

**Pharmazeutische Chemie im neuen Jahrtausend:
Medizinische Chemie und Analytik – zwei Werkzeuge für die Arzneistoffsuche**

3. Lesmüller-Vorlesung, Würzburg 2000

Ulrike Holzgrabe

Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg, Am Hubland, 97074
Würzburg

Einleitung

Unter Pharmazeutischer Chemie werden insbesondere in Deutschland zwei verschiedene Disziplinen verstanden, und zwar einerseits die Medizinische Chemie, die sich mit der Wirkstoffsuche, sei es synthetisch, aus der Natur oder mit dem Computer, beschäftigt und andererseits die Pharmazeutische Analytik, die sich entsprechend den Arzneibüchern mit der Erkennung, der Reinheit und dem Gehalt von Arzneistoffen befasst. Letztere Disziplin bedient sich im wesentlichen chromatografischer Methoden, wie der Hochleistungsflüssigkeits (HPLC)-, der Gas (GC)- und der Dünnschichtchromatografie (DC), sowie verschiedenerlei Titrationsen. Mit Ausnahme der IR- und UV-Methoden hat die Spektroskopie bisher nur wenig Eingang in die Pharmazeutische Analytik gefunden.

Im Rahmen dieser Übersicht soll deutlich gemacht werden, dass Medizinische Chemie und Analytik nicht zwei verschiedene Disziplinen sind. Vielmehr ist die Analytik ein immer wichtigeres Werkzeug der Arzneistoffentwicklung geworden, ohne dass es z. B. keine Kombinatorische Chemie, kein „Proteomics“ oder „Genomics“ gäbe. Insbesondere die gekoppelten Techniken aus Chromatografie und NMR- sowie Massenspektroskopie, wie GC-MS, LC-MS und LC-NMR, haben dazu beigetragen.

Die verschiedenen Möglichkeiten der Arzneistoffsuche sollen im folgenden aufgezeigt werden: Die Rolle des Zufalls, häufig auch Serendipity genannt, der Beitrag theoretischer Methoden wie der Quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehungen (QSAR) und des Molecular Modelling, die Suche von Wirkstoffen in der Natur, die Kombinatorik und der kombinierte Einsatz rationaler und kombinatorischer Methoden. Auch in der Pharmakokinetik spielen die oben genannten gekoppelten Techniken aus Chromatografie und Spektroskopie eine immer wichtigere Rolle. Die Analytik hat vornehmlich zwei Aufgaben; sie muss einerseits die chemische Struktur des Wirkstoffes sichern und soll andererseits dessen Wechselwirkung mit biologischen Systemen aufklären helfen.

Der glückliche Zufall

„Ein glücklicher Zufall hat uns ein Präparat in die Hände gespielt“ bemerkten Cahn und Hepp 1886, als sie an einem Hund die antiseptische Wirkung von Naphthalin, gewonnen aus Steinkohlenteer, überprüften. Die untersuchte Substanz war aber nicht Naphthalin sondern Acetanilid, das später von Kalle & Co. als Antipyreticum (Antifibrin[®]) auf den Markt gebracht und Ausgangspunkt für die Entwicklung von Phenacetin und Paracetamol wurde. Es gibt unzählige dieser Beispiele in der Geschichte der Suche nach neuen Arzneistoffen: Clonidin wurde als Rhinologikum statt als Antihypertensivum entwickelt, Lysergsäurediethylamid (LSD) als kreislaufanregendes Mittel statt als Halluzinogen, Praziquantel als Antidepressivum statt als Antiparasitenmittel, Methaqualon als Antimalariamittel statt als Hypnotikum oder Meprobramat als Muskelrelaxans statt als Tranquilizer (weitere Beispiele siehe^{1,2}). Die Beispiele sind so vielfältig und stellen jeweils so bemerkenswerte Erfolgsgeschichten dar, dass man sich fragen muss, ob rationaler Ansätze der richtige Weg zur schnellen Arzneistoffsuche ist. Sicher ist, dass man dem Zufall Raum geben muss.

Die rationale Suche nach Wirkstoffen: QSAR und Molecular Modelling

Schon vor über 100 Jahren hat Emil Fischer³ erkannt, „...dass Enzym und Glycosid wie Schloss und Schlüssel zueinander passen müssen, um eine chemische Wirkung aufeinander ausüben zu können“. Ein rationales Wirkstoffdesign ist ohne die Kenntnis der detaillierten räumlichen Struktur des Zielmoleküls, des „Schlosses“, schwierig. Die Struktur des Zielproteins ist mittels Röntgenstrukturanalyse nur zugänglich, wenn das Protein (möglichst mit einem Liganden) kristallisierbar ist. Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie kann die Struktur des gelösten Protein ebenfalls aufklären helfen.⁴ Die so ermittelte dreidimensionale Struktur des Zielmoleküls kann am Computer aufgebaut und der Wirkstoff für das „aktive Zentrum“, z. B. des Enzyms, designed und optimiert werden. Diese Technik nennt man struktur-basiertes Wirkstoffdesign⁵. So wurde der HIV-Protease-Hemmstoff Saquinavir am Computer maßgeschneidert: Die Struktur der HIV-Protease, eine Aspartat-Protease, die das bei der Virusvermehrung gebildete Polypeptid zwischen den Aminosäuren Phenylalanin und Prolin in funktionelle Proteine schneidet⁶, wurde mittels einer Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Als Inhibitor war Pepstatin bekannt, das die Protease in subnanomolaren Konzentrationen hemmte, aber nicht in die Zelle penetrieren konnte. So wurde nach ebenso wirksamen Verbindungen gesucht, die bessere pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen. Als Minimalsubstrate der HIV-Protease erwiesen sich Heptapeptide als ausreichend, die vorwiegend zwischen Phenylalanin und Prolin gespalten werden können.

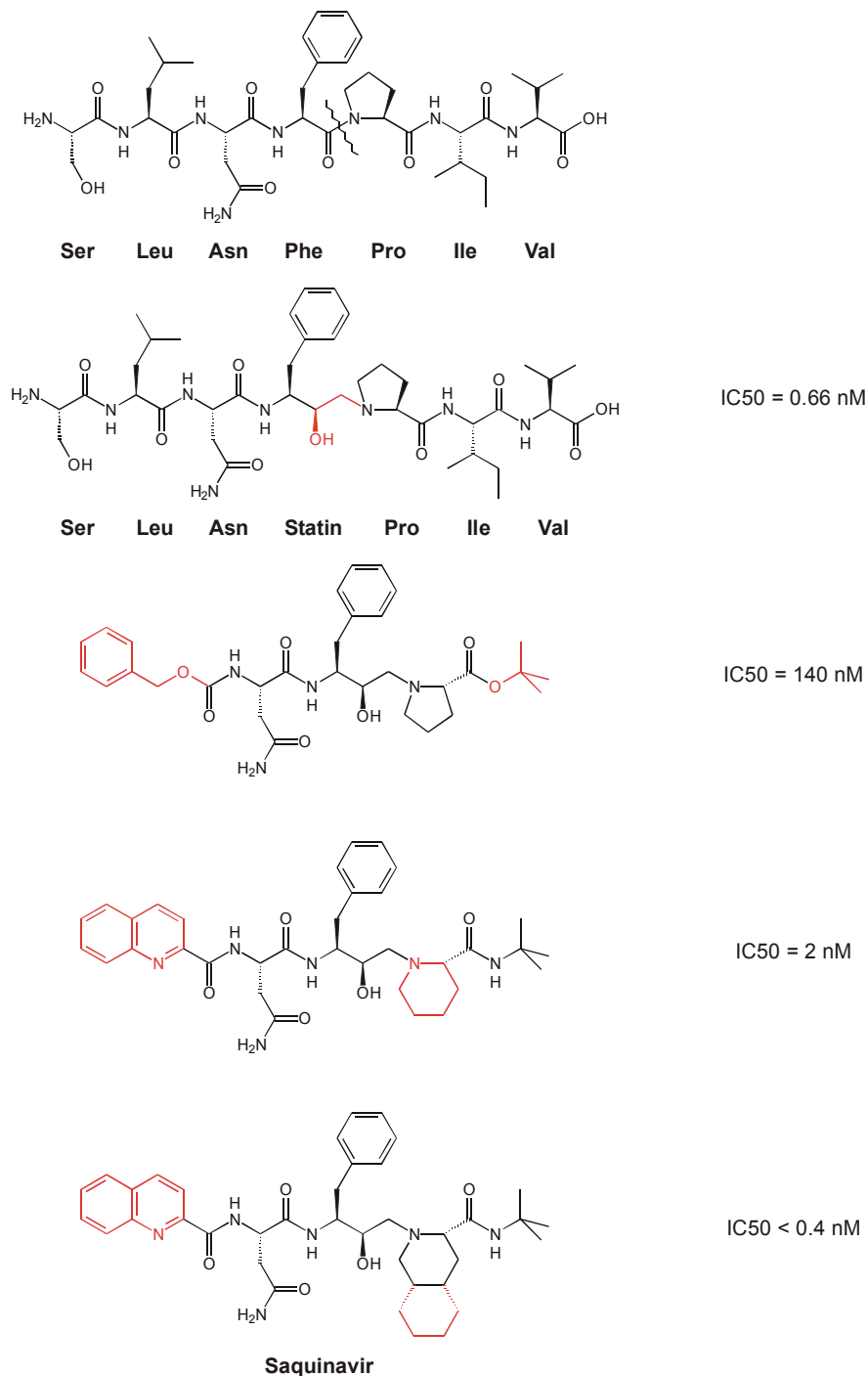


Abb. 1: Optimierung des ursprünglich gefundenen Heptapeptid (obere Struktur) zum Saquinavir. Die jeweils veränderten Strukturelemente sind rot gekennzeichnet, die IC_{50} -Werte an der Struktur vermerkt.

Der Austausch von Phenylalanin gegen die unnatürliche Aminosäure Statin führte bereits zu einem potenten Inhibitor, dessen Bindungsaffinität weiter gesteigert wurde, in dem die im Enzym vorhandenen Bindungstaschen schrittweise besser durch Vergrößerung des ursprünglichen Prolinrings und der Benzyloxygruppe ausgefüllt wurden. Die auf diese Weise erhalte-

ne Struktur des Saquinavir findet sich in allen anderen peptidartigen HIV-Protease-Inhibitoren wieder.

Schwieriger ist rationales Vorgehen, wenn die Struktur der Bindungsstelle nicht bekannt ist. Mit Hilfe der schon von Hansch eingeführten QSAR-Analyse, bei der die Affinität der Liganden zu einem biologischen Zielmolekül durch physikochemische Eigenschaften, sogenannte Deskriptoren, erklärt wird, kann ein Ligand häufig am Computer ohne Ansehen der Bindungsstelle zu einem Wirkstoff optimiert werden^{7,8}. Mit der Methode können zwar keine neuen Leitmoleküle gefunden werden, aber bekannte Leitmoleküle schnell in bezug auf Pharmakodynamik und Pharmakokinetik verbessert werden. Ähnlichkeitsanalyse⁹ von bereits bekannten Liganden einer strukturell unbekanntem Bindungsstelle und De-novo-Design mit Hilfe von Substanzbibliotheken für den Fall, dass es noch keine Liganden für ein bekanntes Zielmolekül gibt, sind weitere Werkzeuge des rationalen Drug-Design, die bei der Wirkstoffentwicklung helfen¹. Es sei aber angemerkt, dass die Effektivität und Vorhersagekraft der Computermethoden mit zunehmender Zahl an „Unbekannten“ deutlich abnimmt. Nichtsdestoweniger gibt es eine ganze Reihe von Arzneistoffen, an deren Entwicklung das sogenannte „Computer-aided Drug Design“ maßgeblich beteiligt war. Dazu zählen neben den oben beschriebenen HIV-Protease-Hemmstoffen der 5-HT_{1D}-Agonist Zolmitriptan, der Carboanhydrase-Inhibitor Dorolamid, der Gyrasehemmstoff Norfloxacin oder auch der Acetylcholinesterase-Hemmstoff Donepezil, der zur Behandlung von Mb. Alzheimer eingesetzt wird.

Wirkstoffe aus der Natur

Bis zu Beginn des 20. Jahrhunderts waren neben wenigen anorganischen Salzen fast alle Arzneimittel Extrakte aus Pflanzen- und Tierprodukten. Aus vielen der Extrakte wurde das „wirksame Prinzip“ isoliert, z. B. die Curare-Arten Toxiferin und Tubocurarin aus *Strychnos*- und *Chondodendron*-Arten, Morphin aus *Papaver somniferum*, Atropin aus *Atropa belladonna* oder Chinin aus *Cinchona*-Arten^{10,11}. Auch heute sind noch ein Drittel der meist verkauften Arzneistoffe natürlichen Ursprungs. Dies gilt insbesondere für Antibiotika, aber auch für Cytostatica (siehe Tabelle 1).

Die Vorteile der Arzneistoffsuche in der Natur liegen klar auf der Hand:

1. Ganz häufig werden neue chemische Strukturen aufgefunden.
2. Es handelt sich um reine Substanzen mit definierter, zumeist rigider Struktur hoher Funktionalität¹².
3. Die strukturelle Diversität der Natur ist größer als die der größten Bibliotheken aus der Kombinatorischen Chemie (s. u.); sie wird Biodiversität genannt.

4. Zwar wird meist die Wirkung einer Arzneipflanze, die untersucht wird, in der Volksmedizin beschrieben, aber der Wirkmechanismus ist nicht bekannt; auf diese Weise können neue therapeutische Ansätze gefunden werden.

Tabelle 1: Neue Arzneistoffe aus der Natur

<p>Aus Mikroorganismen:</p> <p><i>Immunsuppressiva:</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Cyclosporin</p> <p style="padding-left: 40px;">Tacrolimus</p> <p style="padding-left: 40px;">Rapamycin</p> <p><i>CSE-Hemmer:</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Statine: z. B. Lovastatin</p> <p><i>Cytostatica:</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Endiine: z. B. Calicheamycin,</p> <p style="padding-left: 40px;">Dynemicin A</p> <p><i>Antidiabetica:</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Acarbose</p>	<p>Aus Pflanzen:</p> <p><i>Cytostatica:</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Taxol,</p> <p style="padding-left: 40px;">Topotecan,</p> <p style="padding-left: 40px;">Epothilon A und B</p> <p><i>Antiprotozoen-Mittel:</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Artemisinin</p> <hr/> <p>Aus marinen Organismen</p> <p><i>Neurotoxin:</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Brevetoxin</p> <p><i>Cytostatica in klinischer Prüfung:</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Bryostatin, Didemnin B</p>
---	--

Die Art der Naturstoffisolierung hat sich gewandelt. Während man früher nacheinander aus großen Mengen Pflanzenmaterial die Isolierung der einzelnen, reinen Substanzen vornahm, dann die Struktur aufklärte und die biologische Aktivität evaluierte, wählt man heute den Weg der „bioassay-guided-fractionation“ der Extrakte, bei dem in einem Lauf nicht nur mit einfachen biologischen Tests die Wirksamkeit der Fraktionen (z. B.¹³) evaluiert, sondern parallel auch die Struktur mittels NMR- und Massenspektroskopie ermittelt wird. Dies ist durch die gekoppelten Techniken der LC-MS und LC-NMR-Spektroskopie möglich geworden. Auf diese Weise wird der langwierige Prozess der Isolierung und Kristallisation von Substanzen, die ggf. unwirksam sind, umgangen. Außerdem stellt man frühzeitig fest, ob man einer bereits bekannte Substanz auf der Spur ist, die es nicht lohnt, rein zu isolieren. Vorteile bringt dieses konzertierte Vorgehen auch bei Substanzen, die sich während der Isolierung zersetzen würden; Vitamin A ist ein typisches Beispiel¹⁴. Obgleich sozusagen „on-flow“ gearbeitet wird, können in der NMR-Spektroskopie (nach Lösungsmittelunterdrückung) zweidimensionale Messmethoden wie COSY, TOSCY, HMQC, NOESY, ROESY^{15,16,17} etc. verwendet werden, die ein hohes Maß an Strukturinformation liefern. Die Möglichkeit der LC-MS/MS-Messungen mit APCI- (Atmospheric pressure chemical ionization) oder ESI- (Electron-spray

ionization) Techniken hat den Vorteil, dass Molekülionen gefunden werden und in einem weiteren Schritt Tochterionen-Massenspektren erzeugt werden können, aus denen wiederum Strukturinformationen zu entnehmen sind¹⁸. Auf diese Weise identifizierte Hostettmann und seine Mitarbeiter eine Vielzahl von potentiellen Wirkstoffen in Pflanzen^{19,20,21,22}, unter anderem Antioxidantien aus *Orophea enneandra*²³ und Fungizide aus *Bobgunnia madagascariensis*²⁴. Noch einen Schritt weiter geht die analytische Triade von Bringmann und Mitarbeitern. Hier werden zusätzlich LC-CD-Messungen vorgenommen, die über die Ausnutzung des Circular dichroismus weitere Informationen über die Stereochemie geben. So wurden Dioncophylline^{25,26} und Knipholon-Anthrone²⁷ mit Antimalaria-Aktivität aus *Habropetalum dawei* und *Dioncophyllum thollonii* bzw. aus *Kniphofia foliosa* aufgefunden und in ihrer Struktur charakterisiert. Ein besonders großer, bisher kaum ausgeschöpfter Pool an potentiellen neuen Wirkstoffen ist in den marinen Mikroorganismen zu finden^{28,29}. Das Neurotoxin Brevitoxin aus *Bugula neritina* und das Cancerostaticum Didemnin B aus *Trididemnum solidum* sind erste Beispiele dafür.

Zusammenfassend kann man das Vorgehen bei der Suche nach neuen Wirkstoffen aus der Natur wie folgt beschreiben¹⁹:

1. Sammlung und botanische Bestimmung von ausgesuchtem Pflanzenmaterial bzw. Mikroorganismen
2. Extraktion mit geeigneten Lösungsmitteln
3. Biologische und pharmakologische Testung des Rohextraktes
4. „Bioassay-guided“-Fraktionierung (zumeist chromatografische Methoden) zur Erlangung der reinen, biologisch aktiven Bestandteile
5. Online-Strukturbestimmung mittels LC-UV-MS und LC-NMR-Spektroskopie
6. Ausführliche Charakterisierung des pharmakologischen und toxikologischen Profils der reinen Substanzen

Kürzlich haben Grabley und Thiericke¹⁰ eine Automatisierung der HPLC-Trennung von Pflanzenmaterial beschrieben. Ca. 1-5g Pflanzen werden in 300 Fraktionen mit relativ sauberen Metaboliten getrennt, und diese dann dem High-Through-put-Screening (HTS) zur Bestimmung der biologischen Aktivität einerseits und der LC-MS/MS und LC-NMR zur Strukturaufklärung andererseits unterworfen. Mit der Entwicklung der LC-NMR/MS-Kopplung wird die Suche von Wirkstoffen in der Natur noch weiter beschleunigt werden können, wie Spraul und Mitarbeiter am Beispiel von Quercetinglycosiden aus Apfelschalen zeigen konnten³⁰.

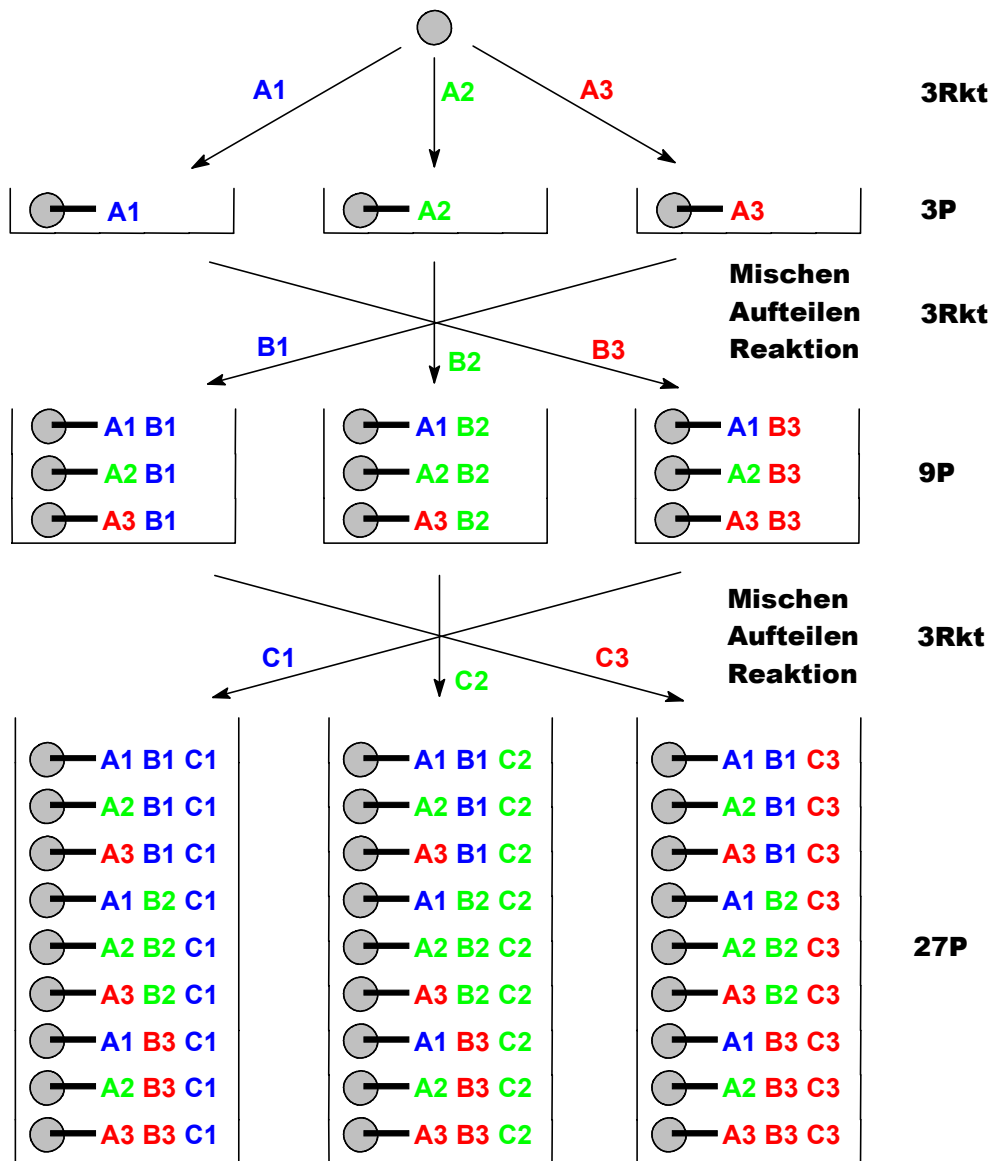
Die „Kombinatorische Biosynthese“ setzt nicht auf fertige Naturstoffe, sondern versucht Sekundärmetabolitengene aus unterschiedlichen Produzenten mittels gentechnischer Methoden neu zu kombinieren. Auf diese Weise können strukturell komplizierte Naturstoffe selektiv variiert oder ganz neue Naturstoffe mit neuen Wirkqualitäten hergestellt werden^{31,32,33,34,35}. Auch hier spielen natürlich die oben genannten gekoppelten Techniken eine wichtige Rolle.

Kombinatorische Chemie

Obleich die Methoden der Kombinatorische Chemie sehr artifiziell aussehen, ist die Kombinatorik keine Erfindung der Menschheit. Die Natur nutzt das Prinzip der Mischung verschiedener Bausteine z. B. beim Aufbau der DNA, wobei sie bei einer DNA aus 300 Basenpaaren 4^{300} verschiedene Sequenzmöglichkeiten hat! Da jeweils 3 Basenpaare eine der 20 Aminosäuren definieren, können 300 Basenpaare in 20^{100} unterschiedliche Proteine übersetzt werden³⁶. Um in ähnlicher Weise möglichst viele Verbindungen (die Gesamtheit der synthetisierten Verbindungen wird Bibliothek genannt) in möglichst wenigen Schritten herstellen zu können, bediente man sich z. B. der sogenannten Split-and-Mix-Technik. Dabei werden die Startmoleküle entsprechend der Merrifield-Synthese³⁷ an einen polymeren Träger gebunden und dann verschiedene Reaktionsschritte ausgeführt. Zwischen jedem Reaktionsschritt wurden alle Bestandteile gemischt (mix) und wieder auf eine definierte Zahl von „Töpfchen“ aufgeteilt (split, siehe Abb. 2). Dadurch entstehen z. B. nach drei Reaktionsschritten jeweils Gemische von neun Verbindungen in drei Töpfen mit jeweils einem Moleküle pro Trägerkügelchen. Diese Töpfe werden dem HTS zugeführt, um herauszufinden, wo sich die höchste biologische Aktivität befindet. Hat man einen Topf mit hoher Aktivität identifiziert, muss durch Deconvolution³⁸ herausgefunden werden, welches der Moleküle in diesem Topf der sogenannte „Hit“ ist. Dies ist sehr aufwendig, da es der Suche der Nadel im berühmten Heuhaufen gleich kommt, und nicht immer von Erfolg gekrönt ist. Außerdem hat die Methode den Nachteil, dass Hits mit mittlerer Aktivität, die durchaus gute neue Leitverbindungen sein können, im Gemisch nicht oder nur schwer gefunden werden. Nicht umsonst wird die Methode gerne auch als eine „Lotterie für Chemiker“ bezeichnet³⁹.

In den letzten Jahren hat man sich mehr der Parallelsynthese häufig auf Mikrotiterplatten zugewandt, die sowohl an der Festphase (siehe Abb. 3) als auch in Lösung durchgeführt wird. Am Ende einer Reaktionssequenz müssen die Zielmoleküle gereinigt, konzentriert und strukturell charakterisiert werden.

Kombinatorische Chemie



Split-Methode:

- = polymeres Trägermaterial
- Rkt** = Zahl parallel durchgeführter Reaktionsansätze
- P** = Zahl der unterschiedlichen Produkte

Abb. 2. Kombinatorische Chemie: die Split-and-Mix-Technik

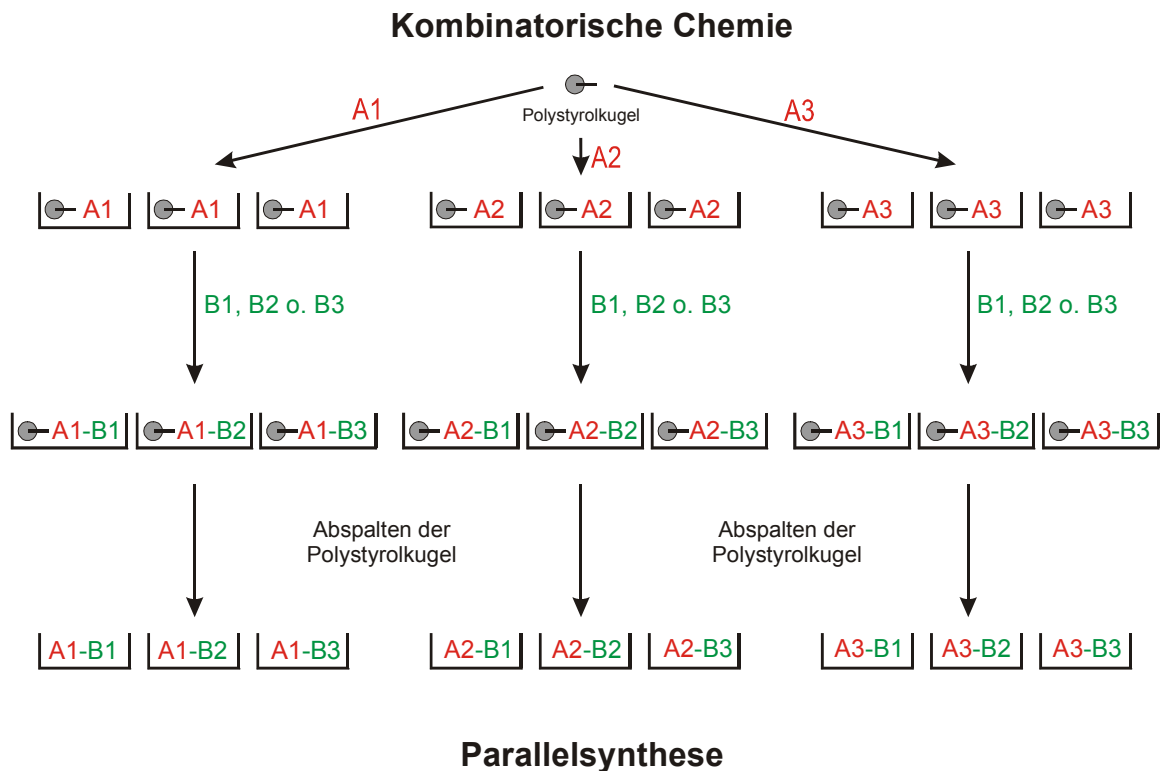


Abb. 3. Kombinatorische Chemie: die Parallelsynthese

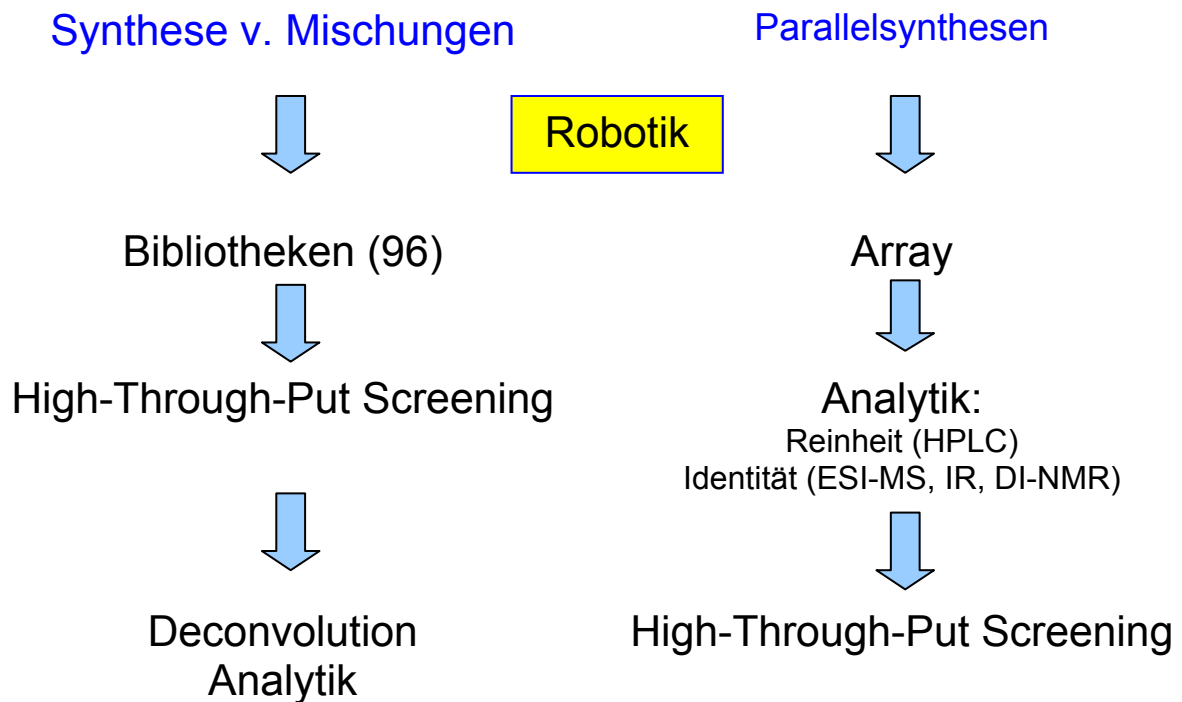


Abb. 4. Vergleich zwischen der Split-and-Mix-Technik und der Parallelsynthese

Aufgrund der in der Kombinatorischen Chemie erzeugten großen Bibliotheken an Verbindungen bedarf eines hohen Grades an Automatisierung. Auch hier haben sich die Kombinationen aus präparativer HPLC oder Festphasenextraktion mit der NMR- und insbesondere der Massenspektroskopie bewährt. Hier hat die Entwicklung der APCI- und ESI-Technik, die auf Einfach- und Triple-Quadrupol- oder Ionenfallen-Massenspektrometern verfügbar ist, Fortschritte gebracht⁴⁰. Von der LC-NMR-Technik wurde außerdem eine Methode abgeleitet, „direct-injection“-NMR genannt, mit der man eindimensionale ¹H-NMR-Spektren der Lösungsproben aus den Mikrotiterplatten und Reaktionsgefäßen direkt messen kann (VAST (= versatile automated sample transport)-Probenwechsler-System)⁴¹. Über Nacht läßt sich auf diese Weise eine Bibliothek von ca. 400 Verbindungen charakterisieren, d. h. die Menge an gewünschtem Produkt sowie die Verunreinigungen quantifizieren. Im nächsten Schritt sollen die NMR-Spektren vorher berechnet und anschließend mit den gemessenen verglichen werden, um die Beurteilung der abgelaufenen Synthese weiter zu automatisieren (z. B.⁴²).

Inzwischen stehen auch Methoden zur Verfügung, die Festphasenreaktionen auf dem Träger zu verfolgen, wie z. B. die FT-IR-Untersuchung⁴³ und die matrix-assisted laser-desorption-ionisation time-of-flight (Maldi-TOF) Massenspektroskopie⁴⁰. Letztere kann zur Bestimmung des Molekulargewichtes als auch der Reinheit genutzt werden.

Trotz der vielfältigen Verbesserungen der Techniken in fast allen Bereichen, d. h. der eigentlichen Synthese, der Reinigung der Zielmoleküle und deren spektroskopischer Charakterisierung, hat die Kombinatorische Chemie bis heute die in sie gesetzten hohen Erwartung, sozusagen das non-plus-ultra-Verfahren der Wirkstoffsuche und insbesondere der Suche nach gänzlich neuen Leitstrukturen zu sein, nicht erfüllt. Dies ist zum Teil darin begründet, dass die so entwickelten Substanzen polar und wasserlöslich sein müssen (die meisten im Handel befindlichen Arzneistoffe sind allerdings eher lipophil), dass noch immer nur eine begrenzte Zahl von Reaktionen für die Synthese zur Verfügung stehen, und dass Reinigung, Identifizierung und Reinheitsanalyse eine immens große Menge an Information erzeugen. Nichtsdestoweniger ist Parallelsynthese ein wichtiges Werkzeug für die Optimierung einer Leitstruktur in Bezug auf Affinität und Spezifität zu einem Zielprotein und, um die Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffes zu verbessern.

Kombinatorisch-rationale Ansätze

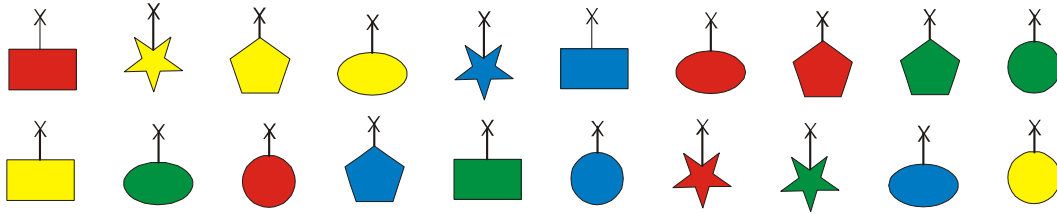
Um die Größe der Bibliotheken auf ein überschaubares Maß zu beschränken, geht man zunehmend dazu über, die bereits vorhandenen Kenntnisse der jeweiligen Wirkstoffsuche in die Planung der Bibliotheken einzubeziehen.

Integration des strukturbasierten Wirkstoffdesign in die Kombinatorische Chemie: Ist die Struktur des Zielproteins sowie die Bindungstasche für den Wirkstoff bekannt, so können am Computer die Substrukturen einer Leitsubstanz ermittelt werden, die bereits Wechselwirkungen mit dem Protein eingehen und zusätzliche neue Molekülteile für weitere Interaktionen reissbrettartig geplant werden. Gehen diese Erkenntnisse in die Planung der Substanzbibliothek ein, kann die Zahl der Verbindungen drastisch gesenkt werden⁴⁴.

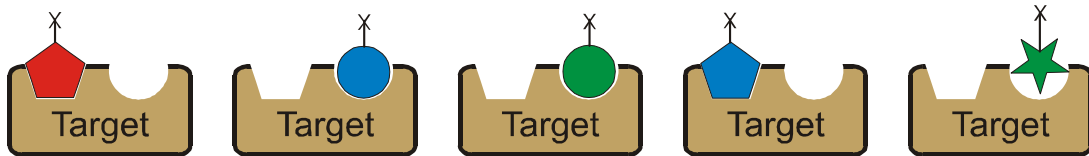
Kombinatorische Zielmolekül-orientierte Wirkstoff-Konstruktion (combinatorial target-guided ligand assembly)⁴⁵: Das Prinzip dieser Methode besteht in der Kopplung von Strukturelementen eines geplanten Wirkstoffes, die einzeln nur eine mittelmäßige Affinität zu einem Zielmolekül haben, aber gemeinsam hochaffin sind. Im ersten Schritt wird ein Satz (Bibliothek) von Bruchstücken eines Wirkstoffes (Molekulargewicht 200-300) synthetisiert, die potentiell Affinität zum Zielmolekül haben und außerdem über einen flexiblen Linker (Kupplungselement) verfügen, über die die entsprechenden Teilstücke später miteinander verknüpft werden können. Die biologische Aktivität dieser Bruchstücke wird gemessen. Im nächsten Schritt werden jeweils zwei der Bruchstücke, die bei der Testung eine relative hohe Affinität zum Zielmolekül (μM) aufwiesen, in allen möglichen Kombination über Linker miteinander verbunden. Diese zweite Bibliothek wird wiederum biologisch evaluiert. Hier zeigen einige der Bruchstückkombinationen eine um Zehnerpotenzen höhere Affinität zum Zielmolekül (nM-pM) als die Einzelteile (siehe Abb. 5). Maly und Mitarbeiter haben auf diese Weise z. B. einen subtypselektiven Inhibitor der nicht-rezeptor-gekoppelten Tyrosinkinase c-Src gefunden. Zuerst wurden über 300 aromatische Substanzen mit einer Oximfunktion als Ankopplungsgruppe für den Linker synthetisiert, die die c-Src zu mehr als 70 % bei einer Konzentration von 500nM hemmten. 37 Bruchstücke wurden dann über die Oximfunktion mit Dibromalkanen unterschiedlicher Länge miteinander verknüpft, wobei die Kombination aus einem Carbazol- und einem Brenzcatechinbruchstück mit einem Ethylenlinker der potenteste Inhibitor war (Abb. 6).

Combinatorial target-guided ligand assembly

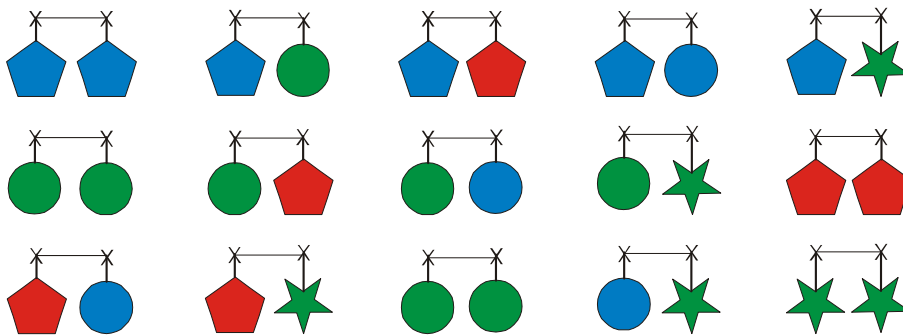
1. Synthese eines Satzes potentieller Wirkstoffteile ($\square, \circ, \triangle, \star, \diamond$) mit einem chemischen Kupplungselement (-x).



2. Testung und Identifizierung der Bruchstücke, die am Zielmolekül binden.



3. Synthese einer Bibliothek aller möglichen Kombinationen der bindenden Bruchstücke



4. Testung der Bibliothek und Identifizierung der besten Verbindung.

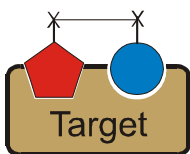
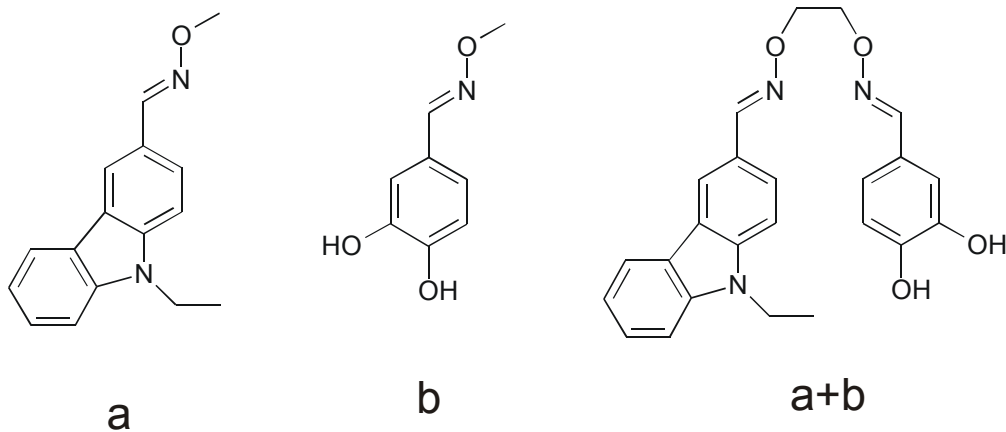


Abb. 5 Schematische Darstellung der kombinatorischen Zielmolekül-orientierten Wirkstoffkonstruktion



Verbindung	IC50 c-SrC [μ M]
a	41 +/- 5
b	40 +/- 16
a+b	0.064 +/- 0.038

Abb. 6 Entwicklung eines selektiven Inhibitors der Tyrosinkinase c-Src mit Hilfe der kombinatorischen Zielmolekül-orientierten Wirkstoffkonstruktion

SAR-by-NMR: Die von Fesik und Mitarbeitern bei Abbott schon 1996 entwickelte „SAR-by-NMR“-Methode⁴⁶ ist im Prinzip ähnlich, nur bedient sie sich nicht der Messung der biologischer Aktivitäten, sondern der Bestimmung der Differenzen von chemischen Verschiebungen im NMR-Spektrum eines Proteins vor und nach dem Binden seines Liganden; dies nennt man „Chemical Shift Mapping“. Voraussetzung für diese Technik, die auf Proteine bis zu einer Größe von ca. 30 kDa anwendbar ist und einer ¹⁵N-Isotopenmarkierung bedarf, ist, dass die ¹⁵N-¹H-Paare im zweidimensionalen HSQC-Experiment gut aufgelöste Spektren des Proteins ergeben. Setzt man nun der Lösung eines Zielprotein einen affinen Liganden zu, so treten im NMR-Spektrum Signalverschiebungen für alle die NH-Gruppen des Proteins auf, die an der Bindung des Liganden beteiligt sind. Auf diese Weise kann man anhand des Differenzspektrums (vor und nach dem Binden) die Bindungsstellen des Liganden ausmachen sowie die Unterschiede in der Bindung verschiedener Liganden visualisieren. Fesik et al. identifizierten so aus Gemischen einer Substanzbibliothek zwei Liganden des FK506-bindenden Proteins, die verschiedene, aber benachbarte Bindungsstellen benutzen. Diese beiden Liganden wurden wiederum über verschiedene Linker miteinander verknüpft, und mit Hilfe der NMR-Spektren die Bindung

charakterisiert, ohne dass eine biologische Affinität während der Optimierung gemessen wurde. So konnte sehr schnell mit diesem Fragment-basierten Ansatz ein potenter Inhibitor des Proteins gefunden werden (siehe Abb. 7). Diese NMR-Technik kann nicht nur in

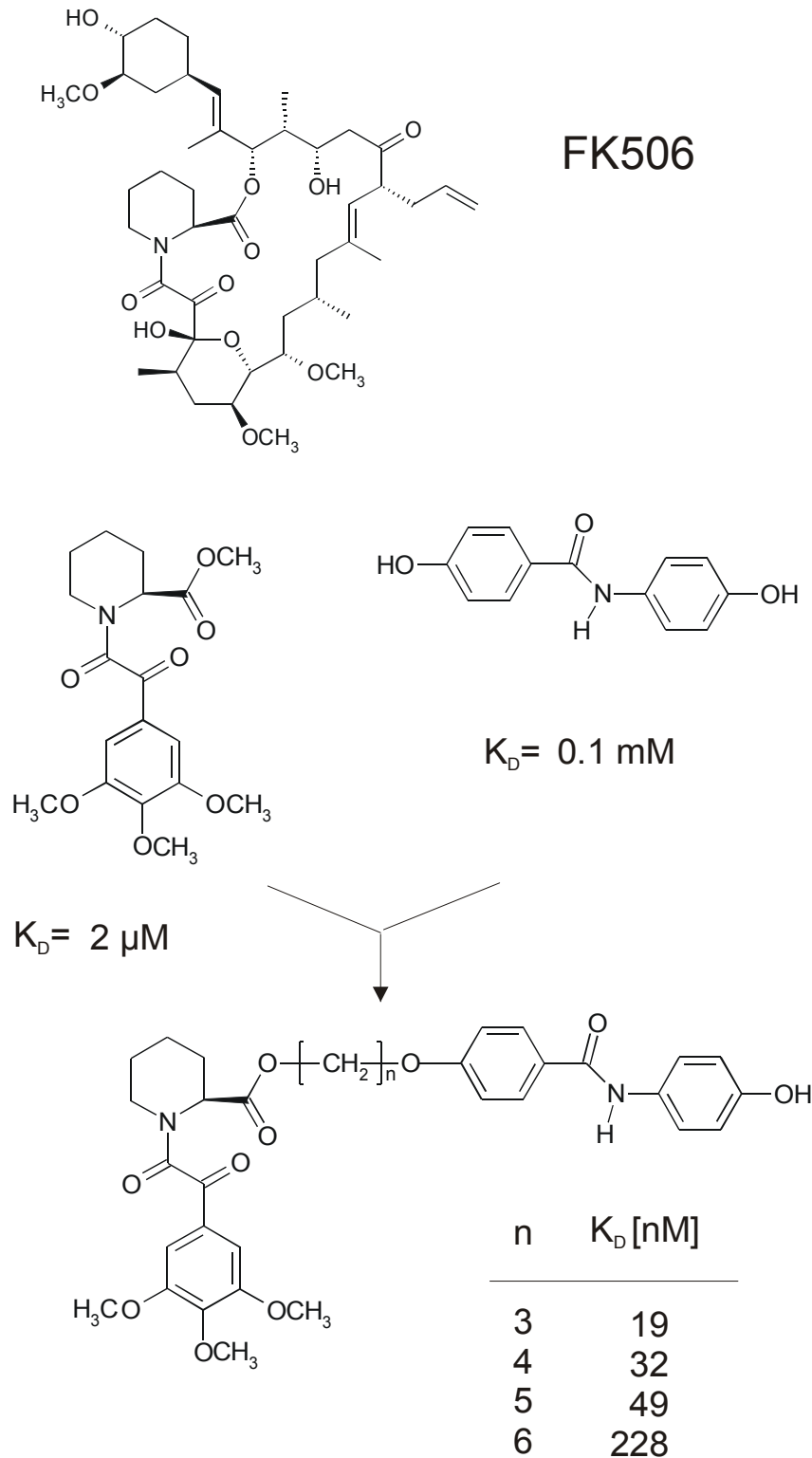


Abb. 7 SAR-by-NMR: Optimierung eines Liganden für das FK506-bindende Protein

der Kombinatorik von Vorteil sein^{47,48}, sondern auch in der schrittweisen Erhöhung der Bindungsaffinität einer Substanz durch systematische Strukturvariation⁴⁹ oder beim High-Through-Put-Screening einer Substanzbibliothek⁵⁰. Einschränkungen dieses Verfahrens sind, dass die Proteine nur eine begrenzte Größe haben können und wasserlöslich sein müssen; außerdem muss das NMR-Spektrum vollständig aufgeklärt und die Proteine ¹⁵N-dotiert sein müssen. Letzteres wird aber zunehmend einfacher.

Andere Möglichkeiten, Informationen über die Bindung von Liganden an Proteine zu erhalten, stellen die STD (saturation transfer difference) NMR-Spektroskopie^{51,52}, die Diffusionsbasierten NMR-Messungen⁵³, transfer-NOE⁵⁴ und NOE-Pumpen⁵⁵ dar.

Ligand-fishing by MS: Die ESI-Massenspektroskopie ist dazu geeignet, Protein-Ligand-Wechselwirkungen zu quantifizieren, da die Komplexe aus Enzym und Ligand bei der Messung erhalten bleiben⁵⁶. So kann man einerseits einem Protein mehrere Liganden zur Wechselwirkung anbieten und mittels ESI-MS messen, welcher Ligand (= Massenzahl) in welchem Ausmaß (= Intensität des Massenpeaks) mit dem Protein interagiert. Andererseits kann man einem Liganden mehrere Proteine oder Proteinfragmente zum Binden anbieten und ebenso die Bindungspartner und die Quantität ermitteln. So wurden von Heck und Mitarbeitern⁵⁷ Komplexe von dem Antibiotikum Vancomycin mit verschiedenen potentiell bindenden Peptidfragmenten, und zwar ac-D-Ala-D-Ala, ac-D-Ala-D-Ala-D-Ala und ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala, im Gemisch ESI-massenspektroskopisch vermessen. Dabei wurde der größte Peak für die Masse 911, die dem Komplex aus Vancomycin und ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala entspricht, erhalten. Dies entspricht der UV-spektroskopisch gemessenen Bindungskonstante (Abb. 8) und dem bakteriziden Verhalten von Vancomycin. Eine Komplexbindung mit den entsprechenden L-Ala-Peptiden wurde erwartungsgemäß nicht beobachtet. Umgekehrt wurde ac₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala mit Vancomycin, Deschlorovancomycin und Desmethylvancomycin im Gemisch vermessen. Hier zeigte der Desmethylvancomycin-Peptid-Komplex den intensivsten Peak im ESI-MS, was wiederum mit großen Wirksamkeit dieses Vancomycin-Derivates, was in China im Handel ist, übereinstimmt. Auf ähnliche Weise wurden von Griffey and Mitarbeitern die nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen einem Gemisch aus Aminoglykosiden mit verschiedenen RNA-Abschnitten simultan quantifiziert⁵⁸. Mit Hilfe dieses massenspektroskopischen Verfahrens könnte man z. B. auch Resistenzen erklären, die auf einer strukturellen Veränderung des Zielmoleküls beruhen.

Tabelle 2: Bindungskonstanten von Peptidfragmenten und Vancomycin

Ligand	K_{ass} ESI-MS	K_{ass} UV
ac-D-Ala-D-Ala	19,000	20,000
ac-L-Ala-L-Ala	< 500	keine Bindung
ac-D-Ala-D-Ala-D-Ala	51,000	50,000
ac ₂ -L-Lys-D-Ala-D-Ala	730,000	1,500,000

Pharmakokinetik

Schon lange hat die LC-MS/MS-Methode in Pharmakokinetik-Untersuchungen Einzug gehalten⁵⁹, da mit Verwendung dieser Methode im Vergleich zur HPLC mit UV-Detektion häufig die Aufarbeitung der Proben aus biologischen Quellen entfallen kann, die Messzeiten kürzer und die Messung spezifischer sind. Außerdem ist die Methode empfindlicher, so dass eine Blutspiegelkurve länger verfolgt werden kann. Dies zeigen z. B. die Kurven des Erythromycin A, das einerseits aus dem Stinoprats (N-Acetylcysteinsalz des Propionats) und andererseits aus dem Ethylsuccinat *in vivo* freigesetzt wird.⁶⁰ Das Propionat flutet nicht nur schneller an als das Ethylsuccinat, es gibt auch über einen längeren Zeitraum in einer höheren Konzentration das Erythromycin A frei.

Weiterhin ist die LC-ESI-MS/MS-Technik geeignet, um sogenannte Casette-Dosing-Experimente^{61,62,63,64} zu analysieren. Hier werden einem Versuchstier gleichzeitig mehrere Arzneistoffe, zumeist einer pharmakologischen Gruppe, appliziert und der Verlauf der Blutspiegelkurven oder Ausscheidung über den Harn über einen gewissen Zeitraum verfolgt. Aufgrund der Selektivität der LC-MS/MS-Methode (LC-ESI-MS/MS oder LC-APCI/MS/MS) lassen sich die Konzentration der Arzneistoffe selbst und häufig auch Ihrer Metaboliten quantifizieren. Der Vorteil des „Casette-dosing“ liegt nicht nur im Zeitgewinn, sondern auch in der Ersparnis an Tierversuchen, so dass auch die Optimierung eines potentiellen Wirkstoffes in Bezug auf seine pharmakokinetischen Eigenschaften beschleunigt werden kann.

Die online-Kopplung von HPLC mit der NMR- und ESI-Massenspektroskopie kann die Detektion und Charakterisierung von Wirkstoffen und deren Metaboliten z. B. in menschlichen Harn vereinfachen. So gelang z. B. Nicholson und seinen Mitarbeitern nicht nur die Bestimmung der bekannten Metaboliten des Paracetamol, des Glucuronid und Sulfat, in Harn, sondern auch der Nachweis des Phenylacetylglutamins⁶⁵, das bisher NMR-spektroskopisch⁶⁶ noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassung

Die spektroskopischen Methoden wie NMR- und Massenspektroskopie, die früher nur zur Strukturaufklärung definierter chemischer Substanzen benutzt wurden, sind heute integraler Bestandteil der Wirkstoffsuche geworden. Sie dienen der Identifizierung der Wirkstoffe in Gemischen, der Kontrolle der Reinheit und der Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und biologischem Zielmolekül. Dies ist nicht nur durch die Weiterentwicklung der Massen- und NMR-Spektroskopie-Techniken an sich möglich geworden, sondern durch die Kombination mit allen chromatografischen Methoden besonders mit der HPLC. Auch Genomics- und Proteomics-Ansätze der Wirkstoffsuche profitieren in erheblichem Maße davon.

So sehr man auch das Arsenal an Methoden für die Wirkstoffsuche erweitert hat, die teuren und zeitaufwendigen klinischen Studien werden auch weiterhin der eigentliche Flaschenhals der Arzneimittelentwicklung sein.

Danksagung

Den Herrn Proff. Dr. G. Bringmann (Chemie, Universität Würzburg) und Dr. F. Sörgel (Institut für Pharmazeutische und Biomedizinische Forschung, Nürnberg-Heroldsberg) danke ich die zur Verfügung gestellten Daten und Abbildungen, den Apothekern H. Projahn und J. Teichgräber für die Erstellung der Abbildungen und - lastbut not least - der Lesmüller-Stiftung für die Einladung zu diesem Vortrag.

Literatur

- ¹ Böhm, H.-J., Klebe, G., H. Kubinyi, Wirkstoffdesign, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1996
- ² de Stevens, G. Serendipity and structured research in drug discovery, Prog. Drug Res. **30**, 189-203 (1986)
- ³ Fischer, E. Ber. Dtsch. Chem. Ges. **27**, 2985-2993 (1894).
- ⁴ Gemmecker, G. NMR as a tool in Drug Design, in NMR Spectroscopy in Drug Development and Analysis (Hrsg. Holzgrabe, U., Wawer, I., Diehl, B.) Wiley-VCH, Weinheim 1999, S. 134-154
- ⁵ Höltje, H.-D., Folkers, G. Molecular Modeling - Basic Principles and Applications in: Methods and Principles in Medicinal Chemistry (Hrsg. Mannhold, R., Kubinyi, H., Timmerman, H), VCH, Weinheim, 1997, Vol. 5
- ⁶ Fitzgerald, P.M., Springer, J.P., Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. **20**, 299-320 (1991)
- ⁷ Kubinyi, H. QSAR: Hansch-Analysis and Related Approaches, VCH, Weinheim, 1993

-
- ⁸ Livingstone, D.J. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **40**, 195-209 (2000)
- ⁹ H. Kubinyi, G. Folkers, Y.C. Martin, 3D QSAR in Drug design, Ligand-Protein Interactions and Molecular Similarity, Vol.2, Part III, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, 1998
- ¹⁰ Weitere Beispiele: Grabley, S., Thiericke, R. The Impact of Natural Products on Drug Discovery, in: *Drug Discovery from Nature* (Hrsg. Grabley, S., Thiericke, R.), Springer Verlag, Berlin 2000, Kap. 1, 3-37
- ¹¹ Soejarto, D.D., Farnsworth, N.R., *Persp. Biol. Med.* **32**, 244-256 (1989)
- ¹² Henkel, T., Brunne, R.M., Müller, H., Reichel, F. *Angew. Chem.* **111**, 688-691 (1999)
- ¹³ Gafner, S., Wolfender, J.L., Hostettmann, *Planta Med.* **62**, 67-69 (1996)
- ¹⁴ Albert, K., Schlotterbeck, G., Braumann, U., Händel, H., Spraul, M., Krack, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **34**, 1014-1016 (1995)
- ¹⁵ Albert, K., On-line-Coupling of HPLC or SFC with NMR Spectroscopy in: *NMR Spectroscopy in Drug Development and Analysis* (Hrsg. Holzgrabe, U., Wawer, I., Diehl, B.) Wiley-VCH, Weinheim 1999, S. 101-117
- ¹⁶ Bringmann, G. Rückert, M., Messer, K., Schupp, O., Louis, A.M., *J. Chromatogr. A* **837**, 267-272 (1999)
- ¹⁷ Bringmann, G., Rückert, M., Saeb, W., Mudogo, V., *Magn. Res. Chem.* **37**, 98-102 (1999)
- ¹⁸ Niessen, W.M.A. *Analytical Mass Spectrometry*, in: *Analytical Chemistry*, (Hrsg. Mermet J.-M, Otto, M., Widmer, H.M.) Wiley-VCH, Weinheim, 1998, Kap. 9.4
- ¹⁹ Hostettmann, K., Hostettmann, M., Rodriguez, S., Wolfender, J.-L. LC-Hyphenated Techniques in the Search for New Bioactive Plant Constituents, in: *The Biology-Chemistry Interface* (Hrsg.: Cooper, R., Snyder, J.K.) M. Dekker, New York 1999, Kap. 4
- ²⁰ Wolfender, J.-L., Rodriguez, S., Hostettmann, K., *J. Chromatogr. A* **794**, 299-316 (1998)
- ²¹ Wolfender, J.-L., Ndjoko, K., Hostettmann, K., *Curr. Org. Chem.* **2**, 575-596 (1998)
- ²² Hostettmann, K., Wolfender, J.-L., Rodriguez, S., *Planta Med.* **63**, 2-10 (1997)
- ²³ Cavin, A., Potterat, O., Wolfender, J.-L., Hostettmann, K., Dyatmyko, W., *J. Nat. Prod.* **61**, 1497-1501 (1998)
- ²⁴ Schaller, F., Rahalison, L., Islam, N., Potterat, O., Hostettmann, K., Stoeckli-Evans, H., Mavi, S., *Helv. Chim. Acta* **83**, 407-413 (2000)
- ²⁵ Bringmann, G. Günther, C., Schlauer, J. Rückert, M. *Anal. Chem.* **70**, 2805-2811 (1998)
- ²⁶ Bringmann, G., Messer, K., Wohlfahrth, M., Kraus, J., Dumbuya K., Rückert, M. *Anal. Chem.* **71**, 2678-2686 (1999)
- ²⁷ Bringmann, G., *Planta Med.* **65**, 757-758 (1999)
- ²⁸ König, G., Wright, A.D. Trends in Marine Biotechnology, in: *Drug Discovery from Nature* (Eds. Grabley, S., Thiericke, R.), Springer Verlag, Berlin 2000, Kap. 10, 180-188
- ²⁹ Jiang, Z.-D., Jensen, P.R., Fenical, W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 2003-2006 (1999)
- ³⁰ Lommen, A., Godejohann, M., Venema, D.P., Hollman, P.C.H., Spraul, M. *Anal. Chem.* **72**, 1793-1797 (2000)
- ³¹ Staunton, J., Wilkinson, B. *Topics Curr. Chem.* **195**, 50-92 (1998)
- ³² Rohr, J. *Angew. Chem.* **107**, 963-967 (1995)
- ³³ Bechthold, A. *Pharm. i. u. Z.* **26**, 12-16 (1997)
- ³⁴ Rohr, J. *Angew. Chem.* **112**, 2967-2969 (2000)
- ³⁵ Hutchinson, C.R. Combinatorial Biosynthesis of Antibiotics, in: *Drug Discovery from Nature* (Eds. Grabley, S., Thiericke, R.), Springer Verlag, Berlin 2000, Kap. 13, 233-254
- ³⁶ Beck-Sickinger, A.G., Weber, P., *Kombinatorische Methoden in Chemie und Biologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1999
- ³⁷ Merrifield, R.B. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149 u. 2154 (1963)
- ³⁸ Houghten, R.A., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 273-282 (2000)

-
- ³⁹ Bhalay G. Chem. Britain, 25-29, März 1999
- ⁴⁰ Sage, A.B., Little, D., Giles, K. LCGC (Curr. Trends Devel. Drug Disc) **18**, S20-S29 (2000)
- ⁴¹ Keifer, P.A., Smallcombe, S.H., Williams, E.H., Salomon, K.E., Mendez, G., Belletire, J.L., Moore, C.D., J. Comb. Chem. **2**, 151-171 (2000)
- ⁴² Meiler, J., Meusinger, R., Will, M. J. Chem. Inf. Comput. Sci. **40**, 1169-1176 (2000)
- ⁴³ Oelichmann, J., Git Labor-Fachzeitschrift, 248-251 (3,2000)
- ⁴⁴ Antel, J. Curr. Op. Drug Discov. Devel. **2**, 224-233 (1999)
- ⁴⁵ Maly, D.J., Choong, I.C., Ellman, J.A., Proc. Nat. Acad. Sci. **97**, 2419-2424 (2000)
- ⁴⁶ Shuker, S.B., Hajduk, P.J., Meadows, R.P., Fesik, S.W., Science **274**, 1531-1534 (1996)
- ⁴⁷ Hajduk, P.J., Sheppard, G., Nettesheim, D.G., Olejniczak, E.T., Shuker, S.B., Meadows, R.P., Steinman, D.H., Carrera, G.M., Marcotte, P.A., Severin, J., Walter, K., Smith, H., Gubbins, E., Simmer, R., Holzman, T.F., Morgan, D.W., Davidsen, S.K., Summers, J.B., Fesik, S.W., J. Am. Chem. Soc. **119**, 5818-5827 (1997)
- ⁴⁸ Hajduk, P.J., Dinges, J., Miknis, G.F., Merlock, M., Middleton, T., Kempf, D.J., Egan, D.A., Walter, K.A., Robins, T.S., Shuker, S.B., Holzman, T.F., Fesik, S.W. J. Med. Chem. **40**, 3144-3150 (1997)
- ⁴⁹ Medek, A., Hajduk, P.J., Mack, J., Fesik, S.W., J. Am. Chem. Soc. **122**, 1241-1242 (2000)
- ⁵⁰ Hajduk, P.J., Gerfin, T., Boehlen, J.-M., Häberli, M., Marek, D., Fesik, S.W., J. Med. Chem. **42**, 2315-2317 (1999)
- ⁵¹ Mayer, M., Meyer, B. Angew. Chem. **111**, 1902-1906 (1999)
- ⁵² Klein, J., Meinecke, R., Mayer, M., Meyer, B., J. Am. Chem. Soc. **121**, 5336-5337 (1999)
- ⁵³ Chen, A., Shapiro, M.J., J. Am. Chem. Soc. **121**, 5338-5339 (1999)
- ⁵⁴ Henrichsen, D., Ernst, B., Magnani, J.L., Wang, W.-T., Meyer, B., Peters, T. Angew. Chem. **111**, 106-110 (1999)
- ⁵⁵ Chen, A., Shapiro, M.J., J. Am. Chem. Soc. **122**, 414-415 (2000)
- ⁵⁶ W.D. Lehmann, Massenspektrometrie in der Biochemie, Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg, 1996, S. 352ff
- ⁵⁷ Jorgenson, T.J.D., Roepstorff, P., Heck, A.J.R, Anal. Chem. **70**, 4427-4432 (1998)
- ⁵⁸ Griffey, R.H., Hofstadler, S.A., Sannes-Lowery, K.A., Ecker, D.J., Crooke, S.T., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **96**, 10129-10133 (1999)
- ⁵⁹ Mück, W. Pharmazie **54**, 639-644 (1999)
- ⁶⁰ Sörgel, F., Kinzig-Schippers, M., Lauschner, R., Dtsch. Apo. Ztg. **136**, 3107-3113 (1996)
- ⁶¹ Beaudry, F., Le Blanc, J.C.Y., Coutu, M., Brown, N.K. Rapid Commun. Mass Spectrom. **12**, 1216-1222 (1998)
- ⁶² Bayliss, M.K., Frick, L.W., Curr. Op. Drug Discov. Develop. **2**, 20-25 (1999)
- ⁶³ Watt, A.P., Morrison, D., Evans, D.C., DDT **5**, 17-24 (2000)
- ⁶⁴ White, R.E., Annu. Rev. Pharmakol. Toxicol. **40**, 133-157 (2000)
- ⁶⁵ Shockor, J.P., Unger, S.E., Wilson, I.D., Foxall, P.J.D., Nicholson, J.K., Lindon, J.C. Anal. Chem. **68**, 4431-4435 (1996)
- ⁶⁶ Burton, K.I., Everett, J.R., Newman, M.J., Pullen, F.S., Richards, D.S., Swanson, A.G., J. Pharm. Biomed. Anal. **15**, 1903-1912 (1997)