

Pilze **in Medizin und Umwelt**

GIT-Supplement 5/83 · G-I-T VERLAG ERNST GIEBELER

Inhalt:

Medizinische Mykologie – eine aufstrebende Fachrichtung • Im Wettlauf mit der Entwicklung • IMIDAZOL-Präparate • Bifonazol • Fortschritt in der Therapie • Ketoconazol • Onychomykosen • Nystatin • Pilzsporen als Allergene • Vergleichende Difusionsteste • Amphotericin B • Griseofulvin • Differenzierende Therapie • Karies-Candidose • „mykorapid“ • Igelpilze • Strahlenpilzforschung in Deutschland
Der Rudolf-Lieske-Förderpreis • WHO-Empfehlungen • Produkt-Informationen



Antimykotische Eigenschaften von Bifonazol (Mycospor®) in vitro und in vivo

Antimycotic properties of bifonazol (Mycospor®) in vitro and in vivo

M. PLEMPPEL, Wuppertal *)

Zusammenfassung

Die experimentellen Eigenschaften von Bifonazol, einem neuen, halogenfreien Imidazolantimykotikum zur topischen Therapie von Dermatomykosen, werden dargestellt.

Die hohe antimykotische Potenz des Wirkstoffes und seine lange Hautverweildauer im Infekt-Protektionstest bei Meer-schweinchen ermöglichten bei Dermatomykosen eine Verkürzung der Therapiedauer auf ca. 2–3 Wochen bei nur einer Applikation pro Tag.

Summary

The experimental properties of bifonazol are described, this compound is a new, halogen-free imidazole antimycotic agent for the local therapy of dermatomycoses.

Infection-protection tests carried out on guinea pigs show that the active substance has a high potency and remains on the skin for a long time. As a result the treatment of dermatomycoses can be reduced to approximately 2–3 weeks with only one application per day.

A. Einleitung

Die seit 1971 im Handel verfügbaren Antimykotika aus der Azol-Klasse haben die Therapiesituation bei Dermatomykosen und vulvovaginalen Sproßpilzinfektionen wesentlich verbessert. Bei den verschiedenen Tinea-Formen, Candidosen der Haut und Schleimhäute und der Pityriasis versicolor können z. B. mit Clotrimazol Heilungsquoten bis 85% erreicht werden. Dazu sind – bei täglich 2–3maliger Applikation – Therapiezeiten von 4–6 Wochen erforderlich. Die Therapie stellt also recht hohe Anforderungen an die Mitarbeit der Patienten. Ist die Compliance mangelhaft, kommt es häufiger zu Rezidiven oder Therapieversagern. Die beiden Compliance-abhängigen Faktoren Therapiedauer und Applikationshäufigkeit schienen uns geeignete Ansatzpunkte für eine Verbesserung der lokalen antimykotischen Therapie zu sein.

Tab. 1: Forschungsziele für ein neues Lokalantimykotikum

1. Allgemeine Eigenschaften eines neuen Präparates:
 - a) breites Wirkungsspektrum
 - b) günstige Resistenzsituation
 - c) gute Haut- und Schleimhautverträglichkeit
2. Zusätzliche Eigenschaften als Auswahlparameter
 - d) verstärkte Fungizidie
 - e) lange Hautverweildauer
 - f) Wirkungsspitzen bei Problemkeimen und Probleminfektionen – z. B. *Torulopsis glabrata* oder *Tinea capitis*
3. Daraus resultierende klinische Vorteile:
 - g) kürzere Therapiedauer
 - h) reduzierte Applikationshäufigkeit pro Tag
 - i) geringere Rezidivhäufigkeit

In der **Tab. 1** sind die Wirkstoff-Eigenschaften zusammengestellt, die nach unserer experimentellen Erfahrung notwendig sind, um die Ziele Therapiezeitverkürzung und Reduzierung der Applikationshäufigkeit bei Haut- und Schleimhautmykosen zu erreichen.

B. Allgemeine Angaben zum Bifonazol

Der Wirkstoff, ein halogenfreies Azolderivat, mit der chemischen Bezeichnung 1-[α -(Biphenyl)-benzyl]imidazole und dem Molekulargewicht 310,4 wurde von E. REGEL im Bayer Pharma-Forschungszentrum Wuppertal synthetisiert. Es bildet farblose, geruchs- und geschmackslose Kristalle. Die Strukturformel ist in **Abb. 1** wiedergegeben.

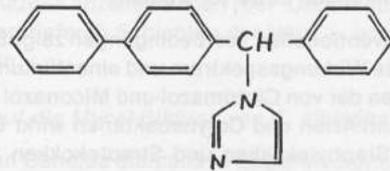


Abb. 1: Strukturformel von Bifonazol

Bifonazol ist mit einer Löslichkeit von 1 mcg/ml praktisch unlöslich in Wasser und mit 25–40 ml/g löslich in Benzol, Methanol und Aceton. Die sehr geringe Wasserlöslichkeit des Präparates muß bei Wirksamkeitsbestimmungen in vitro berücksichtigt werden.

Der Wirkstoff ist in Lösung unter schwach sauren bis schwach alkalischen Bedingungen stabil, während in stark saurem und stark alkalischem Milieu langsame Zersetzung erfolgt. Bifonazol-Lösungen sind lichtempfindlich.

C. Experimentelle Eigenschaften von Bifonazol

Aus 15jähriger Erfahrung mit Azol-Wirkstoffen ist uns bekannt, daß in-vitro-Wirkungen von Azolderivaten auf Pilze nur unbefriedigend mit ihrer In-vivo-Wirksamkeit am infizierten Versuchstier oder am Patienten korrelieren, da die minimalen Hemmkonzentrationen der Azole in vitro von folgenden Faktoren stark beeinflußt werden:

1. Größe des Keiminokulums pro ml Substrat
2. Zusammensetzung des Nährsubstrates
3. Bebrütungszeit
4. physiologischer Zustand der Pilzzellen
5. mehrstündige Lag-Phase bis zum Wirkungseintritt
6. Wasserlöslichkeit des Wirkstoffes.

*) M. Plempele, Inst. f. Chemotherapie, Bayer AG, Pharma-Forschungszentrum, Postfach 101709, D-5600 Wuppertal 1

Tab. 2: Abhängigkeit der MHK-Werte von Bifonazol bei *C. albicans* von Nährsubstrat und Keiminkokulum

Testbedingungen	MHK von Bifonazol bei <i>Cand. albicans</i> in mcg/ml
a) Sabouraud-Medium	
5 × 10 ³ Keime/ml	2 – 16
1 × 10 ⁷ Keime/ml	>64 – 128
b) Kimmig-Medium	
5 × 10 ³ Keime/ml	0,125
1 × 10 ⁷ Keime/ml	> 16 – 32

Tab. 3: Antimykotisches Wirkungsspektrum und Wirkungsintensität in vitro

Pilz-Species	Durchschnittliche MHK-Werte in mcg/ml bei		
	Bifonazol	Clotrimazol	Miconazol
Dermatophyten	<0,25 – 2	0,062 – 1	0,062 – 4
<i>Candida albicans</i>	0,5 – 4	<0,25 – 1	0,5 – 2
andere <i>Candida</i> -Arten	0,5 – 16	0,5 – 4	0,5 – 10
<i>Torulopsis glabrata</i>	<0,25	1 – 4 – 16	1 – 4 – 32
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,5 – 2	0,062 – 1	0,062 – 2
andere <i>Aspergillus</i> -Arten	0,5 – 4	0,5 – 4	0,5 – 8
Chromomyceten	0,1 – 0,5	1 – 2	0,5 – 2
biphasische Pilze	0,062 – 1	0,062 – 1	0,062 – 0,5

In der Tab. 2 ist als Beispiel für das Ausmaß der Abhängigkeit der In-vitro-Wirkung von Bifonazol auf *Candida albicans* von den Testbedingungen in vitro die Beeinflussung der MHK-Werte durch Inokulumgröße und Nährsubstrat dargestellt.

Zur Zeit gibt es noch keine voll befriedigende Erklärung zu einigen dieser Wirkungsabhängigkeiten der Azole in vitro.

Die in Tab. 3 dargestellten und unter konventionellen Testbedingungen ermittelten In-vitro-Wirkungen von Bifonazol im Vergleich zu Clotrimazol und Miconazol müssen für alle 3 Präparate unter diesen Einschränkungen bewertet werden.

Unter diesen konventionellen Testbedingungen zeigt Bifonazol das azoltypisch breite Wirkungsspektrum und eine Wirkungsintensität, die etwa zwischen der von Clotrimazol und Miconazol liegt. Gegenüber *Pityrosporum*-Arten und *Corynebakterien* wirkt Bifonazol mit 0,5–2 mcg/ml, *Staphylokokken* und *Streptokokken* zeigen MHK-Werte zwischen 2 und 16 mcg/ml.

In einem gewissen Gegensatz zu diesem für Azol-Wirkstoffe normalen Verhalten in vitro steht die sehr gute In-vivo-Wirksamkeit von Mycospor®-Creme und Lösung am Modell der experimentellen

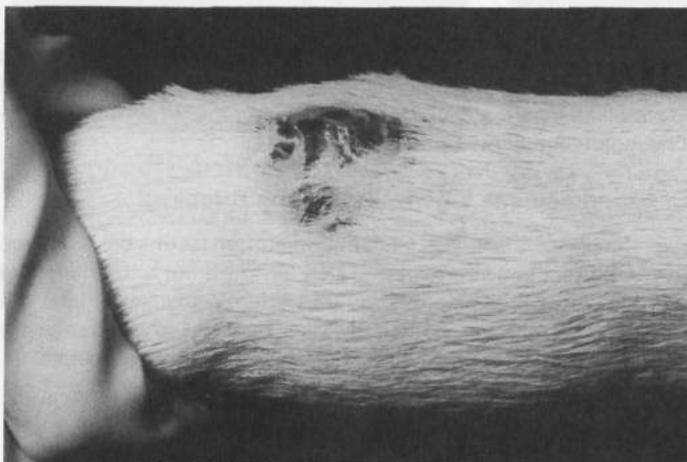


Abb. 2: Meerschweinchen-Trichophytie durch *Trichophyton mentagrophytes*. Unbehandeltes Kontrolltier am 12. Tag p.i.

Meerschweinchen-Trichophytie durch *T. mentagrophytes*: Die Abb. 2 und 3 zeigen den kurativen Effekt einer 0,1%igen Bifonazol-Creme im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrolltier am 12. Tag p.i. Bifonazol wurde in diesem Versuch nur 1mal – am 3. Tag p.i. – appliziert.

Vergleichbar gute Ergebnisse konnten wir in diesem Versuchsmodell bisher nur mit 1%iger Clotrimazol-Creme und der 2%igen Miconazolnitrat-Creme erreichen. Systematische Untersuchungen mit 0,05–0,1–0,5 und 1%igen Formulierungen von Bifonazol an insgesamt 140 Trichophyton-infizierten Meerschweinchen ergaben eine klare Überlegenheit von Bifonazol-Creme und -Lösung im Vergleich zu anderen Azol-Derivaten, die – im Falle von Clotrimazol – den Faktor 5–10 betrug. Auffallend war die nach nur 1maliger Wirkstoffapplikation am 3. Tag p.i. sehr geringe Rezidivquote der Bifonazol-behandelten Tiere mit ca. 3%.

Unter Testbedingungen, die der sehr geringen Wasserlöslichkeit des Präparates und seinen Wirkungsmechanismus-bedingten, speziellen antimykotischen Eigenschaften angepaßt waren, konnte die antimykotische Potenz des Präparates auch in vitro demonstriert werden:

1. Wirkung von Bifonazol auf rasch proliferierende Dermatophyten

Werden Dermatophyten in Kimmig-Nährlösung in Schüttelkulturen gezüchtet, zeigen z. B. *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* und *M.canis* eine rasche Proliferation. In Wirkstoff-freien Kontrollkulturen können bei *T. mentagrophytes* innerhalb von 3 Tagen Myceltrockengewichte von >330 mg erreicht werden. Bei Zusatz von 3–6 Nanogramm (0,003–0,006 mcg) Bifonazol pro ml Nährsubstrat wurden nach 3 Tagen nur noch Myceltrockengewichte von 6–7 mg gemessen (=2% der Kontrolle), beim Clotrimazol mit 6 ng – unter identischen Versuchsbedingungen – 51 mg (=15% der Kontrolle). In den Abb. 4 und 5 ist dieser Versuch mit Bifonazol dargestellt.

2. Fungizide Wirkung auf Dermatophyten

Bifonazol wirkt auf proliferierende Mycelien – jedoch nicht auf Mikro- und Makrokonidien – von Dermatophyten, speziell *Trich. mentagrophytes* und *Trich. rubrum*, in Kimmig-Medium mit Konzentrationen ≥5 mcg/ml und einer Einwirkungszeit von ≥6 Std. fungizid. Beim Clotrimazol sind unter gleichen Versuchsbedingungen fungizide Effekte erst mit Konzentrationen >10–20 mcg/ml und einer Einwirkungszeit von ≥12 Std. nachweisbar.

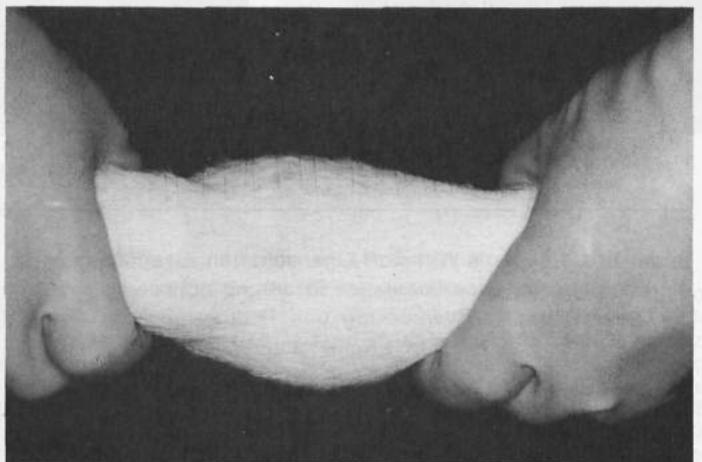


Abb. 3: Meerschweinchen-Trichophytie durch *Trichophyton mentagrophytes*. 1× am 3. Tag p.i. mit 0,1%iger Bifonazol-Creme behandeltes Tier am 12. Tag p.i.

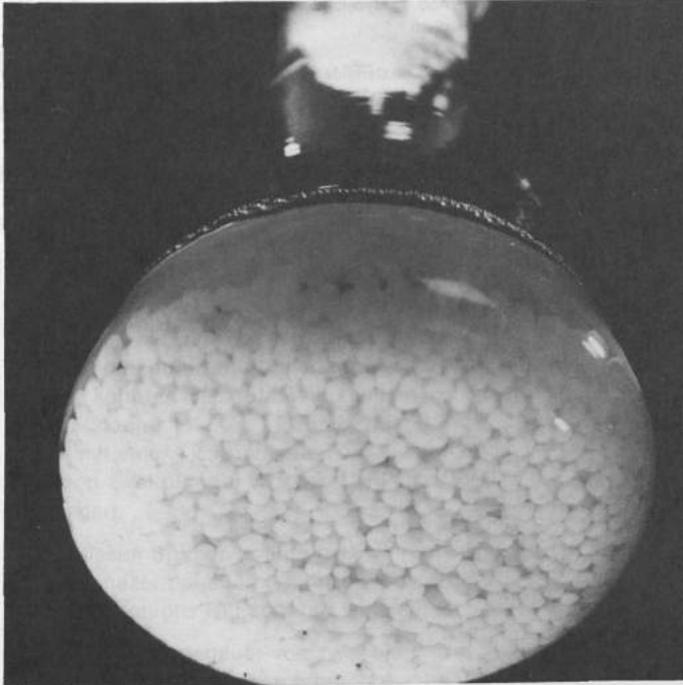


Abb. 4: Trich. mentagrophytes-Schüttelkultur nach 96stündiger Bebrütung. Keimeinsaat: 1×10^6 /ml, Myceltrockengewicht: 336 mg

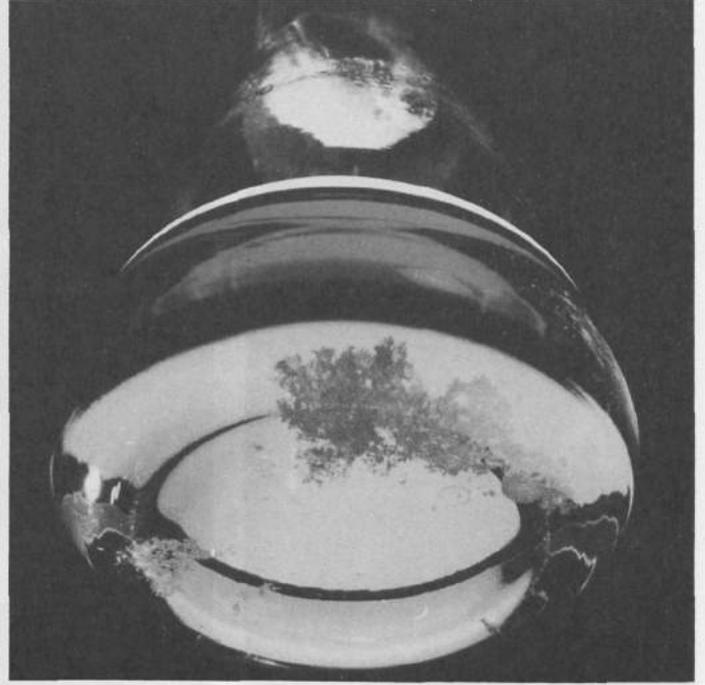


Abb. 5: Trich. mentagrophytes-Schüttelkultur mit Zusatz von 3 Nanogramm Bifonazol nach 96stündiger Bebrütung. Keimeinsaat: 1×10^6 /ml, Myceltrockengewicht: 6–7 mg ($\approx 2\%$ der Kontrolle)

3. Wirkung in „subinhibitorischen“ Konzentrationen

Eine bei Imidazol-Antimykotika allgemeine Eigenschaft, die Verlangsamung des Keimwachstums und der Keimvermehrung in Konzentrationen unterhalb der minimalen Hemmkonzentration ist beim Bifonazol stark ausgeprägt: Bei Dermatophyten wird das

Keimwachstum durch Bifonazol-Konzentrationen, die um die Faktoren 10–20 unter der MHK der Keime liegen, auf etwa 5–15% der Wirkstoff-freien Kontrollkulturen reduziert. In der Abb. 6 ist dies am Beispiel von *T. tonsurans* dargestellt.

Diese stark wachstumsverlangsamende Wirkung von subinhibitorischen Bifonazol-Konzentrationen bei Dermatophyten dürfte – speziell in den tieferen Schichten der Haut – von therapeutischer Relevanz sein.

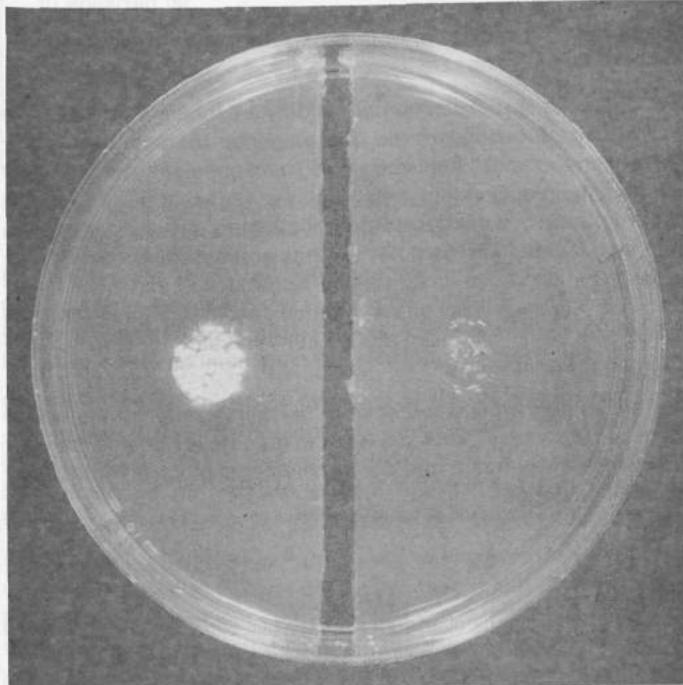


Abb. 6: „Halbseiten“-Versuch zur Partialhemmwirkung von Bifonazol bei Trichophyton tonsurans. (MHK 100%: 2 mcg/ml). Linke Seite: Wirkstoff-freie Kontrolle; rechte Seite: Wachstumshemmung durch 0,1 mcg Bifonazol/ml Agar

4. Wirkung auf die Mycel-Bildung von *C. albicans*

Kultiviert man *Candida albicans* in Eagle-Medium, das als morphogenen Faktor fetales Kälberserum enthält, so bilden 70% der inkulierten *Candida*-Sproßzellen Mycelien (Abb. 7).

Setzt man dem Eagle-Medium Bifonazol in Konzentrationen ab 0,062 mcg/ml zu, wird die Mycelbildung von *C. albicans* völlig unterdrückt und man findet nur verklumpte und gequollene Sproßzellen (Tab. 4).

Dieses Ergebnis ist wichtig und interessant, da Mycelien von *C. albicans* als die invasive Infektionsform des Erregers betrachtet werden, Sproßzellen dagegen als Kontaminationsform.

5. Virulenzabschwächung von *C. albicans* durch Vorbehandlung mit Bifonazol

Setzt man *C. albicans*-Sproßzellen in flüssigem Kimmig-Medium 12–24 Stunden lang der Einwirkung von Bifonazol in Konzentrationen von 0,5–4 mcg/ml aus, filtriert die Keime dann ab und wäscht sie wiederholt mit phys. NaCl-Lösung, so sind sie beim Übertragen auf Petrischalen mit Kimmig-Agar noch subkulturfähig, zeigen aber deutliche, Wirkstoff-bedingte Zellwandschäden (Abb. 8).

Injiziert man 10^6 dieser vorbehandelten und geschädigten, aber noch kulturfähigen Keime iv. bei Mäusen, so kommt es nicht mehr zur Infektion, die Mäuse zeigen keinerlei Krankheitssymptome, während Kontrolltiere nach iv.-Infektion mit der gleichen Keimzahl un behandelter *Candida*-Zellen 5–6 Tage p.i. an einer Nierencandi-

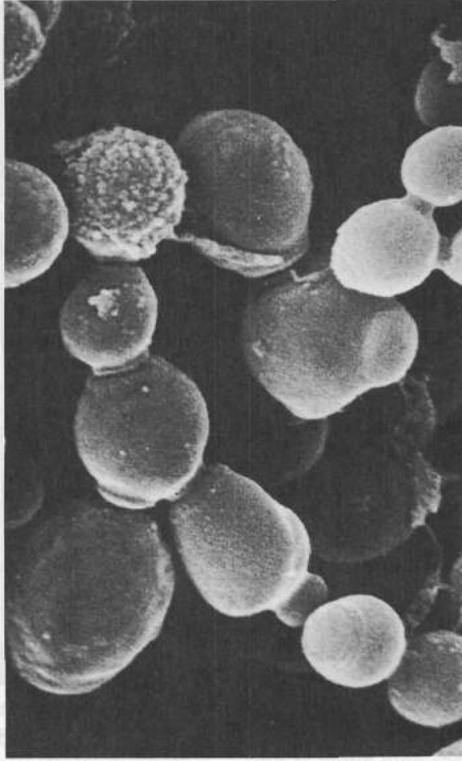
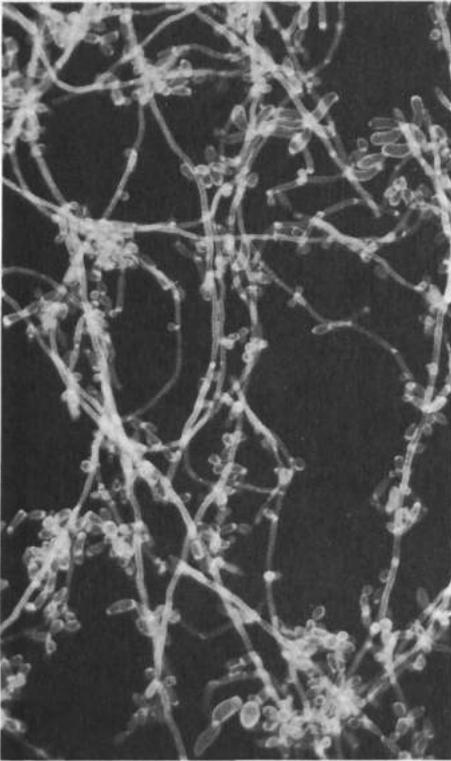


Abb. 7: Mycelbildung von *Candida albicans* in Eagle-Medium

Abb. 8: *Candida albicans* Sproßzellen unter dem Einfluß von 4 mcg Bifonazol/ml Substrat. Typische Zellwandschädigung

Tab. 4: Wirkung von Bifonazol auf die Pseudomycel-Bildung von *Candida albicans* in Eagle-Medium

Wirkstoff-Konzentration in mcg/ml	Morphologie der <i>Candida</i> -Zellen in Eagle-Medium
0 (Kontrolle)	ca. 70% Pseudomycel
0,031	ca. 30% Pseudomycel, 70% Sproßzellen
0,062	fast ausschließlich Sproßzellen einzeln noch elongiert
0,125	Sproßzellen
0,25	wenige verklumpte Sproßzellen

dose sterben. Wir führen diese Virulenzabschwächung Bifonazol-vorbehandelter *Candida*-Zellen auf eine durch die Zellwandschädigung bedingte Unfähigkeit zur Adhäsion an die Zelloberflächen des Makroorganismus zurück, wodurch die Keime ihre Infektiosität verlieren.

6. pH-Abhängigkeit der Bifonazol-Wirkung

Bifonazol hat – im Gegensatz zum Clotrimazol, das bei pH-Werten zwischen 3 und 8 eine uniforme antimykotische Wirkung zeigt – ein ausgeprägtes Wirkungsoptimum im pH-Bereich zwischen 6,7 und 7,4. Bei saurem und alkalischem pH sind bei Dermatophyten und Hefen zur Keimhemmung bis 10mal höhere Wirkstoffkonzentrationen erforderlich. Diese pH-Abhängigkeit der Wirkung mag eine der Ursachen für die unterschiedliche In-vitro-Wirksamkeit von Bifonazol in verschiedenen Nährsubstraten sein.

7. Resistenzverhältnisse

Die Resistenzsituation ist beim Bifonazol Azol-typisch günstig: die Primärresistenzquote humanpathogener Pilze mit MHK-Werten ≥ 32 mcg/ml beträgt, bezogen auf > 1.000 geprüfte Dermatophyten-, Hefen- und Aspergillus-Stämme, > 0,5%.

Sekundäre Resistenzentwicklungen konnten weder im Passageverfahren noch mit Gradienten-Platten beobachtet werden.

8. Hautverweildauer im Tierexperiment

Bei Infekt-Protektionsversuchen mit Mycospor®-Creme am Modell der Meerschweinchen-Trichophytie durch *Trich. mentagrophytes* konnte die Hautverweildauer von Bifonazol nach topischer Applikation von 0,5 ml der 1%igen Formulierung auf eine Hautoberfläche von ca. 3 x 3 cm mit 50 – 60 Std., die der Mycospor-Lösung auf > 36 – < 48 Std. bestimmt werden. Unter gleichen Versuchsbedingungen zeigte Clotrimazol – als Canesten®-Creme und Lösung angewandt – eine Hautverweildauer von 36 bzw. 24 – 30 Std.

D. Schlußfolgerungen aus den experimentellen Eigenschaften von Bifonazol

Die dargestellten experimentell antimykotischen Eigenschaften von Bifonazol, besonders die überzeugende therapeutische Wirkung nach topischer Applikation im Tierexperiment, der fungizide Wirkungstyp bei Dermatophyten und die verlängerte Hautverweildauer im Infekt-Protektionstest ermöglichten uns den Vorschlag, vom bisher üblichen Therapie- und Dosierungsschema bei Dermatomykosen abzuweichen. Statt, wie bisher üblich, bei einer Therapie-dauer von 4 – 6 Wochen ein Antimykotikum täglich 2 – 3mal zu applizieren, kann Bifonazol täglich nur 1mal und nur für 2 – 3 Wochen angewandt werden.

Die bisherigen Ergebnisse sowohl der klinischen Prüfungen als auch der Mycospor®-Verschreibung in der Praxis haben unsere experimentellen Befunde und die daraus abgeleiteten Therapie-vorschläge bestätigt.

Literatur

- [1] PLEMPEL, M., E. REGEL, K.-H. BÜCHEL: Antimycotic efficacy of Bifonazole in vitro and in vivo. *Arzneim. Forsch.* **33** (I) 4 (1983): 517 – 524
- [2] STETTENDORF, S.: Verträglichkeit und Wirksamkeit von Bifonazol bei Dermatomykosen. *Arzneim. Forsch.* **33** (I) 5 (1983): 750 – 754
- [3] YAMAGUCHI, H., T. HIRATANI, M. PLEMPEL: In vitro studies of a new Imidazole-antimycotic, Bifonazole, in comparison with Clotrimazole and Miconazole. *Arzneim. Forsch.* **33** (I) 4 (1983): 546 – 551