

## Einige medizinische und biologische Anwendungen von Chelatkomplexen\*

Von Dr. JACK SCHUBERT, Lemont (USA)\*\*

### I. Einführung

In Pharmakologiebüchern findet sich eine große Zahl scheinbar nicht verwandter Drogen, die alle für den gleichen spezifischen Zweck benützt werden. Viele wertvolle Beziehungen wurden gefunden zwischen der chemotherapeutischen Wirkung<sup>1</sup> der Drogen und Faktoren, wie Azidität, Molekülgröße und Form, Ionenaustausch, Löslichkeit und der Anwesenheit von einfachen funktionellen Gruppen<sup>2-5</sup>. In letzter Zeit trat ein weiterer Faktor von recht allgemeiner Bedeutung stärker in den Vordergrund: die Fähigkeit der Droge, mit Metallionen einen heterozyklischen Ring – einen Chelatring – zu bilden, was mit der therapeutischen Wirkung in Zusammenhang gebracht wird<sup>3, 6, 7, 8</sup>. Diese Vorstellung setzt voraus, daß Metalle direkt oder indirekt an den meisten Stoffwechselprozessen beteiligt sind. Diese Annahme ist berechtigt, wenn man berücksichtigt, daß die meisten chemischen Reaktionsfolgen im Körper durch Enzyme geregelt sind, die ihrerseits meistens Metallionen benötigen, um aktiviert zu werden<sup>9</sup>.

Einige der folgenden Ausführungen entbehren nicht der Spekulation. Solche Spekulationen haben dann einen

\* Im wesentlichen folgen diese Ausführungen dem Robert-Gnehm-Vortrag des Autors vom 1. Februar 1957 an der ETH in Zürich. Die Publikation wurde zum Teil während eines Gastaufenthaltes des Autors als Senior Fellow der National Science Foundation (USA) im Laboratorium für Anorganische Chemie der ETH in Zürich vorbereitet. Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde unter den Auspizien der US Atomic Energy Commission am Argonne National Laboratory, Division of Biological and Medical Research, Lemont, Illinois (USA), ausgeführt.

\*\* Gegenwärtige Adresse: Laboratorium für Anorganische Chemie der ETH in Zürich.

<sup>1</sup> Der Ausdruck Chemotherapie wird hier im weitesten Sinne verstanden, nämlich als therapeutische Verwendung irgendeiner chemischen Substanz.

<sup>2</sup> T. S. WORK und E. WORK, *The Basis of Chemotherapy*, New York 1948.

<sup>3</sup> A. ALBERT, *Selective Toxicity with Special Reference to Chemotherapy*, New York 1951.

<sup>4</sup> A. ALBERT, *Pharmacol. Rev.* 4 (1952) 136.

<sup>5</sup> W. A. SEXTON, *Chemical Constitution and Biological Activity*, New York 1953.

<sup>6</sup> J. SCHUBERT in *Chemical Specificity in Biological Interactions*, herausgegeben von F. G. GURD, New York 1954, S. 114 ff.

<sup>7</sup> M. CHENOWETH, *Pharmacol. Rev.* 8 (1956) 57.

<sup>8</sup> E. D. WEINBERG, *Bacteriol. Rev.* (im Druck).

<sup>9</sup> Einzelne Enzyme, die anscheinend keine Metallionen benötigen, brauchen aber organische Ionen, die ähnliche Eigenschaften wie jene aufweisen.

Wert, wenn sie zu Experimenten anregen, die ohne sie nicht ausgeführt würden. Die Vorstellung, daß Chelatbildung bei der Wirkung von Drogen beteiligt ist, sollte nicht blind verallgemeinert werden, das könnte wie jede andere Verallgemeinerung in einem sehr komplexen Gebiet zu falschen Schlußfolgerungen führen. Chelatbildung muß als eine neben vielen andern Eigenschaften betrachtet werden, wie z. B. Ionisationskonstanten, Penetrationsvermögen und Verhalten im Stoffwechsel. Sie bildet nicht die einzige Erklärung für den Wirkungsmechanismus einer Droge, wie an spezifischen Beispielen dargelegt werden soll.

In der Tat ist es in vielen Fällen schwierig zu beurteilen, bis zu welchem Grad die Fähigkeit einer Droge zur Chelatbildung mit ihrer Wirkung zusammenhängt. Da jedoch die Wirkungsweise einer Droge von einer enormen Zahl von Faktoren abhängt, ist man genötigt, alle allgemeineren Gesichtspunkte heranzuziehen, um die pharmakologische Wirkung ganzer Gruppen scheinbar nicht verwandter Verbindungen in einen Zusammenhang zu bringen.

Verschiedene Kriterien erlauben die Beurteilung, ob Chelatringbildung für die Drogenwirkung verantwortlich ist<sup>7</sup>. Zwei solcher Kriterien ergeben sich aus der Untersuchung:

1. Ob die Änderung der Molekülstruktur, welche die Chelatringbildung verunmöglicht, zum Verlust der pharmakologischen Aktivität führt.
2. Ob eine deutliche Erhöhung oder Erniedrigung der therapeutischen Aktivität einer Droge eintritt, wenn sie mit einem Metallion kombiniert wird.

Eines unserer grundlegenden Postulate zu der Rolle der Chelatbildung bei der Drogenwirkung ist, daß das Metallion eine Brücke zwischen der Droge und dem Enzym, d. h. einen sogenannten *ternären Komplex* bildet. Dies ist ein wichtiger Punkt, denn er klärt einige scheinbare Widersprüche in der Literatur auf. Besteht z. B. die Funktion eines Chelatbildners darin, ein Metallion in Lösung zu bringen, so ist offensichtlich, daß seine Wirkung um so größer sein wird, je größer die Bindungskonstante ist, sofern die andern Faktoren konstant gehalten werden; Beispiele dafür sind: die Beschleunigung der Absonderung radioaktiver Elemente aus dem Kör-

per, die Entgiftung von Metallgiften und die Wiederaktivierung eines durch ein Fremdmetallion blockierten Enzyms. In diesen Fällen besteht die Wirkung des Chelatbildners darin, entweder die Bildung von ternären Komplexen zu verhindern oder bereits bestehende zu zerlegen.

Eine andere Kategorie betrifft viele Fälle, bei welchen die biologische Wirkung scheinbar keine Beziehung zu der Stärke der Bindung zwischen Metallion und Chelatbildner, der ein enzymatisches Substrat sein kann, aufweist. Hierhin gehören z.B. die metallaktivierten Decarboxylierungsreaktionen und die Antituberkulosemittel. Es wird postuliert, daß die relative Bindungskonstante des Metallions zu jedem der beiden andern Partner des ternären Komplexes die ausschlaggebende Rolle spielt, wie dies im Abschnitt IV gezeigt wird. Man muß deshalb immer die mögliche Funktion einer chelatbildenden Droge in Betracht ziehen und beurteilen, ob die Wirkung in der Blockierung eines Enzyms oder im Rücktransport eines Spurenmetalls an den Ort einer biologischen Verletzung zum Zwecke der Wiederherstellung (siehe Abschnitt III a) besteht.

Es ist vorauszusehen, daß in den kommenden Jahren Hunderte von Publikationen erscheinen werden, welche den Zusammenhang zwischen den chelatbildenden Eigenschaften der Verbindungen und ihrer biochemischen Aktivität zeigen oder zu zeigen versuchen werden. Die Literatur ist heute schon angefüllt von Beobachtungen, bei welchen die Rolle der Chelatbildung noch nicht erkannt ist. In einer sehr ausführlichen Serie von Publikationen wurde z. B. der Effekt von Dutzenden von Verbindungen auf die Sedimentationsgeschwindigkeit von Erythrocyten gemessen<sup>10</sup>. Wenn die Resultate unter der Annahme von Chelatbildungsmechanismen betrachtet werden, dann sieht man viele attraktive Zusammenhänge, und es werden zudem eine Reihe weiterer Experimente angeregt.

Chelatbildung ist natürlich nicht die einzige Erklärung der Drogenwirkung. Wenn es so wäre, so könnten die heute in riesiger Zahl verwendeten Drogen auf eine kleine Zahl universeller chelatbildender Verbindungen reduziert werden. Es ist jedoch ein neuer Parameter, welcher neue Gesichtspunkte für den Wirkungsmechanismus der Drogen und Enzyme geben kann.

Im Anschluß an diese einleitenden Bemerkungen sollen einige spezifische Beispiele aufgeführt werden. Sie entstammen Untersuchungsergebnissen, die der Autor mit seinen Mitarbeitern A. LINDENBAUM, M. W. ROSENTHAL und J. M. FRIED im Argonne National Laboratory erzielt hat. Zusätzlich soll ein damit verbundenes Problem zur Sprache kommen, nämlich die Wirkung von Metallen auf Enzyme, speziell auf die Voraussage von enzymatischen Aktivierungen durch Metalle, die aus der Bindungsaffinität des Metalles für das Enzym und das Substrat gemacht werden kann.

<sup>10</sup> P. FORMIJNE, *Proc. Kon. Nederl. Akad. Wetensch.* 58c (1955) 328, 413, 472, 572, 581.

## II. Metallchelate in der Toxikologie

### a) Die Beschleunigung der Ausscheidung radioaktiver Elemente

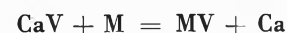
Wenn radioaktive Isotopen geschluckt, inhaliert oder eingespritzt werden, können sie zu akuten oder chronischen Schäden führen, infolge der ionisierenden Strahlung, die sie im Körper aussenden. Die Therapie sucht zu verhindern, daß sie vom Körper zurückgehalten werden, oder die Ausscheidung zu fördern, wenn sie sich im Körper festgesetzt haben. Ausführliche Publikationen über therapeutische Methoden sind kürzlich veröffentlicht worden<sup>11</sup>. Die meisten der gefährlicheren radioaktiven Isotopen sind Metalle, die zur Chelatbildung befähigt sind.

Chelatbildung wird zur Beschleunigung der Ausscheidung von radioaktiven Isotopen im Körper verwendet, da wasserlösliche, leicht ausscheidbare Chelate zwischen dem Isotop und dem Chelatbildner entstehen. Indirekt wird die Chelatbildung bei der Einspritzung von Metallchelaten in die Blutbahn angewandt. Diese zersetzen sich darin unter Bildung leicht ausscheidbarer, kolloider Metallhydroxydpartikel. Diese zirkulierenden «Träger»-Partikel verbinden sich mit den zirkulierenden radioaktiven Isotopen, so daß diese zusammen mit dem Träger ausgeschieden werden.

Beim ersten Verfahren wird meistens, sowohl experimentell wie klinisch, Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) als Chelatbildner verwendet. Da EDTA sich sehr stark mit den gefährlicheren radioaktiven Isotopen, wie den 3 wertigen seltenen Erden und den Transuranen, z. B. Plutonium, verbindet, ist es ein sehr wirksames Mittel. Wenn es innerhalb der Zeit angewendet wird, in welcher der größte Teil der radioaktiven Isotopen sich noch im Blut und den weichen Geweben befindet und labil gebunden ist, kann die Ausscheidung des radioaktiven Isotops um bis auf das Hundertfache gesteigert werden.

Es wird häufig nicht berücksichtigt, daß die Bindung eines radioaktiven Elementes M durch einen injizierten Chelatbildner V eine Verdrängung des Ca-Ions zur Folge hat. Wenn EDTA verwendet wird, so meistens in der Form des Ca-Komplexes, damit es die Ca-Ionenkonzentration des Blutes nicht vermindert.

Der Chelatbildner muß, um gute Resultate zu geben, das störende Metallion stärker binden als das Ca-Ion. Im einfachsten Fall, wenn z. B. angenommen wird, daß die Chelatbildung sehr rasch vor sich geht, was nicht immer der Fall ist, wird die Austauschreaktion wie folgt geschrieben (unter Vernachlässigung der elektrischen Ladung):



wobei das Verhältnis des gebundenen M zum freien M, MV/M proportional dem Verhältnis der entsprechenden Chelatbildungskonstanten ist:

<sup>11</sup> J. SCHUBERT, *Ann. Rev. Nuclear Sci.* 5 (1955) 369; A. CATSCH, *Strahlentherapie* 99 (1956) 290.

$$MV/M \sim K_{MV}/K_{CaV},$$

$$\text{wobei } K_{MV} = \frac{(MV)}{(M)(V)} \text{ und } K_{CaV} = \frac{(CaV)}{(Ca)(V)}.$$

Wenn es sich bei V um EDTA handelt, ist  $K_{CaV} = 10^{10,7}$ , so daß für therapeutische Wirksamkeit  $K_{VM} > 10^{10,7}$  sein sollte.

Es folgt aus dem Gesagten, daß die Anwendung von Chelaten, welche kleine oder keine Affinität für Ca und unverminderte Affinität für M haben, eine große Verbesserung bedeuten würden, wenn die andern Faktoren, wie Giftigkeit, Ausscheidbarkeit des Metallchelates, mit EDTA vergleichbar bleiben. Andererseits wäre der Chelatbildner unwirksam, wenn er in der Lage wäre, das Plasmaeisen so zu binden, daß eine kleine Dosis vollständig in das Eisenchelate verwandelt würde.

Es ist von größter Wichtigkeit, daß der Chelatbildner in einer größtmöglichen Dosis angewendet wird, sonst besteht nämlich die Gefahr, daß, obwohl einerseits eine erhöhte Ausscheidung der radioaktiven Isotopen beobachtet wird, andererseits eine erhöhte Ablagerung der radioaktiven Isotopen in den Knochen erfolgen kann. Mit andern Worten, das Massenwirkungsgesetz fordert sowohl hohe  $K_{MV}$ - und V/M-Werte, um Konkurrenzreaktionen der Gewebeaufbaustoffe zu minimalisieren, welche eine verfrühte Zersetzung des Metallchelates zur Folge hätten.

Der Gebrauch von Metallchelaten als Mittel zur Einführung eines kolloidalen Metallträgers, der die Ausscheidung von Radioisotopen beschleunigt, soll am Beispiel des Zirkoniumcitrate erläutert werden. Zirkoniumsalze, wie z. B. das Chlorid, sind nur in saurer Lösung beständig. Beim physiologischen pH fällt das Zirkonium weitgehend als Hydroxyd und als Phosphat aus, wenn Phosphat vorhanden ist. Deshalb ist es unmöglich, Zirkonium einzuspritzen, das nicht komplex gebunden ist. Der Gebrauch eines Chelates erlaubt die Herstellung eines neutralen, wasserlöslichen Salzes. Zudem wird durch das Verhältnis von Citrat zu Zirkonium die Korngröße des entstehenden Kolloides bestimmt. Dies ist ein sehr wichtiger Faktor, da der Anteil an Zirkon, und damit am Radioisotop, der durch den Urin ausgeschieden wird, eine Funktion der Korngröße ist. Sehr große Partikel, die bei zu kleinem Citratgehalt entstehen, neigen dazu, sich in Leber, Milz und in Knochennähe abzusetzen.

Von großer Wichtigkeit ist die Stabilität des Zirkoniumchelates. Ist sie zu groß, so wird der größte Teil des Zirkoniums als Chelat ausgeschieden, so daß keine Trägerwirkung erreicht wird. Ist die Stabilität zu gering, wird wenig Zirkonium ausgeschieden und der größte Teil der Radioisotopen in den weichen Geweben abgesetzt, obwohl, wie häufig beobachtet wurde, das zirkulierende Radioisotop den Knochen entzogen wird.

Andere Metallionen, die ebenfalls stark hydrolysieren und bei pH 7 nur als polymerisierte Hydroxyde vorkommen, können an Stelle des Zirkoniums verwendet

werden. Ti, Th, Al und Fe sind wirksam, wenn sie als Chelate der Zitronen-, Malein- und anderer Oxysäuren injiziert werden, jedoch sind die Salze des Mg und des Ca unwirksam.

Es besteht die Möglichkeit, daß Polyelektrolyte synthetisiert werden, die eine passende Teilchengröße aufweisen und chelatbildende Gruppen enthalten, die für ein gegebenes Radioisotop große Spezifität aufweisen. Tatsächlich sind synthetische, wasserlösliche Makromoleküle, wie Polyvinylpyrrolidon (PVP), als Entgiftungssubstanzen verwendet worden. Ihre Wirksamkeit beruht auf ihrer Fähigkeit, Komplexe mit den verschiedensten Substanzen bilden zu können, wie z. B. Farbstoffen, Alkaloiden, Salicylaten und anderen Pharmazeutika<sup>12</sup>. Vor einigen Jahren wurde ein leicht ausscheidbares PVP-Präparat verwendet, um Meerschweinchen zu entgiften, die mit Farbstoffen vergiftet worden waren<sup>13</sup>. Das PVP bewirkte eine starke Vergrößerung des Ausscheidungsverhältnisses des PVP-Farbstoffkomplexes; es handelt sich also ebenfalls um eine Trägerreaktion analog derjenigen des Zirkoniumcitrate bei den Radioisotopen. CATSCH<sup>11</sup> erreichte erfolgversprechende Resultate durch den Gebrauch von Polymetaphosphaten (GRAHAM'S Salz).

#### b) Die Behandlung von Metallvergiftungen

Die Hauptschwierigkeit bei der Behandlung von Metallvergiftungen besteht darin, daß der Chelatbildner mit dem Metall in den Geweben nicht in Berührung kommt. Deshalb ist die Behandlung von Metallvergiftungen durch das Einnehmen von Chelatbildnern, welche durch Bildung von wasserlöslichen, ausscheidbaren Chelaten wirken, vor allem dann erfolgreich, wenn sie in einem frühen Stadium erfolgt. Die Bildung von diffusionsfähigen Metallchelaten kann manchmal bewirken, daß giftiges Metall in sonst normalerweise unerreichbare Organe transportiert wird. Ein solches Beispiel unter vielen betrifft einen Patienten, der an einer Arsenvergiftung litt und bei welchem man frühzeitig eine angemessene Therapie mit 2,3-Dimercaptopropanol (BAL) anwendete. Der Patient entwickelte eine periphere Neuropathie, obwohl die Menge des Arsens im Körper anscheinend vermindert worden war<sup>14</sup>. Andere Fälle, in welchen BAL schädigende Wirkungen zeigte, betreffen Cd und Pb.

Die Erwähnung der Möglichkeit, daß unerwünschte Nachwirkungen nach der scheinbar erfolgreichen Behandlung von Metallvergiftungen mit Chelatbildnern erfolgen, soll die Notwendigkeit betonen, daß langfristige Untersuchungen an Patienten gemacht werden müssen, welche entweder in der akuten oder chronischen Phase ihrer Metallvergiftung mit Chelatbildnern behandelt wurden.

<sup>12</sup> T. HIGUCHI und R. KURAMOTO, *J. Amer. Pharm. Assoc., Sci. Ed.* 43 (1954) 398.

<sup>13</sup> R. SCHUBERT, *Rev. Gastroenterology* 17 (1950) 165.

<sup>14</sup> A. HEYMAN, J. B. PFEIFFER, R. W. WILLET und H. M. TAYLOR, *New England J. Med.* 254 (1956) 401.

Viele Berufskrankheiten werden durch Arbeiten mit Salzen giftiger Metalle, wie Blei, Beryllium, Cadmium, Zink, Chrom usw., verursacht. Seit der Entdeckung von 2,3-Dimercaptopropanol<sup>15</sup> im Jahre 1940 wurden Anstrengungen gemacht, um Schwermetallvergiftungen mit spezifischen Reagenzien zu behandeln. Bis EDTA bekannt war, war BAL das meistbenutzte Entgiftungsmittel. Seine Wirkungsweise beruht auf der Bildung eines Chelatringes mit den Sulfhydrylgruppen. Jedoch reagieren viele Metalle mit BAL nicht, oder sie reagieren so schwach, daß sein Gebrauch manchmal die Giftigkeit des Metalls vergrößert. Das neuerdings vor allem bei Bleivergiftungen benutzte EDTA hat die Anzahl der Metallgifte, die durch Einnehmen eines Chelatbildners behandelt werden können, vergrößert.

Es ist aussichtslos, mit einem Chelatbildner *in vivo* zu experimentieren, der mit einem Metall beim pH-Wert 6–8 im Reagenzglas kein Chelat bildet. Es ist ebenfalls nutzlos, mit einem Chelatbildner Metallvergiftungen behandeln zu wollen, der nicht wenigstens einen um  $10^3$  bis  $10^4$ mal höheren  $K_{MV}$ -Wert gibt als der Calciumkomplex. Auf diese auf der Hand liegenden Punkte sei nur deshalb aufmerksam gemacht, da verschiedene Publikationen von Forschern existieren, die Reagenzien wie BAL oder EDTA benutzten, um Vergiftungen von Metallen zu behandeln, die bekannterweise nur sehr schwach mit diesen Reagenzien reagieren.

In der Behandlung von chronischen Metallvergiftungen war es bis jetzt nicht möglich, die Ausscheidung des im Körper gelagerten Metalles zu induzieren. Deshalb haben wir unsere Anstrengungen dem Gebrauch von Farbstoffen gewidmet, die große Affinität zu den Körpergeweben besitzen und die mit den Metallen, welche sich in den Geweben befinden, unlösliche oder polynukleare Chelate, *Lacke* genannt, bilden. Auf diese Weise kann das Metall seine Umgebung nicht angreifen. Es handelt sich also um einen analogen Fall zur Beizenfärbung der Stoffe, bei welcher ein Metallhydroxyd auf den Fasern fixiert wird, das seinerseits den Farbstoff bindet. Im wesentlichen wird ein ternärer Komplex<sup>16</sup> gebildet, der als Austausch der metallkoordinierten OH-Gruppen durch den Farbstoff formuliert werden kann

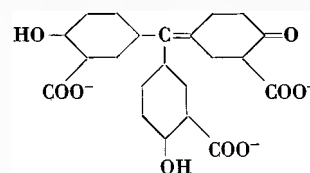


P stellt das Gewebeprotein oder ein Enzym dar. Es wird postuliert, daß die Chelatbildung die Giftwirkung des Metalls M auf das Gewebe erniedrigt oder eliminiert, obwohl die Bindung P–M bestehen bleibt. Im Falle einer Metallvergiftung genügt das Blockieren einiger Koordinationsstellen des Metalles durch den Farbstoff, um dessen Giftigkeit aufzuheben. Dies konnte direkt durch histologische Beobachtungen bei den Untersuchungen der Behandlung von Berylliumvergiftungen durch den Farbstoff Aurintricarboxylsäure (ATA)<sup>17</sup> gezeigt werden.

<sup>15</sup> L. A. STOCKEN u. R. H. S. THOMPSON, *Physiol. Rev.* 29 (1949) 168.

<sup>16</sup> T. R. HUGHES u. I. M. KLOTZ, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1946) 2109.

<sup>17</sup> H. LISCO und M. R. WHITE, *Brit. J. Exper. Pathol.* 36 (1955) 27.



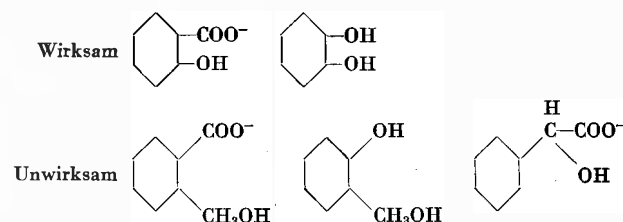
Die Dauerhaftigkeit des Schutzes ergibt sich aus der Tatsache, daß kein Gewebeschaden bei Be-vergifteten Mäusen 320 Tage nach dem Schutz durch ATA nachgewiesen werden konnte. Der schützende Effekt von ATA gegen akute Be-Vergiftung ist sehr ausgeprägt, genügt doch 1 Milligramm, um eine  $LD_{98}$ -Dosis an Beryllium\* (0,7 mg Be/kg) als Be-sulfat, abzuschirmen. Eine Schutzwirkung kann ebenfalls erreicht werden, wenn ATA zwei Tage vor der Einnahme des Be gegeben wird, oder bis 16 Stunden nach der Einnahme einer tödlichen Dosis von Be<sup>18</sup>.

Der Mechanismus der Wirkungsweise von ATA ist in allen Einzelheiten untersucht worden; die Resultate werfen ein klares Licht auf die Faktoren, welche bei der Therapie von Metallvergiftungen durch Chelatbildner wirken<sup>19</sup>. In diesen Versuchen wurde unter anderem die Eignung einer Verbindung geprüft, die Blockierung der alkalischen Phosphatase durch kleinste Mengen von Be ( $\sim 10^{-6}M$ ) und damit die Giftigwirkung *in vivo* aufzuheben.

In vielen Fällen wurde radioaktives <sup>7</sup>Be, in andern wurde <sup>14</sup>C-markiertes ATA verwendet. Einige Resultate sind:

1. Von mehr als 70 untersuchten Verbindungen waren nur diejenigen, die eine chelatbildende Gruppierung aufwiesen, wirksam.

2. Von den Verbindungen mit chelatbildenden Eigenschaften waren einige unwirksam, weil das Be-Chelat beim physiologischen pH instabil ist oder weil das Proton an der chelatbildenden Gruppe so stark gebunden ist, daß Be nicht in der Lage ist, dieses zu verdrängen, wie dies bei den folgenden Verbindungen gezeigt werden soll:



3. Das Vorhandensein von Gruppen, welche die Wasserlöslichkeit des Chelatbildners vergrößern, verkleinern die Schutzwirkung gegen Be-Vergiftungen. Verbindungen, die *in vitro* wirksam sind, wie sich aus Messungen

\*  $LD_{98}$  entspricht einer Dosis, die 98% der Versuchstiere tötet.

<sup>18</sup> M. R. WHITE, A. J. FINKEL und J. SCHUBERT, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 102 (1951) 88.

<sup>19</sup> J. SCHUBERT, M. R. WHITE und A. LINDENBAUM, *J. Biol. Chem.* 196 (1952) 279, 208 (1954) 359; *Arch. Biochem. Biophys.* 52 (1954) 110, 133, 143.

der Aufhebung von Be-induzierten enzymatischen Blockierungen ergab, sind *in vivo* entweder vollständig unwirksam oder nur teilweise wirksam. Die abklingende Fähigkeit bei Verbindungen, die hydrophile Gruppen, wie Sulfonate oder Hydroxyde, enthalten, mit intrazellulär gebundenem Be, zu reagieren, kann einleuchtend am Fall des sulfonierten ATA gezeigt werden. Diese Verbindung bildet ein etwas stabileres Chelat mit Be als ATA und kann die Aufhebung einer enzymatischen Blockierung bewirken, aber sie hat absolut keinen therapeutischen Wert gegen Be-Vergiftungen.

4. Wie Experimente mit Salicylsäure und Sulfosalicylsäure ergaben, ist die Fähigkeit zur Beschleunigung der Ausscheidung eines Metallions nicht notwendigerweise ein Maß für die therapeutische Wirksamkeit. Wenn diese Verbindungen innerhalb einer Stunde nach der Einnahme einer tödlichen Dosis Be-Sulfat verabreicht werden, so sind beide Verbindungen wirksam und verhindern den tödlichen Ausgang der Vergiftung. Wenn sie jedoch erst vier Stunden nach der Be-Einnahme verabreicht werden, so ist nur die Salicylsäure wirksam. Was die Be-Ausscheidung anbelangt, so bewirken beide Verbindungen eine Erhöhung um das Zweieinhalbfache, d. h. eine Erhöhung von 14 auf 35% der injizierten Dosis in den ersten 24 Stunden. Das wirksamere ATA hat keinen Einfluß auf die Ausscheidung. Diese und andere Resultate führen zum unzweideutigen Schluß, daß Chelatbildung *in situ* die wichtigste Rolle bei diesen Untersuchungen spielte. Es ist wahrscheinlich, daß der Gebrauch von chelatbildenden Farbstoffen bei der Behandlung von Metallvergiftungen immer größer wird. Theoretisch scheint es ein sehr vielversprechendes Mittel zu sein, um chronische Metallvergiftungen zu behandeln. Das führt auf Anschauungen zurück, wie sie schon EHRlich geäußert hatte.

Wegen der Schwierigkeit, intrazellulär fixierte Metalle mit Chelatbildnern zu erreichen, wurde auch ein anderer Weg untersucht. Dieser besteht darin, Stoffwechselprozesse *in vivo* so zu beeinflussen, daß der Gehalt an natürlich im Körper vorkommenden chelatbildenden Substanzen innerhalb der Zelle um ein Mehrfaches vergrößert und diese abnorm hohen Konzentrationen für lange Perioden aufrechterhalten werden können. Zur Untersuchung wurde das System des Zitronensäurezyklus der Ratten gewählt, der durch die Verabreichung von nichttödlichen Mengen von Na-Fluoroacetat (FA) beeinflusst wurde. Eine einfache Einspritzung einer nichttödlichen Dosis von FA bewirkt eine deutliche Anreicherung der Zitronensäure in Milz, Niere, Herz, Hirn und Pankreas, jedoch nicht im Blut<sup>20</sup>. Der normale Zitronensäurespiegel in Niere und Milz, 20 bzw. 70 mg/g frischen Gewebes, wird durch FA auf 300 bzw. 500 mg/g erhöht und etwa 24 Stunden beibehalten. Die Wirkung von FA ist vermutlich intrazellulär, da die Reaktionen des Zi-

tronensäurezyklus mit den Mitochondrien der Zelle verbunden sind.

Der therapeutische Wert von FA wurde bei Bleivergiftung geprüft. Es wurde festgestellt, daß bei Ratten, welche eine LD<sub>90</sub>-Dosis Bleinitrat eingenommen hatten, 53% überlebten, wenn sie mit FA behandelt wurden<sup>21</sup>. Massive Dosen von Natriumcitrat schützen vor Bleivergiftungen nicht.

Die Resultate zeigen, daß die Wichtigkeit der Heilmittel, die mit intrazellulären Metallablagerungen reagieren können, nicht genügend betont werden kann. In der klinischen Toxikologie wurde der Tatsache der Erhöhung der Ausscheidung eines giftigen Metalles zu große Bedeutung zugemessen. Es muß daran erinnert werden, daß gerade die giftigsten Metalle diejenigen sind, welche die stabilsten Chelate bilden und deshalb am stärksten von den Gewebeaufbaustoffen gebunden werden.

Man muß berücksichtigen, daß die Bindungskonstante des Kations Fe<sup>+++</sup> mit Porphyrin und anderen ähnlichen Substanzen größer als 10<sup>50</sup> sein kann und daß die Affinität des Hydroxyds selbst bei pH 7 sehr stark sein kann. Es würde deshalb sehr schwer sein, mit den relativ kleinen Chelatkonzentrationen, welche man *in vivo* intrazellulär durch Einspritzen erreichen kann, das Depot giftiger Metalle in den Geweben zu lösen und wegzubringen.

In einer interessanten Versuchsserie<sup>22</sup> resultierte, daß 3-Butylpyridin-6-Carboxylsäure Pflanzen durch Chelatbildung des Porphyrineisens in der Katalyse schädigte, ohne daß sie die physikalische Entfernung des Eisens im Enzym bewirkte. Zufuhr von Eisen konnte die Wirkung dieser Säure wieder aufheben oder verhindern.

### III. Chelatbildung und Drogenwirkung

#### a) Antipyretika und rheumatische Fieber

Es ist schon seit Jahren bekannt, daß die *para*- und *meta*-Isomeren der Hydroxybenzoesäure unwirksam sind, währenddem das *ortho*-Derivat, die Salicylsäure, als Analgetikum, Antipyretikum und bei rheumatischen Fiebern wirksam ist. Es wurde vorgeschlagen, daß die Eigenschaft der Salicylsäure, Chelate zu bilden, welche die andern zwei Isomere nicht teilen, für die therapeutische Wirkung der Salicylate verantwortlich ist<sup>23</sup>. Es ist bemerkenswert, daß die ersten Autoren die Chelatbildung nur in einem engen Sinne auffaßten, nämlich in der Fähigkeit eines Moleküls, eine intramolekulare Wasserstoffbindung aufzubauen, so daß auf diese Weise die Säurestärke vergrößert wird. In keiner dieser Publikationen wurde die Möglichkeit erwähnt, daß eine Metallbindung vorkommen könnte.

<sup>21</sup> J. F. FRIED, M. W. ROSENTHAL und J. SCHUBERT, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92 (1956) 331.

<sup>22</sup> K. TAMARI und J. KAJI, *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 26 (1952) 223.

<sup>23</sup> J. REID, R. D. WATSON, J. B. COCHRAN und D. H. SPROULL, *Brit. Med. J.* 2 (1951) 321.

<sup>20</sup> A. LINDENBAUM, M. R. WHITE und J. SCHUBERT, *J. Biol. Chem.* 190 (1951) 585.



Deshalb verhindert die Bindung des Cu durch Salicylsäure, Cystein, Ascorbinsäure und andere Cu-Chelatbildner die Wirkung des Cu auf das Adrenalin. Andererseits verhindert Zugabe von Kupfer die verstärkende Wirkung dieser Agenzien.

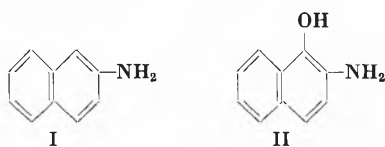
b) *Verschiedene pharmakologische Wirkungen, die mit der Chelatbildung im Zusammenhang stehen*

Es seien einige ausgewählte Beispiele der Chemotherapie oder physiologischen Wirkung erwähnt, bei welchen die Rolle der Chelatbildung entweder übersehen wurde oder ihre Untersuchung erst in den Anfangsstadien steht. In andern Fällen scheint die Rolle der Chelatbildung, obwohl sie erkannt und zum Teil untersucht worden ist, zu keinen eindeutigen Resultaten zu führen. Die Zahl der erwähnten Beispiele könnte um ein Mehrfaches erhöht werden, jedoch beleuchtet die folgende kleine Auswahl das faszinierende und noch unerschlossene Gebiet zur Genüge.

1. Anticarcinogene Agenzien

Viele Antitumordrogen besitzen chelatbildende Eigenschaften<sup>27b</sup>. Es betrifft dies die Antagonisten des Purins, wie z. B. 6-Mercaptopurin, und die Antagonisten der Folsäure, wie z. B. Aminopterin. Äthyleniminverbindungen besitzen chelatbildende Eigenschaften, wenn der Ring durch Hydrolyse geöffnet wird, so wie «Nitrogen Mustard», Triäthylenamin und Triäthylenphosphoramid. Andere anticarcinogene Verbindungen können während des Stoffwechselprozesses in Chelatbildner verwandelt werden.

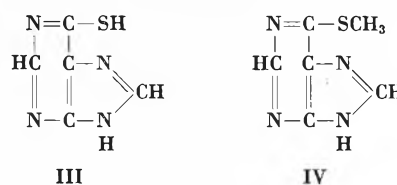
Ein Beispiel eines Carcinogens<sup>7</sup> zeigt die Bedeutung von Stoffwechselveränderungen. Die Verbindung  $\beta$ -Naphthylamin I wird in das  $\gamma$ -Hydroxy-Derivat II umgewandelt, eine Verbindung, welche in Säugetieren Blasen-tumore hervorruft.



Es wurde durch CHENOWETH<sup>7</sup> gezeigt, daß II ein Chelatbildner ist, so daß diese Eigenschaft für die carcinogene Wirkung verantwortlich gemacht werden könnte.

Wenn die Antitumoreigenschaften des 6-Mercaptopurins III tatsächlich auf seine chelatbildenden Eigenschaften zurückzuführen sind, so sollte, wie FURST betonte, die Substitution des Wasserstoffs durch eine Methylgruppe an der Sulfhydrylgruppe IV die Antitumoreigenschaften aufheben, was tatsächlich festgestellt wurde.

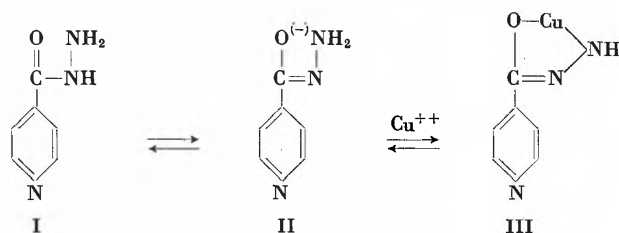
<sup>27b</sup> A. FURST, private Mitteilung, 1956.



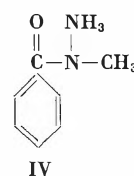
Es gibt natürlich viele Beispiele von Drogen, bei welchen der Ersatz eines H durch eine Methylgruppe die Eigenschaften völlig verändert, obwohl sie Chelatreaktionen zeigen. Die Wirkung chelatbildender Eigenschaften bei Antitumordrogen steckt noch ganz im spekulativen Stadium. Es ist jedoch ein zusätzlicher Parameter, der einer näheren Untersuchung wert ist – wie das auch für andere Beispiele gilt, die in dieser Arbeit erwähnt werden.

2. Isoniazid und Tuberkulose

Die chelatbildenden Eigenschaften vieler Tuberkulosemedikamente wurden schon vor vielen Jahren entdeckt. Eines der wirkungsvollsten Medikamente ist Isoniazid (Isonicotinylhydrazid), I, das in ein Anion II verwandelt



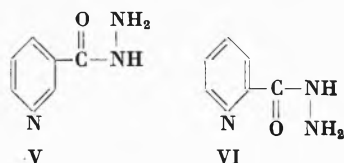
wird. Dieses ist befähigt, mit Kationen, wie  $\text{Cu}^{++}$ , Chelate (III) zu bilden. Es konnte *in vitro* bewiesen werden, daß die Aktivität von Isoniazid durch Kupferionen vergrößert wird<sup>28</sup>. Wenn das Metallchelate eine Rolle spielt, so sollte die Verbindung 1-Isonicotinyl-1-Methylhydrazin IV inaktiv sein, da sie kein Anion entsprechend II bilden kann. Das hat sich auch tatsächlich erwiesen<sup>29</sup>.



Daß bei der Wirkung von Isoniazid auch andere Faktoren als Chelatbildung eine Rolle spielen, wurde durch ALBERT<sup>29</sup> betont. Er bestimmte die Stabilität der Bindung von Isoniazid und verwandten Verbindungen zu Metallen und verglich ihre antituberkulöse Wirkung. Er fand z. B., daß Nicotinhydrazid V biologisch unwirksam ist, aber etwa die gleiche Affinität für Metalle hat, währenddem Picolinhydrazid VI nur ein Achtel der Wirksamkeit von Isoniazid aufweist, jedoch eine  $10^3$ - bis  $10^5$ -fache Affinität für Metalle zeigt.

<sup>28</sup> E. SORKIN, W. ROTH und H. ERLIENMEYER, *Experientia* 15 (1951) 64.

<sup>29</sup> A. ALBERT, *Nature* 177 (1956) 525.



Es ist offensichtlich, daß eine spezifische Eigenschaft vorhanden sein muß, welche an den organischen Teil des Moleküls gebunden ist, die möglicherweise damit zusammenhängen kann, daß das Metallchelate zum Enzym «passen» muß. Zusätzlich ist zu sagen, wie in Abschnitt V diskutiert werden soll, daß die Größe der Bindungskonstante nicht notwendigerweise ein Maß für die physiologische Wirksamkeit bildet, sondern eher die relativen Bindungsverhältnisse zwischen Metall und Verbindung einerseits und Enzym andererseits. Deshalb ist es durchaus möglich, daß ein weniger stabiles Chelat physiologisch aktiver sein kann als ein stabileres.

### 3. Blutdrucksenkende Eigenschaften

Es ist bekannt, daß alle blutdrucksenkenden Mittel, welche die autonomen Nerven nicht blockieren, sowohl beim Menschen wie beim Tier metallbindende Substanzen, wie Thiocyanate, Mercaptane und Thiohydrazine, sind<sup>30</sup>.

Mehrere gut bekannte Chelatbildner waren sowohl allein wie mit metallischem Eisen wirksam, speziell EDTA. Die Hypothese, welche von SCHROEDER und PERRY<sup>30</sup> aufgestellt wurde, erwähnt einige Punkte von allgemeinem Interesse:

“. . . Free chelates bound one or more trace metal ions in the bodies of rats with a resultant antihypertensive effect. As the association between the chelate and the different metals increased, it eventually became sufficiently tight that the active endogenous metal was no longer bound. Such chelates were inert. The predicted  $\log K_2$  value for ethylenediamine tetraacetate of such an endogenous metal is slightly more than 16 since this value corresponds to the change between an antihypertensive effect and vaso-inactivity. Since the transition and near-by metals are bound by several antihypertensive agents as well as by ethylenediamine tetraacetate, it is logical to search among them for a possible exogenous or endogenous metal as being concerned with vasospasm . . . it is evident that the calcium, chromous, manganous, and cobaltous chelates with a  $\log K_2$  value of less than 16.2 were active and that the cupric, zinc, and ferric chelates with higher  $\log K_2$  values were inert.

“. . . the metal chlorides themselves were given, for it is known, for example, that cobalt ion is a vaso-dilator and vanadium a vasoconstrictor substance. It is important to our concept that chromous and manganous ions were not depressant although their chelates were, so that for the first pair of transition metal chelates, at least, the antihypertensive effect was not due to liberation of the injected metal . . .”

<sup>30</sup> H. A. SCHROEDER u. H. M. PERRY, *J. Lab. Clin. Med.* 46 (1955) 416.

Diese Schlußfolgerungen über die Aktivität der Metallchelate mögen nicht unter allen Bedingungen gelten; z. B. wäre es interessant gewesen, wenn das Verhältnis von Chelatbildner zu Metallion verändert worden wäre. Es ist vorstellbar, daß Chelate, welche einen  $\log K_2$ -Wert kleiner als 16,2 haben, durch Zugabe von größeren Mengen an Chelatbildner bei konstanter Metallionenkonzentration unwirksam in Hinsicht auf ihre blutdrucksenkende Wirkung geworden wären. Es ist ferner nicht notwendigerweise richtig, anzunehmen, daß die Injektion freier Kationen eine maximale Konzentration von freien Metallionen bewirkt. Tatsächlich kann der Anteil an freien Metallionen im Organismus um ein Mehrfaches erhöht werden, wenn man ein Chelat verwendet, da ungebundene Kationen rasch in Protein- und Hydroxykomplexe umgewandelt werden können. Man vergleiche z. B. die Unwirksamkeit freier Eisenionen im Gegensatz zu Eisenchelatekomplexen bei der Behandlung von Eisenmangel in Pflanzen<sup>31</sup>.

### 4. Laxantia

Vielfach wurde versucht, die abführenden Eigenschaften einer organischen Verbindung mit der chemischen Struktur in Zusammenhang zu bringen<sup>32,33</sup>. Im Falle der Phenolphthaleine und Hydroxyanthrachinone drängt sich bei der Untersuchung der Beziehung zwischen laxierenden Eigenschaften und chemischer Struktur die Vermutung auf, daß die Chelatbildungsfähigkeit ein wichtiger Faktor sein könnte. Es ist denkbar, daß die Rolle der sogenannten organischen «irritierenden» Abführmittel, d. h. diejenigen, welche die motorische Aktivität des Verdauungskanales vergrößern, darin besteht, daß sie Spurenmetalle an der Darmwand binden. Die Gründe, welche vermuten lassen, daß Chelatbildung und abführende Eigenschaften bei den oberwähnten Verbindungen verknüpft sind, sind die folgenden:

1. Die aktiven Verbindungen enthalten freie phenolische Hydroxylgruppen. Wenn eine oder alle Hydroxylgruppen einer Verbindung mit abführenden Eigenschaften entfernt werden, so zeigt das Produkt keine oder abgeschwächte laxierende Eigenschaften.

2. Wenn eine oder beide OH-Gruppen veräthert und speziell wenn sie verestert sind, so wird die laxierende Wirkung abgeschwächt oder aufgehoben.

Andere Veränderungen, welche die Chelatbildung fördern sollten, vermindern manchmal die laxierenden Eigenschaften. Bevor jedoch mehr über die Biochemie der Stoffwechselforgänge bekannt ist, kann oft nicht beurteilt werden, ob ein anomales Verhalten vorliegt, da im Stoffwechselprozeß Gruppen zu einem Molekül gefügt oder entfernt werden können, die direkt einen Einfluß auf die Chelatbildung haben können.

<sup>31</sup> J. STEWART und C. D. LEONARD, *Science* 116 (1952) 564.

<sup>32</sup> S. LOEWE, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut* 94 (1948) 288.

<sup>33</sup> M. H. HUBACHER, S. DOERNBERG und A. HOMER, *J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 42 (1953) 23.



#### IV. Chelatbildung und Metallaktivierung bei Enzymen

##### a) Nichtenzymatische Katalyse und Metallpartner bei der Proteinbindung

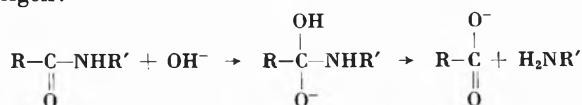
Die enzymatische Aktivität erfordert häufig die Anwesenheit von kleinen Mengen eines Metallions<sup>34</sup>. Es ist postuliert worden, daß ihre Funktion darin besteht, eine Brücke zwischen dem Substrat und dem Enzym zu bilden, so daß ein ternärer Komplex entsteht. Der Beweis, daß Metalle an solchen Vorgängen teilnehmen, konnte erbracht werden, indem bei gewissen Experimenten kleine Moleküle durch Proteine gebunden wurden, welche normalerweise keine oder kleine Affinität zu den gleichen Molekülen zeigen<sup>16, 35, 36</sup>.

Beim gewöhnlich postulierten Mechanismus der Aktivierung eines Enzyms durch ein Metallion wurde, wie dies KLOTZ betonte, das Hauptgewicht auf die Bildung von Chelaten zwischen den Metallionen und dem Substrat als Voraussetzung für die enzymatische Aktivität gelegt. In Anbetracht der nun folgenden Tatsachen ist es jedoch schwierig, an einem solchen Standpunkt festzuhalten<sup>35</sup>:

a) Die am häufigsten anzutreffenden Aktivatoren sind  $Mn^{++}$  und  $Mg^{++}$ ; diese zwei Ionen stehen jedoch am Ende der Liste der Metallionen, welche sich zur Chelatbildung eignen.

b) Die Produkte der Peptidhydrolyse sind im allgemeinen stärkere Chelatbildner als die Ausgangsprodukte.

Bei einer Betrachtung über die enzymatische Hydrolyse der Amide und Peptide durch Peptidasen kam KLOTZ zum Schluß, daß das Metallion wegen seiner stark positiven Ladung die lokale Konzentration der  $OH^-$ -Ionen vergrößert und den Übergangszustand durch Bildung eines Komplexes mit der aktivierten Form des Substrates stabilisiert, wie dies die folgenden Formeln zeigen:



Man kann sich (nach KLOTZ und MING<sup>35</sup>) den metallstabilisierten, aktivierten Zustand bei der enzymatischen Hydrolyse der Peptide wie folgt vorstellen:

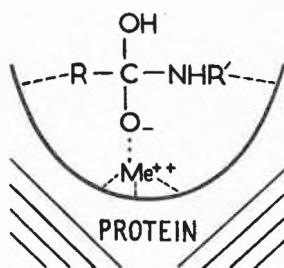


Abb. 1

<sup>34</sup> A. L. LEHNINGER, *Physiol. Rev.* 30 (1950) 393.

<sup>35</sup> I. M. KLOTZ und W. C. LOH MING, *J. Amer. Chem. Soc.* 76 (1954) 805.

<sup>36</sup> B. G. MALMSTROM, *Arch. Biochem. Biophys.* 58 (1955) 398.

Das Kation zieht, dank seinem elektrostatischen Effekt, Elektronen von der C-N-Bindung weg und bewirkt so die Hydrolyse.

Der Grund für die außerordentliche Stellung von  $Mn^{++}$  und  $Mg^{++}$  als Aktivatoren der Peptidasen wird der Tatsache zugeschrieben, daß sie unter den schwächsten Koordinatoren figurieren und deshalb  $OH^-$  genügend schwach binden, um die Stabilisierung des aktivierten Komplexes durch die Bildung einer weiteren Bindung zu erlauben.

Kationen wie  $Cu^{++}$  bilden mit  $OH^-$  so stabile Bindungen, daß es unwahrscheinlich ist, daß sie noch irgendwelche freie Koordinationsstellen besitzen, vor allem bei pH 8–9.

Das vorgeschlagene Bild liefert eine einfache Erklärung für die Forderungen, welche erfüllt sein müssen, damit eine Bindung zwischen Metall und spezifischem Protein zustande kommt. In Abwesenheit eines Proteins wird die Gegenüberstellung des Metalles und Substrates relativ ungewöhnlich sein.

Bei einem nichtenzymatischen Reaktionsmodell wird der katalytische Effekt der Metallionen bei der Decarboxylierung über Chelatbildung erklärt. Das gebundene Metall bringt eine positive Ladung auf den Carbonylsauerstoff, wo die Ladung als Elektronensauger wirkt und dadurch die Decarboxylierung bewirkt<sup>37</sup>.

Eine interessante Aussage von WESTHEIMER lautet, daß durch die Chelatbildung die positive Ladung in eine günstige Lage gebracht werden kann und daß, weil die Metallionen mehrwertig sind, eine höhere positive Ladung an den Reaktionsort gebracht werden kann, als dies durch ein Proton möglich ist. Zudem kann ein Metallion beim physiologischen pH als Katalysator wirken. "Metal-ion catalysis can perhaps be described as superacid catalysis in neutral solution."<sup>37</sup>

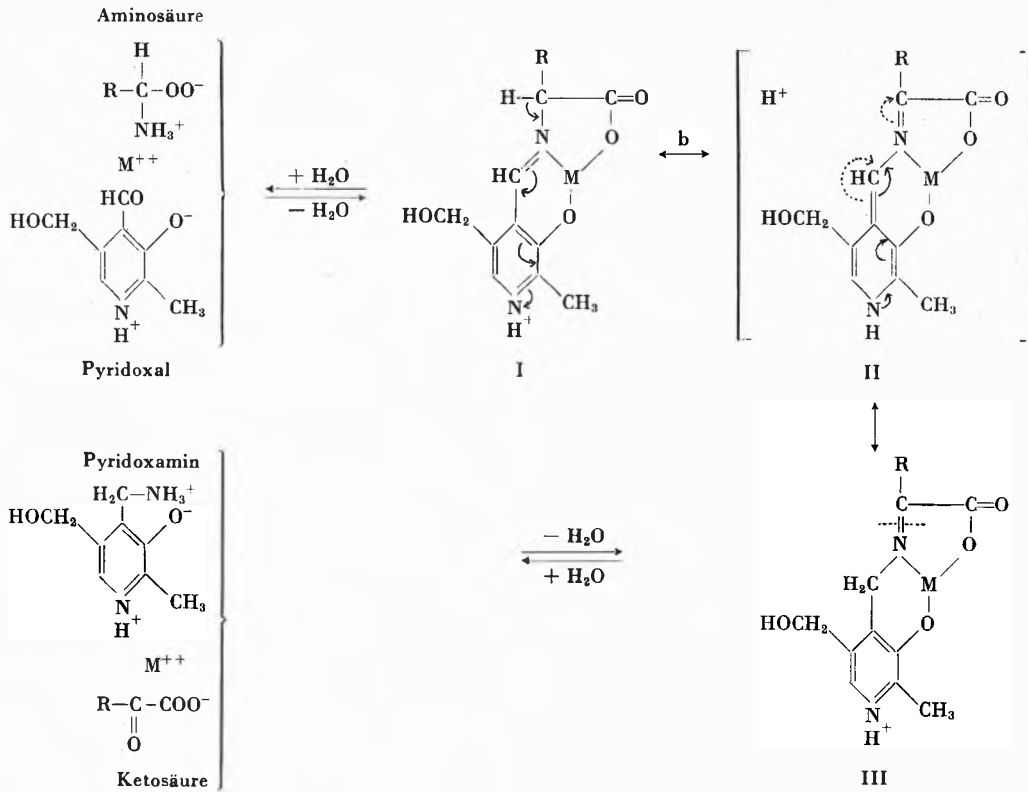
Bei nichtenzymatischen Transaminierungsreaktionen konnte gezeigt werden, daß Metallionen unweigerlich als Katalysatoren anwesend sein müssen, was in der Formel auf der nächsten Seite oben gezeigt wird<sup>38</sup>. Es ist leicht einzusehen, daß sowohl bei der Decarboxylierung als auch bei der Transaminierung solche Metalle die wirkungsvollsten Katalysatoren sein müssen, welche die stabilsten Chelate bilden. Im Falle der enzymatischen Decarboxylierung von Oxalessigsäure ist das wirkungsvollste Kation  $Mn^{++}$ , trotz seiner relativen Wirkungslosigkeit in der nichtenzymatischen Decarboxylierung<sup>39</sup>. Scheinbar wirkt das Enzym so, daß es die Aktivität des Metallions vergrößert. Daß kovalent gebundene Metalle, z. B. in Metallchelaten, wirkungsvollere Katalysatoren sind als das freie Metallion, konnte in verschiedenen Fällen auffallend demonstriert werden, so bei der metallkatalysierten Oxydation von Cyclohexen<sup>40</sup> und

<sup>37</sup> F. W. WESTHEIMER, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Series II, 18 (1955) 15.

<sup>38</sup> J. B. LONGENECKER und E. E. SNELL, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 42 (1956) 221.

<sup>39</sup> R. STEINBERGER und F. H. WESTHEIMER, *J. Amer. Chem. Soc.* 73 (1951) 429.

<sup>40</sup> A. J. CHALK und J. F. SMITH, *Nature* 174 (1954) 802.



bei der Förderung von Decarboxylierungen durch Pyridin, welches Kupfer komplex bindet, ohne seine Ladung abzuschirmen<sup>39</sup>.

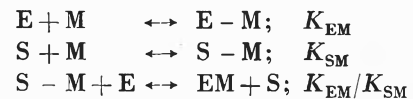
#### b) Der ternäre Komplex und Enzymaktivierung

Das Beweismaterial, welches bis jetzt vorliegt, scheint darauf hinzuweisen, daß die Aktivierung einer enzymatischen Reaktion durch ein Metallion, durch die Bildung eines ternären Komplexes vor sich geht. Die Diskussion soll auf Enzyme beschränkt bleiben, die locker gebundene Metallionen enthalten, d.h. auf solche, die während der Reinigung ihre Aktivität verlieren, deren Aktivität jedoch durch Hinzufügen geeigneter Kationen zurückgehalten werden kann. Sie unterscheiden sich also von der Kategorie der Metallenzyme wie Cytochrom und Kohlensäureanhydrase, bei denen das Metallion nicht durch irgendein anderes Kation ersetzt werden kann, ohne den Verlust der Aktivität zur Folge zu haben. Ferner wird von einer Bindungskonstanten für ein Enzym oder Substrat gesprochen werden, welche der Massenwirkungskonstante entspricht. Es werden folgende Annahmen getroffen:

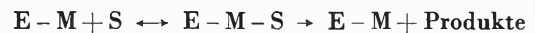
1. Die Bindungskonstanten beziehen sich hauptsächlich nur auf diejenigen prosthetischen Gruppen, welche an der enzymatischen Katalyse teilnehmen.

2. Die Reaktionsprodukte sind schwächer an das aktivierende Metall gebunden als das ursprüngliche Substrat. Andernfalls würde die enzymatische Reaktion durch das gebundene Reaktionsprodukt verhindert, das auf der aktiven enzymatischen Stelle als ternärer Komplex bleiben würde. Ein Beispiel für einen solchen Fall

stellt die Inaktivierung der Dissimilation von Citrat zu Oxaloacetat und Acetat dar, der durch ein aktiviertes Enzym, als Resultat einer Chelatringbildung zwischen Oxaloacetat und dem aktivierenden Metallion, bewirkt wird<sup>41</sup>. Es soll M das freie Metallion, E das freie Enzym und S das Substrat darstellen. Darnach kann die folgende Reaktion stattfinden:



Die Bildung eines ternären Komplexes und seine nachfolgende Dissoziation kann dann wie folgt dargestellt werden:



Gewisse Enzyme werden durch Metallionen blockiert, die sehr stark mit einer funktionellen Gruppe reagieren, die für ihre Aktivität benötigt wird, wie z.B. die Blockierung von Enzymen, die zur Ausübung ihrer Aktivität der SH-Gruppe bedürfen, durch Cu oder die Blockierung der Saccharase durch Ag<sup>+</sup>, welche eine sehr starke Bindung mit den -COOH-Gruppen im Enzym eingehen. In diesen recht häufigen Fällen, wo  $K_{\text{EM}} \gg K_{\text{SM}}$  ist, ist das Substrat nicht in der Lage, die koordinativen Bindungen des Metalles zu verschieben oder zu ersetzen, mit denen es an die aktive funktionelle Gruppe gebunden ist.

Die Zugabe eines Chelatbildners A zum Medium, für das  $K_{\text{AM}} \gg K_{\text{EM}}$  gilt, reaktiviert das Enzym. Diese Reaktionsart kann wie folgt geschrieben werden:

<sup>41</sup> S. DAGLEY und E. A. DAWES, *Nature* 175 (1955) 550.



Solche Konkurrenzreaktionen, welche durch die Gleichungen des Massenwirkungsgesetzes behandelt werden können, sind benützt worden, um die Stabilitätskonstante des komplexen Ions MA zu messen. So wurde zum Beispiel die Stabilität von Be-Komplexen mit Salicylsäure gemessen unter Benützung der Fähigkeit der Salicylsäure, die Be-induzierte Blockierung der alkalischen Phosphatase aufzuheben<sup>6,19</sup>.

Betrachten wir nun diejenigen Enzyme, welche ein oder mehrere spezifische Metallionen benötigen, um wirksam zu funktionieren. Wenn nun  $K_{EM} \gg K_{SM}$  oder  $K_{EM} \ll K_{SM}$  ist, kann das Metallion nur kleine oder keine Wirkung haben, da es im wesentlichen ausschließlich an einen Partner des ternären Komplexes allein gebunden ist. Wenn es allein an das Enzym gebunden ist, können Blockierungen, wie sie oben beschrieben wurden, resultieren. Ist jedoch das Metall gänzlich an das Substrat gebunden, dann ist das Enzym nicht in der Lage, mit dem Substrat in Kontakt zu kommen.

Es wird postuliert, daß optimale enzymatische Aktivierung erreicht wird, wenn das Metallion annähernd gleiche Bindungsaffinität für das Enzym wie für das Substrat besitzt, oder mit anderen Worten, wenn  $K_{EM} \cong K_{SM}$ . Experimentelle Untersuchungen, welche diese Hypothese überprüfen sollten, vor allem, ob Metallionaktivierung bei den Enzymen auch bei locker gebundenen Metallionen erfolgt, ergaben, daß das Verhältnis  $K_{EM}/K_{SM}$  sich 1 als Grenze nähert.

Daten sowohl für  $K_{EM}$  und  $K_{SM}$  sind bei einer Untersuchung des Einflusses von Metallionen an einem kristallisierten Enzym, Enolase, gemessen worden. Als Substrat wurde DL-2-Phosphorglycerinsäure verwendet (PGA)<sup>42</sup>. Die Werte für  $K_{EM}$  und  $K_{SM}$  und die relative Aktivität der Enolase bei Anwesenheit verschiedener Metallionen sind in Tab. 1 dargestellt. Aus den Werten  $K_{EM}/K_{SM}$  müßte geschlossen werden, daß als Aktivatoren  $Mg^{++}$ ,  $Zn^{++}$  und  $Mn^{++}$  in Frage kommen, was mit den experimentellen Beobachtungen übereinstimmt.

Die soeben zitierte Hypothese ist natürlich spekulativ, aber es läßt sich nicht beweisen, daß die gefundenen Zusammenhänge zufällig sind. Die Wahrscheinlichkeit z. B., daß man von Tab. 1 die drei richtigen Metalle aus den sieben wählen würde, ist 1 : 35, ohne Berücksichtigung der Reihenfolge der Aktivitäten innerhalb der aktiven Gruppe. Mit dem FISHER-Test<sup>43</sup> kann gezeigt werden, daß die Wahrscheinlichkeit, daß diese Zusammenhänge zufällig sind, nur 1 : 50 ist, oder kleiner, wenn man mehr Metalle in die Liste aufnimmt<sup>44</sup>. Es ist möglich, die Hypothese auf andere Art zu stützen, man tut aber besser daran, weitere experimentelle Resultate abzuwarten.

<sup>42</sup> B. G. MALMSTROM, *Arch. Biochem. Biophys.* 58 (1955) 381.

<sup>43</sup> O. L. DAVIES, *Statistical Methods in Research and Production*, London 1954.

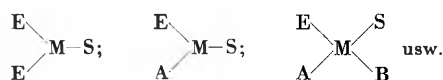
<sup>44</sup> Ich bin Herrn PD Dr. E. HEILBRONNER, Chemisches Institut der ETH, Zürich, für die statistische Berechnung der erwähnten Resultate sehr zu Dank verpflichtet.

Tab. 1. Die Wechselwirkungen der Enolase mit Metallionen\*

Metallion	$K_{EM}$	$K_{SM}$	Aktivität der Enolase relativ zum E-Mg-S-Komplex	$K_{EM}/K_{SM}$
$Mg^{++}$	$10^{3,5}$	$10^{2,9}$	1,00	4
$Zn^{++}$	$10^{5,3}$	$10^{4,4}$	0,30	8
$Mn^{++}$	$10^{4,4}$	$10^{3,5}$	0,29	8
$Fe^{++}$	$10^5$	$\sim 10^{3,3}$	$\sim 0,09$	50
$Ca^{++}$	$10^{4,2}$	$10^{2,7}$	0	30
$Ni^{++}$	$10^{4,6}$	$10^{3,1}$	0	30
$Be^{++}$	$10^{2,8}$	$10^1$	0	60

\* Mit Ausnahme der letzten Kolonne stammen die tabellierten Werte, von wenigen Ausnahmen abgesehen, von MALMSTROM<sup>42</sup>.

Wenn wir von ternären Komplexen sprechen, so schließen wir auch Fälle ein, bei denen mehrere Substanzen Teil des Komplexes sein können, so z. B.



In solchen Fällen können die zusätzlichen Enzyme oder Moleküle A und B wohl den katalytischen Effekt für das primäre Enzym modifizieren, aber man ist trotzdem in der Lage, von einer durchschnittlichen Bindung aller Moleküle auf der linken und rechten Seite des Metallions im ternären Komplex zu sprechen.

## V. Der ternäre Komplex und die Drogenwirkung

Die Wirkungen von Drogen, welche Chelatbildung einschließen, können nicht nur durch den absoluten Wert für die Chelatbindungskonstante beurteilt werden, wie in der Einführung bereits betont wurde. Wenn wir annehmen, daß diese Drogen durch Bildung ternärer Komplexe wirken, müssen wir die relativen Werte von mindestens zwei Bindungskonstanten berücksichtigen – diejenigen zwischen der Droge und dem Enzym und diejenigen zwischen der Droge und dem Metallion. Wenn man daher die Chelatbildungsfähigkeit einer Droge verändert und versucht, die Bindungskonstante mit ihrer biologischen Aktivität in Einklang zu bringen, kann man daher augenscheinliche Widersprüche erwarten. Dies war die Situation beim Antituberkulosemittel Isoniazid, das im Abschnitt III besprochen wurde.

Wenn man also annimmt, daß die Wirkung der Droge die Bildung eines ternären Komplexes einschließt, ist es verständlich, daß eine Droge mit kleinerer Bindungskonstanten für ein spezifisches Metallion (gemessen unter physiologischen Bedingungen) aktiver ist als eine modifizierte Form der Droge mit einer größeren Bindungskonstante. Die umgekehrte Situation kann auch eintreten, so daß es verständlich ist, daß zwei Drogen die gleiche biologische Aktivität, aber verschiedene Bindungskonstanten haben. Das kann leicht aus Abb. 2.

entnommen werden, nach welcher eine optimale Bindungsaffinität einer Droge für ein bestimmtes Metall existiert. Kleinere oder größere Werte ergeben verminderte biologische Aktivität. Wenn die Hypothese, wie sie in Abb. 2 illustriert ist, gilt, dann können einige praktische Anwendungen gemacht werden. Hat eine

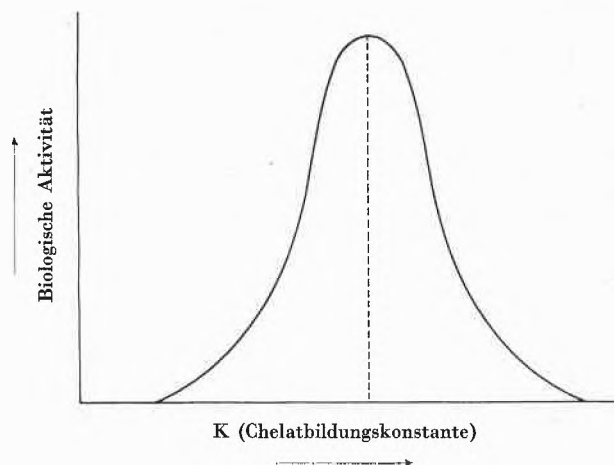


Abb. 2. Angenommene Veränderungen der biologischen Aktivität einer Droge in bezug auf ihre Chelierungsstärke  $K$  (Chelatbildung)

Droge z. B. eine Wirkung, die auf ihren chelatbildenden Eigenschaften beruht, so stellt sich die Frage, wie das Molekül modifiziert werden soll, um eine verbesserte oder aktivere Droge zu erhalten. Zuerst würde man kleine Änderungen an der Gruppierung vornehmen, welche für die Chelatbildung verantwortlich ist, um die Metallbindungsaffinität so zu ändern, daß das Optimum an biologischer Aktivität erreicht wird. Wir nehmen an, daß der Wert dieser Bindungskonstanten, die dem Op-

timium der biologischen Aktivität entspricht, ungefähr gleich sei wie zwischen Droge und Enzym. Zweitens würde man die andern Eigenschaften der Droge ändern, wie Löslichkeit, Größe, Form, Volumen usw., und zwar so, daß die Metallbindungsaffinität annähernd gleich bleibt. Diese zweiten Änderungen haben zum Zweck, Eigenschaften wie Kontakt zwischen Droge und Enzym und Erleichterung der Membranpenetration zu erreichen.

Wenn man die angegebenen Richtlinien verfolgt, muß man vorsichtig sein. Vergleicht man die Metallbindungsaffinität einer Droge mit andern Drogen, um eine Kurve zu erhalten, wie sie in Abb. 2 geschildert wird, so sollten alle geprüften Drogen ähnlicher Struktur sein und, was wichtiger ist, die Änderungen am Molekül, um die chelatbildenden Eigenschaften zu modifizieren, sollten nur an der funktionellen Gruppe gemacht werden. Eine Verschiebung der funktionellen Gruppe oder Gruppen in eine andere Lage im Molekül, relativ zu andern Gruppen, kann ebenfalls eine aktive Droge geben. In diesem Fall sollte die neue Droge jedoch nur mit Drogen der gleichen Struktur verglichen werden. Ist die chelatbildende Gruppe z. B. eine Seitenkette am Benzolring, dann sollten die Veränderungen der Chelatbildungsfähigkeit an der Seitenkette erreicht werden. Wenn die Seitenkette an einem Cyclohexanring steht, dann handelt es sich um eine andere Sorte Drogen, und die hier erhaltenen Chelatbildungskonstanten können nicht ohne weiteres mit denjenigen der Drogen verglichen werden, die ihre chelatbildende Gruppe an einem Benzolring haben.

Selbstverständlich ist alles, was in diesem Abschnitt dargelegt wurde, spekulativ, aber es wird sehr interessant sein, Versuchsreihen zu entwickeln, um die Hypothesen im Detail zu studieren.