

EPOTHILONE: NEUE WIRKSTOFFE GEGEN KREBS

Dieter Schinzer, Anja Limberg

Myxobakterien produzieren einen Naturstoff, das Epothilon, der auf dieselbe Weise gegen Tumorzellen wirkt wie das aus der pazifischen Eibe isolierte Taxol. Letzteres wird bereits erfolgreich in der Krebstherapie eingesetzt. Unser Forscherteam arbeitet derzeit mit einem Schweizer Pharmaunternehmen an der Weiterentwicklung und Testung von Epothilon in der Tumorthherapie. Jedoch werden noch langjährige Studien bis zur medikamentösen Anwendung und Behandlung folgen müssen. Erste klinische Studien laufen bereits in den USA.

Eine der aufsehenerregendsten Entwicklungen des letzten Jahrzehnts auf dem Gebiet der Antitumormittel ist das Taxol[®] (der Name „Taxol“ wurde von Bristol-Myers Squibb als Warenzeichen registriert), das ausgezeichnete Ergebnisse in der Eierstockkrebstherapie erzielt und sich in den drei Jahren seit seiner Zulassung einen stattlichen Marktanteil erobert hat. Diese Vorrangstellung könnte aber infrage gestellt werden durch einen neu entdeckten Naturstoff, den von Myxobakterien der Gattung *Sorangium* produzierten Sekundärmetaboliten Epothilon (Abb. 1), der im *in vitro*-Screening des amerikanischen National Cancer Institute (NCI) eine außergewöhnliche Wirkung und Selektivität gegen Brust- und Dickdarm-Tumorzelllinien zeigt. Epothilon wurde entdeckt von Hans Reichenbach und Gerhard Höfle *et al.* an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig. Obwohl das Molekül von den deutschen Forschern 1993 patentiert wurde, fand es zunächst keine Beachtung, bis Epothilon 1995 unabhängig von der Arbeitsgruppe um Daniel M. Bollag der Merck Forschungslabore in Westpoint, Pennsylvania, aufgrund seiner Taxol-artigen Aktivität wiederentdeckt wurde. Damit erweckte das Interesse der organischen Chemiker an dem Molekül, und es begann ein internationaler Wettlauf um einen synthetischen Zugang zu dem Naturstoff, den die Arbeitsgruppe um Samuel J. Danishefsky vom Sloan-Kettering Institute in New York mit der Veröffentlichung der ersten Totalsynthese von Epothilon A im Dezember 1996 für sich entscheiden konnte.

MYXOBAKTERIEN

Als Quelle für neue biologisch aktive Verbindungen dienen vor allem Pflanzen und Mikroorganismen. Taxol wurde zum Beispiel im Rohextrakt der Rinde der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) entdeckt. Viele der Stoffe mikrobiellen Ursprungs finden unter anderem Anwendung als Therapeutika in der Human- und Veterinärmedizin und in der Landwirtschaft als Futtermittelzusätze, als Insektizide, Herbizide usw. Die Produktion von Sekundärmetaboliten (der Begriff bezieht sich auf Stoffwechselprodukte, die keine essentielle Bedeutung für den zum Wachstum

erforderlichen Primärstoffwechsel haben) durch Mikroorganismen ist damit nicht nur von akademischem Interesse, sondern besitzt auch größte wirtschaftliche Bedeutung. Die heute etwa 10 000 bekannten biologisch aktiven Verbindungen aus Mikroorganismen wurden aus einer verhältnismäßig kleinen Gruppe von Bakterien und Pilzen isoliert. Eine Möglichkeit, neue Substanzen zu finden ist das Screening neuer potentieller Produzenten. In diesem Rahmen werden an der GBF in Braunschweig seit 1975 Myxobakterienstämme gezüchtet und auf die Produktion biologisch aktiver Verbindungen hin untersucht. Myxobakterien waren bis dahin in dieser Hinsicht praktisch völlig unerforscht, da sie als schwierig zu isolieren und zu kultivieren galten.

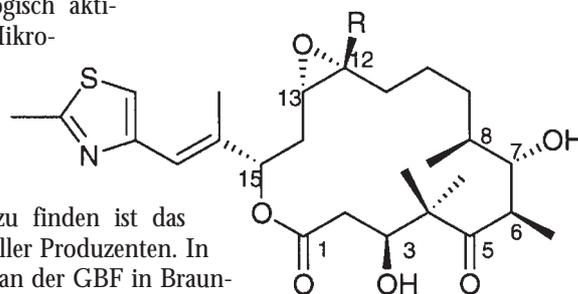
MORPHOLOGIE DER MYXOBAKTERIEN

Myxobakterien besitzen das am weitesten entwickelte Sozialverhalten und die komplexesten Lebenszyklen unter allen bekannten prokaryotischen Organismen.

Myxobakterien sind in der Natur sehr verbreitet: Man findet sie in großer Anzahl in Erde, auf verrottendem Pflanzenmaterial, Dung von Pflanzenfressern und auf Baumrinden.

Hinsichtlich ihrer Ernährung lassen sich zwei Gruppen unterscheiden. Die meisten Arten weisen einen bakteriolytischen Stoffwechsel auf. Sie sind durch die Exkretion von Exoenzymen in der Lage, Biomakromoleküle abzubauen und können sogar ganze Zellen anderer Mikroorganismen, insbesondere von Bakterien und Hefen, auflösen und die freigesetzten Produkte als Nahrung verwenden. Nur die Vertreter der Gattung *Sorangium* sind in der Lage, Cellulose, z. B. in Form von Filterpapier, abzubauen (cellulolytischer Stoffwechsel).

Die vegetativen Zellen der Myxobakterien sind mit 0.7 bis 1.2 µm Breite und 3 bis 12 µm Länge relativ groß und man kann zwei verschiedene Zelltypen unterscheiden. Die Zellen sind entweder schlank, biegsam und spindelförmig (mit spitz zulaufenden Enden) oder stäbchenfö-



**Epothilon A: R = H;
Epothilon B: R = Me**

Abb. 1
Molekülstruktur von Epothilon

Abb. 2
Vegetative Zellen von *Sorangium cellulosum* mit der für die Unterordnung *Sorangineae* typischen Morphologie: zylindrisch und mit abgerundeten Enden.



Abb. 3
Schwärme von Myxobakterienzellen.



Abb. 4
Fruchtkörper von *Sorangium cellulosum* mit robuster Wand.

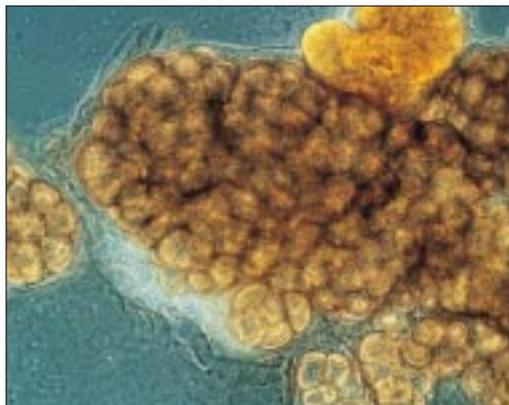
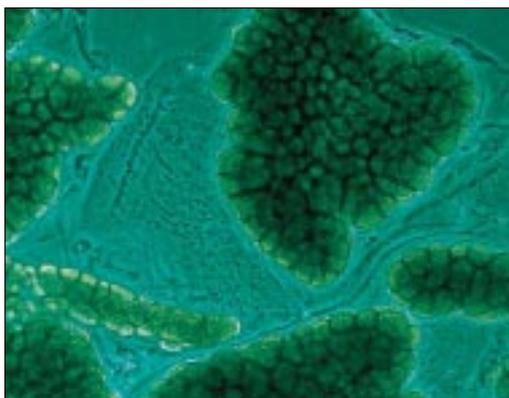


Abb. 5
Fruchtkörper von *Sorangium cellulosum* bestehend aus vielen kleinen, auf dem Nährboden dicht zusammenliegenden, Sporangien.



mit abgerundeten Enden, wie z. B. die von *Sorangium cellulosum* (Abb. 2). Diese zwei Zelltypen repräsentieren zwei taxonomische Untergruppen der Myxobakterien.

Die Myxobakterienzellen besitzen die Fähigkeit, sich auf geeigneten festen Oberflächen durch Gleiten fortzubewegen, so daß man auf festen Medien eine rasche Ausbreitung der Kolonien beobachten kann. (Abb. 3)

Der erstaunlichste Aspekt der Myxobakterien ist die durch Nahrungsknappheit induzierte Bildung von Fruchtkörpern. Diese Eigenschaft unterscheidet Myxobakterien von allen anderen Prokaryoten und erfordert ein hochentwickeltes interzelluläres Kommunikationssystem. Unter Mangelbedingungen wandern die vegetativen Zellen an bestimmten Stellen innerhalb der Kolonien aufeinander zu, türmen sich auf und differenzieren sich zu Fruchtkörpern. Ein einzelner Fruchtkörper kann aus 10^6 oder mehr Zellen bestehen, hat eine Größe von 10 bis 1 000 μm und ist somit mit bloßem Auge zu erkennen. Die Fruchtkörper können je nach Gattung ganz unterschiedlich in Form, Größe und Pigmentierung gestaltet sein. Die Palette reicht vom einfachsten Fall einer kugelförmigen, schleimungebenen Masse, die sich direkt auf dem Substrat befindet, bis hin zu bizarren Formen, bei denen sich ein Stiel bildet, der einen Kopfteil mit fingerartigen Ausstülpungen trägt. Bei den meisten Myxobakterien bildet sich um die zusammengelagerten Zellen herum eine robuste Wand, man spricht dann von Sporangien. Die Fruchtkörper der Gattung *Sorangium* bestehen aus einer mehr oder weniger großen Anzahl von winzigen Sporangien, die in dicht gepackten Haufen auf oder in dem Substrat liegen (Abb. 4, 5).

Während der Reife unterliegen die vegetativen Zellen im Innern der Fruchtkörper einer Morphogenese zu Ruhezellen, den sogenannten Myxosporen. Letztere zeigen eine im Vergleich zu den vegetativen Zellen höhere Resistenz gegen Trockenheit, Hitze und UV-Strahlung. Die Bildung von Myxosporen ermöglicht dem Organismus das Überleben unter ungünstigen Umweltbedingungen. Verbessert sich die Nahrungs- und Umweltsituation, keimen die Myxosporen und gehen wieder in vegetative Zellen über.

Die außergewöhnliche und differenzierte Morphologie der Myxobakterien erlaubt die Identifizierung von Gattungen und Arten fast gänzlich aufgrund von Charakteristika der vegetativen Zellen, der Myxosporen und Fruchtkörper.

MYXOBAKTERIEN ALS PRODUZENTEN BIOLOGISCH AKTIVER SEKUNDÄRMETABOLITE

Während sich das Interesse in der Vergangenheit vor allem auf taxonomische und entwicklungsbiologische Aspekte der Myxobakterien konzentriert hatte, wurden sie in den siebziger Jahren als neue Produzentengruppe biologisch aktiver Sekundärmetabolite entdeckt, zumal sich in der Zwischenzeit gezeigt hatte,

daß Myxobakterien nicht so schwierig handhabbar sind wie früher angenommen wurde und sehr wohl in Flüssigmedien kultiviert werden können. 1977 wurde erstmals die chemische Struktur eines von Myxobakterien produzierten Antibiotikums aufgeklärt: die von einem *Sorangium cellulosum*-Stamm gebildete antifungische Verbindung Ambruticin. Myxobakterien erwiesen sich in den folgenden Jahren als ausgesprochen ergiebige Quelle neuer Verbindungen. In dem seit 1975 an der GBF unter der Leitung von H. Reichenbach und G. Höfle durchgeführten Screening-Programm wurden rund 60 neue Grundstrukturen mit 300 Strukturvarianten aufgeklärt, von denen nur 3 bereits in der Literatur beschrieben waren und von anderen Mikroorganismen produziert wurden. Die neuen Substanzen lassen sich ganz unterschiedlichen chemischen Klassen zuordnen; es wurden makrocyclische Lactame und Lactone isoliert, Polyene, Polyether, Aromaten, Chinone, Alkaloide, Heterocyklen, Peptide und Kombinationen von diesen. Die Fähigkeit, eine bestimmte Verbindung zu produzieren, ist Stamm-spezifisch und keine Eigenschaft der Art. Dies ist ein wichtiger Aspekt angesichts der Tatsache, daß es nur 40 Arten von Myxobakterien gibt, hingegen aber eine praktisch unbegrenzte Anzahl von Stämmen, die ein weites Forschungsfeld bereithalten.

DIE ENTDECKUNG VON EPOTHILON

1985 wurde an der GBF aus einer Bodenprobe, die am Ufer des Zambesi-Stromes im Süden Afrikas gesammelt wurde, der *Sorangium cellulosum* Stamm So ce90 isoliert. Die Kulturbrühe dieses Myxobakteriums zeigte in entsprechenden Screening-Tests biologische Aktivität; durch Zugabe eines Adsorberharzes zur Kultur konnte der aktive Sekundärmetabolit quantitativ gebunden und anschließend vom Harz isoliert werden. Bei der chemischen Bearbeitung durch Höfle und seine Arbeitsgruppe stellte sich heraus, daß es sich um zwei neuartige makrocyclische Polyketide handelte, die nach ihren Struktureinheiten *Epoxid*, *Thiazol* und *Keton* die Namen Epothilon A und B erhielten. Epothilon B unterscheidet sich von Epothilon A durch eine zusätzliche Methylgruppe. Die Strukturen dieser Verbindungen konnten durch spektroskopische Methoden und Röntgenstrukturanalyse von Epothilon B bestimmt werden und wurden im Juli 1996 in der Angewandten Chemie veröffentlicht. Als Reinsubstanzen zeigen die Epothilone A und B eine breite Wirkung gegen eukaryotische Zellen, wobei die Effizienz der Methylvariante B meist um den Faktor 2 höher war als die der Variante A.

Die Epothilone besitzen eine bemerkenswerte antifungische Wirkung gegen Oomyceten, z. B. gegen *Phytophthora infestans*, den Erreger der gefürchteten Kraut- und Knollenfäule der Kartoffel sowohl *in vitro* als auch im Gewächshaus, aber die antifungische Aktivität ist mit einer

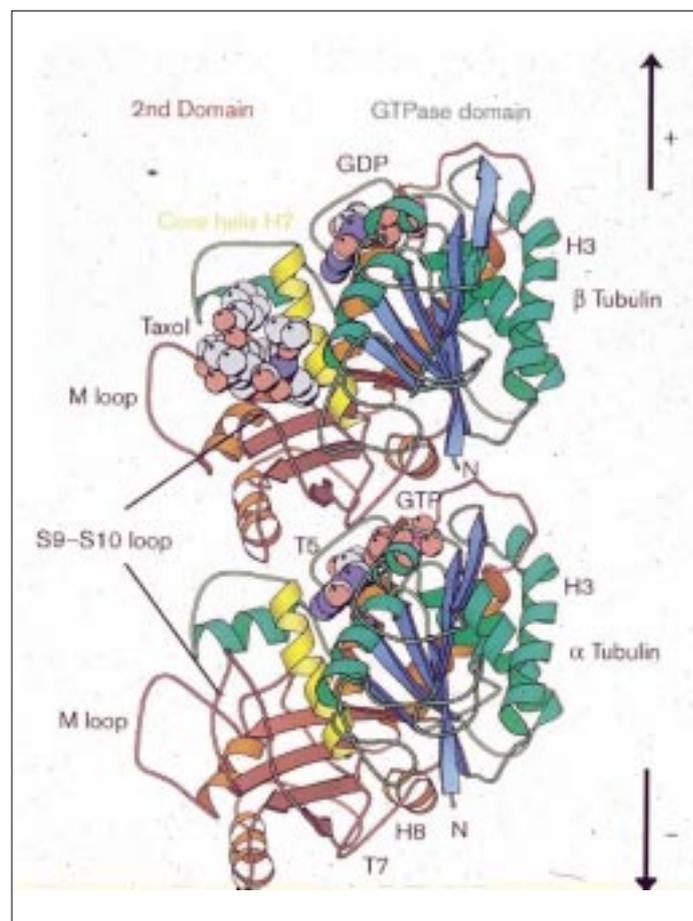


Abb. 6
Dreidimensionale Konformation des Tubulindimers mit gebundenem Taxol. Atomstruktur über Elektronenbeugung.

erheblichen Pflanzentoxizität gekoppelt, so daß weitere Studien in dieser Richtung eingestellt wurden.

Des Weiteren besitzen die Makrolide eine cytotoxische Aktivität gegen Mäusefibroblasten und sie zeigten, wie bereits oben erwähnt, in den Tests des NCI eine außergewöhnliche Wirkung gegen Brust- und Dickdarm-Tumorzelllinien.

Aber weder NCI noch die anderen mit der Substanz befaßten Wissenschaftler entdeckten die Ähnlichkeiten zu Taxol.

Was ist aber nun die besondere Wirkungsweise von Taxol und Epothilon?

TAXOL, EPOTHILON UND DIE MIKROTUBULI

Das Sensationelle an der Entdeckung von Taxol war, daß seine cytotoxische Wirkung auf einer Stabilisierung der Mikrotubuli beruht, während alle bis dahin gefundenen Mikrotubulitaktiven Wirkstoffe wie Colchicin, Podophyllo-toxin oder Vinblastin die Mikrotubuli destabilisieren und auf diese Weise den Zelltod verursachen. Seit der Entdeckung des Wirkungsmechanismus von Taxol vor fast 20 Jahren war trotz intensiver Suche (s. u.) Epothilon die erste Substanz, die den gleichen Mikrotubuli-stabilisierenden Effekt zeigt.

Mikrotubuli können zum einen sehr stabile, statische Strukturen darstellen, z. B. als Bestandteil des Cytoskeletts, andererseits können sie aber auch sehr schnell auf- und wieder abgebaut werden und sind an dynamischen Prozessen wie

Zellteilung oder Proteinsekretion beteiligt. Man bezeichnet dies als dynamische Instabilität der Mikrotubuli. Die dynamischen Eigenschaften gestatten eine schnelle Umwandlung von Mikrotubuli-Strukturen wie z. B. die Umbildung der Cytoskelett-Mikrotubuli zur mitotischen Spindel zu Beginn der Mitose.

Mikrotubuli bestehen aus zwei Proteinen, dem α - und dem β -Tubulin, aus denen sich ein Heterodimer bildet. (Abb. 6) Die Heterodimere bilden in einer Kopf-Schwanz-Anordnung gestreckte Reihen, die sogenannten Protofilamente. In paralleler Anordnung entsteht formal aus 13 Protofilamenten ein zylindrischer Mikrotubulus. Da alle Heterodimere in den Mikrotubuli parallel ausgerichtet sind, ist der Mikrotubulus als Ganzes eine polare Struktur, die ein schnell wachsendes plus-Ende und ein langsam wachsendes minus-Ende besitzt. In der Zelle sind die Mikrotubuli in der Regel mit ihrem minus-Ende in den sogenannten MTOCs (Microtubule Organization Centers, z. B. dem Centrosom) verankert und erstrecken sich mit den plus-Enden von den Ausgangspunkten weg. Das Wachstum der Mikrotubuli erfolgt normalerweise ausgehend von diesen Zentren, da es für die Neubildung von Mikrotubuli in Lösung eine kinetische Barriere gibt. Die Geschwindigkeit, mit der freies Tubulin zu Mikrotubuli polymerisiert, ist proportional zu seiner Konzentration. Wird eine bestimmte kritische Tubulin-Konzentration erreicht, die normalerweise bei einem Wert von $0.2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ liegt, stellt sich an den Enden der Mikrotubuli ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation ein, und es findet kein spontaner Aufbau mehr statt.

Taxol und Epothilon binden an die β -Untereinheit des Heterodimers (Abb. 6) und beeinflussen zum einen das Tubulin-Mikrotubuli-Gleichgewicht, indem sie die Dissoziationsgeschwindigkeit deutlich verringern. Die Gleichgewichtslage wird zugunsten der Mikrotubuli verschoben: Die beiden Naturstoffe machen Mikrotubuli resistent gegen Depolymerisation. Die für eine Polymerisation erforderliche kritische Tubulin-Konzentration wird durch Taxol auf einen Wert unter $0.01 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ gesenkt.

In Gegenwart von Taxol oder Epothilon wird zum anderen die Funktion der MTOCs außer Kraft gesetzt und man beobachtet die Bildung einer Vielzahl kurzer Mikrotubuli, die nicht mit den Organisationszentren verknüpft sind. Die kinetische Barriere für die Neubildung von Mikrotubuli in Lösung wird gebrochen. In *in vitro*-Experimenten (Versuche, in denen man Aspekte der Mikrotubulibildung aus reinem Tubulin sozusagen im Reagenzglas untersucht hat) macht sich diese Barriere dadurch bemerkbar, daß es eine gewisse Verzögerungszeit für die Bildung der Mikrotubuli gibt, da keine Organisationszentren wie in der Zelle vorhanden sind. Bei Zugabe von Taxol oder Epothilon startet die Tubulinpolymerisation hingegen augenblicklich.

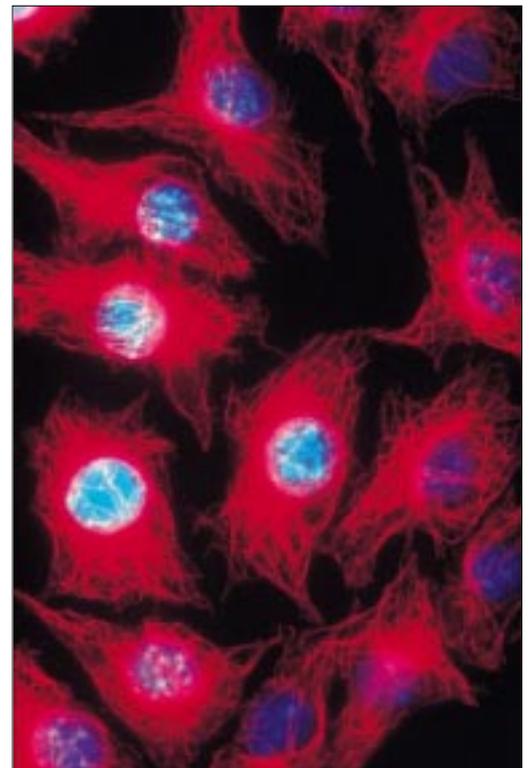


Abb. 7
Humane HeLa Tumorzellen. Das Tubulin erscheint nach Behandlung mit Rhodamin-markierten Antikörpern rot, die Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI blau kontrastiert. Man erkennt die Mikrotubuli, die als Bestandteil des Cytoskeletts netzartig die Zelle durchziehen.

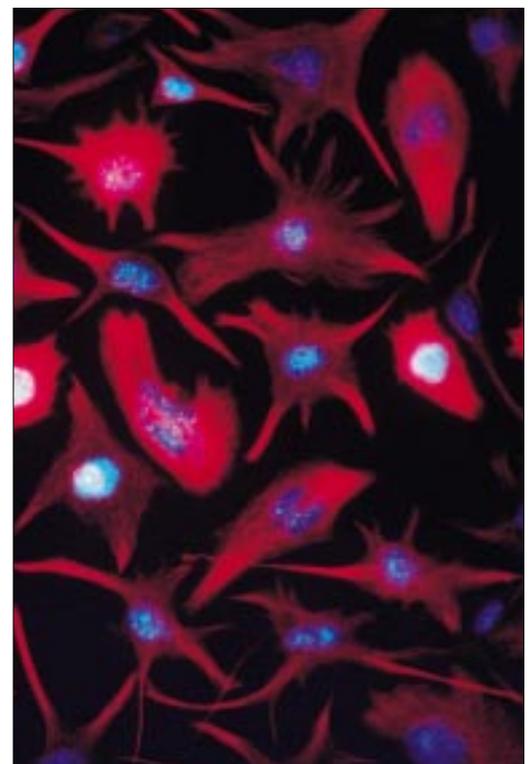


Abb. 8
Humane HeLa Tumorzellen nach Behandlung mit Epothilon. Das Netzwerk verschwindet und die Mikrotubuli verklumpen zu lokalen Bündeln.

Die unter Einwirkung von Epothilon oder Taxol gebildeten Mikrotubuli weisen morphologische Unterschiede zu normalen Mikrotubuli auf: sie sind kürzer, bestehen aus nur 8-9 Protofilamenten und haben einen entsprechend kleineren Durchmesser. Außerdem sind sie auch unter Bedingungen stabil, unter denen Mikrotubuli normalerweise depolymerisieren: sie sind resistent gegenüber Kälte (4 °C) und Calciumionen (4 mM).

Unter dem Mikroskop kann man nach einer relativ hohen Taxol- oder Epothilon-Exposition während der Interphase (der Zeit zwischen zwei Zellteilungen) der Zelle das Verschwinden des Tubulinnetzwerks beobachten. Es entstehen irreversibel kurze Mikrotubuli-Bündel, die unregelmäßig im Cytoplasma verteilt sind (Abb. 7 und 8). Bei kleineren Wirkstoffkonzentrationen bleiben die Interphase-Mikrotubuli in der Regel unbeeinflusst, während selektiv die Bildung und Funktion der Mitosespindel der in der Zellteilung befindlichen Zellen in Mitleidenschaft gezogen wird.

Es ist möglich, daß Krebszellen eine Kontrollfunktion fehlt, die das Fehlen einer normalen mitotischen Spindel anzeigt, so daß sie versuchen, die Mitose fortzusetzen. Die Zellkerne lösen sich schließlich auf und die Zellen unterliegen der Apoptose, dem programmierten Zelltod.

Auch andere von den Mikrotubuli abhängige Zellprozesse können ausgeschaltet werden. Zum Beispiel hemmt Taxol die Fortbewegung der Walker-256-Krebszellen, den intrazellulären Transport von Steroiden in MLTC-1-Zellen und die Sekretion von Insulin aus Pankreaszellen.

TAXOL IN DER ANWENDUNG

Taxol wurde zwar im Rohextrakt der Rinde der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) entdeckt, die Taxolproduktion erfolgt jedoch semisynthetisch ausgehend von 10-Desacetylbaaccatin III, das in Ausbeuten von einem Kilogramm pro 3 000 kg Nadeln der in Europa heimischen Gemeinen Eibe (*Taxus baccata*) zugänglich ist und in vier Schritten in Taxol umgewandelt wird.

Taxol wurde zugelassen für die chemotherapeutische klinische Anwendung gegen Eierstockkrebs. Ein Drittel der Patientinnen sprachen auf die Behandlung mit Taxol an, die Tumore wurden kleiner, obwohl sie gegen andere Therapien resistent waren. Die Anwendbarkeit von Taxol bei anderen Indikationen, wie metastasierendem Brustkrebs, Lungenkrebs und Melanomen, wird untersucht.

Die klinischen Einsatzmöglichkeiten von Taxol werden allerdings eingeschränkt durch eine Reihe von Nebenwirkungen und ungünstigen Eigenschaften. In der bevorzugte Angriffspunkt von Taxol ist die in der Mitose befindliche Zelle. Sich unkontrolliert vermehrende Krebszellen sind infolgedessen von einer Taxol-Therapie am stärksten betroffen. Aber auch andere sich stark vermehrende Zellen werden in Mitleiden-

schaft gezogen. Als Nebenwirkungen, die der Wirkungsmechanismus von Taxol bedingt, treten auf: Neutropenie (die Unfähigkeit bestimmte Granulocyten zu bilden), Alopecia (Haarausfall) und periphere Neuropathie (Absterben motorischer und sensorischer Nerven).

Desweiteren ist Taxol sehr schlecht wasserlöslich, so daß es in einem Lösungsvermittler, Cremaphor, verabreicht werden muß, der wiederum durch die Freisetzung von Histaminen Herzarrhythmien und schwere Überempfindlichkeitsreaktionen hervorrufen kann. Durch die Vorbehandlung mit Antihistaminen und durch lange Infusionszeiten können die Nebenwirkungen jedoch minimiert werden.

Ein anderes Problem ist das Auftreten von Resistenzen, da Taxol wie viele andere Cytostatika aus Zellen mit Multidrug-Resistenz (MDR) durch das Phosphoglykoprotein-Transportsystem herausgepumpt wird. Taxol stellt offenbar ein Substrat für das P-Glykoprotein dar.

Die komplexe Struktur erschwert seine chemische Modifizierung, mit der eine Verringerung der Nebenwirkungen und eine Verbesserung der Wasserlöslichkeit erreicht werden könnte.

Vor dem Hintergrund dieser Schwierigkeiten sind neue Mikrotubuli-stabilisierende Wirkstoffe mit anderen Eigenschaftsprofilen von großem Interesse.

EPOTHILON – EIN POTENTIELLES ANTITUMORMITTEL

Trotz umfassender Screenings mit Hilfe spezieller Testsysteme zur Detektion Taxol-artiger Aktivität, die von Merck, Sharp & Dohme und der Upjohn Company durchgeführt wurden, gab es nur einen Treffer, das Epothilon. Der Verdienst gebührt Daniel M. Bollag und seinen Mitarbeitern, die einen besonders empfindlichen Test zum Aufspüren Mikrotubuli-stabilisierender Aktivität entwickelt haben. Epothilon ist seit der ursprünglichen Entdeckung von Taxol die erste beschriebene Substanz, die den gleichen Wirkungsmechanismus besitzt. Verdrängungsstudien ergaben, daß Epothilon sogar als kompetitiver Inhibitor von Taxol wirkt. Beide konkurrieren offenbar um die gleiche Mikrotubuli-Bindungsstelle.

Erst vor kurzem wurde erkannt, daß weitere Verbindungen, wie Discodermolid, Eleuthrobin und Sarcodictyn, welche aus marinen Quellen isoliert wurden, wie Taxol und Epothilon Mikrotubuli-stabilisierend wirken. Sein Vorkommen in Meeresschwämmen aber macht die Isolierung einer für größere Studien ausreichenden Menge sehr schwierig.

Epothilon hingegen ist durch Fermentation in großen Mengen verfügbar. Und es besitzt noch andere günstige Eigenschaften. Die Probleme bei der Zubereitung als Arzneimittel, wie sie bei Taxol aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit auftreten, dürften sich für Epothilon nicht stellen, da es ungefähr 30 mal besser in Wasser löslich ist als Taxol.

Seine im Vergleich zu Taxol einfache Struktur (Abb. 9) erleichtert chemische Manipulationen am Epothilon-Molekül. Chemiker können daher relativ leicht Derivate, d. h. mehr oder weniger stark veränderte Varianten von Epothilon, herstellen und so versuchen das Molekül den klinischen Erfordernissen anzupassen.

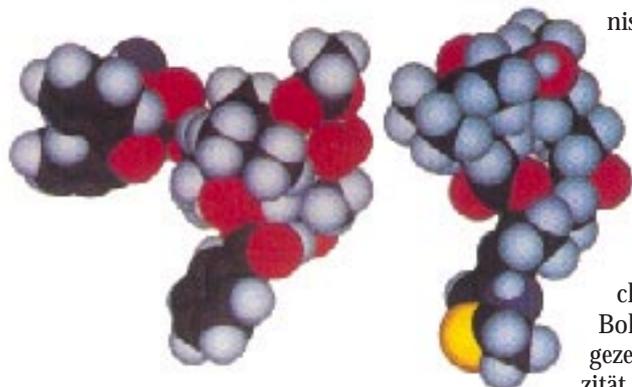


Abb. 9
Räumliche Strukturen von Taxol und Epothilon (Kalottenmodelle)

Der entscheidende Vorteil von Epothilon gegenüber Taxol scheint aber seine cytotoxische Wirkung gegen MDR-Zellen zu sein. Entsprechende Studien von Bollag *et al.* haben gezeigt, daß die Cytotoxizität von Taxol gegen Zellen, die P-Glykoprotein produzieren, ca. 20 000-

fach kleiner ist als gegen Zellen, die dieses Protein nicht herstellen und nicht gegen Cytostatika resistent sind. Epothilon A bzw. B zeigen hingegen einen nur 4- bzw. 12fachen Aktivitätsabfall. Es ist offenbar ein schlechteres Substrat für das Phosphoglykoprotein und wird in erheblich

ren Ringen) ist Epothilon sehr viel einfacher aufgebaut (Abb. 1, 9).

TOTALSYNTHESE VON EPOTHILONEN

Seit Bekanntwerden der biologischen Aktivität und der absoluten Konfiguration der Epothilone begannen – neben unserer Arbeitsgruppe an der TU Braunschweig – zwei weitere wissenschaftliche Teams (Arbeitsgruppe von Prof. Danishefsky vom Sloan-Kettering Institut in New York und die Arbeitsgruppe von Prof. Nicolaou vom Scripps Forschungsinstitut in La Jolla) fieberhaft am Nachbau der von Bakterien stammenden Substanz zu arbeiten. Unser Bestreben war es, eine Synthese zu planen, welche aus sehr einfachen Bausteinen den Zusammenbau des 16gliedrigen Rings ermöglicht (Abb. 10).

Man bezeichnet eine solche Vorgehensweise auch als konvergente Synthesestrategie. Demgegenüber gibt es noch eine lineare Strategie, wobei die gesamte Synthese auf einem einzigen Ausgangsmaterial beruht, von dem alle weiteren Verknüpfungen ausgehen und dadurch wesentlich unökonomischer ist. Daneben wurde darauf geachtet, daß die Synthesebausteine sehr gut variiert werden können, d. h. ein hohes Maß an Flexibilität ermöglicht wird, um die Molekülstruktur später nach Wunsch modifizieren zu können.

Dies stellt nämlich den entscheidenden Vorteil gegenüber der Fermentation von Bakterien dar: Die Bakterien können immer nur das gleiche Epothilon erzeugen, während der Chemiker im Labor fast beliebige Strukturänderungen durchführen kann. Das könnte dazu führen, ein künstliches Derivat von Epothilon im Labor zu synthetisieren, welches noch bessere Eigenschaften bezüglich der Antitumoraktivität besitzt als Epothilon selbst und somit besser für die medizinischen Anforderungen zu nutzen ist.

Nachdem im Dezember 1996 die erste Total-synthese der Arbeitsgruppe von Prof. Danishefsky publiziert wurde, folgten im Abstand einiger Wochen die Totalsynthesen von Prof. Nicolaou und unseres Teams.

Zur Herstellung von Epothilon im Labor ist es wichtig, von vorn herein die Bausteine mit den richtigen Konfigurationen einzusetzen, da in aller Regel die biologische Aktivität entscheidend davon abhängt. Das Team aus New York benutzte eine Trennung der Stereoisomere (Enantiomeren-trennung) über ein Enzym, während die La Jolla Gruppe die optisch aktiven Bausteine aus dem „chiral pool“, d. h. aus der Natur gewonnen hat. Unser Team entschloß sich, die benötigten absoluten Konfigurationen über sogenannte asymmetrische Synthesen (dabei benutzt man optisch aktive Hilfsgruppen zum Aufbau der Moleküle) einzuführen, wodurch auch hier ein Höchstmaß an Flexibilität gegeben ist. Nachdem die Bausteine in optisch aktiver Form vorlagen, konnte der Zusammenbau zum 16gliedrigen Ring beginnen. Hierzu nutzten wir gängige Laborreaktionen (Aldolreaktion, Veresterung), die auch von Enzymen in der Natur durchgeführt werden. Lediglich

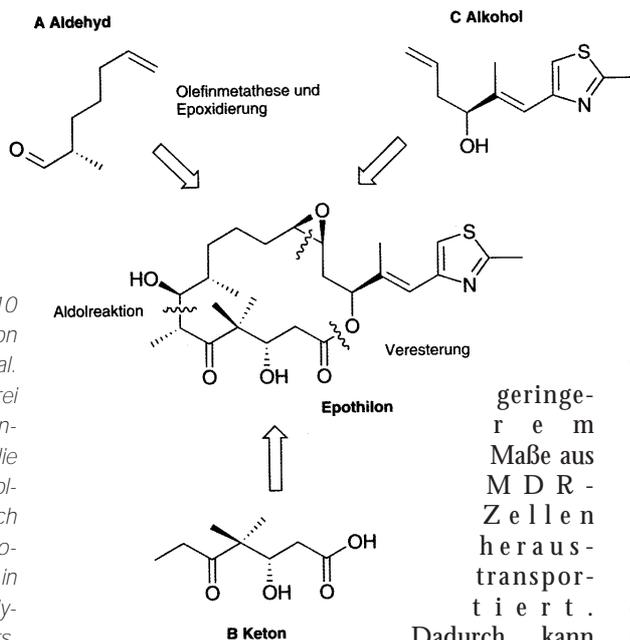


Abb. 10
Strategie zur Synthese von Epothilon nach Schinzer *et al.*
Das Molekül wird aus drei Bausteinen zusammengesetzt. Zunächst wird die Säure mit Hilfe einer Aldolreaktion synthetisiert. Danach verestert man mit einem Alkohol und schließt den Ring in Gegenwart eines Metallkatalysators.

geringerem Maße aus MDR-Zellen heraus transportiert.

Dadurch kann Epothilon auch gegen solche Zellen wirksam sein, die sich gegen eine Behandlung mit Taxol als resistent erwiesen haben.

Trotz des gleichen Wirkungsmechanismus ähneln sich Epothilon und Taxol nur wenig in ihrer chemischen Struktur. Zwar enthalten beide Verbindungen kleine Ether-Ringe, geminale Methylgruppen, Ketogruppen und aromatische Seitenketten, ein Vergleich der Röntgenstrukturbilder zeigt aber, daß die Moleküle sehr unterschiedlich sind. Mit lediglich sieben Stereozentren (Taxol hat elf) und nur einem 16gliedrigen Ring (Taxol besteht aus vier kleine-

der abschließende Ringschluß zum Makrocyclus wurde mit Hilfe einer sehr neuen Reaktion (Olefinmetathese mit Hilfe eines Metallkatalysators) erreicht.

Durch das jetzt gewonnene „Synthese-know-how“ besteht die Möglichkeit, auf breiter Basis Derivate von Epothilon zu synthetisieren, wodurch umfangreiche Studien zur Struktur-Wirkungs-Beziehung möglich werden. Hierdurch könnten die ohnehin schon ausgezeichneten cyto-

toxischen Eigenschaften dieser neuen Leitstruktur (Epothilon bezeichnet man als Leitstruktur, da eine Vielzahl von Strukturvariationen denkbar ist) verbessert werden. Epothilon B bzw. synthetische Abkömmlinge befinden sich mittlerweile bei diversen Pharmafirmen in der klinischen Entwicklung Phase 1, so daß man optimistisch auf eine zukünftige klinische Anwendung im Zusammenhang mit einer erfolgreichen Krebstherapie blicken kann.

Literaturhinweise

- Biologically Active Secondary Metabolites from Myxobacteria. Von H. Reichenbach und G. Höfle in: *Biotechnological Advances*, Band 11, Seiten 219 bis 277, 1993.
- Chemie und Biologie von Taxol. Von K. C. Nicolaou, W.-M. Dai, R. K. Guy in: *Angewandte Chemie*, Deutsche Ausgabe, Band 106, Nr.1, Seiten 38 bis 69, Januar 1994.
- Epothilones, a New Class of Microtubule-stabilizing Agents with Taxol-like Mechanism of Action. Von D. M. Bollag, P. A. McQueney, J. Zhu, O. Hensens, L. Koupal, J. Liesch, M. Goetz, E. Lazarides und C. M. Woods in: *Cancer Research*, Band 55, Seite 2325 bis 2333, 1. Juni 1995.
- Epothilon A und B - neuartige, 16-gliedrige Makrolide mit cytotoxischer Wirkung: Isolierung, Struktur im Kristall und Konformation in Lösung. Von G. Höfle, N. Bedorf, H. Steinmetz, D. Schomburg, K. Gerth und H. Reichenbach in: *Angewandte Chemie*, Deutsche Ausgabe, Band 108, Nr.13/14, Seiten 1671 bis 1673, Juli 1996.
- Totalsynthese von (-)-Epothilon A. Von A. Balog, D. Meng, T. Kamencka, P. Bertinato, D.-S. Su, E. J. Sorensen, S. J. Danishefsky *Angew. Chem.* 1996, 108, 2976.
- Totalsynthese von Epothilon A. Von K. C. Nicolaou, Y. He, D. Vourloumis, H. Valberg, Z. Zang *Angew. Chem.* 1997, 109, 170.
- Totalsynthese von (-)-Epothilon A. Von D. Schinzer, A. Limberg, A. Bauer, O. M. Böhm, M. Cordes in: *Angewandte Chemie*, Deutsche Ausgabe, Band 109, Heft Nr. 5, Seiten 545 bis 546, März 1997.
- Total Synthesis of (-)-Epothilone A. Von D. Schinzer, A. Limberg, A. Bauer, O. M. Böhm, M. Cordes, *Chem. Eur. J.* 1999, 2483.
- Syntheses of (-)-Epothilone B. Von D. Schinzer, A. Bauer, J. Schieber, *Chem. Eur. J.* 1999, 2492.



Prof. Dr. Dieter Schinzer,

studierte an der Universität Marburg Chemie, 1980 Promotion an der Universität Bonn bei Prof. M. T. Reetz und 1986 Habilitation bei Prof. Dr. E. Winterfeldt an der Universität Hannover. Von 1980 bis 1982 erhielt er das Feodor-Lynen Stipendium und weilte am Department of Chemistry, University of California, Berkeley/USA. 1983 bis 1989 Tätigkeit am Institut für Organische Chemie der Universität Hannover mit Unterstützung des Liebig Stipendiums (Fonds der Chemischen Industrie) und des Heisenberg Stipendiums (DFG). Von 1989 bis 1990 übernahm er eine Lehrstuhlvertretung am Institut für Organische Chemie an der Universität Göttingen. Danach folgte die Berufung als Visiting Professor of Chemistry, University of Wisconsin Madison/USA (1990). Seit 1990 hatte er eine C3-Professur am Institut für Organische Chemie an der Universität Braunschweig inne bis 1996 seine Berufung auf den Lehrstuhl Organische Chemie an der Otto-von-Guericke-Universität erfolgte. 1997 übernahm er die Leitung des Chemischen Instituts der hiesigen Universität.

Forschungsschwerpunkte: Metallorganische Chemie (Silicium-, Zinn- und Manganchemie), Entwicklung moderner Synthesemethoden sowie deren Anwendung in der Synthese komplexer Natur und Wirkstoffe mit interessanter biologischer Aktivität, Molecular Modelling, Computeranwendungen in der Chemie.

Prof. Schinzer ist Mitglied nationaler und internationaler Chemischer Gesellschaften. U. a. wurde er 1986 er mit der Werner-von-Siemens-Medaille und 1988 mit dem „NATO award“ ausgezeichnet.



Dr. Anja Limberg,

geb. am 15. Juni 1969 in Hannover, studierte von 1988 bis 1994 Chemie an der Technischen Universität Braunschweig und promovierte dort 1998. Es folgte ein Forschungsaufenthalt an der University of California, Irvine. Seit 1999 arbeitet Anja Limberg als Forschungsschemikerin bei der F. Hoffmann-La Roche AG.