

## Kurzbericht Teilprojekt 1

Zuwendungsempfänger	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH (HZI) – Abt. Mikrobielle Wirkstoffe (MWIS); Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig
Förderkennzeichen	16GW0227K
Vorhabenbezeichnung	Präklinische Entwicklung von Corallopyronin A, einem Antibiotikum mit Wirkungen gegen Würmer, sexuell übertragbare Infektionen (STIs) und Staphylokokken – Nicht-GLP Prä-klinische Versuche
Laufzeit des Vorhabens	01.04.2019 - 30.09.2022
Teilprojektleiter	Herr Prof. Dr. M. Stadler

### 1. Aufgabenstellung sowie wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde

Corallopyronin A (CorA) ist ein Naturstoff, der die RNA Polymerase von *Wolbachia*-Endosymbionten von Wurmern, die lymphatische Filariose und Onchocerciasis hervorrufen) hemmt. Er wirkt auch gut gegen Chlamydien, Gonokokken und Staphylokokken, die alle auf der Prioritätsliste der „Global Health Targets“ der WHO (Weltgesundheitsorganisation) stehen, welche Organismen zusammenfasst gegen welche dringend neue Wirkstoffe gefunden werden müssen. Um den Wirkstoff in die klinische Phase 1 zu bringen, wollen wir eine orale Formulierung entwickeln und Nicht-GLP präklinische Studien in Nagern und Hunden durchführen, um Daten zur Planung späterer GLP-Studien der Substanz zu erhalten. Die Rolle des HZI war die Entwicklung und Durchführung des Produktionsverfahrens und die anschließende Übertragung der Protokolle an ein Vertragsunternehmen (CRO), das nach GMP produzieren kann. Dazu sollten am HZI umfangreiche Arbeiten zur Fermentation und Isolierung der Substanz durchgeführt werden

Die Arbeiten wurden in einer Kooperation zwischen den Arbeitsgruppen von Profs. Marc Stadler (HZI), Achim Hörauf (Universitätsklinikum Bonn; Projektleiter) und Karl Wagner (Universität Bonn) durchgeführt. Andere Teile des Arbeitsprogramms wie die Bereitstellung der Produzentenstämme und die Durchführung der Tierversuche wurden vom DZIF in einem Kernprojekt der „TTU Novel Antibiotics“ gefördert.

Für das aktuelle Teilprojekt waren vor allem die folgenden Veröffentlichungen, bzw. Patente relevant, auf denen unsere Arbeiten aufbauten:

**Patente:** US 9168244 B2, EP 2704708 B1, US 9687470 B2 (Univ. Bonn); (WO 2014/181000 A1 (HZI)

**Veröffentlichungen:** Irschik, H., Jansen, R., Höfle, G., Gerth, K. and Reichenbach, H. (1985) The corallopyronins, new inhibitors of bacterial RNA synthesis from Myxobacteria. *The Journal of Antibiotics*, 38:145-152; Erol Ö, Schäberle TF, Schmitz A, Rachid S, Gurgui C, El Omari M, Lohr F, Kehraus S, Piel J, Müller R, König GM (2010) Biosynthesis of the myxobacterial antibiotic corallopyronin A. *ChemBioChem*;11:1253-1265; Pogorevc D, Panter F, Schillinger C, Jansen R, Wenzel SC, Müller R (2019) Production optimization and biosynthesis revision of corallopyronin A, a potent anti-filarial antibiotic. *Metabolic Engineering*. 55:201-211.

## 2. Ablauf des Vorhabens

Das HZI war hauptsächlich in die biotechnologische Produktion der Substanz und ihrer Aufreinigung involviert. Das Arbeitspaket des HZI war in drei Teile gegliedert:

### **AP 1.1 Biotechnologische Produktion:**

Aus Vorarbeiten und parallel zum Projekt laufenden Arbeiten (gefördert vom DZIF) standen heterologe Stämme von *Myxococcus xanthus* zur Verfügung, die in der AG MINS (Prof. Rolf Müller, HZI/HIPS Saarbrücken) generiert worden waren. Die Fermentation dieser heterologen Produzenten (*Myxococcus xanthus*) sollte weiter optimiert werden.

### **AP 1.2 Optimierung der Aufarbeitung**

Zur Kostenreduktion des Prozesses für die kostspieligere GMP-Produktion wurden umfangreiche Experimente durchgeführt, um die Gewinnung der Rohextrakte und die chromatographische Aufreinigung der Zielsubstanz zu vereinfachen.

### **AP 1.3 Produktion von CorA in Multigramm-Maßstab:**

Auch auf Basis der Ergebnisse von AP 1.1. und 1.2. sollte die Substanz für weiterführende Arbeiten, die von den Partnern in Bonn bzw. von den von ihnen beauftragten Unternehmen (CRO) durchgeführt wurden. Dazu waren Batch-Fermentationen im Pilotmaßstab, inklusive der Aufreinigung der Zielsubstanz im Multi-Gramm-Maßstab geplant.

## 3. Wesentliche Ergebnisse sowie die Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Wie weiter oben erwähnt, lief das Vorhaben auf Basis der Stämme aus der Arbeitsgruppe von Prof. R. Müller, der aber eine andere Abteilung und ein Tochterinstitut des HZI leitet. Mit Hilfe eines heterologen Myxobakteriums *Myxococcus xanthus* wurde Corallopyronin A produziert. Der im HZI entwickelte Bioprozess wurde optimiert und Substanz den Projektpartnern am Universitätsklinikum und der Uni Bonn bereitgestellt. Im Projektzeitraum wurden über 280 Gramm der Zielsubstanz gereinigt und zur Verfügung gestellt.

Entwickelte Prozesse wurden anschließend in Protokolle niedergeschrieben und diese an zwei Vertragsunternehmen (CRO) übertragen. An das belgische CRO konnte der Prozess bis zum Rohprodukt erfolgreich übertragen werden. Das Unternehmen konnte die Substanz schließlich auf Basis dieser Vorschriften im 100 L Maßstab produzieren. Weiterhin wurde der Prozess erfolgreich in den 1500 Liter-Maßstab hochskaliert. Der Vertrag mit einem zweiten CRO für die chromatographische Reinigung wurde gekündigt, da Protokolle trotz Bemühungen nicht erfolgreich übertragen und etabliert werden konnten. Nötige Arbeiten übernahm das HZI, um Projektverzögerungen zu vermeiden. Durch die erfolgte Produktion von HQ-RGM am HZI konnten die Projektpartner die Abrieten an der oralen Formulierung und die Nicht-GLP Toxizitätsstudien durchführen.

## Schlussbericht

Förderkennzeichen: 16GW0227K

ZE: Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH (HZI) – Abt. Mikrobielle Wirkstoffe (MWIS)

Projektleiter: Prof. Dr. Marc Stadler

Vorhabenbezeichnung: Präklinische Entwicklung von Corallopyronin A, einem Antibiotikum mit Wirkungen gegen Würmer, sexuell übertragbare Infektionen (STIs) und Staphylokokken –Produktion von Material von hoher Qualität für die Forschung (HQ-RGM)

Akronym: „CORALS“

Laufzeit des Vorhabens: 01.04.2019 – 30.6.2022 (nach Verlängerung)

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-Programm

**Präklinische Entwicklung von Corallopyronin A, einem Antibiotikum mit  
Wirkungen gegen Würmer, sexuell übertragbare Infektionen (STIs) und  
Staphylokokken –Produktion von Material von hoher Qualität für die Forschung  
(HQ-RGM)**

**Förderkennzeichen: 16GW0227K**

**Zuwendungsempfänger: Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH**

Inhoffenstrasse 7, 38124 Braunschweig

**Teilprojektleitung: Herr Prof. Dr. M. Stadler**

**Laufzeit: 01.04.2019 – 30.6.2022 (nach Verlängerung)**

„Das in diesem Bericht zugrundeliegende Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 161B0630B gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor“.

## II. Eingehende Darstellung

### 1. Ausführliche Darstellung der durchgeführten Arbeiten im Vergleich zur ursprünglichen Vorhabenbeschreibung

#### **AP 1.1 Biotechnologische Produktion:**

Aus Vorarbeiten und parallel zum Projekt laufenden Arbeiten (gefördert vom DZIF) standen heterologe Stämme von *Myxococcus xanthus* zur Verfügung, die in der AG MINS (Prof. Rolf Müller, HZI/HIPS Saarbrücken) generiert worden waren. Die Fermentation wurde im Rahmen des Projektes weiter optimiert. Dafür wurden Medienzusammensetzung, Prozessparameter sowie Feedingstrategien experimentell evaluiert und hinsichtlich der Produkttiter optimiert. Der resultierende stabile Bioprozess wurde in den 300 L Maßstab hochskaliert. Die Produktion besteht aus einer Vorkulturstrategie mit 3 Schritten sowie einer Produktion mit 168 h Produktionszeit. Produkttiter von 100 mg/L konnten erreicht werden.

#### **AP 1.2 Optimierung der Aufarbeitung**

Zur Kostenreduktion des Prozesses für die kostspieligere GMP-Produktion wurden umfangreiche Experimente durchgeführt, um die Gewinnung der Rohextrakte und die chromatographische Aufreinigung der Zielsubstanz zu vereinfachen.

Der finale Reinigungsprozess besteht aus 6 Schritten. Nach dem Produkt-Capture aus XAD-Adsorber wurde das Eluat aufkonzentriert, Corallopyronin A organisch extrahiert und Antischaum mittel Methanol-Heptan-Verteilung vom Produkt abgetrennt. Als letzter Schritt wurde das Corallopyronin A chromatographisch fein gereinigt.

Für die chromatographische Feinreinigung wurden unterschiedliche stationäre Phasen getestet und ein passender Gradient entwickelt. Entwickelte Prozesse wurden hoch skaliert sodass batchweise bis zu 70 g Chrallopyronin A Rohextrakt fein gereinigt werden konnten. Dies entspricht der Trennung von Rohextrakt aus mehreren Fermentern im 100 L Maßstab. Die Reinigung hat eine Ausbeute von 80-90 %. Der Gesamte Prozess resultierte in einer mittleren Ausbeute von 60 % mit einer Produktreinheit > 90 %.

#### **AP 1.3 Produktion von CorA in Multigramm-Maßstab:**

Auch auf Basis der Ergebnisse von AP 1.1. und 1.2. sollte die Substanz für weiterführende Arbeiten, die von den Partnern in Bonn bzw. von den von ihnen beauftragten Unternehmen (CRO) durchgeführt wurden. Dazu waren Batch-Fermentationen im Pilotmaßstab, inklusive der Aufreinigung der Zielsubstanz im Multi-Gramm-Maßstab durchgeführt. Insgesamt wurden über 280 g reines Corallopyronin A den Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt.

### 2. Wichtige Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Sämtliche Posten, welche den zahlenmäßigen Nachweis betreffen, wurden korrekt abgerechnet. Mit den Mitteln wurden Verbrauchsmittel für die Corallopyronin A Produktion und Reinigung sowie Personal zur Projektbearbeitung finanziert.

### 3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeit

Alle durchgeführten Arbeiten waren im Rahmen der Projektplanung notwendig und angemessen. Das HZI produzierte HQ-RGM Corallopyronin A für die Entwicklung einer Formulierung sowie für präklinische Studien des Universitätsklinikums Bonn.

#### **4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans**

Die im Verbund gewonnenen Ergebnisse werden wissenschaftlich für die weitere Entwicklung des Corallopyronin A hin zur klinischen Prüfung der Phase I verwertet. Für das Teilprojekt 1 bedeutet dies, dass der finale Produzentstamm, sowie die Informationen zum Herstellungsprozess zu dem Lohnhersteller transferiert werden, der die prä-GMP und GMP-Produktion des Naturstoffes übernehmen soll. Die entwickelte orale Formulierung aus Teilprojekt 2 wird ebenfalls an den Lohnhersteller übertragen zur Produktion des Prüfmusters für die Phase I. In Teilprojekt 3 werden die nicht-GLP toxikologischen und sicherheitspharmakologischen Studien durchgeführt. Die dabei entstehenden Erkenntnisse werden für die Planung der regulatorisch festgelegten GLP-toxikologischen Prüfungen verwendet.

Der wissenschaftliche Nachwuchs der verschiedenen Institute bzw. der Projektmanager wird die jeweiligen Ergebnisse auf Projektmeetings bzw. Konferenzen vorstellen. Neben der Präsentation auf Tagungen und Kongressen sollen wissenschaftliche Publikationen der Teilprojekte sowie gemeinsame Publikationen in Fachzeitschriften die Ergebnisse und Erkenntnisse des Projektes darstellen, das Potential und die Wirkung des Wirkstoffes aufzeigen, die effiziente Herstellungstechnik belegen sowie die Eignung der oralen Formulierungen demonstrieren. Neben der essentiellen Bekanntmachung des Projektes für den weiteren Fortbestand steht auch die Darstellung der Arbeit der Wissenschaftler und Arbeitsgruppen im Fokus.

Die erfolgreiche Beendigung der präklinischen Phase und die Durchführung der Phase I wird CorA attraktiv für Pharmaunternehmen machen, um CorA entweder zur Behandlung von Filariosen von Individuen oder als Alternative für weitere Indikationen wie z.B. MRSA oder Gonokokken Infektionen einzusetzen.

Wissenschaftlich stellt die präklinische Entwicklung und Durchführung der Phase I Studie für die öffentlich geförderten Institute (Universitätsklinikum Bonn, Universität Bonn und Helmholtz Institut für Infektionsforschung) einen enormen Erfolg dar, der durch das Projekt generierte Erkenntnisgewinn ist für die Wissenschaftler sowie für die Arbeitsgruppen auch hinsichtlich zukünftiger öffentlich geförderter Projekte von großem Wert.

#### **5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Nicht zutreffend

#### **6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse**

Im Berichtszeitraum resultierten fünf Veröffentlichungen aus den Projektergebnissen. Weitere sind in Vorbereitung, und gerade wurde eine weitere angenommen.

- Becker T, Krome AK, Vahdati S, Schiefer A, Pfarr K, Ehrens A, Aden T, Grosse M, Jansen R, Alt S, Hestekamp T, Stadler M, Hübner MP, Kehraus S, König GM, Hoerauf A, Wagner KG (2022). In vitro–In vivo relationship in mini-scale-enabling formulations of corallopyronin A. *Pharmaceutics* 14:1657.
- Balansky J, Pfarr K, Szekat C, Kehraus S, Aden T, Grosse M, Jansen R, Hestekamp T, Schiefer A, König G, Stadler M, Hoerauf A, Bierbaum G (2022) The RNA polymerase inhibitor corallopyronin A has a lower frequency of resistance than rifampicin in *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* 11:920.

- Krome AK, Becker T, Kehraus S, Schiefer A, Steinebach C, Aden T, Frohberger SJ, Mármol Álvaro L, Kapote D, Jansen R, Chaverra-Muñoz L, Hübner MP, Pfarr K, Hesterkamp T, Stadler M, Gütschow M, König GM, Hoerauf A, Wagner KG (2020) Solubility and stability enhanced oral formulations for the anti-Infective corallopyronin A. *Pharmaceutics* 12:1105
- Schiefer A, Hübner MP, Krome A, Lämmer C, Ehrens A, Aden T, Koschel M, Neufeld H, Chaverra-Muñoz L, Jansen R, Kehraus S, König GM, Pogorevc D, Müller R, Stadler M, Hüttel S, Hesterkamp T, Wagner K, Hoerauf A, Pfarr K (2020) Corallopyronin A for short-course anti-wolbachial, macrofilaricidal treatment of filarial infections. *PLoS Negl Trop Dis* 14(12):e0008930.
- Krome AC, Becker T, Kehraus S, Schiefer A, Gütschow M, Chaverra-Muñoz L, Hüttel S, Jansen R, Stadler M, Pogorevc D, Müller R, Hübner MP, Hesterkamp T, Pfarr K, Hoerauf A, Wagner KG, König GM (2022) Corallopyronin A: Antimicrobial discovery to preclinical development. *Nat Prod Rep* 39:1705-1720

Braunschweig, 26.01.2023

---

Prof. Dr. Marc Stadler

(Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung)