

UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS VON ENDOXAN

H. GRUNICKE, M. LIERSCH, H. HOLZER und H. ARNOLD

Aus dem Biochemischen Institut an der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg
im Breisgau und dem Chem. Forschungslaboratorium der Asta-Werke
A. G. Brackwede (Westf.)

(Received 19 May 1965; accepted 17 June 1965)

Abstract—Hydrolytic cleavage of the esteramidring of endoxan* 0, N'-propylene-phosphordiamide¹ yields 0-(3-aminopropyl)-phosphoromonoamidic acid (A2). In contrast with endoxan this compound A2 (Fig. 1) is characterized by a marked antitumor activity *in vitro*.

The same biochemical effects which have been produced by alkylating agents could be demonstrated with A2. A2 inhibits glycolysis in tumor cells by lowering the NAD concentration. Oxygen consumption of the tumor cells is not influenced by A2. Inhibition of glycolysis and decrease in NAD concentration can only be observed in a weakly acid medium (pH 6.0). At pH 7.4 glycolysis remains unchanged.

A structural similarity between A2 and the active antitumor compound present in the serum of endoxan-treated animals is discussed.

ENDOXAN[†] (propylenphosphorsäureesterdiamid) zeigt *in vitro* bei der Inkubation mit Tumorzellen keine cytostatische Wirksamkeit. Nach *in vivo* Applikation an Ratten lässt sich jedoch im Serum dieser Tiere eine cytostatisch aktive Verbindung nachweisen.¹ Über den Mechanismus dieser Aktivierung liegen verschiedene Untersuchungen vor.^{2, 3} Die tatsächliche Reaktionsfolge, die zur Bildung der Wirkform führt, ist jedoch noch unklar.

In vitro lässt sich unter physiologischen Bedingungen eine hydrolytische Spaltung des Endoxans in Bis-(2-chloräthyl)amin und die entsprechend phosphamid ester säure nachweisen.² Nach den Untersuchungen von Brock und Hohorst³ handelt es sich bei der, nach *in vivo* Applikation im Serum nachweisbaren, cytostatisch aktiven Verbindungen jedoch nicht um das freie NH-Lost. Möglichkeiten zur Aktivierung des Endoxans unter Erhaltung der Bindung zwischen Lost-N und Phosphorylrest ergeben sich durch Spaltung des Esteramidringes. Die im Falle einer Spaltung der Esterbildung entstehende Diamidophosphorsäure ist sehr unbeständig. Ausreichende Stabilität besitzt jedoch der durch Öffnung der Amidbindung entstehende N,N-Bis-(β-chloräthyl)-O-(3-aminopropyl)-phosphorsäureamidoester. (Abb. 1)⁴ Im Gegensatz zu Endoxan wirkt diese Verbindung *in vitro* cytostatisch.⁵ Als Ursache der cytostatischen Wirkung sind Alkylierungsreaktionen der N-Lostgruppe anzunehmen. Wie Roitt⁶ und Holzer⁷ zeigen konnten, bewirken alkylierende Cytostatica durch eine Senkung des NAD-Spiegels eine Hemmung der Glycolyse von Tumorzellen. Im Folgenden soll geprüft werden, ob die durch Spaltung des Esteramidringes aus

* N,N-bis-(2-chloroethyl)-

† N,N-Bis-(2-chloräthyl)-N'O-

Endoxan entstehende Amidoestersäure, die als mögliches Aktivierungsprodukt des Endoxans in Frage kommt, die von alkylierenden Cytostatica bekannten Effekte auf Glycolyse und NAD-Gehalt von Ehrlich Ascites Tumorzellen aufweist.

MATERIAL UND METHODEN

Endoxan: Propylenphosphorsäureesterdiamid, Firmenbezeichnung "Endoxan", sowie phosphorsäureamidoester, im Folgenden "A2" benannt, wurden uns von den Asta-Werken, Brackwede, überlassen. Trenimon : 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon1,4 verdanken wir der Firma Bayer, Leverkusen.

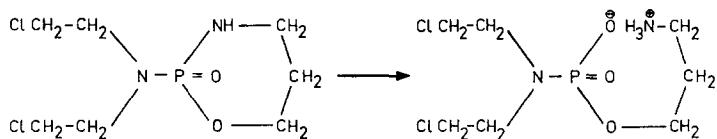


ABB. 1. Strukturformel von Endoxan und N,N-Bis-(2-chloräthyl)-0-(3-aminopropyl)- phosphorsäure-amidoester (A2).

Gewinnung der Ascites-Tumorzellen: Die Asciteszellen wurden 9–10 Tage nach der Inokulation entnommen, in einem gleichen Volumen 0,9% NaCl (1mM an EDTA) aufgenommen, durch kurzes Zentrifugieren von Serum und Erythrocyten getrennt und anschließend in Krebs-Ringer-Bicarbonat- oder Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer suspendiert.

Manometrie: (a) Glycolyse bei pH 6·0: Im Hauptraum 0,1 ml. Zellen in Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer. In der Birne 0,06 ml. 40% Glucose und 0,1 bis 0,2 ml. wässriger Lösung der einzelnen Cytostatica. Gesamtvolume des Ansatzes 3,0 ml. Gasphase 100% CO₂; T 37°. Start durch Einkippen von Glucose und Cytostatica. Ablesezeit 90 Min.

(b) Glycolyse bei pH 7·4: Wie Glycolyse bei pH 6·0, im Hauptraum jedoch 0,05 ml. Zellen. Gasphase 95% N₂/5% CO₂.

(c) Atmung: Im Hauptraum 0,2 ml. Zellen in Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer pH 6·0. Im Einsatz 0,15 ml. 1 N NaOH. In der Birne 0,06 ml. 40% Glucose und 0,2 ml. 0,15 M wässriger Lösung von A2. Gesamtvolume des Ansatzes 3,0 ml. Gasphase Luft; T 37°. Start durch Einkippen von Glucose und A2.

NAD-Bestimmung: Die Prüfung des Einflusses der einzelnen Cytostatica auf den NAD-Gehalt der Zellen erfolgte unter den gleichen Bedingungen, wie sie zur Messung der Glycolyse bei pH 6·0 beschrieben wurden; jedoch wurden statt 0,1 ml. 0,4 ml. Zellen eingesetzt. Die Inkubation wurde nach 50 Min gestoppt durch Zusatz von 0,3 ml. 50% HCIO₄, das gefällte Protein abzentrifugiert und der klare Überstand zum optischen Test nach Warburg⁸ eingesetzt.

RESULTATE

Tab. 1 zeigt die Wirkung von Endoxan sowie verschiedener Konzentrationen von A2 auf die anaerobe Glycolyse von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen bei pH 6·0. Zum

* N,N-Bis-(2-chloräthyl)-N'O-

† N,N-Bis-(2-chloräthyl)-0-(3-aminopropyl)-

TABELLE 1. WIRKUNG VON ENDOXAN UND "A2" AUF DIE ANAEROBE GLYCOLYSE VON EHRLICH-ASCITES-TUMORZELLEN BEI pH 6,0.
ZUM VERGLEICH DIE WIRKUNG VON TRENIMON
(Einzelheiten siehe unter "Material und Methoden")

	Cytostaticum	Glycolyse ($\mu\text{l CO}_2/\text{h}/\mu\text{l Zellen}$)	Hemmung in %
A2	10^{-2} M	2,68	0
A2	10^{-3} M	0,70	74
A2	10^{-4} M	1,20	55
Endoxan	10^{-2} M	2,51	7
Trenimon	10^{-2} M	2,68	0
	10^{-4} M	<0,10	96

Vergleich ist die Wirkung des Trisäthyleniminobenzochinons "Trenimon" aufgeführt. Während Endoxan bei einer Konzentration von 10^{-2} M noch keinen meßbaren Effekt auf die Glycolyse ausübt, verursacht A2 bereits bei einer 10-fach schwächeren Konzentration eine Hemmung der Glycolyse um 55 %. Vergleicht man die Wirkungen von A2 und Trenimon, so zeigt sich, daß 10^{-4} M Trenimon noch einen stärkeren Hemmeffekt ausübt als 10^{-2} M A2.

In zahlreichen Untersuchungen, besonders von Holzer *et al.* (zusammenfassende Darstellung⁹) konnte gezeigt werden, daß die Hemmung der Glycolyse durch alkylierende Cytostatica auf einer Erniedrigung des NAD-Gehaltes der Zellen beruht. Wie Tab. II zeigt, ist für A2 der gleiche Wirkungsmechanismus anzunehmen.

TABELLE 2. EINFLUSS VON ENDOXAN, "A2" UND TRENIMON AUF DEN NAD-GEHALT VON EHRLICH-ASCITES-TUMORZELLEN
(Einzelheiten siehe unter "Material und Methoden").

	Cytostaticum	NAD in $\mu\text{Mol/ml}$ Zellen	NAD in % der Kon- trolle ohne Cytostaticum
A2	10^{-2} M	0,259	100
A2	10^{-3} M	0,056	22
A2	10^{-4} M	0,160	62
Endoxan	10^{-2} M	0,222	86
Trenimon	10^{-2} M	0,262	101
	10^{-4} M	0,030	12

Durch Zusatz von Nicotinsäureamid, welches den Abfall des NAD durch alkylierende Cytostatica infolge einer Inhibierung der NAD-Glycohydrolase verhindert,¹⁰ kann die Glycolysehemmung durch A2 vollkommen aufgehoben werden (vgl. Abb. 2).

Den Einfluss des pH auf die Wirksamkeit von A2 zeigt Abb. 3. Dargestellt ist der Einfluss von 10^{-2} M A2 auf die anaerobe Glycolyse von Asciteszellen bei pH 6,0 und bei pH 7,4. Ein Effekt auf die Glycolyse ist nur bei pH 6,0 nachweisbar.

Eine Hemmung der Atmung durch A2 ließ sich nicht beobachten (vgl. Abb. 4).

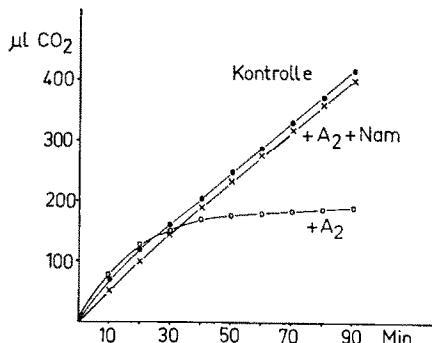


ABB. 2. Schutzeffekt von Nikotinsäureamid (Nam) vor der Glycolysehemmung durch A2. Anaerobe Glycolyse bei pH 6.0. Konzentration von Nikotinsäureamid 2×10^{-2} M, von A2 10^{-3} M. Die Glycolysehemmung durch 10^{-3} M A2 ist in diesem Versuch stärker als bei dem in Tab. 1 dargestellten. Die Ursache ist darin zu sehen, daß die Substanz in diesem Falle ca. 3 h in wässriger Lösung vor Versuchsbeginn stehen blieb. Die Wirkung war in solchen Fällen regelmäßig stärker als bei frisch bereiteten Lösungen.
(Einzelheiten siehe unter "Material und Methoden").

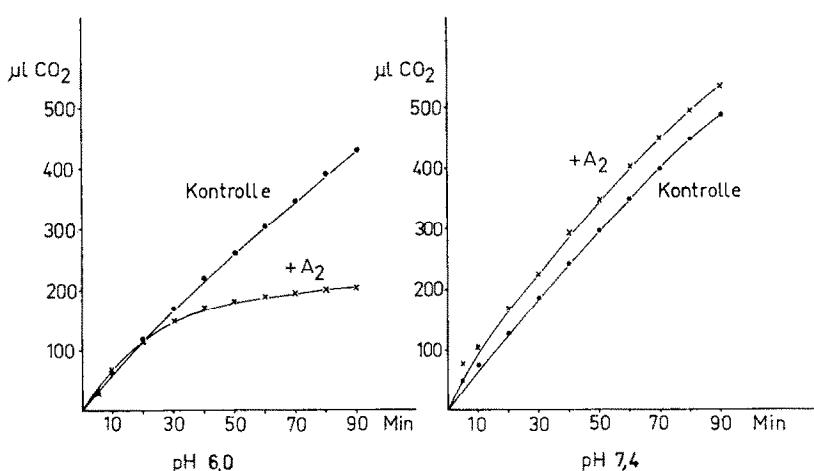


ABB. 3. Einfluß von A2 auf die Glycolyse von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen bei pH 6.0 und pH 7.4.
Konzentration von A2 jeweils 10^{-2} M.
(Einzelheiten siehe unter "Material und Methoden").

DISKUSSION

Durch hydrolytische Spaltung der N-p-Bindung des Esteramidringes entsteht aus Endoxan die entsprechende Amidesteräsäre "A2". Diese Verbindung, in der die Lostgruppe noch in N-phosphorylierter Form vorliegt (s. Abb. 1), zeigt im Gegensatz zu Endoxan in vitro deutliche cytostatische Wirksamkeit.⁵ Biochemisch zeigt diese Substanz die bekannten Effekte alkylierender Cytostatica. Sie verursacht eine Hemmung der Glycolyse durch Senkung des NAD-Gehaltes der Zellen. Glycolysehemmung und NAD-Senkung durch A2 lassen sich durch Nicotinsäureamid aufheben. Wie von Kun *et al.*¹⁰ nachgewiesen werden konnte, ist die Ursache der Schutzwirkung des Nicotinsäureamids vor der NAD-Senkung durch alkylierende Substanzen eine Hemmung der NAD-Glycohydrolase. Es ist deshalb anzunehmen, daß der NAD-Abfall unter A2, ebenso wie der durch andere alkylierende Cytostatica verursachte,

über die NAD-Glycohydrolase verläuft. In Übereinstimmung mit dem Verhalten von Äthyleniminverbindungen¹¹ zeigt A2 trotz der Senkung des NAD-Gehaltes lediglich eine Hemmung der Glycolyse, nicht jedoch der Atmung. Dieser Effekt

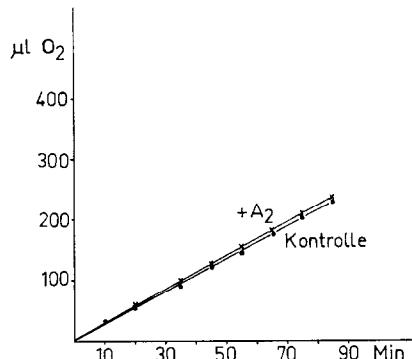


ABB. 4. Einfluß von A2 auf die Atmung von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen. Konzentration an A2 10^{-2} M.
(Einzelheiten siehe unter "Material und Methoden")

findet seine Erklärung in dem Befund von Borst, Grimberg und Holzer,¹² wonach Trisäthyleniminobenzochinon nur eine Erniedrigung des cytoplasmatischen, nicht jedoch des mitochondrialen NAD bewirkt.

Die weitgehende Übereinstimmung der Wirkungen von A2 mit denjenigen anderer alkylierender Cytostatica lässt den Schluß zu, daß die Ursache der cytostatischen Wirkung dieser Verbindung seine Fähigkeit zur Alkylierung ist. Die alkylierende Eigenschaft von A2 *in vitro* läßt sich durch die Alkylierung von *p*-Nitrobenzylpyridin zur quartären Pyridiniumverbindung nachweisen.¹³ Die Reaktionsgeschwindigkeit der Alkylierung wird wahrscheinlich durch die Geschwindigkeit der Dephosphorylierung des Lost-N bestimmt. Diese Eigenschaft ist möglicherweise die Ursache für die starken quantitativen Wirkunterschiede von A2 und Trenimon (vgl. Tab. I). Die Reaktionsgeschwindigkeit ist jedoch kein direktes Maß für die cytostatische Aktivität. Weitere Untersuchungen werden zeigen müssen, ob die nach *in vivo* Applikation von Endoxan im Serum nachweisbare, cytostatisch aktive Verbindung dem A2 gleicht. Nach Brock und Hohorst³ erfolgt die Aktivierung des Endoxans durch enzymatische Prozesse unter Beteiligung der Lebermikrosomen. Erste Hinweise sprechen dafür, daß A2 einer Aktivierung durch die Lebermikrosomen nicht mehr bedarf.¹⁴

ZUSAMMENFASSUNG

Aus Endoxan, N,0,propylenphosphorsäureesterdiamid) entsteht durch hydrolytische Spaltung des Esteramidringes* N-0-(3 aminopropyl)- phosphorsäuremidoster. Diese Verbindung (Bezeichnung A2) besitzt im Gegensatz zu Endoxan *in vitro* deutliche cytostatische Aktivität. Biochemisch finden sich die gleichen Effekte, wie sie von alkylierenden Cytostatica bekannt sind: nämlich eine Hemmung der Glycolyse von Tumorzellen durch Senkung des NAD-Spiegels. Die Atmung der Zellen wird durch A2 nicht beeinflusst. Glycolysehemmung und NAD-Senkung ließen sich nur

* N, N-Bis-(2-chloräthyl)-

im schwach sauren Bereich bei pH 6,0 nachweisen. Bei pH 7,4 blieb die Glycolyse unbeeinflusst.

Ein strukturelle Ähnlichkeit von A2 mit dem im Serum nach *in vivo* Applikation nachweisbaren "aktivierten Endoxan wird diskutiert.

LITERATUR

1. G. E. FOLEY, O. M. FRIEDMAN und B. P. DROLET, *Cancer Res.* **21**, 57 (1961).
2. H. ARNOLD und H. KLOSE, *Arzneimittelforsch.* **11**, 159 (1961).
3. N. BROCK und H. J. HOHORST, *Arzneimittelforsch.* **13**, 1021 (1963).
4. H. ARNOLD und F. BOURSEAUX, *Arzneimittelforsch.* **13**, 927 (1963).
5. H. GERHARTZ, Persönliche Mitteilung an H. ARNOLD.
6. J. M. ROITT, *Biochem. J.* **63**, 300 (1956).
7. H. HOLZER und G. SEDLMAYR, *Ber. ges. Physiol.* **189**, 120 (1957).
8. O. WARBURG und W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.* **287**, 291 (1936).
9. H. HOLZER, *Dtsch. Med. Journal* **12**, 312 (1961).
10. E. KUN, B. LANGER, B. ULRICH, H. HOLZER und H. GRUNICKE, *Proc. Nat. Acad. Sci. (US)* **52**, 1501 (1964).
11. H. HOLZER, G. SEDLMAYR und A. KEMNITZ, *Biochem. Z.* **328**, 163 (1956).
12. P. BORST, H. GRIMBERG und H. HOLZER, *Biochem. biophys. Acta* **74**, 785 (1963).
13. H. M. RAUEN, *Arzneimittelforsch.* **14**, 855 (1964).
14. H. M. RAUEN and K. P. KRAMER, *Arzneimittelforsch.* **14**, 977 (1964).