

#### 4 Diskussion

Antidesmon, ein 1996 entdecktes pflanzliches Alkaloid, wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals auf seine Wirkung gegen parasitische Protozoen getestet. Insbesondere für die durch *Trypanosoma cruzi* und *Leishmania donovani* verursachten Erkrankungen existiert keine befriedigende Therapiemöglichkeit, und Leitstrukturen für neue Medikamente werden seit langem dringlich gesucht.

Aufgrund seiner Struktur und des Synthesewegs in der Pflanze gilt Antidesmon als der erste Repräsentant einer neuen Klasse von Alkaloiden (Bringmann et al 2001, Bringmann, Rischer et al 2000). Parallel zur vorliegenden Arbeit wurde im Biotest gegen *Cladosporidium cucumerinum* (Gottstein 1984) eine stark fungitoxische Wirkung sowie eine anthelminthische Aktivität *in vitro* gegen *Nippostrongylus brasiliensis* und *Trichinella spiralis* (Buske 2000) festgestellt. Auf der Suche nach strukturähnlichen Substanzen, deren Wirkungen bekannt sind und die einen Hinweis auf mögliche biologische Aktivität des Antidesmons geben könnten, fand sich Deferiprone (Strukturformel siehe Kapitel 1.1., Abb. 4), ein synthetischer Schwermetallchelator, der zur Therapie der Thalassämie und bei Schwermetallvergiftungen eingesetzt wird (Olivieri 1996). Deferiprone zeigt zudem Aktivität gegen *T. cruzi in vitro* (Jones 1996, Singh 1997).

Antidesmon wurde daher zunächst auf Wirksamkeit *in vitro* gegen *T. cruzi*, den Erreger der Chagas-Krankheit, untersucht. Dabei wurde seine Wirkung auf die Parasiten mit der einer Referenzsubstanz, Benznidazol, verglichen. Benznidazol ist eines der Mittel der ersten Wahl zur Therapie der Chagas-Krankheit und auch *in vitro* gut wirksam. Es zeigte sich, dass Antidesmon in einer zehnfach niedrigeren Konzentration als Benznidazol gleich stark hemmend auf das Parasitenwachstum wirkte. Die starke Wirksamkeit des Antidesmons wurde in einem Kontrollexperiment durch eine Mitarbeiterin des Tropeninstituts Basel bestätigt. Gegen *T. b. rhodesiense*, ein weiteres humanpathogenes Protozoon, zeigte Antidesmon keine und gegen *T. evansi* nur schwache Wirkung. Die Bioaktivität des Antidesmons ist also spezifisch für *T. cruzi*. Deferiprone erwies sich in der vorliegenden Arbeit als nicht aktiv gegen *T. cruzi*. Die Diskrepanz zu den oben beschriebenen Publikationen lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass die Autoren lediglich die Wirkung von Deferiprone auf die epimastigote Insektenform von *T. cruzi* untersuchten. In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen die amastigote Form, wie sie im infizierten Menschen vorkommt, untersucht. Singh et al fanden zudem, dass der Zusatz von Eisenionen zum Medium die Wirkung des Eisenchelators stark verminderte. Die geringe Wirksamkeit von Deferiprone in der vorliegenden Arbeit könnte daher auch durch einen höheren Eisengehalt des serumhaltigen Amastigotenmediums im Vergleich zum Epimastigotenmedium bedingt sein.

Um die ungewöhnlich hohe Aktivität des Antidesmons genauer zu untersuchen, wurden Derivate des Antidesmons hergestellt. Bei jedem dieser sieben Derivate wurden wichtige strukturelle Eigenschaften der Muttersubstanz verändert. Diese neu synthetisierten Substanzen sowie zwei

natürlich vorkommende Derivate und die beiden bereits erwähnten Strukturanaloga (Strukturformeln s. Kapitel 2.3.1., Abb. 18 bis 23) wurden auf ihre Bioaktivität untersucht. Eventuelle Wirkungsunterschiede sollten Rückschlüsse auf entscheidende Eigenschaften des Antidesmons in Bezug auf seine biologische Wirksamkeit ermöglichen. Es erschien außerdem denkbar, durch Strukturveränderungen sogar eine Verbesserung der Antidesmon-Aktivität zu erzielen.

Die neun Derivate und zwei Strukturanaloga wurden zunächst auf ihre Wirksamkeit gegen *T. cruzi* untersucht. Das Derivat AdOMeb übertraf die Muttersubstanz Antidesmon in seiner antiparasitären Wirkung nochmals deutlich. AdOMeb unterscheidet sich von Antidesmon durch eine Methylgruppe am Stickstoffatom des ersten Ringes und wirkt fünfmal stärker als Antidesmon. Es wirkte in 90fach niedrigerer Konzentration als Benznidazol. Zwei weitere Derivate, AdOL und AdAc, waren ebenfalls stärker wirksam als Benznidazol.

Vor weiteren Bioaktivitätsuntersuchungen war es nun von entscheidender Bedeutung, eine toxische Wirkung der hochaktiven Substanzen auf Säugetierzellen auszuschließen. *T. cruzi* ist ein Protozoon, das sich im infizierten Menschen intrazellulär vermehrt. Daher wurde in dieser Arbeit ein *in-vitro*-Assay verwandt, in dem die Testsubstanzen auf *T. cruzi*-infizierte Säugetier-Myofibroblasten gegeben werden. Eine Reduktion des Parasitenwachstums wäre daher auch durch eine unerwünschte toxische Wirkung der Substanzen auf die Myofibroblasten zu erklären. Es wurden deshalb die IC<sub>50</sub>-Werte der aktiven Substanzen für die Säugetierzellen bestimmt. Eine wachstumshemmende Wirkung auf diese Zellen trat erst bei dem Hundert- bis Tausendfachen der Konzentrationen ein, die eine entsprechende Wachstumsreduktion der Parasiten bewirkten. Der IC<sub>50</sub>-Wert der aktivsten Substanz AdOMeb für die Säugetierzellen lag um das Neuntausendfache höher als der IC<sub>50</sub>-Wert der Substanz für *T. cruzi*. Dagegen war der IC<sub>50</sub>-Wert bei einer der schwach aktiven Substanzen, AdOMec, für die Säugetierzellen nur um das Siebenfache höher als der IC<sub>50</sub>-Wert der Substanz für *T. cruzi*.

Aufgrund dieses Versuchs kann geschlossen werden, dass die Wirkung der vier hoch aktiven Substanzen nicht auf einer Schädigung der Wirtszellen beruht. Antidesmon, AdOMeb, AdAc und AdOL besitzen offenbar eine spezifische wachstumshemmende Wirkung auf die Parasiten.

Es stellte sich nun die Frage, ob diese Substanzen auch Wirksamkeit gegen weitere humanpathogene Protozoen besitzen. Für eine neue Versuchsreihe wurde *Leishmania donovani* ausgewählt, ein humanpathogenes Protozoon, das wie *T. cruzi* zur Familie der Trypanosomatidae gehört und sich ebenfalls im Säugetier intrazellulär vermehrt. Der Großteil der Testsubstanzen erwies sich als inaktiv gegen *L. donovani*. AdOMeb und Antidesmon, im Test gegen *T. cruzi* die aktivsten Substanzen, zeigten schwache Wirksamkeit.

Eine Zytotoxizitätsprüfung mit den Wirtszellen der Leishmanien legte nahe, dass Antidesmon keine spezifische Wirkung auf die Leishmanien besitzt, sondern die Wachstumshemmung der Parasiten auf einer allgemein toxischen Wirkung beruht. AdOMeb wirkte dagegen in deutlich

niedrigerer Konzentration auf die intrazellulären Leishmanien als auf die Wirtszellen. Dies kann auf einer spezifischen Wirkung beruhen, aber auch auf Akkumulation der Substanz durch die Leishmanien selbst oder in den Phagolysosomen der Makrophagen, in denen sich die Parasiten aufhalten (Lucius 1997).

Die Bioaktivitätsprüfung wurde um *Plasmodium falciparum*, ein weiteres wichtiges humanpathogenes Protozoon, das sich ebenfalls intrazellulär vermehrt, erweitert. Weder Antidesmon noch eines der neun Derivate und zwei Strukturanaloga zeigte eine Wirkung gegen die Plasmodien.

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 Zelllinie geprüft. Die Toxizität von Antidesmon lag zwischen der für Benznidazol und Mefloquin.

Die antitrypanosomale Aktivität von Antidesmon wurde nach Fertigstellung dieser Arbeit von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt (Bringmann et al 2001).

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. Für die Bioaktivität von Antidesmon und seinen Derivaten wurde in Deutschland und international ein Patent erteilt (Adam, Buske, Häring und Kekulé 2001).

#### *Fehlerdiskussion*

Die Bioassays, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind international etabliert zum Screening von Naturstoffen auf antiparasitäre Wirkung. Gemäß neuerer Richtlinien zur Standardisierung von Screeningmethoden (Croft und Brun 1999) wurden nur diejenigen Entwicklungsformen der Protozoen verwandt, die auch tatsächlich den Menschen befallen. So sind zum Beispiel die epimastigoten Insektenformen von *T. cruzi* wesentlich einfacher zu kultivieren als die humanpathogenen Amastigoten und wurden daher bisher von der Mehrzahl der Forschungsgruppen zum Screening verwandt. Es wurde jedoch nachgewiesen, dass die Sensitivität der Insektenformen gegenüber Medikamenten normalerweise nicht mit der der Säugetierform übereinstimmt (Brun und Rab 1991, de Castro 1993).

Besonders bei den Bioassays, bei denen Wirtszellen mit Parasiten infiziert wurden, kommen starke Schwankungen der Ergebnisse zwischen einzelnen Versuchsansätzen vor (s. Kaminsky und Brun 1998, Martin et al 2001, Jones et al 2000). Neal und Croft, die den in der vorliegenden Arbeit verwandten *L.-donovani*-Assay entwickelten, berichteten, dass in Abhängigkeit von der Infektionsratio die Empfindlichkeit für Chemotherapeutika *in vitro* um das Achtfache schwankte (Neal und Croft 1984). Um Abweichungen, die über das übliche Maß hinausgingen, zu identifizieren, wurde in jedem Versuch eine Referenzsubstanz mitgeführt. Für diese wurde mit einer Reihe von Versuchen ein Referenzbereich für den IC50-Wert ermittelt. Wurde dieser in einer

der folgenden Tests überschritten, galt dieser Test als Ausreißer und wurde nicht gewertet, um das Ergebnis nicht zu verfälschen. Grundsätzlich wurde jeder Test mindestens zweimal im Duplikat durchgeführt. Aufgrund dieser Maßnahmen, die über den Standard der üblichen Testung von Substanzen an Protozoen hinausgehen, sind die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse als zuverlässig zu bezeichnen.

In Bezug auf die Interpretation der Ergebnisse ist festzustellen, dass im Rahmen dieser Arbeit sichere Aussagen lediglich über die Wirksamkeit der Testsubstanzen auf einzelne Zellen *in vitro* getroffen werden können. Die Übertragbarkeit auf die Verhältnisse *in vivo* ist eingeschränkt, da zum Beispiel bezüglich Resorptions-, Ausscheidungs- und Biotransformationmechanismen des Antidesmons nichts bekannt ist. Weiterhin ist zu beachten, dass die Parasiten, mit denen die Versuche durchgeführt wurden, größtenteils seit Jahrzehnten in Kulturmedium vermehrt werden, so dass eine Veränderung der Pathogenität und eine Alterierung des Stoffwechsels nicht ausgeschlossen werden kann. Dies gilt auch für den mit einem  $\beta$ -Galactosidase-Gen von *Escherichia coli* transfizierten *T.-cruzi*-Stamm, der hier verwendet wurde. Es soll jedoch erwähnt werden, dass die hier verwandte Testmethode eine Standardmethode beim Screening auf antitrypanosomale Aktivität ist, und dass sich bisher kein Hinweis auf Unterschiede in der Empfindlichkeit transfizierter und nichttransfizierter Trypanosomen gegenüber Medikamenten ergeben hat (Buckner et al 1996). Da die Versuche mit murinen Fibroblasten bzw. Makrophagen als Wirtszellen durchgeführt wurden, könnte dies die Übertragbarkeit auf die Verhältnisse im Menschen weiter einschränken. Wo es möglich war, etwa beim *Plasmodium-falciparum*-Assay oder bei der Zytotoxizitätsprüfung von Antidesmon, wurden daher humane Zellen verwandt. Die Empfindlichkeit *in vitro* auf antiparasitäre Substanzen soll jedoch sowohl bei der Verwendung von humanen wie murinen Zellen sehr ähnlich sein (Croft und Neal 1987).

#### *Vergleich mit aktuellen Forschungsergebnissen*

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Versuche unternommen, neue Leitstrukturen zur Entwicklung von Medikamenten gegen *T. cruzi* zu finden, da die bisherigen Therapiemöglichkeiten außerordentlich unbefriedigend sind. Dabei wurden verschiedenen Ansätze verfolgt, die man orientierend in den „chemischen“ und den „biologischen“ Ansatz unterteilen kann (nach Gutteridge 1993).

Der chemische Ansatz umfasst die breit gefächerte Suche nach Leitstrukturen, die sich für eine Weiterentwicklung zu einem Medikament eignen, oft ohne dass die Wirkungsweise oder das zelluläre Ziel der Substanz bekannt ist. Zu diesem Zweck werden - ähnlich wie in dieser Arbeit - synthetische oder Naturstoffe mit bekannter bzw. vermuteter Bioaktivität gegen *T. cruzi in vitro* und eventuell *in vivo* getestet. Sepúlveda-Boza und Cassels veröffentlichen 1996 einen Überblick über mehr als 50 Naturstoffe, bei denen Aktivität gegen *T. cruzi in vitro* gefunden worden war. Die Konzentrationen, in denen diese Stoffe gegen *T. cruzi* wirkten, reichten von weniger als 1  $\mu\text{g/ml}$  bis mehr als 1  $\text{mg/ml}$ . Drei der beschriebenen Naturstoffe weisen wie Antidesmon eine Chinolin-

Grundstruktur auf und waren aktiv gegen *T. cruzi* mit IC50- Werten unter 300 µg/ml. Dabei wäre ein direkter Vergleich der Werte zu den in dieser Arbeit gefundenen nicht zulässig, da zum einen die experimentellen Bedingungen für die Naturstoffe höchst unterschiedlich waren, was Inkubationszeit und -bedingungen betraf und da zum anderen praktisch immer die Wirkung auf die epimastigote Form von *T. cruzi* untersucht wurde. Die Wirkung auf die leicht zu kultivierende Insektenform vernachlässigt jedoch die unterschiedliche Sensitivität der infektiösen Trypomastigoten und der intrazellulären Amastigoten (de Castro 1993). Der Wirkungsmechanismus der aktiven Naturstoffe, über die berichtet wurde, ist unbekannt. Jedoch wurde vermutet, dass die meisten Substanzen über eine Störung der Redoxbalance der Parasiten wirken, entweder durch Beeinflussung der Atmungskette oder der zellulären Abwehr gegen oxidativen Stress (Sepúlveda-Boza und Cassels 1996). Luque et al fanden Aktivität *in vitro* gegen *T.-cruzi*-Epimastigote für einige neue synthetisierte (1,2,4)-triazolo(1,5a)-pyrimidine. Es wurde vermutet, dass die Wirkung auf der strukturellen Ähnlichkeit der Substanzen mit Pyrimidinen und auf einer Interferenz mit der de-novo-Biosynthese von Pyrimidinen beruhen könnte (Luque et al 2000). Unter ähnlichen Gesichtspunkten untersuchten Nakajima-Shimada et al die Wirkung von virustatischen Purin- und Pyrimidinanaloga auf *T. cruzi*-Epimastigote und -Amastigote *in vitro*, wobei sich eine gute Wirkung mehrerer Purinanaloga sowie des Pyrimidinanalogons AZT fand (Nakajima-Shimada et al 1996). De Castro et al untersuchten 45 synthetische und natürliche Substanzen auf Aktivität gegen die trypomastigote Form von *T. cruzi* und kamen zu dem Schluss, dass fünf der neun aktiven Substanzen eine gemeinsame chemische Eigenschaft besitzen (de Castro et al 1993). Durch reduzierende funktionelle Gruppen, so die Überlegung, sind sie potentielle Ein-Elektron-Akzeptoren und bilden Radikale, die durch eine den Substanzen gemeinsame Y-förmige Struktur stabilisiert werden. Damit hätten sie den gleichen Wirkmechanismus wie die für die Testreihe verwandte Referenzsubstanz, Kristallviolett, die vermutlich durch die Bildung partiell reduzierter Sauerstoffmetabolite wirkt (de Castro et al 1993).

In Bezug auf Antidesmon und seine drei hoch wirksamen Derivate wäre zu überlegen, ob diese Substanzen durch (kompetitive) Hemmung der Trypanothioreduktase oder Radikalbildung wirken könnten, wie dies für zahlreiche andere natürliche und synthetische, gegen *T. cruzi* aktive Substanzen diskutiert wird. Trypanothion wirkt bei Trypanosomen und einigen anderen Parasiten als Antioxidans, analog dem Gluthathion bei Säugetieren, und ist für die Aufrechterhaltung des Redoxstatus von Thiolgruppen bedeutsam. Um diesem möglichen Wirkmechanismus nachzugehen, wären weitergehende Untersuchungen notwendig.

Bei der Suche nach möglichen antitrypanosomalen Leitstrukturen wird neben dem chemischen, zuvor beschriebenen von zahlreichen Forschungsgruppen der biologische Ansatz verfolgt. Dieser beruht auf der Identifikation eines zellulären Angriffspunktes und der Suche nach entsprechenden Inhibitoren („target based drug discovery“). Bei *T. cruzi* wurden zahlreiche potentielle zelluläre Angriffspunkte identifiziert und zur Suche nach Leitstrukturen genutzt, unter anderen die

Trypanothionreduktase (Salmon-Chemin et al 2001), die Dihydrofolatreduktase (Chowdhury et al 1999), Proteasen, Transporter, Enzyme der Glykolyse (Werbowetz 2000) und Enzyme der Sterolbiosynthese (Martin et al 2001).

Durch gezielte Untersuchungen sollte überprüft werden, ob Antidesmon und seine Derivate auf eines dieser zahlreichen Targets im Parasiten wirkt. Mit der Identifizierung des zellulären Angriffspunktes wären dann gezielte Veränderungen des Moleküls denkbar, die die Selektivität für das parasitäre Ziel noch weiter erhöhen. Dies geschah zum Beispiels bei dem antitrypanosomalen Chemotherapeutikum Nifurtimox. Nifurtimox hemmt die parasitäre Trypanothionreduktase, aber auch die humane Glutathionreduktase. Die Strukturaufklärung der Trypanothionreduktase ermöglichte es, durch Veränderung der Grundstruktur von Nifurtimox um basische Seitenketten dessen Selektivität für das parasitäre Enzym zu erhöhen (Cox 1993).

#### *Interpretation der Ergebnisse*

Antidesmon und seine Derivate wiesen erhebliche und reproduzierbare Unterschiede in ihrer Bioaktivität auf. Dies zeigt

- a) dass die angewandten Untersuchungsmethoden grundsätzlich geeignet sind und es sich nicht um Sekundäreffekte, Verunreinigungen oder Artefakte handelt
- b) dass mehrere Moleküleigenschaften an der Aktivität beteiligt sind.

#### *Struktur-Wirkungs-Beziehungen*

Vergleicht man die Strukturformeln von Antidesmon und seiner wirksamen Derivate mit den Medikamenten, die bereits zur Therapie der Chagas-Krankheit eingesetzt werden (s. Kapitel 1.2.2., Abb.5 ), so lassen sich nur wenige Gemeinsamkeiten finden. Es handelt sich bei allen Substanzen um kleinere Moleküle, die eine wirtschaftliche Produktion ermöglichen. Zudem besitzen sie mindestens zwei bis drei funktionelle Gruppen, die eine Rezeptorbindung ermöglichen, jedoch insgesamt nicht mehr als fünf bis zehn, was eine spezifische Rezeptoraffinität begünstigt. Abgesehen von diesen Gemeinsamkeiten handelt es sich um sehr unterschiedliche Strukturen.

Eine genauere Betrachtung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen wird durch einen Vergleich von Antidesmon und seinen wirksamen Derivaten mit den inaktiven Derivaten möglich. Hinsichtlich der Bioaktivität scheinen folgende Moleküleigenschaften von Bedeutung zu sein (Strukturformeln siehe Kapitel 1.1. und 2.2.3.):

1. Die bityklische Struktur, da die beiden monozyklischen Substanzen, Deferiprone und Melochinin, unter den am wenigsten aktiven sind. Ursache hierfür könnte die spezifische Bindung an einen Rezeptor sein, die nur den bityklischen Molekülen möglich ist. Antidesmon ist ein Chinolin-Alkaloid. Von zahlreichen Vertretern dieser Substanzgruppe ist eine hohe Aktivität gegen parasitische Protozoen bekannt. Chinin, ein Chinolin-Alkaloid, das erstmals aus *Cinchona succirubra* isoliert wurde, war das erste effektive Mittel gegen Malaria und ist noch heute in Gebrauch (Akendengue 1999). Für einige Naturstoffe, die ebenso wie

Antidesmon eine Isochinolin-Struktur aufweisen, wurde experimentell *in vitro* und *in vivo* eine trypanozide Wirkung gefunden (Bringmann, Hamm et al 2000; Fournet et al 2000).

2. Die Methyl-Substituierung am Stickstoff des ersten Ringes bei AdOMeb. Hierdurch wurde eine Verstärkung der Wirksamkeit auf das Fünffache im Vergleich zur Muttersubstanz erzielt. Zudem wurde die toxische Wirkung auf Säugetierzellen (Makrophagen und Myofibroblasten) reduziert. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass das methylierte Derivat schneller eliminiert wird als die Muttersubstanz.
3. Die Polarität des Moleküls, da die weniger polaren Substanzen, Antidesmon und AdOMeb, um ein Hundertfaches aktiver waren als die polaren Substanzen Deferiprone und Melochinin. Deutlich wird dies auch beim Vergleich der Wirkung von Antidesmon mit seinen natürlich vorkommenden Derivaten Ad-glc und Deoxo-Ad. Diese besitzen in der Seitenkette mit der Glucopyranosylgruppe eine sehr polare Funktion und sind unwirksam gegen *T. cruzi*. Andererseits ist dies nicht die entscheidende Moleküleigenschaft, da AdOMec ebenfalls weniger polar ist als Antidesmon, aber nicht wirksamer. Die Ursache für die stärkere Wirksamkeit der genannten Substanzen könnte das Vorhandensein eines spezifischen Transportmechanismus bei den Parasiten oder deren Wirtszellen sein, so dass diese Substanzen höhere Konzentrationen erreichen.
4. Die Sauerstoff-Funktion am ersten Ring (4-O), da eine Blockierung durch Acetylierung (AdAc) zu einer Verminderung der Bioaktivität auf etwa die Hälfte der Antidesmon-Aktivität führte. Eine Methylierung an dieser Stelle (AdOMec) bewirkte sogar eine Reduktion der Aktivität auf ein Achtzigstel im Vergleich zur Muttersubstanz. Dieses könnte darauf hinweisen, dass 4-O wichtig für die Rezeptorbindung ist.
5. Der Sauerstoff-Substituent am zweiten Ring (C-8). AdOL, das sich durch eine Hydroxy-Funktion an C-8 von Antidesmon unterscheidet, hatte im Vergleich zur Muttersubstanz nur ein Drittel der Aktivität. Die Einführung von raumgreifenden Methyl- und Methoxygruppen an C-7 – wie bei AdNMea und AdNMeb – verringerte die Aktivität sogar um das Fünzigfache. Dies könnte durch eine sterische Behinderung der Bindung an einen hypothetischen Rezeptor erklärt werden.

#### *Mögliche Wirkungsweise*

Im Rahmen der Bioaktivitätsuntersuchungen wurde eine außerordentlich hohe Aktivität des Antidesmons und seiner Derivate AdOMeb, AdAc und AdOL gegen *T. cruzi* gefunden. Es stellt sich die Frage, auf welche Weise diese beiden Substanzen die Parasiten abtöten. Um einen Überblick über mögliche Angriffspunkte zu erhalten, ist es sinnvoll, die Wirkmechanismen der etablierten antitrypanosomalen Medikamente (soweit bekannt) zu betrachten.

1. Bildung von reaktiven Metaboliten

Benznidazol ist ein 2-Nitroimidazol und seit mehr als 30 Jahren in klinischem Gebrauch (Khaw und Panosian 1995). Es wird angenommen, dass die Nitrogruppe des Moleküls im

Parasitenstoffwechsel, vermutlich durch die Trypanothionreduktase, reduziert wird (Harder et al 2001, Croft et al 1997) und die entstandenen Metabolite kovalent oder durch andere Interaktionen an parasitäre DNA, Proteine und Lipide binden (Diaz de Toranza et al 1998, Masana et al 1984). Der oxidative Stress, der durch Benznidazol in therapeutischen Dosen auch in Säugetierzellen ausgelöst wird, kann über eine Erhöhung entsprechender Biomarker in den Hepatozyten behandelte Ratten nachgewiesen werden (Pedrosa et al 2001). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass Benznidazol nicht nur über eine trypanozide, sondern auch über eine immunmodulierende Wirkung den Verlauf der Infektion mit *T. cruzi* günstig beeinflusst (Revelli et al 1999, Piaggio et al 2001, Piaggio, Roggero et al 2001).

Nifurtimox, ein Nitrofuran, ist das zweite Medikament der Wahl zur Behandlung der Chagas-Krankheit. Auch von dieser Substanz wird angenommen, dass sie durch metabolische Reduktion der Nitrogruppe aktiviert wird (Harder et al 2001, Croft et al 1997). Die entstehenden hochreaktiven Nitroanion-Radikale sollen dann mit Sauerstoff reagieren, wobei partiell reduzierte Sauerstoffmetabolite entstehen. Diese führen zur Abtötung der Parasiten, die aufgrund eines Mangels an Detoxifikationsmechanismen sensibler gegenüber Radikalen sind als der Wirtsorganismus (Croft et al 1997). Es wird vermutet, dass die Substanz nach ihrer Aktivierung die DNA der Parasiten alkyliert (Gutteridge 1993). Dies wird durch den elektronenmikroskopischen Nachweis von Chromatinveränderungen bei Nifurtimox-behandelten Epimastigoten gestützt (Mueglas-Serrano et al 2001). Nifurtimox soll zudem an Trypanothion binden (Löscher 2000) und die Trypanothionreduktase spezifisch hemmen (Gutteridge 1993). Die Bildung von reaktiven Nitroanion-Radikalen gilt auch die Ursache für die erhebliche Nebenwirkungsrate beider Präparate (Löscher 2000) sowie die in vitro gefundene Mutagenität der Substanzen (Castro und Diaz deToranzo 1988).

## 2. Hemmung der Nukleinsäuresynthese

An einer anderen Stelle im Parasitenstoffwechsel greift Allopurinol an. Das Medikament hat in mehreren kleinen Therapiestudien eine gewisse Effektivität gegen *T. cruzi* gezeigt (Sauerteig und Weinke 2000). Es fehlt jedoch eine größere randomisierte doppelblinde Studie, die eine bessere Einschätzung der Wirkung erlauben würde (Coura und de Castro 2002). Allopurinol wird im Parasitenstoffwechsel zu seinem Ribonukleotid-Äquivalent umgewandelt und hemmt so die Nukleinsäuresynthese. Da diese Konversion im menschlichen Organismus nicht stattfindet, ist die proliferationshemmende Wirkung spezifisch für die Protozoen (Gutteridge 1993).

## 3. Hemmung der endogenen Sterol-Biosynthese

Ein weiterer möglicher Angriffspunkt antitrypanosomaler Medikamente ist die Sterol-Biosynthese. *T. cruzi* benötigt spezifische Sterole und kann das Cholesterin des Wirtes nicht verwerten (Urbina 1999). Die zur Behandlung von Mykosen etablierten Sterolbiosyntheseinhibitoren, wie Ketoconazol und Itraconazol, erwiesen sich allerdings als zu schwach wirksam gegen *T. cruzi*, obwohl in Einzelfällen über Behandlungserfolge berichtet wurde (Croft et al 1997). Durch



Komplexierung herkömmlicher Azole mit Gold oder Kupfer konnte deren antitrypanosomale Wirksamkeit *in vitro* allerdings erheblich gesteigert werden; möglicherweise verhindert die Komplexbildung bestimmte Deaktivierungsprozesse (Navarro et al 2001). Es wird zudem über Erfolge *in vitro* und in der experimentellen Chemotherapie akut und chronisch *T. cruzi*-infizierter Mäuse mit neu entwickelten Azolderivaten berichtet (Urbina et al 1998, Urbina 1999, Urbina et al 2000). Die Azolderivate wirken über die Hemmung der C-14- $\alpha$ -Demethylase, ein bei Trypanosomen ebenso wie bei Sproß- und Hefepilzen wichtiges Enzym der Ergosterol-Biosynthese (Urbina et al 2000).

Ob Antidesmon und seine Derivate über einen der genannten Mechanismen wirkt und wenn ja, über welchen, ist noch unklar. Antidesmon und AdOMeb zeigten neben ihrer Wirkung auf *T. cruzi* schwache Wirksamkeit gegen *L. donovani*. Das könnte ein Hinweis dafür sein, dass eine intrazelluläre Vermehrung des Parasiten Voraussetzung für die Wirkung ist. Unterstützt wird diese Überlegung durch die Beobachtung, dass Antidesmon nicht auf *T. brucei rhodesiense* wirkte. Dieses humanpathogene Protozoon vermehrt sich im Gegensatz zu *T. cruzi* extrazellulär. Vergleicht man das Wirkungsspektrum von Antidesmon mit dem der oben beschriebenen Chemotherapeutika, gleicht es am ehesten dem von Benznidazol. Diese Substanz wirkt ebenfalls nur auf *T. cruzi*, während Nifurtimox auch Aktivität gegen *T. brucei*-Spezies besitzt (Harder et al 2001). Man sollte daher in weiterführenden Untersuchungen der Frage nachgehen, ob Antidesmon und AdOMeb auf ähnliche Weise wie Benznidazol wirken. Allerdings ist weder für Nifurtimox noch für Benznidazol eine Wirkung auf *L. donovani* bekannt (Harder et al 2001). Da Antidesmon eine völlig neue Wirkstoffgruppe repräsentiert, ist es denkbar, dass auch seine antiparasitäre Wirkungsweise auf einem völlig anderem Prinzip als dem der bisher angewandten Medikamente beruht. Dies würde einen entscheidenden Vorteil bei der Therapie von resistenten *T. cruzi*-Stämmen bedeuten. Diese sind häufig sowohl gegen Benznidazol als auch Nifurtimox resistent, was auf der ähnlichen Wirkungsweise der beiden Medikamente beruhen könnte (Filardi und Brener 1987).

#### *Selektivität*

Das Prinzip der selektiven Toxizität einer Substanz wurde von Ehrlich (1911) eingeführt: „Es sind also nur Substanzen chemotherapeutisch zu verwenden, bei denen die Heildose einen möglichst kleinen Bruchteil der Dosis toxica darstellt.“ Diese Voraussetzung wurde bei Antidesmon und AdOMeb *in vitro* geprüft. Der Selektivitätsindex (IC50-Wert für Säugetierzellen/ IC50-Wert für Parasiten) betrug 8900 für AdOMeb und 1600 für Antidesmon. Die Selektivitätsindices für AdOL und AdAc lagen deutlich niedriger. Für die antitrypanosomalen Chemotherapeutika Suramin und Melarsoprol wurde der Selektivitätsindex unter vergleichbaren Bedingungen mit 20 000 (Suramin) und 2000 (Melarsoprol) bestimmt (Kaminsky et al 1996). Da Antidesmon und AdOMeb erst bei einem Tausendfachen der trypanosomenwirksamen Konzentration das Säugetierzellwachstum hemmen, ist die selektive Wirkung dieser Substanzen auf *T. cruzi* möglicherweise ausreichend für

einen Einsatz in der klinischen Therapie. Einen weiteren Hinweis auf die selektive Wirkung von Antidesmon gab die Beobachtung, dass Antidesmon in Tests mit verwandten Erregern und verschiedenen humanen Zelllinien keine annähernd so stark antiproliferative Wirkung wie auf *T. cruzi* zeigte.

Die Toxizität von Antidesmon *in vitro* im Vergleich mit Benznidazol deutlich höher, jedoch geringer als die von Mefloquin. Man muß hier bedenken, dass Antidesmon und AdOMeb Vertreter einer völlig neuen Wirkstoffgruppe sind. Durch Derivatisierung könnte durch Reduzierung einer toxischen Wirkung die Selektivität weiter erhöht werden, wie dies bereits mit AdOMeb gelungen ist.

#### *Mechanismen selektiver Wirkung*

Worauf die hochselektive Wirkung von Antidesmon und AdOMeb auf *T. cruzi* beruht, ist unklar. Folgende Mechanismen von selektiver Wirkung antiparasitärer Medikamente sind bekannt (nach Gutteridge 1993):

1. Aufnahme bzw. Sekretion sind in Wirtszelle und Parasit unterschiedlich.

Zahlreiche Antimalariamittel sind beispielsweise im Parasiten hundertfach höher konzentriert als im Plasma. Die Selektivität wird hier offenbar durch fehlende Konzentrationsmechanismen im Wirtsorganismus bedingt (Gutteridge 1993).

2. Die Substanz wird nur im Parasiten aktiviert.

Dies ist, wie oben beschrieben, die Ursache für die selektive Wirkung von Allopurinol, Benznidazol und Nifurtimox auf *T. cruzi*. Da Antidesmon, wie oben erwähnt, das gleiche Wirkungsspektrum aufweist wie Benznidazol, wäre es denkbar, dass dieser Mechanismus auch auf Antidesmon zutrifft.

3. Das biochemische Target der Substanz existiert nur im Parasiten

Dies trifft unter anderem auf das antitrypanosomale Chemotherapeutikum Suramin zu, das vermutlich die  $\alpha$ -Glycerophosphatoxidase hemmt, ein glykosomales Enzym, für das es beim Menschen keine Entsprechung gibt (Cox 1993). Diese Substanz wirkt allerdings bei *T. cruzi* nur schwach.

4. Das biochemische Target der Substanz ist in Parasit und Wirt unterschiedlich

So hemmt Eflornithin auch beim Menschen die Ornithindecaboxylase, doch durch höheren Umsatz des menschlichen Enzyms im Vergleich zum trypanosomalen Homologen wird die Blockade umgangen (Gutteridge 1993).

5. Das biochemische Target der Substanz ist für die Lebensfähigkeit des Parasiten wichtiger als für die des Wirtes

Von Melarsoprol, das gegen *T. b. gambiense* und *rhodesiense* wirkt, wird angenommen, dass es die Glykolyse hemmt (Khaw und Panosian 1995). Die selektive Wirkung wird dadurch erklärt, dass die afrikanischen Trypanosomen von einer sehr viel höheren Glykolyserate als bei der

Säugetierzelle abhängig sind, u.a. weil die glykosomalen Enzyme Pyruvat nicht weiter verstoffwechseln können (Bryant 1993).

Durch die bisher durchgeführten Untersuchungen kann die Ursache der selektiven Wirkung von Antidesmon und AdOMeb nicht eruiert werden. Auch bei zahlreichen etablierten Medikamenten ist dieser Mechanismus nicht bekannt. Eine Aufdeckung der Mechanismen, die die selektive Wirkung von Antidesmon und AdOMeb bedingen, wäre auch von praktischem Nutzen. Durch gezielte Derivatisierungen könnte die Selektivität für das parasitäre Target weiter erhöht werden, wie z. B. bei Nifurtimox geschehen (Cox 1993).

#### *Medizinische Bedeutung*

Antidesmon und AdOMeb stellen die ersten Vertreter einer neuen antiparasitären Wirkstoffgruppe dar. Die beiden Substanzen wirken *in vitro* um ein Vielfaches stärker gegen *T. cruzi* als das etablierte Medikament Benznidazol. Die Wirkung ist selektiv und die Toxizität der beiden Substanzen relativ gering, so dass sie für die Phase I der klinischen Prüfung geeignet erscheinen. Zwei weitere Wirkstoffe, AdAc und AdOL, wirken ebenfalls stärker als Benznidazol, weisen jedoch eine geringere Selektivität auf. 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. Derzeit erfolgen Kooperationsgespräche mit pharmazeutischen Firmen zwecks Durchführung weiterer *In-vivo*-Versuche. Für die Bioaktivität von Antidesmon und seinen Derivaten wurde in Deutschland und international ein Patent erteilt (Adam, Buske, Häring und Kekulé 2004). Die in der vorliegenden Arbeit erstmals beschriebenen Wirkstoffe können die Grundlage zur Entwicklung neuer, dringlich benötigter Medikamente gegen die Chagas-Krankheit sein.