

194. Chemische Aspekte der Penicillin-Allergie: Die direkte Penicilloxylierung von ϵ -Aminogruppen durch Penicilline bei pH 7,4¹⁾

von C. H. Schneider und A. L. de Weck

(2. IV. 66)

Theoretischer Teil

Es ist eine gut dokumentierte immunochemische Erfahrung, dass niedermolekulare Substanzen nur dann immunogen wirken, wenn sie eine chemisch stabile Bindung mit einem geeigneten Träger eingehen können. Im Falle der Penicillin-Allergie darf als gesichert gelten, dass kovalent an einen Träger gebundene Penicilloxygruppen eine antigenische Hauptdeterminante darstellen [2] [3]. Dieser Befund stützt sich auf den Nachweis von spezifischen Antipenicilloxy-Antikörpern in den Seren Penicillin-allergischer Patienten und von mit Penicillin immunisierten Kaninchen. Die Natur des Penicilloxyträgers ist noch unbekannt. Die Penicilloxygruppe ist wahrscheinlich als Amid seines α -Carboxyls an die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes eines Proteins oder Peptides gebunden. Da die in dieser und der folgenden Arbeit vorkommenden Carboxylderivate der Penicilloinsäure stets die α -Carboxylgruppe betreffen, wird im weiteren auf eine ausdrückliche Bezeichnung der Carboxylderivate als α -Derivate verzichtet.

Eine direkte Reaktion des Penicillins mit ϵ -Lysylaminogruppen, welche *in vivo* zum angenommenen Penicilloxyprotein oder Penicilloxypeptid führen würde, ist *in vitro* bisher nicht nachgewiesen worden. Im älteren Schrifttum [4] wird eine schnelle Reaktion von Benzylpenicillin mit Cystein und weiteren Aminothiolen in neutraler, wässriger Lösung beschrieben, welche zu α -Amiden der Benzylpenicilloinsäure führt. Für diese Reaktion muss die mit Penicillin reagierende Trägermolekel eine Amino- und eine Thiol-Gruppe auf benachbarten C-Atomen besitzen. Eine derartige Gruppierung kann in Proteinen oder Peptiden nur bei N-terminalem Cystein vorkommen, doch kennt man bis jetzt noch kein Protein mit N-terminalem Cystein. Wesentlich langsamer reagieren mit Penicillin u. a. Penicillamin, Homocystein und Äthylen-diamin; keine Reaktion trat ein mit Thiolen wie Propylmercaptan und Aminen wie Äthylamin, Benzylamin, Anilin, Glycin und DL-Serin [4]. Infolge dieser Stabilität des Penicillins gegenüber Aminen in neutraler, wässriger Lösung hat man als wirksames Allergen zunächst nicht Penicillin selbst, sondern Metaboliten und Zersetzungsprodukte in Betracht gezogen; so vor allem die Penicillensäure, als ein hochreaktives Zersetzungsprodukt des Penicillins, das sich in wässriger saurer, aber in geringerem Masse auch in neutraler Benzylpenicillinlösung bildet und welches mit Aminogruppen unter Bildung von Penicilloxyamiden reagieren kann [5].

Die Annahme der Penicillensäure als die alleinige Vorstufe der Penicilloxy-Determinanten lässt sofort zwei überprüfbare Folgerungen zu.

Einmal sollten die aus Penicillensäure entstandenen Penicilloxyamidgruppen in den vier diastereoisomeren Formen D- α , D- β , D- γ und D- δ auftreten können, weil die

¹⁾ Über einen Teil dieser Ergebnisse wurde bereits kurz berichtet [1].

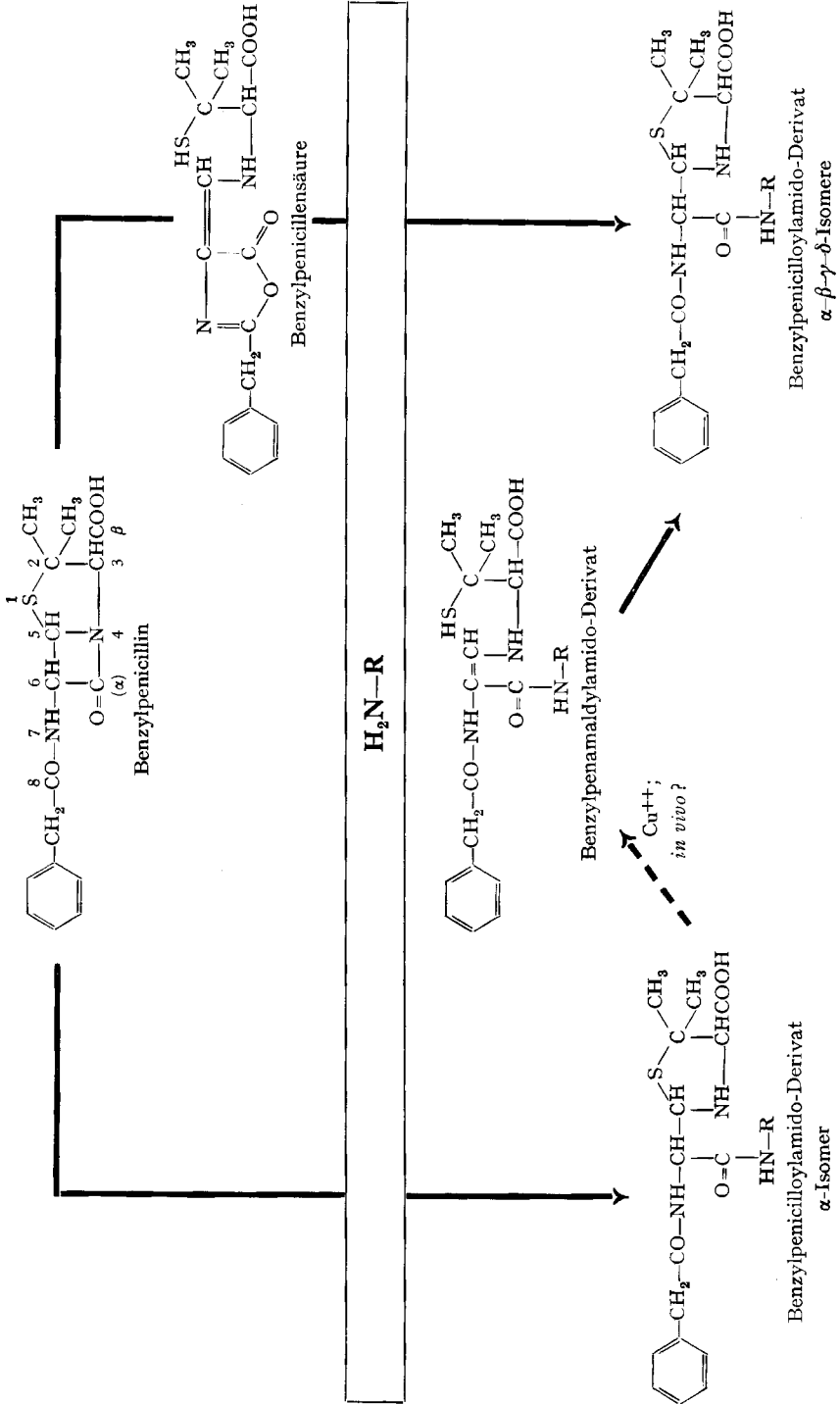
beiden asymmetrischen Zentren C-5 und C-6 der Penicilloylstruktur in der Penicillensäure durch Bildung einer Doppelbindung verschwunden sind und daher bei der Penicilloylamid-Bildung neu entstehen. Im Prinzip müssten daher Antipenicilloyl-Antikörper auffindbar sein, die sich durch das Ausmass ihrer immunologischen Spezifität für die D- α -, D- β -, D- γ - bzw. D- δ -Penicilloylgruppe voneinander unterscheiden. Eine direkte Penicilloylierung von Trägerprotein unter völliger Erhaltung der Konfiguration an C-5 und C-6 würde demgegenüber nur zu einem D- α -Penicilloyl-Antigen und zu Anti-D- α -Penicilloyl-Antikörpern führen. Die bisherigen Hapteninhibitionsstudien [3] [6] sind widersprüchlich und erlauben keine Entscheidung, ob die Antipenicilloyl-Antikörper im allgemeinen durch ein Gemisch der vier diastereoisomeren Penicilloyl-Determinanten hervorgerufen sind oder nicht. Der Einsatz der vier isolierten diastereoisomeren Penicilloyl-Hapteninhibitoren in einem Testsystem, welches die vier diastereoisomeren Antipenicilloyl-Antikörper mit gleicher Empfindlichkeit erfasst, könnte diese Frage lösen. Das Auffinden eines ungleichen Gemisches von diastereoisomeren Penicilloyl-Determinanten oder gar nur der D- α -Penicilloyl-Determinanten würde die Penicillensäure als Zwischenstufe bei der Penicilloylierung des antigenischen Trägers unwahrscheinlich machen, beziehungsweise ausschliessen; auf der anderen Seite aber bedeutete die Demonstration eines Gemisches aus gleichen Anteilen der diastereoisomeren Penicilloyl-Determinanten keinen Beweis für die Existenz der Penicillensäure-Zwischenstufe, da eine bereits gebildete Penicilloylamidgruppe auch nachträglich *in vivo* über die Penamaldoyl-Zwischenstufe racemisiert werden könnte. Die Penicilloylamide zeigen *in vitro* leicht Mutarotation, z. B. in Gegenwart von zweiwertigem Kupfer [3] [7]. Eine derartige Reaktion könnte zu einem Gemisch diastereoisomerer Penicilloyl-Determinanten führen, wie es ähnlich über die Stufe der Penicillensäure entstehen würde (Schema).

Die zweite Folgerung betrifft eine Korrelation zwischen der Bildungsgeschwindigkeit der Penicillensäure *in vitro* aus verschiedenen Penicillinen und der immunogenen Wirkung dieser Penicilline. Falls die Penicillensäure bei der Immunogenizität eine bedeutende Rolle spielte, sollten Penicilline, die relativ langsam Penicillensäure bilden, schlechte Allergene sein und umgekehrt. Das trifft jedoch im allgemeinen nicht zu. Sowohl bei pH 4 als auch bei pH 7,4 entsteht aus Phenoxymethylpenicillin gut 30mal weniger Penicillensäure als unter entsprechenden Bedingungen aus Benzylpenicillin. Beide Penicilline erweisen sich jedoch als ungefähr gleich gute Allergene im Kaninchen. Auch weitere Penicilline mit verschiedenen Acylseitenketten zeigen keine Korrelation zwischen Penicillensäureproduktion *in vitro* und Immunogenizität [8].

Es schien deshalb angezeigt zu überprüfen, ob in neutraler, wässriger Lösung eine von der Penicillensäurebildung unabhängige, direkte Penicilloylierung von Aminen durch Penicillin stattfinden kann²⁾. Das ist in der Tat der Fall: Aus neutralen,

²⁾ Oberhalb etwa pH 10 reagiert Penicillin sehr rasch mit Aminen unter Bildung von α -Amiden der Penicilloinsäure. Unter diesen Bedingungen ist nicht mit einer Penicillensäureumlagerung zu rechnen, und die beobachtete Aminolyse wird als eine direkte Reaktion des β -Lactamringes mit Aminen betrachtet. Es ist möglich, dass die hier zu beschreibende direkte Penicilloylierung von Aminen bei pH 7,4 nach dem gleichen Mechanismus verläuft wie die alkalische Reaktion. In dieser Arbeit benutzen wir jedoch den Ausdruck «Direkte Penicilloylierung» lediglich im Sinne einer Unterscheidung von der Penicilloylierung, welche durch unabhängige intramolekulare Umlagerung von Penicillin zu Penicillensäure und nachfolgende Reaktion dieses Zwischenproduktes mit Aminen erfolgen kann.

Bildungsmöglichkeiten von Penicilloylamid aus Penicillin



wässrigen Lösungen von Benzylpenicillin und ϵ -Aminocaprinsäure bzw. Poly-L-lysin konnten wir ϵ -(Benzylpenicilloyl-amido)-caprinsäure und N⁶-Benzylpenicilloyl-poly-L-lysin isolieren. Andererseits ergaben neutrale Inkubationen von verschiedenen Penicillinen mit ϵ -Aminocaprinsäure und Polylysin, in denen die Penicilloylierung mittels der Penamaldatanalyse verfolgt wurde, dass bei dieser Reaktion die Amidbildung über den Weg der Penicillensäure und ihre anschliessende Reaktion zu einem Penicilloylamid höchstens einen geringen Beitrag zur Gesamtreaktion leistet.

Ein Weg, um zu zeigen, dass die direkte Penicilloylierung *in vivo* einen wichtigen Mechanismus zur Bildung der antigenischen Penicilloyl-Determinanten darstellt, wäre der Einsatz von Penicillin-ähnlichen Verbindungen, welche keine Penicillensäure bilden können, welche jedoch eine zur direkten Penicilloylierung analoge Reaktion mit Aminen eingehen und befähigt sind, spezifische Antikörper *in vivo* zu erzeugen. Über derartige Versuche berichten wir in der folgenden Arbeit.

Experimenteller Teil

1. Material und Methoden. – *Penicilline*: Kristallines Benzylpenicillin-Kaliumsalz (1585 E/mg, Aktivitätsbestimmung des Herstellers), und 6-Aminopenicillansäure (CHAS PFIZER, INC., New York) erhielten wir durch die Freundlichkeit von Dr. D. G. IZZONI. Phenoxymethylpenicillin (Penicillin V) (SPECTA, Paris) war ein Geschenk von Dr. P. KOETSCHET. Allylthiomethylpenicillin (Penicillin O) (UPJOHN INC., Kalamazoo, Mich.) verdanken wir Dr. F. T. JOHNSON. Phenylamino-methylpenicillin (Penbritin), Phenoxyethylpenicillin (Broxil), Methylchlorphenylisoxazyloxylicillin (Orbenin) und 2,6-Dimethoxyphenylpenicillin (Celbenin) (BEECHAM RESEARCH LABORATORIES LTD., Betchworth, Surrey) verdanken wir Dr. F. P. DOYLE. Phenoxypropylpenicillin (Baycillin) (FARBENFABRIKEN BAYER AG, Leverkusen) war ein Geschenk von Dr. E. AUHAGEN. Methylphenylisoxazyloxylicillin (Prostaphlin) (BRISTOL LABORATORIES INC., Syracusc, N.Y.) verdanken wir Dr. A. R. MENOTTI.

ϵ -Aminocaprinsäure (Smp. 205–206°) war ein Produkt der EMSER WERKE AG, Zürich.

Polylysin: Für die Darstellung eines Poly-L-lysin-hydrochlorids des mittleren Molekulargewichtes 1300 sind wir Dr. K. VOGLER (F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO., AG, Basel) zu Dank verpflichtet. In der Ultrazentrifuge und bei der Gelfiltration (Sephadex G-25 und G-50) wanderte es als eine einzige Zone.

Papierchromatographie: Horizontale, zirkuläre Chromatographie geschah auf SCHLEICHER & SCHÜLL Nr. 2043 B mg/l Rundfilter (Durchmesser 17 cm). Zur Pufferung wurde das Papier im gewünschten Puffer getränkt, abgepresst, luftgetrocknet und vor Gebrauch 10 Min. in feuchter Kammer gehalten. Sämtliche Penicilline und ihre schwefelhaltigen Derivate wurden durch Besprühen mit ammoniakalischem Silbernitrat (0,1M AgNO₃ in 0,2M NH₃) sichtbar gemacht.

Gelfiltration: Sephadex-Dextrangele (PHARMACIA, Uppsala) wurden verwendet.

Optische Messungen: In 1-cm-Quarzellen in einem BECKMAN-DB-Spektrophotometer ausgeführt.

Penamaldatanalyse (vgl. [7] [9]): Die Prüflösung (1 ml) wird in einer Quarzelle mit HgCl₂-Lösung (meist 0,001M) versetzt, bis die optische Dichte bei 282 nm nicht mehr ansteigt. Das Verfahren ist gleich wie bei der Bestimmung der Quecksilberäquivalenz [10], nur werden im allgemeinen Portionen von 0,01 ml HgCl₂-Lösung verwendet. Die Konzentration der Prüflösung wird möglichst so gewählt, dass optische Dichten um 0,5–0,6 entstehen. In einigen Fällen, wie z. B. bei der Aminolyse von Celbenin, war die optische Dichte der Messlösung bei 282 nm sehr hoch; durch Verwendung von Messlösung an Stelle von Lösungsmittel in der Vergleichszelle kam eine brauchbare Penamaldatanalyse zustande.

Als Penamaldatwert (PW) ist definiert die maximale optische Dichte bei 282 nm, die eine Lösung in einer 1-cm-Zelle infolge Penamaldatbildung durch HgCl₂ erreichen kann.

Die *Schmelzpunkte* sind in den Kapillaren bestimmt und korrigiert.

2. Präparativer Nachweis der Penicilloylierung von ϵ -Aminogruppen bei pH 7,4 durch Benzylpenicillin. – 2.1. *Benzylpenicillin und ϵ -Aminocaprinsäure*: ϵ -(Benzylpenicilloyl-

amido)-capronsäure-bis-benzylammoniumsalz: Benzylpenicillin in gepufferter 0,5 M Lösung wurde bei pH 7,4 mit der 4,25 fachen molaren Menge an ϵ -Aminocapronsäure bei 37° inkubiert. Nach einem Tag wurde das Reaktionsprodukt durch Ansäuern ausgefällt. Aus dem Niederschlag wurde ϵ -(Benzylpenicilloyl-amido)-capronsäure als kristallines Bis-benzylammoniumsalz in 20–30% Ausbeute gewonnen. Die Produkte aus einem Ansatz in 0,5 M Phosphatpuffer und aus einem eben solchen in 0,1 M Hydrogencarbonatpuffer waren identisch und stimmten in ihren Eigenschaften überein mit einem authentischen Muster von ϵ -(Benzylpenicilloyl-amido)-capronsäure-bis-benzylammoniumsalz, welches durch Reaktion von Benzylpenicillin mit ϵ -Aminocapronsäure in alkalischer Lösung hergestellt wurde.

a) Umsatz bei pH 7,4 in 0,5 M Phosphatpuffer: 3,75 g ϵ -Aminocapronsäure und 2,5 g Benzylpenicillin wurden in 0,5 M Phosphatpuffer zu 13,5 ml gelöst und 23 $\frac{1}{2}$ Std. bei 37° inkubiert. Das pH wurde durch zuerst halbstündliche, später weniger häufige Zusätze von insgesamt 0,88 ml 6 N NaOH zwischen pH 7,3 und 7,5 gehalten (Glaselektrode). In den letzten 10 Std. der Inkubation trat weder Laugenverbrauch noch wesentliche Zunahme des Penamaldatwertes der Lösung ein. Die Lösung wurde dann unter Eiskühlung mit 6 N HCl auf pH 2,5 gebracht. Nach $\frac{1}{2}$ Std. bei 0° wurde der entstandene gummiartige Niederschlag in 35 ml *n*-Butanol gelöst und die Lösung 3mal mit 30 ml Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen mit Na₂SO₄ wurde die Butanollösung mit 2,25 ml Benzylamin versetzt. Nach Zusatz von 70 ml Äther begann die Kristallisation des Benzylammoniumsalzes. Nach weiterem Ätherzusatz (70 ml) und nach Stehen über Nacht bei 0° wurden 1,6 g Rohprodukt erhalten; aus 95-proz. Äthanol-Äther (1:4) 1,3 g Kristalle vom Smp. 105–108°. Zweimalige weitere Umkristallisation aus 95-proz. Äthanol-Äther ergab unter geringen Verlusten ein Produkt mit Smp. 110–113°, Misch-Smp. mit Produkt c) ebenso. $[\alpha]_D^{24} = +69,7^\circ$ ($c = 1$, Wasser). Penamaldatanalyse: $PW_{\text{molar}} = 2,4 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

C₃₆H₄₉O₆N₅S (679,85) Ber. C 63,59 H 7,26 N 10,30% Gef. C 63,12 H 7,53 N 10,24%

b) Umsatz bei pH 7,4 in 0,1 M Na-Hydrogencarbonatlösung: Eine Lösung wie unter a) mit Na-Hydrogencarbonat anstelle von Phosphat wurde 29 Std. bei 37° inkubiert. Das pH wurde mittels 1 N NaOH (pH-Stat) auf 7,40 ± 0,02 gehalten. Die Aufarbeitung ergab 1,32 g, Smp. 111,5–113°, Misch-Smp. mit Prod. c) ebenso. $[\alpha]_D^{24} = +69,2^\circ$ ($c = 1$, Wasser). Penamaldatanalyse: $PW_{\text{molar}} = 2,4 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

c) Umsatz bei pH 10,5 in 1 M Na-Carbonatlösung: 15,0 g ϵ -Aminocapronsäure und 10,0 g Benzylpenicillin wurden in 30 ml 1 M Na₂CO₃ gelöst. Das pH wurde mit einigen ml 6 N NaOH auf 10,5 gebracht, worauf die Lösung 20 Std. bei Zimmertemperatur belassen wurde. Die Aufarbeitung ergab 9,5 g Substanz, Smp. 110–111°. $[\alpha]_D^{24} = +70,0^\circ$ ($c = 1$, Wasser). Penamaldatanalyse: $PW_{\text{molar}} = 2,35 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

C₃₆H₄₉O₆N₅S (679,85) Ber. C 63,59 H 7,26 N 10,30% Gef. C 63,37 H 7,45 N 10,17%

d) Umsatz bei pH 11,7 in verdünnter Natronlauge [7]: 5,2 g Benzylpenicillin und 2,2 g ϵ -Aminocapronsäure wurden in 100 ml Wasser unter Zusatz von 1 N NaOH (etwa 20 ml) bis zu einem End-pH von 11,7 gelöst. Nach 20 Min. Stehen bei Zimmertemp. wie unter a) aufgearbeitet: 5,8 g Rohprodukt (Smp. 101–106°); durch zweimalige Umkristallisation aus 95-proz. Äthanol-Äther gereinigt, Smp. 111–112°. $[\alpha]_D^{24} = +69,0^\circ$ ($c = 1$, Wasser), (Lit. [7]: Smp. 111–112°; $[\alpha]_D^{25} = +70,0^\circ$). Die UV.-Spektren (Fig. 1) der Produkte a–d waren identisch.

2.2. *Benzylpenicillin und Polylysin*: Benzylpenicillin wurde 24 Std. bei 37° mit Polylysin bei pH 7,4 inkubiert. Die Reaktionslösung wurde durch Filtration durch eine Sephadex-G-25-Säule in eine rasch wandernde Komponente (I) und in zwei langsamer wandernde Komponenten (II und III) aufgetrennt. Komponente I, welche stets schön vom übrigen Material getrennt war, bestand aus N ϵ -Benzylpenicilloyl-poly-L-lysin. Die Penicilloylgruppen wurden durch Penamaldatanalyse nachgewiesen und quantitativ bestimmt. In jedem Fall wurde durch ein Kontrollexperiment überprüft, dass kein anderes Material, welches während der Inkubation entstehen kann und durch die Penamaldatanalyse nachweisbar ist, in der Polylysinkomponente gefunden wird. Dazu wurde Benzylpenicillin wie im Hauptexperiment bei pH 7,4, aber ohne Polylysin, inkubiert und das Polylysin erst am Schluss der Inkubation zugesetzt. Diese Kontrollversuche lieferten Polylysinmaterial mit nur unbedeutendem Penamaldatwert. Sie bestätigen daher, dass die durch Gel-filtration isolierten Polylysinkomponenten nur dann signifikante Penamaldatwerte zeigen, wenn vorgängig eine Reaktion von Penicillin mit Polylysin hat stattfinden können (Fig. 2). Immunochemisch wurde die an das Polylysin gebundene Benzylpenicilloylgruppe durch Immunpräzipita-

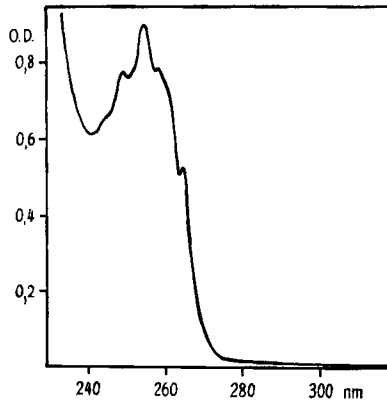


Fig. 1. Absorptionsspektrum von ϵ -(Benzylpenicilloyl-amido)-capronsäure-bis-benzylammoniumsalz (0,1-proz.) in 0,01M Phosphatpuffer pH 7,4

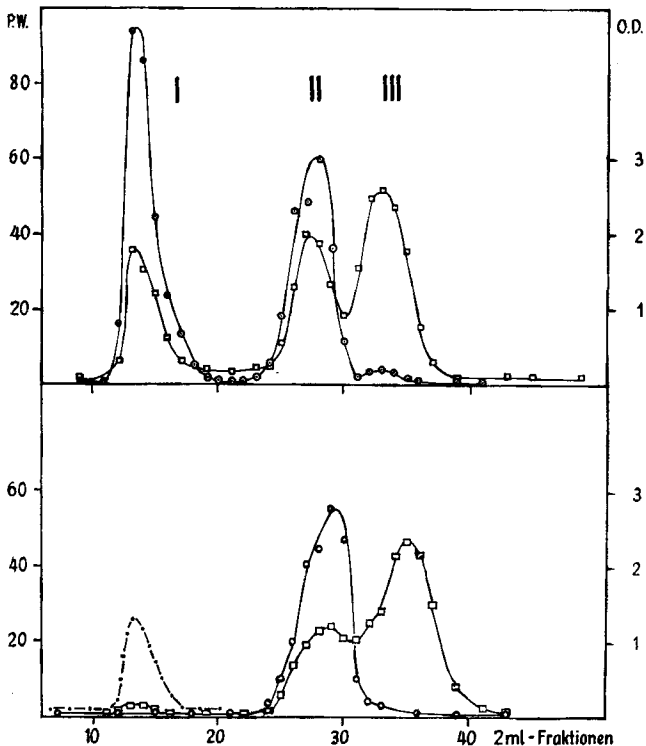


Fig. 2. Gelfiltration von je 1 ml inkubierten Benzylpenicillin/Polylysine-Lösungen durch eine Sephadex-G-25-Säule (1,8 cm \times 30 cm)

Oben: Benzylpenicillin (250 mg) und Polylysine (40 mg) in 4,0 ml McILVAINE-Puffer wurden 24 Std. bei 37° und pH 7,4 inkubiert. – Unten: Dem Ansatz (wie oben) wurde Polylysine erst am Schluss der Inkubation zugesetzt. – Analyse des Eluates: \circ — \circ Penamaldatwert; \square — \square optische Dichte bei 257 nm; \cdots — \cdots FOLIN-LOWRY-Farbe, nur bis Fraktion 20 angegeben.

tion von Kaninchen-Antiserum nachgewiesen, welches durch Immunisation der Tiere mit bovinem Benzylpenicilloyl- γ -globulin erhalten worden war. Die Komponente I, welche nach 24 stdg. Inkubation von Benzylpenicillin mit Polylysin isoliert wurde, erzeugte im Antiserum spezifische Fällungen.

In 2 Experimenten wurde Dimercaptopropanol und in einem Falle eine katalytische Menge von Kupfersulfat zugesetzt. Diese Zusätze übten keinen bedeutenden Einfluss auf den Reaktionsverlauf aus. Dieses Resultat grenzt die hier beobachtete Reaktion ab, gegenüber der Alkohololyse des Benzylpenicillins in Methanol, für welche CHAIN *et al.* [11] eine starke Abhängigkeit von katalytischen Mengen Kupfersalz nachwies und welche durch Dimercaptopropanol-Zusatz praktisch unterdrückt wird. Mit den Komponenten II und III führten wir einige orientierende Versuche durch. Papierchromatographisch verhalten sich die Komponente II wie alkalisch hydrolysiertes Benzylpenicillin, die Komponente III dagegen wie Benzylpenicillin. Im OXFORD-CUP-Test zeigte Komponente II eine sehr geringe antibiotische Aktivität, die Komponente III war dagegen so aktiv, dass sie mit Sicherheit als reich an Benzylpenicillin angesprochen werden kann.

Benzylpenicilloyl-polylysin-Bildung bei pH 7,4: Ansätze von 250 mg Benzylpenicillin und 40 mg Polylysin in 4,0 ml Citrat-Phosphat-Puffer nach McILVAINE wurden 24 Std. bei 37° inkubiert, wobei das pH durch gelegentliche Zusätze von 1N NaOH (insgesamt etwa 0,2 ml) zwischen 7,2 und 7,4 gehalten wurde (Glaselektrode). Anschliessend wurde 1 ml der Reaktionslösung durch eine Sephadex-G-25-Säule (1,8 cm \times 30 cm) filtriert. Die Säule wurde mit Citrat-Phosphat-Puffer nach McILVAINE äquilibriert und eluiert. In der Regel wurden im Eluat Penamaldatwert, optische Dichte bei 257 nm und FOLIN-LOWRY-Farbe [12] bestimmt. Ansätze ohne bzw. mit CuSO₄ oder Dimercaptopropanol führten zu folgenden Penamaldatwerten in den vereinigten Eluaten (je 12 ml) der Komponenten I:

Standardansatz + 0,5 mg Dimercaptopropanol:	26
Standardansatz + 2,5 mg Dimercaptopropanol:	24
Standardansatz + 4,0 Millimicromol CuSO ₄ :	27
Standardansatz:	25

Die kupferhaltige Reaktionslösung zeigte am Schluss der Inkubation eine 10mal höhere optische Dichte bei 280 nm (2,0) als Normalansätze. Falls es sich bei diesem bei 280 nm absorbierenden Material – was wahrscheinlich ist – um Penamaldatderivate mit einer hohen molaren Extinktion handelt, ist die hier beobachtete Reaktion mengenmässig von geringer Bedeutung. Im Eluat der Sephadex-Säule verteilt sich mehr als die Hälfte der 280-nm-Absorption auf Komponente I; ferner trat eine weitere Zone zwischen Komponente I und II auf. Auf Komponente III folgte eine Substanz, die infolge ihrer Absorption bei 320 nm als ein Penicillenat mit hoher molarer Extinktion anzusprechen ist; wenn das zutrifft, fällt dieses Material mengenmässig ebenfalls nicht ins Gewicht.

Immunpräzipitationen: Das Sephadex-Eluat der Komponente I aus einem Standardansatz (Fraktionen 11–17) wurde unverdünnt und in der Verdünnung 1:3 zu qualitativen Präzipitationsreaktionen (Ringtesten) mit Kaninchen-Antiserum gegen die Penicilloylgruppe³⁾ gebraucht. Als Kontrollen wurden verwendet: N⁶-Benzylpenicilloyl-polylysin-Lösung, hergestellt durch vollständige Penicilloylierung von Polylysin in alkalischer Lösung [13] (Penamaldatwert: 42), Polylysin allein (6 mg/ml) und Polylysin (6 mg/ml) im Gemisch mit Benzylpenicilloinsäure-bis-benzylammoniumsalz (2,8 μ Mol/ml). Als Hapteninhibitor wurde ϵ -(Benzylpenicilloyl-amido)-capronsäure-bis-benzylammoniumsalz eingesetzt. Lösungen und Verdünnungen waren in Citrat-Phosphat-Puffer nach McILVAINE bei pH 7,4, s. Tabelle 1.

Komponenten I–III im OXFORD-CUP-Test [14]: Die Durchmesser der Inhibitionszonen wurden mittels einer aus Benzylpenicillin-Versuchen erhaltenen Standardkurve in μ g Benzylpenicillin umgewandelt. Die durch Elution von der Sephadex-Säule erhaltenen Lösungen der Komponenten I–III wurden nach Vereinigung der Fraktionen mit gleichem Inhalt unverdünnt und in geeigneter Verdünnung in 0,01M Phosphat-0,9-proz. NaCl-Puffer aufgetragen. Die Gehalte an Benzylpenicillin, gemittelt aus je 4 Bestimmungen und umgerechnet auf unverdünnte Lösungen, betragen für: Komponente I, 0,0 μ g/ml; Komponente II, 6 μ g/ml; Komponente III, 1000 μ g/ml.

³⁾ Anti-Benzylpenicilloyl-bov.- γ -globulin-Antiserum, gemäss Fussnote 2, Tabelle 1 der nachfolgenden Arbeit.

Tabelle 1. Immunpräzipitationen

	Serumverdünnung	Präzipitation
Sephadexeluat I + Antiserum	—	+++
Sephadexeluat I + Antiserum	1:3	++
Sephadexeluat I + Antiserum mit $10^{-3}M$ Inhibitor	—	—
Sephadexeluat I + Normalkaninchenserum	—	—
Polylysin + Penicilloinsäure + Antiserum	—	—
Polylysin + Penicilloinsäure + Antiserum	1:3	—
Penicilloyl-polylysin + Antiserum	—	+++
Penicilloyl-polylysin + Antiserum	1:1	+++

Aus der optischen Dichte von 2,3 bei 257 nm der Lösung der Komponente III (vgl. Fig. 2) ergibt sich mit $E_m = 256$ [15] ein Benzylpenicillingehalt von 3,3 mg/ml, also nur der 3,3 fache Wert des im OXFORD-Test ermittelten.

Papierchromatographie: 5 μ l der nach Vereinigung ihrer Fraktionen gewonnenen Lösung der Komponente II und 5 μ l einer alkalisch hydrolysierten Benzylpenicillinlösung (10 mg/ml) wurden im System 1-Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:5) chromatographiert. Ferner wurden 5 μ l Lösung der Komponente III und 5 μ l einer wässrigen Benzylpenicillinlösung (10 mg/ml) auf Phosphatpufferpapier pH 7,4 im System *t*-Amylalkohol-Wasser (1:1) chromatographiert. Die getrockneten Chromatogramme wurden mit ammoniakalischer Silbernitratlösung besprüht und zeigten die in Fig. 3 wiedergegebenen Verhältnisse.

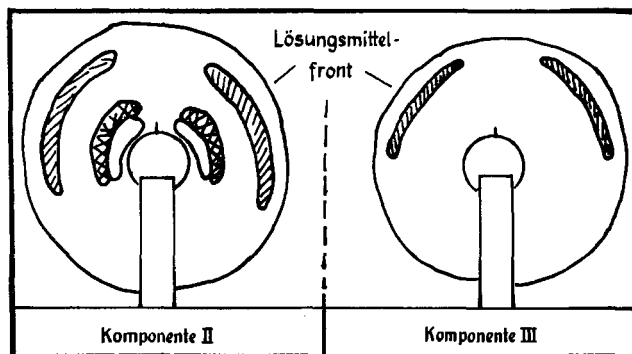





Fig. 3. Papierchromatographie der Komponenten II und III (siehe Text)

Rechts ist in beiden Fällen die entsprechende Vergleichssubstanz aufgetragen. Schraffur:  braun,  tiefbraun,  weiss, heller als der Untergrund.

3. Die Reaktion weiterer Penicilline mit Polylysin und ϵ -Aminocaprinsäure bei pH 7,4. – Verschiedene Penicilline wurden 4 Std. mit Polylysin in 0,05M Phosphatpuffer pH 7,4 bei 37° unter Kontrolle des pH inkubiert. Wie bei den Benzylpenicillin-Versuchen wurden die Polylysinkomponenten I der Inkubationslösungen durch Gelfiltration über Sephadex G-25 isoliert. Kontrollversuche, bei denen das Polylysin erst am Schluss der Inkubation zugesetzt wurde, führten zu Polylysinkomponenten I, die nur geringe Penamaldatwerte zeigten. Zum Vergleich wurden die betreffenden Penicilline mit ϵ -Aminocaprinsäure 6 Std. in 0,05M Phosphatpuffer pH 7,4 bei 37° in einem pH-Stat inkubiert. Die Reaktion des Öffnens des β -Lactamringes wurde durch die Penamaldatanalyse verfolgt [15]. Der Penamaldatwert der Inkubationslösungen stieg nahezu linear mit der Zeit an. In Inkubationslösungen ohne ϵ -Aminocaprinsäure wurden nur geringe Penamaldatwerte (nach 6 stdg. Inkubation ungefähr 100) gemessen, welche durch Hydrolyse zur Penicilloinsäure bedingt sind.

Die in Tabelle 2 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass ganz im Gegensatz zu den stark schwankenden Penicillensäure-Bildungsgeschwindigkeiten einzelner Penicilline die Penicilloylie-

rung von Polylysin und ϵ -Aminocaprinsäure mit den verschiedenen Penicillinen mit recht ähnlicher Geschwindigkeit abläuft. Aus der mangelnden Korrelation zwischen Penicillensäurebildung und Penicilloilylierungsgeschwindigkeit leitet sich ab, dass die Penicillensäurebildung bei der hier beobachteten Reaktion der Penicilloilylierung von höchstens geringer Bedeutung ist. Da diese Annahme in weiteren Versuchen noch erhärtet wird, nehmen wir die beobachteten Reaktionsgeschwindigkeiten als repräsentativ für die direkte Reaktion. Unter dieser Voraussetzung ergibt sich ferner, dass der Einfluss der Penicillinseitenkette auf die direkte Aminolyse nur gering ist, verglichen mit jenem auf die Penicillensäurebildung.

Tabelle 2. *Aminolyse und Penicillensäurebildung verschiedener Penicilline*

Penicillin	N ^ε -Penicilloyl-polylysin ^{a)} μMol	ϵ -(Penicilloyl-amido)-capronsäure, PW nach 6 Std. ^{b)}	Abbau zu Penicillensäure bei 37° (vgl. H ^{c)}) [8]	
			Molpromille pro Minute bei pH 4,0	Molpromille pro Stunde bei pH 7,4
Benzylpenicillin	19,3	1700	2,0	0,26
Phenoxymethylpenicillin	21,1	1700	0,06	0,008
Allylthiomethylpenicillin	22,7	1700	0,5	0,06
Phenoxyäthylpenicillin (Broxil)	22,6	1500	0,08	0,01
Phenoxypropylpenicillin (Baycillin)		1100	0,09	
Dimethoxyphenylpenicillin (Celbenin)	12,3	1200	2,5	0,29
Phenylaminomethylpenicillin (Penbritin)	15,1	e)	0,008	
Methylphenylisoxazyloxyphenicillin (Prostaphlin)	16,7	800	0,2	
Methylchlorphenylisoxazyloxyphenicillin	2,3 ^{d)}	1300	0,1	

a) Penicilloylgruppen auf Polylysin nach 4 stdg. Inkubation von 300 μMol Penicillin in 0,075 M Lösung mit Polylysin (300 μMol ϵ -Aminogruppen) bei pH 7,4 und 37° in Phosphatpuffer. Die Mengen in Mikromol sind aus den Penamaldatwerten der durch Gelfiltration isolierten Komponenten I unter Zugrundelegung einer mittleren molaren Extinktion von 24000 berechnet. Bekannte molare Extinktionen der Bis-benzylammoniumsalze von ϵ -(Benzylpenicilloyl-amido)-capronsäure (24000), ϵ -(Phenoxymethylpenicilloyl-amido)-capronsäure (21500), ϵ -(Allylthiomethylpenicilloyl-amido)-capronsäure (19500) und Dinitrophenylpenicillanylaminocapronsäure (25000) zeigen, dass die Penicillinseitenkette keinen beträchtlichen Einfluss auf die Penamaldatwerte der Penicilloylamide ausübt.

b) Penamaldatwert der Reaktionslösung nach 6-stdg. Inkubation von Penicillin (0,36 M) mit ϵ -Aminocaprinsäure (1,45 M) in 0,05 M Phosphatpuffer bei pH 7,4 und 37°. Ein eventueller Anfangspenamaldatwert ist abgezogen worden.

c) Berechnet aus der Zunahme der Extinktion bei 320 nm der Lösungen von Penicillin in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4, bzw. 0,1 M Acetatpuffer, pH 4,0.

d) Ein beträchtlicher Anteil der Reaktanten ist in der Reaktionsmischung unlöslich.

e) Penbritin ist bei Inkubationsbedingungen nicht hinreichend löslich.

4. Weiteres zur Kenntnis der neutralen Aminolyse der Penicilline. – a) *Penicillensäurebildung in neutraler Lösung im Vergleich zur Aminolyse bei Benzylpenicillin:* In Figur 4 sind zusammengestellt die Hydrolyse, die Penicillensäurebildung und die Aminolyse (in Gegenwart von 1,45 M ϵ -Aminocaprinsäure) einer 0,36 M Benzylpenicillinlösung sowie die Hydrolyse einer 0,36 M Phenoxymethylpenicillinlösung bei pH 7,4 und 37°, alles in Funktion der Zeit. Die Penicillensäurebildung, die sich aus der Zunahme der optischen Dichte bei 320 nm ergibt, ist sehr gering, doch ist sie wegen der Instabilität der Penicillensäure nicht mit der wahren Bildungsgeschwindigkeit iden-

tisch. LEVINE [5] hat gezeigt, dass in 0,1M Phosphatpuffer bei pH 7,5 ein beträchtlicher Teil der Penicillensäure – möglicherweise etwas mehr als die Hälfte – in Penicilloinsäure übergeht. Nimmt man in grober Annäherung an, die gesamte durch die Hydrolysekurve ausgewiesene Benzylpenicilloinsäure sei aus Penicillensäure entstanden, so wäre die wahre Penicillensäureproduktion maximal ungefähr gleich der doppelten Penicilloinsäureproduktion, also 20% der Aminolyse. Nun lässt sich aus der bei pH 7,4 ähnlichen Hydrolyse von Benzylpenicillin und Phenoxymethylpenicillin zweifellos schliessen, dass das Hydrolyseprodukt von Benzylpenicillin nicht zu einem bedeutenden Teil aus Penicillensäure entstanden ist; denn andernfalls müsste die rund 30mal langsamere Penicillensäurebildung aus Phenoxymethylpenicillin eine gegenüber der Benzylpenicillinhydrolyse verlangsamte Phenoxymethylpenicillinhydrolyse zeitigen. Es ist also entsprechend anzunehmen, dass die wahre Benzylpenicillensäurebildung nur einen Bruchteil und wahrscheinlich einen kleinen Bruchteil des Maximalwertes von 20% der Aminolyse ausmacht⁴⁾.

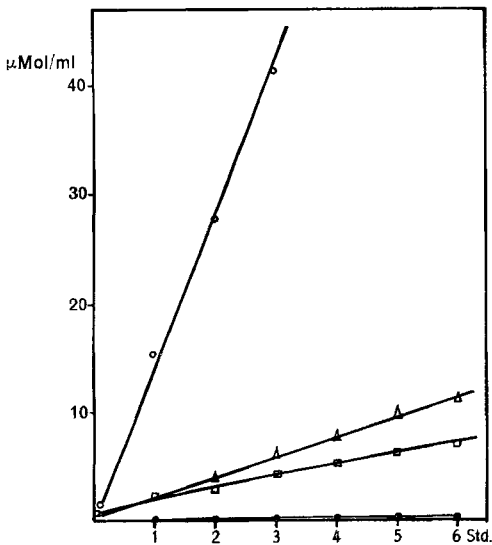


Fig. 4. Hydrolyse, Penicillensäurebildung und Aminolyse von 0,36M Benzylpenicillin in 0,05M Phosphatpuffer bei pH 7,4 und 37°

○—○ Aminolyse in Gegenwart von 1,45M ϵ -Aminocaprinsäure, aus dem Penamaldatwert, $PW_{\text{molar}} = 24000$; □—□ Hydrolyse, aus dem Penamaldatwert, $PW_{\text{molar}} = 10000$; ●—● Penicillensäure, aus der optischen Dichte bei 320 nm, $E_m = 25000$. Das bei 320 nm absorbierende Material liegt wahrscheinlich als Penicillensäuredisulfid vor. Zusätzlich ist die Hydrolyse (Δ — Δ) von Phenoxymethylpenicillin (0,36M) in 0,05M Phosphatpuffer bei pH 7,4 und 37° eingetragen; die experimentellen Punkte sind Durchschnittswerte aus vier Bestimmungen der gleichen Inkubationslösung.

b) *Aminolyse von Benzylpenicillin in Abhängigkeit von der Aminkonzentration*: Benzylpenicillin (0,36M) wurde in 0,05M Phosphatpuffer bei pH 7,4 und 37° in einem pH-Stat 6 Std. mit verschiedenen Mengen ϵ -Aminocaprinsäure inkubiert. Die zeitliche Zunahme des Penamaldatwertes in den Inkubationslösungen war nahezu linear. Der nach 6 Std. erreichte Penamaldatwert ist der angewandten Aminkonzentration proportional (Fig. 5).

Würde die Penicilloilylierung der Aminogruppe durch Penicillensäure erfolgen, die sich durch unabhängige intramolekulare Umlagerung aus Penicillin bildet, so müsste die Penicilloilylierungs-

⁴⁾ Den aus Penamaldatanalysen berechneten Hydrolysesgeschwindigkeiten liegt ein molarer Penamaldatwert von 10000 zugrunde. Diesen Wert findet man nach vollständiger alkalischer Hydrolyse in einer Benzylpenicillinlösung. Möglicherweise ist er zu tief, da Nebenreaktionen bei der Penicillinhydrolyse ins Gewicht fallen könnten. Sollte das zutreffen, so würde der Maximalwert der Penicillensäurebildung weniger als 20% der Aminolyse betragen.

geschwindigkeit mit zunehmender Aminkonzentration einem Grenzwert zustreben, der von der Aminkonzentration unabhängig und nur von der Penicillensäure-Bildungsgeschwindigkeit bestimmt ist. Da die experimentelle Kurve linear ansteigt, kann man auf einen höchstens geringen Beitrag der Penicillensäure zur neutralen Aminolyse des Benzylpenicillins schliessen.

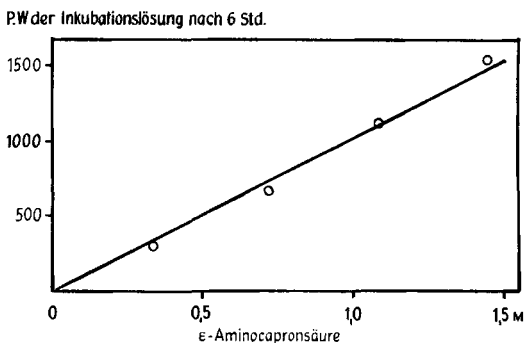


Fig. 5. Geschwindigkeit der Benzylpenicillin-Aminolyse als Funktion der Konzentration von ε-Aminocapronsäure

Der in den Inkubationslösungen durch Penicillinhydrolyse entstandene Penamaldatwert ist abgezogen worden.

c) Vergleich der durch ε-Aminocapronsäure und Äthylendiamin hervorgerufenen Benzylpenicillinaminolyse: Die WINTERSTEINER'sche Zusammenfassung [4] führt Äthylendiamin als einen langsamen Penicillin-Inaktivator auf. Die quantitative Untersuchung jüngerer Datums von NAKKEN *et al.* [16] über die Penicillin-Inaktivierung durch Aminothiole ergibt für die Reaktion von Benzylpenicillin mit Äthylendiamin eine pH-unabhängige Konstante von $0,3 \text{ l Mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$, ein Wert, der mehr als 100mal kleiner ist als die entsprechende Konstante der Benzylpenicillin/Cystein-Reaktion. Eine Untersuchung der Benzylpenicillin/Äthylendiamin-Reaktion und ihr Vergleich mit der Benzylpenicillinaminolyse durch ε-Aminocapronsäure drängte sich auf. Figur 6 zeigt die zeitliche

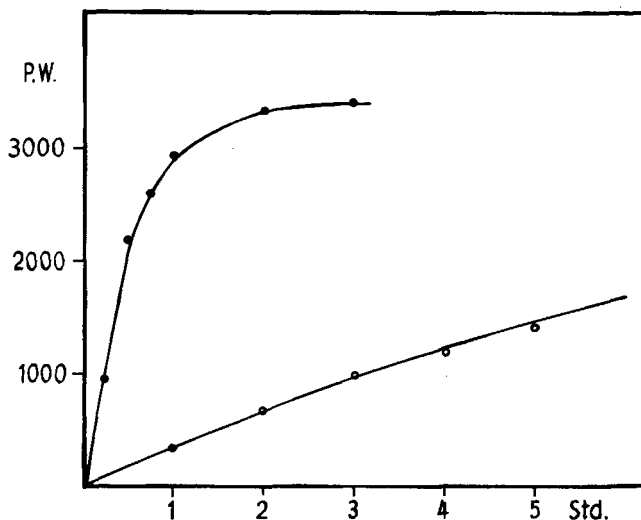


Fig. 6. Aminolyse von 0,36 M Benzylpenicillin durch 1,45 M ε-Aminocapronsäure (○—○) und durch 0,18 M Äthylendiamin-dihydrochlorid (●—●) bei pH 7,4 und 37°

Zunahme des Penamaldatwertes einer neutralen Benzylpenicillinlösung in Gegenwart von ϵ -Aminocaprönsäure bzw. Äthylendiamin-dihydrochlorid. Die Hydrolyse von Benzylpenicillin ist unter diesen Bedingungen vernachlässigbar und würde in 6 Std. lediglich einen Penamaldatwert von 100 bewirken. Immerhin war nicht von vornherein auszuschliessen, dass Äthylendiamin die Penicillinhydrolyse katalytisch beschleunigen würde. Mit Hilfe des Penamaldat-Stabilitätstestes [10] konnte gezeigt werden, dass die Inkubationslösung keinen beachtlichen Anteil an Penicilloinsäure enthielt und dass demnach die gemessene Zunahme des Penamaldatwertes die Aminolysegeschwindigkeit im wesentlichen richtig wiedergibt. Vergleicht man die Zeiten, die benötigt werden, bis ein Penamaldatwert von 1000 in der Äthylendiamin-haltigen Lösung (15 Min.) und in der ϵ -Aminocaprönsäure-haltigen Lösung (190 Min.) erreicht wird, und berücksichtigt man ferner, unter Annahme einer linearen Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Aminkonzentration, dass die Äthylendiaminkonzentration 8mal kleiner als diejenige der ϵ -Aminocaprönsäure ist, so ergibt sich, dass in neutralen Lösungen gleicher Molarität die Penicilloilylierung von Äthylendiamin 100mal rascher abläuft als diejenige von ϵ -Aminocaprönsäure.

Penamaldat-Stabilitätsteste am Schluss der Inkubation. – a) Ein Aliquot der Benzylpenicillin/Äthylendiamin-Inkubationslösung wurde mit 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,4 auf einen Penamaldatwert von 0,6 verdünnt, worauf die Penamaldatstabilität ermittelt wurde: $PS_{10} = 97\%$.

b) Eine Penicilloinsäurelösung ($PW_0 = 0,6$), hergestellt durch alkalische Hydrolyse von Benzylpenicillin, welche eine Penamaldatstabilität $PS_{10} = 23\%$ zeigte, wurde mit der verdünnten Inkubationslösung nach a) im Verhältnis 1:1 gemischt. Das Gemisch zeigte: $PS_{10} = 62\%$; berechnet: $PS_{10} = 60\%$. Die normale Instabilität der Penicilloinsäure ist demnach bei den Versuchsbedingungen gewährleistet.

Diese Arbeit wurde teilweise unterstützt durch Beiträge des U.S. PUBLIC HEALTH SERVICE, des SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG und der EMIL BARRELL-Stiftung. Herrn Dr. K. VÖGLER (F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co., AG, Basel) verdanken wir Elementaranalysen der Präparate. Für technische Assistenz danken wir Frau E. STÄUBLE und Frä. E. BLATTER.

SUMMARY

The aminolysis of penicillins by ϵ -amino groups at pH 7,4 is demonstrated. It is shown that penicillic acid, formed spontaneously under these conditions from penicillins, does not contribute significantly to the penicilloylations observed. Penicillin therefore can directly form penicilloylamides under physiological conditions.

Allergie-Forschungslabor
Dermatologische Klinik, Universität Bern
Inselspital, Bern

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] C. H. SCHNEIDER & A. L. DE WECK, *Nature* 208, 57 (1965).
- [2] A. L. DE WECK, *Int. Arch. Allergy* 27, 20 (1962); C. W. PARKER, J. SHAPIRO, M. KERN & H. N. EISEN, *J. exp. Med.* 115, 821 (1962).
- [3] B. B. LEVINE & Z. OVARY, *J. exp. Med.* 114, 875 (1961).
- [4] O. WINTERSTEINER, H. E. STAVELY, J. D. DUTCHER & M. A. SPIELMAN, in «The Chemistry of Penicillin», edit. by H. T. CLARKE, J. R. JOHNSON & R. ROBINSON, p. 207ff., Princeton Univ. Press, Princeton N. J. 1949.
- [5] B. B. LEVINE, *Arch. Biochem. Biophysics* 93, 50 (1961).
- [6] J. A. THIEL, S. MITCHELL & C. W. PARKER, *J. Allergy* 35, 399 (1964).
- [7] B. B. LEVINE, *J. med. pharmaceut. Chemistry* 5, 1025 (1962).
- [8] A. L. DE WECK, *Int. Arch. Allergy* 21, 38 (1962); *idem*, IIIrd International Congress of Chemotherapy, p. 1294ff., Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1964.
- [9] C. W. PARKER, A. L. DE WECK, M. KERN & H. N. EISEN, *J. exp. Med.* 115, 803 (1962).
- [10] C. H. SCHNEIDER & A. L. DE WECK, *Helv.* 49, 1689 (1966).
- [11] E. CHAIN, F. J. PHILPOT & D. CALLOW, *Arch. Biochemistry* 18, 171 (1948).

- [12] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. S. RANDALL, *J. biol. Chemistry* **193**, 265 (1951).
 [13] C. H. SCHNEIDER & A. L. DE WECK, *Biochem. biophysica Acta* (in Vorbereitung).
 [14] J. W. FOSTER & H. B. WOODRUFF, *J. Bacteriol.* **47**, 43 (1944).
 [15] R. B. WOODWARD, A. NEUBERGER & N. R. TRENNER, in «The Chemistry of Penicillin», edit. by H. T. CLARKE, J. R. JOHNSON & R. ROBINSON, p. 415ff., Princeton Univ. Press, Princeton N. J. 1949.
 [16] K. F. NAKKEN, L. ELDJARN & A. PIHL, *Biochem. Pharmacology* **3**, 89 (1960).

195. Chemische Aspekte der Penicillin-Allergie: die direkte Bildung der Penicilloyl-Determinanten aus Penicillin¹⁾

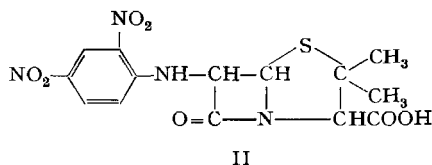
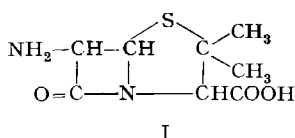
von C. H. Schneider und A. L. de Weck

(2. IV. 66)

Theoretischer Teil

In der vorausgehenden Arbeit [2] untersuchten wir die Reaktion von Penicillinen mit ϵ -Aminocapronsäure und Poly-L-Lysin bei pH 7,4 und zeigten, dass bei diesem pH Penicilline mit Aminogruppen unter Bildung von N⁶-Penicilloylamiden reagieren können, wobei Penicillensäure als Zwischenprodukt kaum in Frage kommen kann. Diese direkte Aminolyse der Penicilline wird, ganz im Gegensatz zur Penicillensäurebildung, durch die verschiedenen Acylseitenketten nur wenig beeinflusst und würde sich als Basis der Penicillin-Immunogenizität [3] [4] schon aus diesem Grund besser eignen als die spontane Penicillensäurebildung. Doch bleibt die Aufgabe zu zeigen, dass die direkte Penicilloylierung auch *in vivo* zu immunogenen Penicilloylkonjugaten führen kann. Hierfür eignen sich Penicillansäuren, welche wie die Penicilline durch Aminolyse Amide bilden, aber im Gegensatz zu jenen nicht in Penicillensäure übergehen können. Diese Verbindungen müssen wie die Penicilline zur Erzeugung von Antikörpern befähigt sein, welche gegen die zur Penicilloyl-Haptenstruktur analogen Determinanten gerichtet sind.

Wir haben bisher zwei derartige Verbindungen näher untersucht: 6-Aminopenicillansäure (I) und 6-(2,4-Dinitrophenylamino)-penicillansäure (II). 6-Aminopenicillansäure ist schon seit einiger Zeit als ein kräftiges Allergen im Kaninchen bekannt [3]. Auf der anderen Seite lässt die Aminogruppe dieser Molekel Nebenreaktionen zu, wie die von uns schon diskutierte Bildung eines cyclischen Carbamats mit CO₂ und die Polymerisation [1], welche bis zur genauen Abklärung jede Argumentation zugunsten einer direkten *in vivo* Penicilloylierung, die sich auf die 6-Aminopenicillansäure-Immunogenizität stützt, schwächen müssen.



¹⁾ Über einen Teil dieser Ergebnisse wurde bereits kurz berichtet [1].