

Struktur-Wirkungsbeziehungen antimykobakterieller Substanzen und Entwicklung mikrobiologischer Methoden zu ihrer Charakterisierung

Kumulative Habilitationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium habilitatus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Apotheker *Dr. rer. nat.* Adrian Richter

Gutachter:

1. Professor Dr. Peter Imming, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Professor Dr. Christa E. Müller, Universität Bonn
3. Professor Dr. Franz Bracher, Ludwig-Maximilians-Universität München

Eröffnung Habilitationsverfahren: 30.10.2024

Verteidigung: 16.05.2025

Probevorlesung: 02.07.2025

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung und Zielstellung.....	1
2. Untersuchung der chemischen Reaktivität und antimykobakteriellen Aktivität von 8-Nitro-BTZs	4
2.1 DprE1 Inhibitoren als antimykobakterielle Wirkstoffe	4
2.2 Reaktivität des elektronenarmen Nitroaromaten in BTZs	5
2.3 Methoden zur Synthese des BTZ-Grundgerüsts	6
2.4 Ergebnisse der Forschungsarbeiten.....	8
2.4.1 Reaktivität der BTZs gegenüber Grignard-Verbindungen	8
2.4.2 8-Nitrobenzisothiazolinone als neue antimykobakterielle Stoffklasse	9
2.4.3 Strukturchemische Charakterisierung der antimykobakteriellen Leitverbindung BTZ043	11
2.5 Zusammenfassung I	12
3. Phenylalaninamide als antimykobakterielle RNA-Polymerase Inhibitoren - Synthese von Analoga und Etablierung mikrobiologischer Testmethoden gegen <i>M. abscessus</i>.....	13
3.1 Die mykobakterielle RNA-Polymerase als Zielstruktur für Arzneistoffe	13
3.2 Rifamycine als klinisch genutzte RNA-Polymerase Inhibitoren	14
3.3 Resistenzen gegen Rifamycine in <i>M. tuberculosis</i> und NTM	15
3.4 Synthetische RNA-Polymerase Inhibitoren - Phenylalaninamide	16
3.5 Mikrobiologische Charakterisierung neuer Wirkstoffe gegen Mykobakterien	18
3.6 Ergebnisse der Forschungsarbeiten.....	20
3.6.1 Identifizierung von Wirkstoffkandidaten gegen <i>M. abscessus</i>	20
3.6.2 Entwicklung eines Makrophagen-Infektionsmodells für <i>M. abscessus</i>	21
3.6.3 Charakterisierung und razemisierungsfreie Synthese des antimykobakteriellen Wirkstoffes MMV688845	22

3.6.4	Antimykobakterielle Charakterisierung und Kombinationstestung der Verbindung MMV688845	23
3.6.5	Synthese und antimykobakterielle Charakterisierung von Phenylalaninamiden.....	25
3.6.6	Derivatisierung von Phenylalaninamiden und Untersuchung ihrer metabolischen Stabilität <i>in vitro</i>	27
3.6.7	Fluoreszenzmikroskopische Anfärbung von <i>M. abscessus</i> mit einem Trehalose-Farbstoffkonjugat sowie dessen strukturelle Charakterisierung.....	29
3.6.8	Charakterisierung von bakteriziden Wirkstoffen gegen <i>M. abscessus</i> mit automatisierter Fluoreszenzmikroskopie nach Anfärbung mit einem Trehalose-Farbstoffkonjugat.....	30
3.6.9	Charakterisierung von Phenylalaninamiden gegen verschiedene pathogene nicht-tuberkulöse Mykobakterien und vergleichende Analyse der RNA-Polymerase.....	32
3.7	Zusammenfassung II	34
4.	Resümee und Ausblick	36
	Literaturverzeichnis.....	37
	Publikationsverzeichnis	45
	Danksagung	50
	Curriculum vitae.....	52
	Eigenständigkeitserklärung	53

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aufbau der Zellwand von <i>M. tuberculosis</i> (modifiziert nach Dulberger et al. ¹⁵) bestehend aus Lipomannan-, Peptidoglycan-, Arabinogalactan- und Mykolsäureschicht (PDIM - Phthiocerol dimycocerosat, LAMs - Lipoarabinomannane, PIMs - Phosphatidylinositol Mannosid)	2
Abbildung 2 Enzymatische Umsetzung von DPR zu DPA durch die Enzyme DprE1 und DprE2.....	4
Abbildung 3 Mechanismus-basierte DprE1 Hemmung durch BTZs.....	5
Abbildung 4 Reaktivität von BTZs gegenüber NaBH ₄ unter Bildung von Meisenheimer-Komplexen. ⁴⁷	6
Abbildung 5 Überblick zu den verschiedenen Methoden der Synthese von BTZs (modifiziert nach Richter et al. ⁴⁴ , Thioharnstoff-Weg (A), Acylisothiocyanat-Weg (B), Dithiocarbamat-Weg (C), Alkylxanthogenat-Weg (D) und der Alkylsulfanyl-Weg (E)).....	7
Abbildung 6 Reaktivität von BTZs gegenüber Methylmagnesiumbromid und die aus der Reaktion resultierenden 5/7-Methyl-BTZs (1 und 2) und 4,5-Dimethyl-5H/4,7-Dimethyl-7H-benzo[e][1,3]thiazine (3 und 4).....	8
Abbildung 7 Synthese der Benzisothiazolinone und Benzoisothiazolole.	10
Abbildung 8 Struktur der mykobakteriellen RNA-Polymerase mit Rifamycin- und Phenylalaninamidbindungsstelle (BH - Brückenhelix, TL - Triggerloop, (1) primären Hauptkanal, (2) NTP-Eingangskanal, (3) RNA-Ausgangskanal).	14
Abbildung 9 Antimykobakterielle Phenylalaninamide: MMV688845 ³⁴ , IX-276 ⁹¹ und D-AAPI ³⁵	17
Abbildung 10 Synthese von MMV688845. Methode A: N-Acylierung von Phenylalanin mit 2-Thiophencarbonsäurechlorid und anschließende Amidkupplung mit 2-Morpholinoanilin. Methode B: Amidkupplung von Boc-Phenylalanin mit 2-Morpholinoanilin, gefolgt von Boc-Schutzgruppenabspaltung und Amidkupplung mit 2-Thiophencarbonsäure.	22
Abbildung 11 Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Phenylalaninamide und Derivatisierung des Screening Hits MMV688845.	25
Abbildung 12 Derivatisierung der Phenylalaninamide zur Verbesserung der metabolischen Stabilität.	27

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ADS	Albumin, Dextrose und Natriumchlorid
BTZs	Benzothiazinone
DPA	Decaprenylphosphoryl- β -D-arabinofuranose
DPR	Decaprenylphosphoryl- β -D-ribofuranose
DprE1	Decaprenylphosphoryl- β -D-ribofuranose 2'-oxidase
DprE2	Decaprenylphosphoryl-D-2'-keto-erythro-pentofuranose-reduktase
DPX	Decaprenylphosphoryl-D-2'-keto-erythro-pentofuranose
ee-Wert	Enantiomeren-Überschuss (enantiomeric excess)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GSK	GlaxoSmithKline
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	High performance liquid chromatography
LAMs	Lipoarabinomannane
<i>M. abscessus</i>	<i>Mycobacterium abscessus</i>
<i>M. smegmatis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MBK	Minimale bakterizide Konzentration
MDR	multi drug resistant
MHII	Müller-Hinton-II Medium (kationen-adjustiert)
MHK	minimale Hemmkonzentration
MmpL3	Mycobacterial membrane protein Large 3
NTM	nicht-tuberkulöse Mykobakterien
NTP	Nukleosidtriphosphat
OADC	Ölsäure, Albumin, Dextrose und Katalase
PDIM	Phthiocerol dimycocerosat
PFA	Paraformaldehyd
PIMs	Phosphatidylinositol mannosid
PXR	Pregnan-X-Rezeptor
tdRFP	tomato red fluorescent protein
THP-1	Tohoku Hospital Pediatrics-1
XDR	extensively drug resistant

1. Einleitung und Zielstellung

Mykobakterielle Infektionen sind ein weltweites Gesundheitsproblem, das durch intrinsische und erworbene Arzneistoffresistenzen pathogener Bakterien verschärft wird. Diese Erkrankungen können in drei Gruppen unterteilt werden: Tuberkulose, Lepra und Infektionen durch NTM (nicht-tuberkulöse Mykobakterien). Die Tuberkulose ist nach wie vor die tödlichste durch Bakterien verursachte Infektionskrankheit. Die Zahl der Todesfälle, die auf Tuberkulose zurückzuführen sind, wird von der WHO für das Jahr 2024 auf 1,3 Millionen geschätzt¹. Der Haupterreger der Tuberkulose ist *M. tuberculosis*, welches zu den langsam wachsenden Mykobakterien gehört. Die Tuberkulose manifestiert sich hauptsächlich als Erkrankung der Lunge (pulmonale Tuberkulose), kann aber auch andere Organe und Gewebe befallen (extrapulmonale Tuberkulose)².

NTM, zu denen alle Mykobakterien gehören, die weder Tuberkulose noch Lepra verursachen, werden zunehmend als Krankheitserreger identifiziert^{3, 4}. NTM-Infektionen manifestieren sich hauptsächlich als Lungenerkrankung, die der pulmonalen Tuberkulose ähnelt. Patienten mit strukturellen Lungenerkrankungen wie Mukoviszidose^{5, 6}, Bronchiektasie⁷, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung⁸ und pulmonaler Tuberkulose⁹ in der Anamnese sind besonders gefährdet, eine pulmonale NTM-Infektion zu entwickeln. In diesem Zusammenhang sind *M. abscessus*^{10, 11} und der *Mycobacterium avium* Komplex^{12, 13}, bestehend aus *Mycobacterium avium* und *Mycobacterium intracellulare*, von besonderer Bedeutung und klinischer Relevanz. Da es in den meisten Ländern der Welt keine Überwachungssysteme für diese Infektionen gibt, ist die epidemiologische Belastung durch diese Krankheit schwieriger abzuschätzen als bei der Tuberkulose¹⁴.

Sowohl NTM als auch *M. tuberculosis* sind in der Lage, als dormante Bakterien persistierende Infektionen zu verursachen, die nur durch eine langwierige Therapie mit mehreren antimykobakteriellen Wirkstoffen erfolgreich behandelt werden können. Die Erreger weisen im Zustand der Dormanz eine geringe metabolische Aktivität auf, was die Bakterien noch unempfindlicher gegen Antibiotika werden lässt. Die Fähigkeit zur Persistenz ist auf zwei Charakteristika der Mykobakterien zurückzuführen: der Aufbau der mykobakteriellen Zellwand¹⁵ und die Fähigkeit zur Replikation nach Phagozytose¹⁶⁻¹⁸ durch alveoläre Makrophagen.

Die mykobakterielle Zellwand besteht aus mehreren Schichten mit hydrophilen und lipophilen Eigenschaften und besitzt zudem eine immunmodulatorische Funktion¹⁹, die es den Bakterien ermöglicht, den

körper eigenen Abwehrmechanismen zu entgehen. Der Aufbau der Zellwand von *M. tuberculosis* ist in Abbildung 1¹⁵ schematisch dargestellt.

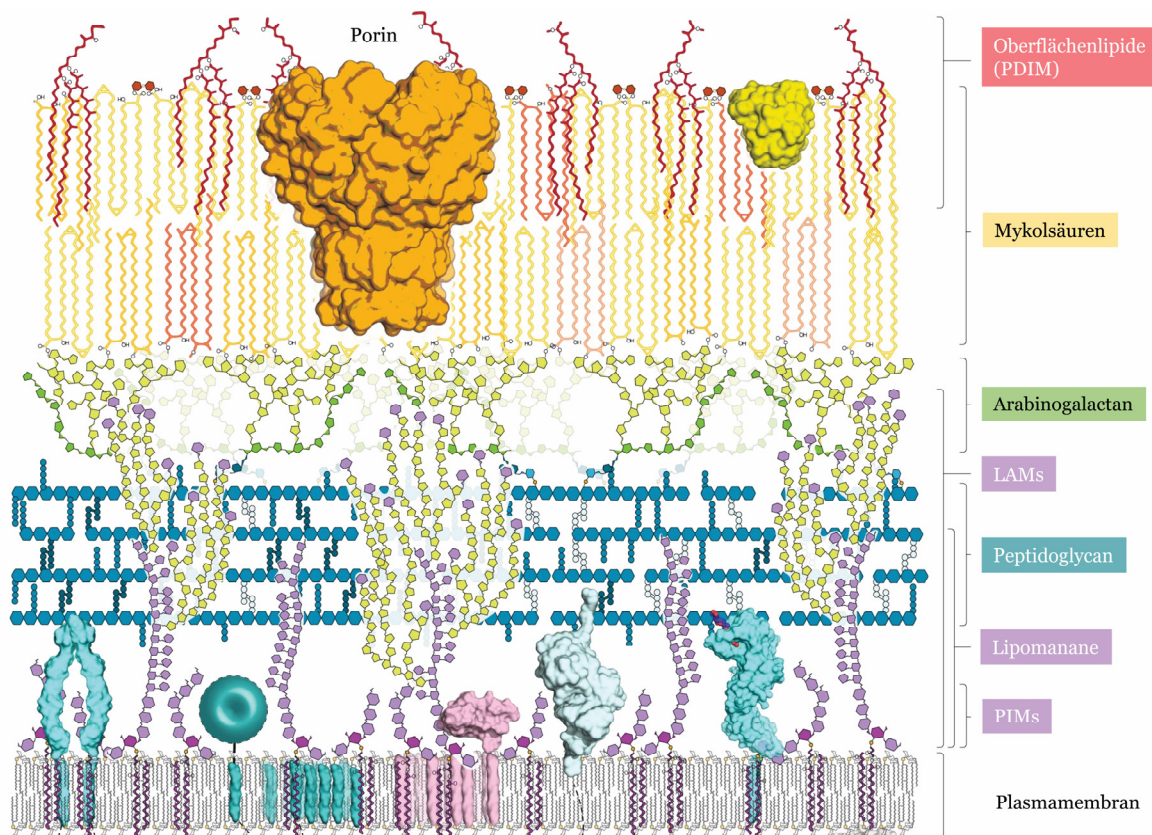


Abbildung 1 Aufbau der Zellwand von *M. tuberculosis* (modifiziert nach Dulberger et al.¹⁵) bestehend aus Lipomannan-, Peptidoglycan-, Arabinogalactan- und Mykolsäureschicht (PDIM - Phthiocerol dimycocerosat, LAMs - Lipoarabinomannane, PIMs - Phosphatidylinositol Mannosid)

Ausgehend von der Plasmamembran besteht die Zellwand der Mykobakterien aus unterschiedlichen Polysacchariden, welche die Lipomannan-, Peptidoglycan- und die Arabinogalactanschichten bilden. An diesen eher hydrophilen Bereich der Zellmembran schließt sich die Mykolsäureschicht an, die aus lipophilen, verzweigtkettigen β -Hydroxyfettsäuren besteht und über Esterbindungen in der Arabinogalactanschicht verankert ist. Die Biosynthese der Arabinogalactanschicht stellt einen Angriffspunkt für antimykobakterielle Wirkstoffe^{20, 21} dar, der in Abschnitt 2 näher beschrieben wird. Die so aufgebaute Zellwand stellt nicht nur eine Permeationsbarriere für Arzneistoffe dar, sondern ermöglicht es den Mykobakterien auch, der Immunantwort des Wirtes zu entgehen. So sind z.B. PDIMs (Phthiocerol dimycocerosat) für die Virulenz von Mykobakterien wichtig, da sie die Reifung des Phagosoms beeinflussen und die Freisetzung von *M. tuberculosis* aus diesem Zellorganell ermöglichen^{22, 23}. Auch LAMs (Lipoarabinomannane) sind ein

entscheidender Virulenzfaktor für Mykobakterien, da sie die Immunantwort der alveolären Makrophagen unterdrücken und so die Entstehung einer Infektion mit Mykobakterien begünstigen²⁴⁻²⁶. Diese Eigenschaften tragen bei *M. tuberculosis*, aber auch bei NTM wie *M. abscessus*, dazu bei, dass die Bakterien nach Phagozytose durch Makrophagen intrazellulär persistieren bzw. replizieren^{27, 28}, was zur Einwanderung weiterer Immunzellen führt und die Bildung von nekrotischen Läsionen im Lungengewebe zur Folge hat. Diese entzündlichen Prozesse führen zur Bildung von Granulomen, in denen sich Kaseum, das zentrale nekrotische Material von mykobakteriellen Läsionen, bilden kann^{29, 30}. Die persistenten Mykobakterien im Kaseum sind sehr unempfindlich gegenüber antiinfektiven Wirkstoffen und nur wenige Wirkmechanismen erzielen eine bakterizide Wirkung, die für eine Eradikation der Erreger notwendig ist. Die RNA-Polymerase Inhibitoren aus der Stoffklasse der Rifamycine besitzen allerdings bakterizide Aktivität gegen persistente *M. tuberculosis*^{30, 31} oder *M. abscessus*^{32, 33} Bakterien.

Die Zielstellung der Arbeit ist die Erforschung neuer antimykobakterieller Stoffklassen, die Wirksamkeit gegen arzneistoffresistente Mykobakterienarten zeigen und auch während der Makrophageninfektion gegen die Erreger wirksam sind. Hierzu wurden die BTZs (Benzothiazinone) als Hemmstoffe der Arabinanbiosynthese untersucht (s. Abschnitt 2). Da die Inhibition der RNA-Polymerase für die antimykobakterielle Therapie von großer Bedeutung ist, aber Resistenzen gegen Rifamycine aber deren Einsatz einschränken, befasst sich Abschnitt 3.6 mit der Erforschung synthetischer antimykobakterieller RNA-Polymerase^{34, 35} Hemmstoffe. Zur Bearbeitung der hier genannten Zielstellung werden Methoden der medizinischen Chemie und der Mikrobiologie eingesetzt.

2. Untersuchung der chemischen Reaktivität und antimykobakteriellen Aktivität von 8-Nitro-BTZs

2.1 DprE1 Inhibitoren als antimykobakterielle Wirkstoffe

Mit dem mykobakteriellen Enzym DprE1³⁶⁻³⁸ (Decaprenylphosphoryl- β -D-ribofuranose 2'-oxidase) wurde ein potentielles Arzneistofftarget entdeckt, welches für den Aufbau der Zellwand essentiell ist, da es in die Biosynthese der Arabinosemonomere involviert ist. Das Enzym katalysiert die Umsetzung von DPR (Decaprenylphosphoryl- β -D-ribofuranose) zu DPX (Decaprenylphosphoryl-D-2'-keto-*erythro*-pentofuranose) wie in Abbildung 2 dargestellt. Diese Oxidationsreaktion wird durch die Reduktion des Coenzyms FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) zu FADH₂ katalysiert. Das im periplasmischen Raum³⁹ lokalisierte Enzym DprE1 kooperiert mit DprE2 (Decaprenylphosphoryl-D-2'-keto-*erythro*-pentofuranose-reduktase)⁴⁰, welches die Ketogruppe wieder zur Hydroxyfunktion reduziert, so dass nach Epimerisierung DPA (Decaprenylphosphoryl- β -D-arabinofuranose) entsteht. Diese Arabinosemonomere sind ein Bestandteil der Arabinogalactanschicht in der mykobakteriellen Zellwand (s. Abbildung 1).

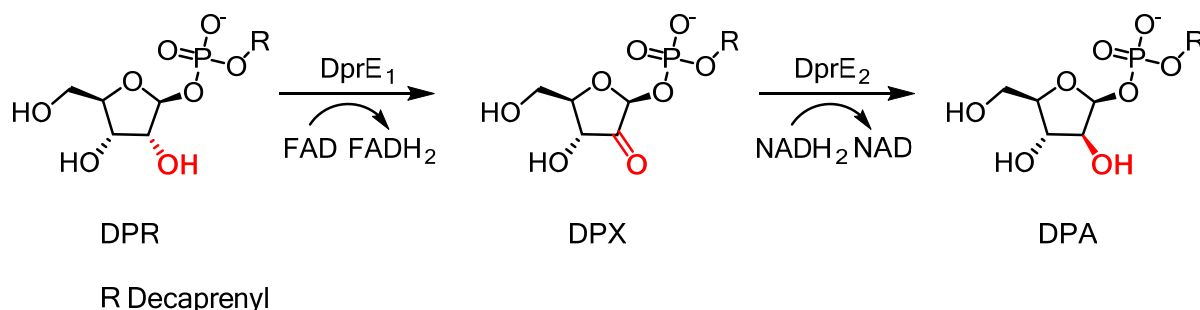


Abbildung 2 Enzymatische Umsetzung von DPR zu DPA durch die Enzyme DprE1 und DprE2.

Die BTZs sind eine Stoffklasse^{20, 41}, die DprE1 irreversibel hemmen und antimykobakterielle Wirkung besitzen. Bei diesen Substanzen handelt es sich um mechanismus-basierte Enzyminhibitoren^{37, 38, 42}, die erst durch die katalytische Aktivität von DprE1 in ihre aktive Form überführt werden. Wie in Abbildung 3 dargestellt, erfolgt nach initialer Bindung die Reduktion der Nitrogruppe zu einer elektrophilen Nitrosofunktion, die eine Cysteinseitenkette kovalent unter Bildung eines Semimercaptals modifiziert und das Enzym irreversibel inhibiert.

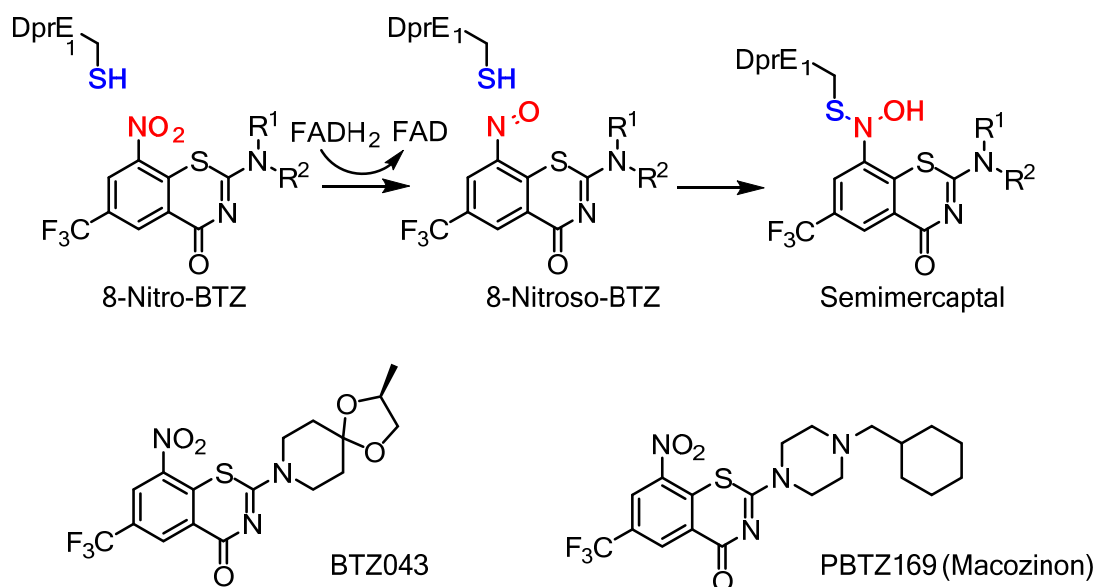


Abbildung 3 Mechanismus-basierte DprE1 Hemmung durch BTZs.

Die in Abbildung 3 gezeigten Leitverbindungen BTZ043²⁰ und PBTZ169 (Macozinon)⁴³ sind in der Entwicklung am weitesten fortgeschritten und weisen *in vitro* MHKs < 1 nM (minimale Hemmkonzentration) gegen *M. tuberculosis* auf. Beide Substanzen besitzen eine für die Wirksamkeit essentielle Nitrogruppe, unterscheiden sich jedoch in der Struktur der Substituenten am Thiazinonring. Während BTZ043 eine (S)-2-Methyl-1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decan-Struktur aufweist, befindet sich bei PBTZ169 an dieser Stelle ein Cyclohexylmethylpiperazin. Die BTZs wirken bakterizid und hemmen das Wachstum von Mykobakterien auch während der Makrophageninfektion⁴⁴. Darüber hinaus zeigten BTZ043 und PBTZ169 in einem chronischen *M. tuberculosis*-Infektionsmodell bei Mäusen eine Reduktion der keimbildenden Einheiten. Aufgrund dieser viel versprechenden Eigenschaften befinden sich BTZ043 und PBTZ169 in klinischen Studien der Phase 2 bzw. 1⁴⁵.

2.2 Reaktivität des elektronenarmen Nitroaromaten in BTZs

Der elektronenarme Nitroaromat der BTZs zeigt eine komplexe Reaktivität gegenüber Nukleophilen⁴⁶, wie NaBH₄, welche zur Bildung von Meisenheimer-Komplexen führt und das aromatische System aufhebt⁴⁷. Die in Abbildung 4 gezeigte Reaktion mit NaBH₄ ist auch für den Metabolismus von BTZs *in vivo* relevant, so konnten die Meisenheimer-Komplexe nach Inkubation in Vollblut oder nach Verabreichung *in vivo* nachgewiesen werden. Dieser Metabolismus deutet auf eine komplexe Pharmakokinetik der BTZ hin, zumal die Bildung des reaktiven Nitroso-BTZ nach Wasserabspaltung von den Meisenheimer-Komplexen möglich ist, dieser Metabolit

aber bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Die in Abschnitt 2.4.1 beschriebene Studie untersucht die hier erläuterte Reaktivität der BTZs.

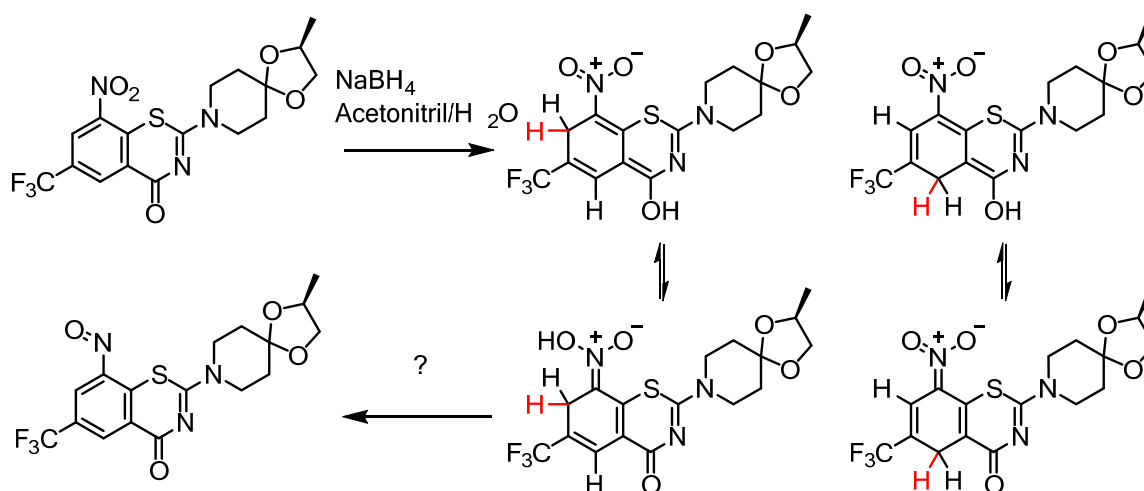


Abbildung 4 Reaktivität von BTZs gegenüber NaBH_4 unter Bildung von Meisenheimer-Komplexen.⁴⁷

2.3 Methoden zur Synthese des BTZ-Grundgerüsts

In der Literatur werden mehrere Synthesewege zur Darstellung von BTZs beschrieben, die in Abbildung 5 zusammengefasst sind. Alle Methoden gehen von 2-Chlorbenzoesäurederivaten aus, allerdings werden anschließend unterschiedliche Strategien zur Synthese des Thiazinonringsystems verwendet. Bei Verwendung des Thioharnstoff-Weges⁴⁴ (Methode A) wird die aromatische Carbonsäure mit Thionylchlorid aktiviert und anschließend mit dem Thioharnstoffderivat des entsprechenden sekundärenamins zum Thiazinonring umgesetzt. Beim Acylisothiocyanat-Weg^{41, 48-50} (Methode B) wird die aromatische Carbonsäure nach Aktivierung in das entsprechende *N*-Acylisothiocyanat überführt, das mit einem sekundären Amin zum BTZ reagiert. Als Alternativen wurden der Dithiocarbamat-Weg⁴¹ (Methode C) und der Alkylxanthogenat-Weg⁵¹ (Methode D) entwickelt. Ein Nachteil beider Wege ist die Verwendung von giftigem und leicht entflammbarem Schwefelkohlenstoff für die Synthese der Dithiocarbamat- und Alkylxanthogenat-Reagenzien. Beim Alkylsulfanyl-Weg⁵² (Methode E) wird der Aminosubstituent an ein stabiles 2-(Alkylsulfanyl)-4*H*-1,3-benzothiazin-4-on-Zwischenprodukt gebunden.

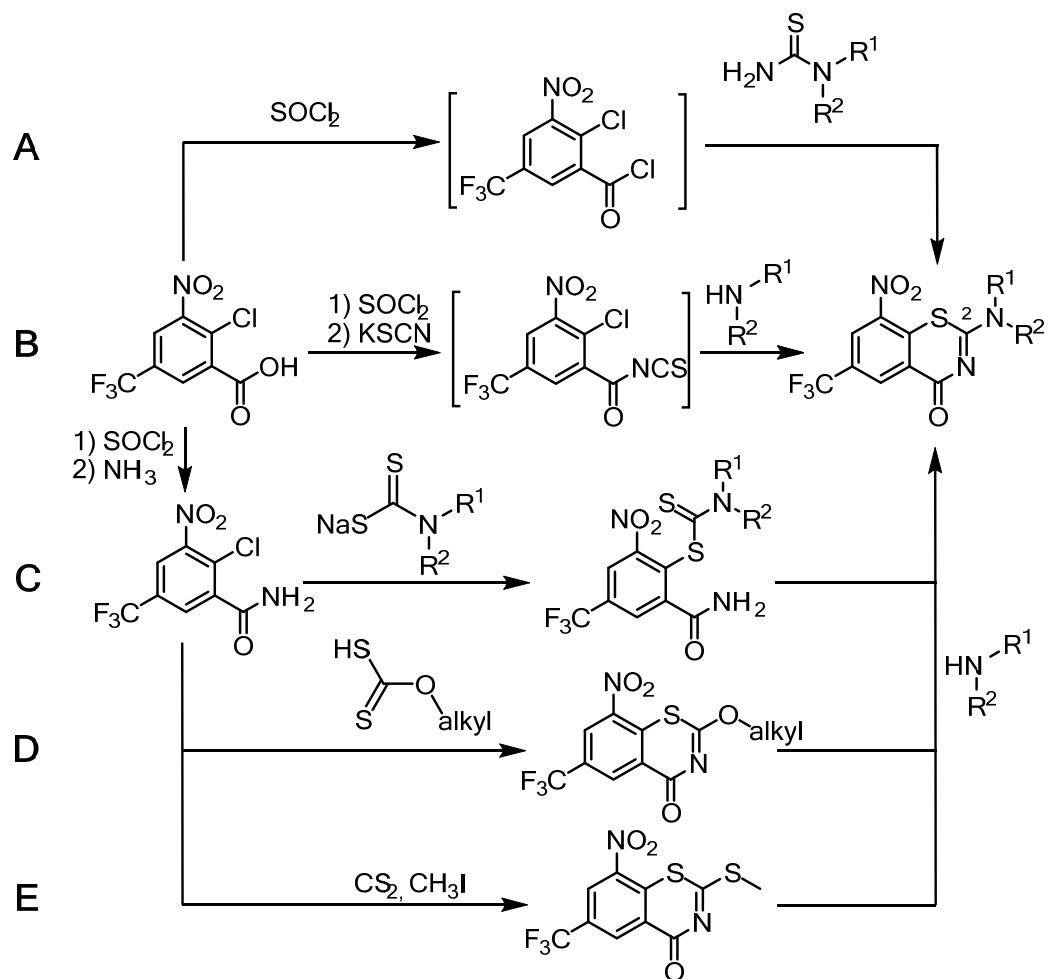


Abbildung 5 Überblick zu den verschiedenen Methoden der Synthese von BTZs (modifiziert nach Richter et al.⁴⁴, Thioharnstoff-Weg (A), Acylisothiocyanat-Weg (B), Dithiocarbamat-Weg (C), Alkylxanthogenat-Weg (D) und der Alkylsulfanyl-Weg (E))

Von den hier vorgestellten Synthesemethoden können der Thioharnstoff-Weg und der Alkylsulfanyl-Weg als die Strategien mit der breitesten Anwendbarkeit und der höchsten Ausbeute angesehen werden. Ein Vorteil des Alkylsulfanyl-Weges ist, dass der Aminosubstituent erst im letzten Syntheseschritt eingeführt wird, sodass diese Methode besonders für die Derivatisierung in dieser Position geeignet ist. Allerdings erfordert der Alkylsulfanyl-Weg Schwefelkohlenstoff und Methyljodid, Reagenzien, auf die bei Anwendung der Thioharnstoffmethode verzichtet werden kann.

2.4 Ergebnisse der Forschungsarbeiten

2.4.1 Reaktivität der BTZs gegenüber Grignard-Verbindungen

Der Ausgangspunkt der Arbeiten war die Reaktivität der BTZs gegenüber nukleophilen Reagenzien ^{46, 47, 53}, wobei die Umsetzung mit Methylmagnesiumbromid detailliert untersucht wurde. Aus der Reaktion konnten, wie in Abbildung 6 dargestellt, vier verschiedene Reaktionsprodukte isoliert und charakterisiert werden: Neben den 5- und 7-Methyl-BTZs (Verbindungen 1 und 2) konnten die stabilen 4,5-Dimethyl-5*H*- und 4,7-Dimethyl-7*H*-benzo[*e*][1,3]thiazine (Verbindungen 3 und 4) identifiziert werden, bei denen das aromatische System aufgehoben ist. Die Konstitution der zum Teil in geringen Ausbeuten isolierten Reaktionsprodukte konnte anhand von Röntgenkristallstrukturen zweifelsfrei bestimmt werden. Die erstmalige Beschreibung der intensiv rot gefärbten Benzo[*e*][1,3]thiazine zeigt einen weiteren Aspekt der Reaktivität der BTZs.

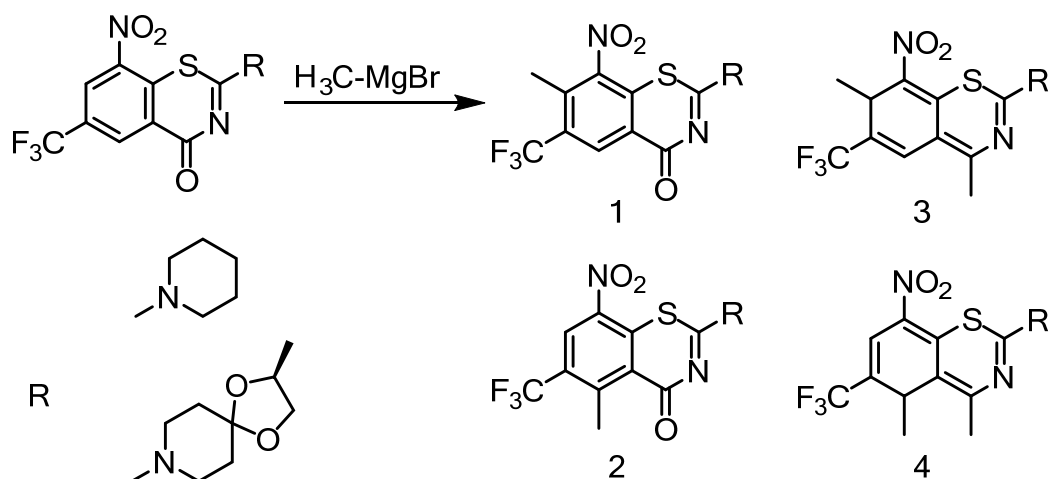


Abbildung 6 Reaktivität von BTZs gegenüber Methylmagnesiumbromid und die aus der Reaktion resultierenden 5/7-Methyl-BTZs (1 und 2) und 4,5-Dimethyl-5*H*/4,7-Dimethyl-7*H*-benzo[*e*][1,3]thiazine (3 und 4).

Darüber hinaus konnte in dieser Studie durch Umsetzung der BTZs mit einem Borandimethylsulfid-Komplex eine selektive Reduktion der Carbonylgruppe erreicht werden, wodurch 8-Nitrobenzo[*e*][1,3]thiazine dargestellt werden konnten. Die genannten Reaktionsprodukte wurden einer antimykobakteriellen Aktivitätstestung gegen *M. tuberculosis* und *M. smegmatis* unterzogen, wobei die monomethylierten BTZs Hemmung des bakteriellen Wachstums zeigten, während die Benzo[*e*][1,3]thiazine ihre antimykobakterielle Aktivität verloren.

Die Ergebnisse der Arbeiten wurden im folgenden Artikel publiziert: *New Insight into Dearomatization and Decarbonylation of Antitubercular 4H-Benzo[e][1,3]thiazinones: Stable 5H- and 7H-Benzo[e][1,3]thiazines*. Adrian Richter, Rüdiger W. Seidel, Jürgen Graf, Richard Goddard, Christoph Lehmann, Tom Schlegel, Nour Khater, Peter Imming; ChemMedChem (2022), 17, e20220002.

[https://chemistry-](https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cmdc.202200021)

[europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cmdc.202200021](https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cmdc.202200021)

<https://doi.org/10.1002/cmdc.202200021>

Beiträge der Autorinnen und Autoren: **Adrian Richter** (Durchführung chemischer Synthesen und Charakterisierung der Reaktionsprodukte, Probenvorbereitung für strukturchemische Versuche, Einwerbung von Drittmitteln, mikrobiologische Testung, verfassen und editieren des Manuskriptes, Konzeption der Studie, Visualisierung), **Rüdiger W. Seidel** (verfassen und editieren des Manuskriptes, Auswertung des Kristallstrukturdaten, Visualisierung), **Jürgen Graf** (Ermittlung der Kristallstrukturdaten), **Richard Goddard** (Ermittlung der Kristallstrukturdaten, editieren des Manuskriptes), **Christoph Lehmann** (Durchführung chemischer Synthesen und Charakterisierung der Reaktionsprodukte), **Tom Schlegel** (Durchführung chemischer Synthesen und Charakterisierung der Reaktionsprodukte), **Nour Khater** (Durchführung chemischer Synthesen und Charakterisierung der Reaktionsprodukte), **Peter Imming** (verfassen und editieren des Manuskriptes, Konzeption der Studie, Betreuung)

2.4.2 8-Nitrobenzisothiazolinone als neue antimykobakterielle Stoffklasse

Die medizinisch-chemische Studie beschreibt die Synthese, analytische Charakterisierung und antimykobakterielle Testung von 8-Nitrobenzisothiazolinonen. Bei den 8-Nitrobenzisothiazolinonen handelt es sich um eine von den BTZs abgeleitete Klasse von DprE1 Inhibitoren, bei denen das Thiazinonringsystem durch einen Fünfring ersetzt ist. Neben den genannten Nitrobenzisothiazolinonen konnten bei der Synthese die isomeren O-Acylbenzisothiazol-3-ole isoliert werden, wie in Abbildung 7 dargestellt. Die analytische Charakterisierung der Verbindungen erfolgte mittels Röntgenkristallographie und $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie.

Die antimykobakterielle Testung gegen *M. tuberculosis* und *M. smegmatis* zeigte, dass die Benzisothiazolinone noch mit MHKs von $\leq 1 \mu\text{M}$ das Wachstum von Mykobakterien hemmen, während die Benzoisothiazolole keine Aktivität mehr besitzen. Ein Docking Experiment für kovalente Inhibitoren zeigte, dass die Benzisothiazolinone ähnlich wie die BTZs an DprE1 binden können.

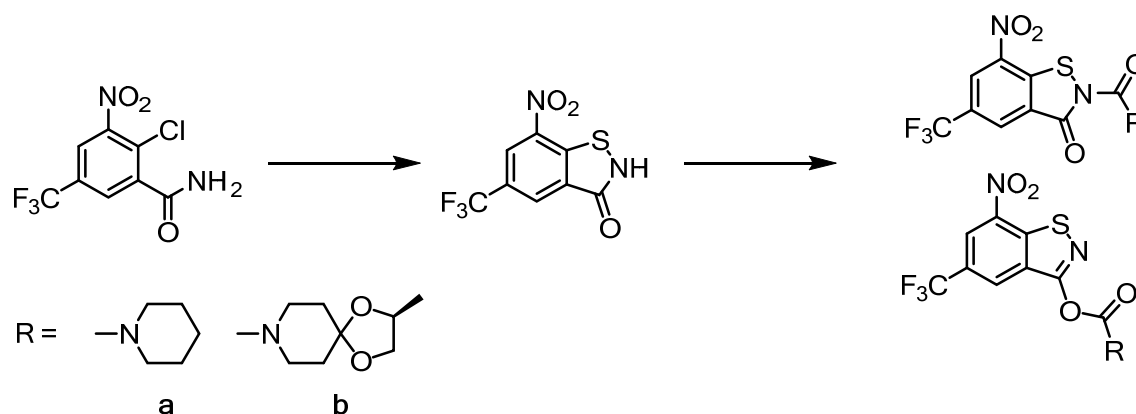


Abbildung 7 Synthese der Benzisothiazolinone und Benzoisothiazolole.

Die Ergebnisse wurden in dem folgenden Artikel publiziert: *BTZ-Derived Benzisothiazolinones with In Vitro Activity against Mycobacterium tuberculosis*. Adrian Richter, Rüdiger W. Seidel, Richard Goddard, Tamira Eckhardt, Christoph Lehmann, Julia Dörner, Fabienne Siersleben, Theresia Sondermann, Lea Mann, Michael Patzer, Christian Jäger, Norbert Reiling, Peter Imming; *ACS Med. Chem. Lett.* (2022), 13(8) 1302–1310.

<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsmchemlett.2c00215>

<https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.2c00215>

Beiträge der Autorinnen und Autoren: **Adrian Richter** (Durchführung chemischer Synthesen und Charakterisierung der Reaktionsprodukte, Probenvorbereitung für strukturchemische Versuche, Einwerbung von Drittmitteln, mikrobiologischen Testung, verfassen und editieren des Manuskriptes, Konzeption der Studie, Visualisierung), **Rüdiger W. Seidel** (verfassen und editieren des Manuskriptes, Auswertung des Kristallstrukturdaten, Visualisierung), **Richard Goddard** (editieren des Manuskriptes, Ermittlung und Auswertung des Kristallstrukturdaten), **Tamira Eckhardt** (Durchführung chemischer Synthesen und Charakterisierung der Reaktionsprodukte), **Christoph Lehmann** (Durchführung chemischer Synthesen und Charakterisierung der Reaktionsprodukte), **Julia Dörner** (Durchführung chemischer Synthesen und Charakterisierung der Reaktionsprodukte), **Fabienne Siersleben**

(mikrobiologische Testung), **Theresia Sonderrmann** (mikrobiologische Testung), **Lea Mann** (mikrobiologische Testung, Datenauswertung), **Michael Patzer** (Strukturchemische Versuche), **Christian Jäger** (in silico Studien), **Norbert Reiling** (mikrobiologische Testung, Datenauswertung), **Peter Imming** (verfassen und editieren des Manuskriptes, Konzeption der Studie, Betreuung)

2.4.3 Strukturchemische Charakterisierung der antimykobakteriellen Leitverbindung BTZ043

Die strukturchemische Untersuchung der antimykobakteriellen Leitverbindung BTZ043 erfolgte durch Kristallstrukturanalyse. Die chirale Verbindung kristallisiert im triklinen Kristallsystem (Raumgruppe $P1$) und die beiden kristallographisch unabhängigen Moleküle stellen diastereomere Konformere dar, die ineinander umgewandelt werden können. ^{13}C -NMR-Messungen bei variabler Temperatur von BTZ043 in CDCl_3 im Bereich von 248-333 K zeigen eine Rotationsbarriere der C-N_{piperidine} Bindung von $E_a = 17,1 \pm 1 \text{ kcal mol}^{-1}$ und $\Delta G^\ddagger = 14,6 \pm 1 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Die Ergebnisse wurden in dem folgenden Artikel publiziert: *Structural elucidation of the antitubercular benzothiazinone BTZ043: A combined X-ray, variable temperature NMR and DFT study*. Adrian Richter, Michael Patzer, Richard Goddard, Julia B. Lingnau, Peter Imming, Rüdiger W. Seidel; *Journal of Molecular Structure* (2022), 1248, 131419.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022286021015477>

<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131419>

Beiträge der Autorinnen und Autoren: **Adrian Richter** (Konzeption der Studie, Probenvorbereitung für strukturchemische Versuche, Einwerbung von Drittmitteln, editieren des Manuskriptes), **Michael Patzer** (Strukturchemische Versuche, formale Analyse, Visualisierung), **Richard Goddard** (Strukturchemische Versuche, Validierung, formale Analyse, Datenkuratierung, editieren des Manuskriptes, Visualisierung), **Julia B. Lingnau** (Strukturchemische Versuche, Validierung, formale Analyse, Visualisierung), **Peter Imming** (Konzeption der Studie, Ressourcen, Betreuung, Projektverwaltung) **Rüdiger W. Seidel** (Konzeption der Studie, Strukturchemische Versuche, Validierung, formale Analyse, Datenkuratierung, Schreiben des Originalentwurfs, Visualisierung, Projektverwaltung)

2.5 Zusammenfassung I

Die drei zusammengefassten Studien untersuchen die Reaktivität, die Strukturchemie und die Struktur-Wirkungsbeziehungen der 8-Nitro-BTZs. Diese Stoffklasse ist von wissenschaftlichem Interesse, da sie ein neues antimykobakterielles Target - DprE1 - adressiert und so bereits bekannte Resistenzmechanismen der Mykobakterien umgeht. Die in Abschnitt 2.4.1 beschriebene Untersuchung belegt allerdings die hohe Reaktivität der elektronenarmen Nitroaromaten gegenüber nukleophilen Reaktionspartnern, welche den 8-Nitro-BTZs für einen Arzneistoff problematische Eigenschaften verleiht. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass nukleophile Agenzien wie Methylmagnesiumbromid BTZs zu Benzo[e][1,3]thiazinen umsetzen können, die keine antimykobakterielle Aktivität besitzen. Inwiefern diese Verbindungen für den Metabolismus der BTZs von Bedeutung sind, sollte bei zukünftigen Pharmakokinetik-Studien untersucht werden. Die Synthese und Charakterisierung der Benzisothiazolinone zeigt, dass die Struktur-Wirkungsbeziehungen der BTZs eine gewissen Variabilität hinsichtlich des Thiazinonringes erlauben. Ein Austausch des Thiazinonsystems durch ein Isothiazolinon ist unter Erhalt der antimykobakteriellen Wirksamkeit möglich, wobei keine Steigerung der Aktivität erzielt werden konnte. Die Leitstruktur BTZO43 konnte zudem röntgenkristallographisch beschrieben werden und die Rotationsbarriere, des für die Wirksamkeit wichtigen (S)-2-Methyl-1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decan-Substituenten wurde bestimmt.

Der aktuelle Wissensstand zu Benzothiazinonen und ihrer antimykobakteriellen Wirkung wurde in folgendem Übersichtsartikel zusammengefasst: *Synthesis, structures, reactivity and medicinal chemistry of antitubercular benzothiazinones*. Rüdiger W. Seidel, Adrian Richter, Richard Goddard, Peter Imming; *Chemical Communications* (2023), 59, 4697-4715.

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2023/cc/d3cc00356f>

<https://doi.org/10.1039/D3CC00356F>

Beiträge der Autoren: **Rüdiger W. Seidel** (Konzeption der Studie, Projektadministration, Visualisierung, schreiben und editieren des Manuskriptes), **Adrian Richter** (Konzeption der Studie, Visualisierung, editieren des Manuskriptes) **Richard Goddard** (Visualisierung), **Peter Imming** (Betreuung, editieren des Manuskriptes)

3. Phenylalaninamide als antimykobakterielle RNA-Polymerase Inhibitoren - Synthese von Analoga und Etablierung mikrobiologischer Testmethoden gegen *M. abscessus*

3.1 Die mykobakterielle RNA-Polymerase als Zielstruktur für Arzneistoffe

Eine wesentliche Zielstruktur für die antimykobakterielle Therapie ist die RNA-Polymerase der Bakterien. Dieses Enzym katalysiert die Transkription von DNA in mRNA und spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Proteinexpression. Die Hemmung der Transkription durch Rifamycine wirkt bakterizid auf die Erreger, wenn diese gegenüber dieser Wirkstoffklasse empfindlich sind.

Die bakterielle RNA-Polymerase besteht aus fünf Untereinheiten, zwei α -Untereinheiten (RpoA) und je einer β -(RpoB), β' -(RpoC) und ω -Untereinheit (RpoZ)^{54, 55}. Das $\alpha_2\beta\beta'\omega$ -Kernenzym weist eine scherenartige Struktur auf, wobei die β - und β' -Untereinheiten einer "Zange" ähneln. Die beiden α -Untereinheiten bilden ein Homodimer und sind für den Aufbau des Kernenzym notwendig. Die α -Untereinheiten fungieren als Gerüst, welches die $\beta\beta'$ -Untereinheit zusammenhält, zudem binden Transkriptionsfaktoren zur Regulation der Transkription an diesen Teil des Enzyms⁵⁶, um die Transkription zu regulieren. Die $\beta\beta'$ -Untereinheit stellt das katalytische Zentrum des Enzyms dar, wobei die kleinere β -Untereinheit an der Initiation/Elongation beteiligt ist, während die β' -Untereinheit an den DNA Strang bindet⁵⁷. Die ω -Untereinheit fungiert als Chaperon für den Enzymkomplex, wobei diese Untereinheit bisher am wenigsten erforscht ist⁵⁸. Das Kernenzym $\alpha_2\beta\beta'\omega$ ist zwar in der Lage, die Elongation der m-RNA durchzuführen, für die Einleitung der Transkription ist jedoch die Bindung an einen Initiationsfaktor notwendig.⁵⁹ Dieser wird als Initiationsfaktor σ bezeichnet, durch seine Bindung an das Kernenzym wird das Holoenzym gebildet⁶⁰⁻⁶².

Der Spalt zwischen β und β' enthält den primären Hauptkanal (1), den NTP (Nukleosidtriphosphat) -Eingangskanal (2) und den RNA-Ausgangskanal (3), wie in Abbildung 8 gezeigt. Das Mg^{2+} -haltige katalytische Zentrum der RNA-Polymerase befindet sich an der Basis dieses Spalts, die Brückenhelix verbindet die Untereinheiten β und β' . Die Triggerschleife ist ein bewegliches Strukturelement des aktiven Zentrums, das zwischen einem offenen Zustand, der den Eintritt des NTP-

Substrats in das Zentrum ermöglicht, und einem geschlossenen Zustand, der das Substrat am Zentrum festhält, wechselt ⁶³.

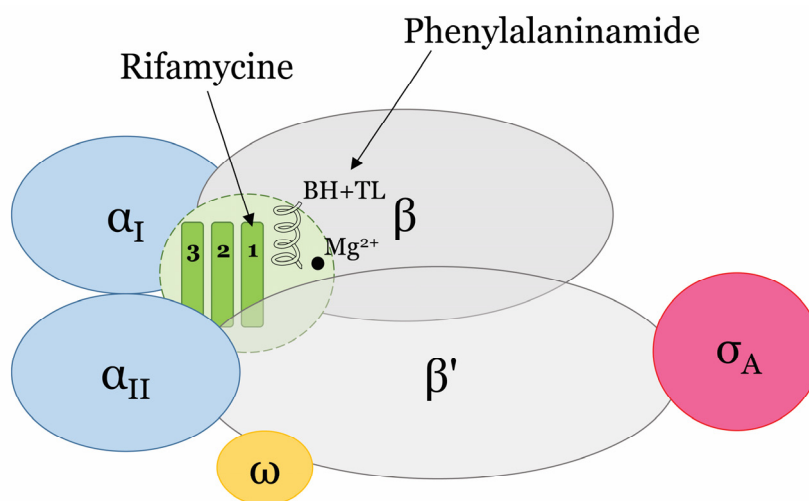


Abbildung 8 Struktur der mykobakteriellen RNA-Polymerase mit Rifamycin- und Phenylalaninamidbindungstelle (BH - Brückenhelix, TL - Triggerloop, (1) primären Hauptkanal, (2) NTP-Eingangskanal, (3) RNA-Ausgangskanal).

Die wichtigste antimykobakterielle Substanzklasse, die durch Hemmung der RNA-Polymerase wirkt, sind die Rifamycine. Sie binden an den primären Hauptkanal in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums und führen so zu einer Hemmung der RNA-Elongation und damit zum Abbruch der RNA-Synthese. Die im Folgenden untersuchten Phenylalaninamide besitzen einen anderen Wirkmechanismus: Vertreter dieser Substanzklasse binden an die N-terminale Brückenhelix und blockieren die Beweglichkeit der Triggerschleife, was zu einer Hemmung der Nukleotidzufuhr und damit zum Abbruch der RNA-Synthese führt.

3.2 Rifamycine als klinisch genutzte RNA-Polymerase Inhibitoren

Vertreter der Rifamycine ⁶⁴ gehören zu den wichtigsten antimykobakteriellen Therapeutika und wirken durch die allosterische Hemmung der RNA-Polymerase bakterizid ^{54, 55}. Das semi-synthetische Rifampicin ist das Mittel der Wahl bei Infektionen mit *M. tuberculosis* ^{65, 66}. Aufgrund seiner bakteriziden Wirkung ist Rifampicin auch mehr als 50 Jahre nach seiner Entwicklung ein unverzichtbares Medikament zur Behandlung der Rifampicin-sensitiven Tuberkulose. Entscheidend für die klinische Wirksamkeit von Rifampicin ist die Penetration in die granulomatösen Areale einer *M. tuberculosis* Infektion ⁶⁷, in denen sich die persistenten Mykobakterien befinden, die für eine effektive Behandlung eradiziert

werden müssen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Rifamycine gegen persistente Mykobakterien im Kaseum bakterizide Wirkung besitzen ²⁹.

Obwohl Rifamycine zur Behandlung von NTM-Infektionen ^{68, 69} und in verschiedenen Kombinationstherapien eingesetzt werden, ist ihr Stellenwert gegen bestimmte NTM-Spezies unklar. Beispielsweise wird für die Behandlung von *Mycobacterium avium* eine Kombinationstherapie mit Ethambutol, Azithromycin und Rifampicin empfohlen. Aktuelle Untersuchungen ^{70, 71} zeigen jedoch keinen Mehrwert für Rifampicin. *M. abscessus* ⁷² besitzt eine intrinsische Resistenz gegen Rifampicin (s. Abschnitt 3.3), so dass Rifampicin für die Behandlung von Infektionen mit diesem Mykobakterium keine therapeutische Bedeutung hat.

Das Spiropiperidyl-Rifamycin Rifabutin zeigt eine verbesserte Aktivität und bakterizide Wirkung gegen Rifampicin-resistente NTM wie *M. abscessus* ^{33, 73}. In einem *in vivo* Mausmodell für eine *M. abscessus* Infektion ist Rifabutin wirksam ⁷⁴, was diesen Arzneistoff zu einem geeigneten Ausgangspunkt für Entwicklung modifizierter Rifamycine mit erweitertem Wirkspektrum macht. Auf diesem Forschungsgebiet wurden bereits Fortschritte erzielt und Rifamycinderivate beschrieben, die bestimmte Resistenzmechanismen umgehen ⁷⁵.

Ein Nachteil von Rifamycinen sind pharmakokinetische Interaktionen, die durch Induktion von Cytochrom P450-Enzymen verursacht werden ^{76, 77}. Durch Bindung an PXR (Pregnan-X-Rezeptor) induzieren Rifamycine die Expression von CYP3A4, aber auch zahlreicher anderer Cytochrom P450-Enzyme, wie CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8 oder CYP2C19 ⁷⁸. Diese Eigenschaft beeinflusst die Pharmakokinetik anderer Wirkstoffe und ist insbesondere bei einer Koinfektion mit HIV (Humanes Immundefizienz-Virus) problematisch.

3.3 Resistenzen gegen Rifamycine in *M. tuberculosis* und NTM

Die therapeutische Nutzbarkeit der Rifamycine kann durch erworbene und intrinsische Resistenzen der Mykobakterien stark eingeschränkt werden ^{79, 80}. Bei *M. tuberculosis* treten erworbene Resistenzen durch Mutationen in der Rifamycin Bindungstasche auf ^{64, 81}. Diese sind meist im *rpoB* Gen lokalisiert, das für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase kodiert, wobei insbesondere die Mutationen S450L und H445Y zu nennen sind, da sie besonders häufig beobachtet werden ⁸². Diese Resistenzen können die sechsmonatige Behandlung einer Tuberkuloseinfektion verlängern ⁸³, was insbesondere bei der MDR (multi drug resistant) oder XDR-Tuberkulose (extensively drug resistant) der Fall ist. Während die MDR-Tuberkulose

Resistenzen gegen Rifampicin und Isoniazid aufweist, besitzt die XDR-Tuberkulose noch zusätzliche Resistenzmechanismen gegen Fluorchinolone, Bedaquilin oder Linezolid¹. Auch wenn mit der Kombination von Bedaquilin, Pretomanid, Linezolid und Moxifloxacin⁸⁴ eine effiziente Wirkstoffkombination zur Behandlung von MDR-Tuberkulose entwickelt wurde, ist ein RNA-Polymerase Hemmstoff, der keine Kreuzresistenzen mit Rifamycinen zeigt, wünschenswert.

M. abscessus und andere NTM besitzen intrinsische Resistenzen gegen Rifamycine, weshalb Vertreter dieser Substanzklasse nur eingeschränkt zur Behandlung von Infektionen mit diesen Erregern eingesetzt werden können. Für *M. abscessus* ist die Inaktivierung von Rifamycinen durch ADP (Adenosindiphosphat)-Ribosylierung⁷² als Resistenzmechanismus beschrieben, dessen Inhibition die Bakterien sensitiv für den Wirkstoff macht⁸⁵. Ein weiterer Mechanismus zur Inaktivierung von Rifampicin in *M. abscessus* ist die Oxidation des Naphthohydrochinon-Systems der Wirkstoffe⁸⁶. So besitzt z.B. Rifabutin eine Naphthochinon-Struktur anstelle des Naphthohydrochinon-Systems, was zu einer verbesserten Aktivität gegenüber *M. abscessus* führt. Die im Vergleich zu *M. tuberculosis* geringere Permeabilität der Zellwand von *M. abscessus* trägt zur Unempfindlichkeit gegenüber dieser Wirkstoffklasse bei⁸⁷.

Für *Mycobacterium avium* konnte eine Rifampicin Resistenz durch Mutationen im *rpoB* Gen nachgewiesen werden⁸⁸, ein Resistenzverhalten, das bereits von *M. tuberculosis* bekannt ist. Auch bei dieser NTM-Spezies wird die verminderte Permeabilität der Zellwand für die Unempfindlichkeit gegenüber Rifamycinen verantwortlich gemacht^{89, 90}.

3.4 Synthetische RNA-Polymerase Inhibitoren - Phenylalaninamide

Die Phenylalaninamide (Strukturformeln siehe Abbildung 9) sind eine antimykobakterielle Stoffklasse, die durch Hemmung der RNA-Polymerase wirkt. Die Verbindung MMV688845 wurde 2013 durch ein Hochdurchsatz-Screening für antimykobakterielle Verbindungen von GSK (GlaxoSmithKline) entdeckt und besitzt eine MHK_{90}^1 von 0.8 μM gegen *M. tuberculosis*. Die Struktur-Wirkungsbeziehung der Stoffklasse wurde erstmals in einer Patentschrift⁹¹ an 220 Verbindungen gegen *M. tuberculosis* und *Mycobacterium avium* untersucht. Dabei wurden der Morpholin- bzw. der Thiophenring von MMV688845 derivatisiert oder durch

¹ MHK_{90} - entspricht der geringsten Wirkstoffkonzentration, bei der das Wachstum eines Erregers um 90 % gemindert ist.

Etherfunktionen ersetzt. Die aktivste Verbindung IX-276 besitzt eine MHK von 0.4 μM gegen *M. tuberculosis*. Zudem erfolgte die Untersuchung des Wirkmechanismus der Phenylalaninamide an der Zielstruktur *M. tuberculosis*-RNA-Polymerase mit der Substanz D-AAP1³⁵. In dieser Studie von Lin et al. konnten der Wirkmechanismus und die Bindungsstelle der Phenylalaninamide durch Enzymhemmtests und eine Röntgenkristallstruktur beschrieben werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Phenylalaninamide an die N-terminale Brückenhelix binden, wodurch die Nukleotidzufuhr gehemmt wird, was zum Abbruch der Transkription führt³⁵. Es zeigte sich zudem, dass die Bindungstasche der Rifamycine und die der Phenylalaninamide räumlich getrennt sind und es zu keiner Überlappung kommt, so dass für die Kombination beider Wirkstoffklassen in vitro ein additiver Effekt beobachtet werden konnte.

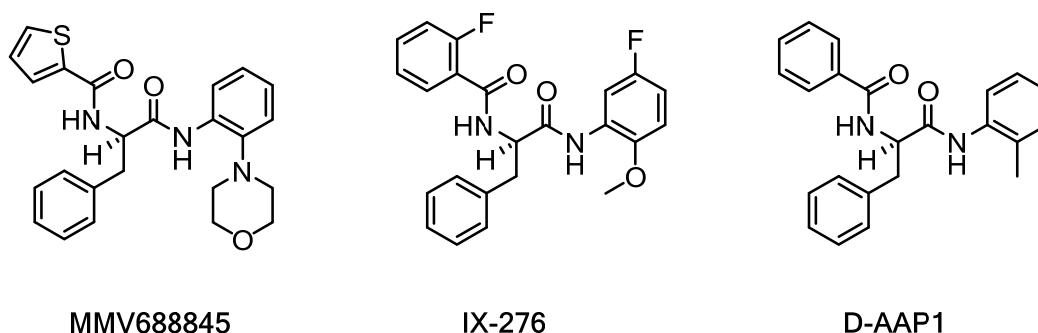


Abbildung 9 Antimykobakterielle Phenylalaninamide: MMV688845³⁴, IX-276⁹¹ und D-AAP1³⁵.

Bemerkenswert ist, dass die Verbindungen aus der Serie der CBR Verbindungen^{92, 93} die RNA-Polymerase über einen sehr ähnlichen Mechanismus hemmen. Allerdings sind die CBR Verbindungen gegen gramnegative Bakterien wie *Escherichia coli* und nicht gegen Mykobakterien wirksam, da sich die Form der Bindungstasche unterscheidet.

3.5 Mikrobiologische Charakterisierung neuer Wirkstoffe gegen Mykobakterien

Zur Charakterisierung von Antiinfektiva hinsichtlich ihrer antimykobakteriellen Wirksamkeit *in vitro* werden verschiedene mikrobiologische Methoden eingesetzt ⁹⁴. Initial wird die Hemmung des Bakterienwachstums durch Bestimmung der niedrigsten Wirkstoffkonzentration, die das Bakterienwachstum hemmt (MHK), untersucht ¹⁰. Die Ergebnisse der MHK-Bestimmung werden durch verschiedene Variablen der Testmethode beeinflusst: Die Bakterienzahl im Inokulum, die Zusammensetzung des Testmediums, die Inkubationszeit und die Auswertemethode beeinflussen den ermittelten MHK-Wert. Für Mykobakterien wird häufig Middlebrook 7H9 als flüssiges Basismedium verwendet ⁹⁵, das mit Nährstoffkonzentraten wie ADS (Albumin, Dextrose und Natriumchlorid) oder OADC (Ölsäure, Albumin, Dextrose und Katalase) supplementiert wird. Alternativ gibt es andere Nährmedien, wie z. B. Mueller-Hinton-Medium, das häufig für schnell wachsende Mykobakterien verwendet wird ⁹⁶. Um eine Verklumpung der Bakterien während der Kultivierung zu verhindern, kann dem Medium ein Detergens wie Tween 80® oder Tyloxapol zugesetzt werden.

Eine weitere Methode der mikrobiologischen Charakterisierung ist die Untersuchung von Antiinfektiva in einem Makrophagen-Infektionsmodell ^{16, 97}. Da alveoläre Makrophagen eine wichtige Infektionsnische für Mykobakterien darstellen, wurden *in vitro* Methoden entwickelt, die dies berücksichtigen. Dazu werden humane (*ex vivo*) oder aus THP-1-Zellen differenzierte Makrophagen mit Mykobakterien infiziert und nach Inkubation mit dem entsprechenden Wirkstoff kann der Effekt auf das bakterielle Wachstum durch Koloniezählung ⁹⁸ oder durch Bildanalyse fluoreszenzmarkierter Bakterien ⁹⁹ quantifiziert werden. Diese Testmethoden berücksichtigen die Permeabilität der Testverbindungen und den Einfluss der Wachstumsbedingungen der Mykobakterien nach Phagozytose auf die Wirkstoffaktivität.

Eine weitere wichtige Eigenschaft antimykobakterieller Substanzen ist ihre bakterizide Wirkung ¹⁰⁰, so wirken z. B. Rifamycine ¹⁰¹ oder Fluorchinolone ¹⁰² bakterizid gegen Mykobakterien. Die bakterizide Wirkung wird üblicherweise durch die Bestimmung der MBK (Minimale bakterizide Konzentration) quantifiziert, wobei die nach Inkubation mit dem Wirkstoff noch teilungsfähigen Bakterien durch Bestimmung der Koloniezahl auf Agarplatten ausgezählt werden. Bakterizide Verbindungen sind dabei in der Lage, 99 % oder 99.9 % aller Bakterien im Inokulum

zu inaktivieren. Die Bestimmung der Koloniezahl auf Agarplatten ist allerdings zeit- und arbeitsaufwendig, was die Anwendbarkeit der Methode einschränkt. Im Abschnitt 3.6.7 ist daher ein Trehalose-Farbstoffkonjugat zur Fluoreszenzfärbung von *M. abscessus* untersucht worden, welches zur Bestimmung der Bakterizidie genutzt werden kann.

Da die Behandlung mykobakterieller Infektionen durch eine Kombination von mindestens drei Wirkstoffen erfolgt¹⁰³⁻¹⁰⁵, ist ein weiterer Aspekt der mikrobiologischen Charakterisierung die Prüfung von Wirkstoffkombinationen *in vitro*. Durch den Einsatz des Checkerboard-Assays¹⁰⁶ kann untersucht werden, ob die Kombination von zwei antimykobakteriellen Substanzen zu einer synergistischen, additiven oder antagonistischen Wirkung führt. Eine Wirkungsverstärkung ist beispielsweise durch eine Veränderung der Zellwanddurchlässigkeit oder durch die Unterdrückung vorhandener Resistenzmechanismen möglich.

Während für *M. tuberculosis* etablierte Methoden¹⁰⁷ zur Bestimmung der MHK/MBK im Nährmedium oder während der Infektion von Makrophagen existieren, die eine gewisse Vergleichbarkeit der Ergebnisse ermöglichen, sind diese für NTM noch nicht in gleichem Maße etabliert^{10, 108}. Für schnell wachsende Mykobakterien, wie z. B. *M. abscessus*, ist eine Anpassung der Methoden erforderlich, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde (s. Abschnitt 3.6.1, 3.6.2 und 3.6.4).

Ein weiterer Unterschied zwischen *M. tuberculosis* und NTM ist die größere genetische Variabilität der Bakterienspezies, die zu unterschiedlichen Empfindlichkeiten gegenüber antimykobakteriellen Substanzen führt¹⁰⁹⁻¹¹¹. Beispielsweise besitzt ein Teil der *M. abscessus*-Subspezies eine induzierbare Resistenz gegenüber Makroliden, die durch die Expression einer ribosomalen Methylase hervorgerufen wird^{112, 113}. Daher ist es sinnvoll, neue Wirkstoffe gegen ein breiteres Spektrum von NTM-Subspezies und klinischen Isolaten zu testen, was für die Phenylalaninamide im Abschnitt 3.6.9 beschrieben ist.

3.6 Ergebnisse der Forschungsarbeiten

3.6.1 Identifizierung von Wirkstoffkandidaten gegen *M. abscessus*

Für die Suche nach neuen Wirkstoffkandidaten wurden zwei Substanzbibliotheken (PathogenBox® und „GSK’s TB compound set“³⁴) mit 568 Testverbindungen gegen *M. abscessus* untersucht. Hierfür wurde ein fluoreszenz-basierter Assay genutzt, für welchen der *M. abscessus* ssp. *abscessus* Stamm ATCC19977 mit dem Plasmid pTEC27 zur tdRFP (tomato red fluorescent protein) Expression transformiert wurde. Die Substanztestung wurde in den Assaymedien 7H9 supplementiert mit ADS und MHII (Müller-Hinton-II Medium, kationen-adjustiert) durchgeführt, um Testverbindungen mit medienunabhängiger Aktivität zu identifizieren. Es wurden fünf Substanzen hinsichtlich ihrer MHK charakterisiert, die das Wachstum von *M. abscessus* in 7H9 supplementiert mit ADS und in MHII hemmen. Insbesondere Inhibitoren des mykobakteriellen Transportproteins MmpL3 (Mycobacterial membrane protein Large 3), wie MMV688846¹¹⁴, MMV687146 / GW623128X¹¹⁵ und GSK2200160A/GSK2200157A¹¹⁶, zeigten *in vitro* Aktivität. Zudem wirkten auch ein Inhibitor der mykobakteriellen RNA-Polymerase (MMV688845^{34, 35}) und ein Gyrase Hemmstoff (MMV688844¹¹⁷) inhibierend auf das Wachstum von *M. abscessus*. Die hier beschriebenen Wirkstoffkandidaten bildeten die Grundlage für eine anschließende Strukturoptimierung mit Fokus auf den RNA-Polymerase-Inhibitor MMV688845.

Die Ergebnisse wurden in dem folgenden Artikel publiziert: *Screening of Preselected Libraries Targeting Mycobacterium abscessus for Drug Discovery*. Adrian Richter, Angelika Strauch, Joseph Chao, Mary Ko, Yossef Av-Gay; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2018), 62 (9).

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.00828-18>

<https://doi.org/10.1128/aac.00828-18>

Beiträge der Autorinnen und Autoren: **Adrian Richter** (Durchführung mikrobiologischer Versuche, verfassen und editieren des Manuskriptes, Visualisierung, Konzeption der Studie) **Angelika Strauch** (Durchführung mikrobiologischer Versuche), **Joseph Chao** (Visualisierung), **Mary Ko** (Durchführung mikrobiologischer Versuche), **Yossef Av-Gay** (Einwerbung von Drittmitteln, Betreuung, editieren des Manuskriptes, Konzeption der Studie)

3.6.2 Entwicklung eines Makrophagen-Infektionsmodells für *M. abscessus*

Ähnlich wie *M. tuberculosis* ist *M. abscessus* in der Lage, alveoläre Makrophagen zu infizieren und deren Immunantwort zu manipulieren, um ihr zu entkommen. *M. abscessus* ist daher in der Lage, sich in Makrophagen zu replizieren, was für die Pathogenese der Lungenerkrankung von entscheidender Bedeutung ist¹¹⁸. Da sich die Wachstumsbedingungen für *M. abscessus* während der Makrophageninfektion deutlich von denen in Kulturmedium unterscheiden, wurde ein fluoreszenzbasierter Assay entwickelt, der die Substanztestung gegen *M. abscessus* während der Makrophageninfektion erlaubt. Für diese Untersuchung werden aus THP-1 Zellen (Tohoku Hospital Pediatrics-1) differenzierte Makrophagen mit dem *M. abscessus* ssp. *abscessus* Stamm ATCC19977 infiziert, der mit dem Plasmid pTEC27 zur tdRFP Expression transformiert wurde. Die bildbasierte Quantifizierung des mykobakteriellen Wachstums erfolgt mittels automatisierter Fluoreszenzmikroskopie. Neben der antimykobakteriellen Wirksamkeit, können mit diesem Assay auch zytotoxische Effekte durch Auszählung der nach der Inkubation verbleibenden Makrophagen untersucht werden. Die automatisierte Auswertung dieses Assays erlaubt die Testung von Substanzbibliotheken, da auf die zeit- und arbeitsaufwendige Koloniezählung verzichtet werden kann. Im Rahmen dieser Studie konnten die PathogenBox® und „GSK's TB compound set“³⁴ mit 568 Testverbindungen untersucht werden. Dabei erwiesen sich die Verbindungen MMV688845^{34, 35} und MMV688846¹¹⁴ als wirksam gegen das mykobakterielle Wachstum in den Immunzellen.

Die Ergebnisse wurden in dem folgenden Artikel publiziert: *THP-1 and Dictyostelium Infection Models for Screening and Characterization of Anti-Mycobacterium abscessus Hit Compounds*. Adrian Richter, Tirosh Shapira, Yossef Av-Gay; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2019), 64(1).

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.01601-19>

<https://doi.org/10.1128/aac.01601-19>

Beiträge der Autoren: **Adrian Richter** (Durchführung mikrobiologischer Versuche, verfassen und editieren des Manuskriptes, Visualisierung, Konzeption der Studie) **Tirosh Shapira** (Durchführung mikrobiologischer Versuche, editieren des Manuskriptes), **Yossef Av-Gay** (Einwerbung von Drittmitteln, Betreuung, editieren des Manuskriptes, Konzeption der Studie)

3.6.3 Charakterisierung und racemisierungsfreie Synthese des antimykobakteriellen Wirkstoffes MMV688845

Das Phenylalaninamid MMV688845 konnte hinsichtlich seiner stereospezifischen Wirksamkeit untersucht werden, zudem führte die hier beschriebene Arbeit zur Etablierung eines racemisierungsfreien Syntheseweges. Die antimykobakterielle Testung der beiden Enantiomere von MMV688845 zeigte, dass nur das *R*-Enantiomer antimykobakterielle Aktivität besitzt, während die *S*-Form sich als unwirksam erwies. Aus diesem Grund war die Synthese des Phenylalaninamides unter Vermeidung der Racemisierung der Ausgangsverbindung D-Phenylalanin ein Ziel der Studie.

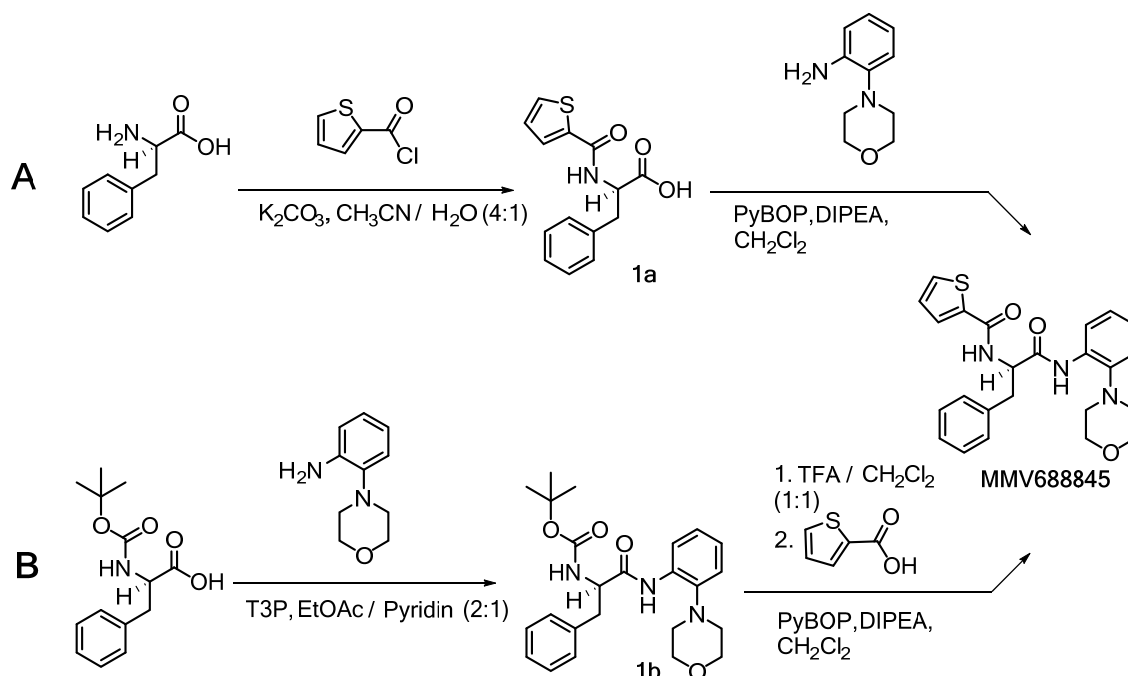


Abbildung 10 Synthese von MMV688845. **Methode A:** N-Acylierung von Phenylalanin mit 2-Thiophencarbonsäurechlorid und anschließende Amidkupplung mit 2-Morpholinoanilin. **Methode B:** Amidkupplung von Boc-Phenylalanin mit 2-Morpholinoanilin, gefolgt von Boc-Schutzgruppenabspaltung und Amidkupplung mit 2-Thiophencarbonsäure.

Für die Synthese der Verbindung MMV688845 wurden zwei unterschiedliche Ansätze genutzt, die in Abbildung 10 gezeigt sind. Die Bestimmung des Enantiomeren-Überschusses der jeweiligen Reaktionsprodukte erfolgte mittels HPLC (High performance liquid chromatography) an einer chiralen stationären Phase. Die Chromatogramme zeigten eine Trennung der beiden Enantiomere, wobei sich herausstellte, dass die Synthese nach Methode A zu einer vollständigen

Razemisierung führt. Im Gegensatz dazu erlaubt Methode B die Synthese von MMV688845 mit *ee*-Werten (Enantiomeren-Überschuss bzw. enantiomeric excess) von >99.9.

Die Ergebnisse wurden in dem folgenden Artikel publiziert: *Racemization-free synthesis of Na-2-thiophenoyl-phenylalanine-2-morpholinoanilide enantiomers and their antimycobacterial activity*. Lea Mann, Markus Lang, Philipp Schulze, Jan H. Halz, René Csuk, Sophie Hoenke, Rüdiger W. Seidel, Adrian Richter; *Amino Acids* (2021), 53(8):1187-1196.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00726-021-03044-1>

<https://doi.org/10.1007/s00726-021-03044-1>

Beiträge der Autorinnen und Autoren: **Lea Mann** (Durchführung der Synthesen und Charakterisierung der Syntheseprodukte, mikrobiologische Charakterisierung, editieren des Manuskriptes), **Markus Lang** (Durchführung der Synthesen und Charakterisierung der Syntheseprodukte), **Philipp Schulze** (Durchführung der HPLC Analytik), **Jan H. Halz** (Ermittlung der Kristallstrukturdaten), **René Csuk** (Betreuung, Auswertung der Zytotoxizitätsdaten), **Sophie Hoenke** (Durchführung der Zytotoxizitätsuntersuchung), **Rüdiger W. Seidel** (Analyse der Kristallstrukturdaten, schreiben und editieren des Manuskriptes), **Adrian Richter** (Durchführung der Synthesen und Charakterisierung der Syntheseprodukte, mikrobiologische Charakterisierung, Einwerbung von Drittmitteln, Betreuung, schreiben und editieren des Manuskriptes, Konzeption der Studie)

3.6.4 Antimykobakterielle Charakterisierung und Kombinationstestung der Verbindung MMV688845

Die Verbindung MMV688845, welche durch die Testung von Substanzbibliotheken identifiziert wurde (s. Abschnitt 3.6.1 und 3.6.2), konnte in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer antimykobakteriellen Aktivität umfassend charakterisiert werden. Zunächst erfolgte die Bestimmung der MHK-Werte gegen verschiedene Subspezies und klinische Isolate von *M. abscessus*, wobei für alle getesteten Bakterien MHK₉₀-Werte zwischen 5 - 10 µM festgestellt werden konnten. Zusätzlich wurde die Bakterizidie von MMV688845 durch Auszählung der koloniebildenden Einheiten untersucht. Es zeigte sich, dass MMV688845 nicht nur bakteriostatisch wirkt, sondern auch die Anzahl der koloniebildenden Einheiten von *M. abscessus* nach mehrtägiger Inkubation um 99 % reduziert.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Testung von MMV688845 in Kombination mit einem anderen Antibiotikum. Hierzu wurde der Checkerboard-Assay^{106, 119} verwendet und die Wirkstoffkombinationen hinsichtlich eines synergistischen oder additiven Effektes klassifiziert. Ein additiver Effekt zeigte sich in Kombination mit verschiedenen Wirkstoffen wie Bedaquilin, Amikacin, Rifabutin oder Tigecyclin. Hervorzuheben ist die synergistische Wirkung von MMV688845 mit den Makroliden Clarithromycin und Azithromycin. Diese Wirkverstärkung ist für den RNA-Polymeraseinhibitor Rifabutin bereits bekannt¹²⁰ und kann durch Suppression einer induzierbaren Makrolidresistenz^{112, 121, 122} bei *M. abscessus* erklärt werden.

Um den Wirkmechanismus von MMV688845 gegen *M. abscessus* genauer zu untersuchen, wurden im Labor resistente Stämme dieses Bakteriums isoliert. Durch Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass Mutationen im *rpoB* Gen, welches die β Untereinheit der RNA-Polymerase kodiert⁵⁴, die Resistenz verursachen. Auf der Grundlage von röntgenkristallographischen Daten der Phenylalaninamid-Bindungsstelle³⁵ in der *M. tuberculosis* RNA-Polymerase konnte ein Homologiemodell auf der Grundlage von *M. abscessus* Sequenzdaten erstellt werden. Anhand des Homologiemodells konnte gezeigt werden, dass die in den resistenten Stämmen veränderten Aminosäuren in unmittelbarer Nähe der Phenylalaninamid-Bindungstasche lokalisiert sind.

Aufgrund der vielversprechenden antimykobakteriellen Eigenschaften von MMV688845 und des aussichtsreichen Wirkmechanismus wurde die Pharmakokinetik nach oraler Gabe der Substanz im Mausmodell untersucht. Dabei zeigte sich eine unzureichende Plasmakonzentration, die möglicherweise auf eine schnelle Biotransformation zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse wurden in dem folgenden Artikel publiziert: *In Vitro Profiling of the Synthetic RNA Polymerase Inhibitor MMV688845 against Mycobacterium abscessus*. Lea Mann, Uday S. Ganapathy, Rana Abdelaziz, Markus Lang, Matthew D. Zimmerman, Véronique Dartois, Thomas Dick, Adrian Richter; *Microbiology Spectrum* (2022), 10(6):e0276022.

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.02760-22>

<https://doi.org/10.1128/spectrum.02760-22>

Beiträge der Autorinnen und Autoren: **Lea Mann** (Durchführung der mikrobiologischen Charakterisierung und Datenauswertung, schreiben und editieren des Manuskriptes, Visualisierung), **Uday S. Ganapathy** (Durchführung der mikrobiologischen Charakterisierung), **Rana Abdelaziz** (Erstellen eines

Homologiemodells für *M. abscessus* RNA-Polymerase), **Markus Lang** (Durchführung der Synthese), **Matthew D. Zimmerman** (Durchführung der *in vivo* Pharmakokinetik), **Véronique Dartois** (Betreuung, Einwerbung von Drittmitteln), **Thomas Dick** (Betreuung, Einwerbung von Drittmitteln, editieren des Manuskriptes, Konzeption der Studie), **Adrian Richter** (Durchführung der mikrobiologischen Charakterisierung und Datenauswertung, Einwerbung von Drittmitteln, Betreuung, schreiben und editieren des Manuskriptes, Konzeption der Studie, Visualisierung)

3.6.5 Synthese und antimykobakterielle Charakterisierung von Phenylalaninamiden

Aufgrund des in Abschnitt 3.6.4 beschriebenen antimykobakteriellen Potenzials der Verbindung MMV688845 erfolgte die chemische Derivatisierung der Phenylalaninamide mit dem Ziel, die *in vitro* Aktivität zu erhöhen und die Struktur-Wirkungs-Beziehungen dieser Substanzklasse zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden 25 Derivate von MMV688845 synthetisiert und gegen pathogene Mykobakterien, wie *M. abscessus* und *M. tuberculosis*, getestet. Zudem wurden die neuen Phenylalaninamide hinsichtlich ihrer Zytotoxizität untersucht.

Wie in Abbildung 11 dargestellt, konnte die Aktivität gegen *M. abscessus* durch Einführung von Thiomorpholin-1,1-dioxid und 2-Fluorbenzoesäure (Substanz ML259) gesteigert werden, was in einer MHK_{90} von 0.78 μM gegen *M. abscessus* und 0.20 μM gegen *M. tuberculosis* resultierte. Neben der Hemmwirkung auf das mykobakterielle Wachstum, wurden auch die bakteriziden Eigenschaften der optimierten Phenylalaninamide erforscht, wobei eine Reduktion der MBK Werte im Vergleich zu MMV688845 beobachtet wurde. Die aktivsten Derivate erreichten bereits bei einer Konzentration von 6,25 - 12,5 μM eine Keimzahlreduktion von 99 %.

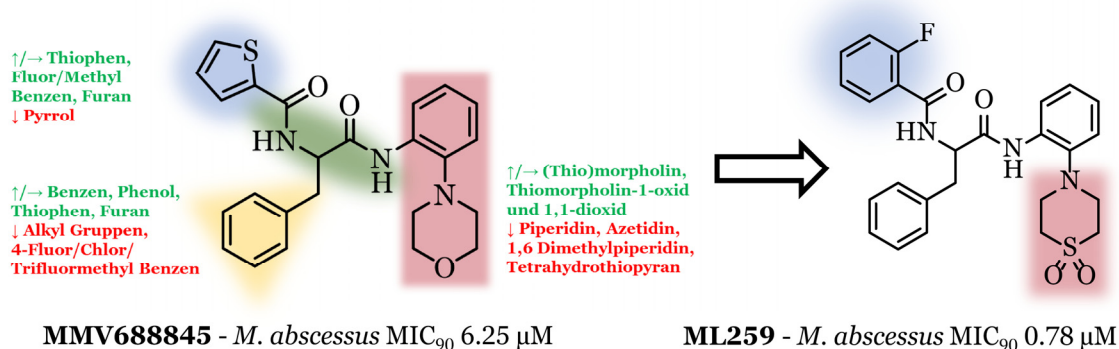


Abbildung 11 Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Phenylalaninamide und Derivatisierung des Screening Hits MMV688845.

Zur Validierung des Wirkmechanismus wurden die aktivsten Derivate von MMV688845 gegen einen *M. abscessus*-Stamm mit einer Mutation in der Phenylalaninamid-Bindungstasche getestet, die Resistenz gegen MMV688845 verursacht. Die von MMV688845 abgeleiteten Derivate zeigten ebenfalls einen Anstieg der MHK, was auf ein gemeinsames Target hindeutet. Die Zytotoxizität wurde an sieben eukaryotischen Zelllinien untersucht, wobei die meisten Phenylalaninamide wie ML259 keine zytotoxische Wirkung zeigten. Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit war die pharmakokinetische Untersuchung von MMV688845 und ML259 *in vitro*. Hierbei zeigte ML259 im Vergleich zu MMV688845 eine verbesserte Stabilität in humanen und murinen Plasma, allerdings wurden beide Verbindungen in einem mikrosomalen Stabilitätsassay schnell abgebaut, was die, im Abschnitt 3.6.4 beschriebene, mangelnde Bioverfügbarkeit der Substanzklasse erklären kann.

Die Ergebnisse wurden in dem folgenden Artikel publiziert: *Synthesis and Characterization of Phenylalanine Amides Active against Mycobacterium abscessus and Other Mycobacteria*. Markus Lang, Uday S. Ganapathy, Lea Mann, Rana Abdelaziz, Rüdiger W. Seidel, Richard Goddard, Ilaria Sequenzia, Sophie Hoenke, Philipp Schulze, Wassihun W. Aragaw, René Csuk, Thomas Dick, Adrian Richter; *Journal of Medicinal Chemistry* (2023); 66(7):5079-5098.

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.3c00009>

<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00009>

Beiträge der Autorinnen und Autoren: **Markus Lang** (Durchführung chemischer Synthesen und Charakterisierung der Reaktionsprodukte, Probenvorbereitung für strukturelle Versuche, verfassen und editieren des Manuskriptes, Konzeption der Studie, Visualisierung), **Uday S. Ganapathy** (Durchführung der mikrobiologischen Charakterisierung), **Lea Mann** (Durchführung der mikrobiologischen Charakterisierung und Datenauswertung), **Rana Abdelaziz** (Durchführung der *in silico* Docking-Studien), **Rüdiger W. Seidel** (Auswertung der Kristallstrukturdaten, editieren des Manuskriptes), **Richard Goddard** (Ermittlung der Kristallstrukturdaten, editieren des Manuskriptes), **Ilaria Sequenzia** (Durchführung der Synthesen), **Sophie Hoenke** (Durchführung der Zytotoxizitätsuntersuchung), **Philipp Schulze** (Durchführung der HPLC Analytik), **Wassihun W. Aragaw** (Durchführung der mikrobiologischen Charakterisierung), **René Csuk** (Betreuung, Auswertung der Zytotoxizitätsdaten), **Thomas Dick** (Einwerbung von Drittmitteln, Betreuung, editieren des

Manuskriptes), **Adrian Richter** (Durchführung der mikrobiologischen Charakterisierung und Datenauswertung, Einwerbung von Drittmitteln, Betreuung, schreiben und editieren des Manuskriptes, Konzeption der Studie)

3.6.6 Derivatisierung von Phenylalaninamiden und Untersuchung ihrer metabolischen Stabilität *in vitro*

Die in den Abschnitten 3.6.4 und 3.6.5 beschriebene metabolische Instabilität und unzureichende Bioverfügbarkeit der Phenylalaninamide bildete die Grundlage für eine weitere Derivatisierung dieser Substanzklasse. Wie in Abbildung 12 dargestellt, erfolgte die Derivatisierung an oder in unmittelbarer Nähe der beiden Carbonsäureamidgruppen, um deren hydrolytische Stabilität zu erhöhen, so wurden Methyl- und Fluor-Substituenten (R^1 , R^2 und R^3) zur Abschirmung eingeführt. Eine weitere Strategie ist die Methylierung der Amidfunktionen in den Positionen R^4 und R^5 . Die so modifizierten Phenylalaninamide wurden auf ihre antimykobakterielle Wirkung gegen *M. abscessus* und *M. tuberculosis* untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Derivatisierung in Position R^2 und R^3 hinsichtlich der antimykobakteriellen Aktivität gut toleriert wird, während Substituenten in Position R^1 die Wirksamkeit stark mindern. Das wirksamste Derivat mit zwei Fluor-Substituenten in Position R^2/R^3 und einem Wasserstoffatom anstelle von R^1 besitzt eine MHK_{90} von $0.15 \mu M$ gegen *M. tuberculosis* und $0.78 \mu M$ gegen *M. abscessus*. Die Methylierung der Amidgruppen hat einen Verlust der antimykobakteriellen Wirksamkeit zur Folge.

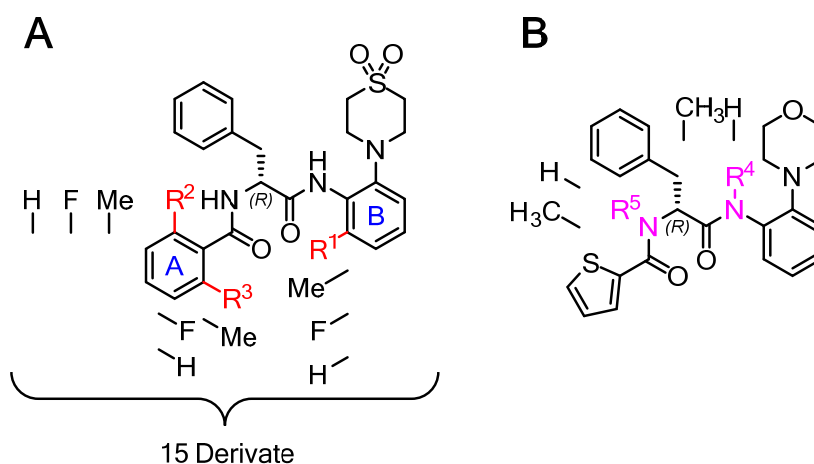


Abbildung 12 Derivatisierung der Phenylalaninamide zur Verbesserung der metabolischen Stabilität.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Studie war die Untersuchung der Plasmastabilität und der mikrosomalen Stabilität der Phenylalaninamid Analoga *in vitro*. Dabei erwiesen sich alle Derivate als stabil gegenüber humanem und murinem Plasma. Im mikrosomalen Assay hingegen zeigten alle Substanzen über einen Zeitraum von 40 Minuten einen Konzentrationsabfall, allerdings mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Die größte Stabilität besitzen Derivate mit einer Methylgruppe in Position R¹ an Ring B, welche gegenüber den Mykobakterien jedoch inaktiv waren. Das Ergebnis der mikrosomalen Stabilitätsuntersuchung weist allerdings darauf hin, dass das Anilid (Ringsystem B) einen Angriffspunkt für die metabolische Inaktivierung darstellt.

Die Ergebnisse wurden in dem folgenden Artikel publiziert: *Synthesis and in vitro metabolic stability of sterically shielded antimycobacterial phenylalanine amides*. Markus Lang, Uday S. Ganapathy, Lea Mann, Rüdiger W. Seidel, Richard Goddard, Frank Erdmann, Thomas Dick, Adrian Richter; ChemMedChem (2024); e202300593.

<https://chemistry->

[europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cmdc.202300593](https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cmdc.202300593)

<https://doi.org/10.1002/cmdc.202300593>

Beiträge der Autorinnen und Autoren: **Markus Lang** (Durchführung chemischer Synthesen und Charakterisierung der Reaktionsprodukte, Probenvorbereitung für strukturchemische Versuche, verfassen und editieren des Manuskriptes, Konzeption der Studie, Visualisierung), **Uday S. Ganapathy** (Durchführung der mikrobiologischen Charakterisierung), **Lea Mann** (Durchführung der mikrobiologischen Charakterisierung und Datenauswertung), **Rüdiger W. Seidel** (Auswertung der Kristallstrukturdaten, editieren des Manuskriptes), **Richard Goddard** (Ermittlung der Kristallstrukturdaten, editieren des Manuskriptes), **Frank Erdmann** (Durchführung und Auswertung der Zytotoxizitätsuntersuchung), **Thomas Dick** (Einwerbung von Drittmitteln, Betreuung, editieren des Manuskriptes), **Adrian Richter** (Einwerbung von Drittmitteln, Betreuung, editieren des Manuskriptes, Konzeption der Studie)

3.6.7 Fluoreszenzmikroskopische Anfärbung von *M. abscessus* mit einem Trehalose-Farbstoffkonjugat sowie dessen strukturchemische Charakterisierung

Für die mikroskopische Detektion und Quantifizierung von (Myko-)Bakterien ist häufig eine Fluoreszenzmarkierung erforderlich. Diese kann durch genetische Modifikation, wie im den Abschnitten 3.6.1 und 3.6.2 beschrieben, erreicht werden. In dieser Studie wurde ein modifiziertes Trehalose-Derivat synthetisiert, das als Fluoreszenzfarbstoff zur Färbung von *M. abscessus* verwendet werden kann.

Fluoreszierende Trehalose-Farbstoffkonjugate werden in die Zellwand von Mykobakterien inkorporiert¹²³, wodurch *M. tuberculosis* fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden kann¹²⁴. Die Trehalose-Farbstoffkonjugate zeigen eine ausgeprägte Solvatochromie: Im wässrigen Assaymedium ist die Fluoreszenz abgeschwächt, während im lipophilen Umfeld der mykobakteriellen Zellwand eine deutliche Intensivierung der Fluoreszenz zu beobachten ist. Ein besonders effektiver Farbstoff für diese Anwendung ist die mit 3-Hydroxychromon-Derivaten konjugierte Trehalose¹²⁵. Dieser Farbstoff wurde synthetisiert und auf seine Eignung für die Fluoreszenzmarkierung von *M. abscessus* untersucht. Der Synthese folgte eine detaillierte NMR-spektroskopische und röntgenkristallographische Charakterisierung des Trehalose-Konjugats.

Die Anfärbung von *M. abscessus* erfolgte durch dreistündige Inkubation der Bakterien mit dem Farbstoff und anschließender Fixierung der Bakterien mit PFA (Paraformaldehyd). Die so angefärbten Bakterien konnten im Fluoreszenzmikroskop ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{--}531 \text{ nm}$) sichtbar gemacht werden.

Die Ergebnisse wurden in den folgenden Artikeln publiziert: *Structural characterization of a 3-hydroxychromone dye trehalose conjugate for fluorescent labelling of mycobacteria*. Adrian Richter, Richard Goddard, Lea Mann, Fabienne Siersleben, Rüdiger W. Seidel; *Journal of Molecular Structure* (2023); 1298(2):137010.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022286023021002>

<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.137010>

Structural Elucidation of 2-(6-(Diethylamino)benzofuran-2-yl)-3-hydroxy-4H-chromen-4-one and Labelling of Mycobacterium aurum Cells. Adrian Richter, Richard Goddard, Fabienne Siersleben, Lea Mann, Rüdiger W. Seidel; Molbank (2023), M1647.

<https://www.mdpi.com/1422-8599/2023/2/M1647>

<https://doi.org/10.3390/M1647>

Beiträge der Autorinnen und Autoren: **Adrian Richter** (Durchführung chemischer Synthesen und Charakterisierung der Reaktionsprodukte, Probenvorbereitung für strukturchemische Versuche, Einwerbung von Drittmitteln, mikrobiologischen Testung, editieren des Manuskriptes, Konzeption der Studie, Visualisierung, Betreuung), **Richard Goddard** (Konzeption der Studie, Ermittlung der Kristallstrukturdaten und deren Auswertung, Visualisierung, editieren des Manuskriptes) **Fabienne Siersleben** (Durchführung mikrobiologischer Versuche, Einwerbung von Drittmitteln), **Lea Mann** (Durchführung mikrobiologischer Versuche, Betreuung, editieren des Manuskriptes, Visualisierung), **Rüdiger W. Seidel** (Konzeption der Studie, Auswertung von Kristallstrukturdaten, schreiben und editieren des Manuskriptes, Visualisierung)

3.6.8 Charakterisierung von bakteriziden Wirkstoffen gegen

***M. abscessus* mit automatisierter Fluoreszenzmikroskopie nach Anfärbung mit einem Trehalose-Farbstoffkonjugat**

Die in Abschnitt 3.6.7 beschriebene Färbung von *M. abscessus* mit einem Trehalose-Farbstoffkonjugat wurde zur Charakterisierung der Testverbindungen hinsichtlich ihrer bakteriziden Wirkung verwendet. Im Vergleich zur herkömmlichen Methode (der Auszählung der koloniebildenden Einheiten auf Agar-Medium zur Untersuchung der Bakterizidie¹²⁶) ist die neue Methode effizienter und erfolgt in flüssigem Medium in 96-Well-Platten.

Für die Durchführung des Assays wird *M. abscessus* mit dem jeweiligen Wirkstoff in Flüssigmedium inkubiert, anschließend wird ein Teil dieser Kultur in wirkstoffreiem Medium stark verdünnt und erneut inkubiert. In diesem Versuchsschritt können sich teilungsfähige Bakterien vermehren, die Teilungsfähigkeit kann jedoch durch die vorangegangene Inkubation mit einem bakteriziden Wirkstoff stark eingeschränkt sein. Nach der zweiten Inkubationsphase

werden die Bakterienzellen mit 3-Hydroxychromon-konjugierter Trehalose¹²⁵ angefärbt (s. Abschnitt 3.6.7) und mittels Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert.

Diese Methode wurde verwendet, um verschiedene Antibiotika wie Moxifloxacin oder Rifabutin hinsichtlich ihrer bakteriziden Eigenschaften gegen *M. abscessus* zu charakterisieren. Die Ergebnisse wurden mit Literaturdaten, aber auch mit experimentellen Daten zu den jeweiligen Wirkstoffen verglichen und es zeigte sich, dass die neue Methode Ergebnisse liefert, die mit der Koloniezählung auf Agar vergleichbar sind. So konnte für den bakteriziden Wirkstoff Rifabutin bei einer Konzentration von 6.3 µM eine 99 %ige Keimzahlreduktion beobachtet werden, während Bedaquilin, das unter den Testbedingungen bakteriostatisch wirkt, keine Keimzahlreduktion zeigte.

Die fluoreszenzbasierte Methode erlaubt eine effiziente Untersuchung der bakteriziden Eigenschaften gegenüber dem pathogenen Bakterium *M. abscessus*. Die Quantifizierung durch automatisierte Fluoreszenzmikroskopie in 96-Well-Platten macht den Test effizient. Durch den Verdünnungsschritt in wirkstofffreiem Medium kann zudem eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Antibiotikarückstände ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse wurden in dem folgenden Artikel publiziert: *Determination of bactericidal activity against 3HC-2-Tre-labelled Mycobacterium abscessus (Mycobacteroides abscessus) by automated fluorescence microscopy*. Lea Mann, Fabienne Siersleben, Markus Lang, Adrian Richter, *Journal of Microbiological Methods* (2024), 224, 107002.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701224001143?via%3Dihub>

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2024.107002>.

Beiträge der Autorinnen und Autoren: **Lea Mann** (Durchführung mikrobiologischer Versuche, Datenauswertung, schreiben und editieren des Manuskriptes, Visualisierung) **Fabienne Siersleben** (Durchführung mikrobiologischer Versuche, Datenauswertung), **Markus Lang** (Durchführung chemischer Synthesen, editieren des Manuskriptes), **Adrian Richter** (Durchführung chemischer Synthesen, Einwerbung von Drittmitteln, editieren des Manuskriptes, Konzeption der Studie, Betreuung, Datenauswertung)

3.6.9 Charakterisierung von Phenylalaninamiden gegen verschiedene pathogene nicht-tuberkulöse Mykobakterien und vergleichende Analyse der RNA-Polymerase

In dieser Studie wurde eine Auswahl von 10 Phenylalaninamiden und des Screening Hits MMV688845 gegen eine Auswahl von 25 nicht-tuberkulösen Mykobakterien hinsichtlich ihrer MHK charakterisiert. Neben *M. abscessus* mit den drei Subspezies *abscessus*, *bolletii* und *massiliense* wurden auch Vertreter des *Mycobacterium avium* Komplexes wie *Mycobacterium avium* und *Mycobacterium intracellulare* in die Untersuchung einbezogen. Darüber hinaus erfolgte die Bestimmung der MHKs auch gegen weitere schnell- und langsam-wachsende pathogene Mykobakterien wie *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium kansasii* und *Mycobacterium chelonae*. Ziel der Untersuchung war es zu prüfen, ob bei Mykobakterien bereits intrinsische Resistenzen gegen die Substanzklasse der Phenylalaninamide vorliegen. Die Ergebnisse der antimykobakteriellen Assays zeigten, dass bei allen untersuchten Spezies bereits Phenylalaninamid-Konzentrationen von $< 5 \mu\text{M}$ ausreichen, um das Bakterienwachstum zu hemmen. Somit zeigten alle Mykobakterienarten eine Sensitivität gegenüber der Wirkstoffklasse, wobei zumeist deutlich geringere Konzentrationen ($< 1 \mu\text{M}$) zur Hemmung des bakteriellen Wachstums ausreichten. Die hier beschriebene MHK-Studie zeigte aber auch Unterschiede in der Sensitivität zwischen verschiedenen nicht-tuberkulösen Mykobakterien: Auffallend war hierbei die ausgeprägte Sensitivität von *Mycobacterium ulcerans* und *Mycobacterium marinum*, während *Mycobacterium simiae* und *Mycobacterium xenopi* die geringste Empfindlichkeit gegenüber Phenylalaninamiden zeigten.

Die vergleichende Analyse der RNA-Polymerase-Sequenzen verschiedener mykobakterieller Spezies mit Fokus auf die Phenylalaninamid-Bindungstasche zeigte einen hohen Konservierungsgrad sowohl in der Primärstruktur als auch in der räumlichen Struktur innerhalb der β - und β' -Untereinheiten. Dies bestätigt den Wert von Phenylalaninamiden als RNA-Polymerase-Inhibitoren mit breitem Wirkungsspektrum gegen Mykobakterien.

Die Ergebnisse wurden in dem folgenden Artikel publiziert: *Broad-Spectrum In Vitro Activity of Na-aroyl-N-aryl-Phenylalanine Amides Against Non-Tuberculous Mycobacteria and Comparative Analysis of RNA Polymerases*. Markus Lang, Uday S. Ganapathy, Thomas Dick, Adrian Richter; *Antibiotics* (2024); 13, 404.

<https://www.mdpi.com/2079-6382/13/5/404>

<https://doi.org/10.3390/antibiotics13050404>

Beiträge der Autoren: **Markus Lang** (Konzeption der Studie, Durchführung mikrobiologischer Versuche und Datenauswertung, software-gestützte Datenauswertung, schreiben und editieren des Manuskriptes, Visualisierung), **Uday S. Ganapathy** (Durchführung mikrobiologischer Versuche und Datenauswertung, editieren des Manuskriptes), **Thomas Dick** (Betreuung, Einwerbung von Drittmitteln), **Adrian Richter** (Konzeption der Studie, editieren des Manuskriptes, Visualisierung, Betreuung, Einwerbung von Drittmitteln)

3.7 Zusammenfassung II

Die in Abschnitt 3.6 aufgeführten Studien belegen den Wert der Phenylalaninamide als antimykobakterielle Stoffklasse, wobei eine Optimierung der pharmakokinetischen Eigenschaften notwendig ist. Die Vertreter dieser Stoffklasse adressieren eine in der antimykobakteriellen Therapie klinisch validierte Zielstruktur: die RNA-Polymerase. Da sich der Bindungsstelle von denen der Rifamycine unterscheidet, treten keine Kreuzresistenzen auf und bisher untersuchte *in vitro* Kombinationen von Rifamycinen und Phenylalaninamiden zeigen eine additive Wirkung gegen Mykobakterien. Bemerkenswert ist die bakterizide Aktivität der Phenylalaninamide und ihre Wirksamkeit im Makrophagen-Infektionsmodell. Zudem zeigen die Verbindungen Wirksamkeit gegen ein breites Spektrum von z.T. Rifamycin resistenten pathogenen Mykobakterien. Diesen vielversprechenden Eigenschaften stehen die geringe Bioverfügbarkeit und der rasche mikrosomale Abbau der Substanzen entgegen. Ein initialer Versuch diese Parameter zu optimieren, ist in Abschnitt 3.6.6 beschrieben, wobei noch kein befriedigendes Ergebnis bezüglich der Stabilität und Aktivität der Phenylalaninamide erzielt werden konnte.

Trotz der ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften besitzen die Phenylalaninamide das Potential einen effektiven antimykobakteriellen Wirkmechanismus für Rifamycin resistente *M. tuberculosis* bzw. NTM zu erschließen. Hierbei wurde ein Schwerpunkt auf *M. abscessus* gelegt, da gegen dieses multiresistente schnell wachsende Mykobakterium nur unzureichende Therapieoptionen zur Verfügung stehen. Der mikrobiologische Teil der Arbeiten berücksichtigt daher gezielt die Eigenschaften dieses Mykobakteriums und die Entwicklung von Testmethoden für Arzneistoffkandidaten gegen *M. abscessus* wurde vorangetrieben (s. Abschnitte 3.6.1, 3.6.2 und 3.6.7). Diese fluoreszenz-basierten Methoden ermöglichen die Charakterisierung von Wirkstoffen hinsichtlich Wachstumshemmung und intrazellulärer Aktivität. Eine Trehalose-Farbstoffkonjugat zur Fluoreszenzfarbstoff soll zudem für die Untersuchung von bakteriziden Eigenschaften herangezogen werden.

Der aktuelle Wissensstand zu den Phenylalaninamiden und ihrer antimykobakteriellen Wirkung wurde in folgenden Übersichtsartikel zusammengefasst:

Na-aroyl-N-aryl-phenylalanine amides: a promising class of antimycobacterial agents targeting the RNA polymerase. Rüdiger W. Seidel, Richard Goddard, Markus Lang, Adrian Richter; Chemistry and Biodiversity, e20240026.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.202400267>

<https://doi.org/10.1002/cbdv.202400267>

Beiträge der Autoren: **Rüdiger W. Seidel** (Konzeption der Studie, schreiben und editieren des Manuskriptes, Visualisierung), **Richard Goddard** (Konzeption der Studie, editieren des Manuskriptes), **Markus Lang** (editieren des Manuskriptes, Visualisierung), **Adrian Richter** (Konzeption der Studie, editieren des Manuskriptes, Betreuung, Einwerbung von Drittmitteln)

4. Resümee und Ausblick

Die in den Abschnitten 2.4 und 3.6 präsentierten Forschungsergebnisse beschreiben die medizinisch-chemische Entwicklung der BTZs und Phenylalaninamide und deren Charakterisierung hinsichtlich ihrer antimykobakteriellen Eigenschaften. Durch die Derivatisierung der Verbindungen wurden deren Reaktivität und ihre Struktur-Wirkungsbeziehungen erforscht und teilweise die antimykobakterielle Aktivität erhöht. Vielversprechend ist die bakterizide Wirkung von BTZs und Phenylalaninamiden, deren Wirksamkeit gegen intrazelluläre Mykobakterien und ihre Wirkweise über bisher klinisch nicht genutzte Mechanismen, was bestehende Resistenzen der Pathogene unwahrscheinlich macht.

Hinsichtlich der BTZs ist ihre hohe *in vitro* Wirksamkeit gegen Mykobakterien (MHK₉₀-Werte ≤ 1 nM) bemerkenswert und unterstreicht die Vulnerabilität der Pathogene durch Inhibition von DprE1. Allerdings ist die Mechanismus-basierte Wirkweise der BTZs an einen elektronenarmen Nitro-Aromaten gebunden, der durch nukleophile Reagenzien *in vitro* aber auch *in vivo* angegriffen werden kann. Dies bedingt häufig überraschende pharmakokinetische Eigenschaften dieser Stoffklasse, die für einen Arzneistoff problematisch ist.

Die weitere Erforschung der Phenylalaninamide ist vielversprechend, da diese das klinisch validierte Target RNA-Polymerase durch einen neuartigen Mechanismus hemmen und so bekannte Resistenzen umgehen. Eine strukturebiologische Untersuchung der Interaktionen dieser Stoffklasse mit der RNA-Polymerase von *M. tuberculosis* und *M. abscessus* ist wünschenswert. Die biochemische Charakterisierung verschiedener Derivate in einem Enzyminhibitionsassay ist zudem notwendig, um ein besseres Verständnis der Struktur-Wirkungsbeziehungen zu ermöglichen. Ein weiterer Schwerpunkt zukünftiger Forschung wird die Identifizierung von Metaboliten nach mikrosomalem Abbau sein. Dadurch kann der Mechanismus, der für die metabolische Labilität der Substanzklasse verantwortlich ist, verstanden werden, was eine gezielte Modifikation der Phenylalaninamide zur Erhöhung der metabolischen Stabilität ermöglicht.

Literaturverzeichnis

- [1] *Global Tuberculosis Report 2023*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2023.
- [2] A. Sharma, M. De Rosa, N. Singla, G. Singh, R. P. Barnwal and A. Pandey, *Tuberculosis: An Overview of the Immunogenic Response, Disease Progression, and Medicinal Chemistry Efforts in the Last Decade toward the Development of Potential Drugs for Extensively Drug-Resistant Tuberculosis Strains*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, **64**, 4359-4395, 10.1021/acs.jmedchem.0c01833.
- [3] V. N. Dahl, M. Molhave, A. Floe, J. van Ingen, T. Schön, T. Lillebaek, A. B. Andersen and C. Wejse, *Global trends of pulmonary infections with nontuberculous mycobacteria: a systematic review*, *International Journal of Infectious Diseases*, 2022, **125**, 120-131
- [4] I. Ahmed, S. Tiberi, J. Farooqi, K. Jabeen, D. Yeboah-Manu, G. B. Migliori and R. Hasan, *Non-tuberculous mycobacterial infections—A neglected and emerging problem*, *International Journal of Infectious Diseases*, 2020, **92**, S46-S50, 10.1016/j.ijid.2020.02.022.
- [5] T. Baird and S. Bell, *Cystic Fibrosis-Related Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease*, *Clinics in Chest Medicine*, 2023, **44**, 847-860, <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2023.06.008>.
- [6] A. Gramegna, S. Misuraca, A. Lombardi, C. Premuda, I. Barone, M. Ori, F. Amati, M. Retucci, E. Nazzari, G. Alicandro, M. Ferrarese, L. Codecasa, A. Bandera, S. Aliberti, V. Dacco and F. Blasi, *Treatable traits and challenges in the clinical management of non-tuberculous mycobacteria lung disease in people with cystic fibrosis*, *Respiratory Research*, 2023, **24**, 316, 10.1186/s12931-023-02612-1.
- [7] P. J. McShane, *Investigation and Management of Bronchiectasis in Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease*, *Clinics in Chest Medicine*, 2023, **44**, 731-742, <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2023.07.005>.
- [8] M. Szturmowicz, K. Oniszh, D. Wyrostkiewicz, P. Radwan-Rohrenschef, D. Filipczak and A. Zabost, *Non-Tuberculous Mycobacteria in Respiratory Specimens of Patients with Obstructive Lung Diseases-Colonization or Disease?*, *Antibiotics*, 2020, **9**, 10.3390/antibiotics9070424.
- [9] M. R. Loebinger, J. K. Quint, R. van der Laan, M. Obradovic, R. Chawla, A. Kishore and J. van Ingen, *Risk Factors for Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis*, *Chest*, 2023, **164**, 1115-1124, 10.1016/j.chest.2023.06.014.
- [10] M.-L. Wu, D. B. Aziz, V. Dartois and T. Dick, *NTM drug discovery: status, gaps and the way forward*, *Drug Discovery Today*, 2018, **23**, 1502-1519, 10.1016/j.drudis.2018.04.001.
- [11] M. D. Johansen, J. L. Herrmann and L. Kremer, *Non-tuberculous mycobacteria and the rise of Mycobacterium abscessus*, *Nature Reviews Microbiology*, 2020, **18**, 392-407, 10.1038/s41579-020-0331-1.
- [12] K. To, R. Cao, A. Yegiazaryan, J. Owens and V. Venketaraman, *General Overview of Nontuberculous Mycobacteria Opportunistic Pathogens: Mycobacterium avium and Mycobacterium abscessus*, *Journal of Clinical Medicine*, 2020, **9**, 10.3390/jcm9082541.
- [13] C. B. Inderlied, C. A. Kemper and L. E. Bermudez, *The Mycobacterium avium complex*, *Clinical Microbiology Reviews*, 1993, **6**, 266-310, 10.1128/CMR.6.3.266.
- [14] J. A. Schildkraut, J. Gallagher, K. Morimoto, C. Lange, C. Haworth, R. A. Floto, W. Hoefsloot, D. E. Griffith, D. Wagner, J. V. Ingen and N. E. T. Ntm, *Epidemiology of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease in Europe and Japan by Delphi estimation*, *Respiratory Medicine*, 2020, **173**, 106164, 10.1016/j.rmed.2020.106164.
- [15] C. L. Dulberger, E. J. Rubin and C. C. Boutte, *The mycobacterial cell envelope - a moving target*, *Nature Reviews Microbiology*, 2020, **18**, 47-59, 10.1038/s41579-019-0273-7.
- [16] A. Machelart, O. R. Song, E. Hoffmann and P. Brodin, *Host-directed therapies offer novel opportunities for the fight against tuberculosis*, *Drug Discovery Today*, 2017, **22**, 1250-1257, 10.1016/j.drudis.2017.05.005.
- [17] A. L. Roux, A. Viljoen, A. Bah, R. Simeone, A. Bernut, L. Laencina, T. Deramaudt, M. Rottman, J. L. Gaillard, L. Majlessi, R. Brosch, F. Girard-Misguich, I. Vergne, C. de Chastellier, L. Kremer and J. L. Herrmann, *The distinct fate of smooth and rough Mycobacterium abscessus variants inside macrophages*, *Open Biology*, 2016, **6**, 10.1098/rsob.160185.

- [18] S. Upadhyay, E. Mittal and J. A. Philips, *Tuberculosis and the art of macrophage manipulation*, *Pathogens and Disease*, 2018, **76**, 10.1093/femspd/fty037.
- [19] C. J. Cambier, K. K. Takaki, R. P. Larson, R. E. Hernandez, D. M. Tobin, K. B. Urdahl, C. L. Cosma and L. Ramakrishnan, *Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids*, *Nature*, 2014, **505**, 218-222, 10.1038/nature12799.
- [20] V. Makarov, G. Manina, K. Mikusova, U. Mollmann, O. Ryabova, B. Saint-Joanis, N. Dhar, M. R. Pasca, S. Buroni, A. P. Lucarelli, A. Milano, E. De Rossi, M. Belanova, A. Bobovska, P. Dianiskova, J. Kordulakova, C. Sala, E. Fullam, P. Schneider, J. D. McKinney, P. Brodin, T. Christophe, S. Waddell, P. Butcher, J. Albrethsen, I. Rosenkrands, R. Brosch, V. Nandi, S. Bharath, S. Gaonkar, R. K. Shandil, V. Balasubramanian, T. Balganes, S. Tyagi, J. Grosset, G. Riccardi and S. T. Cole, *Benzothiazinones Kill Mycobacterium tuberculosis by Blocking Arabinan Synthesis*, *Science*, 2009, **324**, 801-804, 10.1126/science.1171583.
- [21] J. Neres, F. Pojer, E. Molteni, L. R. Chiarelli, N. Dhar, S. Boy-Rottger, S. Buroni, E. Fullam, G. Degiacomi, A. P. Lucarelli, R. J. Read, G. Zanoni, D. E. Edmondson, E. De Rossi, M. R. Pasca, J. D. McKinney, P. J. Dyson, G. Riccardi, A. Mattevi, S. T. Cole and C. Binda, *Structural Basis for Benzothiazinone-Mediated Killing of Mycobacterium tuberculosis*, *Science Translational Medicine*, 2012, **4**, 150ra121-150ra151, 10.1126/scitranslmed.3004395.
- [22] C. Rens, J. D. Chao, D. L. Sexton, E. I. Tocheva and Y. Av-Gay, *Roles for phthiocerol dimycocerosate lipids in Mycobacterium tuberculosis pathogenesis*, *Microbiology (Reading)*, 2021, **167**, 10.1099/mic.0.001042.
- [23] C. J. Cambier, S. M. Banik, J. A. Buonomo and C. R. Bertozzi, *Spreading of a mycobacterial cell-surface lipid into host epithelial membranes promotes infectivity*, *eLife*, 2020, **9**, 10.7554/eLife.60648.
- [24] M. Correia-Neves, C. Sundling, A. Cooper and G. Kallénius, *Lipoarabinomannan in Active and Passive Protection Against Tuberculosis*, *Frontiers in Immunology*, 2019, **10**, 1968, 10.3389/fimmu.2019.01968.
- [25] Y. Guerardel, E. Maes, V. Briken, F. Chirat, Y. Leroy, C. Loch, G. Strecker and L. Kremer, *Lipomannan and lipoarabinomannan from a clinical isolate of Mycobacterium kansasii: novel structural features and apoptosis-inducing properties*, *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**, 36637-36651, 10.1074/jbc.M305427200.
- [26] J. Chan, X. D. Fan, S. W. Hunter, P. J. Brennan and B. R. Bloom, *Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of Mycobacterium tuberculosis within macrophages*, *Infection and Immunity*, 1991, **59**, 1755-1761, 10.1128/iai.59.5.1755-1761.1991.
- [27] S. A. Stanley, S. Raghavan, W. W. Hwang and J. S. Cox, *Acute infection and macrophage subversion by Mycobacterium tuberculosis require a specialized secretion system*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, **100**, 13001-13006, 10.1073/pnas.2235593100.
- [28] J. Pieters, *Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: Maintaining a balance*, *Cell Host & Microbe*, 2008, **3**, 399-407, 10.1016/j.chom.2008.05.006.
- [29] J. P. Sarathy and V. Dartois, *Caseum: a Niche for Mycobacterium tuberculosis Drug-Tolerant Persists*, *Clinical Microbiology Reviews*, 2020, **33**, 10.1128/CMR.00159-19.
- [30] J. P. Sarathy, L. E. Via, D. Weiner, L. Blanc, H. Boshoff, E. A. Eugenin, C. E. Barry and V. A. Dartois, *Extreme Drug Tolerance of Mycobacterium tuberculosis in Caseum*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2018, **62**, 10.1128/AAC.02266-17.
- [31] J. P. Sarathy, M. Xie, R. M. Jones, A. Chang, P. Osiecki, D. Weiner, W. S. Tsao, M. Dougher, L. Blanc, N. Fotouhi, L. E. Via, C. E. Barry, 3rd, I. De Vlaminc, D. R. Sherman and V. A. Dartois, *A Novel Tool to Identify Bactericidal Compounds against Vulnerable Targets in Drug-Tolerant M. tuberculosis found in Caseum*, *mBio*, 2023, **14**, e0059823, 10.1128/mbio.00598-23.
- [32] M. Xie, U. S. Ganapathy, T. Lan, P. Osiecki, J. P. Sarathy, V. Dartois, C. C. Aldrich and T. Dick, *ADP-ribosylation-resistant rifabutin analogs show improved bactericidal activity against drug-tolerant M. abscessus in caseum surrogate*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2023, **67**, 10.1128/aac.00381-23.
- [33] U. S. Ganapathy, V. Dartois and T. Dick, *Repositioning rifamycins for Mycobacterium abscessus lung disease*, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2019, **14**, 867-878, 10.1080/17460441.2019.1629414.
- [34] L. Ballell, R. H. Bates, R. J. Young, D. Alvarez-Gomez, E. Alvarez-Ruiz, V. Barroso, D. Blanco, B. Crespo, J. Escribano, R. González, S. Lozano, S. Huss, A. Santos-Villarejo, J. J.

- Martín-Plaza, A. Mendoza, M. J. Rebollo-Lopez, M. Remuiñan-Blanco, J. L. Lavandera, E. Pérez-Herran, F. J. Gamo-Benito, J. F. García-Bustos, D. Barros, J. P. Castro and N. Cammack, *Fueling Open-Source Drug Discovery: 177 Small-Molecule Leads against Tuberculosis*, *ChemMedChem*, 2013, **8**, 313-321, 10.1002/cmdc.201200428.
- [35] W. Lin, S. Mandal, D. Degen, Y. Liu, Y. W. Ebright, S. Li, Y. Feng, Y. Zhang, S. Mandal, Y. Jiang, S. Liu, M. Gigliotti, M. Talaue, N. Connell, K. Das, E. Arnold and R. H. Ebright, *Structural Basis of Mycobacterium tuberculosis Transcription and Transcription Inhibition*, *Molecular Cell*, 2017, **66**, 169-179.e168, 10.1016/j.molcel.2017.03.001.
- [36] K. Mikusova, V. Makarov and J. Neres, *DprE1--from the discovery to the promising tuberculosis drug target*, *Current Pharmaceutical Design*, 2014, **20**, 4379-4403, 10.2174/138161282027140630122724.
- [37] C. Trefzer, M. Rengifo-Gonzalez, M. J. Hinner, P. Schneider, V. Makarov, S. T. Cole and K. Johnsson, *Benzothiazinones: Prodrugs That Covalently Modify the Decaprenylphosphoryl- β -d-ribose 2'-epimerase DprE1 of Mycobacterium tuberculosis*, *Journal of the American Chemical Society*, 2010, **132**, 13663-13665, 10.1021/ja106357w.
- [38] C. Trefzer, H. Škovierová, S. Buroni, A. Bobovská, S. Nenci, E. Molteni, F. Pojer, M. R. Pasca, V. Makarov, S. T. Cole, G. Riccardi, K. Mikušová and K. Johnsson, *Benzothiazinones Are Suicide Inhibitors of Mycobacterial Decaprenylphosphoryl- β -d-ribofuranose 2'-Oxidase DprE1*, *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **134**, 912-915, 10.1021/ja211042r.
- [39] M. Brecik, I. Centárová, R. Mukherjee, G. S. Kolly, S. Huszár, A. Bobovská, E. Kilacsková, V. Mokošová, Z. Svetlíková, M. Šarkan, J. Neres, J. Korduláková, S. T. Cole and K. Mikušová, *DprE1 Is a Vulnerable Tuberculosis Drug Target Due to Its Cell Wall Localization*, *ACS Chemical Biology*, 2015, **10**, 1631-1636, 10.1021/acschembio.5b00237.
- [40] K. A. Abrahams, S. M. Batt, S. S. Gurucha, N. Veerapen, G. Bashiri and G. S. Besra, *DprE2 is a molecular target of the anti-tubercular nitroimidazole compounds pretomanid and delamanid*, *Nature Communications*, 2023, **14**, 3828, 10.1038/s41467-023-39300-z.
- [41] V. Makarov, S. T. Cole and U. Moellmann, *Germany Pat.*, WO2007134625A1.
- [42] A. Richter, I. Rudolph, U. Möllmann, K. Voigt, C.-W. Chung, O. M. P. Singh, M. Rees, A. Mendoza-Losana, R. Bates, L. Ballell, S. Batt, N. Veerapen, K. Fütterer, G. Besra, P. Imming and A. Argyrou, *Novel insight into the reaction of nitro, nitroso and hydroxylamino benzothiazinones and of benzoxacinones with Mycobacterium tuberculosis DprE1*, *Scientific Reports*, 2018, **8**, 10.1038/s41598-018-31316-6.
- [43] V. Makarov, B. Lechartier, M. Zhang, J. Neres, A. M. Sar, S. A. Raadsen, R. C. Hartkoorn, O. B. Ryabova, A. Vocat, L. A. Decosterd, N. Widmer, T. Buclin, W. Bitter, K. Andries, F. Pojer, P. J. Dyson and S. T. Cole, *Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones*, *EMBO Molecular Medicine*, 2014, **6**, 372-383, 10.1002/emmm.201303575.
- [44] A. Richter, G. Narula, I. Rudolph, R. W. Seidel, C. Wagner, Y. Av-Gay and P. Imming, *Efficient Synthesis of Benzothiazinone Analogues with Activity against Intracellular Mycobacterium tuberculosis*, *ChemMedChem*, 2022, **17**, e202100733, 10.1002/cmdc.202100733.
- [45] R. W. Seidel, A. Richter, R. Goddard and P. Imming, *Synthesis, structures, reactivity and medicinal chemistry of antitubercular benzothiazinones*, *Chemical Communications*, 2023, **59**, 4697-4715, 10.1039/d3cc00356f.
- [46] R. Tiwari, G. C. Moraski, V. Krchňák, P. A. Miller, M. Colon-Martinez, E. Herrero, A. G. Oliver and M. J. Miller, *Thiolates Chemically Induce Redox Activation of BTZO43 and Related Potent Nitroaromatic Anti-Tuberculosis Agents*, *Journal of the American Chemical Society*, 2013, **135**, 3539-3549, 10.1021/ja311058q.
- [47] F. Kloss, V. Krchnak, A. Krchnakova, S. Schieferdecker, J. Dreisbach, V. Krone, U. Möllmann, M. Hoelscher and M. J. Miller, *In-vivo-Deaeromatisierung des potenten Antituberkulose-Wirkstoffs BTZO43 durch Bildung eines Meisenheimer-Komplexes*, *Angewandte Chemie*, 2017, **129**, 2220-2225, 10.1002/ange.201609737.
- [48] J. Imrich and P. Kristian, *Synthesis and investigation of enamine-imine tautomerism of 2,6-disubstituted 4H-1,3-thiazin-4-ones*, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 1982, **47**, 3268-3282.
- [49] C. Gao, T.-H. Ye, N.-Y. Wang, X.-X. Zeng, L.-D. Zhang, Y. Xiong, X.-Y. You, Y. Xia, Y. Xu, C.-T. Peng, W.-Q. Zuo, Y. Wei and L.-T. Yu, *Synthesis and structure-activity relationships evaluation of benzothiazinone derivatives as potential anti-tubercular agents*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, **23**, 4919-4922, 10.1016/j.bmcl.2013.06.069.

- [50] C.-T. Peng, C. Gao, N.-Y. Wang, X.-Y. You, L.-D. Zhang, Y.-X. Zhu, Y. Xv, W.-Q. Zuo, K. Ran, H.-X. Deng, Q. Lei, K.-J. Xiao and L.-T. Yu, *Synthesis and antitubercular evaluation of 4-carbonyl piperazine substituted 1,3-benzothiazin-4-one derivatives*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2015, **25**, 1373-1376, 10.1016/j.bmcl.2015.02.061.
- [51] U. Moellmann, V. Makarov and S. T. Cole, *Germany Pat.*, WO2009010163A1.
- [52] V. A. Makarov, *Russia Pat.*, WO2011132070A1.
- [53] R. Liu, L. Markley, P. A. Miller, S. Franzblau, G. Shetye, R. Ma, K. Savková, K. Mikušová, B. S. Lee, K. Pethe, G. C. Moraski and M. J. Miller, *Hydride-induced Meisenheimer complex formation reflects activity of nitro aromatic anti-tuberculosis compounds*, *RSC Medicinal Chemistry*, 2021, **12**, 62-72, 10.1039/d0md00390e.
- [54] S. H. Kirsch, F. P. J. Haeckl and R. Muller, *Beyond the approved: target sites and inhibitors of bacterial RNA polymerase from bacteria and fungi*, *Natural Products Reports*, 2022, **39**, 1226-1263, 10.1039/d1np00067e.
- [55] F. Stephanie, U. S. F. Tambunan and T. J. Siahaan, *M. tuberculosis Transcription Machinery: A Review on the Mycobacterial RNA Polymerase and Drug Discovery Efforts*, *Life (Basel)*, 2022, **12**, 10.3390/life12111774.
- [56] R. H. Ebricht, *RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II*, *Journal of Molecular Biology*, 2000, **304**, 687-698, 10.1006/jmbi.2000.4309.
- [57] R. Mariani and S. I. Maffioli, *Bacterial RNA polymerase inhibitors: an organized overview of their structure, derivatives, biological activity and current clinical development status*, *Current Medicinal Chemistry*, 2009, **16**, 430-454, 10.2174/092986709787315559.
- [58] J. Lee and S. Borukhov, *Bacterial RNA Polymerase-DNA Interaction-The Driving Force of Gene Expression and the Target for Drug Action*, *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2016, **3**, 73, 10.3389/fmolb.2016.00073.
- [59] I. Petushkov, D. Esyunina and A. Kulbachinskiy, *Possible roles of sigma-dependent RNA polymerase pausing in transcription regulation*, *RNA Biology*, 2017, **14**, 1678-1682, 10.1080/15476286.2017.1356568.
- [60] K. S. Murakami and S. A. Darst, *Bacterial RNA polymerases: the whole story*, *Current Opinion in Structural Biology*, 2003, **13**, 31-39, 10.1016/s0959-440x(02)00005-2.
- [61] M. S. Paget, *Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution*, *Biomolecules*, 2015, **5**, 1245-1265, 10.3390/biom5031245.
- [62] E. F. Ruff, M. T. Record, Jr. and I. Artsimovitch, *Initial events in bacterial transcription initiation*, *Biomolecules*, 2015, **5**, 1035-1062, 10.3390/biom5021035.
- [63] A. Mazumder, M. Lin, A. N. Kapanidis and R. H. Ebricht, *Closing and opening of the RNA polymerase trigger loop*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, **117**, 15642-15649, 10.1073/pnas.1920427117.
- [64] R. A. Adams, G. Leon, N. M. Miller, S. P. Reyes, C. H. Thantrong, A. M. Thokkadam, A. S. Lemma, D. M. Sivaloganathan, X. Wan and M. P. Brynildsen, *Rifamycin antibiotics and the mechanisms of their failure*, *Journal of Antibiotics*, 2021, **74**, 786-798, 10.1038/s41429-021-00462-x.
- [65] M. Grobbelaar, G. E. Louw, S. L. Sampson, P. D. van Helden, P. R. Donald and R. M. Warren, *Evolution of rifampicin treatment for tuberculosis*, *Infection, Genetics and Evolution*, 2019, **74**, 103937, 10.1016/j.meegid.2019.103937.
- [66] *WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment - drug-susceptible tuberculosis treatment.*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2022.
- [67] B. Prideaux, L. E. Via, M. D. Zimmerman, S. Eum, J. Sarathy, P. O'Brien, C. Chen, F. Kaya, D. M. Weiner, P. Y. Chen, T. Song, M. Lee, T. S. Shim, J. S. Cho, W. Kim, S. N. Cho, K. N. Olivier, C. E. Barry and V. Dartois, *The association between sterilizing activity and drug distribution into tuberculosis lesions*, *Nature Medicine*, 2015, **21**, 1223-+, 10.1038/nm.3937.
- [68] M. Yan, S. K. Brode and T. K. Marras, *Treatment of the Less Common Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease*, *Clinics in Chest Medicine*, 2023, **44**, 799-813, 10.1016/j.ccm.2023.06.011.
- [69] C. L. Daley, J. M. Iaccarino, C. Lange, E. Cambau, R. J. Wallace, Jr., C. Andrejak, E. C. Bottger, J. Brozek, D. E. Griffith, L. Guglielmetti, G. A. Huitt, S. L. Knight, P. Leitman, T. K. Marras, K. N. Olivier, M. Santin, J. E. Stout, E. Tortoli, J. van Ingen, D. Wagner and K. L. Winthrop, *Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline*, *European Respiratory Journal*, 2020, **56**, 10.1183/13993003.00535-2020.

- [70] J. A. Schildkraut, J. Raaijmakers, R. Aarnoutse, W. Hoefsloot, H. F. L. Wertheim and J. van Ingen, *The role of rifampicin within the treatment of Mycobacterium avium pulmonary disease*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2023, DOI: 10.1128/aac.00874-23, 10.1128/aac.00874-23.
- [71] J. van Ingen, W. Hoefsloot, V. Dartois and T. Dick, *Rifampicin has no role in treatment of Mycobacterium avium complex pulmonary disease and bactericidal sterilising drugs are needed: a viewpoint*, *European Respiratory Journal*, 2024, **63**, 10.1183/13993003.02210-2023.
- [72] A. Rominski, A. Roditscheff, P. Selchow, E. C. Böttger and P. Sander, *Intrinsic rifamycin resistance of Mycobacterium abscessus mediated by ADP-ribosyltransferase MAB_0591*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2017, **72**, 376-384, 10.1093/jac/dkw466.
- [73] D. B. Aziz, J. L. Low, M. L. Wu, M. Gengenbacher, J. W. P. Teo, V. Dartois and T. Dick, *Rifabutin Is Active against Mycobacterium abscessus Complex*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, **61**, 10.1128/AAC.00155-17.
- [74] T. Dick, S. J. Shin, W. J. Koh, V. Dartois and M. Gengenbacher, *Rifabutin Is Active against Mycobacterium abscessus in Mice*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2020, **64**, 10.1128/AAC.01943-19.
- [75] T. Lan, U. S. Ganapathy, S. Sharma, Y. M. Ahn, M. Zimmerman, V. Molodtsov, P. Hegde, M. Gengenbacher, R. H. Ebright, V. Dartois, J. S. Freundlich, T. Dick and C. C. Aldrich, *Redesign of Rifamycin Antibiotics to Overcome ADP-Ribosylation-Mediated Resistance*, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2022, **61**, 10.1002/anie.202211498.
- [76] M. Niemi, J. T. Backman, M. F. Fromm, P. J. Neuvonen and K. T. Kivistö, *Pharmacokinetic interactions with rifampicin -: Clinical relevance*, *Clinical Pharmacokinetics*, 2003, **42**, 819-850, Doi 10.2165/00003088-200342090-00003.
- [77] J. Hakkola, J. Hukkanen, M. Turpeinen and O. Pelkonen, *Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update*, *Archives of Toxicology*, 2020, **94**, 3671-3722, 10.1007/s00204-020-02936-7.
- [78] R. P. Smith, W. L. Eckalbar, K. M. Morrissey, M. R. Luizon, T. J. Hoffmann, X. F. Sun, S. L. Jones, S. F. Aldred, A. Ramamoorthy, Z. Desta, Y. L. Liu, T. C. Skaar, N. D. Trinklein, K. M. Giacomini and N. Ahituv, *Genome-Wide Discovery of Drug-Dependent Human Liver Regulatory Elements*, *Plos Genetics*, 2014, **10**, 10.1371/journal.pgen.1004648.
- [79] T. Maitre, A. Baulard, A. Aubry and N. Veziris, *Optimizing the use of current antituberculosis drugs to overcome drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*, *Infectious Diseases Now*, 2023, **54**, 104807, 10.1016/j.idnow.2023.104807.
- [80] R. S. K. Sachan, V. Mistry, M. Dholaria, A. Rana, I. Devgon, I. Ali, J. Iqbal, S. M. Eldin, A. R. Mohammad Said Al-Tawaha, S. Bawazeer, J. Dutta and A. Karnwal, *Overcoming Mycobacterium tuberculosis Drug Resistance: Novel Medications and Repositioning Strategies*, *ACS Omega*, 2023, **8**, 32244-32257, 10.1021/acsomega.3c02563.
- [81] A. Telenti, P. Imboden, F. Marchesi, D. Lowrie, S. Cole, M. J. Colston, L. Matter, K. Schopfer and T. Bodmer, *Detection of Rifampicin-Resistance Mutations in Mycobacterium-Tuberculosis*, *Lancet*, 1993, **341**, 647-650, Doi 10.1016/0140-6736(93)90417-F.
- [82] A. Munir, N. Kumar, S. B. Ramalingam, S. Tamilzhalagan, S. K. Shanmugam, A. N. Palaniappan, D. Nair, P. Priyadarshini, M. Natarajan, S. Tripathy, U. D. Ranganathan, S. J. Peacock, J. Parkhill, T. L. Blundell and S. Malhotra, *Identification and Characterization of Genetic Determinants of Isoniazid and Rifampicin Resistance in Mycobacterium tuberculosis in Southern India*, *Scientific Reports*, 2019, **9**, 10.1038/s41598-019-46756-x.
- [83] E. Nathanson, P. Nunn, M. Uplekar, K. Floyd, E. Jaramillo, K. Lönnroth, D. Weil and M. Raviglione, *MDR Tuberculosis - Critical Steps for Prevention and Control*, *New England Journal of Medicine*, 2010, **363**, 1050-1058, DOI 10.1056/NEJMra0908076.
- [84] B. T. Nyang'wa, C. Berry, E. Kazounis, I. Motta, N. Parpieva, Z. Tigay, V. Solodovnikova, I. Liverko, R. Moodliar, M. Dodd, N. Ngubane, M. Rassool, T. D. McHugh, M. Spigelman, D. A. J. Moore, K. Ritmeijer, P. du Cros, K. Fielding and T.-P. S. Collaborators, *A 24-Week, All-Oral Regimen for Rifampin-Resistant Tuberculosis*, *New England Journal of Medicine*, 2022, **387**, 2331-2343, 10.1056/NEJMoA2117166.
- [85] U. S. Ganapathy, T. Lan, V. Dartois, C. C. Aldrich and T. Dick, *Blocking ADP-ribosylation expands the anti-mycobacterial spectrum of rifamycins*, *Microbiology Spectrum*, 2023, **11**, 10.1128/spectrum.01900-23.
- [86] U. S. Ganapathy, T. Lan, P. Krastel, M. Lindman, M. D. Zimmerman, H. Ho, J. P. Sarathy, J. C. Evans, V. Dartois, C. C. Aldrich and T. Dick, *Blocking Bacterial*

- Naphthohydroquinone Oxidation and ADP-Ribosylation Improves Activity of Rifamycins against Mycobacterium abscessus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2021, **65**, 10.1128/AAC.00978-21.
- [87] V. Jarlier and H. Nikaido, *Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics*, *FEMS Microbiology Letters*, 1994, **123**, 11-18, 10.1111/j.1574-6968.1994.tb07194.x.
- [88] S. Obata, Z. Zwolska, E. Toyota, K. Kudo, A. Nakamura, T. Sawai, T. Kuratsuji and T. Kirikae, *Association of rpoB mutations with rifampicin resistance in Mycobacterium avium*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2006, **27**, 32-39, 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.015.
- [89] B. A. Brown-Elliott, K. A. Nash and R. J. Wallace, Jr., *Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria*, *Clinical Microbiology Reviews*, 2012, **25**, 545-582, 10.1128/CMR.05030-11.
- [90] J. Hui, N. Gordon and R. Kajioka, *Permeability barrier to rifampin in mycobacteria*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1977, **11**, 773-779, 10.1128/AAC.11.5.773.
- [91] R. H. Ebright, Y. W. Ebright, S. Mandal, R. Wilde and S. Li, *Preparation of N-alpha-aroyl-N-aryl-phenylalaninamides as inhibitors of bacterial RNA polymerase and as antibacterials* 2015, **WO2015120320A1**
- [92] B. Bae, D. Nayak, A. Ray, A. Mustaev, R. Landick and S. A. Darst, *CBR antimicrobials inhibit RNA polymerase via at least two bridge-helix cap-mediated effects on nucleotide addition*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, **112**, E4178-4187, 10.1073/pnas.1502368112.
- [93] I. Artsimovitch, C. Chu, A. S. Lynch and R. Landick, *A new class of bacterial RNA polymerase inhibitor affects nucleotide addition*, *Science*, 2003, **302**, 650-654, 10.1126/science.1087526.
- [94] S. G. Franzblau, M. A. DeGroote, S. H. Cho, K. Andries, E. Nuermberger, I. M. Orme, K. Mdluli, I. Angulo-Barturen, T. Dick, V. Dartois and A. J. Lenaerts, *Comprehensive analysis of methods used for the evaluation of compounds against Mycobacterium tuberculosis*, *Tuberculosis*, 2012, **92**, 453-488, 10.1016/j.tube.2012.07.003.
- [95] F. A. Sirgel, I. J. Wiid and P. D. van Helden, *Measuring minimum inhibitory concentrations in mycobacteria*, *Methods in Molecular Biology*, 2009, **465**, 173-186, 10.1007/978-1-59745-207-6_11.
- [96] *CSLI - Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia ssp., and Other Aerobic Actinomycetes*, 2018.
- [97] F. Sorrentino, R. Gonzalez Del Rio, X. Zheng, J. Presa Matilla, P. Torres Gomez, M. Martinez Hoyos, M. E. Perez Herran, A. Mendoza Losana and Y. Av-Gay, *Development of an Intracellular Screen for New Compounds Able To Inhibit Mycobacterium tuberculosis Growth in Human Macrophages*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, **60**, 640-645, 10.1128/aac.01920-15.
- [98] B. K. Johnson, S. M. Thomas, A. J. Olive and R. B. Abramovitch, *Macrophage Infection Models for Mycobacterium tuberculosis*, *Methods in Molecular Biology*, 2021, **2314**, 167-182, 10.1007/978-1-0716-1460-0_6.
- [99] S. A. Stanley, A. K. Barczak, M. R. Silvis, S. S. Luo, K. Sogi, M. Vokes, M.-A. Bray, A. E. Carpenter, C. B. Moore, N. Siddiqi, E. J. Rubin and D. T. Hung, *Identification of Host-Targeted Small Molecules That Restrict Intracellular Mycobacterium tuberculosis Growth*, *PLoS Pathogens*, 2014, **10**, e1003946, 10.1371/journal.ppat.1003946.
- [100] N. C. S. Santos, R. B. L. Scodro, E. G. Sampiron, A. L. Ieque, H. C. Carvalho, T. D. S. Santos, L. D. Ghiraldi Lopes, P. A. Z. Campanerut-Sa, V. L. D. Siqueira, K. R. Caleffi-Ferracioli, J. J. V. Teixeira and R. F. Cardoso, *Minimum Bactericidal Concentration Techniques in Mycobacterium tuberculosis: A Systematic Review*, *Microbial Drug Resistance*, 2020, **26**, 752-765, 10.1089/mdr.2019.0191.
- [101] R. Verma, M. Gurumurthy, B. C. M. Yeo, Q. Lu, C. M. Naftalin and N. I. Paton, *Effects of Increasing Concentrations of Rifampicin on Different Mycobacterium tuberculosis Lineages in a Whole-Blood Bactericidal Activity Assay*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2022, **66**, e0169921, 10.1128/AAC.01699-21.
- [102] M. W. Pletz, A. De Roux, A. Roth, K. H. Neumann, H. Mauch and H. Lode, *Early bactericidal activity of moxifloxacin in treatment of pulmonary tuberculosis: a prospective, randomized study*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, **48**, 780-782, 10.1128/AAC.48.3.780-782.2004.

- [103] M. R. Holt and T. Baird, *Treatment Approaches to Mycobacterium abscessus Pulmonary Disease*, *Clinics in Chest Medicine*, 2023, **44**, 785-798, 10.1016/j.ccm.2023.06.010.
- [104] M. H. Nguyen and C. L. Daley, *Treatment of Mycobacterium avium Complex Pulmonary Disease: When Should I Treat and What Therapy Should I Start?*, *Clinics in Chest Medicine*, 2023, **44**, 771-783, 10.1016/j.ccm.2023.06.009.
- [105] V. Dartois and T. Dick, *Therapeutic developments for tuberculosis and nontuberculous mycobacterial lung disease*, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2024, DOI: 10.1038/s41573-024-00897-5, 10.1038/s41573-024-00897-5.
- [106] M. H. Hsieh, C. M. Yu, V. L. Yu and J. W. Chow, *Synergy assessed by checkerboard. A critical analysis*, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 1993, **16**, 343-349, 10.1016/0732-8893(93)90087-n.
- [107] T. Schon, J. Werngren, D. Machado, E. Borroni, M. Wijkander, G. Lina, J. Mouton, E. Matuschek, G. Kahlmeter, C. Giske, M. Santin, D. M. Cirillo, M. Viveiros and E. Cambau, *Antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex isolates - the EUCAST broth microdilution reference method for MIC determination*, *Clinical Microbiology and Infection*, 2020, **26**, 1488-1492, 10.1016/j.cmi.2020.07.036.
- [108] J. O. Falkinham, 3rd, *Challenges of NTM Drug Development*, *Frontiers in Microbiology*, 2018, **9**, 1613, 10.3389/fmicb.2018.01613.
- [109] A. Lewin, E. Kamal, T. Semmler, K. Winter, S. Kaiser, H. Schafer, L. Mao, P. Eschenhagen, C. Grehn, J. Bender and C. Schwarz, *Genetic diversification of persistent Mycobacterium abscessus within cystic fibrosis patients*, *Virulence*, 2021, **12**, 2415-2429, 10.1080/21505594.2021.1959808.
- [110] C. Y. Turenne, *Nontuberculous mycobacteria: Insights on taxonomy and evolution*, *Infection, Genetics and Evolution*, 2019, **72**, 159-168, 10.1016/j.meegid.2019.01.017.
- [111] M. Diricks, M. Merker, N. Wetzstein, T. A. Kohl, S. Niemann and F. P. Maurer, *Delineating Mycobacterium abscessus population structure and transmission employing high-resolution core genome multilocus sequence typing*, *Nature Communications*, 2022, **13**, 4936, 10.1038/s41467-022-32122-5.
- [112] K. A. Nash, B. A. Brown-Elliott and R. J. Wallace, Jr., *A novel gene, erm(41), confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of Mycobacterium abscessus but is absent from Mycobacterium chelonae*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, **53**, 1367-1376, 10.1128/AAC.01275-08.
- [113] F. P. Maurer, C. Castelberg, C. Quiblier, E. C. Bottger and A. Somoskovi, *Erm(41)-dependent inducible resistance to azithromycin and clarithromycin in clinical isolates of Mycobacterium abscessus*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2014, **69**, 1559-1563, 10.1093/jac/dku007.
- [114] C. Dupont, A. Viljoen, F. Dubar, M. Blaise, A. Bernut, A. Pawlik, C. Bouchier, R. Brosch, Y. Guerardel, J. Lelievre, L. Ballell, J. L. Herrmann, C. Biot and L. Kremer, *A new piperidinol derivative targeting mycolic acid transport in Mycobacterium abscessus*, *Molecular Microbiology*, 2016, **101**, 515-529, 10.1111/mmi.13406.
- [115] A. P. Kozikowski, O. K. Onajole, J. Stec, C. Dupont, A. Viljoen, M. Richard, T. Chaira, S. Lun, W. Bishai, V. S. Raj, D. Ordway and L. Kremer, *Targeting Mycolic Acid Transport by Indole-2-carboxamides for the Treatment of Mycobacterium abscessus Infections*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, **60**, 5876-5888, 10.1021/acs.jmedchem.7b00582.
- [116] M. J. Remuinan, E. Perez-Herran, J. Rullas, C. Alemparte, M. Martinez-Hoyos, D. J. Dow, J. Afari, N. Mehta, J. Esquivias, E. Jimenez, F. Ortega-Muro, M. T. Fraile-Gabaldon, V. L. Spivey, N. J. Loman, M. J. Pallen, C. Constantinidou, D. J. Minick, M. Cacho, M. J. Rebollo-Lopez, C. Gonzalez, V. Sousa, I. Angulo-Barturen, A. Mendoza-Losana, D. Barros, G. S. Besra, L. Ballell and N. Cammack, *Tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-carboxamide and N-benzyl-6',7'-dihydrospiro[piperidine-4,4'-thieno[3,2-c]pyran] analogues with bactericidal efficacy against Mycobacterium tuberculosis targeting MmpL3*, *PLoS One*, 2013, **8**, e60933, 10.1371/journal.pone.0060933.
- [117] D. A. Negatu, A. Beuchel, A. Madani, N. Alvarez, C. Chen, W. W. Aragaw, M. D. Zimmerman, B. Laleu, M. Gengenbacher, V. Dartois, P. Imming and T. Dick, *Piperidine-4-Carboxamides Target DNA Gyrase in Mycobacterium abscessus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2021, **65**, e0067621, 10.1128/AAC.00676-21.
- [118] M. D. Johansen, J.-L. Herrmann and L. Kremer, *Non-tuberculous mycobacteria and the rise of Mycobacterium abscessus*, *Nature Reviews Microbiology*, 2020, **18**, 392-407, 10.1038/s41579-020-0331-1.

- [119] C. R. Bonapace, J. A. Bosso, L. V. Friedrich and R. L. White, *Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing*, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2002, **44**, 363-366, 10.1016/S0732-8893(02)00473-x.
- [120] D. B. Aziz, M. L. Go and T. Dick, *Rifabutin Suppresses Inducible Clarithromycin Resistance in Mycobacterium abscessus by Blocking Induction of whiB7 and erm41*, *Antibiotics*, 2020, **9**, 10.3390/antibiotics9020072.
- [121] B. E. Jong, T. S. Wu, N. Y. Chen, C. H. Yang, C. C. Shu, L. S. Wang, T. L. Wu, J. J. Lu, C. H. Chiu, H. C. Lai and W. H. Chung, *Impact on Macrolide Resistance of Genetic Diversity of Mycobacterium abscessus Species*, *Microbiology Spectrum*, 2022, **10**, e0274922, 10.1128/spectrum.02749-22.
- [122] M. Richard, A. V. Gutierrez and L. Kremer, *Dissecting erm(41)-Mediated Macrolide-Inducible Resistance in Mycobacterium abscessus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2020, **64**, 10.1128/AAC.01879-19.
- [123] M. Kamariza, P. Shieh, C. S. Ealand, J. S. Peters, B. Chu, F. P. Rodriguez-Rivera, M. R. Babu Sait, W. V. Treuren, N. Martinson, R. Kalscheuer, B. D. Kana and C. R. Bertozzi, *Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum with a solvatochromic trehalose probe*, *Science Translational Medicine*, 2018, **10**, 10.1126/scitranslmed.aam6310.
- [124] H. A. Sahile, C. Rens, T. Shapira, R. J. Andersen and Y. Av-Gay, *DMN-Tre Labeling for Detection and High-Content Screening of Compounds against Intracellular Mycobacteria*, *ACS Omega*, 2020, **5**, 3661-3669, 10.1021/acsomega.9b04173.
- [125] M. Kamariza, S. G. L. Keyser, A. Utz, B. D. Knapp, C. Ealand, G. Ahn, C. J. Cambier, T. Chen, B. Kana, K. C. Huang and C. R. Bertozzi, *Toward Point-of-Care Detection of Mycobacterium tuberculosis: A Brighter Solvatochromic Probe Detects Mycobacteria within Minutes*, *Journal of the American Chemical Society*, 2021, **1**, 1368-1379, 10.1021/jacsau.1c00173.
- [126] J. Early and T. Alling, *Determination of compound kill kinetics against Mycobacterium tuberculosis*, *Methods in Molecular Biology*, 2015, **1285**, 269-279, 10.1007/978-1-4939-2450-9_16.

Publikationsverzeichnis

- 2024 -

Peña-Díaz, S.; Chao, J.D.; Rens, C.; Haghdadi, H.; Sahile, H.; Zheng, X.; Flanagan, K.; Ko, M.; Shapira, T.; **Richter, A.**; Maestre-Batlle, D.; Canceco, J.O.; Gutierrez, M.; Duc, K.D.; Pelech, S.; Av-Gay, Y. *Glycogen Synthase Kinase 3 inhibition controls Mycobacterium tuberculosis Infection*. **iScience** 27, 110555.

Mann, L.; Siersleben, F.; Lang, M.; **Richter, A.** *Determination of bactericidal activity against 3HC-2-Tre-labelled Mycobacterium abscessus (Mycobacteroides abscessus) by automated fluorescence microscopy*. **Journal of Microbiological Methods**, 224, 107002.

Lang, M.; Goddard, R.; Patzer, M.; Ganapathy, U.S.; Dick, T.; **Richter, A.**; Seidel, R.W. *Polymorphism of an Na-Aroyl-N-Aryl-Phenylalanine Amide: An X-ray and Electron Diffraction Study*. **Molbank**, M1851.

Palme, P.R.; Goddard, R.; **Richter, A.**; Imming, P.; Seidel, R.W. *3-[(Benzo-1,3-dioxol-5-yl)amino]-4-meth-oxy-cyclo-but-3-ene-1,2-dione: polymorphism and twinning of a precursor to an anti-mycobacterial squaramide*. **Acta Crystallographica Section C Structural Chemistry**, C80.

Lang, M.; Ganapathy, U.S.; Dick, T.; **Richter, A.** *Broad-Spectrum In Vitro Activity of Na-aroyl-N-aryl-Phenylalanine Amides Against Non-Tuberculous Mycobacteria and Comparative Analysis of RNA Polymerases*. **Antibiotics** 13(5), 404.

Seidel, R.W.; Goddard, R.; Lang, M.; **Richter, A.** *Na-aroyl-N-aryl-phenylalanine amides: a promising class of antimycobacterial agents targeting the RNA polymerase*. **Chemistry and Biodiversity**, e20240026.

Lang, M.; Ganapathy, U.S.; Mann, L.; Seidel, R.W.; Goddard, R.; Erdmann, F.; Dick, T.; **Richter, A.** *Synthesis and in vitro metabolic stability of sterically shielded antimycobacterial phenylalanine amides*. **ChemMedChem**, e202300593.

- 2023 -

Richter, A.; Goddard, R.; Mann, L.; Siersleben, F.; Seidel, R.W. *Structural characterization of a 3-hydroxychromone dye trehalose conjugate for fluorescent labelling of mycobacteria*. **Journal of Molecular Structure**, 1298(2):137010.

Richter, A.; Goddard, R.; Imming, P.; Seidel, R.W. *Crystal structure and antimycobacterial evaluation of 2-(cyclohexylmethyl)-7-nitro-5-(trifluoromethyl)-benzo[d]isothiazol-3(2H)-one*. **Acta Crystallographica Section E Crystallographic Communications** E79, 1194-1198.

Abdelaziz, R.; Trani, J.M.D.; Sahile, H.; Mann, L.; **Richter, A.**; Liu, Z.; Bueler, S.A.; Cowen, L.E.; Rubinstein, J.L.; Imming, P. *Imidazopyridine Amides: Synthesis, Mycobacterium smegmatis CIII2CIV2 Supercomplex Binding, and In Vitro Antimycobacterial Activity*. **ACS Omega**, 8(21), 19081–19098.

Richter, A.; Goddard, R.; Siersleben, F.; Mann, L.; Seidel, R.W. *Structural Elucidation of 2-(6-(Diethylamino)benzofuran-2-yl)-3-hydroxy-4H-chromen-4-one and Labelling of Mycobacterium aurum Cells*. **Molbank**, M1647.

Palme, P.R.; Goddard, R.; Leutzsch, M.; **Richter, A.**; Imming, P.; Seidel, R.W. *Structural Elucidation of the Triethylammonium Betaine of Squaric Acid*. **Molbank**, M1737.

Courbon, G.M.; Palme, P.R.; Mann, L.; **Richter, A.**; Imming, P.; Rubinstein, J.L. *Mechanism of mycobacterial ATP synthase inhibition by squaramides and second generation diarylquinolines*. **EMBO Journal**, 42(15):e113687.

Seidel, R.W.; **Richter, A.**; Goddard, R.; Imming, P. *Synthesis, structures, reactivity and medicinal chemistry of antitubercular benzothiazinones*. **Chemical Communications** 59, 4697-4715.

Lang, M.; Ganapathy, U.; Mann, L.; Abdelaziz, R.; Seidel, R. W.; Goddard, R.; Sequenzia, I.; Hoenke, S.; Schulze, P.; Aragaw, W.; Csuk, R.; Dick, T.; **Richter, A.** *Synthesis and characterization of phenylalanine amides active against Mycobacterium abscessus and other mycobacteria* **Journal of Medicinal Chemistry**, 66(7), 5079-5098.

Richter, A.; Goddard, R.; Schönefeld, R.; Imming, P.; Seidel, R. W. *Methyl 1-[(6-methoxy-5-methylpyrimidin-4-yl)-methyl]-1H-benzo[d]imidazole-7-carboxylate: a combined X-ray and DFT study*. **IUCrData**, 8, x230025.

- 2022 -

Richter, A.; Goddard, R.; Schönefeld, R.; Imming, P.; Seidel, R. W. *Structural characterization and antimycobacterialevaluation of a benzimidazole analogue of the antituberculosis clinical drug candidate TBA-7371*. **Acta Crystallographica Section E Crystallographic Communications** E78, 1184-1188.

Richter, A.; Goddard, R.; Imming, P.; Seidel, R. W. *Structural characterization of the azoxy derivative of an antitubercular 8-nitro-1,3-benzothiazin-4-one*. **Acta Crystallographica Section E Crystallographic Communications**, E78, 1244-1248.

Mann, L., Ganapathy, U.S., Abdelaziz, R., Lang, M., Zimmerman, M.D., Dartois, V., Dick, T., **Richter, A.** *In Vitro Profiling of the Synthetic RNA Polymerase Inhibitor MMV688845 against Mycobacterium abscessus*. **Microbiology Spectrum**, 10(6):e0276022.

Sao Emani, C.; **Richter, A.**; Singh, A.; Bhatt, A.; Av-Gay Y. *The Δ CysK2 mutant of Mycobacterium tuberculosis is sensitive to vancomycin associated with changes in cell wall phospholipid profile*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 624, 120-126.

Richter, A.; Seidel, R.W.; Goddard, R.; Eckhardt, T.; Lehmann, C.; Dörner, J.; Siersleben, F.; Sondermann, T.; Mann, L.; Patzer, M.; Jäger, C.; Reiling, N.; Imming, P. *BTZ-Derived Benzisothiazolinones with In Vitro Activity against Mycobacterium tuberculosis*. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, 13(8), 1302-1310.

Beuchel, A.; Robaa, D.; Negatu, D.A.; Madani, A.; Alvarez, N.; Zimmerman, M.D.; **Richter, A.**; Mann, L.; Hoenke, S.; Csuk, R.; Dick, T.; Imming, P. *Structure-Activity Relationship of Anti-Mycobacterium abscessus Piperidine- 4-carboxamides, a New Class of NBTI DNA Gyrase Inhibitors*. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, 13(3), 417-427.

Richter, A.; Seidel, R.W.; Graf, J.; Goddard, R.; Lehmann, C.; Schlegel, T.; Khater, N.; Imming, P. *New Insight into Dearomatization and Decarbonylation of Antitubercular 4H-Benzo[e][1,3]thiazinones: Stable 5H-and 7H-Benzo[e][1,3]thiazines*. **ChemMedChem**, 17 (6):e202200021.

Richter, A.; Patzer, M.; Goddard, R.; Lingnau, J. B.; Imming, P.; Seidel, R. W. *Structural elucidation of the antitubercular benzothiazinone BTZO43: A combined X-ray, variable temperature NMR and DFT study.* **Journal of Molecular Structure**, 1248, 131419.

- 2021 -

Richter, A.; Narula, G.; Rudolph, I.; Seidel, R. W.; Wagner, C.; Av-Gay, Y.; Imming, P. *Efficient Synthesis of Benzothiazinone Analogues with Activity against Intracellular Mycobacterium tuberculosis.* **ChemMedChem**, e202100733.

Richter, A.; Goddard, R.; Schlegel, T.; Imming, P.; Seidel, R. W. *2-Chloro-3-nitro-5-(trifluoromethyl)benzoic acid and -benzamide: structural characterization of two precursors for antitubercular benzothiazinones.* **Acta Crystallographica Section E Crystallographic Communications**, 77 (2), 142-147.

Sirak, B.; Mann, L.; **Richter, A.**; Asres, K.; Imming, P. *In Vivo Antimalarial Activity of Leaf Extracts and a Major Compound Isolated from Ranunculus multifidus.* **Molecules**, 26 (20), 6179.

Mann, L.; Lang, M.; Schulze, P.; Halz, J. H.; Csuk, R.; Hoenke, S.; Seidel, R. W.; **Richter, A.** *Racemization-free synthesis of Na-2-thiophenoyl-phenylalanine-2-morpholinoanilide enantiomers and their antimycobacterial activity.* **Amino Acids**, 53 (8), 1187-1196.

Madikizela, B.; Eckhardt, T.; Goddard, R.; **Richter, A.**; Lins, A.; Lehmann, C.; Imming, P.; Seidel, R. W. *Synthesis, structural characterization and antimycobacterial evaluation of several halogenated non-nitro benzothiazinones.* **Medicinal Chemistry Research**, 30 (8), 1523-1533.

Böck, D.; Beuchel, A.; Goddard, R.; **Richter, A.**; Imming, P.; Seidel, R. W. *Protonation sites and hydrogen bonding in mono-hydrobromide salts of two N,4-diheteroaryl 2-aminothiazoles.* **Structural Chemistry**, 32 (3), 989-996.

- 2020 -

Eckhardt, T.; Goddard, R. Rudolph, I.; **Richter, A.**; Lehmann, C.; Imming, P.; Seidel, R. W. *[2-Chloro-3-nitro-5-(trifluoromethyl)phenyl](piperidin-1-yl)methanone: structural characterization of a side product in benzothiazinone synthesis.* **Acta Crystallographica Section E Crystallographic Communications**, 76 (9), 1442-1446.

Patel, A.; Redinger, N.; **Richter, A.**; Woods, A.; Neumann, P. R.; Keegan, G.; Childerhouse, N.; Imming, P.; Schaible, U. E.; Forbes, B.; Dailey, L. A. *In vitro and in vivo antitubercular activity of benzothiazinone-loaded human serum albumin nanocarriers designed for inhalation. Journal of Controlled Release*, 328, 339-349.

Eckhardt, T.; Goddard, R.; Lehmann, C.; **Richter, A.**; Sahile, H. A.; Liu, R.; Tiwari, R.; Oliver, A. G.; Miller, M. J.; Seidel, R. W.; Imming, P. *Crystallographic evidence for unintended benzisothiazolinone 1-oxide formation from benzothiazinones through oxidation. Acta Crystallographica Section C Structural Chemistry*, 76 (9), 907-913.

- 2019 -

Richter, A.; Shapira, T.; Av-Gay, Y. *THP-1 and Dictyostelium Infection Models for Screening and Characterization of Anti-Mycobacterium abscessus Hit Compounds. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64 (1).

- 2018 -

Richter, A.; Strauch, A.; Chao, J.; Ko, M.; Av-Gay, Y. *Screening of Preselected Libraries Targeting Mycobacterium abscessus for Drug Discovery. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62 (9).

Richter, A.; Rudolph, I.; Möllmann, U.; Voigt, K.; Chung, C.-W.; Singh, O. M. P.; Rees, M.; Mendoza-Losana, A.; Bates, R.; Ballell, L.; Batt, S.; Veerapen, N.; Fütterer, K.; Besra, G.; Imming, P.; Argyrou, A. *Novel insight into the reaction of nitro, nitroso and hydroxylamino benzothiazinones and of benzoxacinones with Mycobacterium tuberculosis DprE1. Scientific Reports*, 8 (1).

Laqua, K.; Klemm, M.; Richard-Greenblatt, M.; **Richter, A.**; Liebe, L.; Huang, T.; Lin, S.; Guardia, A.; Pérez-Herran, E.; Ballell, L.; Av-Gay, Y.; Imming, P. *Synthesis, antimycobacterial activity and influence on mycobacterial InhA and PknB of 12-membered cyclodepsipeptides. Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26, 3166-3190.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Peter Imming danken, der meine wissenschaftliche Arbeit jederzeit beispielhaft betreut und unterstützt hat. Diese Unterstützung hat die Entwicklung eines eigenständigen Forschungsprojektes in seiner Arbeitsgruppe erst ermöglicht: Der Rat in wissenschaftlichen Fragen, die Hinweise zur Organisation eines mehrjährigen Forschungsprojektes und die finanzielle Unterstützung haben wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen. In dieser vertrauensvollen Zusammenarbeit sehe ich ein großes Privileg meiner wissenschaftlichen Tätigkeit.

Den Anfang nahm die Habilitation allerdings in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Yossef Av-Gay (University of British Columbia), der mir nach einer Promotion in pharmazeutischer Chemie das Arbeiten mit pathogenen Mykobakterien zutraute und mir ermöglichte mikrobiologische Arbeitstechniken zu erlernen. Forschungsergebnisse aus dieser Zeit legten den Grundstein für das Habitationsprojekt. In diesem Zusammenhang möchte ich Tirosh Shapira, Mary Ko, Joseph Chao, Céline Rens, Sandra Peña, Henok Asfaw und Carine Sao Emani für ihre Unterstützung und die gemeinsame Zeit im S3-Labor danken.

Als erste Doktoranden, die unter meiner Betreuung forschten, gilt mein besonderer Dank Lea Mann und Markus Lang. Ihr wissenschaftlicher Enthusiasmus und Ideenreichtum sowie ihre Geduld haben wesentlich zum Gelingen des Forschungsprojektes beigetragen. Die Betreuung ihrer wissenschaftlichen Arbeit war eine große Bereicherung, umso erfreulicher ist es, dass beide Arbeiten so produktiv verlaufen sind. Mein Dank gilt auch Rüdiger W. Seidel, der nicht nur seine strukturchemische Expertise eingebracht hat, sondern auch mit seiner Erfahrung und unbestechlichen Genauigkeit die Manuskripte redigiert hat. Mein Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe - Paul Palme, Franziska Flesch, Ruth Feilcke, Julia Seiser und Mthandazo Dube - für die Unterstützung, die wissenschaftlichen Diskussionen und die stets angenehme Zusammenarbeit. Weiterhin möchte ich mich bei den Diplom- und Masterstudenten Leo Dumjahn, Tom Schlegel, Fabienne Siersleben, Ilaria Sequenzia, Johannes Döring und Johannes Kollatz bedanken, die im Rahmen des hier beschriebenen Projektes geforscht haben.

Mein herzlicher Dank gilt Jens-Ulrich Rahfeld (Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie), Nadine Taudte und Nadine Jänckel (Periotrap) für die Möglichkeit, in ihrem S2-Labor mikrobiologisch zu arbeiten und für die angenehme wissenschaftliche Zusammenarbeit. An dieser Stelle möchte ich die

produktive und vertrauensvolle Zusammenarbeit mit allen Partnern hervorheben, die über die Jahre aufgebaut werden konnte und auf deren Fortsetzung ich mich freue. Insbesondere Thomas Dick und Uday S. Ganapathy (Hackensack Meridian Health Center for Discovery and Innovation) haben mit ihren mikrobiologischen Kenntnissen und Methoden das Projekt maßgeblich unterstützt und vorangetrieben. Sie ermöglichten auch einen mehrmonatigen Auslandsaufenthalt von Markus Lang, der zu einem wichtigen Bestandteil seiner Dissertation geworden ist. Von großer Bedeutung war auch die Zusammenarbeit mit Richard Goddard (Max-Planck-Institut für Kohlenforschung), der röntgendiffraktometrische Messungen zur Strukturaufklärung durchführte und stets ein gefragter Ratgeber bei der Verbesserung der Manuskripte war.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) - 432291016 und dem Mukoviszidose Institut gGmbH Projekt Nr. 2202 (Bonn, Deutschland), dem Forschungs- und Entwicklungszweig des Deutschen Mukoviszidose e.V., gefördert. Bei beiden Förderinstitutionen möchte ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung herzlich bedanken.

Curriculum vitae

Name (Titel): Richter, (Dr.) **Vorname:** Adrian
Geboren am: **Geburtsort:**
Privatadresse:

Ausbildung und berufliche Laufbahn

ab dem 02.06.2019 wiss. Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit Schwerpunkt antimykobakterieller Wirkstoffforschung: Synthese, Assayentwicklung und mikrobiologische Charakterisierung

02.06.2017 - 01.06.2019 Post-Doc in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Yossef Av-Gay an der University of British Columbia

27.03.2017 Verteidigung der Dissertation mit dem Titel „Synthese von Benzothiazinonen und Derivaten als DprE1 Hemmstoffe mit antimykobakterieller Aktivität“ (Note: *summa cum laude*) ausgezeichnet mit dem Wissenschaftspreis Bayer Bitterfeld GmbH 2016/17

01.01.2017 - 31.05.2017 Apotheker in der Apotheke Zur Goldenen Aue Roßleben

01.01.2013 - 31.12.2016 Promotionsstudent in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Peter Imming, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

04.12.2012 Approbation als Apotheker

01.05.2012 - 31.12.2013 Pharmazeut im Praktikum in der Löwen-Apotheke Naumburg/Saale und der Apotheke Zur Goldenen Aue Roßleben

01.11.2011 - 30.04.2012 Diplomstudent/Pharmazeut im Praktikum in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Peter Imming, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2007-2011 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Abschluss Gesamtnote sehr gut 1,22)

2007 allgemeine Hochschulreife (Abitur) am staatlichen Gymnasium Klosterschule Roßleben

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Ferner erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Habilitation erstmals um die Erlangung dieses Titels bewerbe. Die vorliegende Arbeit ist weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Habilitation oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Adrian Richter, Halle den 08.10.2024