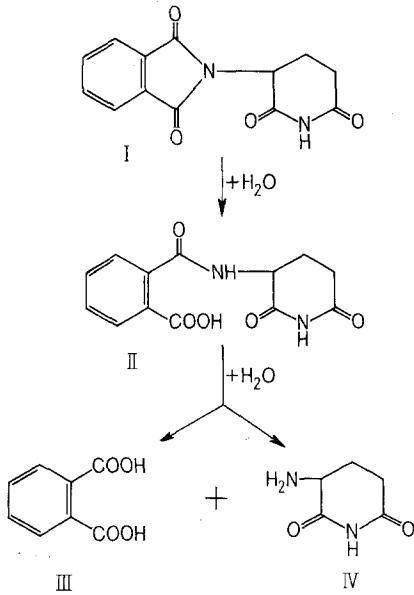


## Teratologische Prüfung der Hydrolysenprodukte des Thalidomids

Thalidomid ist in wässriger Lösung nicht stabil; schon unter physiologischen Reaktionsbedingungen entstehen die 12 theoretisch möglichen Hydrolysenprodukte<sup>1</sup>. Analog verläuft die spontane Hydrolyse im menschlichen und tierischen Organismus<sup>1-3</sup>.

Der bevorzugte Abbauweg des Thalidomid-Moleküls (I) wird durch Aufspaltung einer der identischen Phthalimid-Bindungen eingeleitet. Hierbei entsteht N-(o-Carboxybenzoyl)-DL-glutaminsäureimid (II), das zu den quantitativ dominierenden Metaboliten zählt<sup>3,4</sup>. II kann weiter zu Phthalsäure (III) und DL-Glutaminsäureimid (IV) zerfallen.



Zur Klärung der Frage, inwieweit der intakte Glutaramid-Ring zur teratogenen Aktivität des Thalidomids beiträgt, sollen in vorliegender Mitteilung II und IV unter gleichartigen Versuchsbedingungen wie die anderen Hydrolysenprodukte<sup>5-9</sup> teratologisch getestet werden.

**Material und Methode.** I wurde aus N-Phthalyl-DL-glutaminsäureanhydrid<sup>10</sup> analog 1. c.<sup>11</sup> dargestellt: Smp. 276–278° (Dimethylformamid/Wasser<sup>12</sup>). II liess sich durch alkalische Partialhydrolyse von I gewinnen<sup>13</sup>. Farblose Kristallchen, die nach Erweichen bei 200° und Wiedererstarren um 210° bei 276–278° schmelzen. C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (276,3): Ber. C 56,53, H 4,38, N 10,14%; Gef. C 56,37, H 4,69, N 10,17%. Hydrazinolyse von I

ergab IV in Form des Hydrochlorides<sup>14</sup>. Farblose Kristalle aus Wasser/n-Propanol, die zwischen 250 und 290° unter Violettfärbung schmelzen (vgl. Lit.<sup>15</sup>). C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> · HCl (164,6): Ber. C 36,49, H 5,51, N 17,02, Cl 21,54%; Gef. C 36,63, H 5,54, N 17,19, Cl 21,64%.

Die teratologische Prüfung wurde an Mäusen des Swiss-Inzuchtstammes SWS 53/65 vorgenommen. Experimentelle Einzelheiten über Tierhaltung, künstliche Besamung, Schnittentbindung und Inspektion der Würfe auf Missbildungen finden sich unter l. c.<sup>5</sup>.

Alle Verabreichungen erfolgten am Tag 9 p.c. als einmalige i.p. Injektion (Tabelle I). Lösungsmittel war für beide Verbindungen eine Mischung aus physiologischer Kochsalzlösung und Tween 20 im Verhältnis 3:1. Von der besonders schwer löslichen Substanz II erhielten die Tiere je 50 bzw. 100 mg/kg als 0,5%ige Lösung entsprechend einer maximalen Belastung mit 20 ml Lösungsmittel/kg; IV kam in Form des Hydrochlorides als 4%ige Lösung zur Anwendung (Dosis: je 400 bzw. 800 mg/kg). Die Lösungen wurden innerhalb einer Stunde nach der Zubereitung appliziert. Zur Kontrolle injizierte man 10 graviden Mäusen je 40 ml/kg des Lösungsmittelgemisches.

**Resultate und Diskussion.** An den am Tag 18<sup>1/2</sup> p.c. schnittentbundenen lebenden Feten liessen sich keine äußerlich sichtbaren Missbildungen feststellen. Auch die Untersuchung der Skelette ergab, dass die Substanzen

<sup>1</sup> H. SCHUMACHER, R. L. SMITH und R. T. WILLIAMS, Br. J. Pharmac. 25, 324, 338 (1965).

<sup>2</sup> J. W. FAIGLE, H. KEBERLE, W. RIESS und K. SCHMID, Experientia 18, 389 (1962).

<sup>3</sup> R. BECKMANN, Arzneimittel-Forsch. 13, 185 (1963).

<sup>4</sup> H. KEBERLE, J. W. FAIGLE, H. FRITZ, F. KNÜSEL, P. LOUSTALOT und K. SCHMID, in *Embryopathic Activity of Drugs* (J. and A. Churchill, London 1965), p. 210.

<sup>5</sup> F. KÖHLER und H. OCKENFELS, Experientia 26, 1157 (1970).

<sup>6</sup> F. KÖHLER und W. MEISE, Z. Naturforsch. 26b, 857 (1971).

<sup>7</sup> W. MEISE und F. KÖHLER, Z. Naturforsch. 26b, 1081 (1971).

<sup>8</sup> F. KÖHLER, W. MEISE und H. OCKENFELS, Experientia 27, 1149 (1971).

<sup>9</sup> W. MEISE und F. KÖHLER, Pharmazie 27, 418 (1972).

<sup>10</sup> F. E. KING und D. A. A. KIDD, J. chem. Soc. 1949, 3315.

<sup>11</sup> R. BECKMANN, Arzneimittel-Forsch. 12, 1095 (1962).

<sup>12</sup> Y. F. SHEALY, C. E. OPLIGER und J. A. MONTGOMERY, J. pharmac. Sci. 57, 757 (1968).

<sup>13</sup> M. FIEDLER und W. HEINE, Acta biol. med. german. 13, 1 (1964).

<sup>14</sup> M. C. E. CARRON und A. F. JULLIEN, Lab. Robert & Carriere, Frz. Pat. 1341603; C. A. 60, 6794h (1964).

<sup>15</sup> E. SONDEIMER und R. W. HOLLEY, J. Am. chem. Soc. 79, 3767 (1957).

Tabelle I. Teratologische Prüfung von N-(o-Carboxybenzoyl)-DL-glutaminsäureimid und DL-Glutaminsäureimid·HCl in Kombination mit Tween 20 (SWS-Maus)

Verabreichte Substanz	Dosis	Muttertiere	Implantationen I	Resorptionen		Feten			Gewicht [g] <sup>c</sup>
				R	R/I (%)	F	Gesamt	Missgebildet	
N-(o-Carboxybenzoyl)-DL-									
glutaminsäureimid <sup>a</sup>	50 mg/kg	5	62	3	4,8	59	0	1,27 ± 0,07	
	100 mg/kg	5	55	10	18,2	45	0	0,95 ± 0,05	
DL-Glutaminsäureimid	400 mg/kg	5	55	3	5,5	52	0	1,21 ± 0,07	
·HCl <sup>b</sup>	800 mg/kg	5	55	7	12,7	48	0	1,19 ± 0,09	
Physiolog. NaCl-Lösung + Tween 20	40 ml/kg	10	129	6	4,7	123	0	1,29 ± 0,07	
(Normaltiere)	—	10	134	4	3,0	130	0	1,29 ± 0,05	

<sup>a</sup> 0,5%ig bzw. <sup>b</sup> 4%ig in einer Mischung aus physiologischer Kochsalzlösung und Tween 20 (3:1). Alle Verabreichungen erfolgten am Tag 9 p.c. als einmalige i.p. Injektion. <sup>c</sup> Mittelwerte ± Standardabweichung der Gewichte aller Feten.

Tabelle II. Hydrolysenprodukte des Thalidomids: Embryotoxische und teratogene Wirkung nach i.p. Applikation in Kombination mit Tween 20 (SWS-Maus)

Verabreichte Substanz	Dosis (mg/kg)	Mutter- tiere	Implan- tationen I	Resorptionen		Feten Gesamt F	Feten Missgebildet M	Missgebildet M/F (%)
				R	R/I (%)	F	M	
N-Phthalyl-DL-glutamin <sup>a</sup>	200	5	70	10	14,3	60	10	16,7
N-Phthalyl-DL-isoglutamin <sup>a</sup>	200	5	67	29	43,3	38	4	10,5
N-Phthalyl-DL-glutaminsäure <sup>b</sup>	400	5	65	32	49,2	33	16	48,5
N-(o-Carboxybenzoyl)-DL-glutamin <sup>b</sup>	400	5	52	6	11,5	46	0	0
N-(o-Carboxybenzoyl)-DL-isoglutamin <sup>c</sup>	400	5	59	5	8,5	54	0	0
N-(o-Carboxybenzoyl)-DL-glutaminsäure <sup>c</sup>	400	5	64	5	7,8	59	0	0
DL-Glutamin <sup>d</sup>	400	5	68	7	10,3	61	0	0
DL-Isoglutamin <sup>c</sup>	400	5	64	5	7,8	59	0	0
L-Glutaminsäure <sup>c</sup>	400	5	79	5	6,3	74	0	0
D-Glutaminsäure <sup>c</sup>	400	5	73	7	9,6	66	0	0
Phthalsäure <sup>b</sup>	400	5	64	5	7,8	59	0	0
N-(o-Carboxybenzoyl)-DL-glutaminsäureimid <sup>e</sup>	100	5	55	10	18,2	45	0	0
DL-Glutaminsäureimid · HCl <sup>c</sup>	400	5	55	3	5,5	52	0	0

<sup>a</sup> 1, <sup>b</sup> 2, <sup>c</sup> 4, <sup>d</sup> 8 bzw. <sup>e</sup> 0,5%ig in einer Mischung aus physiologischer Kochsalzlösung und Tween 20 (3:1). Alle Verabreichungen erfolgten i.p. am Tag 9 p.c. als einmalige Dosis.

II und IV in der angewandten Dosierung keine teratogene Wirksamkeit besitzen.

Die Resorptionsrate steigt allerdings im Falle der Substanz II bereits nach Gabe von 100 mg/kg auf 18,2% (Vierfelder- $\chi^2$ ,  $P < 0,05$ ). Bei Substanz IV sind die Resorptionen erst nach 800 mg/kg gegenüber den Kontrolltieren auffällig erhöht ( $R/I = 12,7\%$ ;  $P > 0,05$ ). Die höhere embryotoxische Wirksamkeit von II kommt auch in der ausgeprägteren Erniedrigung der Fetengewichte zum Ausdruck.

Diese Untersuchung stellt den Abschluss einer Versuchsreihe<sup>5-9</sup> dar: Sämtliche Hydrolysenprodukte des Thalidomids wurden synthetisiert und in Kombination mit Tween 20 an der SWS-Maus teratologisch geprüft. Um einen Vergleich der Ergebnisse unter einheitlichen Bedingungen zu ermöglichen, haben wir die Experimente mit N-Phthalyl-DL-glutamin, -isoglutamin und -glutaminsäure für die Dosis 400 mg/kg ergänzt. Hierbei traten folgende Schwierigkeiten auf: Von 3 mit 400 mg/kg N-Phthalyl-DL-glutamin behandelten Mäusen abortierte eine am Tag 10 p.c.; bei der zweiten betrug die Resorptionsrate 100%, während das dritte Muttertier bei 12 Implantationen 10 Resorptionen und 2 fatale Missbildungen aufwies. Die Verabreichung von 400 mg/kg N-Phthalyl-DL-isoglutamin führte bei allen Versuchstieren innerhalb 24 h nach Applikation zum Abort.

Repräsentative Befunde der teratologischen Prüfung aller Hydrolysenprodukte sind in Tabelle II zusammengestellt: N-Phthalyl-DL-glutamin, N-Phthalyl-DL-isoglutamin und N-Phthalyl-DL-glutaminsäure erwiesen sich als teratogen<sup>5-7</sup>. Nach Verabreichung der drei N-(o-Carboxybenzoyl)-Derivate, die aus diesen N-Phthalyl-Aminosäuren durch partielle Hydrolyse entstehen, fanden sich dagegen keine missgebildeten Feten mehr<sup>8,9</sup>. Auch die nach vollständiger Abspaltung der Phthalyl-Gruppe resultierenden freien Aminosäuren (Glutamin, Isoglutamin bzw. Glutaminsäure) sowie die jeweils als zweites Spaltprodukt auftretende Phthalsäure zeigten unter den gleichen Testbedingungen keinen teratogenen Effekt<sup>6-8</sup>. Die neu geprüften Hydrolysenprodukte mit intaktem Glutarimid-Ring erzeugten ebenfalls keine Missbildungen.

Bezüglich der embryotoxischen Wirksamkeit sind die Ergebnisse weniger einheitlich. Die drei teratogenen Substanzen bewirken gleichzeitig eine signifikante Er-

höhung der Resorptionsrate, doch zeigen auch einige der anderen Produkte einen mehr oder weniger deutlich ausgeprägten embryotoxischen Effekt. Da die Thalidomid-Embryopathie jedoch vornehmlich durch schwere Skelett-Missbildungen auffällt<sup>16</sup>, muss bei der abschliessenden Interpretation unserer Ergebnisse die Beziehung zwischen chemischer Struktur und *Teratogenität* im Vordergrund stehen.

Von den 12 Hydrolysenprodukten besitzen nur 3 ebenso wie Thalidomid selbst die intakte Phthalimid-Struktur; nur diese N-Phthalyl-Derivate sind teratogen. Bei der hydrolytischen Aufspaltung der Phthalimid-Gruppierung oder bei der vollständigen Abspaltung des Phthalsäure-Teiles geht die teratogene Aktivität verloren. Hierbei ist es ohne Bedeutung, ob der Glutaminsäure-Teil des Moleküls in einer geöffneten Form oder als Glutarimid-Ring vorliegt. Das Phthalimid-System stellt somit bei den untersuchten Verbindungen das chemische Äquivalent der Teratogenität dar<sup>17</sup>.

*Summary.* N-(o-Carboxybenzoyl)-DL-glutamic acid imide and DL-glutamic acid imide · HCl did not lead to fetal malformations after i.p. administration to pregnant mice; the injected solutions contained 25% Tween 20. Thus, of the 12 hydrolysis products of thalidomide only those 3 which contain the phthalimide moiety show teratogenic activity, i.e. 2-phthalimido-DL-glutaramic acid, 4-phthalimido-DL-glutaramic acid and 2-phthalimido-DL-glutaric acid.

W. MEISE, H. OCKENFELS<sup>18</sup> und F. KÖHLER<sup>19</sup>

Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn,  
Kreuzbergweg 26, D-53 Bonn (Deutschland),  
15. September 1972.

<sup>16</sup> W. G. McBRIDE, Lancet 1961 II, 1358.

<sup>17</sup> Die Autoren danken Herrn Prof. Dr. H. WEICKER und Herrn Prof. Dr. F. ZYMAŁKOWSKI für hilfreiche Diskussionen und für die Unterstützung dieser Untersuchungsreihe.

<sup>18</sup> Abteilung für Biochemie der Universität Ulm, Neubau Oberer Eselsberg, D-79 Ulm (Deutschland).

<sup>19</sup> Institut für Humangenetik der Universität Bonn, Wilhelmsplatz 7, D-53 Bonn (Deutschland).