

- [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 Penicillin<sup>1)</sup>

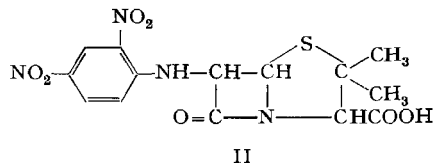
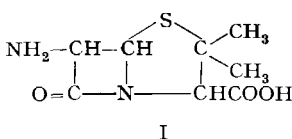
von C. H. Schneider und A. L. de Weck

(2. IV. 66)

### Theoretischer Teil

In der vorausgehenden Arbeit [2] untersuchten wir die Reaktion von Penicillinen mit  $\epsilon$ -Aminocapronsäure und Poly-L-Lysin bei pH 7,4 und zeigten, dass bei diesem pH Penicilline mit Aminogruppen unter Bildung von N<sup>6</sup>-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 CO<sub>2</sub> 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.



<sup>1)</sup> Über einen Teil dieser Ergebnisse wurde bereits kurz berichtet [1].

Wir werden zeigen, dass 6-Aminopenicillansäure bei pH 7,4 in Abwesenheit von  $\text{CO}_2$  mit  $\epsilon$ -Aminocaprönsäure oder Polylysin unter Bildung von Penicillanoylamido-Derivaten reagieren kann. Durch Phenacetylierung des  $\epsilon$ -Aminocaprönsäure-Reaktionsproduktes entstand teilweise  $\epsilon$ -(Benzylpenicilloyl-amido)-caprönsäure, womit die direkte Reaktion der 6-Aminopenicillansäure mit der Aminogruppe der  $\epsilon$ -Aminocaprönsäure nachgewiesen ist. Die Ausbeute war jedoch gering, und das Resultat schliesst in keiner Weise eine Rolle der 6-Aminopenicillansäure-Polymerisation beim Zustandekommen des immunogenen Konjugates *in vivo* aus. Sollte tatsächlich ein «Polymerkonjugat», welches statt monomerer 6-Aminopenicillanoylgruppen polymere Ketten trägt, für die starke Immunogenizität der 6-Aminopenicillansäure verantwortlich sein, so könnte die Penicillensäure bei seinem Zustandekommen *in vivo* nicht von vornherein ausgeschlossen werden; denn Dimere und Polymere der 6-Aminopenicillansäure sind formal Penicilline und können im Prinzip über die Penicillensäure-Zwischenstufe mit dem Träger reagieren. Bis zur weiteren Abklärung dieses Fragenkomplexes kann daher 6-Aminopenicillansäure nicht mit Sicherheit als penicillensäurefreie, immunogene Penicillinverbindung gelten.

Der 6-Dinitrophenylamino-penicillansäure fehlt die freie Aminogruppe und damit die Möglichkeit zu den erwähnten unerwünschten Nebenreaktionen. Wir werden zeigen, dass bei pH 7,4 6-Dinitrophenylamino-penicillansäure mit  $\epsilon$ -Aminocaprönsäure unter Bildung von  $\epsilon$ -(6-Dinitrophenylamino-penicillanoyl-amido)-caprönsäure reagieren kann und dass diese Reaktion praktisch gleich schnell abläuft wie die analoge Penicilloylierung von  $\epsilon$ -Aminocaprönsäure durch Benzylpenicillin oder Phenoxy-methylpenicillin. Da die verschiedenen Acylseitenketten der Penicilline die direkte Aminolyse wenig beeinflussen, waren wir geneigt anzunehmen, die direkte Reaktion des  $\beta$ -Lactamrings mit Aminen werde allgemein durch Substituenten der 6-Aminogruppe wenig oder nicht beeinflusst. Das scheint aber nicht so. Aminolyseversuche mit 6-Isopropylamino-penicillansäure bzw. 6-Dimethylamino-penicillansäure zeigten im Vergleich zu den Penicillin-Aminolysen nur sehr geringe Reaktionsgeschwindigkeiten an [5].

Dank der relativ hohen Aminolysegeschwindigkeit der 6-Dinitrophenylamino-penicillansäure gelang es, unter Bedingungen, wie sie für Benzylpenicillin verwendet werden,  $\epsilon$ -(6-Dinitrophenylamino-penicillanoyl-amido)-caprönsäure und ebenfalls ein Konjugat mit Polylysin herzustellen. 6-Dinitrophenylamino-penicillansäure erwies sich als immunogen im Kaninchen. Die spezifischen Antiseren wurden mit der Hämagglutinationstechnik geprüft; ihre Titer waren niedrig, aber im gleichen Rahmen wie Titer von Antiseren, die durch analoge Immunisation von Kaninchen mit Benzylpenicillin erhalten wurden.

Diese Ergebnisse, vereint mit denjenigen der vorangehenden Arbeit, erlauben nach unserer Meinung den Schluss, dass die direkte Penicilloylierung von Trägerstrukturen *in vivo* – ohne Beteiligung der Penicillensäure, die sich spontan aus Penicillinen bildet – zur Erzeugung von antigenischen Penicilloyl-Determinanten hinreicht.

Ob und inwieweit von Seiten des Trägers aus strukturelle Besonderheiten wie die 1,2-Aminothiolgruppierung die Reaktion erleichtern, bleibt zu prüfen. Wir fanden z. B. kürzlich, dass neben der 1,2-Diaminogruppe auch die 1,3-Diaminogruppierung die neutrale Penicilloylierung beschleunigt [6]. Ob auch gewisse Aminosäuresequenzen diese Reaktion beschleunigen können, ist jedoch noch nicht abgeklärt.

Neben der  $\epsilon$ -Aminogruppe können andere funktionelle Gruppen der Proteine in neutraler, wässriger Lösung direkt penicilloyliert werden. Über diesbezügliche Versuche werden wir in einer folgenden Mitteilung [6] berichten.

### Experimenteller Teil

**1. Material und Methoden.** – Es gelten die Ausführungen in der vorausgehenden Arbeit [2].

**2. Versuche mit 6-Aminopenicillansäure.** – 6-Aminopenicillansäure wurde mit Polylysin bei pH 7,4 und 37° unter Konstanthaltung des pH inkubiert. Im einen Versuch wurde unter Ausschluss von CO<sub>2</sub> in einer Stickstoffatmosphäre in McILVAINE's Citrat-Phosphat-Puffer mit und ohne Polylysin inkubiert. Eine weitere Inkubation geschah in 0,2M Hydrogencarbonatlösung. In den drei Inkubationslösungen erreichte der Penamaldatwert nach den ersten 25–30 Std. einen Wert, der sich bei weitergeführter Inkubation nicht mehr stark änderte. Nach 30 Std. war der Penamaldatwert in der CO<sub>2</sub>-freien, polylysinhaltigen Inkubationslösung etwa 3mal höher als in der polylysinfreien Lösung und ebenfalls 3mal höher als in der Polylysin enthaltenden, hydrogencarbonathaltigen Lösung. Die polylysinhaltigen Reaktionslösungen konnten durch Sephadex-G-25-Gelfiltration in zwei Komponenten mit ungefähr gleichem Penamaldatwert aufgetrennt werden. Die rascher wandernde Komponente (I) enthielt das Polylysinmaterial. Die polylysinfreie Reaktionslösung wurde nach Abschluss der Inkubation mit Polylysin versetzt und wie die erste weiterbehandelt. Die hier erhaltene Komponente I hatte den Penamaldatwert 0; ein messbarer Penamaldatwert wurde nur in den Fraktionen, die die Komponente II enthielten, gefunden. Komponente I der polylysinhaltigen, citrat-phosphat gepufferten Reaktionslösung gab eine spezifische Fällung mit Antibenzylpenicilloyl-Kaninchenantiserum, welche durch 10<sup>-3</sup>M  $\epsilon$ -(Benzylpenicilloyl-amido)-capronsäure-bis-benzylammoniumsalz völlig gehemmt werden konnte.

Diese Versuche zeigen, dass 6-Aminopenicillansäure mit den  $\epsilon$ -Aminogruppen von Polylysin unter Bildung einer chemisch stabilen Bindung bei physiologischem pH reagieren kann. Die Gegenwart von CO<sub>2</sub> ist hierfür nicht erforderlich, sondern führt im Gegenteil zu geringeren Ausbeuten des gewünschten Reaktionsprodukts. Auf der andern Seite besteht die Möglichkeit, dass die 6-Aminopenicillansäure-Polymerisation bei den Inkubationen ihre Rolle spielt [7]. Ein Polylysin, welches einzelne Penicillanoylgruppen, und ein solches, das polymere Penicillanoylketten trüge, würden sich in der durchgeführten Gelfiltration und wahrscheinlich auch im Präzipitationstest nicht wesentlich voneinander unterscheiden.

Mit dem Ziel, abzuklären, ob 6-Aminopenicillansäure mit  $\epsilon$ -Aminogruppen direkt unter Bildung eines  $\epsilon$ -(6-Aminopenicillanoylamido)-Derivates reagieren kann, wurde die Verbindung in Gegenwart von  $\epsilon$ -Aminocapronsäure 23 Std. bei pH 7,4 unter Ausschluss von CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Lösung wurde darauf durch CRAIG-Verteilung in einer Stickstoffatmosphäre in 2 Komponenten mit ungefähr gleich hohen Penamaldatwerten zerlegt. Papierchromatographisch erwies sich, dass die rascher weitergeführte Komponente frei von  $\epsilon$ -Aminocapronsäure war. Die Lösung dieser Komponente wurde auf ein kleines Volumen eingengt und bei pH 7,7 in einem Puffer-Acetongemisch mit Phenylacetylchlorid behandelt. Vorhandene  $\epsilon$ -(6-Aminopenicillanoyl-amido)-capronsäure muss hierbei in  $\epsilon$ -(Benzylpenicilloyl-amido)-capronsäure übergehen. Das Reaktionsprodukt wurde mit HCl ausgefällt und als amorphes Bis-benzylammoniumsalz isoliert. Mittels UV.-Spektrum, Penamaldatwert, Penamaldatstabilität, Papierchromatographie und Gelfiltration liess sich die gereinigte Substanz als ein unreines  $\epsilon$ -(Benzylpenicilloyl-amido)-capronsäure-bis-benzylammoniumsalz identifizieren. Die Ausbeute auf Grund der Penamaldatanalyse betrug 5%. Dieses Ergebnis demonstriert die direkte Reaktion der 6-Aminopenicillansäure mit  $\epsilon$ -Aminocapronsäure unter CO<sub>2</sub>-freien Bedingungen bei pH 7,4.

*Penicillanoyl-Polylysin bei pH 7,4:* Die Ansätze enthielten 145 mg 6-Aminopenicillansäure (neutralisiert mit NaOH) und 40 mg Polylysin in 4,0 ml Puffer bei pH 7,4. Inkubation und Sephadex-G-25-Gelfiltration geschahen grundsätzlich gleich wie bei den entsprechenden Benzylpenicillin-Versuchen. Bei CO<sub>2</sub>-freiem Arbeiten wurde das Inkubationsgemisch in einem bis auf eine kleine Öffnung geschlossenen Gefäss, durch welches ein langsamer Stickstoffstrom geschickt wurde, gehalten. McILVAINE-Puffer wurde unter Rückfluss ausgekocht. Es wurden CO<sub>2</sub>-freie NaOH-Lösungen benutzt.

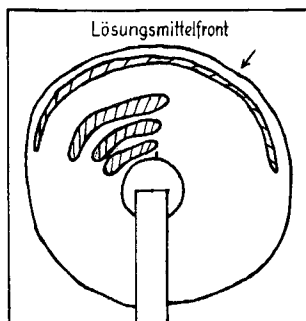
Ansatz in McILVAINE-Puffer: PW der Inkubationslösung nach 30 Std.: 350; PW vor Gelfiltration nach 72 stdg. Inkubation: 430. Nach Gelfiltration: PW der Komponente I/PW der Komponente II = 1,2.

Ansatz in McILVAINE-Puffer ohne Polylysin: PW der Inkubationslösung nach 30 Std.: 125; nach 50 Std.: 130. Nach Zusatz von Polylysin am Ende der Inkubation und Gelfiltration: PW der Komponente I/PW der Komponente II = 0.

Ansatz in Na-Hydrogencarbonatlösung: PW der Inkubationslösung nach 30 Std.: 100; PW nach 47 Std.: 90. Nach Gelfiltration: PW der Komponente I/PW der Komponente II:  $\sim$  1,5.

*Bildung von  $\epsilon$ -(6-Aminopenicillanoyl-amido)-capronsäure:* 1,45 g 6-Aminopenicillansäure wurden in wenig ausgekochtem McILVAINE-Puffer suspendiert und mit  $\text{CO}_2$ -freier NaOH neutralisiert und gelöst. Nach Zugabe von 3,75 g  $\epsilon$ -Aminocapronsäure wurde die Reaktionslösung mit ausgekochtem McILVAINE-Puffer auf 10 ml ergänzt und unter Stickstoff bei pH 7,4 und 37° gehalten. Der Penamaldatwert stieg von anfänglich 150 innert etwa 10 Std. auf 3500 und blieb dann konstant. Nach 22 Std. wurde die Reaktionslösung rasch in eine CRAIG'sche Verteilungsapparatur mit 100 Zellen übergeführt und zwischen den Phasen des Systems *t*-Amylalkohol-Essigsäure-Wasser (20:1:20) verteilt. Die Apparatur war geschlossen und wurde vor Arbeitsbeginn mit Stickstoff durchgespült. Nach 88 Überführungen zeigten Stickstoffbestimmungen und Penamaldatanalysen, dass sich das Reaktionsgemisch in zwei Komponenten mit ungefähr gleichem Penamaldatwert aufgespalten hatte. Die rascher wandernde Komponente enthielt keine  $\epsilon$ -Aminocapronsäure (papierchromatographisch im System *t*-Amylalkohol-Essigsäure-Wasser (20:1:20) nachgewiesen). Die Lösungsmittelphasen, welche die Hauptmenge der rascher wandernden Komponente enthielten, wurden vereinigt, im Rotationsverdampfer bei 40° auf wenige ml eingedampft und mit 3-proz. Na-Hydrogencarbonat auf 60 ml ergänzt. Die Lösung wurde mit 2 ml 2N NaOH auf pH 7,7 gebracht, mit 40 ml Aceton und nach dem Kühlen auf  $-15^\circ$  bis  $-20^\circ$  innert 30 Min. unter Rühren mit 7 mMol Phenylacetylchlorid versetzt. Das pH (Glaselektrode) wurde durch Zugaben von 5N NaOH oberhalb 7,5 gehalten. Nachdem die Reaktionslösung noch 1 Std. bei  $-15^\circ$  bis  $-20^\circ$  und 2 Std. bei Zimmertemperatur weitergerührt worden war, wurde sie mit Äther ausgeschüttelt (total 200 ml) und die wässrige Phase mit 6N HCl unter Eiskühlung angesäuert (pH 2,5). Die Fällung wurde nach halbstündigem Stehen in der Kälte in 20 ml 1-Butanol aufgenommen; letztere Lösung wurde mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und mit 1,8 ml Benzylamin versetzt, worauf durch Ätherzusatz das Bis-benzylammoniumsalz des gewünschten Produktes ölig ausgefällt wurde. Das Salz konnte nicht kristallisiert werden. Nach zweimaliger Umfällung aus 95-proz. Äthanol-Äther (1:10) wurde der ölige Niederschlag in 20 ml 0,1M Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst.

Ausbeute: Der Penamaldatwert der Schlusslösung betrug 400. Bei einer 100-proz. Umwandlung der 6-Aminopenicillansäure in  $\epsilon$ -(Benzylpenicilloyl-amido)-capronsäure-bis-benzylammoniumsalz wäre die Konzentration in der Schlusslösung  $1/3\text{M}$  und der Penamaldatwert 8000. Die Ausbeute beträgt somit 5%. Penamaldatstabilität:  $\text{PS}_{10} = 97\%$ .



Papierchromatographie von  $\epsilon$ -(Benzylpenicilloyl-amido)-capronsäure-bis-benzylammoniumsalz (Rohprodukt)

Links ist das Rohprodukt, rechts reines  $\epsilon$ -(Benzylpenicilloyl-amido)-capronsäure-bis-benzylammoniumsalz aufgetragen. Die Zonen sind braungelb.

UV.-Spektrum: Wie Fig. 1 der vorangehenden Arbeit, mit zusätzlicher Schulter bei 282 nm. Die Extinktion bei 282 nm war ein Drittel derjenigen bei 257 nm.

Gelfiltration: Aliquote der Schlusslösung wurden durch kleine Säulen von Sephadex G-25 und Biogel P-2 (CALBIOCHEM, Luzern) filtriert. Von beiden Säulen wurde das bei 257 nm absorbierende Material je in zwei ungefähr gleich grossen Anteilen eluiert, von denen nur der früher eluierte einen messbaren Penamaldatwert zeigte. Wanderung und Breite dieser durch Penamaldatanalyse erfassbaren Zonen waren so, wie sie auch für reines  $\epsilon$ -(Benzylpenicilloyl-amido)-capronsäure-bis-benzylammoniumsalz erhalten wurden. Nichts deutete auf Anwesenheit höhermolekularen Materials.

Papierchromatographie: 5  $\mu$ l Schlusslösung wurden neben 5  $\mu$ l Lösung von authentischem  $\epsilon$ -(Benzylpenicilloyl-amido)-capronsäure-bis-benzylammoniumsalz (10 mg/ml) auf gepuffertem Papier (0,1M Phosphatpuffer pH 6,5) mit 1-Butanol-Äthanol-Wasser (4:1:1) chromatographiert. Nach dem Behandeln mit ammoniakalischem Silbernitrat zeigte sich das wiedergegebene Bild, welches bestätigt, dass ein Teil des Produkts aus  $\epsilon$ -(Benzylpenicilloyl-amido)-capronsäure-bis-benzylammoniumsalz besteht.

**3. Versuche mit 6-Dinitrophenylamino-penicillansäure.** – 6-Dinitrophenylamino-penicillansäure wurde durch Einwirkung von Dinitrofluorbenzol auf 6-Aminopenicillansäure in einer Mischung von Aceton und Natriumhydrogencarbonat-Lösung hergestellt (s. unten). Das durch Umkristallisation aus Äther und Aceton-Wasser gereinigte Produkt zersetzte sich langsam im Tageslicht in neutraler, wässriger Lösung. Inkubation der Verbindung unter Lichtabschluss mit  $\epsilon$ -Aminocapronsäure in 0,1M Phosphatpuffer bei neutralem pH führte zu  $\epsilon$ -(6-Dinitrophenylamino-penicillanoyl-amido)-capronsäure, welche als Bis-benzylammoniumsalz isoliert und charakterisiert wurde. Das gereinigte Präparat ist in gepufferter, wässriger Lösung im neutralen Bereich, aber auch bei pH 4 im Tageslicht recht unbeständig, und zwar fallen sowohl die Extinktion bei 355 nm als auch der Penamaldatwert innert weniger Stunden auf die Hälfte des Anfangswertes. Dagegen ist die Verbindung im Dunkeln stabil und lässt sich ebenso wie 6-Dinitrophenylamino-penicillansäure im stark gedämpften Licht ohne Störung handhaben. Dies demonstrieren beispielsweise die Papierchromatogramme der gereinigten Substanzen.

Die Aminolyse der 6-Dinitrophenylamino-penicillansäure wurde sowohl in Gegenwart von Polylysin als auch von  $\epsilon$ -Aminocapronsäure verfolgt. Die Messungen wurden wie in Tabelle 2 der vorangehenden Arbeit [2] durchgeführt. Die Zunahme des Penamaldatwertes der  $\epsilon$ -Aminocapronsäure-haltigen Inkubationslösung betrug nach 6 Std. 1900. Der Anfangspenamaldatwert war in einem Versuch 1000, in einem anderen 600. Diese Anfangspenamaldatwerte entstehen möglicherweise beim Neutralisieren der freien Säure vor der Inkubation, durch temporären und lokalen Laugenüberschuss. Ähnliche Anfangspenamaldatwerte sind beispielsweise auch nach Neutralisation der freien Säure von Penicillin V aufgetreten. Die Inkubation mit Polylysin führte zu einem Polylysinkonjugat, welches gemäss Penamaldatanalyse 37,4  $\mu$ Mol 6-Dinitrophenylamino-penicillanoyl-Gruppen tragen würde. Der Kontrollversuch mit erst bei Inkubationsschluss zugesetztem Polylysin führte jedoch im Gegensatz zu den Penicillinversuchen zu einem hohen Penamaldatwert des Polylysins. Nach Abzug dieses Wertes errechnet man für das Konjugat einen Gehalt von 21,6  $\mu$ Mol 6-Dinitrophenylamino-penicillanoyl-Gruppen, was sich mit entsprechenden Penicillinwerten der Tabelle 2 der vorausgehenden Arbeit gut vergleichen lässt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aminolyse der 6-Dinitrophenylamino-penicillansäure mit ähnlicher Geschwindigkeit wie diejenige von Benzylpenicillin oder beispielsweise Phenoxy-methylpenicillin abläuft.

Die Immunogenizität der 6-Dinitrophenylamino-penicillansäure wurde im Kaninchen nachgewiesen. Mehrere Tiere erhielten Injektionen von 6-Dinitrophenylamino-penicillansäure zusammen mit vollständigem FREUND'schen Adjuvans gemäss einem früher beschriebenen Schema [8]. Im Serum dieser Tiere wurden mittels der Hämagglutinationsmethodik spezifische Anti-dinitrophenylaminopenicillanoyl-Antikörper gefunden. Die Titer dieser Antiseren waren niedrig, aber von gleicher Grössenordnung wie die Antibenzylpenicilloyl-Antikörpertiter in Seren von Kaninchen, welche auf entsprechende Weise mit äquimolaren Mengen von Benzylpenicillin immunisiert worden waren (Tabelle).

**6-(2,4-Dinitrophenylamino)-penicillansäure:** 4,3 g 6-Aminopenicillansäure, in 180 ml 3-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung suspendiert, werden durch Zusatz von 2N Na OH in Lösung gebracht (pH der Lösung: 7,7). In die mit 120 ml Aceton versetzte und auf  $-15^{\circ}$  bis  $-20^{\circ}$  gekühlte

Lösung werden innert 20 Min. 4,1 g 2,4-Dinitrofluorbenzol in 40 ml Aceton eingerührt. Nach Weiterrühren in der Kälte (1 Std.) und bei Zimmertemperatur (2–3 Std.) wird die Lösung 3mal mit je 200 ml Äther extrahiert. Nun wird in Gegenwart von frischem Äther (200 ml) und Kühlung (+10°) das pH mit 6N HCl auf 2,0 gesenkt. Der Äther wird von der Wasserphase getrennt, und diese wird mit weiteren 100 ml Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte werden mit wenig Wasser gewaschen und nach dem Trocknen mit Natriumsulfat *in vacuo* auf ungefähr 20 ml eingeeengt. Das rasch auskristallisierende Rohprodukt (3,0 g) wird nach 30 Min. bei 0° abfiltriert und aus Aceton-Wasser (1:1) umkristallisiert: 2,6 g, Smp. 162° (Zers.). Dieses so gereinigte Präparat wurde bei sämtlichen Tierversuchen, präparativen Verwendungen und papierchromatographischen Untersuchungen gebraucht. Ein Teil des Präparats wurde unter geringem Substanzverlust noch zweimal aus Aceton-Wasser umkristallisiert: Smp. 164° (Zers.).

Neutralisationsäquivalent: ber. 382,3; gef. 383 (potentiometrisch in Aceton-Wasser/2,5:1). UV.-Spektrum in 0,1M Phosphatpuffer pH 7,0:  $E_m$  355 nm: 15400;  $E_m$  265 nm: 8800.

$C_{14}H_{14}O_7N_4S$  (382,34) Ber. C 43,98 H 3,69 N 14,65% Gef. C 44,23 H 3,90 N 14,58%

Papierchromatographie: In den drei untersuchten Systemen wanderte 6-Dinitrophenylamino-penicillansäure (5  $\mu$ l einer 1-proz. Lösung in Aceton) als einheitliche, scharfe, gelbe Zone. Beim Besprühen der Chromatogramme mit ammoniakalischem Silbernitrat erfolgte lediglich Braunver-

*Hämagglutinationstiter in Mischungen von Antisera und vorbehandelten Schafererythrocyten<sup>a)</sup>*

| Antisera  | Inhibitor<br>I oder II <sup>b)</sup> | Erythrocyten vorbehandelt mit: |  |
|---|--------------------------------------|--------------------------------|--|
|   |                                      | Benzylpenicillin               | 6-Dinitrophenylamino-<br>penicillansäure |
| Anti-Benzylpenicillin <sup>c)</sup>                               | –                                    | 32                             | 4  |
|   | $1 \cdot 10^{-5}M$ I                 | 0                              | –  |
|   | $1 \cdot 10^{-5}M$ II                | 32                             | –  |
|   | $6 \cdot 10^{-3}M$ II                | 0                              | –  |
| Anti-Benzylpenicilloyl-<br>bov.- $\gamma$ -Globulin <sup>d)</sup> | –                                    | 512                            | 32                                       |
|   | $1 \cdot 10^{-4}M$ I                 | 0                              | 8  |
|   | $1 \cdot 10^{-4}M$ II                | 512                            | 4  |
|   | $6 \cdot 10^{-3}M$ II                | 128                            | –  |
| Anti-6-Dinitrophenyl-<br>amino-penicillansäure <sup>e)</sup>      | –                                    | 4                              | 16–32                                    |
|   | $6 \cdot 10^{-4}M$ I                 | –                              | 8–16                                     |
|   | $6 \cdot 10^{-3}M$ I                 | –                              | 8  |
|   | $1 \cdot 10^{-5}M$ II                | –                              | 8–16                                     |
|   | $1 \cdot 10^{-4}M$ II                | –                              | 4–8                                      |

<sup>a)</sup> Der Titer wird angegeben als reziproker Wert der höchsten Serumverdünnung, die noch eine deutliche Hämagglutination zeigt.

<sup>b)</sup> Als Hapteninhibitoren dienten die Bis-benzylammoniumsalze von  $\epsilon$ -(Benzylpenicilloyl-amido)-capronsäure (I) und  $\epsilon$ -(6-Dinitrophenylamino-penicillanoyl-amido)-capronsäure (II).

<sup>c)</sup> Antiserumpool aus 3 Tieren.

<sup>d)</sup> Diese Daten werden vergleichshalber angegeben. Bovines  $\gamma$ -Globulin mit ungefähr 40 Benzylpenicilloylgruppen pro Molekel (Penamaldatanalyse) wurde hergestellt durch Penicilloylierung des Proteins in 1M  $K_2CO_3$ -Lösung bei 4°. Das neutralisierte und dialysierte Produkt (5 mg pro Tier) wurde in vollständigem FREUND'schem Adjuvans einmal in die Pfoten von Kaninchen (0,4 ml pro Pfote) injiziert. Die Antiseren wurden 3 Wochen später durch Herzpunktion gewonnen.

<sup>e)</sup> Antiserumpool aus 4 Tieren.

färbung der Zonen. Systeme: 1-Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:5), Rf: 0,9; *t*-Amylalkohol-Wasser (1:1), Papier mit 0,1M Phosphatpuffer pH 7,4 gepuffert, Rr: 0,9; 1-Butanol-Pyridin-Wasser (4:0,1:5), Rf: 0,5.

Zersetzung am Tageslicht: Die optische Dichte bei 355 nm einer im Dunkeln hergestellten Lösung der analytisch reinen Substanz in 0,1M Phosphatpuffer pH 7,0 fiel vom Anfangswert 0,71

beim Stehen am Tageslicht nach  $1\frac{1}{2}$  Std. auf 0,54 und nach  $5\frac{1}{2}$  Std. auf 0,45; dagegen blieb die optische Dichte einer wässrigen (sauren) Lösung (16 mg/l) während 2 Std. konstant.

*Bis-benzylammoniumsalz der  $\epsilon$ -(6-Dinitrophenylamino-penicillanoyl-amido)-capronsäure*; Herstellung im Dunkeln bei pH 7,2. – In einer Lösung von 3,8 g  $\epsilon$ -Aminocapronsäure in 8 ml 0,1M Phosphatpuffer pH 7,4 wurden 2,5 g 6-Dinitrophenylamino-penicillansäure eingerührt und durch 5N NaOH neutralisiert und gelöst. Die Inkubation erfolgte bei 37° bei pH 7,2 (pH-Stat, 1N NaOH). Nach 20 Std. verbrauchte die Lösung praktisch keine Lauge mehr, und der Penamaldatwert nahm nicht mehr wesentlich zu. Nach 24 Std. Inkubation wurde das Reaktionsprodukt als Bis-benzylammoniumsalz wie bei der  $\epsilon$ -(Benzylpenicilloyl-amido)-capronsäure (siehe [1], 2.1.a) aufgearbeitet. Ausbeute: 1,8 g, Smp. 135–137°. Penamaldatanalyse:  $PW_{\text{molar}} = 2,5 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

$C_{34}H_{45}O_9N_7S$  (727,82) Ber. C 56,10 H 6,23 N 13,47% Gef. C 55,84 H 6,71 N 12,93%

Papierchromatographie: Die Substanz (5  $\mu$ l einer 1-proz. wässrigen Lösung) wanderte als einheitliche gelbe Zone in den drei Systemen:

- t*-Amylalkohol-Wasser (1:1), Papier mit 0,1M Phosphatpuffer pH 7,4 gepuffert, Rf: 0,7;
- t*-Amylalkohol-Wasser (1:1), Papier mit 0,1M Phosphatpuffer pH 6,5 gepuffert, Rf: 0,7;
- 1-Butanol-Propanol-Wasser (1:1:2), Rf: 0,8.

Nach dem Besprühen der Chromatogramme mit ammoniakalischer Silbernitratlösung färbten sich die gelben Zonen braun. Bei b) und c) trat zusätzlich ein leichter, brauner Schatten hinter der Hauptzone auf.

Zersetzung am Tageslicht: Eine 2,5-proz. Lösung der analytisch reinen Substanz in 0,1M Phosphatpuffer pH 7,4 und eine ebensolche in 0,1M Natriumacetatpuffer pH 4,0 wurden am Tageslicht aufbewahrt (Februartag, Altostratus). Die optischen Dichten bei 355 nm und die Penamaldatwerte der Lösungen sanken auf die folgenden Bruchteile der Anfangswerte:

|                   | Nach 2 Std. |     | Nach 6 Std. |      |
|-------------------|-------------|-----|-------------|------|
|                   | $E_{355}$   | PW  | $E_{355}$   | PW   |
| pH 7,4            | 82%         | 75% | 59%         | 26%  |
| pH 4,0            | 63%         | 45% | 31%         | 22%  |
| pH 7,4 im Dunkeln | –           | –   | 96%         | 99%  |
| pH 4,0 im Dunkeln | –           | –   | 100%        | 100% |

*Hämagglutination von Kaninchen-Antisera*: Die zu untersuchenden Kaninchenantiseren wurden zur Komplementinaktivierung 30 Min. bei 56° gehalten, über Nacht an normale Schaf-Erythrocyten adsorbiert und darauf mit Schaf-Erythrocyten inkubiert, welche mit 6-Dinitrophenylamino-penicillansäure oder Benzylpenicillin in Veronalpuffer wie folgt vorbehandelt worden waren: Eine 10-proz. Suspension der Erythrocyten in 0,15M NaCl-Lösung wurde mit einem gleichen Volumen Kaliumbenzylpenicillinat-Lösung (50 mg/ml) oder Natrium-6-dinitrophenylamino-penicillinat-Lösung (25 mg/ml) und einem halben Volumen 0,1M Veronalpuffer pH 9,0 vermischt und 1 Std. bei 37° inkubiert. Darauf wurden die Zellen mit einer 0,01M Phosphatpuffer- 0,15M Kochsalz-Lösung pH 7,4 gewaschen und als 4-proz. Suspension resuspendiert. Die Inkubation der Erythrocyten mit Antisera und die Ermittlung der Hämagglutinationstiter erfolgten wie früher angegeben [8].

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. VOGLER (F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co., AG, Basel) verdanken wir Elementaranalysen der Präparate. Für technische Assistenz danken wir Frau E. STÄUBLE, Frä. E. BLATTER und Frä. H. AMSTUTZ.

#### SUMMARY

The aminolysis of two penicillin-like compounds which cannot form penicillenic acid has been studied:

(1) 6-Aminopenicillanic acid (which is highly immunogenic) reacts directly with  $\epsilon$ -amino groups at pH 7,4 under  $\text{CO}_2$ -free conditions; the possible role of its polymerisation in this reaction remains to be studied.

(2) 6-Dinitrophenylamino-penicillanic acid reacts with  $\epsilon$ -amino groups at pH 7,4 as fast as benzylpenicillin and other penicillins. Its immunogenicity in the rabbit is similar to that of benzylpenicillin.

It is suggested that the direct penicilloylation of carrier protein structures is a general route to the penicilloyl antigenic determinant *in vivo*.

Allergie-Forschungslabor  
Dermatologische Klinik, Universität Bern  
Inselspital, Bern

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] C. H. SCHNEIDER & A. L. DE WECK, *Nature* 208, 57 (1965).  
 [2] C. H. SCHNEIDER & A. L. DE WECK, *Helv.* 49, 1695 (1966).  
 [3] A. L. DE WECK, *Int. Arch. Allergy* 27, 38 (1962).  
 [4] A. L. DE WECK, IIIrd International Congress of Chemotherapy, p. 1294 ff., Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1964.  
 [5] C. H. SCHNEIDER & A. L. DE WECK, Vorläufige, unpublizierte Untersuchungen.  
 [6] C. H. SCHNEIDER & A. L. DE WECK, *Biochim. biophysica Acta* (in Vorbereitung).  
 [7] N. H. GRANT, D. E. CLARK & H. E. ALBURN, *J. Amer. chem. Soc.* 84, 876 (1962); F. R. BATCHELOR, M. COLE, D. GAZZARD & G. N. ROLINSON, *Nature* 195, 954 (1962).  
 [8] A. L. DE WECK, *Int. Arch. Allergy* 27, 20 (1962).

### 196. Über die Herkunft der C-Atome 22 und 23 im Strychnin

(Vorläufige Mitteilung)

von Ch. Schlatter, E. E. Waldner, H. Schmid, D. Gröger, K. Stolle und K. Mothes

(28. V. 66)

Kürzlich durchgeführte Experimente haben gezeigt, dass der nicht vom Tryptophan herrührende C<sub>9</sub>- bzw. C<sub>10</sub>-Teil der Indolalkaloide Vindolin [1] [2] [3] [4], Reserpinin [2], Ajmalicin [3] [4], Serpentin [3], Catharanthin [3] und 1,2-Dehydrospidospermidin [3] mevaloniden Ursprungs ist. Essigsäure wird zwar auch in diesen C<sub>9</sub>- bzw. C<sub>10</sub>-Teil inkorporiert, aber nur unter praktisch vollständiger Verschmierung [5]. Unter der Voraussetzung, dass die Verhältnisse beim Strychnin (1) dieselben sind, zeigen die nachfolgenden Experimente, dass die zwei zusätzlich im Strychnin enthaltenen C-Atome 22 und 23 aus Essigsäure stammen.

1-[<sup>14</sup>C]-Natriumacetat hat man an junge Pflanzen von *Strychnos nux vomica* L. verabreicht. Bei den beiden ersten Versuchen wurden die Pflanzen ohne Wurzeln in die radioaktive Lösung gestellt und nach 4 Tagen geerntet; beim 3. Versuch hat man der im Boden belassenen Pflanze die Aktivität mittels eingesetzter Subcutankanülen langsam appliziert und die Pflanze erst nach 31 Tagen aufgearbeitet.

Das radioaktive, bis zur Aktivitätskonstanz gereinigte Strychnin ( $4 \cdot 10^{-3}$  bzw.  $1 \cdot 10^{-2}\%$  Inkorporierung) wurde nach WIELAND *et al.* [6] über das 23-Isonitrosostrychnin und sein mit Thionylchlorid erhaltenes Umlagerungsprodukt zu WIELAND-GUMLICH-Aldehyd (2), CO<sub>2</sub> (aus C-22) und HCN (aus C-23) abgebaut<sup>1)</sup>. Die Resultate sind in der Tabelle wiedergegeben.

<sup>1)</sup> Über den Verlauf dieses Abbaus wird später berichtet (cf. [7]).