

Inhibitoren des Endocannabinoid-Abbaus: potenzielle Therapeutika neurologischer Störungen

Michaela Wendeler und Thomas Kolter*

Stichwörter:

Cannabinoide · Lipide · Medizinische Chemie · Neurochemie · Wirkstoff-Design

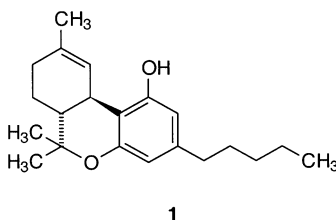
Einleitung

Zubereitungen der Hanfpflanze *Cannabis sativa* finden seit langem als Heil- und Rauschmittel Verwendung. So sind ihre getrockneten Blütenspitzen als Marihuana und ihr getrocknetes Harz als Haschisch bekannt. Seit sechs Jahrzehnten werden auch Chemie und physiologische Wirkungen der Cannabinoide erforscht. In jüngster Zeit richtete sich das Forschungsinteresse verstärkt auf Cannabinoid-Rezeptoren im menschlichen Körper und ihre endogenen Lipid-Liganden. Es mehren sich Hinweise darauf, dass die Beeinflussung des Endocannabinoid-Stoffwechsels neuartige Möglichkeiten zur Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen wie Schmerz, Krebs, Epilepsie und Multiple Sklerose schafft. Kürzlich ist eine Serie hochwirksamer Inhibitoren des Endocannabinoid-Abbaus synthetisiert worden, die die Entwicklung neuer Medikamente gegen Angst und neurologische Störungen versprechen.^[1]

Cannabinoide und ihre Rezeptoren

Der Konsum von Cannabinoiden zieht ein äußerst komplexes Spektrum pharmakologischer Wirkungen nach sich, die sie zur Behandlung der Symp-

tome nahezu jeder Erkrankung interessant erscheinen lassen: Sie wirken beruhigend und stimmungsaufhellend, vermindern das Schmerzempfinden, unterdrücken Übelkeitsgefühle und Brechreiz, wirken appetitanregend, krampflösend und entspannen die Gefäßmuskulatur. Zugleich beeinträchtigen sie jedoch kognitive und motorische Funktionen und stören sensorische Empfindungen und das Kurzzeitgedächtnis.^[2] Die Ursachen der Cannabinoid-Wirkung sind erst in Teilen erforscht. Nach langjährigen Arbeiten konnte 1964 die Struktur des wichtigsten psychoaktiven Inhaltsstoffs von Marihuana, des (–)- Δ^9 -Tetrahydrocannabinols (**1**), aufgeklärt werden.^[3] Dies war



die Grundlage für die Synthese synthetischer Cannabinoid-Derivate, die zur Identifizierung des ersten Cannabinoid-Rezeptors, CB1, im Zentralnervensystem führten.^[4]

Ein weiterer Rezeptor, CB2, wurde 1993 entdeckt.^[5] Bei beiden Rezeptoren handelt es sich um Glycoproteine mit sieben Transmembranhelices, deren Stimulierung zur Aktivierung von G-Proteinen der $G_{i/o}$ -Familie führen. Über diesen Weg hemmen sie die Adenylatcyclase und damit die cAMP-Produktion und sind so an der Regulation zahlreicher Signaltransduktionswege beteiligt.^[6] Für CB1-Rezeptoren ist dar-

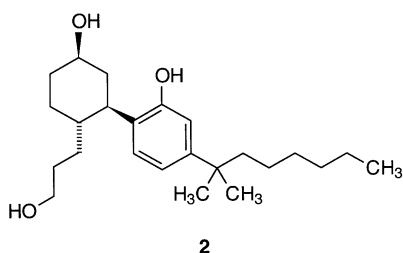
über hinaus die Hemmung spannungsabhängiger Calciumionenkanäle und die Aktivierung von Kaliumionenkanälen belegt. Während CB1 vorwiegend im Zentralnervensystem exprimiert wird und einer der häufigsten neuromodulatorischen Rezeptoren des Gehirns ist, kommt CB2 weitgehend auf Immunzellen vor und ist so an der Vermittlung der immunsuppressiven Wirkung von Cannabinoiden beteiligt.^[5]

Liganden von Cannabinoid-Rezeptoren

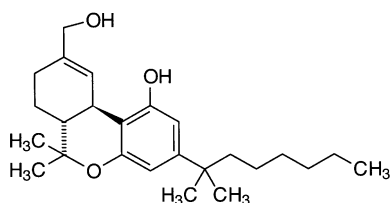
Agonisten von Cannabinoid-Rezeptoren lassen sich verschiedenen Stoffklassen zuordnen. **1** gehört zu einer Familie von über 60 bi- und tricyclischen Sekundärmetaboliten, die sich biosynthetisch von Geranylpyrophosphat und dem Polyketid Olivetol ableiten. Unter dem Namen Marinol wird **1** seit einiger Zeit zur Behandlung von Cytostatikabedingter Übelkeit und von Anorexie mit Gewichtsverlust bei AIDS-Patienten eingesetzt. Strukturelle Veränderungen am Cannabinoid-Gerüst führten zur Synthese und pharmakologischen Charakterisierung von über 300 Verbindungen.^[6] Viele binden sowohl an CB1- als auch an CB2-Rezeptoren, aber auch Liganden mit Selektivität für einen der beiden Rezeptortypen wurden synthetisiert.^[6]

Synthetische Analoga sind z.B. CP-55,940 (**2**), ein voller Agonist beider Rezeptoren mit 4- bis 50fach höherer Wirksamkeit als **1**, der in radiomarkierter Form die erste Charakterisierung des Cannabinoid-Rezeptors ermöglichte,^[7] sowie HU-210 (**3**), eines der zurzeit wirksamsten Cannabinoide.^[8] Agonis-

[*] Priv.-Doz. Dr. T. Kolter
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Universität Bonn
Gerhard-Domagk-Straße 1
53121 Bonn (Deutschland)
Fax: (+49) 228-73-7778
E-mail: tkolter@uni-bonn.de

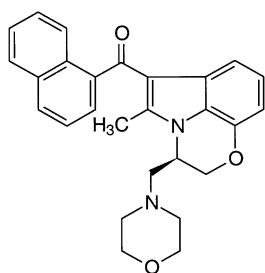


2

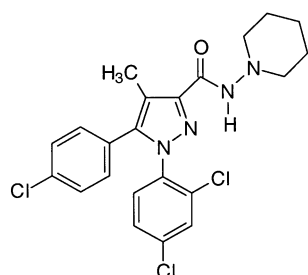


3

ten aus der Stoffklasse der Aminoalkylindole wie WIN-55,212-2 (**4**)^[9] und selektive Antagonisten des CB1-Rezeptors wie SR141716A (**5**)^[10] und des CB2-Rezeptors^[6] haben sich als wertvolle pharmakologische Werkzeuge erwiesen.



4

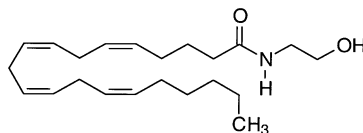


5

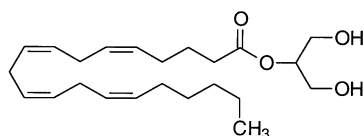
Endogene Cannabinoide

Einige körpereigene Lipide, die im Hirn von Säugern gebildet werden, konnten als endogene Liganden der Cannabinoid-Rezeptoren identifiziert

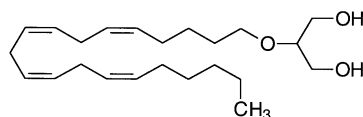
werden. Sie weisen ähnliche pharmakologische Wirkungen wie die Cannabinoid-Rezeptoragonisten pflanzlichen oder synthetischen Ursprungs auf, sind aber metabolisch weniger stabil. Als erstes endogenes Cannabinoid wurde *N*-Arachidonoyl ethanolamin (Anandamid, **6**)^[11] identifiziert, später kamen



6



7



8

2-Arachidonoylglycerol (**7**)^[12,13] und 2-Arachidonoylglycerylether (**8**) hinzu.^[14] Im Unterschied zu klassischen Neurotransmittern werden sie nicht in synaptischen Vesikeln gespeichert, sondern als rasche Antwort auf Membran-Depolarisation und Calcium-Einstrom von Nervenzellen synthetisiert.^[15] Dabei werden **6**^[16,17] und **7**^[18] aus unterschiedlichen Membranlipiden gebildet. Im Fall von **6** überträgt eine Transacylase Arachidonsäure von der *sn*1-Position von Phosphatidylcholin auf die Aminogruppe von Phosphatidylethanolamin. Anschließend wird **6** durch eine Phospholipase-D-Reaktion freigesetzt.

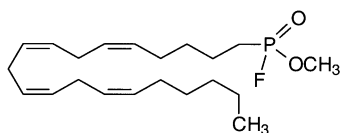
Eine weitere Besonderheit ist, dass endogene Cannabinoide vorwiegend retrograde synaptische Botenstoffe sind: Sie werden von postsynaptischen Neuronen freigesetzt, diffundieren über den synaptischen Spalt und aktivieren den CB1-Rezeptor auf präsynaptischen Nervenzellen.^[19] Die Endocannabinoid-Wirkung wird innerhalb weniger Minu-

ten^[20] durch intrazellulären Abbau terminiert: Endocannabinoide werden in einem proteinvermittelten,^[21] bidirektionalen Prozess durch die Plasmamembran transportiert,^[22] danach werden Anandamid (**6**) und verwandte Substanzen durch die Fettsäureamid-Hydrolase abgebaut.^[23]

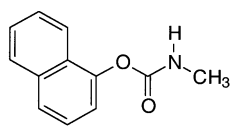
Fettsäureamid-Hydrolase

Konzentration und Wirkungsdauer einiger endogener Cannabinoide werden durch die membranständige Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH) reguliert, die vor allem in Hirn und Leber exprimiert wird. Gentechnisch veränderte Mäuse, bei denen die FAAH ausgeschaltet ist, weisen signifikant erhöhte Konzentrationen an Anandamid und verwandten Fettsäureamiden im Gehirn auf.^[24] Wird diesen Tieren Anandamid intraperitoneal (in die Bauchhöhle) appliziert, so zeigen sie ein Spektrum von CB1-abhängigen Effekten wie Hypomotilität, Katalepsie und Hypothermie. Auffallend ist das drastisch reduzierte Schmerzempfinden der Tiere, ein Effekt, der durch den CB1-Antagonisten **5** aufgehoben werden kann. Diese Resultate belegen eindrücklich, dass der Fettsäureamid-Hydrolase eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Anandamid-Wirkung zukommt und dass Anandamid das Schmerzempfinden beeinflusst. Damit gehören mit der FAAH und dem CB1-Rezeptor zwei Proteine des Endocannabinoid-Systems zu den Targets für die Entwicklung neuartiger Analgetika.^[25]

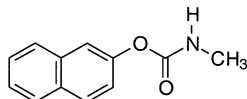
Die FAAH ist ein integrales Membranprotein, das als Homodimer aus zwei 63-kD-Untereinheiten aufgebaut ist. Sie konnte in Gegenwart des kovalenten Inhibitors Methoxyarachidonylfluorophosphonat (**9**) kristallisiert werden.^[26] Die Kristallstruktur zeigt, dass das aktive Zentrum sowohl von der cytosolischen Seite der Membran als auch von der wässrigen Phase des Cytosols zugänglich ist. Die nucleophile Seitenkette von Ser241 ist Teil einer ungewöhnlichen katalytischen Ser-Ser-Lys-Triade. Die Struktur des Enzyms lässt vermuten, dass die abzubauenen Fettsäureamide direkt aus der Membran in das aktive Zentrum des Enzyms gelangen, und nicht erst durch die



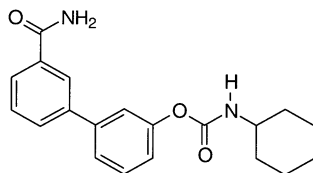
9



10



11



12

wässrige Phase zum Ort ihres Abbaus transportiert werden müssen.

Inhibitoren der Fettsäureamid-Hydrolase

Das Forschungsinteresse der letzten Jahre richtete sich besonders auf Inhibitoren der Fettsäureamid-Hydrolase mit dem Ziel, über die Hemmung des Abbaus die pharmakologisch gewünschte Endocannabinoid-Wirkung verstärken zu können. Derartige Wirkstoffe hätten den Vorteil, dass sie die unerwünschten psychotropen Effekte von Δ^9 -THC und anderen direkt wirkenden, exogenen Cannabinoid-Agonisten vermeiden.^[27] Bisher bekannte FAAH-Inhibitoren ließen allerdings die erforderliche Selektivität oder Bioverfügbarkeit vermissen^[28–30] oder sind in ihrer biologischen Wirkung noch unerforscht.^[31]

Piomelli et al. entwickelten nun eine neue Reihe selektiver FAAH-Inhibitoren auf Carbamat-Basis.^[1] Carbamate sind als kovalente Hemmstoffe von Serinesterasen bekannt. Auf diese Weise hemmt z.B. das Alkaloid der Kalabarbohne Physostigmin die Acetylcholinesterase.^[32] Als Leitstruktur diente der Acetylcholinesterase-Hemmstoff Carbaryl (10). Obwohl die Verbindung inaktiv war, wies ein Regioisomer der Verbindung, 11, eine schwache Hemmwirkung auf ($IC_{50} = 18.6 \mu M$), die durch den Ersatz des Methyl-Substituenten durch eine Cyclohexylgruppe noch verstärkt werden konnte. Weitere Optimierung der Leitstruktur führte zu URB597 (12), das mit einem IC_{50} -Wert von 4 nM

in Membranpräparationen und von 0.5 nM in intakten Neuronen die stärkste inhibitorische Wirkung auf die FAAH zeigte.

Kinetische Analysen lassen darauf schließen, dass ein nucleophiler Angriff des Serinrestes im aktiven Zentrum auf die Carbamat-Gruppe das Enzym irreversibel inaktiviert. Bemerkenswerterweise werden andere Serin-Hydrolasen nicht inhibiert. Im Tierversuch führten intraperitoneale Injektionen dieser Substanz bei Mäusen zu einer starken, konzentrationsabhängigen Hemmung der FAAH-Aktivität im Gehirn und einem signifikanten Anstieg der Konzentration von Anandamid und anderen Fettsäureethanolamiden. Damit ging eine angstlösende und mild analgetische Wirkung einher, die von dem CB1-Rezeptor-Antagonisten 5 aufgehoben werden konnte. Diese Experimente zeigen, dass dem Endocannabinoid-System eine Schlüsselrolle bei der Regulation emotionaler Zustände zukommt.

Ausblick

Trotz ihrer vielversprechenden Eigenschaften^[2] stehen einer breiten klinischen Anwendung von Cannabinoiden ihre unerwünschten psychotropen Nebenwirkungen entgegen. Eine Erhöhung der Endocannabinoid-Konzentration durch selektive Hemmung ihres Abbaus lässt diese Nebenwirkungen nicht in gleichem Maße befürchten, doch ist vor dem klinischen Einsatz von Inhibitoren die Komplexität des Endocannabinoid-Systems zu berücksichtigen:

Nicht nur Anandamid (6), auch weitere Fettsäureamide wie Palmitoylethanolamin, Oleamid und das schlafinduzierende N-Oleylethanolamin werden durch die FAAH abgebaut und können zusammen mit oxygenierten Metaboliten um den Endocannabinoid-Transporter konkurrieren. Rezeptoren für diese bioaktiven Lipide wurden noch nicht charakterisiert, doch dürfte eine Hemmung der FAAH auch andere Signalwege in der Zelle beeinflussen. Zusätzlich zu CB1- und CB2-Rezeptoren bindet Anandamid auch an den Vanilloid-Rezeptor mit teilweise gegenteiligen zellulären Wirkungen. Ferner gibt es Hinweise auf die Existenz nichtklassischer Cannabinoid-Rezeptoren,^[6] deren Einfluss auf Signaltransduktion und Zellgeschehen weitgehend unbekannt ist.

Außer zur Behandlung neurologischer Störungen versprechen Endocannabinoide vor allem in der Krebstherapie neue Behandlungsansätze. Wie auch ihre exogenen Analoga zeigen sie ausgeprägte Antitumoreffekte durch selektive Hemmung der Wachstumsfaktor-abhängigen Zellproliferation oder Induzieren von Apoptose.^[33] Hierbei sind insbesondere metabolisch stabile Analoga, die in sehr geringen, nichtpsychotropen Dosen appliziert werden können, oder solche, die die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren, von großem Interesse.

Die zunehmenden Resultate zum Wirkmechanismus der Endocannabinoide werden ihr pharmakologisches Potenzial erkennen lassen und die Entwicklung von Liganden mit verbesserten Eigenschaften erleichtern.

- [1] S. Kathuria, S. Gaetani, D. Fegley, F. Valino, A. Duranti, A. Tontini, M. Mor, G. Tarzia, G. L. Rana, A. Calignano, A. Giustino, M. Tattoli, M. Palmery, V. Cuomo, D. Piomelli, *Nat. Med.* **2003**, *9*, 76–81.
- [2] B. R. Martin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *301*, 790–796.
- [3] Y. Gaoni, R. Mechoulam, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1646–1647.
- [4] L. A. Matsuda, S. J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young, T. I. Bonner, *Nature* **1990**, *346*, 561–564.
- [5] S. Munro, K. L. Thomas, M. Abu-Shaar, *Nature* **1993**, *365*, 61–65.
- [6] A. C. Howlett, F. Barth, T. I. Bonner, G. Cabral, P. Casellas, W. A. Devane, C. C. Felder, M. Herkenham, K. Mackie, B. R.

- Martin, R. Mechoulam, R. G. Pertwee, *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 161–202.
- [7] W. A. Devane, F. A. Dysarz, M. R. Johnson, L. S. Melvin, A. C. Howlett, *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34*, 605–613.
- [8] C. C. Felder, K. E. Joyce, E. M. Briley, J. Mansouri, K. Mackie, O. Blond, Y. Lai, A. L. Ma, R. L. Mitchell, *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 443–450.
- [9] M. Pacheco, S. R. Childers, R. Arnold, F. Casiano, S. J. Ward, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**, *257*, 170–183.
- [10] M. Rinaldi-Carmona, F. Barth, M. Héaulme, D. Shire, B. Calandra, C. Congy, S. Martinez, J. Maurani, G. Neliat, D. Caput, P. Ferrara, P. Soubrié, J. C. Breliere, G. Le Fur, *FEBS Lett.* **1994**, *350*, 240–244.
- [11] W. A. Devane, L. Hanus, A. Breuer, R. G. Pertwee, L. A. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger, R. Mechoulam, *Science* **1992**, *258*, 1946–1949.
- [12] R. Mechoulam, S. Ben-Shabat, L. Hanus, M. Ligumsky, N. E. Kaminski, A. R. Schatz, A. Gopher, S. Almog, B. R. Martin, D. R. Compton, R. G. Pertwee, G. Griffin, M. Bayewitch, J. Barg, Z. Vogel, *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 83–90.
- [13] T. Sugiura, S. Kondo, A. Sukagawa, S. Nakane, A. Shinoda, K. Itoh, A. Yamashita, K. Waku, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *215*, 89–97.
- [14] L. Hanus, S. Abu-Lafi, E. Fride, A. Breuer, Z. Vogel, D. E. Shalev, I. Kustanovich, R. Mechoulam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 3662–3665.
- [15] V. Di Marzo, L. De Petrocellis, T. Bisogno, D. Melck, *Lipids* **1999**, *34*, 319–325.
- [16] V. Di Marzo, A. Fontana, H. Cadas, S. Schinelli, G. Cimino, J. C. Schwartz, D. Piomelli, *Nature* **1994**, *372*, 686–691.
- [17] H. Cadas, S. Gaillet, M. Beltramo, L. Venance, D. Piomelli, *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 3934–3942.
- [18] T. Bisogno, N. Sepe, D. Melck, S. Maurelli, L. De Petrocellis, V. Di Marzo, *Biochem. J.* **1997**, *322*, 671–677.
- [19] R. I. Wilson, R. A. Nicoll, *Science* **2002**, *296*, 678–682.
- [20] K. A. Willoughby, S. F. Moore, B. R. Martin, E. F. Ellis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *282*, 243–247.
- [21] M. Beltramo, N. Stella, A. Calignano, S. Y. Lin, A. Mariyannis, D. Piomelli, *Science* **1997**, *277*, 1094–1097.
- [22] C. J. Hillard, A. Jarrahian, *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *108*, 123–134.
- [23] V. Di Marzo, A. Fontana, H. Cadas, S. Schinelli, G. Cimino, J. C. Schwartz, D. Piomelli, *Nature* **1994**, *372*, 686–691.
- [24] B. F. Cravatt, K. Demarest, M. P. Patricelli, M. H. Bracey, D. K. Giang, B. R. Martin, A. H. Lichtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 9371–9376.
- [25] D. Gurwitz, A. Weizman, *Drug Discovery Today* **2002**, *7*, 403–406.
- [26] M. H. Bracey, M. A. Hanson, K. R. Masuda, R. C. Stevens, B. F. Cravatt, *Science* **2002**, *298*, 1793–1796.
- [27] W. Hall, N. Solowij, *Lancet* **1998**, *352*, 1611–1616.
- [28] B. Koutek, G. D. Prestwich, A. C. Howlett, S. A. Chin, D. Salehani, N. Akhavan, D. G. Deutsch, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22937–22940.
- [29] M. Beltramo, E. di Tomaso, D. Piomelli, *FEBS Lett.* **1997**, *403*, 263–267.
- [30] L. de Petrocellis, D. Melck, N. Ueda, S. Maurelli, Y. Kurahashi, S. Yamamoto, G. Marino, V. Di Marzo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *231*, 82–88.
- [31] D. L. Boger, H. Sato, R. A. Lerner, M. P. Hedrick, R. A. Fecik, H. Miyauchi, G. D. Wilkie, B. J. Austin, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 5044–5049.
- [32] G. L. Patrick, *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 2. Aufl., Oxford University Press, Oxford, **2001**, S. 473–477.
- [33] M. Bifulco, V. Di Marzo, *Nat. Med.* **2002**, *8*, 547–550.