

- , Wiley, F. H. u. Wolfe, H. D., Experimental production of bladder tumors in the dogs by administration of β -naphthylamine (J. ind. Hyg. Toxicol. 20, 46 [1938]).
 Ingalls, T. H., Incidence of cancer in the carbon black industry (Arch. ind. Hyg. Occ. Med. 7, 662 [1950]).
 Kennaway, E. L. u. —, N. M., A further study of the incidence of cancer of the lung and larynx (Brit. J. Cancer 1, 260 [1947]).
 —, Hieger, I., Cook, J. W. u. Mayneord, W. V., The production of cancer by pure hydrocarbons (Proc. Roy. Soc. [London] 111 B, 455 [1932]).
 Kinoshita, R., Special Report. Studies on the carcinogenic chemical substances (Trans. Soc. path. Japan 27, 665 [1937]).
 Koelsch, F., Die beruflichen Arsenenschäden im Weinbau und in den gewerblichen Betrieben (Arch. Gewerbeopathol. Gewerbehyg. 16, 405 [1958]).
 Kuroda, S. u. Kawahata, K., Über die gewerbliche Entstehung des Lungentumors bei Generatorgasarbeitern (Z. Krebsforsch. 45, 36 [1936]).
 Laskin, S. M., Robinson, A. B. u. Weinmann, C. D., Experimental production of sarcomas by methyl methacrylate implants (Proc. Soc. exp. Biol. Med. 87, 329 [1954]).
 Lickint, F.: Ätiologie und Prophylaxe des Lungentumors, Steinkopff-Verlag, Dresden 1953.
 Lyons, M. J. u. Spencer, J. B., Studies of the unstable components of cigarette smoke (7. Internat. Cancer Congr., London 1958, Abstr. S. 149).
 Miller, J. A. u. —, E. C., The carcinogenic aminoazo dyes (Advances Cancer Res. 1, 339 [1953]).
 Mills, C. A. u. Mills-Porter, M., Tobacco smoking, motor exhaust fumes, and general air pollution in relation to lung cancer incidence (Cancer Res. 17, 981 [1957]).
 Nordmann, M., Der Berufskrebs der Asbestarbeiter (Z. Krebsforsch. 47, 288 [1938]).
 Nothdurft, H., Experimentelle Sarkomauslösung durch eingehielte Fremdkörper (Strahlentherapie 100, 192 [1956]).
 Oettel, H., Gesundheitsgefährdung durch Kunststoffe? (Naunyn-Schmeidebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 232, 113 [1957]).
 Oppenheimer, B. S. u. —, E. T. u. Stout, A. P., Sarcomas induced by implanting cellophane (Proc. Soc. exp. Biol. Med. 67, 33 [1948]).
 —, — u. —, Sarcomas induced in rodents by imbedding various plastic films (Proc. Soc. exp. Biol. Med. 79, 366 [1952]).
 —, E. T. u. —, B. S., Danishesky, I., Stout, A. P. u. Willhite, M., Studies of the mechanism of carcinogenesis by plastic films (7. Internat. Cancer Congr., London 1958, Abstr. S. 210).
 Pein, H. v., Zur Frage der Arsenvergiftung in Weinbaugebieten (Gesundheitsforschung 3, 113 [1941]).
 —, u. Baurhenn, W., Untersuchungen zur Frage der Entstehung der chronischen Arsenvergiftung der Weinbauern (Klin. Wschr. 22, 388 [1943]).
 Peller, S., Berufskrebs, Krebslehre und gewerbliche Krebshygiene (Arch. Gewerbeopathol. Gewerbehyg. 13, 29 [1954]).
 Pfeil, E., Lungentumoren als Berufserkrankung in Chromatbetrieben (Dtsch. med. Wschr. 67, 1197 [1935]).
 Pott, P.: Chirurgical observations relative to the cancer of the scrotum, Hawes and others, London 1775.
 Pullman, A. u. —, B.: Cancérisation par les substances chimiques et structure moléculaire, Masson & Cie, Paris 1955.
 Rehn, L., Blasengeschwüste bei Fuchsinarbeitern, (Arch. klin. Chir. 1, 588 [1895]).
 Roth, F., Über die Spätfolgen des chronischen Arsenismus der Moselwinzer (Dtsch. med. Wschr. 82, 211 [1957]).
 —, Über den Bronchialkrebs arsengeschädigter Winzer (Virchows Arch. 337, 119 [1958]).
 Rudolf, W., „Ketzerische Gegenüberstellung“ (Med. Klin. 53, 72 [1958]).
 Schmähle, D. u. Mecke, R., Quantitative Untersuchung der carcinogenen Wirksamkeit von 4-Amino-stilbenen (Z. Krebsforsch. 67, 230 [1956]).
 Shubik, P. u. Sicé, J., Chemical carcinogenesis as a chronic toxicity test (Cancer Res. 16, 728 [1956]).
 Spannagel, H.: Lungentumore und andere Organschäden durch Chromverbindungen, J. A. Barth-Verlag, Leipzig 1953.
 Spitz, S., Maguirean, W. H. u. Dobriner, K., The carcinogenic action of benzidine (Cancer [Bruxelles] 3, 789 [1950]).
 Stanley, W. M., Die Beziehungen zwischen Viren und Krebs (Krebsarzt 12, 307 [1957]).
 Steiner, P. E., The conditional biological activity of the carcinogens in carbon blacks, and its elimination (Cancer Res. 14, 103 [1954]).
 —, u. Falk, H. L., Summation and inhibition effects of weak and strong carcinogenic hydrocarbons: 1,2-benzanthracene, chrysene, 1:2:5:6-dibenzanthracene and 20-methylicholanthrene (Cancer Res. 11, 56 [1951]).
 Stocks, P. u. Campbell, J. M., Lung cancer death rates among nonsmokers and pipe and cigarette smokers. An evaluation in relation to air pollution by benzpyrene and other substances (Brit. med. J. 1955, 923).
 Szepenwol, J., Presence of a carcinogenic substance in hens' eggs (Proc. Soc. exp. Biol. Med. 96, 332 [1957]).
 Umeda, M., Experimental study of xanthene dyes as carcinogenic agents (Gann, Japan J. Cancer Res. 47, 51 [1956]).
 Volkmar, R., Über das häufige Auftreten von Hautkrebsen bei Braunkohlenarbeitern (Beitr. Chir. 175, 370).
 Waller, R. E., Air pollution as an aetiological factor in lung cancer (7. Internat. Cancer Congr., London 1958, Abstr. S. 77).
 Walpole, A. L., Williams, M. H. C. u. Roberts, D. C., The carcinogenic action of 4-aminodiphenyl and 3:2'-dimethyl-4-aminodiphenyl (Brit. J. ind. Med. 9, 255 [1952]).
 —, — u. —, Bladder tumours induced in rats of two strains with 3:2'-dimethyl-4-aminodiphenyl (Brit. J. Cancer 9, 170 [1955]).
 —, Roberts, D. C., Rose, F. L., Hendry, J. A. u. Homer, R. F., Cytotoxic agents: The carcinogenic actions of some monofunctional ethyleneimine derivatives (Brit. J. Pharmacol. 9, 306 [1954]).
 Warburg, O., Über die Entstehung der Krebszellen — Krebsforschung und Krebsbekämpfung. 4. Jahrestg. Stuttgart 24.—27. 5. 55, Sonderdruck z. Strahlentherapie Bd. 34, S. 3—13.
 —: Über den Stoffwechsel der Tumoren, Springer-Verlag, Berlin 1926.
 Wedler, H. W., Über den Lungentumor bei Asbestose (Dtsch. Arch. klin. Med. 191, 189 [1943]).
 Wynder, E. L. u. Graham, E. A., Aetiologic factors in bronchiogenic carcinoma with special reference to industrial exposures (Arch. ind. Hyg. Occ. Med. 4, 221 [1951]).
 Yamagawa, K. u. Ichikawa, K., Experimental study of the pathogenesis of carcinoma (J. Cancer Res. 3, 1 [1918]).
 Yoshida, T., (Proc. Imp. Acad. [Tokyo] 8, 464 [1932]).
 Zollinger, H. U., Experimentelle Erzeugung maligner Nierenkapseltumoren bei der Ratte durch Druckkreis (Plastik-Kapseln) (Schweiz. Z. Pathol. Bakteriol. 15, 665 [1952]).

Eingegangen am 25. Juli 1958 [A 893]

Synthese und Abbau cytostatisch wirksamer cyclischer N-Phosphamidester des Bis-(β -chloräthyl)-amins

Von Dr. habil. H. ARNOLD und Dr. F. BOURSEAUX

Chemisches Forschungslaboratorium der Asta-Werke A.-G., Chemische Fabrik, Brackwede/Westf.

Es wird über die Synthese sowie über hydrolytische und enzymatische Abbauntersuchungen von neuartigen, cytostatisch wirksamen Diamidophosphorsäure-monoestern mit cyclischer Struktur berichtet. Als gemeinsames Merkmal enthalten sie den N,N-Bis-(β -chloräthyl)-amin-Rest in phosphamidischer Bindung. Mit Hilfe verschiedener Methoden und Versuchsanordnungen wird nachgewiesen, daß diese Cytostatica der N-Lost-Reihe im wäßrigen Milieu in ganz bestimmter Weise aufgespalten werden.

Einleitung

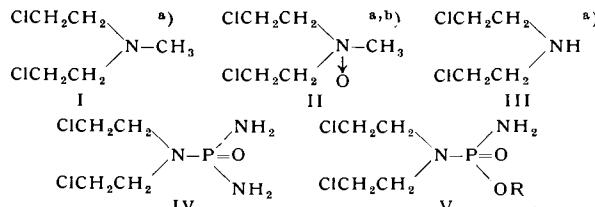
Die cytostatische Wirkung chlorierter Alkylamine vom Typ des N-Lostes (I) beruht im wesentlichen auf der leichten Beweglichkeit der zum Stickstoff β -ständigen Chlor-Atome. Es wird nach W. C. J. Ross¹⁾ angenommen, daß bei der Ionisation dieser Chlor-Atome die Restmolekel eine biologisch aktive Radikalform darstellt. Allgemein wird die Ansicht vertreten, daß sich die Lost-Amine im biologischen Milieu wie alkylierende Agentien verhalten, indem sie mit aktiven Wasserstoff-Atomen, z. B. SH-Gruppen der am Zellaufbau beteiligten Proteine oder Enzyme, reagieren und so eine Wachstumshemmung oder Vernichtung der malignen Zelle verursachen. Der Verwendung der Lost-Amine in der Therapie sind jedoch enge Grenzen ge-

setzt, da sie auch normale Zellen angreifen und infolgedessen schon im Bereich wirksamer Dosen eine erhebliche Toxizität aufweisen. Man hat daher durch Variationen der N-Lost-Molekel versucht, zu Präparaten mit einem günstigen Verhältnis der curativen und der toxischen Effekte zu gelangen. In dieser Richtung waren M. Ishidate und Mitarbeiter²⁾ erfolgreich, indem sie tierexperimentell nachweisen konnten, daß die cytostatische Aktivität von tertiären Lost-Aminen (I) bei der N-Oxydation im Sinne der Formel II erhalten bleibt, die Allgemeinverträglichkeit aber wesentlich verbessert wird. Dies läßt sich über die durch semipolare Sauerstoff-Bindung hervorgerufene Einschränkung der basischen Funktion des Lost-Stickstoffes

¹⁾ W. C. J. Ross, Advances Cancer Res. 1, 397 [1953].
²⁾ M. Ishidate, K. Kabayashi, Y. Sakuray u. T. Yoshida, Proc. Japan Acad. 27, 493 [1951].

und der damit bedingten Herabsetzung des Reaktionsvermögens der Chlor-Atome in β -Stellung erklären. Die cytostatische Wirkung von II muß demzufolge darauf zurückgehen, daß dieses Lost-Derivat unter physiologischen Bedingungen wieder zu einem Produkt mit reaktionsfähigeren β -Chlor-Atomen oder in andere cytostatisch aktive Produkte umgewandelt wird. Diese Vorstellung wird gestützt durch Ergebnisse von H. Druckrey und D. Schmähle³), wonach isolierte Krebszellen in N-Oxyd-Lost-haltiger wässriger Lösung bei 5 °C nur wenig, bei 37 °C dagegen erheblich unter weitgehendem Verlust ihrer Cancerogenität geschädigt werden. Chemische Voraussetzungen für eine derartige „Giftung“ von N-Oxyd-Lost in vivo sind gegeben, da diese Verbindung schon in Gegenwart geringster Schwermetallspuren, z. B. von Eisenionen in physiologischer Konzentration, unter Bildung von Formaldehyd zerfällt⁴) und in schwermetallfreier Lösung in Abhängigkeit von p_{H} und Temperatur einen in der Endphase eine Umlagerung zu einem Hydroxylaminäther einschließenden Abbau durchmacht^{5, 6}). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß man durch geeignete Beeinflussung der Ladungsverhältnisse am Lost-Stickstoff die Reaktionsfähigkeit der β -Chlor-Atome im einen oder anderen Sinne steuern und hierdurch auch die biologische Wirkung ändern kann.

O. M. Friedman und A. M. Seligman^{7, 8)} stellten u. a. N-Phosphorylierungsprodukte der Art IV und V des Bis-(β -chloräthyl)-amins (III) dar, bei denen das basische Zentrum durch Acylierung aufgehoben ist. Diese Verbindungen waren demzufolge untoxischer als III, zeigten aber keine chemotherapeutische Wirksamkeit mehr⁹).



a) Als Hydrochlorid.

b) Mitomen®, Asta-Werke A.-G., Chem. Fabrik, Brackwede/Westf.

³) D. Schmähle u. H. Druckrey, Naturwissenschaften 43, 199 [1956].

⁴) H. Arnold u. J. Venjakob, Arzneimittel-Forsch. 5, 722 [1955].

⁵) M. Ishidate u. Y. Sakurai, 15. Internat. Pharmaceutical Ass., Paris 1953.

⁶) H. Arnold, N. Brock u. H. J. Hohorst, Arzneimittel-Forsch. 7, 735 [1957].

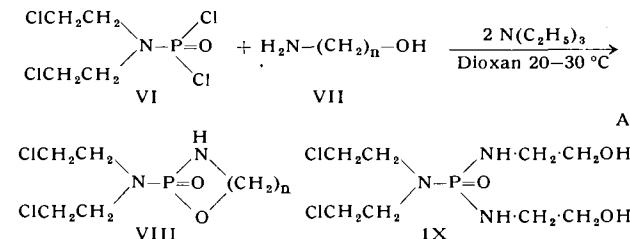
⁷) O. M. Friedman u. A. M. Seligman, J. Amer. chem. Soc. 76, 655 [1954].

⁸) Dieselben, ebenda 76, 658 [1954].

⁹) N. Brock, Arzneimittel-Forsch. 8, 1 [1958].

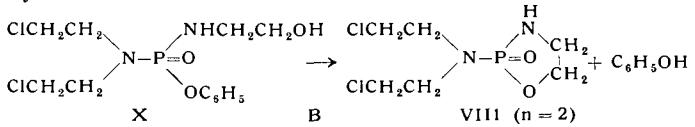
Herstellung cyclischer N,N-Bis(β -chloräthyl)-phosphoamidester

Unser Ziel waren N-Phosphorylierungsprodukte des Bis-(β -chloräthyl)-amins (III), die sich auf Grund der Phosphat-Gruppierung unter physiologischen Bedingungen verändern können. Geeignete Voraussetzungen hierfür bieten (s. unten) cyclische N,N-Bis-(β -chloräthyl)-phosphoamidester (VIII). Wir erhielten diese neuartigen Verbindungen glatt auf dem Wege A aus N,N-Bis-(β -chloräthyl)-phosphamid-dichlorid (VI) und α, ω -Alkanolamine (VII).



Wir haben in den bisherigen Synthesen α, ω -Alkanolamine mit 2 bis 6 Methylen-Gruppen in gerader und verzweigter Kette verwendet, wobei stets ausschließlich die cyclischen Phosphamidester VIII mit fünf bis neun Ringgliedern ($n = 2$ bis 6) erhalten wurden. Es gelang uns nicht, bei Anwendung der Alkanolamine im Überschuß ringoffene Produkte (z. B. der hypothetischen Formel IX) zu erhalten. Die Phosphorsäure ist danach in besonderem Maße zur Bildung stabiler Hetero-Ringe auch mit höherer Gliederzahl befähigt.

Die ausgeprägte Tendenz zur Bildung cyclischer Esteramide kommt auch in der Unbeständigkeit des ringoffenen Phenylesters der N,N-Bis-(β -chloräthyl)-N'-(β -oxyäthyl)-diamido-phosphorsäure (X) zum Ausdruck. Diese Verbindung erleidet schon beim Stehen eine intramolekulare Umesterung im Sinne des Schemas B unter Abspaltung von Phenol zum pentacyclischen Phosphamidester VIII ($n = 2$), den wir auch nach Synthese A bei Verwendung von Äthanolamin als Alkanol-Komponente ($n = 2$) erhielten. Demzufolge bestätigt Gleichung B den cyclischen Verlauf der Synthese A.



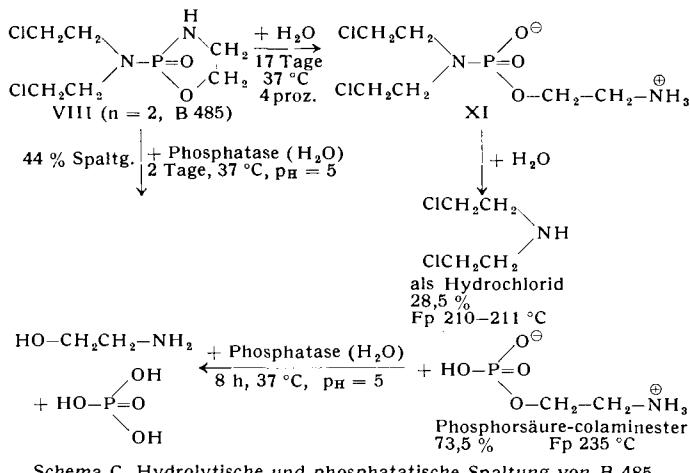
Name	Formel	Fp °C	Löslichk.
N,N-Bis-(β -chloräthyl)-N',O-äthylen-phosphorsäure-ester-diamid B 485		99,4	Wasser: 50 g/l. — Alkohol: s. l. — Benzol: s. l. — HCl ₃ : s. l. — Dioxan: s. l. — Glykol: s. l. — Äther: w. l. — Aceton: w. l.
N,N-Bis-(β -chloräthyl)-N',O-propylen-phosphorsäure-ester-diamid B 518		41–45 (Monohydrat)	Wasser: 40 g/l. — Alkohol: s. l. — Benzol: s. l. — HCl ₃ : s. l. — Dioxan: s. l. — Glykol: s. l. — Äther: w. l. — Aceton: w. l.
N,N-Bis-(β -chloräthyl)-N',O-butylen-phosphorsäure-ester-diamid B 610		76–77	Wasser: 30 g/l. — Alkohol: s. l. — Benzol: s. l. — HCl ₃ : s. l. — Dioxan: s. l. — Glykol: s. l. — Äther: w. l. — Aceton: w. l.
N,N-Bis-(β -chloräthyl)-N',O-amylen-phosphorsäure-ester-diamid B 749		Öl	Wasser: w. l. — Alkohol: s. l. — Benzol: s. l. — HCl ₃ : s. l. — Dioxan: s. l. — Glykol: s. l. — Äther: w. l. — Aceton: w. l.
N,N-Bis-(β -chloräthyl)-N',O-hexylen-phosphorsäure-ester-diamid B 644		Öl	Wasser: w. l. — Alkohol: s. l. — Benzol: s. l. — HCl ₃ : s. l. — Dioxan: s. l. — Glykol: s. l. — Äther: w. l. — Aceton: w. l.

Tabelle 1. Substanzen der allgem. Formel VIII mit $n = 2$ bis 6

N. Brock^{9, 10)} hat die cytostatische Wirkung dieser neuen Lost-Derivate an verschiedenen experimentellen Tiertumoren eingehend geprüft. Besonders interessante Ergebnisse lieferten hierbei die Verbindungen mit den fünf- und sechsgliedrigen Phosphamidester-Ringen: VIII (n = 2, B 485) und VIII (n = 3, B 518)¹¹⁾. Beide Präparate sind im Vergleich zu I und bis zu einem gewissen Grade auch gegenüber II wesentlich besser verträglich. Im Gegensatz zu den von *O. M. Friedman* und *A. M. Seligman*^{7, 8)} u. a. beschriebenen Phosphorylierungsprodukten IV und V vermögen die neuen cyclischen Phosphor-Verbindungen einige Tiertumoren nicht nur im Wachstum zu hemmen, sondern auch zu beseitigen. Die herabgesetzte Toxizität spricht dafür, daß diese cyclischen N-Lost-Phosphamidester als solche weitgehend biologisch inaktiv sind und erst im Organismus in die cytostatisch aktiven Wirkformen übergehen. Auf Grund der nachfolgend beschriebenen Untersuchungsergebnisse können sich die Umwandlungen durch schrittweise Spaltungen der Phosphamid-Bindungen in VIII vollziehen.

Zur Hydrolysierbarkeit der cyclischen Phosphamid- bzw. Phosphorsäureester-Bindungen

Wir ließen wäßrige Lösungen gleicher Molarität von B 485 (VIII, n = 2) und B 518 (VIII, n = 3) mit und ohne Kochsalz-Zusatz längere Zeit bei 4 °C, 20 °C und 37 °C stehen und untersuchten Einzelproben der frischen und verschiedenen lange gestandenen Lösungen. Der pentacyclische Phosphamidester lieferte¹⁰⁾ stets Phosphorsäure-colaminester, der bei der Versuchstemperatur von 37 °C nach 17 Tagen in optimaler Ausbeute von 73,5% erhalten wurde. Als zweites Produkt ließ sich aus den Versuchslösungen in Rohausbeute 28,5% N,N-Bis-(β-chloräthyl)-amin-hydrochlorid isolieren.



Schema C. Hydrolytische und phosphatatische Spaltung von B 485

Für die enzymatischen Ansätze haben wir saure Phosphatase aus menschlicher Prostata angewandt, weil dieses Enzym weitgehend rein zugänglich ist^{12, 13)} und sich zur Testung der Stabilität der Phosphorsäureester-Bindung als besonders geeignet erwies.

Man muß bei den im Formelschema C gezeigten Untersuchungen grundsätzlich unterscheiden zwischen der über die hypothetische Zwischenstufe XI zum Phosphorsäure-colaminester führenden reinen Hydrolyse und der Freisetzung von Phosphorsäure unter Beteiligung der Phosphatase.

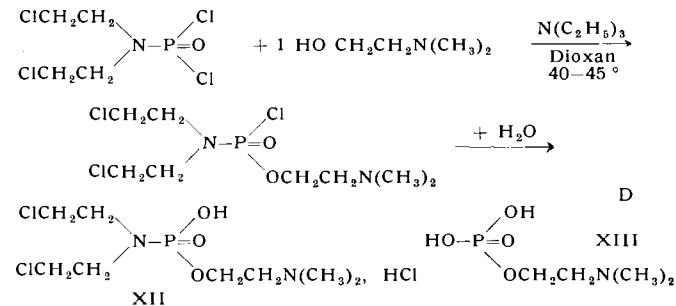
¹⁰⁾ H. Arnold, F. Bourdeaux u. N. Brock, Naturwissenschaften 45, 64 [1958].

¹¹⁾ Endoxan®, Asta-Werke A.-G., Chem. Fabrik, Brackwede/Westf. ¹²⁾ W. Kutschera u. H. Wolberg, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 236, 237 [1953].

¹³⁾ H. Arnold u. H. Klose, Arzneimittel-Forsch. 7, 471 [1957].

Der erste Vorgang benötigt 17 Tage. Die entstehenden Spaltprodukte (Phosphorsäurecolaminester und Bis-(β-chloräthyl)-amin) zeigen, daß bei der Hydrolyse unter schonenden Bedingungen sowohl die cyclische als auch die extracyclische Phosphamid-Bindung gelöst wird, während die in der Ausgangsmoleköl als Ringbindeglied vorliegende Phosphorsäureester-Gruppe erhalten bleibt.

Um Anhaltspunkte über die Spaltbarkeit der Phosphorsäureester-Bindung unter möglichst schonenden Bedingungen zu erhalten, haben wir zunächst in einigen biochemischen Ansätzen B 485 mit mehreren nicht cyclischen Phosphorsäureestern des Colamins als Substrate der Phosphatase verglichen. Zur letztgenannten Gruppe gehörte die beständige und entsprechend Schema D hergestellte Verbindung XII der hypothetischen und infolge ihrer leichten Zersetzung synthetisch nicht zugänglichen Phosphamidestersäure XI (siehe C), weiterhin der dieser zugrunde liegende N-Dimethyl-phosphorsäure-colaminester (XIII) und schließlich der als Endprodukt der Hydrolyse von B 485 nachgewiesene Phosphorsäure-colaminester.



Die Ergebnisse der Phosphatase-Spaltungen von B 485 und von Phosphorsäurecolaminester sind aus Abb. 5 und 6, diejenigen der anderen Vergleichssubstrate XII und XIII aus den Kurven von Abb. 1 ersichtlich.

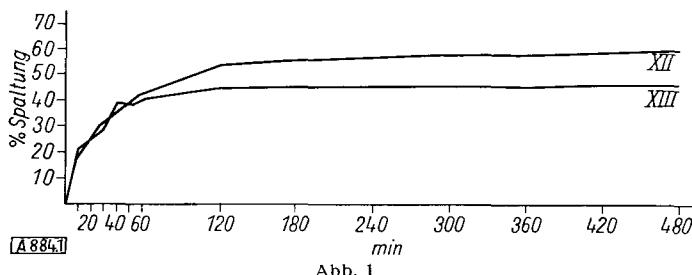
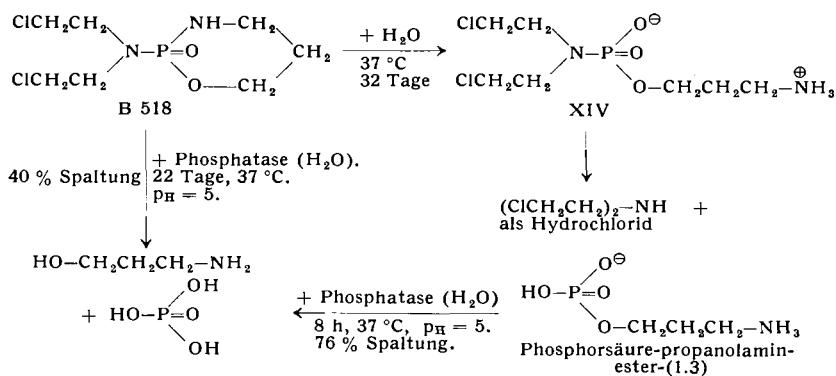


Abbildung 1
Substrat: 0,5 μ Mol XII, Enzym: Phosphatase, 300 γ. –
0,5 μ Mol XIII. – Inkubation: 10 min – 480 min. –
Acetal-Citrat-Puffer: pH 5

Vergleicht man zeitlich die in Prozenten ausgedrückten Phosphatase-Spaltungen dieser Ansätze, so ist zu erkennen, daß der cyclische Phosphamidester B 485 zur 40 bis 50 proz. Phosphorsäure-Freisetzung zwei Tage, das synthetische N-dimethylierte erste Ringöffnungsprodukt XII dagegen nur 2 h und XIII sowie Phosphorsäure-colaminester ebenfalls nur Stunden benötigen (Bild 1, 5 und 6).

Die Sechsring-Verbindung B 518 (VIII, n = 3) ist bei guter Verträglichkeit ein wesentlich wirksameres Cytostaticum als das pentacyclische B 485 (VIII, n = 2)⁹⁾. Es ließ sich papierchromatographisch (Abb. 2, 3 und 4) nachweisen, daß B 518 in wäßriger Lösung grundsätzlich den gleichen strukturellen Abbau erleidet wie B 485 und hierbei Bis-(β-chloräthyl)-amin und der Phosphorsäureester des Propanolamins-(1.3) als Spaltstücke entstehen. Ein extrem verschiedenes Verhalten ergab sich aus vergleichenden Phosphatase-Spaltungen, in denen einerseits das intakte Sechsring-Produkt (B 518) und andererseits



Schema E. Hydrolytische und phosphatatische Spaltung von B 518

das Endprodukt des hydrolytischen Abbaus, der Phosphorsäure-propanolaminester, als Substrate fungieren. Das erstere wird erst innerhalb 22 Tagen zu 40 %, das letztere in 8 h zu 76 % gespalten. Formelschema E gibt eine Übersicht. Der Vergleich mit den analogen Versuchen mit B 485 lässt die wesentlich größere Stabilität des Phosphoramidester-Sixerringes gegenüber dem Fünfring-Homologen erkennen.

Zur papierchromatographischen Untersuchung wurde das Präparat B 518 in wässriger und in physiologischer Kochsalz-Lösung auf Papier aufgetragen. Es wurden hierzu Proben der frisch hergestellten sowie der 6 und 32 Tage bei 37 °C gestandenen Lösungen verwendet. Die beschickten Papierstreifen wurden getrocknet und die Chromatogramme mit einem Lösungsmittelgemisch n-Butanol-n-Propanol-Aceton-80% Ameisensäure im Verhältnis 8:4:5:5 entwickelt. Die Wanderzonen wurden unter Zuhilfenahme von Molybdat- bzw. Ninhydrin-Reagenz sichtbar gemacht. Zum direkten Vergleich wurden in Laufstrecke 1 synthetischer Phosphorsäure-propanolaminester-(1.3)¹⁴ sowie in Laufstrecke 4 Bis-(β-chloroethyl)-aminohydrochlorid verwendet. Abb. 2 zeigt das aus den frischen B 518-Lösungen hergestellte Chromatogramm. Die für B 518 typischen Positionen liegen an den Lösungsmittelfronten der Laufstrecken 2 und 3. Im Chromatogramm der sechs Tage alten Lösung (Abb. 3) sieht man in den Laufstrecken 2 und 3 neben dem unveränderten B 518 schon die zu erwartenden Bruchstücke, die auf den Strecken 1 und 4 parallel laufen. Nach 32 Tagen (Abb. 4) ist der Abbau vollständig, indem nunmehr auf den Strecken 2 und 3

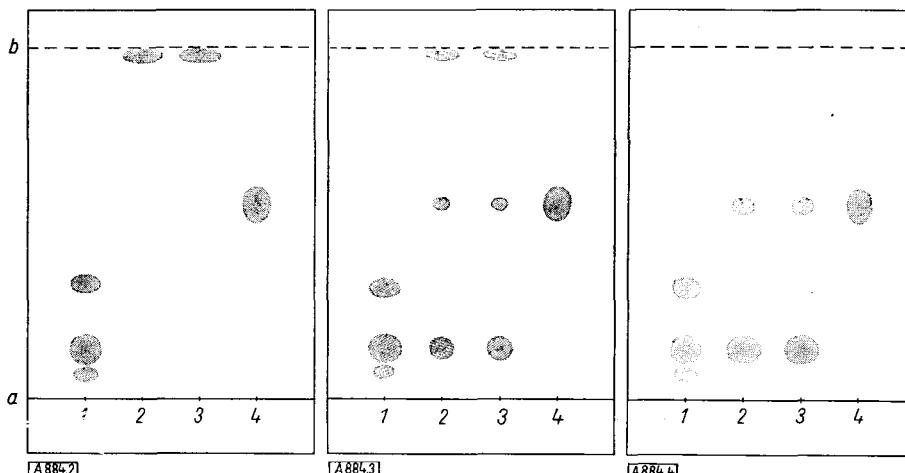


Abb. 2 bis 4

(2 nach einem Tag, 3 nach 6 Tagen, 4 nach 32 Tagen). a = Startlinie, b = Lösungsmittelfront. 1. Phosphorsäure-γ-aminopropylester; 2. B 518 in physiolog. NaCl-Lösg.; 3. B 518 in H₂O; 4. Bis-(β-chloroethyl)-aminohydrochloride.

¹⁴⁾ E. Cherbuliez u. J. Rabinowitz, Helv. chim. Acta 39, 1455 [1956].

nur noch die Flecken der Spaltprodukte vorhanden sind, während an der Lösungsmittelfront die Flecken von B 518 fehlen.

Wir erweiterten die Phosphataseversuche auch auf die höheren cyclischen N-Lost-phosphamidester VIII, n = 4, 5 und 6, wobei entsprechend Abb. 5 mit zunehmender Ringgliederzahl eine Abnahme der Spaltbarkeit festzustellen war.

Die nicht cyclischen Phosphorsäure-alkanolaminester, von denen

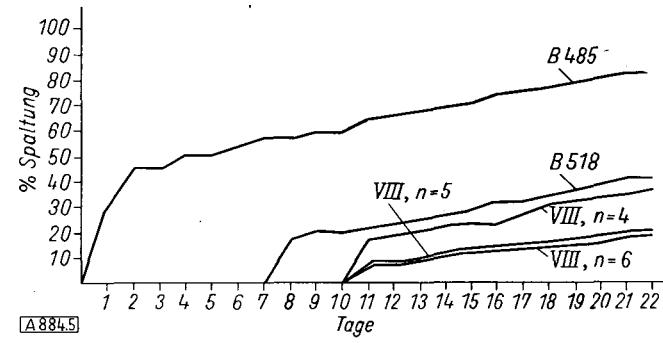


Abb. 5
Phosphatatische Spaltung von B 485, B 518 und höherer Ringhomologe. Enzym: Phosphatase, 300 γ. — Bebrütung: 37 °C. Entnahme der Proben alle 24 h. — Inkubation: 3 h, 37 °C. — Acetat-Citrat-Puffer: pH = 5,0.

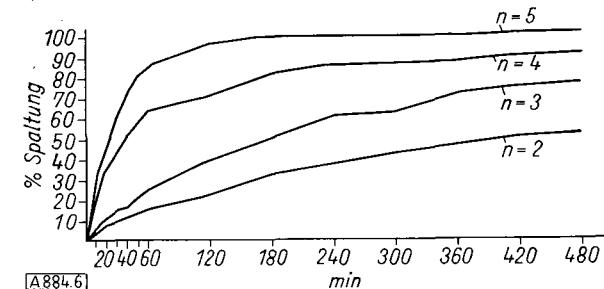


Abb. 6
Phosphatatische Spaltung von Phosphorsäure-alkanolaminester. Substrat: je 0,5 Mol

$$\text{HO}-\overset{\text{OH}}{\underset{\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2}{\text{P}}}=\text{O}$$

Enzym: Phosphatase, 300 γ. Inkubation: 10 min bis 480 min. Acetat-Citrat-Puffer: pH 5.

die ersten beiden als nachgewiesene, die folgenden zunächst noch als hypothetische Endprodukte anzusehen sind, verhalten sich gegenüber Phosphatase umgekehrt wie ihre cyclischen Ausgangsprodukte. Ihre enzymatische Spaltbarkeit steigt mit der Kettenlänge der Alkanolamin-Komponente (Abb. 6). Man beachte, daß die Abszisse in Abb. 5 in Tagen, in Abb. 6 dagegen in Minuten angegeben ist.

Bei Präparat B 485 mit dem Fünfringsystem ließ sich die im Vergleich zu den höheren Ringhomologen verhältnismäßig rasche hydrolytische Ringöffnung auch IR-spektrophotometrisch verfolgen.

Es wurden der frischen sowie in verschiedenen Zeitabständen der bei 37 °C bebrüteten Lösung von B 485 in Wasser Proben entnommen und gefriergetrocknet. Die jeweiligen Trockensubstanzen

wurden in KBr-Einbettung gemessen. Als Vergleichsgrundlage wurden die im Bereich zwischen 3 und 7 μ liegenden Absorptionsen herangezogen, und zwar:

1. $\nu \text{ NH}^+$ (Ammoniumvalenz-Schwingung) bei 3,5 μ
2. $\nu \text{ NH}^+$ (Zwitterionenschwingung) bei 4,74 μ
3. $\delta \text{ NH}^+$ (Ammonium-Deformationsschwingung) bei 6,09 u. 6,44 μ
4. $\nu \text{ NH}$ (Amidvalenzschwingung) bei 3,11 μ
5. $\nu \text{ CH}$ (Valenzschwingung) bei 3,39 und 3,50 μ

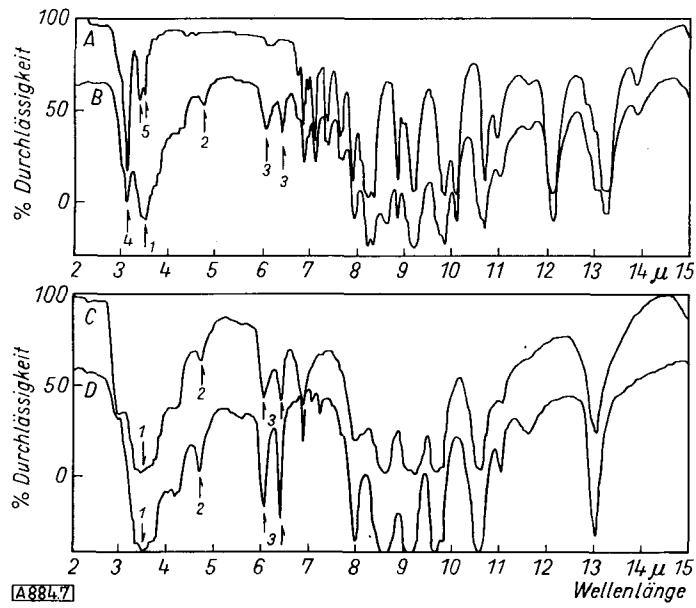


Abb. 7
Infrarotspektren

A: B 485 unverändert aus frischer Lösung. — B: B 485-Lösung nach einem Tag. — C: B 485-Lösung nach fünf Tagen. — D: Phosphorsäure-colaminester

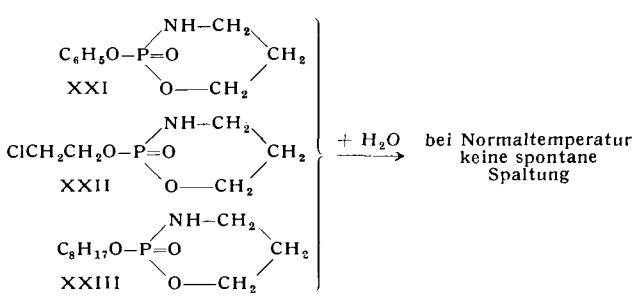
Beim intakten B 485 Phosphamidester-Ring sind erwartungsgemäß lediglich die Amid-Valenzschwingung (3,11 μ) als Kriterium für die als Ringglied vorliegende phosphamidische NH-Gruppe und die beiden CH-Valenzschwingungen, 3,39 und 3,50 μ , erkennbar (IR-Spektrum A). Die nach einem Tag aus der Lösung entnommene Probe lieferte das IR-Spektrum B. Die Amid-Valenzschwingung der Ring-NH-Gruppe ist bereits stark reduziert und die Doppelbande der CH-Valenz durch die stark hervortretende Ammonium-Valenzschwingung bei 3,50 μ überdeckt. Weiterhin werden als Kriterien der beginnenden Ringöffnung die für die Zwitterionen typische Schwingung bei 4,74 μ sowie die beiden $\delta \text{ NH}^+$ -Deformationsschwingungen bei 6,09 und 6,44 μ sichtbar. Wesentlich ausgeprägter sind die letztgenannten Absorptionsen im IR-Spektrum C. Mit C weitgehend ähnlich ist das IR-Spektrum D des synthetischen Phosphorsäure-colaminesters.

Phosphorsäureesteramide mit anderen Substituenten

Die Stabilitätsunterschiede zwischen den fünfgliedrigen und den sechsgliedrigen Esteramid-Ringen waren Veranlassung, Substanzen, in denen an Stelle der N,N-Bis-(β -chloräthyl)-amin-Gruppe ester-artig gebundene Gruppen stehen, zu prüfen.

Wir synthetisierten die Fünfring-esteramide von Phenol XVI, Chloräthanol XVII, Äthanol XVIII, n-Octanol XIX und δ -Chlor-n-butanol XX (vgl. Tabelle 2). Die beiden ersten, XVI und XVII, gingen bei Berührung mit Wasser spontan exotherm unter Ringöffnung in die β -Aminoäthyl-phosphorsäure-diester XVI' und XVII' über. Etwas langsamer, aber ohne erkennbare Erwärmung hydrolysierten die anderen Cyclo-phosphamidester zu den offenen Diestern XVIII', XIX' und XX'. Sie lieferten IR-Spektren, die im Spektralbereich von 3–8 μ die für die Zwitterionenschwingung charakteristischen Absorptionsen zeigen, wie sie in Bild 7 für Phosphorsäure-colaminester dargestellt sind.

Eine entsprechende spontane Ringspaltung konnte bei den hexacyclischen Analoga XXI, XXII und XXIII nicht beobachtet werden.



Es wurde eingangs erwähnt, daß die cytostatische Wirkung mit der Beweglichkeit der β -ständigen Chlor-Atome der Lost-Amine in Zusammenhang steht. In den vorliegenden cyclo-phosphamidierten Lost-Derivaten sind die Chlor-Atome wesentlich fester gebunden als bei N-Lost-Amin (I) und N-Oxyd-Lost (II). Wir haben die beiden wirksamsten Verbindungen B 485 und B 518 in ungepufferter Lösung bei 37 °C 19 Tage auf die Zunahme von Chlor-Ionen geprüft. Die schematische Darstellung der Ergebnisse in Abb. 8 zeigt, daß die Fünfring-Verbindung vornehmlich in den ersten sieben Tagen rascher Chlor-Ionen abgibt als die Sechsring-Verbindung. Mit der Zeit holt aber das letztere auf.

Nr.	Name	Formel		Nr.	Name	Formel	Fp °C
XVI	O-Phenyl-N,O'-äthylen-phosphorsäure-diesteramid		Öl, sehr unbeständig.	XVI'	O-Phenyl-O'- $(\beta$ -aminoäthyl)-phosphorsäure-diester		251
XVII	O-(β -Chloräthyl)-N,O'-äthylen-phosphorsäure-diesteramid		Öl, farblos, leicht bewegl.	XVII'	O-(β -Chloräthyl)-O'- $(\beta$ -aminoäthyl)-phosphorsäure-diester		190–191
XVIII	O-Äthyl-N,O'-äthylen-phosphorsäure-diesteramid		Öl, farblos, leicht bewegl.	XVIII'	O-Äthyl-O'- $(\beta$ -aminoäthyl)-phosphorsäure-diester		223–225
XIX	O-n-Octyl-N,O'-äthylen-phosphorsäure-diesteramid		Öl, dickflüss.	XIX'	O-n-Octyl-O'- $(\beta$ -aminoäthyl)-phosphorsäure-diester		227
XX	O-(δ -Chlorbutyl)-N,O'-äthylen-phosphorsäure-diesteramid		Öl, leicht bewegl.	XX'	O-(Chlorbutyl)-O'- $(\beta$ -aminoäthyl)-phosphorsäure-diester		205

Tabelle 2

Dieser Versuch deutet an, daß auch zwischen der Haftfestigkeit der β -Chlor-Atome und der Ringgröße Beziehungen zu bestehen scheinen; systematische Vergleichsuntersuchungen in dieser Richtung wären daher interessant. Man

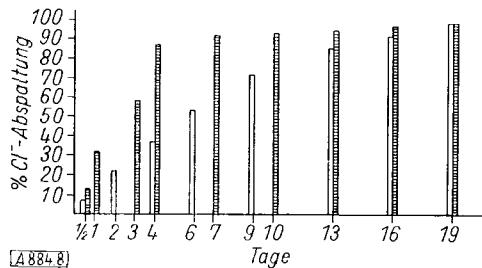


Abb. 8

Chlor-Abspaltung in wässriger Lösung von B 485 und B 518; schraffiert = 0,05 molare (1,23 %)-Lösung von B 485, weiß: 0,05 molare (1,39 %)-Lösung von B 518. Chlor-Bestimmung: Mercuro-metrisch nach Clarke.

kann annehmen, daß die Geschwindigkeit der Ringöffnung den Zeitpunkt maßgebend bestimmt, in welchem sich die cytostatische Wirkform bildet.

Unter Zugrundelegung der in Schema C und D dargestellten Abbauwege können zunächst die N,N-Bis-(β -chloräthyl)-O-(aminoalkanol)-phosphamidestersäuren XI und XIV als cytostatisch aktive Umwandlungsprodukte diskutiert werden. Sie sind unbeständig und vermögen daher sehr leicht mit Bausteinen der Zelle zu reagieren. Als cytostatisches Agens kommt auch das N,N-Bis-(β -chloräthyl)-amin in Frage. Es besitzt bei der Freisetzung in der Zelle noch beide Chlor-Atome, die durch N-Positivierung reaktionsfähig geworden sind¹⁶⁾. Da der erste Abbauschritt in der Lösung der cyclischen Phosphamid-Bindung gemäß Formeln XI und XIV bestehen dürfte, kann daran gedacht werden, daß er durch die bei malignen Tumoren in erhöhter Konzentration vorliegenden Phosphamidasen^{16, 17)} erheblich beschleunigt wird. Eine Tumorspezifität der cyclischen N-Lost-phosphamidester würde hierdurch eine plausible Erklärung finden.

Wir danken: Frau M. Meyer z. Bexten für die papier-chromatographischen Untersuchungen, Frau H. Klose für die biochemischen Spaltversuche mit Phosphatase, Herrn M. Meyer z. Bexten für präparative Arbeiten sowie für die Aufnahme und Interpretation von IR-Spektren, Herrn O. Niepel für die wertvolle Mitarbeit bei den Synthesen.

Eingegangen am 28. März 1958 [A 884]

¹⁶⁾ R. Preussmann, Arzneimittel-Forsch. 8, 9 [1958].

¹⁷⁾ M. Ichihara, J. Biochemistry [Tokyo] 18, 87 [1933].

¹⁷⁾ G. Gomori, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 69, 407 [1948].

Antimikrobiell wirksame Substanzen in Kulturpflanzen

Von Prof. Dr. ARTTURI I. VIRTANEN*)

Biochemisches Institut, Helsinki/Finnland

Das Vorkommen von Antibiotica in höheren Pflanzen erklärt ihre seit alters bekannte Heilwirkung. Vorkommen, Isolierung, Struktur, Eigenschaften und Wirksamkeit antimikrobiell wirksamer Substanzen aus Nutzpflanzen werden beschrieben.

Vor der Entwicklung der modernen Medizin waren verschiedene Kräuter die wichtigsten Arzneimittel, und man schrieb einigen Pflanzen einfach wundersame Wirkungen zu. Seit Anfang der 1940er Jahre haben Antibiotica im Kampf gegen die von Mikroorganismen erregten Krankheiten eine entscheidende Bedeutung erlangt, jedoch handelt es sich dabei ausschließlich um Produkte von Mikroorganismen. Aus höheren Pflanzen ist bisher keine einzige antibiotisch wirksame Substanz isoliert worden, die von praktischer Bedeutung für die therapeutische Medizin wäre, wenn auch schon lange vor dem heutigen Zeitalter der Antibiotica festgestellt wurde, daß einige Pflanzen das Wachstum von Mikroorganismen hemmen können.

Die schönen Erfolge der Pflanzenveredelung und -kultivierung bei der Entwicklung neuer, beständigerer und zugleich ertragreicherer Pflanzensorten haben die Frage immer mehr in den Vordergrund treten lassen, worauf die Beständigkeit von Pflanzen gegen pathogene Mikroorganismen eigentlich beruht. Auf diese Frage hat man bisher keine befriedigende Antwort geben können. Die Genetiker haben in einigen Fällen festgestellt, daß die Beständigkeit einer Pflanzensorte gegen irgendeinen pathogenen Pilz von einem oder mehreren Genen bestimmt wird, aber es ist unbekannt geblieben, welchen Mechanismus die Gene beeinflussen.

Pflanzenpathologen scheinen der Annahme, daß das Resistenzvermögen von Pflanzen auf der Produktion antimikrobiell wirksamer Stoffe beruhen könnte, nicht viel Glauben zu schenken. Das ist verständlich, wenn man bedenkt, daß man bis vor einigen Jahren in den wichtigsten

Kulturpflanzen, wie z. B. in Getreidepflanzen, noch keine gegen pathogene Krankheitserreger aktiven Substanzen gefunden hatte. Einige Pflanzenpathologen haben die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß eine Infektion in den Pflanzen die Bildung von Antistoffen hervorrufen könnte, die das Wachstum der infizierenden Mikroorganismen hemmen. Eine solche Hypothese ist jedoch nicht sehr wahrscheinlich, wenn sie im Sinne einer allgemeinen Immunisierung der Pflanze in Analogie zu Erscheinungen im tierischen Organismus gedacht ist. Wie wir sehen werden, gibt es aber mehrere Beweise dafür, daß die örtliche Beschädigung pflanzlicher Zellen durch mechanische Verletzung oder vielleicht auch durch Infektionen zu schnellen enzymatischen Reaktionen führen kann, die antimikrobiell wirksame Substanzen aus inaktiven Mutterverbindungen entstehen lassen. Die Möglichkeit, daß Pflanzen über mehrere, zum Teil prinzipiell neuartige Mechanismen verfügen, um von Mikroben verursachte Infektionen abzuwehren, muß ernstlich in Erwägung gezogen werden.

In den letzten Jahren sind verschiedene Kulturpflanzen in unserem Laboratorium untersucht worden, um das Vorhandensein von Stoffen aufzudecken, die gegen Pilzkrankheiten antimikrobiell wirksam sind. Diese Arbeit hat gezeigt, daß in all den zahlreichen von uns untersuchten Kulturpflanzen, auch in Getreidepflanzen, solche Substanzen oder deren Vorstufen angetroffen werden. Einige davon ließen sich bereits in reiner Form isolieren und chemisch charakterisieren. Die antimikrobielle Aktivität pflanzlicher Verbindungen ist meistens gering verglichen mit der enormen Aktivität vieler Antibiotica, die von Mikroorganismen gebildet werden. Die einzige Gruppe von Substanzen, deren Aktivität der gebräuchlicher Antibiotica nahekommt, ist die der Senföle, die beim Zer-

*) Nach einem Vortrag auf der dritten Tagung der Nobelpreisträger der Chemie in Lindau (29. 6.-4. 7. 1958). Das Thema wurde auch auf dem deutschen Ernährungskongreß in Mainz (9. 4. 1958) und auf dem Kongreß der Schweizerischen Gesellschaft für Mikrobiologie in Rheinfelden (28. 6. 1958) behandelt.