

## 55. Über die Wirkung von 2-Phenylcyclopropylaminen auf die Monoamin-oxydase und andere Enzymsysteme

18. Mitteilung über Amin-oxydasen<sup>1)2)</sup>

von **Satyapriya Sarkar, Renuka Banerjee, Marian S. Ise** und **E. Albert Zeller**

(7. XII. 59)

Kürzlich wurde *trans*-2-Phenylcyclopropylamin<sup>3)</sup> als ein «potent *in vivo* inhibitor» der Monoamin-oxydase (MO) erkannt<sup>4)</sup>. Nachdem wir diesen Befund, der ohne Mitteilung irgendwelcher enzymologischer Angaben gemacht worden war, durch *in vitro* Versuche bestätigen konnten<sup>5)</sup>, beschlossen wir, die Wirkungsweise dieser neuen Klasse von MO-Inhibitoren mit derjenigen einiger Alkylhydrazine, die sich bisher als die wirksamsten Hemmstoffe erwiesen hatten<sup>6-7)</sup>, zu vergleichen. Es schien uns möglich, auf diesem Weg weiteren Aufschluss über den Bau des aktiven Zentrums der MO<sup>8)9)</sup> zu gewinnen. Eine gründliche Kenntnis dieser Struktur, die als einer der primären Angriffspunkte – «targets» – einer neuen Gruppe von Psychopharmaka gilt, schien uns nicht nur von Bedeutung für die Enzymologie und Stoffwechselchemie zu sein, sondern auch für gewisse Gebiete der Physiologie, Pharmakologie und Klinik<sup>10)</sup>.

Wir danken den NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (United States Public Health Service, Grants RG-5927 und B-1348) und der MULTIPLE SCLEROSIS FOUNDATION OF AMERICA (Prof. Dr. LEWIS J. POLLOCK, M. D., Responsible Investigator) für die Unterstützung dieser Arbeit.

### Experimenteller Teil

Wir erhielten *cis*- und *trans*-2-Phenylcyclopropylamin-hydrochlorid<sup>11)</sup> von den SMITH, KLINE, and FRENCH LABORATORIES (Philadelphia, Pa.)<sup>12)</sup>. Das Hydrochlorid des Cyclohexylamins wurde aus der freien Base (EASTMAN KODAK) gewonnen.

<sup>1)</sup> 17. Mitteilung: J. BARSKY, W. L. PACHA, S. SARKAR & E. A. ZELLER, J. biol. Chemistry 234, 389 (1959).

<sup>2)</sup> Ein Auszug eines Teils dieser Ergebnisse wurde schon früher mitgeteilt: E. A. ZELLER, Transactions of the JOSIAH MACY, JR. Foundation's Fifth Conference on Neuropharmacology, Princeton, N. J., May 1959 (im Druck).

<sup>3)</sup> Tranlycypromine = -SKF *trans* 385 = Parnate (SMITH, KLINE & FRENCH).

<sup>4)</sup> R. E. TEDESCHI, D. H. TEDESCHI, L. COOK, P. A. MATTIS & E. J. FELLOWS, Federation Proc. 78, 451 (1959).

<sup>5)</sup> E. A. ZELLER, J. BARSKY, E. R. BERMAN & J. R. FOUTS, J. Pharmacol. exp. Therap. 106, 427 (1952); weitere Angaben über die Anfänge dieses Gebietes finden sich in den Ref. <sup>6)</sup> und <sup>7)</sup>.

<sup>6)</sup> A. PLETSCHER & K. F. GEY, Science 128, 900 (1958).

<sup>7)</sup> E. A. ZELLER, Pharmacol. Rev. 11, 387 (1959).

<sup>8)</sup> Das erste, rohe Modell des aktiven Zentrums der MO wurde im Jahre 1957 entwickelt (siehe Ref. <sup>7)</sup> und <sup>9)</sup>).

<sup>9)</sup> E. A. ZELLER, J. BARSKY, L. A. BLANKSMA & J. C. LAZANAS, Federation Proc. 16, 276 (1957).

<sup>10)</sup> Eine Übersicht über dieses sich rasch entwickelnde Gebiet findet sich in der Monographie über «Amine oxidase Inhibitors», herausgegeben von E. A. ZELLER *et al.*, Ann. N. Y. Acad. Sci. 80, 551–1045 (1959).

<sup>11)</sup> A. BURGER & W. L. YOST, J. Amer. chem. Soc. 70, 2198 (1948).

<sup>12)</sup> Wir danken Herrn Dr. H. GREEN für die Überlassung der Präparate.

Zur Herstellung des Cyclopropylamins wurde Cyclopropylcyanid (EASTMAN KODAK) über das Imidocyclopropansäure-hydrochlorid<sup>13)</sup> in das entsprechende Carbonsäureamid übergeführt<sup>14)</sup> und dieses durch Sublimation gereinigt (Ausbeute 85%, Smp. 120–121°<sup>15)</sup>). Aus diesem wurde dann mit 60% Ausbeute das Cyclopropylurethan<sup>16)</sup> und daraus durch Verseifen das Amin hergestellt. Zur Reinigung wurde aus Hexanol umkristallisiert und die Kristalle auf der Nutsche mit Äther gewaschen (Ausbeute 55%). Zur Identifizierung wurde das Cyclopropylamin in den Phenylthioharnstoff (Smp. 126°, aus Äthanol<sup>17)</sup>) und in ein Benzamid-Derivat (Smp. 98° aus Äther<sup>18)</sup>) umgewandelt.

Die MO-Präparate – Homogenate, gewaschene Mitochondrien, in Lösung gebrachte Mitochondrien («gelöste Mitochondrien») – wurden nach früher beschriebenen Verfahren hergestellt<sup>19)</sup>. In jedes Gefäß (Gesamtlösung 2 ml) wurde das Äquivalent von 0,1 g (Leber) oder 0,125 g (Hirn) pipettiert. Als Diamin-oxydase (DO) gelangte ein 300fach gereinigtes Ferment aus Schweine-nierenrinde zur Anwendung<sup>20)</sup>. Rinderlinsen dienten als Quelle für ein Chymotrypsin-ähnliches Kathepsin<sup>21)</sup>. Sie wurden im Verhältnis von 1:6 in 0,9-proz. Kochsalzlösung homogenisiert. Die Manometergefäße enthielten 0,8 ml dieses Homogenates (Gesamtvolumen 3 ml).

Die hier angewandten Methoden für die Messung der MO wurden in der 15. Mitteilung dieser Publikationsreihe<sup>19)</sup> und für die Bestimmung der DO in der 12. Mitteilung<sup>23)</sup> beschrieben. Für die Analyse der Ophio-L-Aminosäure-oxydase wurde das Schlangengift in 0,9-proz. Kochsalzlösung aufgenommen und 0,01 M Leucin in Gegenwart von 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,2 abgebaut (Gesamtvolumen 2,0 ml)<sup>24)</sup>.

Die Aktivität beider Cholinesterasen (ChE) wurde manometrisch ermittelt<sup>25)</sup>, und dabei 0,083 ml Menschenserum und 0,01 M Benzoylcholin (F. HOFFMANN-LA ROCHE) für die Serum-ChE, und 0,2 mg Cobragift<sup>26)</sup> und 0,0025 M Acetylcholinjodid (F. HOFFMANN-LA ROCHE) für die Aceto-ChE verwendet. Die Hemmung des kristallinen Rinder-Chymotrypsins (ARMOUR) und des Rinderlinsen-Kathepsins wurde manometrisch in Hydrogenbicarbonatpuffer, pH 6,6 bestimmt<sup>21)</sup>. Als Substrat diente in beiden Fällen 0,01 M L-Phenylalanin-äthylester. Das Linsen-Enzyme, wurde durch 0,01 M Cobaltchlorid<sup>28)</sup> aktiviert. In allen Fällen wurde der Inhibitor ungefähr 15 Min. vor dem Substrat der Enzym-Lösung zugesetzt.

Die Enzymaktivitäten wurden durch deren Anfangsgeschwindigkeit,  $Q = ds/dt$ , ausgedrückt in Mikroatomen (MO und DO) und Mikromolen pro Stunde, charakterisiert. Die Entwicklung flüchtiger Amine, die der Einfachheit halber dem Ammoniak gleichgesetzt wurden, wurde in gleicher Weise berechnet<sup>29)</sup>. Wir bezogen die Q-Werte entweder auf 1 g frisches Gewebe (MO, Linse, Serum-ChE) oder auf 1 mg Trockenzym (Gifte, Chymotrypsin) oder einfach auf

<sup>13)</sup> J. B. CLOKE, E. C. KNOWLES & R. J. ANDERSON, J. Amer. chem. Soc. 58, 2547 (1936).

<sup>14)</sup> M. J. SCHLATTER, J. Amer. chem. Soc. 63, 1733 (1941).

<sup>15)</sup> Nach SCHLATTER<sup>14)</sup>, Smp. 120°.

<sup>16)</sup> P. LIPP, J. BUCHREMER & H. SEELES, Liebigs Ann. Chem. 499, 1 (1932).

<sup>17)</sup> Nach SCHLATTER<sup>14)</sup>, Smp. 125,5°.

<sup>18)</sup> Nach SCHLATTER<sup>14)</sup>, Smp. 99°.

<sup>19)</sup> E. A. ZELLER, J. BARSKY, E. R. BERMAN, M. S. CHERKAS & J. R. FOUTS, J. Pharmacol. exp. Therap. 724, 282 (1958).

<sup>20)</sup> W. L. PACHA & E. A. ZELLER, Abstracts, Division of Biological Chemistry, American Chemical Society, 136. Versammlung, Atlantic City, p. 38-C (1959).

<sup>21)</sup> E. A. ZELLER & A. DEVI, Am. J. Ophthalmol. 44, Part. II, 281 (1957).

<sup>22)</sup> A. DEVI, Amer. J. Ophthalmol. 48, Part II, 29 (1959).

<sup>23)</sup> E. A. ZELLER, J. R. FOUTS, J. A. CARBON, J. C. LAZANAS & W. VÖGTLI, Helv. 39, 1632 (1956).

<sup>24)</sup> E. A. ZELLER & A. MARITZ, Helv. 27, 1888 (1944), «Experimentelles».

<sup>25)</sup> R. AMMON, Arch. ges. Physiol. 233, 486 (1934); H. BIRKHÄUSER, Helv. 23, 1071 (1940).

<sup>26)</sup> E. A. ZELLER, Helv. 32, 94 (1948).

<sup>27)</sup> E. R. PARKS, JR., & G. W. E. PLAUT, J. biol. Chemistry 203, 755 (1953).

<sup>28)</sup> R. BANERJEE, A. DEVI & E. A. ZELLER, unpublierte Resultate.

<sup>29)</sup> Für Bestimmung und Kommentar der Ammoniakwerte siehe «Materials and Methods» in Ref. <sup>19)</sup>.

die im Reaktionsgefäß vorhandene Fermentmenge (DO). Diese Zahlenwerte dienen für die Berechnung der  $pI_{50}$ -Werte, die den negativen Logarithmus derjenigen Inhibitor-Konzentration darstellen, die eine 50-proz. Hemmung verursacht<sup>30)</sup>.

### Ergebnisse

1. *Versuch eines Abbaus von Cycloalkylaminen durch MO.* Mit Suspensionen von Rinderleber-Mitochondrien, deren Q-Werte zwischen 64 und 100 lagen (Tyramin, Standardbedingungen) war weder Oxydation von Cyclopropylamin, Cyclohexylamin oder *cis*- und *trans*-Phenylcyclopropylamin noch eine Desaminierung der beiden letzteren Substanzen zu beobachten. Mit den beiden ersteren Verbindungen konnte wegen deren Flüchtigkeit die übliche Ammoniakbestimmung in CONWAY-Gefäßen nicht durchgeführt werden. Diese Ergebnisse stimmen völlig mit der Erfahrung überein, dass  $\alpha$ -Alkylamine weder durch die MO<sup>31)</sup> noch durch die DO<sup>23)</sup> angegriffen werden.

2. *Hemmung verschiedener MO-Präparate durch cis- und trans-Phenylcyclopropylamin.* Noch nie zuvor wurden für die Rinderleber-Mitochondrien so wirksame MO-Inhibitoren wie die beiden Phenylcyclopropylamine gefunden (Tab. I). Die Kaninchenleber-Mitochondrien erwiesen sich mehr als zehnmal weniger empfindlich als die Rinder-Präparate (Tab. I). Da es denkbar war, dass dieser Unterschied durch die Geschwindigkeit des Eindringens der Hemmstoffe in die verschiedenen Mitochondrien bedingt war, wurden die  $pI_{50}$ -Bestimmungen mit «gelösten» Kaninchenleber-Mitochondrien wiederholt. Die Resultate blieben im wesentlichen dieselben (Tab. I). Als Grundlage für die in Abschnitt 4 beschriebenen *in vivo* Versuche wurde auch die Blockierung der MO von Mäuseleber-Homogenaten gemessen. Die Sensitivität dieses Enzympräparats war von der gleichen Größenordnung wie diejenige der Kaninchenleber (Tab. I) und die des Rattenhirn-Homogenats ( $pI_{50}$  5,6)<sup>32)</sup>.

Tabelle I. Einfluss von *cis*- und *trans*-Phenylcyclopropylamin auf MO und DO

Enzympräparat	Q			$pI_{50}$			
				<i>cis</i> -PCPA		<i>trans</i> -PCPA	
	Ox.	Am.	O/N	Ox.	Am.	Ox.	Am.
MO Rinderleber-Mitoch. . . .	135	130	0,97	6,7	6,7	6,8	6,7
	49	43	0,98	6,9	7,1	7,2	7,2
MO Kaninchenleber-Mitoch. . . <i>idem</i> , «gelöste» Mitoch. . .	68	54	1,01	6,0	5,9	5,7	5,5
	89	66	1,26	6,0	6,0	5,7	5,6
MO Mäuseleber-Homogenat . .	208	130	1,48	5,8	5,6	5,5	5,5
DO Angereichert aus Schweineleberrinde. . . .	100	111	0,91	2,7	2,8	1,5	1,7

Die beiden Isomeren übten annähernd die gleiche blockierende Wirkung auf die hier untersuchten MO-Präparate aus; *cis*-Phenylcyclopropylamin scheint bei der

<sup>30)</sup> J. A. CARBON, W. P. BURKARD & E. A. ZELLER, *Helv.* 41, 1883 (1958).

<sup>31)</sup> Zusammenfassungen bei a) H. BLASCHKO, Amine oxidase and amine metabolism, *Pharmacol. Rev.* 4, 415 (1952), und b) E. A. ZELLER, Oxidation of amines, in J. B. SUMNER und K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Acad. Press, New York 1951, Band II/1, p. 536.

<sup>32)</sup> A. R. MAASS & M. J. NIMMO, *Nature* 184, 547 (1959).

Kaninchen-MO das Übergewicht zu besitzen.

3. *Reversibilität der Hemmung.* Es wurde versucht, die Hemmung der Phenylcyclopropylamine auf die MO durch Dialyse rückgängig zu machen. Bei den Rinderleber-Mitochondrien, die mit  $10^{-5}$  M *cis*- oder *trans*-Isomeren inkubiert worden waren und deren MO nahezu vollständig blockiert war, liess sich stets eine geringe Aktivität – 2 bis 18% des ursprünglichen Q-Werts – durch 24stündige Dialyse gegen Phosphatpuffer zurückgewinnen. Ähnliche Versuche wurden mit Kaninchenleber-Mitochondrien durchgeführt und in Tab. II zusammengefasst. Aus den Zahlen lässt sich wiederum eine kleine, aber deutliche Reaktivierung erkennen. Mit «gelösten» Kaninchenleber-Mitochondrien wurden im wesentlichen die gleichen Resultate erhalten.

Tabelle II. *Reversibilität der Hemmung von MO*

Die Suspension von gewaschenen Kaninchenleber-Mitochondrien wurde auf das Zehnfache mit 0,087 M Phosphatpuffer pH 7,2 verdünnt und 1 Std. mit  $10^{-5}$  M Phenylcyclopropylamin bei Zimmertemperatur stengelassen. Die behandelten und unbehandelten Suspensionen wurden dann 6 Std. gegen Phosphatpuffer bei 4° dialysiert. Der Zellophanschlauch, der nur so weit gefüllt wurde, dass die maximale Schichtdicke der Lösung wenige Millimeter betrug, wurde in einem Glasrohr mit einem kontinuierlichen Strom von Puffer gespült

	vor der Dialyse			nach der Dialyse		
	Q <sub>ox</sub>	Q <sub>am</sub>	O/N	Q <sub>ox</sub>	Q <sub>am</sub>	O/N
Kontrollen . . . . .	87	59	1,13	62	48	1,14
<i>cis</i> -Phenylcyclopropylamin . .	4	4	0,78	9	12	0,86
<i>trans</i> -Phenylcyclopropylamin .	9	8	1,15	19	18	1,02

4. *In-vivo-Hemmung durch trans-Phenylcyclopropylamin.* Wir injizierten  $10^{-5}$  Mol per kg dieser Verbindung intraperitoneal, töteten die Mäuse nach verschiedenen Zeitintervallen und bestimmten unverzüglich die MO-Aktivität in Hirn- und Leber-Homogenaten. Mit zunehmender Dosis des applizierten Inhibitors nahm die Enzymaktivität in beiden Organen ab (Tab. III; Fig.). Die maximale Wirkung trat in Leber und Gehirn schon nach 90 Min. ein – kürzere Intervalle wurden bisher noch nicht untersucht – und blieb während mindestens 5 Std. bestehen (Tab. III). Nach 24 Std. stieg die MO-Aktivität beider Organe deutlich wieder an (Tab. III; Fig. 1). Die der MO des Gehirns erholte sich langsamer als die der Leber-MO. So dauerte es drei Tage, bis das Leberenzym nach einer Injektion von  $10^{-5}$  Mol pro kg *trans*-Phenylcyclopropylamin den ursprünglichen Wert wieder erreicht hat, während das Gehirn nach 4 Tagen nur 75% der MO der Kontrollen aufwies.

5. *Einfluss von Cyclopropylamin und Cyclohexylamin auf die MO.* Cyclohexylamin übt in millimolarer Lösung keinen Einfluss auf die MO von Rinderleber-Mitochondrien aus (Q<sub>ox</sub> 99, Standardbedingungen). Es ist somit  $pI_{50} \ll 3$ . Für Cyclopropylamin und Kaninchenleber-Mitochondrien wurde ein  $pI_{50} = 1,5$  (Oxydationsgeschwindigkeit der Kontrollen Q = 71) gemessen. Die Weglassung des Benzolkernes reduziert somit die MO-blockierende Wirkung der Cyclopropylamin-Derivate um mehr als das Zehntausendfache.

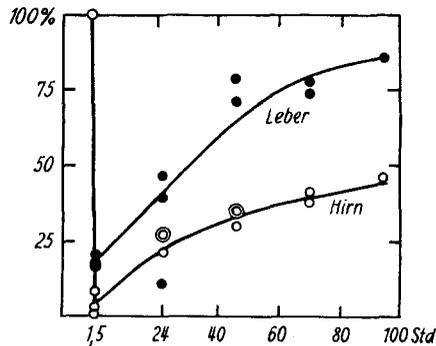
6. *Die Wirkung von Phenylcyclopropylaminen auf die Diamin-oxydase und Ophiol-Aminosäure-oxydase.* Um einen ersten Einblick in die Spezifität der Phenylcyclo-

propylamine zu gewinnen, wurden zwei weitere Fermente, die die oxydative Desaminierung beschleunigen, geprüft. Das erstere, Diamin-oxydase (DO), wurde trotz der nahen Verwandtschaft um das Zehntausendfache bis Hunderttausendfache weniger

Tabelle III. In vivo Hemmung von Leber- und Hirn-MO von Mäusen durch cis- und trans-Phenylcyclopropylamin

Die angegebenen Werte geben die MO-Aktivität in Prozent der ursprünglichen Aktivität (Leber:  $Q_{ox} = 198$ ,  $Q_{am} = 131$ ; Hirn:  $Q_{ox} = 24$ ,  $Q_{am} = 30$ ) an. Zur Darstellung wurden die  $Q_{am}$ -Werte benützt

Injektion: $\mu\text{Mol/kg}$	Stunden nach Injektion			
	1,5	2,5	5	24
<i>Leber-MO</i>				
5 <i>trans</i> -PCPA . . . . .	64	60		
10 <i>trans</i> -PCPA . . . . .	29	36	31	58
15 <i>trans</i> -PCPA . . . . .	18			29
15 <i>cis</i> -PCPA . . . . .	9		14*)	35
<i>Gehirn-MO</i>				
5 <i>trans</i> -PCPA . . . . .	41	64		
10 <i>trans</i> -PCPA . . . . .	31	31	28	43
15 <i>trans</i> -PCPA . . . . .	5			25
15 <i>cis</i> -PCPA . . . . .	1		14*)	15
*) 4 Stunden				



In vivo Hemmung der MO in Leber und Gehirn von Mäusen

Abszisse: Stunden nach Injektion; Ordinate: Prozent der ursprünglichen MO-Aktivität (siehe Tab. III). Zur Darstellung wurden die  $Q_{am}$ -Werte benützt

gehemmt als MO (Tab. I). Die *cis*-Verbindung scheint dem *trans*-Isomeren etwas überlegen zu sein.

Als Vertreter der Klasse von Aminosäure-oxydasen wurde die in unserem Laboratorium entdeckte Ophio-L-Aminosäure-oxydase gewählt<sup>24)</sup> <sup>33)</sup>. Selbst 0,002 M

<sup>33)</sup> E. A. ZELLER, A. MARITZ & B. ISELIN, *Helv.* 28, 1615 (1945); A. E. BENDER & H. A. KREBS, *Biochem. J.* 46, 210 (1950); T. P. SINGER & E. B. KEARNEY, *Arch. Biochemistry* 27, 348 (1950); C. FRIEDEN & S. F. VELICK, *Biochim. biophys. Acta* 23, 439 (1957); J. R. PARIKH, J. P. GREENSTEIN, M. WINITZ & S. M. BIRNBAUM, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 953 (1958); A. N. RADHAKRISHNAN & A. MEISTER, *J. biol. Chemistry* 233, 444 (1958).

Lösungen von Phenylcyclopropylaminen hatten keine nennenswerte Hemmung zur Folge ( $pI_{50} \leq 2,7$ ) (Tab. IV).

7. *Einfluss von Phenylcyclopropylaminen auf hydrolytische Fermente.* Verschiedene Esterasen wurden auf ihr Verhalten gegenüber den beiden Phenylcyclopropylaminen

Tabelle IV. *Effekt von cis- und trans-2-Phenylcyclopropylamin auf verschiedene Fermente*

Enzyme	Inhibitor-Konzentration	Messung	Q		
			Kontrolle	cis-PCPA	trans-PCPA
Aminosäure-oxydase, Gift von <i>Vipera Russeli</i> , 1 mg	0,001 M*)	O <sub>2</sub>	33	41	40
		NH <sub>3</sub>	14	16	16
Aceto-ChE, Gift von <i>Naia naia</i> , 0,2 mg	0,002 M	CO <sub>2</sub>	67	51	60
Menschenserum-ChE	0,01 M	CO <sub>2</sub>	63	67	93
Kathepsin, Linse	0,001 M**)	CO <sub>2</sub>	183	236	236
Chymotrypsin, 50 mg	0,002 M	CO <sub>2</sub>	$5,3 \times 10^5$	$5,7 \times 10^5$	$6,1 \times 10^5$
*) 0,002 M Lösung ohne deutlichen Einfluss    **) 0,005 M Lösung ohne Einfluss					

geprüft (Tab. IV). In keinem Fall konnte eine nennenswerte Hemmung bei Konzentrationen bis zu 0,001 M beobachtet werden<sup>34)</sup>. In einzelnen Fällen wurde die Konzentration bis zu 0,01 M gesteigert, was aber keine erhebliche oder regelmässige Fermentblockierung zur Folge hatte.

### Diskussion der Ergebnisse

Mit den Phenylcyclopropylaminen wird den bisherigen Klassen von Inhibitoren der Monoamin-oxidase (MO) eine neue zugefügt. Die für die Rinderleber-Mitochondrien berechneten  $pI_{50}$ -Werte, die zwischen 6,7 und 7,2 liegen, übertreffen alle bisher gewonnenen Ergebnisse für irgendwelche MO-Präparate. Den Phenylcyclopropylaminen am nächsten in Wirksamkeit kommen einfache Alkylhydrazine, Benzylhydrazin und Abkömmlinge dieses Hydrazins (Tab. V). Das Ausmass der Empfindlichkeit der MO gegenüber den Phenylcyclopropylaminen ist von der gewählten Tierart abhängig (Tab. I), wie das auch schon früher für Iproniazid<sup>37)</sup> beobachtet worden ist<sup>1) 35) 36)</sup>.

Die Resultate der *in-vivo*-Versuche mit *trans*-Phenylcyclopropylamin unterscheiden sich in quantitativer Hinsicht von den seinerzeit mit Iproniazid<sup>37)</sup> erhaltenen derart, dass diese Verbindung, im Gegensatz zu den Phenylcyclopropylaminen, die Leber-MO besser hemmt als die Hirn-MO in Meerschweinchen<sup>35)</sup>, Ratte<sup>36) 38)</sup> und

<sup>34)</sup> Wir danken Fr. VERENA ZELLER und Herrn NORMAN COTHRAN für die Durchführung einiger dieser Versuche.

<sup>35)</sup> E. A. ZELLER & J. BARSKY, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 87, 459 (1952).

<sup>36)</sup> E. A. ZELLER, J. BARSKY & E. R. BERMAN, J. biol. Chemistry 214, 267 (1955).

<sup>37)</sup> 1-Isonicotinyl-2-isopropyl-hydrazin, Marsilid.

<sup>38)</sup> J. H. GOGERTY & A. HORITA, Federation Proc. 18, 395 (1959).

Maus<sup>39)</sup>. Diese Ergebnisse sind aber nicht unbedingt typisch für alle Hydrazin-Derivate, wie das aus den Versuchen mit  $\beta$ -Phenylisopropylhydrazin<sup>40)</sup> hervorgeht, dessen relative Wirkung auf die MO dieser beiden Organe gerade umgekehrt wie für Iproniazid ist<sup>38)</sup>. Die Dauer der *in-vivo*-Hemmung ist ebenfalls sehr verschieden; mit Iproniazid tritt sie später ein und bleibt länger erhalten als mit Phenylcyclopropylamin<sup>36)</sup><sup>39)</sup>. So findet sich im Mäusegehirn die MO-Aktivität nach Applikation einer

Tabelle V. Bisher beobachtete Hemmungen mit  $pI_{50} > 6$ 

Verbindung	$pI_{50}$	Literatur
Äthylhydrazin . . . . .	6,2	1)
Benzylhydrazin . . . . .	6,2	41)
	6,3	42)
	6,4	43)
N-Benzyl-N'-picolinyln-hydrazin . . . . .	6,1	44)
1-Benzyl-2-(5-Methyl-3-isoxazolylcarbonyl)-hydrazin . . . . .	6,1	44)
2-Hydrazinomethyl-thiophen . . . . .	6,6	45)
3-Hydrazinomethyl-pyridin . . . . .	6,6	45)

einzelnen Dosis von Iproniazid noch nach 14 Tagen subnormal<sup>44)</sup>. Vielleicht können diese Ergebnisse mit Beobachtungen in Zusammenhang gebracht werden, nach denen die Blockierung von MO durch Iproniazid durch fortgesetzte Dialyse nicht aufgehoben werden kann<sup>36)</sup>, während die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass ein Teil der Aktivität der durch die Phenylcyclopropylamine gehemmten MO durch Dialyse zurückgewonnen werden kann.

Die im Vergleich zu den Phenylcyclopropylaminen sehr geringe hemmende Wirkung des unsubstituierten Cyclopropylamins erinnert an das Verhalten von analog gebauten MO-Substraten, wobei das Phenylcyclopropylamin dem Phenyläthylamin und das Cyclopropylamin dem Äthylamin entspricht (Tab. VI). Das Verhältnis der Abbaugeschwindigkeiten von Phenyläthylamin und Äthylamin beträgt 100:8 für Rinderleber und 100:ca. 0 für Kaninchenleber<sup>46)</sup>. In der Reihe der Phenylalkylamine erweist sich das Phenyläthylamin als das beste Substrat, und unter den Phenylalkylhydrazinen das Benzylhydrazin als der wirksamste Inhibitor<sup>41)</sup>. Aus diesen Tatsachen wird geschlossen, dass eine zweigliedrige, mit einem aromatischen Ring verbundene Kette das «günstigste» Grundgerüst für Substrate und Inhibitoren der MO darstellt (Tab. VI). Eine ähnliche Struktur ist daraus auch für das aktive

<sup>39)</sup> A. N. DAVISON, A. W. LESSIN & M. W. PARKES, *Experientia* **13**, 329 (1957).

<sup>40)</sup> Catron.

<sup>41)</sup> E. A. ZELLER, On the Nature of the Reactive Surface of Amine Oxidases, in: *Symposium on Biochemistry and Nutrition*, Cornell University, May 1955, published by the New York State College of Agriculture, Ithaca, N.Y., p. 25–33.

<sup>42)</sup> W. SCHULER & R. MEIER, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **13**, 106 (1955).

<sup>43)</sup> S. SARKAR & E. A. ZELLER, unpublizierte Versuche mit «gelösten» Kaninchenleber-Mitochondrien.

<sup>44)</sup> L. O. RANDALL & R. E. BAGDON, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **80**, 626 (1959).

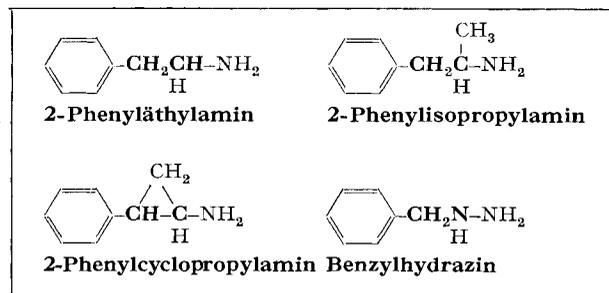
<sup>45)</sup> E. A. ZELLER, L. A. BLANKSMA, W. P. BURKARD, W. L. PACHA & J. C. LAZANAS, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **80**, 583 (1959).

<sup>46)</sup> E. V. HEEGARD & G. A. ALLES, *J. biol. Chemistry* **147**, 505 (1943).

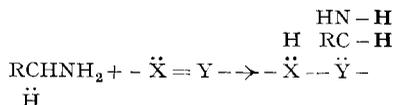
Zentrum der MO abgeleitet worden<sup>7)</sup>. Betrachtet man nun die Phenylcyclopropylamine als dem Phenyläthylamin verwandte Verbindungen, so wird deren grosse Wirksamkeit verständlich<sup>47)</sup>.

Viele Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Phenylcyclopropylamine mit dem aktiven Zentrum der MO reagieren. Dasselbe ist für gewisse Hydrazine, die als «Pseudoamine» zu reagieren scheinen<sup>36) 37) 41)</sup>, und für  $\alpha$ -Alkylphenyläthylamine<sup>31a)</sup>, die mit dem Substrat um das Enzym konkurrieren, zu vermuten. Alle drei Inhibitorgruppen besitzen ein  $\alpha$ -Wasserstoffatom (Tab. VI), von dem für gewisse Hydrazin-

Tabelle VI



derivate gezeigt werden konnte, dass es für die hemmende Wirkung notwendig ist<sup>1) 48)</sup>. Als Arbeitshypothese, die gegenwärtig geprüft wird, nehmen wir deshalb an, dass ein  $\alpha$ -Wasserstoffatom für die Bindung von Substraten oder der oben erwähnten Hemmstoffe an das aktive Zentrum notwendig ist, während ein zweites  $\alpha$ -Wasserstoffatom im Verlauf der Enzymreaktion abgespalten wird. Diese Verhältnisse sind in der folgenden Reaktionsgleichung schematisch dargestellt, wobei die Komponente X-Y einen Teil des Fermentzentrums bedeutet und die fettgedruckten Wasserstoffatome von einem Wasserstoffakzeptor übernommen werden.



## SUMMARY

1. Monoamine oxidase (MO) does not attack cyclopropylamine, cyclohexylamine, *cis*- and *trans*-phenylcyclopropylamine. These results are consistent with previous observations that MO is unable to catalyze the degradation of  $\alpha$ -alkylated amines.

2. The  $\text{pI}_{50}$  values (6.7 to 7.2) of the two phenylcyclopropylamines for beef liver mitochondrial MO are higher than any other  $\text{pI}_{50}$  values hitherto recorded for a MO inhibitor. These values indicate that a tenmillionth ( $10^{-7}$ ) molar solution pro-

<sup>47)</sup> Kürzlich wurde – ohne Mitteilung von enzymologischen Daten – festgestellt, dass 2-Phenylcyclopentylamin, in dem die Aminogruppe durch 2 Kohlenstoffatome vom Benzolring getrennt ist, ebenfalls ein Hemmstoff der MO ist: A. BURGER, R. BENNETT & A. HOFFSTETTER, Abstracts, Division of Medicinal Chemistry, American Chemical Society, 136. Versammlung, Atlantic City, p. 38-0 (1959).

<sup>48)</sup> E. A. ZELLER, J. BARSKY, J. R. FOUTS & J. C. LAZANAS, Biochem. J. 60, V (1955).

duces 50 per cent inhibition. In comparison with the MO of beef liver mitochondria, the MO is less sensitive in intact or solubilized rabbit liver mitochondria and in mouse liver homogenates ( $pI_{50} = 5.6$  to  $6.0$  and  $5.5$  to  $5.8$ , respectively). Essentially the *cis*- and *trans*-isomers display similar inhibitory power; the former seems to be slightly more effective for rabbit and mouse preparations and the latter for beef liver mitochondria.

3. By prolonged dialysis of intact or solubilized rabbit liver mitochondria pretreated with either one of the two geometric isomers, it was possible to recover a small fraction of the MO activity.

4. Intraperitoneal injection of mice with *trans*-phenylcyclopropylamine inhibited brain MO more than liver MO. Maximal inhibition after injection was observed at 1.5 hrs. and persisted for 5 hrs. Liver recovered enzyme activity faster than brain. These effects differ from those observed previously with iproniazid, with respect to the relative inhibition of liver and brain and to the rate of reactivation of MO. *cis*-Phenylcyclopropylamine seems to inhibit both liver and brain at least as strongly as the *trans*-isomer.

5. Cyclopropylamine and cyclohexylamine inhibit MO very slightly. The  $pI_{50}$  value for cyclopropylamine and rabbit liver mitochondria was only 1.5. Thus the difference in inhibitory power between the compounds with and without a benzene ring is more than ten thousand fold. The  $pI_{50}$  values of cyclopropylamine and phenylcyclopropylamines are compared with the degradation rates of two analogue substrates of rabbit liver MO, *viz.* ethylamine and phenylethylamine; while the former is hardly attacked, the latter is one of the best substrates of this enzyme preparation.

6. Diamine oxidase (DO) is fairly resistant to *cis*-phenylcyclopropylamine ( $pI_{50} = 2.7$  to  $2.8$ ) and even less sensitive toward the *trans* isomer ( $pI_{50} = 1.5$  to  $1.7$ ). Therefore, if there is any ability of the *trans*-compound to reduce blood pressure it cannot be ascribed to the blocking of this enzyme and to the concomitant protection of histamine from enzymic degradation.

7. Ophio-L-amino acid oxidase, another enzyme catalyzing oxidative deamination, is not perceptibly influenced by 0.001 M or higher concentrations of either isomer.

8. The *cis*- or *trans*-phenylcyclopropylamines at 0.001 M or higher concentrations, do not block hydrolases, *viz.* aceto-choline-esterase of cobra venom, choline-esterase of human serum, crystalline beef chymotrypsin, and a chymotrypsin-like cathepsin of beef lens.

9. From these and previous data it is concluded that the most suitable inhibitor or substrate of MO is a two-membered chain containing an  $\alpha$ -hydrogen atom and an  $\alpha$ -amino group and being substituted in  $\beta$ -position by an aromatic ring. It is suggested that the  $\alpha$ -hydrogen plays a rôle in binding these agents to the active center of the enzyme.

Departments of Biochemistry and Ophthalmology,  
Northwestern University Medical School,  
Chicago, Illinois