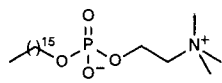


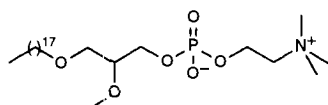
Synthese sowie Antitumorwirksamkeit und Verträglichkeit im Tierexperiment von elementhomologen Phospholipiden**

Jurij Stekar*, Gerhard Nöbner, Bernhard Kutscher, Jürgen Engel und Peter Hilgard

Edelfosin (2-*O*-Methyl-1-*O*-octadecyl-*rac*-glyceryl-3-phosphocholin) 2-N und Miltefosin (Hexadecylphosphocholin) sind Prototypen von neuen, bereits klinisch eingesetzten, krebshemmenden Phospholipiden.



Miltefosin

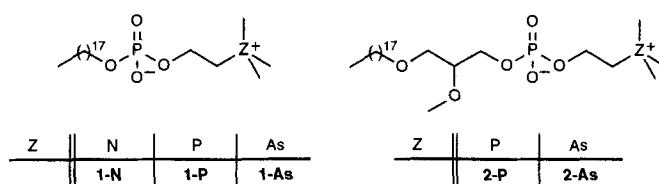


Edelfosin 2-N

Die orale Behandlung der krebserkrankten Patienten führte zu Nebenwirkungen seitens des Verdauungstrakts (Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Körpergewichtsverlust)^[1]. Entsprechende Befunde aus Tierexperimenten ließen vermuten, daß im Laufe der Metabolisierung der verabreichten Phospholipide niedermolekulare, parasympathikomimetisch aktive (d.h. die Wirkungen des parasympathischen Nervensystems imitierende) Cholinester entstehen; derartige Verbindungen könnten für die Darmtoxizität zumindest mitverantwortlich sein. Diese Vermutung wurde gestützt durch den Nachweis der besseren gastrointestinalen Verträglichkeit eines heterocyclischen Phospholipids, in dem Cholin durch *N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-methylpiperidin ersetzt wurde^[2].

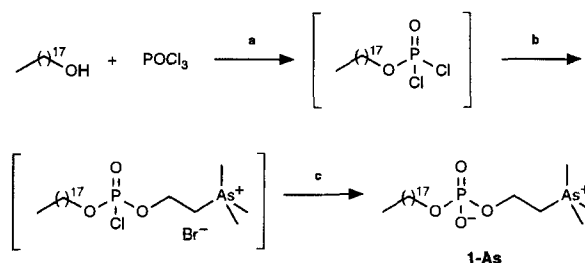
Bei der Suche nach geeigneten neuen Phospholipiden mit einer besseren Verträglichkeit und einer höheren cytostatischen Wirksamkeit war von Bedeutung, daß Phosphonium- und Arsoniumhomologe von Cholinestern, z.B. von Acetylcholin, eine wesentlich schwächere parasympathikomimetische Wirkung haben als die Cholinester selbst^[3]. Außerdem wurde in den letzten Jahren erkannt, daß viele als Nahrungsmittel für Menschen dienende marine Organismen wie Fische, Hummer und Muscheln reichlich Arsoniumverbindungen enthalten (bis zu 80 ppm; der As-Gehalt von Meerwasser beträgt nur 0.003 ppm!). Dabei handelt es sich vor allem um die wenig toxischen Verbindungen Arsoniumbetain und Arsoniumcholin^[4, 5]. Aufgrund dieser Befunde war anzunehmen, daß ein Austausch des Stickstoffatoms in Cholin gegen Arsen- oder Phosphoratom zu besser verträglichen Phospholipiden führen

könnte. Zur Prüfung dieser Arbeitshypothese synthetisierte elementhomologe Verbindungen (Schema 1) sollten in bezug auf biologische Wirkungen mit 1-N (Octadecylphosphocholin) und 2-N verglichen werden, von denen sie sich durch Austausch des Zentralatoms des Oniumkomplexes unter Beibehaltung des Octadecyl- bzw. Octadecylglyceryl-Rests ableiten. Im folgenden berichten wir über die Synthese und die ersten Ergebnisse des biologischen Testens dieser neuartigen Substanzen.



Schema 1. Allgemeine Formulierung und Kurzbezeichnungen der elementhomologen Phospholipide.

Die Stammverbindungen 1-N und 2-N wurden nach bereits beschriebenen Methoden hergestellt^[6, 7]. Zur Synthese von [2-(Trimethylarsonio)ethyl]-*n*-octadecylphosphat 1-As (Schema 1) wurde Phosphoroxychlorid mit *n*-Octadecanol umgesetzt und das gebildete *n*-Octadecylphosphorsäuredichlorid ohne Isolierung mit 2-Hydroxyethyltrimethylarsoniumbromid (hergestellt nach Irgolic et al. aus Trimethylarsan und Bromethanol^[8]) zur Reaktion gebracht. Die Hydrolyse des entstandenen Phosphorsäurediesterchlorids lieferte 1-As als inneres Salz (Schema 2). Das zu 1-As und 1-N elementhomologe 1-P wurde auf analoge Weise aus *n*-Octadecanol, POCl₃ und 2-Hydroxyethyltrimethylphosphoniumbromid hergestellt (Ausbeute 24%).



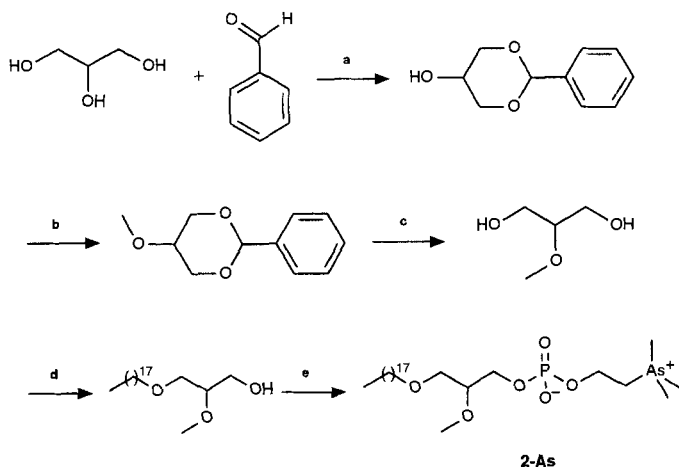
Schema 2. Synthese von 1-As. a) CHCl₃/Pyridin/0 °C; b) HO(CH₂)₂As⁺-(CH₃)₃Br⁻/Pyridin/0 °C → 20 °C; c) 10% HCl/Reinigung mit Ionenaustauscher Amberlite MB3 in Ethanol/Digieren mit Aceton; Gesamtausbeute 43%.

Die Synthese von 2-*O*-Methyl-1-*O*-octadecyl-*rac*-glyceryl-3-phosphoarsoniumcholin 2-As ging von 1,3-Benzylidenglycerin aus, das mit Dimethylsulfat und nach Abspaltung des Benzylidenrests mit Octadecylsulfonsäuremethylester zu 2-*O*-Methyl-1-*O*-octadecyl-*rac*-glycerin alkyliert wurde. Anschließende Phosphorylierung mit POCl₃, Umsetzung des Zwischenprodukts mit Arsoniumcholinbromid und Hydrolyse des entstandenen Diesters führte zu 2-As (Schema 3).

[*] Dr. J. Stekar, Dr. P. Hilgard
Exp. Tumorforschung, ASTA Medica AG
Weismüllerstraße 45, D-60314 Frankfurt am Main
Telefax: Int. + 69/4001-2745

Dr. G. Nöbner, Dr. B. Kutscher, Prof. Dr. J. Engel
Chemische Forschung, ASTA Medica AG

[**] Wir danken Sandra Nemetz und Thomas Kynast für die Durchführung der chemischen Synthesen, Eric Thoenes, Waltraud Maschmann, Susanne Vahlenkamp, Anneli Knoop und Sabine Falk für die biologischen Tests und Uwe Riemer für die Auswertung der Versuche.



Schema 3. Synthese von **2-As**. a) Toluol/*p*-H₃CC₆H₄SO₃H/Rückfluß/-H₂O, Ausbeute 60%; b) KOtBu/Dimethylsulfat/Toluol/60 °C, Ausbeute 83%; c) CH₃OH/H₂O/H₂SO₄/70 °C, Ausbeute 84%; d) H₃C(CH₂)₁₇OSO₂CH₃/KOtBu/*tert*-Amylalkohol/90 °C, Ausbeute 81%; e) 1. POCl₃/Pyridin/CHCl₃/0 °C, 2. HO(CH₂)₂-As⁺(CH₃)₃Br⁻/Pyridin/0 °C → 20 °C, 3. HCl/H₂O, Reinigung mit Ionenaustauscher Amberlite MB3 in Ethanol/Digerieren mit Aceton, Ausbeute 33%; Gesamtausbeute 11%.

Analog wurde **2-P**, das Phosphonium-Homologe von **2-As** (Ausbeute 26%), synthetisiert.

Die NMR-spektroskopischen Daten der neuen Phospholipide sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

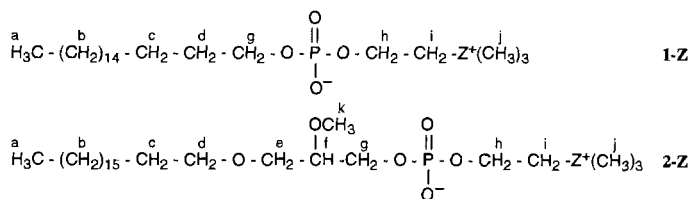


Tabelle 1. Chemische Verschiebungen δ der Verbindungen **1-N**, **1-P**, **1-As**, **2-N**, **2-P** und **2-As** im ¹H-NMR-Spektrum (CD₃OD) [a].

	1-N	1-P	1-As	2-N	2-P	2-As
a	0.97	0.99	0.98	0.97	0.97	0.98
t (3 H)	t (3 H)	t (3 H)	t (3 H)	t (3 H)	t (3 H)	t (3 H)
b	1.34	1.37	1.38	1.34	1.38	1.39
m (28 H)	m (28 H)	m (28 H)	m (30 H)	m (30 H)	m (30 H)	m (30 H)
c	1.67	1.67	1.48	1.63	1.65	1.66
quin (2 H)	quin (2 H)	quin (2 H)	quin (2 H)	quin (2 H)	quin (2 H)	quin (2 H)
d	1.71	1.71	1.73	3.54	3.55	3.55
quin (2 H)	quin (2 H)	quin (2 H)	m (2 H)	m (2 H)	m (2 H)	m (2 H)
e	-	-	-	3.65	3.65	3.63
				m (2 H)	m (2 H)	m (2 H)
f	-	-	-	3.56	3.58	3.59
				m (1 H)	m (1 H)	m (1 H)
g	3.94	3.93	3.95	3.94; 4.03	3.97; 4.05	3.96; 4.05
q (2 H)	q (2 H)	q (2 H)	m (2 × 1 H)	m (2 × 1 H)	m (2 × 1 H)	m (2 × 1 H)
h	4.33	4.27	4.30	4.31	4.31	4.32
m (2 H)	m (2 H)	q (2 H)	m (2 H)	m (2 H)	q (2 H)	q (2 H)
i	3.70	2.65	2.81	3.70	2.67	2.81
m (2 H)	m (2 H)	t (2 H)	m (2 H)	m (2 H)	t (2 H)	t (2 H)
j	3.30	2.01	2.05	3.27	2.02	2.04
s (9 H)	d (9 H)	s (9 H)	s (9 H)	d (9 H)	s (9 H)	s (9 H)
k	-	-	-	3.51	3.55	3.55
				s (3 H)	s (3 H)	s (3 H)

[a] Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf Tetramethylsilan (TMS) extern. Alle Spektren wurden bei 500 MHz mit einem Bruker-AMX-500-Spektrometer bei 25 °C aufgenommen. Abkürzungen: s, Singulett; d, Dublett; t, Triplett, q, Quartett; quin, Quintett. Anzahl der zugeordneten Protonen in Klammern; durch Integration der Signale bestimmt. Korrekte Elementaranalysen.

Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, daß die neu synthetisierten elementhomologen Verbindungen für Mäuse weniger toxisch sind als die beiden Cholinphospholipide **1-N** und **2-N**. Demnach ist bei gleicher Struktur des hydrophoben Molekülteils die Toxizität eines Phospholipids einzig und allein vom Element der fünften Hauptgruppe bestimmt, das als Zentralatom im hydrophilen Oniumkomplex enthalten ist; im Hinblick auf die bekannte Giftigkeit anderer arsenhaltiger Substanzen ist die relativ geringe Toxizität der beiden Arsoniumphospholipide besonders beachtenswert.

Tabelle 2. Akute orale Toxizität (LD₅₀, orale Behandlung [a], mmol kg⁻¹) von **1-N**, **2-N** und den entsprechenden Phosphonium- und Arsoniumphospholipiden an Mäusen.

hydrophober Molekülteil	Onium-Gruppe					
	Me ₃ N	LD ₅₀	Me ₃ P	LD ₅₀	Me ₃ As	LD ₅₀
Octadecyl	1-N	0.8	1-P	1.8 [b]	1-As	2.0 [c]
2- <i>O</i> -Methyl-1- <i>O</i> -octadecylglyceryl	2-N	0.8	2-P	1.8 [b]	2-As	1.7 [b]

[a] Ein akuter oraler LD₅₀-Wert ist die auf ein Kilogramm Körpergewicht bezogene Dosis, die nach einmaliger Gabe der Substanz (Lösungen oder Suspensionen werden durch eine Magensonde in das Magenlumen gespritzt) 50 % der Tiere tötet, und er ist somit ein Maß für die Giftigkeit der geprüften Verbindung; ein vergleichsweise höherer LD₅₀-Wert signalisiert somit eine geringere Toxizität. Zur Ermittlung des LD₅₀-Werts wurden vier äquidistant logarithmische Dosen an je zehn Mäusen verabreicht und die Ergebnisse mit Logitanalyse ausgewertet. [b] P < 0.05 vs. LD₅₀ vom entsprechenden N-haltigen Phospholipid. [c] P = 0.001 vs. LD₅₀ von **1-N**.

Die vergleichsweise geringere Toxizität des Phosphonium- und des Arsoniumalkylphospholipids für die Versuchstiere geht keineswegs mit einer Verminderung der abtötenden Wirkung auf die außerhalb des Organismus wachsenden Krebszellen (Cytotoxizität in vitro, quantifiziert durch EC₉₀-Werte) einher. Obwohl die EC₉₀-Werte eine stärkere antineoplastische Aktivität der elementhomologen Verbindungen andeuten, sind die Unterschiede zu **1-N** statistisch nicht signifikant (Tabelle 3). Ähnlich war auch das Ergebnis der vergleichenden Prüfung der cytotoxischen Wirkung von zwei Glycerophospholipiden an DS-Krebszellen (**2-N**: EC₉₀ = 5.5 µmol L⁻¹; **2-As**: EC₉₀ = 4.8 µmol L⁻¹).

Tabelle 3. Cytotoxizität von drei gruppenhomologen Phospholipiden an der L1210-, KB- und DS-Zelllinie (Weichager Stammzellassay nach Salmon et al. [11]).

Phospholipid	EC ₉₀ [a] [µmol L ⁻¹]		
	L-1210-Zellen	KB-Zellen	DS-Zellen
1-N	7.3 ± 1.6	6.4 ± 3.1	7.3 ± 1.9
1-P	6.6 ± 2.9	6.2 ± 3.1	[b]
1-As	5.8 ± 0.6	6.4 ± 0.9	6.2 ± 2.1

[a] Der EC₉₀-Wert ist die Konzentration, die 90 % der damit behandelten Zellen tötet, d. h. es überleben nur 10 % der ohne Zusatz von Phospholipid kultivierten Zellen; angegeben sind Mittelwerte ± s (n = 6). Je niedriger die EC₉₀-Werte, desto stärker die cytotoxische Wirkung. Kein statistisch signifikanter Unterschied zu den entsprechenden EC₉₀-Werten von **1-N**. ΔEC₉₀ zwischen **1-N** und **1-As** an L-1210-Zellen ist lediglich grenzwertig signifikant (0.10 > P > 0.05; zweiseitiger t-Test). [b] Nicht untersucht.

Die Versuche an Ratten mit DMBA-Karzinom^[12] zeigten, daß Phosphonium- und Arsoniumphospholipide deutlich besser verträglich sind als die entsprechenden Cholinverbindungen. Dies soll anhand eines Vergleichs mit dem bereits klinisch eingesetzten Miltefosin und **1-As** demonstriert werden (**1-N** ist wegen

seiner Toxizität für die Klinik ungeeignet). Aus Abbildung 1a ist ersichtlich, daß nach viermaliger oraler Gabe von 68.1 mg Miltefosin pro kg Körpergewicht ($4 \times 167 \mu\text{mol kg}^{-1}$) am Tag 14 des Versuches eine deutliche Rückbildung der Tumoren (auf etwa 56% des am Tag 0 registrierten Gewichts) zu beobachten war. Jedoch hat sich der Allgemeinzustand der Tiere dabei deutlich verschlechtert (3% Nettokörpergewichtsverlust, d.h. Tiergewicht-Tumorgewicht, am Tag 14, Abb. 1b). Nach

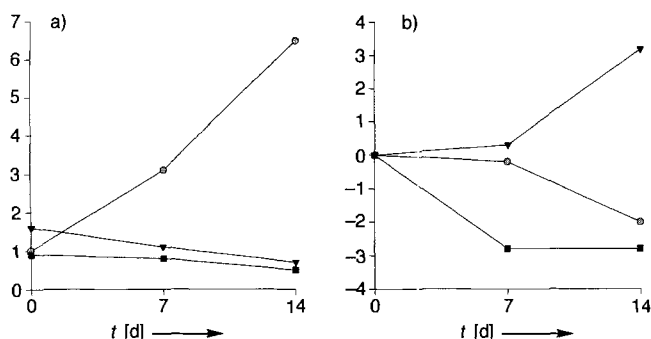


Abb. 1. a) Gewichtsabnahme von DMBA-Tumoren als Folge der viermaligen Behandlung (Tag 0, 3, 7, 10) der Versuchstiere mit Miltefosin oder 1-As sowie ungehemmtes Tumorstadium bei den Kontrolltieren. Unterschiede in der Intensität der Tumorrückbildung zwischen den Miltefosin- und 1-As-behandelten Gruppen sind statistisch nicht signifikant (multivariater Rangtest nach Koziol). Jede der drei Versuchsgruppen wurde mit sieben Ratten belegt. Auf der Ordinate sind die Zentralwerte des Tumorgewichts in Gramm aufgetragen. Die mit gefüllten Vierecken gekennzeichnete Kurve entspricht der oralen Behandlung mit $4 \times 68.1 \text{ mg}$ Miltefosin pro kg Körpergewicht, die mit gefüllten Dreiecken gekennzeichnete der mit $4 \times 68.1 \text{ mg}$ 1-As pro kg Körpergewicht. Die mit gepunkteten Kreisen gekennzeichnete Kurve bezieht sich auf die Kontrolltiere. b) Vergleich der Verträglichkeit von Miltefosin und 1-As anhand der behandlungsbedingten Änderung des mittleren Nettokörpergewichts in den entsprechenden Gruppen. Die beobachteten Unterschiede zwischen den Mittelwerten sind am Tag 14 statistisch signifikant ($P < 0.05$; zweiseitiger t-Test). Abnahme des Nettokörpergewichts in der Kontrollgruppe ist durch die toxische Einwirkung des Tumors auf den Wirtsorganismus bedingt. Jede der drei Versuchsgruppen wurde mit sieben Ratten belegt. Auf der Ordinate ist das arithmetische Mittel der Änderung des Nettokörpergewichts in % aufgetragen. Zuordnung der Kurven siehe Abb. 1a.

viermaliger Behandlung mit 68.1 mg 1-As pro kg Körpergewicht ($4 \times 137 \mu\text{mol kg}^{-1}$) war am Tag 14 eine etwas stärkere Verkleinerung der Tumoren (auf etwa 45% des Ausgangsgewichts, Abb. 1a; Unterschied zum Miltefosin statistisch nicht signifikant) feststellbar, obwohl die Dosis auf molarer Basis nur 82% der Miltefosin-Dosis betrug. Dabei nahmen die Tiere an Gewicht zu (3% am Tag 14, Abb. 1b). Selbst nach $4 \times 100 \text{ mg kg}^{-1}$ ($4 \times 201.4 \mu\text{mol kg}^{-1}$) 1-As war ein Zuwachs des Nettokörpergewichts (1% am Tag 14) zu beobachten und die Tumoren schrumpften auf 20% des am Tag 0 festgestellten Gewichts (Ergebnisse nicht graphisch dargestellt); der Unterschied zu der entsprechenden Veränderung des Körpergewichts und der Rückbildung der Tumoren bei den mit 68.1 mg kg^{-1} Miltefosin behandelten Ratten war statistisch signifikant (Wahrscheinlichkeit $P < 0.05$). Die bessere Verträglichkeit von 1-As ermöglichte somit eine höhere Dosierung, was zu einer Verbesserung der antitumoralen Wirkung führte, d.h. die therapeutische Breite wurde im Vergleich zu Miltefosin vergrößert. Ähnliche Resultate erhielten wir mit anderen hier erwähnten elementhomologen Verbindungen.

In den vorliegenden Experimenten wurden sowohl in vitro als auch am DMBA-Tumor eine den Ausgangsverbindungen entsprechende antitumorale Aktivität von elementhomologen Phospholipiden nachgewiesen. Für eine definitive Beurteilung der krebshemmenden Wirkung an tumortragenden Tieren wer-

den jedoch weitere Vergleichsversuche mit unterschiedlichen Versuchsanordnungen und Dosis-Wirkungs-Kurven vonnöten sein. Ferner haben wir gezeigt, daß 1-As von Ratten mit DMBA-Tumor besser vertragen wird als Miltefosin. Dieser Befund stützt die eingangs dargelegte Hypothese; in der Vergrößerung der therapeutischen Breite liegt der Vorteil der Arsoniumphospholipide gegenüber den stickstoffhaltigen Ausgangsverbindungen Miltefosin und Edelfosin. Somit können durch Veränderungen des Moleküls die Nebenwirkungen, z.B. der Körpergewichtsverlust, von Phospholipiden unabhängig von deren antitumoraler Aktivität beeinflusst werden; dies deutet darauf hin, daß sich der noch unbekannte Mechanismus der krebshemmenden Wirkung dieser Verbindungsklasse von dem für den Gewichtsverlust verantwortlichen unterscheidet.

Die im Vergleich mit Acetylcholin schwächere parasymphathikomimetische Wirkung seines Phosphor- und Arsen-Homologen^[3] wird der Tatsache zugeschrieben, daß P- und As-Atome längere Kovalenzradien aufweisen als N-Atome; infolgedessen werden die Dimensionen des Oniumkomplexes vergrößert^[3]. Die gleiche Erklärung könnte möglicherweise auch für die bessere Verträglichkeit der Phosphonium- und Arsoniumphospholipide zutreffen. Unseres Wissens sind bislang keine krebshemmenden Arsoniumderivate hergestellt worden; einige Arsen(III)-Verbindungen sind antineoplastisch wirksam^[9, 10], jedoch wesentlich toxischer als die hier beschriebenen, vierbindiges Arsen enthaltenden Phospholipide. Über Fortschritte in der Synthese von weiteren biologisch aktiven elementhomologen Phospholipiden wird demnächst berichtet werden.

Eingegangen am 21. Mai,
veränderte Fassung am 28. Juli 1994 [Z 6958]

Stichworte: Antitumormittel · Phospholipide

- [1] S. Danhauser-Riedl, A. Drozd, M. Zaffernai, U. Brunsch, M. Peukert, H. Sindermann, H. W. Präuer, J. R. Siewert, J. Rastetter, W. E. Berdel, *Onkologie* **1991**, *14*, 392–396.
- [2] J. Stekar, P. Hilgard, R. Voegeli, H. R. Maurer, J. Engel, B. Kutscher, G. Nöbner, W. Schumacher, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1993**, *32*, 437–444.
- [3] R. B. Barlow, *Introduction to Chemical Pharmacology*, 2. Aufl., Methuen, London, **1964**, S. 196.
- [4] H. Yamouchi, T. Kaise, Y. Yamamura, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1986**, *36*, 350–355.
- [5] R. Kruse, U. Ballin, 24. GDCh-Hauptversammlung, Hamburg 5.–11. September **1993**, S. 134.
- [6] J. Engel, B. Kutscher, W. Schumacher, U. Niemeyer, A. Olbrich, G. Nöbner (ASTA Medica), DE-B 4220852, **1991**.
- [7] S. Tsushima, Y. Yoshioka, S. Tanida, H. Nomura, S. Nojima, M. Hozumi, *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 3260–3270.
- [8] K. J. Irgolic, T. Junk, C. Kos, W. S. McShare, G. C. Pappalardo, *Appl. Organomet. Chem.* **1987**, *1*, 403–412.
- [9] D. Lissauer, *Ber. Klin. Wochenschr.* **1865**, *2*, 403–404.
- [10] F. E. Knock, *Anticancer Agents*, 1. Aufl., Thomas, Springfield, **1967**, S. 139.
- [11] S. E. Salmon, A. W. Hamburger, B. Soehnlen, B. G. M. Durie, D. S. Alberts, T. E. Moon, *N. Engl. J. Med.* **1978**, *298*, 1321–1324.
- [12] Das DMBA-Karzinom ist ein Brustdrüsenkrebs von Ratten, der durch die einmalige orale Gabe von Dimethylbenz[*a*]anthracen induziert wird.