

## 247. Intracatenare Vernetzung von Gelatine mit Carbodiimid

von A. Gardi und Hs. Nitschmann<sup>1)</sup>

Zentrallaboratorium des Blutspendedienstes des Schweizerischen Roten Kreuzes, Bern,  
und Institut für Organische Chemie der Universität Bern

(21. VII. 72)

*Summary.* Under suitable conditions it is possible to introduce into dissolved denatured gelatin molecules intracatenar cross-links. Working with 2% solutions of commercial gelatin ( $M_n$  approximately 40 000) at 40° and pH 5,75 and with water-soluble carbodiimid as a condensing agent we succeeded in inserting 7–8 intracatenar amide bonds per molecule. The number of cross-links introduced was determined by the decrease of free  $-NH_2$  and  $-COOH$  groups.

Using 4% solutions a gel melting point of the cross-linked preparations below 0° was obtained as compared with the gel melting point of untreated gelatin at 28°.

The low viscosity and the behaviour in gel chromatography on Sepharose 6B show that the cross-linked peptide chains are fixed as rather dense coils.

A small amount of the cross-linking reagent remains covalently bound to the protein, as was shown with tritium labeled carbodiimid. The side reactions possibly responsible for this occurrence are discussed. The bonds between reagent and gelatin are fairly stable at acidic pH, but labile at alkaline pH.

The results of optical measurements (UV. and CD.) on cross-linked gelatin will be reported in another paper.

**1. Einleitung.** – Gelatine verdankt ihre grosse technische Bedeutung in erster Linie der Tatsache, dass warme wässrige Lösungen beim Abkühlen reversibel zu klaren Gelen erstarren. Beim Wiederaufwärmen verflüssigen sich diese Gele wieder innerhalb eines so engen Temperaturbereiches, dass man von einem Gelschmelzpunkt zu sprechen pflegt. Es ist bekannt, dass das Gelieren das Ergebnis des Renaturierungsbestrebens der Peptidketten ist. Die Renaturierung der polydispersen Gelatine gelingt allerdings nur mangelhaft, da nicht einfach eine Trimerisierung unter Ausbildung der Kollagen-Tripel-Helix, sondern eine dreidimensionale Vernetzung der Ketten stattfindet. Für die meisten praktischen Zwecke ist eine Gelatine um so «besser», je grösser ihr Gelbildungsvermögen ist, d.h. je höher bei gegebener Konzentration der Gelschmelzpunkt liegt und je fester ihre Gele sind<sup>2)</sup>.

Es gibt eine Anwendung der Gelatine, bei der das Geliervermögen gänzlich nutzlos, ja sogar unerwünscht ist, nämlich ihr Einsatz als Kolloid in Plasma-Ersatzmitteln, wie sie in der Schock-Therapie in zunehmendem Masse zur Auffüllung des Kreislaufes verwendet werden. Diese Verwendung ist möglich, weil Gelatine an sich nicht toxisch wirkt, weil sie trotz ihres tierischen Ursprunges (Rind oder Schwein) im Kreislauf des Menschen keine sich klinisch manifestierenden Abwehrreaktionen auslöst und weil sie fermentativ abgebaut werden kann, soweit sie nicht einfach durch die Niere wieder ausgeschieden wird.

<sup>1)</sup> Anfragen sind zu richten an den zweitgenannten Autor (H. N.): Institut für Organische Chemie, Erlachstrasse 9a, Postfach 89, CH-3000 Bern 9.

<sup>2)</sup> Von den sehr spezifischen chemischen Eigenschaften, die z. B. eine photographische Gelatine auch noch haben sollte, ist hier nicht die Rede.

Die üblicherweise etwa 4proz. Transfusionslösungen sollten möglichst bis gegen  $0^{\circ}$  hinunter nicht gelieren. Technische Gelatine zu modifizieren ist, um ihr Geliervermögen drastisch herabzusetzen. Dass weder die  $-\text{COOH}$ -, noch die  $-\text{NH}_2$ - oder die  $-\text{OH}$ -Gruppen beim Gelieren eine wesentliche Rolle spielen, haben *J. Bello et al.* [1] [2] gezeigt. Ihre Eliminierung oder Blockierung beeinflusst das Gelieren praktisch nicht. Dies verwundert heute nicht, da wir wissen, dass die tripelhelicale Kollagen-Konformation durch intercatenare H-Bindungen zwischen Peptidgruppen stabilisiert wird. Eine weitere Stabilisierung erfährt die Tripelhelix durch die Prolinreste, die die konformativen Möglichkeiten einschränken. Zwischen dem Gehalt an Prolin und Hydroxyprolin und der Denaturierungstemperatur der Kollagene verschiedener Arten sowie dem Gelschmelzpunkt der betreffenden Gelatine besteht in der Tat eine Beziehung [3]. Diese Tatsache bietet aber keinen Ansatzpunkt für eine gezielte chemische Modifizierung, da sich die Prolinreste nicht eliminieren lassen. Die einfachste Methode, um den Gel-Schmelzpunkt von Gelatine herabzusetzen, besteht in einem weiteren hydrolytischen Abbau, z.B. durch Erhitzen der Lösung bei mässig alkalischem pH. Allerdings muss dabei das mittlere Mol.-Gew. ( $M_n$ ) unter 20000 gesenkt werden, um Präparate zu erhalten, deren 4proz. Lösungen bis  $0^{\circ}$  flüssig bleiben. Eine solche Gelatine ist als Transfusionskolloid aber nicht mehr geeignet, weil sie allzu schnell den Kreislauf verlassen würde.

Verknüpft man aber die kürzeren Ketten einer solchen abgebauten Gelatine kovalent, so kann man wieder grössere Molekeln erhalten, die nun kein erhöhtes Gelbildungsvermögen zeigen, weil sie verzweigt sind.



Bei zwei im Handel befindlichen, nicht gelierenden Plasma-Ersatzmitteln geschieht die Modifizierung der Gelatine nach diesem Prinzip. Die Erfahrung hat allerdings gezeigt, dass man durch intermolekulare Vernetzung kürzerer Ketten nicht zu beliebig grossen und beliebig stark verzweigten Molekeln kommen kann. Wenn man die Bedingungen auf ein solches Ziel hin ausrichtet, stellt man fest, dass die mit dem Vernetzungsmittel versetzten Gelatinelösungen irreversibel gelieren. In der Tat haben die erwähnten Handelspräparate mittlere Mol.-Gew. ( $M_n$ ), die 25000 nicht überschreiten [4] [5], trotzdem höhere Werte vom physiologisch-medizinischen Standpunkt aus erwünscht wären, um die Verweildauer im Kreislauf heraufzusetzen.

Wie *Nitschmann & Stoll* schon 1968 postuliert haben [6] [7], sollte es aber möglich sein, unabgebaute Gelatine in denaturierter Form (statistischer Knäuel) intracatenar zu vernetzen. Von solchen Präparaten wäre zu erwarten, dass sie bei unverändertem Mol.-Gew. ebenfalls ein sehr geringes Geliervermögen zeigen, denn es ist klar, dass intracatenar vernetzte Knäuel in ihrer konformativen Freiheit und damit in ihrem



Renaturierungsbestreben sehr eingeschränkt sind. Im Folgenden soll über Versuche berichtet werden, denen diese Idee zugrunde liegt.

Eine überwiegend oder ausschliesslich intracatenare Vernetzung ist zu erwarten, wenn die Konzentration der Gelatine während der Vernetzungsreaktion klein ist, denn bei steigender Konzentration nimmt die Wahrscheinlichkeit intercatenarer Vernetzung zu. Die maximale Zahl der intracatenaren Brücken, die pro Molekel eingeführt werden können, wird von der Länge der Peptidketten, von ihrer Beweglichkeit und ihrer statistischen Form (Dichte des Knäuels) sowie von Zahl und Verteilung der an der Vernetzung beteiligten funktionellen Gruppen abhängen. Einen Hinweis darauf, was diesbezüglich etwa erwartet werden kann, gab uns die Arbeit von *Marfey et al.* [8] mit synthetischen Polypeptiden. Bei Vernetzungsversuchen an einem gemischten Polypeptid (Poly-Glu<sup>52</sup>-Lys<sup>33</sup>-Tyr<sup>15</sup>) vom Mol.-Gew. 52000 mit *Woodwards* Reagens K oder mit einem wasserlöslichen Carbodiimid konnten diese Autoren zeigen, dass bei Peptidkonzentrationen von höchstens 0,1% ohne Veränderung des Mol.-Gew. bis zu 6 Brückenbindungen pro Molekel eingeführt werden können, die alle intracatenar sein müssen. Der Einfluss auf das konformative Verhalten wurde nicht untersucht, aber es wurde festgestellt, dass die so vernetzten Polypeptidmolekeln in einer Säule von Sephadex G100 stärker retardiert werden als die unvernetzten Molekeln gleichen Gewichts. Das bedeutet, dass die vernetzten Knäuel statistisch betrachtet dichter sind als die freibeweglichen unvernetzten, so dass sie bei gleichem Teilchengewicht rascher und in engere Poren diffundieren können als diese.

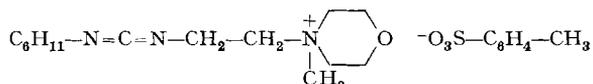
Für die Einführung kovalenter Brückenbindungen bei Peptiden und Proteinen steht eine grosse Zahl bifunktionaler Reagenzien zur Verfügung. Wenn man wie wir an eine eventuelle klinische Verwendung des Präparates denkt, wird man sich auf Reagenzien beschränken, von denen bekannt ist, dass ihr Einbau die Gelatine nicht toxisch machen und nicht mit neuen Antigen determinanten versehen wird. Technische Anwendung haben bisher nur Glyoxal und Hexamethylen-diisocyanat gefunden. Für unsere Modellversuche schien uns die Kondensation von freien Carboxyl- mit freien Aminogruppen des Peptids mit Hilfe von Carbodiimiden besonders geeignet. Die Reaktion läuft unter milden Bedingungen und in wässrigem Milieu. Ein besonderer Vorteil ist auch, dass das Reagens bei der Vernetzung nicht ins Protein eingebaut wird, sondern – von Nebenreaktionen abgesehen – nach der Aktivierung der Carboxylgruppen in ein Harnstoffderivat übergeht, das sich aus dem Präparat entfernen lässt. Die als Brücke eingeführte Säureamidbindung ist sicher physiologisch neutral. Dass Carbodiimid Gelatine zu vernetzen vermag, zeigten zuerst *Sheehan & Hlavka* [9]. Die Anwendbarkeit von Carbodiimiden zur Vernetzung von Gelatine wurde auch in der photographischen Industrie [10] untersucht. Die Herstellung einer carbodiimidvernetzten Gelatine, die als Transfusionskolloid geeignet sein soll, wurde sogar schon patentrechtlich geschützt [11]. Allerdings ist in diesem Verfahren die Vernetzung von einem hydrolytischen Abbau der Gelatine begleitet und die Bedingungen sind nicht so, dass eine vorwiegend intracatenare Vernetzung zu erwarten wäre. Vielmehr ist das Verfahren den schon bekannten ähnlich, bei denen verzweigt-mehrkettige Molekeln entstehen. Auf den Markt ist ein solches Präparat nie gekommen.

Im Folgenden wird gezeigt, dass es tatsächlich auch bei Gelatine möglich ist, die Peptidkettenknäuel mit Carbodiimid intracatenar zu vernetzen. Die mittlere Zahl der Brückenbindungen pro Molekel wurde durch quantitative Bestimmung der

freien -COOH- und -NH<sub>2</sub>-Gruppen ermittelt. Ausserdem wurde mit isotoopenmarkiertem Carbodiimid untersucht, ob und wie weit Reste des Kondensationsmittels im Protein verbleiben. Physikochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass die intracatenar vernetzte Gelatine erwartungsgemäss nur noch in sehr geringem Masse zu einer Renaturierung fähig ist. In dieser Mitteilung beschränken wir uns darauf, Ergebnisse folgender Messungen zu bringen: Mol.-Gew. (osmotisch), Chromatographie, Viskosität und Gel-Schmelzpunkt. Über optische Konformationsuntersuchungen (UV., CD.) werden wir in einer anderen Mitteilung berichten<sup>3)</sup>.

**2. Experimentelles.** - *Material.* Als Ausgangsmaterial verwendeten wir eine alkalisch here gestellte Kalbshautgelatine der Gelatinefabrik Winterthur (interne Bezeichnung: Gelatin-SRK<sup>4)</sup>), mit einem M<sub>n</sub> von 40 000-43 000 (osmotisch bestimmt). In alkalisch hergestellten Gelatinen ist ein grosser Teil der ursprünglich vorhandenen Amidgruppen hydrolysiert, so dass eine maximale Anzahl von Carboxylgruppen in Seitenketten für eine Reaktion mit Carbodiimid zur Verfügung steht (Charakterisierung, vgl. Tab. 4 und 5).

Als Vernetzungsmittel verwendeten wir 1-Cyclohexyl-3-[2-(4methyl-4--morpholinio)-äthyl]-carbodiimid-*p*-toluolsulfonat (Ionisches Carbodiimid, «ICD»), pract., *Fluka*. Das Carbodiimid und das daraus entstehende Harnstoffderivat lassen sich als quaternäre Ammoniumsalze leicht am Ionentauscher abtrennen.



*Vernetzung der Gelatine mit ICD.* Die zu vernetzende Gelatinelösung, enthaltend 2,0 g Protein, wurde in einem mit Rührer und kombinierter Glaselektrode versehenen Sulfierkolben auf dem Wasserbad auf die gewünschte Temperatur erwärmt und auf pH 7,0 resp. 5,75 eingestellt. Die Zugabe des Carbodiimids erfolgte in einer Portion unter starkem Rühren, wobei sich das Salz sofort auflöste. Anschliessend belies man die Lösung während 4-24 Std. bei gleichbleibender Temp., wobei bei einem Teil der Ansätze das pH während der ersten 4 Std. ständig durch Zugaben von verd. HCl kompensiert wurde.

Die Lösung wurde dann an zwei Ionentauschersäulen (Dowex 50 W in Na<sup>+</sup>- resp. H<sup>+</sup>-Form und Dowex 21 K in Cl<sup>-</sup>- resp. OH<sup>-</sup>-Form) von überschüssigem Reagens und gebildetem Harnstoffderivat befreit, anschliessend auf pH 7,0 gebracht und am Rotationsverdampfer im Wasserstrahlvakuum auf ca. 6% Gelatinegehalt eingengt. Nach Zugabe der nach dem Ionenaustausch noch fehlenden Menge NaCl wurde eine NaCl-Konzentration von ca. 0,9% eingestellt. Vor der Auswertung wurden die leicht trüben Lösungen durch Druckfiltration geklärt.

*Synthese von Tritium-markiertem ICD.* 1-Cyclohexyl-3-[2-(4-morpholinyl)-äthyl] carbodiimid wurde nach der Vorschrift von *Sheehan & Hlavka* [13] synthetisiert.

Zur Markierung wurde das Carbodiimid mit tritiiertem Methyljodid CTH<sub>2</sub>I wie folgt quaternisiert: In eine Ampulle wurden 20 mCi CTH<sub>2</sub>I (*Amersham*, England), 20 μl CH<sub>3</sub>I, 100 μl 1-Cyclohexyl-3-[2-(4-morpholinyl)-äthyl]carbodiimid und 400 μl frisch destilliertes Nitromethan eingefüllt. Hierauf wurde die Ampulle abgeschmolzen und während 3,5 Std. unter Lichtausschluss langsam gerollt. Zum Austausch des Anions wurden 4,2 g ICD (pract., *Fluka*) im 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen in so viel CHCl<sub>3</sub> p.A. gelöst, dass eine klare Lösung entstand. Nach Einfrieren des Ampulleninhalts wurde die Ampulle mit dem T-ICD-Iodid aufgebrochen und der Inhalt zu der Chloroformlösung gegeben. Nach gutem Durchmischen wurden 200 ml Äther zugegeben, worauf das Carbodiimid sofort ausfiel, zunächst ölig, nach kurzem Schütteln aber kristallin. Nach 30 Min. Stehenlassen im Dunkeln wurde das Carbodiimid auf der Nutsche abfiltriert, mit Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das so erhaltene hochaktive Carbodiimid wurde in der Tiefkühltruhe bei -60° aufbewahrt. Zur Herstellung des aktiven Vernetzungs-

<sup>3)</sup> Die meisten der Resultate sind der Dissertation von *A. Gardi* entnommen [12].

<sup>4)</sup> SRK: Schweizerisches Rotes Kreuz.

reagens' wurden 4,5 g ICD (*Fluka*) + 0,5 g hochaktives ICD in wenig Chloroform p.A. gelöst, gut vermischt und mit Äther gefällt. Nach Abnutschen und Waschen mit Äther wurde die Substanz nochmals in Chloroform gelöst und wiederum mit Äther gefällt. Das so erhaltene Produkt diente als Vernetzungsreagens. Es wird im folgenden mit T-ICD bezeichnet.

*Synthese von  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -markiertem Glycinnmethylesterhydrochlorid.* Die Synthese erfolgte nach *Brenner & Huber* [14] unter Verwendung von 0,1 mCi  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glycin (*Amersham*, England), Glycin p.A. *Merck* und Methanol p.A. *Merck*.

*Nachweis von Reagensresten in Carbodiimid-vernetzter Gelatine.* 10,0 ml einer 2,0proz., entsalzten Gelatinelösung wurden mit ca. 430 mg T-ICD unter den optimalen Vernetzungsbedingungen (vgl. Tab. 1, Versuche Nr. 30, 32–34) zur Reaktion gebracht. Zur Abtrennung von überschüssigem Reagens und Harnstoffderivat wurden die Ansätze dialysiert oder am Ionenaustauscher entsalzt. Zum Teil wurden die beiden Verfahren kombiniert angewendet. Dialyse: gegen 0,9proz. NaCl-Lösung während mindestens 40 Std. bei Zimmertemperatur mit 4–5maligem Wechsel der NaCl-Lösung.

*Ionenaustausch:* Dimension der verwendeten Säulen:  $15 \times 120$  mm; Kationenaustauscher: Dowex 50 W/X8 50–100 mesh in  $\text{H}^+$ -Form; Anionenaustauscher: Dowex 21 K in  $\text{OH}^-$ -Form.

Der Ionenaustausch erfolgte entweder in der Reihenfolge Kationenaustausch, dann Anionenaustausch ( $\text{H}^+/\text{OH}^-$ ), oder umgekehrt ( $\text{OH}^-/\text{H}^+$ ). Die Gelatinelösungen wurden mit entsalztem Wasser auf 25,0 oder 50,0 ml cluiert und anschliessend der Konzentrationsbestimmung und Aktivitätsmessung unterworfen.

### Chemische und physikalisch-chemische Methoden zur Untersuchung von Gelatinepräparaten.

*Konzentrationsbestimmung.* Sie erfolgte nach der Biuret-Methode [15]. In speziellen Fällen wurde die *Kjeldahl*-Methode und die Methode nach *Waddell* [16] herangezogen.

*Gelschmelzpunkt.* Wir benutzten die Bestimmungsmethode nach *Gerungross* [17], modifiziert von *Baumgartner* [18] und *Stoll* [19]. Die Messungen erfolgten einheitlich an 4proz. Gelatinelösungen mit einem Kochsalzgehalt von 0,9%.

*Molekulargewichte ( $M_n$ ).* Die  $M_n$  bestimmten wir routinemässig mit dem Konzentrationsosmometer nach *Nitschmann et al.* [4], ohne Berücksichtigung der durch die im Osmometer verwendete Membran diffundierenden Anteile<sup>6)</sup> (Teilchen mit  $\text{MG} < 6000$ ).

*Viskositätsmessungen.* Die Bestimmungen der relativen und reduzierten Viskosität erfolgten in einem *Ostwald*-Viskosimeter in 1,0proz. Lösung mit 0,9% NaCl bei  $37^\circ$ .

*Endgruppenbestimmung.* Sowohl die freien Amino- wie die freien Carboxylgruppen der vorgängig total entsalzten Gelatinen wurden je nach zwei unabhängigen Methoden bestimmt. Die freien Aminogruppen bestimmten wir einerseits mittels potentiometrischer Titration nach *Kenchington & Ward* [20] und andererseits mit 2,4-Dinitrofluorbenzol nach *Sanger* [21], wobei mit Ausnahme zweier kleiner Modifikationen nach den Angaben von *Heyns & Legler* [22] gearbeitet wurde. Wir bestimmten lediglich  $\epsilon$ -DNP-Lysin,  $\epsilon$ -DNP-Hydroxylysin sowie DNP-Glycin einzeln und erfassten die übrigen, ätherlöslichen DNP-Aminosäuren gesamthaft, unter Berücksichtigung der von *Porter* [23] angegebenen Hydrolysezerstörungsgrade. Freie Carboxylgruppen bestimmten wir einerseits ebenfalls mittels potentiometrischer Titration, andererseits nach der Methode von *Hoare & Koshland* [24] [25] unter Verwendung von  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glycinnmethylesterhydrochlorid und EDC ( $1\text{-}^4\text{Äthyl-3-dimethyl-aminopropyl-carbodiimid-hydrochlorid}$ , *Sigma Chem. Company*).

Die Resultate bei den Carboxyl- und  $\epsilon$ -Aminogruppen stimmten sehr gut überein, sodass die Titration zur Bestimmung dieser Gruppen gut geeignet ist. Bei der Bestimmung der  $\alpha$ -Aminogruppen jedoch wird in der Titration im ungefähr gleichen pH-Bereich auch die Imidazolgruppe des Histidins erfasst, so dass die Titration zur Bestimmung der  $\alpha$ -Aminogruppen nur bei bekanntem Histidingehalt oder für relative Messungen bei konstantem Histidingehalt herangezogen werden kann.

*Aktivitätsmessungen.* Die Messungen erfolgten in einem *Beckman*-Flüssigkeitsszintillationszähler, Modell L.S. 150, bei einem Gain von 150 in Glas-vials. Die Tritium enthaltenden Verbindungen wurden im Tritium-Integral-Kanal gemessen; als Szintillationslösung dienten dabei 10 ml

<sup>6)</sup> Sie machen erfahrungsgemäss nur wenige Gew.-% aus.

einer Lösung von 4 g PPO oder 5 g Butyl-PBD (Szintillator) in 1 l Toluol (purum *Fluka*) und 0,4 l Methanol (p.A. *Merck*).  $^{14}\text{C}$  enthaltende Verbindungen wurden im Kanal 35–130 gemessen. Der Kanal wurde so eingestellt, dass störende Chemilumineszenzerscheinungen, verursacht durch Soluenc (s. unten) nicht erfasst wurden. Als Szintillationslösung für  $^{14}\text{C}$ -Glycinmethylesterhydrochlorid dienten 10 ml einer Lösung von 4 g PPO (Szintillator) in 1 l Toluol (purum *Fluka*) + 4 ml Methanol (p.A. *Merck*).  $^{14}\text{C}$  enthaltende Gelatine wurde vor der Messung mit «Soluenc TM100» (Solubilizer, Firma *Pachard*) solubilisiert. Als Szintillationslösung für  $^{14}\text{C}$ -Gelatine dienten 10 ml einer Lösung von 4 g PPO in 1 l Toluol (purum, *Fluka*).

*Gelchromatographie.* Die Fraktionierung der Gelatinepräparate erfolgte an einer auf  $39^\circ$  thermostatisierten Säule ( $2,5 \times 100$  cm) von Sepharose 6 B<sup>6)</sup> (vgl. Fig. 2).

**3. Resultate.** – 3.1. *Vernetzung von Gelatine mit ionischem Carbodiimid (ICD).* Wir verwendeten zunächst die von *Marfey et al.* [8] gewählten Versuchsbedingungen: Gelatinekonzentration = 0,1% und eine Reagensmenge entsprechend 50 Mol Carbodiimid pro Mol Gelatine, was einem Verhältnis von 1,15 Mol Carbodiimid pro Mol freie Carboxylgruppen, bzw. 3 Mol Carbodiimid pro Mol  $\epsilon$ -Aminogruppen entsprach. Das pH stellten wir auf 7,0 ein; variiert wurde lediglich die Temperatur zwischen 18 und  $60^\circ$ . Wir mussten jedoch feststellen, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen in keinem Fall eine signifikante Senkung des Gel-Schmelzpunktes erreicht werden konnte. Unabhängig von der Reaktionstemperatur lagen  $M_n$  und Gel-Schmelzpunkt aller Versuche ungefähr beim gleichen Wert wie im Ausgangsmaterial. Auch die Variation der Gelatinekonzentration zwischen 0,1 und 4,0% bei gleichbleibendem Molverhältnis Carbodiimid:–COOH 1,15:1 und bei einer Temperatur von  $40^\circ$  zeigte überraschenderweise keinen Einfluss auf den Gel-Schmelzpunkt. Es war insbesondere auch keine intermolekulare Vernetzung festzustellen, denn das mittlere Teilchengewicht nahm in keinem einzigen Versuch zu.

Erst die Erhöhung der eingesetzten Carbodiimid-Menge und damit die des Molverhältnisses Carbodiimid:–COOH brachte einen Hinweis auf den einzuschlagenden Weg. Die Vernetzung einer 2,0proz. Gelatinelösung mit ca. 2 Mol Carbodiimid pro Mol –COOH bei pH 7,0 und einer Temperatur von  $40^\circ$  brachte eine Senkung des Gel-Schmelzpunktes von  $24^\circ$  auf  $14^\circ$  bei einem praktisch unveränderten  $M_n$  von 39000.

Die weitere Erhöhung der Carbodiimid-Menge unter gleichzeitiger Variation der Gelatinekonzentration und Konstanthaltung des pH in leicht saurem Gebiet ergab schliesslich die in Tab. 1 zusammengestellten Resultate.

Die Reaktionsbedingungen waren folgende:

- Gelatinekonzentration 0,1/1,0/2,0/3,0%
- Molverhältnis ICD:–COOH: 3,1:1/4,6:1/9,1:1
- pH: laufend auf 5,75 kompensiert (Versuch Nr. 35: pH 6,2)
- Reaktionszeit 3–5 Std.
- Reaktionstemperatur:  $40$ – $45^\circ$

Die eingesetzte Rohgelatine war in den meisten Fällen vorher am Ionenaustauscher vollständig entsalzt worden; ausserdem wurden die Ansätze nach der Umsetzung wegen des resultierenden hohen Kochsalzgehaltes nicht an einem Ionenaustauscher in  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -, sondern an einem solchen in  $\text{H}^+$ - und  $\text{OH}^-$ -Form von überschüssigem Reagens, entstandenem Harnstoffderivat und Elektrolyt befreit.

<sup>6)</sup> *Pharmacia*, Uppsala. Ausschlussgrenzen: für Polysaccharide  $1 \times 10^6$ , für Proteine  $4 \times 10^6$ .

Bei einigen Versuchen dieser Serie, besonders bei höheren Gelatinekonzentrationen, trat kurz nach der ICD-Zugabe eine milchige Trübung auf, verbunden mit einer starken Viskositätszunahme oder gar teilweiser Gelierung. Diese Erscheinungen konnten durch dreiminütiges Erhöhen des pH-Wertes auf 10,0 rückgängig gemacht werden. Die Trübung verschwand dabei fast vollständig, die Viskosität nahm wieder ab und gelierte Gelatine verflüssigte sich. Trotzdem ist ein Gelieren während der Umsetzung zu vermeiden, da sonst nur eine geringe Schmelzpunktsdepression resultiert.

Tabelle 1

Ver- suchs- Nr.	pH	Gelatine- Konz. (%)	Molver- hältnis ICD: –COOH	ICD- Konz. (mg/ml)	ent- salzt	Ionen- Austausch gegen	geliert während Um- setzung	M <sub>n</sub>	Gel- Smp. °C
28	5,75	0,1	4,6:1	2,16	+	H <sup>+</sup> , OH <sup>-</sup>	-	38600	11,5
29	5,75	1,0	9,1:1	42,6	+	H <sup>+</sup> , OH <sup>-</sup>	-	31900	△ 0
30	5,75	2,0	4,6:1	43,3	+	H <sup>+</sup> , OH <sup>-</sup>	-	39200	△ 0
31	5,75	2,0	4,6:1	43,3	-	Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup>	-	39600	6,9
32	5,75	2,0	4,6:1	43,3	+	H <sup>+</sup> , OH <sup>-</sup> <sup>a)</sup>	-	47500	6,0
33	5,75	2,0	4,6:1	43,3	+	H <sup>+</sup> , OH <sup>-</sup>	-	42600	△ 0
34	5,75	2,0	4,6:1	43,3	+	H <sup>+</sup> , OH <sup>-</sup>	-	50000	△ 0
35	6,20	2,0	4,6:1	43,3	-	H <sup>+</sup> , OH <sup>-</sup>	-	40800	7,6
36	5,75	3,0	3,1:1	43,3	+	Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup>	+	42000	14,3
37	5,75	3,0	4,6:1	64,5	+	H <sup>+</sup> , OH <sup>-</sup>	+	41000	11,9
Ausgangsgelatine (unverändert)								42000	24

<sup>a)</sup> zweimal ausgetauscht

Die Ergebnisse (Tab. 1) zeigen, dass es tatsächlich möglich ist, den Gel-Schmelzpunkt bei Teilchengewichtsmitteln zwischen 40000 und 50000 bis unter 0° hinunter zu senken. Dabei sind die Grenzen der möglichen Gelatinekonzentrationen recht eng gesteckt: in grosser Verdünnung (0,1%) ist nun zwar auch eine erhebliche Senkung des Gel-Schmelzpunktes zu verzeichnen (11–12°), aber doch nicht bis 0°, andererseits gelieren die Ansätze mit 3,0% bald nach der Reagenszugabe. Die besten Resultate wurden durch Vernetzung von 2,0proz. Gelatinelösungen erzielt (Versuche Nr. 30–35): diese Produkte gelieren bei Mol.-Gew. über 39000 in 4,0proz. Lösung bis 0° hinunter nicht, allerdings nur dann, wenn die Gelatine vor der Umsetzung vollentsalzt wurde. Bei Verwendung nichtentsalzter Gelatine liegen die Gel-Schmelzpunkte bei 7°. Als Erklärung dafür könnte eventuell der relativ hohe Ca<sup>2+</sup>-Gehalt der verwendeten Rohgelatine herangezogen werden: Gelatine SRK enthält ca. 45 mVal Ca<sup>2+</sup> pro 100 g Gelatine [19]; möglicherweise wird dadurch ein Teil der freien Carboxylgruppen (maximal 40%) maskiert und ist somit der Aktivierung mit ICD nicht zugänglich.

Diese Resultate sind einigermaßen erstaunlich: die Vernetzung einer 2,0proz. Gelatinelösung führt zu kaum mehr gelierenden Produkten, also scheinen vor allem intracatenare Brückenbindungen gebildet worden zu sein. Die Vernetzung einer 3,0proz. Lösung dagegen führt zu sofortiger Gelierung, was auf eine vorwiegend intercatenare Vernetzung hindeutet. Eine Erhöhung des Gel-Schmelzpunktes eines bei der Umsetzung flüssig gebliebenen Produktes wurde nie beobachtet!

*Davis & Tabor* [26], die die Vernetzung von Gelatinelösungen kleiner Konzentration ( $< 2\%$ ) durch Formaldehyd mittels Viskositätsmessungen verfolgten, fanden, dass unter diesen Bedingungen entweder keine Veränderung oder aber eine Senkung der Viskosität eintrat, also nie eine Viskositätszunahme. Die Konzentrationsabhängigkeit der spontanen Gelierung bei Behandlung von Gelatine mit Formaldehyd wurde von *Pouradier & Chateau* [27] untersucht. Sie fanden, dass bei verdünnten Gelatinelösungen ( $\leq 2\%$ ), oder wenn die eingesetzte Formaldehydmenge zu klein war, bei  $60^\circ$  nie eine Gelbildung auftrat. Bei höheren Gelatinekonzentrationen (ab  $3\%$ ) und genügend Formaldehyd bildeten sich jedoch bald unschmelzbare Gele. Diese Beobachtungen decken sich vollständig mit unseren Feststellungen; genau wie bei der Formaldehydvernetzung liegt auch bei der Vernetzung mit ICD die Grenze der Gelatinekonzentration, bei deren Überschreitung ein unschmelzbares Gel resultiert, zwischen  $2,0$  und  $3,0\%$ , sofern genügend Vernetzungsreagens vorhanden ist.

Wir haben die Abhängigkeit dieser Grenze von der Menge an Vernetzungsreagens noch etwas näher untersucht, indem wir Gelatinelösungen verschiedener Konzentration ( $1\text{--}6\%$ ) mit steigenden Mengen ICD bei  $40^\circ$  und pH  $5\text{--}6$  inkubierten und feststellten, welche Ansätze nach  $5$  Min. geliert waren. Die erhaltenen Resultate sind in Fig. 1 graphisch dargestellt.

Die Ansätze oberhalb der Grenzlinie A–B gelierten spontan. Es zeigte sich, dass auch bei einem Molverhältnis ICD:–COOH von nur  $1:1$  eine spontane Gelierung auftritt, wenn die Gelatinelösung mindestens  $4,5\%$  ist, dass aber eine  $1\%$  Gelatinelösung auch mit einem  $9$ fachen ICD-Überschuss nicht irreversibel verfestigt werden kann.

Bereits *Sheehan & Hlavka* [9] haben über dieses spontane Gelieren von Gelatine bei Behandlung mit einem wasserlöslichen Carbodiimid berichtet: zu einer Lösung von  $2,0$  g Gelatine in  $25$  ml Wasser ( $8,0\%$ ) gaben sie  $1,5$  g  $1\text{-}\text{Äthyl-3-[2-(4-methyl-4-morpholinio)-\text{äthyl}]carbodiimid-}p\text{-toluolsulfonat}$ . Das entspricht einem Carbodiimidüberschuss von etwa  $1,8:1$ , falls die verwendete Gelatine einen ähnlichen Carboxylgruppengehalt aufwies wie unsere Gelatine. Dieses Reaktionsgemisch gelierte innert  $30$  Sek., verflüssigte sich jedoch nach  $16$  Std. Stehenlassen bei  $25^\circ$  wieder. Diese Beobachtung konnten wir bestätigen: eine  $6\%$  Gelatinelösung, die bei Behandlung mit einem  $1,9$ fachen ICD-Überschuss nach  $6$  Std. bei  $40^\circ$  geliert war (da wir das pH auf  $7,0$  kompensierten, verlief die Reaktion langsamer als bei saurem pH), verflüssigte sich vollständig beim  $12$ std. Stehenlassen bei Zimmertemperatur. Möglicherweise handelt es sich hier um den gleichen Effekt wie beim raschen Verflüssigen von gelierten Ansätzen mit NaOH, indem auch hier durch den pH-Gang allmählich ein alkalisches Milieu entstand. Wie wir bereits erwähnten, ist ein Gelieren der Ansätze und anschliessendes Wiederverflüssigen der Gele mit NaOH zu vermeiden, da dabei der Gel-Schmelzpunkt zu wenig gesenkt wird (vgl. Tab. 1, Versuche  $36$  und  $37$ ).

**3.2. Nachweis von Reagensresten in Carbodiimid-vernetzter Gelatine.** Die Vernetzungsansätze mit grossem Reagensüberschuss mussten nach der Umsetzung mit ICD entsalzt werden (Ionenaustausch gegen  $\text{H}^+$  und  $\text{OH}^-$ ), da der Kochsalzgehalt beim Ionenaustausch gegen  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  physiologische Werte überschritten hätte. Dabei ergab sich überraschenderweise die Feststellung, dass die vernetzte Gelatine nach dem Ionenaustausch in der Reihenfolge: Kationen gegen  $\text{H}^+$ , dann Anionen gegen  $\text{OH}^-$ , nicht wie erwartet leicht sauer (IEP ca.  $5,0$ ), sondern mit einem pH von

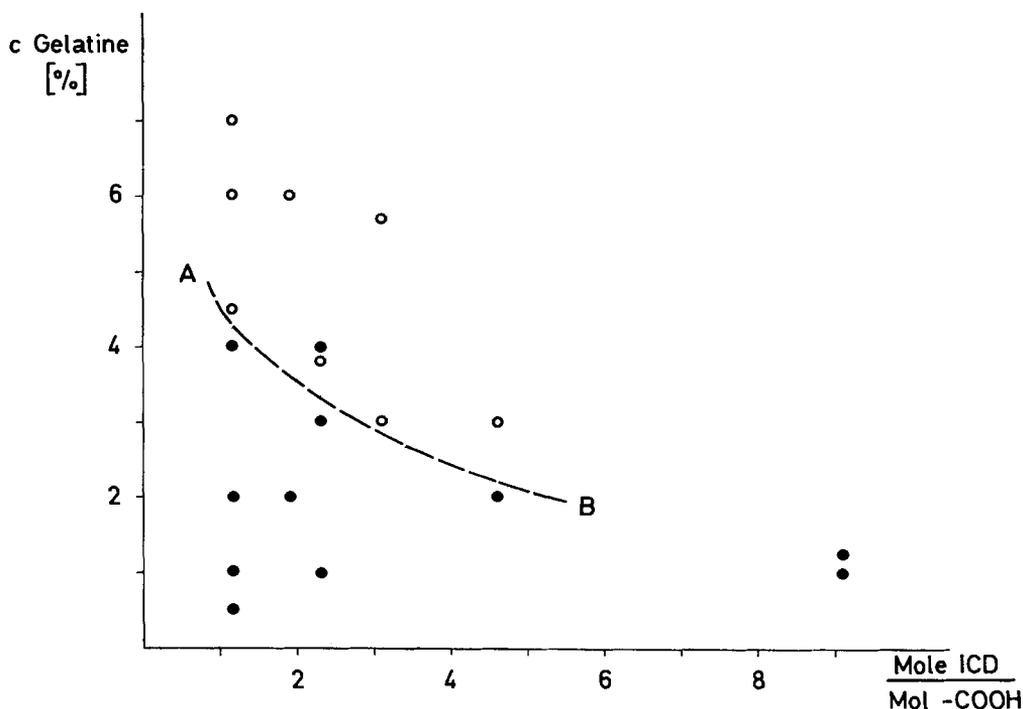


Fig. 1. Die spontane Gelierung von Gelatine bei 40° in Abhängigkeit von der Gelatinekonzentration und dem Carbodiimid-Überschuss

○ = geliert spontan    ● = bleibt flüssig

10–11 auslief. Diese Beobachtung ergab den Hinweis auf eine mögliche Nebenreaktion (vgl. Schema 1). Bei der Addition von Carbodiimid I an eine Carboxylgruppe II kann der primär entstandene O-Acylisoharnstoff III oder IV intramolekular in einen N-Acylharnstoff V oder VI umgelagert werden (Reaktionsschritt 3 oder 4), sofern er nicht vorher mit einem nucleophilen Reaktionspartner weiterreagiert hat. N-Acylharnstoffe sind nach *Khorana* [28] gegen Säuren ziemlich stabil, werden jedoch in alkalischem Milieu leicht hydrolysiert und zum Teil abgebaut. Ein eventuell aus Gelatine und ICD entstandener N-Acylharnstoff wäre also in dem beim Kationenaustausch gegen  $H^+$  entstehenden sauren Milieu stabil und es fände kein Austausch des an das Protein gebundenen ICD-Kations statt. Hingegen werden im nachfolgenden Anionenaustausch sämtliche ICD-Anionen (*p*-Toluolsulfonat) gegen  $OH^-$  ausgetauscht, so dass schliesslich die Gelatinelösung alkalisch werden muss.

Wegen der Instabilität der N-Acylharnstoffe in alkalischem Milieu könnte der zwischen Gelatine und ICD gebildete N-Acylharnstoff V oder VI in der Anionenaustauschersäule unter Katalyse freier  $OH^-$ -Ionen hydrolysiert werden (Reaktionsschritt 5), wobei wiederum eine freie Carboxylatgruppe VII am Protein sowie das kationische Harnstoffderivat VIII entsteht. Da VIII nun frei in Lösung vorliegt, sollte es sich bei einem zweiten Ionenaustausch aus der Gelatinelösung entfernen lassen. Dies konnten wir an Versuch 32 bestätigen: die zunächst alkalisch ausgela-

fene Lösung wurde mit HCl neutralisiert und nochmals auf die inzwischen regenerierten Ionenaustauschersäulen (Reihenfolge Kationit–Anionit) gegeben: die Lösung lief diesmal mit ca. pH 5 aus. Weiter ist anzunehmen, dass bei einem Ionenaustausch in der umgekehrten Reihenfolge, also zunächst Austausch der Anionen, dann der Kationen, sämtliche Reagensreste in einem Arbeitsgang abgetrennt werden können, denn dann würde der N-Acylharnstoff bereits in der ersten Säule (Anionit) durch das alkalische pH hydrolysiert, so dass im nachfolgenden Kationenaustausch sämtliche Kationen austauschbar wären. Auch dies wurde bestätigt: eine nach der Vernetzungsreaktion in umgekehrter Reihenfolge ( $\text{OH}^-/\text{H}^+$ ) entsalzte Gelatinelösung lief bereits beim ersten Mal mit pH ca. 5 aus.

Einen dritten Hinweis darauf, dass das Vernetzungsreagens teilweise in der Gelatine zurückbleiben könnte, erhielten wir aus den unterschiedlichen Resultaten der Konzentrationsbestimmung mittels *Kjeldahl*- oder Biuret-Methode. Bei der *Kjeldahl*-Methode resultierten durchschnittlich 10–30% höhere Werte als bei der Biuretbestimmung. Wir ermittelten daher die Konzentrationen einiger vernetzter Lösungen, von denen eine zweimal in der Reihenfolge  $\text{H}^+/\text{OH}^-$  entsalzt worden war, zusätzlich noch nach der Methode von *Waddell* [16]. Die Biuret- und *Waddell*-Resultate stimmten bei allen Versuchen recht gut überein, dagegen waren die *Kjeldahl*-Werte bei den nur einmal entsalzten Lösungen sehr viel höher; dieser erhöhte Stickstoffgehalt ist wahrscheinlich auf die infolge N-Acylharnstoffbildung noch in der Gelatine vorhandenen Reagensreste zurückzuführen. Einzig in Ansatz 32, der zweimal gegen  $\text{H}^+/\text{OH}^-$  entsalzt worden war, stimmten alle drei Werte gut überein.

Es schien uns wichtig abzuklären, ob und wie weit Carbodiimid durch eine Nebenreaktion tatsächlich eine kovalente Bindung mit der Gelatine eingeht, die erst im alkalischen Milieu des Anionenaustauschers wieder zerfällt. Da Carbodiimid in der Peptid- und Proteinchemie häufig verwendet wird, ist diese Frage von allgemeinerer Bedeutung. Wenn man diese Vernetzungsmethode wirklich für die Herstellung eines Transfusionsmittels benützen wollte, müsste man sich auf alle Fälle überzeugen, ob das Reagens vollständig eliminierbar ist.

Wir brauchten also eine Methode, die es gestattet, kleine Mengen des Reagens quantitativ neben Gelatine nachzuweisen.

Die mit tritium-markiertem ICD (T-ICD) vernetzten Gelatinen wurden nach der Umsetzung auf unterschiedliche Weise aufgearbeitet (Ionenaustausch in der Reihen-

Tabelle 2. Restgehalte an T-ICD resp. Harnstoffderivat in mit T-ICD vernetzter Gelatine

Aufarbeitung	Restgehalte in mMol/100 g Gelatine
Ionenaustausch $\text{H}^+/\text{OH}^-$	55,9–70,5
Zunächst 5 Min. pH 10,0, dann Ionenaustausch $\text{H}^+/\text{OH}^-$	38,2
Ionenaustausch im Mischbett	25,7
Ionenaustausch $\text{Cl}^-/\text{Na}^+$	25,5
Ionenaustausch $\text{H}^+/\text{OH}^-$ , dann dialysiert	8,9
Ionenaustausch $\text{H}^+/\text{OH}^-$ 2×	11,4
nur Dialyse	27,7
Ionenaustausch $\text{OH}^-/\text{H}^+$	7,7–9,8
Zunächst 5 Min. pH 10,0, dann Ionenaustausch $\text{OH}^-/\text{H}^+$	9,7
Ionenaustausch $\text{OH}^-/\text{H}^+$ , dann dialysiert	5,9–6,6

folge  $H^+/OH^-$  und  $OH^-/H^+$ , Dialyse) und anschliessend auf den Restgehalt an Tritium untersucht. Dabei wurde angenommen, dass das Carbodiimid bei der Vernetzungsreaktion und der anschliessenden Aufarbeitung der Gelatine intakt bleibe, abgesehen von seiner Umwandlung in das Harnstoffderivat; wieweit dies zutrifft, wird weiter unten diskutiert. Die gemessenen Aktivitäten konnten so in mMole Carbodiimid- bzw. Harnstoff-Kation pro 100 g Gelatine umgerechnet werden (das *p*-Toluolsulfonat-Ion wird dabei nicht erfasst).

Die erhaltenen Resultate – Restgehalte an Carbodiimid- bzw. Harnstoff-Kation in Abhängigkeit von der Methode der Gelatineaufarbeitung – sind in Tab. 2 zusammengestellt. Die Daten sind mit einem Fehler von mindestens  $\pm 10\%$  behaftet.

In Ergänzung zu den in Tab. 2 aufgeführten Daten ist noch Folgendes festzustellen:

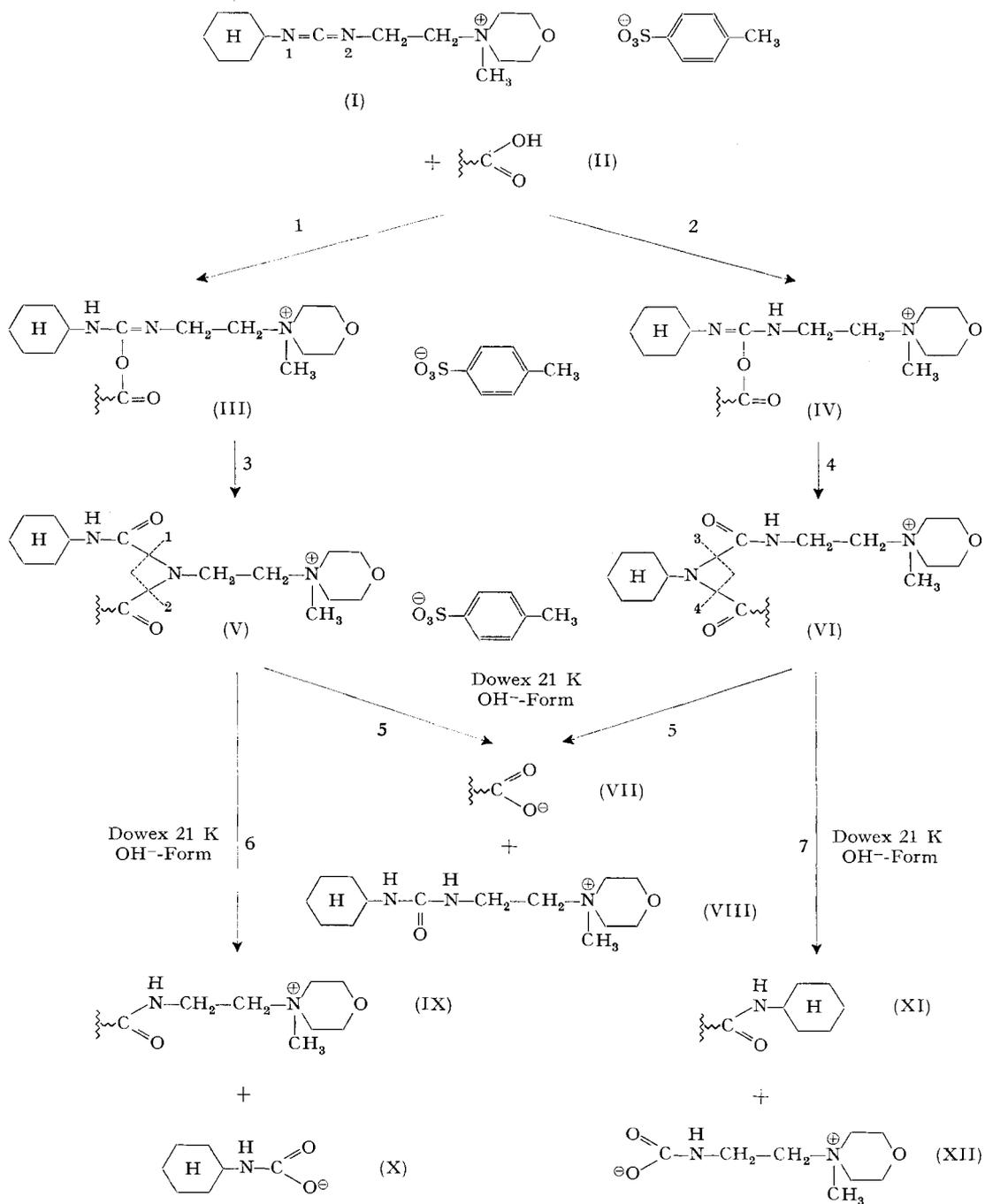
– Die Wiederholung des Ionenaustausches in der Reihenfolge  $OH^-/H^+$  eines bereits einmal auf gleiche Weise entsalzten Vernetzungsansatzes bewirkt nochmals eine Aktivitätsabnahme um 50–65%.

– Aus einer wässrigen, gelatinefreien T-ICD-Lösung wird beim Ionenaustausch in der Reihenfolge  $OH^-/H^+$  zumindest das Kation zu 100% ausgetauscht (keine Aktivität im Eluat).

Wie erwartet, ist die Abtrennbarkeit des Reagens von der Reihenfolge des Ionenaustausches abhängig: nach dem Austausch in der Reihenfolge  $H^+/OH^-$  verbleibt in der Gelatine eine Aktivität entsprechend 56–71 mMol Reagens pro 100 g Gelatine (22,4–28,4 Mol/Mol Gelatine bei  $M_n = 40000$ ,  $\geq 50\%$  aller freien Carboxylgruppen!), nach dem Austausch  $OH^-/H^+$  dagegen nur noch im Mittel 8,5 mMol pro 100 g Gelatine (3,4 Mol/Mol Gelatine). Die anschliessende Dialyse oder ein zweiter Ionenaustausch bringen in beiden Fällen nochmals eine Verbesserung; im Falle  $H^+/OH^-$  erreicht man dadurch Restgehalte, die ungefähr denjenigen nach einmaligem Austausch  $OH^-/H^+$  entsprechen. Auch im Falle  $OH^-/H^+$  nimmt die Restaktivität nochmals ab, verschwindet aber nie vollständig; es verbleibt immer eine Aktivität, die ca. 2 Molen Reagens pro Mol Gelatine entspricht. Dialyse allein, Ionenaustausch gegen  $Cl^-/Na^+$  oder Ionenaustausch im Mischbett bringen keine befriedigenden Resultate. Eine kurze Alkalibehandlung hat, wie erwartet werden konnte, keinen Einfluss auf den anschliessenden Ionenaustausch  $OH^-/H^+$ , wohl aber auf den Austausch  $H^+/OH^-$ : in diesem Fall ist der Restgehalt an Reagens nur noch etwas mehr als halb so gross wie ohne Alkalibehandlung.

Alle diese Resultate stützen unsere Annahme, dass bei der Vernetzung von Gelatine mit ICD in einer Nebenreaktion ein N-Acylharnstoff gebildet wird, der in alkalischem Milieu hydrolyisierbar ist (vgl. Schema 1): Falls der aus ICD und einer Seitenkettencarboxylgruppe der Gelatine zunächst gebildete O-Acylisoharnstoff III oder IV nicht mit einer Aminogruppe weiterreagiert, so kann er sich zu einem N-Acylharnstoff umlagern; dabei ist theoretisch mit einem Gemisch aus V und VI zu rechnen. Da die Addition von Carbonsäuren an Carbodiimide wahrscheinlich mit der Anlagerung eines Protons an das Carbodiimid I beginnt [28], ist aber anzunehmen, dass die Reaktion hauptsächlich oder ausschliesslich nach I verläuft, so dass nach der Umlagerung mehrheitlich V entsteht (in ICD I ist N(2) vor allem wegen des -I-Effekts des positiven Morpholinium-N-Atoms weniger basisch als N(1), daher wird N(1) leichter protoniert als N(2)).

Scheme 1



Im Fall des Ionenaustausches in der Reihenfolge  $H^+/OH^-$  ist der N-Acylharnstoff nach Passieren der Kationenaustauschersäule wegen der Stabilität gegen  $H^+$  noch intakt, er wird aber im Anionenaustauscher, wo ein alkalisches Milieu entsteht, weitgehend hydrolysiert (Reaktion 5), und die beiden Hydrolyseprodukte VII und VIII verlassen zusammen die Säule; sie machen im Tracerversuch die Restaktivität des Eluates aus. Bei anschliessender Dialyse oder einem zweiten Ionenaustausch wird das kationische VIII entfernt, weshalb die Restaktivität stark abnimmt.

Beim Ionenaustausch in der Reihenfolge  $OH^-/H^+$  entsteht sofort zu Beginn ein stark alkalisches Milieu, wodurch der N-Acylharnstoff hydrolysiert wird. Da das an Bindung 2 in V oder 4 in VI beteiligte Carbonyl-C-Atom des Glutamin- oder Asparaginsäurerestes der Gelatine stärker positiviert und daher leichter durch  $OH^-$  angreifbar ist als das an Bindung 1 in V oder 3 in VI beteiligte Carbonyl-C-Atom, wird aus V und auch aus eventuell vorhandenem VI vorwiegend VII und VIII entstehen, also die freie Carboxylgruppe an der Gelatine und das Harnstoffderivat von ICD. In geringerem Masse wird anstelle der Bindung 2 in V bzw. 4 in VI wohl auch die Bindung 1 in V bzw. 3 in VI gespalten, so dass zudem IX und X und eventuell sogar XI und XII gebildet werden (Reaktionen 6 und 7). Beim nachfolgenden Passieren der Kationenaustauschersäule werden nun die kationischen Hydrolyseprodukte, nämlich vorwiegend VIII und allenfalls auch das unter den vorliegenden Bedingungen instabile Carbaminsäurederivat XII (bzw. sein Decarboxylierungsprodukt) abgetrennt, nicht aber IX. Die Gelatine kann also auch nach dem Ionenaustausch in der Reihenfolge  $OH^-/H^+$  noch kovalent gebundene Teile von ICD enthalten; IX ist dank der tritiierten Methylgruppe im Tracerversuch nachweisbar und bedingt wahrscheinlich die Restaktivität, die auch durch kalte Alkalibehandlung, Dialyse und zweiten Ionenaustausch nicht entfernbar ist. Auch XI wäre nicht entfernbar, kann aber im Tracerversuch nicht nachgewiesen werden. Mit wesentlichen Anteilen XI ist allerdings, wie schon begründet, nicht zu rechnen.

Die Tatsache, dass nach der Vernetzung von Gelatine mit ICD und der anschliessenden optimalen Aufarbeitung durch Ionenaustausch in der Reihenfolge  $OH^-/H^+$  mindestens noch ca. 2 COOH-Gruppen pro Molekel Gelatine deriviert sind, obschon sie nicht an einer Brückenbindung beteiligt sind, lässt erwarten, dass bei der Bestimmung der vernetzungsbedingten Abnahme der freien Carboxyl- und Aminogruppen die Resultate um diesen Betrag differieren werden (vgl. 3.4).

3.3. *Der Einfluss der Sterilisation auf  $M_n$  und Gel-Schmelzpunkt.* Da die für weitergehende Untersuchungen vorgesehenen vernetzten Gelatinelösungen für längere Zeit haltbar gemacht werden mussten, wurde der Einfluss des Sterilisierens auf das mittlere Teilchengewicht und auf den Gel-Schmelzpunkt untersucht. Gleichzeitig sollten

Tabelle 3. *Der Einfluss der Sterilisation auf  $M_n$  und Gelschmelzpunkt*

Nr.	$M_n$		Gel-Smp. ( $^{\circ}C$ ) ( $c = 4\%$ )	
	vorher	nachher	vorher	nachher
32	47 500	42 400	6,0	4,4
33	42 600	39 600	$\leq 0$	$\leq 0$
34	50 000	46 800	$\leq 0$	$\leq 0$
35	40 800	37 300	7,6	3,5

uns die Resultate Aufschluss geben über die thermische Stabilität der modifizierten Gelatinen. Der Einfluss der Sterilisation auf die Präparate Nr. 32–35 ist aus Tab. 3 ersichtlich.

Das mittlere Teilchengewicht sank bei der Sterilisation um 3000–5000 (7–11%), der Gel-Schmelzpunkt um 2–4°. Eine weitere Gelatinelösung, die nach der Sterilisation ein  $M_n$  von 40900 und einen Gel-Schmelzpunkt unter 0° aufwies, wurde nochmals im Autoklaven während 20 Min. auf 120° erhitzt (Sterilisationsbedingungen) und anschliessend noch eine Std. bei 110–120° belassen. Nach dieser extremen Hitzebehandlung lag das mittlere Teilchengewicht bei 39000, die Differenz betrug also lediglich noch 2000.

Bei der ersten 20minütigen Sterilisation sanken die mittleren Teilchengewichte um ähnliche Beträge ab, wie das auch bei nicht vernetzter Gelatine der Fall ist. Gewisse Bindungen werden in der Wärme ziemlich rasch hydrolytisch gespalten; die übrigen Bindungen sind dagegen recht beständig, denn bei der anschliessenden, viel länger dauernden Hitzebehandlung war der  $M_n$ -Abfall kleiner als während der kurzen, erstmaligen Erhitzung. Jedenfalls zeigt sich, dass die neu eingeführten Brückenbindungen thermisch stabil sind, andernfalls müssten die Gel-Schmelzpunkte nach der Sterilisation höher liegen als vorher.

3.4. *Analytische und physikochemische Untersuchung eines optimal vernetzten Gelatinepräparates.* Nach Erarbeitung wirkungsvoller Vernetzungsbedingungen sollte an einem unter optimalen Bedingungen vernetzten Präparat (vgl. Versuche Nr. 30, 32–34, Tab. 1; zweimal gegen  $H^+/OH^-$  entsalzt) ein etwas exakteres Bild der eingetretenen Veränderungen ermittelt werden. Vor allem interessierten die Fragen, wieviele Brückenbindungen gebildet wurden und ob die Vernetzung tatsächlich ausschliesslich intracatenar erfolgte, woraus zu schliessen wäre, dass die erreichte Gel-Schmelzpunktsenkung allein auf eine Fixierung des ungeordneten Knäuels zurückzuführen ist.

Der Vergleich der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Ausgangsgelatine und des näher zu untersuchenden ICD-vernetzten Präparates ist in Tab. 4 gegeben.

Tabelle 4. *Vergleich der physikalisch-chemischen Eigenschaften von Ausgangsgelatine und ICD-vernetzter Gelatine*

	ICD-vernetzte Gelatine (sterilisiert)	Ausgangsgelatine
Isoionischer Punkt (aus Titrationskurven)	4,9	4,9
$M_n$	40100	42100
Gel-Smp. in 4,0proz. Lösung	<0°	24°
Gel-Smp. in 5,8proz. Lösung	6°	27°
Reduzierte Viskosität ( $\eta_{red} = \eta_{spez}/c$ )	0,230	0,600

Der Proteinanteil mit  $M_n < 6000$ , der durch die bei der Konzentrationsosmometrie verwendete Cellulosemembran hindurchdiffundieren kann, beträgt bei beiden Präparaten 3–4%.

Aus diesen einfachen Messungen ergibt sich bereits klar, wie stark die Gelatine durch die Vernetzung verändert wurde. Aufgrund der Tatsache, dass bei nur leicht erniedrigtem  $M_n$  (Einfluss der Sterilisation) der Gel-Schmelzpunkt und die reduzierte

Viskosität ganz massiv abgenommen haben, lässt sich annehmen, dass die Vernetzung trotz der relativ hohen Gelatinekonzentration von 2,0% vorwiegend intracatenar erfolgte, wobei die Molekeln in einer dichteren Knäuelform fixiert wurden. Diese Gestaltsänderung gibt auch die Erklärung für die Resultate der Fraktionierung an Sepharose 6B (vgl. Fig. 2).

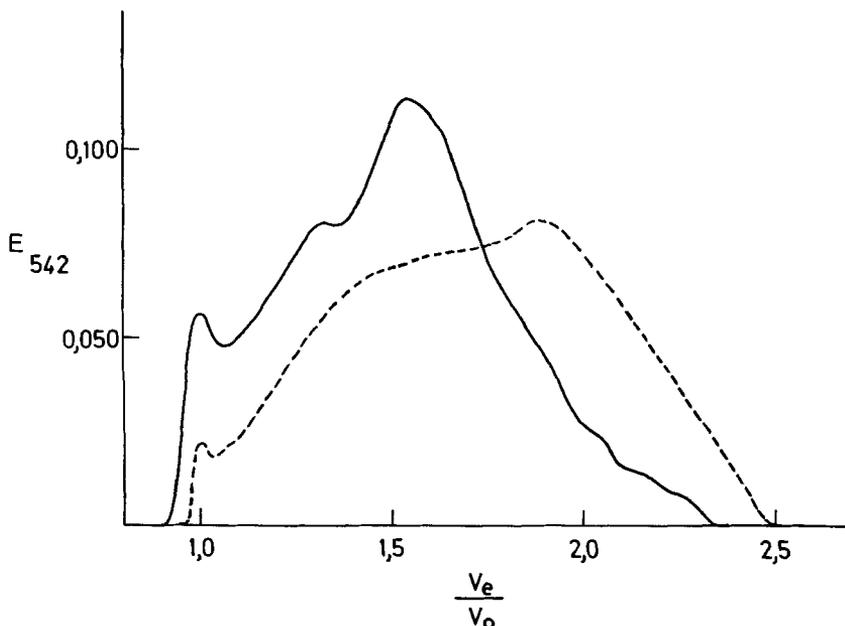


Fig. 2. Sepharose 6 B Chromatographie von 10 ml einer 1,2proz. Lösung von Ausgangsgelatine (—) und ICD-vernetzter Gelatine (---) bei 39°

Als Elutionsmittel diente eine 0,2 M-NaCl-Lösung, enthaltend 0,2% Natriumazid als Bakterio-  
statikum. Es wurden 90 Fraktionen à 5 ml entnommen, deren Konzentration mit der Biuret-  
Methode bestimmt wurde.  $V_0$  betrug 165 ml, die Durchflussgeschwindigkeit 22 ml/Std.

Bei fast gleichem  $M_n$  wird die modifizierte Gelatine stärker im Gelbett zurückge-  
halten als das Ausgangsmaterial, so dass die ganze Elutionskurve nach grösseren  
Elutionsvolumina verschoben ist. Die kompakteren Teilchen der vernetzten Gelatine  
können also offenbar besser in die Gelporen eindringen. Der Vergleich der beiden  
Kurven in Fig. 2 zeigt ausserdem, dass die Vernetzung vorwiegend intracatenar er-  
folgt sein muss, denn der hochmolekulare Anteil der Ausgangsgelatine (Pik bei  
 $V_e/V_0 = 165$  ml) hat mit der Modifikation nicht zu-, sondern eher abgenommen. Diese  
Beobachtungen decken sich mit den früher schon erwähnten von *Marfey et al.* [8].

Die Zahl der neugebildeten Brückenbildungen lässt sich sowohl aus der ver-  
netzungsbedingten Abnahme der freien Aminogruppen wie auch – bei Fehlen von  
Nebenreaktionen – aus der Abnahme der freien Carboxylgruppen berechnen. Es war  
jedoch zu erwarten, dass die Abnahme der freien Carboxylgruppen grösser sein würde  
als diejenige der Aminogruppen, da, wie wir in Abschnitt 3.2 gezeigt haben, ca.  
6 mMol  $-COOH$  pro 100 g Gelatine in einer Nebenreaktion mit Carbodiimid modifi-

ziert werden, ohne an einer Brückenbindung beteiligt zu sein. Die Resultate der Endgruppenbestimmungen sind in Tab. 5 zusammengestellt:

Tabelle 5. Resultate der Endgruppenbestimmung an Gelatine SRK und ICD-vernetzter Gelatine

	Gelatine SRK mMol 100 g Gelatine	ICD-vernetzte Gelatine SRK mMol 100 g Gelatine	Differenz	
			mMol 100 g Gelatine	Mol Mol Gelatine (bei $M_n = 40\,000$ )
<i>Carboxylgruppen</i>				
–COOH (Titration)	110	88	22	8,8
–COOH (nach <i>Hoare &amp; Koshland</i> )	107	85	22	8,8
<i><math>\alpha</math>-Aminogruppen</i>				
–NH <sub>2</sub> + Imidazol (Titration)	6	5	1	0,4
$\alpha$ –NH <sub>2</sub> (DNFB)	2,65	1,79	0,86	0,35
<i><math>\epsilon</math>-Aminogruppen</i>				
$\epsilon$ –NH <sub>2</sub> (Titration)	41	24	17	6,8
$\epsilon$ –NH <sub>2</sub> (DNFB)	40,7	22,7	18,0	7,2
<i>Total Aminogruppen</i>				
–NH <sub>2</sub> (Titration)	47	29	18	7,2
–NH <sub>2</sub> (DNFB)	43,35	24,9	18,9	7,5

1. Sowohl die Tracermethode nach *Hoare & Koshland* wie die Titrationsmethode ergeben eine Abnahme der freien Carboxylgruppen um 22 mMol/100 g Gelatine.

2. Die Abnahme der freien Aminogruppen beträgt 18,0–18,9 mMol/100 g Gelatine, wobei die  $\alpha$ -Aminogruppen um ca. 1 mMol, die  $\epsilon$ -Aminogruppen um 17–18 mMol/100 g Gelatine abgenommen haben. Die Differenz zur Abnahme der Carboxylgruppen beträgt also lediglich 3–4 mMol/100 g und nicht, wie aufgrund der T-ICD-Versuche (Abschnitt 3.2) zu erwarten war, ca. 6 mMol/100 g. Möglicherweise wurden bei dem hier untersuchten Präparat ein Teil der in einer Nebenreaktion modifizierten Carboxylgruppen durch den Sterilisationsprozess wieder freigesetzt.

3. Aus dem mittels DNFB-Methode bestimmten  $\alpha$ -Aminogruppengehalt der Ausgangsgelatine berechnet sich, dass eine solche Endgruppe auf 38000 g Gelatine vorhanden ist, was innerhalb der Fehlergrenze mit dem osmotisch ermittelten  $M_n$  übereinstimmt. Bei dem mit ICD vernetzten Präparat erhält man jedoch eine  $\alpha$ -Aminogruppe auf 56000 g Gelatine. Die Tatsache, dass dieser letztere Wert grösser ist als das osmotisch bestimmte mittlere Mol.-Gew. ( $M_n:40\,000$ ), lässt schliessen, dass nicht mehr jede Molekel eine NH<sub>2</sub>-Gruppe am Ende besitzt. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass ungefähr jede dritte N-endständige freie Aminogruppe mit einer freien Carboxylgruppe in einer Seitenkette zu einer Peptidbindung reagiert hat, so dass eine Molekel mit einer Schleife entstanden ist.

4. Unter der plausiblen Annahme, dass alle verschwundenen Aminogruppen an neugebildeten Brückenbindungen beteiligt sind, lässt sich die Zahl dieser Bindungen

aus der Abnahme des Totals der Aminogruppen berechnen. Danach wurden bei einem  $M_n$  von 40000 pro Molekel 7–8 Brückenbindungen gebildet, wobei von den insgesamt vorhandenen 17–18 Aminogruppen 41–44% in solche Brücken eingebaut wurden.

5. Unter der Annahme, dass das mittlere Teilchengewicht der Gelatine SRK während der Vernetzung mit Carbodiimid von 42000 auf ca. 47000 stieg, müsste pro 9 Molekeln eine intercatenare Brückenbindung gebildet worden sein; dies entspricht ca. 1,5% aller eingeführten Bindungen. Auch aufgrund der Resultate der Endgruppenbestimmung ist also anzunehmen, dass die Vernetzung ganz überwiegend intracatenar erfolgte.

**4. Diskussion.** – Die innermolekulare Vernetzung mit bifunktionellen Reagenzien ist in der letzten Zeit öfters herangezogen worden, um die native dreidimensionale Raumstruktur von Proteinen abzutasten. Es ist klar, dass die beiden zu vernetzenden funktionellen Gruppen des Proteins für das Reagens primär zugänglich sein und ihr gegenseitiger Abstand und ihre Orientierung so sein müssen, dass die Brückenbildung sterisch möglich ist, d. h. die Brücke muss genau auf die Brückenköpfe passen. *H. Fasold et al.* [29] haben kürzlich zusammenfassend über Möglichkeiten berichtet, Vernetzungsreaktionen auf diese Weise analytisch zur Struktursondierung einzusetzen. Bei Proteinen in der kompakten nativen Konformation sind erwartungsgemäss die Bedingungen für die intramolekulare Verknüpfung zweier funktioneller Gruppen sehr eng und man wird mit einem gegebenen Reagens meist nur sehr wenige Brücken einführen können. Für eine direkte Kondensation zweier Gruppen wie  $-\text{COOH}$  und  $-\text{NH}_2$  ohne Brückenmolekel dürften die sterischen Voraussetzungen ebenfalls nur selten erfüllt sein. Anders werden die Verhältnisse, wenn eine Peptidkette aus ihrer mehr oder weniger starren und dichten Konformation befreit, d. h. denaturiert wird. Wenngleich beim beweglichen Knäuel die konformativen Möglichkeiten vor allem aus sterischen Gründen eingeschränkt sind, so wird doch jetzt für die Mehrzahl der reaktiven Gruppen gelegentlich ein Reaktionspartner in die geeignete Distanz kommen können, die einen intracatenaren Brückenschlag erlaubt. Je mehr solche Brücken geschlagen werden, desto stärker wird allerdings die Beweglichkeit bzw. die konformative Freiheit der Kette eingeschränkt und es verwundert deshalb nicht, wenn von der theoretisch möglichen Zahl von Brücken auch unter optimalen Verhältnissen nur ein Teil wirklich gebildet wird. Bei Gelatine sind die für unsere Reaktion limitierenden Aminogruppen eher dünn gesät, so dass bei den hier beschriebenen Versuchen immerhin etwa 40% von ihnen in eine Brückenkondensation einbezogen wurden. Ob das die maximal erreichbare Zahl ist, können wir nicht sagen. Annähernd dürfte es aber zutreffen, denn *Marfey et al.* [8] erzielten bei ihrem synthetischen Polypeptid, das sehr viel mehr reaktive Gruppen trug, auch keine höhere Brückendichte.

Es ist zu erwarten, dass die intracatenare Vernetzung begünstigt ist, wenn der statistische Kettenknäuel an sich schon dicht ist, und dass sie erschwert ist, wenn der Knäuel – z. B. durch gleichsinnige Ladungen – gespreizt ist. Bei Proteinen sollte man also nahe dem isoelektrischen Punkt arbeiten (4,9 für unsere Gelatine). Wir haben den Einfluss des pH auf die Vernetzungsreaktion nicht systematisch untersucht. Immerhin mussten wir erfahren, dass es bei pH 7 nicht möglich war, mit der Carbodiimid-Reaktion den Gel-Schmelzpunkt (Indikator für die intracatenare Vernetzung) bis gegen 0° herabzusetzen. Erst die Versuche bei pH 5,75 brachten den gesuchten

Erfolg, trotzdem hier die Aminogruppen, die als nucleophile Partner reagieren müssen, schon zum grössten Teil protoniert sind.

Überrascht hat uns, dass ein hinsichtlich Erniedrigung des Gel-Schmelzpunktes optimaler Effekt der Vernetzungsreaktion nicht bei den verdünntesten, sondern bei 2proz. Gelatinelösungen erhalten wurde. Zunehmende Verdünnung wird sicher intercatenare Brückenbildung schliesslich ganz verunmöglichen. Andererseits senkt man mit dem Verdünnen die Aktivität der Reagenten, so dass der Umsatz quantitativ zurückbleibt. Bemerkenswert scheint auch, dass in 2proz. Gelatinelösung intercatenare Brückenbildung nur in so minimalem Umfang stattfindet. Eine gegenseitige Durchdringung der Molekelknäuel findet offenbar kaum statt. (Vgl. hierzu die Untersuchungen von *Vollmert & Stutz* [30] über die Struktur von konzentrierten Polymerlösungen und Gelen.)

Bei der intracatenaren Vernetzung sind von den möglichen Kettenknäuelformen die dichteren für die Reaktion begünstigt, was dazu führen muss, dass nach Einführung der maximalen Brückenzahl die Knäuel statistisch betrachtet dichter sein werden als diejenigen unvernetzter Molekel. Diese Erwartung wird bestätigt durch die Tatsache, dass die vernetzte Gelatine in Lösung bedeutend weniger viskos ist als die unvernetzte mit fast gleichem Molekulargewicht (vgl. Tab. 4). Das durch die dichtere Form bedingte höhere Permeationsvermögen für Gelkörner wirft die Frage nach der Verweildauer einer derartigen Gelatine im Kreislauf auf. Ihr Molekulargewicht ist zwar viel höher als das handelsüblicher Transfusionspräparate, aber andererseits sind die Teilchen relativ kompakt, was die Nierenpassage eher erleichtern könnte. Es sind also zwei Faktoren so verändert, dass gegenläufige Effekte zu erwarten sind. Tierversuche zur Abklärung dieser Frage sind im Gange; über die Ergebnisse soll später berichtet werden.

Die durch die Vernetzung erreichte drastische Gel-Schmelzpunktserniedrigung zeigt, dass die Renaturierungsfähigkeit der Gelatine stark beeinträchtigt wurde. Sie ist aber nicht gänzlich eliminiert, denn konzentriertere Lösungen (6–8%) können immer noch gelieren. Das verwundert nicht, denn die mittlere freie Kettenlänge (von Brücke zu Brücke) umfasst immer noch ca. 50 Aminosäurereste. Vor allem Kopf und Schwanz der Ketten dürften für die Assoziation mit Nachbarmolekeln zur Verfügung stehen. Ein quantitatives Bild über die Renaturierungsfähigkeit haben die CD.-Messungen ergeben, über welche später berichtet werden soll.

Die hier vorgelegten Ergebnisse sind ein erster Beitrag zur Frage nach dem Einfluss intracatenarer Vernetzung auf das konformative Verhalten und die damit zusammenhängenden physikalischen Eigenschaften der Gelatine. Analoge Versuche mit anderen Vernetzungsmitteln sind begonnen.

Wir danken Herrn Dr. *Ch. Schlatter*\*) vom Gerichtlich-Medizinischen Institut der Universität Bern (Direktor: Prof. Dr. *E. Läubli*) herzlich für seine wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Tracerversuche.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *J. Bello, H. Bello & J. R. Vinograd*, *Biochim. Biophys. Acta* 57, 214, 222 (1962).
- [2] *J. Bello & J. R. Vinograd*, *Nature* 181, 273 (1958).
- [3] *W. Traub & K. A. Piez*, *Adv. Prot. Chem.* 25, 316 (1971).

\*) Derzeitige Adresse: Prof. Dr. Ch. Schlatter, Physiologisches Institut der veterinär-medizinischen Fakultät der Universität Zürich.

- [4] *Hs. Nitschmann, H. R. Gygax, P. Moser & H. R. Stoll*, *Vox Sang.* **12**, 106 (1967).  
 [5] *Hs. Nitschmann & H. R. Stoll*, *Bibl. haemat.*, No. 33, p. 152–158 (Karger, Basel/New York 1969).  
 [6] *Hs. Nitschmann & H. R. Stoll*, *Pharmazeut. Zeitung* **113**, 1594 (1968).  
 [7] *Hs. Nitschmann & H. R. Stoll*, *Bibl. haemat.*, No. 33, p. 55–74 (Karger, Basel/New York 1969).  
 [8] *P. S. Marfey, Th. J. Gill III & H. W. Kunz*, *Biopolymers* **3**, 27 (1965).  
 [9] *J. C. Sheehan & J. J. Hlavka*, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 4528 (1957).  
 [10] *I. D. Robinson*, *J. Appl. Polym. Sci.* **8**, 1903 (1964).  
 [11] *Brit. Pat. Nr. 1.013.577*.  
 [12] *A. Gardi*, «Versuche zur intracatenaren Vernetzung von Gelatine», Inauguraldissertation, Universität Bern (1971).  
 [13] *J. C. Sheehan & J. J. Hlavka*, *J. Org. Chemistry* **21**, 439 (1956).  
 [14] *M. Brenner & W. Huber*, *Helv.* **36**, 1109 (1953).  
 [15] *B. Lange*, «Kolorimetrische Analyse», Verlag Chemie, Weinheim 1956.  
 [16] *W. J. Waddell*, *J. Lab. Clin. Med.* **48**, 311 (1956).  
 [17] *O. Gerngross*, *Z. Angew. Chem.* **42**, 971 (1929).  
 [18] *E. Baumgartner*, Inauguraldissertation, Universität Bern (1944).  
 [19] *H. R. Stoll*, Inauguraldissertation, Universität Bern (1967).  
 [20] *A. W. Kenchington & A. G. Ward*, *Biochem. J.* **58**, 202 (1954).  
 [21] *F. Sanger*, *Biochem. J.* **39**, 507 (1945).  
 [22] *K. Heyns & G. Legler*, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **306**, 165 (1957).  
 [23] *R. R. Porter*, *Methods in Med. Research* **3**, 256 (1951).  
 [24] *D. G. Hoare & D. E. Koshland*, *J. Amer. chem. Soc.* **88**, 2057 (1966).  
 [25] *D. G. Hoare & D. E. Koshland*, *J. Mol. Biol.* **242**, 2447 (1967).  
 [26] *P. Davis & B. E. Tabor*, *J. Polymer. Sci. A 1*, 799 (1963).  
 [27] *J. Pouradier & H. Chateau*, *J. Chim. Phys.* **53**, 726 (1956).  
 [28] *H. G. Khorana*, *J. chem. Soc.* **1952**, 2081.  
 [29] *H. Fasold, J. Klappenberger, Ch. Mayer & H. Remold*, *Angew. Chem.* **83**, 875 (1971).  
 [30] *B. Vollmert & H. Stutz*, *Angew. Makromol. Chemie* **20**, 71 (1971).

## 248. Methylierungs-Reaktionen an 30-Oxa-[14]cytochalasanen<sup>1)</sup>

von **M. Binder** und **Ch. Tamm**

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

(11. VII. 72)

*Summary.* For synthetic studies the protection of the hydroxyl groups of phomin (cytochalasin B) ((7*S*, 22*R*, 26*R*)-7,26-dihydroxy-22-methyl-30-oxa-[14]cytochalasa-6(18), 19<sup>t</sup>, 27<sup>t</sup>-trien-1,29-dion) (**1**), the dodecahydro-derivative **2**, and the dihydro-derivative **4** by methylation was investigated. Treatment of **1** with CH<sub>3</sub>I/Ag<sub>2</sub>O gave the iminoether **6**. The reaction of **4** with CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>/BF<sub>3</sub> led to the di-O-methyl derivative **8** and to the N-methyl-di-O-methyl derivative **9**, whereas **2** was transformed to the N-methyl-di-O-methyl compound **10** and to the iminoether **11**.

NaBH<sub>4</sub> reduction of **3** yielded not only **4** but also the epimeric dihydro derivative **5**.

**1. Einleitung.** – Das Antibiotikum Phomin (Cytochalasin B) ((7*S*, 22*R*, 26*R*)-7,26-Dihydroxy-22-methyl-30-oxa-[14]cytochalasa-6(18), 19<sup>t</sup>, 27<sup>t</sup>-trien-1,29-dion) (**1**) wurde 1966 erstmals von *Rothweiler & Tamm* [2], später unabhängig davon auch von

<sup>1)</sup> Wir verwenden die von *Binder, Tamm et al.* vorgeschlagenen halbsystematischen Namen anstelle der bisher benutzten Trivialnamen «Phomine» bzw. «Cytochalasine». Vgl. [1].