

# 8 Antibiotika

*Silke C. Wenzel und Rolf Müller*

<b>8.1</b>	<b>Mikrobielle Wirkstoffe gegen Infektionserkrankungen</b>	<b>150</b>
8.1.1	Vorkommen und Bedeutung	150
8.1.2	Biosynthese verschiedener Stoffklassen	151
<b>8.2</b>	<b>Biotechnische Produktion</b>	<b>152</b>
8.2.1	Produzentenstämme	152
8.2.2	Produktionsoptimierung	154
<b>8.3</b>	<b><math>\beta</math>-Lactame</b>	<b>155</b>
8.3.1	$\beta$ -Lactam-Biosynthese	157
8.3.2	$\beta$ -Lactam-Produktion	159
<b>8.4</b>	<b>Lipopeptide</b>	<b>160</b>
8.4.1	Lipopeptid-Biosynthese	162
8.4.2	Lipopeptid-Produktion	165
<b>8.5</b>	<b>Makrolide</b>	<b>165</b>
8.5.1	Makrolid-Biosynthese	166
8.5.2	Makrolid-Produktion	168
<b>8.6</b>	<b>Tetracycline</b>	<b>170</b>
8.6.1	Tetracyclin-Biosynthese	172
8.6.2	Tetracyclin-Produktion	172
<b>8.7</b>	<b>Aminoglykoside</b>	<b>173</b>
8.7.1	Aminoglykosid-Biosynthese	174
8.7.2	Aminoglykosid-Produktion	176
<b>8.8</b>	<b>Ausblick</b>	<b>177</b>

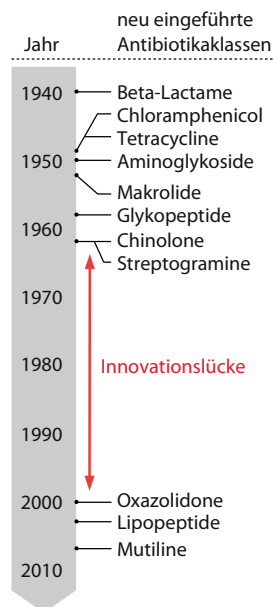
## 8.1 Mikrobielle Wirkstoffe gegen Infektionserkrankungen

Gegen viele Krankheiten haben wir trotz intensiver Suche auch heute noch keine wirksamen Medikamente. Hilfe bei diesen Problemen kommt aus der Erde: Im Boden lebende Mikroorganismen produzieren eine Vielzahl natürlicher Wirkstoffe und stellen so wichtige Quellen für die Entwicklung neuer Anti-Infektiva dar.

### 8.1.1 Vorkommen und Bedeutung

Antibiotika sind häufig von Pilzen oder Bakterien gebildete Wirkstoffe, welche andere Mikroorganismen am Wachstum hindern oder gar abtöten. Diese häufig aufgrund ihrer nicht essenziellen Funktion für den Produzenten als **Sekundärstoffe** bezeichneten Substanzen weisen einen prägenden Einfluss auf unseren Arzneimittelschatz auf. Speziell im Bereich der Antibiotika stellen Wirkstoffe aus Mikroorganismen und deren Derivate derzeit etwa 70 % der pharmazeutisch relevanten Verbindungen dar. Naturstoffe aus Mikroorganismen spielen nicht nur als Anti-Infektiva eine wichtige Rolle in der Medizin. Auch in der Tumorthherapie, als Cholesterolsenker oder als Immunsuppressiva werden sie häufig eingesetzt und haben deshalb auch bei diesen Anwendungen eine außerordentliche medizinische und wirtschaftliche Bedeutung.

Die Funktion der Sekundärstoffe für den Produzenten selbst ist auch heute noch weitgehend unbekannt. Man geht davon aus, dass diese Substanzen für das Wachstum nicht essenziell sind, den Produzenten aber unter gewissen Umweltbedingungen Vorteile in ihrem Lebensraum verschaffen. Neben der naheliegenden Vermutung, dass Antibiotika schlicht biologische Kampfstoffe gegen Nahrungskonkurrenten sind, gibt es diverse Theorien zur Bedeutung im natürlichen Umfeld. Man weiß seit einiger Zeit, dass Sekundärstoffe wichtige Rollen als Si-



**Abb. 8.1** Meilensteine der Antibiotikaforschung. Zwischen 1962 und 2000 wurden keine neuen Antibiotikaklassen durch die Pharmaindustrie in die Therapie eingeführt (modifiziert nach Walsh und Fischbach 2010)

gnalstoffe bei der mikrobiellen Kommunikation und auch im Wechselspiel mit anderen Organismen im natürlichen Umfeld spielen. Zudem sind Funktionen bei Entwicklungsprozessen, für die Eisenversorgung, als Radikalfänger oder auch bei der Regulation interner Prozesse beschrieben.

Mit der Entdeckung des Penicillins und des Streptomycins begann Mitte des vorigen Jahrhunderts die bislang produktivste Zeit der Antibiotikaforschung, in der die meisten der auch heute noch klinisch eingesetzten Substanzen identifiziert und für den Pharmamarkt entwickelt wurden. Die Wirkstoffe wurden aus Extrakten mikrobieller Reinkulturen gewonnen, welche auf die Gegenwart von antibiotisch wirkenden Naturstoffen hin überprüft wurden. Allerdings ist trotz der hervorragenden Erfolge der Antibiotikaentwicklung bis in die späten 1960er-Jahre festzustellen, dass seitdem kaum neue Wirkstoffe auf den Markt kommen, obwohl diese dringend benötigt werden („Innovationslücke“, [Abb. 8.1](#)). Aufgrund der erstaunlichen

Anpassungsfähigkeit der Mikroorganismen im Allgemeinen und somit auch der Infektionserreger sind **Resistenzentwicklungen** gegen Wirkstoffe keine Frage des „Ob“, sondern immer nur des „Wann“. Resistenzen folgen in der Regel drei allgemeinen Mechanismen, welche durch genetische Veränderungen hervorgerufen werden:

- Veränderung der Zielstruktur in der Zelle,
- Inaktivierung des Wirkstoffes,
- Austransport des Wirkstoffes aus der Zelle.

Aus diesen Gründen sollten fortlaufend Anstrengungen unternommen werden, um neue Antibiotika zu entwickeln. In den letzten Jahrzehnten wurden aber aufgrund ökonomischer Überlegungen in der Pharmaindustrie kaum Anti-Infektiva entwickelt. Prinzipiell wurden drei Ansätze zur Entwicklung neuer Wirkstoffe verfolgt: die Herstellung synthetischer Verbindungen, die medizinalchemische Modifikation bekannter Wirkstoffe und die Suche nach neuen Sekundärstoffen. Bis dato wurden allerdings durch chemische Synthese nur sehr wenige Antibiotika verfügbar. Schaut man auf die wenigen neuen Wirkstoffe, welche in den letzten Jahrzehnten Marktreife erlangten bzw. derzeit in der Entwicklungspipeline sind, so stellt man fest, dass Sekundärstoffe weiterhin größte Bedeutung haben: Nach wie vor sind die meisten Entwicklungen naturstoffbasiert (medizinalchemisch optimierte  $\beta$ -Lactam-Derivate oder Tetracycline) oder auch Sekundärstoffe selbst (Daptomycin; Echinocandine). Allerdings ist die Erschließung bislang wenig erforschter Quellen (Abschn. 8.2.1, Produzentenstämme) notwendig, da man in den altbekannten Produzentengruppen mittlerweile nur noch wenige neuartige Naturstoffe findet.

### 8.1.2 Biosynthese verschiedener Stoffklassen

Antibiotika werden als Produkte des Sekundärmetabolismus meist aus wenigen einfachen

Intermediaten des Primärstoffwechsels gebildet. Die Umwandlung und Verknüpfung dieser einfachen Vorstufen (Präkursoren) erfolgt über spezielle Biosynthesesequenzen, an denen meist eine Vielzahl verschiedener Enzyme beteiligt ist. Entsprechend den verwendeten Präkursoren lassen sich die Antibiotika in Hauptklassen einordnen:

- **Peptid-Antibiotika** (aus Aminosäuren),
- **Polyketid-Antibiotika** (aus kurzkettigen, aktivierten Carbonsäuren),
- **Glykosid-Antibiotika** (aus aktivierten Zuckerbausteinen).

Daneben gibt es Wirkstoffe, die aus der Terpenbiosynthese hervorgehen, vom Shikimatweg abgeleitet sind oder auch alkaloidartige Substanzen. Zudem lässt sich anhand bestimmter Strukturmerkmale eine weitere Subklassifizierung durchführen. So gibt es bei den Peptid-Antibiotika beispielsweise die Untergruppe der Lipopeptide (Peptidgrundgerüste modifiziert mit einem Fettsäurerest) oder der Glykopeptide (Peptidgrundgerüste modifiziert mit Zuckerbausteinen). Ähnlich kann man auch die Polyketid-Antibiotika anhand ihrer Struktur in Makrolide, Polyene, Polyether und aromatische Polyketide, zu denen auch die Tetracycline zählen, untergliedern.

Prinzipiell folgen die meisten mikrobiellen Biosynthesen grundsätzlich ähnlichen Mechanismen, die in den nächsten Abschnitten beispielhaft anhand von ausgewählten Wirkstoffen vorgestellt werden.  $\beta$ -Lactame und Lipopeptide werden durch **nicht-ribosomale Peptidsynthetasen** (NRPS) gebildet, während Tetracycline und Makrolide von verschiedenen **Polyketidsynthetasen** (PKS) hergestellt werden.

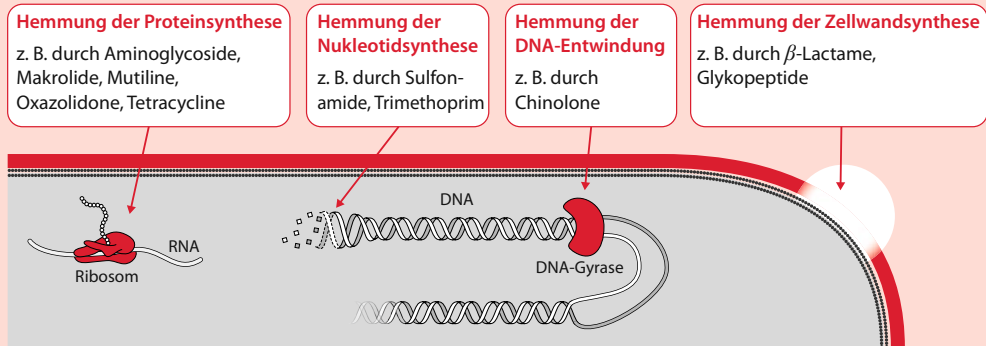
Üblicherweise findet sich in Bakterien (häufig auch in Pilzen) der komplette Satz an Genen, der für die Biosynthese eines Sekundärstoffes benötigt wird, innerhalb einer chromosomalen Region. Man spricht hier von einem **Biosynthese-Gencluster**. Vorteilhafterweise ergibt sich so die Identifizierung aller notwendigen Biosynthesegene, sobald ein einzelnes Gen aus der Biosynthese bekannt ist.

### Wirkweisen von Antibiotika

Als Antibiotika bezeichnet man im allgemeinen Sprachgebrauch antibakteriell wirkende Substanzen biologischen Ursprungs. Zusammen mit anderen Arzneistoffen gegen Infektionserkrankungen, die durch Protozoen, Pilze, Viren und Würmer hervorgerufen werden, bilden sie die Gruppe der Anti-Infektiva. Antibiotika können Bakterien abtöten (**Bakterizidie**) oder am Wach-

tum hindern (**Bakteriostase**). Diese Wirkungen kommen durch Interaktionen mit verschiedenen Angriffspunkten in der bakteriellen Zelle zustande. Grundsätzlich werden Antibiotika nach generellen **Wirkmechanismen** unterschieden, wobei die Biosynthese von Nukleinsäuren, die DNA-Synthese, die RNA-Synthese, die Proteinsynthese und die Zellwandsynthese als hauptsäch-

liche Angriffspunkte bekannt sind. In allen Fällen ist eine möglichst selektive Wirkung auf den Mikroorganismus erwünscht (Paul Ehrlich sprach von „Zauberkugeln“), ohne den Wirt zu schädigen. Dies ist bei den genannten Wirkmechanismen möglich, weil das adressierte Ziel entweder im Wirt nicht vorkommt (z. B. die Zellwand) oder dort strukturell grundsätzlich anders ist (z. B. Ribosomen).



Gängige Antibiotika beeinträchtigen wichtige Funktionen der Bakterienzelle, darunter den Aufbau der Zellwand, die Produktion von Proteinen und das Entwinden der DNA als Voraussetzung für deren Kopiervorgang. Erläutert sind hier Wirkmechanismen verschiedener Antibiotikaklassen

## 8.2 Biotechnische Produktion

Die meisten mikrobiellen Wirkstoffe weisen komplexe Strukturen auf, so dass eine chemische Synthese im technischen Maßstab oft unrentabel oder auch gar nicht möglich ist. Daher werden die Substanzen meist biotechnologisch durch Fermentation ihrer natürlichen Produzenten hergestellt.

### 8.2.1 Produzentenstämme

Im letzten Jahrhundert wurden hauptsächlich die meist im Boden lebenden **Actinomyceten**, einige **Pilze** und endosporenbildende **Bacillen** für die Sekundärstoffproduktion genutzt. Aus ihnen wurden die aktiven Substanzen isoliert, chemisch analysiert und dann für den Einsatz als Antibiotika entwickelt. In Tab. 8.1 sind einige durch industrielle Großfermentation hergestellte Antibiotika und die produzierenden Mikroorganismen aufgelistet. Weitere Pilzfamilien und einige andere Gruppen bakterieller Naturstoffproduzenten spielen heute eine wichtige Rolle für

**Tabelle 8.1** Beispiele für kommerziell produzierte Antibiotika

Antibiotikum	Produzierender Mikroorganismus
Amphotericin	<i>Streptomyces nodosus</i> (A)
Bacitracin	<i>Bacillus licheniformis</i> (EBB)
Cephalosporin	<i>Acremonium chrysogenum</i> (P)
Cycloheximid	<i>Streptomyces griseus</i> (A)
Erythromycin	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> (A)
Gentamycin	<i>Micromonospora purpurea</i> (A)
Griseofulvin	<i>Penicillium griseofulvin</i> (P)
Kanamycin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i> (A)
Neomycin	<i>Streptomyces fradiae</i> (A)
Nystatin	<i>Streptomyces noursei</i> (A)
Penicillin	<i>Penicillium chrysogenum</i> (P)
Polymyxin B	<i>Bacillus polymyxa</i> (EBB)
Rifamycin	<i>Streptomyces mediterranei</i> (A)
Streptomycin	<i>Streptomyces griseus</i> (A)
Tetracycline	<i>Streptomyces rimosus</i> (A)
Vancomycin	<i>Streptomyces orientalis</i> (A)

die **Wirkstoff-Findung**, wobei anzumerken ist, dass die Produzentengruppen fast alle in Habitaten vorkommen, die vielfältig besiedelt sind und somit Nahrungskonkurrenz bedingen. So wurden beispielsweise marine Mikroorganismen, Cyanobakterien, Myxobakterien, Pseudomonaden, Bacillen oder insektenpathogene Bakterien als zusätzliche Quellen für Wirkstoffe etabliert und spielen heute eine zunehmende Rolle. Bei quantitativer Betrachtung ist festzustellen, dass nach wie vor die meisten zugelassenen Antibiotika von Actinomyceten und Pilzen abstammen, wobei zu berücksichtigen ist, dass diese Produzentengruppen auch bei Weitem am längsten und

intensivsten beforscht wurden. Durchschnittlich dauert die Entwicklung eines Arzneistoffes von dessen Identifizierung bis zur Markteinführung mehr als zehn Jahre, sodass erst in Zukunft ausgehend von den erwähnten alternativen Quellen tatsächlich neue marktreife Arzneimittel erwartet werden können.

Generell beruht die Suche nach neuen Antibiotika auf **Screeningmethoden**, welche das Ziel der Identifizierung neuer Wirkstoffe haben, die im Idealfall neue Zielstrukturen im Pathogen adressieren und nicht toxisch für den Menschen sind. Dazu verwendet man verschiedene Vorgehensweisen; zum einen werden lebende Bakterienzellen daraufhin überprüft, ob neue Stoffe diese abtöten, am Wachstum hindern oder mit Infektionsprozessen interferieren. Alternativ werden vielversprechende Zielproteine (sogenannte „Targets“) in reiner Form dargestellt und Inhibitoren dazu gesucht. In beiden Fällen benötigt man zum Screening Substanzbibliotheken, welche rein chemischer Natur sein können oder Naturstoffe darstellen (Abschn. 8.1.1). Neue Produzentengruppen für Sekundärstoffe sind deshalb wichtig, weil in den intensiv untersuchten Actinomyceten und Pilzen immer häufiger Substanzen wiederentdeckt werden, was die Identifizierungsrate für wirklich neue Wirkstoffe und Wirkprinzipien herabsetzt. Ist ein Wirkstoff identifiziert, dann beginnt der lange Weg hin zur Anwendung als Antibiotikum. Die Erfolgsrate hierbei ist gering, da vielfältige Parameter wie die Stabilität im Blut und die Resistenzentwicklung zu berücksichtigen sind. Eine ausreichende Produktion stellt einen ersten wichtigen Schritt dar, der eine Entwicklung erst ermöglicht.

Da die mikrobiellen Stoffe häufig aus chemischer Sicht sehr komplex sind, ist auch heute die mikrobielle Produktion meist der einzig ökonomische Weg für eine Produktion. Allerdings sind die Ausbeuten mit den zunächst identifizierten Wirkstoffproduzenten (Wildstämme) in der Regel sehr gering, weil Mikroorganismen strikte Regulationsmechanismen verwenden, um die energetischen Kosten für die Herstellung der jeweiligen Substanz möglichst gering zu halten und

diese nur dann zu produzieren, wenn dem Organismus auch ein Nutzen durch den Sekundärstoff im natürlichen Habitat entsteht. Folglich ist das Ziel des Industriellen Mikrobiologen die Herstellung und Identifizierung von Mutanten, deren Regulation und Stoffwechsel derart verändert ist, dass größere Mengen an Wirkstoff produziert und im Idealfall direkt in das Medium als „Ausscheidungsprodukt“ abgegeben werden. Dazu erfolgt in der Regel zunächst eine Überprüfung von Stammsammlungen, die auf die Produktion der Zielstruktur hin durchmustert werden. Dadurch werden einige der zunächst „besten Produzenten“ identifiziert, mit denen die nachfolgende Produktionsoptimierung durchgeführt wird. Die gut etablierten Verfahren werden üblicherweise nicht mehr geändert, da damit neue Zulassungsprozesse und oft immense Kosten einhergehen würden. Detaillierte Information über die aktuellen Produktionsstämme und -prozesse sind leider meist kaum zugänglich, da die Hersteller durch deren Preisgabe Wettbewerbsnachteile befürchten.

## 8.2.2 Produktionsoptimierung

---

Die Optimierung der Produktion mikrobieller Sekundärstoffe war lange Jahre ein rein empirischer Prozess, in dem Kultivierungsbedingungen und Stämme durch langwierige Versuche hin zu verbesserten Ausbeuten verändert wurden. Gewöhnlich produzieren die Wildstämme (natürlichen Isolate) meist nur begrenzte Mengen des gewünschten Antibiotikums, in der Regel zwischen 0,1 und 20 mg/l. Daher entwickelten Industrie-Mikrobiologen neue **Hochleistungsstämme**, indem die anfängliche Kultur meist in mehreren Zyklen mutagenisiert wurde. Hierbei spielten ungerichtete Verfahren, wie UV-Strahlung oder Behandlung mit chemischen Agenzien, eine entscheidende Rolle, was auch als **klassische Stammoptimierung** bezeichnet wird. Zudem konnten durch Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Fermentationsparametern wie  $pO_2$ , pH und Nährstoffange-

bot auf die Antibiotika-Produktion mögliche Regulationsmechanismen erkannt und im Folgenden ausgenutzt werden. Beispielsweise war durch Umgehen von Feedback-Inhibitionen eine signifikante Steigerung von Ausbeuten bei der Erythromycin-Produktion möglich. Auch wurden limitierende Vorstufen der Antibiotika-Biosynthese dem Wachstumsmedium zugesetzt, was in vielen Fällen zu einer Produktionsverbesserung führte.

Durch die Entwicklung von gentechnischen Methoden wurden Mikroorganismen gezielt manipulierbar, sodass **gerichtete Stammoptimierungen** durchgeführt werden können. Allerdings setzte dies ein grundlegendes Verständnis der Antibiotika-Produktion und ihrer limitierenden Faktoren in der Wirtszelle voraus. Angriffspunkte zur Produktionsoptimierung ergaben sich auf verschiedenen Ebenen (DNA, RNA, Protein, Metabolit). So wurden beispielsweise zusätzliche Kopien wichtiger Gene in die Zelle eingeschleust, um so durch *multi-copy*-Effekte die Produktion zu erhöhen. Auch bot die genetische Manipulation regulatorischer Prozesse eine Möglichkeit, die Produktionstiter zu steigern, z. B. durch verstärkte Expression von Antibiotika-Biosynthesegenen. Zudem ermöglichte die Hochregulierung bestimmter Stoffwechselwege die vermehrte Bildung von Biosynthese-Vorstufen, sodass auf eine Zufütterung (wie zuvor beschrieben) verzichtet und so der Produktionsprozess verbilligt werden konnte. Es ist zu beachten, dass auch die Selbstresistenz des Produzenten bei gesteigerter Antibiotika-Produktion zu einem limitierenden Faktor werden kann. Dies kann durch Überexpression von Resistenzdeterminanten wie z. B. Efflux-Pumpen umgangen werden, die das Antibiotikum effizient aus der Zelle schleusen.

Die Stärken der gerichteten und meist molekularbiologischen Optimierung von Mikroorganismen zeigen sich in den letzten Jahren immer deutlicher, da neue Produkte nun vermehrt auf diesem Weg zur Marktreife gebracht werden. Das Produkt selbst kann durch solche Prozesse ebenfalls optimiert werden, da durch Modifikation der Biosynthesegene letztlich das

Molekül zielgerichtet verändert werden kann (■ Abb. 8.7). Parallel dazu erfolgen in der Regel Optimierungsprozesse, die auf der chemischen Modifikation der Sekundärstoffe beruhen und verbesserte therapeutische Eigenschaften wie Löslichkeit, Bindungseigenschaften und auch Plasmastabilität zum Ziel haben. Hier spielt die Medizinalchemie die herausragende Rolle, die durch Modifikationen und/oder Partialsynthesen die pharmazeutischen Eigenschaften des Moleküls optimiert.

## 8.3 $\beta$ -Lactame

Zu den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zählen Verbindungen, die einen  $\beta$ -Lactamring als gemeinsames Strukturmerkmal enthalten, der für ihre Wirkung verantwortlich ist. Der wohl bekannteste Vertreter dieser Stoffklasse ist das **Penicillin**, welches als erstes entdecktes Antibiotikum zum Einsatz kam und aufgrund seiner hervorragenden Wirkung berühmt geworden ist.

### Historie

Im Jahr 1928 machte Alexander Fleming die Beobachtung, dass Staphylokokken auf einer Agarplatte, die mit *Penicillium*-Pilzen kontaminiert war, in ihrem Wachstum gehemmt wurden (■ Abb. 1.6). Er reinigte den bakterientötenden Stoff aus dem Nährmedium der Pilzkultur auf und nannte ihn Penicillin. Etwa zehn Jahre später untersuchten H. W. Florey und E. B. Chain die therapeutische Wirkung von Penicillin am Menschen. Dadurch wurde die enorme Bedeutung der Antibiotika für die Therapie erkannt, was 1945 mit dem Nobelpreis für Medizin an Fleming, Florey und Chain gewürdigt wurde. Die Substanz wurde auch lange Zeit nach dem Zweiten Weltkrieg noch als Wundermedizin angesehen, da durch ihren Einsatz zum ersten Mal in der Geschichte Wundinfektionen behandelt werden konnten, welche sonst häufig – auch noch lange nach der eigentlichen Behandlung – zum Tod der Betroffenen führten. Da die Herstellung von Penicillin in der Anfangszeit noch sehr

mühsam war, wurde es sogar aus dem Urin der behandelten Personen zurückgewonnen. Nach der Entdeckung des Penicillins wurden noch eine Reihe weiterer Vertreter dieser Stoffklasse identifiziert, wie die **Cephalosporine** und die **Carbapeneme**.

### Wirkung und Anwendung

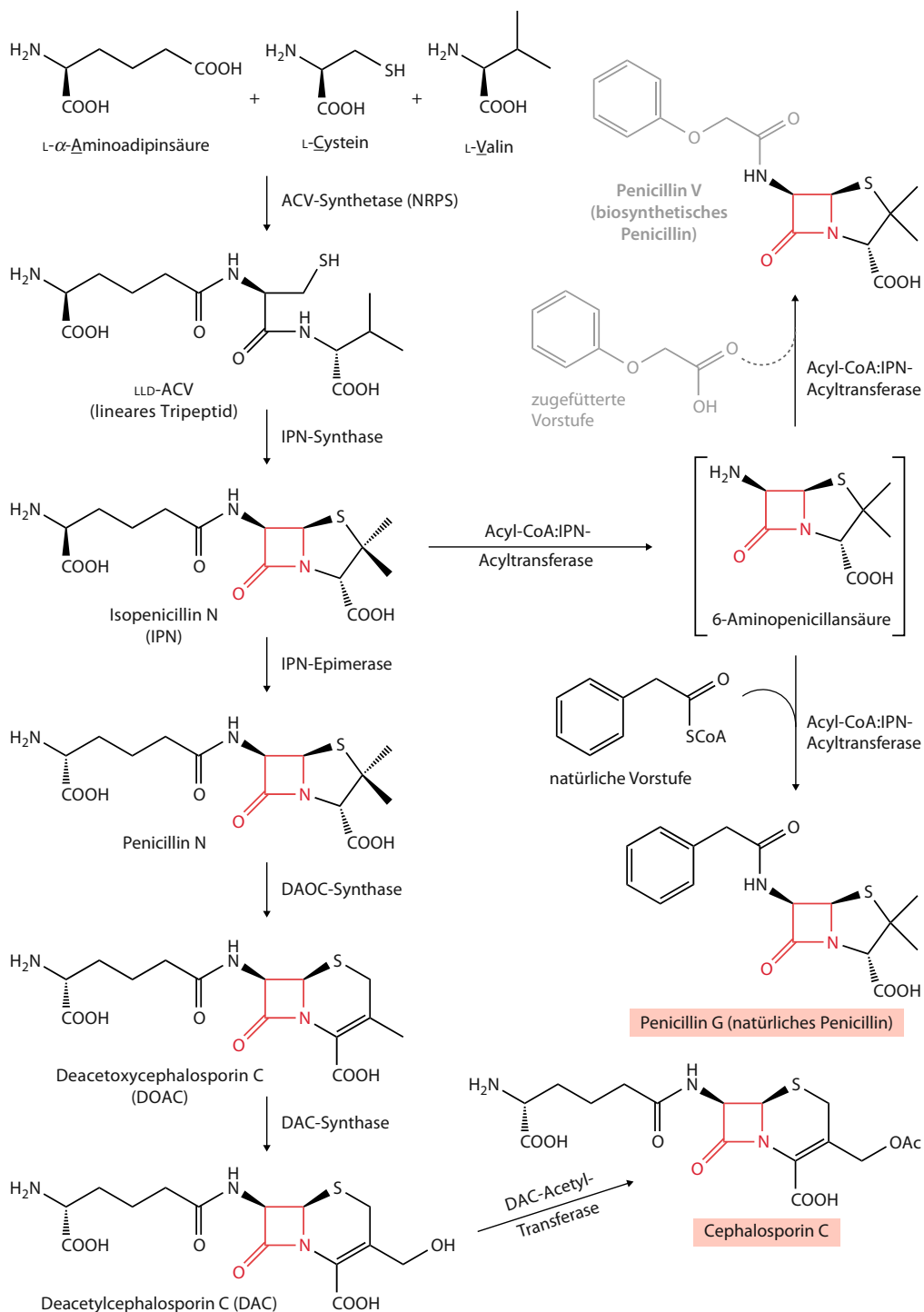
$\beta$ -Lactam-Antibiotika hemmen die bakterielle Zellwandsynthese, wodurch die Bakterien keine Schutzwand mehr aufbauen können und absterben. Bakterien können Resistenzen ausbilden, indem sie beispielsweise eine Lactamase ausscheiden, die den  $\beta$ -Lactamring spaltet. Dieser Resistenzmechanismus kann umgangen werden, indem das Antibiotikum zusammen mit einem Inhibitor der  $\beta$ -Lactamase verabreicht wird. Auch durch strukturelle Modifikation des  $\beta$ -Lactamrings kann die Spaltungsreaktion verhindert werden. Über semisynthetische Ansätze wurden so ausgehend von natürlich produzierten  $\beta$ -Lactamen durch Derivatisierung fortlaufend neue Antibiotika-Generationen hergestellt, um die immer wieder auftretenden Resistenzen zu umgehen.

$\beta$ -Lactam-Antibiotika haben ein breites Wirkungsspektrum, das je nach Verbindung von Gram-positiven bis hin zu Gram-negativen Erregern reicht. Sie werden zur Behandlung verschiedener Infektionskrankheiten eingesetzt und zählen mit großem Abstand zu den am meisten verordneten Antibiotika.  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sind nach wie vor Mittel der Wahl bei Infektionen mit Streptokokken einschließlich der Pneumokokken, die so unterschiedliche Erkrankungen wie eine Angina bis hin zur Hirnhaut- oder Herzklappenentzündung auslösen können.

### Wirtschaftlichkeit

Die Cephalosporine waren mit 11,9 Mrd. US-Dollar Umsatz im Jahr 2009 Spitzenreiter bei den Antibiotika, gefolgt von Breitspektrum-Penicillinen (7,9 Mrd. US-Dollar Umsatz). Zusammen mit weiteren  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (3,6 Mrd. US-Dollar Umsatz) betrug der Anteil dieser Stoffklasse am Antibiotikamarkt im Jahr 2009 etwa 56 %.





**Abb. 8.2** Biosynthese der  $\beta$ -Lactame Penicillin G und Cephalosporin C. Durch Zufütterung modifizierter Vorstufen können neue Derivate hergestellt werden, wie z. B. Penicillin V (Phenoxymethylpenicillin)



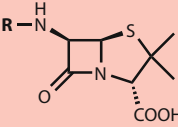
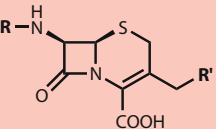
### 8.3.1 $\beta$ -Lactam-Biosynthese

Die Biosynthesen der bicyclischen  $\beta$ -Lactame Penicillin und Cephalosporin sind mittlerweile recht gut charakterisiert (■ Abb. 8.2). Alle natürlich vorkommenden Derivate werden ausgehend von drei Aminosäuren gebildet: L- $\alpha$ -Aminoadipinsäure, L-Cystein und L-Valin (ACV). Über einen nicht-ribosomalen Prozess werden die Vorläufer durch die ACV-Synthetase schrittweise zum linearen Tripeptid kondensiert. Anschließend erfolgt der oxidative Ringschluss zum bicyclischen System, katalysiert durch die Isopenicillin-N-Synthase. Dabei entsteht der viergliedrige  $\beta$ -Lactamring fusioniert mit einem fünfgliedrigen Thiazolidinring, welcher charakteristisch für alle Penicilline ist. Diese Zwischenstufe (Isopenicillin N, IPN) ist der Verzweigungspunkt in der Penicillin- und Cephalosporin-Biosynthese. Im finalen Schritt der Penicillin-Biosynthese wird die hydrophile Seitenkette des  $\beta$ -Lactamrings gegen hydrophobe Acyl-CoA-Derivate ausgetauscht, z. B. gegen Phenylacetyl-CoA zur Produktion von Penicillin G. Die zweistufige Acyltransferreaktion verläuft über die Zwischenstufe 6-Aminopenicillansäure und wird von einem bifunktionalen Enzym, der Acyl-CoA:IPN-Acyltransferase, katalysiert. Im weiteren Verlauf der Cephalosporin-Biosynthese wird zunächst das Stereozentrum der Isopenicillin-N-Seitenkette epimerisiert, wobei Penicillin N entsteht. Eine Expandase katalysiert höchstwahrscheinlich über einen radikalischen Mechanismus die Ringerweiterung zum Dihydrothiazinring. Durch anschließende Oxidation einer Methylgruppe zur Hydroxymethylgruppe und deren Acetylierung wird Cephalosporin C gebildet.

Die  $\beta$ -Lactam-Biosynthesegene sind in Bakterien und in Pilzen so organisiert, dass in der Regel alle notwendigen Gene in einem Abschnitt vorliegen (**Biosynthese-Gencluster**), wobei in Pilzen (wie für Eukaryoten üblich) die Gene einzeln transkribiert werden, während in Bakterien Operons vorliegen. In den bakteriellen Produzenten konnte ein spezifi-

scher Biosyntheseweg für den ungewöhnlichen Baustein L- $\alpha$ -Aminoadipinsäure identifiziert werden. Dieser wird in Pilzen über den Primärstoffwechsel ausgehend von  $\alpha$ -Ketoglutarat und Acetyl-CoA bereitgestellt. Die Aminoadipinsäure kann dann entweder in die  $\beta$ -Lactam-Biosynthese einfließen oder weiter zum Lysin metabolisiert werden. Es wurde festgestellt, dass in *Penicillium*-Stämmen die Antibiotika-Produktion durch Lysin gehemmt wird. Dies beruht auf einer starken Feedback-Hemmung der Homocitratsynthese, einem Zwischenprodukt auf dem Weg zur Aminoadipinsäure. Durch Zugabe von  $\alpha$ -Aminoadipinsäure zum Medium oder die Erzeugung von Lysin-auxotrophen Mutanten kann diese Hemmung umgangen bzw. aufgehoben werden. Eine andere Möglichkeit zur Steigerung der Antibiotika-Produktion ist die Vervielfältigung von Biosynthesegenen. So kann durch Einbringen einer zusätzlichen Kopie des Deacetoxycephalosporin-C-Synthase-Gens die Bildung von Cephalosporin C auf Kosten von Deacetoxycephalosporin C erhöht werden.

Die Mikroorganismen produzieren verschiedene Penicilline und Cephalosporine, die sich in der Struktur der Seitenketten (des N-Acylrestes) unterscheiden. Durch Zusatz unnatürlicher Vorstufen zu der Kulturbrühe können weitere neue Derivate hergestellt werden, die oft auch als **biosynthetische  $\beta$ -Lactame** bezeichnet werden. So wurde beispielsweise durch Fütterung von Phenoxycyessigsäure zu Fermentationskulturen von *P. chrysogenum* das natürlicherweise nicht vorkommende Phenoxymethylpenicillin (Penicillin V) produziert (■ Abb. 8.2). Dieses Verfahren wird auch als **Vorläufer-dirigierte Biosynthese** bezeichnet. Dabei stehen die zugesetzten, alternativen Präkursoren in Konkurrenz mit den natürlicherweise vorkommenden Substraten und es entsteht in der Regel ein Gemisch aus **natürlichen** und **biosynthetischen Penicillinen**. Allerdings akzeptieren die Biosyntheseproteine nicht jede beliebige Vorläufer-Carbonsäure, sodass die Strukturvariationsbreite bei diesem Verfahren beschränkt ist. Eine breitere Palette an neuen Derivaten lässt sich über chemische Modifikation des Penicillin-Grundgerüsts (6-

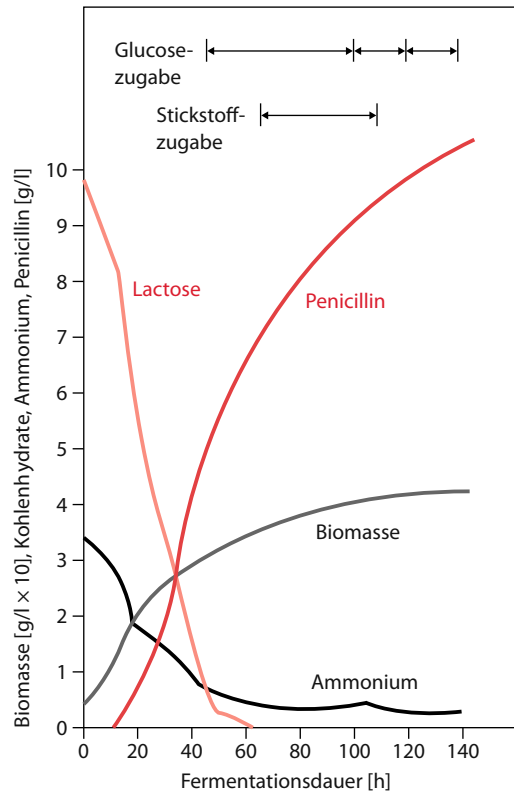
<p><b>■ Tabelle 8.2</b> Beispiele für natürliche, biosynthetische und semisynthetische Penicilline und Cephalosporine. Während der Cephalosporin-Biosynthese erfolgt keine Transacylierung, sodass ein Zusatz von Seitenkettenvorstufen nicht zu biosynthetischen Cephalosporin-Derivaten führt</p>			
Penicilline	 <p><b>Grundgerüst: 6-Aminopenicillansäure</b></p>		
	R		
natürliche Penicilline	Phenyl-CH <sub>2</sub> -CO-		Penicillin G
	H <sub>3</sub> C-CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CO-		Penicillin F
	H <sub>3</sub> C-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CO-		Penicillin K
biosynthetische Penicilline	Phenyl-O-CH <sub>2</sub> -CO-		Penicillin V
	CH <sub>2</sub> =CH-CH <sub>2</sub> -S-CH <sub>2</sub> -CO-		Penicillin O
semisynthetische Penicilline	Phenyl-CH(NH <sub>2</sub> )-CO-		Ampicillin
	4-OH-Phenyl-CH(NH <sub>2</sub> )-CO-		Amoxicillin
Cephalosporine	 <p><b>Grundgerüst: 7-Aminocephalosporansäure</b></p>		
	R	R'	
natürliche Cephalosporine	HO <sub>2</sub> C-CH(NH <sub>2</sub> )-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CO-	AcO-	Cephalosporin C
	HO <sub>2</sub> C-CH(NH <sub>2</sub> )-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -C(O)-	HO-	Deacetyl-cephalosporin C
semisynthetische Cephalosporine	4-OH-Phenyl-CH(NH <sub>2</sub> )-CO-	H-	Cefadroxil
	Phenyl-CH(NH <sub>2</sub> )-CO-	H-	Cephalexin
	Thiophen-CH <sub>2</sub> -CO-	AcO-	Cephalotin

Aminopenicillansäure) erzeugen. Hierbei wird zunächst ein Gemisch aus natürlichen Penicillinen aus der Kulturbrühe isoliert und die unterschiedlichen *N*-Acyl-Seitenketten anschließend enzymatisch abgespalten. Das hierfür benötigte Enzym, die Penicillin-Acylase, wird im technischen Maßstab rekombinant aus speziell gezüchteten *Escherichia coli*-Stämmen hergestellt. Die Deacylierung wird dann mit trägergebunde-

nem (immobilisiertem) Enzym durchgeführt. Die freie Aminogruppe der entstandenen 6-Aminopenicillansäure kann anschließend chemisch mit neuen Acylsubstituenten umgesetzt werden. Daraus resultierende Derivate werden als **halbsynthetische (semisynthetische) Penicilline** bezeichnet. Beispiele für natürliche, biosynthetische und halbsynthetische  $\beta$ -Lactame sind in ■ Tab. 8.2 aufgeführt.

### 8.3.2 $\beta$ -Lactam-Produktion

$\beta$ -Lactam-Antibiotika werden von Bakterien wie auch von Pilzen produziert. Zu den wichtigsten Penicillin-Produzenten zählen Pilze aus der Klasse der Ascomyceten (Schlauchpilze), insbesondere *Penicillium chrysogenum* (syn.: *Penicillium notatum*). Cephalosporine werden von verschiedenen *Streptomyces*-Arten (z. B. *S. lipmanii* sowie *S. clavuligerus*) und dem Pilz *Acremonium chrysogenum* (ehemals *Cephalosporium acremonium*) gebildet. Die Penicillin-Produktionstiter von *Penicillium chrysogenum* liegen mittlerweile bei über 70 g/l, die von Cephalosporin C mit *Acremonium chrysogenum* bei 30 g/l. Zur technischen Herstellung von Penicillin werden Hochleistungs-Produzentenstämme in bis zu 200 m<sup>3</sup> fassenden Bioreaktoren kultiviert. Der Fermentationsprozess beinhaltet in der Regel drei vorab geschaltete Animpfphasen, bevor der mehrtägige Produktionsprozess im Großmaßstab eingeleitet wird. Da es sich bei der Penicillin-Produktion um einen hoch-aeroben Prozess handelt, ist der Gehalt an gelöstem Sauerstoff in der Kulturbrühe insbesondere zu Wachstumsspitzen ein kritischer Parameter. Während der Wachstumsphase ist die Penicillin-Produktion gering, was für viele Sekundärstoffe typisch ist. Sie steigt in der stationären Phase stark an und wird durch kontinuierliche Zugabe von Nährstoffen (z. B. Glucose und Stickstoff) über mehrere Tage ausgedehnt (Fed-Batch-Verfahren; ■ Abb. 8.3). Die kontinuierliche Zuckerfütterung dient auch der Regulation des pH-Wertes, der während der Fermentation zwischen 6,4 und 6,8 liegt und wie die anderen Parameter (Temperatur, Sauerstoff-, Kohlendioxid- und Ammonium-Gehalt) eng überwacht und kontrolliert werden muss, um eine optimale und reproduzierbare Produktion sicherzustellen. Um die Fermentation besser zu steuern, werden meist auch Seitenkettenvorläufer der Nährlösung zugesetzt, sodass statt eines Gemisches nur ein erwünschtes Penicillin-Derivat produziert wird. Für die Penicillin-G-Produktion füttert man Phenyllessigsäure zu, im Fall von



■ **Abb. 8.3** Kinetik der Penicillin-Fermentation mit *Penicillium chrysogenum*. Während der Wachstumsphase wird sehr wenig Penicillin produziert. Die Penicillin-Produktionsphase beginnt, wenn die Zellen in die stationäre Phase eintreten, und kann durch Zugabe von Nährstoffen (Glucose, Stickstoff) über mehrere Tage ausgedehnt werden (modifiziert nach Brock (2003))

Penicillin V Phenoxycyessigsäure. Da Penicillin von dem Pilz ausgeschieden wird, muss es später aus dem Medium extrahiert werden. Hierzu werden die Zellen zunächst durch Filtration abgetrennt. Das Kulturfiltrat wird anschließend angesäuert und mit Amyl-, Butyl- oder Isobutylacetat extrahiert. Nach Anreicherung im Lösungsmittel wird das sauer extrahierte Penicillin in eine alkalische Lösung zurück extrahiert, wobei Verunreinigungen über Aktivkohle abgetrennt werden können. Durch Zusatz von Kaliumacetat kann das Antibiotikum schließlich ausgefällt und als kristallines Kaliumsalz isoliert werden.

**■ Tabelle 8.3** Fortschritte bei der Penicillin-Produktion (modifiziert nach Elander 2003)

Fermentation	1950	2000
Kohlenstoffquelle	Lactose	Glucose/ Saccharose
Verfahren	Batch	Fed-Batch
Medium- Sterilisation	Batch	Kontinuierlich
Zufütterungen	Keine	Viele
Morphologie	Filamentös	Pelletiert
Fermentationszeit	120 h	120–200 h
Tankvolumen [Kilogallonen]	10–20	20–60
Kontrolle	Nur Temperatur	Computer- basiert
Titer [g/l]	0,5–1,0	>40
Effizienz [%]	70–80	>90
Herstellungskosten [US-Dollar]	~ 275–350/kg	~ 15–20/kg

Durch den enormen Anstieg der Fermentations-Produktivitäten in den letzten Jahrzehnten sowie der Rückgewinnungs-Ausbeuten bei der Aufarbeitung konnten die Produktionskosten signifikant reduziert werden, wie bei dem Vergleich der Penicillin-Produktion im Jahr 1950 und 2000 ersichtlich wird (■ Tab. 8.3). Im Jahr 1950 musste noch mit etwa 300 US-Dollar pro kg Penicillin kalkuliert werden, 50 Jahre später lagen die Kosten bereits zwischen 10 und 20 US-Dollar pro kg. Die entscheidenden Schritte zur Produktionsoptimierung waren:

- erhöhte Ausbeuten durch Zusatz von Vorläufermolekülen zum Medium und die Bestimmung von optimalen Kultivierungsbedingungen (Medienzusammensetzung, pH-Wert, Kultivierungstemperatur, Belüftung und Dauer des Fermentationsprozesses);

- Herstellung und Selektion von Hochleistungsproduzenten durch ungerichtete Mutagenese über Röntgen- oder UV-Strahlung;
- Entwicklung von adäquaten industriellen Produktionsanlagen.

Ein Ende der Produktionssteigerung ist noch nicht in Sicht. Die kontinuierlichen Fortschritte auf dem Gebiet der Molekularbiologie und die Sequenzierung von ganzen Produzentengenomen haben die Basis für weitere, insbesondere gerichtete Optimierungen der Penicillin-Produktion geschaffen.

## 8.4 Lipopeptide

Lipopeptide gehören zur großen Klasse der niedermolekularen Peptide. Hierzu zählen beispielsweise auch das **Bacitracin**, welches aus elf Aminosäuren besteht und als Antibiotikum zur topischen Behandlung eingesetzt wird, oder die Glykopeptide, wie das Reserveantibiotikum **Vancomycin**. Während das Aminosäuregerüst von Glykopeptiden durch Zuckerketten modifiziert ist, tragen Lipopeptide stattdessen Fettsäurereste oder zumindest längere lipophile Seitenketten. Zu dieser Substanzklasse zählt auch das **Ciclosporin**, welches als Immunsuppressivum sehr große Bedeutung besitzt (Box „Ciclosporin“).

### Historie

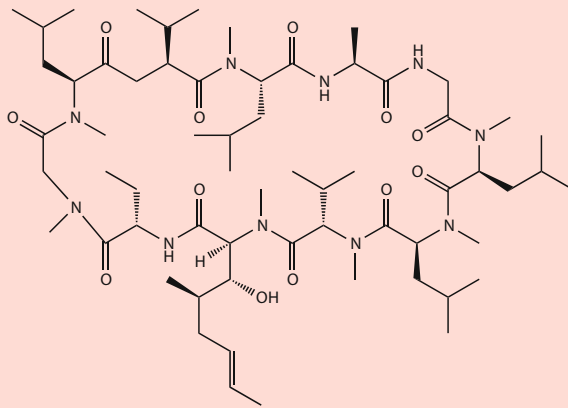
Zu den Lipopeptiden gehört ebenfalls das **Daptomycin**, der erste Vertreter der Lipopeptid-Antibiotika. Es handelt sich hierbei um eine der sehr wenigen neuen Substanzklassen, die nach einer 40-jährigen Innovationslücke der Antibiotikaforschung entwickelt wurden (■ Abb. 8.1). Der Produzentstamm, *Streptomyces roseosporus*, wurde aus einer Bodenprobe vom Berg Ararat (Türkei) isoliert. Er produziert eine Familie von Lipopeptid-Verbindungen (■ Abb. 8.4), von denen Daptomycin aufgrund seiner *in vivo*-Effizienz und geringen Toxizität in Tierversuchen für die weitere Entwicklung ausgewählt wurde. Das Antibiotikum wurde unter dem Handelsna-

## Ciclosporin

Ciclosporin ist ein cyclisches Lipopeptid aus elf Aminosäuren, welches aus dem Schlauchpilz *Tolypocladium inflatum* isoliert wurde. Der Arzneistoff inhibiert die Immunabwehr, indem das Enzym Calcineurin gehemmt wird, was wiederum zur Inhibition der Ausschüttung immunstimulierender Stoffe führt. Der Einsatz von Ciclosporin für die Therapie von Fremdgewebebedingten Abstoßungsreaktionen revolutionierte die Transplantationsmedizin mit Beginn der 1980er-Jahre, weil

die Überlebenszeit der Patienten signifikant erhöht werden konnte. Ohne den Einsatz des Medikamentes waren Transplantationen vorher im Prinzip erfolglos, sodass ohne derartige Arzneimittel heute selbstverständlich erscheinende Erfolge in diesem Bereich der Medizin undenkbar wären. Allein in den USA produzierten 2009 elf pharmazeutische Unternehmen auf biotechnischem Wege Arzneimittel mit Ciclosporin als aktivem Inhaltsstoff. Die weltweiten Umsätze werden mit mehreren

Milliarden US-Dollar angegeben. Ciclosporin-enthaltende Medikamente werden zudem bei Autoimmunerkrankungen wie der Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und schweren, therapieresistenten Formen der atopischen Dermatitis und Psoriasis eingesetzt. Interessanterweise gehören heute die Makrolide des Rapamycin-Typs neben Ciclosporin zu den erfolgreichsten Immunsuppressiva.



Struktur des Immunsuppressivums Ciclosporin A

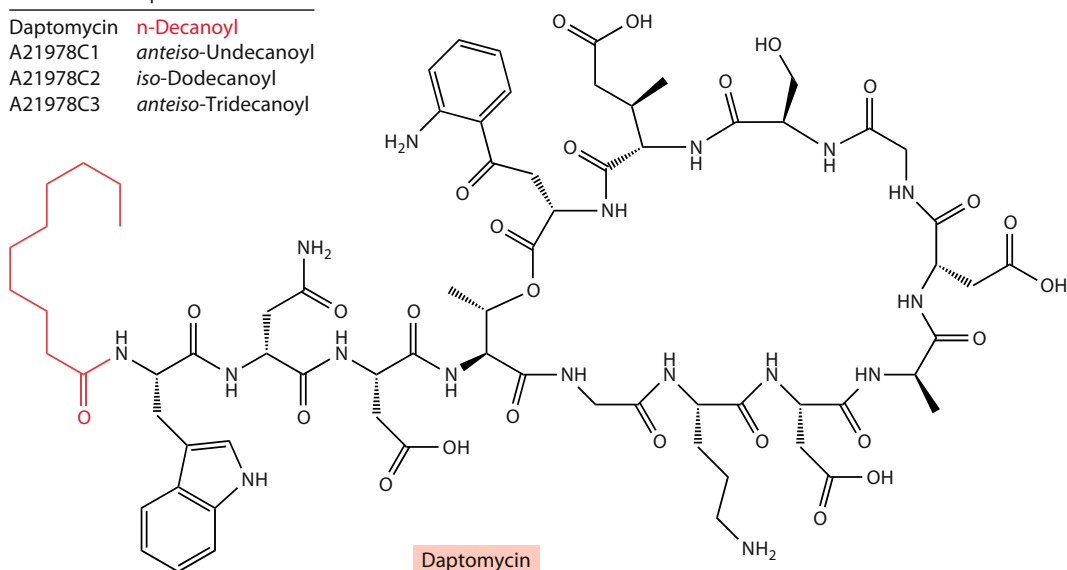
men Cubicin® von dem Pharmakonzern Cubist Pharmaceuticals im Jahr 2003 in den USA auf den Markt gebracht.

## Wirkung und Anwendung

Daptomycin unterscheidet sich in seiner Wirkweise von allen bisher zugelassenen Antibiotika. Es weist Effekte auf die Membran und die Zellwandbiosynthese auf und wirkt bakterizid.

Daptomycin stellt so eine Therapieoption bei Infektionen mit Gram-positiven Problemkeimen dar und wird in erster Linie bei Haut- und Weichteilinfektionen eingesetzt, wenn Reserveantibiotika wie Vancomycin nicht mehr wirksam sind. Andere Indikationen sind systemische Infektionen mit multiresistenten Staphylokokken.

Substanz	Lipidrest
Daptomycin	<b>n-Decanoyl</b>
A21978C1	<i>anteiso</i> -Undecanoyl
A21978C2	<i>iso</i> -Dodecanoyl
A21978C3	<i>anteiso</i> -Tridecanoyl



■ **Abb. 8.4** Daptomycin und andere A21978C-Lipopeptide. Die Naturstoffe unterscheiden sich nur in dem Lipidrest

## Wirtschaftlichkeit

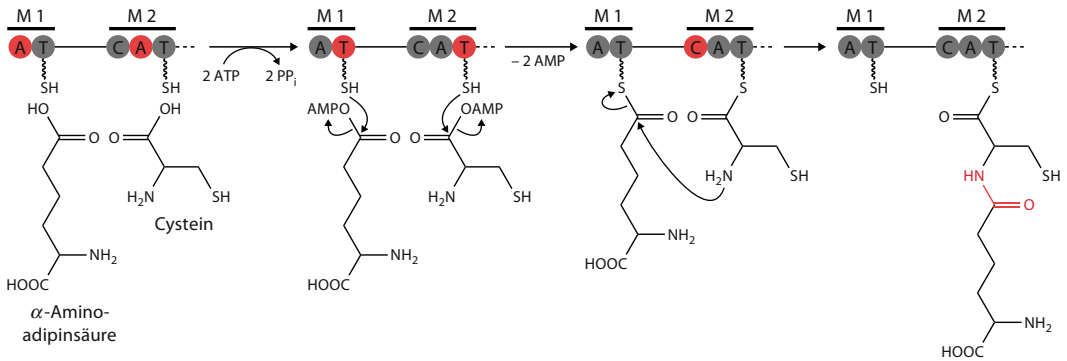
Der Arzneistoff war ökonomisch gesehen die erfolgreichste Markteinführung eines intravenös applizierten Antibiotikums in den USA und machte 2009 weltweit Umsätze von mehr als 400 Mill. US-Dollar.

### 8.4.1 Lipopeptid-Biosynthese

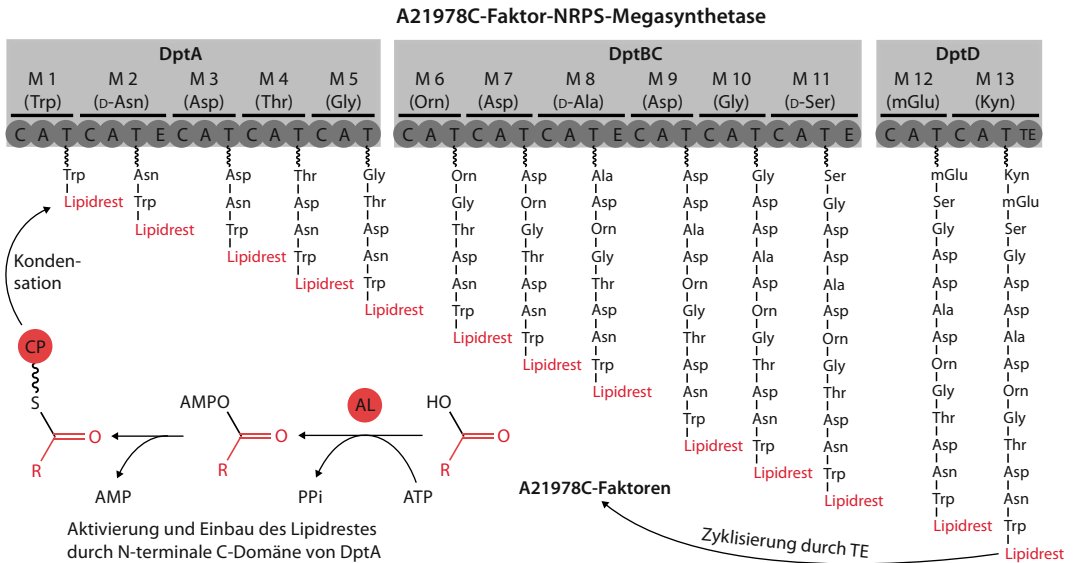
Peptidgrundgerüste werden in der Natur meist durch Verwendung der ribosomalen Biosynthese und anschließende posttranslationale Modifikation aufgebaut. Dies gilt beispielsweise für die antimikrobiellen Peptide, die fast ubiquitär in höheren Organismen vorkommen. Auch einige mikrobielle Sekundärstoffe wie der Konservierungsstoff Nisin werden auf diesem Wege gebildet. Die meisten der bekannten peptidischen Wirkstoffe aus Mikroorganismen, wie auch die  $\beta$ -Lactame (Abschn. 8.3) entstammen jedoch einer anderen und überaus komplexen Biosynthesemaschinerie, den **nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen** (NRPS). Diese multifunktionalen und multimodularen Enzymsysteme erlauben den

sequenziellen Aufbau von Peptidgrundgerüsten in einer Art von Fließbandmaschinerie, wobei alle Intermediate der Biosynthese immer enzymgebunden vorliegen (■ Abb. 8.5 und ■ Abb. 8.6). Die Vorläufer-Aminosäuren werden zunächst als Adenylate aktiviert und unter Bildung von Amidbindungen miteinander verknüpft. An diesem Vorgang sind Adenylierungsdomänen (A) zur Auswahl und Aktivierung der Einheiten, phosphopantetheinylierte Peptidyl-Carrier-Proteine (PCP) zur kovalenten Bindung der Intermediate sowie Kondensationsdomänen (C) zur Verknüpfung der Aminosäure-Bausteine beteiligt (■ Abb. 8.5). Dabei können neben den essenziellen Formen auch diverse ungewöhnliche Aminosäuren zunächst aufgebaut und dann in das Zielmolekül inkorporiert werden. So entstehen cyclische und lineare Peptidgerüste, welche durch modifizierende Enzyme weiter dekoriert werden können (Glykosyltransferasen, Acyltransferasen, Hydroxylasen und andere).


Die katalytischen Domänen, die für den Einbau einer bestimmten Aminosäure benötigt werden, sind zu sogenannten Modulen (M) zusammengefasst. In der Regel ist also jedes Modul für den Einbau einer bestimmten Aminosäure in



**Abb. 8.5** Schema zur Biochemie nicht-ribosomaler Peptidsynthetasen (NRPS) am Beispiel der  $\beta$ -Lactam-Biosynthese (erster Verlängerungszyklus). Nach Auswahl und Aktivierung der beiden Ausgangsaminosäuren durch die Adenylierungsdomänen (A) werden diese an die Peptidyl-Carrier-Protein-Domänen (T = PCP) gebunden. Die Kondensationsdomäne (C) verknüpft die beiden Bausteine unter Ausbildung einer Peptidbindung (rot markiert). M 1: Modul 1, M 2: Modul 2 der NRPS

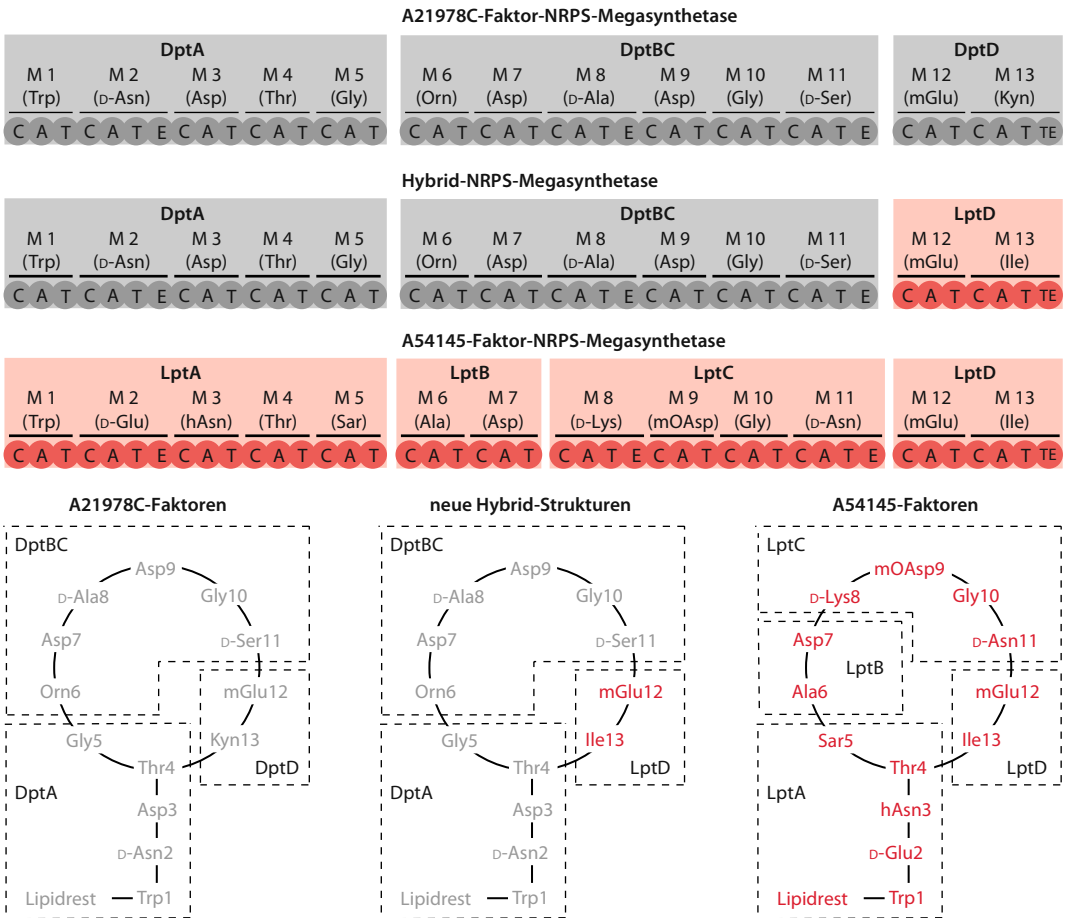


**Abb. 8.6** Biosynthese von Lipopeptiden der A21978C-Familie. Die Lipopeptidfamilie, der auch Daptomycin angehört, wird von einer NRPS-Megasyntetase synthetisiert, die aus drei Untereinheiten besteht (DptA, DptBC und DptD). Diese enthalten insgesamt 13 Module (M 1 bis M 13), die jeweils eine Aminosäure in die Peptidkette einbauen. Die *schwarzen Balken* kennzeichnen, welche katalytischen Domänen zu den jeweiligen Modulen gehören. Das letzte Modul enthält eine C-terminale TE-Domäne, welche die Peptidkette unter Cyclysierung vom Enzymkomplex abspalzt. C: Kondensationsdomäne, A: Adenylierungsdomäne, T = PCP: Peptidyl-Carrier-Protein, E: Epimerisierungsdomäne, TE: Thioesterase, AL: Acyl-CoA-Ligase, Orn: Ornithin, mGlu: Methylglutamat, Kyn: Kynurin

die wachsende Peptidkette verantwortlich. Die NRPS-Megasyntetase für die Biosynthese der A21978C-Faktoren, zu denen auch das Daptomycin zählt, besteht aus drei multimodularen Proteinen (DptA, DptBC und DptD;  Abb. 8.6).


Diese beinhalten insgesamt 13 Module (M 1 bis M 13) zum Aufbau des cyclischen Tridecapeptidgerüsts, welches auch drei D-konfigurierte Aminosäuren aufweist. Diese werden durch sogenannte Epimerisierungsdomänen (E) er-






**Abb. 8.7** Lipopeptid-Biokombinatorik. Kombiniert man NRPS-Untereinheiten der A21978C-Faktor-Megasyntetase (grau) mit Untereinheiten einer eng verwandten Lipopeptid-Megasyntetase (z. B. A54145-Faktor-Megasyntetase, rot) entsteht eine funktionale Hybrid-NRPS-Megasyntetase, die neue Peptidgrundgerüste (Hybrid-Strukturen) produziert. Im hier dargestellten Beispiel wurde das *dptD*-Gen des A21978C-Faktor-Biosyntheseweges gegen das *lptD*-Gen des A54145-Faktor-Biosyntheseweges ausgetauscht. C: Kondensationsdomäne, A: Adenylierungsdomäne, T = PCP: Peptidyl-Carrier-Protein, E: Epimerisierungsdomäne, TE: Thioesterase, Orn: Ornithin, mGlu: Methylglutamat, Kyn: Kynurin, hAsn: Hydroxyasparagin, Sar: Sarcosin, mOAsp: Methoxyasparaginsäure



zeugt, welche in den entsprechenden Modulen zusätzlich enthalten sind (M 2, 8 und 11). Die entstehenden Peptide werden hierdurch in der Regel wesentlich stabiler gegen Hydrolyse. Zudem enthält das Peptidgerüst die drei nicht proteinogenen L-Aminosäuren Ornithin, 3-Methylglutaminsäure (3-MeGlu) und Kynurin. Diese ungewöhnlichen Bausteine werden während der Biosynthese der Lipopeptide enzymatisch erzeugt oder auch als Vorstufen aus dem Zentralstoffwechsel des Produzenten gewonnen. 3-MeGlu wird beispielsweise von einer im Biosynthese-Gencluster codierten Methyltransferase gebildet, welche Glutaminsäure als Substrat verwendet. Deletiert man nun diese Methyltransferase, so entstehen beispielsweise Daptomycin-Derivate, welche keine 3-MeGlu-Einheit mehr enthalten. Der baukastenähnliche Aufbau der NRPS erlaubt die gezielte Veränderung von Biosynthesegenen mit dem Ziel der Produktion von abgewandelten Derivaten, welche bessere pharmazeutische Eigenschaften

als die Grundstruktur aufweisen können (Abschn. 8.4.2 und  Abb. 8.7).

## 8.4.2 Lipopeptid-Produktion

Daptomycin wurde ursprünglich als Teil eines Antibiotika-Komplexes (**A21978C-Faktor**) beschrieben, welcher von dem Actinomyce-ten *Streptomyces roseosporus* gebildet wird. Der Stamm produziert einen cyclischen Lipopeptid-Komplex, der sich aus mehreren Lipopeptiden mit unterschiedlichen Acyl-Seitenketten zusammensetzt ( Abb. 8.4). Diese Seitenketten können von einer Deacylase aus *Actinoplanes utahensis* enzymatisch abgespalten werden, um so das undekorierte Tridecapeptidgerüst herzustellen. In einem chemischen Modifikationsprogramm wurde dieses wieder mit verschiedenen Seitenketten reacyliert und die biologische Aktivität der hergestellten Derivate analysiert. Dabei zeigte die Verbindung mit einem Decanoylrest (die später Daptomycin genannt wurde) das beste Verhältnis von Wirksamkeit und Toxizität. Die enzymatische Deacylierung, gekoppelt mit anschließender chemischer Reacylierung mit Decansäure war allerdings mit hohen Kosten verbunden. Deshalb wurde ein biotechnischer Prozess entwickelt, bei dem Decansäure während der Fermentation zugefüttert wird (**Vorläufer-dirigierte Biosynthese**), um Daptomycin als Hauptkomponente zu produzieren. Der Prozess ist im Vergleich zu anderen langjährig optimierten Antibiotika-Produktionen noch weit entfernt von idealen Ausbeuten, was sich in derzeit angegebenen Produktionsmengen von etwa 0,5 g/l widerspiegelt.

Die Inaktivierung von Daptomycin durch Surfactant auf den Alveolen der Lunge ist ein wesentlicher Nachteil der Substanz, die daher trotz ausgezeichneter Aktivität gegen *Streptococcus pneumoniae* kaum bei Lungenentzündung (Pneumonie) eingesetzt werden kann. Eine verbesserte Aktivität könnte durch die Herstellung neuer Daptomycin-Derivate erreicht werden (strukturelle Optimierung des Daptomycinge-

rüstes). Aufgrund seiner sehr komplexen Struktur sind die Möglichkeiten der Daptomycin-Optimierung via Medizinalchemie in erster Linie auf Modifikationen der Lipid-Seitenkette und auf die  $\delta$ -Aminogruppe der Ornithin-Einheit beschränkt. Da Daptomycin biosynthetisch über einen fließbandartigen NRPS-Mechanismus gebildet wird, stellt das genetische Engineering der beteiligten Megasyntetasen einen attraktiven Ansatz zur Herstellung weiterer Derivate für biologische Studien dar ( Abb. 8.7). Hierzu gibt es bereits erste Erfolge zu verzeichnen. Das in Abschn. 8.4.1 geschilderte umfassende Verständnis zur Daptomycin-Biosynthese war die Grundlage für solche Experimente, mit deren Hilfe bereits eine Vielzahl von genetisch modifizierten Daptomycinen hergestellt wurde. Dabei wurden unter anderem die Daptomycin-Biosynthesegene mit Genen aus der Biogenese strukturell ähnlicher Lipopeptide vermischt, was aufgrund der Modularität von NRPS Erfolg versprechend ist ( Abb. 8.7). Einige der dabei gebildeten Hybrid-Naturstoffe weisen hohe Aktivitäten bei geringer Toxizität auf, sind wirksam gegen *S. pneumoniae* und werden von Surfactant kaum in ihrer Wirkung beeinflusst. Deren Produktion gelang sowohl nach genetischer Modifikation in *Streptomyces fradiae* als auch nach Transfer aller Biosynthesegene in den heterologen Wirt *Streptomyces ambofaciens*, wobei Produktionstiter von fast 400 mg/l erreicht wurden, was derzeit fast denen des optimierten Daptomycin-Produzenten entspricht. Diese Arbeiten zeigen das Potenzial der Methoden der **kombinatorischen Biosynthese** auf, allerdings muss die Zukunft weisen, ob die so hergestellten „unnatürlichen Naturstoffe“ auch Anwendung als Arzneistoffe finden werden.

## 8.5 Makrolide

Makrolid-Antibiotika gehören in der Regel zur Stoffklasse der Polyketide und bestehen aus großgliedrigen (z. B. 12-, 14- oder 16-gliedrigen) cyclischen Lactonringen. Diese sind häufig noch

mit Zuckern dekoriert, was für ihre Wirkung meist essenziell ist.

## Historie

Der älteste zugelassene Vertreter dieser Stoffklasse ist **Erythromycin**. Der Produzentenstamm *Saccharopolyspora erythraea* wurde aus einer philippinischen Bodenprobe isoliert. 1952 brachte das amerikanische Pharmaunternehmen Eli Lilly das Antibiotikum unter dem Namen Ilosone® auf den Markt. Der Naturstoff wurde anschließend durch Medizinalchemie dahingehend weiter optimiert, dass säurestabile und damit magensaftresistente Derivate verfügbar wurden. Weitere wichtige Vertreter dieser Stoffklasse sind Oleandomycin, Leucomycin, Spiramycin und Tylosin, die ebenfalls aus Actinomyceten-Stämmen isoliert wurden.

## Wirkung und Anwendung

Makrolid-Antibiotika binden reversibel an die 50S-Untereinheit der Ribosomen und hemmen so die Translokation in der Elongationsphase. Gezielte medizinalchemische Veränderungen führten dazu, dass die Arzneistoffe auch beim Auftreten von Resistenzmutationen an der 50S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms wirksam bleiben (z. B. Clarithromycin, Telithromycin).

Makrolide sind sehr gut verträglich und kommen insbesondere dann zum Einsatz, wenn gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika Allergien und Resistenzen auftreten. Die antimikrobiellen Wirkungsspektren der Makrolid-Antibiotika, die gegen viele Gram-negative und Gram-positive Keime wirken, sind sich sehr ähnlich. Sie werden breit eingesetzt für die Behandlung von zwei häufigen bakteriellen Infektionen, denen des Atem- und des Harntraktes. Darüber hinaus wird das Makrolid-Antibiotikum Tylosin in einigen Ländern zur Nahrungsmittelkonservierung eingesetzt, in Deutschland sind solche Anwendungen aber grundsätzlich verboten. Ebenso verboten ist mittlerweile der Einsatz von Antibiotika als Tierfutterzusatz, wofür insbesondere die Makrolid-Antibiotika Erythromycin und Oleandomycin angewandt wurden.

## Wirtschaftlichkeit

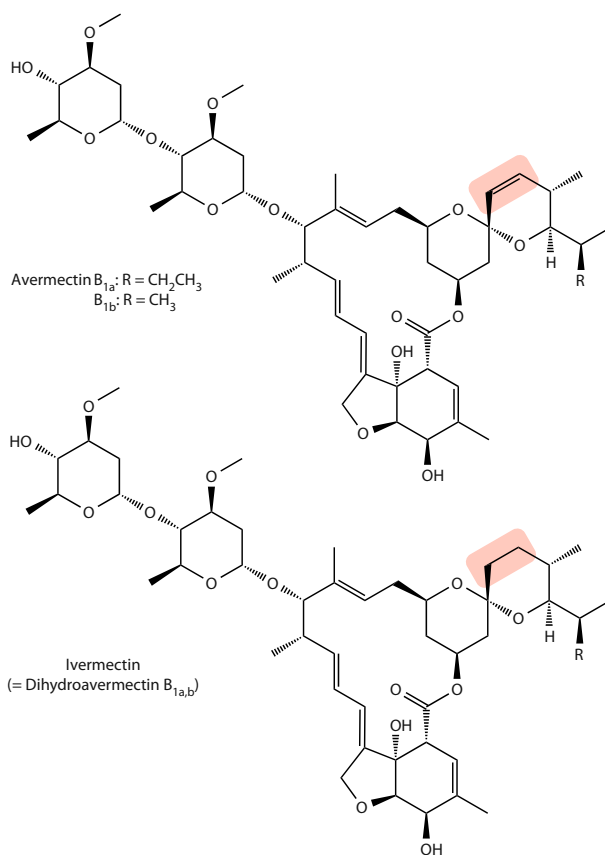
Mit einem jährlichen Umsatz von 4,8 Mrd. US-Dollar machten Makrolide etwa 11 % des Antibiotikamarktes im Jahr 2009 aus.

Zu den Makrolidwirkstoffen gehören außerdem die Antimykotika Nystatin und Amphotericin sowie die Antiparasitika vom Typ des **Avermectins**, welche zunächst aufgrund ihrer hervorragenden Wirkung gegen Würmer in der Tiermedizin Verwendung fanden (■ Abb. 8.8). Merck und Co. Inc. entwickelten Derivate des Avermectins gegen die Flussblindheit (Onchozerkose), welche in Afrika Millionen Menschen betrifft. Bereits eine Einmaldosis des lang wirkenden und durch Vorstufen-dirigierte Biosynthese mit *Streptomyces avermitilis* gewonnenen Ivermectins reicht als Behandlung aus, allerdings konnte sie sich in den betroffenen Ländern kaum jemand leisten. 1987 entschied sich die Firma, das Arzneimittel überall wo nötig kostenfrei abzugeben, was mittlerweile von der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) und der Weltbank unterstützt wird. 2001 kalkulierte man 16 Mill. Kinder, denen durch dieses Vorgehen eine Infektion erspart blieb, und etwa 600 000 Fälle von Erblindung als Folge der Onchozerkose, die verhindert werden konnten. Im Jahr 2020 hofft man eine Ausrottung der Erkrankung erreichen zu können. Der enorme Erfolg des Wirkstoffes Ivermectin und seine Entwicklung sowie sein weit verbreiteter Einsatz als Arzneimittel gegen Tropenkrankheiten war nur durch Profitverzicht des Herstellers möglich. Dieses außergewöhnliche Beispiel zeigt, dass für weit verbreitete Infektionserkrankungen in weniger entwickelten Ländern durchaus Therapieoptionen darstellbar sind, wenn kommerzielle Überlegungen in den Hintergrund treten.

### 8.5.1 Makrolid-Biosynthese

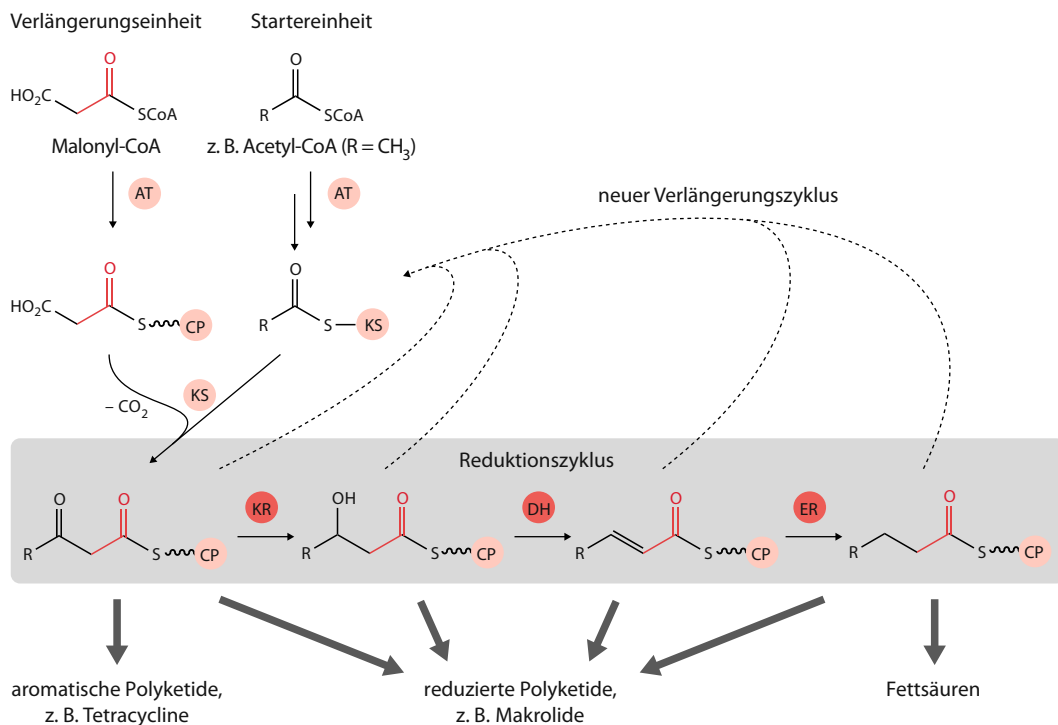
Makrolid-Antibiotika werden von Polyketidsynthasen (PKS) aus aktivierten, kurzkettigen Carbonsäuren hergestellt. Die Biosynthese von Polyketiden verläuft sehr ähnlich zur Fettsäure-

■ **Abb. 8.8** Strukturen von Avermectin und des pharmazeutisch eingesetzten Wirkstoffs Ivermectin



biosynthese an einem hochmolekularen Enzymkomplex. Durch wiederholte decarboxylierende Claisen-Esterkondensationen wird eine aktivierte Acyl-Startereinheit (z. B. Acetyl-CoA) mit Malonyl-CoA-Verlängerungseinheiten oder davon abgeleiteten Derivaten verknüpft. An diesem Vorgang sind Acyltransferasen (AT) zur Auswahl der Einheiten, phosphopantetheinylierte Acyl-Carrier-Proteine (ACP) zur kovalenten Bindung der Intermediate an die Biosyntheseenzyme sowie Ketosynthasen (KS) beteiligt, welche die Bausteine miteinander kondensieren. Nach jedem Kettenverlängerungszyklus kann die gebildete  $\beta$ -Oxofunktion durch Ketoreduktasen (KR), Dehydratasen (DH) und Enoylreduktasen (ER) weiter umgesetzt werden (■ Abb. 8.9). Während bei der Fettsäurebiosynthese dieser Zyklus immer vollständig durchlaufen wird, sind die Reduktionsschritte bei der Polyketidbiosynthese optional. Sie können vor

der nächsten Verlängerungsrunde teilweise oder vollständig ausgelassen werden, sodass teilweise Keto-, Alkohol-, Olefin- bzw. Methyleneinheiten erhalten bleiben. Dabei entstehen die klassischen reduzierten, meist cyclischen Polyketide, worunter auch die Makrolid-Antibiotika fallen. Als Verlängerungseinheiten können hier neben Malonyl-CoA auch noch weitere Vorläufer, wie beispielsweise Methylmalonyl-CoA oder Hydroxymalonyl-CoA dienen. Die am intensivsten erforschte Makrolid-Biosynthese ist die des Erythromycins, dessen 14-gliedriger Lactonring aus sieben Polyketid-Einheiten (einmal Propionyl-CoA und sechsmal Methylmalonyl-CoA) in einer Art Fließbandmechanismus aufgebaut wird (■ Abb. 8.10). Wie für Makrolid-Biosynthesekomplexe üblich, sind alle für einen bestimmten Verlängerungszyklus benötigten Enzymaktivitäten, auch katalytische Domänen genannt, zu einzelnen Modulen gebündelt. In



**Abb. 8.9** Schema zur Fettsäure- und Polyketid-Biosynthese. AT: Acyltransferase, KS: Ketosynthase, ACP (= CP): Acyl-Carrier-Protein, KR: Ketoreduktase, DH: Dehydratase, ER: Enoylreduktase

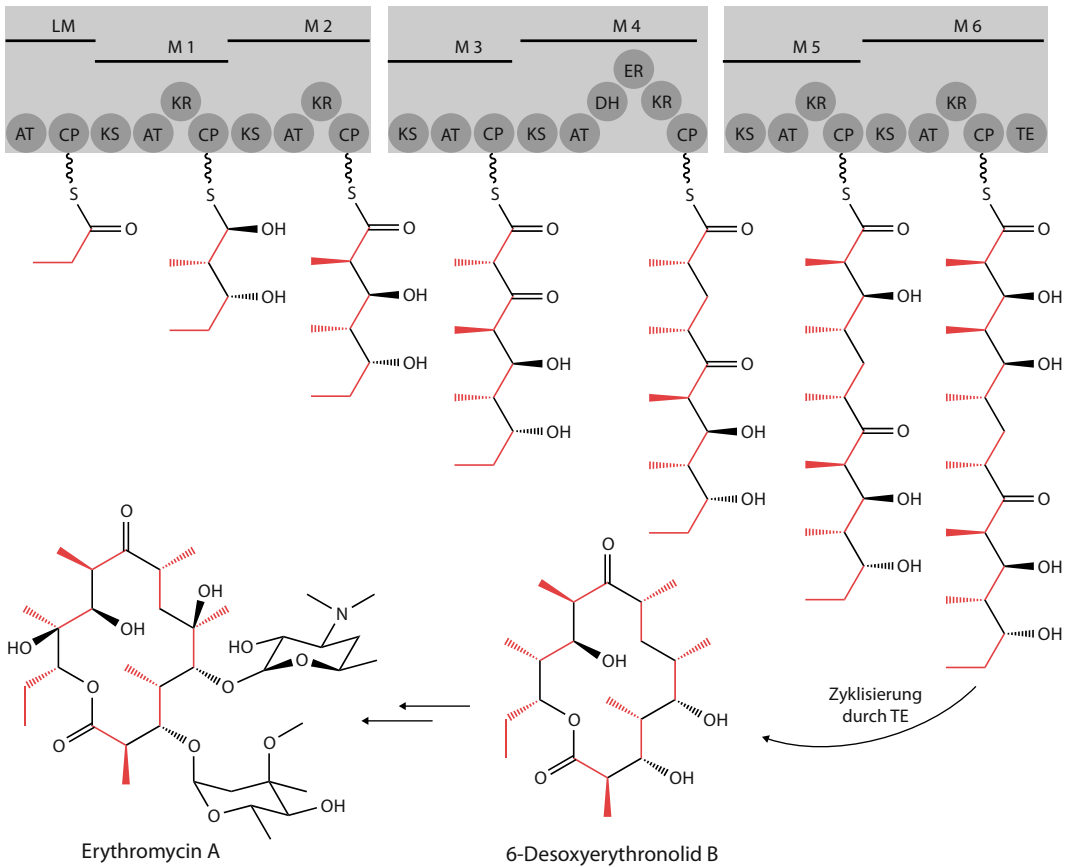
der Regel ist jedes Modul für den Einbau und gegebenenfalls die weitere Modifikation einer bestimmten Verlängerungseinheit verantwortlich. Im Verlauf der Biosynthese sind alle Intermediate fortwährend kovalent über die ACP-Domänen an den Enzymkomplex gebunden. Nach Fertigstellung der linearen Heptaketidkette wird diese über intramolekulare Cyclisierung unter Bildung des **Makrolactons** vom PKS-Enzymkomplex abgespalten. Diese Reaktion wird von einer sogenannten Thioesterase (TE)-Domäne katalysiert. Das erste stabile Zwischenprodukt der Erythromycin-Biosynthese, 6-Desoxyerythronolid B, wird später noch durch sogenannte Post-PKS-Enzyme weiter modifiziert. Neben einer Hydroxylierung werden auch O-Glykosidierungen durchgeführt, die entscheidend für die Wirksamkeit des Naturstoffs sind. Der Erythromycin-Biosyntheseweg codiert neben den drei Polyketidsynthasen und den modifizierenden Enzymen (Hydroxylase und Glykosyltransferasen) auch

transkriptionelle Regulatoren sowie Biosyntheseenzyme zur Herstellung der ungewöhnlichen Zuckerbausteine. Der Gencluster enthält außerdem ein Erythromycin-Resistenzgen, welches konstitutiv exprimiert wird.

## 8.5.2 Makrolid-Produktion

Die Herstellung von Makrolid-Antibiotika erfolgt in der Regel auf komplexen Nährmedien. Im Falle des Erythromycins wird Propionsäure als wichtigster Vorläufer der Biosynthese zugesetzt. Dieser Zusatz ist zur Ausbeutesteigerung sehr effizient, weil die komplette Grundstruktur aus Propionat direkt (Starter der Biosynthese) und aus sechs Methylmalonyl-CoA (MMCoA)-Einheiten entsteht (Abb. 8.11). MMCoA gehört nicht zu den generellen Primärstoffwechselsubstanzen von Mikroorganismen, es kann aber bei

## 6-Desoxyerythronolid-B-Synthase (DEBS)

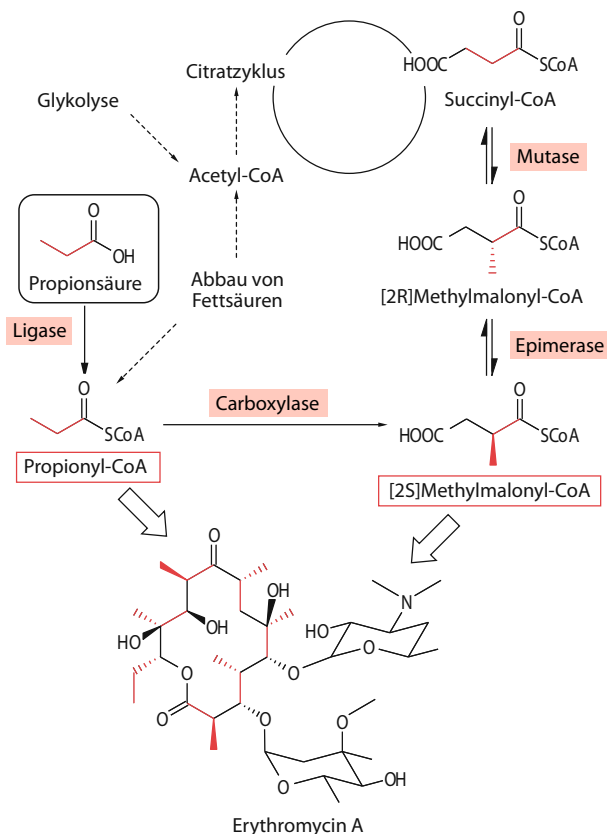


**Abb. 8.10** Biosynthese von Erythromycin A. Das 6-Desoxyerythronolid-B-Makrolidgerüst wird aus Propionyl-CoA und sechs Methylmalonyl-CoA-Verlängerungseinheiten generiert. Die PKS-Megasyntase ist ein Komplex aus drei multifunktionellen Enzymen. Diese beinhalten ein Lademodul (LM) und sechs Verlängerungsmodulen (M1 bis M6), die zusammen sieben Polyketid-Einheiten einbauen. Der schwarze Balken kennzeichnet, welche katalytischen Domänen zum jeweiligen Modul gehören. AT: Acyltransferase, ACP (= CP): Acyl-Carrier-Protein, KS: Ketosynthase, KR: Ketoreduktase, DH: Dehydratase, ER: Enoylreduktase, TE: Thioesterase

entsprechender genetischer Ausstattung ausgehend von Propionat gebildet werden, was auch im Erythromycin-Produzenten der Fall ist. Da die dazu notwendigen Stoffwechselenzyme in der Regel nicht überexprimiert sind, erklärt sich der positive Effekt der Zufütterung. Üblicherweise erfolgt die aerobe submerse Fermentation bei etwa 30 °C, wonach Erythromycin aus der Kulturflüssigkeit extrahiert wird. Durch Alkalisierung fällt der Arzneistoff aus und kann dann umkristallisiert werden. Der erste Produktionsstamm, *S. erythraea* NRRL2338, wurde bereits 1952 beschrieben und wies einen Produkti-

ter von 250 bis 1000 mg/l auf. In den mehr als 50 Jahren, seit die ersten Fermentationsdaten publiziert wurden, hat sich die Produktivität durch klassische Stammentwicklung auf etwa 10 g/l erhöht. Während der Fermentation müssen hohe Glucosekonzentrationen vermieden werden, weil dieser Zucker eine Repression der Syntheserate bedingt. Im Verlauf des Prozesses müssen Hochproduzenten ständig re-isoliert werden, weil genetische Variabilität recht schnell zum Verlust der optimierten Produktionsraten führt. Die Jahresproduktion an Erythromycin wird mit etwa 4000 t angegeben, wovon etwa

**Abb. 8.11** Bildung der Erythromycin-A-Vorläufer Propionyl-CoA und [2S]-Methylmalonyl-CoA. Um die Produktionsausbeuten des Antibiotikums zu erhöhen, wird während der Fermentation Propionsäure zugefüttert



3500 t als Vorstufen für partialsynthetisch verbesserte Erythromycine wie Clarithromycin oder Azithromycin dienen.

teristisch sind auch eine Dimethylamino- sowie eine Carboxamid-Gruppe am A-Ring.

## 8.6 Tetracycline

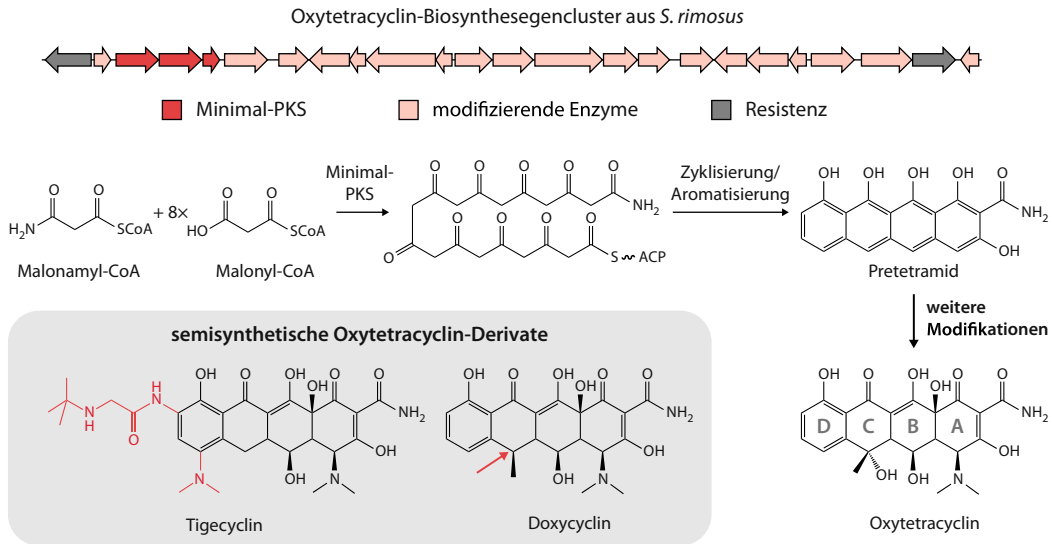
Die natürlich vorkommenden und hauptsächlich von Streptomyceten produzierten Tetracycline sind chemisch sehr eng miteinander verwandt. Wie ihr Name andeutet, leiten sich Tetracycline von einem System aus vier linear annelierten sechsgliedrigen Ringen ab. Der D-Ring des Octahydronaphacen-Grundgerüsts ist aromatisch, während die ABC-Ringe teilweise gesättigt sind (Abb. 8.12). Das Ringsystem ist in der Regel hochsubstituiert, besonders auffällig sind die Keto-Enol-Gruppen auf der einen Halbseite des Moleküls, welche die Komplexbildung mit divalenten Kationen ermöglichen. Charak-

### Historie

Der erste Vertreter dieser Antibiotikaklasse, **Chlortetracyclin**, wurde bereits 1948 von Benjamin Dugger im Goldenen Zeitalter der Antibiotika-Forschung entdeckt. Er isolierte das Antibiotikum aus dem Kulturfiltrat des Bodenbakteriums *Streptomyces aureofaciens*. Wenig später wurden weitere Vertreter dieser Stoffklasse aus verschiedenen Streptomyceten-Stämmen isoliert, wie beispielsweise **Oxytetracyclin** (Terramycin), welches als erster Vertreter dieser Verbindungsklasse von einem Forscherteam der Firma Pfizer strukturell aufgeklärt und 1950 als Breitband-Antibiotikum auf den Markt gebracht wurde.

Um die Resistenzmechanismen zu umgehen, wurden die Grundgerüste fermentativ gewonne-





**Abb. 8.12** Oxytetracyclin-Biosynthese in *Streptomyces rimosus* und semisynthetische Oxytetracyclin-Derivate. Der Biosynthese-Gencluster ist etwa 25 Kilobasen groß und enthält 24 Gene, welche die Minimal-Polyketidsynthase (PKS), modifizierende Enzyme (Aromatasen, Cyclasen, Oxygenasen, Methyltransferasen, Aminotransferase etc.) und Resistenzvermittelnde Enzyme codieren

ner Tetracycline semisynthetisch modifiziert. So entstanden beispielsweise ausgehend vom **Oxytetracyclin** aufeinanderfolgende Generationen neuer Tetracyclin-Antibiotika: **Doxycyclin** und später dann **Tigecyclin**. Letzteres wurde Ende 2007 in Deutschland zugelassen und ist der erste Vertreter der innovativen Klasse der **Glycylcycline**. Es zeigt eine deutlich höhere Affinität zu den Ribosomen und wird nicht von einer Effluxpumpe aus der Zelle transportiert, sodass der neue Arzneistoff zwei problematische Resistenzmechanismen gegen Tetracyclin-Antibiotika umgeht.

## Wirkung und Anwendung

Tetracycline hemmen die bakterielle Proteinsynthese im Anfangsstadium der Elongationsphase. Durch Blockade der 30S-ribosomalen Aminoacylstelle (A-Stelle) wird die Anlagerung der Aminoacyl-tRNA und somit die Verlängerung der Peptidkette verhindert. Schon bald entwickelten sich Resistenzen gegenüber Tetracyclin-Antibiotika, die unter anderem in der Modifikation der Zielstruktur (30S-Untereinheit des Ribosoms) oder in der Expression einer

Effluxpumpe begründet sind, die von einem mittlerweile weit verbreiteten Resistenzgen codiert wird.

Sie wirken als Breitspektrum-Antibiotika gegen eine große Palette Gram-positiver und Gram-negativer Keime und werden seit mehr als einem halben Jahrhundert zur Therapie von Infektionen, z. B. der Atemwege oder des Urogenitaltraktes, eingesetzt. Besonders hervorzuheben ist auch ihre Wirksamkeit gegen zellwandlose Problemkeime (z. B. Chlamydien) und Spirochäten (z. B. Borrelien). Daher kommen sie auch bei der Behandlung von Borreliose zum Einsatz. Das oben erwähnte Tigecyclin wirkt gegen multiresistente Keime wie Methicillin-resistente Staphylokokken und Vancomycin-resistente Enterokokken und stellt daher ein wichtiges Reserveantibiotikum dar. Es kommt nur bei schweren Infektionen mit bestimmten, gegen andere Antibiotika bereits unempfindlichen Keimen zur Anwendung (insbesondere hochresistente Krankenhauskeime wie z. B. MRSA). Zeitweise wurden Tetracycline auch in der Tierernährung eingesetzt, jedoch hat die dadurch beschleunigte Resistenzentwicklung zu einem allgemeinen

Verbot ihrer nicht-therapeutischen Verwendung geführt.

## Wirtschaftlichkeit

Mit etwa 1,6 Mrd. US-Dollar Umsatz im Jahr 2009, machten Tetracycline 4 % des gesamten Antibiotikamarktes aus.

### 8.6.1 Tetracyclin-Biosynthese

Tetracycline zählen zu den Polyketid-Antibiotika, die von PKS-Systemen produziert werden (■ Abb. 8.9). Im Gegensatz zu den modular aufgebauten PKS-Systemen, die die Produktion der Makrolid-Antibiotika steuern, handelt es sich hierbei um monofunktionelle Enzyme. Dies bedeutet, dass die für die Biosynthese erforderlichen katalytischen Aktivitäten auf einzelne Enzyme verteilt sind, die iterativ zum Aufbau der Polyketidkette benutzt werden, wobei zunächst ein **Poly- $\beta$ -Ketointermediat** entsteht (■ Abb. 8.12). Zusätzlich gibt es noch eine Reihe an Enzymen, die das Polyketidgrundgerüst cyclisieren und modifizieren. Die Biosynthesemaschinerie ist um einen **Minimal-PKS**-Enzymkomplex aufgebaut, der alle notwendigen katalytischen Aktivitäten zur Herstellung der naszierenden Polyketidkette beinhaltet und keine separate Acyltransferase (AT) benötigt. Hierzu zählen die zwei Ketosynthasen  $KS_\alpha$  und  $KS_\beta$  sowie ein Acyl-Carrier-Protein (ACP), an das die Malonat-Verlängerungseinheiten bzw. die Poly- $\beta$ -ketointermediate während der Biosynthese kovalent gebunden sind. In einem iterativen Prozess wird die wachsende Kette nach jedem Verlängerungszyklus zur erneuten Claisen-Kondensation wieder auf die  $KS_\alpha$  übertragen, während eine neue Malonyl-CoA-Einheit an das ACP gebunden wird. Die Anzahl der Verlängerungszyklen und die daraus resultierende Länge der Polyketidkette wird dabei durch die  $KS_\beta$  – den sogenannten *chain length factor* – bestimmt. Zum Aufbau des Tetracyclingerüsts werden ausgehend von einer Malonsäureamid-Startereinheit acht Verlängerungszyklen mit Malonyl-CoA durchgeführt. Das lineare Nonaketid-Intermediat

wird durch die Bindung an das Enzym stabilisiert und konnte aufgrund seiner hohen Reaktivität bislang nicht isoliert werden. Im weiteren Verlauf der Biosynthese wird dieses durch Cyclasen und Aromatasen unter Bildung des tetracyclischen Pretetramid-Intermediats von der Minimal-PKS freigesetzt. Das Ringsystem wird schließlich von einer Reihe modifizierender Enzyme, wie Oxygenasen, Methyltransferasen und Amidotransferasen, zum Tetracyclin-Antibiotikum umgewandelt. Dabei sind die Oxygenasen für die Bildung der Keto-Enol-Funktionalitäten zuständig, die eine wichtige Rolle bei der Interaktion der Tetracycline mit dem Ribosom unter Komplexbildung mit  $Mg^{2+}$  spielen. Zur Ausbildung der charakteristischen Dimethylaminogruppe wird die Carbonylgruppe des A-Rings zunächst von einer Amidotransferase transaminiert und anschließend von Methyltransferasen methyliert. Die Biosynthesewege der verschiedenen Tetracyclin-Antibiotika unterscheiden sich darin, dass einige Produzentenstämme individuelle Modifikationsreaktionen nicht bzw. zusätzlich ausführen.

Die für die Tetracyclin-Biosynthese notwendige und große Anzahl von Enzymen wird in der Regel von komplexen Biosynthese-Genclustern codiert. So umfasst der Oxytetracyclin-Biosyntheseweg aus *Streptomyces rimosus* insgesamt mindestens 21 Gene, wovon drei die Minimal-PKS codieren (■ Abb. 8.12). Neben weiteren (modifizierenden) Biosynthesegenen, die den größten Teil des Genclusters ausmachen, findet man auch zwei Resistenzgene. Sie codieren eine Effluxpumpe sowie ein *ribosomal protection protein* (RPP), welches die Tetracyclin-Ribosom-Interaktion verhindert. Dabei dient die Effluxpumpe nicht nur der Selbstresistenz des Produzentenstamms, sondern auch dem Einsatz des Antibiotikums als chemische Waffe gegen mikrobielle Nahrungskonkurrenten.

### 8.6.2 Tetracyclin-Produktion

Zur kommerziellen Herstellung der Tetracycline werden Hochleistungsmutanten des Oxytetra-


cyclin-Produzenten *Streptomyces rimosus* oder des Chlortetracyclin-Produzenten *Streptomyces aureofaciens* eingesetzt. Letzterer produziert, wenn er in einem chloridarmen Medium gezüchtet wird, überwiegend das nicht-chlorierte Tetracyclin. *Streptomyces rimosus* zählt neben dem Streptomycin-Produzenten *Streptomyces griseus* (Abschn. 8.7) zu den am besten charakterisierten *Streptomyces*-Stämmen, die zur industriellen Antibiotika-Produktion eingesetzt werden. Er ist einer der wenigen Streptomyceen, der relativ schnell in einer hochdispersen Form wächst und dabei Zelldichten von etwa 50 g/l erreicht. In industriellen Programmen wurde die Oxytetracyclin-Produktion ausgehend vom ursprünglichen Wildstamm mit Ausbeuten im Bereich von mehreren 10 mg/l zu einem hoch entwickelten Stamm optimiert, der Produktionstiter von nahezu 100 g/l erreicht. Tetracycline werden im aeroben Submersverfahren hergestellt, wobei eine optimale Sauerstoffversorgung für die Ausbeute wesentlich ist. Eine klare Korrelation zwischen Tetracyclin-Produktion und Kohlenhydrat-Katabolismus ist erkennbar. Hochproduzenten weisen in der Regel eine niedrigere Glykolyserate als Stämme mit geringem Tetracyclin-Produktionstiter auf. Da die Tetracyclin-Produktion über Katabolitrepession durch Glucose unterdrückt wird, wird die für optimales Wachstum notwendige Glucose entweder kontinuierlich während der Fermentation hinzugefüttert, oder es werden andere Kohlenstoffquellen verwendet, die keine Katabolitrepession verursachen. Aufgrund einer zusätzlichen Phosphatrepression wird die Fermentation unter Phosphat-limitierenden Bedingungen durchgeführt. Die Vorkulturen zum Animpfen von Fermentern mit Volumina von 80 000 bis 150 000 l werden nach allgemein üblichen Methoden propagiert (5 % Inokulum, 24–30 h Kultivierung). Die Fermentation erfolgt bei 28 °C über etwa 96 h. Dabei wird in der ersten Phase der Fermentation sehr viel Mycel gebildet, und das Antibiotikum wird vorwiegend in der zweiten Phase produziert. Zur Aufarbeitung sind unterschiedliche Verfahren beschrieben worden. Oxytetracyclin kann beispielsweise mit-

hilfe quartärer Ammoniumsalze nach vorheriger Abtrennung des Mycels aus dem Kulturfiltrat ausgefällt werden. Das Präzipitat (quartäres Oxytetracyclinsalz) kann anschließend gelöst und über Filteranlagen weiter gereinigt werden. Das Lösemittel wird über Vakuumtrocknung zurückgewonnen und das Antibiotikum nach Wäsche als Hydrochlorid auskristallisiert.

## 8.7 Aminoglykoside

Aminoglykoside bilden eine große und diverse Gruppe von Antibiotika, die strukturell den Kohlenhydraten sehr ähneln. Ihr Grundgerüst besteht aus einer sechsgliedrigen **Aminocyclitol-Einheit**, die über glykosidische Bindungen mit zwei oder mehr Aminoazuckern verknüpft ist. Daraus leitet sich ihr Name „Aminoglykoside“ ab, und die Verbindungen werden oft auch als **Aminocyclitole** oder **Pseudosaccharide** bezeichnet. Aufgrund ihrer Saccharidstruktur sind Aminoglykoside in der Regel sehr gut wasserlöslich und bilden mit Mineralsäuren Salze. Während es eine Reihe verschiedener Zuckersubstituenten gibt, ist die Aminocyclitol-Komponente weniger variabel.

### Historie

Die Klasse der Aminoglykosid-Antibiotika wurde schon recht früh entdeckt. Der erste Vertreter, **Streptomycin**, wurde bereits im Jahr 1943 von Waksman und seinen Kollegen aus *Streptomyces griseus* isoliert. Das vielversprechende Wirkungsspektrum von Streptomycin hat zur Suche nach weiteren Kandidaten dieser Antibiotikaklasse geführt, einige Beispiele sind in  Tab. 8.4 aufgelistet. Die Entwicklung von Resistenzen nahm auch hier keinen Halt – Mikroorganismen inaktivieren die Antibiotika durch enzymatische Acetylierung von Aminogruppen sowie Phosphorylierung und Adenylierung von Hydroxylgruppen. So inaktiviert eine Phosphotransferase viele Aminoglykosid-Antibiotika durch Phosphorylierung der Hydroxylgruppe in 3'-Stellung. Um die Wirkung des Antibiotikums aufrechtzu-

erhalten, gibt es seit Jahren Bemühungen, solche Resistenzmechanismen zu umgehen. So wurde beispielsweise eine Reihe semisynthetischer Kanamycin-Derivate hergestellt, bei denen in 3'-Position keine Hydroxylgruppe vorhanden ist, sodass diese von der Phosphotransferase nicht mehr modifiziert werden können.

## Wirkung und Anwendung

Aminoglykoside binden an die 30S-Untereinheit der Ribosomen, wodurch Ablesefehler der mRNA verursacht werden. Dadurch werden fehlerhafte Proteine gebildet, die dann oftmals nicht mehr ihre Funktion erfüllen können.

Die antimikrobielle Wirkung von Aminoglykosiden richtet sich sowohl gegen Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien, sodass man hier auch von Breitspektrum-Antibiotika spricht. Sie werden schon seit Jahrzehnten in der Klinik eingesetzt, vor allem bei bakteriellen Infektionskrankheiten mit aeroben, Gram-negativen Keimen, z. B. bei Harnwegsinfekten, „Blutvergiftungen“ (Sepsis), Hirnhaut- oder Herzklappenentzündungen. Einige Aminoglykoside sind aber auch für spezielle Zwecke reserviert. So ist beispielsweise Neomycin nur zur lokalen Behandlung von Entzündungen der Haut, Augen oder Ohren geeignet. Paromycin hingegen dient der Dekontamination des Darms vor operativen Eingriffen und ist das einzige Aminoglykosid, das als Tablette verabreicht werden kann. Zudem werden Aminoglykoside auch häufig in der Veterinärmedizin oder in der Landwirtschaft verwendet, z. B. Hygromycin oder Spectinomycin.

## Wirtschaftlichkeit

Mit etwa einer Milliarde US-Dollar Umsatz im Jahr 2009 machten Aminoglykoside 2 % des gesamten Antibiotikamarktes aus.

### 8.7.1 Aminoglykosid-Biosynthese

Grundsätzlich anders als Polyketide und nicht-ribosomale Peptide entstehen Aminoglykoside, deren Grundgerüst durch den Aufbau und die

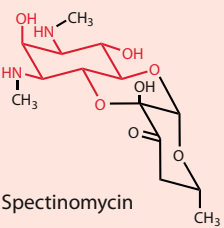
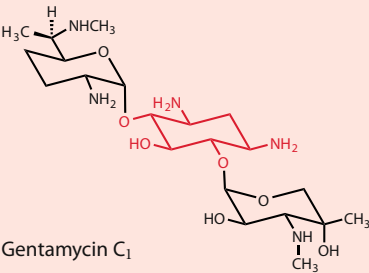
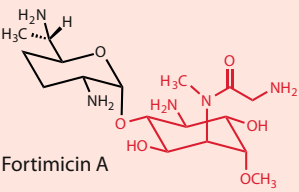
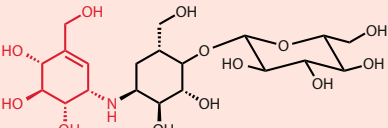
Modifizierung zuckerähnlicher Bausteine ermöglicht wird. Hier bildet eine Vielzahl von Einzelproteinen die Gesamtheit der Biosynthesemaschinerie aus und Intermediate liegen im Gegensatz zur Polyketid- bzw. nicht-ribosomalen Peptid-Biosynthese nicht Carrier-Protein-gebunden vor. Die Biochemie der Aminoglykosid-Biosynthese wird derzeit noch erforscht, da keiner der identifizierten Biosynthesewege schon bis ins Detail aufgeklärt werden konnte.

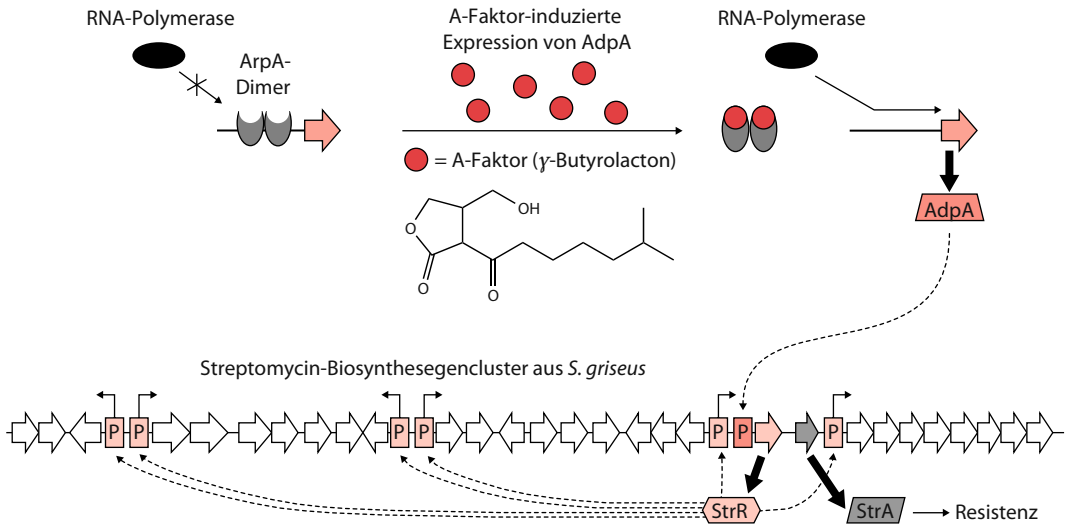
Grundbausteine aller Aminoglykoside sind Cyclitol-Einheiten, die über Verknüpfung mit Zuckereinheiten (Glykosylierung) oder andere Modifikationen dekoriert werden. Die Zuckerbausteine können vor oder nach ihrer Übertragung noch weiter modifiziert werden. Anhand ihres Cyclitolgrundgerüsts können Aminoglykosid-Antibiotika (AGAs) grundsätzlich in vier Gruppen eingeteilt werden (■ Tab. 8.4):

- Streptamin-enhaltende AGAs,
- 2-Desoxystreptamin-enhaltende AGAs,
- Fortamin- und 2-Desoxyfortamin-enhaltende AGAs,
- Valienamin-enhaltende AGAs.

Die ersten drei Cyclitolgerüste werden ausgehend von D-Glucose-6-phosphat über verschiedene Biosyntheserouten gebildet, während das Valienamingrundgerüst aus *sedo*-Heptulose-7-phosphat hervorgeht. Die bisher charakterisierten Biosynthese-Gencluster enthalten zwischen 18 und 34 Genen. Sie codieren im Gegensatz zu den modularen Polyketid- bzw. nicht-ribosomalen Peptid-Biosynthesewegen eine Vielzahl monofunktioneller Enzyme, welche die vielen einzelnen Biosyntheseschritte katalysieren. So besteht Streptomycin beispielsweise aus drei hoch modifizierten Bausteinen (Cyclitolgrundgerüst plus zwei Zuckerbausteine), die in einer Kaskade aufeinanderfolgender Enzymreaktionen generiert und miteinander verknüpft werden. Der hierfür verantwortliche Biosyntheseweg wurde bereits in verschiedenen Streptomyceten-Stämmen identifiziert und umfasst mindestens 29 Gene (■ Abb. 8.13). Neben Enzymen, die direkt der Biosynthese von Streptomycin zugeordnet werden konnten, sind Transporterproteine, ein **Transkriptionsfaktor** (StrR), ein Resistenzgen

**Tabelle 8.4** Beispiele für Aminoglykosid-Antibiotika, ihre Produzenten und Einteilung anhand ihrer Aminocyclitol-Einheit

Produzent	Gruppe	Cyclitol-Einheit	Beispiele
<i>Streptomyces griseus</i>	Streptomycin	Streptamin (STR)	 <p>Spectinomycin</p>
<i>Streptomyces netropsis</i>	Spectinomycin	STR	
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Hygromycin	2-Desoxystreptamin (DOS)	 <p>Gentamicin C<sub>1</sub></p>
<i>Streptomyces spec.</i>	Apramycin	DOS	
<i>Streptomyces fradiae</i>	Neomycin		
<i>Bacillus circulans</i>	Butirosin		
<i>Streptomyces rimosus</i>	Paromomycin		
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Kanamycin		
<i>Streptomyces spec.</i>	Tobramycin		
<i>Micromonospora echinospora</i>	Gentamicin		
<i>Micromonospora olivasterospora</i>	Fortimicin	Fortamin (FOR)	 <p>Fortimicin A</p>
<i>Streptomyces tenjimariensis</i>	Istamycin	FOR	
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Validamycin	Valienamin (VAL)	 <p>Validamycin A</p>
<i>Actinoplanes spec.</i>	Acarbose	VAL	



■ **Abb. 8.13** Regulation der Streptomycin-Biosynthese in *Streptomyces griseus*. Der A-Faktor induziert die Expression von AdpA, welches den Promotor (P) vor dem Streptomycin-Regulationsprotein (StrR) aktiviert. Der transkriptionelle Aktivator StrR bindet an verschiedene Promotorregionen im Streptomycin-Biosynthese-Gencluster

(StrA) und Proteine mit bislang unbekannter Funktion codiert.

Die Sekundärstoff-Produktion in Streptomyceten ist meist Wachstumsphasen-abhängig und setzt in der Regel in der stationären Phase ein, wenn die morphologische Differenzierung (Ausbildung von Luftmycel) beginnt. Die Antibiotika-Produktion wird dabei oft über eine Regulationskaskade kontrolliert, die von einem  $\gamma$ -Butyrolacton eingeleitet wird, dem sogenannten **A-Faktor** (■ Abb. 8.13). Der A-Faktor fungiert als eine Art mikrobielles Hormon, welches üblicherweise in einer späten Wachstumsphase produziert wird. Für den Streptomycin-Produzenten *Streptomyces griseus* wird das regulatorische Zusammenspiel von morphologischer Differenzierung und Antibiotika-Produktion über folgendes Modell erklärt: Ab einem bestimmten Konzentrationslevel bindet das  $\gamma$ -Butyrolacton an den transkriptionellen Inhibitor ArpA. Dieser verliert dadurch seine Fähigkeit, an die DNA zu binden, sodass das *adpA*-Gen exprimiert werden kann. Das gebildete AdpA-Protein bindet dann wiederum an die Promotorregion des *strR*-Gens und aktiviert so dessen Transkription. Hierdurch wird das für den Streptomycin-

Biosyntheseweg spezifische Regulationsprotein StrR gebildet, welches an verschiedene Promotorregionen im Gencluster bindet und als Transkriptionsaktivator agiert. Hierdurch wird die Streptomycin-Biosynthese „angeschaltet“. Neben *strR* induziert der A-Faktor auch die Expression des Resistenzgens *strA*. Dieses codiert für die Streptomycin-6-Phosphotransferase, die dem Stamm Eigenresistenz gegenüber dem produzierten Antibiotikum vermittelt.

## 8.7.2 Aminoglykosid-Produktion

Der überwiegende Teil der heute bekannten Aminoglykosid-Antibiotika wird von Actinomyceten der Gattung *Streptomyces* oder *Micromonospora* produziert. Per Konvention wurde seinerzeit der Ursprung des Antibiotikums durch die Schreibweise in der Endsilbe des Namens kenntlich gemacht. Aminoglykoside aus Streptomyceten wie die Kanamycine wurden mit „-mycin“ bezeichnet, während Vertreter aus *Micromonospora*-Stämmen wie die Gentamicine auf „-micin“ endeten (■ Tab. 8.4). Mittlerweile



wurden aber noch weitere bakterielle Aminoglykosid-Produzenten entdeckt, z.B. *Frankia*, *Actinoplanes* und *Bacillus spec.* Aminoglykosid-Antibiotika werden üblicherweise im Submersverfahren im 50 000- bis 150 000-Liter-Maßstab hergestellt. Bei den Produzentenstämmen handelt es sich meist um Actinomyceten, die Verzweigungen und Mycelien ausbilden. Zur großtechnischen Produktion werden die Stämme stufenweise in Schüttelkulturen und dann in Submersgefäßen vermehrt. In jeder Stufe wachsen die Kulturen etwa zwei Tage und werden dann in frisches Nährmedium mit etwa zehnfachem Volumen übertragen. Die eigentliche Fermentation verläuft in drei Phasen: Während der zweitägigen Wachstumsphase ist der Sauerstoffbedarf sehr hoch und es wird sehr viel Mycel gebildet. In der sich anschließenden ein- bis zweitägigen stationären Phase beginnt die verstärkte Aminoglykosid-Produktion, wobei das Mycelgewicht nahezu konstant bleibt. In der Absterbephase nimmt die Aminoglykosid-Produktion ab und das Mycel beginnt zu autolysieren. In dieser Phase muss der insgesamt etwa fünf Tage andauernde Fermentationsprozess rechtzeitig abgebrochen werden.

Bei der Aufarbeitung wird das Mycel beispielsweise mit Rotationsfiltern vom Kulturfiltrat abgetrennt und entsorgt (z. B. durch Trocknung und anschließende Verbrennung). Zur Isolierung der Aminoglykoside wird üblicherweise die relativ starke Basizität der Aminogruppe ausgenutzt und das Kulturfiltrat zunächst über schwach basische Ionenaustauscher aufgearbeitet. Nach der Erstabtrennung folgen dann noch weitere säulenchromatographische Feinschritte mit schwach basischen Puffersystemen. Meist verzichtet man jedoch auf die aufwendige Isolierung eines Einzelstoffes und reinigt stattdessen definierte Gemische auf.

## 8.8 Ausblick

Sekundärstoffe aus Mikroorganismen sind auch heute die wohl wichtigsten Kandidaten für die

Entwicklung von neuen Antibiotika, welche für die Therapie von Infektionserkrankungen dringend benötigt werden. Eine biotechnische Produktion nach Stamm- und Produktionsoptimierung ist in der Regel möglich und sinnvoll, wenn die Substanz nicht ökonomisch auf synthetischem Wege gewonnen werden kann. Dieser Prozess wurde in den vergangenen Jahrzehnten ungerichtet durch klassische Stammoptimierung vorangetrieben, wobei man sich wegen der Verwendung von Zufallsmutagenesen auf deren positiven Einfluss auf die Produktivität verlassen musste. Heute sind bedingt durch die Revolution der Sequenzierungsmethoden und die Verfügbarkeit von molekularbiologischen Ansätzen Mikroorganismen häufig in kurzer Zeit gezielt genetisch manipulierbar. Da die Genomsequenzen komplett und zu erschwinglichen Kosten aufgeklärt werden können, lassen sich auch die Biosynthese-Gencluster für Sekundärmetaboliten recht leicht identifizieren. Basierend darauf ergeben sich neue Möglichkeiten der Stamm- und Produktionsoptimierung mit molekularbiologischen Methoden, die seit einigen Jahren vermehrt eingesetzt werden. So können basierend auf Studien der Regulation der Biosynthese negative Regulatoren ausgeschaltet und positive Regulatoren verstärkt exprimiert werden. Vorstufen und Kofaktoren werden quantitativ in den Produzenten bestimmt, wodurch Engpässe bei der Produktion identifiziert und nachfolgend durch gezielte Modifikation der zugehörigen Stoffwechselwege umgangen werden können. Es ist offensichtlich, dass Produktionsstämme von neuen Wirkstoffen heute und in Zukunft auf diesem Wege optimiert werden. Zudem kann man nun durch vergleichende Genomik die Mutationen bestimmen, welche durch klassische Mutagenese aus einem Wildstamm den Hochproduzenten machten. Solche Daten liegen zum Avermectin bereits vor und die erhaltenen Erkenntnisse lassen sich nun für die Optimierung weiterer Produkte einsetzen. Inzwischen werden gar komplette Antibiotika-Biosynthesewege, die mehr als 100 000 Basenpaare genetischer Information umfassen, in heterologe Wirte mit vorteilhaften Eigenschaften transplantiert und



dort zur Expression gebracht. Dadurch können Nachteile der Originalproduzenten wie langsames Wachstum oder unzureichende genetische Manipulierbarkeit umgangen werden. Dies ist beispielsweise für das Daptomycin und Derivate davon schon gelungen und weist den Weg in die Zukunft der Wirkstoff-Forschung an mikrobiellen Sekundärstoffen.

## Literaturverzeichnis

- Baltz RH, Demain AL, Davies JE (2010) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. 3. ed. ASM Press Washington, DC
- Brakhage A (2006) Antibiotika. In: Antranikian G (Hrsg) Angewandte Mikrobiologie. 1. Aufl. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. 410–425
- Elander RP (2003) Industrial production of  $\beta$ -lactam antibiotics. Appl Microbiol Biotechnol 61: 385–392
- Flatt PM, Mahmud T (2007) Biosynthesis of aminocyclitol-aminoglycoside antibiotics and related compounds. Nat Prod Rep 24: 358–392
- Kumar CG, Himabindu M, Jetty A (2008) Microbial biosynthesis and applications of gentamicin: a critical appraisal. Crit Rev Biotechnol 28: 173–212
- Minas W (2005) Production of erythromycin with *Saccharopolyspora erythraea*. In: Barredo JL (Hrsg) Methods in Biotechnology: Microbial Processes and Products. Humana Press, New Jersey. 65–91
- Petkovic H, Cullum J, Hranueli D, Hunter IS, Peric-Concha N, Pigac J, Thamchaipenet A, Vujaklija D, Long PF (2006) Genetics of *Streptomyces rimosus*, the oxytetracycline producer. Microbiol Mol Biol Rev 70: 704–728
- Sanchez S, Demain A (2002) Metabolic regulation of fermentation processes. Enzyme Microbiol Technol 31: 895–906
- Schäfer B (2007) Naturstoffe der chemischen Industrie. 1. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Walsh CT, Fischbach MA (2010) Neue Strategie gegen Superkeime. Spektrum der Wissenschaft 4/10: 46–53

Industrielle Mikrobiologie

Sahm, H.; Antranikian, G.; Stahmann, K.-P.; Takors, R.

(Hrsg.)

2013, XII, 310 S. 139 Abb., 110 Abb. in Farbe.,

ISBN: 978-3-8274-3040-3