



Doctoral Thesis

N⁴-Octodecyl-1-β-D-arabinofuranosylcytosine (NOAC), a new anticancer drug: pharmacokinetics and metabolism in mice, distribution in human blood, uptake and cytotoxicity in lymphoma cells

Author(s):

Koller-Lucae, Sibylle Klara Maria

Publication Date:

1998

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001992765> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 12908

**N⁴-OCTADECYL-1- β -D-ARABINOFURANOSYLCYTOSINE
(NOAC), A NEW ANTICANCER DRUG:
PHARMACOKINETICS AND METABOLISM IN MICE,
DISTRIBUTION IN HUMAN BLOOD,
UPTAKE AND CYTOTOXICITY IN LYMPHOMA CELLS**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
SIBYLLE KLARA MARIA KOLLER-LUCAE

Eidg. dipl. Apothekerin, ETH
born Mai 16, 1967
citizen of Burgdorf (BE)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. G. Folkers, examiner
PD Dr. R.A. Schwendener, co-examiner

Zurich 1998

SUMMARY

N⁴-Octadecyl-1-β-D-arabinofuranosylcytosine (NOAC) belongs to a new class of lipophilic 1-β-D-arabinofuranosylcytosine (ara-C) derivatives. The known mechanisms of action of the alkyl-derivatives are different from ara-C referred to deamination to the inactive 1-β-D-arabinofuranosyluracil (ara-U), cellular up-take, formation of ara-C-5'-triphosphate and induction of apoptosis. Antitumour activity in human tumour xenografts mouse models showed better activity in various leukaemias, and an impressive antitumour activity against different solid tumours compared to ara-C. Additionally NOAC is active after oral administration.

In this thesis further aspects of the NOAC pharmacology were investigated. The pharmacokinetic properties were studied in ICR mice after intravenous application of liposomal NOAC. The distribution half-life $t_{1/2\alpha}$ (23 min) and the elimination half-life $t_{1/2\beta}$ (7h) were determined. The drug was mainly distributed into the liver (69%). Analysis of HPLC purified extracts of liver homogenates by LC/MS revealed only the presence of unmetabolised NOAC. After 48 h of treatment, 39% of the injected [5-³H]-NOAC radioactivity was excreted in urine and 16% in faeces. The LC/MS analysis of purified excrements revealed in faeces the presence of unmetabolised NOAC, hydroxylated NOAC (NOAC+OH), its sulfated derivative (NOAC+OSO₃H) and unidentified metabolites; whereas the hydrophilic molecules ara-C and ara-U were found in urine. During the period of 48 h only 2% of the injected NOAC was eliminated in its unmetabolised form, whereas 25% were identified as main metabolite ara-C.

For intravenously administered drugs their distribution behaviour in blood are important parameters. Thus, NOAC was incubated with human blood in vitro. The binding analysis of NOAC to erythrocytes (Ec) resulted in a weak affinity (K_D of 3 mM) and 40×10^6 binding sites per Ec. The Ec partition coefficient D_{Ec} was approximately 4 demonstrating the high accumulation of NOAC in Ec membranes and reflecting the lipophilicity of the drug. The calculated fraction f_b of drug bound to plasma proteins was 30%. Separating human serum after in vitro incubation with NOAC by density gradient

ultracentrifugation resulted in its distribution to lipoproteins (36% to LDL, 21% to HDL, 5% to VLDL) and to other proteins (12%).

The strong affinity of NOAC to LDL might be exploited for the enhanced uptake of the drug in tumour cells expressing high numbers of LDL receptor molecules. This aspect was studied in the last part of this thesis. The specific binding of NOAC incorporated into isolated LDL (NOAC-LDL) to Daudi lymphoma cells was 5 times higher than to human lymphocytes. NOAC-LDL binding to Daudi cells was saturated after 2 h with a K_D of 60 nM and 600'000 NOAC-LDL particles per cell. Blocking the specific and unspecific internalisation by co-incubation of excess empty control LDL and colchicine reduced the NOAC-LDL uptake by 70%. In an in vitro cytotoxicity test the IC_{50} of NOAC on Daudi cells was 40 - 160 μ M, depending on the drug formulation used, whereas ara-C was not toxic under the same conditions. NOAC does not necessarily need to be transferred to LDL in order to act as a cytotoxic drug. Liposomal NOAC binding to Daudi cells was much weaker and unspecific but with liposomes containing 40 times more drug molecules per particle than NOAC-LDL, a IC_{50} more favourable (40 μ M) compared to NOAC-LDL (160 μ M) was obtained.

These investigations demonstrate that NOAC is a very interesting drug with typical properties of a lipophilic compound. The drug needs no elaborate incorporation into isolated LDL or modified liposomes for prolonged circulation because NOAC formulated in plain liposomes distributes after intravenous application quickly into Ec membranes and lipoproteins, mainly LDL. The Ec membranes act as transient depot and the LDL particles may deliver the drug to cells with increased proliferation rates like tumour tissues. The metabolism study revealed the formation of ara-C in mice which is expected to play a role in the antitumour activity of NOAC. Still, there are other mechanisms of action to be analysed. Future clinical investigations with NOAC will show if NOAC holds its promise as a potent new anticancer drug.

ZUSAMMENFASSUNG

N⁴-Oktadecyl-1-β-D-arabinofuranosylcytosin (NOAC) gehört zu einer neuen Klasse von lipophilen 1-β-D-Arabinofuranosylcytosin (Ara-C) Derivaten. Die Alkyl Derivate besitzen einen anderen Wirkmechanismus als Ara-C. Die wesentlichen Unterschiede zeigen sich bei der Desaminierung zum unwirksamen 1-β-D-Arabinofuranosyluracil (Ara-U), der zellulären Aufnahme, der Entstehung von Ara-C-5'-triphosphat und der Apoptose Induktion. Im Vergleich zu Ara-C ist die antitumor Wirkung von NOAC besser. Dies konnte in Maustumor Modellen an verschiedenen humanen Leukämien gezeigt werden. Ausserdem ist NOAC auch gegen solide Tumoren und als orale Verabreichung wirksam.

In dieser Doktorarbeit wurden weitere pharmakologische Aspekte von NOAC untersucht. Die Pharmakokinetik von intravenös verabreichten NOAC Liposomen wurde in Mäusen bestimmt. Die Halbwertszeiten betragen für die Verteilungsphase 23 Minuten und für die Eliminationsphase 7 Stunden. Am meisten NOAC befand sich in der Leber (69%). Mittels LC/MS Analyse konnte unverändertes NOAC in HPLC gereinigten Leberextrakten detektiert werden. Nach 48 Stunden betrug die ausgeschiedene Radioaktivität im Urin 39% des injizierten [5-³H]-NOAC und in den Fäzes 16%. Die gereinigten Exkrementen wurden ebenfalls mit LC/MS analysiert und es gelang neben unbekanntem Metaboliten, unverändertes NOAC, hydroxyliertes NOAC (NOAC+OH) und das sulfatierte Derivat (NOAC+OSO₃H) zu detektieren, während im Urin die hydrophilen Moleküle Ara-C und Ara-U gefunden wurden. Nach 48 h befanden sich in den Exkrementen 2% der injizierten Dosis als unverändertes NOAC und 25% des Hauptmetaboliten Ara-C.

Für intravenös verabreichte Substanzen ist das Verteilungsmuster im Blut ein wichtiger Parameter. NOAC wurde mit humanem Blut in vitro inkubiert. Die Bindung von NOAC an Erythrozyten war schwach ($K_D = 3 \text{ mM}$) mit 40×10^6 NOAC Molekülen pro Erythrozyt. Der Erythrozyten Verteilungskoeffizient D_{Ec} war etwa 4 und resultierte aus der hohen Anreicherung von NOAC in der Erythrozyten Membran, was typisch für einen lipophilen Arzneistoff ist. Die an Plasmaproteine gebundene Fraktion f_b betrug

30%. Wurde mit NOAC inkubiertes Serum mit Hilfe einer Gradienten Ultrazentrifugation aufgetrennt, resultierte eine Verteilung von NOAC in den Lipoprotein zu 36% an LDL, 21% an HDL, 5% an VLDL und zu 12% an andere Serumproteine.

Die Bindung von NOAC an LDL könnte zu einer verstärkten NOAC Aufnahme in Tumor Zellen führen, da deren LDL Rezeptorendichte oft erhöht ist. Dieser Aspekt wurde im letzten Teil dieser Doktorarbeit untersucht. NOAC wurde in isolierte LDL Partikel eingebaut (NOAC-LDL) und die Bindung an Daudi Zellen, eine Lymphom Zelllinie, untersucht. Sie war 5 mal höher als an Lymphozyten. Die Bindung von NOAC-LDL an Daudi Zellen war nach 2 Stunden mit 600'000 NOAC-LDL Partikel/Zelle gesättigt mit einer hohen Affinität ($K_D = 60 \text{ nM}$). Die NOAC-LDL Aufnahme konnte zu 70% blockiert werden, wenn einerseits die spezifische Bindung mit einem Überschuss von leeren LDL Partikeln und die unspezifische Pinozytose mit Colchizin verhindert wurden. Die Konzentration mit der halbmaximalen Hemmwirkung (IC_{50}) von NOAC wurde in einem Zytotoxizitätstest mit Daudizellen bestimmt und bewegte sich, abhängig von der verwendeten Formulierung, zwischen 40 - 160 μM , während Ara-C keine Toxizität unter diesen Bedingungen verursachte. Damit NOAC seine zytotoxische Aktivität entwickelt, muss es nicht zwingend an LDL gebunden vorliegen. NOAC Liposomen zeigte zwar nur schwache und unspezifische Bindung an Daudi Zellen, konnten aber mit 40 mal mehr NOAC Molekülen als LDL beladen werden und hatten deshalb eine günstigere IC_{50} (40 μM) als LDL (160 μM).

Mit den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass NOAC Eigenschaften besitzt, die typisch für eine lipophile Substanz sind. Der Arzneistoff braucht nicht mit aufwendigen Verfahren in LDL inkorporiert zu werden oder als modifizierte langzirkulierende Liposomenpräparation formuliert zu werden, weil NOAC die Liposomen nach intravenöser Verabreichung spontan verlässt und an Erythrozyten und Plasma Proteine bindet. Die Erythrozyten Membranen fungieren dabei als Depot für die NOAC Moleküle und die LDL Partikel könnten NOAC zu Zellen transportieren, welche wegen ihrer erhöhten Proliferationsrate und des daraus resultierenden Bedarfs an Cholesterin über eine erhöhten LDL Rezeptorendichte verfügen, wie das für Tumorzellen beschrieben wurde. Die Metabolismusstudie in Mäusen zeigte für NOAC den Abbau zu Ara-C, welches mit grosser Wahrscheinlichkeit für die zytotoxische

Wirkung von NOAC eine Rolle spielt. Andere Wirkmechanismen müssen erst noch aufgeklärt werden. In klinischen Studien wird sich zeigen, ob das vielversprechende NOAC ein neues potentes Mittel für die Krebs Therapie darstellt.