

# Paradigmenwechsel in der Entwicklung antiinfektiver Chemotherapeutika

Neue Methoden zur Entwicklung neuer Leitstrukturen

Ulrike Holzgrabe, Bonn, und Andreas Bechthold, Tübingen\*

„...dass ein Teil dieser Farbstoffe extra synthetisch hergestellt worden ist und dass jedes der Präparate systematisch auf Toxizität an einer Reihe von Tieren erprobt und dann im Heilversuch geprüft werden muss, so wird man die ungeheure Menge Arbeit, die im Laufe der Jahre geleistet werden muss, abschätzen können.“ So beklagt P. Ehrlich den Aufwand zur Entwicklung wirksamer Antiinfektiva gegen die Schlafkrankheit. Dies hat sich bis heute nicht entscheidend geändert. Die Pharmaindustrie nennt immer noch eine Zahl von etwa 10 000 Substanzen, die synthetisiert und pharmakologisch getestet müssen, ehe ein neuer Wirkstoff zur Marktreife kommt. Dies wiegt umso schwerer, als in den letzten Jahren ein Arsenal neuer Methoden zur Leitstruktursuche und -optimierung entwickelt worden ist. Hier seien die QSAR-Analyse, das Molecular Modelling und die kombinatorische Chemie auf der chemischen Seite und das Screening von Pflanzenextrakten und ähnlichen Naturprodukten und die kombinatorische Biochemie auf der biologischen Seite genannt. In der letzten Zeit stellt man weniger die Leitstruktur in den Mittelpunkt der Forschung, sondern man sucht umgekehrt erst ein geeignetes Target, gegen das ein Antiinfektivum entwickelt wird. Dieser Ansatz, der mit dem Human Genome Project möglich geworden ist, wird mit dem Schlagwort „Genomics“ charakterisiert.

**Schlüsselwörter:** QSAR, Molecular Modelling, kombinatorische Chemie und Biochemie, Naturstoffe, Genomics

*As early as 1910 Paul Ehrlich complained the huge amount of synthesis work and biological testing which is necessary to develop a new drug against the sleeping disease. This expenditure of drug development has not yet changed since that time. The pharmaceutical industry still speaks of 10,000 substances which have to be synthesized and pharmacologically evaluated till a new drug can make its way onto the market. This is, however, remarkable, because a lot of new techniques have been developed in the last years to look for new lead structures and to optimize the molecules. From the chemical point of view, QSAR analysis, Molecular Modelling and the combinatorial chemistry have to be mentioned. The biology provides the broad screening of extracts of plants, microbes and other natural products, and the combinatorial biochemistry. In the last few years the focus has moved from the lead structure to the target. Utilizing the genomics approach a target has to be identified in the first step. Subsequently an inhibitor of the target can be developed using the methods mentioned above.*

**Keywords:** QSAR analysis, Molecular Modelling, combinatorial chemistry and biochemistry, natural products, Genomics

## Historisches

Paul Ehrlich kann nicht nur als der Begründer der Immunologie, sondern auch der rationalen Antiinfektiva-Therapie angesehen werden. Vor P. Ehrlich wurde zum Beispiel die Syphilis martialis mit Quecksilber behandelt. Ehrlich ging hingegen systematisch zu Werke. Aus der

Beobachtung, dass sich Zellen und Zellbestandteile mit Farbstoffen selektiv anfärben lassen, leitete er die Hypothese ab, dass sich die Infektionserreger durch Bindung geeigneter Substanzen (Farbstoffe) auch selektiv abtöten lassen müssten: „Corpora non agunt nisi fixata“ schreibt er 1913 im Lancet [1]. Die Verabreichung von Methylenblau bei Mala-

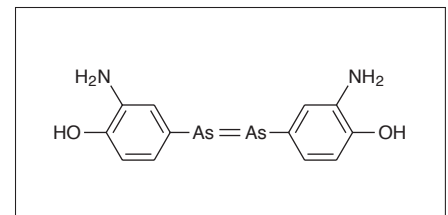


Abb. 1. Salvarsan

riakranken brachte folgerichtig eine Eindämmung des Fiebers. Ein Jahr später, 1892, fanden *Breindl* und *Thomas Atoxyll*<sup>®</sup> zur Behandlung der Schlafkrankheit. Ehrlich klärte 15 Jahre später die Struktur auf: Die vermeintliche Arsanilsäure stellte sich als 4-Aminophenylarsonsäure heraus. War der Ersatz der N=N-Gruppe in den Azofarbstoffen durch das giftige Arsen, das sich bei der Behandlung der Schlafkrankheit bewährt hatte, das erste rationale Drug Design? Salvarsan gegen Syphilis war gefunden (Abb. 1).

Ähnlich verlief die Entdeckung des Suramins: Ehrlich hatte mit Trypanosomen infizierte Mäuse durch eine Injektion mit Trypanrot heilen können. Strukturvariationen dieses Farbstoffs, insbesondere der Ersatz der Azogruppen gegen Amidfunktionen, führte 1920 zu Suramin, das bis heute gegen die Schlafkrankheit eingesetzt wird.

Azofarbstoffe fanden später Eingang in die Antiinfektiva-Therapie: 1932 beobachtete *G. Domagk*, dass das rote Sulfachrysiodin (Prontosil rubrum<sup>®</sup>) Streptokokken abtötet. Sulfachrysiodin würde man heute als Prodrug bezeichnen, das erst zu Sulfanilamid abgebaut werden muss, ehe es seine Wirkung tun kann.

## Anschriften der Verfasser:

Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe, Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn, Kreuzbergweg 26, 53115 Bonn

Priv.-Doz. Dr. Andreas Bechthold, Pharmazeutisches Institut der Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 8, 72076 Tübingen

\*Vortrag bei der Festveranstaltung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V. zur 90-jährigen Wiederkehr der Nobel-Preisverleihung an Paul Ehrlich, Frankfurt, 24. Oktober 1998.

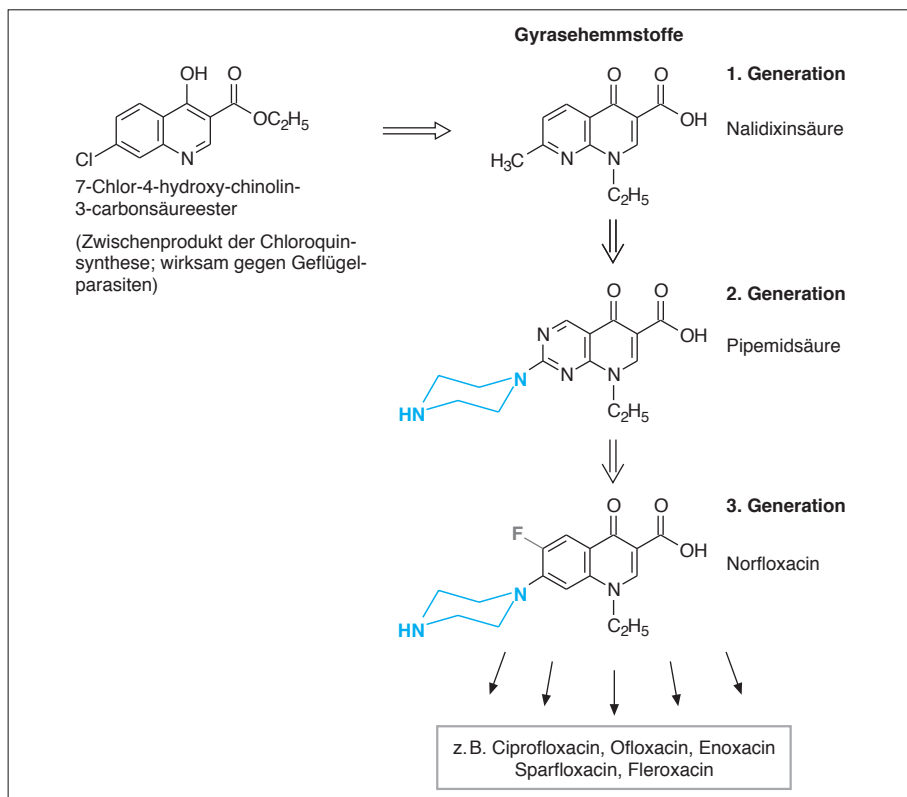


Abb. 2. Entwicklung der Gyrasehemmstoffe aus einem Chloroquin-Synthesezwischenprodukt

Diese Erkenntnis führte in den dreißiger Jahren zu einer Vielzahl von strukturell sehr ähnlichen Sulfonamiden.

Vor 70 Jahren entdeckte *Fleming* rein zufällig das Penicillin. In schneller Folge wurden aus Mikroorganismen Gramicidin, Streptomycin, Chloramphenicol und Tetracyclin isoliert, Letztere alle aus *Streptomyces*-Arten, die später bei einer ganz anderen Methode wichtig werden.

### Auf dem Weg vom blinden Screening zum rationalen Drug Design

Auf der Suche nach neuen Antiinfektiva wurden vor etwa 40 Jahren die Zwischenprodukte der Chloroquin-Synthese, einer Substanz, die sich von dem Naturstoff Chinin ableitet, auf ihre antimikrobielle Aktivität getestet. Dabei zeigte der

7-Chlor-4-hydroxychinolin-3-carbonsäureester gute Wirksamkeit gegen Geflügelparasiten (Abb. 2). Die Substanz wurde optimiert und kam 1962 als Nalidixinsäure (Nogram<sup>®</sup>) in den Handel. Da sie schlecht resorbiert wurde und kein breites Erregerspektrum aufwies, konnte sie nur bei Harnwegsinfekten eingesetzt werden. 15 Jahre später wurde dieses Manko durch Einführung eines Piperazinrings in 7-Stellung des Grundgerüsts behoben. Die Pipemidsäure (Deblaston<sup>®</sup>) konnte wesentlich breiter eingesetzt werden. Erst mit der Fluorsubstitution in 6-Position wurde die Substanzgruppe interessant. Damit hatte man eine neue Leitstruktur gefunden; die so genannten *Fluorchinolone* bewährten sich als Gyrasehemmstoffe. Ausgehend vom Norfloxacin (Barazan<sup>®</sup>) wurden eine Vielzahl von Substanzen in den Markt eingeführt.

Am Beispiel der 1-Phenyl-substituierten Fluorchinolone soll gezeigt werden, wie man eine solche neue Leitstruktur möglichst schnell in Bezug auf Pharmakodynamik und Pharmakokinetik optimieren kann. In den fünfziger Jahren wurde von *C. Hansch* die Analyse „Quantitativer Struktur-Wirkungsbeziehungen“ (QSAR) [2] eingeführt. Hier wird versucht, die biologischen Aktivitäten von Substanzen mit physikochemischen Parametern zu korrelieren, d. h. die unterschiedlichen Aktivitäten mit physikochemischen Eigenschaften, die an bestimmte Strukturelemente eines Wirkstoffs geknüpft sind, zu erklären. Dies sei an einem congenen Satz von 4-Fluorchinolonen demonstriert, die am N1-

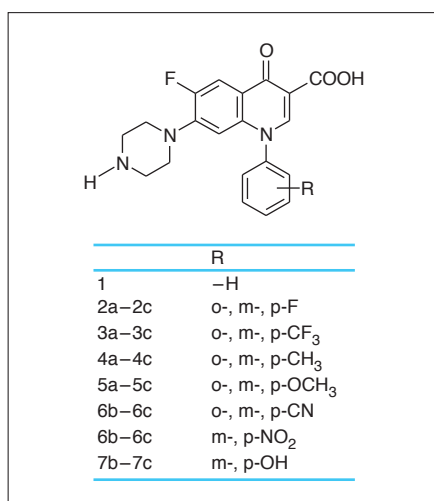


Abb. 3. Congenere Reihe 1-phenylsubstituierter 6-Fluor-7-piperazin-4-quinolon-3-carbonsäuren

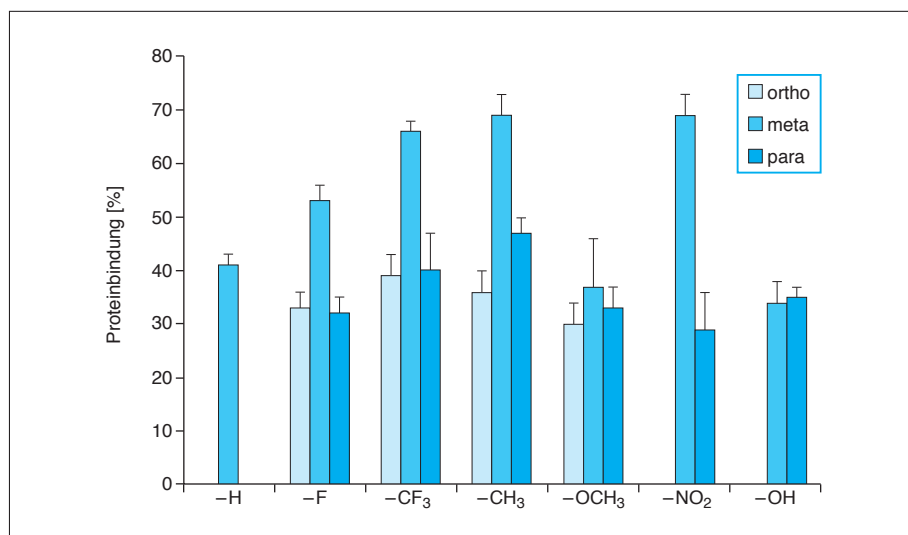


Abb. 4. Prozent der Proteinbindung in Abhängigkeit von der Substitution am 1-Phenylring der Fluorchinolone

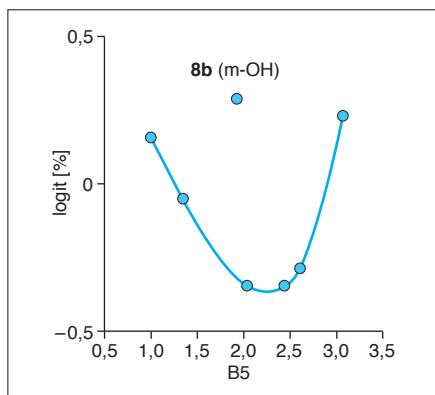


Abb. 5. Bilinearer Zusammenhang zwischen dem Anteil an Proteinbindung (logit %) und der Größe des Substituenten in meta-Position am N1-Phenylring

Phenylring in jeweils *ortho*-, *meta*- und *para*-Position Substituenten aufweisen, die sich in Bezug auf Lipophilie und elektronische Eigenschaften möglichst stark voneinander unterscheiden (Abb. 3). Von allen Derivaten wurden minimale Hemmkonzentrationen gegen verschiedene Bakterien sowie die 90-prozentige Hemmung der Gyrase (aus *E. coli*) bestimmt und nach Korrelationen mit den unterschiedlichsten physikochemischen Parametern wie elektronische Eigenschaften ( $pK_a$ -Werte,  $\sigma$ ), Lipophilie ( $\log P$ ,  $\log k'$ ,  $R_m$ ) und Größe (sterischer Bulk: Verloop-Parameter  $L$ ,  $B_1$  und  $B_5$ ) gesucht [3]. Multiple Regressionsanalysen führten zu folgender signifikanten Korrelation:

$$\log 1/\text{MIC}_{E. coli} = -0,702 (0,34)I_{OH} - 8,34 (0,16) L + 8,58(0,54)$$

$$n = 19; r^2 = 0,64; s = 0,43; F = 14$$

( $n$  = Zahl der Verbindungen,  $r^2$  = Regressions-Koeffizient,  $s$  = Standardabweichung,

$F$  = Verhältnis der erklärten zur nicht erklärten Varianz)

Aus der Gleichung ergibt sich eine negative Korrelation sowohl mit der Größe der Substituenten als auch der Anwesenheit einer OH-Gruppe, oder umgekehrt formuliert, günstig sind kleine Substituenten sowie die Abwesenheit einer Phenolgruppe. Letzteres ist sicher mit Transportphänomenen in die Bakterienzelle zu erklären. Die Korrelation mit der Hemmung des Enzyms sieht etwas anders aus:

$$\log 1/c_{90\% \text{ inhib.}} = 0,879 (0,31)I_{OH} - 5,89 (0,19) B_5 - 1,32(0,54) R_m + 0,67 (0,64)$$

$$n = 16; r^2 = 0,78; s = 0,40; F = 14,6$$

Wieder zeigt sich eine negative Korrelation mit der Substituentengröße, zusätzlich ergibt sich eine negative Korre-

lation mit der Lipophilie und diesmal eine positive Korrelation mit der Anwesenheit einer OH-Gruppe. Dazu ist zu bemerken, dass die *p*-Hydroxyphenyl-substituierte Substanz im Enzymtest sich als das aktivste Chinolon erwies. Die Unterschiede zwischen Ganzzell- und zellfreiem System, die sich aus den Regressionsgleichungen ergeben, lassen sich heute mit den unterschiedlichen Angriffspunkten der Chinolone, der Topoisomerase II und IV, erklären [4].

Da die Proteinbindung ebenfalls mit der Bindung an relativ spezifische Proteine, zumeist Albumin, einhergeht, kann man das Ausmaß der Proteinbindung, bestimmt an Plasma im Hilfe der Ultrafiltration, mit physikochemischen Parametern korrelieren. Auffällig ist auf den ersten Blick, dass die Proteinbindung stark von den Substituenten in meta-Stellung am Phenylring abhängt (Abb. 4). Die Variationen sind hier viel größer (30 bis 70 %) als in *ortho*- und *para*-Stellung (30 bis 40 %). Deshalb wurden in der Regressionsanalyse nur diese Substanzen berücksichtigt.

$$\text{logit}(\%) = -0,64(0,03) B_5 - 4,59 (0,22)\log(\beta B_5 + 1) + 0,78(0,55)$$

$$n = 6; r^2 = 1,00; s = 0,01; F = 2727$$

In der bilinearen Korrelation ergibt sich ein Maximum der Proteinbindung bei einer bestimmten Größe der Substituenten ( $B_{5 \text{ opt}} = 2,05 \approx \text{methyl}$ ), d. h. größere oder kleinere Substituenten bewirken ein kleineres Ausmaß an Proteinbindung (Abb. 5) [5].

Fasst man nun beide QSAR-Analysen zusammen, so wundert es nicht, dass die Gyrasehemmstoffe der letzten Generation [6], die einen N1-Phenylring aufweisen, in *ortho*- und *para*-Stellung einen Fluorrest aufweisen, der der kleinste Nicht-Wasserstoffsubstituent ist (Abb. 6). Auffällig bei allen neuen Gyrasehemmstoffen ist, dass es keinerlei Änderung der Leitstruktur gibt. Auch die 2-Pyridone, deren erster Vertreter, das ABT-719 [7], in der klinischen Prüfung ist, sind aus rein chemischer Sicht keine Innovation; es sind immer noch vinyloge Amide!

Was kann man mit QSAR-Analysen erreichen? Einerseits kann retrospektiv die biologische Aktivität innerhalb einer congenen Substanzreihe mit physikochemischen Eigenschaften erklärt werden. Daraus können häufig Rückschlüs-

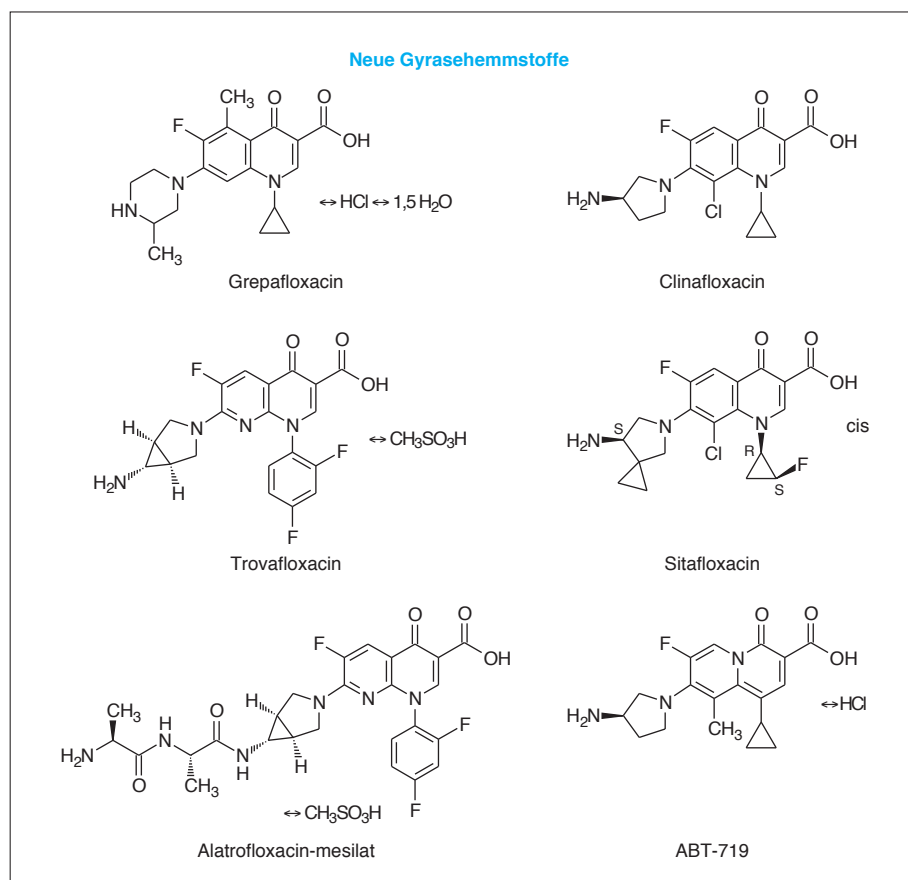


Abb. 6. Gyrasehemmstoffe der neuesten Generation

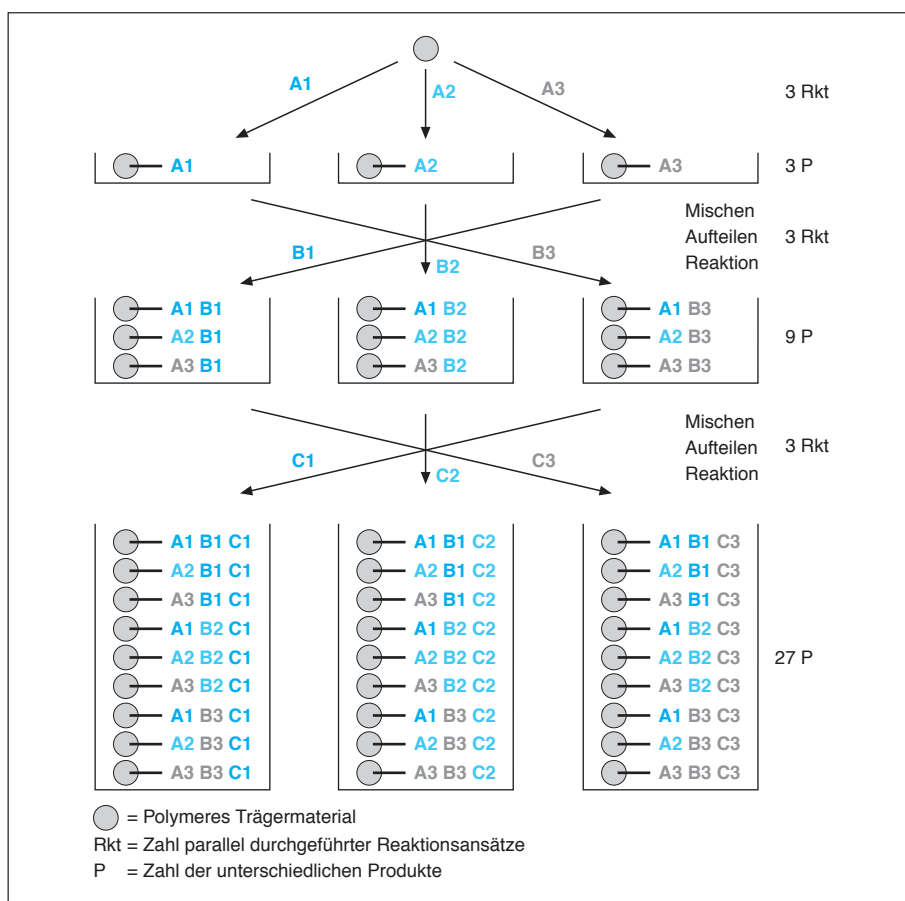


Abb. 7. Split-and-Pool-Methode der kombinatorischen Synthese

se auf das molekulare Aussehen der Bindungsstelle am Zielprotein gezogen werden. Außerdem sind häufig Vorhersagen über die Wirksamkeit noch nicht synthetisierter Substanzen möglich. Dies kann entscheidend sowohl den Synthesaufwand als auch die Zahl der pharmakologischen Testungen senken. Es ist aber nicht möglich, mit dieser Methode zu neuen Leitstrukturen zu kommen, denn

Extrapolationen außerhalb des Substanzschatzes sind nicht valide.

*Molecular-Modelling*-Untersuchungen sind eher geeignet, zu neuen Leitstrukturen zu kommen, wie kürzlich bei der Entwicklung neuer HIV-Proteasehemmer gezeigt wurde. Vor etwa zehn Jahren konnte man sowohl die 3D-Struktur der HIV-Protease, ein Enzym, das die bei der Virusvermehrung synthe-

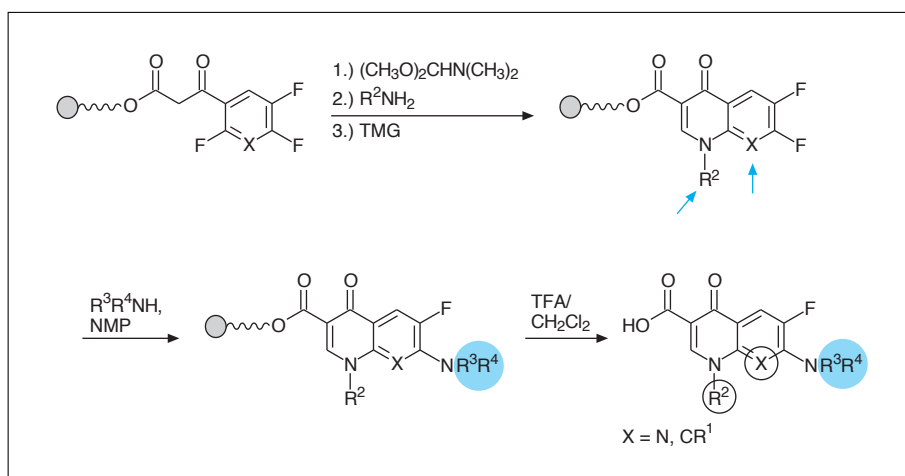


Abb. 8. Kombinatorische Synthese von Gyrasehemmern nach Cody und deWitt

tisierten Polypeptide in funktionelle Proteine zerschneidet, als auch einiger Enzym-Inhibitor-Komplexe bestimmen. Dabei wurde ein Minimalsubstrat, ein Heptapeptid (Ser-Leu-Asn-Phe-Pro-Ile-Val) identifiziert, das in der Folge durch systematische Strukturvariation erst am Computer und dann im Labor optimiert wurde. Saquinavir ist das Produkt dieser erfolgreichen Bemühungen. Molecular Modelling führt insbesondere dann sehr schnell zum Ziel, wenn man – wie eben gezeigt – die Zielstruktur eines Wirkstoffs gut kennt. So wundert es nicht, dass weitere HIV-Protease-Hemmer am Computer designed worden sind [8, 9]. Fehlt die Struktur des Target, was zu meist der Fall ist, so ist das Auffinden neuer Leitstrukturen mit Hilfe des Computers schwierig.

## Kombinatorik zur Erhöhung der Diversität

Lange Jahre waren die Chemiker in der Lage, schneller zu synthetisieren, als die Pharmakologen die neuen Substanzen testen konnten. Mit der Einführung des High-Throughput-Screenings (HTS) kehrten sich die Verhältnisse um. So musste man nach neuen Methoden zur schnellen Synthese vieler Substanzen suchen. Die Idee der Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield [10] aufnehmend, wurde die Kombinatorik entwickelt [11], deren geistiger „Urvater“ vielleicht *Leibniz* mit seiner Diplomarbeit „De Arte Combinatoria“ gewesen ist. Sie wurde in den Anfängen als „Drug Discovery on the Assembly Line“ gefeiert, als eine Revolution, die der Einführung des Fließbandes in der Autoproduktion durch Henry Ford gleichkommt [12, 13].

Repräsentativ für viele verschiedene, aber prinzipiell ähnliche Techniken sei hier die Split-and-Pool-Methode vorgestellt. Abbildung 7 zeigt, wie drei verschiedene Substanzen an eine polymere feste Phase gekoppelt werden, diese werden gemischt, so dass in jedem der drei Töpfe je eine Substanz enthalten ist. Diese werden wiederum mit drei Partnern umgesetzt, so dass neun Produkte entstehen, die ebenfalls auf die drei Töpfe gleichmäßig verteilt werden. Im letzten Schritt dieses Beispiels wird nochmals mit drei Reaktanten umgesetzt. Auf diese Weise werden nach dem One-Bead-one-Compound-Konzept in neun Reaktionsschritten 27 verschiedene Pro-

dukte hergestellt. Dafür hätte man in der klassischen Synthese 81 Reaktionen benötigt. Man spricht von so genannten *Substanzbibliotheken*, die auf diese Weise in kurzer Zeit produziert und dem HTS zugeführt werden können. Dies kann zum Beispiel auf die parallele Synthese von Chinolonderivaten angewendet werden [14]. Benzoylessigsäure wird an ein Wang-Harz gebunden, nach Knoevenagel mit Dimethylformamidmethylacetal und drei verschiedenen primären Aminen zu Enaminen umgesetzt und zyklisiert. Durch nukleophile Substitution des Fluoratoms gegen vier verschiedene zyklische Amine erhält man 36 Gyrasehemstoffe, die als letzten Schritt noch von dem Harz abgespalten werden müssen (Abb. 8). Bestandteil der Bibliothek war Ciprofloxacin. Ob bei dieser kombinatorischen Synthese neue, wirksamere Derivate erhalten wurden, ist nicht bekannt.

Der Vorteil der kombinatorischen Synthese ist sicher, dass in kurzer Zeit Substanzbibliotheken mit einer gewissen Diversität erstellt werden können. Insbesondere bei der Split-Methode und anderen ähnlichen Techniken stellt sich jedoch die Frage, ob unter den Gemischen, die sich in den Töpfen befinden, mittelwirksame Substanzen, die eventuell zu interessanten Arzneistoffen opti-

miert werden könnten, gefunden werden. Hinzu kommt, dass aus dem Substanzgemisch in einem Topf nach dem Screening der „Hit“ herausgefischt werden muss. Dieser Prozess, die Dekonvolution, ist recht aufwendig. So wundert es nicht, dass heute häufig die Methode so genutzt wird, dass in jedem Töpfchen nur eine Substanz synthetisiert wird, die dem HTS zugeführt wird. Damit kann man eigentlich nicht mehr von Kombinatorik reden, sondern nur noch von Robotik [15]. Trotz des unbestrittenen Vorteils der Erzeugung von Diversität in großen Substanzbibliotheken, muss die Kombinatorik noch den Beweis antreten, dass man mit ihrer Hilfe effizient neue Leitstrukturen finden kann. Der erwartete Boom an neuen Leitsubstanzen ist bisher ausgeblieben. Dafür wird die Kombinatorik umso häufiger bei der Optimierung von Leitstrukturen eingesetzt.

## Antiinfektiva und Chemotherapeutika aus der Natur

Schon sehr früh hat man die Heilwirkung von Extrakten aus Pflanzen erkannt. So heißt es zum Beispiel schon 340 n. Chr. in den „Rezepten für den Notfall“ der traditionellen chinesischen Medizin: „Man nehme eine Hand voll qing hao, weiche sie in einem shang (ca. 1 l) Wasser ein, siebe die Flüssigkeit und trinke sie, um das Fieber zu unterdrücken.“ Heute wissen wir, dass dieser Extrakt aus *Artemisia annua*, der bei Malaria eingesetzt wurde, als wirksames Prinzip (= quin hao su) Artemisinin enthält, das sehr stark gegen Blutschizonten wirkt (IC<sub>50</sub> etwa 0,6 bis 6 µg/ml) [16]. Die aus den Artemisia-Arten isolierte Substanz, ein Sesquiterpenlacton, ist aufgrund schlechter Wasserlöslichkeit und unvollständiger Resorption durch eine schlechte Biover-

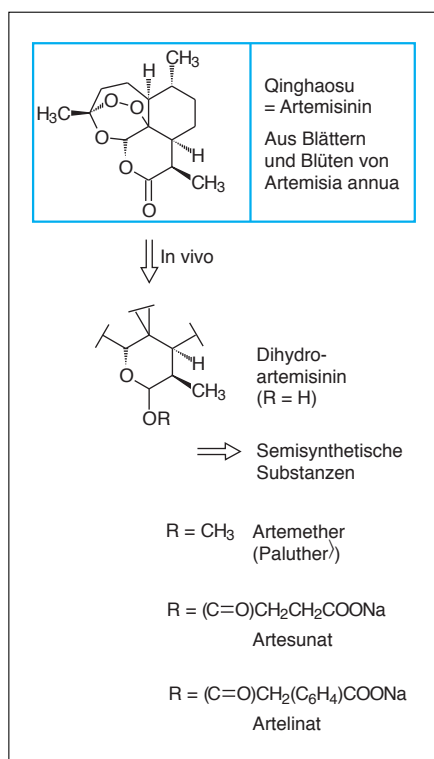


Abb. 9. Artemisinin und davon abgeleitete Arzneistoffe zur klinischen Anwendung

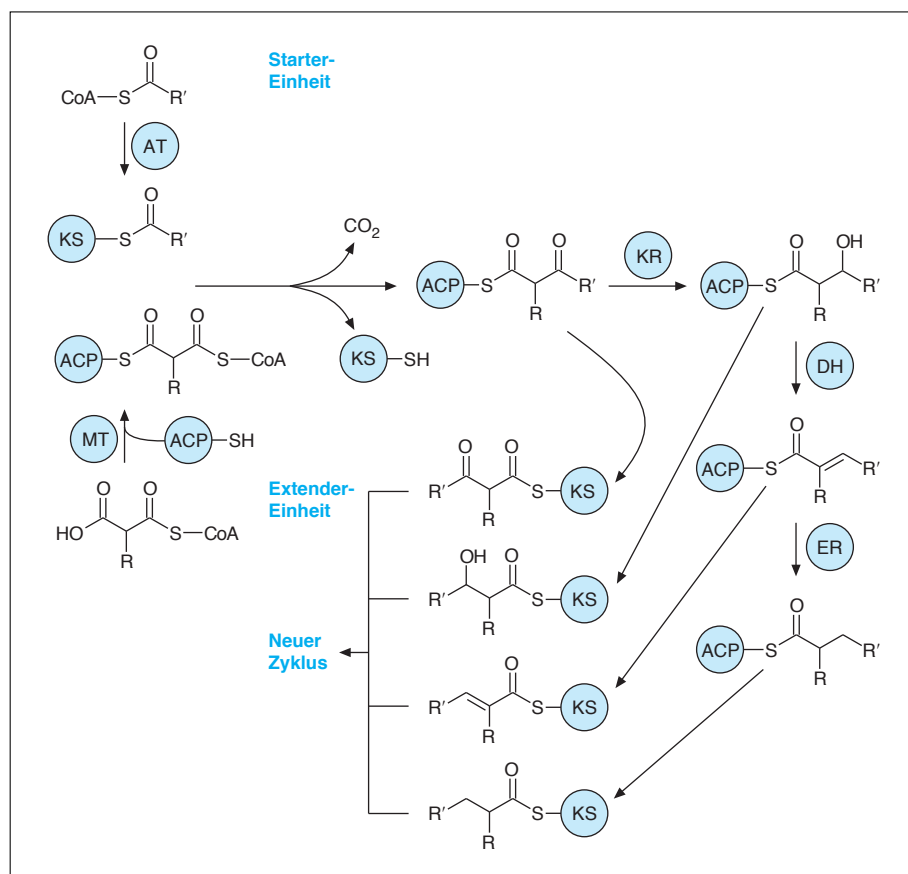


Abb. 10. Mögliche Reaktionen der Polyketidbiosynthese. Die Polyketidbiosynthese wird initiiert durch Anlagerung eines Acyl-Restes (Starter-Einheit), der als CoA-Ester in der Zelle vorkommt, an die Ketosynthasekomponente (KS) der Polyketidsynthase. Eine „Extender-Einheit“, ebenfalls als CoA-Ester vorkommend, wird auf die Phosphopantotheinylgruppe der Acyl-Carrier-Komponente (ACP) gebunden (AT: Acyltransferase, MT: Malonyltransferase). Anschließend erfolgt die Kondensation beider Einheiten unter CO<sub>2</sub>-Abspaltung. Diese nun verlängerte Kette verbleibt am ACP und kann während der Biosynthese durch Reduktasen (KR), Dehydratasen (DH) und Enoyl-Reduktasen (ER) verändert werden, bevor sie in einem weiteren Zyklus verlängert wird.

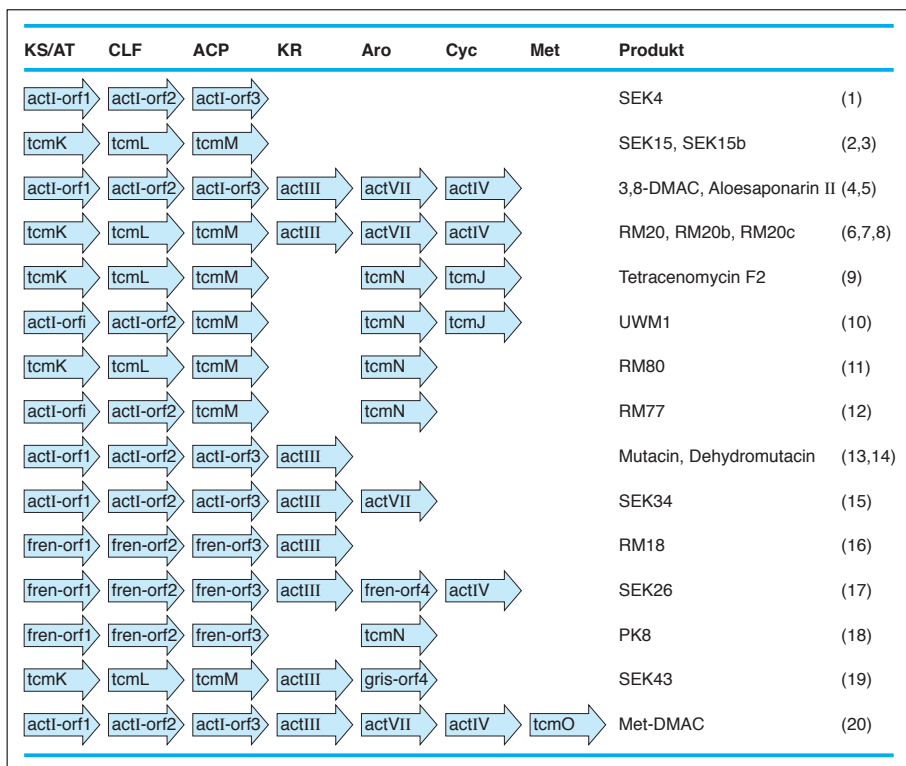


Abb. 11a. Auswahl an Biosynthese-Genkombinationen zur Produktion neuer Naturstoffe in *S. coelicolor* CH999. KS/AT: Ketosynthase/Acyltransferase, CLF: Kettenlängenfaktorprotein, ACP: Acyl-Carrier-Protein, KR: Ketoreduktase, Aro: Aromatase, Cyc: Cyclase, Met: Methyltransferase; act: Gen aus Actinorhodin-Biosynthese-Gencluster, tcm: Gen aus Tetracenomycin-Biosynthese-Gencluster, fren: Gen aus Frenolicin-Biosynthese-Gencluster, gris: Gen aus Griseusin-Biosynthese-Gencluster.

fugbarkeit gekennzeichnet. In vivo wird Artemisinin schnell zu einem Halbketal umgesetzt, das besser bioverfügbar und stärker wirksam ist (Abb. 9). Da dieses Halbketal im sauren Medium des Magens chemisch instabil ist, wurden eine Vielzahl von Derivaten des Halbketals hergestellt: Der Artemether ist inzwischen als Paluther<sup>®</sup> im Handel. Entsprechende Ester sind in der klinischen Prüfung (Abb. 9). Interessanterweise ist der Wirkungsmechanismus dieser Substanzgruppe bis heute nicht endgültig geklärt [17].

Paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>) aus *Taxus brevifolia*, ein Hemmstoff der Tubulinpolymerisation, hat in den letzten Jahren Furore gemacht, da diese sehr stark wirksame Substanz nur in kleinsten Mengen in Eiben zu finden ist. Seit man dieses Problem gelöst hat [18], ist Paclitaxel und das Derivat Docetaxel (Taxotere<sup>®</sup>) im Handel. Und die Optimierung der Substanz geht weiter: I. Ojima stellte auf der ACS-Tagung in Boston 1998 [19] schon die zweite Generation der Taxoide vor, fluorierte Derivate, die eine höhere Zytotoxizität bei langsamerer Metabolisierung zeigen. Epothilon A und B wurden aus

dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* isoliert [20]. Sie haben den gleichen Wirkungsmechanismus wie Paclitaxel, zeichnen sich aber durch bessere Wasserlöslichkeit und stärkere Wirksamkeit gegen Multiple-Drug-Resistance-Zelllinien aus und sind somit interessante Kandidaten für die klinische Prüfung.

Auch Camptothecin aus *Camptotheca accuminata*, ein Hemmstoff der Topoisomerase I [21], wurde chemisch verändert. In der Zytostatika-Therapie werden Topotecan (Hycamtin<sup>®</sup>) und Irinotecan (Campto<sup>®</sup>) bereits routinemäßig eingesetzt, weitere Topoisomerase-Hemmer sind in der klinischen Prüfung [23].

Die zyklischen Endiine, wie Esperamycin aus *Actinomadura verrucosopora*, Calicheamycine aus *Micromonospora echinospora* und Dynemicin aus *Micromonospora chersina*, werden auf ihre klinische Anwendbarkeit getestet. Vielleicht noch Zukunftsmusik ist Leinamycin, das 1989 aus *Streptomyces*-Arten isoliert wurde [24], und O<sub>2</sub> zu O<sub>2</sub>-Radikalen umwandelt, die die DNS zerstören [25], bzw. die DNS über einen komplexen Mechanismus alkyliert [26]. Bisher wenig untersucht sind die Inhalts-

stoffe von marinen Organismen, wie zum Beispiel Schwämmen. Hier wurden kürzlich marine Makrolide isoliert, wie Spongistatin aus *Spirastrella spinispirulifera*, Cinachyrolid A aus *Cinachyra sp.* oder Althohyrine aus *Hyrtios altum*. Diese zu den Spongistatinen zählenden Substanzen sind hochpotente Mitosehemmstoffe und damit ernst zu nehmende Kandidaten für die Chemotherapie [27]. Auch schon lange bekannte Naturstoffe, wie zum Beispiel die peptidischen Lantibiotika Nisin und Mersacidin [28, 29], können – nach Aufklärung des Wirkungsmechanismus – zu interessanten Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Antibiotika werden.

Diese wenigen ausgewählten Beispiele zeigen schon sehr eindrucksvoll, dass in der Natur ein hohes Potential an Biodiversität zu finden ist. Auch in Zukunft wird das Screening von Extrakten eine der wichtigsten Quellen bei der Suche nach ganz neuen Leitstrukturen sein. Partialsynthesen werden helfen, diese Leitstrukturen insbesondere in Bezug auf die Pharmakokinetik zu optimieren.

## Kombinatorische Biosynthese

Nach dem eben Ausgeführten liegt es eigentlich nahe, die Natur zu nutzen, um neue Substanzen, so genannte unnatürliche natürliche Produkte, herzustellen, die wiederum ganz neue Leitstrukturen sein könnten. Dieses wird mit der „Kombinatorischen Biosynthese“ möglich. Zu Beginn der 80er-Jahre [31–33] konnte in mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Arbeiten gezeigt werden, dass die Gene, die für die Biosynthese eines von einem Streptomyceten gebildeten Naturstoffes verantwortlich sind, auf dem Genom geclustert vorliegen. Verfahren wurden entwickelt, die die Klonierung dieser Biosynthese-Gencluster ermöglichten.

Besonders intensiv wurden Substanzen bearbeitet, die zu den Polyketiden gehören. Diese werden durch Polyketidsynthasen gebildet, die die Verknüpfung von Acyl-CoA-Einheiten zu verschiedenartigen Ringsystemen katalysieren. Die Biosynthese wird initiiert durch Anlagerung eines Acyl-Restes (Starter-Einheit), der als CoA-Ester in der Zelle vorkommt, an die Ketosynthasekomponente der Polyketidsynthase. Eine „Extender-Einheit“, ebenfalls ein CoA-Ester, wird an die Phosphopantetheinylgruppe der

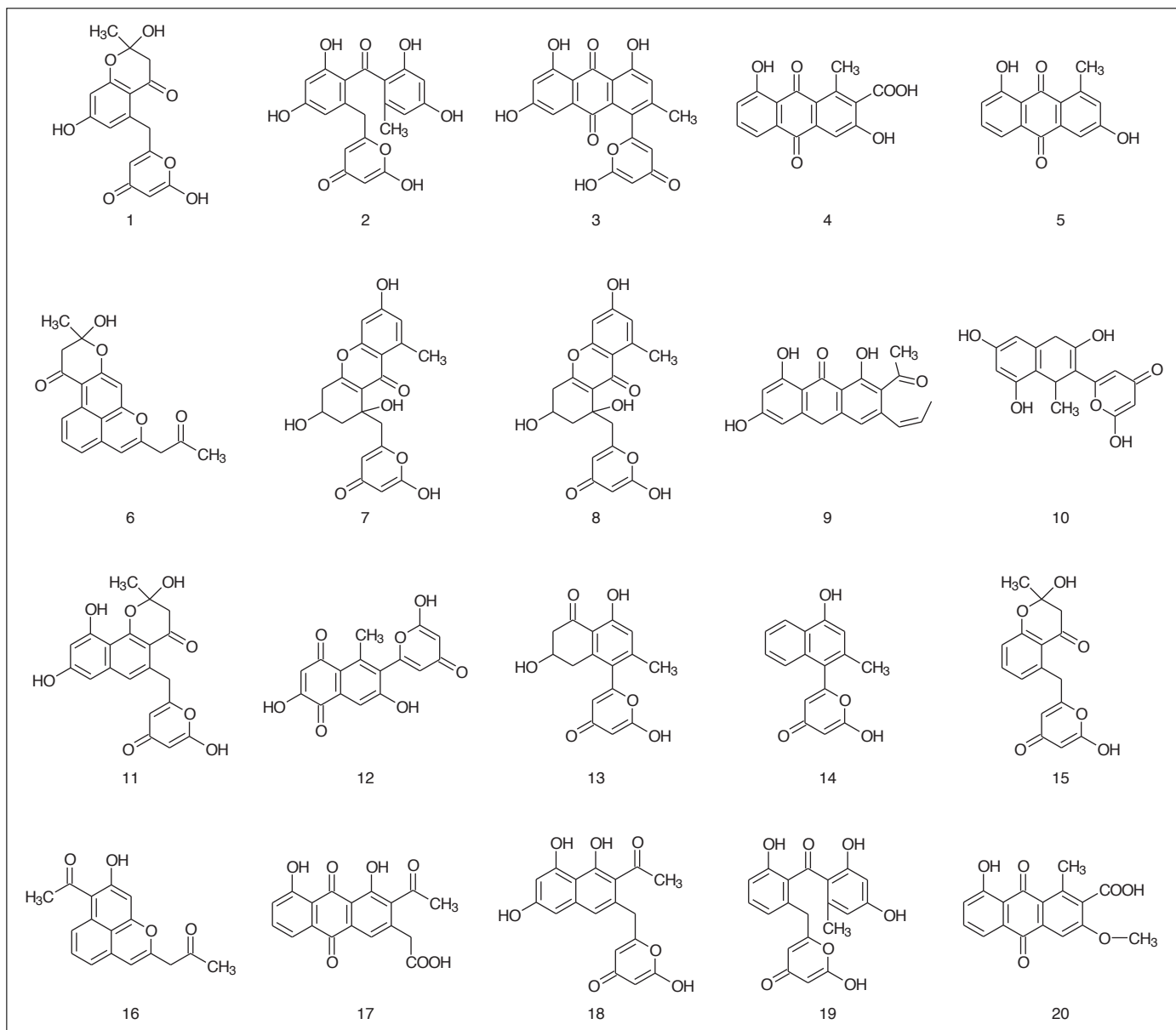


Abb. 11b. Strukturformeln einiger durch Neukombination von Biosynthesegenen hergestellter Substanzen. 1: SEK4, 2: SEK25, 3: SEK15b, 4: 3,8-DMAC, 5: Aloesaponarin, 6: RM20, 7: RM20b, 8: RM20c, 9: Tetracenomycin F2, 10: UWM1, 11: RM80, 12: RM77, 13: Mutacin, 14: Dehydromutacin, 15: SEK34, 16: RM18, 17: SEK26, 18: PK8, 19: SEK43, 20: Met-DMAC.

Acyl-Carrier-Komponente gebunden. Anschließend erfolgt die Kondensation beider Einheiten unter Decarboxylierung. Diese nun verlängerte Kette kann während der Biosynthese durch Reduktasen, Dehydratasen und Enoylreduktasen verändert werden, bevor sie in einem weiteren Zyklus weiter verlängert wird (Abb. 10) [34].

Polyketidsynthase-Gene wurden in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen gefunden. Sie lassen sich aufgrund ihrer Struktur in drei Gruppen einteilen. Die zur ersten Gruppe gehörenden Polyketidsynthasen wurden bei Eukaryonten und bisher bei einem Streptomyceten-Stamm gefunden. Es handelt sich hierbei um

große, multifunktionale Enzyme, die den Aufbau der Polyketidgrundstrukturen katalysieren. Dabei wird eine „iterative“ Funktionsweise angenommen. Jedes katalytische Zentrum des Enzyms agiert mehrmals an der wachsenden Polyketidkette. Sehr gut untersucht ist eine Methylsalicylsäure-Synthase aus *Penicillium patulum*, die die Bildung von Methylsalicylsäure aus Acetyl-CoA-Einheiten katalysiert [35]. Das Enzym besitzt verschiedene katalytische Zentren (ACP, KS, AT, DH, KR), die alle nötigen Schritte der Biosynthese durchführen.

Bei Prokaryonten wurden zwei Typen Polyketidsynthasen gefunden, die als

modulare oder iterative Polyketidsynthasen bezeichnet werden. Zu den modularen (Typ-I-Polyketidsynthasen) gehört beispielsweise die Polyketidsynthase aus *Saccharopolyspora erythraea*, die die Biosynthese des Erythromycin-Aglykons katalysiert [34]. Sie besteht aus drei Untereinheiten, die alle aus jeweils zwei Modulen aufgebaut sind. Jedes Modul enthält katalytische Zentren (Acyltransferase (AT), Acyl-Carrier-Protein (ACP), Ketosynthase (KS), Ketoreduktase (KR), Dehydratase (DH), Enoylreduktase (ER) und Thioesterase (TE)), die für die Ausbildung der spezifischen Grundstruktur des Polyketides verantwortlich sind. Jedes Modul katalysiert die Biosynthese

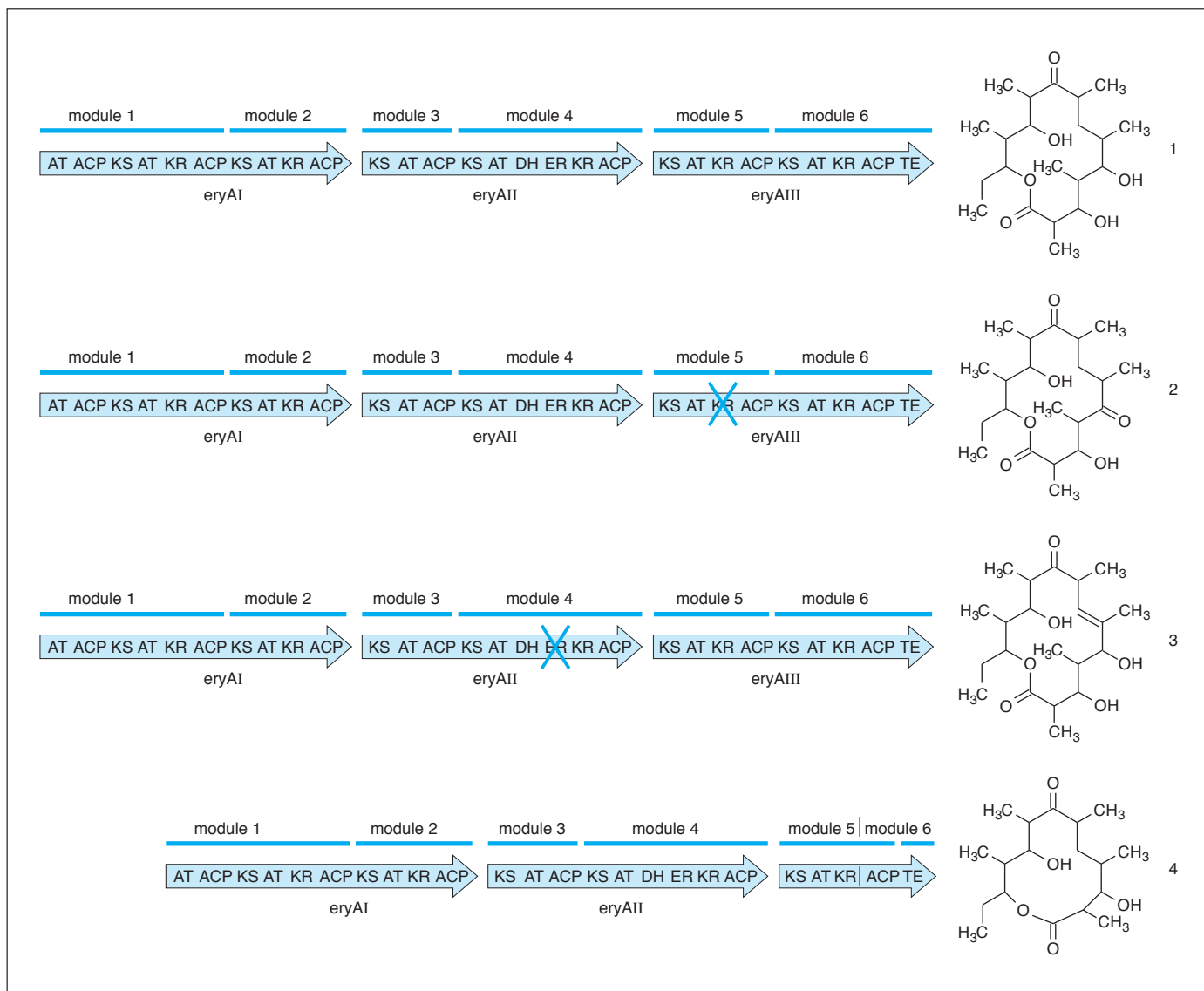


Abb. 12. Herstellung von Derivaten von 6-Deoxyerythronolid (1) durch Deletion einzelner katalytischer Zentren (2, 3) und durch Coexpression von eryAI, eryAII und eines chimären Enzyms, bestehend aus katalytischen Zentren des Moduls 5 und Moduls 6 von eryAIII (3).

eines bestimmten Abschnittes des Polyketides.

Im Unterschied dazu bestehen die als iterativ bezeichneten Polyketidsynthasen (Typ-II-Polyketidsynthasen) aus vielen einzelnen Enzymen mit je einer spezifischen katalytischen Aktivität. Wie bei den Polyketidsynthasen aus Pflanzen und Tieren agiert jedes dieser katalytischen Zentren mehrmals an der wachsenden Polyketidkette. Besonders gut untersucht sind die Polyketidsynthasen aus *Streptomyces glaucescens* (Tetracenomycin-Produzent) und aus *Streptomyces coelicolor* (Actinorhodin-Produzent). Drei Enzyme, eine Ketosynthase, ein so genannter Kettenlängenfaktor und ein Acyl-Carrier-Protein, bilden jeweils die minimale PKS-Einheit, die den Aufbau der

Polyketidkette katalysieren. Ketoreduktasen, Zyklasten und andere Enzyme katalysieren letztendlich die Synthese des zyklisierten und modifizierten Polyketides [34, 36–38].

Experimente zur „Kombinatorischen Biosynthese“ wurden zunächst mit iterativen Polyketidsynthasen durchgeführt. Durch Transformation von Polyketid-Biosynthese-Genclustern eines Organismus in einen anderen wurden Gene recht ungezielt miteinander kombiniert. Zwar wurden neue Verbindungen erhalten, es überrascht jedoch nicht, dass sich diese nur geringfügig von den Ausgangsverbindungen unterschieden [39].

Da diese ungezielte Kombination von Genen nicht zu den erhofften Ergebnissen geführt hatte, wurde ein System ge-

schaffen, in dem zunächst der Actinorhodin-Produzent, *S. coelicolor* CH999, durch Deletion des gesamten Biosynthese-Genclusters so verändert wurde, dass er kein Antibiotikum mehr produzierte. Als zweite Komponente des Systems wurde das Plasmid pRM5 konstruiert, das unter anderem das Gen *actII-ORF4* enthielt, das für einen Transkriptionsaktivator kodiert. Dieser reguliert die Transkriptions-Aktivität des Promotors PactI und so die Expression der in das Plasmid hinter den Promotor einliierten Gene [40]. Polyketidsynthasegene aus Stämmen, die verschiedene Antibiotika herstellen, wurden im Plasmid pRM5 unterschiedlich miteinander kombiniert und im Rezipienten-Stamm exprimiert. Je nach Auswahl und Anordnung

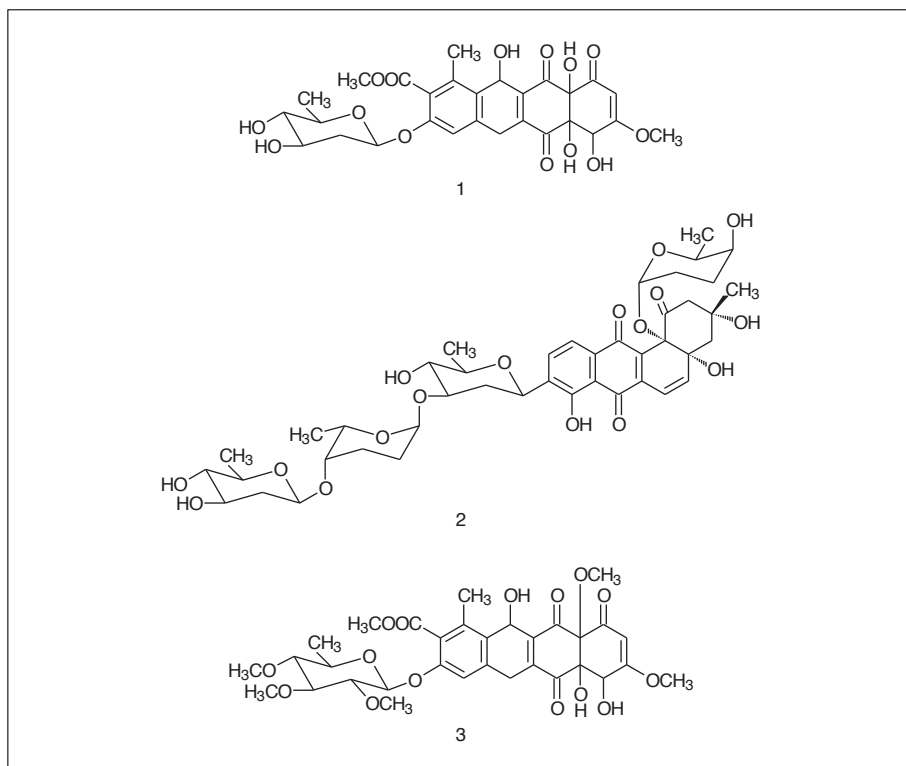


Abb. 13. Produktion eines glycosidierten Hybridantibiotikums in *S. fradiae* Tü2717 durch Transformation des Cosmides 16F4 aus *S. olivaceus* Tü2353. 1: 8-Olivosyl-8-demethyl-tetracenomycin C; 2: Urdamycin A; 3: Elloramycin.

der Gene auf dem Plasmid wurden unterschiedliche Verbindungen produziert, deren Strukturen sich zum Teil stark von der des Actinorhodins und der anderen Ausgangsverbindungen unterschieden (Abb. 11a und 11b) [41–47].

Die Erfolge bei der Herstellung neuer Naturstoffe mit iterativen Polyketidsynthasegenen ermutigte Wissenschaftler, auch die modularen Polyketidsynthasegene zur Herstellung neuer Verbindungen heranzuziehen. Besonders intensiv wurde eine Polyketidsynthase (DEBS) aus *Saccharopolyspora erythraea* untersucht, die die Biosynthese von 6-Deoxyerythronolid B (6-dEB), Grundbaustein des Erythromycins, katalysiert. DEBS besteht aus drei großen Enzymen (EryAI, EryAII, EryAIII) alle mit einem Molekulargewicht über 300 kDa.

Nachdem die Koexpression von *eryAI*, *eryAII* und *eryAIII* in *Streptomyces coelicolor* CH999 gelang und die Bildung von 6-dEB nachgewiesen worden war, wurden anschließend Mutationen in die Gene eingefügt, durch die einzelne katalytische Zentren ausgeschaltet wurden. Expression dieser mutierten Gene führte zur Bildung der erwarteten Keto- und Anhydroderivate von 6-dEB (Abb. 12) [48]. Die Bildung eines zwölfgliedrigen Makro-

lactonringes statt eines vierzehngliedrigen gelang durch die Expression von *eryAI*, *eryAII* und eines chimären Gens, bestehend aus KS, AT und KR des Moduls 5 und ACP und TE des Moduls 6 aus *eryAIII* (Abb. 12) [49]. Bis heute sind auch hier mehr als 20 neue Substanzen gebildet worden. Einige dieser Substanzen sollen ganz neue pharmakologische Eigenschaften aufweisen [50].

Bisher noch wenig untersucht wurde, wie weit man mit Hilfe der „Kombinatorischen Biosynthese“ Moleküle herstellen kann, deren Einzelbestandteile über unterschiedliche Biosynthesewege gebildet werden (Zucker-Polyketide; Zucker-Polypeptide; Fettsäuren-Polyketide; Isopreneinheiten-Polyketide etc.). Ein bereits 1995 durchgeführtes Experiment zeigt, dass dies prinzipiell möglich ist. Ein etwa 25 kb großes DNS-Fragment (Cosmid 16F4), auf dem Gene des Elloramycin-Biosynthese-Genclusters lokalisiert waren, wurde in *Streptomyces fradiae*, dem Urdamycin-Produzenten, zur Expression gebracht. Eine von dem transformierten Stamm gebildete Substanz, 8-D-Olivosyl-8-demethyl-tetracenomycin C, enthielt Strukturmerkmale, die sowohl im Urdamycin als auch im Elloramycin vorkommen (Abb. 12) [51]. Derzeit noch

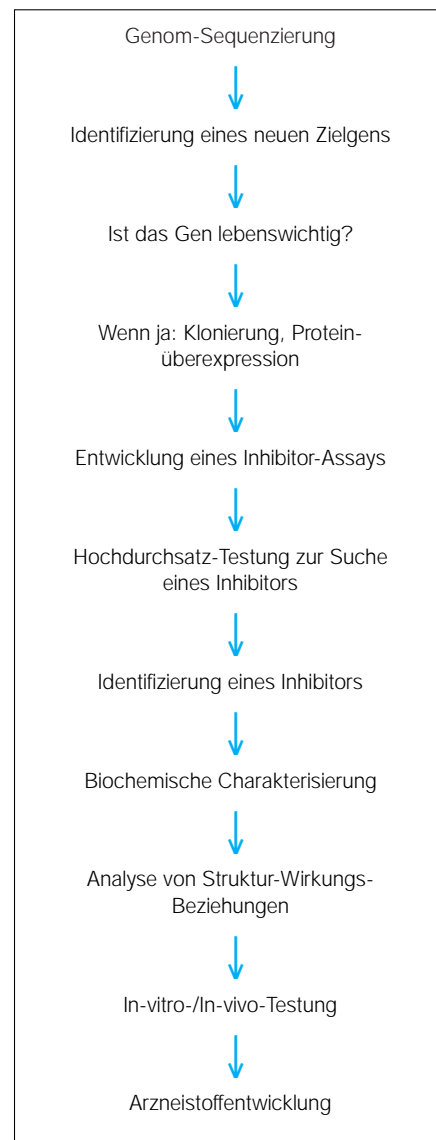


Abb. 14. Genom-Sequenzierung

nicht publizierte Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein auf dem 25 kb großen DNS-Fragment lokalisiertes Glycosyltransferasegen für die Bildung der neuen Substanz verantwortlich ist.

Die Erzeugung neuer Substanzen mit Hilfe der „Kombinatorischen Biosynthese“ gelingt heute auch mit Genen, die an der Biosynthese von Peptidantibiotika beteiligt sind. Weitere Substanzgruppen (Oligosaccharidantibiotika, Aminoglycosidantibiotika) werden intensiv bearbeitet. Zusammenfassend kann resümiert werden, dass sich mit der kombinatorischen Biochemie ein hohes Maß an Diversität erzeugen lässt, was das Auffinden von ganz neuartigen Leitstrukturen ermöglicht [52]. Außerdem bietet sie die Chance, Naturstoffe zu exprimieren, die

in nicht kultivierbaren Mikroorganismen erzeugt werden. Letztere machen etwa 95 der Mikroben aus. Daraus wird das ungeheure Potential der kombinatorischen Biochemie deutlich.

## Genomics

Die Entwicklung von Resistenzen gegen Antiinfektiva ist ein immer größer werdendes Problem. Deshalb ist es wichtig, nicht nur immer spezifischere und selektivere Reagenzien gegen bekannte Targets zu entwickeln, sondern auch nach neuen Targets zu suchen [54].

Bisher hat man bei der Entwicklung neuer Antiinfektiva häufig zuerst eine neue Substanz in der Hand, deren Wirkungsmechanismus man aufgeklärt hat, um dann weitere potentere Derivate zu entwickeln. Heute versucht man diese Bottom-up-Philosophie umzukehren, d. h. Top-down erst ein Target zu definieren, das man mit spezifischen Substanzen zu antagonisieren versucht. Dies ist nach *D. T. W. Chu* [55] „... the only certain way to avoid encountering previously generated resistance [...] to seek new targets against which antagonists have not been previously generated.“

Dieser Weg ist möglich geworden, da man heute in der Lage ist, ganze Genome von Mikroorganismen zu sequenzieren [56, 57]. In Abbildung 14 ist das weitere Vorgehen skizziert. In einem bekannten Genom muss ein Gen identifiziert werden, das es möglichst in allen Bakterien, aber auch nur in Bakterien gibt. Um herauszufinden, ob das Gen für das Bakterium essentiell ist, wird es zum Beispiel durch homologe Rekombination mit externen Genen (Drug Resistance Marker) unterbrochen. Ist dann das Bakterium nicht mehr lebensfähig, kann das Gen als essentiell angesehen werden. Es wird kloniert, um viel Protein aus dem Gen zu produzieren und einen Assay für einen Inhibitor entwickeln zu können. HTS kann bei der Suche nach einem Inhibitor helfen. Hat man einen solchen gefunden, kann die Optimierung beginnen, an deren Ende ein neuer Arzneistoff mit einem neuen Target steht. Ohne dass an dieser Stelle auf Details eingegangen worden ist, so wird doch schon auf den ersten Blick klar, dass dieser Weg zwar sehr innovativ, aber nicht ganz einfach und zu-

sätzlich sehr zeitaufwendig ist. Trotz allem gibt es eine Reihe von Pharmafirmen, die ihn beschreiben.

## Hat wirklich ein Paradigmenwechsel stattgefunden?

Seit Paul Ehrlich hat man eine Reihe von elaborierten Techniken entwickelt, die die Optimierung von bereits gefundenen Leitstrukturen sehr schnell ermöglichen. Hier seien die kombinatorische Chemie, die QSAR-Analyse und das Molecular Modelling genannt. Bei der Suche nach neuen Leitstrukturen kann man vielerlei Strategien verfolgen, vom Breitband-Screening von Naturstoffen verschiedenster Herkunft über die kombinatorische Biochemie bis zum Genomics-Ansatz. Auch ist es nicht unwichtig, dem Kollegen Zufall, dem wir so viele neue Antiinfektiva zu verdanken haben – eine gute Chance zu geben. So kann man nicht unbedingt von einem Paradigmenwechsel sprechen, sondern viel mehr von der Erweiterung des Methodenspektrums zur Leitstruktursuche und Wirkstoffoptimierung.

### Literatur

- Ehrlich P. *Lancet* 1913;2:445-51.
- Kubinyi H. *QSAR Hansch-Analysis and Related Approaches*. Weinheim: VCH-Verlag, 1993.
- Jürgens J, Schedletzky H, Heisig P, Seydel JK, et al. *Arch Pharm Pharm Med Chem* 1996;329:170-90.
- Ferrero L, Cameron B, Manse B, Lagneaux D, et al. *Mol Microbiol* 1994;13:641-53; Heisig P. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;39:879-85 und 1554-8.
- Zlotos G, Bückler A, Jürgens J, Holzgrave U. *Int J Pharm* 1998;169:229-38.
- Holzgrave U, Heisig P. *Pharm Unserer Zeit*. Im Druck.
- Drug Fut* 1995;20:1103-8.
- West ML, Fairlie DP. *TIPS* 1995;16:67-75.
- DeClercq E. *J Med Chem* 1995;14:2491-517.
- Merrifield RB. *J Am Chem Soc* 1963;85:2149 und 2154.
- Balkenhohl F, v.d. Bussche-Hünnefeld C, Lansky A, Zechel C. *Angew Chem* 1996;108:2436-88.
- Alper J. *Science* 1994;264:1399-401.
- Weber L. *Nachr Chem Tech Lab* 1994;42:698-701.
- Cody DR, deWitt SH, et al. 1994. WO 94 08711.
- Cavalla D. *Ann Rep Med Chem* 1998;33:365-84.

- Rücker G. *Pharm Unserer Zeit* 1995;24:189-95.
- Robert A, Meunier B. *Chem Soc Rev* 1998;27:273-9.
- Panchagnula R. *Int J Pharm* 1998;172:1-15.
- Lin S, Slater JC, Pera P, Bernacki RJ, et al. *Book of Abstracts, ACS Boston 1998*. *Med Chem* 1998;315.
- Höfle G, Bedorf Neimetz H, Schomburg D, et al. *Angew Chem* 1996;108:1671-3.
- Chen AY, Liu LF. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1994;34:191-218.
- Drug Fut* 1996;21:881-9.
- Bornkessel B. *Arzneimitteltherapie extra* 1997; (Suppl 22):1-8.
- Hara M, Takahashi I, Yoshida M, Asano K, et al. *J Antibiot* 1989;42:333-5.
- Mitra K, Kim W, Daniels JS, Gates KS. *J Am Chem Soc* 1997;119:11691-2.
- Asai A, Hara M, Kakita S, Kanda Y. *J Am Chem Soc* 1996;118:6802-3.
- Pietruszka J. *Angew Chem* 1998;110:2773-80.
- Bierbaum G, Brötz H, Sahl HG. *Biospektrum Sonderband* 1997;51-4.
- Sahl HG, Bierbaum G. *Ann Rev Microbiol* 1998;52:41-79.
- Bibb MJ, Schottel JL, Cohen SN. *Nature* 1998; 284:526.
- Thompson CJ, Ward JM, Hopwood DA. *Nature* 1980;286:525.
- Suarez JE, Chater KF. *Nature* 1980;286:527.
- Hopwood DA. *Chem Rev* 1997;97:2465-97.
- Beck J, Ripka S, Siegner A, Schiltz E, et al. *Eur J Biochem* 1990;192:487-98.
- Katz L. *Chem Rev* 1997;97:2557-75.
- Hutchinson CR, Fujii I. *Ann Rev Microbiol* 1995;49:201-38.
- Katz L, Donadio S. *Ann Rev Microbiol* 1995;47:875-92.
- Hopwood DA, Malpartida HM, Kieser H, Ikeda J, et al. *Nature* 1985;314:642-4.
- McDaniel R, Ebert-Khosla S, Fu H, Hopwood DA, et al. *J Am Chem Soc* 1993;115:11671-5.
- McDaniel R, Ebert-Khosla S, Fu H, Hopwood DA, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11542-6.
- McDaniel R, Ebert-Khosla S, Fu H, Hopwood DA, et al. *J Am Chem Soc* 1994;116:10854-9.
- Fu H, Ebert-Khosla S, Hopwood DA, Khosla C. *J Am Chem Soc* 1994;116:4166-70.
- Fu H, Ebert-Khosla S, Hopwood DA, Khosla C. *J Am Chem Soc* 1994;116:6443-4.
- Fu H, Alvarez MA, Khosla C, Bailey JE. *Biochemistry* 1996;35:6227-32.
- McDaniel R, Ebert-Khosla S, Hopwood DA, Khosla C. *Nature* 1995;375:549-54.
- Yu TW, Bibb M, Revill WP, Hopwood DA. *J Bacteriol* 1994;176:2627-34.
- Donadio S, McAlpine JB, Sheldon PJ, Jackson M, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7119-23.
- Kao CM, Luo G, Katz L, Cane DE, et al. *J Am Chem Soc* 1995;117:9105-6.
- Leadley P. *Persönliche Mitteilung*.
- Decker H, Rohr J, Motamedi H, Zähler H. *Gene* 1995;166:121-6.
- Rohr J. *Angew Chem* 1995;107:963-7.
- Borman S. *C&EN* 1998;14 Sept:28-9.
- Katz L, Chu DTW, Reich K. *Ann. Rep Med Chem* 1997;32:121-30.
- Chu DTW, Plattner JJ, Katz L. *J Med Chem* 1996;39:3854-74.
- Strauss EJ, Falkow S. *Science* 1977;276:707-12.