

6β -OH-F gave an Rf of 0.69. No fluorescence was observed in the region of the 20β -hydroxy 6β -OH-F marker.

Incubation with cortisone. Two UV absorbing spots with Rf values of 0.18 and 0.48 were observed. Only one soda-fluorescing spot was seen with an Rf value (0.88) comparable to 6β -OH-E when run in a similar solvent system at 30°C.

Control. Only two UV absorbing spots with Rf values of 0.18 and 0.48. No soda-fluorescence at all was observed.

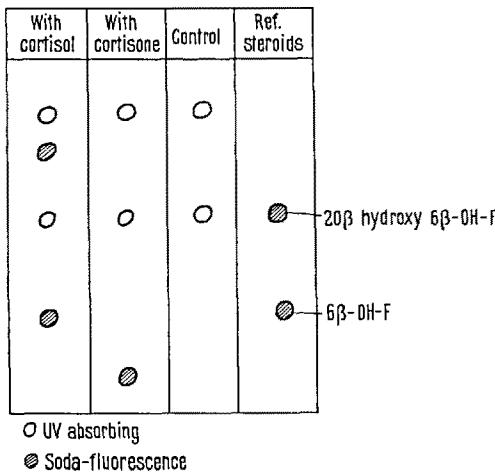


Fig. 2. Chromatography of the products after incubation of placental tissue with cortisol and cortisone.

Conclusions. On the basis of chromatographic mobility, this present work suggests that the human placenta possesses the necessary enzymes for the conversion of cortisol to a Δ^4 -3-ketosteroid with a glycerol side chain more polar than the 20β -hydroxy derivative of 6β -OH-F and the 20α -hydroxy derivative of 6β -OH-F. This compound has the same chromatographic mobility as Compound 4(b) which was previously isolated from pregnancy urine. Since no soda-fluorescing material was observed on chromatograms in the region of either 20α -hydroxy 6β -OH-F or 20β -hydroxy 6β -OH-F after the incubation of cortisol with placental tissue, it would appear that the placenta is contributing to the production of the unidentified polar steroid Compound 4(b) but that the 20β -hydroxy derivatives of 6β -OH-F are being produced at some other site and transported to the placenta. This latter suggestion is supported by the fact that soda-fluorescing material with the chromatographic mobility of 20α -hydroxy 6β -OH-F was only observed in extracts from large amounts of placental tissue.

Zusammenfassung. Es wird nachgewiesen, dass die menschliche Plazenta enzymatisch Cortisol in ein Δ^4 -3-Ketosteroid mit Glycerol-Seitenkette, welches mehr polar ist als die 20α - und 20β -Derivate des 6β -OH-Cortisol, umwandeln kann. Es scheint, dass die Plazenta dieses Steroid das aus dem Urin schwangerer Frauen isoliert wurde, selbst bildet.

R. DIXON and G. W. PENNINGTON

Department of Pharmacology, Trinity College, Dublin (Ireland) and Sheffield and Region Endocrine Investigation Centre, Jessop Hospital for Women, Sheffield (England), December 11, 1964.

Coplanare Hetero-oligobasen (Phthalanilide), hochaktive Cytostatica¹

Ausgehend von theoretischen Vorstellungen über Teilprozesse des aktiven Transports von Ionen durch die Zellmembran unter Beteiligung von Lecithin haben HIRT et al. im Forschungsinstitut Dr. WANDER AG in Bern etwa 900 Stoffe einer Substanzklasse synthetisiert, in der Hoffnung, dass diese Verbindungen, als polyvalente Basen, mit Phosphatiden komplexieren, sich somit als potentielle Hemmsubstanzen des Ionentransports durch die Phosphatidsacetaten der Zellmembran und damit letzten Endes als Cytostatica eines neuartigen Wirkungstypus erweisen möchten². Bei der routinemässig erfolgenden Testung im primären Screeningvorgang des Cancer Chemotherapy National Service Center (CCNSC) in Bethesda (USA), erwiesen sich viele Substanzen dieser Gruppe als hochaktiv gegen die Mäuseleukämie L 1210 und einige ihrer Varianten³, ferner gegen einige in der Ascitesform, aber nicht in der soliden Form wachsende Tumoren. Da eine grössere Anzahl dieser Stoffe auch gegen *Mycobacterium tuberculosis* *in vitro* cytostatisch wirksam ist, erschien die Erforschung des molekularen Wirkungsmechanismus der einzelnen Vertreter dieser Stoffklasse notwendig.

In der bis jetzt vorliegenden amerikanischen Literatur wurde diese Stoffklasse mit dem Oberbegriff «Phthalanilide» belegt. Die repräsentativen Grundtypen weisen ein lateral-symmetrisches Molekelsystem auf, in dem mindestens zwei stark basische Gruppen durch mehrere aromatische Ringe und durch Carbonamidgruppen verbunden sind, derart, dass die Molekel durchgehend planar ist. Die lateralen Adnexe können an dem Mittelring *para*- oder *metaständig* gebunden sein, auch kann dieser noch andere Substituenten tragen. Die nächstfolgenden aromatischen Ringe können vom Mittelring durch Carbonamid-, Ureid- oder noch längere Heterogruppen getrennt sein, und schliesslich besteht auch eine grosse Variationsmöglichkeit in der Ausbildung der basischen, endständigen Gruppierungen, ob offene Anordnungen oder 5- bzw. 6-Ringe

¹ Ausgeführt mit Unterstützung durch den Krebsforschungsfonds des Kultusministeriums Nordrhein-Westfalen.

² R. HIRT und R. BERCHTOLD, Med. exp. 2, 269 (1960); Exper. 17, 418 (1961).

³ S. A. SCHEPARTZ, I. WODINSKY und J. LEITER, Cancer Chemother. Rep. 19, 1 (1962). – J. M. VENDITTI, A. GOLDIN und I. KLINE, Cancer Chemother. Rep. 19, 5 (1962). – L. W. LAW, Cancer Chemother. Rep. 19, 13 (1962). – J. H. BURCHENAL, M. S. LYMAN, J. R. PURPLE et al., Cancer Chemother. Rep. 19, 19 (1962). – R. F. PITILLO, L. L. BENNETT JR., W. A. SHORT et al., Cancer Chemother. Rep. 19, 41 (1962). – W. I. ROGERS, I. M. YORK und C. J. KENSLER, Cancer Chemother. Rep. 19, 67 (1962).

mit oder ohne weitere Substituenten. Da die wenigsten Verbindungen der «Phthalanilide» sich von der Phthalsäure, die meisten sich aber von der Isophthalsäure oder der Terephthalsäure ableiten, und auch die «Anilid»-Anordnung nicht immer gegeben ist, kann die seither gebrauchte Gruppenbezeichnung nur historisch, aber nicht systematisch begründet werden. Es ist schwer, einen die ganze Vielfalt dieser Stoffklasse umgreifenden Oberbegriff zu finden. So bevorzugen wir zurzeit noch den Terminus «coplanare Hetero-oligobasen».

Von den 900 Verbindungen haben wir bis jetzt etwa 50 Substanzen bakteriometrisch, biochemisch und physiko-chemisch näher untersucht. Als repräsentativ seien hier nur die folgenden Substanzen aufgeführt:

Zu den *bakteriometrischen Analysen* erwiesen sich *L. casei* und *S. faecalis* am geeignetsten. Die nach dem üblichen Vorgehen der Wuchshemmungsanalyse⁴ - vgl. hierzu Figur 1a - erhaltenen HD_{50} -Werte (Hemmungsdosis für 50%ige Wuchshemmung) für die oben aufgeführten Substanzen enthält die Tabelle.

HD_{50} -Werte einiger coplanarer Hetero-oligobasen bei *L. casei* (ATCC 7469; Difco Bacto Riboflavin Assay Medium + 0,03 γ Riboflavin/ml; 18 h bei 37°C; Trübungsmessung mit dem Photometer Eppendorf bei 578 m μ ; Mittelwerte aus je 3 Einzelbestimmungen)

Substanz	$HD_{50} \cdot 10^{-5} M$
(I)	0,095
(II)	0,66
(III)	2,3
(IV)	3
(V)	8,5
(VI)	~ 400
(VII)	unwirksam

Zwischen diesen erheblich differierenden, die cytotatische Wirkung charakterisierenden Größen, liegen alle Zahlen für die bis jetzt geprüften weiteren 45 Hetero-oligobasen. Auf Beziehungen zwischen Konstitution und biologischer Wirkung, zu deren Erkenntnis diese Substanzklasse ausgezeichnete Beispiele abgibt, wird später ausführlicher eingegangen, wenn das Experimentalmaterial noch weiter angewachsen ist.

Der *molekulare Wirkungsmechanismus* der coplanaren Hetero-oligobasen besteht in einer Komplexbildung mit Desoxyribonucleinsäure (DNA) und Ribonucleinsäure (RNA)⁵. Wir legen hierfür drei Beweise vor:

(1) *Bakteriometrische Wuchshemmungsanalyse*. In Figur 1b sind die zwischen der 8. und 16. Inkubationsstunde gemessenen Wuchskurven von *S. faecalis* ohne Zusatz von Hetero-oligobase, und ohne oder aber mit Zusatz von 25 bis 100 γ DNA/ml wiedergegeben. DNA-Zusatz allein beschleunigt also den Bakterienwuchs nur schwach. Zugabe von $7,5 \times 10^{-5} M$ (II) (= 42,6 γ /ml) hemmt den Bakterienwuchs vollständig, siehe Figur 1c. Gleichzeitige Zugabe von 25 bis 100 γ DNA/ml hebt diese Wuchshemmung nicht nur zunehmend wieder auf, sondern fördert das Wachstum sogar über das Ausmass des Kontrollansatzes hinaus. Wir haben für dieses Phänomen der Wuchsförderung durch den Hetero-oligobase-DNA-Komplex

⁴ H. M. RAUEN, G. HESS und J. MECHERY, Hoppe Seyler's Z. 315, 46 (1959). - W. KERSTEN, H. KERSTEN und H. M. RAUEN, Nature 187, 60 (1960). - H. M. RAUEN und R. NONHOFF, Arzneim.-Forsch. 13, 558 (1963). - H. M. RAUEN, Arzneim.-Forsch. 13, 1081 (1963); 14, 111 (1964).

⁵ P. S. THAYER und H. L. GORDON, Cancer Chemother. Rep. 19, 55 (1962). - M. J. PINE, E. HARZEWSKI und F. C. WISSLER, Cancer Res. 23, 932 (1963). - A. SIVAK, W. I. ROGERS und C. J. KENSLER, Biochem. Pharm. 12, 1056 (1963).

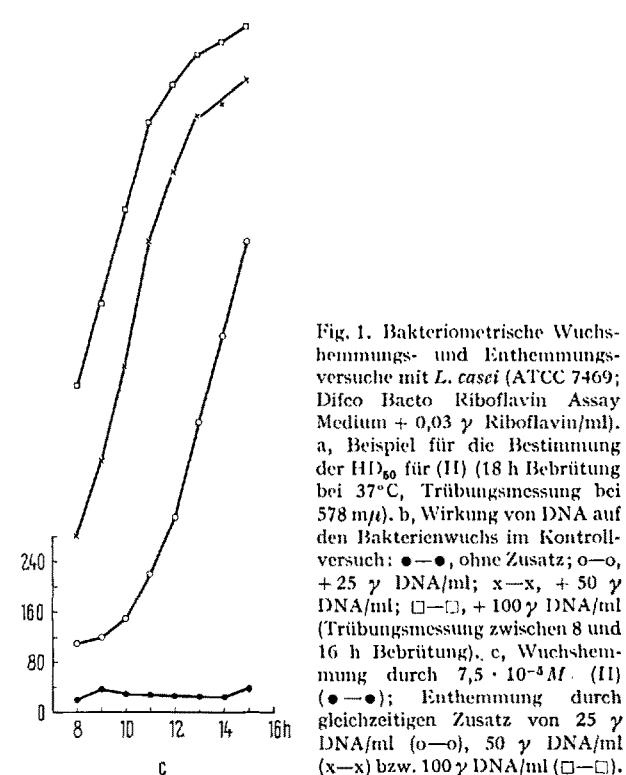
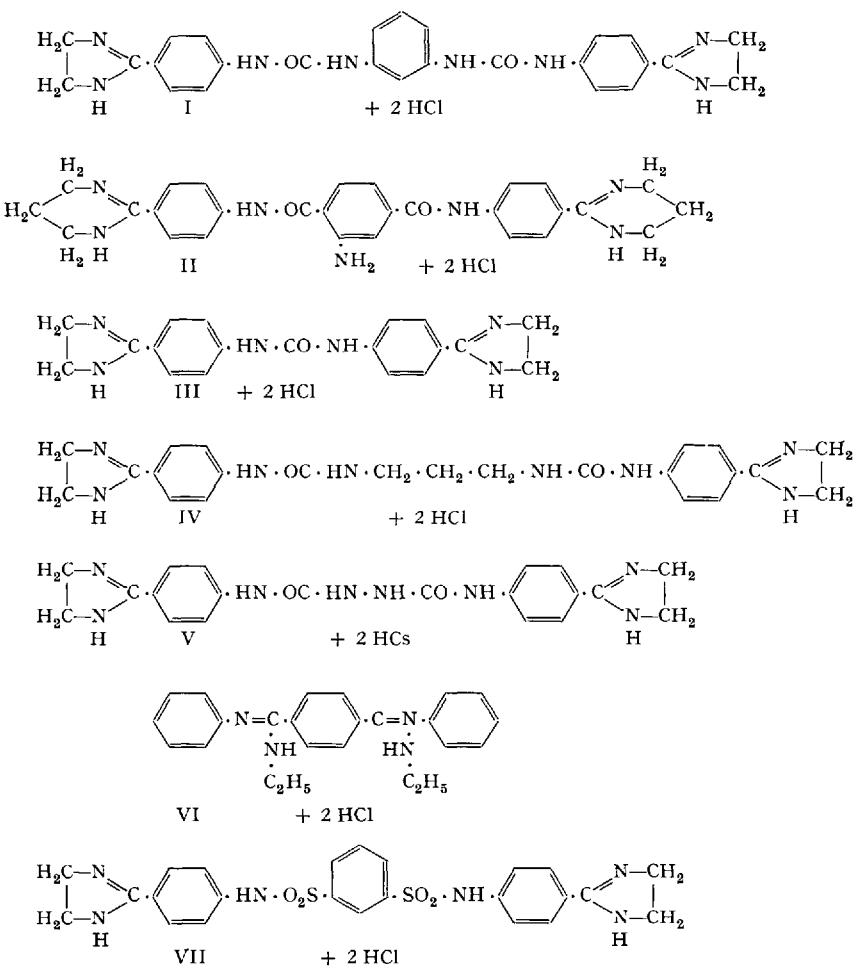


Fig. 1. Bakteriometrische Wuchshemmungs- und Enthemmungsversuche mit *L. casei* (ATCC 7469; Difco Bacto Riboflavin Assay Medium + 0,03 γ Riboflavin/ml). a, Beispiel für die Bestimmung der HD_{50} für (II) (18 h Bebrütung bei 37°C, Trübungsmessung bei 578 m μ). b, Wirkung von DNA auf den Bakterienwuchs im Kontrollversuch: ●—●, ohne Zusatz; ○—○, + 25 γ DNA/ml; x—x, + 50 γ DNA/ml; □—□, + 100 γ DNA/ml (Trübungsmessung zwischen 8 und 16 h Bebrütung). c, Wuchshemmung durch $7,5 \times 10^{-5} M$ (II) (●—●); Enthemmung durch gleichzeitigen Zusatz von 25 γ DNA/ml (○—○), 50 γ DNA/ml (x—x) bzw. 100 γ DNA/ml (□—□).

vorerst noch keine Erklärung. Ausser mit *S. faecalis* lässt es sich auch mit *L. casei* demonstrieren. Die Wuchs-hemmung von *S. faecalis* durch (II) wird auch von RNA aufgehoben, doch zeigt sich hierbei nicht die zusätzliche Wuchssteigerung wie mit der DNA. Die bakteriostatische Wirkung von (I), der wirksamsten der hier aufgeführten Verbindungen, kann nur durch DNA, aber nicht durch RNA, revertiert werden. Anstelle von DNA oder RNA verwendet Pyrimidin- oder Purinbasen, deren Desoxyribonucleotide oder -nucleoside bzw. Ribonucleotide oder -nucleoside, vermochten die Wuchs-hemmung von (II) nicht, auch nicht partiell, wieder aufzuheben.

Konzentration ab, und andere zeigen schon einen anderen Grundtyp von der niedrigsten der geprüften Konzentrationen an. Fast alle Kurvenverläufe der durch den Hetero-oligobase-Anteil des Komplexes bedingten Differenzspektrum-Teilkurven sind mathematisch fassbar. Nach dem Einsetzen von zwei Faktoren, die sich aus der bathochromen und der hypochromen Verschiebung ergeben, in die zugehörige Gleichung, erhält man sich mit den gemessenen Kurventeilen deckende berechnete Kurven. Zwischen den die Horizontal- und Vertikalverschiebungen charakterisierenden Faktoren, z.B. für die in der Tabelle aufgeführten Hetero-oligobasen und den diesen



(2) *Differenzspektren mit DNA.* Die Absorptionsmaxima der coplanaren Hetero-oligobasen liegen im Bereich von $32 \cdot 10^3$ bis $37 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}$, das Absorptionsmaximum der DNA liegt bei $38,5 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}$. Im UV-Bereich beobachtet man als Ausdruck der Komplexierung von DNA mit den komplexophilen Hetero-oligobasen die Ausbildung charakteristischer Differenzspektren (Figur 2). Die Maxima beider Liganden sind nach dem Langwelligen verschoben (Bathochromie) und die Extinktionen bei den Absorptionsmaxima sind vermindert (Hypochromie). Eine Reihe der bis jetzt untersuchten Verbindungen ergibt Differenzspektren eines ähnlichen Typs. Bei einigen dieser Verbindungen ändert sich der Grundtyp mit steigenden Konzentrationen der Hetero-oligobasen von einer bestimmten

Substanzen zugehörigen biologischen Wirkungen (HD_{50} -Werte), ergeben sich keine direkten Beziehungen. Die Ausbildung eines Differenzspektrums ist ein qualitativer Hinweis darauf, dass eine cytostatische Wirkung zu erwarten ist. Es kann aber nicht abgelesen werden, wie stark diese sein muss.

(3) *Methylgrün-DNA-Desorption nach Kurnick.* Eine Reihe von basischen Farbstoffen bilden mit DNA Chromophor-Makromolekül-Komplexe. Unter diesen sind solche mit Methylgrün^{6,7} und Acridinorange⁸⁻¹⁰ eingehender untersucht worden. Wir selbst haben einen Actinomycin C-DNA-Komplex nachgewiesen¹¹. Der Methylgrün-DNA-Komplex eignet sich gut zu Bestimmungen der relativen Affinitäten von Prüfsubstanzen, die den

Chromophor von der DNA zu desorbieren vermögen^{12,13}. Die Desorption drückt sich in einer Extinktionsabnahme bei $15,6 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}$ aus. Figur 3 zeigt eine vollständige Desorptionskurve mit (II). Die Kurven mit vier anderen Hetero-oligobasen wurden nur soweit eingezeichnet, als sie für das Messergebnis notwendig sind. Um dieses zu erhalten, wird eine Horizontale bei 0,75 der Extinktion der Methylgrün-DNA-Stammlösung gezogen. Die Schnittpunkte dieser Horizontalen mit den Desorptionskurven ergeben dann diejenigen Konzentrationen an Hetero-oligobasen, die den gleichen Effekt gegenüber dem Methylgrün-DNA-Komplex ausüben, d.h. soviel Chromophor verdrängen, dass die Extinktion auf 0,75 abnimmt. Beruht der cytostatische Effekt der Hetero-oligobasen ausschliesslich oder überwiegend auf der Komplexierung mit der DNA, dann sollte eine direkte Beziehung zwischen den HD_{50} -Werten (Tabelle) und den relativen Affinitäten gegenüber dem Methylgrün-DNA-Komplex bestehen. Dies ist auch tatsächlich der Fall. Figur 4 zeigt, dass diese Beziehung linear verläuft.

Diskussion. Ebenso wie das planare Acridin dürften sich auch die coplanaren Hetero-oligobasen auf die planaren Purin- und Pyrimidinbasen der DNA vorwiegend durch Betätigung von Wasserstoffbindungen orientieren. Ob die letzteren, wie das erstere, mehr perpendikular als tangential zur Helixachse zu liegen kommen¹⁰, ist noch nicht zu bestimmen, doch können die Mechanismen beider Komplexbildungen wohl am besten durch das Intercalationsmodell von LERMAN¹⁰ wiedergegeben werden. Der

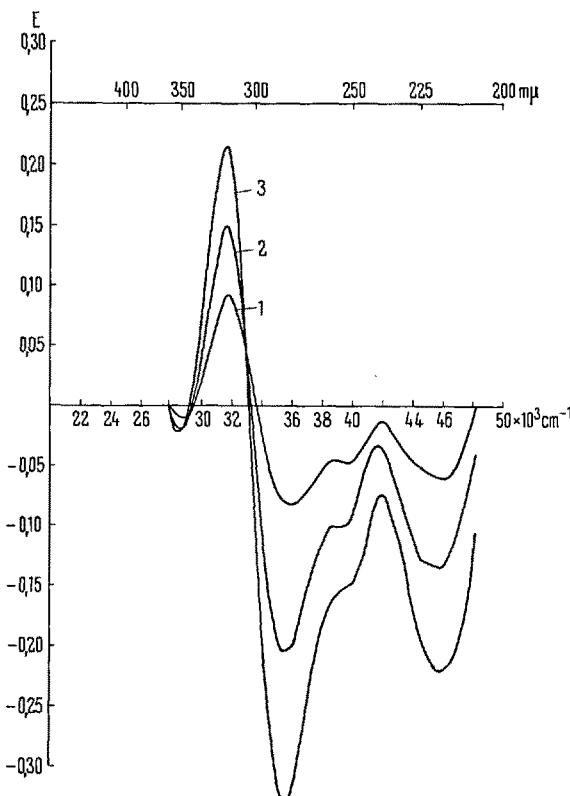


Fig. 2. Differenzspektrum von DNA mit (II). 1, $20 \text{ } \mu \text{DNA/ml} + 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (II); 2, $20 \text{ } \mu \text{DNA/ml} + 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (II); 3, $20 \text{ } \mu \text{DNA/ml} + 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (II). Beckman DK1, selbstregistrierendes Spektralphotometer. Alle Lösungen in TRIS-Puffer, $0,02 \text{ M}$, pH 7,4; DNA-Na-Salz, hochmolekular, 13,87% N; 8,16% P; 0,2% Cl; N/P 1,70; $E_{260}^{1\%} = 201$ (pH 12); $\epsilon(P) = 7600$.

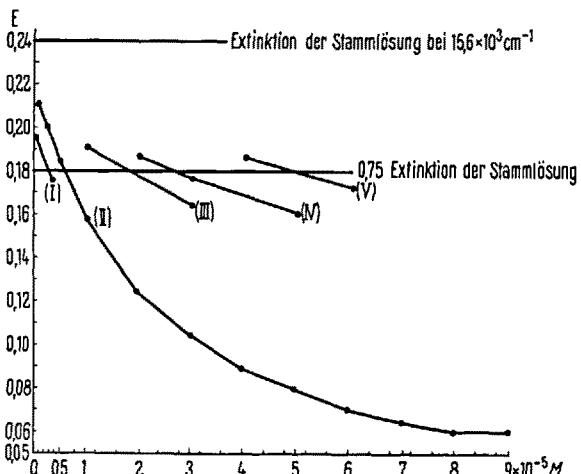


Fig. 3. Verlauf der Desorption des Methylgrün-DNA-Komplexes durch coplanare Hetero-oligobasen und Bestimmung der Bezugsgrössen bei 0,75 der Extinktion der Stammlösung (siehe Text). DNA-Na-Salz, hochmolekular, 13,87% N; 8,16% P; 0,2% Cl; N/P 1,70; $E_{260}^{1\%} = 201$ (pH 12); $\epsilon(P) = 7600$.

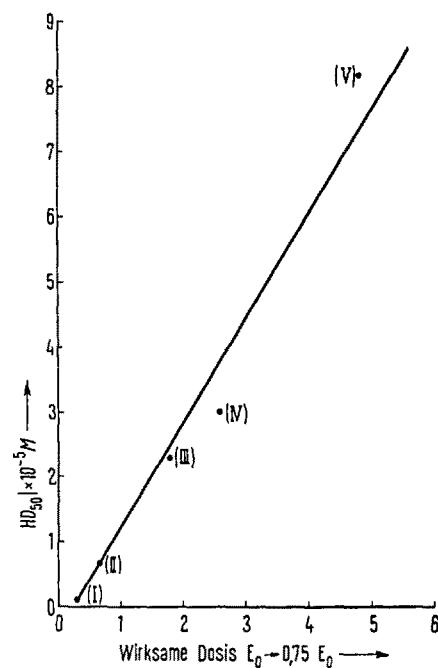


Fig. 4. Beziehung zwischen den bakteriometrischen HD_{50} -Werten (Tabelle) und den aus den Desorptionskurven nach Figur 3 bestimmten Bezugsgrössen.

- ⁶ N. B. KURNICK und M. W. FOSTER, J. gen. Physiol. 34, 147 (1950).
- ⁷ T. KUROZUMI, K. KURIHARA, Y. HADIMORI und K. SHIBATA, J. Biochem. (Tokio) 53, 135 (1963); Chem. Abstr. 59, (12) 4221 h.
- ⁸ R. F. STEINER und R. F. BEERS, IV, Int. Kongr. Biochem., Wien 3/38 (1958).
- ⁹ G. WEILL und M. CALVIN, Biopolymers 1, 401 (1963).
- ¹⁰ L. S. LERMAN, J. mol. Biol. 3, 18 (1961); Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 49, 94 (1963).
- ¹¹ H. M. RAUEN, H. KERSTEN und W. KERSTEN, Hoppe-Seyler's Z. 327, 139 (1960).
- ¹² N. B. KURNICK, Arch. Biochem. 29, 41 (1950).
- ¹³ N. B. KURNICK und I. E. RADCLIFFE, J. lab. clin. Med. 60, 669 (1962).

Intercalationskomplex Hetero-oligobase-DNA gibt sich durch Bathochromie und Hypochromie zu erkennen. Andere Größen, wie sie zum Studium der Bindungsverhältnisse beim Acridinorange-DNA-Komplex bestimmt wurden (Fluoreszenzspektren, Quantenausbeute, Fluoreszenz-polarisation), haben wir noch nicht gemessen. Sie sind jedoch zugänglich, da einige Hetero-oligobasen auch fluorescieren. «Sperrige» Moleküle, d.h. solche, deren Molekeldimensionen und Konformationen bindungsfähiger Gruppen eine Einschiebung in die planaren Basen-anordnungen der DNA nicht zulassen, ergeben auch keine Differenzspektren. Die letzteren erlauben also nur eine Entscheidung über Komplexierungsbefähigung der Hetero-oligobasen mit der DNA im Sinn von Alles-oder-Nichts. Aber nicht alle Substanzen, die ein Differenzspektrum ergeben, sind bakteriostatisch wirksam, umgekehrt ergeben aber alle Hetero-oligobasen, die bakteriostatisch wirksam sind, ein Differenzspektrum. Die Bakteriometrie erlaubt indirekt Aussagen über die Komplexierungsbefähigung der Hetero-oligobasen mit DNA. Das Desorptionsverfahren mit dem Methylgrün-DNA-Komplex lässt eine analoge indirekte Aussage zu. Erstaunlich ist die lineare Beziehung der mit beiden Verfahren gemessenen Größen. HD_{50} -Werte liegen bis jetzt für 50 Hetero-oligobasen vor, Desorptionswerte aber erst für die fünf in Figuren 3–4 wiedergegebenen Stoffe. Interessant scheinen uns aber nicht nur Verbindungen zu sein, die sich in diese Beziehung einordnen lassen, sondern auch solche, die im cytostatischen und physikochemischen

Verhalten davon abweichen. Die coplanaren Hetero-oligobasen besitzen somit erhebliches biologisches Interesse für das eingehendere Studium des molekularen Verhaltens der DNA gegenüber Fremdstoffen als auch praktische Bedeutung für die systematische Entwicklung einer gezielten Cytostase. Hier ist in erster Linie an eine Carcinostase zu denken¹⁴.

Summary. Coplanar hetero-oligobases (phthalanilides), highly effective cytostatica.

Bacteriometrical and physico-chemical tests on coplanar hetero-oligobases have shown the formation of a complex with DNA to be the cause of the cytostatic effect. For several of these compounds an evident correlation is demonstrated between bacteriostatic efficiency and reaction with DNA.

H. M. RAUEN, K. NORPOTH,
W. UNTERBERG und H. HAAR

*Physiologisch-Chemisches Institut der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster (Westfalen, Deutschland),
17. Dezember 1964.*

¹⁴ Wir danken Herrn Dr. HIRT, Forschungsinstitut Dr. A. WANDER AG, Bern, für die zu dieser Arbeit verwendeten coplanaren Hetero-oligobasen.

CONGRESSUS

Italy

Second International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism

Milano, September 13–15, 1965

The European Society for Biochemical Pharmacology, in collaboration with the University of Milano, is to organize the *Second International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism* to be held in Milano on September 13–15, 1965. The symposium will include long and short lectures by invited speakers and a limited number of free communications.

Requests for information, and titles with summaries of 200 words in English should be sent, before March 31, 1965 to: Prof. RODOLFO PAOLETTI, Scientific Secretary, Institute of Pharmacology, University of Milano, Via Andrea del Sarto 21, Milano (Italy), Tel. 719060.

Second International Course on Methods for Lipid Research

Milano, September 16–24, 1965

A NATO Advanced Study Institute on Methods for Lipid Research will be held at the University of Milano on September 16–24, 1965. The course will consist of lectures and demonstrations given by European and American specialists. English will be the official language. Participation is limited to 50 post-graduate applicants of any nationality actively interested in lipid research, to be selected on a competitive basis. A good knowledge of English is essential. A limited number of fellowships for attendance to the course is available.

Applications for attendance and the fellowships should be sent, together with a curriculum vitae and a list of publications, before March 31, 1965 to: Prof. RODOLFO PAOLETTI, Scientific Secretary, Institute of Pharmacology, University of Milano, Via Andrea del Sarto 21, Milano (Italy), Tel. 719060.