

## SUMMARY

Benzamidoxime and cyanic acid react to give O-carbamoyl-benzamidoxime, and not the oxime of benzoylurea as generally admitted. 3-Phenyl-5-hydroxy-1,2,4-oxadiazole is quantitatively formed by reacting hydroxylamine on carbamoylbenzamidine.

UNION CARBIDE EUROPEAN RESEARCH ASSOCIATES

95 rue Gatti de Gamond, Bruxelles 18, Belgique

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. BUYLE, F. ELOY & R. LENAERS, *Helv.* **46**, 1073 (1963).
- [2] E. FALCK, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **18**, 2467 (1885); G. PALAZZO & G. STRANI, *Gazz. chim. ital.* **90**, 1290 (1960).
- [3] G. PALAZZO & G. STRANI, *Gazz. chim. ital.* **91**, 216 (1961).
- [4] E. BECKMANN & K. SANDEL, *Liebigs Ann. Chem.* **296**, 279 (1897).
- [5] F. ELOY, R. LENAERS & R. BUYLE, *Bull. Soc. chim. belg.* **73** (1964), sous presse.
- [6] F. ELOY & R. LENAERS, *Chem. Reviews* **62**, 155 (1962), voir Table 10, p. 172.
- [7] J. EPHRAIM, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **26**, 2227 (1893).

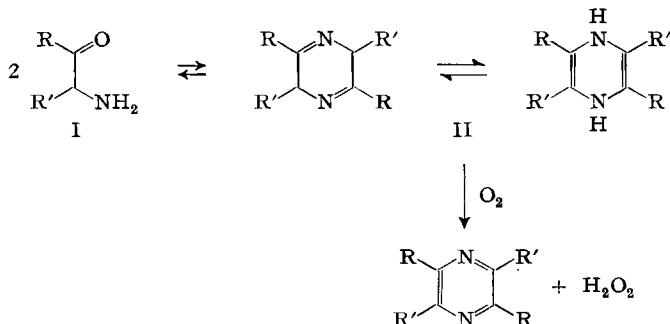
**88. Metallionen-Katalyse bei der  $H_2O_2$ - bzw. Radikalbildung  
durch autoxydable Cytostatica**

von H. ERLENMEYER, R. ZELL, H. BRINTZINGER und B. PRIJS

(22. II. 64)

Die Untersuchung des Mechanismus der cytostatischen Wirkung gewisser radio-mimetischer Stoffe führt zur Ansicht, dass diese Wirkung<sup>1)</sup> mit der biologischen Wirkung ionisierender Strahlung eine Reihe von Reaktionsschritten gemeinsam hat [2] [3] [4]<sup>2)</sup> (s. Schema 2). Bei den auf Strahlenschutz zielenden Eingriffen gilt es, diesen durch Radikal- bzw.  $H_2O_2$ -Bildung gekennzeichneten Reaktionsablauf auf ein Mini-

Schema 1



<sup>1)</sup> Zum gleichen Reaktionstyp gehört möglicherweise auch die carcinostatische Wirkung gewisser Anaerobier [1]<sup>2)</sup>.

<sup>2)</sup> Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 798.

mum herabzusetzen, während er andererseits bei der auf eine cytostatische Wirkung zielen Therapie auf ein Maximum gebracht werden sollte [3].

Insbesondere haben wir uns bei unseren Untersuchungen für die Bedeutung der Metallionen für einzelne Stufen in dieser Folge interessiert. Die Rolle, die Metallionen bei der Aktivierung von  $H_2O_2$  spielen, ist bekannt [5]. Zur Vermutung, dass Metallionen auch noch für andere Stufen des Schemas 2 von Bedeutung sind, wurden wir durch die folgenden Beobachtungen bei der Untersuchung der früher von uns als cytostatisch wirksam erkannten [6]  $\alpha$ -Aminoketone geführt.

Bei deren Autoxydation bildet sich, wie neuere Versuche gezeigt haben [3], im pH-Bereich  $\geq 7$  – in dem auch die biologische Wirkung gesteigert ist [7] – gleichfalls  $H_2O_2$ . Da unter diesen Bedingungen  $\alpha$ -Aminoketone (I) sich zu Dihydropyrazinen kondensieren [7] (Schema 1), ist zu vermuten, dass die zu  $H_2O_2$  führende Reaktion über die Ausbildung solcher «vinylger Hydrazine» (II) verläuft. Die  $\alpha$ -Aminoketone sind demnach, wie auch in neuerer Zeit entwickelte Methylhydrazine [2], als Stoffe mit einer der Strahlenwirkung weitgehend äquivalenten Wirkungsweise zu bewerten.

Ersetzt man nun bei Durchführung der Autoxydationsreaktion der  $\alpha$ -Aminoketone die bei unseren ersten Versuchen verwendeten Glasgefäßes durch solche aus Polyäthylen, so wird die zu beobachtende  $H_2O_2$ -Freisetzung erheblich verringert (Fig. 1a, b). Einen ähnlichen Effekt kann man bei in Glasgefäßen durchgeführten

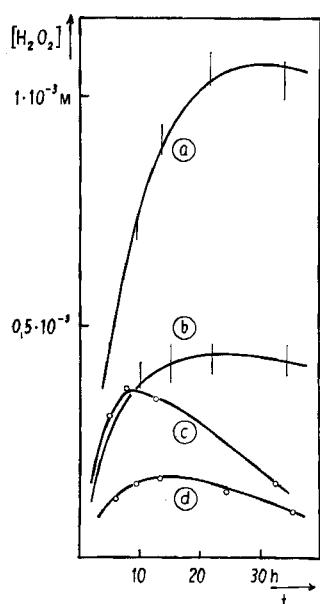


Fig. 1.  $H_2O_2$ -Freisetzung bei der Autoxydation von  $10^{-2}$  M 4-Amino-6-methyl-3-heptanon in  $0,06$  M Phosphatpuffer (pH = 7,5) bei  $37,5^\circ$

(a) in Pyrexglas-Gefäßen; (b) in Polyäthylen-Gefäßen; (c) wie (a), aber unter Zusatz von  $1,3 \cdot 10^{-3}$  M Picolin-säure; (d) wie (b), aber unter Zusatz von  $1,3 \cdot 10^{-3}$  M Picolin-säure

Versuchen durch einen Zusatz des Komplexbildners Picolin-säure erzielen (Fig. 1c). Andererseits begünstigen sowohl in Glas- wie in Polyäthylengefäßes Zusätze von Metallionen (Eisen-, Kupfer- oder Zink-Ionen) in sehr kleiner Konzentration die  $H_2O_2$ -Freisetzung<sup>3)</sup> (Fig. 2-4).

<sup>3)</sup> Bei höheren Metallionen-Konzentrationen überwiegt eine Beschleunigung der  $H_2O_2$ -Zerlegung (Fig. 2-4).

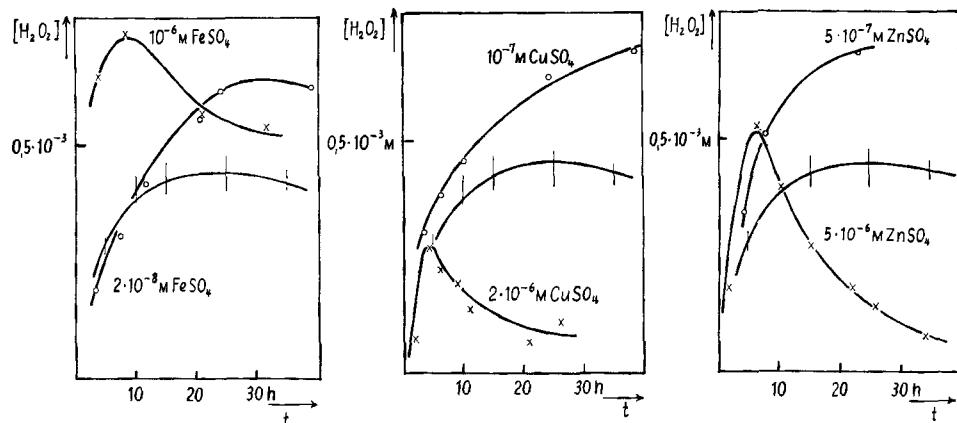


Fig. 2-4. Einfluss verschiedener Metallionen-Zusätze auf den Verlauf der  $H_2O_2$ -Freisetzung bei der Autoxydation von  $10^{-2}$  M 4-Amino-6-methyl-3-heptanon in Polyäthylen-Gefäßen

Zum Vergleich ist jeweils der Verlauf der Reaktion unter gleichen Bedingungen, aber ohne Metallionen-Zusatz (s. Figur 1 b) mit Fehlerintervallen eingezeichnet.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die zu  $H_2O_2$  führende Autoxydationsreaktion durch die in den Wandungen der Glasgefässe stets vorhandenen und z. T. in die Lösung abgegebenen Metallionen begünstigt wird, während in Polyäthylengefäßen dieser Effekt deutlich vermindert ist. Im gleichen Sinne wird in Glasgefäßen durch Komplexbildung mit Picolinsäure die Metallionen-Konzentration vermindert.

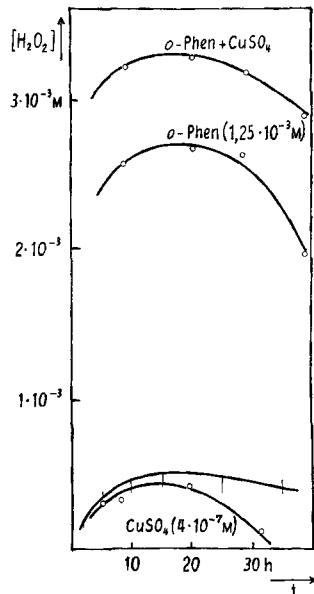


Fig. 5. Steigerung der  $H_2O_2$ -Freisetzung bei der Autoxydation von 4-Amino-6-methyl-3-heptanon durch Zusatz von o-Phenanthroline, von  $Cu^{2+}$  und von Phenanthroline +  $Cu^{2+}$  in Polyäthylen-Gefäßen

(Vergleichskurve 1 b mit Fehlerintervallen eingezeichnet)

Die vorgeschlagene Deutung wird weiter unterstützt durch das Ergebnis von Autoxydations-Versuchen, bei welchen o-Phenanthroline zugefügt wurde. Dieser Zu-

satz bewirkt Aktivierung der stets vorhandenen Spuren von Metallionen, d. h. Steigerung der  $H_2O_2$ -Bildung. Setzt man außerdem noch Metallionen ( $4 \cdot 10^{-7} M Cu^{2+}$ ) zu, so führt dies zu einer weiteren Steigerung (Fig. 5).

Erwähnt sei, dass in Polyäthylengefäßen die früher von uns festgestellte Autoxydations-begünstigende Wirkung von Serotonin [3] ebenfalls herabgesetzt ist (Fig.6).

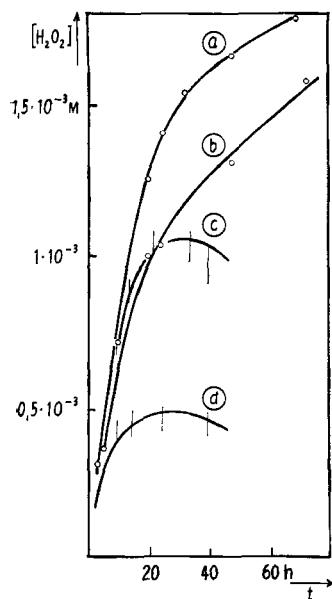


Fig. 6.  $H_2O_2$ -Freisetzung bei der Autoxydation von 4-Amino-6-methyl-3-heptanon in Gegenwart von  $6 \cdot 10^{-4} M$  Serotonin-Kreatinin-Sulfat

(a) in Pyrexglas-Gefäßen und (b) in Polyäthylengefäßen; entsprechende Reaktionen ohne Serotonin-zusatz: Kurve (c) bzw. (d)

Auch die von einer Forschungsgruppe der Fa. HOFFMANN-LA ROCHE beschriebene  $H_2O_2$ -Freisetzung bei der Autoxydation des cytostatisch wirksamen 1-Methyl-2-*p*-(isopropyl-carbamoyl)-benzylhydrazins [2] wird, wie wir fanden, vermindert, wenn man die Autoxydationsversuche in Polyäthylengefäßen durchführt. Ein Zusatz von

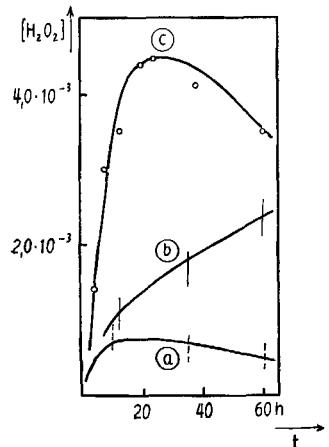


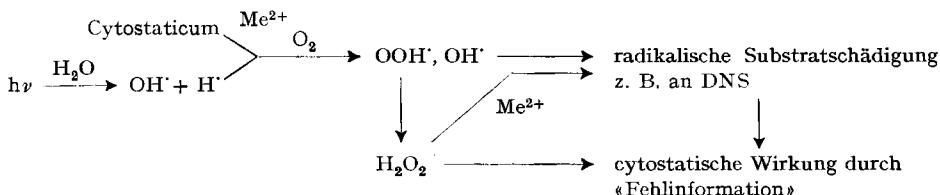
Fig. 7.  $H_2O_2$ -Freisetzung bei der Autoxydation von 1-Methyl-2-*p*-(isopropyl-carbamoyl)-benzylhydrazin  
(a) in Polyäthylengefäßen und (b) in Pyrexglas-Gefäßen;  
(c) unter Zusatz von  $1.3 \cdot 10^{-3} M$  *o*-Phenanthrolin in Pyrexglas-Gefäßen

*o*-Phenanthrolin ( $1,25 \cdot 10^{-3}$  M) führt in Glas auch hier zu einer beträchtlichen Steigerung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung (Fig. 7). In Polyäthylengefäßen, in welchen nach 13-stdg. Reaktionszeit nur ca. 0,1 Mol  $\text{H}_2\text{O}_2$ /Mol Hydrazinderivat gefunden wird, führt *o*-Phenanthrolin-Zusatz (ebenfalls  $1,25 \cdot 10^{-3}$  M) zu einer Steigerung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Freisetzung auf ca. das Doppelte, Zusatz von Phenanthrolin in dieser Menge und von  $\text{CuSO}_4$  ( $10^{-6}$  M) zu einer Steigerung auf das ca. Siebenfache gegenüber der Reaktion des Methylhydrazinderivats allein, gemessen jeweils nach 13 Std.

Die Unterschiede des Reaktionsverlaufs in Glas- gegenüber Polyäthylengefäßen bei allen untersuchten Verbindungen zeigen, dass diese langsam verlaufenden Reaktionen bereits durch Konzentrationen von Metallionen, die nahe bei der Allgegenwärts-Konzentration liegen, beschleunigt werden.

**Diskussion.** – Die aus den bisher bekanntgewordenen Daten abzuleitenden Aspekte für die Beeinflussung des Zellwachstums durch Reaktionen, die  $\text{H}_2\text{O}_2$  erzeugen, sollen am Beispiel der  $\alpha$ -Aminoketone im folgenden erörtert werden (vgl. Schema 2).

Schema 2



1. Durch die beschriebenen Untersuchungen wird die Deutung nahegelegt, dass die biologische Wirkung der  $\alpha$ -Aminoketone auf eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ - oder Radikal-Bildung – z. B. über ein Dihydropyrazin als Kondensationsprodukt – zurückgeführt werden kann, wodurch auch die pH-Abhängigkeit der Wirkung verständlich wird. Erklärt wird damit die Feststellung von STRÄULI [8], dass mit 4-Amino-6-methyl-3-heptanon nur bei lokaler Applikation Tumorregressionen zu erhalten sind, da bei jeder anderen Verabreichung die Konzentration der Aminoketone am Erfolgsort so stark herabgesetzt wird, dass die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Dihydropyrazinen – die mit dem Quadrat der Aminoketon-Konzentration abnimmt – und damit auch die der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung kleiner wird.

2. Diese Zusammenhänge machen besonders deutlich, wie wenig gegebenenfalls die Ergebnisse eines *in-vivo*-Tests über die molekularbiologische Wirksamkeit einer Verbindung aussagen und wie Transport und Wirkung – zwei in den meisten Tests nicht zu trennende Faktoren – gekoppelt sind. Aber es ist gerade das Problem der molekularbiologischen Wirksamkeit unter dem Aspekt der Auswahl und der Entwicklungsmöglichkeiten von chemischen Stoffgruppen für die Tumortherapie von grösster Bedeutung, so dass die Ausarbeitung eines Tests, der nur diese Information erfasst, sehr wichtig wäre.

3. Unsere Versuche mit verschiedenen Aminoketonen lassen auch erkennen, dass die bei solchen *in-vitro*-Versuchen ermittelte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge nicht als Mass für die cytostatische Wirkung einer Verbindung genommen werden kann, da die messbare  $\text{H}_2\text{O}_2$ -

Konzentration von zu vielen Faktoren – wie eben Metallionen-Konzentrationen und -Bindungsverhältnisse – abhängig ist, die *in vitro* und *in vivo* verschieden sind. So hatten frühere biologische Versuche<sup>4)</sup> ergeben, dass unter den Methyl-aminoketonen (I, R = -CH<sub>3</sub>) das Aminoketon mit R' = (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>- wirksamer ist als dasjenige mit R' = *p*-HO-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-<sup>5)</sup>. Hingegen zeigten unsere Autoxydationsversuche in Glasgefäßen, dass mit letzterer Verbindung eine ca. doppelt so hohe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration zu erzielen ist, als mit der erstgenannten [3].

4. Für die Deutung des Befundes, dass die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung von der Gegenwart von Metallionen abhängt, liegt es nahe anzunehmen, dass sich aus O<sub>2</sub>, den bei Kondensation der Aminoketone entstehenden Dihydropyrazinen und dem Metallion ternäre Komplexe ausbilden, in denen die Autoxydation beschleunigt verläuft<sup>5)</sup>. Die chemische Natur der Metallionen, ihre Konzentration und – wie die Versuche mit Phenanthrolin zeigen – der Me-Ligand-Bindungszustand werden für die katalytische Wirkung auf den Autoxydationsvorgang von Bedeutung sein. Der Möglichkeit, solche Radikal- bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildungsreaktionen durch geeignete Metallionen bzw. Liganden zu beeinflussen, wird für eine optimale Gestaltung einer Tumorthерапie mit radio-mimetischen Verbindungen dieser Art eine grosse Bedeutung zukommen.

5. Über den für die gewebeschädigende Wirkung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verantwortlichen molekularbiologischen Reaktionsmechanismus lässt sich aus den vorliegenden Versuchen nichts aussagen. Eine Überführung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Radikale – ein gleichfalls von Metallionen abhängender Vorgang [5] – ist möglich. BOLLAG [10] hat gefunden, dass cytotatisch wirksame Methylhydrazine die Antikörper-Bildung herabsetzen, eine Eigenschaft, die auch den wohl nur als Antimetaboliten wirksamen Verbindungen wie Thienyl- oder *p*-Fluorphenyl-alanin zukommt [11]; diese Beobachtung lässt daran denken, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vielleicht auch als «Antimetabolit» des H<sub>2</sub>O wirken kann, welches über H-Brücken als integrierender Bestandteil in viele biochemisch wesentliche Strukturen eingebaut ist [12]. Bei der Ausbildung von Wasserstoffbrücken, bei denen dann H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> anstelle von H<sub>2</sub>O eintritt, müssten Störungen auftreten, die sich bei den Reproduktionsmechanismen und anderen biologischen Reaktionen hemmend auswirken könnten.

**Experimentelles.** – Die Aminoketone wurden aus CCl<sub>4</sub> umkristallisiert, sie zeigten die in der Literatur [6] angegebenen Smp, ebenso Picolinsäure. Im übrigen wurden Reagenzien *pro analysi* verwendet. Wasser war durch Ionenaustauscher ionenfrei gemacht.

Autoxydationsversuche (in Gefäßen aus Pyrex-Glas bzw. aus Polyäthylen): 0,2 mMol des Aminoketon- bzw. des 1-Methyl-2-*p*-(isopropyl-carbamoyl)-benzylhydrazin-hydrochlorids wurden im Reaktionsgefäß in 20 ml 0,06M Phosphatpuffer, pH = 7,5, gelöst; allfällige weitere Zusätze wurden aus so konzentrierter Stammlösung zugegeben, dass die Volumenvermehrung vernachlässigbar, die Konzentrationen an Aminoketon bzw. Methylhydrazin also stets 10<sup>-2</sup>M waren. Sodann wurde im Thermostat bei 37,5° ± 0,1° unter Durchleiten eines schwachen Luftstromes inkubiert. Die entstandene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration wurde bestimmt, indem 0,5 ml der Reaktionslösung in der Küvette mit 2,5 ml 5 · 10<sup>-3</sup>M Titanysulfat-Lösung in 3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt und die Extinktion dieser Lösung bei 410 mμ gegen eine Mischung von 0,5 ml Reaktionslösung und 2,5 ml 3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gemessen wurde.

<sup>4)</sup> *Xenopus*-Regenerationstest [6].

<sup>5)</sup> Zur Bedeutung von O<sub>2</sub>-Komplexen dieser Art bei Autoxydationsreaktionen s. GRAF & FAL-LAB [9].

Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG gilt unser Dank für die Unterstützung dieser Arbeit. Der Firma HOFFMANN-LA ROCHE AG, Basel, danken wir für die Überlassung von 1-Methyl-2-*p*-(isopropyl-carbamoyl)-benzylhydrazin.

#### SUMMARY

The formation of  $H_2O_2$  during autoxydation of certain cytostatic agents like  $\alpha$ -aminoketones and methylhydrazine derivatives is shown to depend on the presence of metal ions. The biochemical implications of this finding, *e.g.* for the development of cytostatic tumor therapy and of appropriate tests are discussed.

Universität Basel,  
Institut für anorganische Chemie

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. R. MÖSE, Z. Krebsforsch. **63**, 63 (1959); D. KAYSER, Z. Naturforsch. **18b**, 748 (1963).
- [2] K. BERNEIS, M. KOFLER, W. BOLLAG, A. KAISER & A. LANGEMANN, Experientia **19**, 132 (1963); K. BERNEIS, M. KOFLER, W. BOLLAG, P. ZELLER, A. KAISER & A. LANGEMANN, Helv. **46**, 2157 (1963).
- [3] R. ZELL, H. BRINTZINGER, B. PRIJS & H. ERLENMEYER, Experientia, **20**, 117 (1964).
- [4] G. WEITZEL, E. BUDDECKE & F. SCHNEIDER, Z. physiol. Chem. **323**, 211 (1961); H. BERG & G. HORN, Naturwiss. **50**, 356 (1963).
- [5] H. BRINTZINGER, B. PRIJS & H. ERLENMEYER, Experientia **16**, 468 (1960); S. FALLAB & H. ERLENMEYER, *ibid.* **19**, 374 (1963).
- [6] H. ERLENMEYER & F. E. LEHMANN, Experientia **12**, 472 (1949); F. E. LEHMANN, A. BRETSCHER, H. KÜHNE, E. SORKIN, M. ERNE & H. ERLENMEYER, Helv. **33**, 1217 (1950).
- [7] F. E. LEHMANN, R. WEBER, H. AEBI, J. BÄUMLER & H. ERLENMEYER, Helv. physiol. Acta **12**, 147 (1954).
- [8] P. STRÄULI, Oncologia **12**, 143 (1959).
- [9] L. GRAF & S. FALLAB, Experientia **20**, 46 (1964).
- [10] W. BOLLAG, Experientia **19**, 304 (1963).
- [11] R. SCHWARTZ & J. ANDRÉ, II. Intern. Symposium on Immunopathology, Basel 1962, p. 385.
- [12] S. z. B. Übersichtsartikel I. M. KLOTZ, in Horizons in Biochemistry, New York 1962, M. KASHA & B. PULLMAN ed., p. 523.