

# Selektive Inhibitoren der Dihydrofolat-Reduktase (Nobel-Vortrag) \*\*

Von George H. Hitchings, Jr.\*

## Einleitung

Mein Interesse an Nucleinsäuren, deren Bausteinen und Metabolismus kann bis zu dem Zeitpunkt zurückverfolgt werden, als von *Fiske* und *Subbarow* im Muskelgewebe das Adenosintriphosphat entdeckt wurde<sup>[1]</sup>. Ich war 1928 als Doktorand an die Harvard University gegangen und 1929 an die Harvard Medical School gewechselt. *Otto Folin*, damals Leiter der Abteilung für Biologische Chemie, bestimmte, daß ich mein erstes prädoktorales Jahr bei *Cyrus J. Fiske* verbringen sollte, der damals gerade mit der bedeutenden Entdeckung des Kreatinphosphats und der instabilen Phosphorverbindungen im Muskel- und anderen Geweben beschäftigt war. Ich vertiefte mich schnell in die Entwicklung analytischer Werkzeuge, mit denen der Metabolismus von Adenosintriphosphat verfolgt werden sollte<sup>[2]</sup>.

Dieses Interesse verband sich mit anderen, als ich im Jahre 1942 der Burroughs Wellcome Co. als einziges Mitglied der Abteilung für Biochemie beitrat. In der Zwischenzeit war das Antimetaboliten-Prinzip von *Woods*<sup>[3]</sup> und *Fildes*<sup>[4]</sup> formuliert worden. Ich sah die Möglichkeit, die Biosynthese der Nucleinsäuren in neuer, vielversprechender Weise durch den Einsatz von synthetischen Analoga der Purin- und Pyrimidinbasen in einem System zu erforschen, von dem diese heterocyclischen Verbindungen für die Biosynthese genutzt werden.

Es gelang mir, *Elvira Falco*, die damals Assistentin in der Abteilung für Bakteriologie war, für das Projekt zu interessieren. Zusammen arbeiteten wir ein auf *Lactobacillus casei* basierendes System aus; *L. casei* wuchs sowohl mit dem damals unbekannten „*L. casei*“-Wachstumsfaktor als auch mit einer Mischung aus Thymin und einem Purin (Abb. 1)<sup>[5]</sup>.

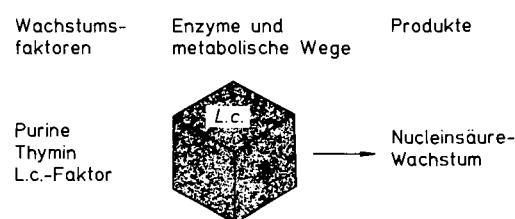


Abb. 1. Die Verwendung von *Lactobacillus casei* als „black box“ von Enzymen und metabolischen Wegen des Nucleinsäure-Metabolismus [9].

Dieses System lieferte uns schnell ermutigende Ergebnisse. Mit einem einfachen Test auf bakterizide Aktivität fanden wir, daß die Analoga nicht nur das *L. casei*-System inhibierten, sondern auch pathogene Bakterien. Zusätzlich untersuchten wir die Toxizität in noch wachsenden Ratten und anderen biologischen Systemen und fanden unsere Ergebnisse immer aufregender.

[\*] Prof. G. H. Hitchings  
Wellcome Research Laboratories  
Burroughs Wellcome Co.  
3030 Cornwallis Road, Research Triangle Park, NC 27709 (USA)

[\*\*] Copyright © The Nobel Foundation 1989. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

Im Jahre 1947 arbeiteten bereits sechs oder sieben von uns an diesen Untersuchungen, und unser Gefühl kann etwa so beschrieben werden: „Wir haben die chemotherapeutischen Wirkstoffe, jetzt müssen wir nur noch die Krankheiten finden, gegen die sie helfen.“ Zu diesem Zeitpunkt arrangierte ich zwei Zusammenarbeiten, die eine mit dem Sloan-Kettering-Institut, das die Antitumoraktivität mit Sarcoma 180 in Mäusen testen sollte, die andere mit externen Laboratorien, um unsere Tests auf bakterizide und Antimalaria-Wirkung auszudehnen. Der Test auf Antimalaria-Wirksamkeit wurde dazugenommen, weil *Peter B. Russell*, auch ein Mitglied unserer Forschungsgruppe, die Ähnlichkeit von 2,4-Diamino-5-phenylpyrimidin mit einer hypothetischen Konformation des Malaria-Mittels Proguanil bemerkte. Später stellte sich heraus, daß seine Vorahnung richtig war; Dihydrotriazin ist der aktive Metabolit von Proguanil<sup>[6]</sup>.

Im nächsten Jahr entwickelten sich zwei Richtungen fast simultan. *Falco* eröffnete mit der Synthese von 2,4-Diamino-5-phenoxyprymidin den Zugang zu einer Reihe von selektiven Inhibitoren der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR), und *Gertrude Elion* synthetisierte 2,6-Diaminopurin<sup>[7]</sup>. Letzteres war eine der vier ersten Verbindungen, die wir dem Sloan-Kettering-Institut schickten. Es war gegen Sarcoma 180 aktiv, wurde von *Joseph H. Burchenal* klinischen Tests unterzogen und bewirkte mindestens eine spektakuläre Remission<sup>[8]</sup>. Das genügte, um die Chemotherapie von Krebs als ein ständiges Hauptziel unserer Gruppe zu etablieren. Die Geschichte der Purin-Analoga, die das bestimmende Thema in *Gertrude Elions* Karriere waren, erzählt sie selbst in ihrem Nobel-Vortrag<sup>[\*]</sup>.

## Die Entdeckung der DHFR-Inhibitoren

Mein Hauptthema hier sollen die selektiven Inhibitoren der Dihydrofolat-Reduktase sein. Das Wissen über die biochemische Rolle der Folate ist parallel zur Entwicklung dieser Inhibitoren gewachsen. Abbildung 2 zeigt, daß Dihydrofolat in Prokaryonten (Mikroorganismen) de novo synthetisiert wird, während für die höheren Spezies der Eukaryonten (Wirte) dieses Vitamin vorgebildet sein muß. Ich werde mitten in die Geschichte der selektiven DHFR-Inhibitoren einsteigen und sie bis zu den neuesten aufregenden Entwicklungen weitererzählen.

Eine kurze Übersicht über unsere Forschung wurde bei einem Symposium zu Ehren von Sir *Henry Wellcome* gegeben<sup>[9]</sup>. Eine Reihe von Publikationen<sup>[10–12]</sup> erzählt die Geschichte der Selektivität der 2,4-Diaminopyrimidine von der ersten Erkenntnis vor 1950 bis zur Bestätigung. Die Beweise lieferten Inhibitor-Analyse, Sequenzierung, Konformationsstudien, induzierte Mitogenese, Computer-unterstützte Konformationsuntersuchungen und auf diesen Informationen basierende neue Synthesen.

Der erste Hinweis auf den Wirkungsmechanismus dieser Verbindungen ist in Abbildung 3 gezeigt<sup>[13]</sup>. Das Wachstum

[\*] Siehe vorstehenden Beitrag.

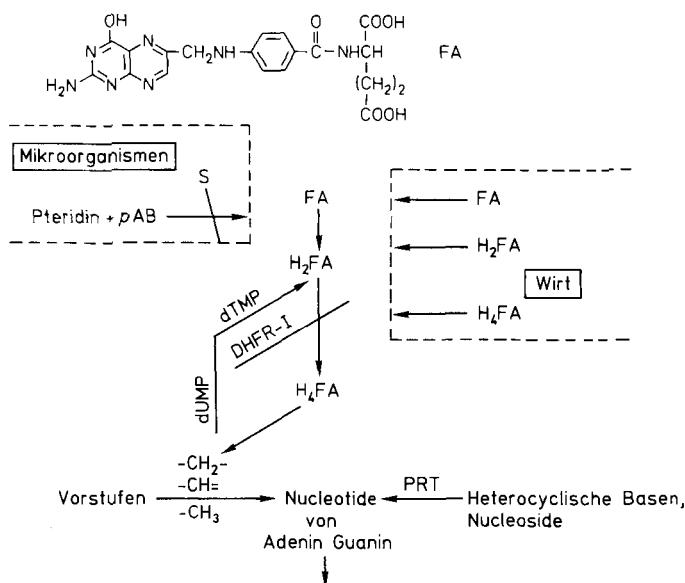


Abb. 2. Folat-Metabolismus. Oben links ist die Biosynthese in Prokaryonten gezeigt; oben rechts die Aufnahme des vorgeformten Vitamins bei Säugetieren. Die nachfolgende Nutzung für die Biosynthese von Nucleinsäurekomponenten ist darunter dargestellt. DHFR und die Selektivität ihrer Inhibitoren nehmen einen zentralen Platz ein. FA = Folat; H<sub>2</sub>FA = Dihydrofolat; H<sub>4</sub>FA = Tetrahydrofolat; dTMP = Thymidylat; dUMP = Desoxyuridylat; pAB = p-Aminobenzoësäure; PRT = Phosphoribosyl-Transferase [10].

von *Streptococcus faecium* wurde sehr leicht durch ein Diaminopyrimidin (Pyr) gehemmt, wenn das Wachstum von Folat induziert wurde, während 500- bis 1000mal mehr Inhibitor gebraucht wurde, wenn Tetrahydrofolat gegeben wurde. Diese Tatsache wurde korrekt als Hemmung des noch unbekannten Enzyms, das Folat zu Tetrahydrofolat reduziert, interpretiert.

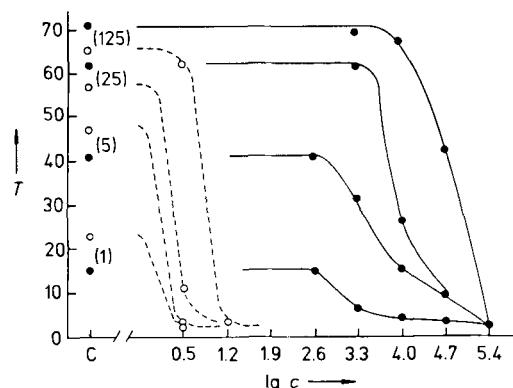


Abb. 3. Die zur Wachstumsinhibition von *Streptococcus faecium* benötigte Pyrimethamin(Pyr)-Konzentration ( $c$  in  $10^{-9}$  g pro 10 mL) ist abhängig davon, ob FA (○—○) oder eine Form von H<sub>4</sub>FA (●—●) im Medium verwendet wird [13].  $T$  = Trübungsgrad.

Bis zum Jahre 1950 waren wir zu der Überzeugung gelangt, daß wir es mit selektiven Inhibitoren der Dihydrofolat-Reduktase zu tun hatten, und es schien wahrscheinlich, daß sich die DHFR-Feinstrukturen von Spezies zu Spezies in einigen Details unterscheiden und daß ein gegebener Inhibitor beträchtliche Selektivität als Resultat einer unterschiedlich starken Bindung an die Dihydrofolat-Reduktase des Wirtes bzw. Parasiten aufweisen könnte<sup>[14]</sup>.

Tests ergaben, daß das volle strukturelle Analogon von Methotrexat (MTX) wenig Selektivität zeigt, während Pyr

gegen das Enzym des Malaria-Erregers und Trimethoprim (Tmp) gegen ein bakterielles Enzym hochaktiv sind; weder Pyr noch Tmp sind besonders toxisch für das Enzym aus Rattenleber. Die Isolierung und Charakterisierung der DHFR aus den Testsystemen führte zuerst zur Inhibitor-Analyse (Tabelle 1), die eindeutig belegte, daß sich die Struk-

Tabelle 1. Die Konzentrationen ( $IC_{50} \times 10^8$ ) von MTX, Pyr und Tmp, die zur Inhibition der DHFR aus *E. coli*, Rattenleber und *P. berghei* benötigt werden [9].

Inhibitor	<i>E. coli</i>	Enzym aus Rattenleber	<i>P. berghei</i>
MTX	0.1	0.2	0.07
Pyr	250	70	0.05
Tmp	0.5	$3 \times 10^3$	7.0

turen der Dihydrofolat-Reduktasen je nach Quelle unterscheiden. Bald folgten Aminosäure- und Sequenz-Analysen.

Gleichzeitig vergrößerte sich unser Wissen über die Bedeutung von Folat-Derivaten bei Biosynthesen und Metabolismen, und so konnte die Bedeutung einer DHFR-Hemmung besser eingeschätzt werden (Abb. 4, 5). Anfangs wird die

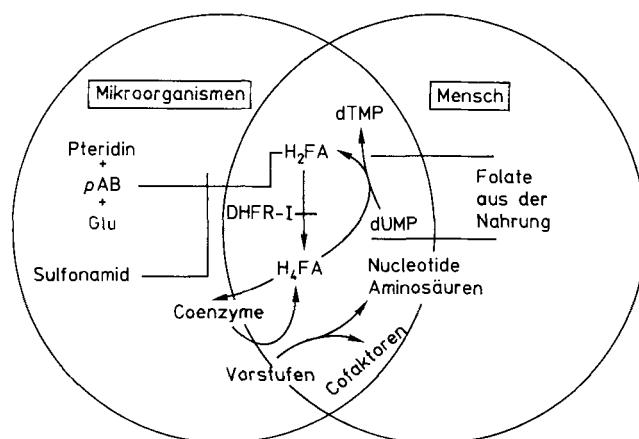


Abb. 4. Die metabolischen Reaktionen, die von H<sub>4</sub>FA-Derivaten katalysiert werden. Glu = Glutamat [12].

Aktivität des Enzyms zur Synthese von H<sub>4</sub>FA benötigt und später, um H<sub>4</sub>FA nach seiner Reoxidation Molekül für Molekül bei der Bildung von Thymidylat aus Desoxyuridylat wiederzuverwerten.

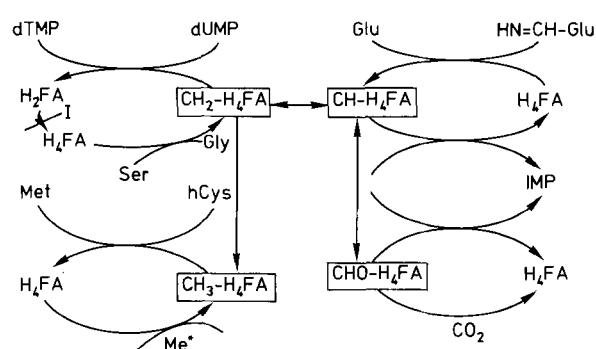


Abb. 5. Details von Reaktionen spezifischer Folat-haltiger Cofaktoren. Gegen den Uhrzeigersinn: N<sup>10</sup>-Formyl-, N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methylen-, -Methylen- und N<sup>5</sup>-Methyltetrahydrofolat. Ser = Serin; Met = Methionin; IMP = Inosinsäure [12].

Bestimmungen der Aminosäuresequenzen zeigten erst den vollen Umfang der Variabilität der Grundbausteine dieses Enzyms in den verschiedenen Spezies<sup>[15]</sup>. Die Enzyme zweier Bakterienspezies stimmen nur zu 30% überein, und auch zwischen Pro- und Eukaryonten besteht nur eine 30proz. Homologie. Nur die höheren Spezies zeigen eine bis zu 90proz. Homologie. Hitchings und Roth fanden 16 Übereinstimmungen bei den Enzymen von *E. coli* und Mäusetumor L1210<sup>[12]</sup>. Sie sagten richtig voraus, daß die Untersuchung vieler Enzyme die Anzahl der Übereinstimmungen reduzieren würde. Wenn man noch die selteneren Enzyme, z. B. die von Plasmiden aus Protozoen kodierten, dazunimmt, so wird die Zahl noch kleiner.

Die „mainstream“-Enzyme (aus Bakterien und Säugetieren) haben ähnliche Konformationen. Die von Richardson<sup>[16]</sup> publizierte Konformation kann als Prototyp verstanden werden (Abb. 6). Obwohl die Enzyme der Säugetiere

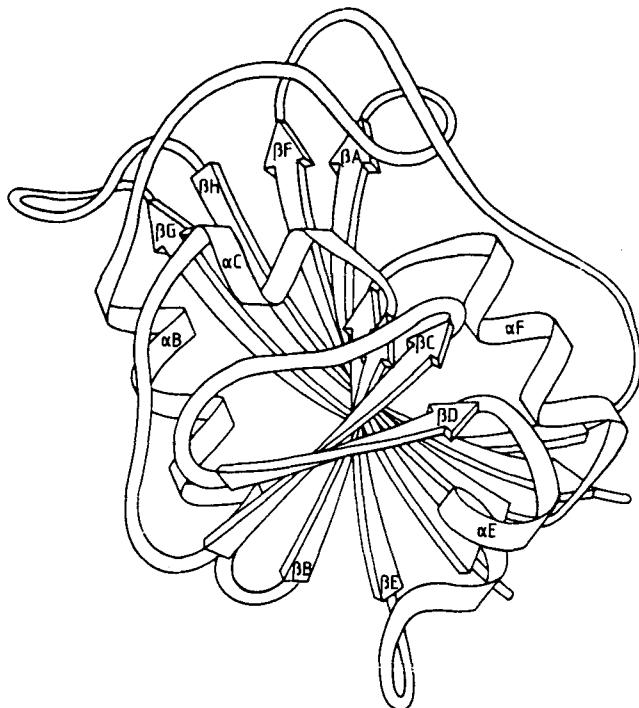


Abb. 6. Graphische Darstellung der DHFR-Konformation [16].

etwa 3000 Dalton größer sind als dieses bakterielle Enzym, sind die Hauptkonformationen durch die zusätzlichen, als Schleifen („loops“) vorliegenden Teile kaum verändert. Allerdings können Enzyme aus anderen Organismen auch so verschieden sein, daß zweifelhaft ist, ob es sich überhaupt um Dihydrofolat-Reduktasen handelt oder ob ihre DHFR-Aktivität nur sekundär gegenüber einer anderen unbekannten

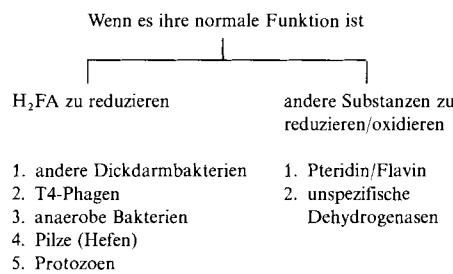


Abb. 7. Mögliche Ursprünge untypischer Dihydrofolat-Reduktasen (DHFR-II) [18].

Funktion ist, siehe Matthews et al.<sup>[17]</sup>. Abbildung 7<sup>[18]</sup> zeigt einige mögliche Ursprünge der DHFR vom Typ II.

## Anwendungen der DHFR-Inhibitoren

### Synergetische Mischungen

Es ist jetzt an der Zeit, auf einige Anwendungen von selektiven DHFR-Inhibitoren hinzuweisen. Dabei ist natürlich vor allem Co-Trimoxazol als wichtiges bakterizides Chemotherapeutikum zu nennen. Es wurde aufgrund der Erkenntnis entwickelt, daß durch die Kombination von Trimethoprim (Tmp) mit Sulfamethoxazol eine sequenzielle Blockade eines wichtigen Biosyntheseweges in einem Bakterium und in anderen Prokaryonten erreicht werden kann (Tabelle 2). Die

Tabelle 2. Effekt der Kombination von einem Teil Tmp mit 20 Teilen Sulfamethoxazol auf die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) [19].

Organismus	MIC [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] von			
	Sulfamethoxazol einzeln	Sulfamethoxazol Mischung	Tmp einzeln	Tmp Mischung
<i>Streptococcus pyogenes</i>	>100	1	1	0.05
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	30	2	2	0.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	0.3	1	0.015
<i>Haemophilus influenzae</i>	10	0.3	1	0.015
<i>Bordetella pertussis</i>	50	4	3	0.2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>100	4	1	0.2
<i>Klebsiella aerogenes</i>	>100	4	1	0.2
<i>Escherichia coli</i>	3	1	0.3	0.05
<i>Salmonella typhimurium</i>	10	1	0.3	0.05
<i>Shigella sonnei</i>	10	1	0.3	0.05
<i>Proteus vulgaris</i>	30	3	3	0.15

geringen Auswirkungen auf den Wirt zeigen, daß in Eukaryonten diejenigen Reaktionen, die zur Biosynthese von Dihydrofolat bei Prokaryonten dienen, nicht ablaufen.

Die Daten in Tabelle 2 beweisen die starke Steigerung der Wirksamkeit<sup>[19]</sup>: Die für eine Inhibition erforderliche Mindestkonzentration einer Verbindung kann um das 10- bis 20fache kleiner sein, wenn die zweite Komponente anwesend ist. Außerdem kann die Kombination auch gegen Organis-

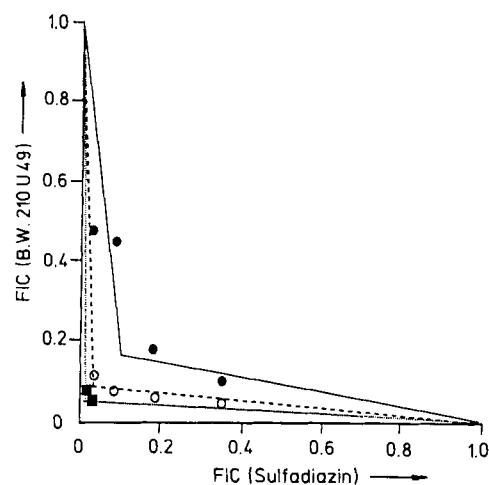


Abb. 8. Fraktionelle inhibitorische Konzentration FIC von B.W. 210U49 und Sulfadiazin zur 50proz. Inhibition von *P. vulgaris* bei An- und Abwesenheit von 8-Aza-guanin: ●—● ohne, ○---○ 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ■—■ 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  8-Azaguainin [20].

men wirksam sein, die durch eine Einzelkomponente nicht inhibiert würden, z. B. gegen *Klebsiella* sp. und *Streptococcus* Gruppe C, bei denen die Konzentrationen der Einzelinhibitoren im Grenzbereich liegen oder nicht erreichbar sind.

Abbildung 8 illustriert eine weitere mögliche Verwendung von biochemisch verwandten Inhibitoren<sup>[20]</sup>. Hier erhöht der Zusatz von 8-Azaguanin zu einer sich schon verstärkenden Kombination von Diaveridin (B.W. 210 U49) mit Sulfadiazin die Wirksamkeit weiter. Solche biochemisch orientierten Dreifachkombinationen werden erst wenig eingesetzt, aber ihr Potential ist verfügbar.

Ich möchte mich jetzt auf die Verwendung der einzelnen DHFR-Inhibitoren konzentrieren.

### Trimethoprim und seine Derivate

Das chronologisch erste und immer noch bedeutendste Mittel für die Chemotherapie von Krebs ist das Methotrexat (MTX) aus den Lederle-Laboratorien. MTX wurde schon 1948 für die Therapie von akuter Leukämie eingeführt<sup>[21]</sup> und ist heute immer noch wichtig. Es ist jedoch, wie Tabelle 1 zeigt, relativ unselektiv. Sein therapeutischer Nutzen hängt hauptsächlich von Unterschieden in der Aufnahme, Glutamylierung, zellulären Exkretion, im zellulären metabolischen Gleichgewicht und in anderen Faktoren ab.

Im Gegensatz zu MTX, das Folat strukturell sehr ähnlich ist, waren unsere eigenen Antifolate signifikant anders und hoch selektiv. Dies wird durch Prüfung der genauen Struktur und der aktiven Zentren einiger Enzyme deutlich werden.

Dazu vergleichen wir die Feinstruktur des Komplexes aus MTX und Cofaktor in der DHFR von *L. casei* (Abb. 9)<sup>[22]</sup>

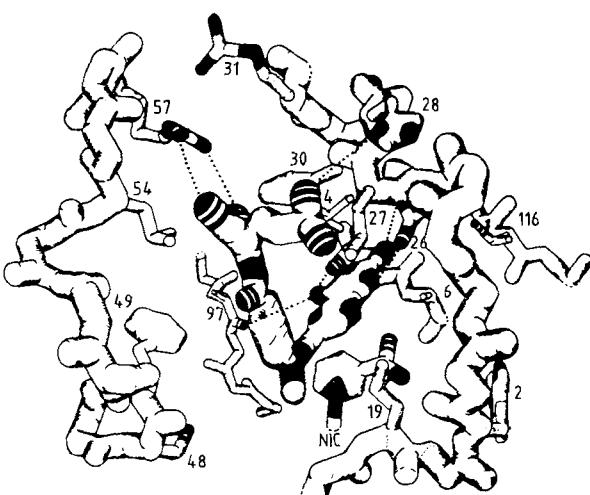


Abb. 9. Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der *L. casei*-DHFR; die Bindung von Methotrexat und Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH) ist gezeigt [22].

mit der des Komplexes ausTmp und Cofaktor in der DHFR aus Hühnerleber (Abb. 10)<sup>[23]</sup>. Es ist offensichtlich, daß das MTX-Molekül viel Platz einnimmt als das Tmp-Molekül. Solche Unterschiede werden überall dort sichtbar, wo kleine Inhibitormoleküle beobachtet werden, und die Unterschiede in den aktiven Zentren der Enzyme entsprechen den Selektivitäten der kleinen Inhibitormoleküle.

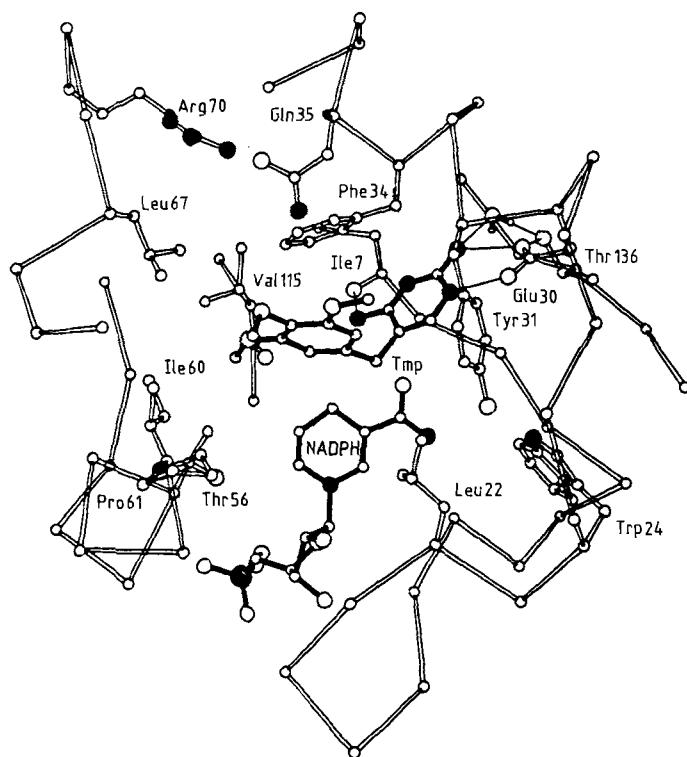


Abb. 10. Schematische Darstellung des Cofaktors in Hühnerleber-DHFR; die Bindung von Tmp und NADPH ist gezeigt [23].

Eine Reihe von Studien untersuchte die Funktionen spezifischer Aminosäureester. Eine der stichhaltigsten wurde von Kraut et al. durchgeführt<sup>[24]</sup> und vereinte mehrere Experimente. Die Aktivität des *E. coli*-Enzyms, bei dem Aspartat durch Asparagin ersetzt war, betrug nur 0.1% der Aktivität des unveränderten Enzyms, so daß die Bedeutung der ionisierbaren Carboxygruppe deutlich wurde (Abb. 11). Der Er-

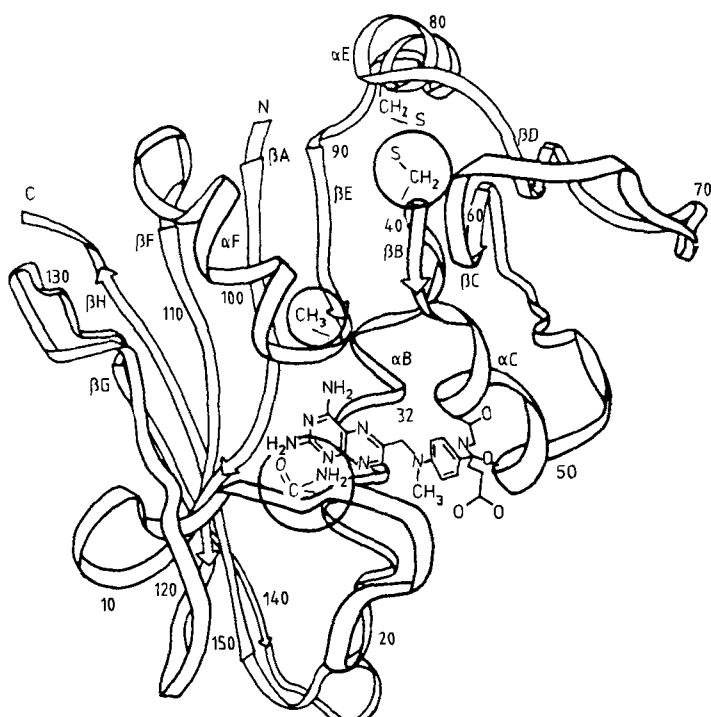


Abb. 11. *E. coli*-DHFR mit induzierten spezifischen Mutationen [24].

satz des benachbarten Alanyl- durch den Glycyl-Rest inaktivierte das Enzym vermutlich durch Konformationsänderung vollständig. Das Auswechseln der SH-Gruppe gegen eine OH-Gruppe (Cystein gegen Serin) hatte kaum eine Wirkung. Solche Experimente können also zur Synthese von neuen wertvollen Inhibitoren führen.

Ein erst relativ spät erkannter Aspekt des Folat-Metabolismus ist, daß es sich bei den hochmolekularen Derivaten der Folsäure um Polyglutamate handelt. Da die Kettenlänge dieser Derivate bei weitem zu groß für einen effizienten Transport in die Zelle hinein ist, verfügen die meisten Zellen über eine Pteroylpolyglutamat-Synthetase. Die Anzahl der Glutamyl-Reste variiert mit der Zeit und dem Zelltyp. Die hohe Komplexität dieser Reaktionen wird gerade erst erkannt. Es ist trotzdem interessant und instruktiv, die Bindungskonstanten und kinetischen Werte von Folat-Polyglutamaten in einigen enzymatischen Reaktionen des Folat-Metabolismus zu vergleichen (Tabelle 3)<sup>[25]</sup>.

Tabelle 3. Vergleich der Bindungskonstanten  $K_m$  und kinetischen Werte  $v_{max}$  von Polyglutamaten der Länge  $n$  in enzymatischen Reaktionen des Folat-Metabolismus. TS = Thymidylat-Synthase; TF = AICAR-Transformylase; GAR-TF = GAR-Transformylase [25].

Enzym	$n$	$n/1$	
		$K_m$	$v_{max}$
DHFR	5	1	—
Serin- $\text{HOCH}_2$ -Transferase	5	0.0025	—
$N^5,N^{10}$ - $\text{CH}_2\text{-H}_4\text{FA}$ -Dehydrogenase	3	<1	1.7
$N^{10}$ - $\text{CHO-H}_4\text{FA}$ -Synthetase	3	0.01	0.5
$N^{10}$ - $\text{CHO-H}_4\text{FA}$ -Synthetase	5	0.001	0.25
$N^5,N^{10}$ - $\text{CH}_2\text{-H}_4\text{FA}$ -Cyclohydrolase	5	0.5	1.5
TS	3	0.2	—
TS	5	0.014	3
AICAR-TF	3	0.01	1
GAR-TF	3	0.8	5

Der Inhibitor MTX und auch Tetrahydrofolat unterliegen der Polyglutamylierung. In vielen Fällen ist das Verhältnis von Folat-Polyglutamat zu Inhibitor-Polyglutamat fast unverändert, aber man kann voraussagen, daß bei den vielen Möglichkeiten doch für einige Anomalien und einige therapeutische Indices eine Erklärung auf dieser Basis gefunden werden wird. Einige Auswirkungen der Glutamylierung auf spezifische Biosynthese-Enzyme sind in Tabelle 4 gezeigt<sup>[26]</sup>.

Tabelle 4. Der Effekt der Pentaglutamylierung auf die Bindung von MTX an spezifische Tetrahydrofolat-nutzende Synthese-Enzyme [26].

Enzym	Folat-Cofaktor	$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ] von		$K_i$ (MTX)
		MTX	MTX-Glu <sub>5</sub>	
TS	$N^5,N^{10}$ - $\text{CH}_2\text{-H}_4\text{PteGlu}_1$	13.0	0.047	277
	$N^5,N^{10}$ - $\text{CH}_2\text{-H}_4\text{PteGlu}_5$	14.3	0.056	254
AICAR-TF	$N^{10}$ - $\text{CHO-H}_4\text{PteGlu}_1$	143.9	0.057	2508
	$N^{10}$ - $\text{CHO-H}_4\text{PteGlu}_5$	40.0	5.89	6.8
GAR-TF	$N^{10}$ - $\text{CHO-H}_4\text{PteGlu}_1$	80	2.5	32
	$N^{10}$ - $\text{CHO-H}_4\text{PteGlu}_5$	84	22.0	4

Ich möchte mich jetzt der genauen Struktur spezifischer Enzyme und ihrer Verwertung für die Synthese aktiverer Inhibitoren zuwenden. Abbildung 12<sup>[27]</sup> zeigt, wie das Tmp-Molekül in die *E. coli*-DHFR paßt. Oben links (Rest 57) kann man die Guanidinogruppe des Arginin sehen. Das wur-

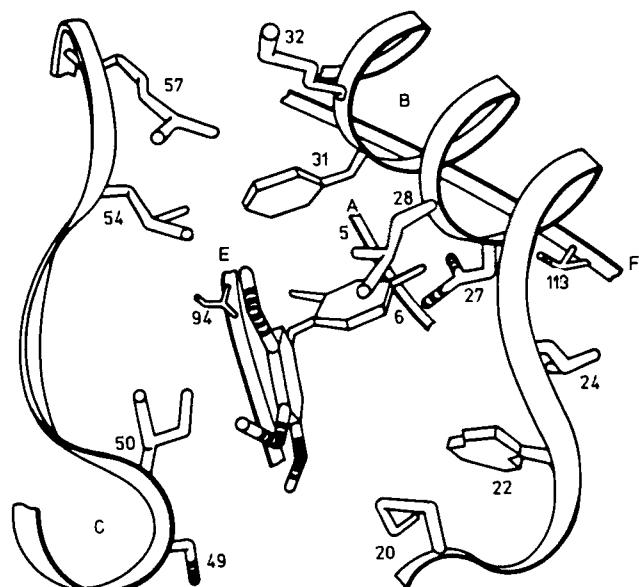


Abb. 12. Sitz von Tmp (Mitte) in der DHFR von *E. coli* [27].

de von *Lee Kuyper* ausgenutzt, der die *m*-Methoxy-Gruppe von Tmp durch eine Reihe von Carboxyalkoxy-Gruppen ersetzte. Als optimale Länge erwiesen sich 5 Kohlenstoffatome, und das Produkt, das Carboxyamyoxy-Derivat, band 50mal stärker an das Enzym als Tmp<sup>[28]</sup>. In derselben Art synthetisierte *Barbara Roth* ein Bromacetoxypheoxy-Analogon von Tmp und fand, daß dieses Derivat an den Histidin-22-Rest des Enzyms kovalent bindet<sup>[29]</sup>. Diese Beispiele mögen als Vorgeschmack auf eine große und aufregende Zukunft dienen.

### Lipophile DHFR-Inhibitoren

Eine ganze Reihe von Resistzenzen gegen Antifolate tauchte bald nach Beginn der Arbeit an diesen Inhibitoren auf. Eine der Resistzenzen beruhte auf dem Verlust des zellulären Transportmechanismus (Abb. 13); dadurch wurde die Suche

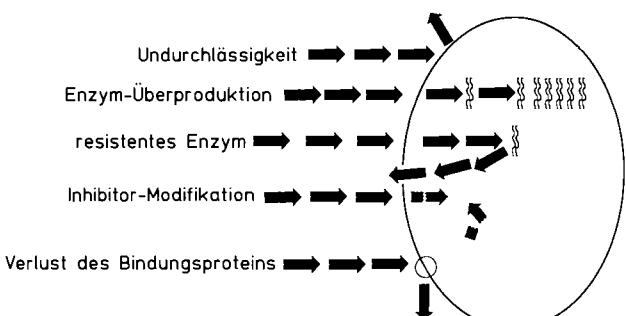


Abb. 13. Ursachen für Resistenz gegen DHFR-Inhibitoren [18].

nach lipophilen Inhibitoren, die nicht von diesem Transportmechanismus in die Zelle hinein abhängig sind, sehr angelegt. Gegenwärtig sind die beiden potentiell nützlichsten Substanzen Trimetrexat und Piritrexim (Abb. 14). Die Anwendung dieser Inhibitoren steckt noch in den Kinderschuhen, aber alle beide verfügen über interessante Eigenschaften. Die Wirkungen von Trimetrexat und MTX werden in

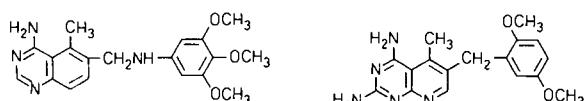


Abb. 14. Die Strukturformeln von Trimetrexat (links) und Piritrexim (rechts), zwei potentiell nützlichen DHFR-Inhibitoren.

Tabelle 5 verglichenen<sup>[30]</sup>. Sowohl Trimetrexat als auch Piritrexim sind wirksam gegen infektiöse prokaryontische Organismen. Mit einer Kombination von Trimetrexat und Leucovo-

Tabelle 5. Vergleich der Wirksamkeiten von Trimetrexat und MTX gegen transplantierbare Mäusetumore und bei Xenotransplantaten [30].

	Tumor-System	Trimetrexat	MTX
Maus	L1210-Leukämie	++	++
	P388-Leukämie	++	++
	B16-Melanom	++	--
	Lewis-Lungenkarzinom	--	--
	Darmkrebs 26	++	--
	Darmkrebs 38	+	--
	CD8F1-Brustkrebs	++	+
	Brustkrebs MX-1	--	--
menschliches	Lungenkrebs LX-1	--	--
	Darmkrebs CX-1	--	--
Xenotransplantat			

rin wurden schon AIDS-Patienten mit pneumocystischer Lungenentzündung erfolgreich behandelt<sup>[31]</sup>. Tabelle 6 zeigt die Auswirkung einer Kombination der beiden Medikamente Piritrexim und Sulfadiazin auf die Behandlung der Mäuse-Toxoplasmose<sup>[32]</sup>.

### Inhibitoren anderer Enzyme

Schließlich soll hier noch der wichtigste selektive Inhibitor der Thymidylat-Synthase (TS) (Abb. 15) erwähnt werden: 5,8-Didesazaisopteroylglutamat (IAHQ) (Abb. 16). IAHQ und spezifische Inhibitoren anderer Biosynthese-Reaktionen, bei denen Tetrahydrofolat eine Rolle spielt, stellen den Anfang einer biochemisch orientierten und verbesserten Chemotherapie des Krebses dar<sup>[33]</sup>.

Tabelle 6. Effekt der Kombination von Piritrexim (P) und Sulfadiazin (S) bei der Behandlung der Mäuse-Toxoplasmose. Von Sulfadiazin wurden 4, 40 und 400 mg kg<sup>-1</sup> pro Tag oral gegeben, von Piritrexim 20 mg kg<sup>-1</sup> pro Tag i.p. verabreicht [32].

Behandlung [a]	Gesamtsterblichkeit nach n Tagen [%]						
	n = 3	6	9	12	15	18	20
keine	0	0	100	—	—	—	—
S(4)	0	20	60	100	—	—	—
P + S(4)	0	20	40	60	80	80	80
S(40)	0	20	40	100	—	—	—
P + S(40)	20	20	20	40	80	80	80
S(400)	0	0	80	100	—	—	—
P + S(400)	0	0	0	0	0	0	0

[a] In Klammern ist die Sulfadiazin-Konzentration angegeben.

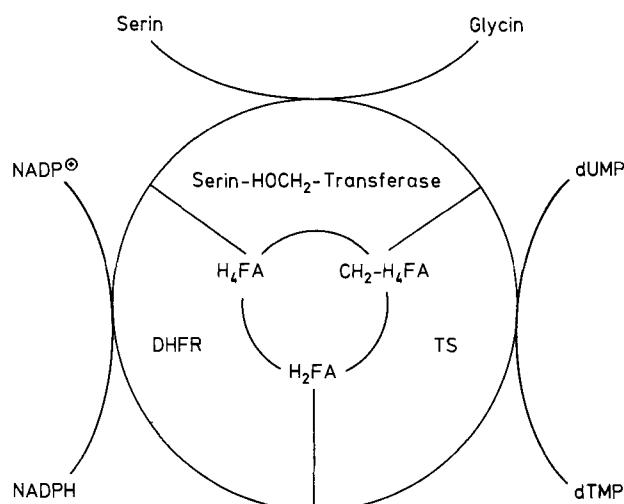


Abb. 15. Der Thymidylat-Synthesecyclus.

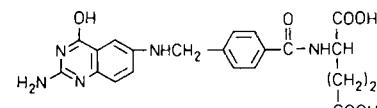


Abb. 16. Die Strukturformel von IAHQ, einem selektiven TS-Inhibitor.

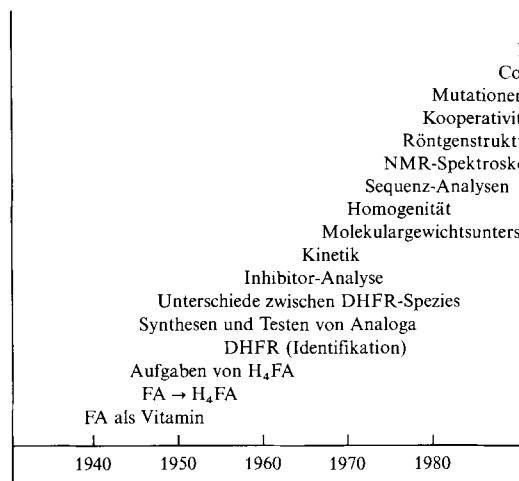


Abb. 17. Der Zuwachs an Wissen über die Dihydrofolat-Reduktase, beginnend in den vierziger Jahren mit ungezielten Studien, bis zur Entdeckung neuer nützlicher Verbindungen und zu Methoden zum Design von Wirkstoffen in den achtziger Jahren [34]. Die Position der einzelnen Erkenntnis auf der Ordinatenachse ist ein Maß für ihren Nutzen beim Design neuer DHFR-Inhibitoren.

## Schlußbemerkung

Ich bin sehr glücklich, über vier Jahrzehnte auf einem Gebiet gearbeitet zu haben, das mit jedem Jahr noch aufregender wurde und wird. Abbildung 17 zeigt – angefangen mit unseren Arbeiten in den vierziger Jahren – die Geschichte des stetig gewachsenen Wissens über die Dihydrofolat-Reduktase. Die ungezielten frühen Versuche führten zur Entwicklung nützlicher Mittel gegen eine Vielzahl von Krankheiten (Abb. 18) und haben so unsere Überzeugung

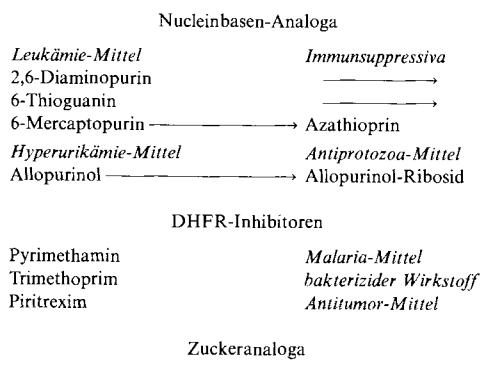


Abb. 18. Medikamentöse Therapien, die aus Dihydrofolat-Reduktase-Inhibitoren entwickelt wurden.

gerechtfertigt, daß dieser Ansatz erfolgreicher ist als eine enge Zielsetzung. Auch 1988 noch werden mit dieser Strategie nützliche neue Verbindungen gefunden.

Ich möchte mit einem Zitat aus einer meiner eigenen Publikationen schließen<sup>[35]</sup>: „To the biochemical chemotherapist, it is not only a matter of faith, but an obvious fact, that every cell type must have a characteristic biochemical pattern, and therefore be susceptible to attack at some *locus* or *loci* critical for its survival and replication.“[\*]

*Ich danke Mara Gabriel und Coyla Barry für ihre gute und aufopfernde Arbeit, die diesen Rückblick möglich machte.*

Eingegangen am 27. Januar 1989 [A 723]  
Übersetzt von Dr. Christiane Koszka, Bonn

[\*] „Für den biochemisch orientierten Chemotherapeuten ist es keine Frage des Glaubens, sondern eine Gewißheit, daß jede Zelle ein charakteristisches biochemisches Muster aufweist und daher dem Angriff an einer oder mehreren Stellen, die kritisch für ihr Überleben und die Replikation sind, zugänglich sein muß.“

- [1] C. J. Fiske, Y. Subbarow, *Science (Washington)* 70 (1929) 381.
- [2] G. H. Hitchings, *Dissertation*, Harvard University 1933.
- [3] D. D. Woods, *Br. J. Exp. Pathol.* 21 (1940) 74.
- [4] P. Fildes, *Lancet* 1940 I, 955.
- [5] G. H. Hitchings, E. A. Falco, M. B. Sherwood, *Science (Washington)* 102 (1945) 251.
- [6] E. A. Falco, G. H. Hitchings, P. B. Russell, H. VanderWerff, *Nature (London)* 164 (1949) 107.
- [7] G. H. Hitchings, G. B. Elion, H. VanderWerff, E. A. Falco, *J. Biol. Chem.* 174 (1948) 765.
- [8] J. H. Burchenal, D. A. Karnofsky, E. M. Kingsley-Pillers, C. M. Southam, W. P. Laird Meyers, G. C. Escher, L. F. Craver, H. W. Dargeon, C. P. Rhoads, *Cancer (Philadelphia)* 4 (1951) 549.
- [9] G. H. Hitchings, *Drug Intell. Clin. Pharm.* 16 (1982) 843.
- [10] G. H. Hitchings, J. J. Burchall, *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* 27 (1965) 417.
- [11] G. H. Hitchings, S. L. Smith, *Adv. Enzyme Regul.* 18 (1980) 349.
- [12] G. H. Hitchings, B. Roth in M. Sandler (Hrsg.): *Enzyme Inhibitors as Drugs*, University Park Press, Baltimore 1980, S. 263–280.
- [13] G. H. Hitchings, E. A. Falco, G. B. Elion, S. Singer, G. B. Waring, D. J. Hutchison, J. H. Burchenal, *Arch. Biochem. Biophys.* 40 (1952) 479.
- [14] G. H. Hitchings in L. G. Goodwin, R. H. Nimmo-Smith (Hrsg.): *Drugs, Parasites and Hosts*, Little-Brown, Boston 1962, S. 196–210.
- [15] A. C. Y. Chang, J. H. Nunberg, R. J. Kaufman, H. A. Erlich, R. T. Schimke, S. N. Cohen, *Nature (London)* 275 (1978) 617.
- [16] S. Richardson, *Adv. Protein Chem.* 34 (1981) 167.
- [17] D. A. Matthews, S. L. Smith, D. P. Baccanari, J. J. Burchall, S. J. Oatley, J. Kraut, *Biochemistry* 25 (1986) 4194.
- [18] J. Burchall, *Wellcome Scientist Lecture 1983*.
- [19] S. R. M. Bushby in M. Finland, E. H. Kass (Hrsg.): *Trimethoprim-sulfamethoxazole, Microbiological, Pharmacological and Clinical Considerations*, University of Chicago Press, Chicago, USA 1973, S. 10–30.
- [20] G. B. Elion, S. Singer, G. H. Hitchings, *Antibiot. Chemother. (Washington)* 10 (1960) 556.
- [21] S. Farber, L. K. Diemand, R. F. Mercer, R. F. Sylvester, J. A. Wolff, *N. Engl. J. Med.* 238 (1948) 787.
- [22] B. Roth, E. Bliss, C. R. Bedell in S. Neidle, M. J. Waring (Hrsg.): *Molecular Aspects of Anti-Cancer Drug Action*, Macmillan, London 1983, S. 363–393.
- [23] D. A. Matthews, J. T. Bolin, J. M. Burridge, D. J. Filman, K. W. Volz, B. T. Kaufman, C. R. Bedell, J. N. Campness, D. K. Stammers, J. Kraut, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 381.
- [24] J. E. Villafranca, E. H. Howell, D. H. Voet, M. S. Strobel, R. C. Ogden, J. N. Abelson, J. Kraut, *Science (Washington)* 222 (1983) 782.
- [25] J. J. McGuire, J. K. Coward in R. L. Blakley, S. J. Benkovic (Hrsg.): *Folates and Pterins, Vol. 1*, Wiley, New York 1984, S. 135–190.
- [26] C. J. Allegra, J. C. Drake, J. Jolivet, B. A. Chabner in I. D. Goldman (Hrsg.): *Proceedings of the Second Workshop on Folyl and Antifolyl Polyglutamates*, Praeger, New York 1985, S. 348–359.
- [27] C. R. Bedell in A. S. Horn, C. J. DeRanter (Hrsg.): *X-ray Crystallography and Drug Action*, Oxford University Press, Oxford 1984, S. 169–193.
- [28] L. F. Kuyper, B. Roth, D. P. Baccanari, R. Ferone, C. R. Bedell, J. N. Champness, D. K. Stammers, J. G. Dann, F. E. Norrington, D. J. Baker, *J. Med. Chem.* 28 (1985) 303.
- [29] J. H. Chan, L. F. Kuyper, B. Roth, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* 189 (1985) 87.
- [30] J. T. Lin, J. R. Bertino, *J. Clin. Oncol.* 5 (1987) 2032.
- [31] C. J. Allegra, B. A. Chabner, C. U. Tuazon, D. Ogata-Arakaki, B. Baird, J. C. Drake, J. T. Simmons, E. E. Lack, J. H. Shelhamer, F. Balis, R. Walker, J. A. Kovacs, H. C. Lane, H. Masur, *N. Engl. J. Med.* 317 (1987) 978.
- [32] F. Araujo, D. R. Guptill, J. S. Remington, *J. Infect. Dis.* 156 (1987) 828.
- [33] D. J. Fernandes, J. R. Bertino, J. B. Hynes, *Cancer Res.* 43 (1983) 1117.
- [34] G. H. Hitchings, in A. Burgen (Hrsg.): *Discoveries*, Cambridge University Press, Cambridge, im Druck.
- [35] G. H. Hitchings, *Cancer Res.* 29 (1969) 1895.