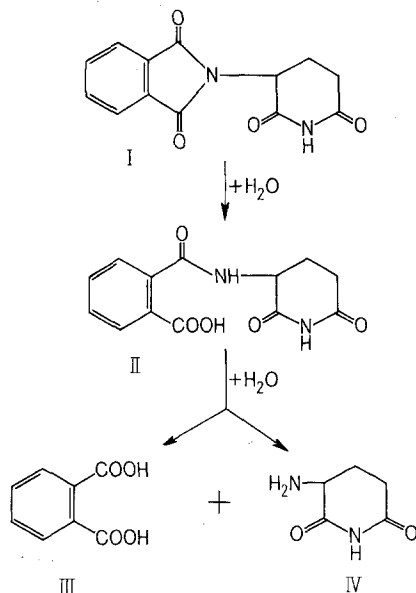


Teratologische Prüfung der Hydrolysenprodukte des Thalidomids

Thalidomid ist in wässriger Lösung nicht stabil; schon unter physiologischen Reaktionsbedingungen entstehen die 12 theoretisch möglichen Hydrolysenprodukte¹. Analog verläuft die spontane Hydrolyse im menschlichen und tierischen Organismus¹⁻³.

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^{3,4}. II kann weiter zu Phthalsäure (III) und DL-Glutaminsäureimid (IV) zerfallen.



Zur Klärung der Frage, inwieweit der intakte Glutarimid-Ring zur teratogenen Aktivität des Thalidomids beiträgt, sollen in vorliegender Mitteilung II und IV unter gleichartigen Versuchsbedingungen wie die anderen Hydrolysenprodukte⁵⁻⁹ teratologisch getestet werden.

Material und Methode. I wurde aus N-Phthalyl-DL-glutaminsäureanhydrid¹⁰ analog l. c.¹¹ dargestellt: Smp. 276–278° (Dimethylformamid/Wasser¹²). II liess sich durch alkalische Partialhydrolyse von I gewinnen¹³. Farblose Kriställchen, die nach Erweichen bei 200° und Wiedererstarren um 210° bei 276–278° schmelzen. C₁₃H₁₂N₂O₅ (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 Hydrochlorides¹⁴. Farblose Kristalle aus Wasser/*n*-Propanol, die zwischen 250 und 290° unter Violettfärbung schmelzen (vgl. Lit.¹⁵). C₅H₈N₂O₂ · 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.⁵.

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 18½ p.c. schnittentbundenen lebenden Feten liessen sich keine äusserlich sichtbaren Missbildungen feststellen. Auch die Untersuchung der Skelette ergab, dass die Substanzen

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

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

³ R. BECKMANN, Arzneimittel-Forsch. 13, 185 (1963).

⁴ 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.

⁵ F. KÖHLER und H. OCKENFELS, Experientia 26, 1157 (1970).

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

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

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

⁹ W. MEISE und F. KÖHLER, Pharmazie 27, 418 (1972).

¹⁰ F. E. KING und D. A. A. KIDD, J. chem. Soc. 1949, 3315.

¹¹ R. BECKMANN, Arzneimittel-Forsch. 12, 1095 (1962).

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

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

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

¹⁵ E. SONDHEIMER 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	Mutter-tiere	Implan-tationen I	Resorptionen		Feten		Gewicht [g] ^e
				R	R/I (%)	F	M	
N-(o-Carboxybenzoyl)-DL-glutaminsäureimid ^a	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 · HCl ^b	400 mg/kg	5	55	3	5,5	52	0	1,21 ± 0,07
	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

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

^a 1, ^b 2, ^c 4, ^d 8 bzw. ^e 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- χ^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 Versuchsreihe⁵⁻⁹ 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 fetale 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 teratogen⁵⁻⁷. 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^{8,9}. 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 Effekt⁶⁻⁸. 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 auffällt¹⁶, 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 dar¹⁷.

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. OCKENFELS¹⁸ und F. KÖHLER¹⁹

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

¹⁶ W. G. McBride, *Lancet* 1961 II, 1358.

¹⁷ Die Autoren danken Herrn Prof. Dr. H. WEICKER und Herrn Prof. Dr. F. ZYMALKOWSKI für hilfreiche Diskussionen und für die Unterstützung dieser Untersuchungsreihe.

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

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