

The presence of considerable amounts of a metabolic product in brain was established as follows: Pooled brains from five animals given imipramine 3 h previously were homogenized with three volumes of water, the homogenate was alkalized with 1.0 *N* NaOH to about pH 12, and shaken with three volumes of heptane containing 1.5% isoamyl alcohol. Phenolic material was removed by shaking the heptane phase with a small volume of 0.1 *N* NaOH. Basic material in the heptane phase was returned to an aqueous phase by shaking with $\frac{1}{3}$ volume of 0.2 *M* phosphate buffer, pH 5.9, which would extract only a small fraction of any imipramine that might be present. Traces of imipramine in the buffer phase were removed by shaking with three volumes of the heptane-isoamyl alcohol mixture, and the buffer phase was then alkalized with 3 *N* NaOH. The fluorescence spectra of this solution, examined with a spectrofluorometer, revealed material with fluorescent characteristics similar to those of imipramine (activation maximum: 295 m μ , fluorescence maximum: 415 m μ , uncorrected). The results indicated that a heptane-soluble metabolite had accumulated in brain in amounts equivalent to about 10 μ g of imipramine per g of tissue. The material was then extracted into heptane.

The metabolite was identified as desmethylinipramine (DMI) as follows:

Gas Chromatography. An aliquot of the heptane phase was evaporated to dryness under reduced pressure, and the residue dissolved in a small amount of acetone. The resulting solution was dried over MgSO₄ and evaporated to about 0.1 ml at room temperature under a stream of nitrogen. The material was subjected to gas chromatography at 175°C using a column of 0.75% Silicone Polymer, SE 30 Gas-Chrome P (mesh-size 100–140), and an argon pressure of one atmosphere⁷. The retention time of the principal component was identical to that of DMI, the monomethyl analogue of imipramine, a metabolite previously isolated by HERRMANN and PULVER⁸ from urine, lung, and liver of animals given imipramine.

Paper Chromatography. Another aliquot of the heptane phase was evaporated to dryness under reduced pressure and the residue dissolved in a small volume of methanol. The methanol solution was applied to Whatman 3 paper, impregnated with peanut oil⁹. The chromatograms were developed by ascending chromatography with a solvent system consisting of concentrated ammonia and methanol (1:1). The chromatogram was irradiated with a shortwave ultraviolet lamp (Model SL 2537 Mineralight lamp). No fluorescent material was seen at room temperature, but on cooling the paper with liquid nitrogen, a brilliant fluorescent spot appeared with an R_f value (0.23) corresponding to DMI. No fluorescent spot was found having an R_f value (0.33) corresponding to desdimethyl-

imipramine, the primary amine analogue of imipramine. When the chromatogram was sprayed with diazotized *p*-nitroaniline and HCl as described by HERRMANN et al.⁸, the fluorescent material formed a blue spot similar to that formed from authentic DMI.

The accumulation of DMI in brain after administration of imipramine suggested that the action of the latter drug might be mediated through the metabolic product. Further experimental support of this was provided by giving imipramine in repeated doses, 20 mg/kg, every 6 h over a period of 24 h. 4 h after the last dose, the animals were given either RO-4-1284 or reserpine. No sedation occurred, and in about 1 h the animals displayed marked hyperactivity lasting over several hours. Analysis of brain showed negligible amounts of imipramine and about 20 to 30 μ g of DMI per g of tissue.

Pharmacological studies have shown that DMI is a new type of antidepressant¹⁰. It does not elicit excitation in the normal rat nor does it block monoamine oxidase or affect brain amines. The antidepressant action of DMI becomes dramatically evident in studies which show that in rats pretreated with the drug the effects of RO-4-1284 or reserpine are reversed. The action of the drug in this regard is far more rapid and potent than that of imipramine. In fact imipramine itself does not seem to have this action for it actually inhibits the action of DMI. Preliminary clinical studies in collaboration with N. KLINE (unpublished) indicate that DMI is potent and rapidly acting in endogenous depression.

Zusammenfassung. Nach Verabreichung von Imipramin (Tofranil) wurde aus dem Gehirn von Ratten Desmethylinipramin, das N-Monomethylderivat, isoliert. Dieser Metabolit beziehungsweise dessen Anreicherung *in vivo* scheint für die antidepressive Wirkung von Imipramin verantwortlich zu sein.

J. R. GILLETTE, J. V. DINGELL, F. SULSER,
R. KUNTZMAN, and B. B. BRODIE

Laboratory of Chemical Pharmacology, National Heart Institute, National Institutes of Health, Bethesda (Maryland), July 17, 1961.

⁷ We thank Dr. W. J. A. VAN DEN HEUVEL for performing the gas chromatography analyses.

⁸ B. HERRMANN and R. PULVER, Arch. int. Pharmacodyn., 126, 454 (1960). Reference samples of desmethylinipramine and desdimethylimipramine were obtained through the courtesy of Dr. F. HAEFLIGER, J. R. Geigy, S.A., Basel.

⁹ B. HERRMANN, W. SCHINDLER, and R. PULVER, Med. exp., 1, 381 (1959).

¹⁰ F. SULSER, J. V. DINGELL, J. R. GILLETTE, and B. B. BRODIE, in preparation.

Biophysikalische Studien mit synthetischem Lecithin als Weg zu neuartigen Chemotherapeutika

In unserer letzten Mitteilung¹ haben wir dargelegt, dass dem Lecithin vermutlich die biologische Funktion eines «carriers» beim Ionentransport durch den lipiden Teil der Zellwand zukommt.

In einem einfachen biophysikalischen Modell konnten wir zeigen, dass Lecithin, gelöst in CCl₄, befähigt ist, Anionen aus wässriger Lösung in die lipide Phase überzuführen, wenn in der wässrigen Phase zugleich gewisse Kationen vorhanden sind. Aus messtechnischen Gründen

wurde als Anion Tropäolin verwendet. Die Bindungsfähigkeit zwischen Lecithin und diesem Farbstoff ist stark abhängig von der Art und Konzentration der anwesenden Kationen. Es wurde gefunden, dass insbesondere polybasische Verbindungen wie Protamin und Polymyxin den Transport in die lipide Phase fördern.

In weiteren Versuchen stellten wir fest, dass in CCl₄ gelöstes Lecithin befähigt ist, in Wasser gelöstes Trypaflavin (Kation) in die lipide Phase überzuführen und dass dieselben Kationen, die den Übergang von Tropäolin fördern,

¹ R. HIRT und R. BERCHTOLD, Med. exp., 2, 269 (1960).

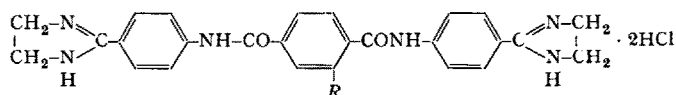
hier nun hemmen. Auch hier sind Protamin und Polymyxin besonders aktiv. Figur 1 und 2 zeigen als Vergleich die Absorption von Trypaflavin bzw. Tropäolin² in die lipide Phase in Abhängigkeit von der Konzentration einiger charakteristischer Kationen in der wässrigen Schicht.

Unseres Erachtens kommt der Übergang von Tropäolin in die CCl₄-Phase dadurch zustande, dass sich vorerst das polybasische Protamin bzw. Polymyxin an der Grenzfläche Lipoid-Wasser anlagert. Dabei werden die sauren Gruppen des Phosphatids besetzt und an der Grenzfläche fixiert unter Freisetzung der Cholin-Komponente, an die sich der saure ionisierte Farbstoff anlagert und als Farbstoff-Lecithinkomplex in der lipiden Phase gelöst wird. Andererseits wird die Bildung des CCl₄-löslichen Trypaflavin-Lecithinsalzes durch die an der Grenzfläche adsorbierten polybasischen Verbindungen kompetitiv gehemmt.

Offensichtlich müssen 3 Bedingungen erfüllt sein, um maximale Wirkung zu erzielen: (1) Mehrfachbasische Verbindung, (2) sterisch wenig gehinderte stark basische Zentren (bei pH 7 zum grossen Teil protoniert) und (3) Adsorption an der Grenzfläche Lipoid-Wasser durch Van der Waals'sche Kräfte.

Wir haben Verbindungen synthetisiert, die aller Voraussicht nach diese Bedingungen erfüllen sollten, und in unserer Versuchsanordnung gemessen. Eine Auswahl von Messresultaten zeigt Figur 3, wobei auch Verbindungen einbezogen sind, die die Bedingungen nicht erfüllen.

Es ist aus der Figur 3 ersichtlich, dass in der Tat maximale Hemmwirkung dann auftritt, wenn mindestens zwei stark basische Gruppen durch mehrere coplanare Ringe³ und durch Carbonamid-Gruppen verknüpft sind; ferner muss das Molekül eine durchgehende Konjugation aufweisen. Besonders interessant waren bisher Verbindungen mit folgender Struktur:



Diskussion. Es ist klar, dass solchen polyvalenten Basen auf Grund ihrer Fähigkeit, Phosphatide zu «fixieren», erhebliche Bedeutung als biologisch aktive Substanzen zukommt. Als «Phosphatid-Blocker» können sie als potentielle Hemmsubstanzen des Ionentransportes durch Phosphatidmembranen der lebenden Zelle angesehen werden. Da auch die Proteinsynthese über Phospho-Lipid-Aminosäure-Komplexe⁵⁻⁹ verläuft, könnte erwartet werden, dass solche polybasischen Stoffe durch Blockierung dieser Phospholipide einen Einfluss auf das Zellwachstum ausüben¹⁰. Nun sind in unserem Test die Lecithin-

moleküle innerhalb der lipiden Phase und in der Grenzfläche frei beweglich. Ihre sauren Gruppen können sich innerhalb der Grenzfläche den basischen Zentren der adsorbierten Basen weitgehend anpassen.

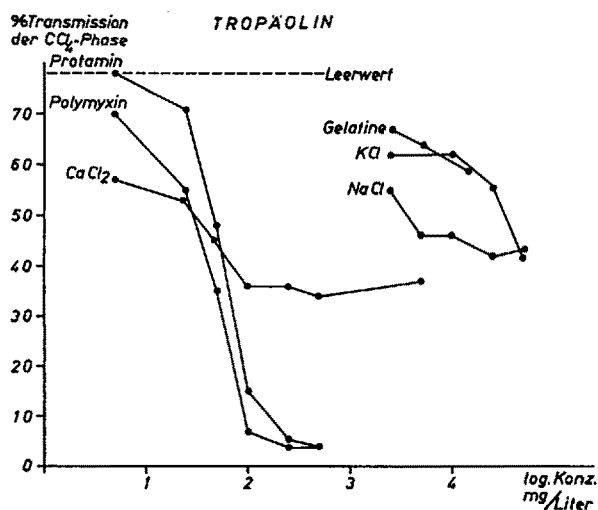


Fig. 2

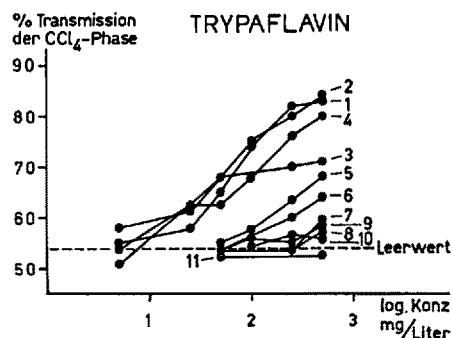


Fig. 3. (1) Terephthal-dianilid-4',4''-bis(2-imidazolin)-dihydrochlorid. (2) Terephthal-dianilid-3',3''-bis-(2-imidazolin)-dihydrochlorid. (3) Nitro-terephthal-dianilid-4',4''-bis(2-imidazolin)-dihydrochlorid. (4) Chlor-terephthal-dianilid-4',4''-bis(2-imidazolin)-dihydrochlorid. (5) Diphenyl-4,4'-bis(2-imidazolin)-dihydrochlorid. (6) Benzol-m-disulfonsäure-dianilid-4,4'-bis(2-imidazolin)-dihydrochlorid. (7) Äthylendiamin-dihydrochlorid. (8) Phenyl-1,4-bis(2-imidazolin)-dihydrochlorid. (9) Terephthal-bis-(N-methyl-piperazid)-dihydrochlorid. (10) Terephthal-dianilid-4',4''-bis-trimethylammoniumchlorid. (11) Putrescin-dihydrochlorid, Arcain-dihydrochlorid, Isophthal-bis-(γ-pyridylamid)-dihydrochlorid.

² Die relativen Konzentrationen der Farbstoffe in der CCl₄-Phase wurden wie früher (vgl. ¹) colorimetrisch bei 420 mμ bestimmt. Auch die übrige Messanordnung ist dieselbe.

³ Eine Parallele hierzu sind die Bedingungen, wie sie für das Vorkommen des kristallin-flüssigen Zustandes erfüllt sein müssen (vgl. ⁴).

⁴ CH. WIEGAND, in HOUBEN-WEYL, *Methoden der organischen Chemie*, 3. Aufl. (Stuttgart 1955), Bd. 3/1, p. 681. - D. VORLÄNDER, *Chemische Kristallographie der Flüssigkeiten* (Leipzig 1924). - C. WEYGAND, *Hand- und Jahrbuch der chemischen Physik*, 2 (Leipzig 1941). - CH. R. WIEGAND, *Z. Naturforsch.* 12b, 512 (1957).

⁵ J. A. V. BUTLER, G. N. GODSON und G. D. HUNTER, in R. J. C. HARRIES, *Protein Biosynthesis* (Academic Press, London 1961).

⁶ G. E. HUNTER und G. N. GODSON, *Nature* 189, 140 (1961).

⁷ R. W. HENDLER, *J. biol. Chem.* 234, 1466 (1959).

⁸ W. L. GABY und R. SILBERMAN, *Arch. Biochem. Biophys.* 87, 188 (1960).

⁹ G. N. GODSON und G. D. HUNTER, *Biochem. J.* 79, 37 P (1961).

¹⁰ Der Wirkungsmechanismus von natürlichen Antikörpern oder «endogenen Antibiotika»¹¹ könnte ebenfalls dieser Art sein.

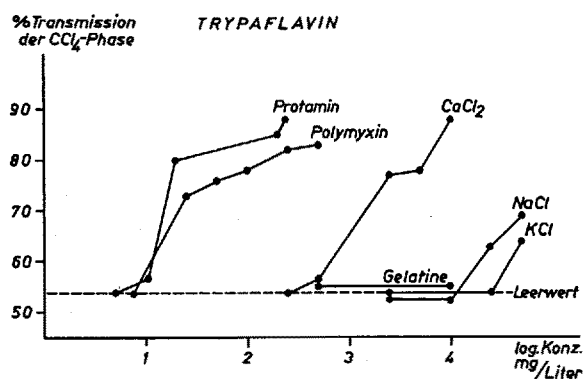


Fig. 1

Anders wird jedoch die Situation, wenn man wie STEINBERG¹³ annimmt, dass die sauren Phosphatidgruppen an der Grenzfläche der Zellen in einer starren, zellspezifischen mosaikartigen Struktur verteilt sind. Dann wird zusätzlich auch noch die Lage der positiven Ladungen dieser Hemmsubstanzen eine wesentliche Rolle spielen, und zwar in dem Sinne, dass zu einer bestimmten Anordnung der Phosphatide in der Zellwand die Lage der basischen Gruppen in der Molekülebene kongruent sein muss. Nur so wird durch potenzierte Coulombsche Attraktion eine maximale Affinität gewährleistet. Unser Test zeigt nur die allgemeinen Bedingungen einer Phosphatid-Blockierung. Eine zellspezifische Wirkung, die durch geeignete Variation der Strukturen erwartet werden kann, muss am biologischen Objekt eruiert werden.

Es hat sich nun tatsächlich gezeigt, dass eine Reihe von neuen Verbindungen, die nach diesen Gesichtspunkten synthetisiert wurden, in Übereinstimmung mit der Wirkung an unserem Test eine auffällige und differenzierte Wirkung auf lebende Zellen haben. So übertreffen einige dieser Stoffe die *in vitro*-Hemmwirkung von INH auf Tbc-Bakterien. Besonders interessant ist jedoch die Wirkung bei tierexperimentellen Neoplasmen. So verlängert die oben mit der Strukturformel angeführte Verbindung die Überlebenszeit von mit Leukämie beimpften Mäusen bei grosser therapeutischer Breite um 330% bei $R = H$, um 250% bei $R = NO_2$ und um 400% bei $R = Cl$ ¹³. Die Wir-

kung ist spezifisch auf jeweils eine Krebsart. Durch kleine Variationen in der Struktur wird die Wirkung auf andere Neoplasmen, wie Sarkom oder Carcinom, verschoben.

Wir sind damit beschäftigt, eine grössere Zahl von strukturell verwandten Verbindungen herzustellen und zu prüfen¹⁴.

Summary. Based on the behaviour of lecithin in a biophysical cell model, novel compounds have been developed which are regarded as 'phosphatide blockers' in the membrane of the living cell. They inhibit neoplasms in animal experiments to a high degree, and are therefore potential chemotherapeutic agents of great interest.

R. HIRT und R. BERCHTOLD

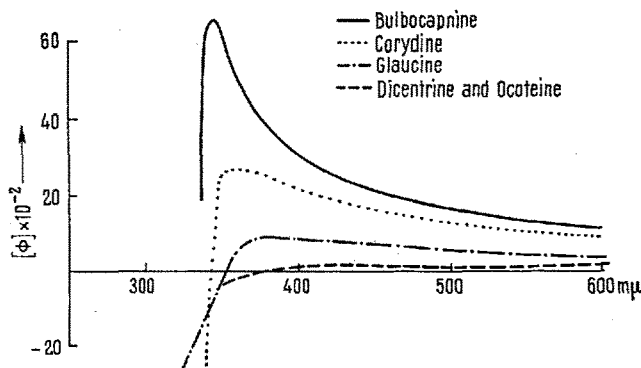
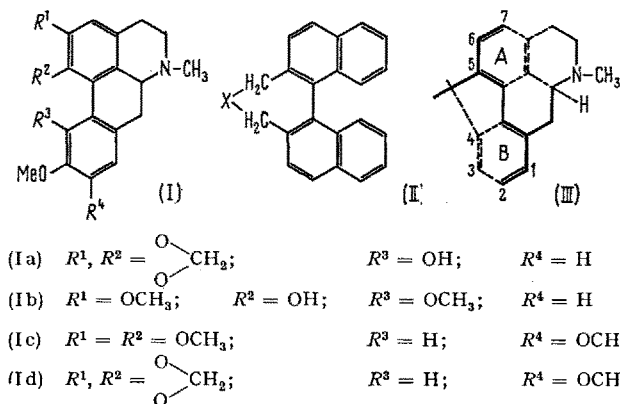
Forschungsinstitut Dr. A. Wander AG, Bern (Schweiz), 21. Juli 1961.

The Anomalous Rotatory Dispersion Curves of Aporphine Alkaloids

The configuration of optically active biaryls has been successfully correlated by examining their rotatory dispersion curves^{1,2}. We wish now to report some results of our studies on the rotatory dispersion of some aporphine alkaloids which may be connected with their biphenyl systems.

Bulbocapnine (Ia) and corydine (Ib) exhibit anomalous positive curves (Figure) which are somewhat similar to those presented by members of the (S)-series of 2,2'-bridged, 1,1'-binaphthyls¹ (II). Bases which have the 4 position unsubstituted, such as glaucine (Ic), dicentrine (Id), and possibly ocoteine³, nevertheless show plain curves (or nearly so as in the case of glaucine, where there is a plateau at about 365–370 mμ).

Recently, SHAMMA⁴ has called attention to the striking correlations⁵ between the optical rotations (D line) and the ultraviolet spectra of the aporphine alkaloids. The absolute stereochemistry of the asymmetric carbon of the latter has been shown to be as indicated in (III)⁶, where the rigid biphenyl systems is fixed in a (S) configuration and the substituents in the ring A are β (above the plane)⁴.



It would appear that the anomalous curves obtained for bulbocapnine and corydine are associated with strained biaryl systems, and that the differences of magnitude of the optical rotations (D line)⁴ and of the rotatory dispersion curves are related to the change of their dihedral angles between the planes of the two aromatic rings caused by the presence or absence of substituents at carbon 4⁷.

Zusammenfassung. Die Untersuchung der Rotationsdispersionskurven einiger Aporphin-Basen ergab anomale Dispersion für Basen, die in 4-Stellung substituiert sind, und normale Dispersion für die unsubstituierten Basen.

M. J. VERNENGO⁸

University Chemical Laboratory, Cambridge (England), April 17, 1961.

¹ K. MISLOW, M. A. W. GLASS, R. E. O'BRIEN, P. RUTKIN, D. H. STEINBERG, and C. DJERASSI, J. Amer. chem. Soc. **82**, 4740 (1960).

² K. MISLOW and C. DJERASSI, J. Amer. chem. Soc. **82**, 5247 (1960).

³ Unpublished results.

⁴ M. SHAMMA, Exp. **16**, 484 (1960).

⁵ A. GIRARDET, J. chem. Soc. **1931**, 2630.

⁶ H. CORRODI and E. HARDEGGER, Helv. chim. Acta **39**, 889 (1956).

⁷ The author is indebted to Prof. W. KLYNE and Dr. J. HARLEY-MASON for their comments.

⁸ Present address: Laboratorio de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires (Argentina).