

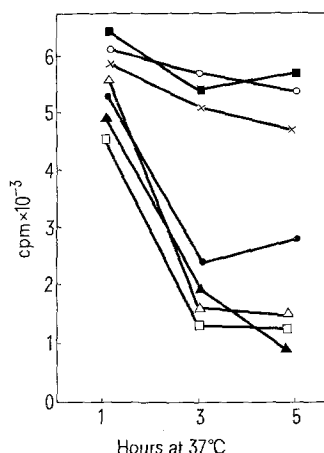


Fig. 2. Effect of poliovirus inhibitors on the leucine uptake by infected cells. HEp2 monolayers were infected with 50 PFU/cell and incubated at 37°C. Inhibitors were added at time 0. Incorporation of H^3 leucine (0.1 μ Ci/ml, 1 h pulses) in uninfected cells ($\circ-\circ$) or infected cells ($\bullet-\bullet$), maintained in Hank's BSS supplemented with AMD 2 μ g/ml and in infected cells maintained in the same medium containing guanidine HCl 300 μ g/ml ($\Delta-\Delta$), D-penicillamine 150 μ g/ml ($\square-\square$); HBB 150 μ g/ml ($\triangle-\triangle$), S-7 250 μ g/ml ($\blacksquare-\blacksquare$), and guanidine HCl 300 μ g/ml + S-7 250 μ g/ml ($\times-\times$).

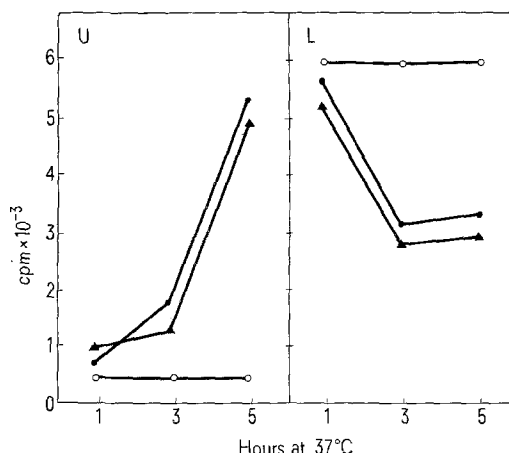


Fig. 3. Effect of S-7 on the blockade of cell protein synthesis induced by a S-7 resistant strain of poliovirus 1. HEp2 cell monolayers were infected with 50 PFU/cell and incubated at 37°C in Hank's BSS containing AMD (2 μ g/ml), with or without S-7 (250 μ g/ml). Incorporation of H^3 Uridine (0.3 μ Ci/ml from time 0) (U) and of H^3 Leucine (0.1 μ Ci/ml, 1 h pulses) (L) in uninfected cells ($\circ-\circ$), in infected cells ($\bullet-\bullet$) and in infected cells maintained in S-7 250 μ g/ml ($\blacktriangle-\blacktriangle$).

tral red was measured at 530 nm. For more details see previous papers⁹.

Results. The data in Figure 1 show that, like guanidine, D-penicillamine and HBB, also S-7 prevents virus RNA replication, infectious virus production and CPE. However (Figure 2), only the thiopyrimidine is able to prevent the sudden decrease in leucine uptake which occurs within 3 h after infection and is ascribed to the sprogramming activity of virus proteins on cell polyribosomes¹⁰. Since the thiopyrimidine exerts this action also in cells in which virus proteins are reduced by guanidine, it can be assumed that S-7 prevents a virus-induced blockade of cell protein synthesis. The thiopyrimidine does not seem to exert this effect through a direct protection of cell polyribosomes, as other authors have observed for chloroquine in Newcastle Disease virus infected cells¹¹, but rather by acting on virus cycle. In fact no such effect can be seen in cells infected with the S-7 resistant variant of poliovirus (Figure 3).

The above results show that, contrary to what has been observed up to now for guanidine¹², D-penicillamine¹³, and HBB¹³, specific inhibitors of virus synthesis can also prevent the virus-induced damage in cell metabolism which causes cell death even when virus replication is inhibited¹⁴.

Riassunto. Contrariamente ad altri inibitori specifici del poliovirus che prevengono RNA-sintesi virale ed effetto citopatologico, ma non hanno effetto sui danni precoci che l'infezione induce nel metabolismo cellulare, un derivato tiopirimidinico è anche capace di impedire il blocco precoce, virus indotto, delle proteino-sintesi cellulari.

MARIA A. MARCIALIS, P. LA COLLA and B. LODDO¹⁵

Istituto di Microbiologia II della Università degli Studi di Cagliari,
Via Porcell 12, Cagliari (Italy), 30 March 1972.

⁹ A. M. CIOGLIA, C. DE GIULI, O. ZUFFARDI, F. PALMAS, M. A. MARCIALIS, P. LA COLLA, B. SCARPA and B. LODDO, Riv. Farmac. Ter., Modena 2, 61 (1971).

¹⁰ S. PENMAN and D. SUMMERS, Virology 27, 614 (1965).

¹¹ D. E. WILSON, J. gen. Virol. 14, 107 (1972).

¹² B. LODDO, Minerva Med. 59, 3373 (1968).

¹³ L. A. CALIGUIRI, H. J. EGGERS, N. IKEGAMI and I. TAMM, Virology 27, 551 (1965).

¹⁴ We are indebted to Dr. MASUZO KANOMORI and Dr. IGOR TAMM for the gift of S-7 and HBB.

¹⁵ This work has been supported by the Consiglio Nazionale delle Ricerche, Rome (Italy).

Versuche zur Wirkungssteigerung der Kombination Sulfamethoxazol/Trimethoprim durch EDTA und Levallorphan an *Escherichia coli*

In letzter Zeit wurden verschiedentlich Versuche unternommen, die Wirkung von Antibiotika durch EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure) zu steigern. Ein solcher Effekt, bestehend in einer verstärkten Wirkstoffaufnahme in die Bakterienzelle, ist durchaus zu erwarten, da durch die Bindung zweiwertiger Metallionen tiefgreifende Veränderungen in der Zellwand auftreten¹. Eine synergistische Wirkung von EDTA mit verschiedenen Antibiotika konn-

te allerdings nicht generell festgestellt werden^{2,3}. Die Ergebnisse variieren von Stamm zu Stamm und auch mit dem jeweils geprüften Antibiotikum.

RAWAL und OWEN⁴ fanden, dass EDTA die Wirkung der Kombination Sulfamethoxazol/Trimethoprim (SMZ/TM) bei *Pseudomonas* verstärkt, bzw. dass erst durch diese Kombination primär resistente Keime in vitro ansprechen. Da andererseits EDTA auch bei *E. coli* zu einer Wir-

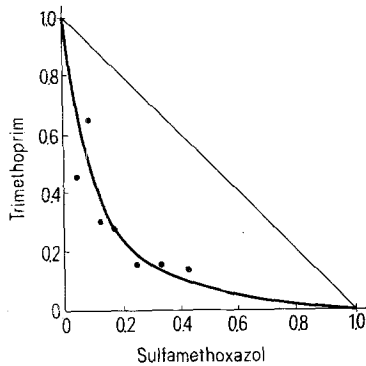


Fig. 1. Synergismus der Kombination SMZ/TM an *E. coli* in Minimalmedium mit 0,1% Casamino acids. Aufgetragen sind die «fractional inhibitory concentrations».

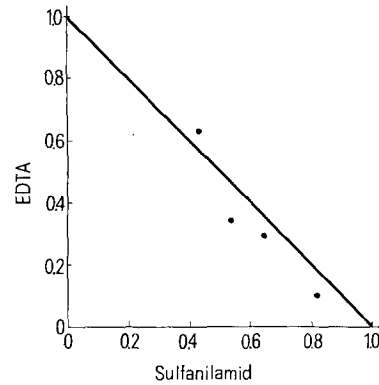


Fig. 2. Wirkung der Kombination von EDTA mit Sulfanilamid auf *E. coli*. Bedingungen wie in Figur 1.

kungssteigerung von Tetracyclinen und Penicillin V führte², erschien es interessant, den Einfluss von EDTA auf die Kombination SMZ/TM auch an *E. coli* zu überprüfen.

Die gegenseitige Beeinflussung der verschiedenen Substanzen wurde nach der Methode von ELION et al.⁵ ermittelt. Zur Errechnung der «fractional inhibitory concentrations» wurden diejenigen Konzentrationen verwendet, die zu einer Wachstumshemmung von 50% (abgelesen als Trübung bei 600 nm) führten. Das Wachstum erfolgte in 10 ml Minimalmedium⁶, mit oder ohne Zusatz von 0,1% Casamino acids, bei 37°C über 24 h. Im Isobologramm liegen bei überadditiver Wirkung die sich entsprechenden Indices in Richtung zum Nullpunkt. Figur 1 zeigt die nach dieser Methode erhaltene synergistische Wirkung der Kombination SMZ/TM.

Es wurde zunächst geprüft, ob die Einzelkomponenten SMZ bzw. TM mit EDTA (Dinatriumsalz) eine Wirkungssteigerung zeigen. Eine solche konnte weder mit SMZ noch mit TM gefunden werden. Erwartungsgemäss zeigte sich auch bei der Kombination SMZ/TM (im Verhältnis 10:1) mit EDTA nur eine rein additive Wirkung. Es wurden die gleichen negativen Ergebnisse bei Versuchen in verschiedenen Medien erhalten.

Sowohl TM als auch SMZ sind in sehr niedrigen Konzentrationen wirksam und gelangen offensichtlich gut in die Bakterienzelle. Es wurde daher untersucht, ob ein positiver Effekt von EDTA auf die Wirkstoffaufnahme vorhanden ist, wenn es mit dem schlechter permeierenden Sulfanilamid kombiniert wird. Unter den Testbedingungen waren 185 µg/ml Sulfanilamid nötig, um das Wachstum von *E. coli* um 50% zu hemmen, während von SMZ 1 µg/ml (als Natriumsalz) genügten. Ebenso wie SMZ zeigte jedoch auch Sulfanilamid in Gegenwart von EDTA keine gesteigerte Wirkung (Figur 2).

Ähnlich wie EDTA, das Veränderungen an der Zellwand verursacht, beeinflusst Levallorphan (l-3-Hydroxy-N-allyl-morphinan) die Permeabilität der Plasmamembran⁷. Die Möglichkeit, durch Kombination von TM bzw. SMZ mit Levallorphan (als Tartrat) zu einer Wirkungsverstärkung zu gelangen, was theoretisch von Interesse wäre, wurde daher geprüft. Hinweise auf einen überadditiven Effekt konnten jedoch weder mit SMZ noch mit TM erbracht werden.

Es wurde somit in vitro bei *E. coli* in keinem Fall eine positive Beeinflussung der minimalen Hemmkonzentrationen sowohl der Einzelkomponenten als auch der Kombination SMZ/TM durch gleichzeitige Gabe von EDTA bzw. Levallorphan gefunden. Eine überadditive Wirkung

ist somit, wie auch von anderen Autoren bestätigt wird, keineswegs generell zu erwarten⁸. EDTA scheint daher vor allem bei speziellen Zellwandverhältnissen, wie sie z.B. bei *Pseudomonas* vorliegen⁹, zu einer Steigerung der Wirkstoffaufnahme zu führen¹⁰. Eine chemotherapeutische Anwendung von Kombinationen mit EDTA erscheint sehr fragwürdig, zumal vereinzelte Ergebnisse, welche in vitro positiv waren, sich in vivo nicht bestätigen³.

Summary. EDTA, which is reported to potentiate the action of some antibiotics and chemotherapeutics in various bacterial strains, showed only additive effects in *E. coli*, when combined with trimethoprim or sulfamethoxazole, either singly or together. Neither was a potentiation seen with sulfanilamide, the permeation and effectiveness of which is less pronounced than that of sulfamethoxazole. The same negative results were obtained with levallorphan, which leads to alterations in the cell membrane. EDTA may therefore be of chemotherapeutic interest only in special cases, e.g. in *Pseudomonas* species which possess a highly EDTA-sensitive cell wall.

R. THEN

Abteilung für Experimentelle Medizin der
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, CH-4002 Basel (Schweiz),
7. April 1972.

¹ C. A. SCHNAITMAN, J. Bact. 108, 553 (1971).

² K. SEEGER und G. HENTSCHEL, Arzneimittel-Forsch. 21, 1590 (1971).

³ G. HENTSCHEL und K. SEEGER, Arzneimittel-Forsch. 21, 1215 (1971).

⁴ B. D. RAWAL und W. R. OWEN, Appl. Microbiol. 27, 367 (1971).

⁵ G. B. ELION, S. SINGER und G. H. HITCHINGS, J. biol. Chem. 208, 477 (1954).

⁶ K. G. LARK, T. REPKO und E. J. HOFFMAN, Biochim. biophys. Acta 76, 9 (1963).

⁷ P. L. BOQUET, M. A. DEVYNCK, H. AURELLE und P. FROMAGEOT, Europ. J. Biochem. 27, 536 (1971).

⁸ H. C. NEU und E. B. WINSELL, Nature, Lond. 225, 763 (1970).

⁹ S. G. WILKINSON, J. Bact. 104, 1035 (1970).

¹⁰ R. WEISER, J. WIMPENNY und A. W. ASCHER, Lancet 2, 619, No. 7621 (1969).