

Christian Franz Schleger  
Dr. med.

### **In-vivo-Untersuchungen zur antiretroviralen Wirkung des Etherlipid-Nukleotid-Konjugates BM 21.1290**

Geboren am 08.01.1967 in Groß Döbern/Oberschlesien

Reifeprüfung am 10.06.1986 in Mannheim

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1987/88 bis WS 1994/95

Physikum am 31.08.1989 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium im Klinikum Mannheim

Praktisches Jahr im Diakonissenkrankenhaus Mannheim und an der University of Utah, School of Medicine, Salt Lake City, U.S.A.

Staatsexamen am 10.05.1994 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pharmakologie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. D.B.J. Herrmann

BM 21.1290 ist ein Thioetherlipid-AZT-Konjugat, das von der Firma Boehringer Mannheim GmbH als neues Arzneimittel zur Therapie von HIV-Infektionen entwickelt wird.

In In-vitro-Versuchen wurde die antiretrovirale Wirksamkeit von BM 21.1290 an verschiedenen HIV-1- und HIV-2-infizierten humanen Zelllinien nachgewiesen. BM 21.1290 zeigte im Vergleich zur Referenzsubstanz AZT einen wesentlich größeren therapeutischen Index.

In dieser Arbeit wurde in vivo der Wirksamkeitsnachweis und die Verträglichkeit von BM 21.1290 im Friend-Leukämie-Virus (FLV)- Modell untersucht. Als Versuchstiere wurden FLV-sensitive, weibliche Balb/c-Mäuse eingesetzt. Die wichtigsten Parameter für den Krankheitsverlauf und Therapieerfolg waren die virusinduzierte Splenomegalie, Erythroleukämie (gemessen als WBC), Thrombozytopenie, die RT-Titer im Serum und die Überlebenszeit der Versuchstiere. Die Verträglichkeit wurde an den gleichen Versuchstieren durch Bestimmung von Knochenmarkzellularität, verschiedener hämatologischer Parameter (WBC, Plt, RBC, MCH, MCHC, MCV, Hb und Hkt) und des Körpergewichtes erfaßt.

Die Milzgewichte der FLV-infizierten und mit PBS-scheintherapierten Mäuse war mit durchschnittlich  $1.98 \pm 0.18$  g etwa 19 mal schwerer als Milzen gesunder Balb/c-Mäuse. BM 21.1290 war im murinen FLV-Modell sowohl unter „prophylaktischen“ als auch therapeutischen Bedingungen stärker antiretroviral wirksam als AZT. Unter „prophylaktischer“ Gabe (Therapie von Tag 0 bis Tag +13 p.i.) mit  $12.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$  lag die Hemmung der virusinduzierten Splenomegalie bei 88% in der mit BM 21.1290 therapierten Gruppe im Vergleich zu 78% bei den mit AZT therapierten Tieren ( $12.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$ ). Unter therapeutischen Bedingungen (Therapie von Tag +3 bis Tag +13 p.i. bzw. von Tag +7 bis Tag +13 p.i.) war mit BM 21.1290 im Gegensatz zu AZT immer noch eine hochsignifikante ( $p \leq 0.01$ ), dosisabhängige Hemmung der Splenomegalie zu beobachten. Der Therapieerfolg unter BM 21.1290 war dabei sowohl von der Virusdosis als auch vom Zeitpunkt des Therapiebeginns p.i. abhängig. Unter identischen Bedingungen war mit AZT ( $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$ ) bei Therapiebeginn am Tag +3 p.i. lediglich noch eine schwach signifikante, bei Start der  $12.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$  Applikation am Tag +7 p.i. keine Hemmung der Splenomegalie zu erreichen. Die hier vorgestellten Überlebenszeit-Experimente im FLV-Modell mit einer Nachbeobachtungszeit von 400 Tagen bestätigen den für BM 21.1290 gegenüber AZT anhand von Surrogatparametern beobachteten Therapievorteil. Die mediane Überlebenszeit der scheintherapierten Kontrolltiere betrug 19 Tage. 9 von 10 Mäuse, die mit  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$  BM 21.1290 behandelt wurden, lebten noch nach 400 Tagen. In der entsprechenden AZT-Gruppe überlebten lediglich 4 von 10 Mäusen den Beobachtungszeitraum. Unter den eingesetzten Dosen war keine Knochenmarktoxizität zu beobachten. Ebenfalls konnte keine Körpergewichtsreduktion als Ausdruck der Toxizität der eingesetzten Substanzen nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluß von BM 21.1290 im Vergleich zu AZT auf die Immunantwort gegen SRBC in gesunden und in FLV-infizierten Mäusen untersucht. Die T-zellabhängige humorale Immunantwort wurde in diesen Versuchen anhand eines modifizierten solid-phase-ELISA nach Mori verfolgt. Die Untersuchungen zeigten, daß in gesunden Mäusen BM 21.1290 bzw. AZT keinen Einfluß auf die Anti-SRBC-IgM- und -IgG-Antikörpertiter nach SRBC-Immunisierung haben. In infizierten Tieren jedoch, welche durch das Virus in ihrer Immunantwort deutlich supprimiert sind, zeigten die Testsubstanzen antiretrovirale Wirksamkeit. In diesen Versuchen bestätigte sich, daß die virusinduzierte Suppression der humoralen Immunantwort unter Therapie mit BM 21.1290 dosisabhängig vollkommen restauriert werden kann. Die Behandlung mit den entsprechenden AZT-Dosen führte dagegen nicht zu einer Restauration des Immunsystems. Darüber hinaus konnte die deutlich bessere antiretrovirale Wirksamkeit von BM 21.1290 im Vergleich zu AZT hinsichtlich Reduktion der virusinduzierten Splenomegalie,

Reduktion der RT-Aktivität im Serum und Restauration der hämatologischen Parameter auch im „kombinierten“ FLV- SRBC- Tiermodell reproduziert werden.

Der therapeutische Vorteil von BM 21.1290 im Vergleich zu AZT im murinen FLV-Modell läßt sich u.a. anhand der besseren Pharmakokinetik von BM 21.1290 erklären. Die Halbwertszeit von BM 21.1290 im Plasma von Mäusen beträgt ca. 4-6 h, die von AZT nur 20 min. Herrmann et al. konnten nachweisen, daß BM 21.1290 in Zellen nicht zu AZT, sondern direkt zu AZT-Monophosphat und dem korrespondierendem Lipidanteil gespalten wird. AZT-Monophosphat kann aufgrund einer negativen Ladung die Zellmembran nicht mehr nach extrazellulär passieren. AZT hingegen ist ungeladen und kann die Zellmembran frei passieren. Aufgrund des AZT-Konzentrationsgefälles diffundiert AZT aus der Zelle wieder heraus.

Basierend auf den hier vorgelegten In-vivo-Daten sowie auf einer Vielzahl weiterer In-vitro- und In-vivo-Ergebnisse zu BM 21.1290 wurde diese Substanz inzwischen in drei klinischen Studien an ARC/AIDS-Patienten geprüft. Dabei konnte die gute Verträglichkeit sowie die bessere antiretrovirale Potenz von BM 21.1290 am Patienten bestätigt werden.