

## Über den Metabolismus eines cytostatisch wirksamen Methylhydrazin-Derivates (Natulan)

Über das cytostatisch wirksame Methylhydrazin-Derivat Ro 4-6467<sup>1</sup> (Natulan) liegen bereits eine Reihe von Mitteilungen chemischer<sup>2,3</sup>, tierexperimenteller<sup>4-6</sup> und klinischer Richtung<sup>7,8</sup> vor. Nachstehend folgt eine kurze Mitteilung über den Metabolismus des Präparates. Eine ausführliche Arbeit einschliesslich der detaillierten Beschreibung der angewandten Methoden wird an anderer Stelle erscheinen<sup>9</sup>.

**Methodik.** Natulan im Blutplasma: Nach Abzentrifugierung der Erythrocyten wird das Oxalatplasma nach AWAPARA deproteinisiert<sup>10</sup>. Das Natulan geht hierbei in die Chloroformphase über. Mit verdünnter Salzsäure wird Natulan selektiv extrahiert und nach Neutralisierung der Säure mit Ferrizyanid oxydiert. Das gebildete Ferrozyanid wird dann in Berliner Blau übergeführt und photometriert.

<sup>14</sup>C-Azoderivat im Blutplasma: Da die nach AWAPARA erhaltene organische Phase neben Natulan im wesentlichen nur sein Azoderivat enthält, ist bei Anwendung von <sup>14</sup>C-markiertem Material die Radioaktivität der organischen Phase nach Abtrennung des Natulan ein Mass für den Azokörpergehalt des Blutes.

<sup>14</sup>C-Terephthalsäurederivat im Blutplasma: Aus der Dünnschichtchromatographie ergibt sich, dass das wässrige Deproteinat nach AWAPARA als praktisch einzigen Natulanmetaboliten Terephthalsäureisopropylamid enthält. Die Radioaktivität des Deproteinates ist daher ein Mass für den Gehalt dieses Metaboliten im Blut.

**Ergebnisse.** Die Figur zeigt den Verlauf des Blutspiegels von Natulan nach der i.v. Injektion von 250 mg bei fünf Patienten. Die Halbwertszeit  $t_{0,5}$  des Konzentrationsabfalls von durchschnittlich 7 min ist bemerkenswert kurz. Analoge Versuche beim Hund bzw. bei der Ratte ergeben eine  $t_{0,5}$  von 12 bzw. 24 min. Die Umsetzung des Präparates erfolgt also auch bei diesen Tierspecies rasch.

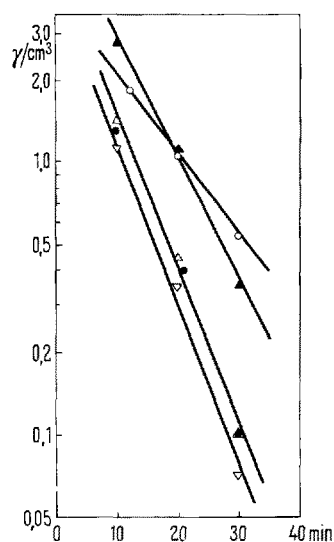
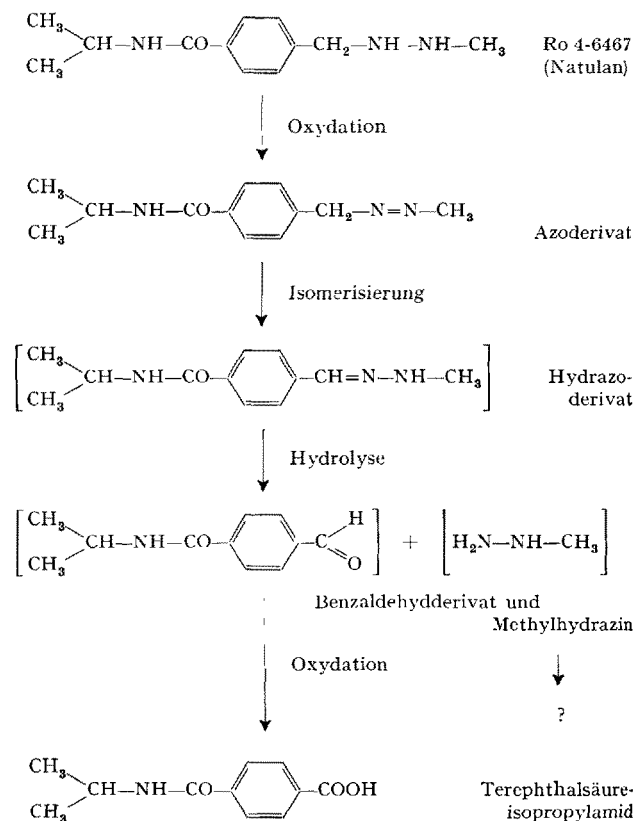
Durch Verwendung von markiertem Natulan (<sup>14</sup>C-Carbamoyl) kann gezeigt werden, dass synchron mit dem raschen Abfall von Natulan im Blut ein Konzentrationsanstieg des Azoderivates erfolgt. Wie bei der autoxyda-

tiven Zersetzung von Natulan in Phosphatpufferlösung<sup>3</sup> kommt es also auch in vivo zunächst zu einer Oxydation. Das Azoderivat wird dann weiter metabolisiert, wobei schliesslich Terephthalsäureisopropylamid entsteht. Dieses ist schon 10 min nach der i.v. Injektion von Natulan im Blutplasma nachweisbar und wird als ionisierte Verbindung in der Folge durch die Nieren eliminiert.

Im Harn findet sich als wichtigstes Endprodukt des Natulanabbaus das erwähnte Terephthalsäurederivat, wie unabhängig von uns auch OLIVERIO und KELLY gefunden haben<sup>6</sup>. In eigenen Versuchen am Menschen sind nach der i.v. Injektion von 25 mg <sup>14</sup>C-Natulan im 24-h-Harn 42% der Gesamtdosis als Terephthalsäurederivat ausgeschieden worden. Ähnliche Werte haben Versuche beim Hund und bei der Ratte ergeben. Das unveränderte Pharmakon konnte im Harn nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann der Metabolismus von Natulan gemäss Schema formuliert werden. Dabei ist festzuhalten, dass verschiedene Intermediärmetabolite (Hydrazoderivat, Methylhydrazin, Benzaldehydderivat) lediglich hypothetischer Natur sind bzw. im Blutplasma bisher nicht

### Metabolismus von Natulan im tierischen Organismus



Natulankonzentration im Blutplasma bei 5 Patienten nach i.v. Injektion von je 250 mg Natulan zur Zeit 0. Semilogarithmische Darstellung.

<sup>1</sup> Ro 4-6467 = 1-Methyl-2-*p*-(isopropyl-carbamoyl)-benzyl-hydrazin-hydrochlorid.

<sup>2</sup> P. ZELLER et al., Exper. 19, 129 (1963).

<sup>3</sup> K. BERNEIS et al., Helv. chim. Acta 46, 2157 (1964).

<sup>4</sup> W. BOLLAG und E. GRUNBERG, Exper. 19, 130 (1963).

<sup>5</sup> A. RUTISHAUSER und W. BOLLAG, Exper. 19, 131 (1963).

<sup>6</sup> V. T. OLIVERIO und M. G. KELLY, Symposium on Chemotherapy of Cancer, Lugano, 29.4.-1.5.64 (Elsevier, Amsterdam 1964).

<sup>7</sup> A. D'ALESSANDRI et al., Schweiz. med. Wschr. 93, 1018 (1963).

<sup>8</sup> G. MATHÉ et al., Presse méd. 72, 1641 (1964).

<sup>9</sup> In Vorbereitung.

<sup>10</sup> J. AWAPARA, Arch. Biochem. 19, 172 (1948).

nachgewiesen werden konnten. Möglicherweise treten diese Metabolite nur intrazellulär auf und werden dann rasch weiter metabolisiert.

**Diskussion.** Auffallend ist die sehr kurze Halbwertszeit der Elimination aus dem Blutplasma, die auf den raschen Oxydationsprozess zurückzuführen ist. Hierbei spielen zweifellos vorläufig nicht näher definierbare Organfermente eine Rolle, denn bei Inkubation von Natulan in defibriertem Blut ist lediglich eine langsame, über Stunden protrahierte Autoxydation zu registrieren. Die rasche Oxydation bzw. Umwandlung der Hydrazingruppe in eine Azogruppe könnte der Grund sein, warum die N-Acetylierung, die in der Regel bei der Entgiftung von aromatischen Aminen (Sulfonamide) und aromatischen Hydraziden (Isoniazid) im Vordergrund steht, beim Natulan von sekundärer Bedeutung ist.

Als wahrscheinlich darf angenommen werden, dass bei der Oxydation der Hydrazingruppe in vivo ähnlich wie bei der Autoxydation in vitro HO-Radikale gebildet werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen

liefern demnach neue Hinweise für die Richtigkeit der aus der spezifischen Reaktionsfähigkeit der Verbindung in vitro abgeleiteten Auffassung über ihre Wirkungsweise als Cytostaticum<sup>1</sup>.

**Summary.** The metabolism of the tumour-inhibiting methylhydrazine-derivative Natulan proceeds according to a similar pattern in man, dog and rat. Initially, a very rapid oxidation of the hydrazine-group with the formation of an azo-compound takes place, then splitting of the molecule and further oxidative degradation occurs. The major portion of the drug is excreted in urine as N-isopropyl-terephthalamic acid. Some implications of the results for elucidating the mechanism of the antitumour activity of the drug are pointed out.

J. RAAFLAUB und D. E. SCHWARTZ

*Abteilung für experimentelle Medizin der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel (Schweiz), 26. Oktober 1964.*

### Succinic-Dehydrogenase Activity in the Neuromuscular Spindles of the Chick

During our studies on the location of the succinic-dehydrogenase in the muscle of the chick<sup>1</sup>, we observed elements with intense reaction for this enzyme which are interpreted according to their morphological characteristics as neuromuscular spindles. Such elements are mostly found in the muscle erector spinae and tibialis anterior. Sections of the fresh material were cut on the freezing microtome. The medium for incubation was the following: 10 mg of nitro BT dissolved in 10 ml of distilled water, 5 ml of 0.2M sodium succinate and 5 ml of 0.2M pH 7.7 phosphate buffer. Incubation time was 10–15 min at 37°C, followed by fixation in 10% formalin. The

sections were mounted in Apathy's syrup or in glycerine jelly.

In the longitudinal sections of the intrafusal fibres, we observed three zones with different kinds of reactions: (a) with thin grains disposed in longitudinal rows all along the breadth of the fibre (see Figure 1A); (b) with clusters leaving spaces among them which are probably occupied by nucleus (see Figure 1B); (c) with a very positive reaction all along the breadth of the fibre without staining the nuclei disposed in several rows (see Figure 3). Three kinds of reactions are observed in the transversal section: (a) little grains disposed all along the breadth

<sup>1</sup> N. I. GERMINO, H. D'ALBORA, and J. P. WAHRMANN, in press.

The Figures correspond to sections of skeletal muscle of chick, with the technique to show the activity of the succinic-dehydrogenase.

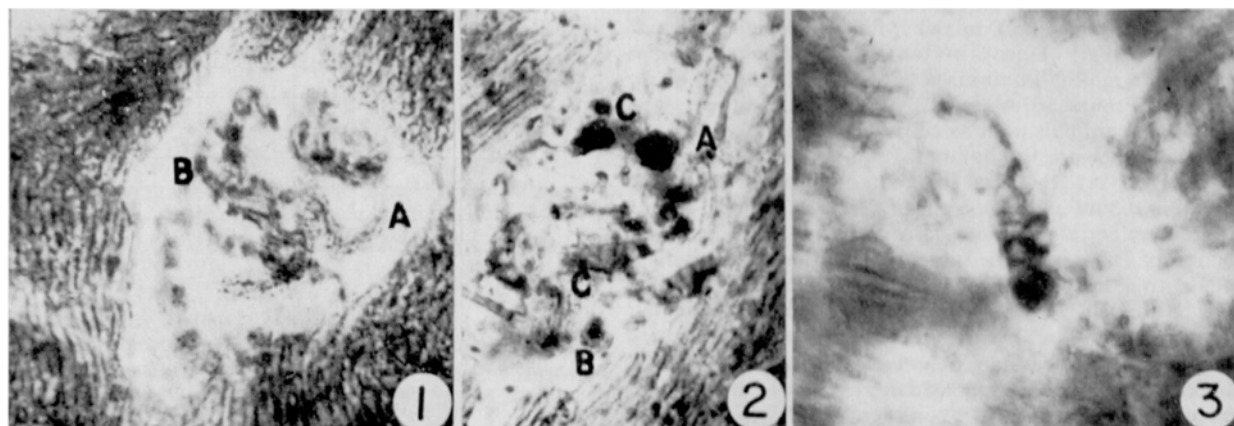


Fig. 1. Longitudinal sections of several intrafusal fibres: A - with granular reactions in rows; B - with thick clusters leaving limpid spaces among them, which are probably occupied by nucleus.

Fig. 2. Complex muscle spindle: A - a fibre with grains disposed in

rows; B - transversal section fibre with only one central cluster; C - transversal and longitudinal section of zones with 'nuclear bags'.

Fig. 3. A zone of 'nuclear bags' with an intense internuclear reaction.