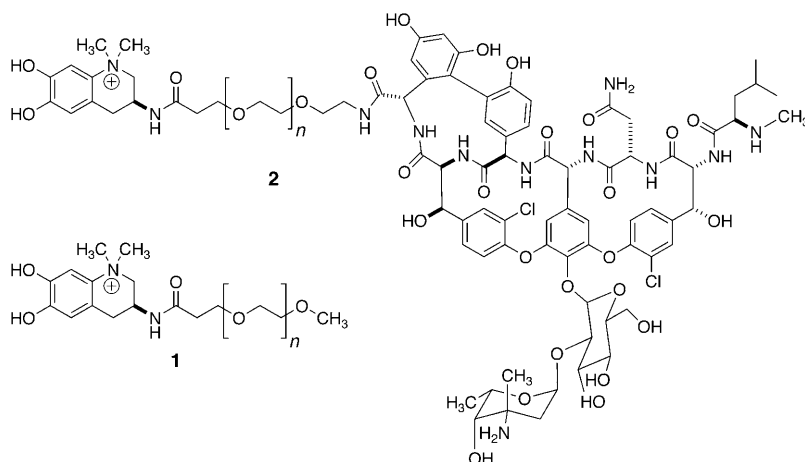


Antimikrobielle Oberflächen durch Naturstoffhybride**

Jean-Yves Wach, Simone Bonazzi und Karl Gademann*

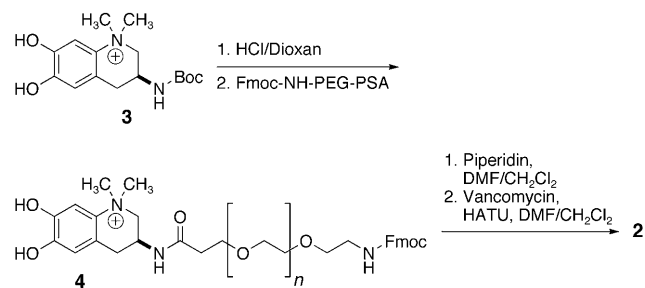
Infektionen nach Behandlungen in Spitälern, Altenheimen und Pflegeeinrichtungen (nosokomiale Sekundärinfektionen) stellen ein schweres Problem für Patienten dar^[1] und erhalten durch das zunehmende Auftreten von resistenten Pathogenen zusätzliche Brisanz.^[2] Insbesondere bei Implantaten, Kathetern und Stents treten hohe Infektionsraten auf^[3] – so beträgt die Infektionsrate z.B. bei Harnkathetern bis zu 30 % pro Woche!^[4] Zusätzliche Komplikationen können sich durch Einkapselung mit Gewebe ergeben, wodurch Antibiotika nur noch schlecht den Wirkort erreichen können und somit eine bis 1000-mal verringerte Effizienz erzielen.^[2a,d,e,5] Bei Implantaten lässt sich eine Behandlung oft nur durch Ersatz der betroffenen Teile erreichen, was hohe Kosten, Leid und Schmerzen für die Patienten und ihre Angehörigen zur Folge hat. Ein vielversprechender Ansatz zur Vermeidung solcher nosokomialer Infektionen besteht in der Auftragung von Antibiotika direkt auf biomedizinische Materialien.^[6] Hier berichten wir über das Design, die Herstellung und die biologische Evaluierung eines Naturstoffhybrids zur Herstellung antimikrobieller Oberflächen.^[7]

Naturstoffhybride sind Verbindungen, in denen biologisch aktive Fragmente verschiedener Naturstoffe gekuppelt werden, mit dem Ziel, zwei unterschiedliche Wirkmechanismen zu kombinieren.^[8] So wurden z.B. cytotoxische Derivate von CC-1065 mit DNA bindenden Naturstoffen^[9a,b] oder Zuckern^[9c] hybridisiert, um eine hoch selektive Wirkung zu erzielen. Wir berichteten vor einiger Zeit über die nützlichen Eigenschaften des cyanobakteriellen Siderophors Anachelin,^[10] stark, selektiv und wirksam an Metalloxide zu binden.^[11] So konnten proteinresistente Oberflächen durch Eintauchen in Lösungen des PEG-verknüpften Anachelin-Chromophors **1** hergestellt werden (PEG = Polyethylenglycol).^[11]



Wir stellten nun die Frage, ob das stark an Oberflächen bindende Anachelin mit einem antibakteriell wirksamen Naturstoff hybridisiert werden kann, um so die Eigenschaften beider Verbindungen zu kombinieren. Als Zielmolekül wählten wir Hybrid **2**, in dem der Anachelin-Chromophor durch eine Polyethylenglycolbrücke mit dem klinisch eingesetzten Antibiotikum Vancomycin verknüpft ist. Jedes dieser Fragmente sollte eine gewünschte Eigenschaft in den Hybrid **2** einbringen: Der Anachelin-Chromophor sollte die Immobilisierung des Hybrids auf Oberflächen ermöglichen, Vancomycin wirkt auf die Zellwandbiosynthese und sollte somit das Wachstum von Bakterien unterbinden, und die lange PEG3000-Brücke sollte für eine Protein- und Zellresistenz der modifizierten Oberfläche wie auch für eine optimale Positionierung des Antibiotikums sorgen.

Die Synthese der Zielverbindung **2** begann mit der Herstellung des Anachelin-Chromophors **3**, der gemäß Literaturvorschrift aus Boc-L-DOPA hergestellt werden kann (Schema 1).^[10c,d,g] Abspaltung der Boc-Gruppe (mit HCl in Dioxan) und nachfolgende Kupplung mit dem difunktionellen 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-NH-PEG-Succinylester ergaben das PEG-verknüpfte Anachelin-Derivat **4**.



Schema 1. Herstellung des Hybrids **2**. Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, L-DOPA = L-3,4-Dihydroxyphenylalanin.

[*] J.-Y. Wach, S. Bonazzi, Prof. Dr. K. Gademann
Chemical Synthesis Laboratory
Swiss Federal Institute of Technology (EPFL)
1015 Lausanne (Schweiz)
Fax: (+41) 21-693-9700
E-Mail: karl.gademann@epfl.ch
Homepage: <http://lsync.epfl.ch>

[**] Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds für die Unterstützung dieser Arbeiten (Projektnr. 200021-115918/1 wie auch der Latsis-Stiftung. Diese Arbeit ist Teil der geplanten Dissertation von S.B. an der ETH Zürich. Wir danken B. Malisova für die Herstellung der Titandioxid-Chips.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200801570> zu finden.

Abspaltung der Fmoc-Gruppe durch Piperidin unter milden Bedingungen lieferte das terminale Amin, das mit Vancomycin unter Verwendung von HATU nach einem modifizierten Verfahren^[12] gekuppelt wurde. Der so erhaltene Hybrid **2** wurde durch Größenausschlusschromatographie gereinigt und war nun bereit für die Funktionalisierung von Oberflächen.

Zuerst einmal wurde untersucht, ob die Modifikation von Vancomycin zum Hybrid **2** einen Einfluss auf die biologische Wirkung hat. Daher wurden Hemmhofexperimente mit *Bacillus subtilis* ATCC 6633 durchgeführt, wobei sowohl Vancomycin wie auch **2** in Lösung getestet wurden. Interessanterweise zeigte **2** eine signifikante antibakterielle Aktivität, die jedoch um einen Faktor zwei gegenüber der von Vancomycin reduziert war. Dies lässt sich mit dem höheren Molekulargewicht und der daraus folgenden geringen Diffusionswahrscheinlichkeit von **2** erklären.

Als nächstes wurde die Oberflächenmodifizierung von TiO₂ mit **2** untersucht. Titan ist ein wichtiger Werkstoff für Implantate und wird wegen seiner Biokompatibilität geschätzt. Wir funktionalisierten TiO₂-Oberflächen mithilfe eines einfachen Verfahrens, das von uns für den Anachelin-Chromophor entwickelt worden war.^[11] Die Titandioxid-Chips wurden in einer Lösung von **2** in 3-(*N*-Morpholin)propansulfonsäure(MOPS)-Puffer vier Stunden inkubiert und anschließend mit HEPES-Puffer gewaschen. Dieses einfache Tauch-und-Spül-Verfahren ermöglichte die Herstellung von modifizierten TiO₂- und auch Glasoberflächen.

Die so erhaltenen, funktionalisierten TiO₂-Oberflächen wurden nun auf ihre biologische Aktivität untersucht. Zu diesem Zweck verwendeten wir das Live/Dead-Kit,^[13] mit dessen Hilfe sich tote von lebenden Zellen fluoreszenzmikroskopisch unterscheiden lassen. Lebende Zellen werden dabei grün angefärbt, und bei toten Zellen wird die dann zugängliche DNA durch rot fluoreszierenden Farbstoff gefärbt. Als Modellorganismus wählten wir *Bacillus subtilis* ATCC 6633,^[14] dessen Suszeptibilität gegen Vancomycin dokumentiert ist.^[15] Als Kontrolle fungierten unbehandelte TiO₂-Oberflächen, die in bakteriellen Kulturen inkubiert wurden. Anfärben einer unbehandelten Kultur mit dem Live/Dead-Kit wies lebende Zellen nach (Abbildung 1 a). Zur positiven Kontrolle wurde eine TiO₂-Oberfläche in *B. subtilis* in Gegenwart von Vancomycin inkubiert; nach Anfärben wurden fluoreszenzmikroskopisch klar tote Zellen nachgewiesen (Abbildung 1 b).^[16]

Nach diesen positiven und negativen Kontrollen inkubierten wir die mit **2** modifizierten TiO₂-Oberflächen in Suspensionen von *B. subtilis*. Nach sechsständiger Inkubation wurde wiederum durch Anfärben der Zustand der Zellen untersucht (Abbildung 1 c). Dabei wurden ausschließlich tote Zellen detektiert, und es konnte kein Unterschied zwischen durch **2** immobilisiertem Vancomycin (Abbildung 1 c) und Vancomycin in Lösung (Abbildung 1 b) festgestellt werden. Um zu untersuchen, ob immobilisiertes **2** für die biologische Aktivität verantwortlich ist, wurden die Eintauchlösung, die Waschlösung wie auch die Inkubationslösung (nur Medium ohne Bakterien) auf antimikrobielle Aktivität getestet – alle waren inaktiv (siehe auch Ausblutungsexperimente weiter unten). Im Anschluss untersuchten wir, ob tote Zellen an der

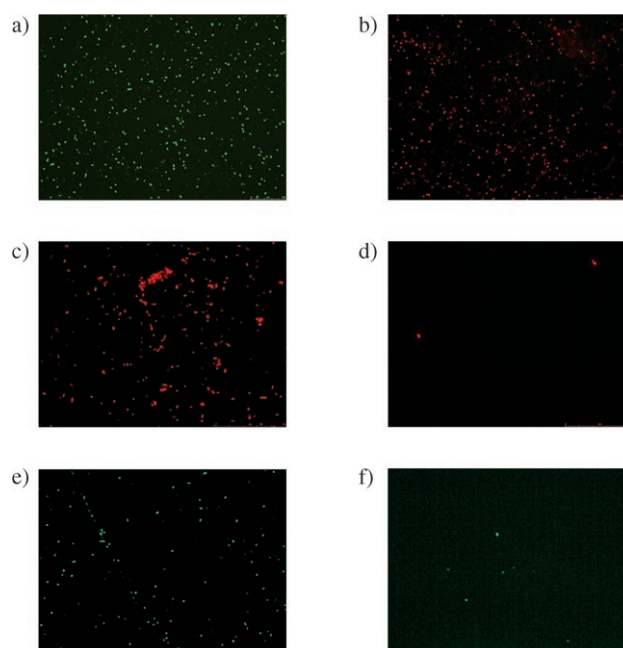


Abbildung 1. Repräsentative Ausschnitte von TiO₂-Oberflächen nach Inkubation in Suspensionen von *B. subtilis* ATCC 6633 (6 h) und nachfolgendem Anfärben mit dem Live/Dead-Kit, gemessen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie (siehe auch die Hintergrundinformationen). a) Unbehandelte TiO₂-Oberflächen. b) Unbehandelte TiO₂-Oberflächen und Vancomycin in Lösung. c) Durch **2** modifizierte TiO₂-Oberflächen. d) Durch **2** modifizierte TiO₂-Oberflächen nach Waschen mit PBS-Puffer (PBS = phosphatgepufferte Salzlösung). e) Durch **1** PEG-modifizierte TiO₂-Oberflächen. f) Durch **1** PEG-modifizierte TiO₂-Oberflächen nach Waschen mit PBS-Puffer.

funktionalisierten Oberfläche haften bleiben oder ob sie sich durch Waschen entfernen lassen. Die mit **2** behandelten Oberflächen wurden daher nach der Inkubation mit *B. subtilis* kurz mit Puffer gespült, und der Zustand sowie die Zahl der Zellen wurden wiederum durch Anfärben und Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Interessanterweise ist die Zahl toter Zellen drastisch reduziert (Abbildung 1 d), und es verbleiben nur wenige tote Bakterien an der Oberfläche. Diese Befunde sind wichtig, da sie klar zeigen, dass die PEG-Brücke eine zellresistente Funktion ausübt und somit die Anlagerung von Bakterien entweder an tote Zellen oder an Zellmaterial sehr erschwert wird. Zuletzt untersuchten wir noch, ob **2** und insbesondere das darin enthaltene Vancomycin-Fragment für die beschriebene Aktivität wichtig sind.^[17] Wir adsorbierten den PEG-Anachelin-Chromophor **1** an eine TiO₂-Oberfläche und inkubierten die so erhaltenen PEG-modifizierten Oberflächen in Suspensionen von *B. subtilis*. Beim Anfärben mit dem Live/Dead-Kit wurden nur lebende Zellen beobachtet; somit konnte keine antimikrobielle Aktivität für das unfunktionalisierte PEG-Derivat **1** nachgewiesen werden (Abbildung 1 e). Wiederum wurde durch Waschen die Zahl lebender Zellen an der Oberfläche stark verringert (Abbildung 1 f). Diese Befunde zeigen, dass **1** zwar in der Lage ist, zellresistente TiO₂-Oberflächen zu generieren, jedoch ohne antimikrobielle Aktivität – diese kann nur mit **2** erreicht werden.

Wir untersuchten nun, ob **2** an der Oberfläche verbleibt oder ob es durch Puffer oder Medium abgewaschen werden kann und so seine Aktivität vermindert wird. Dazu wurde eine mit **2** beschichtete, antimikrobielle TiO₂-Oberfläche fünfmal hintereinander in einer bakteriellen Suspension sechs Stunden lang inkubiert und nachfolgend mit Puffer gewaschen. Wie aus Abbildung 2 ersichtlich ist, bleiben dabei

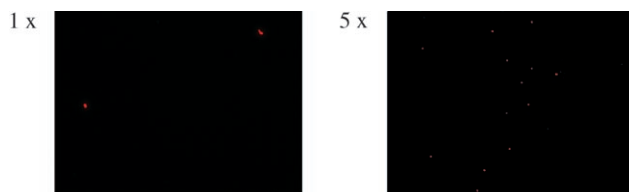


Abbildung 2. Repräsentative Ausschnitte von mit **2** behandelten TiO₂-Oberflächen nach Inkubation in einer Suspension von *B. subtilis* und Waschen (links) sowie nach fünfmaliger Sequenz von Inkubation und Waschen (rechts), gemessen mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie nach Anfärben durch das Live/Dead-Kit.

sowohl die antimikrobielle Aktivität wie auch die zellresistenten Eigenschaften erhalten. Daraus folgt nun, dass die Bindung von **2** an TiO₂-Oberflächen stark ist, was auch durch Untersuchungen anderer Forschungsgruppen für DOPA-Peptide gezeigt wurde.^[18] So konnten Messersmith und Mitarbeiter durch rasterkraftmikroskopische (AFM-)Untersuchungen zeigen, dass die Dissoziationskraft der DOPA-TiO₂-Bindung über 800 pN beträgt – eine der stärksten je gemessenen, reversiblen Wechselwirkungen.^[18d] Diese Untersuchungen unterstreichen die herausragende Bedeutung von Catecholen und besonders des Anachelin-Chromophors für die Funktionalisierung von Oberflächen.

Wir haben hier die Synthese, Immobilisierung und biologische Evaluierung des Naturstoffhybrides **2** vorgestellt. Diese Verbindung vereint die Eigenschaften der darin enthaltenen Naturstoffe: Der Anachelin-Chromophor ermöglicht eine starke Bindung an TiO₂-Oberflächen, und Vancomycin ergibt die antimikrobielle Aktivität. Weiterhin trägt die PEG-Brücke zu einer Zellresistenz bei, d. h., die Anlagerung von toten Zellen und Zellbestandteilen wird unterdrückt. Zu den Vorteilen der durch **2** modifizierten Oberflächen zählen:

- 1) Einfache Herstellung durch ein Tauch-und-Spül-Verfahren;
- 2) starke antimikrobielle Aktivität gegen *B. subtilis*;
- 3) zellresistente Eigenschaften, die die Anlagerung toter Zellen wie auch von Zellmaterial verhindern;
- 4) starke Oberflächenbindung durch den Anachelin-Chromophor, was eine Ausblutung verhindert und somit eine wiederholte Verwendung bei gleich bleibender Aktivität ermöglicht.

Die hier beschriebene Hybridstrategie sollte sich auch auf andere Naturstoffe anwenden lassen. Besonders die Kompatibilität der Catecholgruppe mit vielen anderen funktionellen Gruppen (im Unterschied zu sonst verwendeten Silanen und Thiolen) ist von Vorteil, was auch eine Anwendung dieser Methode in Naturstoff-Mikroarrays ermöglichen kann.

Weiter könnten die einzigartigen Eigenschaften von Naturstoffen genutzt werden, um biologische Vorgänge wie Wachstum, Differenzierung und Bewegung auf Oberflächen durch entsprechende Naturstoffhybride zu steuern.

Eingegangen am 4. April 2008

Online veröffentlicht am 31. Juli 2008

Stichwörter: Antibiotika · Biomaterialien · Konjugate · Naturstoffe · Siderophore

- [1] a) P. W. Stone, D. Braccia, E. Larson, *Am. J. Infect. Control* **2005**, 33, 501; b) D. Cardo, T. Horan, M. Andrus, M. Dembinski, J. Edwards, G. Peavy, J. Tolson, D. Wagner, *Am. J. Infect. Control* **2004**, 32, 470; c) J. P. Burke, *N. Engl. J. Med.* **2003**, 348, 651; d) L. L. Leape, T. A. Brennan, N. Laird, A. G. Lawthers, A. R. Locolio, B. A. Barnes, L. Hebert, J. P. Newhouse, P. C. Weiler, H. Hiatt, *N. Engl. J. Med.* **1991**, 324, 377.
- [2] a) T. F. C. Mah, G. A. O'Toole, *Trends Microbiol.* **2001**, 9, 34; b) P. S. Stewart, J. W. Costerton, *Lancet* **2001**, 358, 135; c) C. Walsh, *Nature* **2000**, 406, 775; d) J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, H. M. Lappin-Scott, *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, 49, 711; e) J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg, *Science* **1999**, 284, 1318; f) H. S. Gold, R. C. Moellering, Jr., *N. Engl. J. Med.* **1996**, 335, 1445.
- [3] a) B. Foxman, *Am. J. Med.* **2002**, 113, 5S; b) K. L. Garvin, A. D. Hanssen, *J. Bone Jt. Surg. Am. Vol.* **1995**, 77, 1576; c) N. Rao, G. L. Soxman, *Op. Techn. Orthop.* **2002**, 12, 131; d) S. Saint, C. E. Chenoweth, *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2003**, 17, 411; e) J. W. Warren, *Med. Clin. North Am.* **1991**, 75, 481; f) W. Zimmerli, A. Trampuz, P. E. Ochsner, *N. Engl. J. Med.* **2004**, 351, 1645.
- [4] L. E. Nicolle, *Clin. Infect. Dis.* **2008**, 46, 251.
- [5] J. M. Rodriguez-Martinez, A. Pascual, *Rev. Med. Microbiol.* **2006**, 17, 65.
- [6] a) V. Antoci, Jr., C. S. Adams, N. J. Hickok, I. M. Shapiro, J. Parvizi, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2007**, 88; b) V. Antoci, Jr., S. B. King, B. Jose, J. Parvizi, A. R. Zeiger, E. Wickstrom, T. A. Freeman, R. J. Composto, P. Ducheyne, I. M. Shapiro, N. J. Hickok, C. S. Adams, *J. Orthop. Res.* **2007**, 25, 858; c) O. P. Edupuganti, V. Antoci, Jr., S. B. King, B. Jose, C. S. Adams, J. Parvizi, I. M. Shapiro, A. R. Zeiger, N. J. Hickok, E. Wickstrom, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 2692; d) B. Jose, V. Antoci, Jr., A. R. Zeiger, E. Wickstrom, N. J. Hickok, *Chem. Biol.* **2005**, 12, 1041.
- [7] a) F. Gelman, K. Lewis, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Lett.* **2004**, 26, 1695; b) J. Haldar, D. An, L. A. De Cienfuegos, J. Chen, A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 17667; c) J. Haldar, J. Chen, T. M. Tumpey, L. V. Gubareva, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Lett.* **2008**, 30, 475; d) J. Haldar, A. K. Weight, A. M. Klibanov, *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 2412; e) A. M. Klibanov, *J. Mater. Chem.* **2007**, 17, 2479; f) K. Lewis, A. M. Klibanov, *Trends Biotechnol.* **2005**, 23, 343; g) J. Lin, S. K. Murthy, B. D. Olsen, K. K. Gleason, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Lett.* **2003**, 25, 1661; h) J. Lin, S. Qiu, K. Lewis, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Prog.* **2002**, 18, 1082; i) J. Lin, S. Qiu, K. Lewis, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, 83, 168; j) J. Lin, J. C. Tiller, S. B. Lee, K. Lewis, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Lett.* **2002**, 24, 801; k) N. M. Milovic, J. Wang, K. Lewis, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, 90, 715; l) D. Park, J. Wang, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Prog.* **2006**, 22, 584; m) J. C. Tiller, S. B. Lee, K. Lewis, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, 79, 465; n) J. C. Tiller, C. J. Liao, K. Lewis, A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 5981.
- [8] Übersichtsartikel: a) K. Gademann, *Chimia* **2006**, 60, 841; b) L. F. Tietze, H. P. Bell, S. Chandrasekhar, *Angew. Chem.* **2003**,

- 115, 4128; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3996; c) G. Mehta, V. Singh, *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 324.
- [9] a) N. L. Fregeau, Y. Wang, R. T. Pon, W. A. Wylie, J. W. Lown, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8917–8925; b) Y. Wang, R. Gupta, L. Huang, W. Luo, J. W. Lown, *Anti-Cancer Drug Des.* **1996**, *11*, 15–34; c) L. F. Tietze, T. Feuerstein, A. Fecher, F. Haunert, O. Panknin, U. Borchers, I. Schuberth, F. Alves, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 785–787; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 759–761.
- [10] a) H. Beiderbeck, K. Taraz, H. Budzikiewicz, A. E. Walsby, *Z. Naturforsch. C* **2000**, *55*, 681; b) Y. Itou, S. Okada, M. Murakami, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9093; c) K. Gademann, Y. Bethuel, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4707; d) K. Gademann, Y. Bethuel, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3389; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3327; e) Y. Ito, K. Ishida, S. Okada, M. Murakami, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 9075; f) Y. Bethuel, K. Gademann, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6258; g) K. Gademann, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 913.
- [11] S. Zürcher, D. Wäckerlin, Y. Bethuel, B. Malisova, M. Textor, S. Tosatti, K. Gademann, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1064.
- [12] B. Xing, C.-W. Yu, K.-H. Chow, P.-L. Ho, D. Fu, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14846.
- [13] B. L. Roth, M. Poot, S. T. Yue, P. J. Millard, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 2421.
- [14] I. W. Dawes, J. Mandelstam, *J. Bacteriol.* **1970**, *103*, 529.
- [15] a) J. D. Coonrod, P. J. Leadley, T. C. Eickhoff, *J. Infect. Dis.* **1971**, *123*, 102; b) D. J. Weber, S. M. Saviteer, W. A. Rutala, C. A. Thomann, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, *32*, 642.
- [16] Die Zellen (in Abbildung 1 a) und Zellbestandteile (in Abbildung 1 b) lassen sich auch durch Waschen größtenteils nicht von der Oberfläche entfernen.
- [17] Der Anachelin-Chromophor war in einem Panel von elf Pathogenen nur schwach ($32 \mu\text{g mL}^{-1}$) gegen *Moraxella catarrhalis* A-894 aktiv, jedoch nicht in Konzentrationen bis $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ gegen *S. aureus* und *E. faecium*: K. Gademann, Y. Bethuel, H. H. Locher, C. Hubschwerlen, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 8361.
- [18] a) J. L. Dalsin, B. H. Hu, B. P. Lee, P. B. Messersmith, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4253; b) J. L. Dalsin, P. B. Messersmith, *Mater. Today* **2005**, *8*, 38; c) X. Fan, L. Lin, J. L. Dalsin, P. B. Messersmith, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15843; d) H. Lee, N. F. Scherer, P. B. Messersmith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 12999; e) J. H. Waite, M. L. Tanzer, *Science* **1981**, *212*, 1038.