

# **Schlussbericht GoBio-Projekt**

## **"Neue Antibiotika gegen resistente Krankheitserreger"**

Zuwendungsempfänger: Prof. Dr. Dirk Bumann, Uni Freiburg

Förderkennzeichen: 0315077

Vorhabensbezeichnung: Neue Antibiotika gegen resistente Krankheitserreger

Laufzeit des Vorhabens: 1.07.07 bis 30.06.10 mit kostenneutraler Verlängerung bis 30.11.2011

Berichtszeitraum: 01.07.2007 bis 30.11.2011

### **1. Aufgabenstellung**

Im Förderzeitraum sollte eine Screening-Plattform auf Basis der Zelldurchflusscytometrie und und bakteriellen Biosensoren zur Detektion von antibiotisch Wirksamen Molekülen bis zum Proof-of-Concept entwickelt werden. Desweiteren sollten die Voraussetzungen für eine Kommerzialisierung in Form einer Firmengründung und des Einwerbens von Privatkapital geschaffen werden.

### **2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde**

Durch den Projektleiter konnte in herausragenden Veröffentlichungen gezeigt werden, dass die zur Verfügung stehenden Zielstoffwechselwege in Erregern schon bekannt sind. Jedoch werden noch nicht alle Zielmoleküle innerhalb dieser Stoffwechselwege als Targets genutzt. Ziel dieses Projekts ist die Entdeckung von neuen Wirkstoffen gegen schon bekannte und unbekannte Zielmoleküle dieser Stoffwechselwege. Vorarbeiten für entsprechende Biosensoren wurden vom Projektleiter schon veröffentlicht (Becker et al.). Die notwendigen Laboratorien sowie die Grundausstattung wurde von der Universität Freiburg gestellt.

### **3. Planung und Ablauf des Vorhabens,**

Basierend auf den Vorarbeiten des Projektleiters sollten die bestehenden Protokolle zur Herstellung geeigneter Biosensoren verbessert werden. Als Basis für die Biosensoren wurden sowohl *E. coli* als *B. subtilis* als Vertreter Gram-negativer bzw. Gram-positiver Krankheitserreger bearbeitet. Im Verlauf des Projektes wurden aus strategischen Gründen nur die Gram-negativen Biosensoren weiterentwickelt. Während des Projektes wurden Strategien und Protokolle entwickelt, um möglichst effektiv das Screening durchzuführen, die anfallenden Daten zu analysieren und die sich daraus ergebenden Hits weiter zu untersuchen.

### **4. wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde**

Die durchgeführten Arbeiten basieren alle auf den bereits im Vorfeld durch den Projektleiter

veröffentlichten Arbeiten. Für die gesamte Plattform wurde eine Freedom-to-Operate Analyse erfolgreich durchgeführt. Die erforderlichen Lizenzen für die genutzten Fluoreszenzproteine hätten für eine kommerziellen Nutzung problemlos erworben werden können.

Für die Recherchen wurden die Zugangsmöglichkeiten der Universitätsbibliothek Freiburg zur Fachliteratur, sowie weitere Dienste wie z.B. SciFinder und anderen, teils öffentlich zugänglichen, Datenbanken genutzt.

## **5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.**

Es wurde mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Andreas Bechthold, die auf die Gewinnung von antibiotischen Wirkstoffen aus Bodenbakterien spezialisiert ist, zusammengearbeitet, um eine Quelle für weitere potentielle Wirkstoffkandidaten neben den synthetischen Kleinmolekülbibliotheken zu haben.

## **6. der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele,**

Mit Hilfe der Zuwendung wurde ein Team aus je zwei Senior PostDocs, PostDocs, Doktoranden und technischen Angestellten zusammengestellt und die für das Vorhaben nötige Technologie in Form des Durchflusszytometers angeschafft. Im Laufe des Projektes wurden Promotor-Trap-libraries jeweils von *E. coli* und *B. subtilis* hergestellt und nach geeigneten Antibiotika Biosensoren selektiert. Für die daraus resultierenden Biosensoren wurden dose / response Profile mit einem Panel repräsentativer Antibiotika erstellt, anhand derer die Biosensoren für die Screening-Plattform ausgewählt wurden. Um die vorhandenen Biosensoren weiter zu optimieren wurden Methoden zur Regulierung der GFP Produktion entwickelt sowie die mit den Promotoren zusammenhängenden Signalkaskaden untersucht. Aufgrund der Entwicklungen auf dem Antibiotika-Markt wurden die Arbeiten an den Gram-positiven Biosensoren zurückgestellt, um die Gram-negativen Biosensoren schneller voranzutreiben. Mit den gram-negativen Biosensoren wurde eine Screening Strategie entwickelt, die es ermöglichte mehrere dieser Sensoren gleichzeitig einzusetzen. Hierbei wurden die optimalen Kombinationen der Biosensoren ermittelt und SOPs geschrieben, um eine gleichbleibende Qualität der Ergebnisse zu sichern. Da die manuelle Auswertung der anfallenden Zytometer Daten mit der geräteeigenen Software zu zeitintensiv ist, wurde als Ersatz die Infrastruktur für eine automatische Auswertung geschaffen und eine Softwarelösung auf Basis der frei verfügbaren Programmbibliothek flowCore entwickelt.

Um aus dem Angebot von synthetischen Kleinmolekülen eine Untergruppe mit möglichst hoher Diversität und großer Wahrscheinlichkeit auf antimikrobielle Wirkung auszusuchen wurden verschiedene frei verfügbare Cheminformatik-Tools kombiniert und eingesetzt. Bei vier verschiedenen Anbietern wurden insgesamt 50.000 Substanzen bestellt, die mit der Screening-Plattform bei einer Rate von 12000 Substanzen pro Monat bearbeitet wurden. Daraus resultierten 78 Hits von denen 55 in 14 verschiedene Strukturtypen eingeteilt werden konnten. Die Auswahl an Kleinmolekülen beinhaltete unabsichtlich auch 7 bekannte Antibiotika, die alle gefunden und deren Mechanismus richtig zugewiesen wurde. Hierdurch konnte die Funktionsweise der Plattform-Technologie bestätigt werden.

Von den 14 verschiedenen Strukturtypen wurden in mehreren Runden Derivate bestellt und analysiert. Hierbei konnten für zwei Moleküle erhebliche Verbesserungen erzielt werden,

jedoch stellte sich heraus, dass die verbesserten Moleküle sehr verwandt mit schon bekannten antibiotisch wirksamen Substanzen sind. Durch die Kombination von verschiedenen Strukturtypen wurden 32 neue Moleküle designt, die zur Synthese in Auftrag gegeben wurden. Bei der Synthese ergaben sich unvorhersehbare Probleme, so dass nur 12 dieser Substanzen hergestellt werden konnten. Keine dieser Substanzen hatte eine verbesserte Wirksamkeit gegenüber den Ausgangssubstanzen.

Mithilfe der Plattform-Technologie wurden ausgewählte Rohextrakte aus Streptomyceten Kulturen getestet. Aufgrund der Ergebnisse wurde ein Produzent ausgewählt um weitere Tests mit gereinigten Fraktionen durchzuführen. Die Substanz wurde zur Produktion bei einem externen Dienstleister bestellt. Es wurden MIC Werte bestimmt und ein Standard-Peritonitis Mausmodell entworfen und getestet, wobei sich sehr gute Werte ergaben. Die Strukturaufklärung des Naturstoffs durch NMR erforderte einen sehr hohen Zeitaufwand. Letztendlich konnte die Struktur über einen Literaturvergleich bestimmt werden und führte zu dem Ergebnis, dass dieser Stoff schon als antibiotisch wirksam bekannt ist.

Zur Erfüllung der Bedingungen für eine Phase II Förderung wurde nach einer erfolgreichen Freedom-to-Operate Analyse die FreiBiotics GmbH gegründet. Es wurde ein Business Plan inklusive der Finanzplanung für die nächsten fünf Jahre erstellt und mehrere potentielle Kooperationspartner und Investoren angesprochen.

Trotz einer Bewilligung der Phase II Förderung konnte bis zum Ende des Förderzeitraums Phase I kein ausreichendes Privatkapital für die Phase II eingeworben werden.

## **7. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises,**

1. Cytometer  
Das Cytometer stellte die Kerntechnologie des Screeningverfahrens dar.
2. automatische Pipetten  
Die automatischen Pipetten waren für die zügige und fehlerfreie Verteilung der Substanzen in den Reihenexperimenten essentiell.
3. Molekülsammlungen  
Die für das Screening notwendigen Substanz-Bibliotheken wurden von verschiedenen Herstellern eingekauft.
4. Medizinalchemie  
Für die Verbesserung der resultierenden Hits wurde das fehlende Know-How durch externe Beratung (Dr. P. Schneider, FreiBiotics GmbH) gestellt. Die vorgeschlagenen Derivate wurden wenn verfügbar direkt eingekauft oder zur Synthese in Auftrag gegeben (ChemStep).
5. Synthese Naturstoff  
Die Herstellung von Naturstoffen in größeren Mengen wurde in Auftrag gegeben (Hypha), da dies mit den im Labor verfügbaren Mitteln nicht möglich ist.
6. Beratung  
Für die Finanzplanung und die Erstellung des Businessplans, sowie die Kontaktherstellung zu Investoren wurden externe Berater beauftragt (Wilke, icon GmbH, Dr. A. E. Bruno, FreiBiotics GmbH)
7. Patente

Das professionelle Freedom-to-Operate Gutachten für den europäischen Raum wurde durch Herrn Patentanwalt Dr. B. Jungblut, Jungblut & Seuss Patentanwälte (Berlin) durchgeführt. Sowohl die Screening-Plattform BASP für Gram-negative als auch Gram-positive Erreger als auch das Avilamycin Projekt (Kooperationen mit AG Bechthold) wurden zum Patent durch die Albert-Ludwigs-Universität Freiburg angemeldet: Europäische und internationale Patentanmeldung "Method for producing a biosensor for an in vitro screening system for identifying anti-infective substances, and uses thereof" Aktenzeichen: EP10 00 0732.7 (25.01.2010) und PCT/EP2011/050959 (25.01.2011). Die Ausarbeitung und die Einreichung des Patents erfolgte durch den Patentanwalt Dr. Jan B. Krauss, BOEHMERT & BOEHMERT (Berlin).

#### 8. Personal

Die Personalkosten stellen den größten Teil der Projektkosten dar. Hierdurch wurde ein 9 köpfiges Team von wissenschaftlichen Mitarbeitern inklusive Projektleiter finanziert, um die im Projekt anfallenden Forschungsarbeiten zu planen und durchzuführen.

#### **8. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit,**

Diverse Übersichtsartikel in der Fachpresse (ECDC/EMA joint technical report "The bacterial challenge: time to react, 2009; L. Silver, 2011) weisen auf eine dramatische Entwicklung der Antibiotikaresistenz im Vergleich mit der immer geringer werdenden Anzahl der neuen Zulassungen hin. Vor allem die Pipeline für die Entwicklung antimikrobieller Wirkstoffe gegen Gram-negative Erreger ist leer. Daher ist es im hohen Maß erforderlich Methoden zur Entdeckung und Entwicklung neuer antimikrobieller Wirkstoffe voranzutreiben, um der zukünftigen Resistenzsituation Herr zu werden.

#### **9. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans,**

Während der Durchführung des Vorhabens hat sich die Situation bezüglich der Resistenzentwicklung und der Anzahl der in der Pipeline befindlichen Wirkstoffkandidaten, bezogen auf die Gram-negativen Erreger eher verschärft (ECDC/EMA joint technical report "The bacterial challenge: time to react, 2009; L. Silver, 2011). Deshalb ist eine Entwicklung geeigneter Technologien unabdingbar, um neue antibiotisch wirksame Moleküle zu finden. Im Projektzeitraum konnte gezeigt werden, dass mit der entwickelten Screening Plattform die Wirkstoffsuche und Optimierung sehr effizient und preiswert durchgeführt werden kann. Außerdem kann die Plattform-Technologie schnell an neue Bedürfnisse angepasst werden.

#### **10. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.**

Das im Projektzeitraum entwickelte Screening Verfahren wurde beim europäischen Patentamt unter der Aktenzeichen: EP10 00 0732.7 (25.01.2010) und PCT/EP2011/050959 (25.01.2011) und dem Titel "Method for producing a biosensor for an in vitro screening system for identifying anti-infective substances, and uses thereof" angemeldet und veröffentlicht.

Eine Veröffentlichung der Forschungsergebnisse ist aufgrund der fehlenden Weiterfinanzierung in der Fachpresse geplant.

## **Literaturverzeichnis**

ECDC/EMA joint technical report "The bacterial challenge: time to react. EMA doc. Ref. EMA/576176/2009. ISBN 978-92-9193-193-4. Stockholm, September 2009.

L. Silver, 2011. Challenges of Antibacterial Discovery. Clinical Microbiology Reviews, January 2011, p. 71-109, Vol. 24, No. 1.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Dirk Bumann". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke at the end.

Prof. Dirk Bumann

## Berichtsblatt

### "Neue Antibiotika gegen resistente Krankheitserreger"

Im Laufe der Förderperiode wurden Promotor-Trap-Libraries von *E. coli* und *B. subtilis* hergestellt, aus denen Biosensoren für verschiedene bakterielle Stoffwechselwege, die als Ziel von vorhandenen Antibiotika bekannt sind, hervorgingen. Aus diesen Biosensoren wurde diejenige ausgewählt, die eine möglichst hohe Spezifität besaßen. Danach wurden mehrere Kombinationen von Biosensoren und Fluoreszenzmarkern etabliert, die eine gleichzeitige Analyse mit guter Signaltrennung am Durchflussscytometer zulassen. Es wurde eine Auswerteroutine programmiert, die die automatische Zuordnung der erhaltenen Biosensoren-Profile zur Inhibierung eines Stoffwechselweges durchführt.

Mit der etablierten Screening Plattform wurden insgesamt 50.000 Kleinmoleküle verschiedener Hersteller untersucht. Die resultierenden Hits wurden in Strukturklassen eingeteilt und in mehreren Runden optimiert, wobei durch die Plattform-Technologie gewährleistet werden konnte, dass beim Optimierungsprozess das ursprüngliche Target beibehalten wird.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass mit der entwickelten Technologie Naturstoffextrakte und auch Mischungen zweier antibiotisch wirksamen Substanzen gescreent werden können.

Sowohl aus dem Kleinmolekül Screen als auch bei den Naturstoffprodukten konnten keine neuen viel versprechenden Substanzen gefunden werden. Hierzu bedarf es weiterer Screening Kampagnen mit größeren und chemisch anspruchsvolleren Molekülbibliotheken.



Prof. Dirk Bumann