

Thalidomid-Analoga, 5. Mitt.:

Untersuchungen zum Metabolismus
der Thalidomid-ähnlichen Verbindung K-2004*

Von

Gertrude Pischek**, E. Kaiser und H. Koch

Aus dem Pharmazeutisch-Chemischen Institut
und dem Medizinisch-Chemischen Institut der Universität Wien, Österreich

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 5. November 1973)

*Thalidomide Analogues, V. Investigations of the metabolism
of the Thalidomide-like Compound K-2004*

The test compound *K-2004*, a non-teratogenic congener of thalidomide, is quickly absorbed in the rat after oral application and, like thalidomide, degraded hydrolytically. Three metabolites appearing in the urine have been identified. The absence of teratogenicity of *K-2004* is not due to a different metabolism but probably to an altered reactivity towards a recently proposed specific receptor.

2-(Bicyclo[2.2.1]heptan-2-*endo*-3-*endo*-dicarboximido)-glutarimid (**1 a**), das in der Literatur¹⁻³ auch unter der Prüfbezeichnung *K-2004* aufscheint, ist eine dem Thalidomid (α -Phthalimido-glutarimid, **2 a**) strukturell^{1, 2, 5} und pharmakologisch^{4, 5} verwandte Substanz, zeigt jedoch nicht dessen embryotoxische und teratogene Eigenschaften^{3, 5}.

Über das Schicksal von **1 a** im Säugerorganismus liegen bis jetzt keine Untersuchungen vor. Hingegen sind über die Pharmakokinetik und den Metabolismus von **2 a** und dessen Hydrolyseprodukten mehrere eingehende Untersuchungen durchgeführt und publiziert worden^{6, 7}.

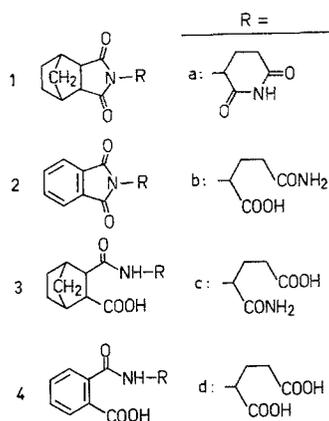
Durch Vergleich der im Urin ausgeschiedenen Metaboliten der beiden Substanzen sollte nach Unterschieden im Stoffwechselverhalten von **1 a** und **2 a** gesucht werden, um dadurch weitere Anhaltspunkte für eine Erklärung der fehlenden Teratogenität bei **1 a** zu

* Die Testsubstanz *K-2004* (**1 a**) wie auch die Vergleichssubstanzen wurden von der Fa. F. J. Kwizda, Wien, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

** Teil der Dissertation von G. Pischek, Universität Wien, 1973.

finden. In der vorliegenden Mitteilung wird über die Ergebnisse dieses Vergleichs berichtet.

Die hinsichtlich des Thalidomid-Metabolismus am besten untersuchte Tierspecies ist die Ratte. *Beckmann*⁶ hatte außerdem festgestellt, daß der biologische Abbau von **2 a** beim Menschen und bei der Ratte in nahezu gleicher Weise erfolgt. Aus diesem Grunde wählten wir für unsere Untersuchung ebenfalls dieses Versuchstier. Da Schlafmittel ferner stets auf peroralem Wege verabreicht werden, wendeten wir auch im Tierversuch diese Applikationsart an.



Die Tiere, die unter den üblichen Bedingungen in Stoffwechselfähigen gehalten wurden, erhielten jeweils eine einmalige Dosis der Testsubstanzen **1 a** bzw. **2 a** appliziert. Der innerhalb eines bestimmten Zeitraumes nach der Behandlung abgegebene Harn wurde aufgearbeitet und dünnschichtchromatographisch untersucht.

Die *DC* der Rattenharnextrakte nach Thalidomid-Behandlung ergab das aus der Literatur^{6, 7} bekannte Bild. Die vier wichtigsten Metaboliten erscheinen neben unverändertem **2 a** als deutlich abgegrenzte Flecken und sind eindeutig identifizierbar. Ein typisches Chromatogramm ist in Abb. 1 wiedergegeben.

Im Urin der in gleicher Weise mit der Testsubstanz *K-2004* behandelten Tiere lassen sich nur drei Metaboliten neben (viel) unverändertem Wirkstoff eindeutig nachweisen (Abb. 2). Zwei davon entsprechen den erwarteten Hydrolyseprodukten mit geöffnetem Glutarimidring (**1 c**, **1 d**). Das dritte, das Glutaminderivat **1 b**, fehlt aber eigenartigerweise.

Ein weiterer Fleck im Chromatogramm liegt zwischen jenem von **1 c** und **1 d**. Auf Grund des *R_f*-Wertes und des Trennverhaltens der

analogen Thalidomid-Metaboliten ist anzunehmen, daß sich in diesem Fleck die Tricarbonsäure **3 d** anreichert.

Wie schon aus den vorangegangenen Abbauprodukten in vitro zu ersehen war², ist bei **1 a** die Bildung einiger der theoretisch möglichen 13 Hydrolyseprodukte erschwert. Dieses Verhalten steht in deutlichem

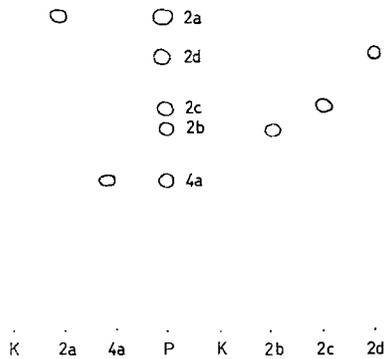


Abb. 1

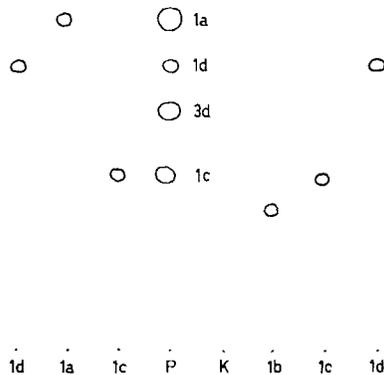


Abb. 2

Gegensatz zu jenem von **2 a**, bei dem die analogen Metaboliten vergleichsweise leicht entstehen. Demnach wären die Verbindungen **3 a—d** aller Voraussicht nach bei der Körperpassage von **1 a** nicht zu erwarten, sofern der Abbau im Organismus ausschließlich durch spontane, das heißt nicht enzymatisch katalysierte Hydrolyse erfolgt.

Da die Verbindung **3 d** unter den physiologischen Verhältnissen entsprechenden pH-Bedingungen in vitro nicht gebildet wird², deutet ihr Auftreten im Harn auf die Beteiligung eines enzymatisch gesteuerten Vorganges beim Abbau von **1 a** im Organismus hin.

In einer gesonderten Versuchsreihe wurde der am 1. und 2. Tag gesammelte Urin der mit **1 a** behandelten Ratten vor der Extraktion 8 Std. mit HCl behandelt, um eventuell gebildete Schwefelsäure- und Glucuronsäure-Konjugate aufzuspalten. Die danach erhaltenen Chromatogramme entsprachen in allen Einzelheiten den oben beschriebenen (Abb. 2), so daß eine Konjugationsreaktion im Organismus ausgeschlossen erscheint.

Fassen wir die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammen, so können wir feststellen: Die Testsubstanz *K-2004* wird nach peroraler Applikation bei der Ratte, ebenso wie das nahe verwandte Thalidomid^{6,7}, bei der Körperpassage in ähnlicher Weise und ausschließlich auf hydrolytischem Wege abgebaut.

Geringfügige qualitative und quantitative Unterschiede bei den im Harn auftretenden Metaboliten von **1 a** und **2 a** sind zwar erkennbar, doch sind diese nicht so gravierend, daß sie für die unterschiedliche Toxizität relevant erscheinen. **1 a** scheint auch im Organismus wie *in vitro*² eine etwas größere Beständigkeit gegenüber hydrolytischen Spaltungsreaktionen aufzuweisen als **2 a**.

Die fehlende Teratogenität bei *K-2004* ist somit *nicht* auf einen unterschiedlichen Metabolismus, sondern aller Wahrscheinlichkeit nach auf eine geänderte Reaktivität gegenüber einem spezifischen Rezeptor zurückzuführen.

Der molekulare Mechanismus der teratogenen Wirkung von **2 a** war in den vergangenen Jahren Gegenstand zahlloser Spekulationen und experimenteller Untersuchungen. Hierüber wurde bereits zusammenfassend referiert⁹.

Eine bestechende Theorie der Thalidomid-Wirkung, die vor kurzem publiziert wurde¹⁰, besagt, daß **2 a** mit Nucleinsäuren eine spezifische Bindung eingeht und dadurch deren regulatorische Funktion in der Zelle in charakteristischer Weise stört. Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit des Phthalimid-Systems mit bestimmten Nucleobasen (Guanin) soll sich **2 a** mit diesem Molekülteil zwischen die Basenpaare der Helix einlagern, während gleichzeitig der Imidwasserstoff des Glutarimid-Ringes den Furanosid-Sauerstoff der (Desoxy-)Ribose protoniert. Anschließend reagiert eines der beiden Phthalimid-Carbonyl-C-Atome von **2 a** mit dem 7-N-Atom des Guaninrestes, wobei die Glycosidbindung gesprengt wird und ein acyliertes Purin entsteht.

Für die teratogene Wirkung sind somit drei strukturelle Voraussetzungen erforderlich:

- a) ein ebenes (aromatisches) Phthalimid-Ringsystem,
- b) eine reaktive (acylierende) Carbonylgruppe in diesem System und
- c) ein ionisierbarer Imidwasserstoff im richtigen Abstand vom

Phthalimidkern. Diese letzte Forderung dürfte im α -substituierten Glutarimid-System optimal erfüllt sein.

Bei der Testsubstanz *K-2004* sind die unter a) und b) genannten Bedingungen *nicht* gegeben. Das voluminöse, annähernd sphärisch gebaute Ringsystem in **1 a** ist viel zu sperrig und daher zu einer Interkalation ungeeignet. Die Reaktionsfähigkeit der acylierenden Gruppe in dem bicyclischen Dicarboximid ist, wie wir zeigen konnten², gegenüber dem Phthalimidsystem von **2 a** deutlich herabgesetzt und reicht zu einer Acylierung von Nucleobasen unter physiologischen Bedingungen nicht aus.

Die Testsubstanz *K-2004* ist nach dieser Theorie der Thalidomid-Wirkung¹⁰, im Gegensatz zu **2 a**, zu einer Reaktion mit dem spezifischen Rezeptor nicht befähigt und kann daher auch nicht den durch **2 a** bewirkten Effekt (teratogene Mißbildung) induzieren. Die pharmakologische Aktivität (sedativ-hypnotische Wirkung), die nach unseren bisherigen Erfahrungen^{1, 2, 4} an den substituierten Glutarimidring gebunden ist, wird von dieser geänderten Reaktivität nicht berührt.

Experimenteller Teil

Herstellung und Eigenschaften der Testsubstanz **1 a** und der Metaboliten **1 b—d** und **3 a—d** wurden bereits² beschrieben.

Thalidomid (**2 a**) und seine Hydrolysenprodukte (**2 b—d**, **4 a—d**) sowie Glutamin, Isoglutamin und α -Aminoglutarimid wurden nach bekannten Verfahren synthetisiert. L-Glutaminsäure wurde aus dem Handel bezogen.

Die dünn-schichtchromatographische Identifizierung von **1 a**, **2 a** und ihren Metaboliten ist ebenfalls bereits an anderen Stellen publiziert worden^{1, 2, 8}.

Als Versuchstiere benützte man Albinoratten (Sprague-Dawley) beiderlei Geschlechts mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 150 g. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere 24 Stdn. nüchtern gehalten. Dabei wurde im Stoffwechsellkäfig Harn gesammelt; dieser Kontrollharn wurde dann parallel mit dem Probenharn aufgearbeitet und dünn-schichtchromatographisch untersucht.

Pro Tier wurde eine einmalige Dosis von 2000 mg/kg **1 a** bzw. **2 a**, in 0,5%-Carboxymethylcellulose-Schleim suspendiert, mittels Schlundsonde verabreicht. Je 2 Ratten wurden zusammen in einem Stoffwechsellkäfig gehalten und der innerhalb der ersten 24 Stdn. abgegebene Harn gesammelt. In einigen Fällen wurde auch der am 2., 3. und 4. Tag nach Verabreichung der Testsubstanzen ausgeschiedene Harn aufgefangen. Um eine nachträgliche spontane Hydrolyse der Testsubstanzen und Metaboliten während der Sammelperiode zu unterbinden, wurden im Harnauffanggefäß 2 ml 1*n*-HCl vorgelegt. Die von 2 Ratten ausgeschiedene Harnmenge betrug im Mittel etwa 20 ml pro Tag. Während des Versuchs stand den Tieren getrocknetes Weißbrot und Wasser in unbegrenzter Menge zur Verfügung.

Der filtrierte Harn wurde zweimal mit dem doppelten Volumen Äther und einmal mit dem doppelten Volumen CHCl_3 ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden über Na_2SO_4 sicc. getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck bei 30° zusammen zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde in Chloroform—Methanol (2:1) aufgenommen und diese Lösung direkt zur DC verwendet. Die Trennung erfolgte eindimensional mit einer Laufhöhe von 15 cm.

Literatur

- ¹ 1.—3. Mitt.: *H. Koch* und *J. Kotlan*, Mh. Chem. **97**, 1648 (1966); *H. Koch*, *J. Kotlan* und *H. Braun*, Mh. Chem. **98**, 702 (1967); *H. Koch*, *J. Kotlan*, *E. Farkouh* und *M. Lindner*, Mh. Chem. **102**, 609 (1971).
- ² 4. Mitt.: *H. Koch*, *J. Kotlan*, *E. Farkouh* und *G. Pischek*, Ann. Chem. **755**, 51 (1971).
- ³ *L. Stockinger* und *H. Koch*, Arzneimittel-Forsch. **19**, 167 (1969).
- ⁴ *O. Kraupp* (unveröffentlicht).
- ⁵ *F. Köhler* und *H. Koch* (in Vorbereitung).
- ⁶ *R. Beckmann*, Arzneimittel-Forsch. **12**, 1095 (1962); **13**, 185 (1963).
- ⁷ *R. Beckmann*, Arch. Exper. Path. Pharmacol. **245**, 90 (1963); *J. W. Faigle*, *H. Keberle*, *W. Riess* und *K. Schmid*, Experientia **18**, 389 (1962); *R. D. MacKenzie* und *W. R. McGrath*, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **109**, 511 (1962); *R. L. Smith*, *R. A. D. Williams* und *R. T. Williams*, Life Sci. **1**, No. 7, 333 (1962); *H. Schumacher*, *R. L. Smith* und *R. T. Williams*, Brit. J. Pharmacol. **25**, 338 (1965); *A. Tanaka*, *A. Hasegawa* und *G. Urakubo*, Chem. Pharm. Bull. [Tokyo] **13**, 1263 (1965); *S. Fabro*, *R. L. Smith* und *R. T. Williams*, Biochem. J. **104**, 565, 570 (1967); *S. Fabro*, *D. Hague* und *R. L. Smith*, Biochem. J. **103**, 26 P (1967); *D. E. Hague*, *S. Fabro* und *R. L. Smith*, J. Pharm. Pharmacol. **19**, 603 (1967); *H. Schumacher*, *D. A. Blake* und *J. R. Gillette*, J. Pharmacol. Exptl. Therap. **160**, 201 (1968).
- ⁸ *G. Pischek*, *E. Kaiser* und *H. Koch*, Mikrochim. Acta [Wien] **1970**, 530.
- ⁹ *H. Koch*, Scientia pharmac. [Wien] **34**, 257 (1966); *H. Koch* und *F. Schnabel-Arikan*, Scientia pharmac. [Wien] **36**, 121 (1968); *H. Koch*, Scientia pharmac. [Wien] **39**, 209 (1971); *N. A. Jönsson*, Acta Pharm. Suecica **9**, 521 (1972).
- ¹⁰ *N. A. Jönsson*, Acta Pharm. Suecica **9**, 543 (1972).

Doz. Dr. H. Koch
Pharmazeutisch-Chemisches Institut
Universität Wien
Währinger Straße 10
A-1090 Wien
Österreich