A. THEORETISCHER TEIL

1. Einleitung

1.1 Quo vadis Life Sciences?

Anfang der achtziger Jahre begann in der Chemie- und Pharmabranche eine Periode reger Umstrukturierungen und Umorientierungen, die auch jetzt noch anhält. Pharmazeutische und agrochemische Bereiche wurden zusammengelegt, oftmals in Kombination mit biotechnologischen Anwendungen, und das Ganze Life Sciences genannt. Die Hoffnung bestand darin, Synergismen in Forschung und Entwicklung sowie in der verwendeten Technologie nutzen zu können.[1] In der folgenden Zeit entstanden durch vielfache Fusionen und Aufkäufe kleinerer Betriebe Großunternehmen wie Aventis oder Novartis.*

Bereits kurz vor Beginn des neuen Jahrtausends wandten sich die ersten Firmen wieder von diesem Konzept ab. Der insbesondere in den USA gesunkene Profit in der Landwirtschaft hatte die Agrarindustrie schwer getroffen und stand somit im krassen Gegensatz zum zweistelligen Wachstum des Pharmamarktes.[1] In Verbindung mit dem von Anteilseignern ausgeübten Druck, den Gewinnfaktor zu erhöhen, führten die divergenten Märkte zu einer neuen Welle von Umstrukturierungen. Die Agrarbereiche wurden ausgelagert und erneute Fusionen und Aufkäufe führten zum jetzigen Bild der zumeist getrennt voneinander existierenden Pharma- bzw. Agrarunternehmen.** Ein Blick auf die Börsendaten verrät dagegen, dass oftmals auch nach der Abspaltung des landwirtschaftlichen Teils kein signifikanter Anstieg der Aktienkurse zu verzeichnen ist.[1]

Rein wirtschaftlich gesehen zahlen sich Fusionen nur aus, wenn dadurch eine höhere Gewinnspanne erreicht wird. Pharmaunternehmen vertreten vielfach die Meinung, dass wirtschaftliche Größe ein entscheidender Faktor ist, um auf dem Markt zu bestehen. Es zeigte sich jedoch, dass trotz des betriebswirtschaftlichen Potentials für größere Effizienz die Firmenröße allein nicht entscheidet.[2] Oftmals sind die neu entstandenen Unternehmen nicht innovativer als zuvor[3], die Aufkäufe dienen lediglich der Verringerung der Konkurrenz. Zusätzlich führen Fusionen und Umstrukturierungen zu Unterbrechungen in Forschung und

* Aventis entstand 1999 aus den Pharma- und Agrochemiebereichen der Firmen Hoechst und Rhône-Poulenc, Novartis wurde 1997 in gleicher Weise von den Firmen Sandoz und Ciba-Geigy gegründet.

** Elf Monate nach der Gründung spaltete Aventis den Agrobereich ab (Aventis CropScience). Im Jahr der Gründung kombinierte Novartis seinen agrochemischen Zweig mit AstraZeneca, es entstand daraus Syngenta.

Entwicklung. Ein guter Teil des Wachstums nach einer erfolgten Fusion lässt sich auf Kosteneinsparungen zurückzuführen.[2]

Aufgrund der immensen Entwicklungskosten (etwa 600 Mio. $[4]) und -zeiten (12 bis 15 Jahre[5]) für ein neues Medikament kann eine zusätzliche Woche während der Entwicklung weit über eine Mio. Dollar kosten. Schätzungen gehen davon aus, dass zwei Drittel der Entwicklungskosten in die Untersuchung von schließlich verworfenen Leitstrukturen fließen.[4] Aus diesen Gründen werden unsichere Projekte schneller aufgegeben. Ein finanziell wichtiger Faktor für die forschende Pharmaindustrie ist zudem, dass sie zunehmend mit dem Auslaufen ihrer Exklusivitätsrechte für Patente konfrontiert wird. So sanken die Verkaufszahlen von Eli Lillys Antidepressivum Prozac® innerhalb von zwei Monaten um 70 %, als nach Ablauf des Patentschutzes preiswerte Generika auf den Markt kamen. Innerhalb des nächsten Jahrzehnts werden im Pharmabereich Patente mit einem Marktvolumen von mehr als 60 Mrd. $ auslaufen, 13 der 35 führenden Medikamente verlieren ihren Patentschutz bereits innerhalb der nächsten fünf Jahre.[7]

Vor allem finanzielle Überlegungen führten daraufhin zu einer Strategie, die die Zahl der Leitsubstanzen durch einen immer größeren Proben- und Targetdurchsatz erhöhen sollte. Der daraus resultierende Trend zu Automatisierung und Miniaturisierung förderte die Entwicklung des High Throughput Screenings (HTS) und erzeugte einen stetig wachsenden Bedarf an neuen Substanzen für die Testsysteme. Mehrere Tausend Substanzen können bei Verwendung eines Assays derzeit pro Woche untersucht werden.[6] Mit dieser Entwicklung einher ging eine Abwendung von Naturstoffen als Ideengeber für Leitstrukturen, da sie erheblich kosten- und zeitaufwändiger in der Erforschung sind als synthetische Verbindungen. Mit der großen Anzahl an Syntheseprodukten, die mittels kombinatorischer Chemie schnell und effektiv erzeugt werden können, hoffte man, ausreichend Ansatzpunkte für neue Medikamente zu finden. Auffällig ist allerdings, dass trotz einer Vervielfachung des Screeningdurchsatzes die Zahl der erfolgreichen Leitstrukturen nicht im gleichen Maße angestiegen ist. Die an die kombinatorische Chemie gestellten Erwartungen wurden nicht erfüllt.
Es wird deutlich, dass sich die pharmazeutische Industrie derzeit in einer Produktivitäts- und Innovationskrise[7] befindet, was sich unter anderem in einem Rückgang der neu auf den Markt eingeführten Arzneimittel ausdrückt: 2001 waren es nur 37, was ein 20-Jahres Tief darstellt.[7] Kritische Stimmen sprechen von einer „Target-reichen, aber Leitstruktur-armen Ära“, in der wir uns befinden.[8]

Angesichts der steigenden Anzahl sowohl neuer (SARS) als auch bereits besiegt geglaubter infektiöser Krankheiten (z.B. Tuberkulose, Influenza) drängt sich die Frage auf, ob nicht auch die Industrienationen Gefahr laufen, in einigen Jahren ohne Verteidigung gegen bakterielle Infektionen dazustehen.

1.2 Zur Rolle von Naturstoffen in der Pharmaforschung

Von der Kombinatorischen Chemie bereits weitgehend zurückgedrängt erleben Naturstoffe derzeit eine „Wiederentdeckung". Es wurde erkannt, dass Substanzbibliotheken, die nur aus synthetischen Produkten bestehen, eine erheblich geringere strukturelle Komplexität und Diversität aufweisen.[9] So unterscheiden sich die Strukturen von synthetisierten Verbindungen, Naturstoffen und Medikament-Wirkstoffen in wichtigen Punkten, von denen einige hier zur Verdeutlichung aufgezeigt werden sollen:

Tabelle 1: Durchschnittswerte ausgewählter molekularer Eigenschaften von Syntheseprodukten (n = 670536), Medikamenten (n = 10968) und Naturstoffen (n = 3287) [10]

Eigenschaft	**Syntheseprodukte**	**Medikamente**	**Naturstoffe**
Molmasse (g/mol)	393	340	414
Anzahl drehbarer Bindungen	6.4	5.6	4.4
Anzahl chiraler Zentren	0.4	2.3	6.2
Mehrfachbindungsanteil	12.0	8.0	8.8
Anzahl N-/O-Atome	2.69/2.77	1.64/4.03	0.84/5.9
Anzahl S-/Halogenatome	0.45/0.80	0.23/0.34	0.03/0.02

Tabelle 1 verdeutlicht, dass Syntheseprodukte im Schnitt erheblich weniger Chiralitätszentren besitzen. Es ist bekannt, dass dies die biologische Aktivität von Wirkstoffen deutlich senken kann. Produkte der kombinatorischen Chemie sind demnach biologisch weniger relevant[8], während Naturstoffe hingegen die Fähigkeit besitzen, funktionelle Gruppen in einer günstigeren Zusammenstellung zu präsentieren.[9] Anders ausgedrückt bedeutet das Ersetzen von Naturstoff-basierten Substanzbanken durch solche, die nur „kombinatorische" Substanzen enthalten, nichts anderes als das Zurückgreifen auf eine ungünstigere Verbindungsklasse.

Dass Substanzen aus Mikroorganismen oder Pflanzen logische Startpunkte für die Suche nach Wirkstoffen gegen Infektionen oder Krebs sein können, ist aufgrund ihrer Bedeutung im Produzenten verständlich, sollen sie doch unter anderem bei der Bekämpfung von Konkurrenten oder Schädlingen helfen. Die Evolution betrieb ihre eigene Art von kombinatorischer Chemie und optimierte verschiedene Substanzen auf diese Aufgabe hin.[3] Warum aber sollten sich Strukturen speziell gegen bestimmte menschliche Krankheiten, z.B. Schizophrenie, entwickelt haben? Diese nicht ganz unberechtigte Frage trug entscheidend zur Verunsicherung Naturstoffen gegenüber bei.
Zur Bewertung ist es hilfreich, sich vor Augen zu führen, dass in der Natur fundamentale Prozesse wie der Energie-Metabolismus hoch konserviert sind. Zum Vergleich: ca. 65 % der humanen Krankheitsgene finden in dem Fadenwurm *C. elegans* ein Pendant.[11]

Analysiert man Proteine auf strukturelle Elemente hin, so findet man hoch konservierte Anteile, die Domänen, die durch Peptidlinker miteinander verbunden und zur Sekundärstruktur organisiert werden.[12] Im Gegensatz zu den hunderttausenden menschlichen Enzymen gibt es laut Schätzungen, die auf laufenden Genomsequenzierungsprojekten beruhen, nur 4000 bis 60000 verschiedene Domänen.[12] Strukturell gesehen können Enzyme einander also recht ähnlich sein, auch wenn sie völlig verschiedene Funktionen erfüllen. Diese Ähnlichkeit in der Protein-Domänen Struktur kann dazu genutzt werden, auf einer Leitstruktur basierend Inhibitoren für Enzyme mit verschiedener Funktion zu entwickeln.
Ein Beipiel für die Berechtigung dieses Ansatzes sind Ergebnisse des Screenings nach potenteren Inhibitoren der Leukotrien A4 (LTA4) Hydrolase.[9] Das Enzym katalysiert den letzten Schritt in der Biosynthese von Leukotrien A4 und spielt somit eine wichtige Rolle in der Reaktion des Körpers bei Entzündungen. Die entsprechenden katalytischen Domänen besitzen eine große Ähnlichkeit zu bestimmten Metalloproteasen wie dem Thermolysin.[12] Dies wurde als Ansatzpunkt zu einem Screeningprogramm verwendet, in dem eine Serie von Analoga des Thermolysin-hemmenden Wirkstoffs Bestatin synhetisiert und auf ihre Aktivität hin überprüft wurde. Es konnten so Inhibitoren gewonnen werden, die im nanomolaren Bereich wirken.
Vor etwa 10 Jahren bestimmte das Argument, dass aufgrund von Domänenähnlichkeiten entwickelte Wirkstoffe nicht enzymspezifisch genug seien die wissenschaftliche Meinung.[13] Inzwischen ist akzeptiert, dass die Natur in der Feinstruktur der Domänen ausreichend variiert hat, um Selektivität zu garantieren. Allerdings erreicht man nur mit separater Optimierung für das einzelne Enzym bestmögliche Ergebnisse.

Da Naturstoffe von Enzymen produziert werden, besitzen sie zwangsläufig eine Affinität zu verschiedenen Enzymklassen bzw. -domänen. Für dieses Phänomen wurde der Begriff „privilegierte Strukturen“ geprägt (Evans, Merck[12]). Auf der Suche nach Leitstrukturen für ein bestimmtes Target sind demzufolge Substanzbibliotheken auf Basis von natürlichen Verbindungen ein guter Ansatz. Bei der Wirkstoffsuche aber Substanzbibliotheken einzusetzen, die nur aus Naturstoffen bestehen, wäre im Sinne der zuvor geforderten Diversität kontraproduktiv. Es konnte gezeigt werden, dass aus Naturstoffen und Naturstoffanaloga bestehende Banken effektiver sind als reine Naturstoffbanken.[9]

Die Tatsache, dass 61 % aller in den Jahren 1981 bis 2002 als Medikament eingeführten kleinen Moleküle von Naturstoffen abgeleitet oder aber von ihnen inspiriert sind*, verdeutlicht die Bedeutung der Naturstoffe für die Pharmaforschung.[14] In bestimmten therapeutischen Bereichen ist der Anteil sogar noch größer: z.B. bei Krebstherapeutika (74 %) und bei antibakteriellen Wirkstoffen (78 %). Aus der kombinatorischen Chemie ist dagegen bis heute kein *de novo* synthetisiertes Produkt bekannt, das bereits in der Anwendung ist[14] und nur eins, das sich zurzeit in Phase II der klinischen Tests befindet[15].

1.3 Wie sieht die Zukunft der pharmazeutischen Forschung aus?

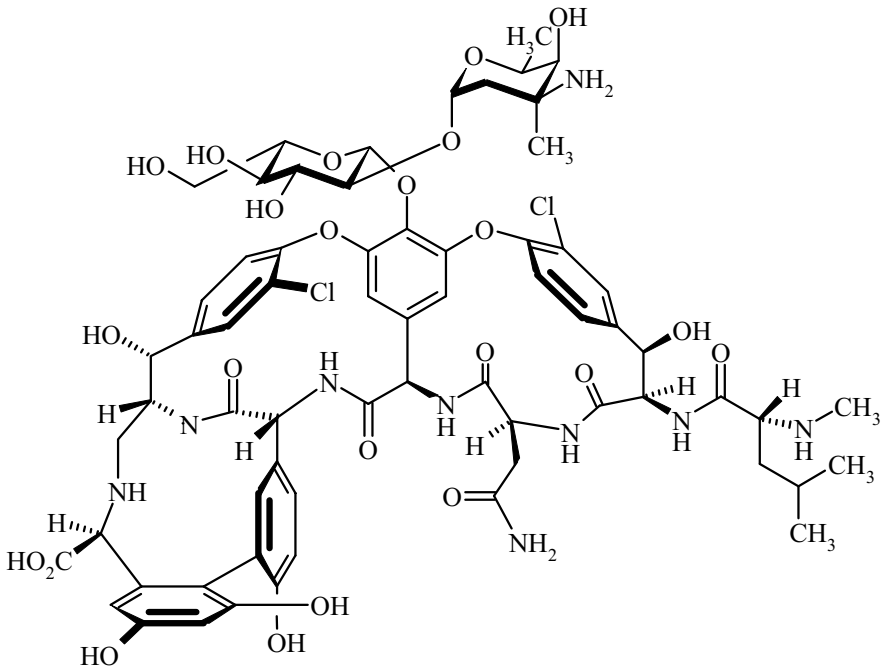
Nachdem ein Innovationsdefizit in der Industrie sichtbar geworden ist[9] und Naturstoffe nicht mehr nur als Quelle für antibakterielle oder gegen Krebs wirksame Substanzen betrachtet werden, sollten die strategischen Entscheidungen der 90er Jahre im Lichte neuer Erkenntnisse überdacht werden. In diesem Zusammenhang ist von großer Bedeutung, dass sich auch die Naturstoffforschung stark weiterentwickelt hat.[13] So hat im letzten Jahrzehnt die Geschwindigkeit der Identifizierung neuer Metaboliten aus der Natur erheblich zugenommen. Durch die Kopplung von HPLC mit verschiedenen spektroskopischen Nachweistechniken, z.B. UV/Vis[16], UV/NMR[17], oder UV/MS können bereits bekannte Verbindungen über Datenbankabgleich sehr schnell identifiziert und Reisolierungen vermieden werden. Diese Techniken werden zukünftig bei der Entdeckung neuer Leitstrukturen eine noch größere Rolle spielen.

* Naturstoffe 6 %, Naturstoffderivate 27 %, synthetische Komponenten mit Naturstoff-basiertem Pharmakophor 5 %, synthetische Produkte, die aufgrund von Wissen aus der Naturstoffforschung erstellt wurden (Naturstoffimitatoren) 23 %. In diesen Zahlen nicht enthalten sind Derivate oder Analoga von schon auf dem Markt befindlichen Wirkstoffen.

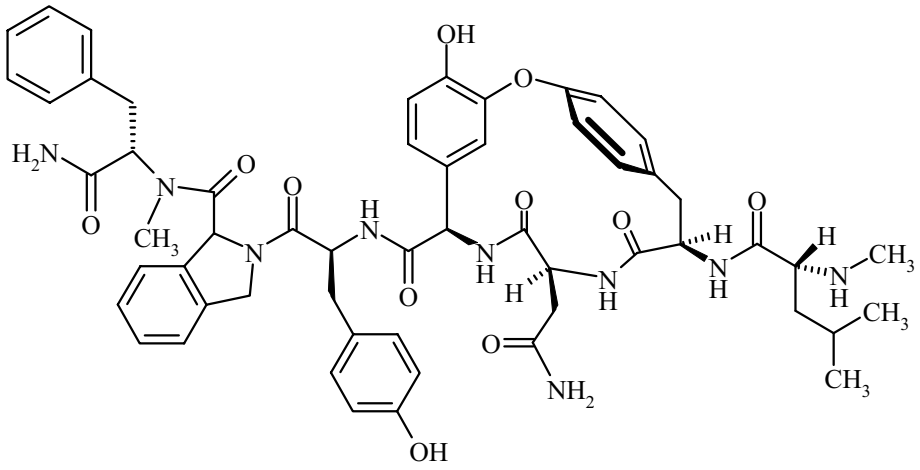
Auch in der Anwendung der kombinatorischen Chemie scheint sich ein Paradigmenwechsel dahingehend zu manifestieren, dass nicht die reine Anzahl an Verbindungen als bestimmend für die Qualität einer Substanzbibliothek angesehen wird, sondern ihre strukturelle Diversität.[12] Intensive Forschung führte zu neuen Methoden[18], mit deren Hilfe auch komplexe Naturstoffe mit einer zweistelligen Anzahl an Reaktionsschritten synthetisch hergestellt und dabei kombinatorisch eine Vielzahl an Analoga kreiert werden können.[19,20,21] Vielfach bewährt hat sich die Methode der Festphasensynthese.[21,22]

Besondere Erwähnung verdient eine Veröffentlichung von Ellman und Mitarbeitern, die die Erstellung einer Bibliothek von mehr als 39000 Vancomycin-Derivaten und -angelehnten Substanzen beschreibt.[23] Da Vancomycin (**1**) als Reserve-Therapeutikum bei Methicillin-resistenten Stämmen dient, hat eine Resistenz gegen **1** beim betroffenen Patienten besonders schwere Folgen. Resistente Stämme produzieren für die Zellwandbiosynthese einen veränderten Vorläufer, in dem eine terminale D-Alanin Einheit des Peptidoglykans durch D-Lactat ersetzt ist.[24] Anstelle einer Wasserstoff-Brückenbindung zur Vancomycin-Bindestelle wird dadurch eine abstoßende Wechselwirkung eingeführt, die die Affinität um den Faktor 1000 verringert.

Aus der Bibliothek der kombinatorisch erzeugten Vancomycin-Derivate konnte eine Substanz (**2**) identifiziert werden, die trotz ihrer etwas abgeschwächten Bindung an die unmodifizierte Seitenkette fünfmal stärker an die Lactat-enthaltende Seitenkette bindet. Dieser Effekt resultiert aus der relativen Flexibilität des acyclischen Tripeptids im linken Molekülteil. **2** könnte sich zu einem wichtigen Ansatzpunkt bei der Überwindung der Vancomycin-Resistenz entwickeln.[23]



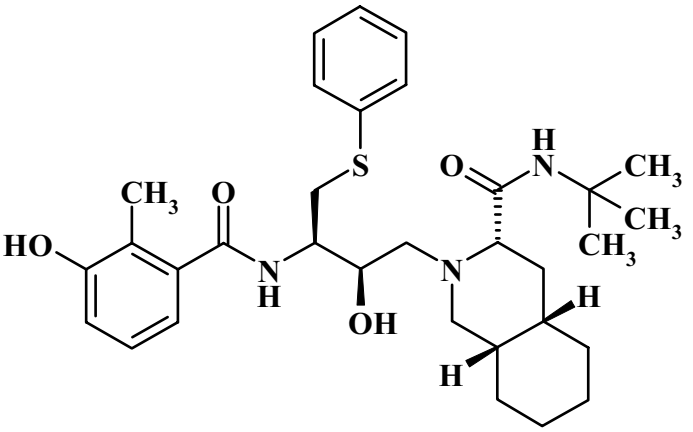
Vancomycin (**1**)



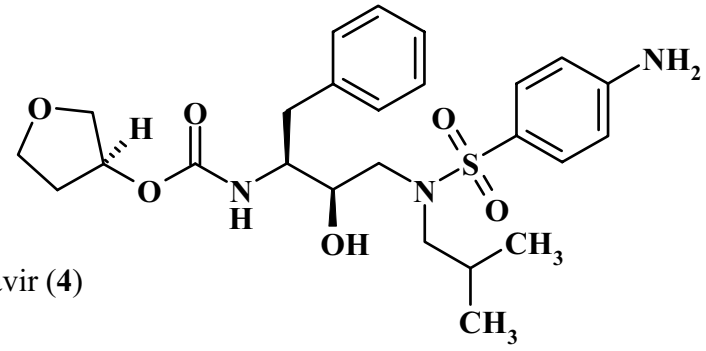
Vancomycin-Derivat (**2**)

Ein weiteres Beispiel dafür, dass Naturstoffe als biologisch validierte Startpunkte für das Bibliothekdesign durch kombinatorische Chemie dienen und dabei in relativ kleinen Banken eine deutlich höhere Trefferquote liefern können, ist die Synthese einer Nakijichinon-Substanzbank. Von 56 Analoga der Nakijichinone hemmte eine Verbindung selektiv den KDR-Rezeptor, eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die an der Tumor-Angiogenese beteiligt ist.[25,26]

Der nahezu exponentielle Fortschritt in der Computertechnologie ermöglicht die Berechnung von Wechselwirkungen zwischen Molekülen, deren Bestimmung noch vor 15 Jahren beträchtlichen Aufwand in der klinischen Forschung erfordert hätte. Beispielsweise können klinische ADME/T* Studien erheblich verkürzt werden, indem die Lebertoxizität und die Affinität zu Membran-Transporterproteinen von Wirkstoffen berechnet werden. Bisher sind allerdings nur wenige Wirkstoffe direkt auf dieses Drug Design zurückzuführen. Viracept® (Nelfinavir, **3**) und Agenerase® (Amprenavir, **4**) sind zwei Beispiele[8] für peptidmimetische HIV-Protease-Inhibitoren, die durch Molecular Modeling entwickelt wurden.



Nelfinavir (**3**)



Amprenavir (**4**)

Die Anwendung der High Throughput Kristallographie[27] soll die Bestimmung von Proteinstrukturen selbst bei sehr geringen Ausgangsmengen ermöglichen.[8] Mit entsprechenden Kristallstrukturen könnten viele der unzähligen Targets, die das Humangenom-Projekt erbracht hat bzw. noch erbringen wird, einem virtuellen Screening zugeführt werden. Praktisch „*in silico*“ können auf diese Weise Substanzbanken auf potentielle Inhibitoren durchsucht werden.

* ADME/T = Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion und Toxizität.

Viele Anwendungsmöglichkeiten wird die Forschung auf dem Gebiet der Proteomics eröffnen. Durch Vergleich von Expressionszuständen in krankem und gesundem Gewebe lassen sich funktionelle Zusammenhänge von Enzymen und Krankheiten aufdecken.[28] Dies wird eine gezieltere Suche nach Wirkstoffen ermöglichen.

Da es oftmals für ein Krankheitsbild verschiedene Ursachen gibt[29], heißt die Zukunft der medizinischen Therapie Individualisierung. Schon lange wird die „Verabschiedung vom Durchschnittspatienten“ gefordert, da im Durchschnitt nur etwa 20 bis 40 % der Patienten optimal auf ein Medikament reagieren.[30] Derzeit werden genetische Testsysteme jedoch lediglich verwendet, um für klinische Untersuchungen die richtigen Testpersonen auszuwählen.

Seit der Schaffung der Life Sciences hat die pharmazeutische Forschung gewaltige Umstrukturierungen und Neuerungen in der Technik erfahren. Durch das Scheitern rein synthetischer Ansätze bei der Wirkstoffsuche zeichnet sich deutlich ab, dass die Zukunft der Pharmaindustrie von der Etablierung neuer Leitstrukturen aus der Natur abhängt. So wird es ein wichtiges Ziel sein, das Potential der Natur nutzbar zu machen. Derzeit sind schätzungsweise erst 1 - 10 % der als kultivierbar geltenden Mikroorganismen auf Sekundärstoffproduktion hin untersucht worden.[31] Neben dem Rückgriff auf seltene Mikroorganismen oder marine Organismen eröffnet auch die intensive Erforschung einzelner Bakterienstämme Wege zu interessanten neuen Naturstoffen. Die vorliegende Arbeit gibt mit den bakteriellen Sekundärstoffen Phenalinolacton A (**5**) und Hexacyclinsäure (**6**) zwei Beispiele für die Berechtigung dieses Ansatzes, da derart komplexe Strukturen sicherlich von keinem Chemiker der an synthetisch leicht zugänglichen Substanzen interessiert ist dargestellt worden wären.