

Aus dem
Institut für Medizinische Mikrobiologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. Dr. A.S. Kekulé

**Neue antiparasitäre Substanzen
mit Wirkung auf humanpathogene Protozoen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Anke Häring
geboren am 10.06.1974 in Hagen/ Westfalen

Gutachter:

1. Prof. Dr. A. Kekulé
2. Prof. Dr. Ockert
3. Prof. Dr. Rodloff (Leipzig)

eingereicht am: 18.05.2004, verteidigt am: 10.02.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000008513

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008513>]

Kurzreferat

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Antidesmon, einem neuartigen pflanzlichen Alkaloid, auf humanpathogene Protozoen *in vitro* getestet. Dabei wurde eine bisher unbekannte Wirkung auf *Trypanosoma cruzi*, den Erreger der Chagas-Krankheit, gefunden. Antidesmon war gegen *T. cruzi* wirksamer als das Standardmedikament Benznidazol. Der IC50-Wert (der die Substanzkonzentration angibt, bei der das Parasitenwachstum auf die Hälfte reduziert wird) betrug 0,04 µg/ml für Antidesmon und 0,6 µg/ml für Benznidazol. Antidesmon zeigte keine wesentliche Wirkung *in vitro* gegen zwei andere pathogene Trypanosomenspezies, *T. brucei rhodesiense* und *T. evansi*. Die Bioaktivität des Antidesmons ist für *T. cruzi* spezifisch. Um diese für einen Naturstoff ungewöhnlich hohe Aktivität genauer zu untersuchen, wurden sieben neu synthetisierte Antidesmon-Derivate sowie zwei natürliche Derivate vergleichend mit Antidesmon und einer Referenzsubstanz auf ihre Aktivität untersucht. Das Derivat AdOMeb wirkte in einer 90fach niedrigeren Konzentration als Benznidazol auf *T. cruzi* und übertraf mit einem IC50-Wert von 0,007 µg/ml die Wirksamkeit der Muttersubstanz Antidesmon. Zwei weitere Derivate, AdOL und AdAc, wirkten ebenfalls in niedrigerer Konzentration als Benznidazol. Es konnte ausgeschlossen werden, daß die Aktivität der Substanzen auf einer Schädigung der murinen Wirtszellen der Parasiten beruht. Für Antidesmon und AdOMeb ergaben sich hohe Werte für den Selektivitätsindex, ein Hinweis auf eine spezifische antiparasitäre Wirkung. Gegen *Leishmania donovani*, einen Erreger der viszeralen Leishmaniose, zeigten lediglich Antidesmon und AdOMeb schwache Wirksamkeit. Die Zytotoxizitätsprüfung mit den Wirtszellen der Leishmanien ergab, dass die Wirkung von Antidesmon auf diese Parasiten eher auf allgemeiner als auf spezifischer Toxizität beruht; bei AdOMeb dagegen ist eine spezifische Aktivität anzunehmen. Keine der Testsubstanzen erwies sich als aktiv gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum*. Im Zytotoxizitätstest mit humanen und murinen Zelllinien lag die Toxizität von Antidesmon zwischen der für Benznidazol und Mefloquin. 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.

Weltweit sind etwa 16-18 Millionen Menschen mit *T. cruzi* infiziert. Bis heute existiert keine befriedigende Therapiemöglichkeit für die Chagaskrankheit. Mit Antidesmon wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Leitstruktur zur Entwicklung dringend benötigter Medikamente gegen *T. cruzi* gefunden. Der Wirkungsmechanismus von Antidesmon ist noch unklar, da es sich um eine neue Substanzklasse mit antiparasitärer Wirkung handelt. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Aktivität des Alkaloids spezifisch für *T. cruzi* ist und nicht auf allgemeiner Toxizität beruht. Durch N-Methylierung am ersten Ring des Bicyclus konnte die Wirksamkeit der Muttersubstanz um das Fünffache gesteigert werden; gleichzeitig verringerte sich die Toxizität für Säugetierzellen. Für die antiparasitäre Wirkung von Antidesmon und seinen Derivaten wurde in Deutschland und international ein Patent erteilt.

Bibliographische Angaben

Häring, Anke: Neue antiparasitäre Substanzen mit Wirkung auf humanpathogene Protozoen
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2004

Gliederung

	Seite
1 Einleitung und Zielstellung	1
1.1 Charakterisierung der untersuchten Substanz: Antidesmon	1
1.2 Charakterisierung der untersuchten Krankheitserreger	3
1.2.1 Familie der <i>Trypanosomatidae</i>	4
1.2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.2.3 <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	8
1.2.4 <i>Trypanosoma evansi</i>	9
1.2.5 <i>Leishmania donovani</i>	10
1.2.6 <i>Plasmodium falciparum</i>	11
2 Ergebnisse	12
2.1 Validierung der Testmethoden	12
2.1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
2.1.2 <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> und <i>Trypanosoma evansi</i>	13
2.1.3 <i>Leishmania donovani</i>	14
2.1.4 <i>Plasmodium falciparum</i>	14
2.1.5 Zytotoxizitätstests	17
2.2 Bioaktivitätsuntersuchungen	17
2.2.1 Wirkung von Antidesmon auf <i>T. cruzi</i>	18
2.2.2 Wirkung von Antidesmon auf <i>T. b. rhodesiense</i> und <i>T. evansi</i>	20
2.2.3 Synthese und Struktur der Antidesmon-Derivate	23
2.2.4 Wirkung der Antidesmon-Derivate auf <i>T. cruzi</i>	25
2.2.5 Selektivitätsindices von Antidesmon und seinen Derivaten für <i>T. cruzi</i>	34
2.2.6 Wirkung von Antidesmon und seinen Derivaten auf <i>L. donovani</i>	36
2.2.7 Selektivitätsindices von Antidesmon und seinen Derivaten für <i>L. donovani</i>	41
2.2.8 Wirkung von Antidesmon und seinen Derivaten auf <i>P. falciparum</i>	43
2.2.9 Toxizitätsprüfung von Antidesmon <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	46
3 Material und Methoden	50
3.1 Protozoen und Zelllinien	50
3.2 Materialien	50
3.2.1 Medien	52
3.2.2 Weitere Lösungen	53
3.2.3 Testsubstanz-Stammlösungen	54

3.3	Testmethoden	54
3.3.1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	54
3.3.2	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> und <i>Trypanosoma evansi</i>	55
3.3.3	<i>Leishmania donovani</i>	56
3.3.4	<i>Plasmodium falciparum</i>	57
3.3.5	Toxizitätsprüfung <i>in vitro</i>	58
3.3.6	Toxizitätsprüfung <i>in vivo</i>	59
3.3.7	Berechnung der IC50-Werte und statistische Auswertung	60
4	Diskussion	61
5	Zusammenfassung	72
6	Literatur	73
7	Thesen	80

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Anfangskonzentration
IC50	50% inhibitorische Konzentration
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Konz.	Konzentration
<i>L. donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i>
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuche
n.e.	nicht ermittelbar
n.u.	nicht untersucht
%NIZ	% nichtinfizierte Zellen
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
SI	Selektivitätsindex
STI	Schweizer Tropeninstitut
<i>T. b. rhodesiense</i>	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. evansi</i>	<i>Trypanosoma evansi</i>
TR	Trypanothionreduktase
σ	Standardabweichung

Für Thomas

1 Einleitung und Zielstellung

Erkrankungen durch parasitische Protozoen sind weltweit eine der größten Gesundheitsgefahren. Mehr als eine Million Menschen starben 1999 an Malaria, etwa 16-18 Millionen Menschen sind mit *Trypanosoma cruzi*, dem Erreger der Chagas-Krankheit, infiziert. Etwa 140 000 Todesfälle pro Jahr sind auf Infektionen durch Leishmanien und Trypanosomen zurückzuführen (World Health Report 2000). Die Therapiemöglichkeiten für diese Infektionen sind äußerst unbefriedigend: Die Medikamente haben schwere Nebenwirkungen und sind bei vielen Patienten nicht effektiv, oder sie sind zu teuer zum Einsatz in den betroffenen Ländern. Deshalb besteht ein dringender Bedarf an neuen Wirkstoffen (Harder 2001). Dennoch waren unter 1223 Medikamenten, die zwischen 1975 und 1996 auf dem Markt kamen, lediglich drei gegen die erwähnten parasitären Protozoen gerichtet (WHO/TDR 2000). Naturstoffe aus Pflanzen gelten als wichtige Quelle bei der Suche nach neuen antiparasitären Wirkstoffen (Willcox et al 2001). Die beiden größten Gruppen der Antimalariamittel leiten sich von pflanzlichen Produkten ab (Chinin aus *Cinchona species* und Artemisinin aus *Artemisia annua*).

Ziel dieser Arbeit war es, das neu entdeckte pflanzliche Alkaloid Antidesmon auf seine Aktivität gegen parasitische Protozoen und seine Toxizität auf Säugetierzellen zu testen. Bei guter Wirksamkeit und geringer Toxizität wäre eine neue Leitsubstanz für dringlich benötigte antiparasitäre Medikamente gefunden.

1.1 Charakterisierung der untersuchten Substanz: Antidesmon

Entdeckung und Strukturaufklärung

Antidesmon, ein neuartiges pflanzliches Alkaloid, wurde 1996 am Institut für Pflanzenbiochemie Halle/ Saale entdeckt. Im Rahmen einer Diplomarbeit wurden Naturstoffe aus Wurzeln und Blättern von *Antidesma membranaceum*, einer afrikanischen Pflanze, untersucht (Buske 1996). Unter den isolierten Reinsubstanzen fand sich neben bekannten Sekundärmetaboliten des Pflanzenstoffwechsels eine Substanz mit ungewöhnlicher Struktur, die den Trivialnamen Antidesmon erhielt (Buske et al. 1999). Durch genauere Untersuchung mit spektroskopischen Methoden und Derivatisierungen wurde die Struktur als 3-Methoxy-2-methyl-5-*n*-octyl-1,5,6,7-tetrahydro-chinolin-4,8-dion aufgeklärt (Bringmann et al. 2000, Abb.1).

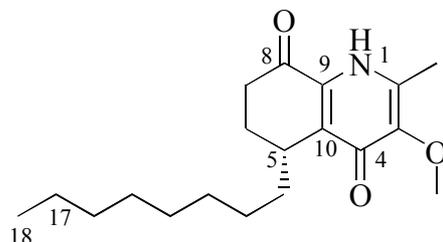


Abbildung 1: Struktur von Antidesmon

Vorkommen und Isolierung

Das in dieser Arbeit zur Testung verwendete Antidesmon wurde aus *Antidesma membranaceum* Müll. Arg. und *Antidesma venosum* E. Mey isoliert. Die Pflanzen kommen im äquatorialen Afrika

vor, wo sie als Sträucher oder bis 20 m hohe Bäume wachsen (Abb. 2). Antidesmon kann in allen Pflanzenteilen in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen werden. Außer in den zwei genannten wurde Antidesmon in zehn weiteren *Antidesma*-Arten und zwei Arten verwandter Gattungen gefunden (Buske 2000). Es sind eine Reihe von volksmedizinischen Anwendungen von *Antidesma*-Arten in Südostasien bekannt, die jedoch lokal beschränkt und in ihrer Zubereitung und Anwendung sehr heterogen sind, so dass sich kein eindeutiges Wirkprinzip zuordnen lässt (Perry 1980). Aus Ostafrika sind keine volksmedizinischen Anwendungen bekannt (Chhabra et al. 1990). Blattmaterial von *Antidesma bunius* wurde in der europäischen Medizin als Diaphoretikum benutzt (Hoppe, 1958). Mittlerweile wurde der Biosyntheseweg des Antidesmons in der Pflanze aufgeklärt (Bringmann, Rischer et al., 2000).



Abbildung 2: *Antidesma venosum* (Abbildung: Dr. A. Buske)

Antidesmon zählt zu den so genannten Sekundärmetaboliten. So werden niedermolekulare Produkte des Sekundärstoffwechsels ($MW < 1500$) in Pflanzen und niederen Organismen bezeichnet (Steglich 1997). Sie haben keine Bedeutung für den Energiestoffwechsel oder den Aufbau von Stützgewebe, sondern übernehmen Aufgaben, für die den Pflanzen spezielle Organe fehlen, oder entstehen im Metabolismus von Produkten des Primärstoffwechsels (Harborne 1995).

Es sind bisher nur drei weitere Substanzen mit dem Antidesmon zugrunde liegenden 5,6,7,8-Tetrahydrochinolin-Bicyclus bekannt (Tinto et al. 1991; Alves et al. 1999). Diese wurden in Pflanzen der Gattung *Hyeronima* gefunden, die den *Antidesma*-Arten nahe verwandt ist (Webster 1994). Eine der Substanzen erwies als identisch mit Antidesmon, die andere als Struktur analogon mit verkürzter Seitenkette (Buske 2000)

Um die für die biologische Testung notwendigen Mengen zu gewinnen, wurde das Isolationsverfahren optimiert (Buske 2000). Die Prüfung der so erhaltenen Reinsubstanz erfolgte mit HPLC (high performance liquid chromatography) und spektroskopischen Methoden (Buske 2000). Die Ausbeute mit dieser Methode beträgt etwa 40 mg Antidesmon pro kg getrocknetem Blattmaterial (Buske 2000).

Bioaktivität

Eine der wichtigsten Anwendungen der Naturstoffchemie ist die Suche nach Leitstrukturen für die Pharmazie. Etwa 40% aller Arzneimittel leiten sich von Naturstoffen ab (Falbe 1998). Es stellte sich die Frage, ob das neuartige Alkaloid Antidesmon eine Aktivität gegen Krankheitserreger besitzt. Auf der Suche nach strukturähnlichen Substanzen, deren Bioaktivität bekannt ist und die einen Hinweis auf mögliche Wirkungsart des Antidesmons geben könnten, wurde Melochinin (Abb. 3) gefunden, ein Naturstoff aus *Melochia pyraminata* (Medina et al. 1979). Die Substanz ist Ursache der oftmals tödlichen Rinderlähmung, die das weidende Vieh in mittelamerikanischen Ländern befällt, wenn dieses in der Trockenzeit Blätter der giftigen Pflanze frisst (Breuer 1981).

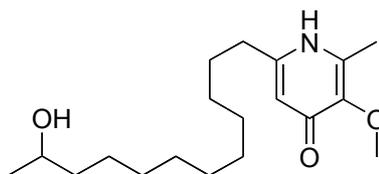


Abbildung 3: Struktur von Melochinin

Deferiprone (Abb. 4) ist eine weitere dem Antidesmon strukturverwandte Substanz, ein synthetischer Chelatbildner, der zur Therapie der Thalassämie und bei Schwermetallvergiftungen eingesetzt wird (Olivieri 1996). Deferiprone zeigt Aktivität gegen *Trypanosoma cruzi in vitro* (Jones 1996; Singh 1997).

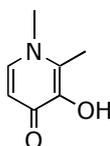


Abbildung 4: Struktur von Deferiprone (1,2-Dimethyl-3-hydroxy-4(1H)-pyridon)

1.2 Charakterisierung der untersuchten Krankheitserreger

Auswahl der untersuchten Krankheitserreger

Mit Deferiprone fand sich eine dem Antidesmon strukturverwandte Substanz, die eine antiparasitäre Aktivität gegen *T. cruzi* aufweist. Daher wurde Antidesmon in der vorliegenden Arbeit zunächst auf Aktivität gegen *T. cruzi* untersucht. Des Weiteren wurde die Wirkung auf zwei weitere Trypanosomenspezies, *T. brucei rhodesiense* und *T. evansi*, geprüft, sowie die Aktivität gegen *Leishmania donovani*, ein weiteres humanpathogenes Protozoon aus der Familie der

Trypanosomatidae. Zusätzlich wurde die Wirkung von Antidesmon auf *Plasmodium falciparum*, ein humanpathogenes Protozoon, das der Familie der Apicomplexa angehört, untersucht. Hierbei interessierte besonders der Aspekt, ob sich eine eventuelle Aktivität gegen *Trypanosomatidae* auch auf *Plasmodium* erstreckt.

1.2.1 Familie der *Trypanosomatidae*

Die *Trypanosomatidae* sind parasitische Protozoen (einzellige eukaryotische Lebewesen) und gehören zum Stamm der *Euglenozoa* und dem Unterstamm *Kinetoplasta*. Sie besitzen ein einzigartiges Organell, den Kinetoplasten, der mitochondriale DNA enthält (Lucius und Loos-Frank 1997). Die Fortbewegung der Parasiten erfolgt mit Hilfe eines Flagellums, dessen Ursprung in Nähe des Kinetoplasten liegt.

Die Parasiten unterliegen im Laufe ihres Lebenszyklus einem Formwandel, in dem der Kinetoplast-Flagellum-Komplex vom vorderen zum hinteren Ende der Zelle wandert. Damit gehen Veränderungen des mitochondrialen Systems der Parasiten einher, die Ausdruck ihrer Anpassung an unterschiedliche Wirte und Gewebe sind (Cox 1993). Zu der Familie der *Trypanosomatidae* gehören die Gattungen *Trypanosoma* und *Leishmania*. Allen gemeinsam ist ein Wirtswechsel zwischen Säugetier und Insekt. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Parasitenarten werden im Folgenden genauer charakterisiert.

1.2.2 *Trypanosoma cruzi*

Bedeutung

Trypanosoma cruzi verursacht die amerikanische Trypanosomiasis oder Chagas-Krankheit, so benannt nach Carlos Chagas, der die Krankheit 1909 in Brasilien erstmals beschrieb. Sie kommt endemisch in Süd- und Mittelamerika vor und ist dort von großer epidemiologischer Bedeutung. Die Anzahl der Infizierten wird auf 16-18 Millionen geschätzt, etwa 100 Millionen Menschen leben unter Infektionsrisiko (WHO 2001). *T. cruzi* wird durch den Kot blutsaugender Raubwanzen übertragen. Die Infektion ist eine Zoonose und der Mensch als Wirt im Lebenszyklus der Parasiten nicht notwendig. Eine Infektion von Menschen in größerem Umfang wurde erst möglich, als Siedler in Südamerika einzogen (v. Kirchhoff 1995). Die nachtaktiven Raubwanzen adaptierten sich an das Leben in Ritzen einfacher Behausungen, möglicherweise, weil ihr natürlicher Lebensraum durch Abholzung eingeschränkt wurde (Knobloch 1996) Daher ist die Chagas-Krankheit vor allem ein Problem armer Menschen in ländlichen Gegenden. Die Trypanosomen werden aber auch durch Bluttransfusionen, Transplantationen, intrauterine Infektion oder Verletzungen in Diagnostiklaboren übertragen (v. Kirchhoff 1995). Benannt wurde der Parasit nach dem brasilianischen Arzt Dr. Oswaldo Cruz, dem es erstmals gelang, die Parasiten auf Affen zu übertragen und in ihrem Blut nachzuweisen (Sauerteig und Weinke 2000).

Chagas-Krankheit

Bei der menschlichen Infektion mit *T. cruzi* unterscheidet man drei Phasen: die akute, die intermediäre oder indeterminierte und die chronische Phase. In der Mehrzahl der Fälle dringen die

Parasiten in der Umgebung des Auges ein, was zum charakteristischen Romaña- Syndrom führt (Konjunktivitis, Ödem der Augenlider, Schwellung der regionalen Lymphknoten). Ist die Inokulationsstelle an anderen Körperpartien, kann dort die Bildung eines Hautknötchens („Chagom“) beobachtet werden (Sauerteig und Weinke 2000, Knobloch 1996). Die Symptome der akuten Krankheit sind uncharakteristisch: Fieber, Hepatosplenomegalie, Lymphknotenschwellungen und Ödeme. Sie werden vor allem bei Säuglingen und Kleinkindern beobachtet und sind in ihrer Ausprägung sehr unterschiedlich (WHO 1991). Die Mortalität erreicht in einigen Regionen 10% und mehr (Sauerteig und Weinke 2000). Komplikationen werden durch akute Myokarditis und Meningoenzephalitis verursacht (Knobloch 1996). In den meisten Fällen verschwinden die Symptome nach 4-8 Wochen (WHO 1991). Es folgt die intermediäre oder indetermierte Phase, die einer asymptomatisch persistierenden Infektion entspricht (Knobloch 1996). Sie dauert in der Regel 10-20 Jahre, in Einzelfällen länger. Nur bei etwa einem Drittel der Patienten finden sich Zeichen der chronischen Erkrankung (Sauerteig und Weinke 2000). Tierexperimentell fanden sich Hinweise auf starke Einflüsse der Geschlechts und des sozialen Ranges auf den Verlauf der Erkrankung (Schuster und Schaub 2001). Die häufigste und bedeutendste Veränderung ist eine dilatative Kardiomyopathie mit Arrhythmien und Reizleitungsstörungen. Pathologisches Substrat dieser Veränderungen ist eine chronische mikrofokale und disseminierte Myokarditis (Elizari-Marcelo 1999). Seltener findet sich die Bildung von Megaorganen, wie Megaösophagus und Megakolon, die vor allem in Brasilien vorkommt (Elizari-Marcelo 1999). Sie soll Folge einer Zerstörung der Ganglienzellen in den Meißner- und Auerbach-Plexus sein (Sauerteig und Weinke 2000). Auch Veränderungen des retinalen Pigmentepithels wurden beobachtet (Fröhlich et al 1997). Die Pathogenese der chronischen Krankheit ist weitgehend unklar. Es existieren verschiedene Erklärungsmodelle; das populärste erklärt die Schäden durch Autoimmunprozesse, da in geschädigten Geweben der Patienten histologisch meist keine Parasiten gefunden wurden. Diese Theorie wird seit langem kontrovers diskutiert, in letzter Zeit vor allem aufgrund der Tatsache, dass sich mit immunhistochemischen Methoden oft *T.-cruzi*-Antigen in solchen Geweben nachweisen lässt (Kierszenbaum 1999). Andere Modelle gehen von neuronalen Schäden während der akuten Infektion als Ursache der chronischen Krankheit aus oder erklären diese durch Mikrozirkulationsstörungen oder die Aktivierung von Eosinophilen und Neutrophilen durch die Parasiten (Kierszenbaum 1999). Die Diagnostik erfolgt in der akuten Phase durch direkten Parasitennachweis im peripheren Blut; verschiedene Anreicherungsverfahren erleichtern den Nachweis. Auch in Muskelbiopsien können die Parasiten nachgewiesen werden (Sauerteig und Weinke 2000). In der chronischen Phase werden ELISA und Immunofluoreszenz zum serologischen Nachweis angewandt. Die sicherste Methode, in der chronischen Phase einen Parasitennachweis zu führen, ist die von Brumpt 1914 entwickelte Xenodiagnose. Hierbei lässt man

(im Labor gezogene) Raubwanzen nymphen Blut des Patienten saugen und untersucht nach 1, 2 und 3 Monaten den Kot der Wanzen auf Parasitenausscheidung (Sauerteig und Weinke 2000).

Erreger

Durch Saugen von Blut eines infizierten Menschen oder Tieres nimmt die Raubwanze trypomastigote Formen von *T. cruzi* auf, die sich im Enddarm des Insekts als Epimastigote vermehren (Abb. 5). Mit dem Kot werden dann direkt nach einer Blutmahlzeit metazyklische Trypomastigote ausgeschieden, die durch den Stichkanal in das Gewebe des Wirts gelangen können, wenn dieser sich etwa an der Stichstelle kratzt (Lucius und Loos-Frank 1997). Die Erreger können auch durch andere Hautläsionen oder – nach Einreiben des Kots in die Konjunktiva – über die Mukosa in das Gewebe eindringen (Sauerteig und Weinke 2000). Die Parasiten lassen sich von Zellen des mononukleär- phagozytierenden Systems aufnehmen. Sie können auch bei Zellen, die eigentlich nicht zur Phagozytose befähigt sind, wie Muskel- und Nervenzellen, eine induzierte Phagozytose anregen. Die Parasiten zerstören nach kurzer Zeit die entstandene parasitophore Vakuole und liegen dann frei im Zytoplasma (Lucius und Loos-Frank 1997). Sie wandeln sich zu amastigoten Formen um und vermehren sich. Noch innerhalb der Zelle entwickeln sie sich zu Trypomastigoten, die mit dem Aufplatzen der Wirtszelle frei werden und ins Blut gelangen (Abb. 5). Anders als die afrikanischen Trypanosomen ist *T. cruzi* nicht zur Antigenvariation befähigt (Cox 1993). Daher werden die meisten Parasiten vom Immunsystem erkannt und eliminiert. Dennoch können etliche Trypomastigote überleben und weitere Zellen infizieren, da *T. cruzi* unter anderem ein komplementinhibierendes Protein (Knobloch 1996) sowie die Fähigkeit zur Immunglobulinspaltung besitzt (Cox 1993).

Therapie

Es stehen heute zwei spezifische Medikamente zur Behandlung der akuten Chagas- Krankheit zur Verfügung: Nifurtimox (Lampit), eingeführt 1965, und Benznidazol (Ragonil, Radanil) sind seit 1971 in klinischem Gebrauch (Croft et al 1997). Beide Medikamente sind toxisch und sollten zu Beginn der Therapie nur stationär verabreicht werden. Die Behandlungsdauer beträgt 50-60 Tage (Sauerteig und Weinke 2000). Unerwünschte gastrointestinale und neuropsychiatrische Nebenwirkungen bei der Therapie mit Nifurtimox sind häufig (30-70%). Die Produktion von Nifurtimox ist mittlerweile eingestellt worden (Croft et al 1997). Benznidazol soll die Parasitämie wirksamer beeinflussen als Nifurtimox und verträglicher sein. Dennoch treten auch hier in 10-70% Nebenwirkungen auf; häufig sind Übelkeit, Schwindel und periphere Polyneuropathie, zudem wurden im Tierversuch – wie auch für Nifurtimox – mutagene und embryotoxische Wirkungen festgestellt.

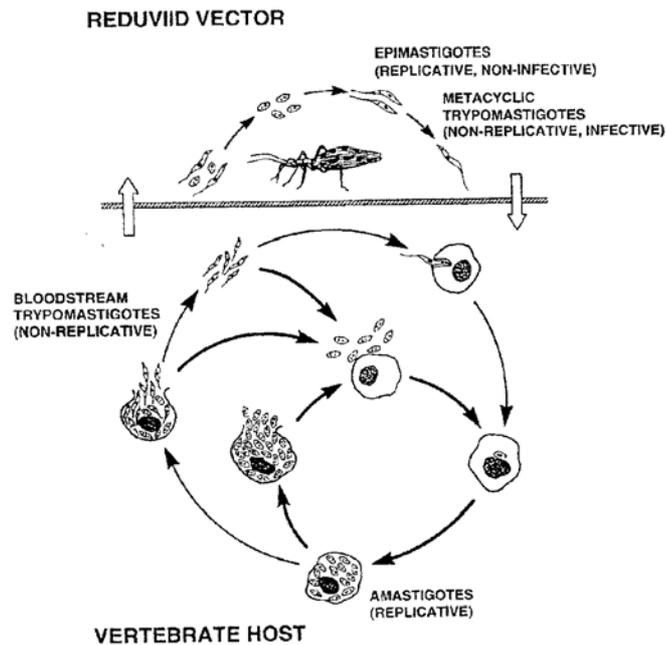


Abbildung 5 : Lebenszyklus von *T. cruzi* (aus Urbina 1999)

Durch die lange Behandlungsdauer, die häufigen und ernsten Nebenwirkungen und die relativ hohen Kosten der Medikamente ist die Therapiesituation schwierig. In der akuten Phase der Krankheit können Benznidazol und Nifurtimox die Mortalität senken; allerdings scheinen sie den Übergang in die chronische Phase nicht verhindern zu können (Muegler-Serrano et al 2002). In der chronischen Phase sind die Medikamente wenig effektiv; eine brasilianische Studie ergab, dass bei chronisch Infizierten die Parasitämie auch nach einer Therapie mit Nitroderivaten fortbestand (Braga et al 2000). Zudem wurde sowohl über natürlich vorkommende wie auch experimentell induzierbare Resistenzen gegen Nifurtimox und Benznidazol berichtet (Filardi und Brener 1987, Murta und Romanha AJ 1998). Es besteht daher dringender Bedarf für neue, effektive Medikamente (Amato Neto 1999). Nur wenige neue Substanzen sind seit der Einführung von Benznidazol und Nifurtimox zur Therapie chagaskranker Patienten erprobt worden (Abb. 6). Darunter hat Allopurinol in einigen kleinen Studien Effektivität gegen *T. cruzi* gezeigt (Croft et al 1997). Des Weiteren wurde über einzelne Fälle berichtet, in denen eine Therapie von Chagaskranken mit Ketoconazol, Itraconazol oder Fluconazol erfolgreich war (Coura und de Castro 2002)

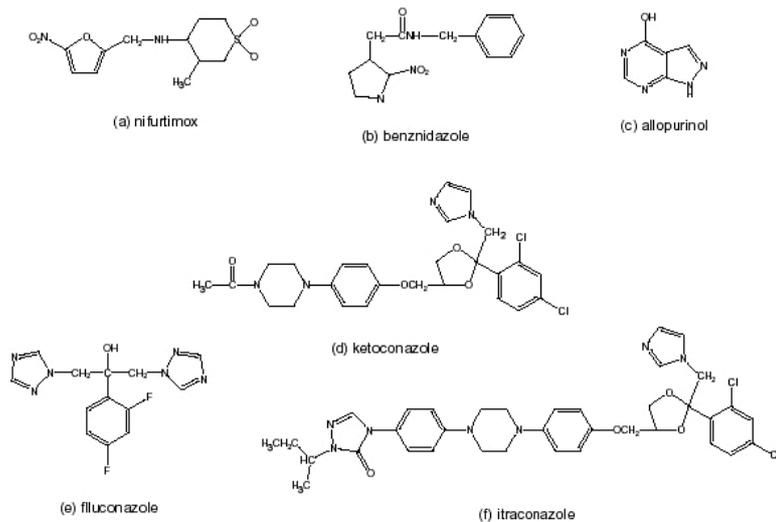


Abbildung 6: Medikamente, die zur Therapie der Chagas-Krankheit eingesetzt werden (aus Coura und de Castro 2002)

1.2.3 *Trypanosoma brucei rhodesiense*

Bedeutung

Trypanosoma brucei rhodesiense und *gambiense* verursachen die humane afrikanische Trypanosomiasis, auch „Schlafkrankheit“ genannt. Unbehandelt verläuft die Erkrankung in der Regel tödlich. Etwa 60 Millionen Menschen leben unter Infektionsrisiko. Das Verbreitungsgebiet der humanen afrikanischen Trypanosomiasis entspricht dem des einzigen Vektors, der Tsetsefliege der Gattung *Glossina*, und liegt im tropischen Afrika zwischen 14° nördlicher und 29° südlicher Breite (Brun et al 2000).

Humane Afrikanische Trypanosomiasis (Schlafkrankheit)

Infektionen mit *T. brucei rhodesiense* verlaufen meist akut mit klinischen Manifestationen innerhalb von Tagen bis wenigen Wochen. An der Eintrittsstelle bildet sich zunächst häufig eine rötlich-derbe Hautschwellung („Trypanosomenschanke“), gefolgt von der ersten Erkrankungsphase mit intermittierenden Fieberschüben und Lymphknotenschwellungen. In der zweiten Erkrankungsphase zeigen die Patienten die Symptome einer chronischen Enzephalitis mit neurologischen Ausfällen, Krampfanfällen und Schlafstörungen. Der Tod tritt oft durch interkurrente Infektionen und Mangelernährung ein (Knobloch 1996).

Erreger

Die metazyklischen Formen der Parasiten werden beim Saugakt der infizierten Tsetsefliege übertragen und breiten sich nach Vermehrung im Säugetierwirt nach wenigen Tagen hämatogen aus, bis sie schließlich das ZNS penetrieren. Sie leben extrazellulär in Blut, Liquor und interstitiellem Raum. Die Oberfläche der Parasiten ist mit einer einheitlichen Schicht eines Glykoproteins (VSG= variable surface glycoprotein) bedeckt, auf das der Wirtsorganismus mit Bildung spezifischer Antikörper reagiert, durch die die Erreger krisenhaft auf der Blutbahn

eliminiert werden. Regelmäßig überlebt jedoch eine Subpopulation der Trypanosomen, die genetisch determiniert mit einer neuen VSG-Variante ausgestattet ist, die vom Immunsystem zunächst nicht erkannt wird (Brun et al 2000).

Therapie

Im ersten Krankheitsstadium ist das Mittel der Wahl Suramin (Germanin), ein Naphtylamin, das intravenös appliziert werden muß. Nebenwirkungen sind Fieber, Übelkeit, Diarrhö und Stomatitis (Denise und Barrett 2001). Im zweiten Stadium der Erkrankung ist das Mittel der Wahl Melarsoprol (Arsobal), eine Kombination einer trivalenten Arsenverbindung mit dem Schmermetallchelator Dimercaprol in Propylenglycol (als Lösungsmittel), die 1949 zur antitrypanosomalen Therapie eingeführt wurde (Lang 2000). Die Substanz wird über einen spezifischen parasitären Purintransporter angereichert - dessen Fehlen bei bestimmten Parasitenstämmen zu Melarsoprolresistenz führt - und scheint irreversibel an Trypanothion zu binden und die Trypanothionreduktase zu hemmen (Lang 2000, Denise und Barrett 2001). 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. Die Therapie ist mit ernstesten Nebenwirkungen belastet; bei 2-10% der Behandelten kommt es zu einer Enzephalopathie, die oft zum Tod führt (Brun et al 2000).

1.2.4 *Trypanosoma evansi*

Bedeutung

T. evansi ist von Afrika über Vorder- bis nach Ostasien verbreitet und wurde in die Neue Welt eingeschleppt. Das Protozoon parasitiert bei vielen Arten von Huftieren und ruft dort die Surra hervor. Es kann aber auch Nagetiere und Carnivore befallen (Lucius und Loos-Frank 1997).

Erreger

T. evansi wird von Insekten übertragen, doch im es erfolgt keine Entwicklung im Insekt. Trypanosomen, die sich in Blutresten an den Mundwerkzeugen der Vektoren befinden (meist Stechfliegen), werden passiv mit dem Stich übertragen. Von manchen Autoren wird *T. evansi* als Unterart von *T. brucei* angesehen, die sich durch sekundäre Reduzierung der Insektenphase abgespalten hat (Lucius und Loos-Frank 1997). Manche Stämme haben den Kinetoplast und damit die Fähigkeit verloren, sich an Insektenbedingungen anzupassen.

Surra

Die Surra ist eine Erkrankung mit Fieber, zentralnervösen Störungen und extremer Abmagerung bei Pferden, Kamelen, Wasserbüffeln und Hunden. Bei Pferden kann rasch das ZNS befallen werden und zu fortschreitender Lähmung und schließlich zum Tod führen. Rinder und Schweine werden ebenfalls infiziert, entwickeln aber keine Symptome (Lucius und Loos-Frank 1997).

Therapie

Die Therapie erfolgt unter anderem mit Suramin, Quinapyramin oder Melarsoprol, wobei zunehmend Resistenzen bekannt werden (El Rayah 1999).

1.2.5 *Leishmania donovani*

Bedeutung

Leishmania donovani ist der Erreger der viszeralen Leishmaniose in Ostafrika, Indien und Nordostchina (Harms-Zwingenberger und Bienzle 2000). Jährlich werden weltweit etwa 500 000 neue Fälle von viszeraler Leishmaniose gemeldet (WHO 2000). Im Gegensatz zu den kutanen und mukokutanen Leishmaniosen verlaufen über 90% der manifesten Erkrankungen tödlich (Harms-Zwingenberger und Bienzle 2000).

Viszerale Leishmaniose (Kala-Azar)

Die meisten Leishmanieninfektionen bleiben inapparent, nur in etwa 10% der Fälle manifestiert sich die Erkrankung. Die Inkubationszeit beträgt in der Regel 3-6 Monate. Aufgrund des speziellen Tropismus der Erreger werden von der viszeralen Leishmaniose makrophagenreiche Organe wie Milz, Leber, Lymphknoten und Knochenmark besonders betroffen (Harms-Zwingenberger und Bienzle 2000). Die Hauptsymptome sind Fieber, Hepatosplenomegalie und progrediente Panzytopenie. Bei HIV-Infizierten entwickelt sich häufig ein atypisches klinisches Bild (Desjeux 1999). Im fortgeschrittenen Stadium entsteht charakteristischerweise durch Aussaat der Erreger in die Haut ein verändertes Hautkolorit, das zu der aus dem Hindi stammenden Bezeichnung Kala-Azar (schwarze Krankheit) führte. Häufigste Todesursachen sind durch die Leukopenie begünstigte Sekundärinfektionen und Hämorrhagien.

Erreger

Leishmanien werden durch Phlebotomen (Schmetterlingsmücken) übertragen, die in den Tropen und Subtropen weit verbreitet sind. Die Infektion kann jedoch auch durch Bluttransfusionen, Organtransplantationen und durch kontaminierte Injektionskanülen bei Drogensüchtigen erfolgen (Rajasekariah 2001). Die Phlebotomen nehmen bei der Blutmahlzeit amastigote, unbegeißelte Leishmanien aus Haut oder Blut der Wirtes auf; diese entwickeln sich zur promastigoten, begeißelten Form. Nach Inokulation werden die Promastigoten innerhalb von Minuten von Makrophagen oder Monozyten des Wirts phagozytiert und vermögen mittels komplexer Mechanismen zu überleben, nachdem das Phagosom mit Lysosomen fusioniert (Lucius und Loos-Frank 1997). Nach der etwa zwei Tage dauernden intrazellulären Replikation platzen die Wirtszellen und die freigesetzten Amastigoten werden erneut von Makrophagen bzw. Monozyten aufgenommen.

Therapie

Die Therapie der ersten Wahl sind seit über 50 Jahren die 5-wertigen Antimonpräparate Natriumstibogluconat (Pentostam) und Megluminantimoniat (Glucantime); beide Präparate müssen über mindestens 30 Tage parenteral verabreicht werden. Nebenwirkungen wie Übelkeit, Myalgien und Arthralgien sind bei den zur Behandlung notwendigen hohen Dosen häufig (80%). Die Wirkungsweise der Antimonpräparate ist unklar, doch Akkumulation und Retention der Präparate in Makrophagen gelten als wichtige Faktoren (Roberts et al 1995).

1.2.6 *Plasmodium falciparum*

Bedeutung

Malaria, hervorgerufen durch Protozoen der Gattung *Plasmodium*, gilt als eine der weltweit größten Gesundheitsgefahren mit etwa 500 Millionen Erkrankungsfällen pro Jahr. Wichtigster und gefährlichster Erreger ist *Plasmodium falciparum*, Erreger der *Malaria tropica* und nahezu allein verantwortlich für die Mortalität der Malaria, die derzeit mit jährlich 1,5-2,7 Millionen Todesfällen geschätzt wird (Phillips 2001). Die geographische Verbreitung der Erkrankung entspricht vor allem der des Vektors, der Anophelesmücke, in Afrika, Asien und Mittel- und Südamerika.

Malaria tropica

Die Inkubationszeit beträgt 8 bis 15 Tage. Das Fieber ist nach kurzer Initialphase hoch und in Gegensatz zu anderen Malariaformen selten periodisch. Die hohe Letalität wird bedingt durch zerebrale Malaria mit Krampfanfällen und neurologischen Ausfällen bis hin zum Koma sowie schwere hämolytische Anämie, Lungenödem, Niereninsuffizienz, Spontanblutungen, disseminierte intravaskuläre Koagulation und Hyperpyrexie (Eckert 1997).

Erreger

Plasmodium falciparum ist ein Protozoon der Gattung *Plasmodium* und gehört zu den *Apicomplexa*. Moskitos der Gattung *Anopheles* übertragen beim Stich die infektiösen Sporoziten. Sie gelangen in die Blutbahn des Wirtes, dringen in Leberzellen ein und wandeln sich zu Schizonten um, die bis zu 30 000 Merozoiten enthalten. Die Merozoiten wiederum infizieren nach ihrer Freisetzung in die Blutbahn Erythrozyten und führen damit zur Parasitämie. Nach Befall der Erythrozyten entwickeln sich die Merozoiten zu Ringformen, die bei *P. falciparum* das entscheidende diagnostische Kriterium darstellen. Die Parasiten reifen intraerythrozytär zu Schizonten heran, die sich in bis zu 32 Merozoiten teilen, welche nach Zerstörung der Wirtszelle ins Blutplasma freigesetzt werden, woraufhin sie weitere Erythrozyten befallen. Während bei anderen Plasmodienformen der Anteil der infizierten Erythrozyten meist auf unter 2% begrenzt ist, können von *P. falciparum* prinzipiell alle Erythrozyten befallen werden (Lang 2000).

Therapie

Die unkomplizierte *Malaria tropica* wird mit der Gabe von Chloroquin (Resochin) über drei Tage behandelt. Die Wirkungsweise dieses 4-Aminochinolins ist nicht genau bekannt, die Nebenwirkungen umfassen Übelkeit und Kopfschmerzen sowie Hypotonie; insgesamt ist die Toxizität bei therapeutischer Dosierung gering (Lang 2000). In den meisten Malariagebieten gibt es eine zunehmende Resistenzentwicklung von *P. falciparum*- Stämmen gegen Chloroquin (Löscher 2000). Bei vermuteter Chloroquinresistenz der Erreger wird mit Mefloquin (Lariam), Halofantrin (Halfan) oder einer Kombination von Atavaquon und Proguanil (Malarone) behandelt.

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).

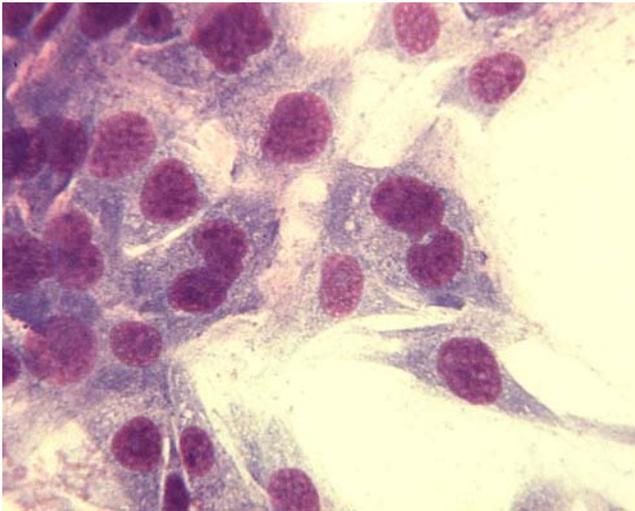


Abbildung 7:
Kultur von L6-Myofibroblasten
(Giemsa-Färbung, Vergrößerung 50fach)

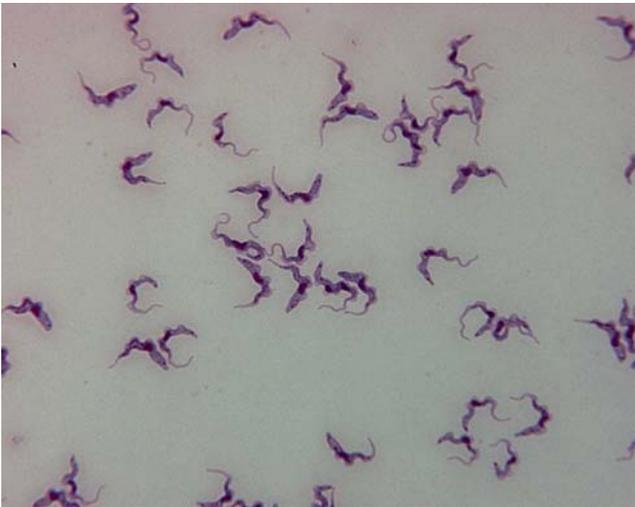


Abbildung 8:
***Trypanosoma brucei rhodesiense*, trypomastigote Form**
(Giemsa-Färbung, Vergrößerung 50fach)

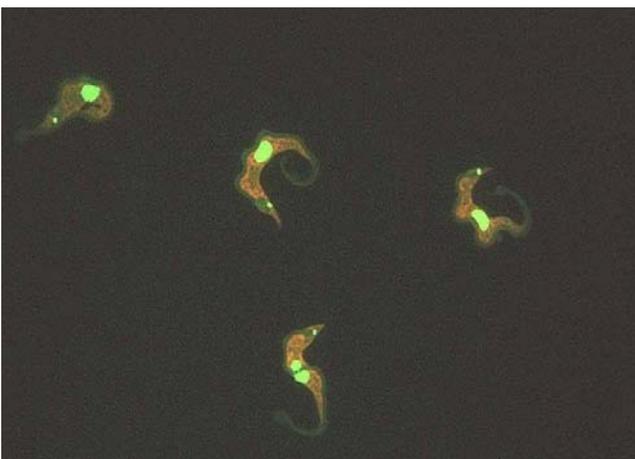


Abbildung 9:
***Trypanosoma evansi*, trypomastigote Form**
(Acridin-Orange-Färbung, Vergrößerung 100fach)
Der Farbstoff lässt DNA-haltige Zellbestandteile
(Zellkern und Kinetoplast) grün und das Zytoplasma
orange erscheinen

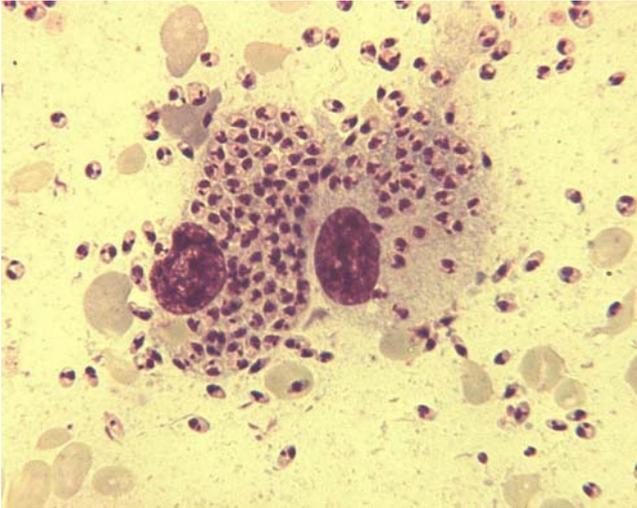


Abbildung 10:
Leishmania donovani, amastigote Form,
 intrazellulär in zwei Makrophagen und extrazellulär
 (Giemsa-Färbung, Vergrößerung 50fach)

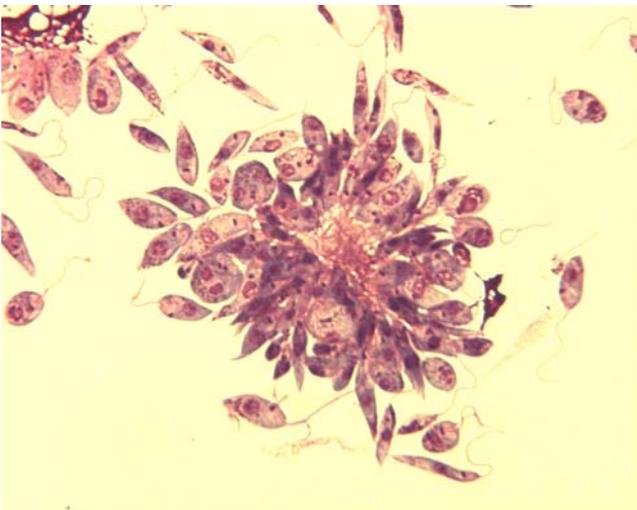


Abbildung 11:
Leishmania donovani, promastigote Form, in
 Kulturmedium (Giemsa-Färbung, Vergrößerung 100fach)

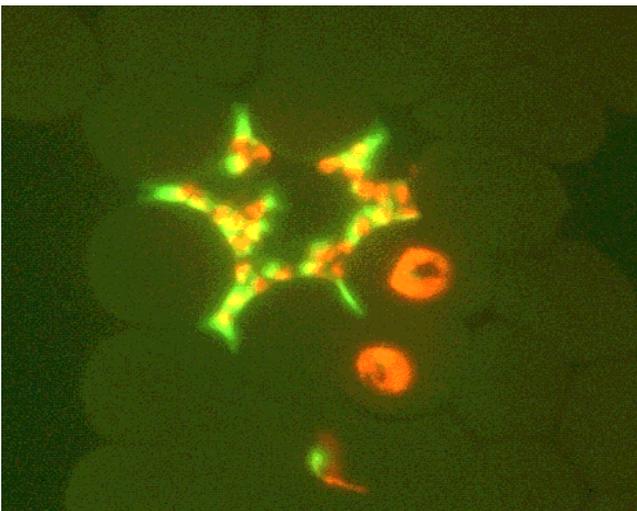


Abbildung 12:
Plasmodium-falciparum-befallene Erythrozyten im
 Kulturausstrich; charakteristische Ringform der
 intrazellulären Merozoiten, zwischen den
 Erythrozyten erkennt man freigesetzte Merozoiten
 (Acridin-Orange-Färbung, Vergrößerung 100fach)

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.

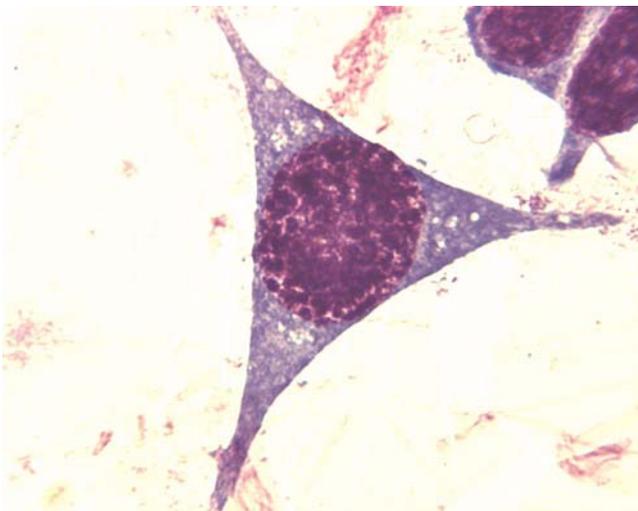


Abbildung 13:
NB2a- Zellen (murine Neuroblastomzellen),
Bildung von Zellausläufern als Zeichen der
Anhaftung (Giemsa-Färbung, Vergrößerung
100fach)
Abbildung: A. Häring

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)

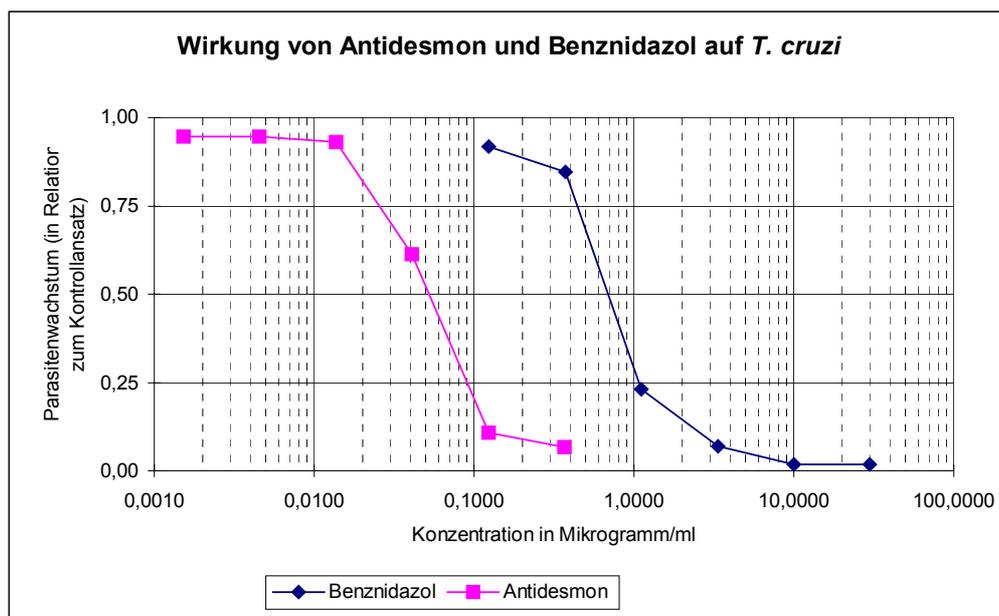


Abbildung 14: Vergleich der trypanoziden Wirkung von Antidesmon und Benznidazol, ermittelt im *T.-cruzi*-in-vitro-Assay (Tabelle 7). Die Höchstkonzentration von Antidesmon war 0,37, von Benznidazol 30 µg/ml; die Wirkung wird als prozentuales Wachstum im Vergleich zur Positivkontrolle angegeben.

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*.

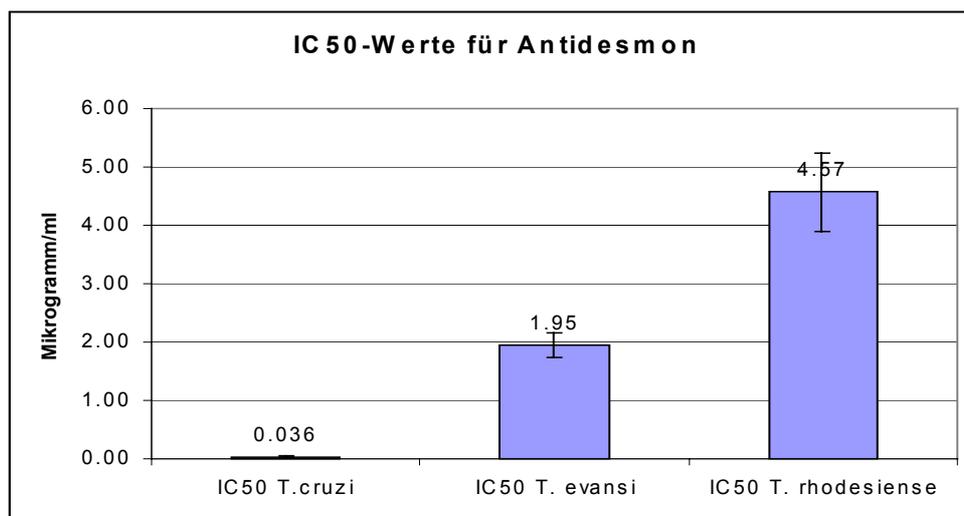


Abbildung 15: Vergleich der IC50-Werte für Antidesmon für verschiedene Trypanosomenspezies

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).

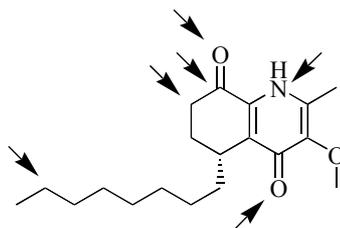


Abbildung 16: Derivatisierungspositionen bei Antidesmon

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.

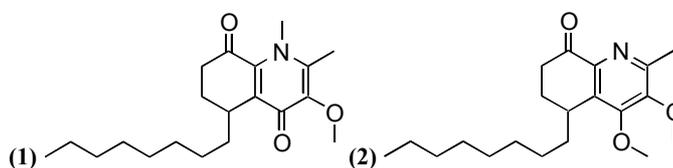


Abbildung 17: N-Methylantidesmon (AdOMeb,1); O-Methylantidesmon (AdOMec,2)

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

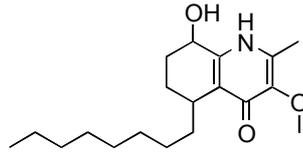


Abbildung 18: 8-Dihydroantidesmon (AdOL)

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.

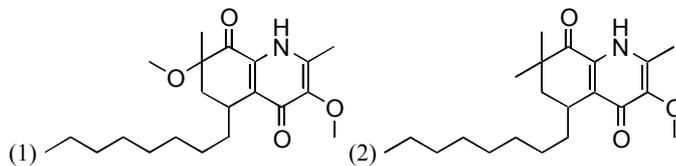


Abbildung 19: 7-Methoxy-7-methylantidesmon (AdNMea, 1); 7,7-Dimethylantidesmon (AdNMeb, 2)

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.

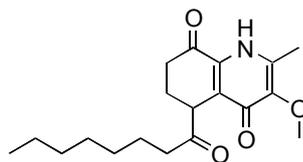


Abbildung 20: 13-Oxo-Antidesmon (AdAml)

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.

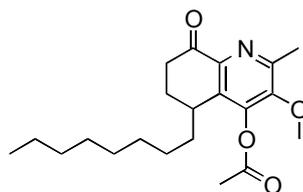


Abbildung 21: 4-O-Acetyl-Antidesmon (AdAc)

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.

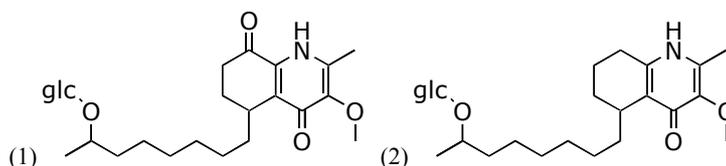


Abbildung 22: 17-Glucopyranosyloxy-Antidesmon (Ad-glc, 1), 8-Deoxo-17-glucopyranosyloxy-Antidesmon (DeoxoAd, 2)

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.

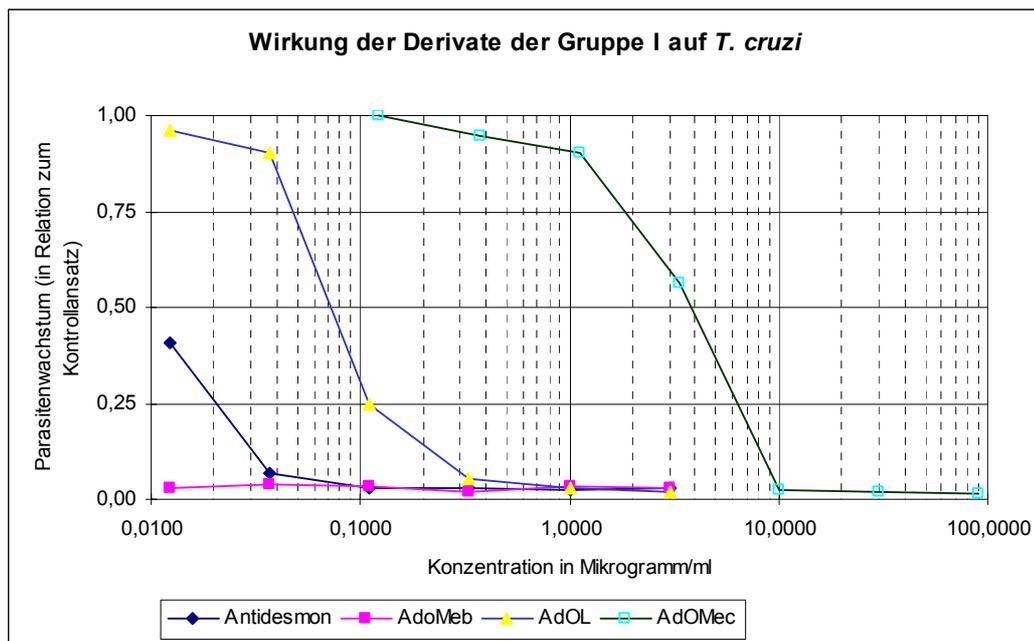


Abb. 23: Vergleich der antitrypanosomalen Wirkung der Derivate aus Gruppe I und Antidesmon (Daten für die Derivate aus Tabelle 11, für Antidesmon aus Tabelle 6)

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)

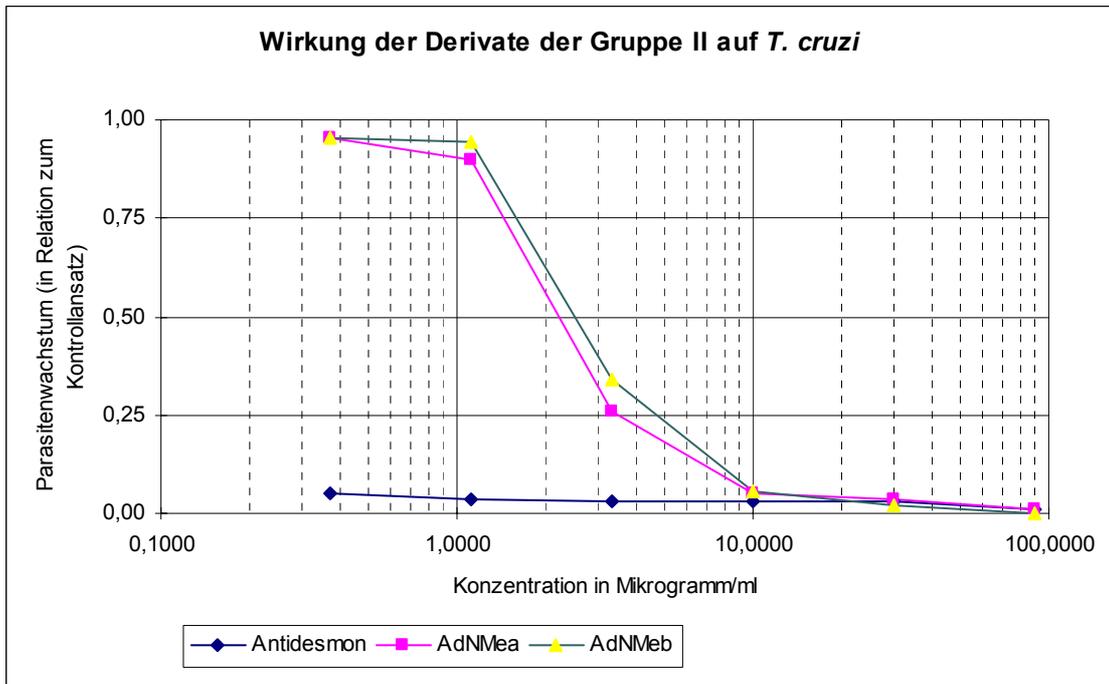


Abb. 24: Vergleich der antitrypanosomalen Wirkung der Derivate aus Gruppe II und Antidesmon (Daten für die Derivate aus Tabelle 12, für Antidesmon aus Tabelle 6)

	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)

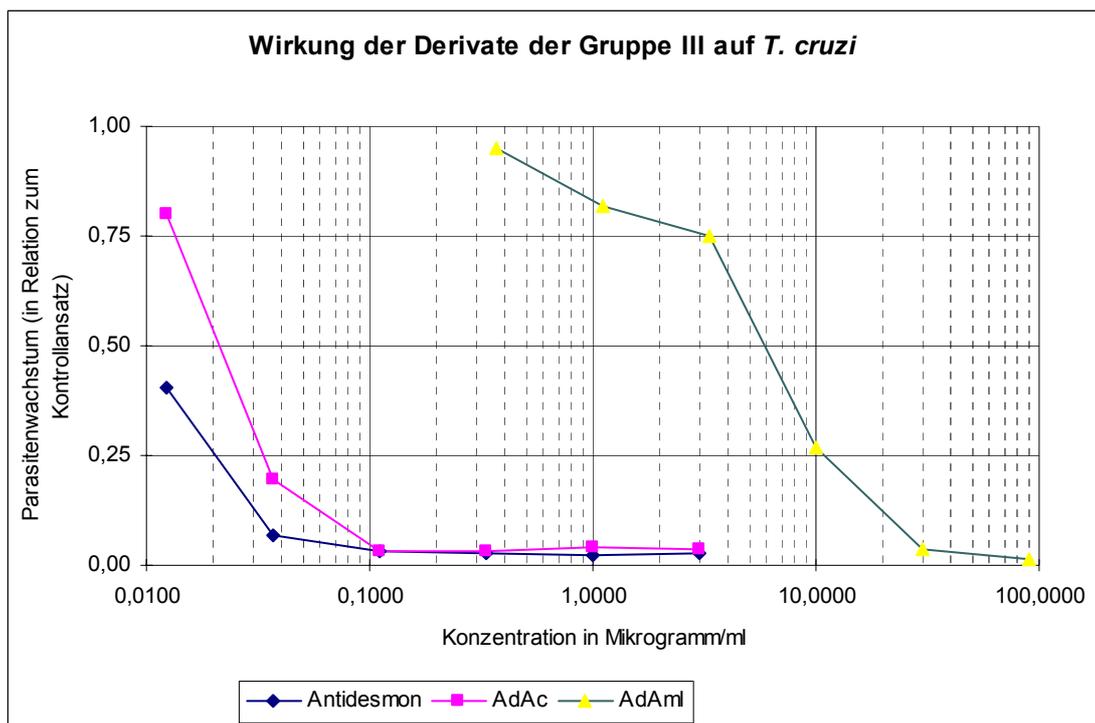


Abbildung 25: Vergleich der antitrypanosomalen Wirkung der Derivate aus Gruppe III mit Antidesmon (Daten für die Derivate aus Tabelle 13, für Antidesmon aus Tabelle 6)

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)

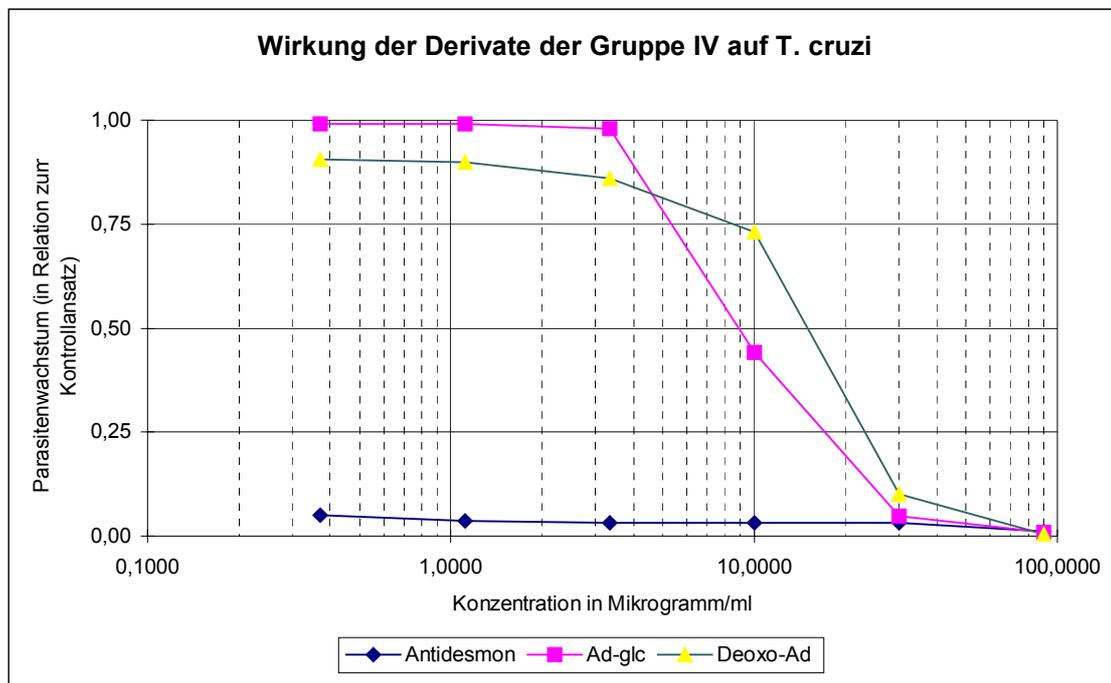


Abbildung 26: Vergleich der antitrypanosomalen Aktivität der Gruppe IV-Derivate mit Antidesmon (Daten für die Derivate aus Tabelle 14, für Antidesmon aus Tabelle 6)

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)

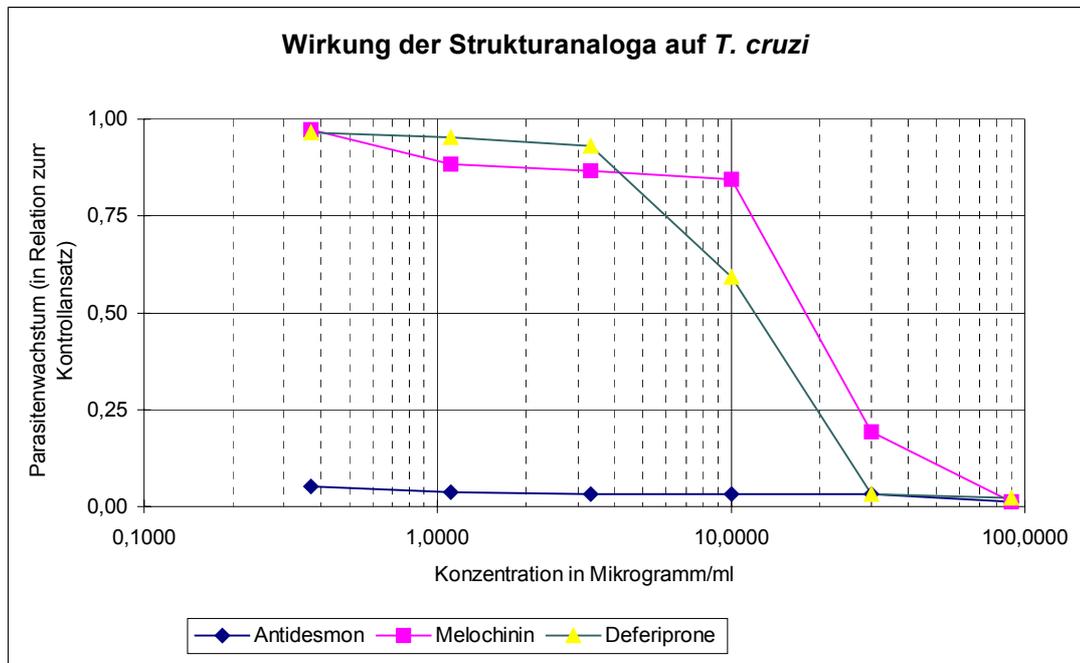


Abbildung 27: Vergleich der antitrypanosomalen Aktivität der Strukturanaloga mit Antidesmon (Daten für die Derivate aus Tabelle 15, für Antidesmon aus Tabelle 6)

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.

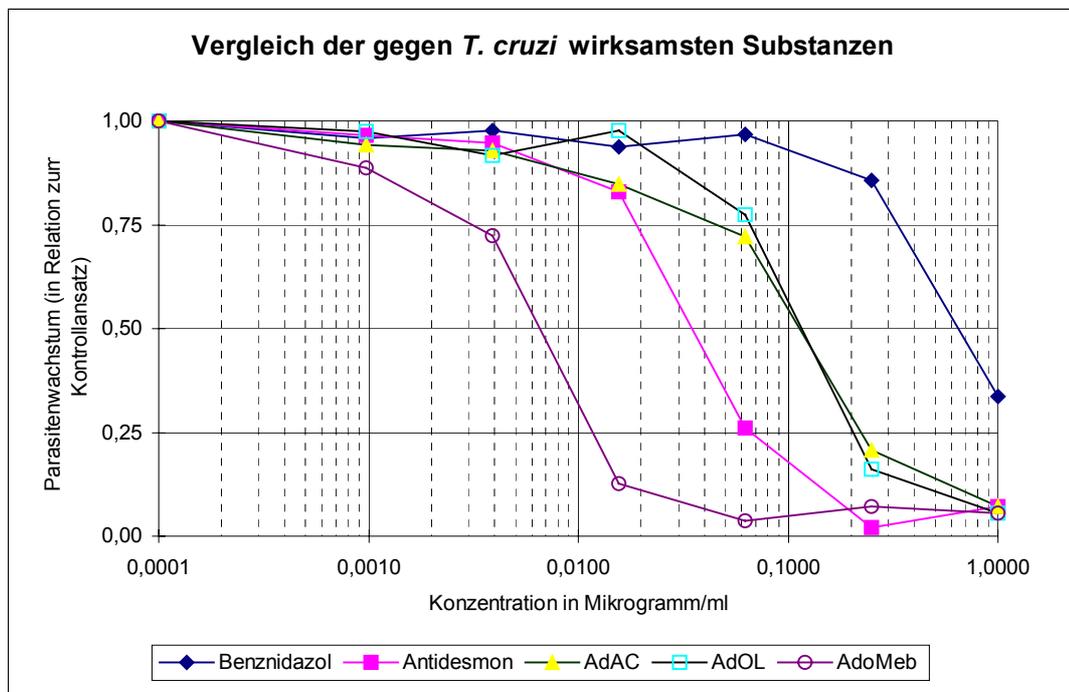


Abbildung 28: Vergleich der Substanzen, die die höchste Aktivität gegen *T. cruzi* zeigten (Daten aus Tabelle 16)

	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).

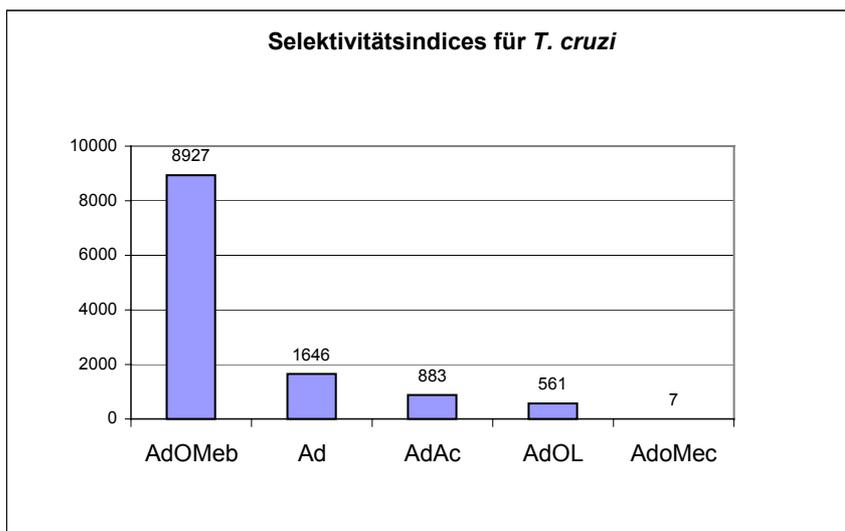


Abbildung 29: Selektivitätsindices der untersuchten Substanzen für *T. cruzi* (Erläuterung im Text)

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)

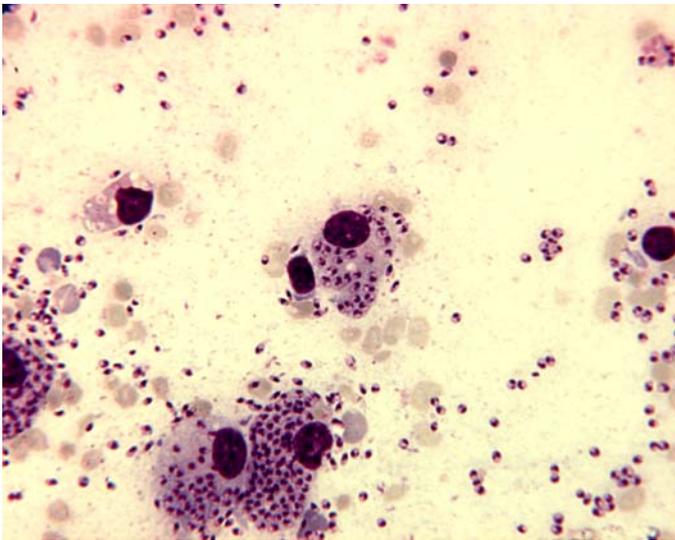


Abbildung 31 :
Kultur von *L.-donovani*-infizierten Makrophagen,
inkubiert mit Antidesmon; Konzentration 1,1 µg/ml
(Giemsa-Färbung, Vergrößerung 50fach)

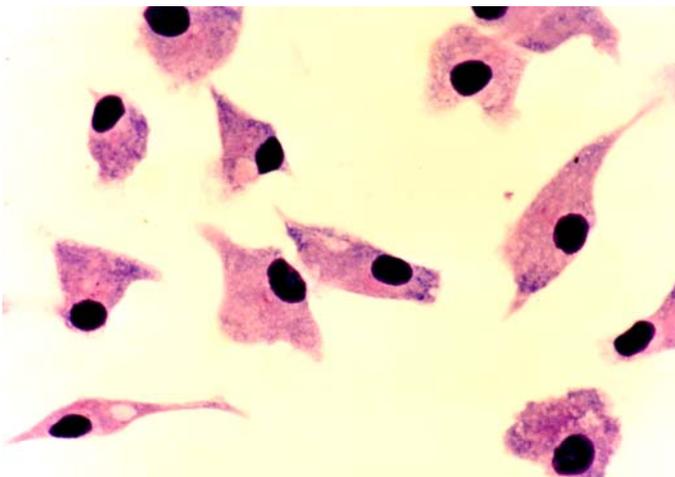


Abbildung 32:
Kultur von *L.-donovani*-infizierten Makrophagen,
inkubiert mit AdOMeb; Konzentration 1,1 µg/ml
(Giemsa-Färbung, Vergrößerung 50fach)

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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$. 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 $\mu\text{g/ml}$	Aktiv
0,05- 1 $\mu\text{g/ml}$	Schwach aktiv
>1 $\mu\text{g/ml}$	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 $\mu\text{g/ml}$ im Test gegen den partiell resistenten Stamm K1 und ein Wert von 0,004 $\mu\text{g/ml}$ für den nicht resistenten Stamm NF54 (Tab. 31). Antidesmon hatte einen IC50-Wert von 4,1 $\mu\text{g/ml}$ im Test gegen den Stamm K1 und 3,0 $\mu\text{g/ml}$ 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.

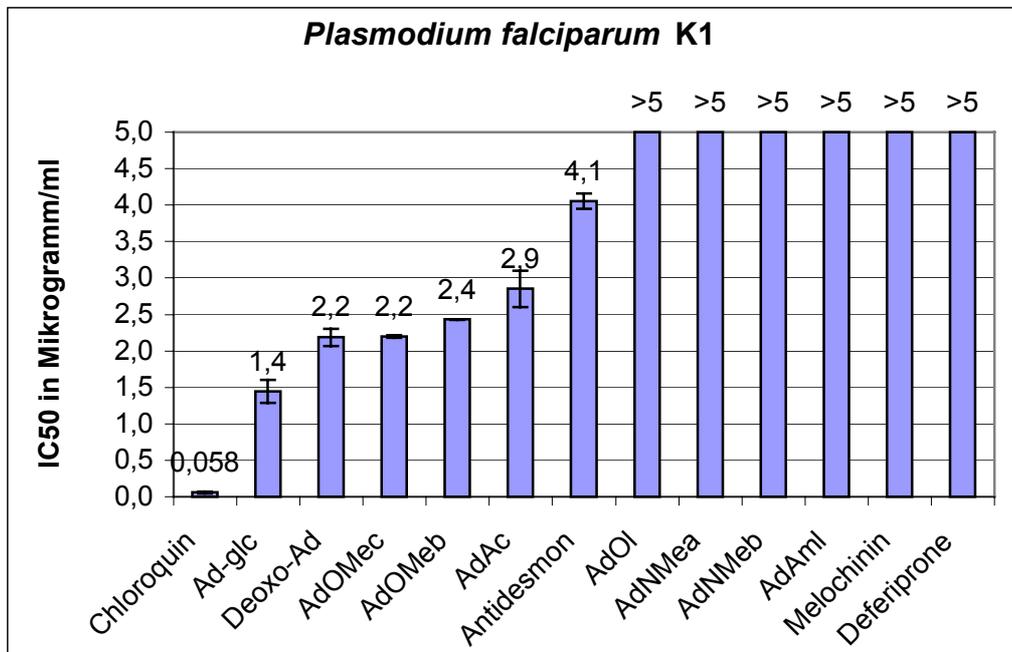


Abbildung 33: IC50- Werte in der *in-vitro*- Testreihe gegen den *P.- falciparum*- Stamm K1

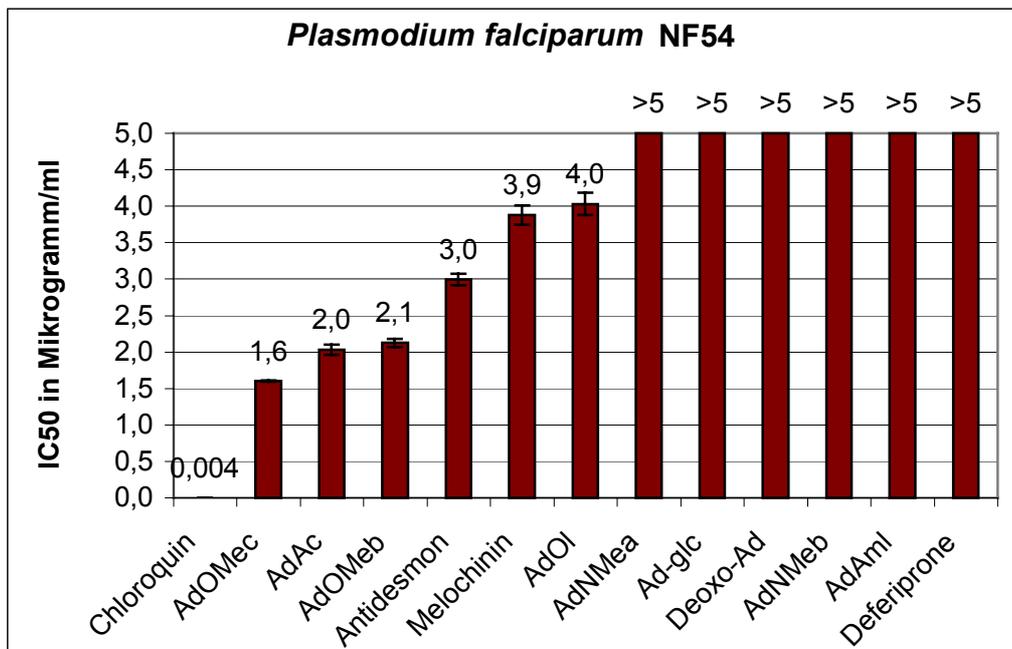


Abbildung 34: IC50-Werte in der *In-vitro*-Testreihe gegen den *P.-falciparum*-Stamm NF54

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.

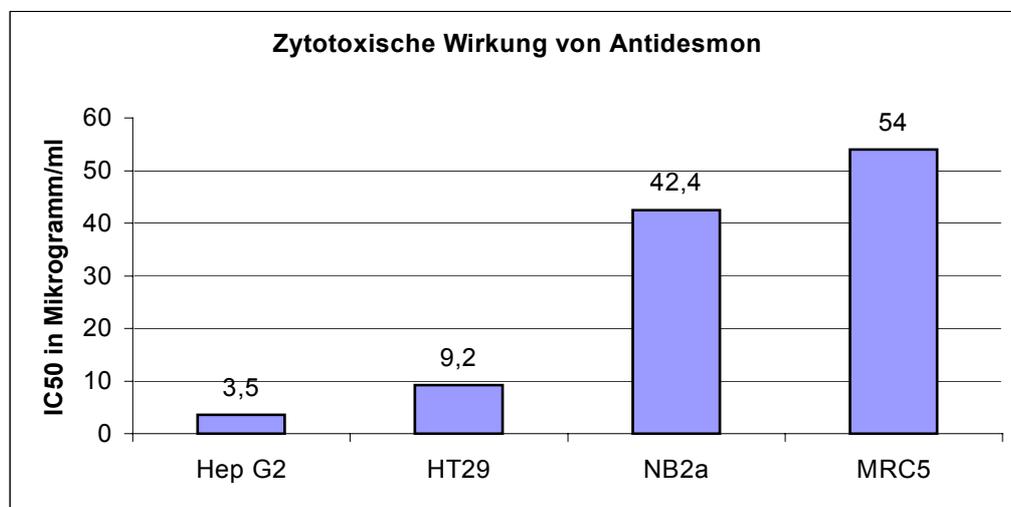


Abbildung 35: Zytotoxische Wirkung von Antidesmon auf humane und murine Zelllinien

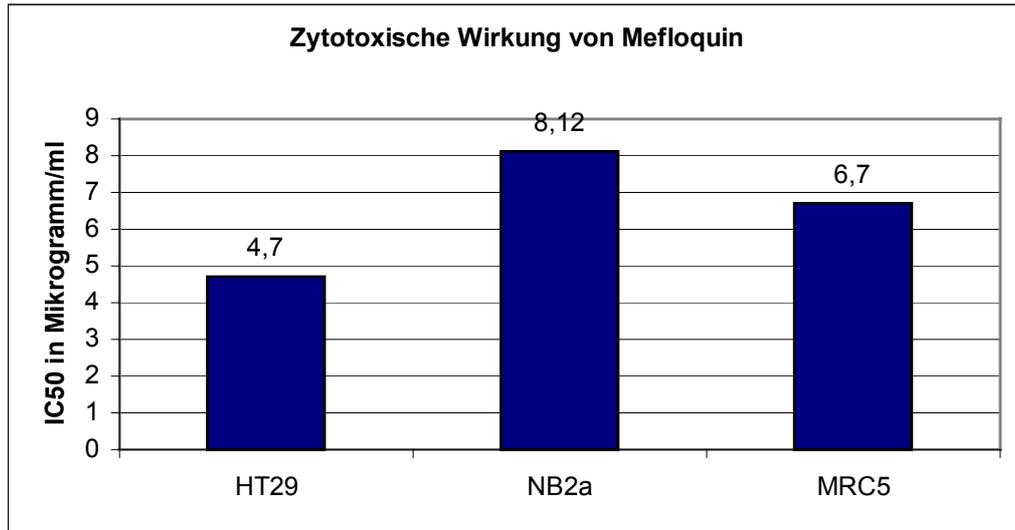


Abbildung 36: Zytotoxische Wirkung von Mefloquin auf humane und murine Zelllinien

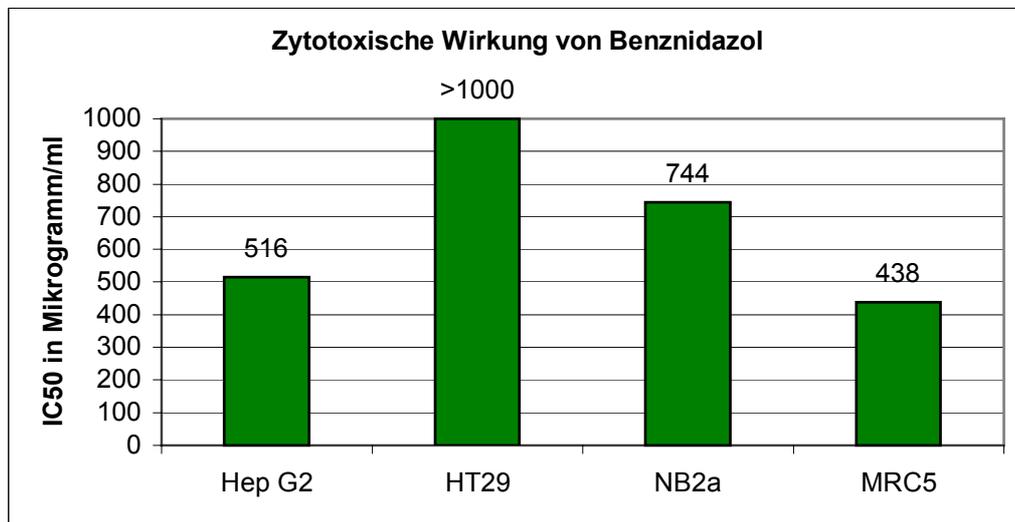


Abbildung 37: Zytotoxische Wirkung von Benznidazol auf humane und murine Zelllinien

3 Material und Methoden

3.1 Protozoen und Zelllinien

Plasmodium falciparum: *P. falciparum* NF 54 (keine Resistenz vorhanden), an Permanentkultur adaptiert im STI Basel, isoliert von T. Ponnudurai (Kayser et al 2001); *P. falciparum* K1 (chloroquin- und pyrimethaminresistent), an Permanentkultur adaptiert im STI Basel, isoliert durch S. Thaithong, China (Kayser et al 2001)

Trypanosoma cruzi: *T. cruzi* (Tulahuen-Stamm), transfiziert mit β -Galactosidase-Gen aus *Escherischia coli*, erhalten von Dr. F. S. Buckner, University of Washington, Seattle (Buckner et al 1996)

Trypanosoma brucei rhodesiense: *T. brucei rhodesiense* STIB 900, 1982 isoliert aus einem Patienten in Tansania, an axenische Permanentkultur adaptiert im STI Basel nach 22 Maus- und einer Fliegenpassage (Kaminsky et al 1996)

Trypanosoma evansi: *T. evansi* STIB 806 DKC, isoliert durch Jin Hua, China, an axenische Permanentkultur adaptiert im STI Basel nach einer Mauspassage (Kaminsky et al 1996)

Leishmania donovani: *L. donovani* MHOM/ET/67/HU3, an axenische Permanentkultur adaptiert im STI Basel (Blaxter et al 1988)

Säugetierzellen:

- L-6 (Myofibroblasten, Ratte)
- Makrophagen (Maus)
- Neuro-2a (Neuroblastom, Maus)

Humane Zelllinien:

- HT29 (kolorektales Adenokarzinom)
- MRC-5 (Lungenfibroblasten)
- Hep G2 (hepatozelluläres Karzinom)

Säugetiere:

- CD1-Mäuse (weiblich)

3.2 Materialien

Referenzmedikamente

- Radanil (Benznidazol), Hoffmann-LaRoche, Basel, CH
- Pentostam (Natriumstibogluconat), Wellcome, UK
- Arsobal (Melarsoprol), Specia, Paris, F
- Chloroquin (Chloroquindiphosphat), Sigma-Aldrich, CH
- Lariam (Mefloquin), Hoffmann-LaRoche, Basel, CH

Chemikalien und Lösungen

- Alamar Blue-Fluoreszenzfarbstoff (Trinova Biochem, Giessen, D)
- Albu max Rinderserumalbumin (Life Tech)

- Betaplate Szintillationsflüssigkeit (Wallac)
- Chlorophenolrot- β -Galactopyranosid CPRG (Böhringer, Mannheim)
- Dimethylsulfoxid DMSO
- Erythrozytenkonzentrat Blutgruppe A, rhesuspositiv (Blutspendezentrum Basel)
- Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert (Life Tech)
- Glutaminlsg. 200 mM/100 ml (Life Tech)
- ^3H -Hypoxanthin (Amersham Pharmacia Biotech, UK)
- HEPES (Life Tech)
- Giemsa-Stammlösung
- MEM Minimum Essential Medium Eagle
- Mercaptoethanol
- Neomycin-Lsg. 10000 U/ml (Life Tech)
- Phenolrot
- Phosphatgepufferte Salzlösung PBS (Life Tech)
- Pferdeserum, hitzeinaktiviert
- RPMI 1640 (Life Tech)
- Titriplex III EDTA
- Trypanblau (Chroma- Gesellschaft Schmidt u. Co)
- Trypsin

Hersteller: Life Tech, Karlsruhe, D; Bioconcept, Allschwil, CH ; Wallac, UK

Substanzen ohne Herstellerangabe wurden bezogen von: Fluka Chemie AG, Buchs, CH; Merck KGaA, Darmstadt, D; Sigma, Buchs, CH

Sonstiges Material

- Betaplate-Zellharvester (Wallac)
- Betaplate-Szintillationscounter (Wallac)
- Cytofluor-2300-Fluoreszenzreader (Millipore)
- Eppendorftubes (Eppendorf)
- 16-Kammer-Objektträger (LabTec)
- 96-Well-Mikrotiterplatten (Costar)
- 20-ml-Petrischalen (Falcon)
- 24-Well-Zellkulturcluster (Falcon)
- 25-ml-Zellkulturflaschen (Falcon)

Hersteller:

Falcon Becton-Dickinson, Basel, CH; Costar Corning Inc., NY, USA

Fotos mit Leica DC 20 Digitalkamera, Fluoreszenzfarbstoff: Acridinorange

Computerprogramme: Microsoft Office 97: Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft Photo Editor. Statistik: SPSS.

3.2.1 Medien

Kulturmedium für P. falciparum:

- 50 mg Hypoxanthin
- 5,94 g HEPES
- 10,44 g RPMI 1640 mit L-Glutamin, ohne NaHCO₃
- 5 g Albu max

Aqua dest. ad 1000 ml

Sterilfiltrieren, bei 4°C aufbewahren, vor Gebrauch versetzen mit

- 42 ml NaHCO₃-Lsg. 5%
- 10 ml Neomycin-Lsg. 10000 UG/ml

Screeningmedium für P. falciparum:

- Kulturmedium ohne Hypoxanthin

Waschmedium für P. falciparum

- Kulturmedium ohne Hypoxanthin und Albu max

Erythrozytensuspension für P. falciparum

- Erythrozytenkonzentrat Blutgruppe A, rhesuspositiv
- Waschmedium, Screeningmedium

Je 30 ml des Konzentrates in 50-ml-Tubes bei 2000 rpm 10 min abzentrifugieren. Plasma und Leukozyten absaugen, mit Waschmedium auf je 50 ml auffüllen. Resuspendieren, zentrifugieren wie zuvor, Überstand absaugen. Waschen zwei- bis dreimal wiederholen.

Pellet 1:1 mit Screeningmedium auffüllen, bei 4°C max. 7 Tage aufbewahren

Kultur- und Screeningmedium für T. cruzi und L-6-Myofibroblasten

- 100 ml hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum
- 8,5 ml Glutamin-Log. (200mM)

RPMI 1640 ad 1000ml. Bei 4°C aufbewahren.

Kulturmedium für L. donovani

- 500 ml SDM-Medium (Brun und Schöneberger 1979)
- 500 ml SM-Medium (Cunningham 1977)

Mit 4 N NaOH auf pH 5,4 einstellen

Screeningmedium für L. donovani, Makrophagen und HepG2

- 100 ml hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum

RPMI 1640 ad 1000 ml. Bei 4°C aufbewahren.

Screening- und Kulturmedium für HT29, MRC-5, Neuro-2a

- 100 ml FCS

MEM ad 1000 ml. Bei 4°C aufbewahren.

Screening- und Kulturmedium für T. evansi und T. b. rhodesiense

- 150 ml hitzeinaktiviertes Pferdeserum

- 10 ml Mercaptoethanol-Lösung (14 µl Mercaptoethanol in 10 ml H₂O)
- 10 ml Baltz'-Lösung

MEM ad 1000 ml. Bei 4°C aufbewahren

3.2.2 Weitere Lösungen

CPRG-Lösung

- 15,19 mg CPRG
- 250 µl Nonidet P40
- 100 ml PBS

Sterilfiltrieren, bei 4°C im Dunkeln aufbewahren

Earle's Balanced Salt Solution EBBS

- 0,4 g KCl
- 6,8 g NaCl
- 2,2 g NaHCO₃
- 0,14 g NaH₂PO₄·H₂O
- 1 g Glucose
- 0,01 g Phenolrot

Aqua dest ad 1000 ml. Sterilfiltrieren und portioniert bei –20°C lagern.

Giemsa-Lösung

- 20 ml Giemsa-Stammlösung 8%
- 220 ml Puffer (4,2 g KH₂PO₄, 10 g NaH₂PO₄, Aqua dest. ad 10 l)

Trypsinlösung

- 8 g NaCl
- 0,4 g KCl
- 0,35 g NaHCO₃
- 1 g Glucose
- 1g Phenolrot

Aqua dest ad 1000 ml, Zugabe von

- 200 mg Titriplex III (EDTA)
- 500 mg Trypsin

Mit 1 N NaOH auf pH 7,7 einstellen, sterilfiltrieren und bei –20°C lagern

Baltz'-Lösung

- 6,8 g Hypoxanthin

In 1N NaOH lösen.

- 11g Na-Pyruvat

Aqua dest. ad 100 ml. Sterilfiltrieren und bei –20°C aufbewahren.

3.2.3 Testsubstanz-Stammlösungen

Für alle Tests wurden Stammlösungen des Antidesmons, seiner Derivate und der Referenzsubstanzen zu 10 mg/ml in DMSO hergestellt. Deferiprone wurde in 10% Ethanol gelöst. Die Stammlösungen wurden in Eppendorftubes bei -20°C gelagert und für jeden Testansatz neue Verdünnungen in dem jeweiligen Medium hergestellt.

3.3 Testmethoden

3.3.1 *Trypanosoma cruzi*

Kultivierung

Die Kultivierung der Parasiten erfolgte in 25-ml-Zellkulturflaschen mit einer L-6-Myofibroblasten-Zellschicht als Wirtszellen. Die Inkubation sowohl der Kulturen als auch der Testansätze fand im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 in angefeuchteter Luft statt. Dreimal wöchentlich wurden die Kulturen mikroskopisch kontrolliert, das Medium gewechselt und mit 1-3 ml des Mediums (je nach Parasitendichte) eine neue L-6-Zelllage infiziert. Überwogen die Epimastigoten in der Kultur, wurde sie verworfen.

Testmethode (nach Buckner et al. 1997)

Am ersten Tag des Versuchs erfolgte die Aussaat der Wirtszellen auf der Testplatte. Dazu wurde aus einer L-6-Zellkulturflasche das Medium entfernt und mit EBBS gespült. Die Zellen wurden trypsinisiert und in Kulturmedium resuspendiert, anschließend mit Trypanblau-Lösung 0,9% in PBS angefärbt und die Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde mit Medium auf eine Dichte von 2×10^3 Zellen/ml verdünnt und je 100 μl in jede Vertiefung einer 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben (Abb. 38). Es folgte eine Inkubation für 24 Stunden. Dann wurde das Medium aus einer Zellkulturflasche mit Trypanosomen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, entfernt und dessen Parasitendichte, mit der gleichen Methode wie bei den L-6-Zellen beschrieben, bestimmt sowie auf 5×10^3 Trypanosomen/ml eingestellt. Hierauf folgte das Einbringen von je 50 μl der Suspension in alle Vertiefungen der inkubierten Mikrotiterplatte bis auf die der Reihen 3,6,9, und 12. Diese blieben parasitenfrei und dienten als Negativ- und Hintergrundkontrolle. Es schloss sich eine Inkubation für 48 Stunden an. Am vierten Tag wurde das Medium aus allen Vertiefungen entfernt und in die Reihen A-G der Platte frisches Kulturmedium gegeben. Die Testsubstanz-Stammlösungen wurden mit Kulturmedium auf die gewünschte Anfangskonzentration (AK) verdünnt und je 150 μl einer Verdünnung in drei nebeneinander liegende Vertiefungen der Reihe H gegeben. Aus der letzten Reihe wurden mit einer Zwölf-Schacht-Serienpipette jeder Kammer 50 μl entnommen und in Reihe G gegeben, gut gemischt und wiederum 50 μl aus Reihe G in Reihe F eingebracht. So wurde bis zu der Reihe C verfahren und die restlichen 50 μl verworfen. Es ergab sich eine Serienverdünnung von 1:3 von Reihe H bis Reihe C. A und B blieben frei von Testsubstanz und dienten als Kontrolle. Auf diese

Weise konnten pro Platte vier Substanzen im Parallelansatz und in je sechs Konzentrationen untersucht werden.

	A	B	C	D	E	F	G	H
	Kein Med.		1/ 243 AK	1/81 AK	1/27 AK	1/9 AK	1/3 AK	AK
<i>T. cruzi</i> + L-6	Positiv-Kontrolle							1
								2
L-6	Negativ-Kontrolle							3
<i>T. cruzi</i> + L-6 ...								4 ...

Abbildung 38: Schema der Mikrotiterplatten-Aufteilung im *T. cruzi*-Assay (AK= Anfangskonzentration)

Nach einer 72stündigen Inkubation wurde die Platte unter einem Umkehrmikroskop bei 200facher Vergrößerung betrachtet, um eventuelle zytotoxische Effekte der Medikamente auf die Wirtszellen in den Kontrollreihen ohne Parasiten festzustellen, die das Versuchsergebnis verfälschen könnten.

Auswertung

Jede Vertiefung erhielt anschließend 50 µl der CPRG- Lösung, des Substrats für die Farbreaktion. Nach 2-6 Stunden Inkubationszeit konnte die Intensität der Reaktion als Extinktion bei 540 nm mit dem Elisa-Reader abgelesen werden. Die Daten wurden in Excel-Format konvertiert und mit Hilfe von Excel als Hemmkurven in halblogarithmischer Auftragung dargestellt. Hierzu wurden für jede Substanz die Intensitätswerte der Parallelansätze gemittelt. Der Extinktionswert der Negativkontrolle für die entsprechende Substanzkonzentration wurde von diesem Mittel abgezogen. Das Mittel der Positivkontrolle wurde als 100prozentiges Wachstum definiert und alle anderen Werte dazu in Bezug gesetzt.

3.3.2 *Trypanosoma brucei rhodesiense* und *Trypanosoma evansi*

Kultivierung

Die Kultivierung erfolgte in 24-Well-Platten in jeweils 4 Parasitenkonzentrationen zu je 1 ml in oben erwähntem Kulturmedium. Die Inkubation sowohl der Kulturen als auch der Testansätze fand im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in angefeuchteter Luft statt.

Dreimal pro Woche wurden Trypanosomen in der logarithmischen Wachstumsphase den Wells entnommen und vier neue Verdünnungen (in Zehnerschritten) in frischem Medium hergestellt.

Testmethode (nach Rüz et al. 1997)

In jede Vertiefung eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 50 µl Medium gegeben, Zeile H blieb frei. Jeweils drei nebeneinander liegende Vertiefungen dieser Zeile erhielten 100 µl Medium mit der doppelten Startkonzentration einer Substanz. Mit 50 µl aus der letzten Zeile wurden Serienverdünnungen von 1:2 bis zur Zeile C angefertigt. Die Zeilen A und B dienten als Kontrolle ohne Testsubstanz. Auf diese Weise konnten vier Substanzen pro Platte in sechs Konzentrationen und im Parallelansatz getestet werden. In die Reihen 3,6,9 und 12 wurde anschließend 50 µl

Medium ohne Trypanosomen gegeben. Diese Reihen dienten als Hintergrundkontrolle ohne Parasiten. Die übrigen Reihen erhielten 50 µl einer Trypanosomensuspension in Medium pro Vertiefung; die Parasitenkonzentration wurde bei *T. b. rhodesiense* auf 4×10^4 /ml, bei *T. evansi* auf 2×10^4 /ml eingestellt. Es folgte eine Inkubation für 72 Stunden.

Auswertung

Nach der Inkubation erhielt jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 10 µl des Fluoreszenzfarbstoffs Alamar Blue. Es folgte eine Inkubation für 2 Stunden. Anschließend wurde die Platte in einem Fluoreszenzreader bei 530 nm Exzitation und 590 nm Emission gelesen, die Daten in Excel-Format konvertiert und mit Hilfe von Excel die IC50 bestimmt.

3.3.3 *Leishmania donovani*

Kultivierung

Die Kultivierung der Parasiten erfolgte axenisch in der amastigoten Form mit oben erwähntem Medium in Zellkulturflaschen. Kulturen und Testansätze wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dreimal wöchentlich wurde das Medium der laufenden Kulturen gewechselt und bei Bedarf die Kulturen verdünnt.

Testmethode (nach Neal und Croft 1984)

Als Wirtszellen dienten Makrophagen aus CD1-Mäusen. Die Zellen wurden durch peritoneale Waschung mit 5 ml Screeningmedium aus einer zuvor getöteten Maus gewonnen, der am vorhergehenden Tag eine sterile zweiprozentige Stärkelösung in destilliertem Wasser intraperitoneal gespritzt wurde. Die Spülflüssigkeit wurde bei 1500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der Bodensatz anschließend in 5 ml frischem Medium aufgenommen. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte nach Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer. Die Suspension wurde auf eine Konzentration von 4×10^5 Zellen/ml verdünnt. Je 100 µl dieser Suspension wurde in die Kammern eines 16-Kammer-Objektträgers gegeben und anschließend für 24 Stunden inkubiert. Danach wurde die Zelldichte einer axenischen Amastigotenkultur mit Hilfe eines Zellzählautomaten (Casy Counter) bestimmt und mit Screeningmedium auf $1,2 \times 10^6$ Flagellaten/ml eingestellt. Jede Kammer des Objektträgers erhielt 100 µl der Leishmaniensuspension. Nach 4 - 6 Stunden Inkubation wurde die Flüssigkeit aus allen Kammern abgesaugt und durch 200 µl frisches Medium ersetzt. Es folgte eine erneute 24stündige Inkubation, nach der das Medium wieder entfernt und durch 200 µl frisches ersetzt wurde. Die Testsubstanz-Stammlösungen wurden mit Screeningmedium auf ein Dreifaches der gewünschten Anfangskonzentration (AK) verdünnt. Je zwei Kammern der Reihe A des Objektträgers erhielten 100 µl einer Verdünnung (Abb. 39). Vier Kammern blieben ohne Medikament und dienten als Positivkontrolle. Mit einer Serienpipette wurde nun allen Kammern der Reihe A 100 µl entnommen und in die Reihe B gegeben. Es ergab sich eine Weiterverdünnung auf ein Drittel der Anfangskonzentration. Auf diese Weise konnten drei Substanzen pro Objektträger in zwei

Verdünnungen und im Parallelansatz getestet werden. Zeigten Substanzen im ersten Versuch Aktivität, so wurde der Versuch mit vier Verdünnungen im Parallelansatz wiederholt. Jeder Testansatz wurde 96 Stunden inkubiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Referenz-Substanz		Testsubstanz 1		Testsubstanz 2		Positiv-Kontrolle	
A	AK							
B	1/3 AK							

Abbildung 39: Schema der Objektträger-Aufteilung im *L.-donovani*-Assay

Nach dieser Zeit wurde das Medium abgesaugt, die Kammern des Objektträgers entfernt und dieser mit reinem Ethanol fixiert und anschließend mit Giemsa-Lösung gefärbt.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch mit einem 50fach-Immersionöl-Objektiv. Hierbei wurden zunächst in dem Positivkontrollfeld etwa 200 Makrophagen ausgezählt und das Verhältnis von infizierten zu nichtinfizierten Zellen bestimmt. Dieser Prozentsatz diente als Bezugswert für die Hemmwirkung der getesteten Substanzen. Mit den Feldern, in denen die Leishmanien den Testsubstanzen ausgesetzt waren, wurde ebenso verfahren. Neben der Ermittlung der Verhältnisse von infizierten zu uninfizierten Makrophagen wurde nach morphologischen Veränderungen der Makrophagen als Zeichen eventueller zytotoxischer Wirkung der Substanz gesucht. Die prozentuale Hemmung im Parallelansatz wurde gemittelt. Es ergaben sich zwei bis sechs Hemmwerte pro Substanz, je nach Zahl der Verdünnungsschritte. Die IC₅₀ wurde mit anhand dieser Werte bestimmt (s. Kapitel 3.3.7).

3.3.4 *Plasmodium falciparum*

Kultivierung

Die Kultivierung erfolgte in 20-ml-Petrischalen mit Kulturmedium und 5% humanen Erythrozyten. Die Inkubation sowohl der Kulturen als auch der Testansätze fand im Brutschrank bei 37°C und 3% O₂, 4% CO₂ und 93% N₂ statt. Das Medium wurde täglich gewechselt. Dreimal wöchentlich wurde ein Ausstrich der Parasitenkulturen hergestellt, mit reinem Methanol fixiert und mit Giemsa-Lösung gefärbt. Der prozentuale Erythrozytenbefall wurde mikroskopisch mit einem 100fach-Immersionöl-Objektiv ermittelt und die Kulturen verdünnt, falls die Parasitämie über 10% lag.

Testmethode (nach Desjardins et al. 1979).

Für den Testansatz wurde zunächst ein Ausstrich der beiden Plasmodienkulturen hergestellt und die Parasitämie bestimmt. Anschließend wurde durch Zugabe von Screeningmedium und Erythrozytenkonzentrat für beide Stämme je eine Parasitensuspension mit 0,3% Parasitämie und 2,5% Erythrozyten hergestellt. Es folgte eine Verdünnung der Substanzstammlösungen mit Screeningmedium auf ein Vierfaches der gewünschten Anfangskonzentration. Der Testansatz wurde immer mit zwei Platten für die zwei unterschiedlichen Plasmodienstämme durchgeführt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Positivkontrolle								Negativkontrolle			
B	Referenz-Substanz 1		Referenz-Substanz 2		Test-Substanz 1		Test-Substanz 2		Test-Substanz 3		Test-Substanz 4	
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Abbildung 40: Schema der Mikrotiterplatten-Aufteilung im *P.falciparum*-Assay

Jede Vertiefung einer 96-Well-Mikrotiterplatte erhielt nun 100 µl Screeningmedium (Abb. 40). In je zwei nebeneinander liegende Kammern der Reihe H wurden dann 100 µl der Anfangsverdünnung einer Substanz gegeben. Durch Umpipettieren von 100 µl aus dieser Reihe in die darüber liegende ergab sich eine Serienverdünnung von 1:2. So wurde bis zur Reihe B verfahren und der Überstand verworfen. Reihe A blieb ohne Substanz. Auf diese Weise konnten sechs Substanzen pro Platte in je sieben Konzentrationen untersucht werden. In sämtliche Vertiefungen der Platte bis auf A9-A12 wurden anschließend 100 µl der vorbereiteten Plasmodiensuspension eines Stammes gegeben. Die Kammern A9-A12 erhielten 100 µl einer 2,5%igen Erythrozytensuspension in Screeningmedium als Negativkontrolle, A1-A9 dienten als Positivkontrolle. Die Ansätze wurden 48 Stunden unter den oben angegebenen Bedingungen inkubiert. Danach wurde jeder Kammer der Platten 50 µl ³H-Hypoxanthin-Lösung hinzugefügt und erneut für 24 Stunden inkubiert.

Auswertung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Testplatten in einen Zellharvester gegeben, der die Zellen hämolysierte und auf eine Glasfaser-Filtermatte transferierte. Diese wurde mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in eine Folie eingeschweißt und in einen Szintillationscounter gegeben. Nach Konvertierung der Daten in Excel-Format erfolgte die Ermittlung der IC50. Werte.

3.3.5 Toxizitätsprüfung *in vitro*

Kultivierung

Die Säugetierzellen wurden in dem jeweiligen Kulturmedium in 20-ml-Zellkulturflaschen als Monolayer gezüchtet. Die Inkubation sowohl der Kulturen als auch der Testansätze erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Dreimal wöchentlich wurde das Medium gewechselt und Zellkulturen mit mehr als einer Zelllage verworfen.

Testmethode

Zellen aus einer laufenden Zellkultur wurden wie bei dem *Trypanosoma-cruzi*-Test mit EBBS-Lösung gewaschen und anschließend trypsiniert, dann in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und die Zelldichte nach Färbung mit Trypanblau-Lösung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die

Suspension wurde mit Medium auf $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt. In die Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurde je 50 μ l der Zellsuspension gegeben (Abb. 41). Die Reihen 3,6,9, und 12 blieben frei und erhielten anschließend 50 μ l Medium als Negativkontrolle. Es folgte eine Inkubation für 24 Stunden. Danach wurde die Flüssigkeit aus allen Reihen entfernt und in Reihe A-G durch 100 μ l frisches Medium ersetzt. Die Testsubstanzen wurden mit Medium auf die gewünschte Anfangskonzentration (AK) verdünnt und 150 μ l dieser Lösung in Reihe H gegeben. Durch Umpipettieren von je 50 μ l von Reihe H zur Reihe C ergab sich eine Serienverdünnung im Verhältnis 1:3. Die restlichen 50 μ l wurden verworfen. Die Reihen A und B blieben frei von Testsubstanz und dienten als Positivkontrolle. Es schloss sich eine Inkubation für 48 Stunden an.

	A	B	C	D	E	F	G	H	
	Keine Substanz		1/243	1/81 AK	1/27 AK	1/9 AK	1/3 AK	AK	
L-6	Positiv-Kontrolle								1
L-6									2
Zellfrei	Negativ-Kontrolle								3
L-6									4..

Abbildung 41: Schema der Mikrotiterplatten-Aufteilung im Zytotoxizitäts-Assay

Auswertung

Nach der Inkubation erhielt jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 10 μ l des Fluoreszenzfarbstoffs Alamar Blue. Es folgte eine Inkubation für 2 Stunden. Anschließend wurde die Platte in einem Fluoreszenzreader bei 530 nm Exzitation und 590 nm Emission gelesen, die Daten in ein Excel-Format konvertiert und die IC50-Werte bestimmt (s. Kapitel 3.3.7).

3.3.6 Toxizitätsprüfung *in vivo*

Zwei CD-1-Mäusen wurden je 250 μ l einer Verdünnung von DMSO-gelöstem Antidesmon in destilliertem Wasser intraperitoneal gespritzt. Die Mäuse erhielten am ersten Tag eine Dosis von 5 mg/kg und wurden anschließend 48 Stunden auf Anzeichen einer toxischen Wirkung beobachtet. Traten keine Symptome auf, wurde nach 48 Stunden die Konzentration von Antidesmon verdoppelt und die Mäuse wiederum 48 Stunden beobachtet. Die Dosis wurde gesteigert, bis toxische Wirkung zu beobachten war. War eine toxische Dosis ermittelt, wurde einer weiteren CD1-Maus die entsprechende Höchstkonzentration von DMSO i.p. gespritzt, um einen eventuellen toxischen Effekt des Lösungsmittels festzustellen.

3.3.7 Berechnung der IC50-Werte und statistische Auswertung

Als Endergebnis aller *In-vitro*-Tests wurde die IC50, die Substanzkonzentration, bei der eine 50prozentige Wachstumshemmung der Parasiten eintrat, mittels folgender Formel aus den ermittelten Daten errechnet.

<p style="text-align: center;">IC50-Berechnung in der Auswertung der Parasiten- und Zytotoxizitäts-<i>in-vitro</i>-Assays</p> <p style="text-align: center;">$\text{EXP} \{[\text{LOG}(X_1) + \{(Y_1 - 0,5) / (Y_1 - Y_2)\} \times [\text{LOG}(X_1) - \text{LOG}(X_2)]] \times \text{LN}(10)\}$<p style="text-align: center;"><small>Y₁= kleinster der Hemmwerte größer 50%; X₁=entsprechende Konzentration der Testsubstanz Y₂=größter der Hemmwerte kleiner 50%; X₂=entsprechende Konzentration der Testsubstanz</small></p></p>
--

Abb. 42: Bestimmung des IC-50-Wertes

Konnte keine IC50 festgestellt werden, wurde der Versuch mit entsprechend veränderter Anfangskonzentration wiederholt. Wirkte eine Substanz stark hemmend auf das Parasitenwachstum, so dass bei den gegebenen Konzentrationen kein Wachstum von mehr als 50 Prozent der Positivkontrolle festgestellt werden konnte, wurde der IC50-Wert mittels linearer Regressionsanalyse ermittelt. Ebenso wurde verfahren, wenn eine Substanz das Parasitenwachstum nur in geringem Maße reduzierte, so dass keine Wachstumsreduktion auf weniger als 50 Prozent der Positivkontrolle verzeichnet wurde. Wenn das Wachstum der Parasiten von einer Substanz in allen Konzentrationen auf Werte unter 10 Prozent reduziert wurde, unterblieb eine Bestimmung und der Versuch wurde wiederholt. Die Beurteilung der Substanzen als aktiv, schwach und nicht aktiv entsprechend der IC50-Werte wurde gemäß der Festlegung der Drug Discovery Research Group von TDR/WHO getroffen (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. R. Brun, STI Basel, 2003) Der statistische Vergleich der IC50-Werte wurde mit dem SPSS-Programm durchgeführt. Es wurde der nichtparametrische Test nach Friedman benutzt. Die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen erfolgte mit Microsoft Office EXCEL.

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 IC₅₀-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 IC₅₀-Wert der aktivsten Substanz AdOMeb für die Säugetierzellen lag um das Neuntausendfache höher als der IC₅₀-Wert der Substanz für *T. cruzi*. Dagegen war der IC₅₀-Wert bei einer der schwach aktiven Substanzen, AdOMec, für die Säugetierzellen nur um das Siebenfache höher als der IC₅₀-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 β -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 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 Cholesterol 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- α -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 α -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.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Antidesmon, einem neuartigen pflanzlichen Alkaloid, auf humanpathogene Protozoen *in vitro* getestet. Dabei wurde eine bisher unbekannte Wirkung auf *Trypanosoma cruzi*, den Erreger der Chagas-Krankheit, gefunden. Antidesmon war gegen *T. cruzi* wirksamer als das Standardmedikament Benznidazol. Der IC50-Wert (der die Substanzkonzentration angibt, bei der das Parasitenwachstum auf die Hälfte reduziert wird) betrug 0,04 µg/ml für Antidesmon und 0,6 µg/ml für Benznidazol. Antidesmon zeigte keine wesentliche Wirkung *in vitro* gegen zwei andere pathogene Trypanosomenspezies, *T. brucei rhodesiense* und *T. evansi*. Die Bioaktivität des Antidesmons ist für *T. cruzi* spezifisch. Um diese für einen Naturstoff ungewöhnlich hohe Aktivität genauer zu untersuchen, wurden sieben neu synthetisierte Antidesmon-Derivate sowie zwei natürliche Derivate vergleichend mit Antidesmon und einer Referenzsubstanz auf ihre Aktivität untersucht. Das Derivat AdOMeb wirkte in einer 90fach niedrigeren Konzentration als Benznidazol auf *T. cruzi* und übertraf mit einem IC50-Wert von 0,007 µg/ml die Wirksamkeit der Muttersubstanz Antidesmon. Zwei weitere Derivate, AdOL und AdAc, wirkten ebenfalls in niedrigerer Konzentration als Benznidazol. Es konnte ausgeschlossen werden, dass die Aktivität der Substanzen auf einer Schädigung der murinen Wirtszellen der Parasiten beruht. Für Antidesmon und AdOMeb ergaben sich hohe Werte für den Selektivitätsindex, ein Hinweis auf eine spezifische antiparasitäre Wirkung. Gegen *Leishmania donovani*, einen Erreger der viszeralen Leishmaniose, zeigten lediglich Antidesmon und AdOMeb schwache Wirksamkeit. Die Zytotoxizitätsprüfung mit den Wirtszellen der Leishmanien ergab, dass die Wirkung von Antidesmon auf diese Parasiten eher auf allgemeiner als auf spezifischer Toxizität beruht; bei AdOMeb dagegen ist eine spezifische Aktivität anzunehmen. Keine der Testsubstanzen erwies sich als aktiv gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum*. Im Zytotoxizitätstest mit humanen und murinen Zelllinien lag die Toxizität von Antidesmon zwischen der für Benznidazol und Mefloquin. 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.

Weltweit sind etwa 16-18 Millionen Menschen mit *T. cruzi* infiziert. Bis heute existiert keine befriedigende Therapiemöglichkeit für die Chagaskrankheit. Mit Antidesmon wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Leitstruktur zur Entwicklung dringend benötigter Medikamente gegen *T. cruzi* gefunden. Der Wirkungsmechanismus von Antidesmon ist noch unklar, da es sich um eine neue Substanzklasse mit antiparasitärer Wirkung handelt. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Aktivität des Alkaloids spezifisch für *T. cruzi* ist und nicht auf allgemeiner Toxizität beruht. Durch N-Methylierung am ersten Ring des Bicyclus konnte die Wirksamkeit der Muttersubstanz um das Fünffache gesteigert werden; gleichzeitig verringerte sich die Toxizität auf Säugetierzellen. Für die antiparasitäre Wirkung von Antidesmon und seinen Derivaten wurde in Deutschland und international ein Patent erteilt.

6 Literatur

1. Adam G, Buske A, Häring A, Kekulé A: Patentschrift Nr. 10129927. Deutsches Patent- und Markenamt München, **2004**
2. Akendengue B, Ngou-Milama E, Laurens A, Hocquemiller R: Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. *Parasite* (**1999**), 3-8
3. Alves TMA., Zani CL: New tetrahydroisoquinolines from Hyeronima oblonga (Euphorbiaceae). *Tetrahedron Lett* 40 (**1999**), 205-208
4. Amato Neto V: Etiological treatment for infection by Trypanosoma cruzi. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (**1999**), Suppl I: 337- 339
5. Barile FA, Arjun S, Hopkinson D: In vitro cytotoxicity testing: Biological and statistical significance. *Toxicol In Vitro* 7 (**1993**), 111-116
6. Blaxter ML, Miles MA, Kelly JM: Specific serodiagnosis of visceral leishmaniasis using a Leishmania donovani antigen identified by expression cloning. *Mol Biochem Parasitol* 30 (**1988**): 259-70
7. Braga MS, Lauria-Pires L, Arganaraz ER, Nascimento RJ, Teixeira ARL: Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-trypanosoma cruzi nitroderivatives. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 42 (**2000**), 157-161
8. Breuer H, Medina E, Rangel M: The role of the alkaloid Melochinin in the central american cattle paralysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 316 (**1981**), R24
9. Bringmann G, Hamm A, Gunther C, Michel M, Brun R, Mudugo V: Ancistroealaines A and B, two new bioactive naphthylisoquinolines, and related naphthoic acids from Ancistrocladus ealaensis. *J Nat Prod* 63 (**2000**), 1465-70
10. Bringmann G, Rischer H, Wohlfahrt M, Schlauer J: Biosynthesis of Antidesmone in Cell Cultures of Antidesma membranaceum (Euphorbiaceae): An unprecedented class of glycine-derived Alkaloids. *J Am Chem Soc* 122 (**2000**), 9905-9910
11. Bringmann G, Schlauer J, Rischer H, Wohlfarth M, Mühlbacher J, Buske A, Porzel A, Schmidt J, Adam G: Revised Structure of Antidesmone, an unusual alkaloid from tropical antidesma plants (Euphorbiaceae). *Tetrahedron* 56 (**2000**), 3691-3695
12. Bringmann G, Wohlfarth M, Haller R, Baer S, Brun R: Anitdesmone, a novel antitrypanosomal alkaloid. *Pharm Pharmacol Lett* 11 (**2001**), 47-48
13. Brun R, Lang W, Löscher T: Afrikanische Trypanosomiasis (Schlafkrankheit). In: Lang W, Löscher T (Hrsg.): Tropenmedizin in Klinik und Praxis. 2. neubearb. Auflage. Thieme, Stuttgart, New York, **2000**. S. 50-66
14. Brun R, Rab S: In vitro drug sensitivity of Trypanosoma congolese isolates. *Parasitol Res* 77 (**1991**), 341-345

15. Brun R, Schöneberger M: Cultivation and in vitro cloning of procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. *Acta Tropica* 36 (1979), 289-292
16. Bryant C: *Biochemistry*. In: Cox FEG (Hrsg): *Modern Parasitology: A Textbook of Parasitology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh (usw.), 1993. S 117-136
17. Buckner FS, Verlinde CLMJ, La Flamme AC, Van Voehis WC: Effective technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β -galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother*, 40 (1997), 2592-2597
18. Buske A: Phytochemische Untersuchung der Afrikanischen Euphorbiaceen *Antidesma membranaceum* und *Antidesma venosum*. Dissertation (Chemie), MLU Halle/ Saale. Rhombos Verlag Berlin 2000
19. Buske A: Über Inhaltsstoffe der Afrikanischen Euphorbiaceae *Antidesma membranaceum*. Diplomarbeit (Chemie), MLU Halle/Saale., 1996
20. Buske A, Busemann S, Mühlbacher J, Schmidt J, Porzel A, Bringmann G, Adam G: *Antidesmone*, a novel type isoquinoline alkaloid from *Antidesma membranaceum* (Euphorbiaceae). *Tetrahedron* 55 (1999), 1079-1086
21. Castro JA, Diaz de Toranza EG: Toxic effects of Nifurtimox and Benznidazole, two drugs used against american trypanosomiasis (Chagas' disease). *Biomed Environ Sci* 1 (1988), 19-33
22. De Castro SL, Pinto MCRF und Pinto AV: Screening of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi*. I Establishing a structure/ activity relationship. *Microbios* 78 (1994), 83-90
23. Chhabra S C, Mahunnah R L, Mshiu E N: Plants used in traditional medicine in Eastern Tanzania. III: Angiosperms (Euphorbiaceae to Menispermaceae). *J Ethnopharmacol* 28 (1990), 255-283
24. Chowdhury SF, Villamor VB, Guerrero RH, Leal I, Brun R, Croft SL, Goodman JM, Maes L, Ruiz-Perez LM, Pacanowska DG, Gilbert ICH: Design, synthesis and evaluation of inhibitors of trypanosomal and leishmanial dihydrofolate reductase. *J Med Chem* 42 (1999), 4300-4312
25. Coura JA, de Castro SL: A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97 (2002), 3-24
26. Cox FEG: *Parasitic Protozoa*. In: Cox FEG (Hrsg): *Modern Parasitology: A Textbook of Parasitology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh (usw.), 1993. S 1-8
27. Croft SL, Brun R: In vivo and in vitro models for the identification and evaluation of drugs active against *Trypanosoma* and *Leishmania*. Vortrag anlässlich „COST B9 congress on antiparasitic chemotherapy“, Mai 1999, Montpellier
28. Croft SL, Urbina JA, Brun R: Chemotherapy of human leishmaniasis and trypanosomiasis. In: Hide G, Mottram JC, Coombs GH, Holmes PH (Hrsg.): *Trypanosomiasis and Leishmaniasis*. CAB International, 1997. S. 245-257

29. *Cunningham I*: New culture medium for maintenance of Tsetse tissues and growth of trypanosomatids. *J Protozool* 24 (1977), 325-329
30. *Denise H*, Barrett MP: Uptake and mode of action of drugs used against sleeping sickness. *Biochem Pharmacol* 61 (2001), 1-5
31. *Desjardins RE*, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD: Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother*, 16 (1979), 710-718
32. *Desjeux P*: Global control and Leishmania HIV co-infection. *Clin Dermatol* 17 (1999), 317-325
33. *Diaz de Toranza EG*, Castro JA, Franke de Cazzullo DM, Cazzullo JJ: Interaction of Benznidazole with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 44 (1998), 880-889
34. *Eckert J*: Protozoen. In: Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM: Medizinische Mikrobiologie (9. Aufl.), Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1997. S.484-557
35. *El Rayah IE*, Kaminsky R, Schmid C, El Malik KH: Drug resistance in sudanese *Trypanosoma evansi*. *Vet Parasitol* 80(4) (1999), 281-287
36. *Falbe J*, Regnitz M (Hrsg.): Römpp Lexikon Chemie. Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1998, S. 2851, 4262
37. *Filardi LS*, Brener Z: Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81 (1987), 755-9
38. *Fournet A*, Rojas de Arias A, Ferreira ME, Nakayama H, Torres de Ortiz S, Schinini A, Samunido M, Vera de Bilbao N, Lavault M, Bonte F: Efficacy of the bisbenzylisoquinoline alkaloids in acute and chronic *Trypanosoma cruzi* murine model. *Int J Antimicrob Agents* 13 (2000), 189-95
39. *Freiburghaus F*, Kaminsky R, Nkunya MHH, Brun R: Evaluation of African medical plants for their in vitro trypanocidal activity. *J Ethnopharmacol* 55 (1996), 1-11
40. *Fröhlich SJ*, Mino de Kaspar H, Peran R, Vera de Bilbao N, Schinini A, Rojas de Arias A, Sanches Insfran N, Moreno Azorero R, Heidenkummer P; Klauf V: Beteiligung der Chagas-Krankheit (Amerikanische Trypanosomiasis) am inneren Auge. *Ophthalmologe* 94 (1997), 206-210
41. *Gutteridge WE* : *Chemotherapy*. In: Cox FEG (Hrsg): *Modern Parasitology: A Textbook of Parasitology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh (usw.), 1993. S 1-8
42. *Gottstein D*, Gross D, Lehmann H: Mikrotest mit *Cladosporidium cucumerinum* Ell. & Arth. zum Nachweis fungitoxischer Verbindungen auf Dünnschichtplatten. *Z ges Hyg* 30 (1984), 620-621
43. *Harder A*, Greif G, Haberkorn A: Chemotherapeutic approaches to protozoa: Kinetoplastida-current level of knowledge and outlook. *Parasitol Res* 87 (2001), 778-780

44. Harms-Zwingenberger G, Bienzle U: Leishmaniosen. In: Lang W, Löscher T (Hrsg.): Tropenmedizin in Klinik und Praxis. 2. neubearb. Auflage. Thieme, Stuttgart, New York, **2000**. S. 37-49
45. Harborne J B: Ökologische Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1995**
46. Hoppe HA: Drogenkunde: Handbuch der pflanzlichen und tierischen Rohstoffe. 7. Auflage. Cram, de Gruyter & Co, Hamburg, **1958**, S. 83
47. Jones M M, Singh PK, Lane JE, Rodrigues RR, Nasset A, Suarez CC, Bogitsh BJ, Carter CE: Inhibition of Trypanosoma cruzi epimastigotes in vitro by iron chelating agents. *Arzneim Forsch* 46 (**1996**), 1158-1162
48. Kaminsky R, Brun R: In vivo and in vitro activities of trybazine hydrochloride against various pathogenic trypanosome species. *Antimicrob Agents Chemother* 42 (**1998**), 2858-2862
49. Kaminsky R, Schmid C, Brun R: An „in vitro selectivity index“ for evaluation of cytotoxicity of antitrypanosomal compounds. *In Vitro Toxicol* 9 (**1996**), 315-324
50. Kayser O, Kiderlen AF, Brun R: In vitro activity of aurones against Plasmodium falciparum strains K1 und NF54. *Planta Med* 67 (**2001**), 718-21
51. Khaw M, Panosian CB: Human antiprotozoal therapy: past, present and future. *Clin Microbiol Rev* 8 (**1995**), 427-43.
52. Kierszenbaum F: Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Rev* 12 (**1999**), 210-223
53. v. Kirchhoff L: Trypanosoma species (American trypanosomiasis, Chagas' disease): Biology of trypanosomes. In: Mandell, GL (Hrsg.): Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 4. Aufl. Churchill Livingstone, New York **1995**. S. 2442-2450
54. Knobloch J: Trypanosomiasis. In: Knobloch J (Hrsg.) Tropen und Reisemedizin. Gustav Fischer, Jena (usw.), **1996**. S. 257-271
- Lang W: Malaria. In: Lang W, Löscher T (Hrsg.): Tropenmedizin in Klinik und Praxis. 2. neubearb. Auflage. Thieme, Stuttgart, New York, **2000**. S.10-33.
55. Löscher T: Wichtige Medikamente in der Tropenmedizin. In: Lang W, Löscher T (Hrsg.): Tropenmedizin in Klinik und Praxis. 2. neubearb. Auflage. Thieme, Stuttgart, New York, **2000**. S. 664-690
56. Lucius R, Loos-Frank B: Parasitologie: Grundlagen für Biologen, Mediziner und Veterinärmediziner. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **1997**. S. 39-62
57. Luque F, Fernández-Ramos C, Entrala E, Rosales MJ, Navarro JA, Romero MA, Salas JM, Sánchez-Moreno M: In vitro evaluation of newly synthesized (1,2,4)triazolo(1,5a)pyrimidine derivatives against T. cruzi, Leishmania donovani and Phytomonas staheli. *Comp Biochem Physiol Part C* 126 (**2000**), 39-44

58. Martin MB, Grimley JS, Lewis JC, Heath HAT, Bailey BN, Kendrick H, Yardley V, Caldera A, Lira R, Urbina JA, Moreno SNJ, Docampo R, Croft SL, Oldfield E: Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: A potential route to chemotherapy. *J Med Chem* 44 (2001), 909-916
59. Masana M, de Toranza EG, Castro JA: Reductive metabolism and activation of benznidazole. *Biochem Pharmacol* 33 (1984), 1041-1045
60. Medina E, Spitteller G: Konstitutionsaufklärung des Melochinins, eines Pyridon-Alkaloids neuen Typus aus *Melochia pyramidata* L. (Sterculiaceae). *Chem Ber* 112 (1979), 376-81
61. Muegla-Serrano S, Le-Senne A, Fernández-Portillo C, Nogal JJ, Ochoa C, Gómez-Barrio A: In vitro and in vivo anti-*Trypanosoma cruzi* activity of a novel nitro-derivative. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97 (2002), 553-557
62. Muegla-Serrano S, Pérez-Serrano J, Gómez-Barrio A, Arán VJ, Rodríguez-Caabeiro F: Ultrastructural alterations induced by nifurtimox and another nitro derivative on epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 88 (2001), 97-101
63. Murta SM, Romanha AJ: In vivo selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology* 116 (1998), 165-71
64. Murta SM, Ropert C, Alves RO, Gazzinelli RT, Romanha AJ: In vivo treatment with Benznidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. *Parasite Immunol* 21 (1999), 535-44
65. Nakajima-Shimada J, Hirota Y, Aoki T: Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells by purine and pyrimidine analogs. *Antimicrob Agents Chemother* 40 (1996), 2455-2458
66. Navarra M, Cisneros-Fajardo E, Lehmann T, Sánchez-Delgado RA, Atencio R, Silva P, Lira R, Urbina JA: Towards a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases: 6. Synthesis and characterization of new copper (II) and gold (I) clotrimazole and ketoconazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*. *Inorg Chem* 40 (2001), 6879-6884
67. Neal JA, Croft SL: An in vitro system for determining the activity of compounds against the intracellular amastigote form of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* 14 (1984), 463-475
68. Olivieri NF, Brittenham GM, McLaren CE, Templeton DM, Cameron RG, Burt AD, Fleming KA: Long-term safety and effectiveness of iron-chelating therapy with Deferiprone for thalassaemia major. *N Engl J Med* 339 (1998), 417-423
69. Oppenheimer FR, Michels PA: Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drug targets. *Int J Parasitol* 31 (2001), 482-90
70. Pedrosa RC, De Bem AF, Locatelli C, Pedrosa RC, Geremias R, Wilhelm Filho D: Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. *Redox Rep* 6 (2001), 265-70

71. Perry LM: Medical plants from east and southeast asia: Attributed properties and uses. The MIT Press Cambridge, MA. **1980**, S. 137-138
72. Phillips RS: Current status of malaria and potential for control. *Clin Microbiol Rev* 14 (**2001**), 208-226
73. Piaggio E, Roggero E, Pitashny M, Wietzerbin J, Bottasso OA, Revelli SS: Treatment with benznidazole and its immunomodulating effects on *Trypanosoma cruzi*-infected rats. *Parasitol Res* 87 (**2001**), 539-555
74. Piaggio E, Sancéau J, Revelli S, Bottasso O, Wietzerbin J, Serra E: Trypanocidal drug Benznidazole impairs lipopolysaccharide induction of macrophage nitric oxide synthase gene transcription through inhibition of NF- κ B activation. *J Immunol* 167 (**2001**), 3422-3426
75. Rajaskariah, GHR: WorldLeish II: impressions from a 'new leishmaniac'. *Trends Parasitol* 17 (**2001**), 403-405
76. Revelli SL, Le Page C, Piaggio E, Wietzerbin J, Bottasso O: Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages. *Clin Exp Immunol* 118 (**1999**), 271-277
77. Roberts WL, Berman JD und Rainey PM: In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrob Agents Chemother* 39 (**1995**), 1234-1239
78. Rätz B, Iten M, Grether-Bühler Y, Kaminsky R, Brun R: The Alamar Blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T. b. rhodesiense* and *T. b. gambiense*) in vitro. *Acta Tropica* 54 (**1997**), 139-147
79. Salmon-Chemin L, Buisine E, Yardley V, Kohler S, Debreu MA, Landry V, Sergheraert C, Croft SL, Krauth-Siegel RL, Davioud-Charvet E: 2- and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: synthesis and correlation between redox cycling activities and in vitro cytotoxicity. *J Med Chem* 44 (**2001**), 548-565
80. Sauerteig E, Weinke T: Amerikanische Trypanosomiasis. In: Lang W, Löscher T (Hrsg.): Tropenmedizin in Klinik und Praxis. 2. Neubearb. Auflage. Thieme, Stuttgart, New York, **2000**. S. 59-67
81. Sepúlveda-Boza S, Cassels BK: Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med* 62 (**1996**), 98-105
82. Schuster JP, Schaub GA: Experimental Chagas disease: the influence of sex and psychoneuroimmunological factors. *Parasitol Res* 16 (**2001**), 77-82
83. Singh PK, Jones MM, Lane JE, Nasset A, Zimmerman LJ, Ribeiro-Rodrigues R, Richter A, Stenger MR, Carter CE: Synthesis and in vitro trypanocidal activity of some novel iron chelating agents. *Arzheim Forsch* 47 (I) (**1997**), 311-315
84. Steglich W, Fugmann B, Lang-Fugmann S (Hrsg.): Römpp Lexikon Naturstoffchemie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, **1997**, S. 428, 581

85. Tinto WF, Blyden G, Reynolds WF, McLean S: Constituents of *Hyeronima alchorneoides*. *J Nat Prod* 54 (1991), 1309-1313
86. Urbina JA: Chemotherapy of Chagas' disease: the how and why. *J Mol Med* 77 (1999), 332-338
87. Urbina JA, Lira JA, Visbal G, Batrolí J: In vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 44 (2000), 2498-2502
88. Urbina JA, Payara G, Contreras LM, Liendo A, Sanoja C, Molina J, Piras M, Piras R, Perez N, Wincker P, Loebenberg D: Antiproliferative effects and mechanisms of action of SCH 56592 against *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*: In vitro and in vivo studies. *Antimicrob Ag Chemother* 42 (1998), 1771-1777
89. Villar JC, Marin-Neo JA, Ebrahim S, Yusuf S: Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic *Trypanosoma cruzei* infection (Cochrane review). In: *The Cochrane Library* , 1, 2002. Oxford: Update Software
90. Webster GL: Synopsis of the Genera and Suprageneric Taxa of Euphorbiaceae. *Ann Missouri Bot Gard* 81 (1994), 33-144
91. Welburn SC, Fèvre EM, Coleman PG, Odiit M und Maudlin I: Sleeping sickness: a tale of two diseases. *Trends Parasitol* 17 (2001), 19-24
92. Werbowetz KA: Target-based drug discovery for Malaria, Leishmaniasis and Trypanosomiasis. *Curr Med Chem* 7 (2000), 835-860
93. WHO Fact Sheet No 116 (2000); <http://www.who.int/inf-fs/en/fact116.html>
94. WHO/ TDR: Chagas disease (2001); <http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm>
95. WHO/ TDR: New drug targets and leads for kinetoplastid drug discovery. TDR News 62 (2000); <http://www.who.int/tdr/publications/tdrnews62/kinetoplastid.htm>
96. Willcox ML, Cosentino MJ, Pink R, Bodeker G and Wayling S: Natural products for the treatment of tropical diseases. *Trends Parasitol* 17 (2001), 58-60

7 Thesen

1. Antidesmon, ein neuartiges pflanzliches Alkaloid, wurde auf seine Wirkung gegen humanpathogene Protozoen *in vitro* getestet.
2. Es fand sich eine bisher unbekannte Wirkung auf *Trypanosoma cruzi*, den Erreger der Chagas-Krankheit, für Antidesmon (IC50-Wert 0,04 µg/ml), die die Wirkung des Standardmedikamentes Benznidazol (IC50-Wert 0,6 µg/ml) übertraf.
3. Antidesmon zeigte keine wesentliche Wirkung gegen zwei weitere humanpathogene Trypanosomenspezies, *T. brucei rhodesiense* und *T. evansi*.
4. Zur genaueren Untersuchung dieses ungewöhnlich wirksamen Naturstoffes wurden sieben neu synthetisierte Antidesmon-Derivate sowie zwei natürliche Derivate vergleichend mit Antidesmon und einer Referenzsubstanz auf ihre antiparasitäre Aktivität *in vitro* untersucht.
5. Das Derivat AdOMeb wirkte in einer 90fach niedrigeren Konzentration als Benznidazol auf *T. cruzi* und übertraf mit einem IC50-Wert von 0,007 µg/ml die Wirksamkeit der Muttersubstanz Antidesmon. Zwei weitere Derivate, AdOL und AdAc, wirkten ebenfalls in niedrigerer Konzentration als Benznidazol.
6. In einem Zytotoxizitätstest konnte ausgeschlossen werden, daß die Aktivität der wirksamen Substanzen auf einer Schädigung der murinen Wirtszellen der Parasiten beruht. Für Antidesmon und AdOMeb ergaben sich hohe Werte für den Selektivitätsindex, ein Hinweis auf eine spezifische antiparasitäre Wirkung.
7. Antidesmon und AdoMeb zeigten schwache Wirksamkeit gegen *Leishmania donovani*, einen Erreger der viszeralen Leishmaniose.
8. Keine der Testsubstanzen erwies sich als aktiv gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum*.
9. Im Zytotoxizitätstest mit humanen und murinen Zelllinien lag die Toxizität von Antidesmon zwischen der für die Vergleichssubstanzen Benznidazol und Mefloquin. 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.
10. Mit Antidesmon wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Leitstruktur zur Entwicklung dringend benötigter Medikamente gegen *T. cruzi* gefunden. Durch N-Methylierung am ersten Ring des Bicyclus konnte die Wirksamkeit der Muttersubstanz um das Fünffache gesteigert werden; gleichzeitig verringerte sich die Toxizität auf Säugetierzellen. Für die Wirkung von Antidesmon und seinen Derivaten wurde in Deutschland und international ein Patent erteilt.

Lebenslauf

- Name: Anke HÄRING
- Geburtsdatum, -ort: 10.6.1974, Hagen (NRW)
- Adresse: Jahnstr. 7, 06112 Halle
- Familienstand: ledig
- Schulbildung: Grundschule Hagen- Haspe (1980-84)
Gymnasium Hagen/ Hohenlimburg (1984-1993)
Abitur 1993 (Note 2)
- Universitäre Ausbildung: Seit 1995 Studium der Humanmedizin an der Martin- Luther-
Universität Halle- Wittenberg
- Ärztliche Vorprüfung 1997 (Note 2)
 - Erstes Staatsexamen 1998 (Note 2)
 - Zweites Staatsexamen 2001 (Note 2)
 - 10/2001 – 10/2002 Praktisches Jahr
 - 1. Terial Innere Medizin (St. Elisabeth, Halle)
 - 2. Terial Dermatologie (Universitätsklinik Halle)
 - 3. Terial Chirurgie (Kantonsspital Bruderholz, CH)
 - Drittes Staatsexamen 2003 (Note 1)
- Klinische Ausbildung: Seit Januar 2003 Ärztin im Praktikum in der Universitätsklinik für
Dermatologie und Venerologie Leipzig
- Sonstige Ausbildung und Tätigkeiten:
- Tutorin im Präparierkurs und im Kurs der Medizinischen Mikrobiologie (1998/ 2000)
 - Famulaturen: Innere Medizin, Unfallchirurgie, Gynäkologie, Dermatologie (Halle), Tropenmedizin (Leipzig, Tübingen)

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angaben der Quellen gekennzeichnet. Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung dieser Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Anke Häring

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Dr. Kekulé für die Stellung des Themas und seine hervorragende fachliche und persönliche Betreuung danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Reto Brun vom Schweizer Tropeninstitut für die Möglichkeit, Versuche im Protozoologie-Labor des Tropeninstitutes durchzuführen, sowie für seine freundliche Betreuung und Unterstützung. Elke Gobright und Christian Scheurer möchte ich herzlich danken für die ausserordentlich gute Einweisung und Betreuung im Protozoologie-Labor.

Herrn Dr. Alexander Buske möchte ich besonders danken für die Bereitstellung von Antidesmon und den Antidesmon-Derivaten, ferner für seine hervorragende und ausführliche Beratung in chemischen und biochemischen Aspekten.