

WIRKSSTOFF-FORSCHUNG

Neuer Wirkstoff gegen Leishmaniosen und Trypanosomen entwickelt

Vernachlässigte Krankheiten kommen vor allem in armen Ländern der Tropen und Subtropen vor. Zur Bekämpfung dieser Krankheiten stehen häufig nur veraltete und minder wirksame Medikamente zur Verfügung. Neue Präparate, die billiger, effektiver, verträglicher und leichter verabreichbar sind als die bisherigen Mittel, werden dringend benötigt. Ein neu entwickelter Wirkstoff gibt jetzt Hoffnung als Breitbandtherapeutikum zur Behandlung von drei tödlichen parasitären Infektionskrankheiten.

Schlafkrankheit (afrikanische Trypanosomose), Chagaskrankheit (amerikanische Trypanosomose) und Leishmaniosen gehören zu den armutsassoziierten, vernachlässigten Tropenkrankheiten (neglected tropical diseases, NTDs). Diese Infektionskrankheiten werden durch die verwandten parasitischen Protozoen *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* und *Leishmania* sp. aus der Familie der Trypanosomatidae (Ordnung Kinetoplastida) verursacht und durch Insekten übertragen (Tab.). Über 1 Millionen Menschen erkranken jährlich an der Schlafkrankheit, der Chagaskrankheit oder der Leishmaniose und etwa 50 000 Betroffene sterben an den Infektionen [1]. Zur Behandlung der Leishmaniosen und Trypanosomen stehen nur wenige Medikamente zur Verfügung (Tab.), die alle veraltet sind und zum Teil erhebliche Nebenwirkungen zeigen. Da die Trypanosomatiden biologisch und genetisch sehr ähnlich sind, sollte es prinzipiell möglich sein, einen Wirkstoff zu finden, mit dem alle drei Parasitosen behandelt werden können.

Nun hat ein Forscherteam vom Genomics-Institut der Novartis-Forschungstiftung in San Diego, Kalifornien, USA, einen neuen Arzneistoff entwickelt, der gegen die Erreger der Schlafkrankheit, Chagaskrankheit und Leishmaniosen wirksam ist [2]. Dazu testeten die Forscher zunächst eine Bibliothek mit 3 Millionen Substanzen und fahndeten nach Verbindungen, die das Wachstum von *T. brucei*, *T. cruzi* und *L. donovani* in der Zellkultur hemmten. Bei dem Screening wurde eine 2-Phenylloxazolo[4,5-b]pyridin-Verbindung (GNF5343, Abb.) als eine gegenüber den drei Parasiten wirksame Substanz identifiziert. Um die Bioverfügbarkeit und die Selektivität von GNF5343 zu optimieren, wurden etwa 3000 Derivate der Verbindung konzipiert und synthetisiert. Es wurde eine Substanz (GNF6702, Abb.) identifiziert, die die Zellproliferation der Parasiten mit halbmaximalen Wachstumshemmkonzentrationen von 18 bis 120 nM inhibierte, ohne jedoch die Zellvermehrung von Säugetierzellen zu beeinflussen. In Tierversuchen konnten die Forscher schließlich nachweisen, dass mit den Parasiten infizierte Mäuse erfolgreich mit GNF6702 therapiert werden konnten. Darüber hinaus tolerierten die Mäuse die Behandlung mit der Verbindung sehr gut.

Um den Wirkmechanismus von GNF6702 zu entschlüsseln, erzeugten die Forscher mit den analog wirksamen Verbindungen GNF3943 und GNF8000 (frühere Analoga der Serie, Abb.) gegen diese Stoffgruppe resistente *T. cruzi*-Parasiten. Dazu wurden die Parasiten in Gegenwart steigender Konzentrationen von GNF3943 oder GNF8000 kultiviert, bis eine deutliche Resistenz gegenüber den Verbindungen erzielt wurde. Im Vergleich zu Wildtypparasiten zeigten die mutierten Parasiten eine 40fache geringere Sensitivität gegenüber GNF6702. Die Sequenzierung des kompletten Genoms der resistenten Parasiten offenbarten nur wenige Mutationen, u. a. in der β 4-Untereinheit des Proteasoms. Da das Proteasom als Abfallentsorgungsenzym eine lebenswichtige Aufgabe in jeglicher Zelle erfüllt [3], vermuteten die Forscher, dass dieser Enzymkomplex der Angriffspunkt von GNF6702 ist. Um dies zu beweisen, wurden Hemmstudien mit gereinigtem *T. cruzi*-Proteasom durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass die chymotrypsinähnliche Aktivität des Proteasoms durch GNF6702 inhibiert wurde ($IC_{50} = 35$ nM), während die trypsinähnliche und die caspaseähnliche Aktivitäten sich nicht durch die Verbindung beeinflussen ließen

(IC₅₀ > 10 µM). Da die chymotrypsinähnliche Aktivität mit der β5-Untereinheit des Proteasoms assoziiert ist, aber die resistenten *T. cruzi*-Parasiten Mutationen in der nicht katalytisch aktiven β4-Untereinheit aufwiesen und weiterhin sensitiv gegenüber prototypischen Proteasomhemmstoffen wie Bortezomib und MG132 waren, nahmen die Forscher an, dass GNF6702 kein kompetitiver Inhibitor sein konnte. Kinetische Analysen lieferten schließlich den Beweis, dass GNF6702 ein nichtkompetitiver Inhibitor mit einem K_i-Wert von 79 nM ist. Vermutlich blockiert GNF6702 die chymotrypsinähnliche Aktivität dadurch, dass die Substanz an der Nahtstelle der β4- und β5-Untereinheiten bindet, ohne dabei die Substratbindung zu beeinflussen. Mutierte β4-Untereinheiten scheinen nicht mehr in der Lage zu sein, GNF6702 zu binden, was die Insensibilität der resistenten *T. cruzi*-Parasiten gegenüber der Substanz erklären würde. Diese Vermutung wird durch die Unempfindlichkeit des menschlichen Proteasoms gegenüber GNF6702 bestätigt. Denn die β4-Untereinheit des menschlichen Proteasoms hat an der Position 29 ein Methionin, die gleiche Aminosäure, die auch an der entsprechenden Position bei der mutierten β4-Untereinheit (I29M Mutation) bei einer der resistenten *T. cruzi*-Parasiten gefunden wurde.

Schließlich überprüften die Forscher noch, ob GNF6702 auch das Proteasom in intakten Parasiten-Zellen inhibierte. Eine Hemmung des Proteasoms geht gewöhnlich mit einer intrazellulären Anreicherung von ubiquitinierten Proteinen einher. Wie erwartet, führte eine Behandlung von *T. cruzi* mit der Verbindung zu einer deutlichen Zunahme von ubiquitinierten Proteinen in den Parasiten. Im Gegensatz dazu wurde keine Anhäufung von ubiquitinierten Proteinen in Säugetierzellen nach Behandlung mit GNF6702 gefunden. Dieses Ergebnis bestätigte letztendlich das Proteasom als Zielmolekül von GNF6702 und die hohe Selektivität der Verbindung.

Dieses Medikamentenentwicklungsprogramm hat auf eindrucksvolle Weise einmal mehr aufgezeigt, welch enormer Aufwand nötig ist, um einen neuen Arzneistoff zu entwickeln. Obwohl GNF6702 in der Lage ist, Mäuse von einer Trypanosomen- bzw. Leishmanien-Infektion zu heilen, ist die Substanz jedoch kaum wirksamer als die schon vorhandenen Mittel. Ob sich GNF6702 (oder davon abgeleitete Analoga) zu einem neuen Medikament zur Therapie der Schlafkrankheit, der Chagaskrankheit und/oder der Leishmaniosen entwickeln lässt, werden klinische Studien zeigen müssen. Weil diese Studien langwierig und teuer sind, und lediglich die ärmsten Menschen in der Welt von diesen vernachlässigten Krankheiten betroffen sind, ist es jedoch fraglich, ob am Ende ein neues Medikament gegen diese Parasitosen zur Verfügung stehen wird. Da verwandte Trypanosomen auch die Tierseuchen Nagana und Surra verursachen, und die Anforderungen an ein Tierarzneimittel gewöhnlich geringer sind, wäre eine alternative Möglichkeit, GNF6702 zunächst in ein Medikament zur Therapie dieser Tierkrankheiten zu entwickeln. Später wäre möglicherweise auch ein Einsatz in der Humanmedizin denkbar, wie zum Beispiel bei dem Wirkstoff Ivermectin, der primär gegen Wurmparasiten von Nutztieren entwickelt wurde, ehe er zur Behandlung von humanen Helminthosen (insbesondere der Flussblindheit in Afrika und Südamerika) zur Anwendung kam.

[1] World Health Organization, Third WHO Report on Neglected Tropical Diseases, 2015. –

[2] S. Khare et al., *Nature* **537**, 229 (2016). – [3] D. Steverding, *Chem unserer Zeit*, **46**, 218 (2012).

PD Dr. Dietmar Steverding, Norwich, England

Tab. Trypanosomen und Leishmaniosen des Menschen.

Krankheit	Schlafkrankheit	Chagaskrankheit	Hautleishmaniose	Schleimhaut-leishmaniose	Viszerale Leishmaniose
Erreger	<i>T. b. gambiense</i> <i>T. b. rhodesiense</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>L. aethiopica</i> ^a <i>L. columbiensis</i> ^b <i>L. lainsoni</i> ^b <i>L. lindenbergi</i> ^b <i>L. major</i> ^{a,c} <i>L. mexicana</i> ^b <i>L. naffi</i> ^b <i>L. tropica</i> ^{a,c} <i>L. shawi</i> ^b <i>L. venezuelensis</i> ^b	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. peruviana</i>	<i>L. donovani</i> ^a <i>L. infantum</i> ^{a,b}
Insektvektor	Tsetsefliegen (<i>Glossina</i> sp.)	Raubwanzen (<i>Triatoma</i> sp., <i>Rhodnius</i> sp., <i>Panstrongylus</i> sp.)	Sandmücken (^{a,c} <i>Phlebotomus</i> sp., ^b <i>Lutzomyia</i> sp.)	Sandmücken (<i>Lutzomyia</i> sp.)	Sandmücken (^a <i>Phlebotomus</i> sp., ^b <i>Lutzomyia</i> sp.)
Geographische Verbreitung	Afrika südlich der Sahara	Lateinamerika	^a Afrika, ^b Lateinamerika, ^c Asien	Lateinamerika	^a Europa, Afrika, Asien, ^b Lateinamerika
Behandlung	Eflornithin, Melarsoprol, Nifurtimox, Pentamidin, Suramin	Benznidazol, Nifurtimox	Allopurinol, Amphotericin B, Glucantim, Miltefosin, Paromomycin, Pentamidin, Pentostam, Imidazolverbindungen (z. B. Fluconazol)		

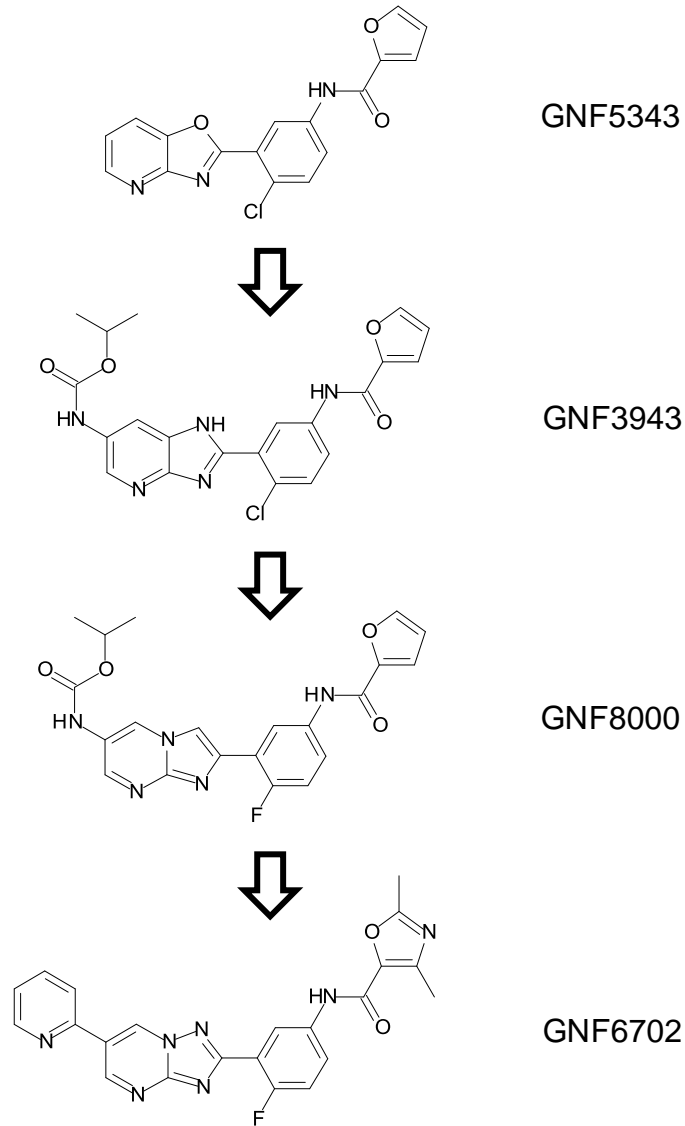


Abb. Entwicklung des Wirkstoffmoleküls GNF6702 ausgehend von der Substanz GNF5343 durch schrittweise Optimierung (künstliche Evolution). Die Substanzen GNF3943 und GNF8000 dienten zur Enschlüsselung des Wirkmechanismus.