

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 5 (1983) 143—149

Aus der Pharmazeutischen Forschungsabteilung der
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel (Schweiz)

Chemotherapeutische Wirksamkeit von 2 neuen 2-Nitroimidazolderivaten gegen *Trypanosoma brucei* *rhodesiense* bei der experimentellen Schlafkrank- heit von Maus und Kaninchen

R. Richle und W. Hofheinz

Einleitung

Die afrikanische Schlafkrankheit gehört zu jenen 6 Krankheiten des Menschen im tropisch-subtropischen Gebiet, für die die WHO um die Mitte der siebziger Jahre spezielle Arbeitsgruppen (Forschungsgruppen) ins Leben gerufen hat, weil sie deren Bekämpfung — sei es durch Behandlung erkrankter Menschen oder Vernichtung der Zwischenwirte und/oder Überträger — als ungenügend und dringend verbesserungsbedürftig erachtete.

Die Schlafkrankheit wird durch Trypanosomen verursacht; Überträger sind in beiden Geschlechtern blutsaugende Stechfliegen aus der Gattung *Glossina*. Für *T. brucei rhodesiense* besteht mit Sicherheit, für *T. brucei gambiense* wahrscheinlich ebenfalls ein Tierreservoir für den Krankheitserreger. Man unterscheidet zwei geographisch getrennte Formen der Schlafkrankheit, nämlich die vorwiegend auf Westafrika beschränkte eher mildere und langsamere verlaufende durch *Trypanosoma brucei gambiense* verursachte, und die mehr auf Ostafrika beschränkte, durch *Trypanosoma brucei rhodesiense* bedingte in der Regel schneller und öfter tödlich verlaufende Schlafkrankheit. Bei beiden Typen unterscheidet man außerdem das primäre akute Stadium mit Trypanosomen im Blut und Lymphknoten sowie das sekundäre, chronische Stadium, bei dem Trypanosomen ins zentrale Nervensystem eingedrungen sind.

Zur Behandlung der Schlafkrankheit stehen verschiedene Medikamente zur Verfügung, die wohl hochwirksam sind, aber alle vor über 30 Jahren entwickelt wurden und die heutigen Anforderungen an die Sicherheit und Verträglichkeit längst nicht mehr erfüllen. Gute Erfolge in der Behandlung der Schlafkrankheit sind mit den vorhandenen Medikamenten in der frühen Krankheitsphase zu erzielen, solange das zentrale Nervensystem noch nicht befallen ist. Für die Behandlung der fortgeschrittenen Schlafkrankheit stehen nur Arsenpräparate zur Verfügung, da mit Suramin und Pentamidin wegen der Blut-Hirnschranke im ZNS keine oder nicht ausreichende Spiegel erreicht werden.

Bei der Suche nach neuen Mitteln gegen Protozoenkrankheiten sind wir in der Gruppe der Nitroimidazole auf Substanzen gestoßen, die an unseren Tiermodellen für die Schlafkrankheit eine hohe Wirksamkeit entfalten: Ro 15-0216, 2-(Dimethylamino)-4'-(1-methyl-2-nitroimidazol-5-yl)methoxyacetanilid und Ro 15-6547, 4'-(1-Methyl-2-nitroimidazol-5-yl)methoxy-1-pyrrolidin-acetanilid. Da von verschiedenen Heterozyklen, insbesondere von Nitroimidazolen, bekannt ist, daß sie leicht ins zentrale Nervensystem übertreten, darf gehofft werden, daß sich mit den neuen, gegenüber *Trypanosoma brucei rhodesiense* hochwirksamen 2-Nitroimidazolen eine mögliche Alternative zu den alten Arsenverbindungen für die Behandlung der Schlafkrankheit anbietet.

Methoden

Werden 18—20 g schwere Albinomäuse (SPF-Auszuchtstamm Füllinsdorf, ♂, Nafag Pelletfutter Nr. 850 und Wasser ad libitum) mit ca. 250.000 trypomastigoten Formen von *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Stamm Bukavu) intraperitoneal infiziert, so entwickelt sich innert 2—3 Tagen bei allen Tieren eine hohe Parasitaemie und sämtliche Tiere erliegen der Infektion innert 4—6 Tagen (vgl. Tabelle 1). Als Maß für die Wirksamkeit diente beim Prüfen von neuen chemischen Substanzen die Verlängerung der Überlebenszeit der behandelten Mäuse im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren. Als 50 % wirksame Dosis (ED₅₀) wurde diejenige Dosis bezeichnet, die 24, 48 und 72 Stunden nach der Infektion appliziert zum Überleben der Hälfte der behandelten Tiere bei Versuchsabschluß 20 Tage nach der Infektion führt.

Wird die zu prüfende Substanz nur einmal am 3. Tag nach der Infektion appliziert, so kann ihr trypanosomizider Effekt daran abgeschätzt werden, wieviel Zeit es für das völlige Verschwinden der Trypanosomen aus dem Blut braucht. Ein weiteres Wirkungskriterium ist die rückfallsfreie Überlebenszeit der behandelten Mäuse nach einer einzigen Dosis.

JENNINGS et al. haben 1980 gezeigt, daß die Wirksamkeit von 5-Nitroimidazolen durch Kombination mit Berenil erheblich gesteigert werden kann. Wir kombinierten die 2-Nitroimidazolderivate mit Suramin, einem Präparat, das bei der Behandlung der Frühphase der Schlafkrankheit des Menschen immer noch häufig verwendet wird. Suramin wurde den Mäusen 1 Tag nach der Infektion einmal in der Dosierung 1, 2,5, 5, 10 und 25 mg/kg s.c. appliziert, gefolgt von drei peroralen Dosen von 25, 50 oder 100 mg/kg Ro 15-0216 oder Ro 15-6547 am 6., 7. und 8. Tag nach der Infektion. Als Wirkungskriterium diente das rückfallsfreie Überleben der Mäuse am 80. Tag nach der Behandlung.

Werden Hasenkaninchen im Gewicht von 1,6 bis 1,8 kg (Stamm Füllinsdorf, Nafag Pelletfutter Nr. 814, Wasser ad libitum) mit ca. 5×10^7 trypomastigoten Formen von *T. b. rhodesiense* intravenös infiziert, so tritt innert einer Woche eine in der Regel geringe, am Anfang mikroskopisch erfaßbare fluktuierende Parasitaemie auf, die im späteren Verlauf häufig fehlt oder allenfalls mikroskopisch nicht nachweisbar ist. Dagegen kommt es an den Ohren, an Nase und Lippen, an den Augenlidern sowie an den Pfoten und im Perinealbereich, beim männlichen Tier auch am Skrotum und Präputium, zu entzündlichen Schwellungen, die ulzerieren und häufig mit dicken Krusten belegt sind. In der serösen Flüssigkeit, die sich aus diesen Läsionen auspressen läßt, können Trypanosomen mikroskopisch ohne große Mühe nachgewiesen werden. Unbehandelte Kaninchen sterben vereinzelt innert der ersten zwei Wochen, die meisten überleben unter Zunahme der erwähnten Läsionen, die mit starker Abmagerung einhergeht, 4—8 Wochen. Zur Bestimmung der Wirksamkeit wurden 5—10 Dosen von je 50 oder 100 mg/kg/Tag von Ro 15-6547 peroral appliziert, beginnend am 7. Tag nach der Infektion.

Resultate und Diskussion

Wurden die beiden 2-Nitroimidazolderivate Ro 15-0216 und Ro 15-6547 mit *T. b. rhodesiense* infizierten Mäusen 24, 48 und 72 Stunden nach der Infektion in einer Dosierung von 2,7 bzw. 3 mg/kg peroral appliziert, so überlebten 50 % der Tiere die unbehandelt regelmäßig innert 4—6 Tagen tödlich verlaufende Infektion während mindestens 20 Tagen. Bei einer akuten Toxizität von 500—1000, bzw. 1000—2000 mg/kg p.o. bedeutet dies eine sehr hohe Wirksamkeit. Die heute gebräuchlichen Mittel zur Behandlung der Schlafkrankheit (Suramin, Pentamidin, Melarsoprol) weisen im Mäuseversuch mit

T. b. rhodesiense unter gleichen Versuchsbedingungen wohl etwas niedrigere ED₅₀-Werte auf, müssen aber parenteral appliziert werden und sind an der Maus toxischer als die 2-Nitroimidazole (Tabelle 2).

Wurden für die Prüfung von Ro 15-0216 und Ro 15-6547 Mäuse eingesetzt, die mit einem frisch vom schlafkranken Menschen isolierten Stamm von *T. b. rhodesiense* (STB 704 B) infiziert waren, so ergab sich für beide Präparate eine gleich gute Wirksamkeit wie mit dem sonst verwendeten an Mäuse seit längerer Zeit adaptierten Stamm Bukavu (Tabelle 3).

Wurde eine einzige Dosis von 25, 50 oder 100 mg/kg von Ro 15-0216 oder Ro 15-6547 am 3. Tag nach der Infektion appliziert, so verschwanden die Trypanosomen bei den in diesem Zeitpunkt hoch parasitärischen Tieren innert 24 Stunden völlig aus dem Blute. Während es nach der Behandlung mit 25 oder 50 mg/kg p.o. zu Rückfällen innert 1—2 Wochen kam, vermochten 100 mg/kg die Mäuse parasitologisch zu heilen. Die rückfallsfreie Überlebenszeit betrug im ersten Versuch 40 Tage (Tabelle 4). In späteren Versuchen wurde die Nachbeobachtungszeit auf 80 Tage ausgedehnt, wobei ebenfalls sämtliche mit 100 mg/kg behandelten Tiere ohne Rückfälle überlebten.

Wie aus der Tabelle 5 ersichtlich ist, kann die Wirksamkeit einer einzigen subkutanen Dosis von Suramin mit den 2-Nitroimidazolderivaten deutlich gesteigert werden, wenn der Prozentsatz rückfallsfrei überlebender Tiere als Wirkungskriterium verwendet wird. Die für ein 100 % rückfallsfreies Überleben der mit dem 2-Nitroimidazolderivat Ro 15-6547 behandelten Tiere notwendigen Dosis von 100 mg/kg kann dagegen durch die Kombination mit Suramin nicht wesentlich niedriger gewählt werden.

Behandelte man mit *T. b. rhodesiense* infizierte Kaninchen ab 7. Tag nach der Infektion mit 5—10 Dosen von 50 oder 100 mg/kg/Tag von Ro 15-6547, so kam es bei allen behandelten Tieren zu einer spektakulären Besserung der genannten Läsionen. Wie aus Tabelle 6 im Detail ersehen werden kann, waren am Ende der 180-tägigen Beobachtungsdauer 5 von 13 Tieren parasitologisch geheilt. Bei 8 Tieren dagegen kam es während der Nachbeobachtungszeit zu Rückfällen, die nach einer mittleren Überlebenszeit von 93 Tagen zum Tod führten, während die mittlere Überlebenszeit von unbehandelten Kontrollen nur 40 Tage betrug.

Im Gegensatz zu den gebräuchlichen Mitteln zur Behandlung der Schlafkrankheit sind die beiden 2-Nitroimidazolderivate Ro 15-0216 und Ro 15-6547 bei peroraler Applikation wirksam. Bei der experimentellen Schlafkrankheit der Maus zeigen sie bereits in niedriger Dosierung eine hohe Wirksamkeit. Für eine rückfallsfreie Behandlung sind bei Maus und Kaninchen dagegen Dosen von 50—100 mg/kg erforderlich. In früheren Untersuchungen mit Benznidazol, einem anderen 2-Nitroimidazolderivat, konnte jedoch von RICHLE und RAAFLAUB (1980) gezeigt werden, daß wegen pharmakokinetischer Unterschiede zwischen Maus und Mensch beim Menschen für die kurative Behandlung der Chagas-Krankheit 10—15 mal niedrigere Dosen erforderlich waren als bei der Maus. Die bei der experimentellen Schlafkrankheit von Maus und Kaninchen ermittelte Wirksamkeit von Ro 15-0216 und Ro 15-6547 gibt deshalb zur berechtigten Hoffnung Anlaß, daß diese neuen Präparate zu Mitteln für die Behandlung der Schlafkrankheit des Menschen entwickelt werden können.

Zusammenfassung

In der Gruppe der 2-Nitroimidazolderivate wurden zwei Substanzen aufgefunden, deren Wirksamkeit an den Tiermodellen für die Schlafkrankheit des Menschen eine mögliche

**TABELLE 1: Experimentelle Schlafkrankheit der Maus:
Verlauf der unbehandelten T. rhodesiense-Infektion**

Mäuse 20 g	Tage p.i.								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
K				100/1*	100/1	+			
R				100/1	100/1	+			
S				50/1	100/1	+			
KR				100/1	+				
KS				50/1	100/1	+			
KRS				100/1	100/1	+			

Infektion i.p. am Tag 0 mit ca. 250.000 Trypanosomen

* Anzahl Trypanosomen pro Gesichtsfeld bei 320-facher Vergrößerung
Mittlere Überlebenszeit 4,8 Tage

**TABELLE 2: Akute Toxizität und chemotherapeutische Wirksamkeit
gegen Trypanosoma rhodesiense an der Maus**

Verbindung	Akute Tox. LD ₅₀ mg/kg	Wirksamkeit gegen T.rhodesiense ED ₅₀ mg/kg
Ro 15-6547	500—1000 p.o. 500—1000 s.c.	2,7 p.o.
Ro 15-0216	1000—2000 p.o. 500—1000 s.c.	3,0 p.o.
Ro 7-1051 (Benznidazol)	>5000 p.o.	>400 p.o.
Suramin	530 s.c.	0,6 s.c.
Pentamidin	110 s.c.	0,9 s.c.
Melarsoprol	56—112 s.c.	0,5 s.c.

**TABELLE 3: Experimentelle Schlafkrankheit der Maus:
Wirksamkeit von Ro 15-0216 und Ro 15-6547 gegenüber einem frisch
vom Menschen isolierten Stamm von T.rhodesiense
(Stamm STB 704B)**

Dosis mg/kg p.o. x 3	Beobachtungszeit 60 Tage	
	Ro 15-0216	Ro 15-6547
1	keine Heilung	keine Heilung
3	50% Rückfälle	50% Rückfälle
10	0% Rückfälle	0% Rückfälle
25	0% Rückfälle	0% Rückfälle

10 Mäuse pro Dosis

Alternative zu den bisher für die Behandlung der Schlafkrankheit zur Verfügung stehenden Medikamenten erhoffen läßt. Es wurden 18—20 g schwere Albinomäuse mit ca. 250.000 trypomastigoten Formen eines an die Maus adaptierten Stammes von *Trypanosoma brucei rhodesiense* intraperitoneal infiziert, und es entwickelte sich innert 3 Tagen bei allen Tieren eine hochgradige Parasitaemie, und sämtliche Mäuse erlagen der Infektion innert 4—6 Tagen. Wurden aber solchermaßen infizierte Tiere beginnend am Tage nach der Infektion während 3 Tagen mit Dosen von 3 mg/kg/Tag per os von Ro 15-0216 oder Ro 15-6547 behandelt, so überlebte die Hälfte der Tiere bei Versuchsabschluß 20 Tage nach Infektion. Erfolgte die Behandlung nur einmal erst am 3. Tage nach der Infektion, wenn sämtliche Mäuse bereits eine hochgradige Parasitaemie aufwiesen, so verschwanden bei einmaliger peroraler Applikation von ≥ 100 mg/kg Ro 15-0216 oder Ro 15-6547 die Trypanosomen innert 24 Stunden völlig aus dem Blut. Sämtliche behandelten Tiere überlebten und blieben während der Nachbeobachtungszeit von 40—80 Tagen parasitenfrei. Bei niedrigerer Dosierung kam es nach einer dosisabhängig unterschiedlich langen parasitenfreien Periode zu Rückfällen. Ein frisch vom Menschen isolierter Stamm von *T. brucei rhodesiense* sprach bei damit infizierten Mäusen gleich gut auf die Behandlung mit den beiden Präparaten an wie der sonst verwendete seit längerer Zeit an Mäuse adaptierte Stamm.

Beim Kaninchen, das nach Infektion mit *T. brucei rhodesiense* einen chronischen Krankheitsverlauf mit geringer, fluktuierender Parasitaemie und Läsionen an verschiedenen Organen zeigt, bewirkt das Präparat Ro 15-6547 bei 5—10 mal peroral applizierten Dosen von 50 oder 100 mg/kg/Tag bei 5 von 13 Tieren außer einer spektakulären Verbesserung der klinischen Symptome eine parasitologische Heilung. Bei 8 von 13 Tieren traten während der Nachbeobachtung von 180 Tagen Rückfälle auf.

Summary

Two new 2-nitroimidazole derivatives (Ro 15-0216 and Ro 15-6547) were found to exert a high chemotherapeutic activity in experimental sleeping sickness of mice and rabbits. Mice infected intraperitoneally with about 250.000 trypomastigotes of *Trypanosoma brucei rhodesiense* develop very high levels of parasitaemia and die of the infection within 4—6 days. Both compounds kept alive 50 per cent of the treated animals for at least 20 days, when daily doses of 3 mg/kg were administered orally 24, 48 and 72 hours after the infection. If the treatment was postponed to the third day after the infection (i.e., one to two days before death if untreated), when all the animals had already considerable levels of parasitaemia, a single dose of 100 mg/kg produced permanent clearance of parasitaemia within 24 hours in all the animals for at least 40 days. Mice treated with lower single doses on the third day after infection relapsed after dose-related parasite-free periods. Mice infected with a strain of *T. brucei rhodesiense*, recently isolated from a clinical case of sleeping sickness responded as well to treatment as did those infected with an old mouse-adapted strain.

In rabbits *Trypanosoma brucei rhodesiense* produced a more chronic disease with low fluctuating parasitaemia and lesions in various organs. With oral doses of 50—100 mg/kg/day of Ro 15-6547 administered 5—10 times from the seventh day after infection a remarkable improvement of all the symptoms was regularly achieved. Five out of the total of 13 animals were permanently cured, whereas 8 animals relapsed and died during the course of the observation period of 180 days after treatment.

TABELLE 4:

**Experimentelle Schlafkrankheit der Maus:
Wirksamkeit einer einzigen Dosis von Ro 15-6547
bei etablierter Parasitaemie (Tag 3 p.i.)**

Ro 15-6547 mg/kg p.o.	Prozentsatz mikroskop. parasiten- freier Tiere an den Tagen				Mittlere Überlebenszeit nach Infektion (Tage)
	5	10	20	40	
100	100	100	100	100	> 40
50	100	100	10	0	23
25	100	50	0		14,3
0	0				4,8

10 Mäuse pro Dosis

TABELLE 5:

**Kombination von Ro 15-6547 mit Suramin zur Behandlung
der experimentellen Schlafkrankheit der Maus**

Suramin mg/kg s.c Tag 3 p.i.	Ro 15-6547 mg/kg p.o. Tage 6, 7, 8 p.i.	Rückfallfrei überlebende Mäuse am Tag 80 n. B.
1		0/6
2,5		3/6
5	25	3/6
10		4/6
25		4/6
1		5/6
2,5		4/6
5	50	4/6
10		2/6
25		6/6
1		5/6
2,5		6/6
5	100	6/6
10		6/6
25		6/6
1		0/6
2,5		0/6
5	0	0/6
10		1/6
25		5/6

Mittlere Überlebenszeit unbehandelter Kontrollen 5 Tage
10 Mäuse pro Dosis

TABELLE 6:

**Experimentelle Schlafkrankheit beim Kaninchen:
Wirksamkeit von Ro 15-6547 im vorgerückten Stadium der Krankheit**

Behandlungs- schema (tägl. Dosis p.o.)	Anzahl Tiere	Tiere geheilt (180 d.*)	Tiere Tod nach Rückfall	Tiere Tod ohne Besserung	Mittlere Überlebens- zeit in d.
50 mg/kgx10 d.	5	2	3	0	89
100 mg/kgx 5 d.	3	1	2	0	88
100 mg/kgx10 d.	5	2	3	0	101
unbehandelte Kontrollen	4	0	0	4	40

* d. = days (Tage)

Literatur

The African trypanosomiasis. Report of a Joint WHO Expert Committee and FAO Expert Consultation.
Technical Report Series 635
World Health Organization, Geneva 1979.

JENNINGS, F.W., G.M. URQUHART, P.K. MURRAY, B.M. MILLER (1980): "Berenil" and nitroimidazole combinations in the treatment of *Trypanosoma brucei* infection with central nervous system involvement. *Int. J. Parasitol.* 10, 27—32.

RICHLE, R.W., J. RAAFLAUB (1980): Difference of effective antitrypanosomal dosages of benznidazole in mice and man. Chemotherapeutic and pharmacokinetic results. *Acta Tropica* 37, 257—261.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. med. vet. R. Richle
F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G.
Pharmazeutische Forschung
124, Grenzacherstrasse
4002 Basel/Schweiz

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: 1983

Band/Volume: [5](#)

Autor(en)/Author(s): Richle R., Hofheinz W.

Artikel/Article: [Chemotherapeutische Wirksamkeit von 2 neuen 2-Nitroimidazolderivaten gegen Trypanosoma brucei rhodesiense bei der experimentellen Schlafkrankheit von Maus und Kaninchen. 143-149](#)