

SUMMARY

Benzamidoxime and cyanic acid react to give O-carbamoyl-benzamidoxime, and not the oxime of benzoylurea as generally admitted. 3-Phenyl-5-hydroxy-1,2,4-oxadiazole is quantitatively formed by reacting hydroxylamine on carbamoylbenzamide.

UNION CARBIDE EUROPEAN RESEARCH ASSOCIATES
95 rue Gatti de Gamond, Bruxelles 18, Belgique

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. BUYLE, F. ELOY & R. LENAERS, *Helv.* **46**, 1073 (1963).
 [2] E. FALCK, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **18**, 2467 (1885); G. PALAZZO & G. STRANI, *Gazz. chim. ital.* **90**, 1290 (1960).
 [3] G. PALAZZO & G. STRANI, *Gazz. chim. ital.* **91**, 216 (1961).
 [4] E. BECKMANN & K. SANDEL, *Liebigs Ann. Chem.* **296**, 279 (1897).
 [5] F. ELOY, R. LENAERS & R. BUYLE, *Bull. Soc. chim. belg.* **73** (1964), sous presse.
 [6] F. ELOY & R. LENAERS, *Chem. Reviews* **62**, 155 (1962), voir Table 10, p. 172.
 [7] J. EPHRAIM, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **26**, 2227 (1893).

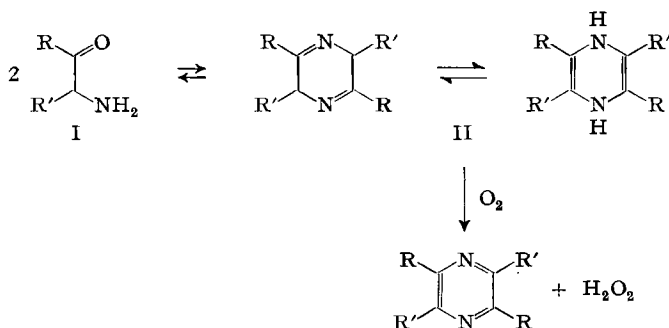
88. Metallionen-Katalyse bei der H_2O_2 - bzw. Radikalbildung durch autoxydable Cytostatica

von H. Erlenmeyer, R. Zell, H. Brintzinger und B. Prijs

(22. II. 64)

Die Untersuchung des Mechanismus der cytotostatischen Wirkung gewisser radio-mimetischer Stoffe führt zur Ansicht, dass diese Wirkung¹⁾ mit der biologischen Wirkung ionisierender Strahlung eine Reihe von Reaktionsschritten gemeinsam hat [2] [3] [4]²⁾ (s. Schema 2). Bei den auf Strahlenschutz zielenden Eingriffen gilt es, diesen durch Radikal- bzw. H_2O_2 -Bildung gekennzeichneten Reaktionsablauf auf ein Mini-

Schema 1



¹⁾ Zum gleichen Reaktionstyp gehört möglicherweise auch die carcinostatische Wirkung gewisser Anaerobier [1]²⁾.

²⁾ Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 798.

zum herabzusetzen, während er andererseits bei der auf eine cytotostatische Wirkung zielenden Therapie auf ein Maximum gebracht werden sollte [3].

Insbesondere haben wir uns bei unseren Untersuchungen für die Bedeutung der Metallionen für einzelne Stufen in dieser Folge interessiert. Die Rolle, die Metallionen bei der Aktivierung von H_2O_2 spielen, ist bekannt [5]. Zur Vermutung, dass Metallionen auch noch für andere Stufen des Schemas 2 von Bedeutung sind, wurden wir durch die folgenden Beobachtungen bei der Untersuchung der früher von uns als cytotostatisch wirksam erkannten [6] α -Aminoketone geführt.

Bei deren Autoxydation bildet sich, wie neuere Versuche gezeigt haben [3], im pH-Bereich $\cong 7$ – in dem auch die biologische Wirkung gesteigert ist [7] – gleichfalls H_2O_2 . Da unter diesen Bedingungen α -Aminoketone (I) sich zu Dihydropyrazinen kondensieren [7] (Schema 1), ist zu vermuten, dass die zu H_2O_2 führende Reaktion über die Ausbildung solcher «vinyloger Hydrazine» (II) verläuft. Die α -Aminoketone sind demnach, wie auch in neuerer Zeit entwickelte Methylhydrazine [2], als Stoffe mit einer der Strahlenwirkung weitgehend äquivalenten Wirkungsweise zu bewerten.

Ersetzt man nun bei Durchführung der Autoxydationsreaktion der α -Aminoketone die bei unseren ersten Versuchen verwendeten Glasgefäße durch solche aus Polyäthylen, so wird die zu beobachtende H_2O_2 -Freisetzung erheblich verringert (Fig. 1a, b). Einen ähnlichen Effekt kann man bei in Glasgefäßen durchgeführten

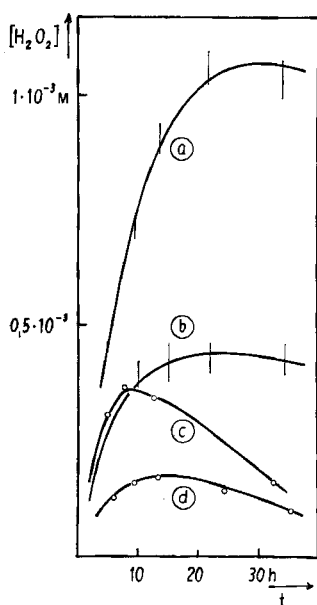


Fig. 1. H_2O_2 -Freisetzung bei der Autoxydation von 10^{-2} M 4-Amino-6-methyl-3-heptanon in 0,06 M Phosphatpuffer (pH = 7,5) bei $37,5^\circ$

(a) in Pyrexglas-Gefäßen; (b) in Polyäthylen-Gefäßen; (c) wie (a), aber unter Zusatz von $1,3 \cdot 10^{-3}$ M Picolinsäure; (d) wie (b), aber unter Zusatz von $1,3 \cdot 10^{-3}$ M Picolinsäure

Versuchen durch einen Zusatz des Komplexbildners Picolinsäure erzielen (Fig. 1c). Andererseits begünstigen sowohl in Glas- wie in Polyäthylengefäßen Zusätze von Metallionen (Eisen-, Kupfer- oder Zink-Ionen) in sehr kleiner Konzentration die H_2O_2 -Freisetzung³⁾ (Fig. 2-4).

³⁾ Bei höheren Metallionen-Konzentrationen überwiegt eine Beschleunigung der H_2O_2 -Zerlegung (Fig. 2-4).

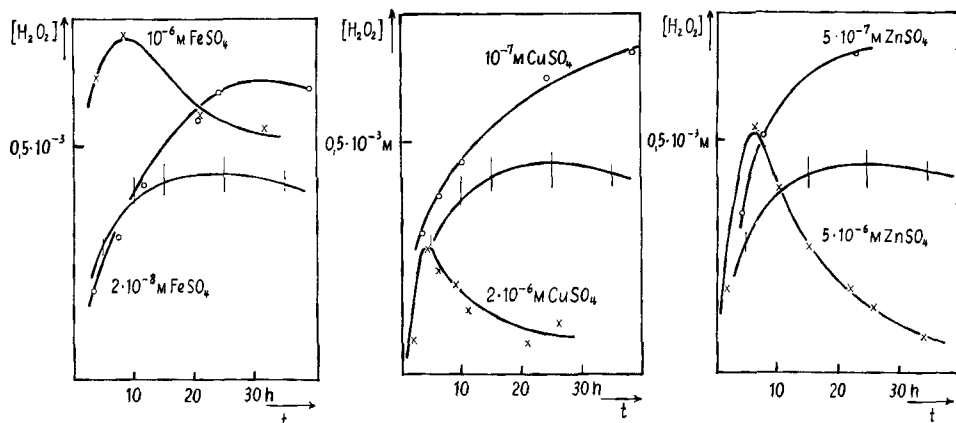


Fig. 2-4. Einfluss verschiedener Metallionen-Zusätze auf den Verlauf der H_2O_2 -Freisetzung bei der Autoxydation von 10^{-2} M 4-Amino-6-methyl-3-heptanon in Polyäthylen-Gefässen

Zum Vergleich ist jeweils der Verlauf der Reaktion unter gleichen Bedingungen, aber ohne Metallionen-Zusatz (s. Figur 1 b) mit Fehlerintervallen eingezeichnet.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die zu H_2O_2 führende Autoxydationsreaktion durch die in den Wandungen der Glasgefässe stets vorhandenen und z. T. in die Lösung abgegebenen Metallionen begünstigt wird, während in Polyäthylengefässen dieser Effekt deutlich vermindert ist. Im gleichen Sinne wird in Glasgefässen durch Komplexbildung mit Picolinsäure die Metallionen-Konzentration vermindert.

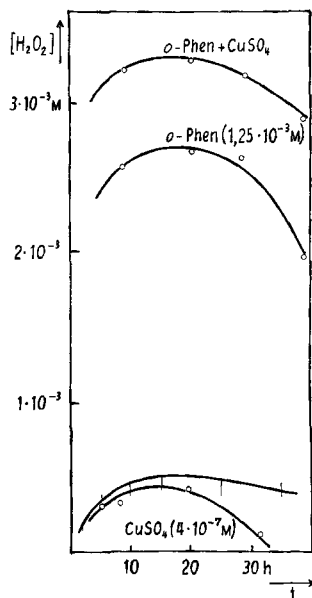


Fig. 5. Steigerung der H_2O_2 -Freisetzung bei der Autoxydation von 4-Amino-6-methyl-3-heptanon durch Zusatz von *o*-Phenanthrolin, von Cu^{2+} und von Phenanthrolin + Cu^{2+} in Polyäthylen-Gefässen

(Vergleichskurve 1 b mit Fehlerintervallen eingezeichnet)

Die vorgeschlagene Deutung wird weiter unterstützt durch das Ergebnis von Autoxydations-Versuchen, bei welchen *o*-Phenanthrolin zugefügt wurde. Dieser Zu-

satz bewirkt Aktivierung der stets vorhandenen Spuren von Metallionen, d. h. Steigerung der H_2O_2 -Bildung. Setzt man ausserdem noch Metallionen ($4 \cdot 10^{-7} M Cu^{2+}$) zu, so führt dies zu einer weiteren Steigerung (Fig. 5).

Erwähnt sei, dass in Polyäthylengefässen die früher von uns festgestellte Autoxydations-begünstigende Wirkung von Serotonin [3] ebenfalls herabgesetzt ist (Fig. 6).

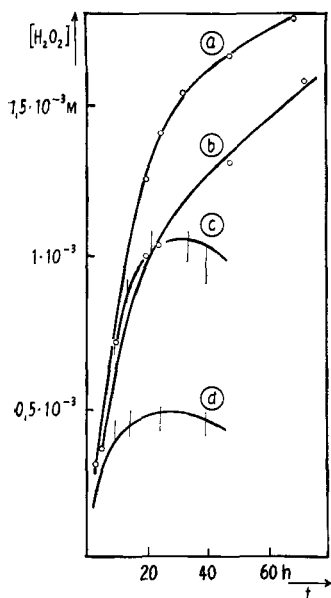


Fig. 6. H_2O_2 -Freisetzung bei der Autoxydation von 4-Amino-6-methyl-3-heptanon in Gegenwart von $6 \cdot 10^{-4} M$ Serotonin-Kreatinin-Sulfat

(a) in Pyrexglas-Gefässen und (b) in Polyäthylengefässen; entsprechende Reaktionen ohne Serotoninzusatz: Kurve (c) bzw. (d)

Auch die von einer Forschungsgruppe der Fa. HOFFMANN-LA ROCHE beschriebene H_2O_2 -Freisetzung bei der Autoxydation des cytostatisch wirksamen 1-Methyl-2-*p*-(isopropyl-carbamoyl)-benzylhydrazins [2] wird, wie wir fanden, vermindert, wenn man die Autoxydationsversuche in Polyäthylengefässen durchführt. Ein Zusatz von *

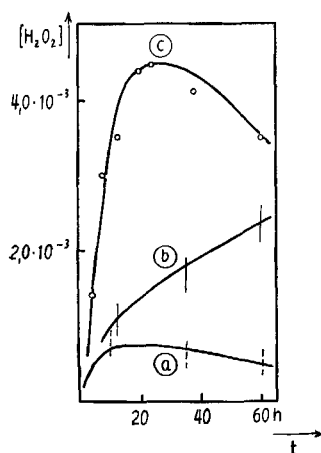
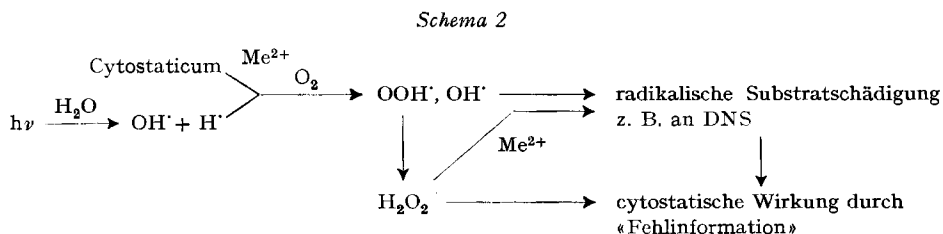


Fig. 7. H_2O_2 -Freisetzung bei der Autoxydation von 1-Methyl-2-*p*-(isopropyl-carbamoyl)-benzylhydrazin (a) in Polyäthylen- und (b) in Pyrexglas-Gefässen; (c) unter Zusatz von $1,3 \cdot 10^{-3} M$ *o*-Phenanthrolin in Pyrexglas-Gefässen

o-Phenanthrolin ($1,25 \cdot 10^{-3} \text{M}$) führt in Glas auch hier zu einer beträchtlichen Steigerung der H_2O_2 -Freisetzung (Fig. 7). In Polyäthylengefäßen, in welchen nach 13-stdg. Reaktionszeit nur ca. 0,1 Mol H_2O_2 /Mol Hydrazinderivat gefunden wird, führt *o*-Phenanthrolin-Zusatz (ebenfalls $1,25 \cdot 10^{-3} \text{M}$) zu einer Steigerung der H_2O_2 -Freisetzung auf ca. das Doppelte, Zusatz von Phenanthrolin in dieser Menge und von CuSO_4 (10^{-6}M) zu einer Steigerung auf das ca. Siebenfache gegenüber der Reaktion des Methylhydrazinderivats allein, gemessen jeweils nach 13 Std.

Die Unterschiede des Reaktionsverlaufs in Glas- gegenüber Polyäthylengefäßen bei allen untersuchten Verbindungen zeigen, dass diese langsam verlaufenden Reaktionen bereits durch Konzentrationen von Metallionen, die nahe bei der Allgegenwarts-Konzentration liegen, beschleunigt werden.

Diskussion. – Die aus den bisher bekanntgewordenen Daten abzuleitenden Aspekte für die Beeinflussung des Zellwachstums durch Reaktionen, die H_2O_2 erzeugen, sollen am Beispiel der α -Aminoketone im folgenden erörtert werden (vgl. Schema 2).



1. Durch die beschriebenen Untersuchungen wird die Deutung nahegelegt, dass die biologische Wirkung der α -Aminoketone auf eine H_2O_2 - oder Radikal-Bildung – z. B. über ein Dihydropyrazin als Kondensationsprodukt – zurückgeführt werden kann, wodurch auch die pH-Abhängigkeit der Wirkung verständlich wird. Erklärt wird damit die Feststellung von STRÄULI [8], dass mit 4-Amino-6-methyl-3-heptanon nur bei lokaler Applikation Tumorr regressionen zu erhalten sind, da bei jeder anderen Verabreichung die Konzentration der Aminoketone am Erfolgsort so stark herabgesetzt wird, dass die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Dihydropyrazinen – die mit dem Quadrat der Aminoketon-Konzentration abnimmt – und damit auch die der H_2O_2 -Bildung kleiner wird.

2. Diese Zusammenhänge machen besonders deutlich, wie wenig gegebenenfalls die Ergebnisse eines *in-vivo*-Tests über die molekularbiologische Wirksamkeit einer Verbindung aussagen und wie Transport und Wirkung – zwei in den meisten Tests nicht zu trennende Faktoren – gekoppelt sind. Aber es ist gerade das Problem der molekularbiologischen Wirksamkeit unter dem Aspekt der Auswahl und der Entwicklungsmöglichkeiten von chemischen Stoffgruppen für die Tumorthherapie von grösster Bedeutung, so dass die Ausarbeitung eines Tests, der nur diese Information erfasst, sehr wichtig wäre.

3. Unsere Versuche mit verschiedenen Aminoketonen lassen auch erkennen, dass die bei solchen *in-vitro*-Versuchen ermittelte H_2O_2 -Menge nicht als Mass für die cytostatische Wirkung einer Verbindung genommen werden kann, da die messbare H_2O_2 -

Konzentration von zu vielen Faktoren – wie eben Metallionen-Konzentrationen und -Bindungsverhältnisse – abhängig ist, die *in vitro* und *in vivo* verschieden sind. So hatten frühere biologische Versuche⁴⁾ ergeben, dass unter den Methyl-aminoketonen (I, R = -CH₃) das Aminoketon mit R' = (CH₃)₂CHCH₂- wirksamer ist als dasjenige mit R' = *p*-HO-C₆H₄-CH₂-. Hingegen zeigten unsere Autoxydationsversuche in Glasgefässen, dass mit letzterer Verbindung eine ca. doppelt so hohe H₂O₂-Konzentration zu erzielen ist, als mit der erstgenannten [3].

4. Für die Deutung des Befundes, dass die H₂O₂-Bildung von der Gegenwart von Metallionen abhängt, liegt es nahe anzunehmen, dass sich aus O₂, den bei Kondensation der Aminoketone entstehenden Dihydropyrazinen und dem Metallion ternäre Komplexe ausbilden, in denen die Autoxydation beschleunigt verläuft⁵⁾. Die chemische Natur der Metallionen, ihre Konzentration und – wie die Versuche mit Phenanthrolin zeigen – der Me-Ligand-Bindungszustand werden für die katalytische Wirkung auf den Autoxydationsvorgang von Bedeutung sein. Der Möglichkeit, solche Radikal- bzw. H₂O₂-Bildungsreaktionen durch geeignete Metallionen bzw. Liganden zu beeinflussen, wird für eine optimale Gestaltung einer Tumorthherapie mit radiomimetischen Verbindungen dieser Art eine grosse Bedeutung zukommen.

5. Über den für die gewebeschädigende Wirkung des H₂O₂ verantwortlichen molekularbiologischen Reaktionsmechanismus lässt sich aus den vorliegenden Versuchen nichts aussagen. Eine Überführung des H₂O₂ in Radikale – ein gleichfalls von Metallionen abhängender Vorgang [5] – ist möglich. BOLLAG [10] hat gefunden, dass cyto-statisch wirksame Methylhydrazine die Antikörper-Bildung herabsetzen, eine Eigenschaft, die auch den wohl nur als Antimetaboliten wirksamen Verbindungen wie Thienyl- oder *p*-Fluorphenyl-alanin zukommt [11]; diese Beobachtung lässt daran denken, dass H₂O₂ vielleicht auch als «Antimetabolit» des H₂O wirken kann, welches über H-Brücken als integrierender Bestandteil in viele biochemisch wesentliche Strukturen eingebaut ist [12]. Bei der Ausbildung von Wasserstoffbrücken, bei denen dann H₂O₂ anstelle von H₂O eintritt, müssten Störungen auftreten, die sich bei den Reproduktionsmechanismen und anderen biologischen Reaktionen hemmend auswirken könnten.

Experimentelles. – Die Aminoketone wurden aus CCl₄ umkristallisiert, sie zeigten die in der Literatur [6] angegebenen Smp, ebenso Picolinsäure. Im übrigen wurden Reagenzien *pro analysi* verwendet. Wasser war durch Ionenaustauscher ionenfrei gemacht.

Autoxydationsversuche (in Gefässen aus Pyrex-Glas bzw. aus Polyäthylen): 0,2 mMol des Aminoketon- bzw. des 1-Methyl-2-*p*-(isopropyl-carbamoyl)-benzylhydrazin-hydrochlorids wurden im Reaktionsgefäss in 20 ml 0,06M Phosphatpuffer, pH = 7,5, gelöst; allfällige weitere Zusätze wurden aus so konzentrierter Stammlösung zugegeben, dass die Volumenvermehrung vernachlässigbar, die Konzentrationen an Aminoketon bzw. Methylhydrazin also stets 10⁻²M waren. Sodann wurde im Thermostat bei 37,5° ± 0,1° unter Durchleiten eines schwachen Luftstromes inkubiert. Die entstandene H₂O₂-Konzentration wurde bestimmt, indem 0,5 ml der Reaktionslösung in der Küvette mit 2,5 ml 5 · 10⁻³M Titanylsulfat-Lösung in 3N H₂SO₄ versetzt und die Extinktion dieser Lösung bei 410 mμ gegen eine Mischung von 0,5 ml Reaktionslösung und 2,5 ml 3N H₂SO₄ gemessen wurde.

⁴⁾ *Xenopus*-Regenerationstest [6].

⁵⁾ Zur Bedeutung von O₂-Komplexen dieser Art bei Autoxydationsreaktionen s. GRAF & FAL-LAB [9].

Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG gilt unser Dank für die Unterstützung dieser Arbeit. Der Firma HOFFMANN-LA ROCHE AG, Basel, danken wir für die Überlassung von 1-Methyl-2-*p*-(isopropyl-carbamoyl)-benzylhydrazin.

SUMMARY

The formation of H_2O_2 during autoxydation of certain cytostatic agents like α -aminoketones and methylhydrazine derivatives is shown to depend on the presence of metal ions. The biochemical implications of this finding, *e.g.* for the development of cytostatic tumor therapy and of appropriate tests are discussed.

Universität Basel,
Institut für anorganische Chemie

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. R. MÖSE, *Z. Krebsforsch.* **63**, 63 (1959); D. KAYSER, *Z. Naturforsch.* **18b**, 748 (1963).
 - [2] K. BERNEIS, M. KOFLER, W. BOLLAG, A. KAISER & A. LANGEMANN, *Experientia* **19**, 132 (1963); K. BERNEIS, M. KOFLER, W. BOLLAG, P. ZELLER, A. KAISER & A. LANGEMANN, *Helv. 46*, 2157 (1963).
 - [3] R. ZELL, H. BRINTZINGER, B. PRIJS & H. ERLLENMEYER, *Experientia*, **20**, 117 (1964).
 - [4] G. WEITZEL, E. BUDDECKE & F. SCHNEIDER, *Z. physiol. Chem.* **323**, 211 (1961); H. BERG & G. HORN, *Naturwiss.* **50**, 356 (1963).
 - [5] H. BRINTZINGER, B. PRIJS & H. ERLLENMEYER, *Experientia* **16**, 468 (1960); S. FALLAB & H. ERLLENMEYER, *ibid.* **19**, 374 (1963).
 - [6] H. ERLLENMEYER & F. E. LEHMANN, *Experientia* **12**, 472 (1949); F. E. LEHMANN, A. BRETSCHER, H. KÜHNE, E. SORKIN, M. ERNE & H. ERLLENMEYER, *Helv.* **33**, 1217 (1950).
 - [7] F. E. LEHMANN, R. WEBER, H. AEBI, J. BÄUMLER & H. ERLLENMEYER, *Helv. physiol. Acta* **12**, 147 (1954).
 - [8] P. STRÄULI, *Oncologia* **12**, 143 (1959).
 - [9] L. GRAF & S. FALLAB, *Experientia* **20**, 46 (1964).
 - [10] W. BOLLAG, *Experientia* **19**, 304 (1963).
 - [11] R. SCHWARTZ & J. ANDRÉ, II. Intern. Symposium on Immunopathology, Basel 1962, p. 385.
 - [12] S. z. B. Übersichtsartikel I. M. KLOTZ, in *Horizons in Biochemistry*, New York 1962, M. KASHA & B. PULLMAN ed., p. 523.
-