese neuen Peptid-Antibiotika auf *on-target*-Modifikationen des Zielmoleküls LtpA. Dies ist ein großer Vorteil, denn gewöhnlich basieren Resistenzen gegen klinisch verwendete Antibiotika vor allem auf *off-traget*-Modifikationen, wie die Heraufregulierung von Effluxpumpen, die eine Ursache für Multiresistenzen sind. Die vielversprechenden *in-vitro*- und *in-vivo*-Eigenschaften dieser neuen Peptid-Antibiotika - zusammen mit dem neuen Wirkmechanismus, der keine Kreuzresistenzen mit anderen Antibiotika zeigt - könnten Thanatin-Analoga zu einer wichtigen Alternative im Kampf gegen antibiotikaresistenten Erregern machen. Bevor diese neuen antibakteriellen Antibiotika vermarkt werden können, müssen sie aber zunächst noch in klinischen Studien evaluiert werden.

[1] Antimicrobial Resistance Collaborators, Lancet **399**, 629 (2022) – [2] M. Schuster et al., Sci. Adv. **9**, eadg3683 (2023).

*PD Dr. Dietmar Steverding, Norwich, England*



**Abb. 1.** Primärstruktur von Thanatin und dem optimierten Analogon **7**. Die im Rahmen der Optimierung veränderten/ausgetauschten Aminosäuren sind in Rot hervorgehoben. Gua, Guanidin; Hyp, *trans*-4-Hydroxyprolin; Pen, L-Penicillamin; Dab, L-2,4-Diaminobuttersäure; *Dab*, D-2,4-Diaminobuttersäure. [Abb. D. Steverding]



**Abb. 2.** Wirkungsweise von Thanatin und Thanatin-Analoga. Die antimikrobiellen Peptide binden an LptA und bewirken dadurch die Zerstörung der periplasmatischen LptA-Proteinbrücke. Als Folge kann Lipopolysaccharid (LPS) nicht mehr von der inneren Membran zur äußeren Membran transportiert werden und reichert sich im Zytoplasma an, was den Tod der Zell verursacht. [Abb. D. Steverding, verändert nach [2]]