

KFK-338

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

April 1965

Gesellschaft für Kernforschung m.B.H.
Zentralbücherei

KFK 338

Institut für Strahlenbiologie

Vergleichende Untersuchungen über die Toxizität der Ca- und Zn(II)-Chelate
der Diäthylentriaminpentaessigsäure

A. Catsch, E. von Wedelstaedt

Neue Möglichkeiten der Chelat-Therapie der Hämosiderose

Du Khuong Lê



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.

KARLSRUHE

Vergleichende Untersuchungen über die Toxizität der Ca- und Zn(II)-Chelate der Diäthylentriaminpentaessigsäure

In früheren Untersuchungen^{1,2} stellten wir eine im Vergleich zum Ca-Chelat der Diäthylentriaminpentaessigsäure (DTPA) geringere Toxizität der Zn(II)-DTPA fest; Angaben über das Verhältnis der toxischen Dosen konnten jedoch nicht gemacht werden. Bei der Dekoration von Radionucliden (⁹¹Y, ¹⁴⁴Ce) zeigten dagegen beide Chelate keine wesentlicheren Effektivitätsunterschiede³. In der vorliegenden Untersuchung sollten die toxischen Dosen der Ca- und Zn(II)-DTPA bestimmt werden, deren Kenntnis für die wegen des höheren therapeutischen Index in Frage kommende praktische Verwendung der Zn(II)-DTPA naturgemäss von Interesse ist.

Verschiedene Dosen der Chelate⁴ wurden Männchen des NMRI-Mäuseinzuchtstammes (mittleres Gewicht 27 g) intraperitoneal täglich injiziert, bis die Letalität 100% bzw. (im Falle wenig toxischer Dosen) ca. 50% betrug. Das injizierte Volumen betrug 0,5–1 ml.

Bei Auftragen des Probits der kumulativen Letalität gegen den Logarithmus der zu verschiedenen Zeitpunkten erreichten Gesamtdosen erhält man Dosis-Effekt-Kurven, die in keinem Fall statistisch signifikante Abweichungen von der Linearität aufweisen. Die berechneten⁵ LD₅₀-Werte verhalten sich umgekehrt proportional zur Höhe der Einzeldosis (Tabelle). Die somit vorliegende Nicht-additivität einzelner Chelatdosen ist auf das Wirksamwerden eines Erholungsprozesses zurückzuführen, der bereits früher aufgrund anderer Befunde^{2,6} postuliert werden musste. In die gleiche Richtung weist auch die Zunahme der Neigung der Dosis-Effekt-Kurven mit wachsender Ca-DTPA-Einzeldosis (Figur 1).

Die früher² gefundene geringere Toxizität des Zn(II)-Chelats konnte bestätigt werden, jedoch war Ca-DTPA in der vorliegenden Untersuchung weniger toxisch als früher festgestellt. Als Ursache für diese Diskrepanz kam das im Vergleich zur früheren Untersuchung geringere Körpergewicht der Tiere insofern in Frage, als bei Ratten eine

ausgeprägte positive Korrelation zwischen Körpergewicht und Chelattoxizität vorliegt². Diese Vermutung konnte bestätigt werden: Bei 35 g schweren Mäusen betrug die LD_{50} nach taglicher Verabreichung von $5 \text{ mM} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ $14,8 \text{ mM} \cdot \text{kg}^{-1}$ im Vergleich zu dem wesentlich höheren Wert bei leichteren Tieren (vgl. Tabelle).

Die Abhängigkeit der der LD_{50} entsprechenden Zahl der Einzeldosen von der Höhe der Einzeldosis kann bei beiden Chelaten, zumindest in einem grösseren Dosisbereich, durch parallele Gerade wiedergegeben werden (Figur 2). Die bei höheren Ca-DTPA-Dosen unverkennbare Abweichung von der linearen Abhängigkeit wurde bereits früher gefunden² und damit erklärt, dass die durch den Chelatbildner gesetzten Schäden eine gewisse Zeit beanspruchen, ehe sie zum letalen Ausgang führen, so dass die während dieser Zeit applizierten Dosen zum Effekt nichts mehr beitragen, wohl aber in die LD_{50} -Werte eingehen. Dass ein analoges Verhalten im Falle der Zn(II)-DTPA vermisst wird, kann als Hinweis für einen anderen, eventuell mit der hohen Konzentration der injizierten Lösungen zusammenhängenden Mortalitätsmechanismus höherer Zn(II)-DTPA-Dosen aufgefasst werden; dafür sprächen auch die im Vergleich zu Ca-DTPA grosseren Regressionskoeffizienten (Figur 1).

Was das Verhältnis der toxischen Dosen beider Chelate betrifft, so sind, wie die Figur 2 zeigt, zwei grundsätzlich

Kumulative LD_{50} und Mutungsgrenzen für $P = 0,05$ in Abhängigkeit von der Art des Chelats und der Höhe der Einzeldosis. Je 25 Mäuse pro Gruppe

Chelat	Einzeldosis ($\text{mM} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	LD_{50} ($\text{mM} \cdot \text{kg}^{-1}$)
$\text{Na}_2\text{Zn-DTPA}$	10	111 (85–145)
$\text{Na}_3\text{Zn-DTPA}$	14,1	48 (39– 59)
$\text{Na}_2\text{Zn-DTPA}$	20	23 (19– 28)
$\text{Na}_3\text{Ca-DTPA}$	2,5	114 (47–276)
$\text{Na}_3\text{Ca-DTPA}$	3,55	81 (67– 98)
$\text{Na}_2\text{Ca-DTPA}$	4	43 (36– 51)
$\text{Na}_3\text{Ca-DTPA}$	5	37 (30– 47)
$\text{Na}_3\text{Ca-DTPA}^*$	7	32 (29– 37)

* 20 Tiere.

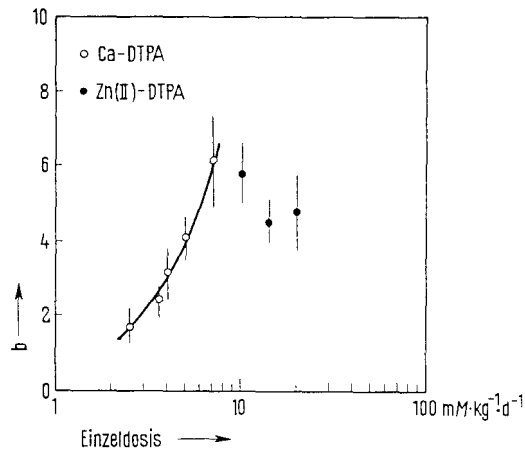


Fig. 1. Abhängigkeit des Regressionskoeffizienten b der Dosis-Effekt-Kurven von der Art des Chelats und der Höhe der Einzeldosis. Einfache Standardfehler

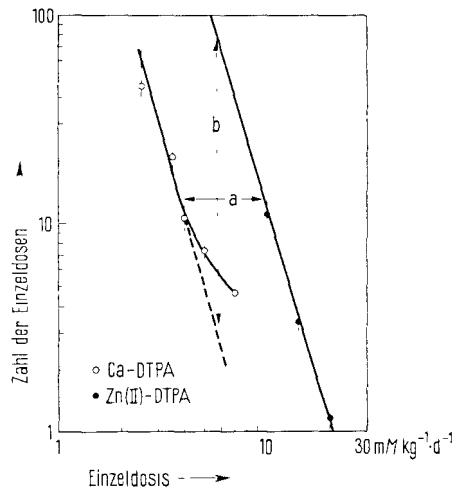


Fig. 2. Abhängigkeit der Zahl der Einzeldosen ($LD_{50}/mM \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$) von der Art des Chelats und der Höhe der Einzeldosis. Einfache Standardfehler. Bezüglich der Vergleiche (a) (b) s. Text

verschiedene Vergleichsmöglichkeiten gegeben: (a) Bei einer vorgegebenen Zahl von Chelatapplikationen muss zur Erreichung des gleichen toxischen Effekts die Einzeldosis der Zn(II)-DTPA 2,5mal grösser als bei Ca-DTPA sein. (b) Bei gleicher Höhe der Einzeldosen dagegen muss die Zahl der Zn(II)-DTPA-Applikationen um rund das 30fache erhöht werden. Die in (a) und (b) angegebenen Quotienten müssen insofern als Mindestwerte angesehen werden, als nach dem oben Gesagten die Möglichkeit besteht, dass die Toxizität der Zn(II)-DTPA in dem untersuchten Dosisbereich z. T. unspezifischer Art ist.

Die Erhöhung des therapeutischen Index ist somit nur im Falle (b) ausreichend gross, um die Verwendung der Zn(II)-DTPA in Erwägung ziehen zu können. Anders ausgedrückt, wird das Zn(II)-Chelat nur dann Vorteile bieten, wenn eine über längere Zeit fortgesetzte Chelatmedikation indiziert ist.

Summary. The lethal effect of daily intraperitoneal administrations of Ca-DTPA and Zn(II)-DTPA was studied in mice. Due to recovery processes, single chelate doses are non-additive and the cumulative LD₅₀ increases with decreasing daily dosage. At a given number of administrations, Zn(II)-DTPA is 2.5 times less toxic than Ca-DTPA. However, if the daily dosage is kept constant and the number of administrations variable, Zn(II)-DTPA is 30 times less toxic.

A. CATSCH und E. VON WEDELSTAEDT

*Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum
Karlsruhe (Deutschland), 4. Dezember 1964.*

¹ A. CATSCH, in *Strahlenschutz in Forschung und Praxis*, Bd. 3 (Freiburg i. Br. 1963), p. 183

² A. CATSCH, *Arch. exp. Path. Pharm.* 216, 316 (1964).

³ A. CATSCH, D. KH. LÉ und D. CHAMBAULT, *Int. J. Rad. Biol.* 8, 35 (1964).

⁴ Für die Überlassung der Substanzen danken wir der J. R. Geigy AG, Basel.

⁵ D. J. FINNEY, *Probit Analysis* (Cambridge 1952).

⁶ V. NIGROVIĆ, *Arch. exp. Path. Pharm.* 219, 206 (1964).



Sonderdruck aus:

» ARZNEIMITTEL-FORSCHUNG «

» DRUG RESEARCH «

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) **15**, 587—588 (1965)

Editio Cantor / Aulendorf i. Württ.

Aus dem Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

Neue Möglichkeiten der Chelat-Therapie der Hämosiderose

Von

Du Khuong Lê

Aus dem Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe
Neue Möglichkeiten der Chelat-Therapie der Häm siderose

Von Du Khuong Lê

Bei der Chelat-Therapie der Eisenspeicherkrankheit konnten durch die Entwicklung und Einführung bestimmter Substanzen in letzter Zeit wesentliche Fortschritte erzielt werden. Es handelt sich dabei um die Diäthylentriaminpentaessigsäure [e.g. 4] und Desferrioxamin [e.g. 6, 10], die nach den bisherigen Erfahrungen, denen allerdings eine nur verhältnismäßig kleine Zahl untersuchter Chelatbildner zugrunde liegt, als Mittel der Wahl angesehen werden.

Die vorliegende Untersuchung stellt sich die Aufgabe, die Wirksamkeit einer größeren Zahl von Chelatbildnern unter dem Gesichtspunkt ihrer evt. praktischen Verwendung zu prüfen. Da die experimentelle Auslösung einer Häm siderose bei Versuchstieren bekanntlich überaus schwierig ist, wurde die Chelat-Effektivität in folgenden Versuchsarrangements geprüft.

1. Trägerfreies $^{59}\text{FeCl}_3$ wurde gleichzeitig mit $8\ \mu\text{M}$ Chelatbildner (pH 7–8) erwachsenen Ratten des Heiligenberg-Stammes iv. injiziert, die nach 48 h im Körper verbliebene Aktivität mittels eines Ganzkörper-Zählers bestimmt und in % des ^{59}Fe -Gehalts von Kontrolltieren ausgedrückt.

2. Humanserum, dessen Gehalt an freiem Transferrin wir bestimmten [9], wurde mit $^{59}\text{FeCl}_3$ und nach 10 min mit einer dem freien Transferrin äquivalenten Menge von $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ versetzt. Nach weiteren 10 min erfolgte die Zugabe des Chelatbildners in einem molaren Verhältnis zum Gesamttransferrin von 1000:1. Nach 6 h Inkubation bei 37°C und pH 7,4 (Barbital-Puffer) führten wir eine Fällung mit abs. Äthanol durch und bestimmten im Präzipitat, das quantitativ das Transferrin enthält, die ^{59}Fe -Aktivität mittels eines TJ (Tl)-Szintillationskristalls und drückten sie in % von Kontrollpräzipitaten aus.

Untersucht wurden folgende Chelatbildner: Äthylendiamintetraessigsäure (ADTA), Diäthylentriaminpentaessigsäure (DTPA), 2:2'-Bis-[di(carboxymethyl)amino]diäthyläther (BADÄ), Hydroxyäthyläthylendiamintriessigsäure (HADTA), 1:2-Diaminocyclohexantetraessigsäure (DCTA), Bis(2-hydroxycyclohexyl)äthylendiamindiessigsäure (BHCADA), 2-(β -aminoäthoxy)cyclohexylaminotetraessigsäure (ACATA), Äthylendiamindi-(o-hydroxyphenyl)essigsäure (ADDHA) und Desferrioxamin (DFOA). Alle Substanzen mit Ausnahme von DFOA wurden als Calcium-Natrium-Chelate verabfolgt.

Bei dem Versuch in vivo (vgl. Tab.) erwies sich DFOA allen aliphatischen Polyaminosäuren in mehr

Tab.: ^{59}Fe -Aktivität der Ratten (in vivo) und des Transferrins (in vitro), ausgedrückt in % der Kontrolle (Mittelwert \pm Standardfehler). Der Kontrollwert betrug $94,4 \pm 5\%$ der injizierten Aktivität (in vivo) bzw. $99,6 \pm 0,24\%$ (in vitro).

Chelat	% der Kontrolle	
	in vivo	in vitro
ADTA	$80,5 \pm 0,8$	$83,8 \pm 0,5$
DTPA	$60,6 \pm 1,2$	$85,7 \pm 0,4$
BADÄ	$38,9 \pm 1,2$	$21,8 \pm 0,6$
HADTA	$68,0 \pm 0,4$	$46,5 \pm 0,7$
DCTA	$4,1 \pm 0,2$	$82,8 \pm 0,4$
BHCADA	$40,8 \pm 1,6$	$48,9 \pm 1,0$
ACATA	$7,9 \pm 0,6$	$12,7 \pm 0,2$
ADDHA	$50,9 \pm 2,6$	$53,4 \pm 0,7$
DFOA	$28,6 \pm 1,6$	$51,7 \pm 0,5$

oder weniger starkem Maße überlegen. Auffallend ist weiterhin die im Vergleich zu den aliphatischen Chelatbildnern stärkere Beeinflussung der ^{59}Fe -Retention durch Substanzen mit cyclischer Struktur, insbesondere durch ACATA und DCTA. Die hohe Effektivität

der DCTA wurde bereits durch Rubin u. Princiotto [8] festgestellt. Wir sind uns dessen bewußt, daß die gewählte Versuchsarrangements, d. h. die gleichzeitige Verabreichung von ^{59}Fe und Chelatbildner, nicht als Modell für die Mobilisierung pathologischer Eisenablagerungen durch Chelatbildner gelten kann; gleichwohl kann sie gewisse Aufschlüsse über die Stabilität der Fe(III)-Chelate bei Anwesenheit konkurrierender endogener Liganden vermitteln. So besteht im Falle der ADTA, DTPA, ADDHA und DFOA die theoretisch erwartete [5] positive Korrelation zwischen Effektivität und dem Quotienten der Stabilitätskonstanten

$$\frac{K_{\text{Fe}^{3+}}}{K_{\text{Fe}^{3+}\text{L}}} / \frac{K_{\text{Ca}}}{K_{\text{CaL}}}$$

Für die anderen Substanzen sind die entsprechenden Konstanten noch nicht bekannt.

Der Versuch in vitro zeigt beim Vergleich mit der Serie in vivo mehrere Abweichungen: Die meisten Chelate sind weniger wirksam, als der Versuch in vivo erwarten ließ; am stärksten ausgeprägt ist dies im Falle der DCTA, deren Mobilisierungseffektivität sehr gering und der von ADTA und DTPA vergleichbar ist. Nur HADTA, ADDHA und BADÄ sind in vitro wirksamer. Hervorzuheben ist schließlich die im Vergleich zu DFOA bessere Wirksamkeit des BADÄ und vor allem der ACATA.

Die Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen beider Versuchsreihen können kaum durch die Annahme eines unterschiedlichen metabolischen Verhaltens bestimmter Chelatbildner, wie dies von Rubin u. Princiotto [8] diskutiert wird, befriedigend erklärt werden. Wir sind vielmehr geneigt, beispielsweise die sehr hohe Effektivität der DCTA in vivo auf die Robustheit der Fe(III)-DCTA zurückzuführen, d. h. auf die (unabhängig von der Chelatstabilität) überaus träge verlaufenden Austauschreaktionen. Daß Fe(III) bevorzugt robuste Koordinationsverbindungen bildet, geht aus den Untersuchungen von Rubin et al. [7] hervor.

Der Versuch in vitro kann mit einer gewissen Berechtigung als Modell für die Chelat-Therapie pathologischer Eisenablagerungen angesehen werden. Dies gilt um so mehr, als in letzterem Fall im Vergleich zu dem Modellversuch eine höhere Effektivität erwartet werden kann: Wir untersuchten nur die Mobilisierung des Fe(III) aus dem Transferrin-Komplex, der nach Davis et al. [5] überaus stabil ist ($\log K \sim 30$), während das durch andere endogene Liganden gebundene „Speicher“eisen wesentlich leichter mobilisierbar ist [2]. Im Hinblick auf die von uns festgestellte deutliche Überlegenheit von BADÄ und ACATA erscheint uns die klinische Prüfung beider Substanzen, vor allem der ACATA, und ihr Vergleich mit DFOA gerechtfertigt und wünschenswert. Die Verträglichkeit der BADÄ bei einer Dosierung von $\leq 80\ \mu\text{M} \times \text{kg}^{-1} \times \text{d}^{-1}$ ist der von ADTA und DTPA durchaus vergleichbar [1]; toxikologische Untersuchungen mit ACATA wurden bisher noch nicht durchgeführt, doch ist im Vergleich zu den anderen Polyaminosäuren ein exceptionelles Verhalten wenig wahrscheinlich.

Zusammenfassung

Es wurden die Beeinflussung der Retention von Radioeisen im Organismus der Ratte und die Mobilisierung von Eisen aus dem Fe(III)-Transferrin-Komplex durch verschiedene Polyaminosäuren und Desferrioxamin (DFOA) untersucht. Zwei Verbindungen, 2:2'-Bis[di(carboxymethyl)amino]diäthyläther (BADÄ) und insbesondere 2-(β -aminoäthoxy)cyclohexylaminotetraessigsäure (ACATA) erwiesen sich dabei als wesentlich wirksamer als DFOA und Diäthylentriaminpentaessigsäure (DTPA). Es wird auf die Bedeutung der cycli-

schen Struktur des Liganden bei der Komplexierung von Fe(III) hingewiesen.

Für die Überlassung des Desferrioxamins (Desferal®) danken wir der Ciba AG, Basel, der Polyaminosäuren der J. R. Geigy AG, Basel.

Summary

New possibilities in the chelation therapy of hemosiderosis

The efficacy of several polyamino acids in preventing the retention of radioiron in the rat as well as in mobilizing iron from Fe(III)-transferrin has been studied. Two compounds, 2:2'-Bis[di(carboxymethyl)amino]diethyl ether (BADA) and, in particular, 2-(β -aminoethoxy)cyclohexylaminetetraacetic acid (ACATA) were found to be markedly superior to diethylaminepentaacetic acid (DTPA) and desferrioxamine (DFOA). The influence of the cyclic structure (e.g. ACATA and DCTA) on the complex-forming ability in the particular case of Fe(III) must be stressed.

Literatur

- [1] Catsch, A., *Radioactive Metal Mobilization in Medicine*. Springfield, Ill. 1964
- [2] Cleton, F., Turnbull, A., and Finch, C. A., *J. Clin. Invest.* **42**, 327 (1963)
- [3] Davis, B., Saltman, P., and Benson, S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **8**, 56 (1962)
- [4] Fahey, J.L., Rath, C.E., Princiotto, J.V., Brick, I. B., and Rubin, M., *J. Lab. and Clin. Med.* **57**, 436 (1961)
- [5] Heller, H.-J. u. Catsch, A., *Strahlentherapie* **109**, 464 (1959)
- [6] Moeschlin, S., et al., *Schweiz. Med. Wschr.* **92**, 1295 (1962)
- [7] Rubin, M., Houlihan, J., and Princiotto, J. V., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **103**, 663 (1960)
- [8] Rubin, M., and Princiotto, J. V., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **88**, 450 (1960)
- [9] Surgenov, D. M., Koechlin, B. A., and Strong, L. E., *J. Clin. Invest.* **28**, 73 (1949)
- [10] Wöhler, F., *Proc. 8th. Congr. Europ. Soc. Haemat. Vienna* 1961, I, p. 580

Anschr. d. Verf.: Dr. Du Khuong Lê, Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum, 75 Karlsruhe, Postfach 947

Verantwortlich für die Redaktion: Dr. W. Saenger; Verlag: Editio Cantor, 796 Aulendorf i. Württ.; Ruf: Aulendorf (07525) 431
Druck: Vereinigte Buchdruckereien, August Sandmaier & Sohn, 7952 Bad Buchau a. F.

Bezugsbedingungen: Die Zeitschrift erscheint monatlich einmal. Sie kann vom Verlag oder durch eine Buchhandlung bezogen werden. Der Bezugspreis beträgt im Abonnement pro Halbjahr (6 Hefte) 35,— DM einschl. Versandkosten. Das Einzelheft kostet 6,— DM einschl. Versandkosten. Kostenlose Probehefte liefert der Verlag auf Anforderung. Auslandsabonnements errechnen sich pro Jahr einschl. Versand auf der Basis von 72,— DM.