

Pyrrolnitrin als Leitsubstanz
für Wirkstoffe, die durch
Aktivierung einer Pilz-
spezifischen Histidin-Kinase
antifungal wirken

Frank Ebel



Herkunft wichtiger Antimykotika

- **Azole (Clotrimazol)**

- Screening von über 600 Trityl-Imidazol-Derivaten

- **Polyene (Amphotericin B)**

- *Streptomyces nodosum*
- Vancomycin, Erythromycin, Chloramphenicol
- Amphotericin B, Nystatin

- **Ecchinocandine**

- Papulacandine aus dem marinen Pilz
- *Papularia sphaerosperma*

aus *Pseudomonas pyrocinia*

[Agr. Biol. Chem., Vol. 28, No. 8, p. 575~576, 1964]

Pyrrolnitrin, a New Antibiotic Substance, Produced by *Pseudomonas*

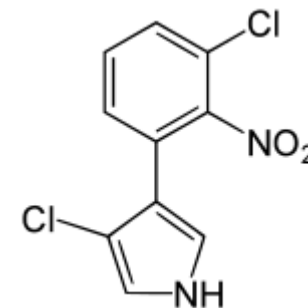
Sir:

A new antibiotic substance was isolated from the bacterial cells of a *Pseudomonas*. The antibiotic substance was named Pyrrolnitrin.

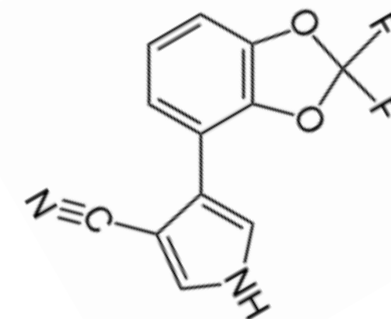
Pyrrolnitrin was extracted with acetone from bacterial cells which were grown on bouillon medium. The oily matter obtained from concentrate of acetone solution was extracted again with petroleum benzin. The

for ferric chloride test. The formula $C_{10}H_6O_2N_2Cl_2$ was assigned to Pyrrolnitrin through elementary analysis and molecular weight determination (Rast, 243). *Anal.* Found: C, 46.58; H, 2.42; O, 12.41; N, 10.82; Cl, 27.23%. Calcd. for $C_{10}H_6O_2N_2Cl_2$: C, 46.71; H, 2.33; O, 12.45; N, 10.89; Cl, 27.68%. The infrared spectrum of Pyrrolnitrin is shown in Fig. 1.

The band at 3480 cm^{-1} in the infrared



Pyrrolnitrin



Fludioxonil

Aspergilli

Fludioxonil paper disk assay (5 µg / disk)



A. fumigatus

37°C

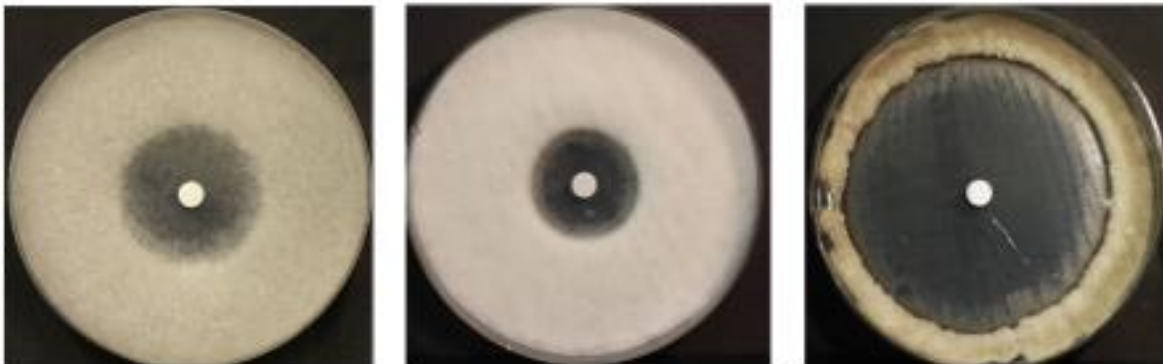
Mucorales

L. corymbifera

R. oryzae

S. minutisporum

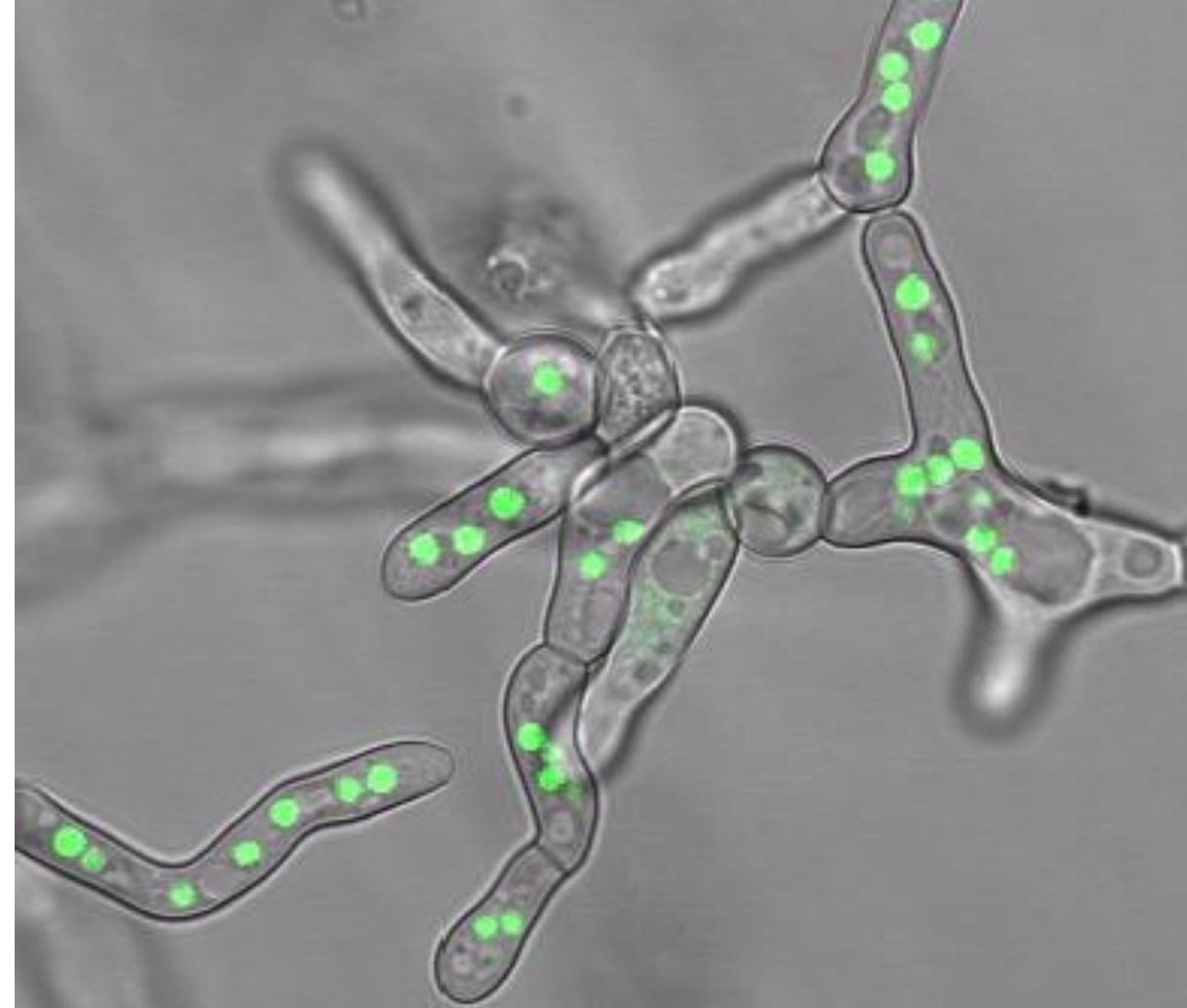
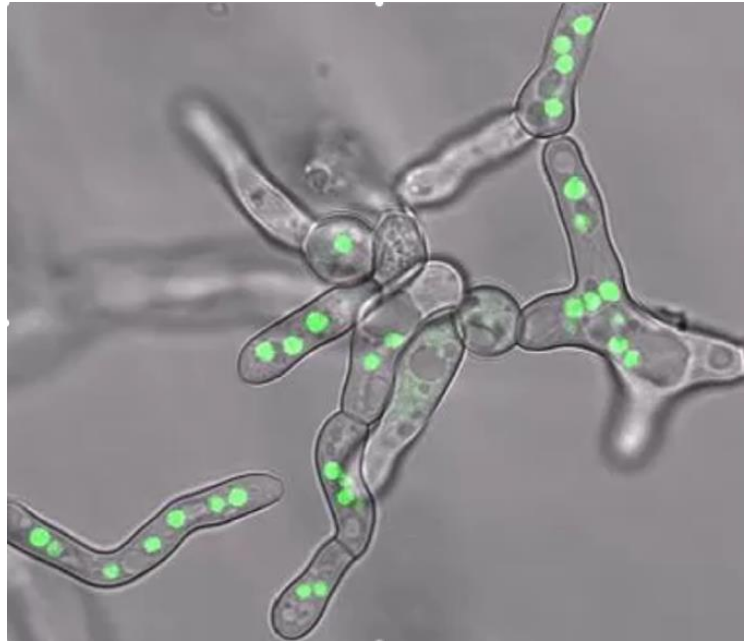
Particular strong activity against
Scedosporium prolificans,
S. aurantiacum and
Pseudallescheria boydii



fludioxonil

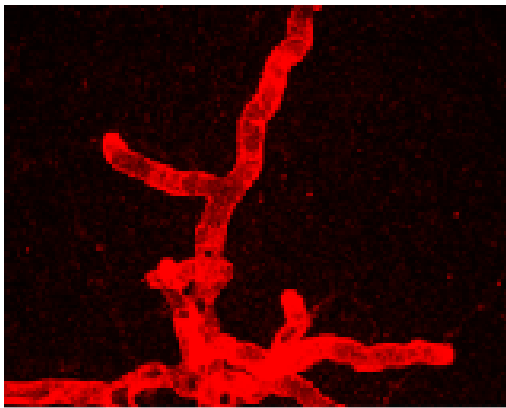
Fludioxonil (1 µg/ml)
video starts after 4 h
ends after 9 h

- Growth arrest
- Swelling
- **Lysis**
- Septation
- Mitosis

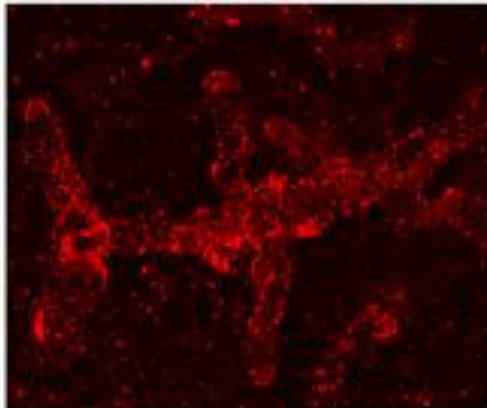


Fludioxonil-induced Cell Wall Reorganizations

galactomannan



0 h

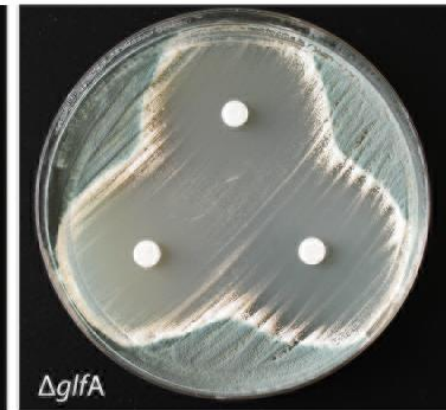


10 h

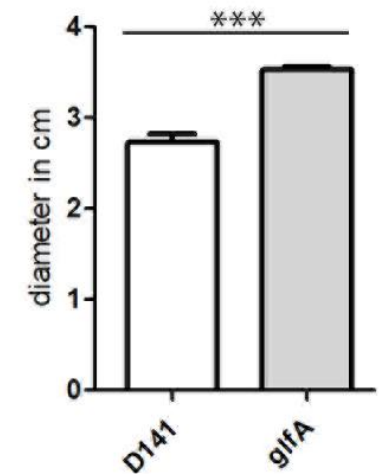
fludioxonil (1 μ g/ml)



D141

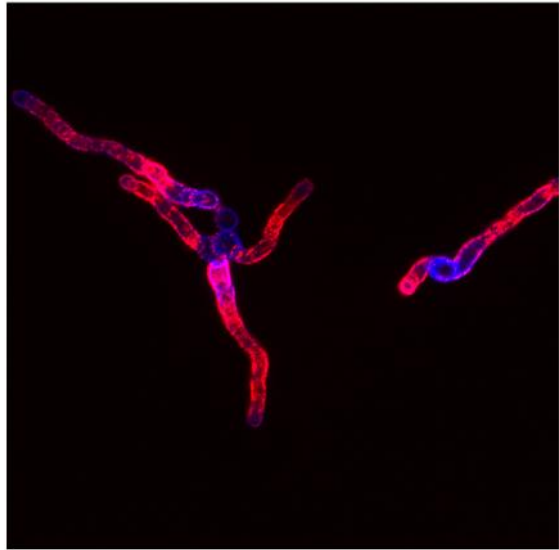


Δ glfA

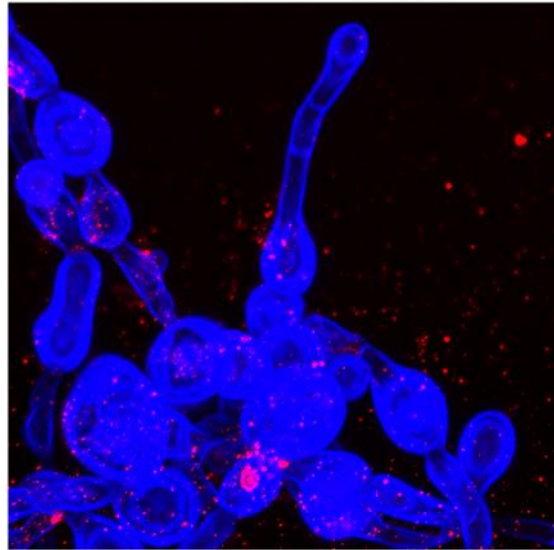


Impact of Fludioxonil: Increased Osmotic Pressure and Cell Wall Reorganizations

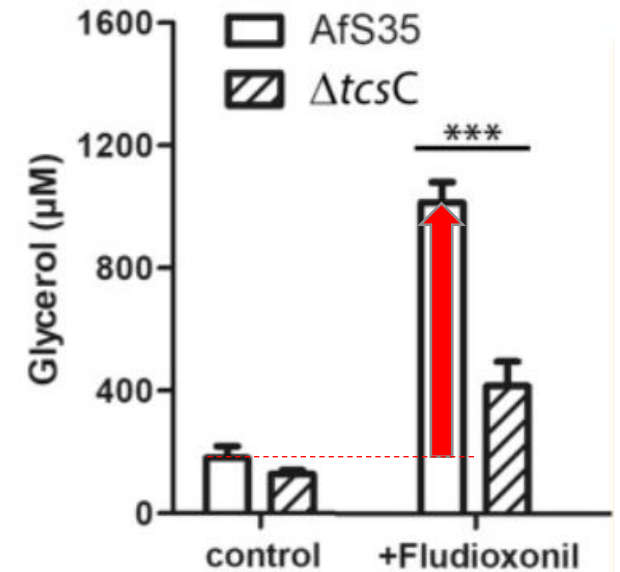
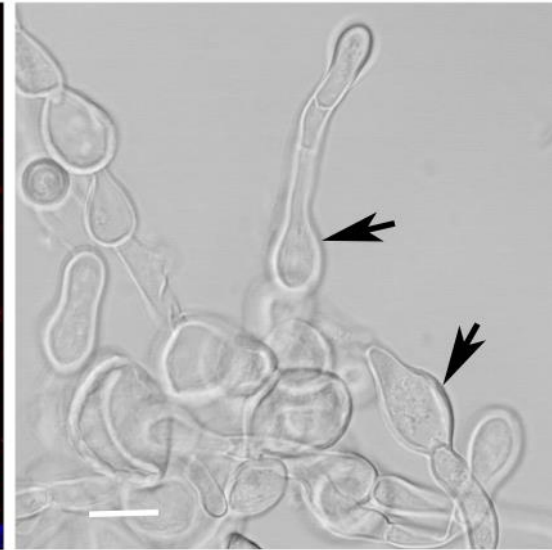
w/o fludioxonil



with fludioxonil

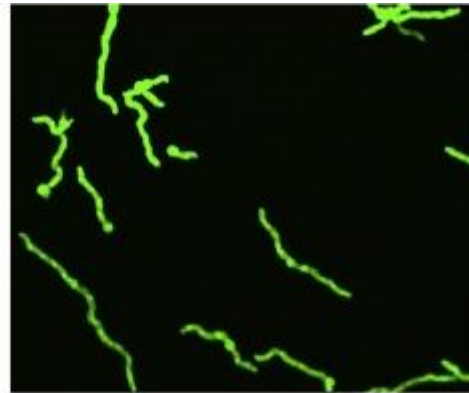
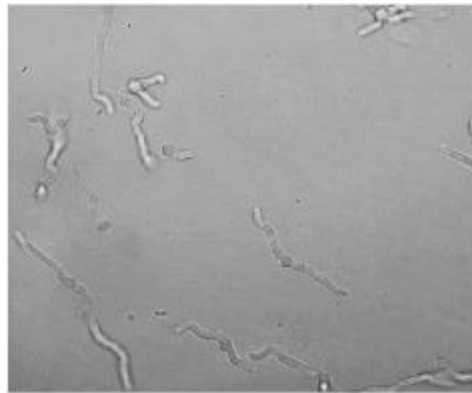


chitin galactomannan

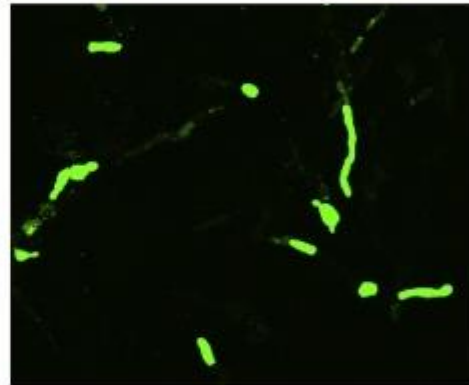


- increased osmotic pressure in the cytoplasm
- impaired cell wall stability

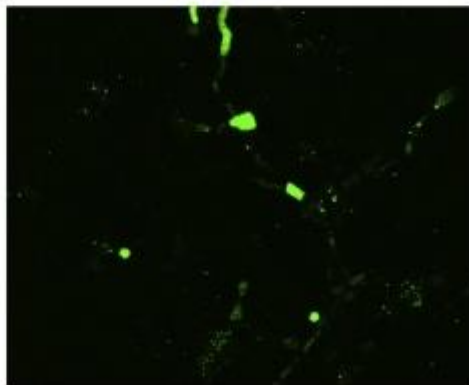
Fludioxonil-induced lysis of GFP-expressing *A. fumigatus* hyphae



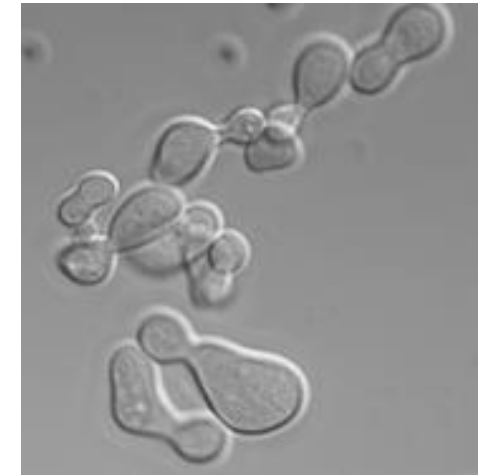
0h



24h

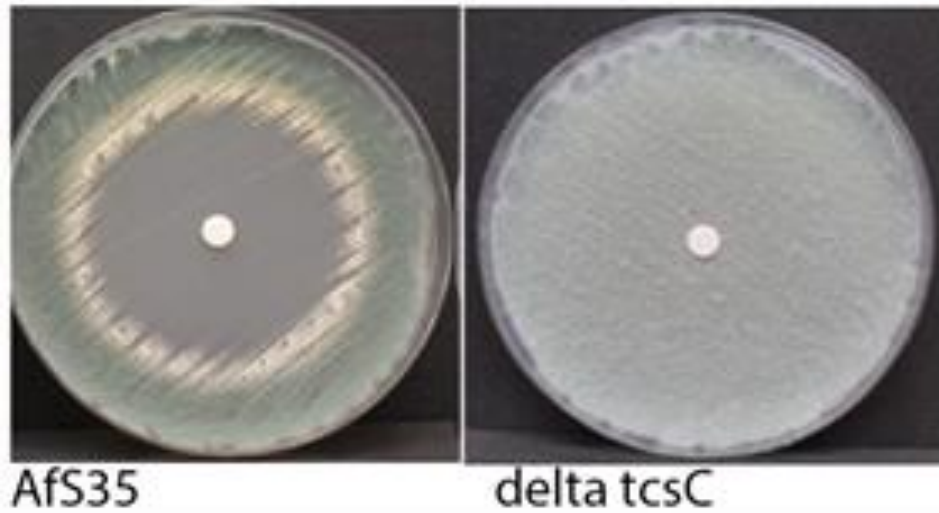


48h

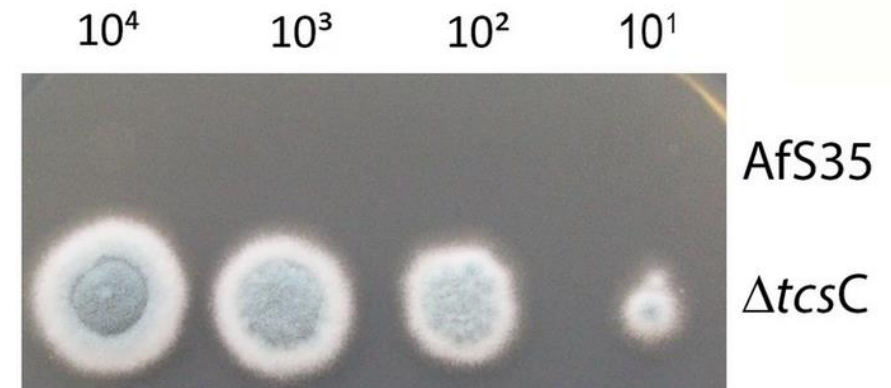


Fludioxonil triggers its fungicidal activity via TcsC

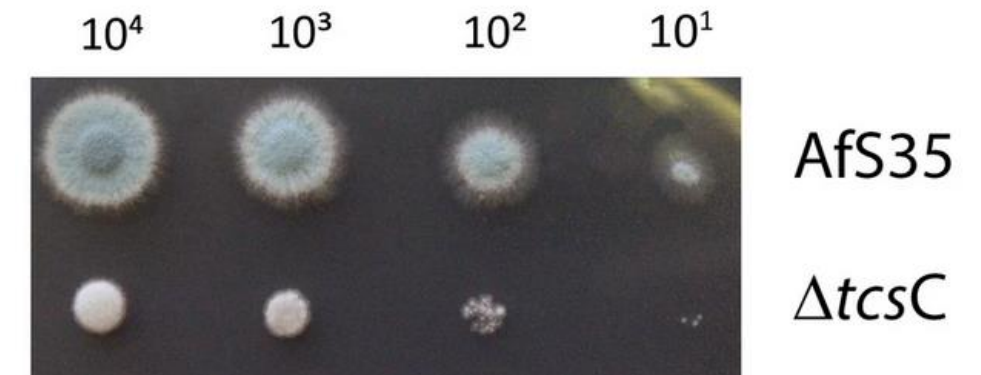
+ fludioxonil



McCormick *et al.*, PLoSone, 2012

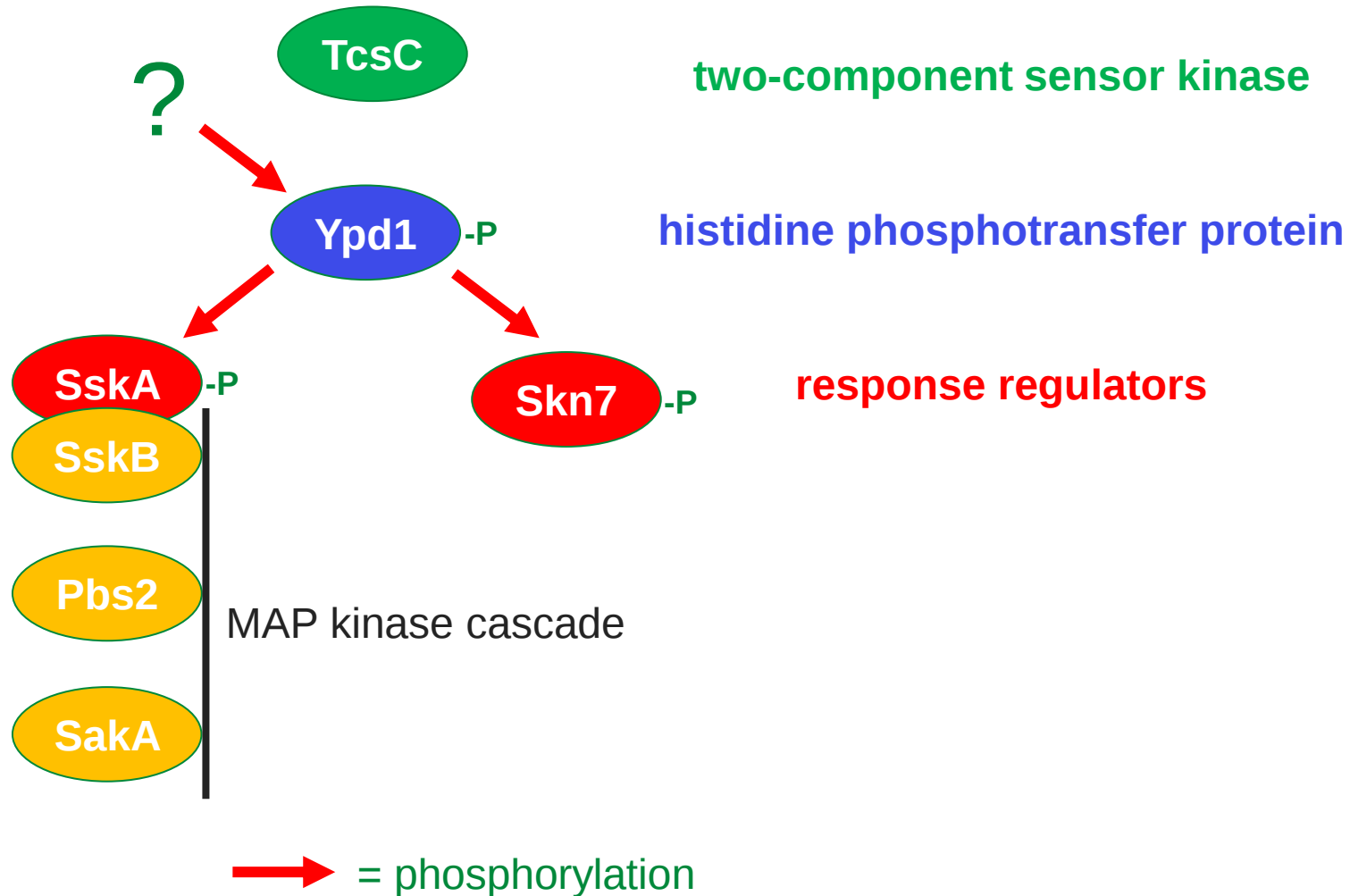


Fludioxonil (1 μ g/ml)



NaCl (1 M)

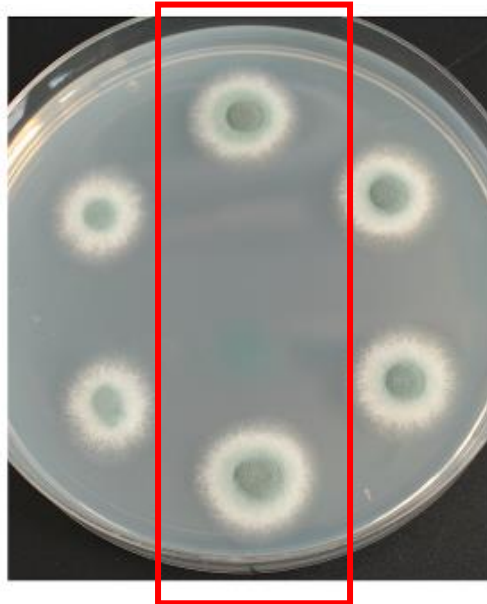
High Osmolarity Glycerol (HOG) Pathway



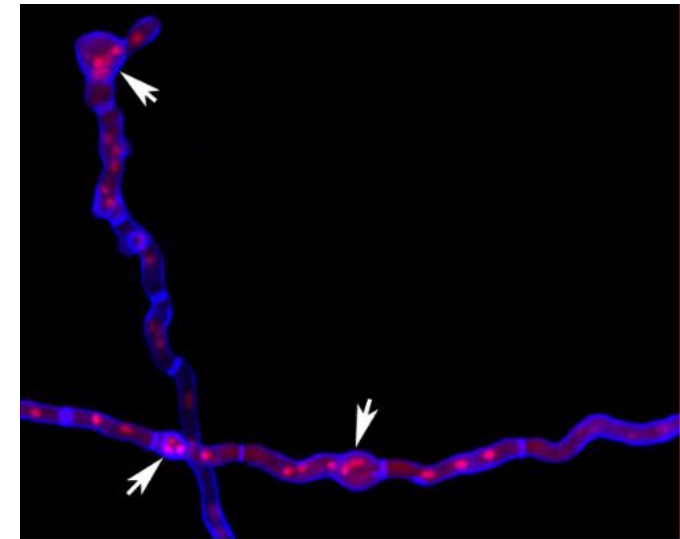
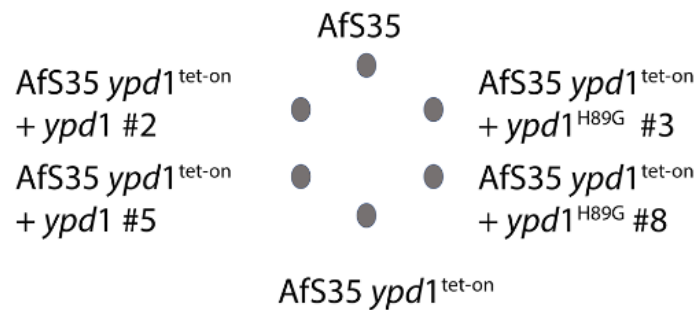
Another target: Ypd1

*ypd1*_{tet-on} without doxycyclin
phenotype resembles that of fludioxonil-treated
wild type hyphae

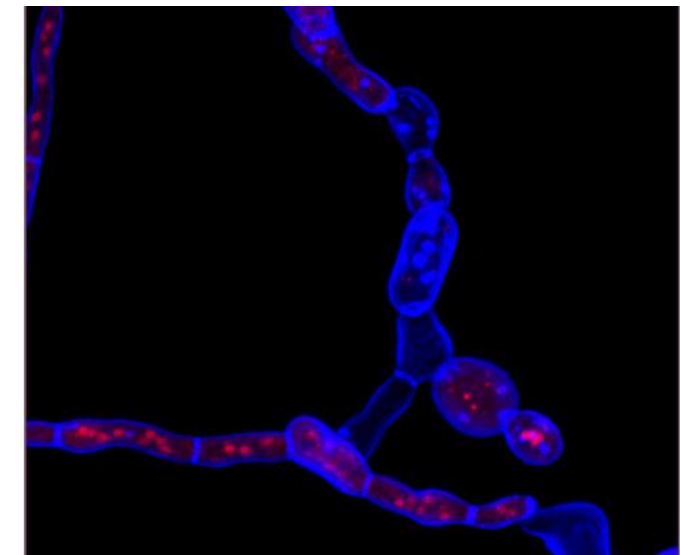
AMM
with doxy



AMM
w/o doxy



24h



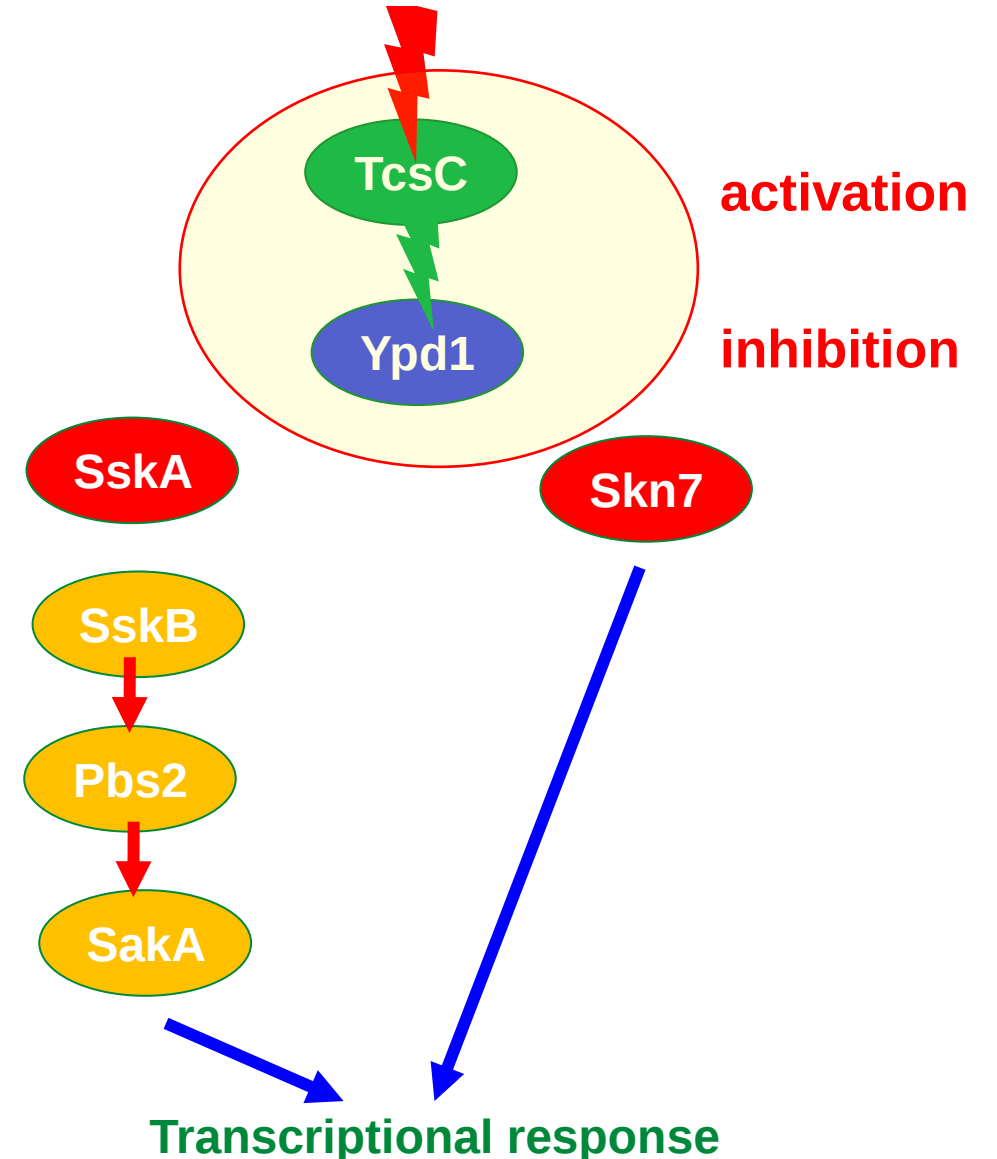
42h

chitin nuclei

High Osmolarity Glycerol (HOG) Pathway

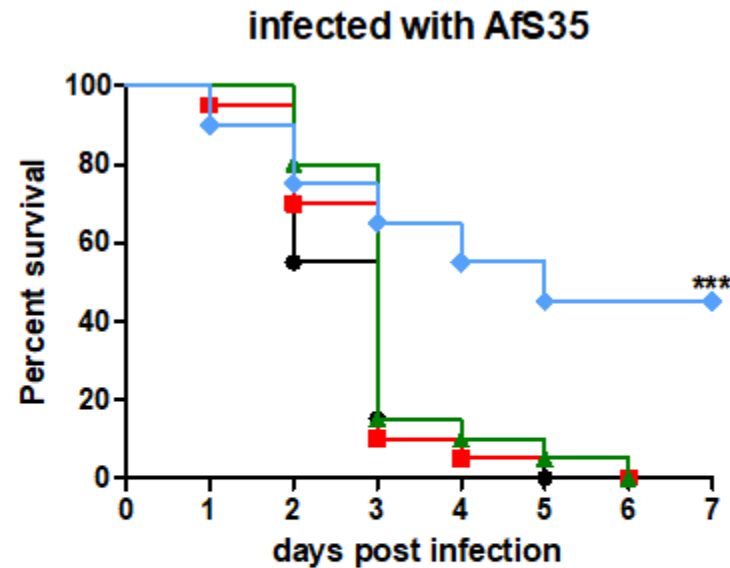
two-component sensor kinase
histidin phosphotransfer protein
response regulators

Hyperosmotic stress
Fludioxonil / Pyrrolnitrin



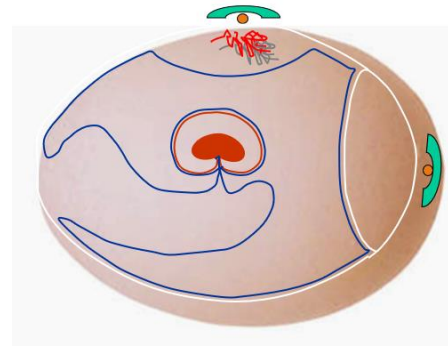
Mammals possess no orthologs
of Ypd1 and TcsC

Infection of Embryonated Eggs



- Af35/EtOH/EtOH/EtOH
- Af35/Flu50/EtOH/EtOH
- ▲ Af35/Flu50/Flu50/EtOH
- ◆ Af35/Flu50/Flu50/Flu50

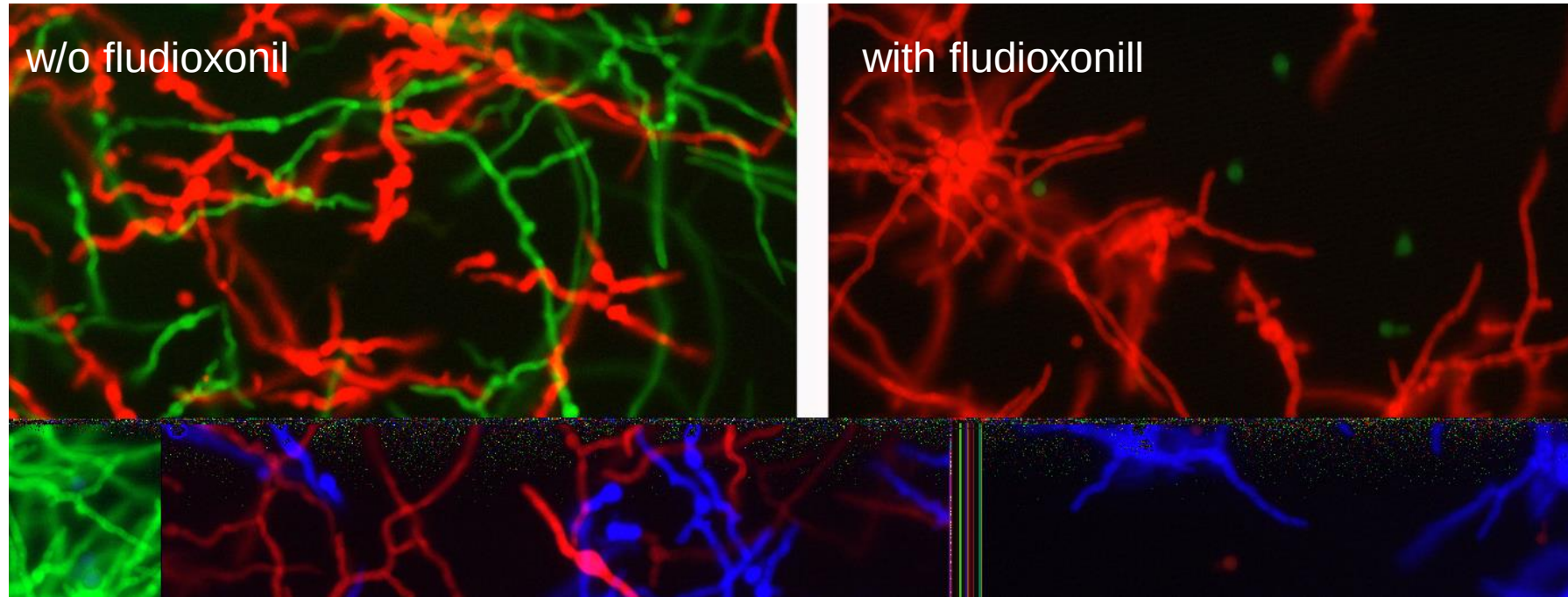
50 µg fludioxonil / EtOH
at day 1, 2, 3



The presence of albumin
has a negative impact on
the antifungal activity of
fludioxonil

Screening Assay for TcsC-dependent Antifungal Agents

- *A. nidulans* (RG 1)



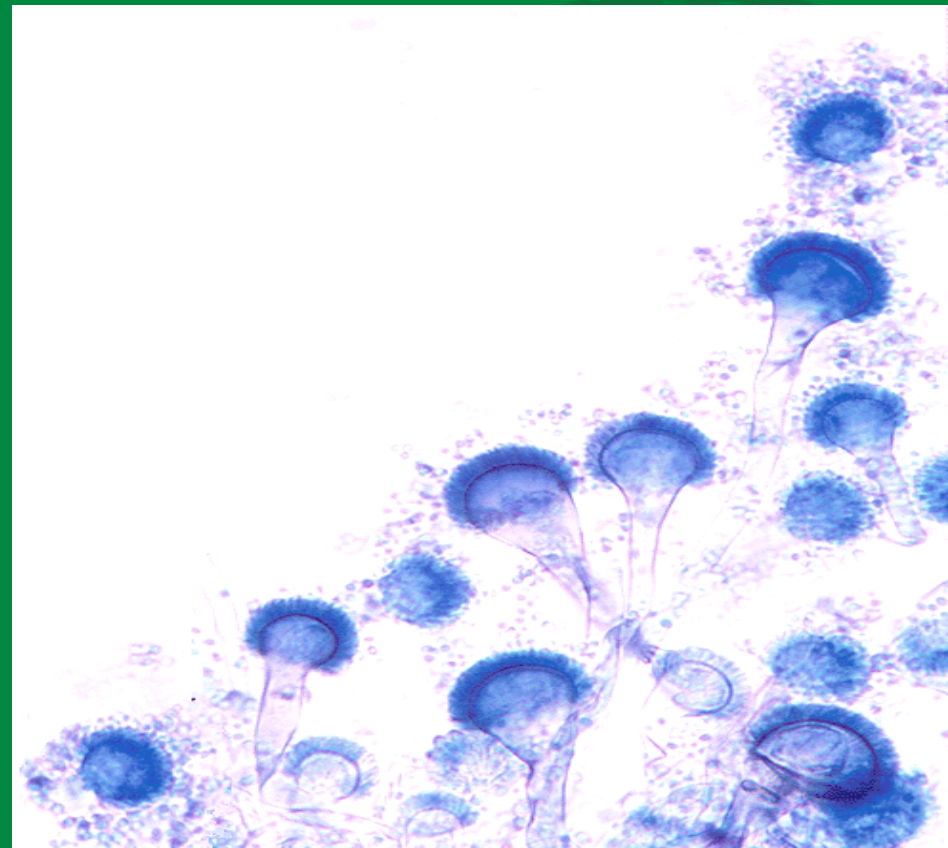
wild type strain (GFP) / $\Delta tcsC$ mutant (RFP)



Isabella Böhmer
Allison McCormick
Sebastian Schrüfer
Anja Spadinger
Anna Vincek
Anne Wiedemann

Ilse Jacobsen, HKI, Jena

Prof. Frank Ebel
Sonnenstr. 24 · 85764 Oberschleißheim · Tel. +49 89 2180-2534
frank.ebel@lmu.de





LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Herkunft wichtiger Antimykotika

Experimentelle Befunde über ein neues, oral wirksames Antimykotikum mit breitem Wirkungsspektrum

M. Plömpel, K. Bartmann, K. H. Büchel
und E. Regel

Forschungslaboratorien der Farbenfabriken Bayer AG,
Werk Elberfeld

Nach den Blut- und Gewebespiegeln, die mit verschiedenen Dosen von Bis-phenyl-(2-chlorphenyl)-1-imidazolyl-methan (BAY b 5097) bei Versuchstieren und Patienten erreicht werden, kann die Empfindlichkeitsgrenze pathogener Pilze in vivo mit 4–6 (–8) γ /ml angenommen werden. In diesem Konzentrationsbereich in vivo sicher erreichbar sind 1. alle geprüften Candida-Arten, vor allem C. albicans und C. tropicalis, 2. die Dermatophyten der Gattungen Trichophyton und Microsporon, 3. die Sproßpilze der Gattungen Coccidioides immitis, Paracoccidioides brasiliensis, Histoplasma capsulatum und Cryptococcus neoformans, 4. die Aspergillen, 5. die Chromomyceten der Gattungen Phialophora und Hormodendrum, 6. Cladosporium carrioni. In vivo möglicherweise noch erreichbar sind die Allescherien, das biphasische Sporotrichon Schenckii sowie Schimmelpilze der Gattungen Mucor und Blakeslea, die nur ausnahmsweise pathogen sind. Nicht mehr im In-vivo-Wirkungsspektrum liegen Madurella-Arten und die aufgrund ihrer Zellwandstruktur zu den Bakterien zählenden, aerob wachsenden Strahlenpilze Nocardia asteroides und N. brasiliensis. Nach unseren tierexperimentellen Daten wirkt BAY b 5097 bei oraler Applikation bei System- und Dermatomykosen in der erforderlichen Dosierung zuverlässig. Die optimale Therapiedauer im Tierexperiment beträgt bei System-Mykosen 8–12 Tage, bei Dermatomykosen 12–16 Tage, eine kürzere Therapiedauer führt zu Rezidiven.

Bis-phenyl-(2-chlorphenyl)-1-imidazolylmethan (BAY b 5097) wurde 1967 neben 600 weiteren Tritylimidazol-Derivaten in den Forschungslaboratorien der Farbenfabriken Bayer AG synthetisiert. Von anderen Triphenylmethan-Verbindungen war bekannt, daß sie zur Bildung reaktiver Carbonium-Ionen befähigt sind und molluskizide sowie blattfungizide Eigenschaften haben.

Chemie und allgemeine Eigenschaften: BAY b 5097 ist eine farblose, kristalline Substanz mit einem Schmelzpunkt von 143 °C. Sie reagiert schwach basisch und bildet mit anorganischen und organischen Säuren stabile Salze. Beim Erwärmen in wässrigen Säuren hydrolysiert BAY b 5097 rasch in Imidazol und 2-Chlor-tritylcarbinol, gegenüber Alkali ist die Substanz stabil. Die Löslichkeit der freien Base in Wasser, Benzin und Toluol ist gering, dagegen gut in Aceton, Chloroform, Essigester und Dimethylformamid.

sowie einige wichtige pharmakokinetische Eigenschaften von BAY b 5097 zusammengestellt:

Antimycetisches Wirkungsspektrum, Wirkungsintensität und Wirkungstyp

Das antimycetische Wirkungsspektrum in vitro wurde im Reihenverdünnungstest ermittelt, Wirkungsintensität und Wirkungstyp wurden im Warburg-Gerät an proliferierenden Keimen der Gattungen Trichophyton, Candida und Histoplasma bestimmt. Als Nährsubstrate dienten für Dermatophyten und Aspergillen Sabourauds »milieu d'épreuve«, für Sproßpilze Fleischwasser-Traubenzucker-Bouillon. Bebrütungstemperatur war 28° C, Bebrütungsdauer 24–96 Stunden.

In der Tabelle 1 sind die minimalen Hemmkonzentrationen von BAY b 5097 gegenüber verschiedenen Pilzspezies angegeben. Das antimycetische Wirkungsspektrum des

- Clotrimazol
- *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. Band 94, Nr. 26, 1969, S. 1356–1364
- 1967 über 600 Tritylimidazol-Derivate getestet
- Trityl = Triphenylmethyl (Schutzgruppe)

Herkunft wichtiger Antimykotika

Amphotericin B, a polyene-macrolactone from *Streptomyces nodosum* (1955)

Vancomycin, Erythromycin, Chloramphenicol

Amphotericin B, Nystatin



- **Echinocandins** derive from papulacandins isolated from a strain of *Papularia sphaerosperma*

> [J Antibiot \(Tokyo\)](#). 1977 Apr;30(4):289-96. doi: 10.7164/antibiotics.30.289 .

Papulacandins, a new family of antibiotics with antifungal activity, I. Fermentation, isolation, chemical and biological characterization of papulacandins A, B, C, D and E

P Traxler, J Gruner, J A Auden

WoRMS name details

★ ***Papularia* Fr., 1825**

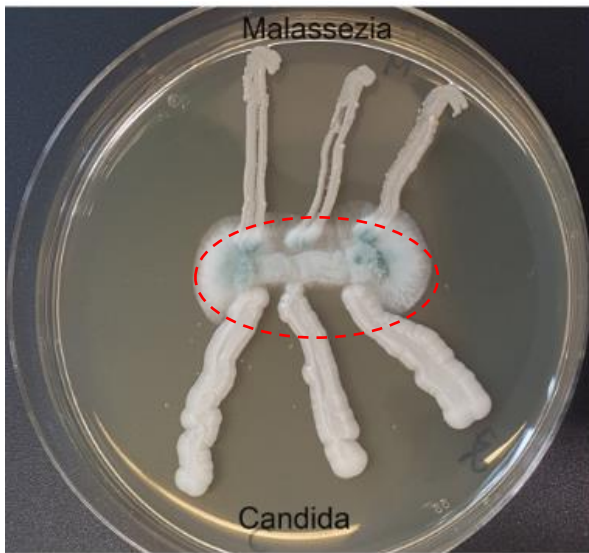
AphiaID 100235 (urn:lsid:marinespecies.org:taxname:100235)

Classification Biota > ★ [Fungi](#) (Kingdom) > ★ [Ascomycota](#) (Phylum (Division)) > ★ [Pezizomycotina](#) (Subphylum (Subdivision)) > ★ [Sordariomycetes](#) (Class) > ★ [Xylariomycetidae](#) (Subclass) > ★ [Xylariales](#) (Order) > ★ [Apiosporaceae](#) (Family) > ★ [Papularia](#) (Genus)

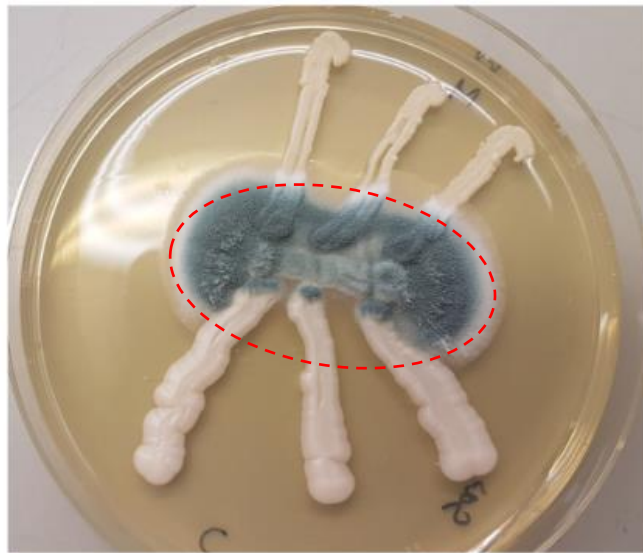


Antagonismus zwischen Pilzen

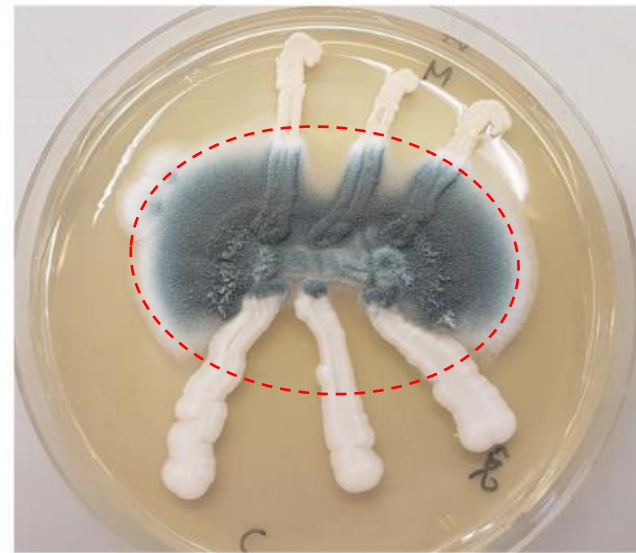
- *Aspergillus fumigatus*
- *Malassezia pachydermatis*



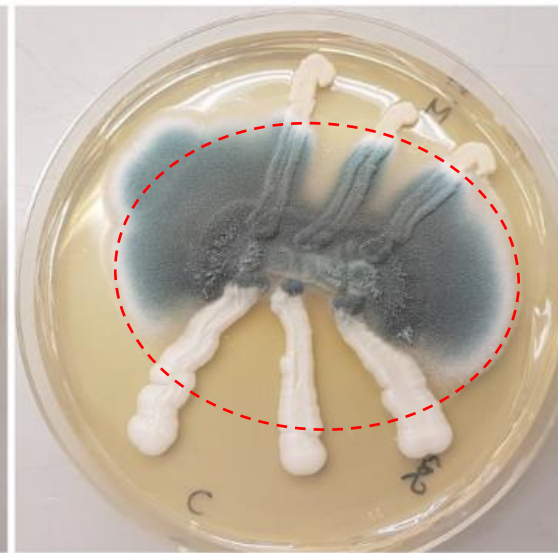
Tag 1



Tag 2



Tag 3



Tag 4

- *Candida albicans*