

2 Ergebnisse

2.1 Validierung der Testmethoden

Aufgrund der geringen Ausbeute bei der Isolierung und Synthese standen nur sehr kleine Mengen von Antidesmon und dessen Derivate zur Verfügung. Es wurde daher versucht, die bei Bioassays üblichen Schwankungen möglichst gering zu halten, da nur eine bestimmte Anzahl von Testwiederholungen möglich war.

Zu diesem Zweck wurden die Tests zunächst mehrfach mit einer Referenzsubstanz durchgeführt. Aus den so erhaltenen IC50-Werten wurde ein Referenzbereich errechnet, in dem 95% der ermittelten Werte lagen. Dieser Bereich diente als Standard für die folgenden Versuche mit Antidesmon. In diesen Versuchen wurde unter gleichen Bedingungen der IC50-Wert für die jeweilige Referenzsubstanz ermittelt. Lag der Wert für die Referenzsubstanz außerhalb des vorab ermittelten Referenzbereiches, wurde der jeweilige Versuch nicht gewertet und wiederholt. Zugleich wurde nach Faktoren, die das Versuchsergebnis verfälschen könnten, gesucht. Es ergaben sich folgende prinzipielle Fehlerquellen, auf die Einfluss genommen werden konnte:

1. Die Vitalität der Parasiten oder der Wirtszellen ist vermindert.

Die Ursache hierfür könnte eine Kontamination des Mediums mit Bakterien oder Pilzen oder ein Nährstoffmangel sein. Eine bereits zu Beginn des Tests verminderte Vitalität der Parasiten würde fälschlich hohe Werte für die Wirksamkeit einer Substanz erbringen. Die Parasiten- und Wirtszellkulturen wurden daher regelmäßig vor Ansetzen der Versuche mikroskopisch kontrolliert und gefärbte Ausstriche angefertigt (Abb. 7). Dabei wurde die Vitalität und Morphologie der Parasiten und die Form und Dicke der Zellschichten der Wirtszellen beurteilt. Eine Kontamination oder Verbrauch des Mediums wurde durch Trübung bzw. Farbumschlag des zugesetzten Indikators auffällig. Vor dem Aussäen der Wirtszellen in die Testplatte müssen die Zellkulturen trypsiniert werden, um sie vom Boden der Kulturflasche zu lösen. Vorversuche zeigten, dass dieser Prozess oft zur Schädigung einzelner Zellen führt. Deshalb wurde die zur Auszählung verwandte Probe der trypsinierten Zellen mit dem Farbstoff Trypanblau versetzt, der tote Organismen blau anfärbt. So wurde sichergestellt, dass nur lebensfähige Zellen in die Zählung eingingen. Mit den Parasiten wurde ebenso verfahren. Vor der Infektion der Wirtszellschicht bei einem Test wurde die Intaktheit der Wirtszellen mikroskopisch geprüft.

- 2 Die Parasiten befinden sich nicht in der logarithmischen Wachstumsphase

Dies sollte vor jedem Versuch sichergestellt werden, da sonst die Vermehrungsgeschwindigkeit der Parasiten trotz initial gleicher Parasitendichte von Versuch zu Versuch schwanken und unterschiedliche Werte für die Wirksamkeit einer Substanz liefern könnte. Dies wurde durch regelmäßige Vereinzelung der Parasitenkulturen nach einem zu diesem Zweck festgelegten Schema erzielt (s. Kap. 3.3., Testmethoden).

- 3 Es liegt nicht die gewünschte Entwicklungsstufe der Parasiten vor

In den hier verwandten *in-vitro*-Assays sollte die Wirkung der zugesetzten Substanz auf die humanpathogenen Entwicklungsformen der Parasiten beurteilt werden. Es zeigte sich jedoch, dass sich bei längerer Kultivierung ein Teil der Parasiten in die Insektenformen umwandelt. In diesem Fall wurde die Kultur verworfen. Aufgrund der Vorversuche wurde festgelegt, dass vor jedem Versuch eine mikroskopische Kontrolle des Anteils an unerwünschten Insektenformen in der Kultur zu erfolgen hatte.

Auf die schrittweise Optimierung der verschiedenen Assays wird im Folgenden gesondert eingegangen.

2.1.1 *Trypanosoma cruzi*

Im *in-vitro*-Test mit *Trypanosoma cruzi* wurden in 23 Versuchen IC50-Werte für die Referenzsubstanz Benznidazol ermittelt, einem Standardmedikament zur Behandlung der Infektion mit *Trypanosoma cruzi*. Als Mittelwert ergab sich 0,49 µg/ml und ein Referenzbereich gemäß Tab. 1. Dieser liegt im Bereich der für diese Bioassays üblichen Schwankungen (vgl. Freiburghaus et al 1996, Kaminsky und Brun 1998, Luque et al. 2000).

Benznidazol	
Werte in µg/ml	
Mittlere IC50	0,49
σ (n=23)	0,16
MW \pm 2 σ	0,17-0,81

Tabelle 1: Referenzbereich für Benznidazol (Werte aus 23 unabhängigen Versuchen; σ = Standardabweichung)

Wie oben ausgeführt, diente dieser Referenzbereich als Standard für die folgenden Versuche mit Antidesmon. In den Versuchen wurde unter gleichen Bedingungen der IC50-Wert für Benznidazol ermittelt. Lag der Wert außerhalb des Referenzbereiches, musste der jeweilige Versuch kritisch betrachtet werden. Solche Versuche wurden nicht gewertet und wiederholt.

2.1.2 *Trypanosoma brucei rhodesiense* und *Trypanosoma evansi*

Als Referenzsubstanz für *T. b. rhodesiense* und *T. evansi* wurde Melarsoprol verwandt; hier ist eine gute Aktivität *in vitro* und *in vivo* bekannt. Aus 19 IC50-Werten für die Substanz, die in aufeinander folgenden Tests mit dieser Methode bestimmt worden waren, wurde ein Referenzbereich für die *In-vitro*-Versuche mit *T. b. rhodesiense* (MW \pm 2 σ) ermittelt (Tab. 2). Die Ermittlung eines Referenzbereiches für *T. evansi* erfolgte aus zeitlichen Gründen nicht. Die Kontrolle der Parasitenkulturen erfolgte in gleicher Weise wie bei *T. cruzi* mikroskopisch und durch Anfertigen von Ausstrichen. Die Zielform des Assays ist die trypomastigote Form, wie sie im Blut befallener Menschen vorkommt (Abb. 8). Da bei *T. evansi* Stämme mit und ohne Kinetoplast gezüchtet wurden, wurde vor dem Versuchsansatz das Vorhandensein des Organells mittels Fluoreszenzfärbung überprüft (Abb. 9). Eine Kontrolle der Wirtszellkulturen entfiel, da dieser Test axenisch durchgeführt wird.

Melarsoprol	
Werte in µg/ml	
Mittlere IC50	0,001586
St.-Abw. σ (n=19)	0,000638
MW $\pm 2\sigma$	0,00031-0,00286

Tabelle 2: Referenzbereich für Melarsoprol (Werte aus 19 unabhängigen Versuchen; σ = Standardabweichung)

2.1.3. *Leishmania donovani*

Als Referenzsubstanz wurde Natriumstibogluconat benutzt, das *in vivo* gut wirksam gegen *L. donovani* ist und zur Therapie der viszeralen Leishmaniose benutzt wird. Es wurde, analog zu den bereits beschriebenen Assays, ein Referenzbereich für diese Substanz erstellt (Tab. 3); Versuche, bei denen der IC50-Wert für die mitgeführte Referenzsubstanz außerhalb dieses Bereiches lag, wurden nicht gewertet und wiederholt.

Natriumstibogluconat	
Werte in µg/ml	
Mittlere IC50	49
St.-Abw. σ (n=12)	11,6
MW $\pm 2\sigma$	25,7-72,3

Tabelle 3: Referenzbereich für Natriumstibogluconat (Werte aus 12 unabhängigen Versuchen; σ = Standardabweichung)

Die Zielform dieses Assays ist die amastigote intrazelluläre Form (Abb. 10); daher sollte auch die axenische Permanentkultur aus Amastigoten bestehen. Das wurde durch mikroskopische Kontrollen der Kulturen vor Ansetzen der Versuche sichergestellt. Fanden sich promastigote Formen in der Kultur (Abb. 11), wurde sie verworfen. Eine unerwünschte Toxizität der Testsubstanz gegenüber den Wirtszellen der Parasiten kann eine scheinbare Wirkung vortäuschen. Bei der mikroskopischen Auswertung des Tests wurden daher auch Veränderungen der Makrophagen, die auf eine zytotoxische Wirkung hinweisen könnten, beurteilt und protokolliert.

2.1.4 *Plasmodium falciparum*

Als Referenzsubstanz für die *In-vitro*-Versuche mit *Plasmodium falciparum* diene Chloroquin, ein bewährtes Malaria-Chemotherapeutikum. Die Versuche wurden mit zwei Stämmen des Malaria-Erregers durchgeführt. Der Stamm K1 weist eine partielle Chloroquinresistenz auf, der Stamm NF54 ist nicht resistent. In 23 Versuchen wurden für beide Stämme IC50-Werte und ein Referenzbereich ermittelt (Tab. 4).

Chloroquin		
Werte in µg/ml		
Plasmodienstamm	K1	NF54
Mittlere IC50	0,069	0,0044
St.-Abw. σ (n=19)	0,02	0,0014
MW $\pm 2\sigma$	0,027-0,111	0,0017-0,0017-0,0072

Tabelle 4: Referenzbereich für Chloroquin (σ = Standardabweichung).

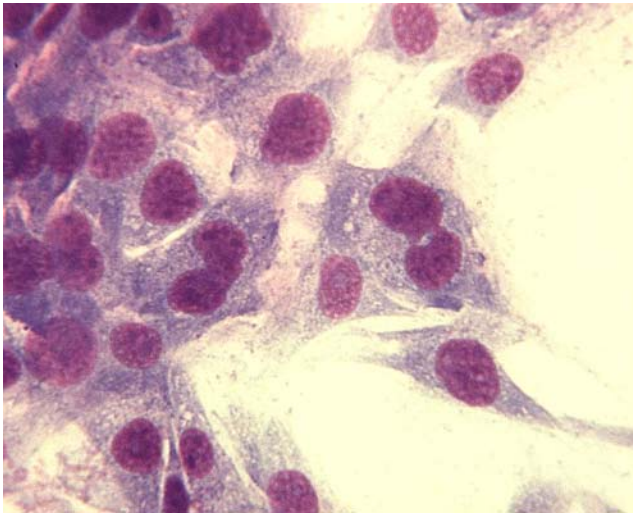


Abbildung 7:
Kultur von L6-Myofibroblasten
(Giemsa-Färbung, Vergrößerung 50fach)

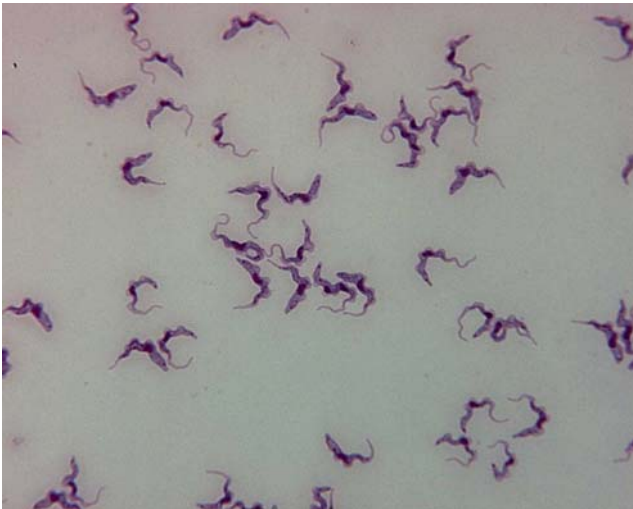


Abbildung 8:
***Trypanosoma brucei rhodesiense*, trypomastigote Form**
(Giemsa-Färbung, Vergrößerung 50fach)

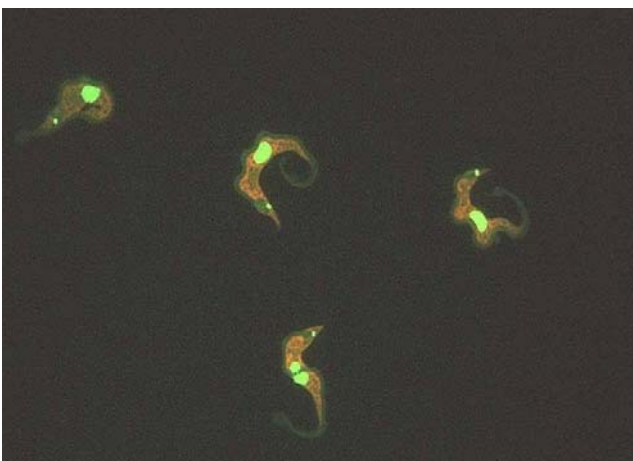


Abbildung 9:
***Trypanosoma evansi*, trypomastigote Form**
(Acridin-Orange-Färbung, Vergrößerung 100fach)
Der Farbstoff lässt DNA-haltige Zellbestandteile
(Zellkern und Kinetoplast) grün und das Zytoplasma
orange erscheinen

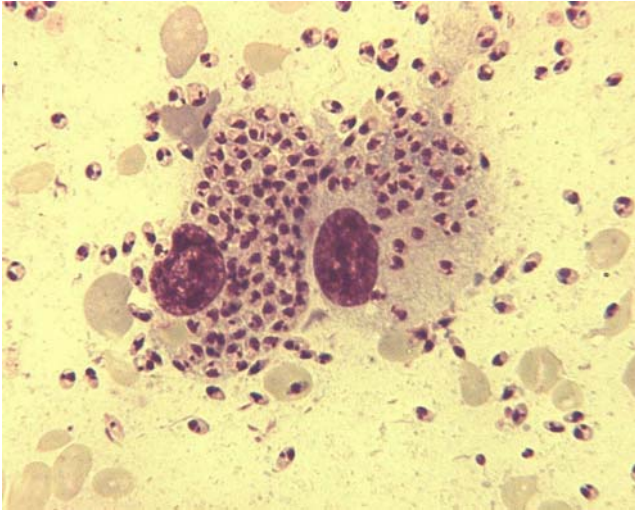


Abbildung 10:
Leishmania donovani, amastigote Form,
 intrazellulär in zwei Makrophagen und extrazellulär
 (Giemsa-Färbung, Vergrößerung 50fach)

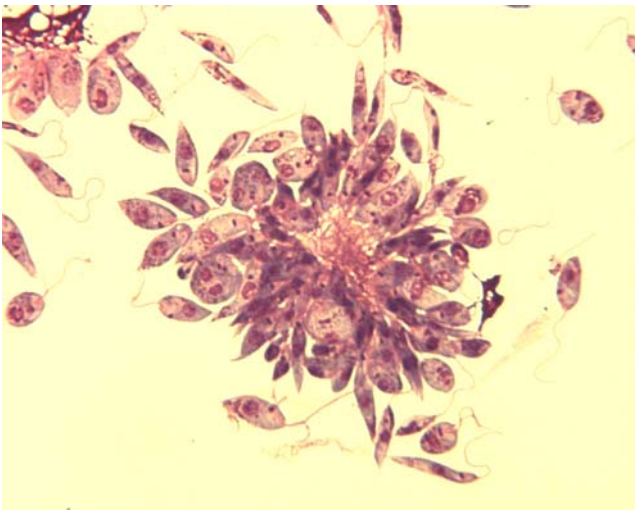


Abbildung 11:
Leishmania donovani, promastigote Form, in
 Kulturmedium (Giemsa-Färbung, Vergrößerung 100fach)

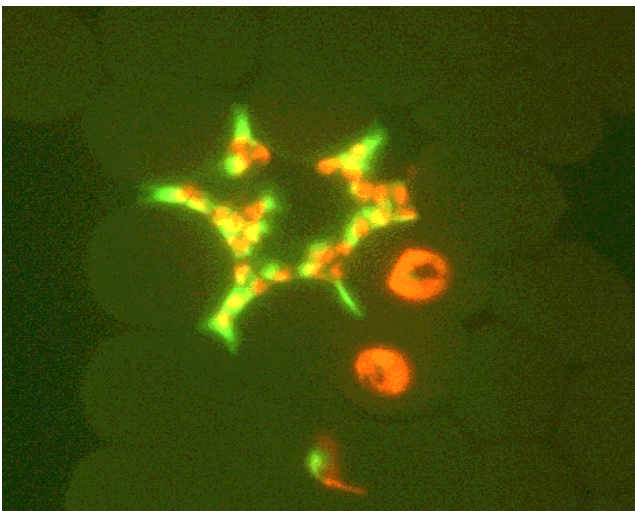


Abbildung 12:
Plasmodium-falciparum-befallene Erythrozyten im
 Kulturausstrich; charakteristische Ringform der
 intrazellulären Merozoiten, zwischen den
 Erythrozyten erkennt man freigesetzte Merozoiten
 (Acridin-Orange-Färbung, Vergrößerung 100fach)

Abb. 8-12: A. Häring

Als kritischer Parameter bei diesem Assay erwies sich der Anteil der parasitierten Erythrozyten in der Testlösung. Eine zu hohe Parasitämie würde zu einer Selbstlimitierung des Parasitenwachstums führen, eine zu geringe ein unzureichend schwaches Signal bei der Auswertung bedingen. Zur Konstanthaltung der Bedingungen wurde daher vor jedem Versuch ein Ausstrich der Plasmodienkulturen hergestellt (Abb. 12) und der Prozentsatz der befallenen Erythrozyten bestimmt. Die Parasitämie wurde für die Versuche auf 0,3% eingestellt.

2.1.5 Zytotoxizitätstests

Vor dem Ansetzen der Versuche wurden die Vitalität der Zellkulturen kontrolliert, indem die Kultur mittels Umkehrmikroskop betrachtet und ein gefärbter Ausstrich der Zellkultur angefertigt wurde. Nach der Trypsinierung der Zellen wurde, wie bereits in 2.1.1 beschrieben, eine Probe mit Trypanblau gefärbt und ausgezählt, so dass nur lebensfähige Zellen in die Zählung eingingen. Die Zellen wurden anschließend auf den Testplatten ausgesät und 24 Stunden inkubiert, so dass nach der Trypsinierung eine Regeneration und ein Anhaften der Zellen erfolgen konnte. Bei Ausbleiben des Anhaftens ergaben sich aufgrund des Mangels an lebensfähigen Zellen fälschlich hohe Werte für die Zytotoxizität einer Substanz. Nach der Inkubation wurde daher eine mikroskopische Kontrolle durchgeführt, die sicherstellen sollte, dass die Zellen eine lang gestreckte Form als Zeichen der Anhaftung angenommen hatten und keine strukturellen Schäden aufwiesen (Abb. 13). Die Ermittlung eines Referenzbereiches war bei diesen Versuchen nicht möglich, da die Verfügung stehende Zellzahl nicht ausreichend war.

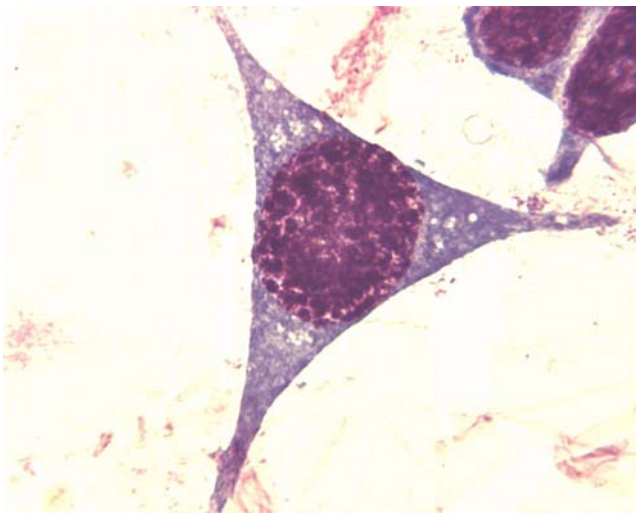


Abbildung 13:
NB2a- Zellen (murine Neuroblastomzellen),
Bildung von Zellausläufern als Zeichen der
Anhaftung (Giemsa-Färbung, Vergrößerung
100fach)
Abbildung: A. Häring

2.2 Bioaktivitätsuntersuchungen

Das Ziel der Versuche war es, Antidesmon auf Aktivität zunächst gegen Trypanosomen *in vitro* zu testen und die Wirkung mit der einer Referenzsubstanz zu vergleichen. Hierbei wurde jede Substanz im Parallelansatz in sechs Konzentrationen getestet, die sich durch Reihenverdünnung der Anfangskonzentration ergaben. Das Wachstum der Parasiten bei einer gegebenen

Substanzkonzentration wurde als Prozentsatz des Parasitenwachstums ohne Wirksubstanz (Kontrollansatz) berechnet. In den Tabellen sind die Ergebnisse der Parallelansätze getrennt aufgeführt, für die Diagramme wurden die Resultate eines Versuches gemittelt. Als Endergebnis jedes Versuchs wurde der IC50-Wert ermittelt (s. Kapitel 3.3.7). Dieser Wert gibt die Substanzkonzentration an, die eine fünfzigprozentige Wachstumshemmung der Parasiten im Vergleich zum Kontrollansatz bewirkt.

2.2.1 Wirkung von Antidesmon auf *T. cruzi*

Als Referenzsubstanz wurde Benznidazol ausgewählt, das eines der Mittel der ersten Wahl zur Therapie der durch *T. cruzi* verursachten Chagas-Krankheit und auch *in vitro* gut wirksam ist. Die Aktivität der getesteten Substanzen wurde anhand der ermittelten IC50-Werte gemäß der Festlegung der Drug Discovery Research Group von TDR/WHO (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. R. Brun, STI Basel, 2003) in „aktiv“, „schwach aktiv“ und „inaktiv“ eingeteilt (Tab. 5)

IC50-Wert	Bewertung
< 1 µg/ml	Aktiv
1-3 µg/ml	Schwach aktiv
>3 µg/ml	Inaktiv

Tabelle 5: Bewertung der Testsubstanzen im *T. cruzi*- Assay

Der erste Versuch wurde mit einer Höchstkonzentration von 90 µg/ml für Antidesmon und 30 µg/ml für Benznidazol in sechs Reihenverdünnungen von 1:3 und je zwei Parallelansätzen durchgeführt (Tab. 6). Es ergab sich ein IC50-Wert von 0,49 µg/ml als Mittelwert der beiden Parallelansätze für Benznidazol. Für Antidesmon konnte kein IC50-Wert ermittelt werden, da selbst in der kleinsten Konzentration von 0,37 µg/ml das Parasitenwachstum weit unter 50 Prozent der Positivkontrolle lag. Dieses Ergebnis wies auf eine stark hemmende Wirkung des Antidesmons auf das Parasitenwachstum hin. Der IC50-Wert musste gemäß diesen Resultaten kleiner als 0,37 µg/ml sein.

Folglich wurde die Anfangskonzentration von Antidesmon im nächsten Versuch verringert und mit 3 µg/ml begonnen, um einen genauen IC50-Wert zu erhalten. Trotz der um ein Dreißigstel verringerten Anfangskonzentration konnte erneut kein IC50-Wert für Antidesmon ermittelt werden (Tab. 6). Noch in der kleinsten Antidesmon- Konzentration (0,01 µg/ml) war das Parasitenwachstum auf 34 bzw. 48% der Positivkontrolle reduziert. Es musste angenommen werden, dass die IC50 kleiner als 0,01 µg/ml ist. Für die Referenzsubstanz Benznidazol ergab sich als Mittelwert der beiden Ansätze ein IC50-Wert von 0,46 µg/ml.

	Konz. (µg/ml)	%Wachstum _a	%Wachstum _b	±σ	Konz. (µg/ml)	%Wachstum _c	%Wachstum _d	±σ
Benznidazol	30,00	2,3%	4,2%	1,3%	30,00	1,3%	3,2%	1,3%
	10,00	4,2%	5,5%	0,9%	10,00	3,2%	4,5%	0,9%
	3,33	5,3%	8,2%	2,1%	3,33	7,4%	9,3%	1,3%
	1,11	11,5%	15,6%	2,9%	1,11	12,3%	18,6%	4,5%
	0,37	54,1%	73,5%	13,7%	0,37	54,2%	75,7%	15,2%
	0,12	69,2%	89,0%	14,0%	0,12	70,3%	92,0%	15,3%
IC50 (µg/ml)		0,4	0,59	0,1		0,42	0,51	0,46* ± 0,1
Antidesmon	90,00	1,2%	1,4%	0,1%	3,00	2,3%	3,3%	0,7%
	30,00	2,6%	4,8%	1,6%	1,00	1,9%	2,8%	0,6%
	10,00	2,6%	4,8%	1,6%	0,33	3,1%	2,5%	0,4%
	3,33	1,9%	5,5%	2,5%	0,11	3,1%	3,0%	0,1%
	1,11	3,1%	5,5%	1,7%	0,04	7,3%	6,8%	0,4%
	0,37	4,7%	7,1%	1,7%	0,01	33,9%	47,6%	9,7%
IC50 (µg/ml)		<0,37	<0,37	<u>n.e.</u>		<0,01	<0,01	<u>n.e.</u>

Tabelle 6: Ergebnisse im *T. cruzi*-in-vitro-Assay: Antidesmon und Benznidazol wurden in zwei unabhängigen Versuchen mit je zwei Parallelansätzen a/b und c/d in sechs Konzentrationen getestet, die sich durch 1:3 Reihenverdünnung der Anfangskonzentration ergaben.

Die Hemmwirkung auf die Parasiten wird als prozentuales Wachstum in Bezug zur Postivkontrolle angegeben (±σ = Standardabweichung der links angeführten Ergebnisse der zwei Parallelansätze a/b bzw. c/d; * = Mittelwert der IC50-Werte, n.e.= nicht ermittelbar)

Im nächsten Test wurde die Höchstkonzentration von Antidesmon nochmals verringert. Der Test wurde mit einer Anfangskonzentration von 0,37 µg/ml für Antidesmon und 30 µg/ml für Benznidazol im Parallelversuch und sechs Reihenverdünnungen von 1:3 durchgeführt (Tab. 7). Es ergab sich für Antidesmon ein IC50-Wert von 0,054 µg/ml als Mittelwert der beiden Parallelansätze und analog für Benznidazol ein Wert von 0,69 µg/ml. Dieses Testresultat wurde in einem neuen Versuch mit der gleichen Methode durch eine Mitarbeiterin des Tropeninstitutes Basel überprüft. Anfangskonzentrationen und Verdünnungsschritte entsprachen Tab. 7. Hier bestätigte sich das Ergebnis: Für Antidesmon wurde ein IC50-Wert von 0,012 µg/ml, für Benznidazol 0,28 µg/ml gefunden (Daten nicht dargestellt). Der Unterschied zwischen den in diesem und in Versuch 3 gefundenen IC50-Werten liegt im Bereich der üblichen Schwankungen (s. Kap. 2.1.1)

	Konz.(µg/ml)	%Wachstum _a	%Wachstum _b	± σ
Benznidazol	30,0	1,8%	1,8%	0
	10,0	1,8%	1,8%	0
	3,33	6,9%	7,1%	0,1%
	1,11	20,9%	25,2%	3,0%
	0,37	83,1%	86,1%	2,1%
	0,12	86,7%	97,5%	7,6%
IC50 (µg/ml)		0,66	0,71	0,69* ± 0,04
Antidesmon	0,37	6,8%	6,7%	0,1%
	0,12	11,5%	10,3%	0,8%
	0,04	65,0%	57,9%	5,0%
	0,01	98,4%	95,2%	2,3%
	0,005	94,4%	94,9%	0,4%
	0,002	96,1%	93,0%	2,2%
IC50 (µg/ml)		0,059	0,049	0,054* ± 0,01

Tabelle 7: Wirkung von Antidesmon und Benznidazol im *T. cruzi*-in-vitro-Assay in zwei Parallelansätzen a und b ($\pm\sigma$ = Standardabweichung der links angeführten Ergebnisse der zwei Parallelansätze a/b, * = Mittelwert der IC50-Werte)

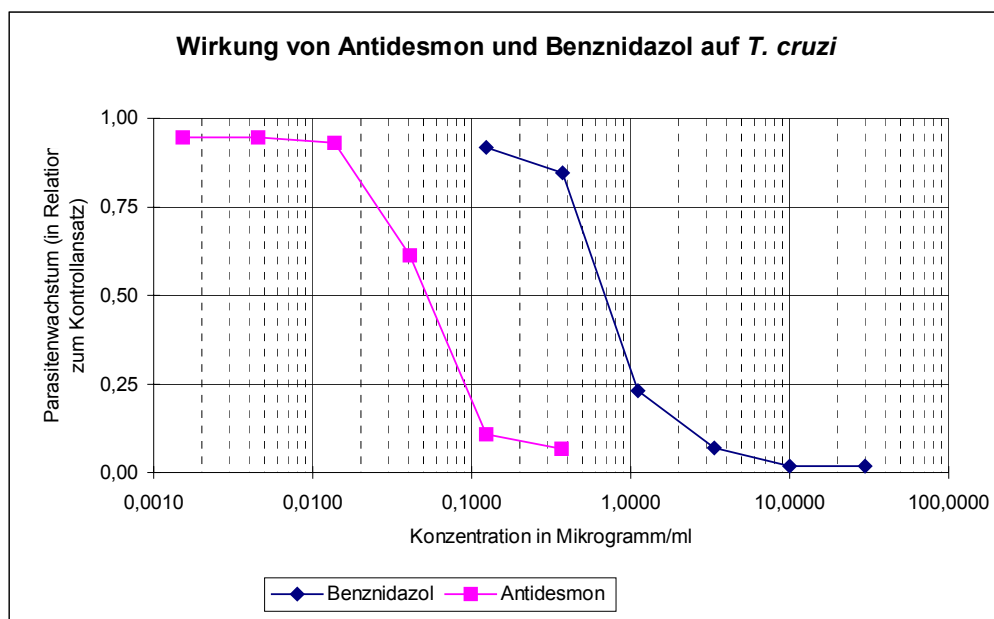


Abbildung 14: Vergleich der trypanoziden Wirkung von Antidesmon und Benznidazol, ermittelt im *T.-cruzi*-in-vitro-Assay (Tabelle 7). Die Höchstkonzentration von Antidesmon war 0,37, von Benznidazol 30 µg/ml; die Wirkung wird als prozentuales Wachstum im Vergleich zur Positivkontrolle angegeben.

2.2.2 Wirkung von Antidesmon auf *T. b. rhodesiense* und *T. evansi*

In den vorangegangenen Versuchen wurde eine Aktivität von Antidesmon gegen *T. cruzi* ermittelt. Es stellte sich nun die Frage, ob Antidesmon spezifisch auf *T. cruzi* wirkt oder auch Aktivität gegen andere Trypanosomenspezies besitzt. Um dies zu prüfen, wurde die Wirkung von Antidesmon gegen *T. b. rhodesiense* und *T. evansi* *in vitro* untersucht. Als Referenzsubstanz für die Versuche wurde Melarsoprol verwandt. Von dieser Substanz ist eine gute Aktivität *in vitro* und *in vivo* gegen die beiden Trypanosomenspezies bekannt. Die Aktivität von Antidesmon wurde nach

dem ermittelten IC50-Wert gemäß der Festlegung der Drug Discovery Research Group von TDR/WHO (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. R. Brun, STI Basel, 2003) als „aktiv“, „schwach aktiv“ und „inaktiv“ beurteilt (Tab. 8)

IC50-Wert	Bewertung
< 0,2 µg/ml	Aktiv
0,2- 3 µg/ml	Schwach aktiv
>3 µg/ml	Inaktiv

Tabelle 8: Bewertung der Testsubstanzen im *T. b. rhodesiense*- und *T. evansi*- Assay

Die Wirkung von Antidesmon gegen *T. b. rhodesiense* wurde in zwei Versuchen in sechs Konzentrationen geprüft, die sich aus einer 1:3- bzw. 1:2- Reihenverdünnung ergaben. Die Anfangskonzentration war im ersten Versuch 100 µg/ml, im zweiten 75 µg/ml. In jeden Versuch wurde die Referenzsubstanz in den gleichen Verdünnungsschritten und in beiden Fällen mit einer Anfangskonzentration von 0,08 µg/ml mitgeführt. Im *T. b. rhodesiense*-Assay ergab sich für Antidesmon ein mittlerer IC50-Wert von 4,57 µg/ml, für Melarsoprol betrug er 0,0013 µg/ml (Tab. 9). Antidesmon bewirkt erst in signifikant höheren Konzentrationen als Melarsoprol ($p < 0,05$) eine Wachstumsreduktion der Parasiten. Der Naturstoff muss unter pharmakologischen Gesichtspunkten deshalb als inaktiv gegen *T. b. rhodesiense* eingestuft werden.

	Konz. (µg/ml)	% Wachstum _a	% Wachstum _b	±σ	Konz. (µg/ml)	% Wachstum _c	% Wachstum _d	±σ
Antidesmon	100,0	0,7%	0,5%	0,1%	75,0	1,0%	0,3%	0,5%
	33,3	0,4%	0,5%	0,1%	37,5	1,4%	0,8%	0,4%
	11,1	1,7%	2,3%	0,4%	18,75	0,3%	0,9%	0,4%
	3,7	57,6%	75,7%	12,8%	9,37	2,6%	1,7%	0,6%
	1,24	86,1%	99,3%	9,3%	4,69	28,4%	49,9%	15,2%
	0,41	93,9%	100,9%	4,9%	2,34	100,5%	84,3%	11,5%
IC50 (µg/ml)		4,29	5,44	0,81		3,87	4,67	4,57* ± 0,7
Melarsoprol	0,08	0,5%	0,2%	0,2%	0,08	1,7%	2,1%	0,3%
	0,03	0,4%	0,6%	0,1%	0,04	0,7%	0,1%	0,4%
	0,01	1,3%	0,8%	0,4%	0,02	1,9%	1,7%	0,1%
	0,003	3,5%	5,8%	1,6%	0,009	1,3%	1,4%	0,1%
	0,001	42,4%	51,8%	6,6%	0,005	3,7%	2,9%	0,6%
	0,0003	75,6%	83,6%	5,7%	0,002	14,4%	13,2%	0,8%
IC50 (µg/ml)		0,0007	0,001	0,001		0,0018*	0,0017*	0,0013* ± 0,0005

Tabelle 9: Wirkung von Antidesmon auf *T. b. rhodesiense* im *In-vitro*-Assay im Vergleich zu Melarsoprol; Werte aus zwei unabhängigen Versuchen mit je zwei Parallelansätzen a/b und c/d (±σ = Standard-Abweichung der links angeführten Ergebnisse der zwei Parallelansätze a/b bzw. c/d; * = Mittelwert der IC50-Werte)

Die Wirkung von Antidesmon und Melarsoprol auf *T. evansi* wurde analog dem oben beschriebenen ersten Versuch untersucht (Tab. 10). Auch hier lag der IC50-Wert von Antidesmon

mit 1,95 µg/ml deutlich höher als der von Melarsoprol. Nach Tab. 8 kann Antidesmon dennoch als schwach wirksam gegen *T. evansi* bezeichnet werden.

	Konz. (µg/ml)	%Wachstum _a	%Wachstum _b	±σ
Antidesmon	75,0	1,8%	1,5%	0,2%
	37,5	5,2%	1,8%	2,4%
	18,7	1,2%	1,2%	0,0%
	9,37	5,4%	2,9%	1,8%
	4,69	32,7%	16,5%	11,5%
	2,34	40,6%	19,7%	14,8%
IC50 (µg/ml)		2,1*	1,8*	1,95*±0,21
Melarsoprol	0,08	0,3%	3,2%	2,1%
	0,04	0,7%	3,3%	1,8%
	0,02	2,1%	4,9%	2,0%
	0,009	2,5%	2,4%	0,1%
	0,005	4,4%	5,9%	1,1%
	0,002	45,5%	44,9%	0,4%
IC50 (µg/ml)		0,0017*	0,0016*	0,0017*±0,0001

Tabelle 10: Wirkung von Antidesmon auf *T. evansi* in zwei Parallelansätzen a und b (±σ = Standard-abweichung der links angeführten Ergebnisse der zwei Parallelansätze a/b; * = Mittelwert der IC50-Werte)

Wirkung von Antidesmon auf verschiedene Trypanosomenspezies

Vergleicht man die IC50-Werte für die drei Trypanosomenspezies miteinander (Abb. 15), so ist zu erkennen, dass der IC50-Wert des Antidesmons für *T. cruzi* erheblich niedriger ist als die Werte für *T. b. rhodesiense* und *T. evansi*. Zudem wirkte Antidesmon im *T.-cruzi*- Assay in niedrigerer Konzentration als die Referenzsubstanz, während bei den anderen beiden Trypanosomenspezies der IC50-Wert der Referenzsubstanz Melarsoprol deutlich niedriger liegt als der des Antidesmons. Die hohe antitrypanosomale Wirksamkeit von Antidesmon ist also spezifisch für *T. cruzi*.

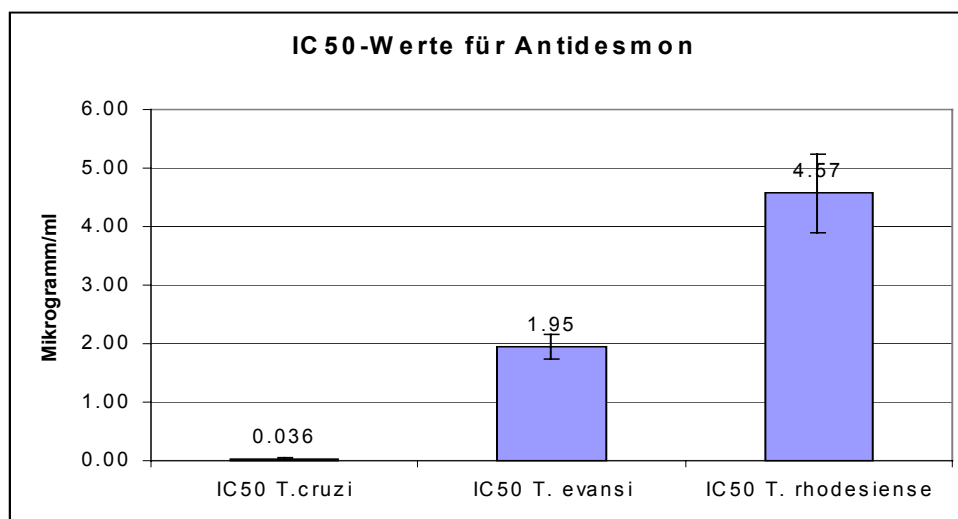


Abbildung 15: Vergleich der IC50-Werte für Antidesmon für verschiedene Trypanosomenspezies

2.2.3 Synthese und Struktur der Antidesmon-Derivate

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit von Antidesmon gegen *T. cruzi* festgestellt. Die Bindung pharmakologisch aktiver Substanzen an ihren Bindungspartner wird typischerweise von funktionellen Gruppen, sterischen und elektrostatischen Faktoren sowie der Struktur der Seitenkette beeinflusst. Nun stellte sich die Frage, welche chemische Eigenschaft oder Bindungsstelle des Antidesmons diese Aktivität bedingt. Zur Untersuchung dieser Frage wurden Derivate untersucht, bei denen jeweils eine chemische Funktion des Antidesmons gezielt verändert wurde (Abb. 16).

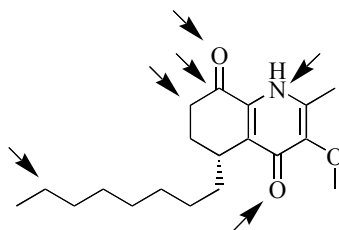


Abbildung 16: Derivatisierungspositionen bei Antidesmon

Die *In-vitro*-Wirkung der sich in diesen Eigenschaften unterscheidenden Derivate auf die Protozoen wurde getestet und mit der Wirkung der Muttersubstanz verglichen. Es wurden sieben Derivate hergestellt und zwei natürlich vorkommende Derivate isoliert. Die Synthese erfolgte durch Dr. A. Buske am Institut für Pflanzenbiochemie Halle/Saale. Die Prüfung der Reinsubstanzen erfolgte mit HPLC (high performance liquid chromatography) und spektroskopischen Methoden (Buske 2000). Nach dem Ziel der Synthese bzw. der Struktur lassen sich die Substanzen in vier Gruppen einteilen.

I. Derivatisierung der funktionellen Gruppen am Bicyclus

In der Reaktion von Antidesmon mit Diazomethan entstand N-Methylantidesmon (AdOMeb) und O-Methylantidesmon (AdOMec) (Abb.17). Durch die Reaktion erfolgte eine Veränderung der funktionellen Gruppen am Stickstoff bzw. am Sauerstoff des ersten Ringes durch eine Methylgruppe.

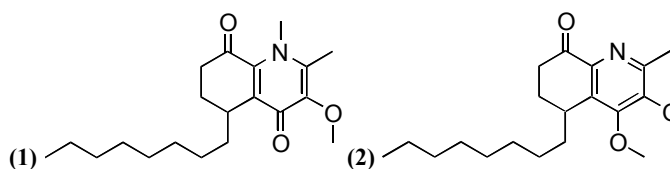


Abbildung 17: N-Methylantidesmon (AdOMeb,1); O-Methylantidesmon (AdOMec,2)

Bei 8-Dihydroantidesmon (AdOL, Abb. 18) wurde die Ketogruppe am zweiten Ring in eine Hydroxygruppe überführt. Es entstand durch Reduktion mit Lithium-Aluminiumhydrid.

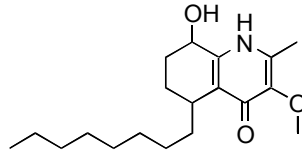


Abbildung 18: 8-Dihydroantidesmon (AdOL)

II. Erhöhung der sterischen Ansprüche

Durch Einführung der raumgreifenden Methyl- und Methoxygruppen an C7 des Bicyclus wurden zwei weitere Derivate hergestellt. 7-Methoxy-7-methylantidesmon (AdNMea) und 7,7-Dimethylantidesmon (AdNMeb, Abb. 19) stellen höhere sterische Ansprüche an den hypothetischen Bindungspartner als Antidesmon. Sie entstanden in der Reaktion von Antidesmon mit Methyljodid.

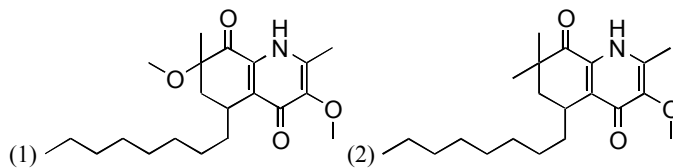


Abbildung 19: 7-Methoxy-7-methylantidesmon (AdNMea, 1); 7,7-Dimethylantidesmon (AdNMeb, 2)

III. Änderung des elektrostatischen Oberflächenpotentials

4-O-Acetyl-Antidesmon (AdAc) und 13-Oxo-Antidesmon (AdAml) zeichnen sich durch ein verändertes elektrostatisches Oberflächenpotential aus. Bei 13-Oxo-Antidesmon (Abb.20), einem Umwandlungsprodukt von in Methanol gelöstem Antidesmon unter Einwirkung von Licht, wird dies durch eine neu eingeführte Ketogruppe an C8 bewirkt.

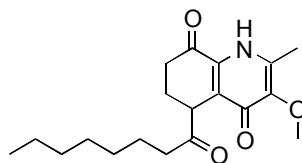


Abbildung 20: 13-Oxo-Antidesmon (AdAml)

4-O-Acetyl-Antidesmon (Abb.21) entstand durch Reaktion mit Pyridin und Acetanhydrid. Hier wurde der Sauerstoff an C4 des Bicyclus acetyliert, was ebenfalls eine Änderung des Oberflächenpotentials bewirkt.

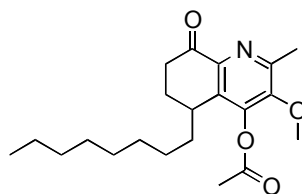


Abbildung 21: 4-O-Acetyl-Antidesmon (AdAc)

IV. Änderung der Polarität und der Seitenkette

17-Glucopyranosyloxy-Antidesmon (Ad-glc) und 8-Deoxo-17-glucopyranosyloxy-Antidesmon (DeoxoAd) sind natürlicherweise in Antidesma-Arten vorkommende Antidesmon-Derivate (Abb. 22). Beide besitzen in der Seitenkette mit der Glucopyranosylgruppe eine sehr polare Funktion. 8-Deoxo-17-glucopyranosyloxy-Antidesmon fehlt darüber hinaus die Ketogruppe an C8.

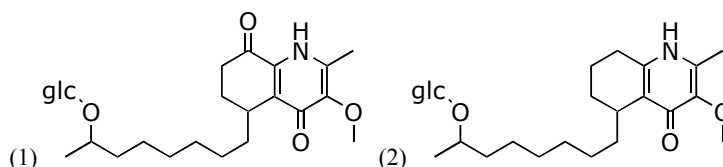


Abbildung 22: 17-Glucopyranosyloxy-Antidesmon (Ad-glc, 1), 8-Deoxo-17-glucopyranosyloxy-Antidesmon (DeoxoAd, 2)

2.2.4 Wirkung der Antidesmon-Derivate auf *T. cruzi*

Nachdem festgestellt wurde, dass Antidesmon in niedrigerer Konzentration gegen *T. cruzi* wirkt als das bewährte Chemotherapeutikum Benznidazol, wurden die neu synthetisierten Derivate auf ihre antitrypanosomale Wirkung geprüft. Ziel der Untersuchungen war es, IC₅₀-Werte für sämtliche Derivate zu ermitteln. Dazu wurde jede Substanz zunächst in zwei unabhängigen Testreihen jeweils in zwei Parallelansätzen untersucht.

Anschließend wurde Wirkung der einzelnen Derivate mit der Muttersubstanz Antidesmon verglichen. Bei jedem der Derivate wurden bestimmte chemische Eigenschaften des Antidesmons verändert. Daher ermöglicht ein Vergleich ihrer Wirkung Rückschlüsse auf die für die antiparasitäre Wirkung des Antidesmons entscheidenden chemischen Eigenschaften. Auf die gleiche Weise wurde die antitrypanosomale Wirkung der beiden bekannten Strukturanaloga des Antidesmons, Melochinon und Deferiprone (s. Kapitel 1.1) untersucht. Für die Referenzsubstanz Benznidazol wurden in beiden Testreihen je zwei IC₅₀-Werte ermittelt, die in Tabelle 11 angegeben sind. Sie sind die Referenzwerte für die gesamte Testreihe. Die Anfangskonzentration von Benznidazol war in beiden Versuchsdurchläufen 30 µg/ml, da sich erwiesen hatte, dass mit dieser Dosierung am sichersten ein IC₅₀-Wert für die Referenzsubstanz ermittelt werden konnte.

Gruppe I: AdOMeb, AdOMec, AdOL

Bei diesen Derivaten wurden funktionelle Gruppen am Bicyclus verändert. Die Anfangskonzentration im ersten Versuch war für alle Derivate 90 µg/ml. Es wurden sechs Reihenverdünnungen von 1:3 und je zwei Parallelversuche pro Test durchgeführt (Tab. 9). Es ergab sich in der ersten Versuchsreihe (Ansatz a und b) eine IC₅₀ von 0,41 bzw. 0,58 µg/ml für Benznidazol. Die IC₅₀ für das Derivat AdOMec betrug 1,56 bzw. 1,21 µg/ml. Die Derivate AdOMeb und AdOL zeigten eine stärkere Wirkung auf *T. cruzi*. Sie vermochten das Wachstum der Parasiten noch in der kleinsten Konzentration auf weniger als zehn Prozent des Kontrollansatzes zu reduzieren. Ein IC₅₀-Wert konnte deshalb für diese beiden Substanzen nicht ermittelt werden.

Daher wurde der folgenden Versuchsreihe (Ansatz c und d) die Anfangskonzentration von AdOMeb und AdOL um ein Dreißigstel auf 3 µg/ml reduziert.

	Konz. (µg/ml)	% Wachstum _a	% Wachstum _b	±σ	Konz. (µg/ml)	% Wachstum _c	% Wachstum _d	±σ
Benznidazol	30,00	2,7%	4,1%	1,0%	30,00	1,4%	2,4%	0,7%
	10,00	4,3%	5,9%	1,1%	10,00	4,4%	4,6%	0,1%
	3,33	5,4%	8,0%	1,8%	3,33	7,5%	9,4%	1,3%
	1,11	11,7%	14,6%	2,1%	1,11	11,3%	10,7%	0,4%
	0,37	54,0%	74,5%	14,5%	0,37	53,2%	74,7%	15,2%
	0,12	69,3%	88,0%	13,2%	0,12	71,3%	89,0%	12,5%
IC50 (µg/ml)		0,41	0,58	0,12		0,45	0,48	0,48*± 0,1
AdOMec	90,00	2,8%	3,1%	0,2%	90,00	1,4%	1,4%	0,0%
	30,00	4,7%	3,7%	0,7%	30,00	1,9%	1,7%	0,1%
	10,00	3,1%	3,4%	0,2%	10,00	2,2%	2,3%	0,1%
	3,33	14,3%	13,4%	0,6%	3,33	54,1%	58,6%	3,2%
	1,11	66,0%	52,9%	9,3%	1,11	96,1%	84,3%	8,3%
	0,37	84,4%	77,8%	4,7%	0,37	99,1%	90,1%	6,4%
IC50 (µg/ml)		1,56	1,21	0,25		3,63	3,94	2,59*±1,4
AdOMeb	90,00	2,1%	2,9%	0,6%	3,00	2,7%	2,8%	0,1%
	30,00	1,9%	2,5%	0,4%	1,00	3,2%	3,9%	0,5%
	10,00	2,7%	3,9%	0,8%	0,33	2,3%	1,8%	0,4%
	3,33	2,5%	3,3%	0,6%	0,11	3,5%	3,3%	0,1%
	1,11	1,7%	2,7%	0,7%	0,04	3,9%	3,9%	0,0%
	0,37	3,3%	1,8%	1,1%	0,01	2,8%	2,6%	0,1%
IC50 (µg/ml)		<0,37	<0,37	n.e.		<0,01	<0,01	n.e.
AdOL	90,00	2,7%	1,9%	0,6%	3,00	1,5%	2,3%	0,6%
	30,00	3,5%	5,5%	1,4%	1,00	2,9%	2,8%	0,1%
	10,00	1,7%	3,8%	1,5%	0,33	6,4%	4,7%	1,2%
	3,33	3,5%	4,9%	1,0%	0,11	28,4%	21,2%	5,1%
	1,11	4,2%	5,5%	0,9%	0,04	87,8%	92,7%	3,5%
	0,37	7,0%	8,1%	0,8%	0,01	98,6%	93,9%	3,3%
IC50 (µg/ml)		<0,37	<0,37	n.e.		0,075	0,071	0,073*± 0,003

Tabelle 11: Ergebnisse im *T. cruzi*-in-vitro-Assay für die Derivate der Gruppe I in zwei unabhängigen Versuchen mit je zwei Parallelansätzen a/b und c/d (±σ= Standardabweichung der links angeführten Ergebnisse der zwei Parallelansätze a/b bzw. c/d; *= Mittelwert der IC50-Werte, n.e.= nicht ermittelbar)

Der neue Ansatz ergab IC50-Werte von 0,45 bzw. 0,48 µg/ml für Benznidazol und von 3,63 bzw. 3,94 µg/ml für AdOMec. Durch die niedrigere Anfangskonzentration konnten nun auch IC50-Werte für AdOL berechnet werden, die mit 0,075 und 0,071 µg/ml ähnlich niedrig lagen wie die des Antidesmons (s. Tab. 7). Das Derivat AdOMeb zeigte die größte antitrypanosomale Aktivität der Substanzen dieser Gruppe. In der niedrigsten Konzentration von 0,01 µg/ml reduzierte es das Trypanosomenwachstum auf unter drei Prozent der Positivkontrolle. Der IC50-Wert des Derivats ist demnach kleiner als 0,01 µg/ml. Der Vergleich der Dosis-Wirkungs-Beziehungen (Abb. 23) der Derivategruppe I mit Antidesmon zeigt, dass AdOMeb eine noch höhere antitrypanosomale Aktivität als Antidesmon besitzt.

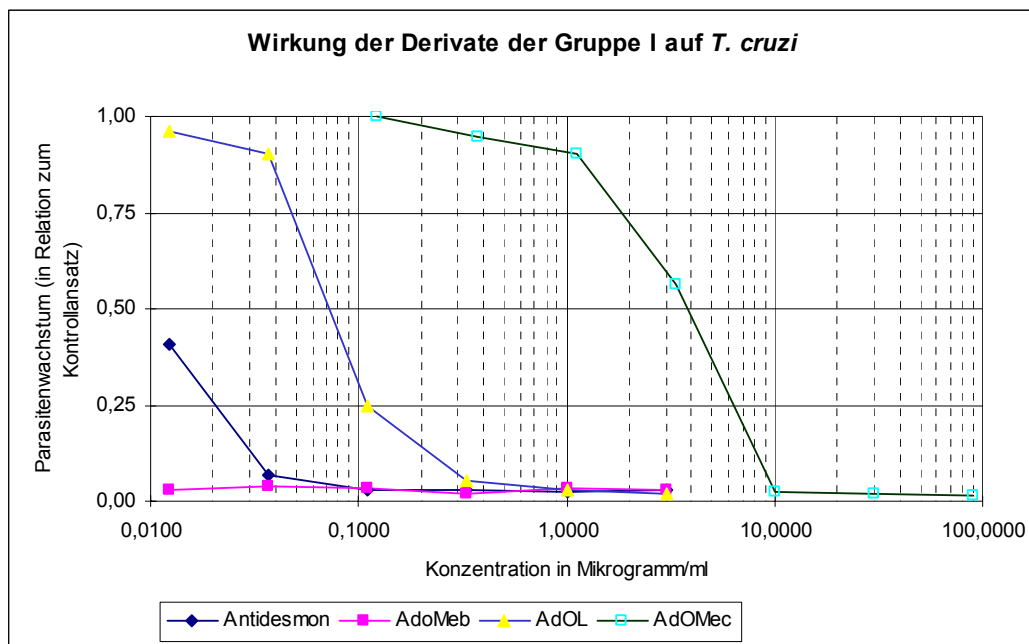


Abb. 23: Vergleich der antitrypanosomalen Wirkung der Derivate aus Gruppe I und Antidesmon (Daten für die Derivate aus Tabelle 11, für Antidesmon aus Tabelle 6)

Gruppe II: AdNMeb, AdNMea

Diese Derivate unterscheiden sich vom Antidesmon durch ihre sterischen Ansprüche. In beiden Versuchsreihen war die Anfangskonzentration der Derivate aus Gruppe II 90 µg/ml. Sie erwiesen sich in ihrer Wirkstärke als sehr ähnlich. Es ergab sich als mittlere IC₅₀ ein Wert von 1,93 µg/ml für AdNMea und 2,12 µg/ml für AdNMeb. Beide Derivate wirken also etwa 40mal schwächer als Antidesmon (Tab. 12, Abb. 24)

Gruppe III: AdAc, AdAml

Die beiden Derivate der Gruppe III, AdAc und AdAml, weisen ein gegenüber dem Antidesmon verändertes Oberflächenpotential auf. Sie wurden zunächst mit einer Anfangskonzentration von 90 µg/ml getestet. Es wurden sechs Reihenverdünnungen von 1:3 und je zwei Parallelversuche pro Test durchgeführt (Tab. 13). Es ergab sich ein IC₅₀-Wert von 7,34 µg/ml für AdAml (Mittelwert der vier Parallelansätze). Das Derivat wirkte damit 160mal schwächer als Antidesmon. Das Derivat AdAc reduzierte das Trypanosomenwachstum im ersten Ansatz noch in der kleinsten Konzentration auf Werte unter 10 Prozent im Vergleich zum Kontrollansatz. Deshalb wurde im folgenden Versuch die Anfangskonzentration von AdAc auf 3 µg/ml verringert. Der IC₅₀-Wert betrug in beiden Parallelansätzen 0,02 µg/ml. In dieser Gruppe ist ein deutlicher Wirkungsunterschied zwischen beiden Substanzen zu erkennen. Während AdAml keine Aktivität gegenüber *T. cruzi* aufwies, zeigte AdAc eine hohe Aktivität, wenn auch etwas geringer als die Muttersubstanz (Abb. 25).

	Konz(µg/ml)	%Wachstum _a	%Wachstum _b	%Wachstum _c	%Wachstum _d	±σ
AdNMea	90,00	1,1%	1,8%	1,3%	1,1%	0,3%
	30,00	3,4%	4,4%	4,4%	2,5%	0,9%
	10,00	2,6%	5,1%	5,2%	4,5%	1,2%
	3,33	9,8%	23,9%	28,6%	23,1%	8,1%
	1,11	62,4%	74,4%	88,7%	90,8%	13,3%
	0,37	69,7%	83,9%	93,3%	97,9%	12,4%
IC50 (µg/ml)		1,44	1,89	2,25	2,15	1,93* ± 0,4
AdNMeb	90,00	1,0%	1,0%	0,2%	0,3%	0,4%
	30,00	0,9%	1,1%	2,1%	2,4%	0,7%
	10,00	2,2%	6,7%	6,3%	4,8%	2,0%
	3,33	17,9%	22,8%	34,5%	33,7%	8,2%
	1,11	88,8%	58,9%	97,6%	91,2%	17,2%
	0,37	95,5%	83,9%	96,7%	94,5%	5,9%
IC50 (µg/ml)		2,03	1,46	2,54	2,44	2,12* ± 0,5

Tabelle 12: Ergebnisse im *T. cruzi*-in-vitro-Assay für die Derivate der Gruppe II in zwei unabhängigen Versuchen mit je zwei Parallelansätzen a/b und c/d (±σ= Standardabweichung der links angeführten Ergebnisse der zwei Parallelansätze a/b bzw. c/d; *= Mittelwert der IC50-Werte)

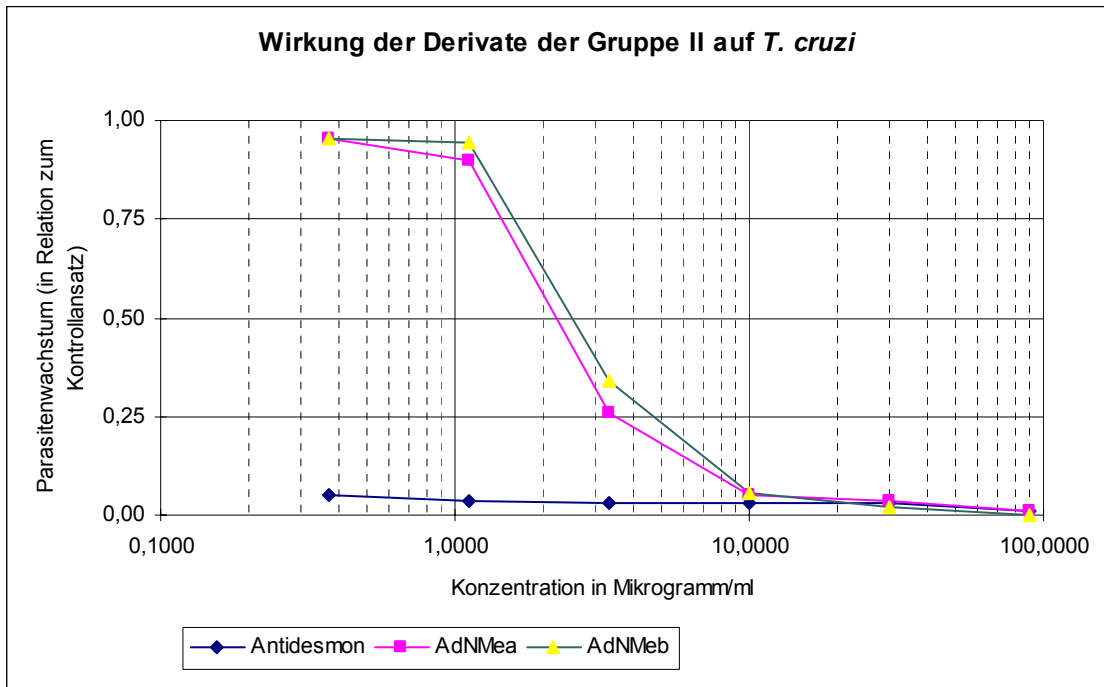


Abb. 24: Vergleich der antitrypanosomalen Wirkung der Derivate aus Gruppe II und Antidesmon (Daten für die Derivate aus Tabelle 12, für Antidesmon aus Tabelle 6)

	Konz ($\mu\text{g/ml}$)	% Wachstum _a	% Wachstum _b	$\pm\sigma$	Konz ($\mu\text{g/ml}$)	% Wachstum _c	% Wachstum _d	$\pm\sigma$
AdAc	90,00	5,2%	4,7%	0,4%	3,00	4,6%	2,9%	1,2%
	30,00	3,1%	2,3%	0,6%	1,00	4,3%	4,0%	0,2%
	10,00	4,6%	2,6%	1,4%	0,33	3,3%	3,0%	0,2%
	3,33	7,1%	3,7%	2,4%	0,11	1,3%	4,5%	2,3%
	1,11	7,1%	4,7%	1,7%	0,04	15,7%	22,1%	4,5%
	0,37	7,7%	3,7%	2,8%	0,01	83,5%	77,3%	4,4%
IC50 ($\mu\text{g/ml}$)		<0,37	<0,37	n.e.		0,02	0,02	0,02*\pm0
AdAml	90,00	0,3%	1,8%	1,1%	90,00	1,0%	1,7%	0,5%
	30,00	6,0%	4,5%	1,1%	30,00	4,5%	2,6%	1,3%
	10,00	48,3%	32,7%	11,0%	10,00	38,5%	16,7%	15,4%
	3,33	89,7%	93,9%	3,0%	3,33	80,2%	70,4%	6,9%
	1,11	90,4%	98,4%	5,7%	1,11	90,7%	73,4%	12,2%
	0,37	92,9%	99,6%	4,7%	0,37	92,2%	97,1%	3,5%
IC50 ($\mu\text{g/ml}$)		9,57	7,33	1,6		7,39	5,06	7,34*\pm1,8

Tabelle 13: Ergebnisse im *T. cruzi*-in-vitro-Assay für die Derivate der Gruppe III in zwei unabhängigen Versuchen mit je zwei Parallelansätzen a/b und c/d ($\pm\sigma$ = Standardabweichung der links angeführten Ergebnisse der zwei Parallelansätze a/b bzw. c/d; *= Mittelwert der IC50-Werte, n.e.= nicht ermittelbar)

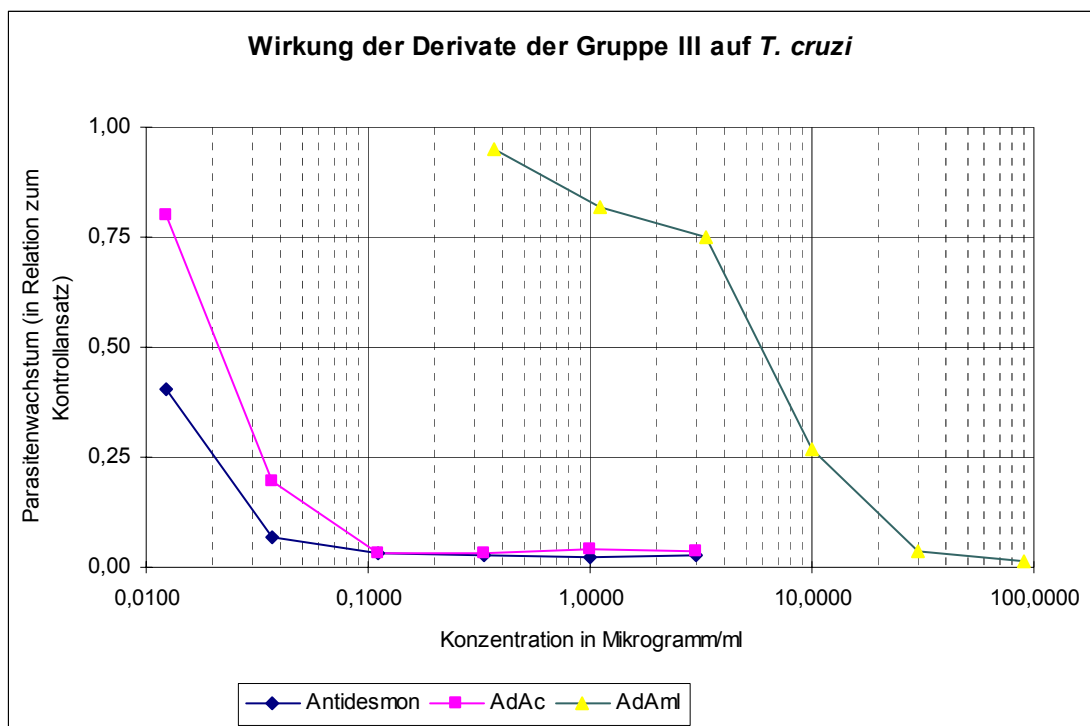


Abbildung 25: Vergleich der antitrypanosomalen Wirkung der Derivate aus Gruppe III mit Antidesmon (Daten für die Derivate aus Tabelle 13, für Antidesmon aus Tabelle 6)

Gruppe IV: Ad-glc, Deoxo-Ad

Im Unterschied zu Antidesmon besitzen diese natürlichen Derivate eine Glucopyranosylgruppe in der Seitenkette; bei Deoxo-Ad fehlt zudem die Ketogruppe an C8. Die Substanzen wurden in beiden Versuchsreihen mit einer Anfangskonzentration von 90 $\mu\text{g/ml}$ getestet. Als Endergebnis fand sich eine mittlere IC50 von 7,28 $\mu\text{g/ml}$ für Ad-glc und damit eine über 140fach schwächere

Wirkung in Relation zu Antidesmon. Deoxo-Ad hatte mit 15,27 µg/ml den höchsten IC50-Wert der bisher untersuchten Substanzen, seine relative Wirkstärke im Vergleich zu Antidesmon beträgt damit etwa ein Dreihundertstel (Tab. 14, Abb. 26).

	Konz (µg/ml)	% Wachstum _a	% Wachstum _b	% Wachstum _c	% Wachstum _d	±σ
Ad-glc	90,00	2,0%	2,3%	0,9%	1,1%	0,7%
	30,00	6,5%	3,6%	4,4%	5,2%	1,2%
	10,00	28,5%	13,8%	42,2%	45,9%	14,6%
	3,33	75,5%	76,0%	97,8%	100,3%	13,5%
	1,11	82,3%	82,6%	99,6%	99,5%	9,9%
	0,37	98,3%	83,9%	100,3%	99,1%	7,7%
IC50 (µg/ml)		6,05	5,28	8,57	9,21	7,28*± 1,9
Deoxo-Ad	90,00	2,3%	3,9%	0,3%	0,4%	1,7%
	30,00	11,5%	16,5%	11,2%	9,0%	3,2%
	10,00	78,9%	70,2%	72,1%	74,1%	3,7%
	3,33	79,7%	96,8%	83,0%	89,0%	7,5%
	1,11	85,8%	93,1%	90,3%	89,0%	3,0%
	0,37	92,5%	86,7%	94,3%	86,5%	4,0%
IC50 (µg/ml)		16,02	15,12	14,90	15,02	15,27*± 0,5

Tabelle 14: Ergebnisse im *T. cruzi*-in-vitro-Assay für die Derivate der Gruppe IV in zwei unabhängigen Versuchen mit je zwei Parallelansätzen a/b und c/d(±σ= Standardabweichung der links angeführten Ergebnisse der Parallelansätze a-d; *= Mittelwert der IC50-Werte, n.e.= nicht ermittelbar)

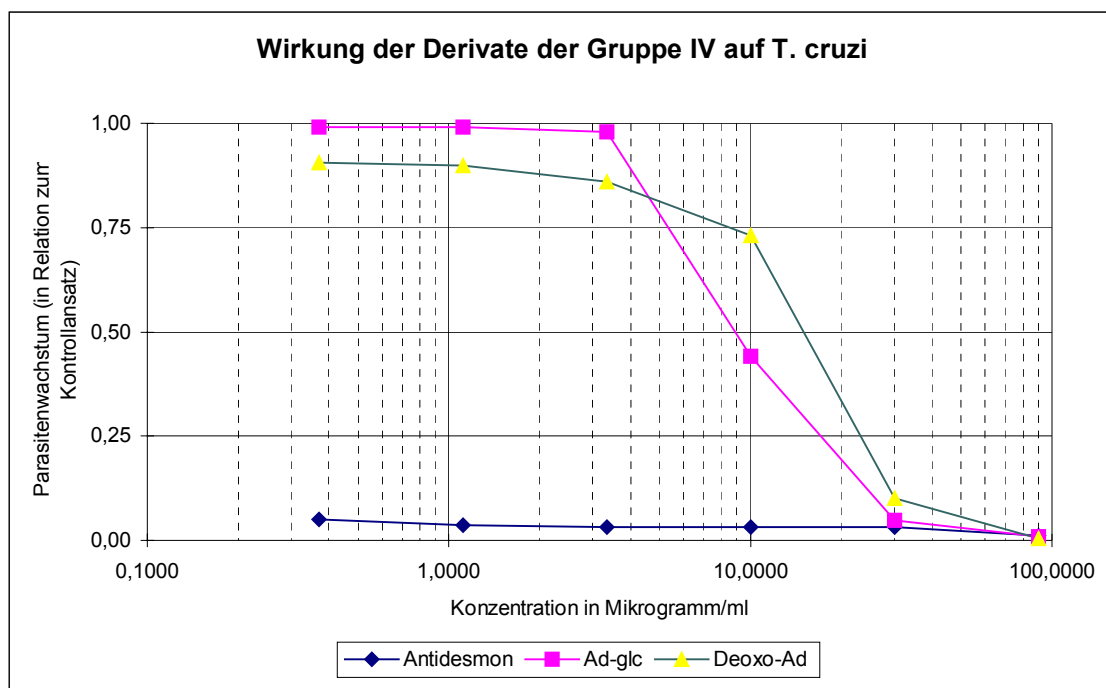


Abbildung 26: Vergleich der antitrypanosomalen Aktivität der Gruppe IV-Derivate mit Antidesmon (Daten für die Derivate aus Tabelle 14, für Antidesmon aus Tabelle 6)

Strukturanaloga: Melochinin und Deferiprone

Melochinin ist ein als giftig bekannter Naturstoff, Deferiprone ein synthetischer Schwermetall-Chelatbildner. Beide Substanzen weisen eine Strukturähnlichkeit mit Antidesmon auf. Daher war

ihre antitrypanosomale Aktivität im Vergleich zu Antidesmon und seinen Derivaten von großem Interesse, zumal eine trypanozide Wirkung für Deferiprone bereits beschrieben wurde (s. Kap 1.1). Die Anfangskonzentration beider Substanzen war 90 µg/ml (Tab. 15). Es ergab sich als mittlere IC50 für Deferiprone 9,62 µg/ml und für Melochinin 16,89 µg/ml. Damit war Melochinin mit einem 340stel der Wirkstärke von Antidesmon die am wenigsten wirksame aller untersuchten Substanzen. Auch Deferiprone zeigte im Vergleich zu Antidesmon nur geringe Aktivität (Abb. 27)

	Konz (µg/ml)	% Wachstum _a	% Wachstum _b	% Wachstum _c	% Wachstum _d	±σ
Deferiprone	90,00	2,1%	2,1%	2,0%	2,6%	0,3%
	30,00	1,8%	3,7%	3,9%	2,4%	1,0%
	10,00	23,6%	48,7%	53,6%	64,6%	17,3%
	3,33	67,8%	78,2%	89,0%	96,7%	12,6%
	1,11	80,7%	78,0%	92,4%	97,9%	9,5%
	0,37	83,0%	66,4%	97,2%	96,1%	14,4%
IC50 (µg/ml)		5,19	9,52	10,84	12,94	9,62*± 3,3
Melochinin	90,00	0,9%	2,4%	1,1%	1,5%	0,7%
	30,00	16,3%	18,1%	15,7%	22,3%	3,0%
	10,00	71,1%	77,3%	87,7%	81,2%	7,0%
	3,33	87,7%	89,9%	88,2%	85,1%	2,0%
	1,11	99,6%	95,2%	85,2%	91,2%	6,1%
	0,37	99,2%	99,1%	96,4%	98,0%	1,3%
IC50 (µg/ml)		15,27	16,60	17,78	17,90	16,89*± 1,2

Tabelle 15: Ergebnisse im *T. cruzi*-in-vitro-Assay für die Strukturanaloga des Antidesmons in zwei unabhängigen Versuchen mit je zwei Parallelansätzen a/b und c/d (±σ= Standardabweichung der links angeführten Ergebnisse der Parallelansätze a-d; *= Mittelwert der IC50-Werte, n.e.= nicht ermittelbar)

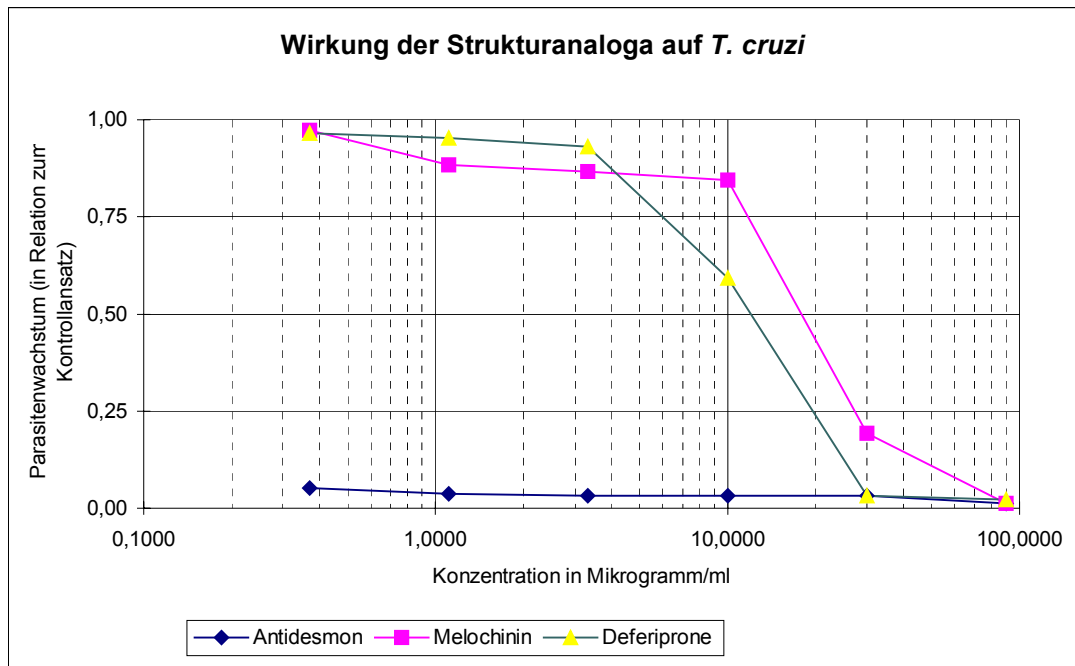


Abbildung 27: Vergleich der antitrypanosomalen Aktivität der Strukturanaloga mit Antidesmon (Daten für die Derivate aus Tabelle 15, für Antidesmon aus Tabelle 6)

Vergleichende Untersuchung der aktiven Substanzen

Die zweimalige Testung der Antidesmon-Derivate hatte im Vergleich zur Referenzsubstanz Benznidazol eine starke Wirksamkeit für mehrere der neuen Substanzen ergeben. Als aktiv wurden gemäß einer üblichen Klassifizierung Substanzen mit einer IC50 unter 1 µg/ml bezeichnet (Tab. 8). Das trifft auf Antidesmon, Benznidazol, AdAc, AdOL und AdOMeb zu. Diese Substanzen wurden nun in zwei neuen Versuchsreihen untersucht. Das Ziel war es, die gefundenen IC50-Werte zu überprüfen und zudem einen IC50-Wert für AdOMeb zu bestimmen, der wegen der starken Wirksamkeit zunächst nur näherungsweise bestimmt werden konnte. Durch gleiche Anfangskonzentration und gemeinsame Testung aller aktiven Substanzen wurde ein direkter Vergleich der Wirksamkeit ermöglicht. Die Anfangskonzentration aller Substanzen war 1 µg/ml (zuvor 3 µg/ml für die wirksamen Derivate und 0,37 µg/ml für die Muttersubstanz). Es wurden sechs Reihenverdünnungen von 1:4 durchgeführt (zuvor Verdünnungen von 1:3). Beide Versuche bestanden aus je zwei Parallelansätzen pro Substanz. Als mittlere IC50-Werte ergab sich für AdOMeb 0,0067 µg/ml, für Antidesmon 0,027 µg/ml sowie für AdAc 0,093 µg/ml. Die entsprechenden Werte für AdOL und Benznidazol waren 0,013 und 0,69 µg/ml (Tab. 16). Die Resultate bestätigen, dass sowohl Antidesmon als auch die drei getesteten Derivate in deutlich niedrigerer Dosis als Benznidazol das Parasitenwachstum hemmen (Abb. 28). Mit einem IC50-Wert von 0,0067 µg/ml war AdOMeb die wirksamste der untersuchten Substanzen. Sie besitzt im Vergleich zur Referenzsubstanz Benznidazol eine nahezu 100fach stärkere Wirkung.

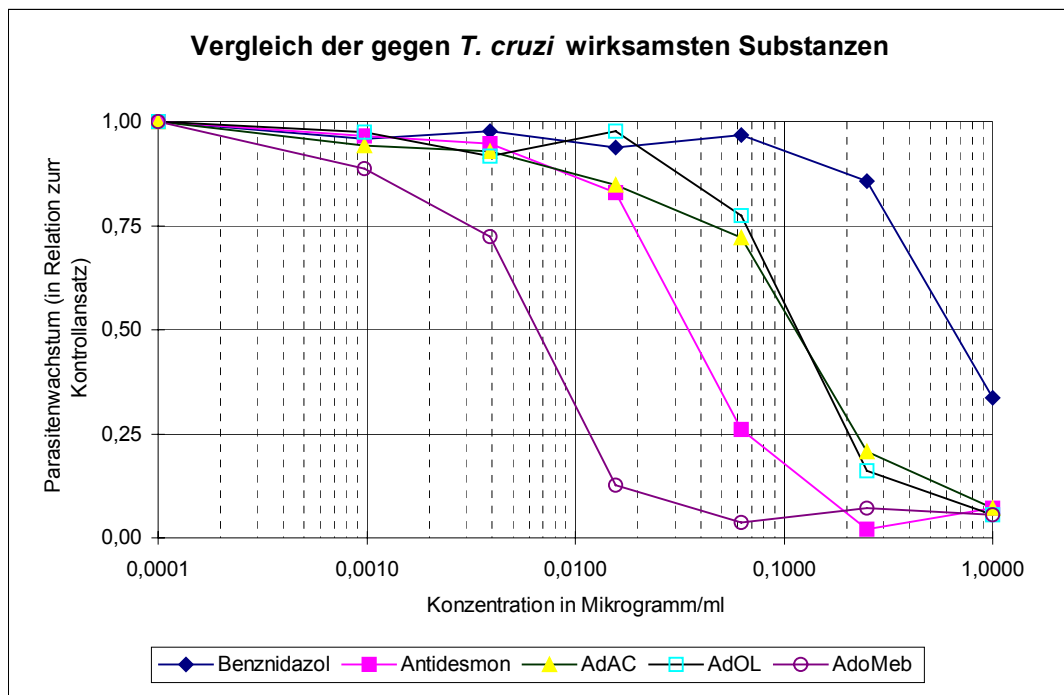


Abbildung 28: Vergleich der Substanzen, die die höchste Aktivität gegen *T. cruzi* zeigten (Daten aus Tabelle 16)

	Konz (µg/ml)	% Wachstum _a	% Wachstum _b	% Wachstum _c	% Wachstum _d	±σ
AdO Meb	1,00	6,0%	12,2%	8,5%	2,0%	4,3%
	0,25	11,9%	16,6%	7,0%	7,1%	4,6%
	0,06	3,6%	7,0%	1,1%	6,4%	2,7%
	0,016	15,7%	21,4%	9,9%	15,4%	4,7%
	0,004	62,0%	75,1%	66,6%	78,7%	7,7%
	0,001	86,1%	98,0%	89,2%	88,4%	5,2%
IC50 (µg/ml)		0,006	0,007	0,006	0,007	0,0067*± 0,001
Ad	1,00	4,9%	3,1%	4,9%	9,5%	2,7%
	0,25	4,7%	0,2%	2,2%	2,0%	1,9%
	0,06	13,4%	8,3%	20,1%	31,6%	10,1%
	0,016	59,4%	50,2%	74,3%	91,5%	18,1%
	0,004	99,1%	99,2%	95,8%	93,8%	2,6%
	0,001	98,0%	100,2%	94,7%	98,2%	2,3%
IC50 (µg/ml)		0,021	0,016	0,029	0,041	0,027*± 0,01
AdAc	1,00	7,5%	5,6%	6,0%	8,5%	1,3%
	0,25	16,5%	9,6%	19,9%	21,7%	5,3%
	0,06	53,1%	56,6%	67,4%	77,3%	11,0%
	0,016	90,7%	91,5%	78,6%	91,6%	6,3%
	0,004	92,1%	94,9%	83,0%	103,4%	8,4%
	0,001	90,4%	99,7%	93,2%	95,5%	3,9%
IC50 (µg/ml)		0,070	0,076	0,104	0,123	0,093*± 0,02
AdOL	1,00	2,7%	4,0%	7,1%	3,8%	1,9%
	0,25	24,9%	28,9%	19,1%	13,1%	6,9%
	0,06	88,9%	78,9%	74,1%	81,0%	6,2%
	0,016	99,9%	100,0%	91,5%	103,9%	5,2%
	0,004	100,1%	100,9%	91,1%	92,4%	5,1%
	0,001	100,9%	100,3%	99,8%	100,8%	0,5%
IC50 (µg/ml)		0,145	0,139	0,115	0,118	0,13*± 0,01
Benznidazol	1,00	30,5%	36,9%	31,5%	37,9%	3,7%
	0,25	91,4%	91,5%	89,4%	91,5%	1,0%
	0,06	93,2%	93,2%	90,2%	92,2%	1,4%
	0,016	91,8%	95,7%	90,8%	95,7%	2,6%
	0,004	95,1%	99,5%	95,2%	97,5%	2,1%
	0,001	93,5%	98,4%	93,5%	98,4%	2,8%
IC50 (µg/ml)		0,681	0,725	0,641	0,717	0,69*± 0,04

Tabelle 16: Ergebnisse im *T. cruzi*-in-vitro-Assay für die in bisherigen Versuchen am stärksten wirksamen Substanzen in zwei unabhängigen Versuchen mit je zwei Parallelansätzen a/b und c/d (±σ= Standard-abweichung der links angeführten Ergebnisse der Parallelansätze a-d; *= Mittelwert der IC50-Werte)

Zusammenfassung

In der Zusammenschau aller ermittelten IC50-Werte erwies sich AdOMeb als die Substanz, die das Trypanosomenwachstum am stärksten hemmt (Tab. 17). Es wirkte in signifikant geringerer Konzentration ($p < 0,01$; s. Kap. 3.3.7.) als alle anderen getesteten Substanzen, einschließlich der Referenzsubstanz Benznidazol.

Wirkung	Substanz	IC50-Mittelwert	σ	n
Aktiv	AdOMeb	0,0067	0,0009	4
	Ad	0,036	0,015	6
	AdAc	0,069	0,038	6
	AdOL	0,110	0,031	6
	Benznidazol	0,602	0,109	8
Schwach aktiv	AdNMea	1,935	0,364	4
	AdNMeb	2,12	0,494	4
	AdOMec	2,59	1,402	4
Nicht aktiv	Ad-glc	7,28	1,908	4
	AdAml	7,34	1,842	4
	Deferiprone	9,62	3,275	4
	Deoxo-Ad	15,27	0,512	4
	Melochinin	16,89	1,226	4

Tabelle 17: Wirkung, mittlere IC-50-Werte und Standardabweichung σ aller getesteten Substanzen im *in-vitro*-Assay gegen *Trypanosoma cruzi* in $\mu\text{g/ml}$ in n Versuchsansätzen

2.2.5 Selektivitätsindices von Antidesmon und seinen Derivaten für *T. cruzi*

In dem zur Untersuchung der Substanzen verwandten *T.-cruzi*-Assay vermehrten sich die Parasiten in einer Lage von L-6-Myofibroblasten. Eine Verminderung des Trypanosomenwachstums durch eine Substanz könnte auch auf einer Schädigung der Wirtszellen beruhen. Eine solche toxische Wirkung wäre unerwünscht. Die Wirkung der Testsubstanzen auf die Wirtszellen wurde bei jedem Versuch lichtmikroskopisch beurteilt (s. Kap. 2.1.1). Zusätzlich sollte nun in einem Zytotoxizitätstest die Wirkung ausgewählter Testsubstanzen auf die Myofibroblasten quantitativ bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde die Wachstumshemmung von L-6-Zellen durch Antidesmon und die drei wirksamsten seiner Derivate sowie die Referenzsubstanz Benznidazol geprüft und IC50-Werte in gleicher Weise wie im *T.-cruzi*-Assay ermittelt. Die toxische Wirkung der drei schwach aktiven sowie der inaktiven Substanzen Deferiprone, Melochinin und Deoxo-Ad wurde ebenfalls untersucht. Die Anfangskonzentration war 100 $\mu\text{g/ml}$, mit Ausnahme von Benznidazol (1000 $\mu\text{g/ml}$) und den inaktiven Substanzen Deoxo-Ad und Melochinin (200 $\mu\text{g/ml}$). Es wurde ein Versuch im Doppelansatz und je sechs Reihenverdünnungen von 1:2 durchgeführt. Die IC50-Werte der gegen *T. cruzi* aktiven Substanzen AdOMeb, Antidesmon, AdOl und AdAc lagen um 60 $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 18). Am stärksten toxisch auf die Wirtszellen wirkte das Derivat AdOMec (IC50 19,1 $\mu\text{g/ml}$). Diese Substanz hatte lediglich eine schwache Aktivität gegen *T. cruzi* gezeigt. Die beiden ebenfalls schwach aktiven Substanzen der Gruppe II hemmten das

Zellwachstum dagegen in den Höchstkonzentrationen von 100 µg/ml kaum. Die inaktiven Substanzen Deferiprone, Melochinin und Deoxo-Ad zeigten in den Höchstkonzentrationen von 100 (Deferiprone) bzw. 200 µg/ml keine toxische Wirkung. Benznidazol verringerte das Zellwachstum in der höchsten möglichen Konzentration von 1000 µg/ml nicht auf Werte unter 50 Prozent der Kontrolle (Tab. 18). Der für eine pharmakologische Anwendbarkeit entscheidende Parameter ist der Selektivitätsindex (Tab. 19). Dieser ist der Quotient aus dem mittleren IC50-Wert für die Säugerzellen und dem mittleren IC-50-Wert für die Parasiten. Je höher der Selektivitätsindex, desto wahrscheinlicher eine hohe Wirksamkeit gegen die Trypanosomen bei geringer Zytotoxizität. Es ergab sich für das Derivat AdOMeb bei weitem der größte Selektivitätsindex (Abb. 29). Für das Derivat AdOMec, das bei schwacher Wirksamkeit eine hohe Toxizität aufwies, errechnete sich der niedrigste Selektivitätsindex der betrachteten Substanzen. Ein Selektivitätsindex für Benznidazol ließ sich wegen einer fehlenden toxischen Wirkung auf die Wirtszellen in der höchsten technisch möglichen Konzentration nicht bestimmen. Er liegt deutlich über 1660 (Tab. 19).

Substanz	IC50 in µg/ml
AdOMec	19,1
Ad	58,8
AdOMeb	59,5
AdAc	60,9
AdOL	61,7
AdNMea	>100
AdNMeb	>100
Deferiprone	>100
Deoxo-Ad	>200
Melochinin	>200
Benznidazol	>1000

Tabelle 18: Wirkung der Testsubstanzen auf die Wirtszellen von *Trypanosoma cruzi* (L6-Myofibroblasten)

Substanz	<i>T. cruzi</i> - IC50	L6- IC50	SI
Benznidazol	0,602	>1000	>1660
AdOMeb	0,007	59,5	8927
Ad	0,036	58,8	1646
AdAc	0,069	60,9	883
AdOL	0,11	61,70	561
AdOMec	2,59	19,10	7

Tabelle 19: Vergleich der IC50-Werte für die Parasiten und deren Wirtszellen und Berechnung des Selektivitätsindex (SI).

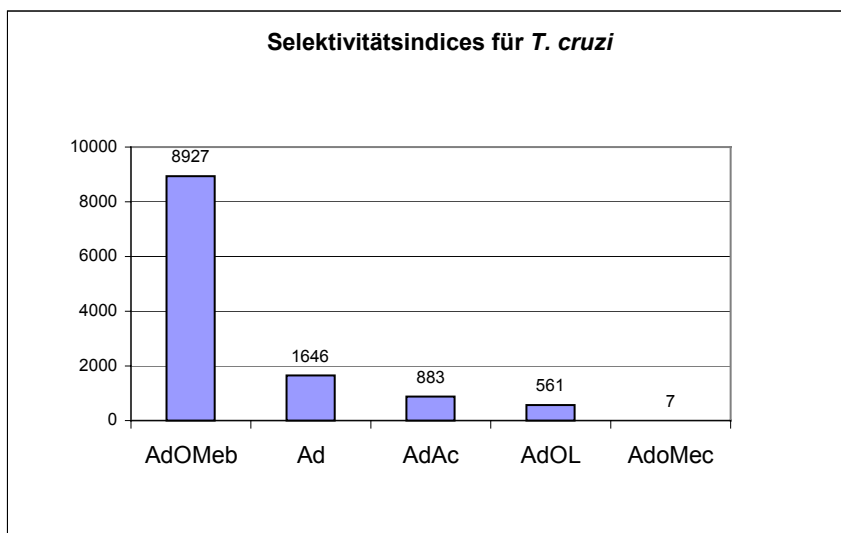


Abbildung 29: Selektivitätsindices der untersuchten Substanzen für *T. cruzi* (Erläuterung im Text)

2.2.6 Wirkung von Antidesmon und seinen Derivaten auf *L. donovani*

Die Wirkung von Antidesmon, seinen Derivaten und Strukturanaloga auf *Leishmania donovani* wurde in zwei Versuchsreihen betrachtet. Als Referenzsubstanz diente das Chemotherapeutikum Natriumstibogluconat. Maß für die Wirkung der Substanzen war der Anteil nichtinfizierter Makrophagen im Vergleich zu einem Kontrollansatz. Der IC50-Wert wurde durch lineare Regressionsanalyse als Endresultat jedes Versuchs berechnet (s. Kap. 3.3.7). War der Anteil nichtinfizierter Zellen bei der größten Konzentration einer Substanz 10 Prozent oder weniger, unterblieb eine IC50-Bestimmung und die Substanz wurde als inaktiv bezeichnet. Bei der mikroskopischen Auswertung wurden auch toxische Effekte der Testsubstanz auf die Makrophagen beurteilt. Alle Substanzen wurden zunächst in Konzentrationen von 15 und 5 µg/ml im Duplikat getestet. Die Referenzsubstanz Natriumstibogluconat wurde in Dosen von 150 und 50 µg/ml getestet. Aus bereits durchgeführten Versuchen zur Erstellung des Referenzbereiches war bekannt, dass das Chemotherapeutikum *in vitro* erst in hohen Dosen wirkt. Hieraus erklärt sich der Konzentrationsunterschied zu den anderen Testsubstanzen. Die Aktivität einer Substanz wurde anhand der IC50-Werte gemäß der Festlegung der Drug Discovery Research Group von TDR/WHO beurteilt (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. R. Brun, STI Basel, 2003, Tab. 20)

IC50-Wert	Bewertung
< 1 µg/ml	Aktiv
1-5 µg/ml	Schwach aktiv
>5 µg/ml	Inaktiv

Tabelle 20: Bewertung der Aktivität der Testsubstanzen gegen *L. donovani*

Antidesmon

In zwei Versuchsreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen (Tab. 21) ergab sich ein mittlerer IC50-Wert von 4,6 µg/ml für Antidesmon und 59,3 µg/ml für Natriumstibogluconat. Antidesmon wurde aufgrund des Resultats als schwach wirksam gegen *L. donovani* eingestuft. Die lichtmikroskopische Auswertung der Versuche ergab Hinweise auf eine toxische Wirkung des Antidesmons auf die Wirtszellen. In einer Konzentration von 10 µg/ml war eine Abrundung und Schrumpfung der Makrophagen als Zeichen einer toxischen Wirkung zu beobachten. (Abb. 30), der Anteil der nichtinfizierten Zellen betrug 97%. Die Zellschäden könnten mitverursachend für den geringen Anteil infizierter Zellen sein. In der mittleren Konzentration von 3,3 µg/ml zeigten die Makrophagen größtenteils normale Morphologie. Hier waren 23% der Zellen nicht infiziert. Die niedrigste Antidesmon-Konzentration (1,1 µg/ml) hatte keine sichtbaren Zellschäden zur Folge (Abb. 31). Nahezu alle Makrophagen waren allerdings infiziert. Die Referenzsubstanz Natriumstibogluconat verursachte keine mikroskopisch erkennbaren Zellveränderungen in Konzentrationen von 40 und 13,3 µg/ml. Der Anteil nichtinfizierter Zellen war mit 43 und 6% im Vergleich zum Ansatz mit Antidesmon relativ gering.

	Konz. (µg/ml)	% NIZ	Konz. (µg/ml)	%NIZ	MW
Anti- desmon	15,0	100%	10,0	97%	
	5,0	57%	3,3	23%	
			1,1	1%	
IC50 (µg/ml)		4,2		5	4,6
Natriumstibogluconat	150,0	99%	40,0	43%	
	50,0	29%	13,3	6%	
IC50 (µg/ml)		69,5		49,0	59,3

Tabelle 21: Wirkung von Antidesmon auf *Leishmania donovani* in zwei unabhängigen Versuchen (%NIZ= Anteil nichtinfizierter Zellen, MW= Mittelwert der IC50-Werte aus beiden Versuchen)

Gruppe I: AdOMec, AdOMeb, AdOL

Für AdOMec und AdOl wurden mittlere IC50-Werte von 18 bzw. 15 µg/ml gefunden (Tab. 22). Beide Substanzen gelten damit als inaktiv. Bei der mikroskopischen Auswertung fiel eine starke Toxizität von AdOMec auf die untersuchten Zellen auf. In der Probe mit der höchsten Testkonzentration dieser Substanz (30 µg/ml) waren nur noch Zelltrümmer und stark verformte Zellen zu finden, was auf eine stark zytotoxische Wirkung der Substanz schließen lässt. Der mittlere IC50-Wert von AdOMeb wurde mit 1,3 µg/ml bestimmt (Tab. 22). Die Substanz ist damit die wirksamste unter den bisher untersuchten. Bei einer Konzentration von 10 µg/ml fand sich keine infizierte Zelle mehr, Merkmale einer toxischen Wirkung waren mikroskopisch nicht festzustellen (Abb. 32).

	Konz. (µg/ml)	% NIZ	Konz. (µg/ml)	%NIZ	MW
AdOMec	15,0	41%	30,0	tox	
	5,0	18%	10,0	41%	
			3,3	2%	
IC50(µg/ml)		23,0		12,9	18,0
AdOMeb	15,0	100%	10,0	100%	
	5,0	79%	3,3	66%	
			1,1	3%	
IC50 (µg/ml)		1,1		1,5	1,3
AdOL	15,0	47%	30,0	99%	
	5,0	16%	10,0	25%	
			3,3	1%	
IC50(µg/ml)		16,7		14,5	15,6

Tabelle 22: Wirkung der Derivategruppe I auf *Leishmania donovani* in zwei unabhängigen Versuchen (%NIZ= Anteil nichtinfizierter Zellen, MW= Mittelwert der IC50-Werte aus beiden Versuchen)

Gruppe II: AdNMeb, AdNMea

In zwei parallelen Versuchen konnte kein IC50-Wert für die Derivate ermittelt werden, da ihre Wirkung auf die Parasiten zu gering war. Die höchste Konzentration von AdNMea und AdNMeb (60µg) verringerte die Zahl der infizierten Zellen lediglich um 5 bzw. 9 Prozent (Tab. 23). Lichtmikroskopisch waren keine Anzeichen einer toxischen Wirkung festzustellen. Die Substanzen sind damit nicht aktiv gegen *L. donovani*.

	Konz. (µg/ml)	% NIZ	Konz. (µg/ml)	%NIZ
AdNMea	15,0	2%	60,0	5%
	5,0	1%	20,0	3%
			6,6	1%
IC50 (µg/ml)		>15		>60
AdNMeb	15,0	7%	60,0	9%
	5,0	2%	20,0	6%
			6,6	2%
IC50 (µg/ml)		>15		>60

Tabelle 23: Wirkung der Derivategruppe II auf *Leishmania donovani* in zwei unabhängigen Versuchen (%NIZ = Anteil nichtinfizierter Zellen).

Gruppe III: AdAc, AdAml

Der mittlere IC50-Wert von AdAc wurde mit 5,6 µg/ml festgestellt. Die mikroskopische Auswertung zeigte einen geringfügigen toxischen Effekt in der Konzentration 15 µg/ml. Für AdAml konnte wegen seiner geringen Wirkung auf die Leishmanien kein IC50-Wert ermittelt werden (Tab. 24). Beide Derivate waren damit als inaktiv einzustufen.

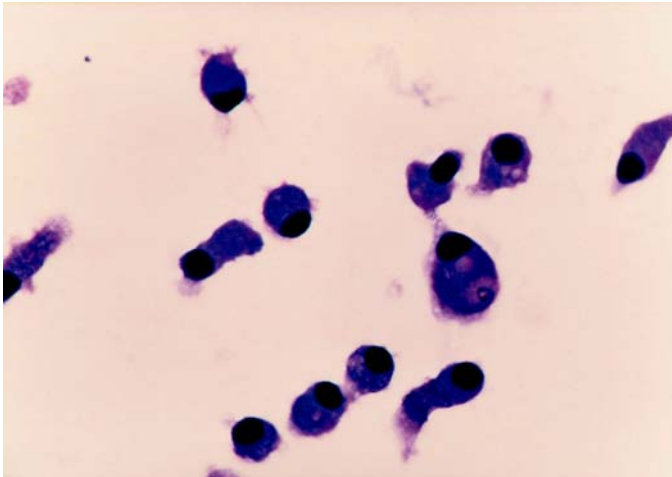


Abbildung 30:
Kultur von *L.-donovani*-infizierten Makrophagen,
inkubiert
mit Antidesmon; Konzentration 10 µg/ml
(Giemsa-Färbung, Vergrößerung 50fach)

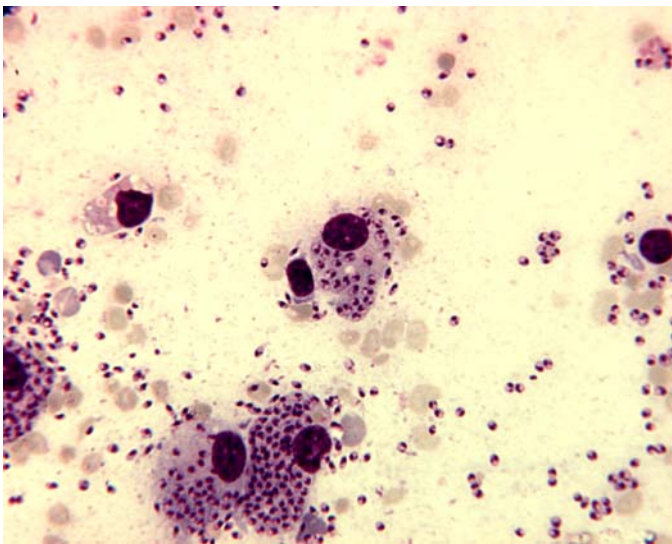


Abbildung 31 :
Kultur von *L.-donovani*-infizierten Makrophagen,
inkubiert mit Antidesmon; Konzentration 1,1 µg/ml
(Giemsa-Färbung, Vergrößerung 50fach)

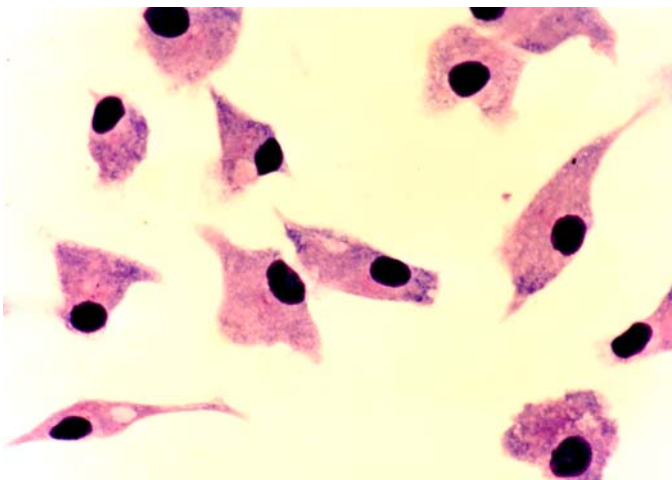


Abbildung 32:
Kultur von *L.-donovani*-infizierten Makrophagen,
inkubiert mit AdOMeb; Konzentration 1,1 µg/ml
(Giemsa-Färbung, Vergrößerung 50fach)

Abb. 30-32: A. Häring

	Konz. (µg/ml)	% NIZ	Konz. (µg/ml)	%NIZ	
AdAc	15,0	99%	15,0	100%	
	5,0	32%	5,0	56%	
			1,6	24%	
IC50 (µg/ml)		6,7		4,4	5,6
AdAml	15,0	3%	60,0	9%	
	5,0	1%	20,0	6%	
			6,6	2%	
IC50 (µg/ml)		>15		>60	n.e.

Tabelle 24: Wirkung der Derivategruppe III auf *Leishmania donovani* in zwei unabhängigen Versuchsreihen (%NIZ= Anteil nichtinfizierter Zellen).

Gruppe IV: Ad-glc, Deoxo- Ad

Diese Substanzen bewirkten lediglich eine sehr geringe Reduktion des Anteils an infizierten Zellen. IC50-Werte konnten daher nicht festgestellt werden. Es zeigten sich lichtmikroskopisch keine Hinweise auf einen toxischen Effekt der Substanzen. Ad-glc und Deoxo-Ad sind somit nicht wirksam gegen *L. donovani* (Tab. 25).

	Konz. (µg/ml)	% NIZ	Konz. (µg/ml)	%NIZ
Ad-glc	15,0	2%	60,0	2%
	5,0	1%	20,0	1%
			6,6	1%
IC50 (µg/ml)		>15		>60
Deoxo-glc	15,0	9%	60,0	10%
	5,0	1%	20,0	6%
			6,6	1%
IC50 (µg/ml)		>15		>60

Tabelle 25: Wirkung der Derivategruppe IV auf *Leishmania donovani* in zwei unabhängigen Versuchsreihen (%NIZ= Anteil nichtinfizierter Zellen)

Strukturanaloga: Melochinin und Deferiprone

Die beiden Strukturanaloga bewirkten kaum eine Verringerung des Anteils an befallenen Zellen. IC50-Werte konnten aufgrund der mangelnden Wirkung nicht ermittelt werden. Mikroskopisch war eine toxische Wirkung von Deferiprone auf die Makrophagen festzustellen. In der Konzentration 60 µg/ml erschien die Zellgröße verringert und die Zellen hatten sich abgerundet. Beide Substanzen sind daher nicht wirksam gegen *L. donovani* (Tab. 26).

	Konz. (µg/ml)	% NIZ	Konz. (µg/ml)	%NIZ
Melochinin	15,0	7%	60,0	9%
	5,0	2%	20,0	2%
			6,6	1%
IC50 (µg/ml)		>15		>60
Deferiprone	15,0	7%	60,0	9%
	5,0	1%	20,0	6%
			6,6	1%
IC50 (µg/ml)		>15		>60

Tabelle 26: Wirkung der Strukturanaloga auf *Leishmania donovani* in zwei unabhängigen Versuchsreihen (%NIZ = Anteil nichtinfizierter Zellen).

2.2.7 Selektivitätsindices von Antidesmon und seinen Derivaten für *L. donovani*

Im *Leishmania-donovani*-Assay vermehren sich die Parasiten in einer Lage von Makrophagen aus der Maus. Es wurde daher die Toxizität der drei im *L.-donovani*-Assay aktivsten Substanzen auf diese Zellen ermittelt. Hiermit sollte geprüft werden, ob die Wirkung auf die Leishmanien auf einer Schädigung der Wirtszellen beruht. Das Maß für die zytotoxische Wirkung der Substanzen war die Wachstumshemmung der Makrophagen im Vergleich zu einem Kontrollansatz. Es ergab sich ein IC50-Wert von 7,04 µg/ml für Antidesmon und 11,12 µg/ml für AdAc (Tab. 28). Die geringste Toxizität besaß AdOMeb (IC50 28,03 µg/ml). Ein IC50-Wert für die Referenzsubstanz Natriumstibogluconat konnte nicht ermittelt werden, da selbst in höchsten Konzentration (1000 µg/ml) nur geringe Wachstumshemmung der Makrophagen eintrat. Eine höhere Dosierung war nicht möglich, da das Medikament bereits in der Konzentration von 1000 µg/ml teilweise ausfiel. Aus den ermittelten IC50-Werten wurde der Selektivitätsindex (SI) berechnet (Tab. 27). AdOMeb hat mit 21,6 den größten Selektivitätsindex. Dagegen weist der niedrige SI für Antidesmon (1,5) und AdAc (2,0) darauf hin, dass bei diesen Substanzen keine spezifische Wirkung auf die Leishmanien vorliegt. Ein genauer SI für Natriumstibogluconat konnte nicht bestimmt werden, der Wert muß erheblich größer als 18 sein. Dies ist kennzeichnend für die spezifische Wirkung dieser Substanz gegen *L. donovani*.

Substanz	IC50 in µg/ml		SI
	L. donovani	Makro- phagen	
Na-stibogl.	59,25	>1000	>17
AdOMeb	1,3	28,0	21,6
AdAc	5,6	11,1	2,0
Ad	4,6	7,0	1,5

Tabelle 27: Selektivitätsindices SI (IC50 Makrophagen/ IC50 Leishmanien) für *L. donovani*

	Konz. (µg/ml)	% Wachs- tum _a	%Wachs- tum _b	+/- σ
Ad	75,0	5,0%	3,7%	0,9%
	37,5	1,9%	3,5%	1,1%
	18,8	15,1%	16,6%	1,1%
	9,4	37,8%	44,1%	4,5%
	4,7	58,1%	68,0%	7,0%
	2,3	76,9%	99,6%	16,1%
IC50 (µg/ml)		6,18	7,90	7,04*+/- 1,2
AdAc	75,0	3,9%	3,3%	0,4%
	37,5	4,7%	5,0%	0,2%
	18,8	31,1%	34,5%	2,4%
	9,4	55,4%	55,7%	0,2%
	4,7	77,1%	85,1%	5,7%
	2,3	99,7%	99,4%	0,2%
IC50 (µg/ml)		10,94	11,30	11,12*+/- 0,2
AdOMeb	75,0	1,9%	2,0%	0,1%
	37,5	30,5%	32,8%	1,6%
	18,8	72,1%	78,9%	4,8%
	9,4	84,6%	94,0%	6,6%
	4,7	93,2%	99,9%	4,7%
	2,3	99,2%	99,9%	0,5%
IC50 (µg/ml)		27,09	28,96	28,03*+/- 1,3
Natrium- stibogluconat	1000,0	96,3%	96,8%	0,4%
	500,0	99,4%	97,3%	1,5%
	250,0	98,0%	99,0%	0,7%
	125,0	98,5%	98,0%	0,4%
	62,5	98,6%	100,0%	1,0%
	31,3	99,0%	99,4%	0,3%
IC50 (µg/ml)		>1000	>1000	n.e.

Tabelle 28: Wirkung ausgewählter Substanzen auf die Wirtszellen von *Leishmania donovani* ($\pm\sigma$ = Standard-abweichung der links angeführten Ergebnisse der zwei Parallelansätze a und b; *= Mittelwert der IC50-Werte in den Parallelansätzen a und b, n.e.= nicht ermittelbar)

Zusammenfassung

Von den untersuchten Substanzen erwiesen sich AdOMeb und Antidesmon als schwach wirksam gegen *L. donovani* (Tab. 29). AdOMeb zeigte, wie auch im *T.-cruzi*- Assay, die stärkste antiparasitäre Aktivität der getesteten Substanzen; der IC-50-Wert von 1,3 µg/ml entspricht einer schwachen Wirkung auf die Leishmanien. Zugleich weist der Selektivitätsindex von 21,6 auf das Vorliegen einer spezifischen Wirkung hin, die pharmakologisch jedoch nicht ausreichend erscheint. Bei Antidesmon ist eine selektive Wirkung auf die Leishmanien nicht wahrscheinlich, da seine Toxizität auf die Wirtszellen relativ hoch und dementsprechend der Selektivitätsindex sehr niedrig ist. Die IC50-Werte aller Testsubstanzen liegen zwar erheblich niedriger als die der Referenzsubstanz Natriumstibogluconat, jedoch zeigt das *in vivo* gut wirksame Medikament trotz der hohen benötigten Dosen bei *In-vitro*-Tests eine ausgeprägt selektive Wirkung auf die Parasiten.

Wirkung	Substanz	IC50 _a	IC50 _b	MW	±σ
Aktiv	Na- Stibogl.	69,5	49,0	59,3	14,5
Schwach aktiv	AdOMeb	1,1	1,5	1,3	0,3
Nicht aktiv	Ad	4,2	5,0	4,6	0,6
	AdAc	6,7	4,4	5,6	1,6
	AdOL	16,7	14,5	15,6	1,6
	AdOMec	23,0	12,9	18,0	7,1
	AdNMea	>15	>60	n.e.	n.e.
	AdA2-glc	>15	>60	n.e.	n.e.
	AdB2-glc	>15	>60	n.e.	n.e.
	AdNMeb	>15	>60	n.e.	n.e.
	AdAmI	>15	>60	n.e.	n.e.
	Melochinin	>15	>60	n.e.	n.e.
Deferiprone	>15	>60	n.e.	n.e.	

Tabelle 29: Wirkung, IC50- Werte und mittlere IC-50-Werte (MW) sowie Standardabweichung σ aller getesteten Substanzen in µg/ml im *in-vitro*-Assay gegen *Leishmania donovani* in zwei unabhängigen Versuchsreihen _a und _b, n.e.= nicht ermittelbar

2.2.8 Wirkung von Antidesmon und seinen Derivaten auf *P. falciparum*

Antidesmon, seine Derivate und Strukturanaloga wurden auf Aktivität gegen zwei Stämme des Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum* getestet. Der Stamm K1 weist eine partielle Chloroquinresistenz auf, der Stamm NF54 ist nicht resistent. Als Referenzsubstanz diente Chloroquin, ein bewährtes Malaria-Chemotherapeutikum. Das Maß für die Wirkung einer Substanz war die Wachstumshemmung der Parasiten. Alle Substanzen wurden je zweimal gegen NF54 und K1 getestet. Die Anfangskonzentration betrug einheitlich 5 µg/ml. In jedem Versuch wurde ein IC50-Wert für die jeweilige Substanz bestimmt. Nach diesem Wert wurde gemäß der Festlegung der Drug Discovery Research Group von TDR/WHO (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. R. Brun, STI Basel, 2003) die Wirksamkeit eingeschätzt (Tab. 30)

IC50-Wert	Bewertung
< 0,05 µg/ml	Aktiv
0,05- 1 µg/ml	Schwach aktiv
>1 µg/ml	Inaktiv

Tabelle 30: Bewertung der Aktivität der Testsubstanzen im *P.-falciparum*- Assay

Antidesmon, Derivate und Strukturanaloga

Da die Resultate der Tests für alle Substanzen ähnlich waren, werden die Ergebnisse im Folgenden für alle Substanzgruppen zusammenfassend dargestellt.

Für die Referenzsubstanz Chloroquin fand sich ein IC50-Wert von 0,058 µg/ml im Test gegen den partiell resistenten Stamm K1 und ein Wert von 0,004 µg/ml für den nicht resistenten Stamm NF54 (Tab. 31). Antidesmon hatte einen IC50-Wert von 4,1 µg/ml im Test gegen den Stamm K1 und 3,0 µg/ml gegen den Stamm NF54 (Mittelwerte). Es war damit nicht aktiv gegen die getesteten Plasmodienstämme. In der Derivategruppe I fanden sich für AdOMec und AdOMeb mittlere IC50-

Werte von 2,2 und 2,4 µg/ml gegen K1 und 1,6 und 2,1 µg/ml gegen NF54. Die beiden Substanzen wirken damit in niedrigerer Konzentration als Antidesmon gegen den jeweiligen Parasitenstamm.

AdOL vermochte in der höchsten Konzentration von 5 µg/ml das Wachstum von K1 nicht auf Werte unter 50 Prozent zu reduzieren, die IC50 für NF54 war 4,0 µg/ml. Keine der Substanzen in der Gruppe I erwies sich damit als aktiv gegen die Plasmodien.

Die beiden Derivate der Gruppe II bewirkten in der höchsten Konzentration von 5 µg/ml eine nur sehr geringe Wachstumsreduktion von K1 und NF54. IC50-Werte konnten daher nicht ermittelt werden. Aus dem gleichen Grund ließen sich für AdAml (Derivategruppe III) keine IC50-Werte bestimmen. Die mittleren IC50-Werte für AdAc betragen 2,9 µg/ml für K1 und µg/ml für NF54. Beide Substanzen zeigten somit keine spezifische Aktivität gegen Plasmodien. Für beide Substanzen der Gruppe IV konnten IC50-Werte im Test gegen K1 bestimmt werden. Sie betragen im Mittel 1,4 µg/ml bei Ad-glc und 2,2 µg/ml bei Deoxo-Ad. Im Test gegen NF54 bewirkten beide Substanzen in der Höchstkonzentration nur geringe Wachstumsreduktion. Auch die Derivate der Gruppe IV wiesen damit keine Aktivität gegen die Parasiten auf. Gleiches gilt für die Strukturanaloga Melochinin und Deferiprone. In dieser Gruppe konnte nur für Melochinin ein IC50-Wert ermittelt werden; er betrug 3,9 µg/ml im Test gegen NF54.

Wirkung	Substanz	<i>P. falciparum</i> K1				<i>P. falciparum</i> NF54			
		IC50 _a	IC50 _b	MW	±σ	IC50 _a	IC50 _b	MW	±σ
aktiv	Chloroquin	0,048	0,067	0,058	0	0,0034	0,0039	0,004	0
Nicht aktiv	Ad	4,0	4,1	4,1	0,1	3,1	2,9	3,0	0,1
	AdOMec	2,2	2,2	2,2	0	1,6	1,6	1,6	0
	AdOMeb	2,4	2,4	2,4	0	2,2	2,1	2,1	0,1
	AdOI	>5	>5	n.e.	n.e.	4,1	3,9	4,0	0,1
	AdNMea	>5	>5	n.e.	n.e.	>5	>5	n.e.	n.e.
	AdNMeb	>5	>5	n.e.	n.e.	>5	>5	n.e.	n.e.
	AdAc	2,7	3,0	2,9	0,2	2,0	2,1	2,0	0,1
	AdAml	>5	>5	n.e.	n.e.	>5	>5	n.e.	n.e.
	Ad-glc	1,3	1,6	1,4	0,2	>5	>5	n.e.	n.e.
	Deoxo-Ad	2,1	2,3	2,2	0,1	>5	>5	n.e.	n.e.
	Melochinin	>5	>5	n.e.	n.e.	3,8	4,0	3,9	0,1
Deferiprone	>5	>5	n.e.	n.e.	>5	>5	n.e.	n.e.	

Tabelle 31: Wirkung, IC50- Werte und mittlere IC-50-Werte (MW) sowie Standardabweichung σ aller getesteten Substanzen in µg/ml im *in-vitro*-Assay gegen die *P.-falciparum*- Stämme K1 und NF54 in zwei unabhängigen Versuchsreihen _a und _b (n.e.= nicht ermittelbar)

Zusammenfassung

Antidesmon, seine Derivate und Strukturanaloga wurden in zwei Versuchsreihen gegen die *P.-falciparum*-Stämme K1 und NF54 getestet. Unter den untersuchten Substanzen wirkte Ad-glc in der niedrigsten Konzentration gegen den Stamm K1 (Abb. 33). Dieses Derivat hatte keine Aktivität gegen *L. donovani* oder *T. cruzi* gezeigt.

Den niedrigsten IC50-Wert im Test gegen den Stamm NF54 wies das Derivat AdOMec auf (Abb. 34). Bewertet man die Wirkung der Testsubstanzen anhand der IC50 (Tab. 31), so erweist sich - abgesehen von der Referenzsubstanz - keine als pharmakologisch aktiv gegen die beiden getesteten Plasmodienstämme. Daher wurde in diesem Fall auf die Bestimmung der Selektivität verzichtet.

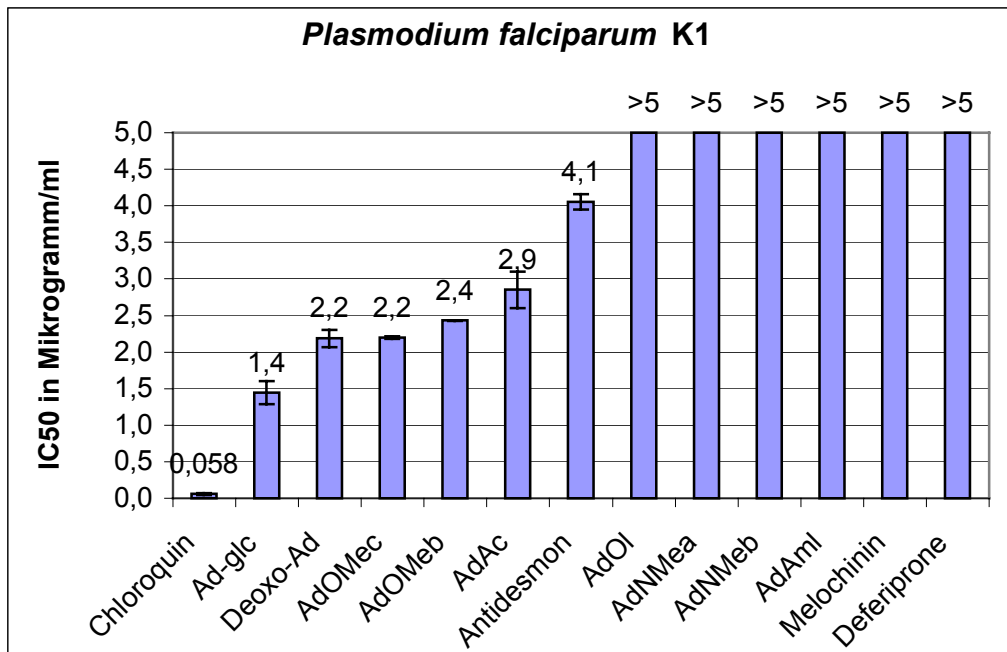


Abbildung 33: IC50- Werte in der *in-vitro*- Testreihe gegen den *P.- falciparum*- Stamm K1

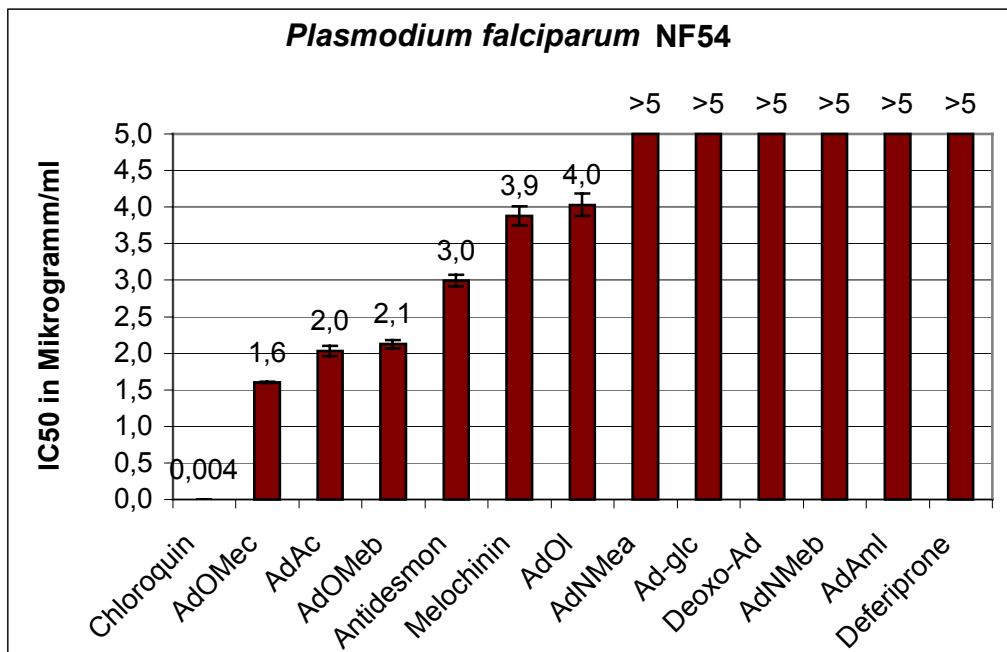


Abbildung 34: IC50-Werte in der *In-vitro*-Testreihe gegen den *P.-falciparum*-Stamm NF54

2.2.9 Toxizitätsprüfung von Antidesmon *in vitro* und *in vivo*

Wie beschrieben, konnte mit Antidesmon eine neuartige Muttersubstanz mit Potenzial für eine klinische Anwendung zur Therapie parasitärer Erkrankungen gefunden werden. Um die Anwendbarkeit der Substanzen als Medikament zu prüfen, ist als nächster Schritt eine Abschätzung der Toxizität erforderlich.

Toxizitätsprüfung mit humanen und murine Zellen in vitro

Um einen Aufschluss über die allgemeine Zytotoxizität von Antidesmon im Vergleich zu in Anwendung befindlichen antiparasitären Medikamenten zu bekommen, wurde die Substanz vergleichend mit den Chemotherapeutika Mefloquin und Benznidazol auf toxische Wirkung auf verschiedenen humane und murine Zelllinien geprüft.

Die Höchstkonzentration von Antidesmon und Mefloquin war in allen Versuchen 100 µg/ml, die von Benznidazol 1000 µg/ml. Es wurden sechs Reihenverdünnungen von 1:2 hergestellt. Pro Zelllinie wurde ein Versuch im Parallelansatz durchgeführt und die gemessene Wachstumshemmung der Zelllinien in beiden Ansätzen gemittelt. Die IC₅₀ wurde gemäß mittels linearer Regressionsanalyse (siehe Kapitel 3.3.7) berechnet.

Humane Zelllinien

Die Toxizität auf humane Zellen wurde an den in der pharmakologischen Wirkstoffprüfung etablierten Zelllinien HepG2 (hepatozelluläre Karzinomzellen), MRC5 (Lungenfibroblasten) und HT29 (kolorektale Adenokarzinomzellen) untersucht (Tab. 32).

Im Versuch mit HepG2 fand sich ein IC₅₀-Wert von 3,5 µg/ml für Antidesmon und 516 µg/ml für Benznidazol. Die Toxizität von Mefloquin konnte aufgrund der geringen Menge der zur Verfügung stehenden HepG2-Zellen hier nicht untersucht werden. Der IC₅₀-Wert für die Zelllinie HT29 betrug 9,2 µg/ml für Antidesmon und 4,7 µg/ml für Mefloquin. Benznidazol verringerte das Wachstum der Zellen in der Höchstkonzentration von 1000 µg/ml nicht auf weniger als 50 Prozent, weshalb hier keine IC₅₀ bestimmt werden konnte. Für MRC5 ergaben sich IC₅₀-Werte von 54 µg/ml (Antidesmon), 438 µg/ml (Benznidazol) und 6,7 µg/ml (Mefloquin).

Murine Zelllinien

Die Wirkung von Antidesmon auf murine Makrophagen und Myofibroblasten wurde bereits untersucht (Kapitel 2.2.5. und 2.2.7.). Ergänzend wurde die Wirkung auf die Zelllinie NB2a (Neuroblastomzellen aus der Maus) betrachtet. Hier fanden sich IC₅₀-Werte von 42,36 µg/ml für Antidesmon, 745 µg/ml für Benznidazol und 8,1 µg/ml für Mefloquin (Tab.33).

Zelllinie/ Substanz	HepG2		HT29		MRC5	
	Konz.(µg/ml)	%Wachstum	Konz.(µg/ml)	%Wachstum	Konz.(µg/ml)	%Wachstum
Anti desmon	100,0	1,9%	100,0	1,5%	100,00	1%
	50,0	7,4%	50,0	3,4%	50,00	56%
	25,0	6,3%	25,0	2,6%	25,00	99%
	12,5	7,3%	12,5	12,3%	12,50	100%
	6,3	24,5%	6,3	97,0%	6,25	100%
	3,1	55,4%	3,1	125,5%	3,13	100%
IC50 (µg/ml)		3,5		9,2		54,0
Benz nidazol	1000,0	10,6%	1000,0	60,8%	1000,0	38,5%
	333,3	76,1%	333,3	92,0%	500,0	41,1%
	111,1	88,2%	111,1	93,8%	250,0	87,5%
	37,0	87,9%	37,0	99,9%	125,0	93,5%
	12,3	91,3%	12,3	99,9%	62,5	98,7%
	4,1	85,3%	4,1	99,9%	31,3	97,5%
IC50 (µg/ml)		516		>1000		438
Mefloquin			100,0	0,2%	100,0	0,2%
			50,0	0,6%	50,0	0,4%
			25,0	0,4%	25,0	0,2%
			12,5	2,0%	12,5	0,6%
			6,3	23,5%	6,3	55,1%
			3,1	87,2%	3,1	86,4%
IC50(µg/ml)		n.u.		4,7		6,7

Tabelle 32: IC50- Werte im Test auf Zytotoxizität gegen humane Zelllinien (n.u.=nicht untersucht)

Zelllinie/ Substanz	NB2a	
	Konz.(µg/ml)	%Wachstum
Antidesmon	100,0	0,5%
	50,0	45,7%
	25,0	63,6%
	12,5	71,6%
	6,3	85,0%
	3,1	96,3%
IC50 (µg/ml)		42,4
Benznidazol	1000,0	32,3%
	500,0	74,0%
	250,0	72,6%
	125,0	90,7%
	62,5	88,9%
	31,3	93,5%
IC50 (µg/ml)		745
Mefloquin	100,0	0,4%
	50,0	0,6%
	25,0	0,7%
	12,5	1,5%
	6,3	79,5%
	3,1	94,0%
IC50 (µg/ml)		8,1

Tabelle 33: IC50-Werte im Test auf Zytotoxizität gegen Neuroblastomzellen der Maus

Toxizitätsprüfung in vivo

An zwei gesunden CD1-Mäusen wurde die toxische Wirkung von Antidesmon in vivo untersucht. Dadurch konnte die höchste tolerierte Dosis von Antidesmon ermittelt werden. Dies diente der Vorbereitung von Therapieversuchen bei parasiteninfizierten Mäusen mit Antidesmon. Den Mäusen wurden nach Schema Antidesmon-Lösungen steigender Konzentration bis zum Erreichen der letalen Dosis intraperitoneal gespritzt (Tab. 34). Die toxische Dosis von Antidesmon wurde mit 50 mg/kg, die höchste tolerierte Dosis mit 20 mg/kg bei intraperitonealer Gabe bestimmt.

Antidesmon Dosis	Wirkung
Tag 1: 5 mg/kg	Keine Toxizität
Tag 3: 10 mg/kg	Keine Toxizität
Tag 5: 20 mg/kg	Keine Toxizität
Tag 8: 50 mg/kg	Nach Injektion Krämpfe, Tetraplegie, Dyspnoe Nach 15 min Exitus

Tab. 34: Toxizitätsprüfung von Antidesmon in vivo (intraperitoneale Applikation bei zwei Mäusen)

Zusammenfassung

Antidesmon wirkte auf alle Zelllinien in erheblich geringeren Konzentrationen als Benznidazol toxisch (Abb. 35, 36). Im Vergleich zu Mefloquin ist die Toxizität von Antidesmon jedoch geringer (Abb. 37). Die höchste toxische Wirkung von Antidesmon wurde bei den hepatozellulären Karzinomzellen festgestellt. Am wenigsten toxisch wirkte es auf humane Lungenfibroblasten. Vorbereitend für Versuche an *T.cruzi*-infizierten Mäusen wurde in einem *In-vivo*-Experiment an gesunden Mäusen die höchste tolerierte Dosis von Antidesmon bei i.p.-Applikation mit 20 mg/kg festgestellt. Von einer größeren Anzahl von *In-vivo*-Versuchen wurde aufgrund der geringen Toxizität von Antidesmon und der geringen Menge des vorhandenen Antidesmons abgesehen. Nach diesen Ergebnissen kann Antidesmon als grundsätzlich geeignet für die klinische Prüfung eingestuft werden.

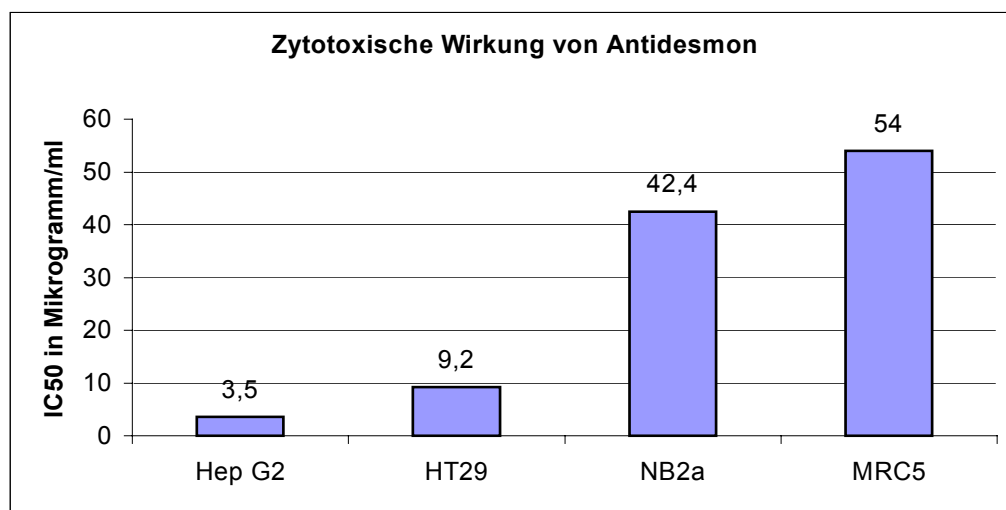


Abbildung 35: Zytotoxische Wirkung von Antidesmon auf humane und murine Zelllinien

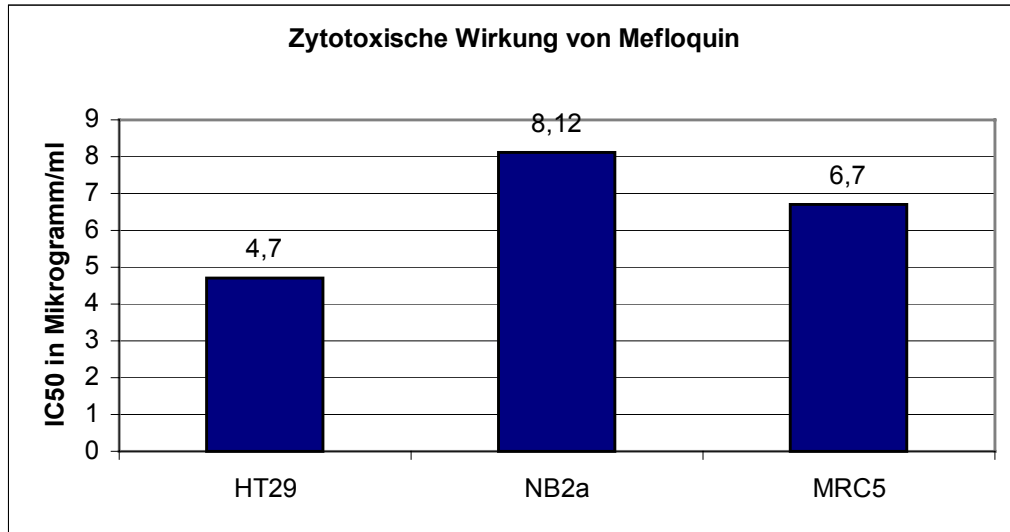


Abbildung 36: Zytotoxische Wirkung von Mefloquin auf humane und murine Zelllinien

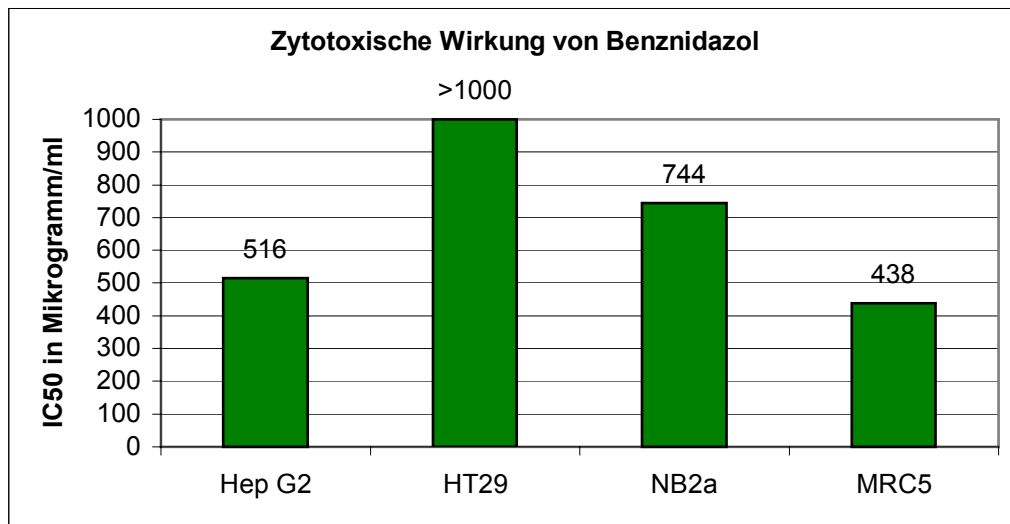


Abbildung 37: Zytotoxische Wirkung von Benznidazol auf humane und murine Zelllinien