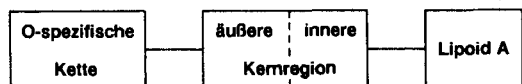


## Endotoxin-Antagonisten: potentielle Therapeutica der Gram-negativen Sepsis\*\*

Otto Holst\*

Die Endotoxine [Lipopolysaccharide (LPS)] Gram-negativer Bakterien sind amphiphile Makromoleküle der äußeren Membran der Zellwand<sup>[1, 2]</sup>. LPS sind für das Überleben der Bakterien essentiell; sie tragen zur Versteifung der Zellwand bei, schützen vor Gallensalzen, Darmenzymen und Abwehrmechanismen des Wirts, und auch vor Antibiotica. In höheren Tieren und dem Menschen rufen Endotoxine eine Reihe von pathophysiologischen Effekten hervor. Selbst in geringen Mengen können sie zu einer Sepsis führen, die weiterhin bei Blutdruckabfall und Multiorganversagen in den Zustand des septischen Schocks übergeht, weltweit die häufigste Todesursache auf Intensivstationen. LPS sind ebenfalls Antigene und damit im Prozeß der spezifischen Erkennung von Bakterien und deren Abwehr durch den Wirtsorganismus involviert. Gerade die biologischen Aktivitäten von LPS und deren klinische Bedeutung sind ein wesentlicher Grund für weltweit enorme Forschungsaktivitäten hinsichtlich der Struktur und Funktion von LPS und um neue Möglichkeiten zur Sepsistherapie zu eröffnen.

Die LPS aller Gram-negativen Bakterien sind grundsätzlich ähnlich aufgebaut (Schema 1)<sup>[2]</sup>. Sie weisen einen Lipidteil auf, das Lipid A<sup>[3]</sup>, das das Molekül in der äußeren Membran der

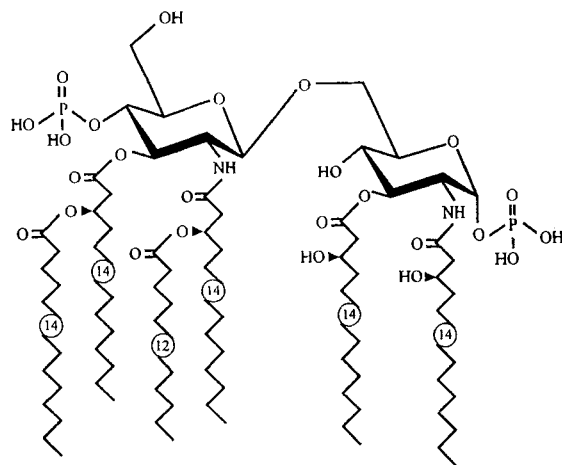


Schema 1. Genereller Aufbau von LPS.

Zellwand verankert, und eine daran gebundene mehr oder weniger komplexe Zuckerkette. Diese umfaßt in verschiedenen Bakterienfamilien (z.B. *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*) ein Oligosaccharid von bis zu 15 Zuckern (die sogenannte Kernregion)<sup>[4]</sup>, das mit einem aus Wiederholungseinheiten aufgebauten Polysaccharid (O-Antigen) substituiert ist (S-Form LPS). Ein zweiter LPS-Typ, der zuerst in Mutanten von Enterobakterien entdeckt wurde, die im Gencluster der O-Antigen-Biosynthese (*rfb*) defekt waren, besteht nur aus Lipid A und der Kernregion (R-Form LPS). Später wurde diese LPS-Form auch in Bakterien ohne bekannten genetischen Defekt nachgewiesen, beispielsweise in *Bordetella pertussis* (Keuchhusten) oder *Neisseria gonorrhoeae* (Gonorrhoe).

Bei einer Infektion wird LPS aus den Bakterien freigesetzt, z.B. nach deren Zelltod. Das LPS reagiert mit bestimmten Serumkomponenten, unter denen das lipopolysaccharide binding protein (LBP) eine maßgebliche Rolle einnimmt. LPS komplexiert LBP und kann danach an einen Rezeptor (CD14) der Ma-

krophagen gebunden werden<sup>[5]</sup>, die über einen noch nicht in allen Einzelheiten geklärten Signaltransduktionsmechanismus bestimmte Mediatoren wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und die Interleukine (IL) 1, 6 und 8 synthetisieren und sezernieren. Dies führt bei Überproduktion zu den pathophysiologischen Wirkungen des Endotoxins. Zur Initialisierung dieser Kaskade wird keinesfalls das vollständige LPS-Molekül benötigt. Wie bereits in den fünfziger Jahren postuliert und in den achtziger Jahren nach einer Reihe von biologischen Experimenten mit natürlichen Präparaten und synthetisiertem *Escherichia coli*-Lipid-A (Schema 2) verifiziert<sup>[6, 7]</sup>, ist das toxische Prinzip des LPS das Lipid A.

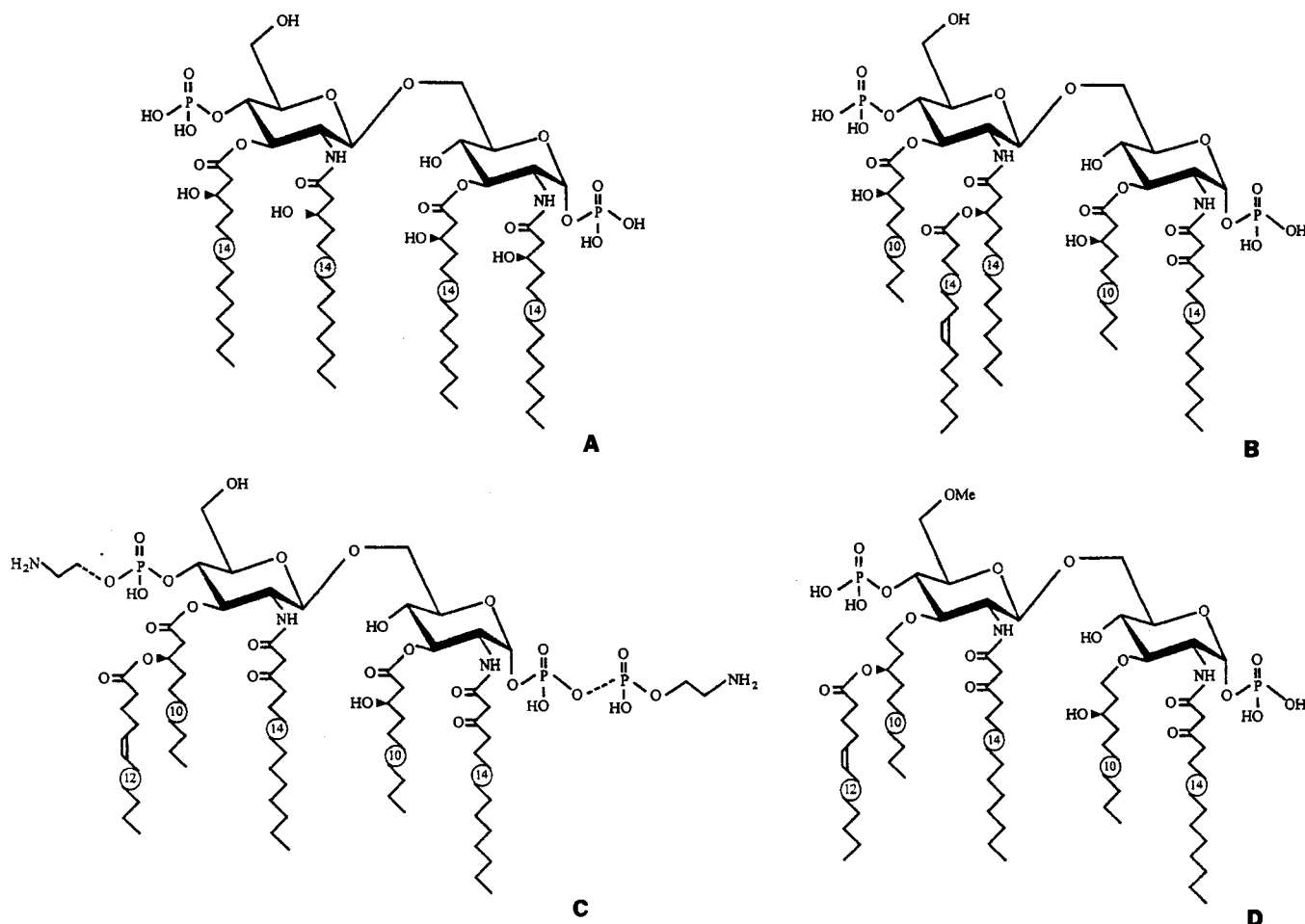


Schema 2. Struktur des Lipids A aus *E. coli*. Die Zahlen in Kreisen entsprechen der Länge der Kohlenstoffkette.

Die Gram-negative Sepsis ist auch heute noch mit einer Mortalitätsrate von bis zu 60% verbunden, unter anderem bedingt durch die Verbreitung von Antibiotica-resistenten Keimen, gerade in Krankenhäusern. Auch werden LPS durch Antibiotica aus Bakterien freigesetzt. Neue Strategien zur Vermeidung oder Therapie der Gram-negativen Sepsis können an mehreren Punkten der Endotoxin-Kaskade ansetzen: am LPS selbst, an der Interaktion von LPS mit Serumfaktoren/Zellrezeptoren oder an der Produktion und Sekretion von Mediatoren. Neben den Bemühungen, kreuzreaktive und -protektive Antikörper, insbesondere gegen Lipid A, zu erhalten und auch therapeutisch zu nutzen, wurde auch ein Inhibitor der TNF- $\alpha$ -Synthese identifiziert, der Mäuse vor der letalen Wirkung von Endotoxin schützt. Ein monoklonaler Antikörper (HA-1A) mit vermeintlicher Lipid-A-Spezifität kam für kurze Zeit zur klinischen Anwendung, wurde dann aber wieder vom Markt genommen, da er sich nicht bewährte. Sehr wichtig sind nun meiner Meinung nach neuere Untersuchungen zur Wirkung von nicht-toxischen Endotoxin-Antagonisten. Hierbei handelt es sich um Struktur-Analoga des Lipids A, von denen einige in Schema 3 dargestellt sind. Eine dieser Substanzen ist das Tetraacyl-Lipid A A (Precursor Ia), eine Vorstufe in der Biosynthese des

[\*] Priv.-Doz. Dr. O. Holst  
Forschungsinstitut Borstel  
Institut für Experimentelle Biologie und Medizin  
Parkallee 22, D-23845 Borstel  
Telefax: Int. + 4537/10419

[\*\*] Ich danke Herrn Dr. U. Zähringer für seine Hilfe bei der Anfertigung der Schemata und Herrn Prof. Dr. H. Brade für die kritische Durchsicht des Manuskripts.



Schema 3. Strukturen von Precursor Ia **A**, Lipoid A aus *R. sphaeroides* **B**, Lipoid A aus *R. capsulatus* **C** und von E5531 **D**.

Lipoids A<sup>[8]</sup>, die später ebenfalls chemisch synthetisiert wurde (Substanz 406)<sup>[9]</sup>. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß Precursor Ia die in humanen Makrophagen durch LPS induzierte Monokinproduktion bereits auf der mRNA-Ebene effektiv hemmt. Vergleichende Untersuchungen mit anderen synthetischen Struktur-Analoga zeigten, daß die Wirksamkeit solcher Disaccharid-Antagonisten vom Acylierungs- und Phosphorylierungsmuster abhängig ist. Der tetraacylierte und bisphosphorylierte Precursor Ia ist bislang einer der wirksamsten Inhibitoren. Bei Makrophagen und Monozyten beruht der Mechanismus dieser inhibitorischen Wirkung auf kompetitiver Bindung des Antagonisten an den Rezeptor CD14. Da Precursor Ia **A** im Gegensatz zum Menschen im Mausmodell in vitro und in vivo agonistisch wirkt, kann diese Substanz nicht in einem Sepsismodell in Mäusen auf seine antagonistischen Qualitäten getestet werden.

Andere antagonistisch wirksame Substanzen sind die nicht-toxischen Lipide A aus *Rhodobacter sphaeroides* und *R. capsulatus* (Schema 3)<sup>[10–15]</sup>. Das Lipoid A aus *R. sphaeroides* **B** wurde auch chemisch synthetisiert<sup>[16]</sup>. Die spektroskopische Analyse des Produkts ergab Differenzen zur Struktur des natürlichen Isolats, offensichtlich im Bereich der Fettsäuren. Die Autoren vermuteten daher, daß die vorgeschlagene Struktur des isolierten Lipoids A nicht korrekt ist. Eine endgültige Klärung dieser Diskrepanz steht jedoch noch aus. Sehr wichtig ist nun

eine kürzlich erschienene Arbeit<sup>[17]</sup>, in der die Synthese eines Struktur-Analogons, E5531 **D** (Schema 3), des Lipoids A aus *R. capsulatus* **C** und eine umfassende Charakterisierung seiner toxischen und antagonistischen Eigenschaften publiziert wurde. Da ein chemisch synthetisiertes *R.-capsulatus*-Lipoid-A bei längerem Lagern degradiert wurde (hydrolytische Abspaltung der Acylgruppen an C-3 und C-3' des Glucosamindisaccharids), womit ein wesentliches Kriterium eines Therapeuticums, nämlich dessen Stabilität, nicht erfüllt war, mußte ein Derivat dieses Moleküls hergestellt werden. Nach der Einführung von Etherbrücken an C-3 und C-3' wurde ein stabiles Präparat erhalten. Genauso faszinierend wie die Synthese sind die Ergebnisse der biologischen In-vitro- und In-vivo-Tests mit E5531 **D**. Zunächst konnte unter anderem die in humanen Monozyten und im Vollblut spezifisch durch LPS induzierte Produktion von Cytokinen gehemmt werden. Besonders hervorzuheben ist, daß, anders als Precursor Ia **A**, E5531 **D** in keinem getesteten Human- und Mauszellsystem irgendeine endotoxische Aktivität aufwies. Somit waren In-vivo-Mausmodelle möglich. Damit wurde gezeigt, daß der durch LPS-Injektion verursachte Anstieg der Konzentration von TNF- $\alpha$  im Plasma und die Sterberate von 100% der Tiere durch gleichzeitige Injektion von E5531 **D** weitgehend nivelliert wurden. Noch bedeutender ist ein Infektionsmodell, in dem Tiere vor einer experimentellen *E.-coli*-Peritonitis (Bauchfellentzündung) durch kombinierte Gabe von E5531 und einem

$\beta$ -Lactam-Antibioticum langfristig geschützt werden konnten, nicht jedoch durch alleinige Injektion von E5531 oder dem Antibioticum; durch letzteres wurden zwar die Bakterien abgetötet, es kam jedoch zur vermehrten Freisetzung von Endotoxin. Dieses Infektionsmodell scheint geeignet zu sein, wesentliche Vorgänge einer humanen Sepsis widerzuspiegeln und ist damit sicherlich ein wichtiges Instrument für zukünftige In-vivo-Untersuchungen. Aufgrund seiner günstigen biologischen Eigenschaften konnte E5531 D bereits klinisch an Freiwilligen getestet werden: Es hatte keinerlei endotoxische Aktivitäten und senkte, bei gleichzeitiger Injektion, dosisabhängig endotoxische LPS-Effekte, z.B. die Menge an freigesetzten Cytokinen.

Die bislang erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß nichttoxische Struktur-Analoga von Lipoid A, wie Precursor Ia und E5531, potente Endotoxin-Antagonisten in vitro und zum Teil auch in vivo sind. Vielversprechend ist insbesondere E5531; diese Substanz könnte zu wichtigen Fortschritten in der Therapie der Gram-negativen Sepsis führen, sollten sich seine günstigen Eigenschaften in weiteren klinischen Untersuchungen bestätigen.

**Stichworte:** Arzneimittel · Endotoxine · Lipopolysaccharide · Medizinische Chemie ·

- [1] B. Lugtenberg, L. van Alphen, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, 737, 51–115.
- [2] E. T. Rietschel, H. Brade, *Sci. Am.* **1992**, 267, 54–61.
- [3] U. Zähringer, B. Lindner, E. T. Rietschel, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, 50, 211–276.

- [4] a) *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides, Vol. 1* (Hrsg.: D. C. Morrison, J. L. Ryan), CRC, Boca Raton, FL, **1992**; b) O. Holst, H. Brade in Lit. [4a], S. 135.
- [5] E. T. Rietschel, H. Brade, O. Holst, L. Brade, S. Müller-Loennies, U. Mamat, U. Zähringer, F. Beckmann, U. Seydel, K. Brandenburg, A. J. Ulmer, T. Matern, H. Heine, J. Schletter, S. Hauschildt, H. Loppnow, H.-D. Flad, U. F. Schade, F. Di Padova, R. R. Schumann, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, unveröffentlicht.
- [6] O. Westphal, O. Lüderitz, *Angew. Chem.* **1954**, 66, 407–417.
- [7] H. Brade, L. Brade, E. T. Rietschel, *Zbl. Bakt. Hyg. A* **1988**, 268, 151–179.
- [8] C. R. H. Raetz in Lit. [4a], S. 67.
- [9] S. Kusumoto in Lit. [4a], S. 81.
- [10] N. Qureshi, K. Takayama, R. Kurtz, *Infect. Immun.* **1991**, 59, 441–444.
- [11] H. Loppnow, E. T. Rietschel, H. Brade, U. Schönbeck, P. Libby, M.-H. Wang, H. Heine, W. Feist, I. Dürrbaum-Landmann, M. Ernst, E. Brandt, E. Grage-Griebenow, A. J. Ulmer, S. Campos-Portuguez, U. Schade, T. Kirikae, S. Kusumoto, J. Krauss, H. Mayer, H.-D. Flat in *Bacterial Endotoxin: Recognition and Effector Mechanisms* (Hrsg.: J. Levin, C. R. Alving, R. S. Munford, P. L. Stütz), Elsevier, Amsterdam, **1993**, S. 337.
- [12] P. V. Salimath, J. Weckesser, W. Strittmatter, H. Mayer, *Eur. J. Biochem.* **1983**, 136, 195–200.
- [13] N. Qureshi, J. P. Honovich, H. Hara, R. J. Cotter, K. Takayama, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 5502–5504.
- [14] T. Merkofer, A. Neszmelyi, H. Mayer, *Workshop Endotoxine und Exotoxine als bakterielle Pathogenitätsfaktoren*, **1995**, Forschungsinstitut Borstel, P 1.3.
- [15] J. H. Krauss, U. Seydel, J. Weckesser, H. Mayer, *Eur. J. Biochem.* **1989**, 180, 519–526.
- [16] W. J. Christ, P. D. McGuinness, O. Asano, Y. Wang, M. A. Mullarkey, M. Perez, L. D. Hawkins, T. A. Blythe, G. R. Dubuc, A. L. Robidoux, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 3637–3638.
- [17] W. J. Christ, O. Asano, A. L. Robidoux, M. Perez, Y. Wang, G. R. Dubuc, W. E. Gavin, L. D. Hawkins, P. D. McGuinness, M. A. Mullarkey, M. D. Lewis, Y. Kishi, T. Kawata, J. R. Bristol, J. R. Rose, D. P. Rossignol, S. Kobayashi, I. Hishinuma, A. Kimura, N. Asakawa, K. Katayama, I. Yamatsu, *Science* **1995**, 268, 80–83.