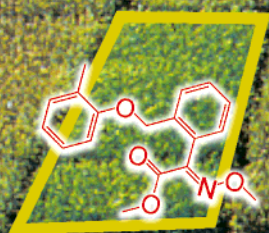




# Strobilurine – neue Fungizide für den Pflanzenschutz



## Kresoxim-methyl



# Strobilurine: Evolution einer neuen Wirkstoffklasse

**Hubert Sauter,\* Wolfgang Steglich und Timm Anke**

*Professor Hans-Jürgen Quadbeck-Seeger zum 60. Geburtstag gewidmet*

Die Natur liefert als Ergebnis spezieller Biosynthesewege Wirkstoffe mit den verschiedensten biologischen Aktivitäten. Manche erfüllen für die Organismen, in denen sie entstehen, überlebenswichtige Funktionen. So produzieren einige Pilze fungizid wirkende Strobilurine und Oudemansine, gegen die die Produzenten selbst unempfindlich sind, die aber andere Pilzarten von der gemeinsamen Nahrungsgrundlage fernhalten. Nach der Entdeckung dieser Naturstoffe, der Identifizierung der  $\beta$ -Methoxyacrylatgruppe als gemeinsa-

mem Strukturelement und der Aufklärung des Wirkungsmechanismus in den siebziger Jahren verlagerte sich der Schwerpunkt der Forschungsaktivitäten von der Hochschule in die Industrie. Ein spannender Wettlauf konkurrierender Arbeitsgruppen der industriellen Fungizidforschung setzte ein. Ziel war – und ist – die Entwicklung praxisgerechter Fungizide für den Pflanzenschutz. Der Aufsatz beleuchtet methodische Vorgehensweisen bei der Leitstruktoptimierung und die Bedeutung der Kenntnis von Struktur-

Wirkungs-Beziehungen. Die Variation der Leitstrukturen der Naturstoffe und die Selektion geeigneter Kandidaten führten zur firmenübergreifenden Evolution der Strobilurine als neuer Wirkstoffklasse. Einige Produkte sind bereits im Handel, weitere werden erwartet – eine faszinierende Erfolgsgeschichte.

**Stichwörter:** Fungizide • Naturstoffe • Strobilurine • Struktur-Aktivitäts-Beziehungen • Wirkstoff-Forschung

## 1. Einleitung

Pilze haben in der Geschichte der Menschheit schon von alters her eine wichtige Rolle gespielt, so bei der Herstellung von Nahrungsmitteln wie Käse, Hefeteig oder Sojasauce oder bei der alkoholischen Gärung. In einigen asiatischen und amerikanischen Kulturkreisen fanden Pilze, da sie Lieferanten von Halluzinogenen sind, bei Kulthandlungen Verwendung. Auch als Delikatessen werden Fruchtkörper von Pilzen (für den Laien die eigentlichen, weil sichtbaren Manifestationen von Pilzen) seit der Antike geschätzt, z.B. die den Gourmet besonders ansprechende Trüffel. Als Heilmittel war die Bedeutung von Pilzen, verglichen mit der von Pflanzen, jedoch eher gering. Dies änderte sich erst 1928 mit der

bahnbrechenden Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming und seiner Entwicklung zum ersten hochwirksamen Antibiotikum aus einem Schimmelpilz. Seit dieser Zeit ist die Bedeutung von Pilzen als Produzenten von Antibiotika und anderen pharmakologisch aktiven Naturstoffen offensichtlich.<sup>[1]</sup>

## 2. Die natürlichen Strobilurine und Oudemansine

### 2.1. Vorgeschichte

Die Strobilurine wurden bei einer Ende 1976 begonnenen Suche nach neuen antibiotisch wirksamen Substanzen aus Basidiomyceten identifiziert. Diese Klasse höherer Pilze, zu der viele bekannte Arten wie der Fliegenpilz und der Steinpilz gehören, wurde zu dieser Zeit von Wirkstoff-Forschern gemieden, da ihre Mycelkulturen wegen des oft langsamen Wachstums als schwieriger zu handhaben galten als die der überaus wirkstoffreichen Streptomyceten, die zu den Bakterien gehören. Doch versprachen die Arbeiten über Pigmente und Toxine der Fruchtkörper<sup>[2]</sup> einen originellen und vielfältigen Sekundärstoffwechsel auch der Mycelkulturen. Die Arbeiten von Jones und Thaller zur Bildung von Polyalkinen bei Basidiomyceten ließen bereits auf eine Ähnlichkeit zwischen dem Sekundärstoffwechsel der Basidiomyceten

[\*] Dr. H. Sauter

BASF AG

Hauptlaboratorium, Forschung Fungizide

D-67056 Ludwigshafen

Fax: (+49) 621-60-21156

E-mail: hubert.sauter@basf-ag.de

Prof. Dr. W. Steglich

Institut für Organische Chemie der Universität

Butenandtstraße 5–13/F, D-81377 München

Prof. Dr. T. Anke

Fachbereich Biologie, Lehrbereich Biotechnologie

Paul-Ehrlich-Straße, Gebäude 23, D-67663 Kaiserslautern

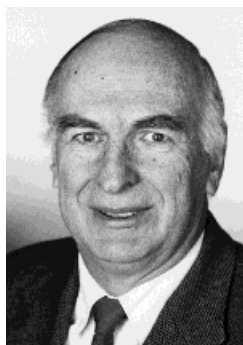
und dem höherer Pflanzen, vor allem der *Apiaceae* und *Asteraceae*, schließen.<sup>[3]</sup> Dazu kamen die Pionierarbeiten der Arbeitsgruppen von Anchel, Kavanagh und Hervey,<sup>[4]</sup> die in den vierziger und fünfziger Jahren Hunderte von Fruchtkörperextrakten und zum Teil auch schon entsprechende Pilzmycelkulturen auf die Bildung von Antibiotika untersucht hatten. Als herausragendes Ergebnis ihrer Arbeiten wurde mit Pleuromutilin ein neues antibakterielles Antibiotikum mit interessantem Wirkort beschrieben,<sup>[4]</sup> das Jahre später in Form des semisynthetischen Derivats Tiamulin von der Sandoz AG in die Veterinärmedizin eingeführt wurde.<sup>[5]</sup> All dies und die Möglichkeit, in dem von Zähler geleiteten Sonderforschungsbereich „Chemische Biologie der Mikroorganismen“ in Tübingen ein geeignetes Umfeld vorzufinden, hat einen von uns (T.A.) ermutigt, die Arbeit mit Basidiomyceten zu beginnen. Unter den ersten Antibiotika, die dabei entdeckt wurden, waren die Strobilurine A und B aus Kulturen des Kiefernzapfenröhlings *Strobilurus tenacellus*.<sup>[6]</sup> Aus diesem Pilz waren bisher noch keine Naturstoffe isoliert worden. Unsere erste Publikation 1977 beschrieb neben den physikalischen und chemischen Eigenschaften auch eine stark fungizide Wirkung auf eine Reihe von Pilzen.<sup>[6]</sup> Die hohe cytotoxische Aktivität gegen Ehrlich-Ascites-Tumorzellen veranlaßte Douros vom National Cancer Institute (USA) im selben Jahr, eine Probe der Strobilurine für Untersuchungen zur Antitumor-Aktivität zu erbitten. 1978 konnten ihm die ersten 117 mg Strobilurin A zugesandt werden. Bald darauf erhielten wir den Befund, daß Strobilurin A zwar nur eine sehr schwache Antitumorwirkung, aber erfreulicherweise auch keine akute Toxizität bei den tumortragenden Mäusen aufwies.

Die Strukturaufklärung im Arbeitskreis von einem von uns (W.S.) ergab, daß die Strobilurine eine ungewöhnlich einfache Struktur haben und offenbar eine neue Klasse von fungiziden Antibiotika bilden, deren Vorkommen sich nicht auf die Gattung *Strobilurus* beschränkte.<sup>[7]</sup> Strobilurin A konnte auch aus Kulturen von *Cyphellopsis* und aus zwei *Mycena*-Arten isoliert werden. Ursprünglich wurde für die Seitenkette eine all-*trans*-(9*E*)-Konfiguration angenommen, die später (1984) zur (9*Z*)-Konfiguration revidiert wurde.<sup>[8]</sup> Zwischen Strobilurin A und Mucidin, einem 1969<sup>[9]</sup> ohne Strukturvorschlag veröffentlichten und 1970<sup>[10]</sup> patentierten fungiziden Antibiotikum mit gleicher Summenformel, gleichem UV-Spektrum und gleicher Wirkung, wurde eine große Ähnlichkeit festgestellt. Der für Mucidin angegebene Drehwert von +33° ( $c=10$  bei 546 nm) schloß jedoch eine Identität mit dem achiralen Strobilurin A völlig aus. Mucidin war aus dem Buchenschleimröhlings *Oudemansiella mucida* isoliert worden und fand in der Tschechoslowakei Anwendung als antimykotische Salbe (Mucidermin „Spofa“). Um sicherzugehen, daß es sich bei Mucidin und Strobilurin A um unterschiedliche Verbindungen handelt, wurden Mycelkulturen von *O. mucida* angelegt und auf die Bildung von fungiziden Antibiotika untersucht. Zu unserer Überraschung fanden wir nicht Mucidin, sondern als neuen Naturstoff das kristalline, optisch aktive Oudemansin A und das in Form eines Öls isolierte Strobilurin A.<sup>[11]</sup> Wie die Strobilurine A und B wies auch Oudemansin A eine stark fungizide Wirkung auf. Als sehr langwierig erwies sich die Klärung der Frage, um welche Verbindung es sich bei „Mucidin“ handelte. Tschechische Patente und Publikationen waren widersprüchlich. Ein Patent<sup>[12]</sup> beschrieb unter Bezugnahme auf frühere Patente

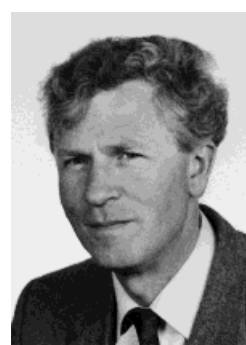
Hubert Sauter ist Wissenschaftlicher Direktor im Hauptlaboratorium der BASF AG, Forschung Fungizide. Er studierte ab 1964 Chemie in Freiburg i. Br., zwischenzeitlich (1965/66) auch Philosophie und Psychologie. Nach der Promotion 1973 bei H. Prinzbach war er ein Jahr lang Postdoktorand bei R. B. Woodward an der Harvard University, Cambridge, Massachusetts, und trat 1976 in die BASF ein. Sein besonderes Engagement gilt seither der Fungizidforschung.



H. Sauter



W. Steglich



T. Anke

Wolfgang Steglich, Professor und Vorstand am Institut für Organische Chemie der Universität München, studierte ab 1951 Chemie an der TU Berlin und promovierte 1960 bei F. Weygand an der TU München. An einen Forschungsaufenthalt bei D. H. R. Barton in London schlossen sich Professuren in Berlin, Bonn und München an. Sein Interesse liegt auf dem Gebiet der Naturstoffchemie, von der Strukturaufklärung bis zur Entwicklung neuer Synthesemethoden.

Timm Anke ist als Biochemiker und Mikrobiologe Professor für Biotechnologie an der Universität Kaiserslautern. Er studierte ab 1964 Biochemie in Tübingen und promovierte 1973 bei H. Dieckmann. Nach einem Forschungsaufenthalt bei F. Lipman in New York folgten die Habilitation in Tübingen und 1981 die Berufung nach Kaiserslautern. Das beherrschende Thema seiner Arbeiten ist die Suche nach biologisch aktiven Naturstoffen aus Basidiomyceten und die Aufklärung ihrer Wirkungsmechanismen.

gleicher Herkunft<sup>[10]</sup> die Struktur korrekt als (9Z)-Strobilurin A. Auf den zuvor für Mucidin beschriebenen Drehwert wurde in dieser Arbeit<sup>[10]</sup> nicht eingegangen. Sedmera et al. publizierten 1981 unter Bezugnahme auf die früheren Patente,<sup>[10, 12]</sup> darunter auch auf das mit der korrekten (9Z)-Konfiguration, verwirrenderweise die Identität von Mucidin und (9E)-Strobilurin A.<sup>[13]</sup> Der in dem tschechischen Patent<sup>[10b]</sup> angegebene Drehwert wurde als „Druckfehler“ bezeichnet. Die endgültige Klärung brachte schließlich eine Publikation im Jahr 1986,<sup>[14]</sup> in der die völlige Identität von (9Z)-Strobilurin A und Mucidin durch einen direkten spektroskopischen Vergleich festgestellt wird.

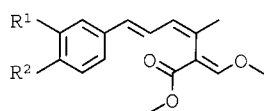
## 2.2. Vorkommen der Naturstoffe in Pilzen

Pilze, die Strobilurine und Oudemansine bilden, sind weltweit in allen Klimazonen anzutreffen.<sup>[17b]</sup> Mit einer Ausnahme (*Bolinea lutea*, ein Ascomycet) gehören alle Produzenten zu den Basidiomyceten.<sup>[15]</sup> Einige Strukturen (Schema 1) sind recht komplex wie die von Strobilurin E, das sich durch starke fungizide und sehr starke cytostatische Wirkung auszeichnet.<sup>[16]</sup> Die Strukturen der 9-Methoxystrobilurine K und L, des Strobilurins D und des Hydroxystrobilurins D wurden inzwischen revidiert.<sup>[17]</sup> Eine von der Firma Xenova beschriebene antibakterielle Wirkung von 9-Meth-

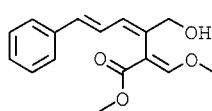
oxystrobilurin L erwies sich inzwischen als falsch, ebenso wie die dort vorgeschlagene Struktur.<sup>[18]</sup>

## 2.3. Bedeutung der Naturstoffe für die Produzenten

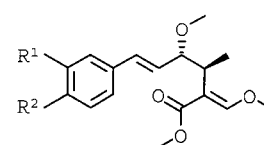
Zur Suche nach neuen Wirkstoffen werden Basidiomyceten bei einem von uns (T.A.) normalerweise auf komplexen, sehr nährstoffreichen Medien kultiviert, um ein gutes Wachstum der Mycelien und eine hohe Produktion von Sekundärmetaboliten zu ermöglichen. Da diese Bedingungen aber keinesfalls denen auf natürlichen Substraten entsprechen, z. B. auf Boden, Blättern oder (am häufigsten) Holz, wurden einige Strobilurinproduzenten auch auf ihren natürlichen, zuvor sterilisierten Substraten angezogen und auf die Bildung von Antibiotika untersucht. Dabei wurden Oudemansin A und Strobilurine in einer *Pterula*-Art, einer tropischen *Favolaschia*-Art und in *Mycena tintinnabulum* nachgewiesen.<sup>[19]</sup> Bei *Mycena tintinnabulum* gelang der Nachweis von Strobilurin D sowohl in den Fruchtkörpern (Hüten) als auch im myceldurchwachsenen Substrat (Eichenholz) in der freien Natur. Die im myceldurchwachsenen Eichenholz bestimmten Konzentrationen reichten aus, um andere Pilze im Wachstum zu hemmen. Dieser Befund sowie das weltweite Vorkommen der Strobilurine und Oudemansine lassen den Schluß zu, daß sich die Produzenten dieser Verbindungen damit einen Über-



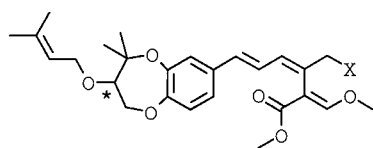
Strobilurin A:  $R^1 = R^2 = H$   
 Strobilurin B:  $R^1 = OCH_3, R^2 = Cl$   
 Strobilurin C:  $R^1 = OCH_2-CH=C(CH_3)_2,$   
 $R^2 = H$   
 Strobilurin F-2:  $R^1 = H,$   
 $R^2 = -OCH_2-CH=C(CH_3)_2$   
 Strobilurin F-1:  $R^1 = OH, R^2 = H$   
 Strobilurin H:  $R^1 = H, R^2 = OCH_3$



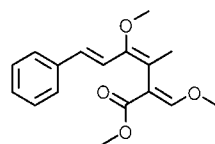
Hydroxystrobilurin A



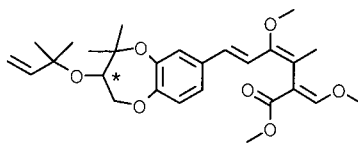
Oudemansin A:  $R^1 = R^2 = H$   
 Oudemansin B:  $R^1 = OCH_3, R^2 = Cl$   
 Oudemansin X:  $R^1 = H, R^2 = OCH_3$



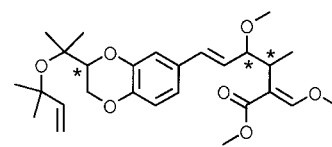
Strobilurin D (rev.):  $X = H$   
 (= Strobilurin G)  
 Hydroxystrobilurin D (rev.):  $X = OH$



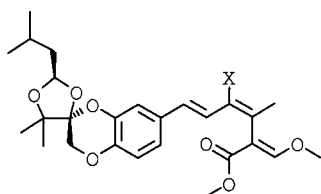
9-Methoxystrobilurin A



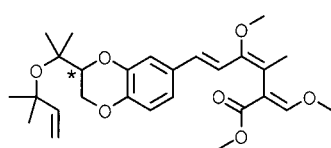
9-Methoxystrobilurin K



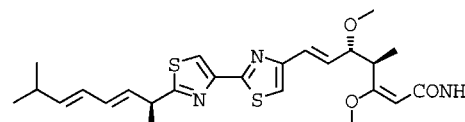
Oudemansin L



Strobilurin E:  $X = H$   
 9-Methoxystrobilurin E:  $X = OCH_3$



9-Methoxystrobilurin L



Myxothiazol A

Schema 1. Die natürlichen Strobilurine und Oudemansine<sup>[17b, 66]</sup> sowie Myxothiazol A.<sup>[21a]</sup> Die Markierung \* kennzeichnet ein Stereozentrum mit unbekannter Konfiguration.

Lebensvorteil gegenüber anderen parasitischen oder dasselbe Substrat besiedelnden Pilzen verschaffen.

Wie aber schützen sich die Strobilurine oder Oudemansine bildenden Pilze vor dem eigenen, oft in beachtlichen Mengen produzierten fungiziden Toxin? Dieser Frage sind wir gemeinsam mit der Arbeitsgruppe von Brand und von Jagow nachgegangen. Dabei zeigte sich, daß bei *Strobilurus tenacellus* der Wirkort im Cytochrom-b-Protein (siehe Abschnitt 2.4) so verändert ist, daß die Bindung der Strobilurine und Oudemansine sehr erschwert wird. Dies beruht im wesentlichen auf dem Austausch einer kleinen Aminosäure (Alanin oder Threonin) in Position 127 durch das größere Isoleucin. Dieser eine Resistenz bewirkende Austausch erfolgt in einer Region, die bei den gegen Strobilurintoxine sensiblen Spezies hochkonserviert ist. Bei *S. tenacellus* sind weitere kleine Aminosäuren in Position 254 durch Glutamin sowie in Position 261 Asparagin durch Asparaginsäure ersetzt. Diese Aminosäurereste liegen alle in der Bindungstasche des reduzierten Coenzyms Q.<sup>[20]</sup>

## 2.4. Wirkungsweise der Naturstoffe

Untersuchungen zur Wirkungsweise der Strobilurine und Oudemansine ergaben sehr früh, daß diese Naturstoffe die Atmung von Pilzen hemmen. Mit Zellen des Ehrlich-Ascites-Carcinoms wurde nachgewiesen, daß der Wirkort ausschließlich in der Atmungskette (Abbildung 1) zu suchen war.

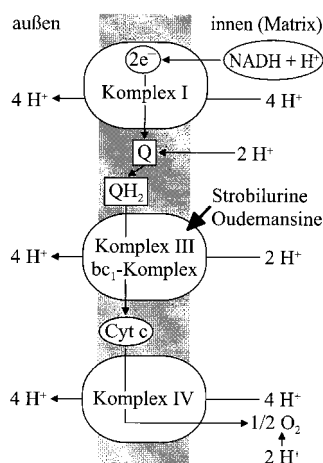


Abbildung 1. Der Wirkort der Strobilurine und Oudemansine in der mitochondrialen Atmungskette.

Andere Effekte wie die vollständige Hemmung der Protein-, RNA- und DNA-Synthese waren nach Ansicht eines von uns (T.A.) eine Folge des dadurch hervorgerufenen ATP-Mangels in den Zellen. Die Sauerstoffaufnahme und die ATP-Synthese von Rattenlebermitochondrien wurden sowohl mit  $\alpha$ -Ketoglutarat als auch mit Succinat als Substrat gehemmt, der Wirkort konnte somit nur im Komplex III oder IV der Atmungskette liegen.<sup>[11]</sup> Ein glücklicher Umstand führte dazu, daß wir in von Jagow einen äußerst kompetenten Partner fanden, dem es gelang, den Wirkort der Strobilurine und Oudemansine im mitochondrialen  $bc_1$ -Komplex ziemlich genau zu lokalisieren. In der ersten gemeinsamen Veröffentlichung

ist dargelegt, daß die Strobilurine A und B, Oudemansin A sowie das in den Arbeitskreisen von Reichenbach und Höfle bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig isolierte Myxothiazol<sup>[21a]</sup> an denselben Wirkort binden.<sup>[21b]</sup> Allen Verbindungen gemeinsam ist die (*E*)- $\beta$ -Methoxyacrylat-Einheit als das für die Wirkungsweise offenbar essentiellen Strukturelement. Die Strobilurine, die Oudemansine und Myxothiazol binden reversibel an das Ubihydrochinon-Oxidations(Qp)-Zentrum des  $bc_1$ -Komplexes und haben zur Kenntnis von Struktur und Funktion dieses Teils der Atmungskette beigetragen.<sup>[22]</sup> Antimycin, ein in Streptomyceten häufig vorkommendes fungizides und säugertoxisches Antibiotikum, bindet an das andere Zentrum des  $bc_1$ -Komplexes, das Qn-Zentrum. Die Röntgenstrukturanalyse des  $bc_1$ -Komplexes aus Rinderherz gelang kürzlich der Arbeitsgruppe von Deisenhofer, wobei auch die Bindungsstellen für Myxothiazol und Antimycin A identifiziert wurden.<sup>[23]</sup>

Die erste Patentanmeldung zu Strobilurin A erfolgte in Zusammenarbeit mit der Hoechst AG.<sup>[26]</sup> Sie beschrieb die Synthese von Strobilurin A, für das eine Verwendung als Antimykotikum in der Humanmedizin möglich schien. Da es jedoch schlechter als andere auf dem Markt befindliche Antimykotika war, wurde dieses Patent später aufgegeben. Mehrere Totalsynthesen der natürlichen Strobilurine und Oudemansine werden in Übersichtsartikeln beschrieben und kommentiert.<sup>[17b, 24]</sup>

## 3. Leitstrukturoptimierung im industriellen Forschungswettbewerb

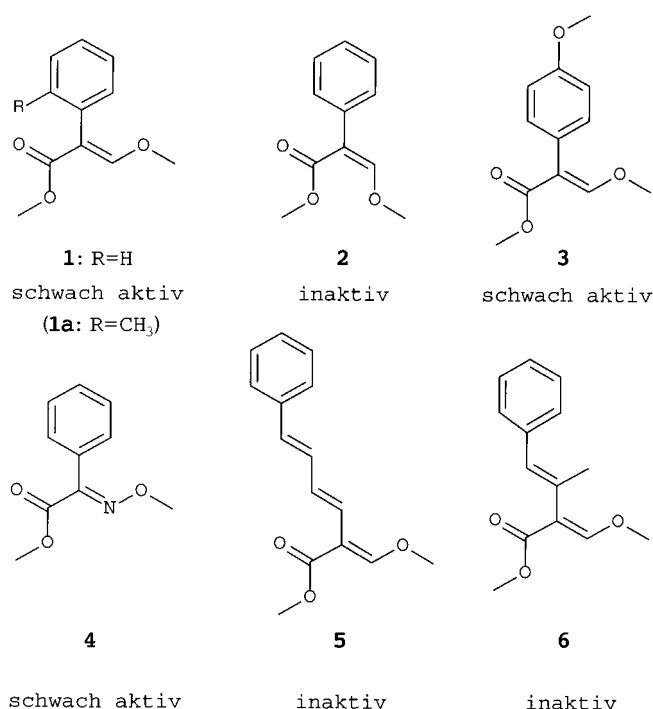
### 3.1. Erste Strukturvarianten

Die beiden Naturstoffe Strobilurin A und Oudemansin A vereinen eine seltene Kombination von günstigen molekularen und biologischen Eigenschaften in sich, so daß es sich geradezu anbot, diesen Verbindungstyp auch als Vorbild und Ausgangspunkt für die Synthese von Derivaten zugrunde zu legen.<sup>[24]</sup> Zum einen bestach die für bioaktive Naturstoffe seltene Einfachheit der Strukturen. Das Vorkommen der  $\beta$ -Methoxyacrylatgruppe in beiden Naturstoffen war außerdem ein Hinweis darauf, daß es sich nicht um isoliert vorkommende Einzelwirkstoffe, sondern wohl eher um eine Gruppe von aktiven Verbindungen handelte. Zum anderen lag die fungizide Aktivität bei Labortests auf einem hohen Niveau und bildete daher in Verbindung mit dem „neuartigen“ Wirkungsmechanismus der Atmungshemmung bei gleichzeitig niedriger Toxizität gegen Säugerzellen einen starken Anreiz.

Bereits 1977 wurde deshalb im Arbeitskreis eines von uns (W.S.) damit begonnen, Molekülvarianten von Strobilurin A zu synthetisieren, um leicht zugängliche Analoga mit ähnlicher oder möglichst verbesserter fungizider Wirkung zu erhalten.<sup>[25]</sup>

Die  $\beta$ -Methoxyacrylatgruppe, deren Heteroatome intermolekulare polare Wechselwirkungen ermöglichen, wurde als essentiell, d. h. als Pharmakophor angesehen und zunächst nur im Sinne von Pflichtübungen abgewandelt. Für Strukturvariationen boten sich die anderen Molekülregionen eher an.

Aus diesen Überlegungen resultierten einfache Phenylderivate wie **1–3**, aber auch Norstrobilurin A **5** und das „verkürzte“ Analogon **6** (Schema 2).<sup>[24, 25]</sup>



Schema 2. Strukturen und Aktivitäten einfacher Strobilurinanaloga. Die Aktivität wurde anhand der Atmungshemmung von und im Agar-Diffusionstest mit *Penicillium notatum* ermittelt.<sup>[24, 25]</sup>

Die Aktivität derartiger Verbindungen erreichte in den Labortests zwar nicht die Höhe des natürlichen Vorbilds, doch hatten immerhin einige von ihnen sowohl im Test auf Atmungshemmung bei dem repräsentativen Pilz *Penicillium notatum* als auch im Agar-Diffusionstest gegen die gleiche Spezies noch meßbare, wenn auch schwache Aktivität.

So konnten erste wichtige Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden:<sup>[24, 25]</sup> Die (*E*)-Konfiguration des Pharmakophors ist demnach wie in **1** essentiell, denn das (*Z*)-Isomer **2** war inaktiv. Substituenten im Arylrest wie in **3** schienen „erlaubt“ zu sein; sogar der C/N-Austausch in der Enolethergruppe, der zum Oximether **4** führte, verringerte die Aktivität nicht wesentlich. Wirkungsverluste traten hingegen beim gestreckten (*9E*)-Norstrobilurin A **5** ebenso wie bei der ähnlich geformten Variante **6** auf; diesen Verbindungen fehlte die charakteristische Molekülgestalt, die im Strobilurin A wie im Oudemansin A durch Verdrillung der zentralen Einfachbindung zu einer annähernd rechtwinkligen Anordnung des  $\beta$ -Methoxyacrylatpharmakophors relativ zur phenylsubstituierten Seitenkette führt (Abbildung 2). In den Varianten **1–4** fehlt die Seitenkette völlig.

Parallel zu diesen Leitstrukturvariationen wurde die Kooperation mit industriellen Partnern gesucht, um die Brauchbarkeit des Wirkstofftyps für eine Optimierung von Struktur und Wirkung unter dem Gesichtspunkt einer potentiellen Anwendung als Agrarfungizide oder Humanantimykotika zu eruieren. Die Resonanz in der Industrie war wegen aktueller, anderweitiger Prioritäten größtenteils zurückhaltend. 1982 bat Zeneca (damals noch ICI) um eine Probe Oudemansin

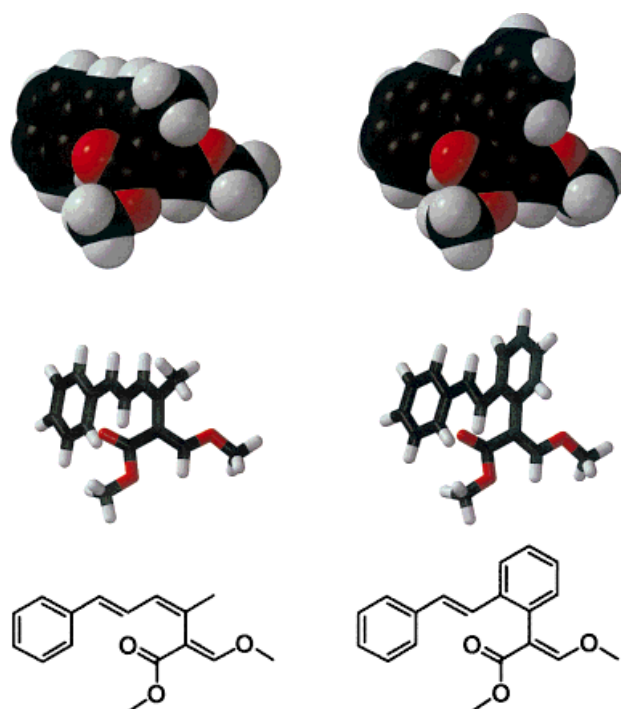
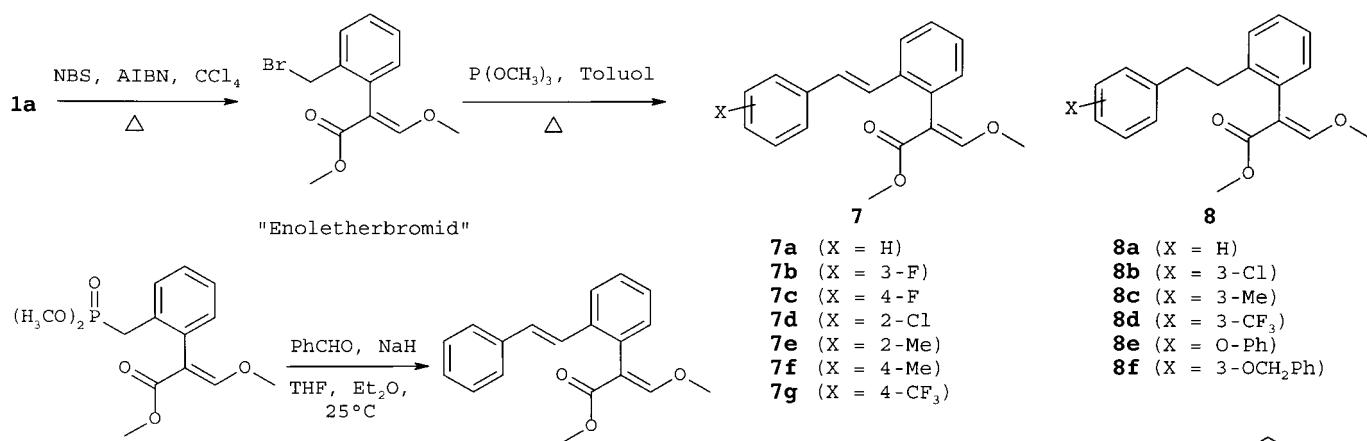


Abbildung 2. Computerberechnete Kalotten- und Stabmodelle von Strobilurin A (links) und des Enoletherstilbens **7a** (rechts). Kohlenstoff: schwarz, Sauerstoff: rot, Wasserstoff: weiß. (Wir danken Dr. W. Altenhofen, BASF, für die Rechnungen und die Computergraphiken.)

und erhielt diese von einem von uns (T.A.). 1983 zeigte die BASF im Rahmen eines mit öffentlichen Mitteln geförderten Gemeinschaftsprojekts mit mehreren Hochschularbeitskreisen<sup>[27]</sup> Interesse und erhielt Strobilurin A für In-vivo-Tests an pilzinfectierten Pflanzen im Gewächshaus. Die Testergebnisse waren enttäuschend: Die Wirkung war überraschend schwach und nur gegen zwei von sechs phytopathogenen Pilzen bei hohen Anwendungskonzentrationen gerade noch wahrnehmbar.<sup>[28]</sup> Dies entsprach nach den sehr guten Ergebnissen der Agar-Diffusionstests im Labor nicht den Erwartungen, so daß sich die Frage nach möglichen Ursachen stellte.

Gemeinsam mit Schirmer, der damals die Hochschulkoperationen für die BASF-Pflanzenschutzforschung betreute, stellten wir die Hypothese auf, daß das Triensystem in Strobilurin A zu einem raschen photolytischen und/oder oxidativen Abbau des Naturstoffs und damit zu einem raschem Wirkungsverlust unter den Bedingungen der Tests im Gewächshaus führt. Diese Hypothese war so plausibel, daß zunächst darauf verzichtet wurde, sie analytisch-experimentell zu verifizieren. Ein anderes Vorgehen schien attraktiver: Wir wollten das Triensystem durch Überbrücken mit einem Aren stabilisieren und in der Hoffnung auf eine verbesserte In-vivo-Wirkung das „Enoletherstilben“ **7a** synthetisieren und testen. Die Synthese wurde im Arbeitskreis Steglich nach den oben beschriebenen Vorarbeiten rasch realisiert (Schema 3).<sup>[29a]</sup>

In der Tat erwies sich **7a** als Volltreffer. Es wies nicht nur bei der Atmungshemmung gegen *P. notatum* eine im Vergleich zu Strobilurin A mindestens zehnfach höhere Aktivität auf,<sup>[29b,c]</sup> sondern erfüllte auch in vivo bei den Tests an pilzinfectierten Pflanzen im Gewächshaus hinsichtlich Wirkungsstärke und Wirkungsbreite die hochgesteckten Erwartungen. Gute



"Enoetherphosphonat"

Schema 3. Synthese des Enoetherstilbens **7a**.<sup>[24, 29a]</sup> – AIBN = 2,2'-Azobisisobutyronitril, NBS = *N*-Bromsuccinimid.

(<15% Befall) bis sehr gute Wirkungen (<5% Befall) bei Anwendungskonzentrationen von 63 ppm, teilweise noch bei 16 ppm, waren bei folgenden Pilzkrankheiten zu verzeichnen: Weizenmehltau (*Erysiphe graminis*), Weizenbraunrost (*Puccinia recondita*), Reisbrand (*Pyricularia oryzae*), Gerstenetzflecken (*Drechslera teres*), Rebenperonospora (*Plasmopara viticola*) und Krautfäule (*Phytophthora infestans*).<sup>[30]</sup>

Die Überbrückung durch das zentrale Aren im Enoletherstilben **7a** hatte demnach offenbar die Affinität zum mitochondrialen Wirkort nicht nur nicht vermindert, sondern der Tendenz nach sogar erhöht und darüber hinaus auch – wie erhofft – dem Molekül die benötigte Stabilität verliehen. Damit ist **7a** eine gegenüber Strobilurin A modifizierte, wirksamere und insgesamt aussichtsreichere Leitstruktur.

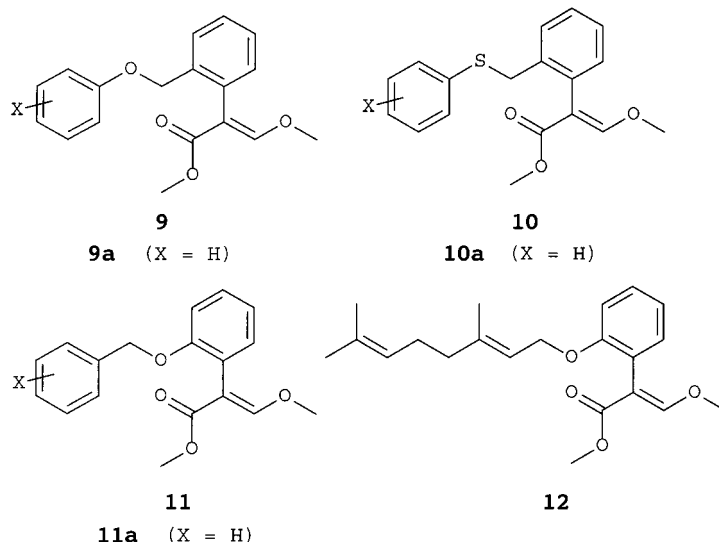
### 3.2. Eine weitere Generation von Strobilurinvarianten

An diesem Ergebnis orientierte sich die Synthese weiterer Varianten von **7**, z. B. die von **8–12** (Schema 4), unter zunehmender Beteiligung der BASF. Alle Verbindungen wiesen in den Labortests ähnliche Aktivitäten wie Strobilurin A auf, übertrafen dieses in den Gewächshaustests jedoch deutlich. Einige der neuen Derivate hatten in Abhängigkeit vom untersuchten Pilz zum Teil sogar eine höhere Wirksamkeit als das Enoletherstilben **7a**.<sup>[30]</sup>

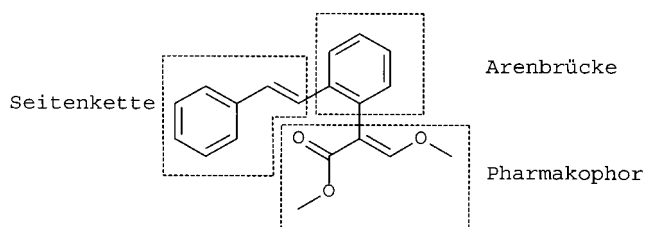
Für das Design von Strobilurinvarianten erwies sich die gedankliche Aufteilung der Leitstruktur Enoletherstilben in drei Molekülregionen als zweckmäßig: Seitenkette, Arenbrücke und Pharmakophor (Schema 5). Durch Variation der Seitenkette erhielten wir die Verbindungen **7**,<sup>[31]</sup> **8**,<sup>[32]</sup> **9** und **10**<sup>[33]</sup> sowie **11**,<sup>[34]</sup> für die jeweils gesonderte Patentanmeldungen eingereicht wurden.

### 3.3. Erste Freilandtests bei BASF

Der nächste Schritt bestand in der biologischen Untersuchung ausgewählter Verbindungen unter Freilandbedin-



Schema 4. Vom Enoletherstilben **7a** abgeleitete Strobilurinvarianten.<sup>[24, 31–34]</sup>



Schema 5. Die Regionen der Enoletherstilben-Leitstruktur, die strukturell modifiziert wurden.

gungen. Im Ablauf einer Leitstrukturoptimierung bedarf der Übergang von Tests im Gewächshaus zu Versuchen im Freiland besonderer Aufmerksamkeit. Drei Aspekte sind dabei ausschlaggebend:

- Die benötigten Wirkstoffmengen und damit der Syntheseaufwand steigen stark an. Zur Durchführung von In-vitro- und anderen Tests im Labor reichen in der Regel wenige Milligramm, und selbst für ausführliche Verdünnungsreihen bei Anwendungen im Gewächshaus genügt pro Testsubstanz eine Wirkstoffmenge von insgesamt ca. 100 mg. Dadurch ist der Test von Tausenden einzelner Strukturvarianten pro Jahr ohne weiteres möglich und Routine. Demgegenüber erfordert die erste Prüfung im Freiland – üblicherweise in quadratmetergroßen Kleinparzellen – bei Aufwandmengen von 100–1000 g ha<sup>-1</sup> je nach Kulturpflanze,

Pilzpathogen und Zahl der Behandlungen zwischen einem und zehn Gramm pro Indikation, insgesamt also Nachlieferungsmengen bis zu 100 g; hinzu kommen Wirkstoffmengen für die Ausarbeitung von Formulierungen zu einer für den Einsatz im Freiland geeigneten Aufbereitung der Wirkstoffe, z.B. als Emulsionskonzentrat, Suspensionskonzentrat oder wasserdispergierbares Pulver oder Granulat.

- Aus diesen und anderen, sich aus der Praxis ergebenden Gründen ist die Zahl der im Freiland testbaren Verbindungen auf kaum mehr als hundert pro Jahr begrenzt. Verbindungen, die nicht in die Freilandtests gelangen, sind damit bereits nahezu endgültig aus dem Optimierungsprozeß ausgeschieden.

- Langjährige Erfahrung hat gezeigt, daß die Modelltests im Gewächshaus nur eine begrenzte Prognosesicherheit für die praxisrelevanten und deshalb entscheidenden Wirkungen im Freiland bieten. Offensichtliche Diskrepanzen<sup>[35a]</sup> im Sinne falsch positiver wie falsch negativer Resultate bei Gewächshaustests<sup>[35b]</sup> sind besonders dann möglich, wenn es um die Rangfolge der Wirkstärken innerhalb einer Gruppe aktiver Verbindungen geht.<sup>[35c, 36]</sup> In Tabelle 1 wird dies in der jeweils letzten Zeile deutlich: Die Rangkorrelationskoeffizienten<sup>[39]</sup> zwischen den Ergebnissen von Freiland- und Gewächshaustests reichen von brauchbaren (0.74 für Weizenmehltau, 0.6 für Krautfäule) bis zu weniger prognosegeeigneten Werten (z.B. –0.3 für Netzfleckenkrankheit).

Insofern wird die Selektion der „richtigen“ Kandidaten für die Freilandprüfungen zu einem kritischen, wegen der vegetationsbedingt nur saisonal in jährlichem Rhythmus<sup>[37]</sup> möglichen Freilandtests geschwindigkeitsbestimmenden und damit auch für den Gesamterfolg entscheidenden Schritt<sup>[36]</sup> im gesamten Prozeß der Leitstrukturoptimierung (siehe Abbildung 4, Abschnitt 4.4).

Bei der BASF wurden für die Kleinparzellenversuche der Saison 1986 aus den bis Dezember 1985 synthetisierten rund 100 Strobilurinderivaten zunächst 15 Verbindungen selektiert und je nach den Ergebnissen der vorangegangenen Gewächshaustests für mehrere Indikationen untersucht. In Tabelle 1 sind diese Verbindungen und die zugehörigen Ergebnisse zusammengefaßt.<sup>[38]</sup>

Beim Freilandversuch gegen Weizenmehltau fällt die klare Aufteilung in Verbindungen mit guter Wirkung wie die vier Dihydrostilbene **8** einerseits und unwirksame Verbindungen wie die Stilbene **7** andererseits auf. Dies erscheint angesichts der Photolabilität von Stilbenen verständlich, die bekanntlich nach (*E*) → (*Z*)-Isomerisierung leicht eine Photocyclisierung zu Dihydrophenanthrenen und anschließende Folgereaktionen, z.B. die oxidative Aromatisierung, eingehen können.<sup>[40]</sup> Insgesamt ist die Rangkorrelation mit den Ergebnissen der Gewächshaustests für die untersuchten Verbindungen als gut einzustufen ( $r_s = 0.74$ ); allerdings war die schlechtere Wirkung der Stilbene **7** im Gewächshaus nicht so ausgeprägt wie unter den photochemisch stärker belastenden Freilandbedingungen. Besonders bemerkenswert war die Wirkung von **8d** gegen Weizenmehltau im Freilandversuch. Die Verbindung übertraf bei maximalem Befallsdruck (100 % Befall in den unbehandelten Parzellen) – allerdings bei höherer Aufwandmenge (1000 g) – das Standard-Vergleichsmittel Corbel – ein motivierendes Ergebnis.

Beim Test gegen die Netzfleckenkrankheit erwiesen sich bei geringerem Befallsdruck (35 %) sogar die drei hier geprüften Stilbene **7** als einigermaßen wirksam. Das einzige getestete Dihydrostilben **8d** war demgegenüber wieder deutlich aktiver und übertraf – bei allerdings doppelter Aufwandmenge – das Standard-Vergleichsmittel Desmel.

Eine starke Wirkung wies **8d** auf, der Spitzenreiter gegen Weizenmehltau, auch im Versuch gegen die Spelzenbräune, diesmal jedoch dicht gefolgt vom Stilben **7e**. Die Anwendung gegen Weizenbraunrost war wegen des besonders niedrigen Befallsdrucks (18 %) und der relativ schwachen Wirkung der fünf getesteten Dihydrostilbene nicht besonders aussagekräftig. Als Mittel gegen Krautfäule fiel bei hohem Befallsdruck das Dihydrostilben **8a** als beste Verbindung auf, aber auch zwei Stilbene hatten meßbare Wirkung. Bei Anwendungen gegen Apfelschorf lag das Stilben **7a** mit sehr guter Wirkung auf Rang 1 und damit auf dem Niveau des Standard-Vergleichsmittels. Zusammenfassend war im Hinblick auf Struktur-Wirkungs-Beziehungen festzustellen, daß die photolabilen Stilbene gegenüber den Dihydrostilbenen im Freiland deutlich abfielen. Erstere waren aber immerhin in Versuchen wirksam, bei denen der Zeitraum zwischen Wirkstoffapplikation und Versuchsauswertung relativ kurz war (bei den Anwendungen gegen Spelzenbräune, Krautfäule und Apfelschorf), d.h. nach 8 Tagen gegenüber ca. 30 Tagen bei den übrigen Versuchen. Zu den Strukturtypen **9** und **10** lag nur ein Ergebnis aus Freilandversuchen mit je einer einzigen Verbindung vor; eine fundierte Beurteilung war deshalb noch nicht möglich.

Die ersten Resultate aus diesen für die Beurteilung des ganzen Strukturtyps entscheidenden Kleinparzellenversuchen unter Freilandbedingungen wurden im Mai 1986 erhalten. Bereits zu diesem Zeitpunkt lagen einige höchst erfreuliche Ergebnisse vor, beispielsweise erste Hinweise auf die sehr guten, auf dem Niveau des Standard-Vergleichsmittels Corbel liegenden Wirkungen von **8a**, **8b** und **8d**. Auch die ersten Befunde bei der Anwendung gegen die Netzfleckenkrankheit in Gerste, z.B. nach Behandlung mit **8b**, gaben Anlaß zu hochgesteckten Erwartungen: Es kam Euphorie auf. Die Geburt einer neuen fungiziden Wirkstoffklasse schien nicht nur glücklich überstanden, der weiteren Entwicklung der Babys konnte hoffnungsvoll und zuversichtlich entgegen gesehen werden.

Mitten in dieser Aufbruchstimmung mußten wir eine – aus unserer Sicht böse – Überraschung hinnehmen: Ende April 1986 wurde eine umfassende Patentanmeldung der Firma ICI (heute Zeneca) veröffentlicht,<sup>[41]</sup> von der wir wenig später Kenntnis erhielten. Das erste Prioritätsdatum war der 19.10.1984.<sup>[42]</sup> Die Grundformel **I** des äußerst breitgefaßten allgemeinen Anspruchs ist in Schema 6 wiedergegeben.  $R^1$  und  $R^2$  stehen für breitest variable Substituenten von Wasserstoff bis zu gegebenenfalls substituierten („optionally substituted“) Alkyl-, Aryl-, Cycloalkylalkyl- und ähnlichen Resten.<sup>[43]</sup> Noch variantenreicher waren die Definitionen für X, Y und Z. Andererseits war jedoch bereits ab dem Unteranspruch 7<sup>[41]</sup> (Formel **XII** in Schema 6) der eigentliche Kern definiert. Weitere Unteransprüche galten z.B. dem Strukturtyp **13**. Als Einzelverbindungen waren „unser“ Enoletherstil-



Tabelle 1. Testergebnisse und Wirkungsrangfolge von Strobilurinen bei der Anwendung gegen Pilzkrankheiten im Freiland 1986<sup>[38]</sup> und im Gewächshaus.<sup>[30]</sup>

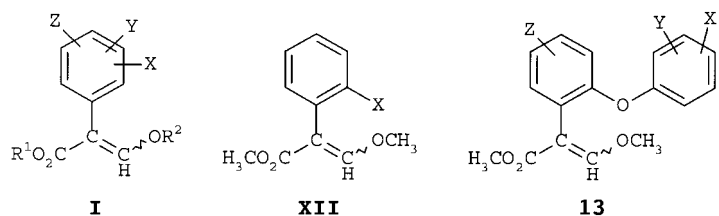
Verbindung	Weizenmehltau <sup>[a]</sup>			Netzflecken <sup>[f]</sup>			Spelzenbräune <sup>[i]</sup>		
	Pilzbefall <sup>[b]</sup> [%]	R <sub>F</sub> <sup>[c]</sup>	R <sub>G</sub> <sup>[d,e]</sup>	Pilzbefall <sup>[g]</sup> [%]	R <sub>F</sub> <sup>[c]</sup>	R <sub>G</sub> <sup>[h]</sup>	Pilzbefall <sup>[j]</sup> [%]	R <sub>F</sub> <sup>[c]</sup>	R <sub>G</sub> <sup>[k]</sup>
<b>7a</b>				28	5	2	30	6	1
<b>7b</b>	100	7	9	25	4	3			
<b>7c</b>	100	7	7						
<b>7d</b>				22	3	1			
<b>7e</b>	100	7	3				10	2	4.5
<b>7f</b>	100	7	8						
<b>7g</b>	100	7	6				61	7	8
<b>8a</b>	22	2.5	1				18	5	4.5
<b>8b</b>	22	2.5	5	4	1	4	13	4	4.5
<b>8c</b>	31	4	4				12	3	4.5
<b>8d</b>	15	1	2				8	1	4.5
<b>8e</b>							68	8	4.5
<b>8f</b>									
<b>9a</b>									
<b>10a</b>				18	2	5			
unbehandelt	100			35			71		
Standard	18			5			5		
r <sub>s</sub> <sup>[u]</sup>		0.74			− 0.30			0.23	

Verbindung	Weizenbraunrost <sup>[e]</sup>			Krautfäule <sup>[o]</sup>			Apfelschorf <sup>[t]</sup>		
	Pilzbefall <sup>[m]</sup> [%]	R <sub>F</sub> <sup>[c]</sup>	R <sub>G</sub> <sup>[n]</sup>	Pilzbefall <sup>[p]</sup> [%]	R <sub>F</sub> <sup>[c]</sup>	R <sub>G</sub> <sup>[q]</sup>	Pilzbefall <sup>[s]</sup> [%]	R <sub>F</sub> <sup>[c]</sup>	R <sub>G</sub> <sup>[t]</sup>
<b>7a</b>				68	3	1	5	1	3
<b>7b</b>									
<b>7c</b>									
<b>7d</b>									
<b>7e</b>									
<b>7f</b>				61	2	2			
<b>7g</b>									
<b>8a</b>	18	5	4	33	1	3			
<b>8b</b>	10	1.5	2						
<b>8c</b>	10	1.5	4						
<b>8d</b>	12	3	4						
<b>8e</b>				84	5	5	8	2	2
<b>8f</b>				77	4	4	15	3	1
<b>9a</b>	15	4	1						
<b>10a</b>									
unbehandelt	18			84			77		
Standard	9			14			6		
r <sub>s</sub> <sup>[u]</sup>		0.13			0.6			− 1.0	

[a] *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. [b] Kleinparzellenversuch an Winterweizen; Spontaninfektion; Behandlung nach 2.5 % Vorbefall mit je 750 g ha<sup>−1</sup> Wirkstoff; Auswertung 31 Tage nach Behandlung; Standard-Vergleichssubstanz: Corbel, 750 g ha<sup>−1</sup>. [c] R<sub>F</sub> = Rangplatz im Freiland gemäß der Definition in Lit. [39] innerhalb der getesteten Verbindungen (senkrechte Spalte). [d] R<sub>G</sub> = Rangplatz im Gewächshaus, ermittelt aus mehreren Versuchen nach Behandlung mit verschiedenen Spritzkonzentrationen. [e] Zur Ermittlung von R<sub>G</sub> wurden protektive Behandlungen im Gewächshaus mit Spritzkonzentrationen von 16, 8, 4, 2 und 1 ppm herangezogen. Die Rangfolge ändert sich bei entsprechenden kurativen Tests; die Ergebnisse dieser Versuche liefern erwartungsgemäß eine bessere Rangkorrelation mit den Ergebnissen des (teilweise kurativen) Freilandversuchs: r<sub>s</sub> = 0.87. [f] *Pyrenophora teres* f. sp. *hordei* (Netzfleckenkrankheit an Gerste). [g] Kleinparzellenversuch mit Wintergerste; zweimalige künstliche Infektion 5 und 2 Tage vor der Behandlung mit je 1000 g ha<sup>−1</sup> Wirkstoff; Auswertung 36 Tage nach Behandlung; Standard-Vergleichssubstanz: Desmel, 500 g ha<sup>−1</sup>. [h] Ermittelt aus protektiven Tests im Gewächshaus nach Behandlung mit Spritzkonzentrationen von 250, 125, 63 und 31 ppm. [i] *Leptosphaeria nodorum* an Weizen. [j] Kleinparzellenversuch an Winterweizen; künstliche Infektion 3 Tage nach Behandlung mit je 1000 g ha<sup>−1</sup> Wirkstoff; Standard-Vergleichssubstanz: Desmel, 250 g ha<sup>−1</sup>. [k] Ermittelt aus protektiven Tests im Gewächshaus nach Behandlung mit Spritzkonzentrationen von 125, 63 und 31 ppm. [l] *Puccinia recondita* (Weizenbraunrost). [m] Kleinparzellenversuch an Winterweizen; Spontaninfektion; Behandlung ohne Vorbefall mit je 750 g ha<sup>−1</sup> Wirkstoff; Auswertung 32 Tage nach Behandlung; Standard-Vergleichssubstanz: Impact, 125 g ha<sup>−1</sup>. [n] Ermittelt aus kurativen Tests im Gewächshaus nach Behandlung mit Spritzkonzentrationen von 250, 63 und 16 ppm. [o] *Phytophthora infestans*. [p] Kleinparzellenversuch an Kartoffeln; Spontaninfektion; dreimalige Behandlung ohne Vorbefall in wöchentlichem Rhythmus mit je 1000 g ha<sup>−1</sup> Wirkstoff; Auswertung 30 Tage nach der letzten Behandlung; Standard-Vergleichssubstanz: Polyram-Combi (80proz.), 500 g ha<sup>−1</sup>. [q] Ermittelt aus protektiven Tests im Gewächshaus an Tomatenpflänzchen nach Behandlung mit Spritzkonzentrationen von 63, 31 und 16 ppm. [r] *Venturia inaequalis*. [s] Versuch an Apfelbäumen, Sorte Golden Delicious; Spontaninfektion; 18malige Behandlung in wöchentlichem Rhythmus ohne Vorbefall mit je 210 g ha<sup>−1</sup> Wirkstoff; Auswertung 7 Tage nach der letzten Behandlung, dabei wurde nur der Befall auf den bei Behandlungsbeginn vorhandenen Blättern berücksichtigt; Standard-Vergleichssubstanz: Baycor, 140 g ha<sup>−1</sup>. [t] Ermittelt aus kurativen Tests an Apfelsämlingen im Gewächshaus nach Behandlung mit Spritzkonzentrationen von 75 und 31 ppm. [u] r<sub>s</sub> ist der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman;<sup>[39]</sup> es wurden die Rangfolgen der Reihen R<sub>G</sub> und R<sub>F</sub> miteinander korreliert.

ben **7a** und die bereits in unserem Freilandversuch aufgefallene, hydrierte Variante **8a** beansprucht. Frappant war die Parallelität mit unseren Ideen und Konzepten im Kern jener Anmeldung. Alle BASF-Anmeldungen über die Enol-ether-Strobilurine<sup>[31–34]</sup> waren von dieser patentrechtlich vor-

rangigen Basisanmeldung betroffen – ein Desaster, das uns zu diesem Zeitpunkt um so mehr zurückwarf, als wir gerade begonnen hatten, das große Potential der Strobilurine auch unter dem Aspekt praktischer Einsatzmöglichkeiten zu verifizieren.



Schema 6. Formeln aus den Ansprüchen der ICI-Patentanmeldung<sup>[41]</sup> über die Enoether-Strobilurine. Näheres siehe Text.

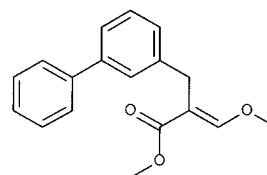
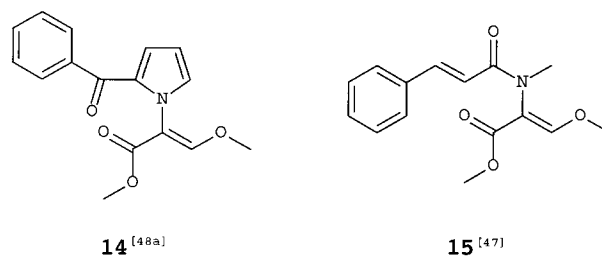
Intern stellten wir uns kritische Fragen: Wie war so etwas möglich? Hatten wir geschlafen? Waren Indiskretionen, war gar „Spionage“ im Spiel? Die Antwort war bald gefunden. Sie war eindeutig, klar und einfach: Alles hatte sich im Rahmen eines fairen Wettbewerbs forschender Arbeitsgruppen vollzogen.

### 3.4. Der Weg des Zeneca-Forschungsteams zu Azoxystrobin<sup>[44, 45]</sup>

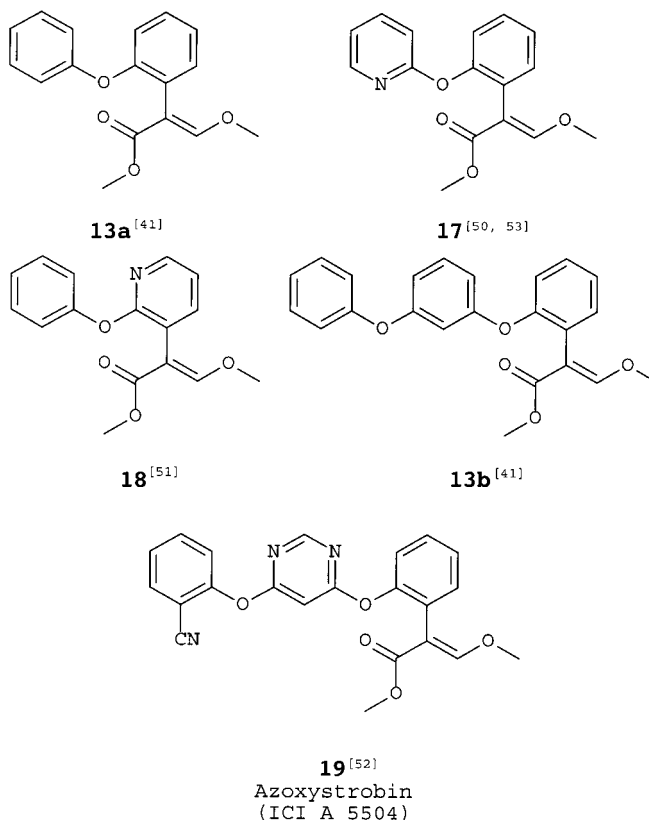
Anfang der achtziger Jahre hatte man bei Zeneca begonnen, sich systematisch und verstärkt mit Naturstoffen als möglichen Leitstrukturen für Fungizide zu beschäftigen. Dabei fiel Baldwin, einem Biochemiker im Zeneca-Team für Fungizidforschung, die bereits erwähnte Arbeit<sup>[21b]</sup> über die gemeinsamen Strukturelemente und den gemeinsamen Wirkungsmechanismus von Oudemansin, Strobilurin A und B sowie Myxothiazol auf. Zeneca bat daraufhin einen von uns (T.A.) um eine Probe Oudemansin A für Gewächshaustests und erhielt im Juni 1982 4 mg kristalline Substanz. Die Ergebnisse der Gewächshaustests bei Zeneca<sup>[46]</sup> gegen acht Pathogene waren höchst beeindruckend. Im Gegensatz zu Strobilurin A ist Oudemansin A unter Gewächshausbedingungen nämlich hinreichend stabil und hat deshalb auch dort bereits bei der niedrigen Anwendungskonzentration von 33 ppm reproduzierbar sehr hohe fungizide Wirkungen und ein auffallend breites Wirkungsspektrum. Stimuliert durch diese überzeugenden Testergebnisse griff Zeneca unter der Leitung von Clough die Thematik Strobilurine – damals allerdings noch unter der Bezeichnung  $\beta$ -Methoxyacrylate – rasch auf breiter Front auf. Unter anderem wurden stereoselektive Synthesen für (9*E*)- und (9*Z*)-Strobilurin A konzipiert und realisiert<sup>[45e]</sup> und damit unabhängig von uns die richtige Konfiguration des Naturstoffs Strobilurin A bestätigt. Im Anschluß daran konnte anhand analytischer Untersuchungen gezeigt werden, daß für die unzureichende Wirkung des synthetischen (9*Z*)-Strobilurins A bei den Gewächshaustests neben seiner relativ hohen Flüchtigkeit die äußerst hohe Photolabilität verantwortlich ist.<sup>[45a,b]</sup>

Ähnliche Überlegungen wie bei uns führten auch bei Zeneca bald zur Synthese des Enoetherstilbens **7a**. Parallel dazu wurde aber auch schon eine Reihe anderer stabilisierter, wirksamer und leicht zugänglicher Varianten synthetisiert, z. B. **14–16** (Schema 7).

Für den Fortschritt der Arbeiten bei Zeneca spielte der Diphenylether **13a** eine entscheidende Rolle (Schema 8). Im Vergleich zum Enoetherstilben **7a** war seine Photostabilität



Schema 7. Stabilisierte, aktive Strobilurinvarianten aus der Anfangsphase der Leitstrukturoptimierung bei Zeneca.<sup>[45e]</sup>



Schema 8. Bei Zeneca auf dem Weg zu Azoxystrobin hergestellte Strobilurinanaloga mit Variationen in der Seitenkette und der Arenbrücke.<sup>[45e]</sup>

nochmals verbessert, die Aktivität im Gewächshaus und im Freiland war hoch und sein Wirkungsspektrum breit.<sup>[45e]</sup> Hinzu kam eine Moleküleigenschaft, nach der man bei Zeneca gezielt Ausschau hielt und auf die man das biologische Screening-Programm entsprechend ausgerichtet hatte: die systemische Beweglichkeit im wäßrigen Saftstrom der behandelten Pflanzen. Sie führt dazu, daß ein systemischer Wirkstoff nach der Applikation nicht nur dort verbleibt, wo die

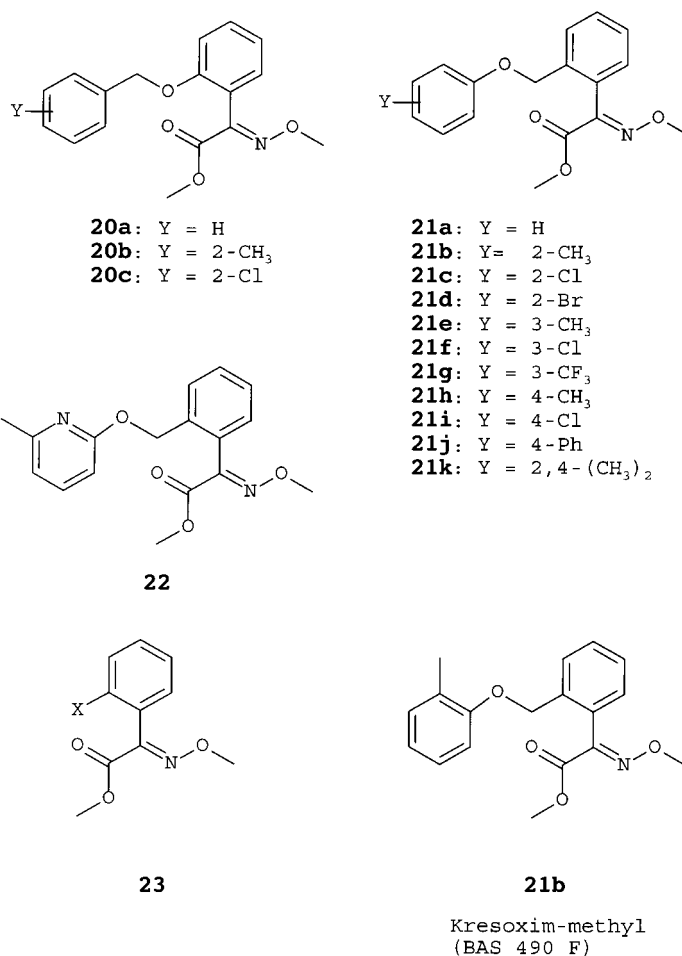
Pflanzenoberfläche von der Spritzbrühe getroffen wurde, sondern in die Pflanze penetriert und dort in gelöster Form transportiert wird.<sup>[49]</sup> Der systemische Transport eines Fungizids hat zur Folge, daß die Wirkung nicht nur lokal begrenzt bleibt, sondern sich wegen der Verteilungsprozesse auch auf nicht betroffene Pflanzenteile ausdehnen kann. Bei Zeneca wurde der Schluß gezogen, daß auch die systemische Verteilung beim Diphenylether **13a** ursächlich für die im Freiland beobachtete, besonders gute fungizide Wirkung war, gleichzeitig jedoch auch zu den leichten phytotoxischen Schäden bei einigen empfindlichen Pflanzenarten beitrug. Das Ziel der weiteren Optimierung war es daher, die Lipophilie neuer Strukturvarianten so niedrig zu halten, daß ein systemischer Transport möglich war,<sup>[49c]</sup> gleichzeitig aber keine Phytotoxizität auftrat. Die Einführung von Heteroatomen wie in den Verbindungen **17** und **18** erwies sich diesbezüglich als vorteilhaft. Die Verbindung **13b** brachte in anderer Hinsicht einen Fortschritt: Ihre Wirksamkeit war im Gewächshaus der von **13a** überlegen. Dies sprach für ein besseres Andocken am mitochondrialen bc<sub>1</sub>-Komplex. Allerdings stieg durch den zusätzlichen Phenoxy-substituenten die Lipophilie so stark an, daß die systemische Beweglichkeit verloren ging.<sup>[49c, 54]</sup> Die Einführung hydrophiler Strukturelemente in die lipophile Seitenkette von **13b** lieferte schließlich **19** als Ergebnis der Leitstrukturoptimierung. Die Verbindung hatte die gewünschten physikochemischen und biologischen Eigenschaften und wurde zunächst unter der Code-Nr. ICIA 5504, später unter der Internationalen Kurzbezeichnung (common name) Azoxystrobin entwickelt und im Februar 1996 in Deutschland unter dem Handelsnamen Amistar am Markt eingeführt.<sup>[45e]</sup> Einzelheiten zum biologischen Wirkungsprofil von Azoxystrobin und weiteren Strobilurinen sind vergleichend im Abschnitt 5.3 dargelegt.

### 3.5. Die zweite Phase der Leitstrukturoptimierung bei BASF: der Weg zu Kresoxim-methyl<sup>[28]</sup>

Nach dem Einreichen und der Veröffentlichung ihrer Enolether-Basisanmeldung<sup>[41]</sup> im April 1986 konnte sich das Zeneca-Team aufgrund seiner komfortablen patentrechtlichen Situation relativ gelassen der Optimierung der Seitenkette unter Beibehaltung des Enolether-Pharmakophors zuwenden. Ganz anders war dagegen die Lage für das Fungizid-Team der BASF im Mai 1986. Die veröffentlichten Ansprüche von Zeneca schienen „wasserdicht“, echte Lücken waren zunächst nur bei der Arenbrücke erkennbar. Es bestand die Gefahr,<sup>[55]</sup> daß unsere bisherigen Arbeiten auf diesem Gebiet – zumindest für uns – vergeblich waren. Dennoch verlangten die zu diesem Zeitpunkt eingetroffenen, vielversprechenden Ergebnisse der Freilandversuche (siehe Tabelle 1) geradezu kategorisch danach, daß ein Ausweg gefunden werden mußte. Zu verlockend erschienen sowohl das biologische Potential der neuen Stoffklasse als auch die große Variationsbreite von Arenbrücke und Seitenkette, die unter anderem aus den Zeneca-Anmeldungen<sup>[41, 47]</sup> erkennbar waren. Als Folge dieser Überlegungen entschloß sich das BASF-Team, die einzige wirkliche Lücke der engmaschigen Patentansprüche von Zeneca anzugreifen und den Pharmakophor abzuwandeln.<sup>[56]</sup>

Variationen des Pharmakophors einer Wirkstoffklasse bringen stets ein besonders hohes Risiko eines drastischen Aktivitätsverlustes mit sich, weil der Pharmakophor – per definitionem – diejenige Gruppe einer Wirkstoffklasse ist, die über intermolekulare Wechselwirkungen den entscheidenden energetischen Beitrag für das Andocken am Target liefert. Fast immer sind daran Heteroatome beteiligt, die polare Wechselwirkungen und spezielle, vektoriell-räumliche Anordnungen in bezug auf den Rest des Wirkstoffmoleküls ermöglichen. Der Enolether-Pharmakophor enthält drei solche Heteroatome, jeweils Sauerstoffatome. Über ihre Funktion beim Andocken an den bc<sub>1</sub>-Komplex war damals nichts bekannt.

Im BASF-Team hatten Wenderoth und Rentzea bereits begonnen, die Enolether-Gruppe im Pharmakophor durch eine Oximether-Einheit zu ersetzen. Wie die Analyse des Pharmakophors ergibt, bleiben dabei nicht nur alle drei ursprünglichen Heteroatome erhalten, sondern wahrscheinlich auch – wie bereits ohne Computermodelle erkennbar ist – die *Möglichkeiten* ihrer vektoriellen Ausrichtung, sofern die als essentiell erkannte (*E*)-Konfiguration an der Doppelbindung beibehalten wird (siehe Schema 2, **1** versus **2**). Lediglich das sp<sup>2</sup>-hybridisierte Stickstoffatom war neu. Erste Derivate (**20a** und **21a**) der Strukturtypen **20** und **21** (Schema 9) waren bereits synthetisiert und im Gewächshaus getestet worden.



Schema 9. Die ersten bei der BASF auf dem Weg zu Kresoxim-methyl synthetisierten Strobilurine (**20–22**) des Strukturtyps **23** mit Oximether-Pharmakophor.



Wir waren wegen guter In-vitro-Ergebnisse und erster Resultate aus Gewächshaustests sicher, daß in diesen Oximethern ein hohes biologisches Potential steckt. Wegen der Konkurrenzsituation zu Zeneca wurde bereits im Juli 1986 eine entsprechende Patentanmeldung<sup>[57]</sup> eingereicht – zum Glück für uns, wie sich später herausstellte. Was wir damals noch nicht wußten, wohl aber befürchten mußten, war, daß die Zeneca-Gruppe die gleichen Ideen verfolgte und ihrerseits dabei war, die Oximether anzumelden.<sup>[58]</sup> Zunächst mußte jedoch die übliche achtzehnmonatige Wartezeit nach der Patenteinreichung<sup>[42]</sup> überstanden werden. Erst im Januar 1988 war klar, daß wir diesmal mit einem Prioritätsvorsprung von nur zwei Tagen(!) die zweite Runde des Wettlaufs für uns hatten entscheiden können.

Zwischenzeitlich gingen bei der BASF die Optimierungsarbeiten an den Oximethern weiter. Für die Freilandsaison 1988 waren zwei Derivate von **20**, **20b** und **20c**, wegen ihrer guten Wirkung gegen Weizenmehltau im Gewächshaus für Kleinparzellenversuche vorgesehen. Diese Wirkung bestätigte sich dort und lag auf ähnlichem Niveau wie die Standard-Vergleichsverbindung Corbel.

Entscheidend für den weiteren Fortgang der Leitstruktur-optimierung war, daß ab Juni 1987 bei der BASF ein biochemischer Test<sup>[59]</sup> zur Verfügung stand, mit dem sich die Frage, wie gut die Strobilurinvarianten am mitochondrialen bc<sub>1</sub>-Komplex andocken, wesentlich direkter beantworten ließ als mit den etablierten Gewächshaus- oder gar Freilandtests. Submitochondriale Präparationen aus Hefezellen wurden als Modellsysteme für die Atmungskette von Pilzen benutzt. Der Test liefert als Endergebnis eine Aussage über die inhibierende Aktivität der Testsubstanzen gegenüber dem bc<sub>1</sub>-Komplex in Form von I<sub>50</sub>-Werten, also denjenigen Wirkstoffkonzentrationen, die für eine 50%ige Hemmung notwendig sind. Dabei gilt: Je kleiner der I<sub>50</sub>-Wert ist, desto aktiver ist die jeweilige Verbindung.<sup>[60]</sup>

Mit diesen Tests konnten recht bald sehr klare Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden (siehe auch Abschnitt 4.1). Bei einem paarweise durchgeführten Vergleich von Enol- und Oximethern mit identischer Seitenkette – die Arenbrücke war stets eine Phenyleneinheit – zeigte sich, daß beide Pharmakophortypen am Wirkort gleichwertig sind und dort keine wesentlichen Aktivitätsunterschiede verursachen. Beide Pharmakophore docken also gleichermaßen gut an – ein Erfolgserlebnis. Weiterhin ging aus einem wiederum paarweise durchgeführten Vergleich eindeutig hervor, daß die Derivate des Typs **21** durchschnittlich ca. zehnmal aktiver sind als die entsprechenden Regioisomere **20**. Dieses Ergebnis war aus den Gewächshausversuchen nicht oder nicht so eindeutig zu erkennen, da dort die markanten Unterschiede durch den Einfluß verschiedener Faktoren der komplexeren Versuchsanordnungen verwischt wurden, also gewissermaßen im Rauschen untergingen.<sup>[61]</sup>

Die Ergebnisse waren für das weitere Vorgehen maßgebend und führten dazu, die Oximether **21** mit Phenoxy-methyl-Seitenkette im weiteren Syntheseprogramm zu favorisieren und die Selektion der Testsubstanzen für die Freilandsaison 1989 auf Derivate des aktiveren Strukturtyps **21** zu konzentrieren. Die zehn Varianten **21b–k** sowie das heterocyclische Derivat **22** wurden im Freiland getestet. Die Erwar-

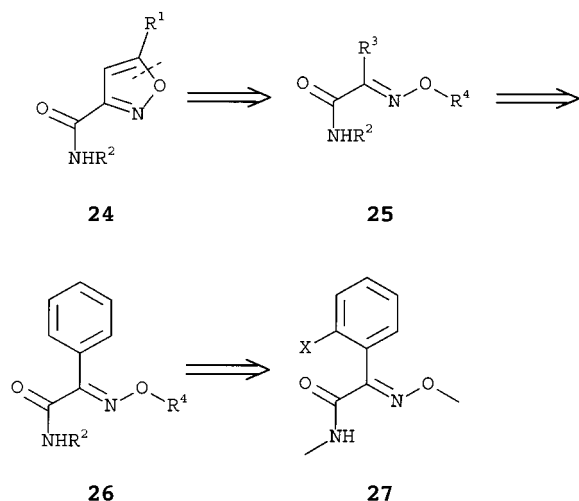
tungen waren hoch, hatten doch bereits in der Freilandsaison 1988 zwei Derivate des am Wirkort schwächer aktiven Typs **20** bemerkenswerte Resultate ergeben. Die Erwartungen wurden vollständig erfüllt: Alle Varianten des Typs **21** waren im Freiland mehr oder weniger aktiv, speziell gegen Getreidemehltau, aber auch gegen weitere Getreidekrankheiten wie Spelzenbräune und Netzfleckenkrankheit. Ein Vergleich mit **20b** und **c**, den beiden Verbindungen der vorherigen Generation mit Benzyloxy-Seitenkette, zeigte klar die Überlegenheit des neuen Typs **21** unter Freilandbedingungen. Weiterhin waren bei den Anwendungen gegen Weizenmehltau klare Wirkungsvorteile der Oximether **21** gegenüber einigen zum Vergleich ebenfalls getesteten Enolethern zu erkennen.

Unter den Wirkstoffen des Typs **21** mit herausragender Aktivität wurde unter anderem aus Gründen der Wirtschaftlichkeit **21b** (das spätere Kresoxim-methyl) für die weitere Entwicklung ausgewählt; **21b** verband in optimaler Weise eine hohe fungizide Wirkung mit günstigen Perspektiven für eine kostengünstige technische Synthese, da für den Aufbau der Seitenkette lediglich das billige Großprodukt *o*-Kresol als Baustein benötigt wird.<sup>[62]</sup>

**21b** wurde zunächst unter der Code-Nr. BAS490F, später unter dem Common name Kresoxim-methyl entwickelt und wiederum im Wettlauf mit Zeneca im Februar 1996 in Deutschland behördlich zugelassen und am Markt eingeführt, wenige Tage vor der Zulassung von Azoxystrobin. Einzelheiten über seine biologischen Eigenschaften und die daraus resultierende Marktpositionierung sind in Abschnitt 5.3 dargestellt.

### 3.6. Der Einstieg des Shionogi-Teams in die Strobilurinchemie<sup>[63]</sup>

Eher zufällig, aus einer ganz anderen Richtung und auf anderem Weg gelangten Fungizidforscher der Firma Shionogi zu den Strobilurinen. Dort waren nicht die Naturstoffe Strobilurin A und Oudemansin A mit ihren vielversprechenden biologischen Wirkungen der Ausgangspunkt, sondern eine völlig andere, „hauseigene“ Verbindungsgruppe: die Carbamoylisoaxazole **24** (Schema 10)<sup>[63]</sup> mit fungizider Wirkung gegen Reiskrankheiten. Ein Zusammenhang zwischen diesen Heterocyclen und Strobilurinen ist nicht erkennbar. Verbindungen des Typs **24** fehlen zwei der für Strobilurine typischen Merkmale: das breite fungizide Wirkungsspektrum und der charakteristische Wirkungsmechanismus der Atmungshemmung. Bei der Strukturvariation von **24** verfolgte das Shionogi-Team mit einer im wesentlichen auf strukturchemischen Überlegungen und der effizienten Umsetzung von hauseigenem „Synthese-Know-how“ beruhenden Gedankenkette, neuen Strukturen und biologischen Tests den in Schema 10 skizzierten Weg<sup>[63]</sup> und gelangte so zu den Oximetheramidinen **26**. Die Struktur dieser Verbindungen ist den Oximether-Strobilurinen bereits so ähnlich (siehe z. B. **4**, **20–23**), daß es nicht verwundert, daß das Shionogi-Team durch systematische Variation schließlich zum Verbindungstyp **27** gelangte und dessen biologisches Potential sowie den Zusammenhang mit den Strobilurinen von BASF und Zeneca erkannte. In Kenntnis<sup>[63b]</sup> der Anfang 1988 offengelegten



Schema 10. Der bei Shionogi gedanklich verfolgte Weg zu den Oximetheramiden **27**.<sup>[63]</sup>

Oximether-Patente<sup>[57, 58]</sup> und der übrigen bis dahin publizierten Strobilurin-Anmeldungen reichte Shionogi eine Patentanmeldung<sup>[64]</sup> ein, deren Kern die allgemeine Struktur **27** ist. Damit war ein neuer Pharmakophor gefunden: die zu den Oximethermethylestern isosteren Oximethermethyllamide.

Im Verlauf eigener Arbeiten zur Leitstrukturoptimierung hatte auch das BASF-Team in Abänderung des Oximether-Pharmakophors die entsprechenden Amide untersucht – allerdings erst spät, da die Optimierungen der Seitenkette wie in Abschnitt 3.5 beschrieben Vorrang hatten.

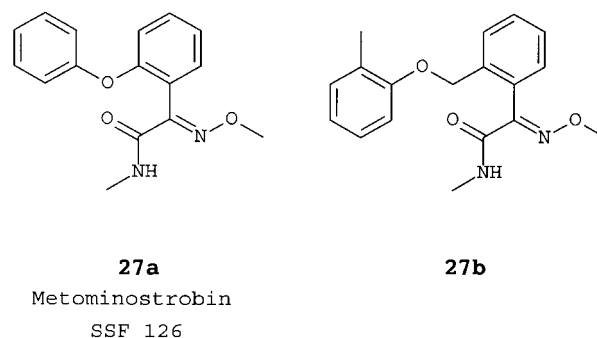
Als erste und zunächst einzige Variante des Typs **27** wurde bei der BASF gezielt die Verbindung **27b** mit der in der Oximetherreihe optimalen Seitenkette von **21b** ausgewählt und Ende 1989 synthetisiert. Die Ergebnisse der Gewächshaustests waren gut, aber nicht überragend. Im Vergleich zu **21b** war der  $I_{50}$ -Wert von **27b** im Hefetest um mehr als das Zehnfache ungünstiger. Deswegen und angesichts attraktiverer Alternativen erschien es anfänglich nicht nötig, hier besondere Prioritäten zu setzen – ein gewaltiger Irrtum. Erst nachdem bei weiteren Derivaten bessere Wirkungen erkennbar waren, wurde Ende 1990, aber immerhin noch vor Veröffentlichung der Shionogi-Anmeldung<sup>[64]</sup> eine entsprechende Patentanmeldung der BASF eingereicht.<sup>[65]</sup> Damit gab es einen weiteren Fall von Patentüberschneidungen bei den Strobilurinen.

Die Arbeiten bei Shionogi führten schließlich zu einem Entwicklungsprodukt mit der Code-Nr. SSF126<sup>[66]</sup> (Schema 11). Es erhielt den vorläufigen Common name Metominostrobin und wurde 1998 unter dem Handelsnamen Ori-bright als Fungizid gegen Reiskrankheiten am japanischen Markt eingeführt.

### 3.7. Der Weg von Novartis zu eigenen Strobilurinen

Dieser Weg erscheint unter vier völlig verschiedenen Aspekten bemerkenswert:

- Bei Ciba-Geigy hatten Wissenschaftler aus der Pharma- und Fermentationsforschung im Rahmen von Arbeiten zur

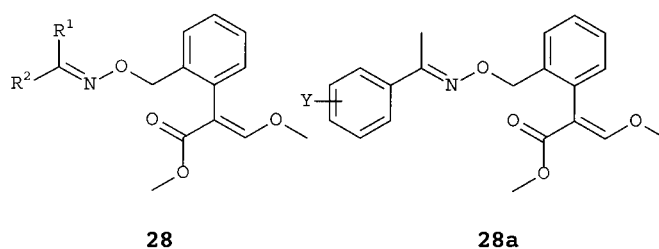


Schema 11. Das Strobilurin **27a** der Shionogi und die erste bei der BASF synthetisierte Variante **27b** mit Oximetheramid-Pharmakophor.

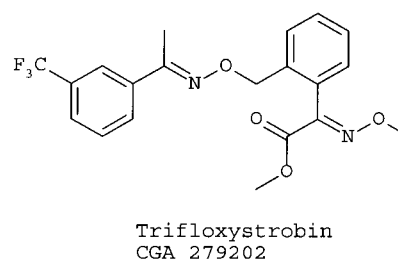
Identifizierung neuer, biologisch aktiver Naturstoffe schon in den achtziger Jahren Strobilurine isoliert und als fungizid erkannt,<sup>[66]</sup> aber das Thema zunächst wohl nicht weiter verfolgt.

- Unabhängig davon hatte eine Arbeitsgruppe für Fungizidsynthesen bei der Maag AG, die damals noch als Tochterfirma zu Hoffmann-La Roche gehörte, offenbar frühzeitig nach der Veröffentlichung der Zeneca-Basisanmeldung<sup>[41]</sup> zu den Enolethern eine Lücke in den dortigen Ansprüchen entdeckt, hatte hierzu eigene Arbeiten durchgeführt und zum Jahreswechsel 1988/89 eine eigene Anmeldung eingereicht.<sup>[67b]</sup> Die Synthesegruppe der Maag AG ging einschließlich ihres Patentbesitzes bei einer Firmenakquisition 1990 zunächst zu Ciba-Geigy und später – nach der Fusion mit Sandoz im Jahre 1996 – zu Novartis über: eine glückliche Rückkehr der Strobilurine zur ehemaligen Ciba-Geigy?<sup>[68]</sup>

- Den Kern der Maag-Anmeldung<sup>[67b]</sup> bilden die Formeln **28–28b** (Schema 12), bei denen eine neue Seitenkette in die Enolether eingeführt wurde – also klassische „Me-too“-Chemie.<sup>[69]</sup> Man mag zwar darüber streiten, ob die in **28** skizzierte Seitenkette patentrechtlich unangreifbar unter den Begriff „optionally substituted alkyl“ in der Zeneca-Basisan-



**28b**:  $R^1 = CH_3$ ,  $R^2 = \text{Heteroaryl}$



Schema 12. Strobilurine mit der neuen Oximether-Seitenkette. Die Formeln **28–28b** sind die Kernstrukturen zweier nur um fünf Wochen zeitversetzter Patentanmeldungen der Zeneca<sup>[67a]</sup> und der Maag AG.<sup>[67b]</sup>

meldung<sup>[41]</sup> fällt oder nicht; jedenfalls steht zweifelsfrei fest, daß es sich hierbei um einen substituierten Methylrest handelt. Das Besondere der Strobilurine mit Oximether-Seitenkette, speziell der Derivate vom Typ **28a**, ist ihre etwas höhere biologische Aktivität<sup>[70]</sup> – auch im Vergleich zu den bisherigen, bereits optimierten Derivaten mit Phenoxy- und Phenoxymethyl-Seitenketten (z. B. **27a, b**, Schema 11).

● Patentrechtlich führte diese Oximether-Seitenkette in der Folgezeit zu einem kuriosen Durcheinander. Bei Zeneca hatte man nämlich inzwischen ebenfalls das hohe Potential dieser Seitenkette erkannt und mit einem Vorsprung von fünf Wochen vor Maag eine entsprechende Anmeldung mit Enolether-Pharmakophor eingereicht.<sup>[67a]</sup> Weitere Konkurrenten beteiligten sich an diesem beinahe grotesken Wettlauf, ohne daß man zum Zeitpunkt der Anmeldungen voneinander wußte.<sup>[42]</sup> Plötzlich schien alle Welt die Oximether-Seitenkette zu entdecken. Innerhalb von nur wenig mehr als zwei Jahren waren acht Anmeldungen von fünf(!) verschiedenen Firmen erschienen (Tabelle 2).<sup>[67]</sup> Man erkennt, daß mit dem Auf-

Tabelle 2. Die ersten Patente auf Strobilurine mit Oximether-Seitenkette (vgl. Formeln **28–28b**, Schema 12).

erstes Prioritätsdatum	Patentinhaber (Anmelder)	Pharmakophor	Lit.
21. Nov. 1988	Zeneca (ICI)	Enolether <sup>[a]</sup>	[67a]
29. Dez. 1988	Novartis (Maag AG)	Enolether	[67b]
22. Aug. 1989	Nihon Nohyaku	Enolether	[67c]
02. Nov. 1989	Ube	Enolether	[67d]
05. Juni 1990	Novartis (Maag AG)	Oximetherester <sup>[b]</sup> Thioenolether <sup>[c]</sup>	[67e]
27. Juni 1990	BASF	Oximetherester <sup>[d]</sup> Oximetheramide <sup>[e]</sup>	[67f]
22. Aug. 1990	Zeneca (ICI)	Oximetherester	[67g]
30. Jan. 1991	Zeneca (ICI)	Oximetheramide	[67h]

[a] Siehe Formel **XII** in Schema 6. [b] Siehe Formel **23** in Schema 9. [c] Der Pharmakophor hat die *E*-konfigurierte Formel  $-C(COOCH_3)=CHSCH_3$ . [d] Zum Prioritätsdatum war die Zeneca-Anmeldung über Enolether<sup>[67a]</sup> bereits offengelegt (Veröffentlichungsdatum Mai 1990). Die in der BASF-Anmeldung zunächst miteingereichten Ansprüche auf Enolether wurden in den Patentprüfungsverfahren weitestgehend zurückgezogen. [e] Siehe Formel **27** in Schema 10.

treten neuer Pharmakophorvarianten zeitlich versetzt auch die entsprechenden Anmeldungen mit der neuen Oximether-Seitenkette eingereicht wurden. Für Novartis ist die Tatsache wichtig, daß es dem Maag-Team gelungen war,<sup>[67e]</sup> drei Wochen vor der BASF<sup>[67f]</sup> und elf Wochen vor Zeneca<sup>[67g]</sup> die Kombination von Oximetherester-Pharmakophor und Oximether-Seitenkette anzumelden. Die Frage nach einer eventuellen Abhängigkeit der Novartis-Verbindungen vom ersten, in den allgemeinen Ansprüchen sehr breitgefaßten Patent von Zeneca zu den Strobilurinen mit Oximether-Pharmakophor<sup>[58]</sup> wurde zugunsten von Novartis geklärt, da das Zeneca-Patent<sup>[58]</sup> kürzlich von der Beschwerdekammer des Europäischen Patentamtes widerrufen wurde. Ein Wirkstoff von Novartis aus dieser Gruppe ist unter der Code-Nr. CGA 279202<sup>[71]</sup> mit dem Common name Trifloxystrobin (Schema 12) in fortgeschrittener Entwicklung und befindet sich in den USA im Zulassungsverfahren.

## 4. Struktur-Wirkungs-Beziehungen zur Steuerung der Leitstrukturoptimierung

### 4.1. Moleküleigenschaften und Wirkungsvariable

Die Wirkung eines Fungizids unter Praxisbedingungen im komplexen System Schadpilz/Pflanze/Umwelt wird von einer Vielzahl höchst unterschiedlicher Faktoren beeinflusst.<sup>[72]</sup> Für die Leitstrukturoptimierung ist es zweckmäßig, den Komplex aus diesen Faktoren und den zugehörigen Moleküleigenschaften gedanklich zweizuteilen.<sup>[73]</sup> Entscheidend ist zum einen die Affinität des Wirkstoffs zum Target-Enzym im Schadpilz, die bei Strobilurinen primär durch die Stärke der Bindung am  $bc_1$ -Komplex der Atmungskette determiniert wird. Zum anderen ist für die Wirkung in vivo unter Praxisbedingungen jedoch ebenso entscheidend, wieviel Wirkstoff überhaupt am Wirkort ankommt. Dafür ist das biokinetische Verhalten des Wirkstoffs ausschlaggebend, also diejenigen Moleküleigenschaften, die Resorption, Transport, Abbau und gegebenenfalls Ausscheidung bestimmen.

Veränderungen der Leitstruktur wirken sich nicht nur auf die Affinität des Wirkstoffs zum Target-Enzym, sondern in vielfältiger Weise auch auf seine biokinetischen Moleküleigenschaften aus. Dadurch wird letztlich nicht nur die fungizide Wirkung gegen die Schadpilze in vivo beeinflusst, sondern auch die Selektivität gegenüber anderen als den Zielorganismen (z. B. Pflanzen, Nutzinsekten) und das Umweltverhalten (z. B. Abbau und Versickerung im Boden, Verflüchtigung).

Für eine rational angelegte Leitstrukturoptimierung ist es wichtig, all diese Einflußfaktoren gedanklich zu separieren und die zugehörigen Moleküleigenschaften und deren Auswirkungen auf die Aktivität am Wirkort und die einzelnen biokinetischen Parameter nach Möglichkeit frühzeitig experimentell zu ermitteln und für die Optimierung der Wirkstoffstrukturen hinsichtlich Wirkung und Umweltverträglichkeit zu nutzen. Von besonderer Bedeutung für Struktur-Wirkungs-Analysen sind die folgenden, leicht meßbaren Moleküleigenschaften:

- Der Schmelzpunkt zur Beurteilung der Anflutgeschwindigkeit und damit auch der Bioverfügbarkeit,
- der Dampfdruck als Maß für die Flüchtigkeit und die quasisystemische Mobilität (siehe unten) auf der Blattoberfläche,
- Lipophilie und Wasserlöslichkeit zur Beurteilung von Resorptions- und Transportverhalten und
- die Photostabilität als ein Maß für die Überlebensdauer des Wirkstoffs insbesondere unter Freilandbedingungen.

Unter den zu beobachtenden biologischen Effekten sind die folgenden Einzel- und Summenparameter von besonderem Interesse:<sup>[74]</sup>

- Die Aktivität auf der Ebene des molekularen Wirkortes. Für die Strobilurine ist dies die Konstante für die Bindung am  $bc_1$ -Komplex oder – einfacher meßbar – diejenige Wirkstoffkonzentration, die zu 50% iger Hemmung einer entsprechenden Enzympräparation führt (der  $I_{50}$ -Wert, z. B. aus dem Test an Hefemitochondrien als Modellsystem,<sup>[60]</sup> siehe Abschnitt 3.5);



- die Aktivität auf der zellulären Ebene der Zielorganismen, also beispielsweise die Hemmung der Atmung oder des Wachstums von Pilzkulturen auf künstlichen Nährmedien im Labor;
- die metabolischen Abbaugeschwindigkeiten (Halbwertszeiten) der Wirkstoffmoleküle in pflanzlichen oder pilzlichen Zellkulturmodellen oder in ganzen Pflanzen;
- die Wirkstoffmenge auf der Oberfläche des behandelten Blattes, im seinem Inneren und in unbehandelten Blättern der Pflanze nach Applikation auf einem bestimmten Blatt als Funktion der Zeit;
- die Wirkungen an pilzinfiltrierten Pflanzen im Gewächshaus;
- die fungiziden Wirkungen unter Freilandbedingungen;
- die Wirkungen auf aquatische und terrestrische Nicht-Zielorganismen im Laborversuch und
- Abbaugeschwindigkeiten und Versickerungsverhalten im Boden (Labormodelle).

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist wegen des komplexen Zusammenwirkens von zahlreichen Variablen besondere Sorgfalt geboten. Häufig lassen sich Struktur-Wirkungs-Tendenzen nur mit Mühe erkennen oder errahnen. Da es aus praktischen Gründen kaum möglich ist, alle neuen Testsubstanzen<sup>[75]</sup> in jeder Testanordnung zu untersuchen, wurden bei der BASF nur der Hefemitochondrientest und die Gewächshaustests für alle Strobilurine routinemäßig durchgeführt. Aus diesem Grund kommt der sinnvollen und systematischen Auswahl der Wirkstoffkandidaten für die zusätzlichen, aufwendigeren Tests besondere Bedeutung zu.

Für Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei Strobilurinen in einigen der genannten Tests auf der Basis von verschiedenen molekularen Variablen sind mehrere Beispiele publiziert worden.<sup>[28, 45a-c, 76]</sup>

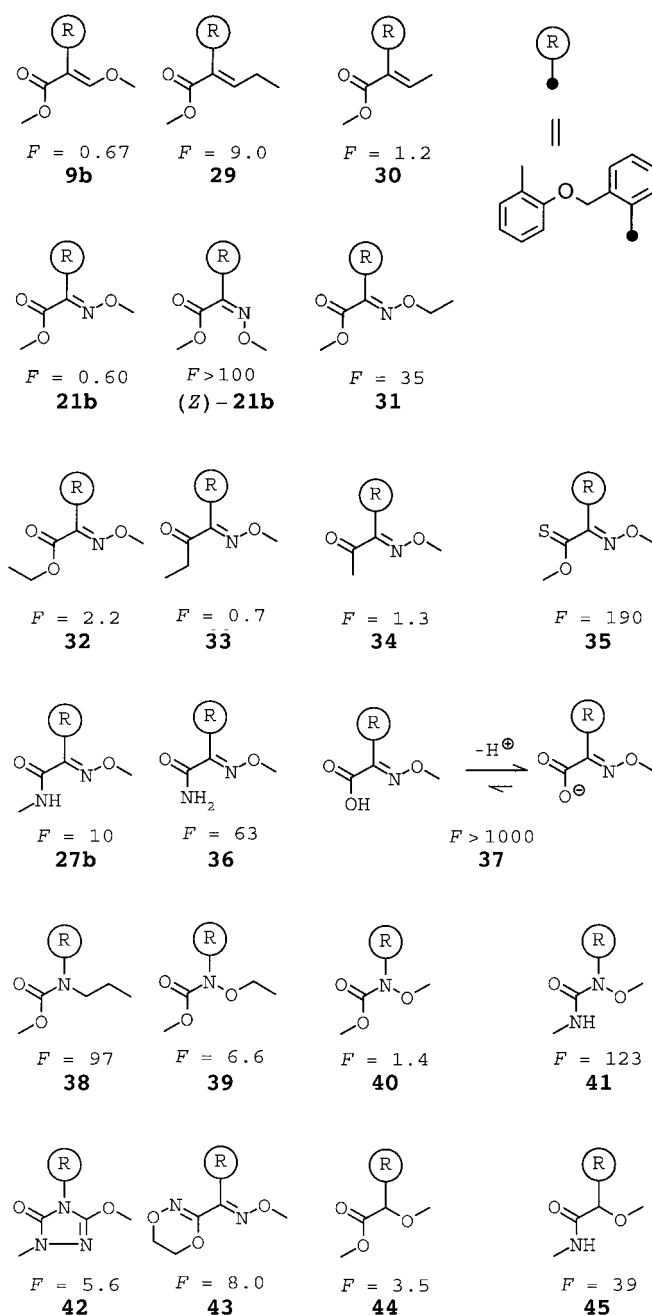
## 4.2. Pharmakophorvariationen

Gerade für das Auffinden neuer Pharmakophorvarianten hat sich der Test an Hefemitochondrien als äußerst nützlich erwiesen. Um die jeweiligen Resultate gut vergleichen zu können, wurde bei jeder Meßreihe mit dem Enoletherstilben **7a** als Standard gearbeitet und der für eine Testsubstanz bestimmte  $I_{50}$ -Wert auf diesen bezogen:

$$F = \frac{I_{50}(\text{Testsubstanz})}{I_{50}(\mathbf{7a})}$$

Definitionsgemäß ist  $F = 1$  für **7a**. Weiter gilt: Je kleiner  $F$  ist, um so höher ist die Aktivität. Schema 13 gibt einen kleinen Ausschnitt aus der Fülle der Pharmakophorvarianten und vermittelt einen Eindruck von Struktur-Wirkungs-Beziehungen, von denen hier nur wenige, aber wesentliche Aspekte diskutiert werden.<sup>[77]</sup>

- Höchst erstaunlich ist die Variationsbreite der Strukturen ohne grundsätzlichen Verlust der Aktivität am Wirkort. Auf ähnlichem Wirkniveau wie die „klassischen“ Enolether **9b** und Oximether **21b** liegen der Crotonsäureester **30**,<sup>[78]</sup> die Ketone **33** und **34**<sup>[79]</sup> sowie das *N*-Methoxycarbamat **40**.<sup>[80a]</sup> Auch die Varianten **27b**,<sup>[64, 65]</sup> sowie **41**,<sup>[80]</sup> **42**<sup>[81]</sup> und **43**<sup>[82]</sup> und



Schema 13. Strobilurine mit der Seitenkette von Kresoxim-methyl und variiertem Pharmakophor. Ihre relativen Aktivitäten am Wirkort sind unter den Formeln angegeben, wobei  $F$  umgekehrt proportional zur Aktivität ist (siehe Text).

die Mandelsäurederivate **44** und **45**<sup>[83]</sup> sind noch bemerkenswert aktiv.

- Ein mehr oder weniger drastischer Aktivitätsabfall tritt ein, wenn die Substituenten rechts oder links an der Peripherie des Pharmakophors größer werden (vgl. **31/32** versus **21b**). Die optimale Größe haben offenbar verkürzte Varianten wie **30** (vgl. **29**) oder **40** (vgl. **39**). Die *E*-Konfiguration an der zentralen Doppelbindung darf nicht ohne negative Folgen geändert werden, wie ein Vergleich der  $F$ -Werte von (*E*)-**21b** und (*Z*)-**21b** zeigt.

- Wie bei den Seitenkettensvarianten (siehe Abschnitt 4.3, Abbildung 3) hängt auch bei den Pharmakophorvarianten die

Aktivität deutlich von der Lipophilie des Moleküls ab. Bis zu einem Optimum von  $\log P_{ow} > 4$  nimmt die Aktivität mit steigender Lipophilie zu. Bei einem Vergleich der isosteren Ester/Amid-Paare **21b/27b**, **40/41** und **44/45** erkennt man, daß der jeweils um 0.7  $\log P_{ow}$ -Einheiten lipophilere Ester entsprechend aktiver ist. Für die Bewertung der Aktivität von Pharmakophorvarianten muß also auch die Lipophilie des Gesamtmoleküls berücksichtigt werden.

- Das einzige essentielle Heteroatom im Pharmakophor ist das Carbonyl-Sauerstoffatom, das am Wirkort offenbar als Wasserstoffbrückenacceptor fungiert, oder ein äquivalenter H-Acceptor. Darauf läßt insbesondere der deutliche Aktivitätsverlust beim Übergang von C=O zu C=S (vgl. **21b** und **35**) und zu C=CH<sub>2</sub><sup>[77]</sup> schließen.

- Die Frage, ob die C=O-Bindung relativ zur zweiten Doppelbindung nach Nordwesten (*s-trans*-Konformation) oder nach Süden (*s-cis*-Konformation) zeigt, wird durch die wirksame, cyclisch fixierte Variante **42**<sup>[81a]</sup> eindeutig zugunsten der *s-trans*-Konformation entschieden.

Auch die biophysikalischen und biokinetischen Eigenschaften der Pharmakophore ließen einige wichtige Tendenzen erkennen, die Einfluß auf die biologischen Wirkungen haben.

- Die Lipophilie der Pharmakophorvarianten steigt bei gleichbleibendem Molekülrest (R) (siehe Schema 13) in folgender Reihenfolge: cyclische Variante (wie in **42**,  $\log P_{ow} = 2.3$ ) < Oximetheramid **27b** ( $\log P_{ow} = 2.8$ ) < Oximetherester **21b** ( $\log P_{ow} = 3.5$ ) < *N*-Methoxycarbamat **40** ( $\log P_{ow} = 3.7$ )  $\approx$  Enolether **9b** ( $\log P_{ow} = 3.7$ ) < Methylketon **34** ( $\log P_{ow} = 4.0$ ) < Crotonsäureester **30** ( $\log P_{ow} = 4.4$ ).

Beim Design neuer Varianten war auch zu berücksichtigen, daß sich die Lipophilie des Gesamtmoleküls nicht nur auf die Aktivität am mitochondrialen Wirkort auswirkt, sondern auch einen erheblichen Einfluß auf die Resorption und das Transportverhalten hat. Deshalb benötigen z. B. die lipophilen Crotonsäureester hydrophilere Seitenketten als die per se hydrophileren Oximetheramide, um einen Lipophiliebereich zu erreichen, in dem systemischer Transport in Pflanzen möglich ist ( $\log P_{ow} < 4$ ).<sup>[49]</sup>

- Auch der Dampfdruck der Verbindungen wird vom Pharmakophortyp wesentlich mitbestimmt. Bei den stärker polaren Oximetheramiden ist er z. B. um mehr als eine Größenordnung niedriger als bei den entsprechenden Oximetherestern (**21b**:  $2.3 \times 10^{-8}$  hPa; **27b**:  $7.5 \times 10^{-10}$  hPa).<sup>[28b]</sup> Da ein Zusammenhang zwischen Dampfdruck und quasisystemischer Beweglichkeit der Wirkstoffe auf Blattoberflächen besteht,<sup>[28b]</sup> beeinflusst der Dampfdruck die Verteilung von Strobilurinen *auf* den zu schützenden Pflanzen maßgeblich. Erwünscht ist in der Praxis – insbesondere nach protektiver (d. h. vorbeugender) Fungizidapplikation<sup>[84d]</sup> – ein möglichst gleichmäßiger Schutzfilm.

Darüber hinaus konnte für viele Strobilurine gezeigt werden, daß auch in eher kurativ (d. h. nach erfolgtem Pilzbefall) angelegten<sup>[84d]</sup> Freilandversuchen ein Zusammenhang zwischen dem Dampfdruck und der Wirkung gegen Weizenmehltau besteht.<sup>[28b]</sup> Da Weizenmehltau ein Schadpilz ist, der hauptsächlich *auf* der Blattoberfläche wächst, ist dies verständlich. Ebenso verständlich ist, daß ein entsprechender Zusammenhang beim Weizenbraunrost, der vorzugsweise *innerhalb* der Blätter wächst, zumindest in

kurativen Versuchsanordnungen nicht gefunden werden konnte.

- Für die Abbaugeschwindigkeiten von Strobilurinen im Boden sowie in pflanzlichen und pilzlichen Zellkulturen sind ebenfalls allgemeine Tendenzen in Abhängigkeit vom Pharmakophor erkennbar. Danach steigen die Abbaugeschwindigkeiten in der Reihenfolge: cyclische Variante (Typ **42**)  $\leq$  Oximetheramid  $\ll$  Enolether  $\leq$  Methoxycarbamat  $\leq$  Crotonsäureester  $\ll$  Oximetherester. Demzufolge zeichnen sich z. B. die metabolisch recht stabilen Oximetheramide durch eine lange Wirkungsdauer im Freiland aus, haben aber auch – dies ist die Kehrseite der Medaille – im Boden eine entsprechend hohe Persistenz. Ihre lange Lebensdauer in den behandelten Kulturpflanzen ist für den systemischen Transport ideal. Demgegenüber verhindert gerade die rasche Metabolisierung der Oximetherester zur nahezu inaktiven Carbonsäure (vgl. **37**, Schema 13) ausgeprägte systemische Eigenschaften, gewährleistet andererseits aber auch den erwünschten, besonders raschen Abbau im Boden; die Halbwertszeiten betragen dort einige Stunden bis wenige Tage.<sup>[84a]</sup>

### 4.3. Variation der Seitenkette und der Arenbrücke

Bezüglich des Wirkorts konnten für eine Reihe von Oximethern des Typs **21** klare, quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen nach einer bilinearen Gleichung ermittelt werden<sup>[28a, 85]</sup> (Abbildung 3). Ähnliche Korrelationen wurden

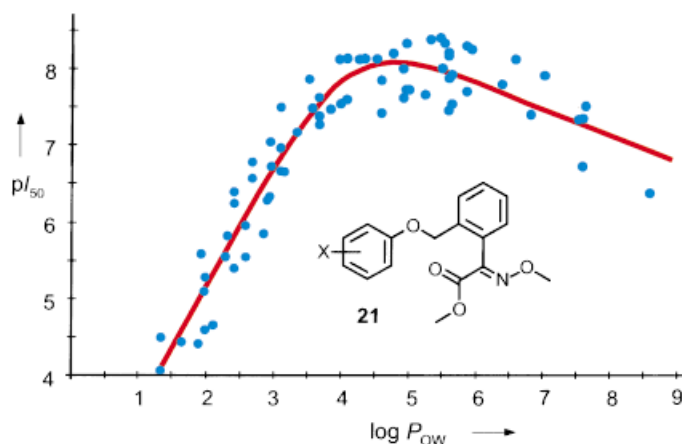


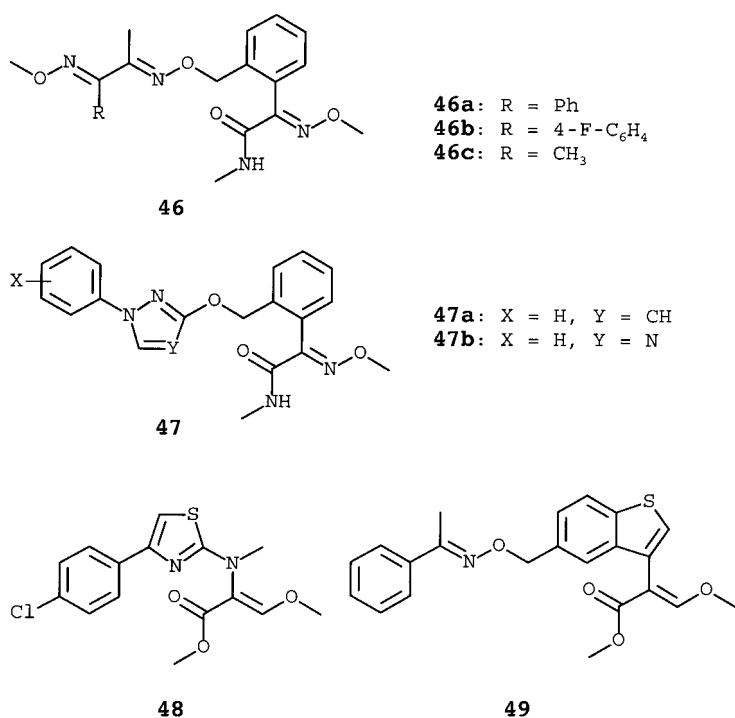
Abbildung 3. Aktivität von Strobilurin-Oximethern **21** am Wirkort in Abhängigkeit von der Lipophilie des Substituenten X.  $pI_{50}$  ist der negative dekadische Logarithmus des  $I_{50}$ -Wertes aus dem Test an Hefemitochondrien. Jeder Punkt repräsentiert eine Variante der Struktur **21**.<sup>[28]</sup>

für Enolether des Typs **9**, Oximetheramide, Crotonsäureester und Methoxycarbamate abgeleitet.<sup>[86]</sup> Es zeigte sich, daß die Lipophilie des Gesamtmoleküls – modifiziert durch den Substituenten X in der Seitenkette – eindeutig die entscheidende Einflußgröße ist. Signifikante „Underperformer“ bezogen auf die in Abbildung 3 gezeigte Kurve treten dann auf, wenn die Raumerfüllung der Seitenkette durch bestimmte Substituenten oder Substitutionsmuster X ein optimales Andocken am Target nicht mehr zuläßt.<sup>[28a]</sup>

Der Einfluß von Arenbrücke und Seitenkette auf die biokinetischen Eigenschaften geht z.B. aus der in Abschnitt 3.4 skizzierten Optimierung des Diphenylethers **13a** zum Azoxystrobin von Zeneca hervor.<sup>[45a,e]</sup> Wesentlich war dabei die Einführung von Heteroatomen, um die Molekül-lipophilie gezielt zu verringern und damit systemischen Transport bei gleichzeitig möglichst geringer Beeinträchtigung der Aktivität am Wirkort zu ermöglichen.

Eine ähnliche Funktion haben die Heteroatome in den bereits in Abschnitt 3.7 erwähnten Oximether-Seitenketten, z.B. in Verbindungen des Typs **28a**. Bei diesen ist die Seitenkette gegenüber den Phenoxymethyl-Seitenketten des Typs **9** um zwei Atome verlängert, ohne daß die Lipophilie drastisch ansteigt.<sup>[87]</sup>  $\log P_{ow}$  beträgt 3.2 für **9a** und ist für **28a** (mit Y = H) mit 3.6 nur wenig größer. Die Ausweitung dieser Prinzipien auf Strobilurine mit „Doppeloximether“-Seitenketten wie in **46** führte zu Derivaten mit vergleichsweise niedriger Lipophilie ( $\log P_{ow}$  = 3.2 für **46a**) und sehr guten Wirkungen in Freilandversuchen.<sup>[88, 89]</sup> Noch hydrophilere Seitenketten finden sich in **47a**<sup>[90]</sup> ( $\log P_{ow}$  = 2.6) und **47b**<sup>[90]</sup> ( $\log P_{ow}$  = 1.5).

Auch die aus der Fülle der bisher bekanntgewordenen Derivate mehr oder weniger willkürlich herausgegriffenen Verbindungen **48**<sup>[91]</sup> und **49**<sup>[92]</sup> dienen zur Illustration der ohne grundsätzlichen Aktivitätsverlust möglichen Variantenvielfalt (Schema 14).



Schema 14. Beispiele für Strobilurine mit Variationen in Seitenkette und Arenbrücke.

#### 4.4. Leitstrukturvariation und Kandidaten-Selektion

Im Evolutionsprozeß einer neuen Wirkstoffklasse – wie hier der Strobilurine – entsprechen die Leitstrukturvariationen den Mutationen einer natürlichen Evolution. Die Selektion einzelner oder weniger Kandidaten für die Weiterentwicklung bis zur Marktreife entspricht dann dem „survival of the fittest“ (Abbildung 4). Sowohl bei der Variation als auch bei der Selektion müssen optimale Kompromisse hinsichtlich aller Stoffeigenschaften gefunden werden. Ergebnisse aus Studien zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen sind in beiden Fällen ein wesentliches, rückkoppelndes Steuerungselement.

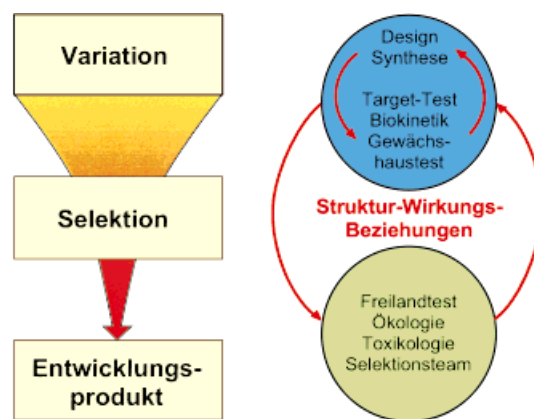


Abbildung 4. Schematische Darstellung des Evolutionsprozesses bei der Leitstrukturoptimierung.

Dabei gilt es, die Auswirkungen von Strukturvariationen innerhalb der einzelnen Molekülregionen auf die einzelnen Observablen der verschiedenen Ebenen (z.B. Wirkort, Biotest, Biotest) zu analysieren und insbesondere im Hinblick auf die Gesamtwirkungen unter Praxisbedingungen verstehen zu lernen. Hierin liegt primär eine Herausforderung für den Chemiker, der das Syntheseprogramm plant. Nicht minder entscheidend ist jedoch auch die Berücksichtigung derartiger Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei späteren Selektionsprozessen. Hier wie da geht es wegen der komplexen Zusammenhänge häufig weniger um eindeutig ableitbare, zwingende Konsequenzen, sondern eher um Ermessensentscheidungen auf der Grundlage „weicher“ Daten, bloßer Schätzungen oder ungünstigstenfalls Spekulationen. Die empirische Sozialforschung hat gezeigt, daß in solchen Fällen die Bewertungen und Entscheidungen eines Teams denen der treffsichersten Einzelpersonen grundsätzlich überlegen sind.<sup>[93]</sup> Daher liegt es nahe, den „Leistungsvorteil der Gruppe“<sup>[93]</sup> bei Selektionsprozessen im Verlauf einer Leitstrukturoptimierung durch interdisziplinär zusammengesetzte Teams auszuschöpfen.

## 5. Biologische Eigenschaften der Strobilurine

### 5.1. Bedeutung des Wirkungsmechanismus

Für das biologische Wirkungsprofil der Strobilurine ist ihr Wirkungsmechanismus, die Atmungshemmung, in mehrfacher Hinsicht ausschlaggebend. Da alle Eukaryonten den bc<sub>1</sub>-Komplex in der mitochondrialen Atmungskette haben, stellt sich die Frage, inwieweit sich die Strukturen der bc<sub>1</sub>-Komplexe verschiedener Spezies auf die Bindungseigenschaften einzelner Strobilurinvarianten auswirken und damit bereits



auf Target-Ebene zu einer selektiven Toxizität führen. Submolekulare Details hierzu sind aus der Kenntnis der Kristallstrukturen von  $bc_1$ -Komplexen bei zunehmend höherer Auflösung zu erwarten.<sup>[23, 94]</sup> Die bisher bekannt gewordenen Aminosäuresequenzen aus verschiedenen Spezies weisen im Bereich der Bindungstasche jedenfalls einen hohen Konservierungsgrad auf.<sup>[20, 95]</sup> An submitochondrialen Enzympräparationen aus mehreren Spezies (Pilze, Stubenfliege, Ratte, Mais) konnte mit 14 Strobilurinen und Myxothiazol gezeigt werden, daß auf dieser wirkortnahen Ebene *keine* wesentlichen Beiträge zur Speziesselektivität zu erwarten sind.<sup>[28, 60]</sup> Dagegen beruht das natürliche Vorkommen von Pilzspezies, die gegen  $bc_1$ -Inhibitoren resistent sind, offenbar auf Mutationen des  $bc_1$ -Komplexes, die das Andocken von Strobilurinen in der Bindungstasche verhindern.<sup>[20]</sup>

Das Auftreten resistenter Phytopathogene, in denen ähnliche Mutationen vorliegen, kann demzufolge a priori nicht ausgeschlossen werden. Ob und inwieweit dies unter dem Selektionsdruck fortgesetzter Strobilurinbehandlungen in der landwirtschaftlichen Praxis von Bedeutung für die Entwicklung gravierender Resistenzen gegen die Strobilurine sein wird, kann nur die Felderfahrung der kommenden Jahre zeigen.<sup>[96]</sup>

## 5.2. Physiologische Konsequenzen des Wirkungsmechanismus

Der Wirkungsmechanismus der Atmungshemmung führt dazu, daß auf biochemischer Ebene die an die Atmungskette gekoppelte Bildung von ATP unterbunden wird. Physiologisch resultiert daraus eine besonders ausgeprägte Hemmung von stark energie-, d.h. atmungsabhängigen Wachstumsprozessen. Hierzu gehört neben dem Wachstum von Tumorzelllinien insbesondere die Sporenkeimung von Pilzen. Mit dem Strobilurin BAS 490F konnte für mehrere Pilzspezies gezeigt werden, daß die vollständige Hemmung ihrer Sporenkeimung bei erheblich niedrigeren Wirkstoffkonzentrationen (Faktoren zwischen 10 und 10000) eintritt als die 50%ige Hemmung des Mycelwachstums der gleichen Spezies.<sup>[28b]</sup> Da unter den Eukaryonten Sporenkeimung fast ausschließlich bei Pilzen auftritt,<sup>[97]</sup> ist eine auch für die praktische Anwendung entscheidende Selektivität und therapeutische Breite auf physiologischer Ebene gegeben.

## 5.3. Wirkungsprofile und Anwendungen von Strobilurinen

Aufgrund der hohen Sensibilität der pilzlichen Sporenkeimung gegenüber Strobilurinen haben diese generell, besonders bei frühzeitiger protektiver Anwendung, ein bemerkenswert breites Wirkungspotential gegen nahezu alle Phytopathogene. Bei der praktischen Anwendung als Agrarfungizide hängen die erzielbaren Spitzenwirkungen und die ökologischen Effekte allerdings erheblich von den biophysikalischen und biokinetischen Eigenschaften der einzelnen Wirkstoffe ab.

- Kresoxim-methyl zeichnet sich in dieser Hinsicht besonders durch zwei Eigenschaften aus: Der noch meßbare Dampfdruck des Wirkstoffs ( $2.3 \times 10^{-8}$  hPa) und seine relativ hohe Lipophilie ( $\log P_{ow} = 3.5$ ) ermöglichen Verteilungsprozesse zwischen den lipophilen wachsbeschichteten Oberflächen von Pflanzen und der unmittelbar darüber befindlichen Gasphase der Grenzschichten („boundary layers“). Obgleich Kresoxim-methyl wegen seiner biokinetischen Eigenschaften nicht für den systemischen Transport *innerhalb* von Pflanzen geeignet ist (siehe Abschnitt 4.2), führt die Diffusion in die Gasphase zu Migrations- und Verteilungsprozessen *auf* der Pflanzenoberfläche und damit zu einer quasisystemischen Beweglichkeit.<sup>[28b]</sup> Die zweite herausragende Eigenschaft ist der rasche metabolische Abbau zur praktisch unwirksamen Carbonsäure in Nicht-Zielorganismen. Er läßt zwar einerseits den systemischen Transport in Pflanzen nicht zu, führt jedoch andererseits zu erhöhter Selektivität und günstigem ökologischem Profil.<sup>[84]</sup>

In der praktischen Anwendung zeichnet sich Kresoxim-methyl – insbesondere bei protektivem Einsatz – durch ein breites Wirkungsspektrum gegen zahlreiche Phytopathogene aus.<sup>[98]</sup> Spitzenwirkungen – auch bei kurativer Anwendung nach einer Infektion – werden gegen den auf Blattoberflächen wachsenden Getreidemehltau sowie gegen Apfelschorf bereits bei Aufwandmengen unter  $125 \text{ g ha}^{-1}$  erzielt. Für die Praxis von Bedeutung sind die insbesondere im Getreideanbau erzielbaren Ertragssteigerungen, die das aufgrund der rein fungiziden Wirkungen zu erwartende Ausmaß deutlich übersteigen.<sup>[99]</sup>

Kresoxim-methyl wird in Handelsprodukten wie Discus (in Japan als Strobey vertrieben) als Einzelwirkstoff besonders für den Obstanbau, als Brio und Mentor im Gemisch mit dem BASF-Aminfungizid Fenpropimorph zur Bekämpfung von Getreidemehltau sowie in der Dreier-Mischung mit Fenpropimorph und dem BASF-Triazolfungizid Epoxiconazol unter dem Namen Juwel Top als Getreide-Breitbandfungizid eingesetzt. Die Mischungen dienen zum einen der Erweiterung des Wirkungsprofils, zum anderen der Vorbeugung gegen die Entwicklung möglicher Resistenzen.

- Azoxystrobin hat deutlich andere biophysikalische und biokinetische Eigenschaften und ein anderes, teilweise komplementäres Wirkungsspektrum.<sup>[45e, 100]</sup> Sein Dampfdruck ist erheblich niedriger ( $1.1 \times 10^{-12}$  hPa bei  $25^\circ\text{C}$ ), die Wirkung, z.B. gegen Getreidemehltau, demzufolge nur mäßig. Der langsamere metabolische Abbau in Pflanzen und die relativ niedrige Lipophilie ( $\log P_{ow} = 2.5$ ) ermöglichen den systemischen Transport in den behandelten Pflanzen. Unter Handelsnamen wie Amistar, Bankit oder Heritage wird es gegen eine Vielzahl von Phytopathogenen in zahlreichen landwirtschaftlichen Kulturen eingesetzt.

- Metominostrobin hat eine noch niedrigere Lipophilie ( $\log P_{ow} = 2.3$ ) als Azoxystrobin und eine ca. 20fach höhere Wasserlöslichkeit.<sup>[20e, 101]</sup> Durch die Oximetheramidgruppe ist eine besonders hohe metabolische Stabilität des Pharmakophors gegeben. Der Wirkstoff wird nach Applikation auf die Wasseroberfläche von Reisfeldern oder auf die Erde von Setzlingskästen über die Wurzeln aufgenommen, systemisch transportiert und bekämpft aus dem Inneren der Reispflanzen heraus die Schadpilze.<sup>[101]</sup> Er wird insbesondere gegen den

Reisbrand *Pyricularia oryzae* und andere Reiskrankheiten unter dem Handelsnamen Oribright in Japan eingesetzt.

- CGA 279202 (Trifloxystrobin) hat wie Kresoxim-methyl den Oximetherester als Pharmakophor. Verglichen mit Kresoxim-methyl hat es eine höhere Lipophilie ( $\log P_{ow} = 4.5$ ), einen vergleichbaren Dampfdruck ( $3.4 \times 10^{-8}$  hPa) und ähnliche Transport- und Verteilungseigenschaften. Es soll unter dem Handelsnamen FLINT gegen eine Reihe von Pilzkrankheiten in verschiedenen landwirtschaftlichen Kulturen eingesetzt werden.<sup>[71]</sup>

## 6. Industrielle Strobilurinsynthesen

Eine zusammenfassende Darstellung beschreibt die bekannten Verfahren zum Aufbau der Enolether-, Oximether- und Oximetheramid-Pharmakophore sowie Palladium-katalysierte Kupplungen kompletter Pharmakophore an die überbrückende Areneinheit in *o*-Position zur bereits vorhandenen Seitenkette.<sup>[45e]</sup> Schlüsselschritte einer eleganten Synthese von Kresoxim-methyl sind die in alkalischem Milieu irreversible Lactonringöffnung des Phthalids mit Kresolat und die Pinner-Reaktion eines Acylcyanids beim anschließenden Aufbau des Pharmakophors.<sup>[28a, 102]</sup> In einer interessanten Synthesevariante für Trifloxystrobin erfolgt die Kupplung von Seitenkette und Pharmakophor gleichzeitig mit dem Aufbau der Arenbrücke über eine Diels-Alder-Reaktion.<sup>[103]</sup>

## 7. Wirtschaftliche Bedeutung, Zusammenfassung und Ausblick

Bereits heute zeichnet sich ab, daß die Stoffklasse der Strobilurine eine der bedeutendsten Produktinnovationen im Pflanzenschutz ist.

Dementsprechend forschen inzwischen nahezu alle bedeutenden Unternehmen, die sich mit dem Pflanzenschutz beschäftigen, auf diesem Gebiet; bis heute wurden hierzu insgesamt über 500 internationale Patentanmeldungen von mehr als 20 Firmen und Forschungsinstituten offengelegt (Abbildung 5 und Lit. [45e]). Weltweit dürften in der Industrie bisher – vorsichtig geschätzt – weit über 30000 Strobilurinanaloga synthetisiert worden sein.

Der für Fungizide neuartige Wirkungsmechanismus, der auf der Hemmung der Zellatmung von Schadpilzen beruht, ist im Hinblick auf Resistenzerscheinungen gegenüber etablierten Fungiziden von Vorteil. Er ist auch die Ursache für eine besonders hohe Sensitivität der stark atmungsabhängigen pilzlichen Sporenkeimung gegenüber diesen Wirkstoffen und trägt damit zur selektiven Wirkung gegen Pilze als Zielorganismen bei – ein entscheidender Faktor für die generell sehr gute Umweltverträglichkeit der Strobilurine.

Aufgrund des breiten Wirkungsspektrums, der langen Wirkungsdauer, der hohen Wirksamkeit bei gleichzeitig niedriger Dosierung und ihrer ausgezeichneten Umweltverträglichkeit setzen die Strobilurine neue Maßstäbe bei der Pilzbekämpfung. Sie leisten damit einen wesentlichen Beitrag zum integrierten Pflanzenschutz. Die Anwender in der landwirtschaftlichen Praxis nehmen die Innovation begeistert

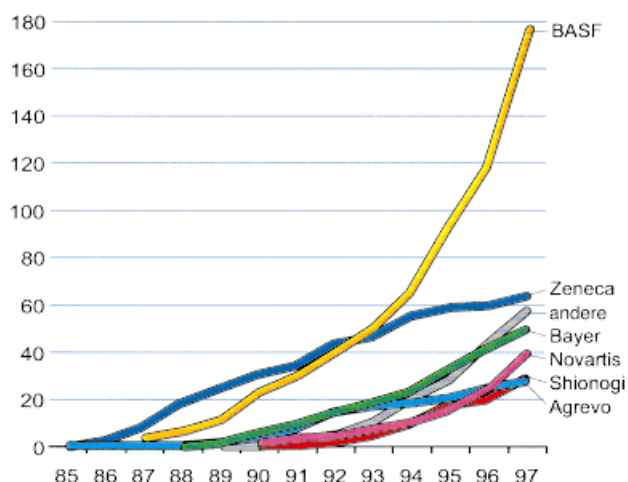


Abbildung 5. Zahl der veröffentlichten internationalen Strobilurin-Patentanmeldungen in den Jahren 1986–1997.

auf.<sup>[104]</sup> Entsprechend hoch sind die Schätzungen für das künftige Marktpotential. Die Umsätze für das Jahr 2006 – zehn Jahre nach Markteinführung der beiden ersten Strobilurine Kresoxim-methyl und Azoxystrobin – dürften insgesamt, d.h. unter Einbeziehung aller noch zu erwartenden Produkte des internationalen Wettbewerbs, weltweit zwei Milliarden Mark übertreffen; das sind annähernd 20% des Fungizid-Weltmarktes. Damit dürften die Strobilurine – wenn keine unerwarteten kontraproduktiven Resistenzerscheinungen auftreten – in nicht zu ferner Zukunft den ersten Platz im Markt einnehmen, den zur Zeit noch die Triazole als größte fungizide Stoffklasse besetzen.

Die Geschichte der Strobilurinforschung ist in vielerlei Hinsicht auch eine Geschichte angewandter Chemie: Sie zeigt die Evolution einer neuen Wirkstoffklasse. Diese Story mag an- oder aufregend wirken; sie ist voll von Impulsen und Ergebnissen, wie man sie sich als Forscher wünscht, aber auch voll von Irrungen, Wirrungen, Enttäuschungen und immer noch offenen Fragen. Neben den Naturstoffleitstrukturen vom Strobilurintyp sollte man wohl auch dies als Geschenk der Natur betrachten.

*Im Sinne des eben Gesagten gebührt der Natur Dank. Unser ganz besonderer Dank gilt jedoch vor allem den wissenschaftlich engagierten Kollegen und Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppen, die im Text sowie in den Anmerkungen und Literaturziten genannt sind.*

Eingegangen am 16. Oktober 1998 [A 308]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1328–1349

- [1] *Fungal Biotechnology* (Hrsg.: T. Anke), Chapman and Hall, Weinheim, **1997**.
- [2] Übersichten: Pigmente: a) M. Gill, *Prod. Rep.* **1994**, 11, 67–90; b) M. Gill, W. Steglich in *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Vol. 51 (Hrsg.: L. Zechmeister), Springer, Wien, **1987**, S. 1–317; c) Toxine: A. Bresinsky, H. Besl, *Giftpilze*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **1985**.
- [3] E. R. H. Jones, V. Thaller in *Handbook of Microbiology*, Vol. 5 (Hrsg.: A. I. Laskin, H. A. Lechevalier), 2. Aufl., CRC Press, Boca Raton, **1984**, S. 83–99.

- [4] a) H. Anchel, A. Hervey, W. J. Robbins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1950**, 36, 300–305; b) F. Kavanagh, A. Hervey, W. J. Robbins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1951**, 37, 570–574.
- [5] H. Egger, H. Reinshagen, *J. Antibiot.* **1976**, 29, 915–922; H. Egger, H. Reinshagen, *J. Antibiot.* **1976**, 29, 923–927.
- [6] T. Anke, F. Oberwinkler, W. Steglich, G. Schramm, *J. Antibiot.* **1977**, 30, 806–810.
- [7] G. Schramm, W. Steglich, T. Anke, F. Oberwinkler, *Chem. Ber.* **1978**, 111, 2779–2784.
- [8] T. Anke, G. Schramm, B. Schwalge, B. Steffan, W. Steglich, *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1616–1625.
- [9] V. Musilek, J. Cerna, V. Sasek, M. Semerzieva, M. Vondracek, *Folia Microbiol.* **1969**, 14, 377–387.
- [10] a) V. Musilek, CS-B 136492, **1970** (Priorität: 17.12.1965); b) M. Vondracek, J. Capkova, J. Slechts, A. Benda, V. Musilek, J. Cudlin, CS-B 136495, **1970** (Priorität: 18.1.1967).
- [11] T. Anke, H.-J. Hecht, G. Schramm, W. Steglich, *J. Antibiot.* **1979**, 32, 1112–1117. Eine atemungshemmende Wirkung ist auch für Mucidin beschrieben: J. Subik, M. Behun, V. Musilek, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1974**, 57, 17–22.
- [12] M. Vondracek, J. Capkova, K. Culik, CS-B 180775, **1979** (Priorität: 29.8.1974).
- [13] P. Sedmera, V. Musilek, F. Nerud, *J. Antibiot.* **1981**, 34, 1069.
- [14] G. von Jagow, G. W. Gribble, B. L. Trumpower, *Biochemistry* **1986**, 25, 775–780.
- [15] T. Anke, *Can. J. Bot.* **1995**, 73 (Suppl. 1), 940–945.
- [16] W. Weber, T. Anke, B. Steffan, W. Steglich, *J. Antibiot.* **1990**, 43, 207–212.
- [17] a) G. M. Nicholas, J. W. Blunt, A. L. J. Cole, M. H. G. Munro, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 7465–7468; b) „Strobilurins and Oudemansins“: T. Anke, W. Steglich in *Drug Discovery from Nature* (Hrsg.: S. Grabley, R. Thiericke), Springer, Heidelberg, **1999**, im Druck.
- [18] K. A. Wood, D. A. Kau, S. K. Wrigley, R. Beneyto, D. V. Renno, A. M. Ainsworth, J. Penn, D. Hill, J. Killackey, P. Depledge, *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, 646–649.
- [19] M. Engler, T. Anke, O. Sterner, *Z. Naturforsch. C* **1998**, 53, 318–324.
- [20] P. Kraiczy, U. Haase, S. Gencic, S. Flindt, T. Anke, U. Brandt, G. von Jagow, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 235, 54–63.
- [21] a) W. Trowitsch, G. Reifensahl, V. Wray, K. Gerth, *J. Antibiot.* **1980**, 33, 1480–1490; b) W. F. Becker, G. von Jagow, T. Anke, W. Steglich, *FEBS Lett.* **1981**, 132, 329–333.
- [22] U. Brandt, U. Haase, H. Schagger, G. von Jagow in *Wege zu neuen Produkten und Verfahren der Biotechnologie, DECHEMA Monographien, Vol. 129* (Hrsg.: T. Anke, U. Onken), VCH, Weinheim, **1993**, S. 27–38.
- [23] D. Xia, C.-A. Yu, H. Kim, J.-Z. Xia, A. M. Kachurin, L. Zhang, L. Yu, J. Deisenhofer, *Science* **1997**, 277, 60–66.
- [24] „ $\beta$ -Methoxyacrylate Antibiotics: From Biological Activity to Synthetic Analogues“: T. Anke, W. Steglich in *Biologically Active Molecules* (Hrsg.: U. P. Schlunegger), Springer, Berlin, **1989**, S. 9–25.
- [25] G. Schramm, Dissertation, Universität Bonn, **1980**.
- [26] W. Steglich, G. Schramm, T. Anke, F. Oberwinkler (Hoechst AG), EP-A 044448, **1980** (Priorität: 4.7.1980).
- [27] Für die Förderung des Projekts *Inhaltsstoffe aus Mikroorganismen und Pflanzen als neue Wirkstoffe oder Wirkstoffmodelle im Pflanzenschutz* in den Jahren 1983–1992 danken wir dem Bundesministerium für Forschung und Technologie (jetzt BMBF).
- [28] a) „Strobilurins – From Natural Products to a New Class of Fungicides“: H. Sauter, E. Ammermann, F. Röhl in *Crop Protection Agents from Nature: Natural Products and Analogues* (Hrsg.: L. G. Copping), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1996**; b) „Mitochondrial respiration as a target for antifungals: lessons from research on strobilurins“: H. Sauter, E. Ammermann, R. Benoit, S. Brand, R. E. Gold, W. Grammenos, H. Köhle, G. Lorenz, B. Müller, F. Röhl, U. Schirmer, J. B. Speakman, B. Wenderoth, H. Wingert in *Antifungal Agents, Discovery and Mode of Action* (Hrsg.: G. K. Dixon, L. G. Copping, D. W. Hollomon), BIOS Scientific Publishers, Oxford, **1995**, S. 173–191.
- [29] a) B. A. M. Schwalge, Dissertation, Universität Bonn, **1986**; b) S. Zapf, Dissertation, Universität Kaiserslautern, **1994**; c) M. Engler, Dissertation, Universität Kaiserslautern, **1997**.
- [30] E. Ammermann danken wir für die Überlassung der Ergebnisse der Gewächshaustests und hilfreiche Diskussionen in diesem Zusammenhang.
- [31] U. Schirmer, S. Karbach, E. H. Pommer, E. Ammermann, W. Steglich, B. A. M. Schwalge, T. Anke (BASF AG), EP-A 203606, **1985** (Priorität: 30.5.1985).
- [32] U. Schirmer, S. Karbach, E. H. Pommer, E. Ammermann, W. Steglich, B. A. M. Schwalge, T. Anke (BASF AG), EP-A 229974, **1985** (Priorität: 20.12.1985).
- [33] U. Schirmer, S. Karbach, E. H. Pommer, E. Ammermann, W. Steglich, B. A. M. Schwalge, T. Anke (BASF AG), EP-A 226917, **1985** (Priorität: 20.12.1985).
- [34] U. Schirmer, S. Karbach, E. H. Pommer, E. Ammermann, W. Steglich, B. A. M. Schwalge, T. Anke (BASF AG), EP-A 203608, **1985** (Priorität: 30.5.1985).
- [35] a) „Factors Involved in Apparent Discrepancies of Fungicide Performance“: R. E. Gold, A. Akers, H. Sauter in *Comparing Glasshouse and Field Pesticide Performance II* (Hrsg.: H. G. Hewitt, J. Caseley, L. G. Copping, B. T. Grayson, D. Tyson), British Crop Protection Monograph 49, **1994**, S. 47–56; b) In beiden Fällen scheinen die unterschiedlichen zeitlichen Versuchsabläufe wesentlich zu sein: Während im Gewächshaustest der Zeitraum zwischen Wirkstoffapplikation und Versuchsauswertung in den Eingangstests üblicherweise nur 8 Tage beträgt, kann er in Freilandversuchen je nach Indikation bis zu 30 Tagen und mehr betragen. Falsch positive Resultate aus Gewächshaustests lassen sich bei einzelnen Testsubstanzen leicht mit einem relativ raschen Verschwinden des Wirkstoffs durch Abbau auf verschiedenen Wegen (z.B. Photolyse, Metabolismen) erklären. Schwieriger sind falsch negative Resultate zu verstehen. In diesen Fällen dürfte das relativ langsame „Anfluten“ (d.h. der Anstieg der verfügbaren Konzentration) des in molekulardisperser Form benötigten Wirkstoffs ein wesentlicher Faktor sein, insbesondere dann, wenn sich im Gewächshaus mikrokristalline Wirkstoffdepots höherschmelzender Verbindungen auf den Versuchspflanzen abgelagert haben. Dagegen kann ein langsames, aber kontinuierliches Anfluten unter Freilandbedingungen durchaus zu einer besonders guten Wirkung am Ende eines Versuchs führen. Ein weiterer Faktor, der im Freiland zu besseren Ergebnissen als im Gewächshaus führen kann, ist ein besonders langsames „Abfluten“ (d.h. der Abfall der verfügbaren Konzentration) aufgrund einer hohen Biostabilität als individueller Substanzeigenschaft. c) Siehe Tabelle 1. Sie enthält unter anderem Korrelationen von Wirkungsrangfolgen aus Gewächshaus- und Freilandtests.
- [36] Diese für die Fungizidforschung anscheinend besonders gravierende Problematik rückte gerade bei der Leitstrukturoptimierung der Strobilurine zunehmend ins Bewusstsein und führte bei der BASF zu einem intensiven Überdenken der Vorgehensweise bei der Selektion von Wirkstoffen für Freilandtests. H.S. dankt den beteiligten Kollegen für zahlreiche interdisziplinäre Diskussionen hierzu und insbesondere der Leiterin der biologischen Fungizidforschung der BASF, G. Lorenz, für hilfreiche Unterstützung und klärende Beiträge.
- [37] Bei Nutzung des unterschiedlichen Jahreszeitenrhythmus von nördlicher und südlicher Hemisphäre sind pro Jahr zwei zeitlich deutlich versetzte Testreihen im Freiland möglich.
- [38] Wir danken E. H. Pommer für die Überlassung der Ergebnisse der Freilandtests.
- [39] S. Siegel, *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*, McGraw-Hill, New York, **1956**, S. 202–213. Bezogen auf Tabelle 1 gilt für den Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten  $r_s$  folgende Formel:

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum (R_F - R_G)^2}{n(n^2 - 1)}$$

Für die Bedeutung von  $R_F$  und  $R_G$  siehe Tabelle 1;  $n$  ist die Zahl der Verbindungen, deren Testergebnisse miteinander korreliert werden. Bei gleichen Rangplätzen innerhalb der Spalten wurde  $r_s$  gemäß Formel 9.4 auf S. 207 des oben zitierten Buches korrigiert.

- [40] a) H. Meier, *Methoden Org. Chem. (Houben-Weyl) 4th ed.* 1952–, Vol. 4/5a Photochemie I, **1975**, S. 189–204, S. 254, S. 511–519. b) Experimentell konnte für einige Enoetherstilbene gezeigt

werden, daß photochemische Cyclisierungen von 1,3,5-Hexatrienen nicht nur zu Dihydrophenanthrenen führen, sondern unter Einbeziehung der Enoether-Doppelbindung des Pharmakophors bevorzugt einen anderen Verlauf nehmen (siehe hierzu Lit. [45a,b]).

- [41] M. J. Bushell, K. Beutement, J. M. Clough, P. DeFraine, V. M. Anthony, C. R. A. Godfrey (ICI), EP-A 178826, **1984** (Priorität: 19.10.1984, 20.12.1984, veröffentlicht am 23.4.1986).
- [42] Die Latenzzeit zwischen Einreichen (Prioritätsdatum) und Veröffentlichung einer Europäischen Patentanmeldung beträgt achtzehn Monate. Nach dem Prioritätsdatum einer eigenen Anmeldung muß der Einreicher also achtzehn Monate warten, bevor er sicher sein kann, daß ihm kein Konkurrenzpatent zuvorgekommen ist.
- [43] Ein Kollege bemerkte scherzhaft, lediglich bei Wasserstoff habe man<sup>[41]</sup> den Zusatz „optionally substituted“ vergessen.
- [44] a) Im Text wird nur noch von Zeneca die Rede sein, auch wenn – je nach Zeitpunkt – ICI korrekter wäre. b) 1992/1993 wurde die Firma ICI in zwei eigenständige Unternehmen geteilt. Der Bereich Chemie firmierte weiter als ICI, der Bereich „Life Sciences“ wurde ausgliedert und firmiert seither als Zeneca.
- [45] Aus dem Team der Zeneca kommen mehrere exzellente Übersichtsartikel zu den Strobilurinen. Lit. [45e] (siehe unten) gibt darüber hinaus einen Überblick über den historischen Ablauf der gesamten Strobilurinforchung. a) „Fungicidal  $\beta$ -methoxyacrylates: From natural products to novel synthetic agricultural fungicides“: K. Beutement, J. M. Clough, P. J. de Fraine, C. R. A. Godfrey, *Pestic. Sci.* **1991**, 31, 499–519. b) „Fungicidal  $\beta$ -methoxyacrylates: From natural products to novel synthetic agricultural fungicides“: J. M. Clough, P. J. de Fraine, T. E. M. Fraser, C. R. A. Godfrey, *ACS Symp. Ser.* **1992**, 504, 372–383; c) „Role of Natural Products in Pesticide Discovery. The  $\beta$ -Methoxyacrylates“: J. M. Clough, A. D. Evans, P. J. de Fraine, T. E. M. Fraser, C. R. A. Godfrey, D. Youle, *ACS Symp. Ser.* **1994**, 551, 37–53; d) „Fungicidal  $\beta$ -Methoxyacrylates. N-Linked Pyrroles“: K. Beutement, J. M. Clough, P. J. de Fraine, C. R. A. Godfrey, *ACS Symp. Ser.* **1995**, 584, 326–342; e) „The Strobilurin Fungicides“: J. M. Clough, C. R. A. Godfrey in *Fungicidal Activity* (Hrsg.: D. H. Hutson, J. Miyamoto), Wiley, Chichester, **1998**, S. 109–148.
- [46] Einer von uns (T.A.) erhielt einen Bericht der ICI Plant Protection Division (*Evaluation of Oudemansin for antifungal and antibacterial activity, January 1984*) von der Deutschen ICI GmbH.
- [47] J. M. Clough, I. T. Kay (ICI), EP-A 178808, **1984**, (Priorität: 18.10.1984, 23.5.1985).
- [48] a) P. DeFraine, B. K. Snell, J. M. Clough, V. M. Anthony, K. Beutement (ICI), EP-A 206523, **1985** (Priorität: 18.8.1985, 17.4.1986); b) J. M. Clough, C. R. A. Godfrey (ICI), EP-A 212859, **1985** (Priorität: 22.08.1985).
- [49] a) Der Transport von gelösten Substanzen im Inneren höherer Pflanzen erfolgt im wesentlichen in zwei separaten Systemen. Im normalerweise rasch fließenden Transpirationsstrom des Xylems (Leitbündelsystem von der Wurzel bis zu den Blattspitzen) können beispielsweise von der Wurzel aufgenommene Mineralstoffe aufwärts (akropetal) in Richtung Blattspitze transportiert werden. Der Transport in die Gegenrichtung (basipetal) ist nur innerhalb des pflanzlichen Phloemsystems (Siebröhren) möglich. Er ist z. B. für den Transport von Assimilaten vom Ort ihrer Biosynthese in den Blättern abwärts in Richtung Blattscheide oder Stengel essentiell. Siehe: H. Mohr, P. Schopfer, *Pflanzenphysiologie*, Springer, Berlin, **1992**, S. 487–517. b) Für die systemische Verteilung von Xenobiotika (z. B. Fungiziden) nach Blattapplikation ist in der Regel als erster Schritt die Penetration von der Blattoberfläche ins Blattinnere durch die Wachsschicht der Cuticula in die wäßrigen Phasen von Xylem oder Phloem nötig. Dieser biophysikalische Vorgang entspricht im wesentlichen dem Verteilungsprozeß zwischen drei Phasen: einer äußeren wäßrigen oder gasförmigen Phase, der lipophilen Cuticula und dem wäßrigen Pflanzensaft im Inneren. Dementsprechend gibt es einen optimalen Bereich für die Lipid/Wasser-Verteilungskoeffizienten der Wirkstoffe, die näherungsweise den Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ( $P_{ow}$ ) entsprechen. Für Fungizide, die über die Blätter appliziert werden, werden  $\log P_{ow}$ -Werte von ca. 2–4 als optimal angesehen. Siehe hierzu: „Principles of uptake and systemic transport of fungicides within the plant“: F. Jacob, S. Neumann in *Modern Selective Fungicides* (Hrsg.: H. Lyr), Longman Scientific & Technical, Essex, **1987**, S. 13–30. c) Für den effizienten Transport von Xenobiotika im pflanzlichen Xylem ist eine ausreichende Wasserlöslichkeit erforderlich. Sie sollte im allgemeinen  $>10 \text{ mg L}^{-1}$  betragen (korreliert mit  $\log P_{ow}$ -Werten  $<4$ ). Bei hochaktiven Wirkstoffen können im Einzelfall allerdings auch geringere Wasserlöslichkeiten genügen, um makroskopisch zu systemischen Wirkungen zu führen – trotz sehr geringer transportierter Wirkstoffmengen. d) Die Voraussetzung für einen effizienten basipetalen Transport von Xenobiotika im Phloem ist (im Unterschied zu dem im Xylem) eine nochmals deutlich erhöhte Wasserlöslichkeit. Da es sich um einen Prozeß mit niedriger Transportgeschwindigkeit handelt, muß eine genügend lange Verweildauer im Phloem gegeben sein. Dies ist dann der Fall, wenn der Wirkstoff selbst eine besonders hohe Wasserlöslichkeit (vorzugsweise  $>10 \text{ g L}^{-1}$ , korreliert mit  $\log P_{ow}$ -Werten  $<0$ ) aufweist und/oder wenn der Wirkstoff als acide Verbindung im leicht alkalischen Milieu des Phloems (pH 7.4–8.7) überwiegend als Anion vorliegt (dies ist bei  $\text{pK}_a$ -Werten  $<5$  der Fall). Siehe hierzu Lit. [49b] sowie: D. A. Kleier, *Pestic. Sci.* **1994**, 42, 1–11. e) Die teilweise gegensätzlichen physikalischen Voraussetzungen für das Penetrieren der Cuticula einerseits und den Transport in den wäßrigen Systemen der Pflanze andererseits führen dazu, daß sich hochlipophile Wirkstoffe ( $\log P_{ow} > 4$ ) kaum für einen systemischen Transport eignen. Dagegen bewirkt eine sehr niedrige Lipophilie ( $\log P_{ow} < 0$ ), daß die Wirkstoffe nicht mehr gut durch die Cuticula penetrieren können und gegebenenfalls auf anderen Wegen ins Pflanzeninnere gelangen und/oder spezielle Formulierungszusätze benötigen. Siehe hierzu: P. J. G. Stevens, E. A. Baker, N. H. Anderson, *Pestic. Sci.* **1988**, 24, 31–53; E. A. Baker, A. L. Hayes, R. C. Butler, *Pestic. Sci.* **1992**, 34, 167–182. f) Selbstverständlich ist für den systemischen Transport außerdem eine genügend hohe metabolische Stabilität des jeweiligen Wirkstoffs im Pflanzensystem Voraussetzung, um dort eine hinreichend lange Lebensdauer zu gewährleisten.
- [50] V. M. Anthony, J. M. Clough, P. DeFraine, C. R. A. Godfrey (ICI), EP-A 242070, **1986** (Priorität: 17.4.1986, 22.1.1987).
- [51] V. M. Anthony, J. M. Clough, P. DeFraine, C. R. A. Godfrey, P. J. Crowley, K. Anderton (ICI), EP-A 243012, **1986** (Priorität: 17.4.1986, 26.1.1987).
- [52] C. R. A. Godfrey, I. Streeting, R. Cheetham (ICI), EP-A 382375, **1989** (Priorität: 10.2.1989).
- [53] V. M. Anthony, J. M. Clough, P. DeFraine, C. R. A. Godfrey, I. Ferguson, P. Crowley, M. G. Hutchings (Zeneca), EP-A 242081, **1986** (Priorität: 17.4.1986, 23.12.1986).
- [54] Der  $\log P_{ow}$ -Wert für **13a** beträgt 3.3,<sup>[45b]</sup> für **13b** 5.1,<sup>[45c]</sup> für **19** 2.5,<sup>[45e]</sup>
- [55] Bekanntlich wächst aber, wo Gefahr ist, das Rettende auch (nach Friedrich Hölderlin, *Patos*).
- [56] „Itzt ist es nicht mehr mit Murren und Verwünschen getan. (...) Ein verzweifelter Übel will eine verwegene Arznei.“ (Friedrich Schiller, *Die Verschwörung des Fiesco zu Genua*, 4. Aufzug, 6. Auftritt).
- [57] B. Wenderoth, C. Rentzea, E. Ammermann, E. H. Pommer, W. Steglich, T. Anke (BASF AG), EP-A 253213, **1986** (Priorität: 16.7.1986).
- [58] V. M. Anthony, J. M. Clough, C. R. A. Godfrey, T. E. Wiggins (ICI), EP-A 254426, **1986** (Priorität: 18.7.1986).
- [59] H.S. dankt F. Röhl für die Etablierung und Automatisierung dieses Tests, für zuverlässige und kompetente Prüfung tausender Strobilurinvarianten sowie für die rasche Rückmeldung der Testergebnisse und ihre Bewertung.
- [60] Zum Testsystem siehe: a) F. Röhl, H. Sauter, *Biochem. Soc. Trans.* **1994**, 22, 63S; b) Lit. [28].
- [61] Zur grundsätzlichen Bedeutung biochemischer Testmodelle für die Leitstrukturfindung und -optimierung siehe z. B.: J. Dancer, A. Schulz, T. Peine, K. Wright, *Pestic. Outlook* **1998**, 9(3), 36–41, zit. Lit.
- [62] Zur Synthese siehe Abschnitt 6.
- [63] a) „Phenoxyphenyl alkoxyiminoacetamides. New broad spectrum fungicides“: Y. Hayase, T. Kataoka, M. Masuko, M. Niikawa, M. Ichinari, H. Takenaka, T. Takahashi, Y. Hayashi, R. Takeda, *ACS Symp. Ser.* **1995**, 584, 343–353; b) M. Masuko, *Annu. Rep. Shionogi Res. Lab.* **1997**, 47, 33–57.
- [64] Y. Hayase, T. Kataoka, H. Takenaka, M. Ichinari, M. Masuko, T. Takahashi, N. Tanimoto (Shionogi), EP-A 398692, **1989** (Priorität: 17.5.1989, 29.12.1989).

- [65] S. Brand, E. Ammermann, G. Lorenz, H. Sauter, K. Oberdorf, U. Kardorff, C. Künast (BASF AG), EP-A 477 631, **1990** (Priorität: 22.9.1990).
- [66] a) A. Fredenhagen, A. Kühn, H. H. Peter, V. Cuomo, U. Giuliano, J. Antibiot. **1990**, 43, 655–660; b) A. Fredenhagen, P. Hug, H. H. Peter, J. Antibiot. **1990**, 43, 661–667.
- [67] a) P. J. de Fraine, A. Martin (Zeneca), EP-A 370 629, **1988** (Priorität: 21.11.1988, 9.3.1989); b) H. P. Isenring, S. Trah, B. Weiss (Hoffmann-La Roche), WO-A 90/07 493, **1988** (Priorität: 29.12.1988); c) K. Tsubata, N. Nijno, E. Endo, Y. Yamamoto, H. Kanno (Nihon Nohyaku), EP-A 414 153, **1989** (Priorität: 22.8.1989); d) M. Watanabe, T. Tanaka, H. Kobayashi, S. Yokoyama (Ube), EP-A 426 460, **1989** (Priorität: 2.11.1989, 27.2.1990); e) H. P. Isenring, B. Weiss (Ciba-Geigy), EP-A 460 575, **1990** (Priorität: 5.6.1990, 23.4.1991); f) S. Brand, U. Kardorff, R. Kirstgen, B. Müller, K. Oberdorf, H. Sauter, G. Lorenz, E. Ammermann, C. Künast, A. Harreus (BASF AG), EP-A 463 488, **1990** (Priorität: 27.6.1990); g) J. M. Clough, C. R. A. Godfrey, P. J. de Fraine (Zeneca), EP-A 472 300, **1990** (Priorität: 22.8.1990); h) J. M. Clough, C. R. A. Godfrey, P. J. de Fraine, I. R. Matthews (Zeneca), WO-A 92/13 830, **1991** (Priorität: 30.1.1991, 14.8.1991).
- [68] Seinerzeit hatte sich auch die BASF um die Akquisition der Maag AG bemüht – ohne Erfolg. Im Vordergrund des BASF-Interesses standen jedoch nicht die Strobilurine, sondern das schon bestehende Fungizidgeschäft der Maag (z. B. Corbel).
- [69] Dieser Begriff wird leider immer noch häufig in abwertendem Sinne benutzt. Das ist meist nicht gerechtfertigt, da erstens eine besondere, kreative Leistung dazu gehört, eine brauchbare Lücke in einem engmaschigen Patentanspruch zu finden und zweitens derartige „Me-too“-Varianten durchaus zu besonderen und unerwarteten Wirkungssteigerungen führen können – so auch in diesem Fall (siehe Text).
- [70] Vgl. Lit. [20e] sowie P. J. de Fraine, J. M. Clough, *Pestic. Sci.* **1995**, 44, 77–79.
- [71] a) „CGA 279 202. A new Plant Health Product for Protection Against Diseases of Agronomic Crops, Vegetables, Tree Crops and Turf“: *Novartis Technical Bulletin* **1998**; b) „CGA 279 202: A new broad-spectrum strobilurin fungicide“: P. Margot, F. Huggenberger, J. Amrein, B. Weiss, *Abstr. Pap. Brighton Crop Prot. Conf. Pests and Diseases* (Farnham, UK) **1998**, S. 275–382.
- [72] Für eine ausgezeichnete Einführung siehe: L. G. Copping, H. G. Hewitt, *Chemistry and Mode of Action of Crop Protection Agents*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1998**.
- [73] Siehe z. B.: „Optimization of Physicochemical and Biophysical Properties of Pesticides“: I. J. Graham-Bryce, *ACS Symp. Ser.* **1994**, 225, 185–207.
- [74] H. S. dankt H. Köhle für zahlreiche Diskussionen und Anregungen in diesem Zusammenhang.
- [75] Bei der BASF wurden bislang über 15 000 Strobilurinvarianten synthetisiert.
- [76] a) H. Köhle, R. E. Gold, E. Ammermann, H. Sauter, *Biochem. Soc. Trans.* **1994**, 22, 65S.
- [77] Eine ausführlichere Diskussion findet sich in Lit. [28a].
- [78] B. Wenderoth, H. Sauter, E. Ammermann, E. H. Pommer (BASF), EP-A 280 185, **1987** (Priorität: 20.2.1987).
- [79] R. Benoit, H. Sauter, R. Kirstgen, G. Lorenz, E. Ammermann (BASF), EP-A 498 188, **1991** (Priorität: 7.2.1991).
- [80] a) B. Müller, H. Sauter, F. Röhl, R. Dötzer, G. Lorenz, E. Ammermann (BASF), WO-A 93/15 046, **1992** (Priorität: 29.1.1992, 26.6.1992, 5.10.1992); b) Hier gab es einen weiteren Patentwettbewerb. Zunächst waren die schwächer wirksamen N-Alkylcarbamate von Ishihara angemeldet worden: T. Komyoji, I. Shigehava, N. Matsuo, H. Shimoharada, T. Ohshima, T. Akagi, S. Mitani (Ishihara), EP-A 498 396, **1991** (Priorität: 7.2.1991, 23.10.1991). Dann folgte unsere Anmeldung.<sup>[80a]</sup> Schließlich hat auch Nihon Nohyaku die N-Methoxycarbamate angemeldet: H. Ohnishi, S. Tajima, Y. Yamamoto, H. Kanno (Nihon Nohyaku), EP-A 619 301, **1993** (Priorität: 4.4.1993).
- [81] a) R. J. Brown, K.-M. Sun, D. A. Frasier (DuPont), WO-A 95/14 009, **1993** (Priorität: 19.11.1993). b) Kurz nach Veröffentlichung dieser Anmeldung im Mai 1995 hat Novartis Strobilurine mit ähnlichen cyclischen Pharmakophoren und spezieller Seitenkette angemeldet:
- H. Ziegler, R. Zurflüh, A. C. O'Sullivan (Novartis), WO-A 97/02 255, **1995** (Priorität: 4.7.1995, 24.5.1996).
- [82] B. W. Krüger, L. Assmann, H. Gayer, P. Gerdes, U. Heinemann, D. Kuhnt, U. Philipp, T. Seitz, J. Stetter, R. Tiemann, H. W. Dehne, S. Dutzmann, G. Häussler (Bayer AG), WO-A 95/04 728, **1993** (Priorität: 11.8.1993, 10.3.1994).
- [83] a) T. Ohtsuka, T. Murashi, S. Suzuki, M. Masuko, H. Takenaka (Shionogi), WO-A 95/27 693, **1994** (Priorität: 6.4.1994, 7.7.1994, 4.11.1994, 27.1.1995); b) K. Oberdorf, H. Sauter, H. König, A. Harreus, B. Müller, R. Kirstgen, W. Grammenos, H. Bayer, F. Röhl, G. Lorenz, E. Ammermann, V. Harries (BASF AG), WO-A 96/07 633, **1994** (Priorität: 10.9.1994).
- [84] a) „The synthetic strobilurin BAS 490F: profile of a modern fungicide“: R. E. Gold, E. Ammermann, H. Köhle, G. M. E. Leinhos, G. Lorenz, J. B. Speakman, M. Stark-Urnau, H. Sauter in *Modern Fungicides and Antifungal Compounds* (Hrsg.: H. Lyr, P. E. Russell, H. D. Sisler), Intercept, Andover, **1996**, S. 79–92; b) R. E. Gold, G. M. E. Leinhos, *Pestic. Sci.* **1995**, 43, 250–253. c) *Kresoxim-methyl*, Produktinformation der BASF AG, Ludwigshafen, **1993**. d) Die Begriffe „protektiv“ (schützend) und „kurativ“ (heilend) beziehen sich auf den Zeitpunkt der Fungizidbehandlung vor bzw. nach einer Pilzinfektion.
- [85] H. S. dankt H. Kubinyi für diese und andere QSAR-Rechnungen und für zahlreiche aufschlußreiche Diskussionen.
- [86] W. Grammenos, H. Kubinyi, H. Sauter, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [87] Auch eine Verlängerung des Zwischenstücks zwischen den beiden Arenen (von der Phenoxy-Seitenkette in **13a** zur Phenoxy-methyl-Seitenkette in **9a**) erhöht den  $\log P_{ow}$ -Wert nur um ca. 0.3.
- [88] Auch hier gab es ein – im Nachhinein betrachtet – faszinierendes Patentwettrennen: a) H. Ziegler, S. Trah, S. Farooq, R. Zurflüh (Ciba-Geigy), WO-A 95/18 789, **1994** (Priorität: 5.1.1994, 1.7.1994); b) H. Bayer, H. Sauter, R. Müller, W. Grammenos, A. Harreus, R. Kirstgen, F. Röhl, E. Ammermann, G. Lorenz (BASF AG), WO-A 95/21 153, **1994** (Priorität: 4.2.1994, 17.6.1994); c) H. Bayer, H. Sauter, R. Müller, W. Grammenos, A. Harreus, R. Kirstgen, F. Röhl, E. Ammermann, G. Lorenz (BASF AG), WO-A 95/21 154, **1994** (Priorität: 4.2.1994, 17.6.1994); d) H. Bayer, H. Sauter, R. Müller, W. Grammenos, A. Harreus, R. Kirstgen, F. Röhl, E. Ammermann, G. Lorenz (BASF AG), WO-A 95/21 156, **1994** (Priorität: 4.2.1994, 17.6.1994). e) Siehe auch Lit. [81b]. Dort hat Novartis die spezielle „Doppeloximether“-Seitenkette mit „neuem“ cyclischen Pharmakophor beansprucht.
- [89] Die BASF meldete trotz verlorengegangener Priorität für die Wirkstoffmoleküle Mischungen mit einigen dieser Strobilurine mit „Doppeloximether“-Seitenkette zum Patent an, z. B.: B. Schwalge, R. Müller, H. Bayer, H. Sauter, R. Saur, K. Schelberger, E. Ammermann, G. Lorenz, S. Strathmann (BASF AG), WO-A 97/06 678, **1995** (Priorität: 17.8.1995).
- [90] R. Kirstgen, W. Grammenos, H. Bayer, R. Doetzer, H. Koenig, K. Oberdorf, H. Sauter, H. Wingert, G. Lorenz, E. Ammermann, V. Harries (BASF AG), WO-A 94/19 331, **1993** (Priorität: 23.2.1993).
- [91] G. Kleefeld, A. Klausener, W. Krämer, W. Brandes, S. Dutzmann, G. Häussler (Bayer AG), EP-A 331 966, **1988** (Priorität: 5.3.1988).
- [92] S. Trah, F. Gantz (Maag AG), EP-A 433 233, **1989** (Priorität: 14.12.1989).
- [93] a) P. R. Hofstätter, *Gruppensdynamik*, Rowohlt, Hamburg, **1957**, S. 27–63; b) „Teamarbeit und Einzelarbeit aus Sicht der Arbeitspsychologie“: B. Biäsch, *Ind. Org.* **1962**, 31, 139–142.
- [94] a) S. Iwata, J. W. Lee, K. Okada, J. K. Lee, M. Iwata, B. Rasmussen, T. A. Link, S. Ramaswamy, B. K. Jap, *Science* **1998**, 281, 64–71; b) Z. Zhang, L. Huang, V. M. Shulmeister, Y.-I. Chi, K. K. Kim, L.-W. Hung, A. R. Crofts, E. A. Berry, S.-H. Kim, *Nature* **1998**, 392, 677–684.
- [95] a) M. Degli Eposti, S. de Vries, M. Crimi, A. X. Gnelli, T. Patarnello, A. Meyer, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1143, 243–271; b) U. Brandt, B. L. Trumpower, *Crit. Rev. Biochem.* **1994**, 29, 165–197.
- [96] a) „Fungicide Resistance“: S. J. Kendall, D. W. Hollomon in *Fungicidal Activity* (Hrsg.: D. Hutson, J. Miyamoto), Wiley, Chichester, **1998**, S. 7–108. b) Zu den modernen Methoden eines auch vorbeugenden Resistenzmanagements gehören unter anderem der Einsatz von Mischungen und alternierende Behandlungen mit Fungiziden aus anderen Stoffklassen sowie die firmenübergreifende



- Kooperation und Abstimmung von Anwendungsempfehlungen im FRAC (Fungicide Resistance Action Committee); vgl. Lit. [72], S. 111.
- [97] Lediglich bei Algen und Moosen gibt es noch Sporenkeimung.
- [98] „BAS490F – a broad-spectrum fungicide with a new mode of action“: E. Ammermann, G. Lorenz, K. Schelberger, B. Wenderoth, H. Sauter, C. Rentzea, *Abstr. Pap. Brighton Crop Prot. Conf. Pests and Diseases, Vol. 1* (Farnham, UK) **1992**, S. 403–410.
- [99] a) H. Köhle, K. Grossmann, G. Retzlaff, A. Akers, *Gesunde Pflanz.* **1997**, 49(8), 1–5; b) R. Saur, B. H. Menck, G. Prigge, *Gesunde Pflanz.* **1997**, 49(5), 151–158.
- [100] „ICIA 5504: a novel, broad-spectrum, systemic  $\beta$ -methoxyacrylate fungicide“: J. R. Godwin, V. M. Anthony, J. M. Clough, C. R. A. Godfrey, *Abstr. Pap. Brighton Crop Prot. Conf. Pests and Diseases, Vol. 1* (Farnham, UK) **1992**, S. 435–442.
- [101] a) M. Masuko, M. Niikawa, T. Kataoka, M. Ichinari, H. Takenaka, Y. Hayase, Y. Hayashi, R. Takeda, *Abstr. Pap. 6th Int. Congr. Plant Pathology* (Montreal) **1993**, S. 91; b) M. Masuko, M. Niikawa, T. Kataoka, M. Ichinari, H. Takenaka, Y. Hayase, Y. Hayashi, R. Takeda, Poster, vorgestellt beim 6th International Congress of Plant Pathology, Montreal, **1993**.
- [102] H. Wingert, B. Wolf, B. Benoit, H. Sauter, M. Hepp, W. Grammenos, T. Kükenhöfner (BASF AG), EP-A 493711, **1990**, (Priorität: 31.12.1990).
- [103] O. Hueter, A. Pfiffner, H. Szczepanski, M. Zeller, *Abstr. Pap. 9th Int. Congr. Pest. Chem.* (London) **1998**, S. 1A-008.
- [104] a) „Strobilurine in der Wintergerste verbessern die Qualität“: K. Schlüter, *Landpost* (Stuttgart) **1997**, 7. Juni, S. 34; b) „Fungizid-Nachlese 1997 – Das Jahr der Stobis“: J. Wörle, *dlz agrarmagazin* (München) **1997**, Heft 11, S. 26; c) „Strobilurine: Erfahrungen aus 1997 nutzen“: J. Frahm, *top agrar* **1998**, Heft 1, S. 60; d) „Fungizid-Einsatz im Getreide 1998 – Die Karten werden neu gemischt“: H. Hanhart, J. Frahm, *top agrar* **1998**, Heft 1, S. 64.