

Benflumetol: In vitro-Sensibilität von Plasmodium falciparum in Thailand

H. Noedl¹, Somsak Prajakwong², G. Wiedermann¹, H. Kollaritsch¹,
G. Wernsdorfer³, W. H. Wernsdorfer^{1,3}

Einleitung

Malaria ist in vielen Tropenländern nach wie vor eine der größten Gefahren für Gesundheit und Leben. Weltweit bewegt sich die jährliche Erkrankungsziffer zwischen 300 und 500 Millionen, die der Todesfälle zwischen 1,5 und 2,7 Millionen (11). An diesen Dimensionen hat sich seit einem Jahrzehnt wenig geändert. Einer der wichtigsten Gründe für diese Stagnation ist die hohe physiologische Anpassungsfähigkeit und zunehmende Arzneimittelresistenz von *Plasmodium falciparum* (7). In Teilen Südostasiens ist das therapeutische Potential schon nahezu erschöpft. Die rasche Ausbreitung der Mefloquinresistenz (3, 9) unterstreicht den Bedarf an neuen Alternativen für die Behandlung multiresistenter Falciparum-Malaria.

Benflumetol wurde in den frühen 70er Jahren an der Academy of Military Medical Sciences in Peking erstmals synthetisiert. Es handelt sich um ein 2, 4, 7, 9-substituiertes Fluoren (Abb. 1). Strukturell zeigt es Verwandtschaft zu anderen blutschizontoziden Arylaminoalkoholen der Klasse II (4). Der Wirkungsmechanismus von Benflumetol entspricht daher vermutlich jenem von Chinin, Mefloquin und Halofantrin, basierend auf lysosomaler Aufnahme des Wirkstoffs, Bindung an Häm in aus dem parasitären Hämoglobinabbau, sowie Behinderung der Polymerisation des toxischen Hämins zu Malariapigment.

Benflumetol wird relativ langsam aus dem Gastrointestinaltrakt absorbiert. Die höchsten Plasmawerte werden nach etwa 4 bis 8 Stunden erreicht. Im Blutplasma ist Benflumetol in hohem Maße (etwa 99,9%) an Proteine gebunden. Absorption und Plasmaspitzenwerte zeigen große interindividuelle Verschiedenheit. Bei gesunden Probanden liegt die Halbwertszeit zwischen 16 und 105 Stunden. Sie ist abhängig von vorangegangener Nahrungsaufnahme (4).

Benflumetol zeigte bei allen bisher untersuchten Plasmodienarten blutschizontozide Wirkung in vivo, d. h. *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. cynomolgi* und *P. berghei*. Im therapeutischen Vergleich mit Mefloquin bei Falciparum-Malaria führte die orale Kombination von Benflumetol und Artemether zu schnellerer Beseitigung der asexuellen Parasitenformen (30 - 36 Stunden) und Entfieberung (18 Stunden), sowie rascherem Verschwinden von Gametozyten (152 Stunden). Bei Monotherapie mit Benflumetol ist zwar mit einer hohen Heilungsrate zu rechnen, jedoch ist der Wirkungseintritt wesentlich langsamer.

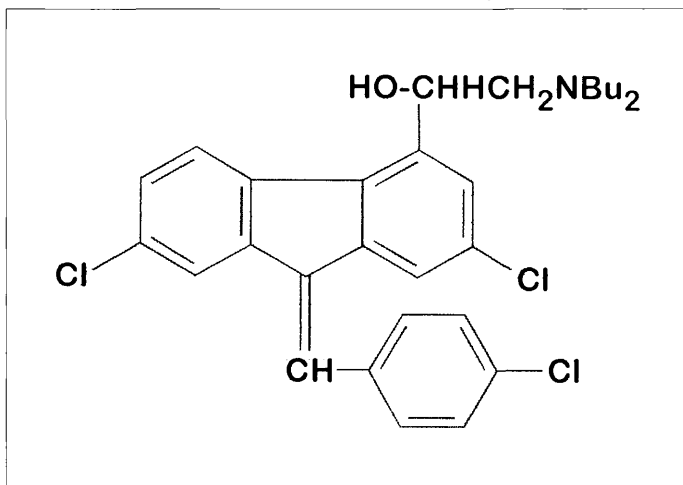


Abbildung 1:
Benflumetol

Im Tierversuch fand sich äußerst geringe akute und subakute Toxizität bei oraler Verabreichung (4). Alle beschriebenen Veränderungen (glomeruläre Atrophie, Leberdegeneration, Auswirkung auf Hämatopoese und Kalziumspiegel) erwiesen sich als reversibel. In klinischen Studien wurde die Kombination von Benflumetol und Artemether gut vertragen (4, 5, 6) und zeigte weniger Nebenwirkungen im Vergleich zu Mefloquin oder Chloroquin.

Durch die Kombination von Benflumetol und β -Artemether kann im Vergleich zur Monotherapie mit Benflumetol ein rascherer Wirkungseintritt erreicht werden ohne die mit der Monotherapie mit Artemether verbundene hohe Rekrudenzrate in Kauf nehmen zu müssen. Zudem haben beide Substanzen verschiedene Wirkungsmechanismen und entfalten Synergismus (4).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die in vitro-Sensibilität von *P. falciparum* gegenüber Benflumetol zu ermitteln, mögliche Beziehungen zu anderen Arzneimitteln aufzuzeigen und die Basis für longitudinale Untersuchungen zu schaffen.

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden zwischen Mai und Juli 1997, zu Beginn der Regenzeit, in der Provinz von Mae Hong Son in Nordwest-Thailand nahe der Grenze zu Myanmar (Burma) in Zusammenarbeit mit dem Gesundheitsministerium von Thailand durchgeführt.

Parasitenisolate

Die Parasitenisolate stammten von ambulanten Patienten der Malariaklinik Unit 8 oder der Poliklinik des Provinzkrankenhauses Mae Hong Son. Sämtliche Patienten hatten Fieberanamnese oder waren febril zum Zeitpunkt der Untersuchung. Als Einschlusskriterien galten mikroskopisch bestätigte Mono-Infektion mit *P. falciparum* und Parasitämie (asexuelle Formen) von 1.000 - 80.000. Ausgeschlossen wurden kürzlich vorbehandelte Patienten (14 Tage für 4-Aminochinoline, 28 Tage für Pyrimethamin und Sulfonamide, 63 Tage für Mefloquin).

In vitro-Testverfahren

Die Durchführung der in vitro-Tests folgte der WHO Standardmethodik für den Mikrottest Mark II (10). Für den Test wurden sterile 8 x 12 Mikrokulturplatten (FALCON 3070) verwendet, welche mit aufsteigenden Benflumetolmengen entsprechend Konzentrationen von 3 - 3.000 nmol/l Blut-Medium-Mischung (BMM) vordosiert waren. Die Konzentrationen waren so gewählt, daß der zu erwartende EC-90 Wert (90 % Hemmung) sich etwa im Mittelbereich befinden würde.

Nach Desinfektion wurden allen Patienten mittels sterilen, heparinisierten Kapillaren 300 μ l Blut aus der Fingerbeere entnommen sowie ein Tropfen Blut zur Herstellung eines dicken Tropfens zwecks Bestimmung der Parasitendichte. Das in den Kapillaren gesammelte Blut wurde in 2,7 ml RPMI 1640 LPLF Medium suspendiert. Dieses Medium hat einen gegenüber normalem RPMI 1640 geringeren Gehalt an para-Aminobenzoesäure und Folsäure. Hierdurch wird das Wachstum von *P. falciparum* verbessert und die Möglichkeit gegeben, auch Sensibilitätsprüfungen mit Folsäurehemmern durchzuführen. Die Blut-Medium-Mischung (BMM) wurde innerhalb von höchstens drei Stunden verarbeitet. Bis dahin wurde sie bei 37°C aufbewahrt.

Jeweils 50 μ l der BMM wurden mittels Eppendorf-Pipette, von A beginnend, in die Vertiefungen der Testplatte verbracht. Nach Beschickung wurde die Platte mit einem sterilen Deckel verschlossen und in einem Kerzentopf bei 37,5°C für 25 Stunden inkubiert. Nach der Bebrütung wurde die überstehende Flüssigkeit aus den Vertiefungen der jeweiligen Serie abpipettiert und das Sediment als dicke Tropfen verarbeitet. Die 8 Proben jeder Serie wurden in immer gleicher Folge auf einen Objektträger verbracht. Nach 24-stündiger Trocknung wurden die Präparate mit 3% Giemsa Lösung bei pH 6,95 für 30 Minuten gefärbt.

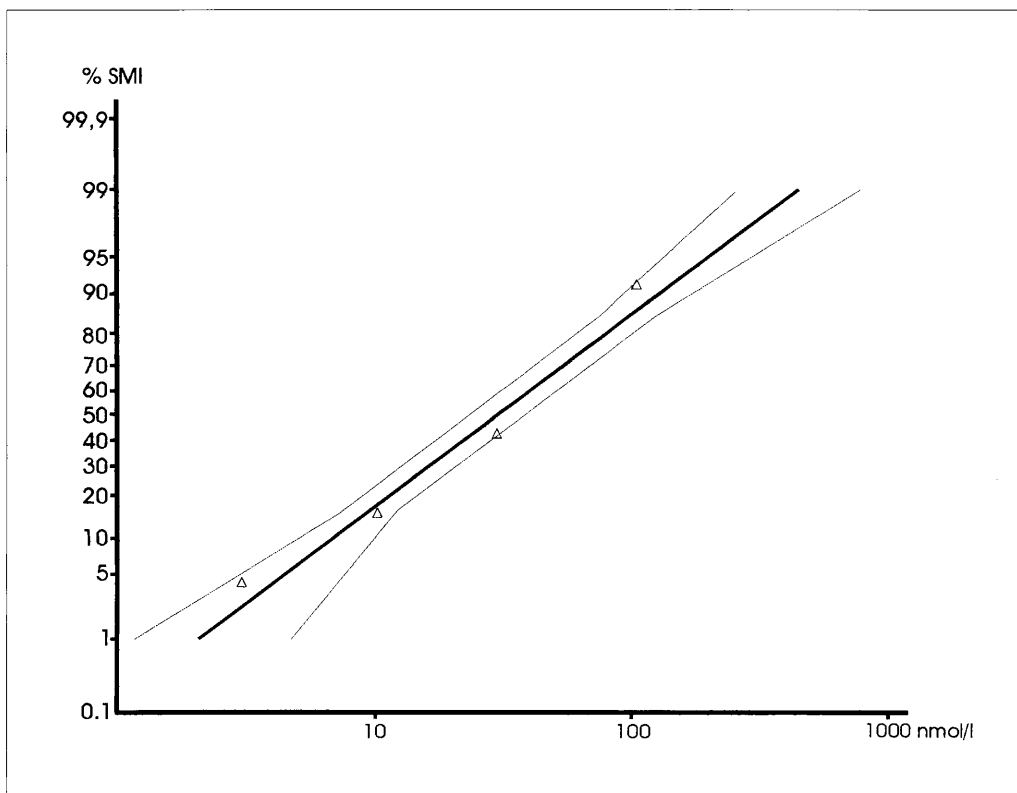


Abbildung 2:

Logprobit Analyse der Schizontenreifungshemmung (SMI) durch Benflumetol bei *Plasmodium falciparum*. Mae Hong Son, Thailand, 1997. Ergebnisse von 72 Tests.

Starke Linie = Regressionsgerade
Feine Linien = 95% Vertrauensintervalle.

FIELD & WILCOXON (1), wobei jedoch im Interesse höherer Genauigkeit statt des nomographischen ein mathematisches Verfahren (8) gewählt wurde. Diese Methode schließt die Gewichtung nach Wachstum in der Kontrolle ($\Sigma c/n$) ein.

Ergebnisse

Insgesamt 72 *P. falciparum* Isolate wurden erfolgreich auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Benflumetol untersucht. Das geometrische Mittel der asexuellen Parasitendichte lag bei 13298/μl Blut, die mittlere Schizontenzahl in den Kontrollen (A) bei 97,72 pro 200 asexuelle Parasiten (48,9%).

Keines der Isolate zeigte bei den beiden geringsten Konzentrationen (3 und 10 nmol/l BMM) eine vollständige Hemmung der Schizontenreifung. Der sogenannte „cut-off point“, d. h. die Konzentration, bei welcher keine Schizontenbildung mehr zu beobachten ist, lag bei den meisten Isolaten (38; 53%) bei 100 nmol/l BMM. Drei Isolate (4%) waren bereits bei 30 nmol/l BMM vollständig gehemmt. Bei 31 (43%) Isolaten endete die Schizontenreifung bei 300 nmol/l BMM. Das geometrische Mittel der „cut-off points“ lag bei 153 nmol/l BMM.

Die relative Schizontenreifungshemmung stieg ab etwa 10 nmol/l deutlich an und erreichte bei 300 nmol/l schließlich 100% (Tab. 1). Die EC-50 lag bei 29,74 nmol/l, die EC-90 bei 128,77 nmol/l. Die Tabellen 2 und 3 zeigen die Werte verschiedener effektiver Konzentrationen und die Parameter der Regression für Benflumetol, Abbildung 2 deren graphische Auswertung. In Relation zu der Regressionsgeraden zeigen die Datenpunkte noch ausreichende Homogenität (χ^2 für Heterogenität = 6,46 bei zulässigen 7,82). Die 95% Vertrauensgrenzen für die verschiedenen EC-Werte sind relativ eng.

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch bei tausendfacher Vergrößerung (Ölimmersion). Gezählt wurden Schizonten und Präschizonten mit drei oder mehr Chromatinkernen in Relation zu insgesamt 200 asexuellen Parasiten. Die Zahl von Schizonten und Präschizonten in der Kontrolle (A) diente als Referenzwert (Wachstum 100%) für die Bestimmung der Reifungshemmung bei den verschiedenen Arzneimittelkonzentrationen. Gemäß Konvention galt der Test als erfolgreich, wenn sich in der Kontrolle mindestens 10 % der Parasiten (d. h. 20 von 100) zu Präschizonten oder Schizonten entwickelt hatten.

Statistische Auswertung

Da praktisch alle *P. falciparum* Populationen hinsichtlich ihrer Arzneimittelempfindlichkeit eine lognormale Verteilung zeigen, erfolgte die Auswertung der Daten nach der klassischen Methode von LITCH-

Tabelle 1:

Schizontenreifungshemmung von *Plasmodium falciparum* durch Benflumetol. Mae Hong Son, Thailand, 1997. Ergebnisse von 72 Isolaten.

Benflumetolkonzentration (nmol/l BMM)	Schizontenreifungshemmung (%)
3,0	4,65
10,0	15,41
30,0	41,73
100,0	91,44
300,0	100,00
1000,0	100,00
3000,0	100,00

Tabelle 2:

EC-Werte für Benflumetol (in nmol/l BMM) bei *Plasmodium falciparum*. Mae Hong Son, Thailand, 1997. Ergebnisse von 72 Isolaten.

EC	Mittelwert	Untere 95% Vertrauensgrenze	Obere 95 % Vertrauensgrenze
EC- 1	2,08	1,20	3,61
EC-16	9,54	7,33	12,40
EC-50	29,74	22,87	38,66
EC-84	92,73	71,32	120,57
EC-90	128,77	88,50	187,36
EC-95	195,10	126,98	299,75
EC-99	425,28	245,20	737,60

Tabelle 3:

Ausgewählte Regressionsparameter der *in vitro* Sensibilität von *Plasmodium falciparum* (nach Litchfield & Wilcoxon, 1). Mae Hong Son, Thailand, 1997.

Parameter	Wert
Anzahl der geprüften Isolate	72
Interzept der Regressionslinie a	2,0336
Neigung der Regressionslinie b	0,8744
Korrelationskoeffizient r	0,9733
χ^2 für Heterogenität	6,4594
Steigungsfunktion S	3,1184
Steigungsfaktor fs	1,2287
Faktor der EC-50 f_{EC-50}	1,3002
Faktor der EC-90 f_{EC-90}	1,4550

Diskussion

Da Benflumetol bisher weder in Thailand noch im benachbarten Myanmar – mit Ausnahme klinischer Studien – für die Therapie oder Prophylaxe der Malaria eingesetzt wurde, war nicht mit dem Vorhandensein von Resistenzen zu rechnen. Die mittleren EC-50 und EC-90 Werte von 29,7 bzw. 128,8 nmol/l BMM weisen auf eine ausreichende Benflumetol-Sensibilität der getesteten *P. falciparum* Isolate hin. Auch die für den Behandlungserfolg bei Nichtimmunen maßgebende EC-99 befindet sich mit 425,3 nmol/l noch durchaus im klinisch erreichten Bereich.

Die relativ geringe Malaria-Prävalenz und -Inzidenz im Studiengebiet sowie die strikte Kontrolle der Abgabe der wichtigsten Malariamittel, insbesondere Mefloquin, erschweren die lokale Entstehung von Arzneimittelresistenzen. Die Malariasituation im nahegelegenen Myanmar hingegen ist durch wesentlich höhere Prävalenz und Inzidenz gekennzeichnet. Hinzu kommt, daß wegen des schlecht funktionierenden staatlichen Gesundheitssystems und der freien Verfügbarkeit nahezu aller Malariamittel im privaten Sektor die Selbstmedikation in Myanmar praktisch zur Regel geworden ist. Wegen der grenznahen Lage von Mae Hong Son war mit einer hohen Zahl eingeschleppter Infektionen mit verminderter Sensibilität gegenüber gängigen Malariamitteln zu rechnen. Allerdings hat die Proportion der eingeschleppten Malariafälle noch nicht wieder die vor der Grenzschließung 1995 verzeichnete Höhe erreicht.

Die Gegenüberstellung der Hemmwerte nach Herkunft der Isolate zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die EC-50 Werte der Isolate von thailändischen Patienten (29,8 nmol/l; n = 50) unterschieden sich nur wenig von jenen der aus Myanmar gekommenen Patienten (29,7 nmol/l; n = 22). Auch die Regressionslinien waren parallel und sehr nahe beieinander. Die Werte für die Potency Ratio ($PR_{EC-50} = 1,0022$; $PR_{EC-90} = 1,0870$) weisen auf außerordentlich geringfügige Unterschiede der Wirksamkeit von Benflumetol in beiden Herkunftsgebieten hin.

Im Vergleich zu den von Vugt et al. (6) aus dem etwa 300 km südlich von Mae Hong Son gelegenen Mae Sot für die Jahre 1995 und 1996 berichteten EC-50 Werten (54 nmol/l;

n = 18) erwiesen sich die in Mae Hong Son verzeichneten Werte als deutlich geringer. Diese Ergebnisse unterstreichen die notorisch schlechte Sensibilitätslage in der Region von Mae Sot. Sie weisen auch darauf hin, daß in Gebieten mit verminderter Sensibilität gegenüber den üblichen Malariamitteln mit einem Wirkungsverlust von Benflumetol gerechnet werden muß. Dies wiederum könnte ein Hinweis auf Wirkungskorrelationen mit anderen strukturell verwandten Arylaminoalkoholen sein (2).

Von Bedeutung für die zu erwartenden Veränderungen der Sensibilitätslage von *P. falciparum* gegenüber Benflumetol dürfte nicht zuletzt das Therapieschema sein. Die empfohlene Verabreichung der Kombination mit Artemether (CGP 56697) in vier Dosen von je 80 mg Artemether und

480 mg Benflumetol (0, 12, 24 und 48 Stunden) entspricht in etwa dem Dosierschema bei Chloroquin. Sie verlangt ausreichende Compliance seitens der Patienten und möglichst konsequente Kontrolle über die gesamte Therapiedauer, um einen vorzeitigen Therapieabbruch zu verhindern. Dies ist von ganz besonderer Bedeutung, wenn die Kombinationstherapie zur Sicherstellung ausreichender Heilungsquoten um 1 oder 2 Tage verlängert werden muß, wie etwa im Gebiet von Mae Sot. Um einer raschen Entwicklung von Resistenz vorzubeugen, ist die strikte Beschränkung des Verkaufs von Benflumetol und anderer Malariamittel eine der wichtigsten Forderungen für deren künftige Anwendung.

Zusammenfassung Die in vitro-Sensibilität von *Plasmodium falciparum* gegenüber Benflumetol wurde in einer zwischen Mai und Juli 1997 in Mae Hong Son, Nordwest-Thailand, durchgeführten Feldstudie untersucht. Nach der Methodik des WHO Standard Mikrotests (Mark II) wurden 72 frische Isolate erfolgreich getestet. Die mittleren EC-50 und EC-90 Werte von 29,7 und 128,8 nmol/l Blut-Medium-Mischung belegen die ausgeprägte blutschizontozide Wirkung dieses neuen Malariamittels. In Mae Hong Son erwies sich Benflumetol als deutlich wirksamer als in einer Studie im 300 km weiter südlich in Mae Sot aus den Jahren 1995 und 1996. Lokal erworbene Infektionen zeigten im Vergleich zu jenen aus dem nahen Myanmar keinen statistisch signifikanten Unterschied der Sensibilität gegenüber Benflumetol.

Schlüsselwörter Malaria, *Plasmodium falciparum*, Benflumetol, Arzneimittelempfindlichkeit, Resistenz.

Summary *Benflumetol: In vitro sensitivity of Plasmodium falciparum in Thailand*

The *in vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to benflumetol was investigated at Mae Hong Son, northwestern Thailand, between May and July 1997. Using the WHO standard microtest system for the assessment of the inhibition of schizont maturation, 72 fresh isolates of *P. falciparum* were successfully tested. The mean EC-50 and EC-90 values of 29.7 and 128.8 nmol/l blood-medium-mixture are indicative of the marked blood schizontocidal activity of benflumetol. The sensitivity was distinctly higher than that observed in 1995 and 1996 at Mae Sot, situated 300 km to the south of Mae Hong Son. There was no significant difference between the *in vitro* response to benflumetol of infections acquired in the Province of Mae Hong Son and those originating from nearby Myanmar.

Key words Malaria, *Plasmodium falciparum*, benflumetol, drug sensitivity, resistance.

Danksagung Die Verfasser danken dem Personal des Office of Vector-Borne Disease Control, Chiang Mai, der Malariaklinik Unit 8 und der Poliklinik des Provinzkrankenhauses von Mae Hong Son für die gute und allzeit effiziente Zusammenarbeit.

Dem Österreichischen Bundesministerium für Wissenschaft und Verkehr sei für die Mittel gedankt, welche es H. N. gestatteten, an dieser Studie teilzunehmen.

Hinweis Liste der verwendeten Abkürzungen siehe Arbeit ZATLOUKAL et al. (Seite 170).

Literatur

1. LITCHFIELD, J. T., WILCOXON, F. (1949):
A simplified method of evaluating dose-effect experiments.
J. Pharm. Exp. Ther. 96, 99-113.
2. NOEDL, H. (1997):
In vitro Sensibilität thailändischer Isolate von Plasmodium falciparum gegenüber
Benflumetol, TA2256, Chinin und Chinidin.
Dissertation, Universität Wien.
3. NOSTEN, F. et al. (1991):
Mefloquine resistant falciparum malaria on the Thai-Burmese border.
Lancet 337, 1140-1143.
4. NOVARTIS (1997)
Meeting the challenge, CGP 56697, a novel antimalarial combination.
Current Medical Literature, London. ISBN 1 85009 151 X.
5. SEIDLEIN, L.von et al. (1997):
Treatment of African children with uncomplicated falciparum malaria with a new antimalarial drug, CGP 56697.
J. Infect. Dis. 176, 1113-1116.
6. VUGT, M. et al. (1998):
Randomized comparison of artemether-benflumetol and artesunate-mefloquine in the treatment of multidrug-resistant falciparum malaria.
Antimicrob. Agents and Chemoth. 42, 135-139.
7. WERNSDORFER, W. H. (1991):
The development and spread of drug resistant malaria.
Parasitology Today 7, 297-303.
8. WERNSDORFER, W. H., WERNSDORFER, M.G. (1995):
The evaluation of in vitro tests for the assessment of drug response in Plasmodium falciparum.
Mitt. Österr. Ges. Tropmed. Parasitol. 17, 221-228.
9. WHITE, N. J. (1992)
Antimalarial drug resistance: the pace quickens.
J. Antimicrob. Chemoth. 30, 571-585.
10. WORLD HEALTH ORGANIZATION (1990):
In vitro micro-test (Mark II) for the assessment of the response of Plasmodium falciparum to chloroquine, mefloquine, quinine, sulfadoxine/pyrimethamine, and amodiaquine.
WHO document MAP/87.2, Rev.1.
11. WORLD HEALTH ORGANIZATION (1996):
Division of Control of Tropical Diseases: Progress Report 1996.
WHO, Geneva.

Korrespondenzadresse Prof. Dr. W. H. Wernsdorfer
Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin Universität Wien
Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien · Austria

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1998

Band/Volume: [20](#)

Autor(en)/Author(s): Noedl Harald, Prajakwong Somsak, Wiedermann Gerhard, Kollaritsch Herwig, Wernsdorfer Gunther, Wernsdorfer Walther H.

Artikel/Article: [Benflumetol: In vitro-Sensibilität von Plasmodium falciparum in Thailand. 171-176](#)