

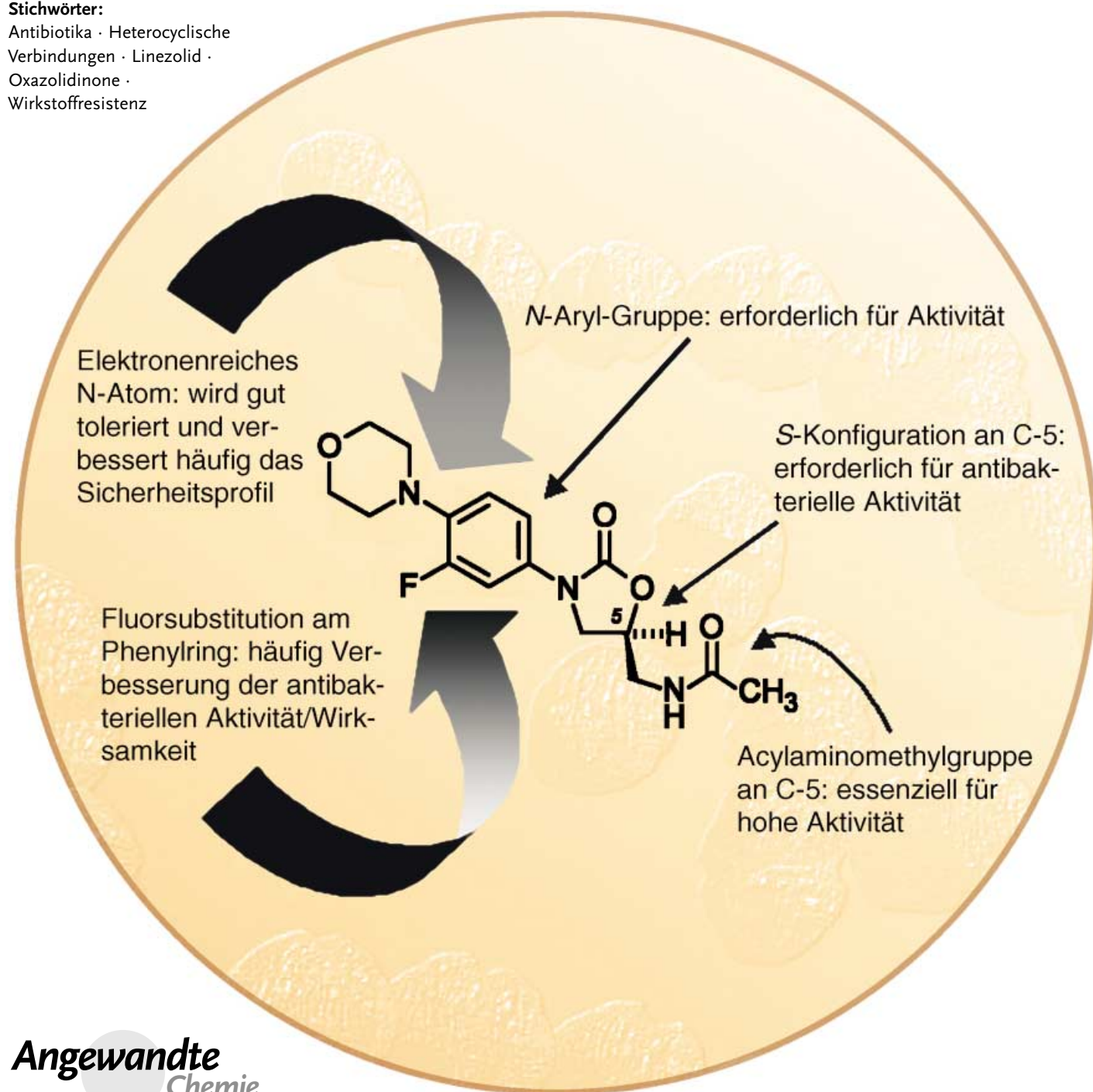
Wirkstoff-Design

Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Oxazolidinonen: Grundlage der Entwicklung von Linezolid

Michael R. Barbachyn* und Charles W. Ford

Stichwörter:

Antibiotika · Heterocyclische
Verbindungen · Linezolid ·
Oxazolidinone ·
Wirkstoffresistenz



Die zunehmende Resistenz von Bakterien gegen Antibiotika ist gegenwärtig eines der drängendsten Probleme in der Medizin. In dieser Hinsicht besonders bedenklich sind durch mehrfachresistente Gram-positive Pathogene verursachte Infektionen, die signifikante Krankheits- und Sterblichkeitsziffern verursachen. Eine Reihe von Lösungsansätzen wurde zur Bekämpfung der Bakterienresistenz eingeführt. Der am häufigsten angewendete Ansatz beruht auf der Modifizierung existierender Klassen von Antibiotika zur Herstellung neuer Analoga mit verbesserten Eigenschaften. Weitere Strategien sind die Kombination von antibakteriellen mit anderen Wirkstoffen und die Anwendung von Zusatztherapeutika wie Immunmodulatoren. Die größte Bedeutung hat aber zweifellos die Entwicklung neuer Klassen antibakterieller Wirkstoffe mit neuartigen Wirkmechanismen, die sich durch das Fehlen von Kreuzresistenzen mit existierenden antimikrobiellen Wirkstoffen auszeichnen. Dieser Aufsatz schildert die Arbeiten, die zur Entwicklung von Linezolid führten, dem ersten klinisch nutzbaren Oxazolidinon-Antibiotikum.

1. Einleitung

In den 80er Jahren wurde der Markt für Antibiotika im Wesentlichen als gesättigt betrachtet, in dem Sinne, dass eine große Auswahl an Antibiotika zur Verfügung stand und beim Menschen, wenn überhaupt, nur wenige bakterielle Erkrankungen auftraten, die sich nicht durch Antibiotika heilen ließen. Man hatte sich an die Erfolge der Antibiotikaforschung und -entwicklung durch pharmazeutische Unternehmen gewöhnt. Die damals etablierten Antibiotika wurden hauptsächlich durch biologisches Screening von Fermentationsbrühen, Naturstoffextrakten und Substanzbibliotheken aus der laufenden Forschung entdeckt. Die große Zahl der erhältlichen Antibiotika resultierte aus der Anwendung von iterativen Entwicklungsprozessen, in denen strukturverwandte Verbindungen einer bestimmten Substanzklasse synthetisiert und in den Markt eingeführt wurden, wenn immer diese gegenüber etablierten Antibiotika Verbesserungen hinsichtlich der intrinsischen Wirksamkeit, dem Spektrum der antibakteriellen Aktivität oder der Arzneimittelsicherheit aufwiesen. Die umfassende Forschung und Entwicklung unter Nutzung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen (structure-activity relationships, SAR) führte zu einer Vielzahl unterschiedlicher Antibiotika derselben Substanzklasse. Mitte der 80er Jahre waren seit über zwanzig Jahren keine neuen Antibiotikaklassen in den Markt eingeführt worden, und viele Abnehmer vertraten gegenüber den pharmazeutischen Unternehmen den Standpunkt, dass mehr Antibiotika zur Verfügung standen als benötigt.

Etwa zur gleichen Zeit als deutlich wurde, dass die Entwicklung neuer Antibiotikaklassen beträchtliche Investitionen in neue Technologien erforderte und der Markt für Antibiotika gesättigt war, begann sich ein Gefahrenpotenzial Gram-positiver Bakterien wie Staphylococci, Streptococci und Enterococci abzuzeichnen, die Resistenzen gegen die vorhandenen Antibiotikaklassen entwickelt hatten. Bei En-

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	2057
2. Oxazolidinone	2058
3. Biologische Evaluierung von Linezolid	2063
4. Sonstige biologische Befunde	2067
5. Zusammenfassung	2068

terococci, insbesondere *Enterococci faecalis* und *Enterococcus faecium*, wurde ein Nischenwechsel beobachtet. Während sie früher vornehmlich in intraabdominalen Abszessen und bei Harnwegsinfektionen angetroffen wurden, begannen sie nun vermehrt bei älteren stationären Patienten, Bak-

teriämie zu verursachen. Die beiden Enterococciarten gelten zwar nicht als starke Pathogene, in dem Sinne, dass sie hochvirulente Erkrankungen verursachen, entwickelten aber eine Mehrfachresistenz, wobei viele Stämme sogar gegen Vancomycin resistent wurden,^[1] was ihre Bekämpfung außerordentlich schwierig machte. Bis in die 90er Jahre konnten Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae*, dem häufigsten Erreger von Infektionskrankheiten beim Menschen, durch eine Reihe billiger und seit langem angewendeter Antibiotika behandelt werden. In der Folge von mindestens zwei unabhängigen Ausbrüchen penicillinresistenter Formen von *S. pneumoniae* haben sich die resistenten Varianten dieses Pathogens mittlerweile weltweit verbreitet und zudem Resistenzen auch gegen andere Antibiotikaklassen entwickelt. Heute sind mehrfachresistente *S. pneumoniae* bereits eine schwerwiegende Bedrohung in den pazifischen Randgebieten und werden allmählich zu einem erheblichen Problem der medizinischen Grundversorgung in den Vereinigten Staaten und in Teilen Europas.^[2-6]

Unter den Gram-positiven Erregern haben *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* wegen Resistenzentwicklungen zu Behandlungsproblemen in Kliniken geführt. Ein Versagen der Behandlung von Infektionen durch jedes dieser Pathogene kann leicht zum Tod des Patienten führen. Die in den vergangenen Jahren am häufigsten festgestellte Form der so bezeichneten „Mehrfachresistenz“ bei Staphylococci betrifft in der Hauptsache eine Resistenz gegen Methicillin. Methicillinresistenz heißt jedoch nicht, dass es kein Mittel gegen diesen Erreger gibt –

[*] Dr. M. R. Barbachyn, Dr. C. W. Ford
Medicinal Chemistry Research
Pharmacia Corporation
7000 Portage Road, Kalamazoo, MI 49001 (USA)
Fax: (+1) 269-833-9629
E-mail: michael.r.barbachyn@pharmacia.com

es bedeutet vielmehr, dass ausschließlich Vancomycin sicher gegen mehrfachresistente Staphylococcen wirkt. Um festzustellen, ob auch andere Antibiotika wirksam sind, muss der Erreger isoliert und auf sein Verhalten gegen den Wirkstoff untersucht werden.^[7] Wegen des sehr schnellen und tödlichen Krankheitsverlaufs bei Infektionen durch Staphylococcen muss die Therapie jedoch möglichst früh eingeleitet werden, sodass für eine Isolierung des Erregers und eine Wirksamkeitsprüfung keine Zeit bleibt. Unter diesen Umständen ist eine Behandlung mit Vancomycin sicher empirisch die Methode der Wahl, wenn auch angesichts der Erfahrungen mit vancomycinresistenten Enterococcen ein Transfer der Resistenz auf Staphylococcen berechtigterweise befürchtet wurde, zumal eine Infektion durch einen sowohl mehrfach- als auch vancomycinresistenten Staphylococcenstamm im Prinzip unheilbar wäre.

Die therapeutisch bedenkliche Resistenzentwicklung Gram-positiver Bakterienstämme ist unmittelbare Folge eines schrumpfenden Forschungs- und Entwicklungsaufwandes im Bereich Antibiotika. Eine umfassende Bewertung des Antibiotikamarktes Mitte der 80er Jahre durch unser Unternehmen, Pharmacia, führte zu dem Schluss, dass noch immer ein Bedarf an neuen Wirkstoffklassen mit antibakteriellen Eigenschaften zur empirischen Bekämpfung von Staphylococcen und anderen Gram-positiven Erregern besteht. Kurz nach Abschluss dieser Studie besuchten wir 1987 eine Präsentation von Wissenschaftlern der Firma E.I. du Pont de Nemours & Company (DuPont), die ihre gesammelten Ergebnisse über eine neue Klasse von antibakteriellen Wirkstoffen, den Oxazolidinonen, vorstellten.^[8] Die Oxazolidinone erschienen uns deshalb interessant, weil sie sämtliche Merkmale aufweisen, die in der damaligen Zeit für Antibiotika als wichtig erachtet wurden. Ihr Wirkungsspektrum deckte die wichtigen Gram-positiven Pathogene ab, insbesondere jene, die wegen der Entwicklung von Resistenzen große Probleme bereiteten, sowie *S. pneumoniae*, das wir damals hinsichtlich Resistenzentwicklung als potenziell bedrohlich eingestuft hatten. Die Oxazolidinone schienen einen einzigartigen Wirkmechanismus zu haben und zeigten in Einklang damit keine Kreuzresistenz zu existierenden bakteriellen Resistenzmechanismen.^[8–10] Die Oxazolidinone waren oral wirksam, eine Eigenschaft, die wir als ein Schlüsselkriterium neuer Antibiotika für die Grundversorgung ansahen. Durch eine orale Verabreichung waren im

stationären Bereich entscheidende Kostensenkungen zu erwarten, da auf diese intravenöse Therapien rasch beendet und von oraltherapeutischen Maßnahmen bereits in der Klinik oder in häuslicher Umgebung des Patienten abgelöst werden könnten. Es war extrem schwierig, oxazolidinonresistente Mutanten unter Laborbedingungen zu selektieren. Die experimentell nachgewiesene antibakterielle Wirkung und das pharmakokinetische Verhalten ließen hoffen, dass die Oxazolidinone im menschlichen Organismus hinreichend wirksam sein sollten, um auch unter marktwirtschaftlichen Gesichtspunkten vielversprechend zu sein.^[11–13] Vor diesem Hintergrund fiel der Entschluss, die Oxazolidinone in einer präklinischen Pilotstudie („Proof-of-Concept-Studie“) einzusetzen, deren Ziel es war, die vielversprechenden Wirkungseigenschaften der Oxazolidinone zu belegen.

2. Oxazolidinone

2.1. Allgemeines Evaluierungsschema

Das von uns angewendete allgemeine Schema zur biologischen Evaluierung von Oxazolidinon-Analoga ist in Abbildung 1 dargestellt. Viele Mitglieder unseres Forschungsteams hatten Erfahrung in der Synthese und Evaluierung von Analoga existierender Antibiotika, jedoch bildeten die Oxazolidinone eine besondere Herausforderung, da zum damaligen Zeitpunkt auf keinerlei Informationen hinsichtlich Eigenschaften und biologischer Aktivität dieser neuen Antibiotikaklasse zurückgegriffen werden konnte. Die notgedrungene Einfachheit unseres Evaluierungsschemas spiegelt daher die Tatsache wider, dass wir zu Beginn unseres Forschungsprogramms über keinerlei signifikante Erkenntnisse hinsichtlich der biologischen Wirksamkeit der Oxazolidinone verfügten.

Die Oxazolidinon-Analoga wurden In-vitro-Testreihen unterzogen, in denen die MIC-Werte jeder Verbindung gegen ein Array von Gram-positiven, Gram-negativen und anaeroben Bakterien bestimmt wurden (MIC = minimale Hemmkonzentration („minimum inhibitory concentration“): die Minimalkonzentration eines Wirkstoffes, mit der unter standardisierten Bedingungen Bakterienzellen getötet oder ihr Wachstum inhibiert werden kann). Untersucht wurden sowohl antibiotikaempfindliche als auch antibiotikaresistente



Michael R. Barbachyn erhielt seinen PhD 1983 von der Wayne State University mit einer bei Prof. Carl R. Johnson angefertigten Arbeit. Nach einem Postdoc-Aufenthalt bei Prof. Samuel Danishefsky an der Yale University trat er 1985 in die Upjohn Company (heute Pharmacia Corporation) ein. Seit Anfang der 90er Jahre war er unmittelbar am Oxazolidinonprojekt bei Pharmacia beteiligt und trug so maßgeblich zur Entwicklung von Linezolid bei, dem ersten marktvertriebenen antibakteriellen Oxazolidinon-Wirkstoff. Er ist Mitinhaber von 30

US-Patenten und hat an einer Reihe von Veröffentlichungen über Antiinfektiva mitgewirkt.



Charles W. Ford begann seine Laufbahn mit einem Abschluss in Mikrobiologie an der University of Texas at Austin. Nach seinem Beitritt in die Upjohn Company (heute Pharmacia Corporation) war er als leitender Mikrobiologe für die biologische Forschung innerhalb des Oxazolidinonprojekts bei Pharmacia verantwortlich und von den bescheidenen Anfängen des Projekts bis fast zur Markteinführung von Linezolid maßgeblich an dessen Entwicklung beteiligt. Mittlerweile ist er Senior Fellow in der Forschung und führt seine Arbeiten zur In-vivo-Evaluation vielversprechender experimenteller Antibiotika fort.

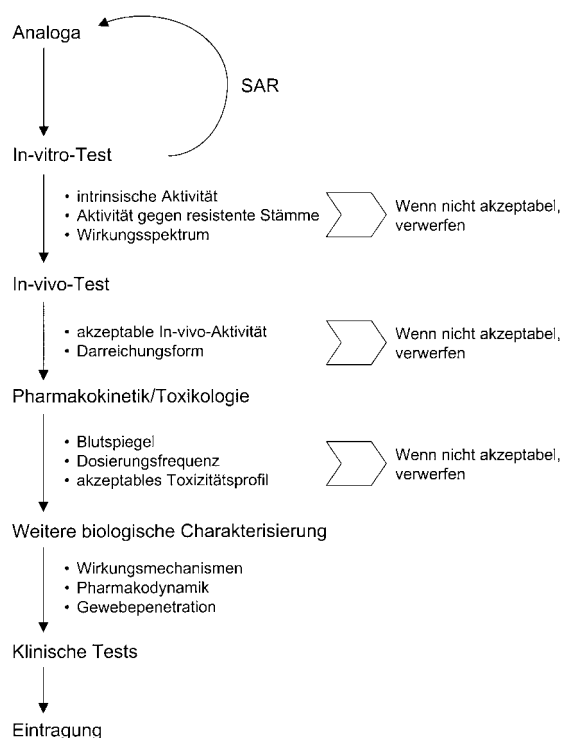


Abbildung 1. Allgemeines Testschema zur Evaluierung der Oxazolidinone unter Berücksichtigung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen.

Bakterienstämme. Neben dem MIC-Wert wurde die Aktivität eines Wirkstoffs gegen resistente Stämme ermittelt, um so das antibakterielle Wirkungsspektrum eines Kandidaten einzuschätzen. Das zur Aufstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen wichtigste Kriterium war zunächst der MIC-Wert, doch wurden andere Kriterien mit zunehmendem Entwicklungsstadium der Kandidaten stärker herangezogen. Als internes Kriterium wählten wir einen MIC-Wert von $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ oder darunter bei 90 % der untersuchten Stämme. Ein solcher Wert sollte zu einem Oxazolidinon führen, das zu dem von uns gewählten Goldstandard, Vancomycin, konkurrenzfähig sein sollte. Ein Testkandidat würde die erste Runde der In-vitro-Tests dann überstehen, wenn sein MIC_{90} -Wert gegen die wichtigsten Gram-positiven Erreger $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ oder darunter betrug, er gegen antibiotika-resistente Bakterien aktiv war und wenn sein Wirkungsspektrum alle wichtigen Gram-positiven Erreger abdeckte.

Verbindungen, die die In-vitro-Kriterien erfüllten, wurden anschließend In-vivo-Tests unterzogen, in denen ihre orale Aktivität in Mausmodellen humaner Bakterienerkrankungen im Vergleich zu subkutan verabreichtem Vancomycin evaluiert wurde. Ziel war die Auffindung von Oxazolidinonen mit gleicher oraler Aktivität wie subkutan verabreichtes Vancomycin, das selbst nicht oral aktiv ist. Unserer Auffassung nach musste das Ziel so hoch gesteckt werden, weil wir davon ausgehen mussten, dass unsere potenziellen Abnehmer ausschließlich mit einem oral zu verabreichenden Wirkstoff gegen Infektionen durch Gram-positive Bakterien zu überzeugen waren. Der oralen Aktivität der Testkandidaten wurde demzufolge allergrößte Bedeutung zugemessen. Darüber hinaus legten wir Wert darauf, dass die oral verab-

reichbaren Substanzen hinreichend gut löslich waren, um auch für intravenöse Formulierungen infrage zu kommen. Dies war eine Voraussetzung für die erfolgreiche Markteinführung eines Antibiotikums für die klinische Therapie schwerer Infektionen. Es war nicht anzunehmen, dass Ärzte bei schweren Infektionen oder auch nur in klinischen Testreihen von der intravenösen Verabreichung von Vancomycin auf oral verabreichbare Oxazolidinone umstellen würden. Erst nach erfolgreicher Einführung intravenöser Oxazolidinonpräparate würde die Umstellung von intravenöser auf Oraltherapie vermittelbar sein.

Verbindungen, die hinsichtlich ihrer Aktivität im In-vivo-Infektionsmodell äquivalent zu Vancomycin waren, wurden anschließend pharmakokinetisch in der Ratte und im Hund evaluiert und toxikologisch untersucht. Die toxikologischen Evaluierungen waren bei Weitem zu umfangreich, um sie in diesem Aufsatz detailliert darzustellen. In den pharmakokinetischen Untersuchungen musste eine Verbindung zwei Vorgaben erfüllen, um die nächste Stufe der klinischen Tests zu erreichen. Unser Kriterium war, dass anhand der Blutwerte in Ratte und Hund nach oraler Verabreichung auf eine maximale Serumkonzentration (C_{max}) im Menschen von $12\text{--}15 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ebenfalls bei oraler Gabe) geschlossen werden konnte. Da die Oxazolidinonpräparate auch gegen schwere bakterielle Humaninfektionen eingesetzt werden sollten, wählten wir eine Zielvorgabe für C_{max} , die dreimal so hoch war wie der MIC_{90} -Wert für das am schlechtesten ansprechende Bakterium ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$). Ein C_{max} -Wert dieser Größenordnung würde gewährleisten, dass die Wirkstoffkonzentration im Blut eine ausreichend lange Zeit oberhalb des MIC-Wertes gegen alle Bakterien blieb. Wenn die maximale Serumkonzentration die wichtigste charakteristische Größe zur Korrelation der antibakteriellen Wirkung in vivo war, dann war dieser C_{max} -Wert hinreichend groß, um eine Wirksamkeit auch beim Menschen voraussagen zu können. Im Hinblick auf die erwünschte orale Verabreichung des Präparats wurde eine zweimal tägliche Dosierung beim Menschen angestrebt. Eine dreimal tägliche Verabreichung wurde als problematisch angesehen, weil Eltern ihren Kinder eine weitere Dosis für den Nachmittag mit in die Schule geben müssten, und auch erwachsene Patienten daran denken müssten, das Medikament während des Tages bei sich zu führen. Die zweimal tägliche Dosierung, d. h. einmal morgens und einmal am Abend, wurde als die bequemste und am wenigsten problematische Dosierungsvorgabe angesehen.

Jede Verbindung, die die In-vitro- und In-vivo-Kriterien erfüllte, die toxikologischen Tests überstand und das korrekte pharmakokinetische Profil besaß, wurde zu einem Kandidaten für klinische Studien. Nach weitergehenden präklinischen Tests wurde dieser Kandidat dann in die Phase I der klinischen Studien aufgenommen. Auch als die ersten Oxazolidinone bereits in der klinischen Entwicklung waren, haben wir unsere Forschungen zur biologischen Charakterisierung der Oxazolidinone fortgesetzt. Insbesondere konzentrierten wir uns auf den Wirkmechanismus, da wir dessen Aufklärung hinsichtlich der Marktakzeptanz einer völlig neuartigen Wirkstoffklasse für außerordentlich wichtig hielten. Ebenso versuchten wir herauszufinden, aus welchen Gründen das Wirkungsspektrum auf Gram-positive Bakte-

rien begrenzt war. Der pharmakokinetische Schlüsselparameter der Oxazolidinone, der am ehesten Rückschlüsse hinsichtlich des Erfolgs klinischer Behandlungen zuließ, wurde durch umfangreiche In-vivo-Testreihen ermittelt. Dieser Parameter erlaubte den Ärzten, anhand der Blutwerte auf die Wirkung der Substanz im Patienten zu schließen. Die Verteilung der Substanzen im Gewebe wurde untersucht, damit sich vorhersagen ließ, welche extravaskulären Bakterienerkrankungen auf eine Oxazolidinon-Therapie ansprechen würden. Darüber hinaus wurden einige hochspezialisierte Wirksamkeitsmodelle entwickelt, um Aussagen darüber zu treffen, ob und welche Wirkung Oxazolidinone bei der Behandlung von Endokarditis (Herzinnenhautentzündung) und Osteomyelitis (Knochenhautentzündungen) haben würden. Ebenso untersuchten wir den möglichen Einfluss von Oxazolidinonen bei Konzentrationen unterhalb des MIC-Wertes auf die Virulenzfaktorproduktion bestimmter Organismen.

2.2. Erste Studien zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Auf der 1987 stattfindenden Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) präsentierten Wissenschaftler der Fa. DuPont die Strukturen und antibakteriellen Aktivitätsprofile von zwei neuen Wirkstoffen, DuP-105 und DuP-721, als Kandidaten für klinische Studien.^[13] Es waren die ersten wirksamen Vertreter einer neuartigen Antibiotikaklasse, der Oxazolidinone. Die Verbindungen gingen aus iterativen medizinisch-chemischen Forschungen ausgehend von einer Serie racemischer 5-Halogenmethyl-3-phenyl-2-oxazolidinone hervor, die sich bei der Behandlung einer Reihe von Pflanzenkrankheiten als wirkungsvoll erwiesen hatten. Verbindung **1** (Abbildung 2) ist ein Beispiel dieser Verbindungsklasse.^[14] Die chemische Modifizierung von **1** lieferte Analoga wie **2** (S-6123), die Studien zufolge eine moderate In-vitro-Aktivität und In-vivo-Wirksamkeit gegen mehrere Gram-positive und Gram-negative Organismen zeigten.^[15] Zu diesem Zeitpunkt wurde deutlich, dass die absolute Konfiguration der Oxazolidinone an C-5 eine bedeutende Rolle spielte. Die Weiterentwicklung von Analoga wie **2** führte schließlich zu den prototypischen Oxazolidinonen DuP-721 und DuP-105,^[16] die gegenüber den

Stammverbindungen erheblich verbesserte Eigenschaftsprofile aufwiesen.

Einige Aktivitätstrends, die auf einer Analyse von frühen Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei DuPont beruhen, sind in Abbildung 3 zusammengefasst. Wie im Folgenden noch deutlich werden wird, müssen einige dieser Annahmen heute revidiert werden.

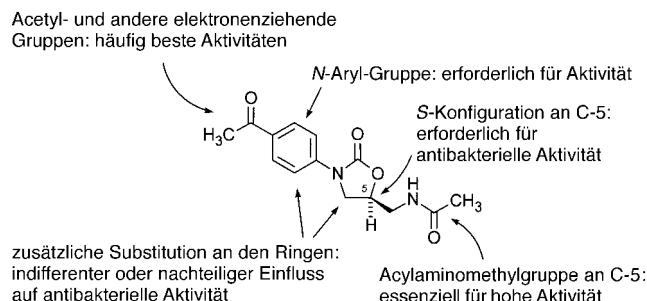


Abbildung 3. Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Oxazolidinonen gemäß früher Studien bei DuPont.

Wir entschieden uns, Oxazolidinone in einer Proof-of-Concept-Studie zu untersuchen, deren Ziel es war, strukturell neue Oxazolidinone mit vielversprechenden biologischen Charakteristika, insbesondere hinsichtlich der antibakteriellen Aktivität und der Arzneimittelsicherheit, identifizieren und synthetisieren zu können.

2.3. Interimsphasen der Entwicklung

In den ersten Entwicklungsphasen bei Pharmacia wurde eine Reihe struktureller Modifizierungen der Leitverbindung DuP-721 hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die antibakterielle Aktivität untersucht. Auf eine detaillierte Darstellung dieser Untersuchungen muss hier verzichtet werden, sodass wir unsere Diskussion auf Analoga beschränken, in denen der 4-substituierte Phenylring von DuP-721 durch ein anelliertes bicyclisches System ersetzt ist. Im Speziellen wurden Analoga mit Indanon- (PNU-82965)^[17] und Tetralon-Einheiten (PNU-85055)^[18] hergestellt und getestet. Anhand dieser Verbindun-

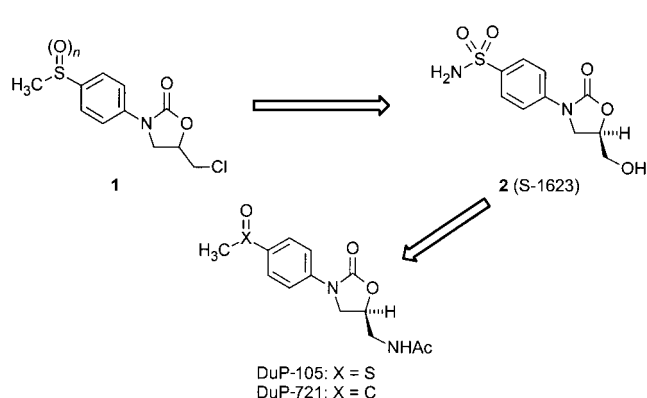
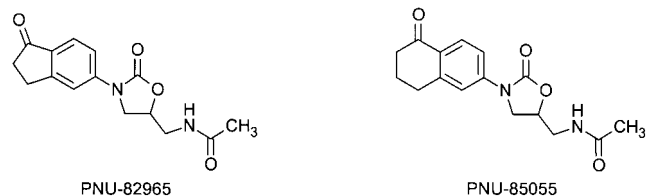


Abbildung 2. Entwicklungsstufen von Oxazolidinonen nach DuPont.

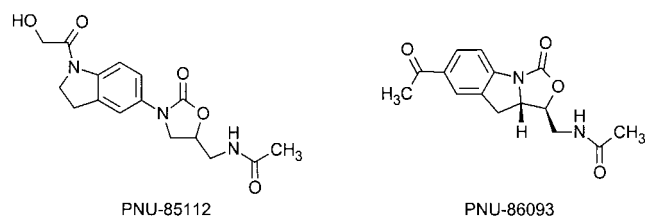


gen sollte der Effekt einer Anellierung des Acetylsubstituenten an den Phenylring von DuP-721 untersucht werden. Es sei angemerkt, dass die in dieser ersten Phase untersuchten Analoga der rascheren Herstellung wegen als Racemate synthetisiert wurden. Da ausschließlich das S-Enantiomer antibakteriell aktiv ist,^[16] beobachtet man beim racemischen

Material im Allgemeinen eine halbierte Aktivität gegenüber dem reinen Enantiomer. Gleichwohl sollte es in der ersten Projektphase genügen, racemische Gemische zur Herleitung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen heranzuziehen.

Die Verbindung PNU-82965 sollte eine entscheidende Rolle im Oxazolidinon-Programm bei Pharmacia spielen. 1989 tauchten vereinzelte Berichte auf, nach denen DuPont klinische Studien an einem ihrer Oxazolidinone aufgrund der in mehreren Tiermodellen beobachteten Toxizität gestoppt hatte.^[19] Um diesen Hinweisen nachzugehen, wurden bei Pharmacia vergleichende Sicherheitsevaluierungen mit racemischem DuP-721 und PNU-82965 ausgeführt.^[20] In dieser Studie wurden racemisches DuP-721 und PNU-82965 in einer Dosis von 100 mg pro kg Körpergewicht zweimal täglich über einen Zeitraum von 30 Tagen an drei männliche und drei weibliche Sprague-Dawley-Ratten oral verabreicht. Von den mit racemischem DuP-721 behandelten Ratten verstarb eine, und zwei weitere wurden in moribundem Zustand eingeschläfert. Darüber hinaus wurden an den mit racemischem DuP-721 behandelten Tieren ein fortschreitender Gewichtsverlust sowie Anzeichen auf eine Knochenmarkatrophie festgestellt. Im Unterschied dazu zeigten die mit PNU-82965 behandelten Ratten lediglich einige Nebenwirkungen, die allesamt als geringfügig eingestuft wurden. Es gab weder klinische Symptome, noch Spuren im Urin oder im Serum, noch histopathologische Erscheinungsformen einer wirkstoffbezogenen Toxizität. Als wichtigste Schlussfolgerung dieser Vergleichsstudie wurde erkannt, dass Struktur und Toxizität der Oxazolidinone zusammenhängen.

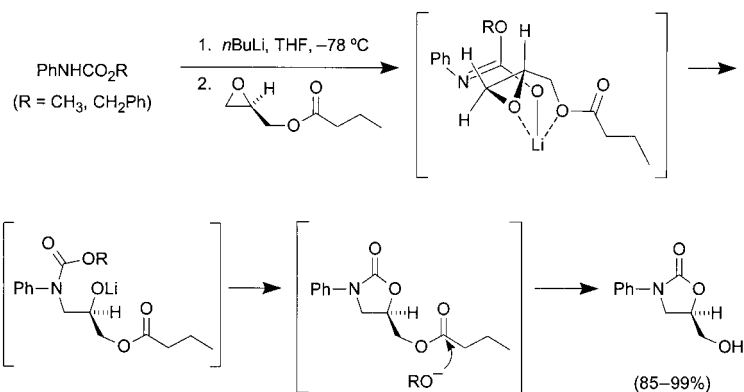
Aufbauend auf den ermutigenden Ergebnissen der Toxizitätsstudie mit PNU-82965 und mit der Überlegung, dass alternative bicyclische Ringsysteme dem Oxazolidinon-Pharmacophor verbesserte Eigenschaften verleihen könnten, wurde das racemische Indolinderivat PNU-85112 als Zielverbindung identifiziert und synthetisiert.^[21] Wie der Vorläufer PNU-82965 bewährte sich auch das Indolinderivat in Toxizitätsstudien an der Ratte hervorragend, und sowohl In-vitro-Aktivität als auch In-vivo-Wirkung kamen der von (\pm)-DuP-721 nahe.



Weitergehende Untersuchungen an Analoga von DuP-721 mit anellierten Ringsystemen führten schließlich zur Synthese tricyclischer Verbindungen wie dem racemischen PNU-86093.^[22] Mithilfe dieses Moleküls und weiterer Analoga (die hier nicht diskutiert werden können) wurde der optimale Diederwinkel zwischen der Oxazolidinoneinheit und dem benachbarten Phenylring bestimmt. (\pm)-PNU-

86093 zeigte in vitro eine antibakterielle Aktivität, die etwas niedriger war als die von (\pm)-DuP-721.

Nachdem nun antibakteriell wirksame und sichere Oxazolidinone zur Verfügung standen, rückte die Synthese der enantiomerenreinen Verbindungen in den Vordergrund. Zuvor beschriebene Synthesemethoden ausgehend von Arylisocyanaten waren zwar erfolgreich angewendet worden, erwiesen sich jedoch nicht als allgemein einsetzbar.^[16,17] Im Zuge umfangreicher Untersuchungen bei Pharmacia wurde schließlich entdeckt, dass *N*-lithiierte Carbamaterivate des Anilins unter geeigneten Bedingungen mit käuflichem (*R*)-Glycidylbutyrat direkt zu (*R*)-3-Aryl-5-(hydroxymethyl)oxazolidinonen umgesetzt werden können (Schema 1).^[23] Die erhaltenen Hydroxymethylderivate lassen sich anschließend leicht in die Endprodukte überführen.



Schema 1. Enantioselective Synthese von Phenyloxazolidinonen (Manninen-Reaktion).

2.4. Entwicklung der Piperazinylphenyloxazolidinone

Wir fragten uns, ob die 4-Pyridyleinheit der DuPont'schen Leitverbindung E3709 durch gesättigte heterocyclische Bioisostere ersetzt werden könnte (Abbildung 4). Die Überlegungen stützten sich, wenn auch im umgekehrten Sinne, auf Erfahrungen aus dem Bereich der antibakteriellen Chinolonwirkstoffe, bei denen der Piperazinring in z. B. Ciprofloxacin

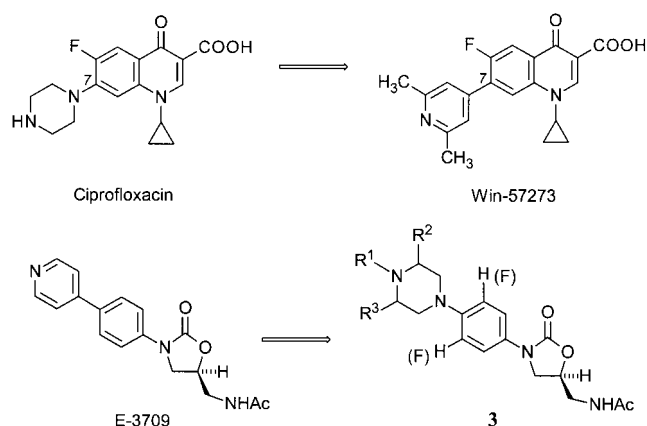
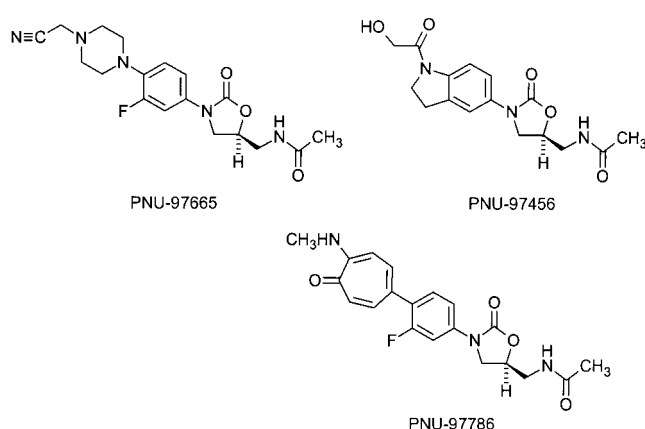


Abbildung 4. Entwicklung der Piperazinylphenyloxazolidinone.

durch einen Pyridinsubstituenten wie in Win-57273 ersetzt worden war.^[24] Weiterer Nutzen konnte aus den gut untersuchten Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Chinolone gezogen werden, demgemäß Fluorsubstituenten in bestimmten Positionen die Wirksamkeit erhöhen und darüber hinaus das pharmakokinetische Profil der Wirkstoffe bei oraler Verabreichung verbessern.^[25] Parallel zu unseren Studien zur Piperazinylderivatisierung hofften wir darauf, dass der stark elektronenziehende Fluorsubstituent an den *meta*-Positionen des zentralen Phenylrings toleriert würde und dem Oxazolidinon-Target verbesserte antibakterielle und/oder andere willkommene Eigenschaften verleiht (siehe die allgemeine Struktur **3** in Abbildung 4).

Gegen Ende 1992 hatten sich unsere Forschungen auf drei Oxazolidinon-Unterklassen konzentriert: 1) Piperazinylphenyloxazolidinone (z. B. PNU-97665),^[26] 2) Indolinyloxazolidinone (z. B. PNU-97456)^[27] und 3) Troponylphenyloxazolidi-



none (z. B. PNU-97786).^[27] Die Indoline hatten im Allgemeinen ein ausgezeichnetes Sicherheitsprofil, wiesen jedoch etwas niedrigere antibakterielle Aktivitäten auf. Die Troponylderivate waren hinsichtlich ihrer antibakteriellen Aktivität die interessantesten Analoga, fielen jedoch durch mangelnde Wasserlöslichkeit und ungünstige pharmakokinetische Parameter auf. Einige Piperazinyl-derivate schließlich zeigten bei akzeptablem Sicherheitsprofil, guter Wasserlöslichkeit und günstigen pharmakokinetischen Parametern ausgezeichnete In-vitro- und In-vivo-Aktivität. Als zusätzliches Plus erwies sich die relativ einfache Synthese der Piperazinderivate. Aufgrund dieser und anderer Eigenschaften wurde in den weiteren Forschungen das Hauptaugenmerk auf die Piperazin-Serie gelegt.

2.5. Piperazinylphenyloxazolidinone und Isostere

Eine ganze Reihe von Piperazinylphenyloxazolidinonen der allgemeinen Struktur **3** wurde synthetisiert. Viele dieser Verbindungen wiesen vielversprechende Grade antibakterieller In-vitro- (MIC) und In-vivo-Aktivität (ED_{50}) auf. Von besonderem Interesse war der Befund, dass ein oder zwei Fluoratome in Nachbarschaft zum *para*-Piperazinylsubstituenten einen signifikanten Potenzierungseffekt auf die antibakterielle Aktivität hatten (Tabelle 1). Diese Beobachtung ist im Einklang mit Ergebnissen anderer Oxazolidinonklassen.^[27] Es stellte sich weiterhin heraus, dass eine große Zahl von Alkyl-, Acyl- und Sulfonylsubstituenten am distalen Piperazin-Stickstoffatom toleriert wird. Nach Iteration einiger Synthesansätze wurde erkannt, dass die Hydroxyacetyl-Gruppe der optimale Substituent am Stickstoffatom ist. Als Ideallösung mit der besten Balance aus antibakterieller Aktivität, Pharmakokinetik, Wasserlöslichkeit und anderen entscheidenden Eigenschaften erwies sich letztlich das Monofluorderivat PNU-100592 (Eprezolid).^[28] Eine Synthese von PNU-100592 aus einer frühen Laborphase ist in Schema 2 wiedergegeben.

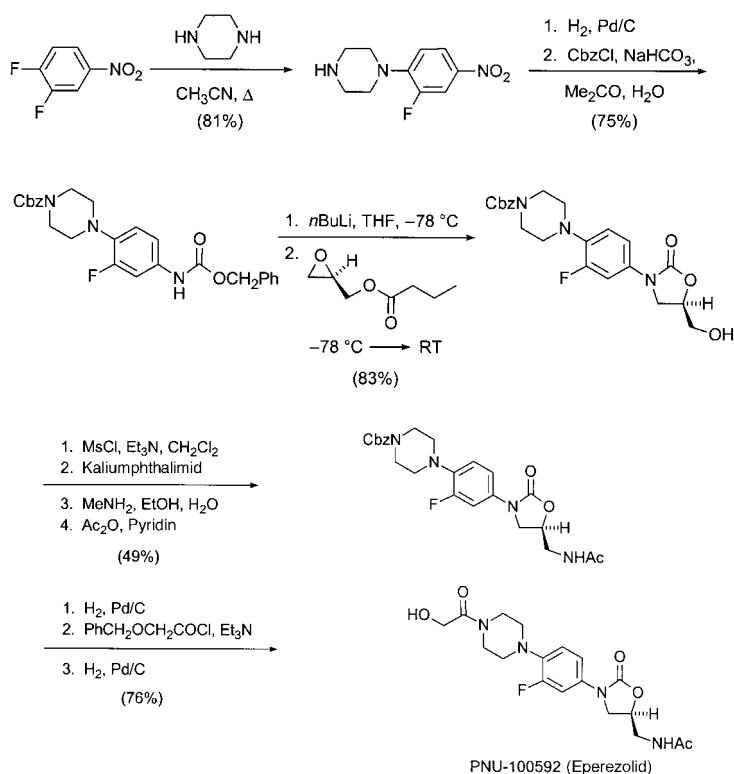
Aus der Literatur über Chinolon-Antibiotika war uns bekannt, dass bioisostere Alternativen zum Piperazinring existierten. Daran anknüpfende systematische Modifizierungen führten zur Entdeckung des antimykotischen Thiomorpholinderivats PNU-100480^[29] und des Morpholin-analogen PNU-100766, das später unter dem Namen Linezolid bekannt werden sollte.^[28]

Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, wurden einige der von DuPont aufgestellten Leitlinien zur Aktivität von Oxazolidinonen im Zuge des umfangreichen SAR-Programms bei

Tabelle 1: Potenzierungseffekt bei Piperazinylphenyloxazolidinonen durch Fluorierung des Phenylrings.

PNU	R ¹	R ²	R ³	MIC [$\mu\text{g mL}^{-1}$]			ED ₅₀ [mg kg^{-1}] ^[d]
				SA ^[a]	EF ^[b]	SP ^[c]	
107399	CO ₂ Me	H	H	4	4	2	n.u. ^[e]
98257	CO ₂ Me	H	F	4	2	1	3.7 (1.6)
98170	CO ₂ Me	F	F	2	2	0.5	2.5 (1.3)
108946	COCH ₂ OH	H	H	4	2	1	n.u.
100592	COCH ₂ OH	H	F	4	1	< 0.5	3.3 (5.0)
100675	COCH ₂ OH	F	F	2	1	0.25	1.6 (1.8)
143145	COCH ₂ OH	H	OMe	> 16	> 16	> 16	n.u.
97665	CH ₂ CN	H	F	8	4	1	4.0 (2.2)
98172	CH ₂ CN	F	F	4	2	1	2.8 (2.7)
99200	(CH ₂) ₂ OMe	H	F	16	16	2	7.9 (1.7)
99372	(CH ₂) ₂ OMe	F	F	8	4	1	7.7 (2.0)
100762	(CH ₂) ₂ F	H	F	16	8	2	8.6 (5.0)
100349	(CH ₂) ₂ F	F	F	4	2	1	5.0 (2.8)

[a] SA = *Staphylococcus aureus* UC9213. [b] EF = *Enterococcus faecalis* UC9217. [c] SP = *Streptococcus pneumoniae* UC9912. [d] ED₅₀ = Effektivdosis₅₀ (die aufgenommene Menge eines Stoffes, bei der 50 % der Prüforganismen eine erkennbare Wirkung zeigen). Oxazolidinone wurden oral verabreicht, in Klammern stehen Ergebnisse mit subkutan verabreichtem Vancomycin. [e] n.u. = nicht untersucht.



Schema 2. Laborsynthese von Eperezolid (PNU-100592). Cbz = Benzyloxycarbonyl, Ms = Methansulfonyl.

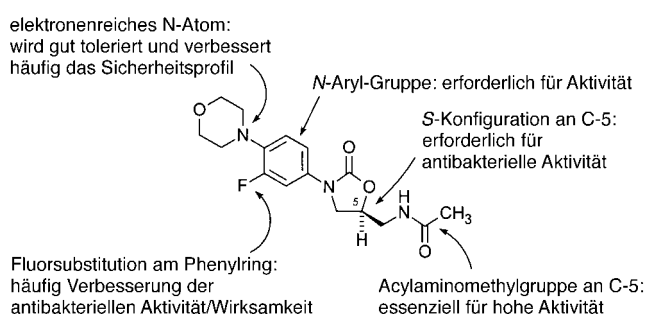
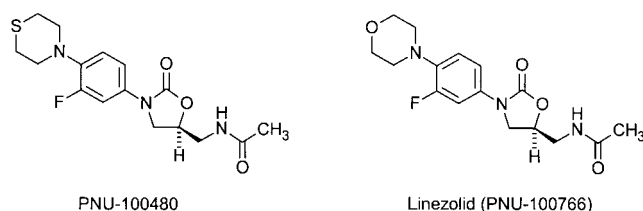


Abbildung 5. Revidierte Struktur-Wirkungs-Beziehungen gemäß Studien bei Pharmacia.

Pharmacia revidiert. Der vielleicht interessanteste Befund dabei ist, dass ein elektronenreicher Aminosubstituent am Phenylring den Verbindungen ausgezeichnete antibakterielle Aktivität bei anhaltend gutem Sicherheitsprofil verleihen kann. Ein weiteres wichtiges Ergebnis ist der Potenzierungs-

effekt durch ein oder zwei Fluorsubstituenten in Nachbarstellung zum Morpholin- oder Piperazinring.

2.6. Linezolid und Eperezolid

Die ersten Oxazolidinone, die als potenzielle Wirkstoffkandidaten aus den Testreihen hervorgingen, waren Eperezolid (PNU-100592) und Linezolid (PNU-100766). Ungewöhnlicherweise verhielten sich beide Verbindungen in der präklinischen Testphase weitgehend identisch, d.h., ihre MIC-Werte, ihr antibakterielles Wirkspektrum, ihre aus Versuchen mit infizierten Mäusen erhaltenen ED_{50} -Werte sowie ihr pharmakokinetisches Verhalten bei mindestens zwei Tierarten waren innerhalb der Fehlergrenzen gleich. Vor diesem Hintergrund entschieden wir uns für die unübliche Strategie, sowohl Eperezolid als auch Linezolid in die klinische Phase I zu übernehmen. Dabei sollte festgestellt werden, ob sich beide hinsichtlich ihres pharmakokinetischen Verhaltens im Menschen unterschieden. Die Auswertung der Blutspiegel ergab, dass Linezolid beim Menschen vermutlich nur zweimal täglich, Eperezolid dagegen dreimal täglich verabreicht werden müsste. Aufgrund dieses Vorteils wurde Linezolid für die weitere Entwicklung ausgewählt.

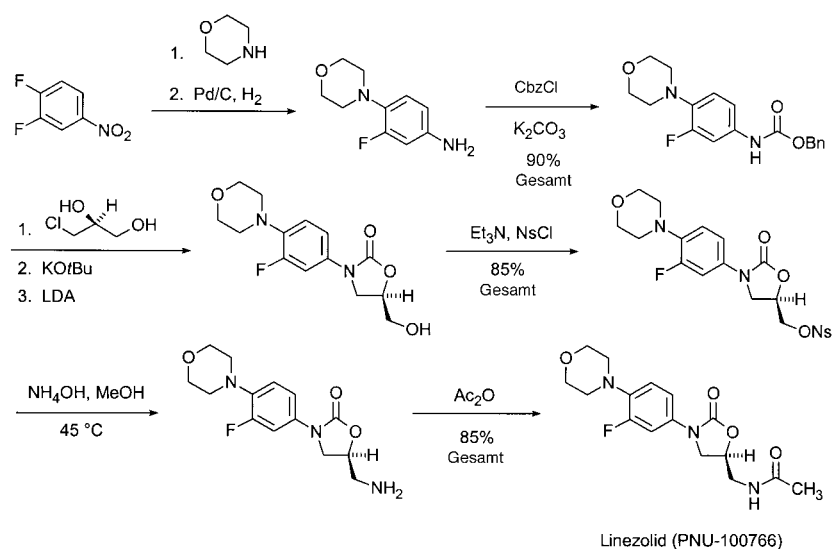
2.7. Synthese von Linezolid im Verfahrensmaßstab

Um die klinischen Studien zu erleichtern, wurde eine effiziente und kostengünstige Linezolid-Synthese benötigt. Durchgesetzt hat sich letztlich das in Schema 3 gezeigte Verfahren, das auch im großen Maßstab angewendet werden kann.^[30]

3. Biologische Evaluierung von Linezolid

3.1. Antibakterielle In-vitro-Aktivität

Die Bestimmung der MIC-Werte ist der erste Schritt bei der Untersuchung biologischer Schlüsseldaten zur Aufstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Antibiotika. Da es bei Verbindungen einer neuen Antibiotikaklasse nur wenige oder keine Erfahrungswerte gibt, aus denen auf der Grundlage von MIC-Werten auf Blutkonzentrationen oder In-vivo-Wirksamkeiten geschlossen werden kann, wird als erster Ansatz ein Vergleich mit MIC-Werten von markt-etablierten Antibiotika herangezogen. Da wir in unserem SAR-Programm *Staphylococcus aureus* als Schlüsselerreger eingesetzt hatten, zogen wir die MIC-Werte von Vancomycin, das als einziges Antibiotikum sicher gegen Staphylococceninfektionen wirkte, als Goldstandard heran. Unsere Abnehmer waren durch die gewohnte Anwendung von Vancomycin mit MIC-Werten gegen Staphylococcen zwischen 1 und $2\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ vertraut und würden Oxazolidinone mit Werten



Schema 3. Synthese von Linezolid (PNU-100766) im Verfahrensmaßstab. LDA = Lithium-diisopropylamid, Ns = *m*-Nitrophenylsulfonyl.

im selben Bereich problemlos akzeptieren. Tatsächlich ging aus den Studien hervor, dass die Wirksamkeit von Linezolid gegen Staphylococcen der von Vancomycin ähnelt (Tabelle 2). Die MIC₉₀-Werte von Linezolid gegen methicillinempfindliche und -resistente *S. aureus* reichen von 2 bis 4 µg mL⁻¹ und liegen somit innerhalb der Fehlergrenzen nahe bei den Vancomycin-Werten (1–2 µg mL⁻¹).^[31] Der MIC₉₀-Wert sowohl von Linezolid als auch von Vancomycin gegen *Staphylococcus epidermidis*, einen Erreger, der bei Infektionen durch Katheter und andere invasive Instrumente auftritt, beträgt 2 µg mL⁻¹. Andere Arbeitsgruppen bestätigten sehr bald die Wirksamkeit von Linezolid gegen Staphylococcen und sein zu Vancomycin nahezu äquivalentes Verhalten.^[32–38] Zu diesem Zeitpunkt wurde eine Vielzahl von Staphylococcenstämmen mit unterschiedlichem Resistenzmuster in vitro gegen Linezolid getestet, wobei zwei entscheidende Befunde auftreten konnten: erstens, dass die Aktivität von Linezolid nicht von einer bereits ausgebildeten Antibiotikaresistenz des Staphylococcenstamms beeinträchtigt wurde, was auf einen neuen Wirkmechanismus von Linezolid hinweist, zweitens, dass die MIC-Werte von Linezolid gegen viele der untersuchten Staphylococcenstämmen sehr ähnlich waren, was als kennzeichnend für eine neue Klasse von Antibiotika gilt.

Auch gegen Enterococcen erwies sich Linezolid in vitro als wirksam (Tabelle 2). Alle untersuchten Stämme von *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* wurden bei Konzentrationen von 4 µg mL⁻¹ oder darunter inhibiert.^[31] Dieser Befund war von großer Wichtigkeit, denn die Enterococcen hatten im Verlauf der 90er Jahre eine allgemeine Antibiotikaresistenz, bei zunehmender Zahl vancomycinresistenter Stämme, entwickelt. Die Wirksamkeit von Linezolid blieb von der Vancomycinresistenz der Enterococcen unberührt, sodass vielversprechende Heilungsaussichten für Enterococcen-Infektionen bestanden, die bis dahin durch Antibiotika nicht behandelbar waren. Ähnlich wie gegen Staphylococcen zeigte Linezolid eine gleichbleibend gute Wirksam-

keit gegen geographisch unterschiedliche Enterococcenstämmen mit breitem Resistenzmuster.

Nach unserer Einschätzung ist es von größter Bedeutung, dass Linezolid hochwirksam gegen penicillinresistente und -empfindliche *Streptococcus pneumoniae* und *Streptococcus pyogenes* war (Tabelle 2). Wenngleich die vermeintlich stärkste Bedrohung hinsichtlich Resistenzentwicklung in den 90er Jahren von Staphylococcen und Enterococcen ausging, dehnten wir unsere Untersuchungen auch auf Streptococcen aus. Der Grund dafür lag auf der Hand: *S. pneumoniae* ist als Haupterreger von Infektionen der oberen und unteren Atemwege der am häufigsten auftretende Verursacher bakterieller Infektionen beim Menschen. Seit den Anfängen des Antibiotikaeinsatzes wurden Infektionen mit *S. pneumoniae* wirkungsvoll mit billigen Antibiotika älterer Produktionslinien behandelt. Mit der Entwicklung von Resistenzen gegen β-Lactame (Penicilline), gegen Makrolide und schließlich gegen Chinolone wurde die Behandlung von Infektionen der oberen und

unteren Atemwege zunehmend zu einem therapeutischen Problem. Linezolid war gegen Streptococcen gut wirksam und blieb von bestehenden β-Lactam-Resistenzen unberührt. Die Wirksamkeit gegen *S. pyogenes* erweitert das Anwendungsspektrum von Linezolid und ermöglicht die Behandlung von unmittelbar nach der Entbindung auftretenden Infektionen. Interessanterweise umfasst das Wirkungsspektrum von Linezolid analog zu vielen anderen gegen Gram-positive Bakterien wirkenden Antibiotika sowohl die Staphylococcen als auch die Streptococcen, wobei eine höhere intrinsische Aktivität gegen die Streptococcen beobachtet wird.

Das Wirkungsspektrum von Linezolid verdient besondere Erwähnung, da dieses Kriterium darüber entscheidet, ob ein Wirkstoff in der klinischen Anwendung brauchbar sein wird. Linezolid umfasst in dieser Hinsicht die wichtigsten Gram-positiven Erreger, d. h. die Staphylococcen, die Enterococcen und die Streptococcen. Bei einem solchen Wirkungsspektrum konnte man davon ausgehen, dass die wichtigsten Infektionskrankheiten mit Linezolid zu behandeln sein werden und es somit eine willkommene Bereicherung des Arsenal an Antibiotika darstellt. Wie für Antibiotika mit Aktivität gegen Gram-positive Pathogene typisch, erwies sich Linezolid als unwirksam gegen Gram-negative Erreger und war demgemäß nur schwach aktiv gegen *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis*, zwei anspruchsvolle Gram-negative Erreger, die zusammen mit *S. pneumoniae* bei Erkrankungen der unteren und oberen Atemwege auftreten (Tabelle 2). Auch gegen medizinisch relevante anaerobe Bakterien wie *Bacteroides fragilis*, *Clostridium* spp. und *Peptostreptococcus* spp. scheint Linezolid nur eine geringe In-vitro-Wirkung zu haben, ein Befund, der dem Verhalten anderer Antibiotika mit Aktivität gegen Gram-positive Bakterien, z. B. Clindamycin, entspricht (Tabelle 2).^[39]

In der frühen Phase des Oxazolidinon-SAR-Programms tauchte ein zunächst unerklärlicher Befund auf: Wir wussten, dass das Aktivitätsspektrum der Oxazolidinone Gram-negative Erreger nicht umfasst, dennoch konnten Biologen

Tabelle 2: In-vitro-Aktivitäten von Linezolid und Vancomycin.

Organismus	Wirkstoff	MIC ₉₀ [$\mu\text{g mL}^{-1}$] ^[a]
<i>Staphylococcus aureus</i> (methicillinempfindlich)	Linezolid	4
<i>S. aureus</i> (methicillinresistent)	Vancomycin	1
	Linezolid	4
	Vancomycin	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (methicillinempfindlich)	Linezolid	2
<i>S. epidermidis</i> (methicillinresistent)	Vancomycin	2
	Linezolid	2
	Vancomycin	2
<i>Enterococcus faecalis</i> (methicillinempfindlich)	Linezolid	4
<i>E. faecalis</i> (VanB)	Vancomycin	2
	Linezolid	4
	Vancomycin	> 16
<i>Enterococcus faecium</i>	Linezolid	2
	Vancomycin	≤ 0.5
<i>E. faecium</i> (VanA)	Linezolid	4
	Vancomycin	> 16
<i>E. faecium</i> (VanB)	Linezolid	4
	Vancomycin	> 16
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Linezolid	1
	Vancomycin	≤ 0.25
<i>S. pneumoniae</i> (penicillinempfindlich oder -resistent)	Linezolid	1
	Vancomycin	≤ 0.25
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Linezolid	2
	Vancomycin	0.5
<i>Haemophilus influenzae</i> ^[b]	Linezolid	8
	Vancomycin	> 16
<i>Moraxella catarrhalis</i> ^[b]	Linezolid	4
	Vancomycin	> 16
Gram-negative Bakterien ^[c]	Linezolid	> 64
	Vancomycin	> 16
<i>Bacteroides fragilis</i> ^[d]	Linezolid	≥ 16
	Vancomycin	> 16
<i>Clostridium</i> spp. ^[d]	Linezolid	2
	Clindamycin	4
<i>Peptostreptococcus</i> spp. ^[d]	Linezolid	2
	Clindamycin	2

[a] MIC₉₀ = Konzentration, bei der 90% der untersuchten Stämme unter Standardbedingungen abgetötet oder wachstumsinhibiert werden.

[b] Anspruchsvolle Gram-negative Bakterien. [c] Erreger aus zehn Gattungen. [d] Anaerobe pathogene Bakterien.

unserer Arbeitsgruppe in einem zellfreien Assay eine Oxazolidinon-induzierte Inhibition der bakteriellen Proteinsynthese beobachten. Zu unserer Überraschung bestand das zellfreie Assay aus Extrakten von *Escherichia coli*, einem Gram-negativen Erreger, gegen den die Oxazolidinone einschließlich Linezolid keine nennenswerte Wirkung zeigten. Augenscheinlich waren Oxazolidinone somit in Abwesenheit von Zellmembranen und Zellwänden Gram-negativer Bakterien hochaktive Inhibitoren der Proteinsynthese von

E. coli! Mit dem Hauptaugenmerk auf der antibakteriellen Wirkung von Oxazolidinonen gegen Gram-positive Erreger nahmen wir an, dass die fehlende Aktivität gegen Gram-negative Erreger mit einem nicht näher identifizierten Transportprozess zusammenhängt. Diese Ergebnisse wurden später erneut aufgegriffen, wobei wir zeigen konnten, dass *E. coli*-Zellen, deren AcrAB-Transmembranpumpe durch gezielte Mutagenese ausgeschaltet wurde, sowohl in vitro als auch in vivo auf Linezolid ansprechen.^[40] Die fehlende Aktivität der Oxazolidinone gegen Gram-negative Bakterien beruht demzufolge auf der Wirkung der zellulären Transmembranpumpen, die das Oxazolidinon – zusammen mit anderen Molekülen – relativ schnell aus dem Zellinneren herauspumpen und so dessen Anreicherung verhindern.

3.2. In-vivo-Aktivität von Linezolid

In der zweiten Stufe der Evaluationsphase potenzieller Oxazolidinon-Wirkstoffe wird deren In-vivo-Aktivität bestimmt. Üblicherweise werden dabei zunächst die ED₅₀-Werte (d.h. die Menge an Wirkstoff in mg pro kg Körpergewicht, mit der 50% der infizierten Tiere geheilt werden können) bei Bakteriämie im Mausmodell experimentell ermittelt. Um eine Bakteriämie durch orale Wirkstoffgabe erfolgreich behandeln zu können, muss das Antibiotikum während seines Durchgangs durch den Magen und durch Teile des Verdauungstraktes intakt bleiben. Darüber hinaus muss ein Großteil des Antibiotikums die Darmwand passieren, und es muss in Blutkonzentrationen auftreten, die hinreichend hoch sind, um die Bakterien effektiv abzutöten. Dabei darf es nicht metabolisiert oder enzymatisch in inaktive Formen umgewandelt werden. Zudem muss es hinreichend lange im Blutstrom zirkulieren und darf nicht zu schnell ausgeschieden werden. Der Wert des Tiermodells besteht darin, dass dabei der Wirkstoff, genau wie beim Menschen, alle oben beschriebenen Hürden nehmen muss. Daher ermöglichen Studien von Bakteriämie-Modellen gegenüber Versuchen an Infektionsmodellen, bei denen die Bakterien innerhalb anderer Gewebearten vorliegen, die direkteste und effizienteste Bestimmung der In-vivo-Aktivität eines Wirkstoffs.

Die Ergebnisse der Wirksamkeitsstudien von Linezolid an der Maus sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Aufgeführt ist lediglich eine Auswahl an repräsentativen Daten unterschiedlicher In-vivo-Testreihen, die Ergebnisse vieler weiterer Tests mit anderen Erregerstämmen sind hier nicht wiedergegeben.^[41] In den Tests zeigte sich, dass oral verabreichtes Linezolid und subkutan injiziertes Vancomycin ähnliche Aktivitäten im Mausmodell aufweisen (Vancomycin ist wie erwähnt nicht oral verabreichbar). Die Ergebnisse belegten, dass wir das Hauptziel unseres Forschungsprogramms erreicht hatten: einen Wirkstoff zu entwickeln, dessen Aktivität bei oraler Verabreichung dem von subkutan verabfolgtem Vancomycin praktisch gleicht.

Die Wirksamkeit von Linezolid und Vancomycin gegen antibiotikaempfindliche Stämme von *S. aureus* (UC9271) ist äquivalent, wobei die entsprechenden ED₅₀-Werte der Wirkstoffe innerhalb der Fehlergrenzen identisch sind (Daten

Tabelle 3: In-vivo-Aktivitäten von Linezolid und Vancomycin.

Bakterium	Wirkstoff ^[a]	MIC [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	ED ₅₀ [mg kg^{-1}] ^[b]
<i>Staphylococcus aureus</i> UC9271	Linezolid	9.0	6.9
	Vancomycin	1.0	13.2
<i>S. aureus</i> UC6685 ^[c]	Linezolid	2.0	3.8
	Vancomycin	2.0	2.6
<i>S. aureus</i> UC15080 ^[c]	Linezolid	0.5	3.8
	Vancomycin	1.0	1.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> UC12084 ^[c]	Linezolid	1.0	4.7
	Vancomycin	2.0	1.8
<i>Staphylococcus pneumoniae</i> UC15088 ^[c]	Linezolid	1.0	2.7
	Cefaclor	> 32.0	> 20.0
<i>Staphylococcus pyogenes</i> UC152	Linezolid	2.0	5.0
	Clindamycin	0.6	8.6
<i>Enterococcus faecalis</i> UC12379 ^[d]	Linezolid	4.0	10.0
	Vancomycin	1.0	0.5
<i>Enterococcus faecium</i> UC15090 ^[e]	Linezolid	4.0	24.0
	Vancomycin	> 69.0	> 100.0
<i>S. aureus</i> UC9271 ^[f]	Linezolid	4.0	39.7
	Vancomycin	1.0	4.7
<i>E. faecalis</i> UC15060 ^[f]	Linezolid	4.0	11.0
	Vancomycin	2.0	16.3
<i>Bacteroides fragilis</i> UC12199 ^[f]	Linezolid	4.0	46.3
	Clindamycin	1.0	200.0

[a] Linezolid wurde oral, Vancomycin subkutan verabreicht. [b] Die Menge Wirkstoff in mg pro kg Körpergewicht, die nötig ist, um 50 % der infizierten Tiere zu heilen. [c] Methicillin- und mehrfach-resistent. [d] Penicillin- und cephalosporinresistent. [e] Vancomycinresistent; Versuche wurden an neutropenischen Mäusen ausgeführt. [f] Subkutane Infektionen des weichen Gewebes.

nicht aufgeführt). Von besonderer Bedeutung war, dass Linezolid gegen methicillin- und mehrfachresistente Stämme von *S. aureus* die gleiche In-vivo-Aktivität aufweist wie Vancomycin. Auch in dem ungewöhnlichen Bakteriämie-modell mit *Staphylococcus epidermidis* gleicht die Wirkung von Linezolid der von Vancomycin. Linezolid erfüllte somit unsere anfangs aufgestellten Kriterien hinsichtlich der In-vivo-Aktivität gegen Staphylococci und zeigte darüber hinaus hervorragende Wirksamkeit gegen penicillin- und cephalosporinresistente *Streptococcus pneumoniae* und einen *S. pyogenes*-Stamm (Tabelle 3). Infektionen mit mehreren *S. pneumoniae*-Stämmen unterschiedlicher Resistenzprofile konnten in vivo mit Linezolid behandelt werden, wobei die entsprechenden ED₅₀-Werte zwischen 3 und 10 mg kg⁻¹ lagen (Daten nicht aufgeführt). Vancomycin erwies sich im Bakteriämie-Modell von *Enterococcus faecalis* als numerisch potenter als Linezolid, dessen Aktivität in Anbetracht der oralen Verabreichung mit einem ED₅₀-Wert von 10 mg kg⁻¹ dennoch als hoch einzustufen ist. Ein derart potenter, oral verfügbarer Wirkstoff gegen Enterococci-Infektionen ist ungewöhnlich. Noch wichtiger erschien uns, dass Linezolid auch gegen vancomycinresistente *E. faecium*-Bakterien wirksam war (Tabelle 3), zumal die Studie an einem neutropenischen Mausmodell ausgeführt wurde, dessen Behandlung weitaus schwieriger ist als die eines normalen Mausmodells.

Drei weitere in Tabelle 3 aufgeführte In-vivo-Studien betreffen Infektionen weicher Gewebe mit subkutan lokalisierten Bakterien im Mausmodell. Der Behandlungserfolg wird in diesen Fällen durch mikrobiologische Bestimmung der Bakterienzahl im Infektionsgebiet am Ende der Therapie evaluiert. Alle drei Infektionstypen konnten therapiert

werden, sodass oral verabreichtes Linezolid nachweislich zu den Infektionsherden vordringen konnte. Gewebeinfektionen mit *S. aureus* wurden sowohl von Linezolid als auch von Vancomycin therapiert, und wenn-gleich beide Wirkstoffe unterschiedliche ED₅₀-Werte ergaben, lässt sich aus diesem Modell auf die Wirksamkeit beider Antibiotika schließen. Eine Gewebeinfektion mit dem wichtigen Erreger *E. faecalis* sprach sehr gut auf oral verabreichtes Linezolid an. Höchst interessant war die ausgezeichnete Wirkung von oral verabreichtem Linezolid bei Gewebeinfektionen mit dem anaeroben *Bacteroides fragilis*. Die besondere Bedeutung dieser Modelle liegt darin, dass ein Wirkstoff das tierische Gewebe durchdringen muss, um Infektionen effektiv zu therapieren. Dies gelingt Linezolid nicht nur in Konzentrationen, die ausreichen, um Bakterien wirkungsvoll abzutöten – es gelingt zudem nach oraler Verabreichung! Dieser und alle übrigen Befunde aus den In-vivo-Tests deuteten darauf hin, dass Linezolid bei einer Vielzahl von Infektionskrankheiten beim Menschen wirkungsvoll eingesetzt werden konnte.

Verschiedene andere Tiermodelle lieferten im Vorfeld oder im Verlauf klinischer Studien weitere Informationen zur Wirksamkeit von Linezolid. Im Rattenmodell der Streptococcenpneumonie^[42] war zweimal täglich in Dosen von je 50 mg kg⁻¹ verabreichtes Linezolid genauso potent wie Ceftriaxon, ein pharmakokinetisch verfeinertes Cephalosporin, das einmal täglich in einer Dosis von 100 mg kg⁻¹ verabreicht wurde. In einem Chinchillamodell der Mittelohrentzündung (Otitis media) tötete zweimal täglich in einer Dosis von je 25 mg kg⁻¹ verabreichtes Linezolid problemlos mehrfachresistente Bakterien von *S. pneumoniae*. Nicht wirksam war Linezolid allerdings gegen *H. influenzae* bei MIC-Werten von 8–16 $\mu\text{g mL}^{-1}$.^[43] Bei einer Dosis von 25 mg kg⁻¹ war Linezolid gegen ein intraperitoneales Abszess-Modell mit *E. faecium* schwach wirksam, während eine Dosis von 100 mg kg⁻¹ die Bakterienzahl im Abszess erheblich verminderte.^[44]

Von einem neuen, gegen Gram-positive Erreger aktiven Antibiotikum erhoffte sich die Medizin eine Wirkung gegen die durch Staphylococci verursachte Form der Endokarditis (Herzinnenhautentzündung), die zumeist lebensbedrohend und nur sehr schwer zu behandeln ist. Insbesondere interessierten sich unsere Abnehmer für eine mögliche Anwendung von oral zu verabreichendem Linezolid zur Behandlung von Endokarditis. Direkte Vergleichsstudien zu Linezolid und Vancomycin wurden an Kaninchenmodellen der durch antibiotikaempfindliche oder methicillinresistente Stämme von *S. aureus* verursachten Endokarditis ausgeführt.^[45,46] In einer ersten Studie konnten nach oraler Gabe von Linezolid in einer Dosis von 50 mg kg⁻¹ bei 50 % der infizierten Tiere in den Herzklappen keine Kulturen mehr nachgewiesen werden. Bei intravenös in einer Dosis von 25 mg kg⁻¹ verabreichtem

Vancomycin lag die Erfolgsquote bei 8/11. Bei positiven Tieren konnte am Ende der Linezolid- und der Vancomycin-Therapie eine Reduktion der Bakterienzahl im Blut von 2.3 CFU mL^{-1} (CFU = koloniebildende Bakterieneinheiten) auf 1.5 CFU mL^{-1} (jeweils logarithmierte Werte) beobachtet werden. Sowohl Vancomycin als auch Linezolid verminderten die Bakterienzahl der Herzklappenflora von 8.4 CFU g^{-1} auf 4.3 bzw. 4.0 CFU g^{-1} (logarithmierte Werte). Linezolid war in diesem sehr wichtigen Infektionsmodell ebenso wirksam wie Vancomycin, und seine orale Verabreichbarkeit zählte als entscheidendes Kriterium bei der Behandlung von Patienten im Hinblick auf Akzeptanz und Sicherheit. Als Schlüsselparame-ter dieser pharmakokinetischen Studie wurde der Befund identifiziert, dass bei solchen schwierig zu behandelnden Infektionen die Linezolid-Blutkonzentrationen auf dem Niveau des MIC_{90} -Wertes des entsprechenden Erregers oder darüber gehalten werden müssen. Gleiches wurde in nachfolgenden Studien zur Endokarditis mit methicillinresistenten *S. aureus* beobachtet,^[46] bei denen oral verabreichtes Linezolid erneut besser abschnitt als intravenöses Vancomycin. Aufgrund der Versuche am Tiermodell nahmen wir an, dass Linezolid bei der Behandlung humaner Endokarditis eine wichtige Rolle spielen und als Alternative zu Vancomycin bei der Bekämpfung der durch antibiotikaresistente *S. aureus* verursachten Endokarditis eingesetzt werden könnte.

3.3. Pharmakokinetisches und pharmakodynamisches Verhalten von Linezolid

Einer der Schlüsselparame-ter bei der Beurteilung anti-biotischer Wirkstoffe im Menschen ist der Blutspiegel. In klinischen Tests wurden nach oraler Gabe von 600 mg Linezolid – so gewählt auf Grundlage der Tierversuche – die entsprechenden Blutspiegel ermittelt.^[47] Die 600-mg-Dosis führte beim Menschen zu Mittelwerten der maximalen Serumkonzentration von ca. $19 \mu\text{g mL}^{-1}$, die 12 h nach Verabreichung auf durchschnittlich $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ gesunken waren. Anhand dieser Blutwerte konnte geschlossen werden, dass durch eine einmalige Dosierung von 600 mg Linezolid die Wirkstoffkonzentration im Blut den MIC_{90} -Wert gegen Staphylococcen, Streptococcen und Enterococcen übertreffen würde, ein Befund, der hinsichtlich einer Humantherapie mit Linezolid überaus vielversprechend war. Darüber hinaus konnte davon ausgegangen werden, dass Linezolid zweimal täglich in einem Intervall von ca. zwölf Stunden verabreicht werden konnte und somit einen klaren Vorteil gegenüber Medikamenten mit dreimal täglicher Dosierung besäße. Ein sehr erfreuliches, wenn auch recht ungewöhnliches Ergebnis dieser Studie war, dass oral verabreichtes Linezolid zu rechnerisch 103 % biologisch wirksam ist, d. h., die Fläche unter der Blutspiegelkurve nach oraler Gabe von Linezolid gleicht der Fläche nach intravenöser Gabe. Aus vorange-gangenen Tierversuchen lagen bereits Hinweise auf diesen Befund vor. Ein solches Verhalten ist extrem selten; es sagt aus, dass dem Patienten der Wirkstoff durch orale Einnahme in der gleichen Konzentration zur Verfügung steht wie nach einer intravenösen Verabreichung. In praktischer Hinsicht

bedeutet dies ferner, dass der Wirkstoff unabhängig von der Therapieform gleich dosiert werden kann, sodass die Dosis bei Umstellung von intravenöser auf orale Therapie nicht geändert werden muss.

In klinischen Studien und Tierversuchen konnten noch weitere wichtige pharmakokinetische Eigenschaften von Linezolid bestimmt werden. So wurde gezeigt, dass die Linezolid-Aufnahme durch Nahrung im Verdauungstrakt nicht beeinträchtigt wird und Linezolid daher sowohl mit Mahlzeiten als auch zu jedem anderen Zeitpunkt eingenommen werden kann.^[48] Wichtig ist außerdem, dass Linezolid nicht von Cytochrom P450 metabolisiert wird und keine der wesentlichen P450-Isoformen inhibiert.^[49] Eine Metabolisierung wird zwar durchaus beobachtet, aber es handelt sich um eine nichtenzymatische Oxidation, und die Metaboliten haben keinerlei antibakterielle Aktivität. Zwischen 8 und 8.5 % des Linezolid werden mit dem Urin ausgeschieden, 7 bis 12 % über den Darm.^[50] Linezolid zeigte somit ein gutes pharmakokinetisches Verhalten und sollte problemlos in der Therapie einsetzbar sein.

Da Linezolid der erste Vertreter der Oxazolidinone mit antibakteriellen Eigenschaften war, der an den Markt geführt werden sollte, wollten wir untersuchen, mit welchem phar-makodynamischen Parameter sich der Heilungserfolg mit Linezolid am ehesten voraussagen lässt. Solche Informatio-nen würden eine große Bedeutung für den Entwurf der klinischen Studien haben und unseren Abnehmern die Möglichkeit geben, das erwartete pharmakokinetische Ver-halten am Patienten mit dem pharmakodynamischen Schlüs-selparame-ter abzustimmen. Um Aufschluss zu erhalten, wurden die pharmakodynamischen Parameter bei einer Oberschenkelinfektion durch *S. aureus* im Mausmodell unter-sucht.^[51] Der Parameter, aus dem am ehesten auf einen Heilungserfolg geschlossen werden konnte, war die Zeit-spanne, während der der Wirkstoffblutspiegel oberhalb des für den Erreger charakteristischen MIC_{90} -Wertes lag. Wir fanden darüber hinaus, dass diese Zeitspanne mindestens 40–60 % des Dosierungsintervalls betragen sollte. Da eine Linezolid-Dosis von 600 mg im *gesamten* Dosierungsintervall zu Blutspiegelwerten oberhalb des MIC_{90} -Wertes führt, genügt diese Dosierung in mehr als ausreichendem Maße den Minimalanforderungen des pharmakodynamischen Modells.

4. Sonstige biologische Befunde

4.1. Mechanismus der antibakteriellen Wirkung von Linezolid

Ein Schlüsselcharakteristikum, das den Wirkstoff Line-zolid unserer Auffassung nach so außergewöhnlich attraktiv machte, war die Tatsache, dass Linezolid einer gänzlich neuen Klasse von Antibiotika angehörte, deren Aktivität nicht von bereits bestehenden bakteriellen Resistenzmechanismen beeinträchtigt wurde. Es war daher zum einen wichtig nachzuweisen, dass Linezolid tatsächlich über einen einzig-artigen Mechanismus wirkt, und zum anderen diesen Mecha-nismus aufzuklären. An Eperezolid ausgeführte Studien ergaben eindeutig, dass Eperezolid an die 50S-Untereinheit

des Ribosoms bindet und diese Bindung von der Dosis abhängt.^[52] Es wurde postuliert, dass der vorliegende Wirkmechanismus sich von den Mechanismen des Chloramphenicols und Lincomycins unterscheidet, die beide offenbar an Bindungsstellen in der Nähe der spezifischen Eperozolid-Bindungsstelle andocken. An einem zellfreien *E.-coli*-Proteinsyntheseassay konnte gezeigt werden, dass Linezolid in vitro die Phagen-spezifische Translation sowie die Terminierung und die Elongation der Polypeptidkette inhibiert.^[53] Aufbauend auf diesen Beobachtungen konnten wir zeigen, dass auch Linezolid an die ribosomale 50S-Untereinheit bindet und dadurch die Bildung eines funktionalen Initiationskomplexes der Proteinsynthese verhindert (Figure 6).^[54] Dieser Befund belegt, dass Linezolid einzigartig unter den Proteinsyntheseinhibitoren ist und erklärt auch, warum Linezolid gegen solche Gram-positiven Erreger antibakteriell wirksam bleibt, die resistent gegen andere Antibiotikaklassen sind.

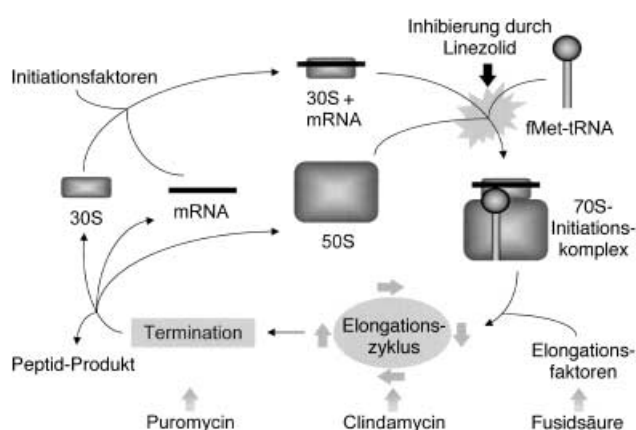


Abbildung 6. Wirkmechanismus von Linezolid.

4.2. Verteilung von Linezolid im Gewebe

Die In-vivo-Experimente am Mausmodell, mit denen nachgewiesen wurde, dass Linezolid einen mikrobiologischen Heilungseffekt bei Infektionen weicher Gewebe hat, belegen eindeutig, dass Linezolid in ausreichender Konzentration und über einen ausreichend langen Zeitraum vom Blutstrom in das Gewebe eintritt. Die Linezolidpenetranz aus dem Blut wurde mit einer direkteren, quantitativen Methode an der Ratte untersucht,^[55] wobei die qualitativ festgestellte gute Gewebedurchdringung bestätigt wurde. In den Versuchen wurde Ratten ¹⁴C-markiertes Linezolid intravenös in einer Dosis von 10 mg kg⁻¹ verabreicht. Nach zwanzig Minuten war Linezolid bei einem Gewebespiegel von 10.5 µg-Äquiv. g⁻¹ über die Gewebe des gesamten Körpers verteilt. In vielen Gewebearten konnte eine mindestens zweifache MIC₉₀-Konzentration gegen Staphylococci (8 µg mL⁻¹) nachgewiesen werden, darunter in Dick- und Dünndarm, Blase, Lymphknoten, Bauchspeicheldrüse, Milz, Knochenmark, Muskeln, Thymusdrüse, Schilddrüse, Herz, Lunge, Leber und Hypophyse. Die Linezolid-Konzentration in der Glaskörperflüssigkeit und im Hirn betrugen 14% der Blutspiegelwerte. Die einzigen Gewebearten, in die Linezolid bei dieser Dosierung nicht eindringen konnte, waren die Knochensubstanz und das

weiße Fett. Diese Befunde waren und sind von großer Bedeutung: Sie zeigen an, dass die Heilungsaussichten von Infektionen durch Gram-positive Bakterien bei Verabreichung von Linezolid sehr hoch sind – ganz gleich wo sich der Infektionsherd befindet. Da die meisten Infektionsherde beim Menschen nicht auf das Blut beschränkt sind, steht der Medizin mit Linezolid ein wirksames Präparat zur Bekämpfung solcher Infektionen zur Verfügung.

4.3. Bakteriostatische oder bakterizide Wirkung

Ein Antibiotikum wird als bakteriostatisch bezeichnet, wenn es während eines Zeitraums von 16 bis 24 h unter Standardbedingungen weniger als 3 log einer Bakterienkultur tötet. Bakterizid sind solche Wirkstoffe, die mehr als 3 log töten. Gemäß dieser Definition wurde Linezolid als bakteriostatisch gegen Staphylococci und Enterococci und als bakterizid gegen Pneumococci klassifiziert. Einer allgemeinen Faustregel zufolge sollen bakteriostatische Mittel bei besonders schweren Infektionen mit Gram-positiven Erregern, z.B. bei einer Endokarditis, und in lebensbedrohlichen Situationen nicht eingesetzt werden. Für diese Regel gibt es Ausnahmen, und wir fragten uns, ob Linezolid nicht eine davon sein könnte, da aus mehreren Versuchen hervorging, dass Linezolid bei Infektionen am Menschen seine antibiotische Wirkung ausgesprochen rasch entfaltet. Eine rasche Wirkung ist aber kein übliches Charakteristikum biostatischer Medikamente. Um dieser Frage nachzugehen, untersuchten wir die Wirkung von Linezolid auf die Toxinproduktion in *S. aureus* und *S. pyogenes*.^[56] Bei diesen In-vitro-Studien beschränkten wir uns auf Linezolid-Konzentrationen unterhalb des MIC-Wertes für den jeweiligen Organismus. Selbst bei Konzentrationen von 25 oder 50% des MIC-Wertes konnte Linezolid die α-Hämolysin-, δ-Hämolysin- und die Koagulase-Werte in Kulturen von *S. aureus* sowie die Streptolysin-O- und die DNAase-Werte in Kulturen von *S. pyogenes* deutlich reduzieren. So lag z.B. in Abwesenheit von Linezolid der α-Hämolysin-Titer einer *S.-aureus*-Kultur bei 512; durch Linezolid-Zusatz entsprechend 25% des MIC-Wertes (wobei die Zellen nicht abgetötet wurden) reduzierte sich der Titer auf 2. Obwohl Linezolid formal biostatisch wirkt, verhält es sich wegen der Reduzierung der Toxinproduktion in vivo unserer Einschätzung nach wie ein biozider Wirkstoff. Die Schnelligkeit, mit der Linezolid Bakterienzellen abtötet, ist daher weniger wichtig als die Tatsache, dass Linezolid die Toxinproduktion hemmt und dadurch die für das Krankheitsbild charakteristischen Gewebeschäden unterdrückt. Linezolid wirkt daher in vivo wie ein biozider Wirkstoff, obwohl es im Reagensglas ein eindeutig biostatisches Verhalten zeigt.

5. Zusammenfassung

Der seit zwanzig Jahren anhaltende Prozess der Resistenzentwicklung Gram-positiver pathogener Bakterien hat zu einem Bedarf an neuen Antibiotikaklassen geführt, deren Gebrauch nicht von bestehenden Resistenzen eingeschränkt

wird. Mit den Oxazolidinonen steht nun eine solche Verbindungskategorie mit einem grundlegend neuen Wirkmechanismus zur Verfügung, deren Aktivität durch bereits existierende Resistenzen Gram-positiver Erreger nicht beeinträchtigt wird, und die zudem oral verabreichbar sind. Zur Aufstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen haben wir klare biologische Zielvorgaben definiert, die sowohl die Wirkstoffaktivität in vitro und in vivo sowie pharmakokinetische Parameter umfassen. Erste medizinisch-chemische Versuche konzentrierten sich auf Modifikationen der Indanon- und Tetralon-Untereinheiten, und frühe Erfolge führten zur Fortsetzung des Programms. Ein wesentlicher Teil der Forschung betraf die Entwicklung enantiospezifischer Synthesen, die in der Folge weitere Untersuchungen an Piperazinyl-, Indolidinyl- und Troponylphenyloxazolidinonen ermöglichten. Die ersten Kandidaten für die klinische Testphase, Linezolid und Eperezolid, stammten aus der Gruppe der Piperazinyl-derivate, wobei Linezolid aufgrund des besseren pharmakokinetischen Verhaltens für die weitere Entwicklung ausgewählt wurde. In nachfolgenden klinischen Testphasen am Patienten bewährte sich Linezolid hervorragend und war mit den wirksamsten Antibiotika am Markt gleichwertig. Linezolid wurde im April 2000 in den USA und im Oktober 2001 in Deutschland zugelassen.

Eingegangen am 8. April 2002 [A528]

Übersetzt von Dr. Rüdiger Faust, London

- [1] B. E. Murray, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1987**, 36, 1791.
- [2] P. C. Applebaum, *Eur. J. Clin. Microbiol.* **1987**, 6, 367.
- [3] R. F. Brieman, *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **1994**, 271, 1831.
- [4] S. K. Spangler, M. R. Jacobs, P. C. Applebaum, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, 40, 481.
- [5] P. K. Ho, T.-L. Que, D. N.-C. Tsung, T.-K. Ng, K.-H. Chou, W.-H. Seto, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43, 1310.
- [6] C. Thornsberry, P. T. Ogilvie, H. P. Holley, Jr., D. F. Sahn, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43, 2612.
- [7] R. L. Thompson, R. P. Wenzel, *Ann. Intern. Med.* **1992**, 97, 925.
- [8] A. M. Slee, M. A. Wuonola, R. J. McRipley, I. Zajac, M. J. Zawada, P. T. Bartholomew, W. A. Gregory, M. Forbes, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1987**, 31, 1791.
- [9] A. L. Barry, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, 32, 150.
- [10] H. C. Neu, A. Novelli, G. Saha, N.-X. Chin, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, 32, 580.
- [11] J. S. Daly, G. M. Eliopoulos, E. Reiszner, R. C. Moerllinger, Jr., *J. Antimicrob. Chemother.* **1988**, 21, 721.
- [12] D. C. Eustice, P. A. Feldman, I. Zajac, A. M. Slee, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, 32, 1218.
- [13] A. M. Slee, M. A. Wuonola, R. J. McRipley, I. Zajac, M. J. Zawada, P. T. Bartholomew, W. A. Gregory, M. Forbes, *Abstr. Pap. 27th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (October 4–7, 1987, New York), **1987**, Abstract No. 244.
- [14] R. B. Fugitt, R. W. Luckenbaugh (DuPont), US4128654, **1978** [*Chem. Abstr.* **1978**, 90, 147009].
- [15] W. A. Gregory (DuPont), US4461773, **1984** [*Chem. Abstr.* **1984**, 101, 211126].
- [16] W. A. Gregory, D. R. Brittelli, C.-L. Wang, M. A. Wuonola, R. J. McRipley, D. C. Eustice, V. S. Eberly, P. T. Bartholomew, A. M. Slee, M. Forbes, *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 1673; siehe auch: B. Riedl, R. Endermann, *Expert Opin. Ther. Pat.* **1999**, 9, 625; M. Genin, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2000**, 10, 1.
- [17] C. H. Park, D. R. Brittelli, C.-L. Wang, F. D. Marsh, W. A. Gregory, M. A. Wuonola, R. J. McRipley, V. S. Eberly, A. M. Slee, M. Forbes, *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 1156.
- [18] S. J. Brickner (Upjohn), US5225565, **1993** [*Chem. Abstr.* **1990**, 113, 172009].
- [19] *Scrip* **1987**, 25, 1250; *Pharmaprojects* **1993** (June); *Pharmaprojects* **1995** (April 12); *Pharmcast-International* **1995** (February), 7-I-484, 7-I-487; *Adis R&D Insight* **1996** (December 1); *Adis R&D Insight* **1997** (April 24).
- [20] R. C. Piper, T. F. Platte, J. R. Palmer (Pharmacia Corporation), unveröffentlichte Ergebnisse.
- [21] S. J. Brickner (Upjohn), US5164510, **1992** [*Chem. Abstr.* **1990**, 113, 172004].
- [22] D. M. Gleave, S. J. Brickner, P. R. Manninen, D. A. Allwine, K. D. Lovasz, D. C. Rohrer, J. A. Tucker, G. E. Zurenko, C. W. Ford, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 1231.
- [23] S. J. Brickner, P. R. Manninen, D. A. Ulanowicz, K. D. Lovasz, D. C. Rohrer, *Abstr. Pap. 206th National Meeting of the American Chemical Society* (August 1993, Chicago), **1993**, ORGN089.
- [24] M. Reuman, S. J. Daum, B. Singh, S. A. Coughlin, D. M. Sedlock, J. B. Rake, G. Y. Leshner, *Abstr. Pap. 29th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (September 17–20, 1989, Houston), **1989**, Abstract No. 1193.
- [25] D. E. Nix, J. J. Schentag, *J. Clin. Pharmacol.* **1988**, 28, 169; D. T. W. Chu, P. B. Fernandes, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, 33, 131.
- [26] D. K. Hutchinson, M. R. Barbachyn, S. J. Brickner, R. B. Gam-mill, M. V. Patel (Upjohn), US 5547950, **1996** [*Chem. Abstr.* **1996**, 125, 221870].
- [27] M. R. Barbachyn, D. S. Toops, D. A. Ulanowicz, K. C. Grega, S. J. Brickner, C. W. Ford, G. E. Zurenko, J. C. Hamel, R. D. Schaadt, D. Stapert, B. H. Yagi, J. M. Buysse, W. F. Demyan, J. O. Kilburn, S. E. Glickman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 1003; M. R. Barbachyn, D. S. Toops, K. C. Grega, S. K. Hendges, C. W. Ford, G. E. Zurenko, J. C. Hamel, R. D. Schaadt, D. Stapert, B. H. Yagi, J. M. Buysse, W. F. Demyan, J. O. Kilburn, S. E. Glickman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 1009.
- [28] M. R. Barbachyn, S. J. Brickner, D. K. Hutchinson (Upjohn), US5688792, **1997** [*Chem. Abstr.* **1995**, 123, 256742]; S. J. Brickner, D. K. Hutchinson, M. R. Barbachyn, P. R. Manninen, D. A. Ulanowicz, S. A. Garmon, K. C. Grega, S. K. Hendges, D. S. Toops, C. W. Ford, G. E. Zurenko, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 673.
- [29] M. R. Barbachyn, D. K. Hutchinson, S. J. Brickner, M. H. Cynamon, J. O. Kilburn, S. P. Klemens, S. E. Glickman, K. C. Grega, S. K. Hendges, D. S. Toops, C. W. Ford, G. E. Zurenko, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 680.
- [30] B. A. Pearlman, W. R. Perrault, M. R. Barbachyn, P. R. Manninen, D. S. Toops, D. J. Houser, T. J. Fleck (Upjohn), US5837870, **1998** [*Chem. Abstr.* **1998**, 130, 25061].
- [31] G. E. Zurenko, B. H. Yagi, R. D. Schaadt, J. W. Allison, D. K. Hutchinson, M. R. Barbachyn, S. J. Brickner, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, 40, 839.
- [32] J. H. Jorgensen, M. L. McElmeel, C. W. Trippy, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41, 465.
- [33] G. W. Kaatz, S. M. Seo, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, 40, 799.
- [34] M. J. Rybak, D. M. Cappelletty, T. Moldovan, J. R. Aeschlimann, G. W. Kaatz, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42, 721.
- [35] L. Mulazimoglu, S. D. Drenning, V. L. Yu, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, 40, 2428.
- [36] C. Von Eiff, G. Peters, *J. Antimicrob. Chemother.* **1999**, 43, 569.
- [37] A. P. Johnson, M. Warner, D. M. Livermore, *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, 45, 225.
- [38] M. E. Jones, M. R. Visser, M. Klootwijk, P. Heisig, J. Verhoef, F. J. Schmitz, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43, 421.
- [39] G. H. Yagi, G. E. Zurenko, *Anaerobe* **1997**, 3, 301.

- [40] J. M. Buysse, W. F. Demyan, D. S. Dunyak, D. Stapert, J. C. Hamel, C. W. Ford, *Abstr. Pap. 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (September 15–18, 1996, New Orleans), **1996**.
- [41] C. W. Ford, J. C. Hamel, D. M. Wilson, J. K. Moerman, D. Stapert, R. J. Yancey, D. K. Hutchinson, M. R. Barbachyn, S. J. Brickner, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 1508.
- [42] N. J. Gentry-Nielsen, K. M. Olsen, L. C. Preheim, *Abstr. Pap. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (September 17–20, 2000, Toronto), **2000**.
- [43] S. I. Pelton, D. E. Piper, M. S. Rouse, J. M. Steckelberg, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 3438.
- [44] T. Schulin, T. C. Eliopoulos, R. C. Moellering, G. M. Eliopoulos, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 2873.
- [45] M. P. Oramas-Shirey, L. V. Buchanan, C. L. Dileto-Fang, C. F. Dailey, C. W. Ford, D. W. Batts, J. K. Gibson, *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *47*, 349.
- [46] C. F. Dailey, C. L. Dileto-Fang, L. V. Buchanan, M. P. Oramas-Shirey, D. H. Batts, C. W. Ford, J. K. Gibson, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2304.
- [47] M. R. Turner, A. Forrest, J. M. Hyatt, C. H. Ballow, D. J. Stalker, I. R. Welshman, J. J. Schentag, *Abstr. Pap. 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (September 24–27, 1998, San Diego), **1998**.
- [48] I. R. Welshman, D. J. Stalker, C. P. Wajszczuk, *Antinfect. Drugs Chemother.* **1998**, *16* (Abstracts, Suppl. 1).
- [49] L. C. Wienkers, M. A. Wynalda, K. L. Feenstra, P. Gao, J. G. Slatte, *Abstr. Pap. 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (September 26–29, 1999, San Francisco), **1999**.
- [50] K. L. Feenstra, J. G. Slatte, D. J. Stalker, K. S. Cathcart, M. T. Verburg, M. G. Johnson, B. E. Bothwell, M. D. Koets, G. M. Newcomb, G. W. Peng, R. P. Stryd, P. E. Fagerness, *Abstr. Pap. 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (September 1995, San Francisco), **1995**.
- [51] D. Andes, M. L. Van Ogtrop, W. A. Craig, *Abstr. Pap. 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (September 24–27, 1998, San Diego), **1998**.
- [52] A. H. Lin, R. W. Murray, T. J. Vidmar, K. R. Marotti, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 2127.
- [53] D. L. Shinabarger, K. R. Marotti, R. W. Murray, A. H. Lin, E. P. Melchior, S. M. Swaney, D. S. Dunyak, W. F. Demyan, J. M. Buysse, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 2132.
- [54] S. M. Swaney, H. Aoki, M. C. Ganoza, D. L. Shinabarger, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 3251.
- [55] K. Chiba, K. L. Feenstra, J. G. Slatte, P. T. Daley-Yates, J. N. Duncan, P. E. Fagerness, M. R. Howard, I. J. Martin, N. Ozawa, B. J. Passingham, H. G. Parks, G. W. Peng, R. J. Simmonds, W. Speed, D. Yallop, S. Yamazaki, *Abstr. Pap. 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (September 24–27, 1998, San Diego), **1998**.
- [56] C. G. Gemmell, C. W. Ford, *Abstr. Pap. 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (September 26–29, 1999, San Francisco), **1999**.