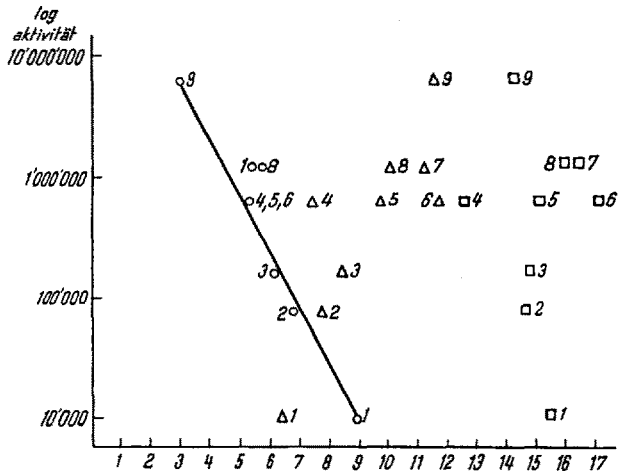


Nr.	Verbindung	$K_{Cu} = 10^n$	$K_{Co} = 10^m$	$K_{Co}/K_{Cu} = 10^{-x}$	In-vitro-tuberkulo- statische Hemm- konzentration
1	5,7-Dijod-8-oxychinolin	15,4	6,5	8,9	Mol/10 000
2	5-Oxychinoxalin	14,6	7,8	6,8	Mol/80 000
3	5,7-Diallyl-8-oxychinolin	14,7	8,5	6,2	Mol/160 000
4	8-Oxychinolin	12,7	7,4	5,3	Mol/640 000
5	8-Oxychinolin-7-karbonsäureäthylester	15,1	9,8	5,3	Mol/640 000
6	8-Oxychinolin-7-karbonsäurehydrazid	17,1	11,8	5,3	Mol/640 000
7	7-Allyl-8-oxychinolin	16,4	11,1	5,3	Mol/1 280 000
8	5-Methyl-8-oxychinolin	16,2	10,2	5,7	Mol/1 280 000
9	Isonikotinsäurehydrazid	14,3	11,3	3,0	Mol/6 400 000

Die Konstante für den Cu-Oxin-Komplex fällt mit dem K_1 -Wert von ALBERT *et al.*¹ zusammen. Wir müssen aber vermuten, dass unsere Konstante einen $K_1 \cdot K_2$ -Wert darstellt, da die polarographische Methode unmittelbar diese liefert. Die Dissoziation des Cu-Oxin-Komplexes verläuft höchstwahrscheinlich nicht in 2 Stufen, sondern bloss in einer, da eine zweite Welle im Polarogramm nicht nachweisbar ist. Dass die Diskrepanz mit den Messungen von ALBERT *et al.* nicht messtechnisch bedingt ist, zeigt, dass unser mit der selben Methode gemessener Isonikotinyldhydrazid-Cu-Komplexwert in sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von ERLÉNMEYER *et al.* steht.

Die Co^{+++} -Komplexstabilität konnte polarographisch nicht bestimmt werden, da das Co^{+++} -Ion nur in Gegenwart von Komplexbildnern stabil ist. Wir waren so gezwungen, die Stabilitäten spektrophotometrisch mit der Methode P. JOB² zu bestimmen.



Die Ergebnisse, welche aus der Tabelle und seiner graphischen Darstellung ersichtlich sind, zeigen, dass die Stabilität der Cu^{++} - oder Co^{+++} -Komplexe als Funktion der tuberkulostatischen Aktivität in sich keine Regelmässigkeit aufzeigt.

Wenn wir aber die Funktion $K_{Co^{+++}}/K_{Cu^{++}}$ darstellen, so sehen wir, dass das Steigen dieses Wertes von $10^{-8,9}$ bis 10^{-3} mit dem Steigen der in-vitro-Aktivität³ von Mol/10 000 bis Mol/6 400 000 verbunden ist. Die Er-

gebnisse der Messungen bestätigen somit unsere Hypothese und unterstützen experimentell auch die feineren Vorstellungen von ERLÉNMEYER und Mitarbeitern. Ob die Gültigkeit dieser Hypothese auch für andere Komplexbildner-Typen als 8-Oxychinolin besteht, bleibt dahingestellt.

MIKLÓS VAJDA und TAMÁS NÓGRÁDI

Organisch-Chemisches Institut der L. Eötvös Universität, Budapest, und Forschungsinstitut für Pharmazeutische Industrie, Budapest, den 7. November 1953.

Summary

Based on polarographic viz. spectrophotometric determinations of the stabilities of several Cu^{++} - and Co^{+++} hydroxyquinolin complexes it has been shown that a correlation exists between the quotient of complex-stabilities $K_{Co^{+++}}/K_{Cu^{++}}$ and antitubercular activity (cf. table and graph). This supports the hypothesis that the 8-hydroxyquinolin derivatives and analogues act by competitive antagonism; the Cu^{++} -hydroxyquinolates are able to replace Co in a prosthetic group of Mycobacterium-enzyme with Cu.

Purification de la pénicillinase de *Bacillus cereus*

La pénicillinase, enzyme adaptatif produit par certaines bactéries, inactive les pénicillines¹ en hydrolysant leur liaison β lactamique. La préparation de cet enzyme a été entreprise par divers investigateurs, à partir de la pénicillinase extra-cellulaire produite par des micro-organismes aérobies (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*)².

Sa purification partielle fut obtenue par application de méthodes diverses:

- concentration par dialyse de deux jours, à froid³,
- adsorption sur Filter Cel, puis élution en milieu ammoniacal⁴,
- précipitations isoélectriques, et relargage par le sulfate d'ammonium⁵.

¹ E. P. ABRAHAM, *The Enzymes*, Vol. I, part. 2, chap. 37 (Academic Press Inc., New-York 19..), p. 1170.

² J. UNGAR, *Nature* 154, 236 (1944). – E. S. DUTHIE, *J. Gen. physiol.* 1, 370 (1947).

³ R. G. Benedict, W. H. SCHMIDT et R. D. COGHILL, *Arch. Biochem.* 8, 377 (1945).

⁴ R. D. HOUSEWRIGHT et R. J. HENRY, *J. Biol. Chem.* 167, 553 (1947). – G. A. LEPAGE, J. F. MORGAN et M. E. CAMPBELL, *J. Biol. Chem.* 166, 465 (1946).

⁵ J. F. MORGAN et M. E. CAMPBELL, *J. Biol. Chem.* 169, 377 (1947).

¹ A. ALBERT, M. J. GIBSON, S. D. RUBBO, *Brit. J. exp. Pathol.* 31, 425 (1950), und 34, 119 (1953).

² P. JOB, *Ann. Chim.* 9, 113 (1928).

³ Die in-vitro-Aktivität wurde auf dem $H_{37}Rv$ -Stamm in Duboschem Nährmedium durch das Mikrobiologische Institut der Universität Szeged ermittelt, wofür wir Herrn Prof. Dr. G. IVÁNOVICS und Herrn Dr. I. KOZSKA auch an dieser Stelle Dank sagen.

Il est difficile de comparer la pureté des fractions obtenues, car l'unité de pénicillinase n'était pas définie de la même façon par les divers auteurs.

Nous avons adopté une unité de pénicillinase analogue à celle que GABOR B. LEVY¹, H. PÉNAU et coll.² ont définie. Cette unité est la mieux adaptée aux méthodes de dosages iodométrique³ et spectrophotométrique³ que nous avons appliquées.

Nous avons préparé la pénicillinase par culture de *Bacillus cereus*, (NRRL B 569), en milieu à base de glucose, peptone, chlorure de sodium, en fioles de FERNBACH agitées à 24°C. L'addition fractionnée, en cours de culture, de doses croissantes de benzylpénicilline, provoque l'augmentation de la sécrétion de l'enzyme; celle-ci atteint son maximum vers la 48^e heure, et diminue ensuite rapidement. Le titre varie de 5000 à 18000 unités pénicillinase par cm³.

Les premiers stades de notre méthode de fractionnement ont déjà été brièvement décrits⁴. Nous résumons ci-dessous notre méthode de purification de la pénicillinase:

I. – Le bouillon de culture centrifugé, refroidi à 2°C, est additionné lentement de 2 volumes d'acétone refroidie à -10°C. Le précipité est séparé par centrifugation à -10°C, après 30 min. Par dessiccation sous vide à froid, on obtient une poudre sèche, dite «poudre acétonique», dans laquelle on retrouve 50 % de l'activité initiale: un activateur de la pénicillinase est en effet éliminé dans la solution hydroacétonique, mais la totalité de l'enzyme est pratiquement présente dans le floculat.

II. – La «poudre acétonique» est mise en suspension dans un tampon acétique pH 5,1 (CH₃CO₂Na M 2,5 parties + CH₃CO₂H M 1,0 partie), à raison de 10 cm³ pour 1 g. Après agitation de 60 min à 37°C, la suspension est centrifugée et le culot est éliminé.

Bien que l'activité de la poudre acétonique soit pratiquement stable pendant plusieurs mois, une poudre fraîchement préparée se solubilise plus complètement dans le tampon acétique qu'une poudre plus ancienne, pour laquelle une perte d'activité d'environ 30 % peut être observée à ce stade, dans le culot de centrifugation.

III. – La solution est amenée à 0,43 de saturation en sulfate d'ammonium, par addition de la quantité convenable de solution aqueuse saturée de ce sel. Après centrifugation, le culot est éliminé.

IV. – La solution est amenée à 0,60 de saturation en sulfate d'ammonium, comme ci-dessus. Après centrifugation, le culot est lavé par remise en suspension dans une solution aqueuse de sulfate d'ammonium à 0,60 de saturation, puis centrifugé.

Le culot final est éliminé.

V. – La solution est amenée à 0,70 de saturation en sulfate d'ammonium, comme ci-dessus. Après centrifugation, le culot est débarrassé de cristaux de sulfate de calcium par trois lavages successifs avec une solution aqueuse saturée de sulfate d'ammonium. Il peut être conservé à ce stade en vue d'une purification ultérieure.

VI. – La solution est amenée à 0,88 de saturation, par addition, cette fois, de sulfate d'ammonium cristallisé. Le culot séparé par centrifugation renferme 50 % de l'activité initiale; il est débarrassé de sulfate de calcium

par trois lavages successifs avec une solution aqueuse saturée de sulfate d'ammonium. La solution est éliminée.

VII. – Les ions SO₄⁻⁴ de la solution aqueuse du culot VI lavé (titre: 200 000 unités par cm³) sont échangés contre des ions CH₃COO⁻ par échangeur d'anions Amberlite IR 4 B. Cette opération s'effectue sans perte d'activité.

VIII. – La solution est additionnée de 2 volumes d'acétone à -10°C; après 20 min de floculation à -10°C, le précipité est séparé par centrifugation à -6°C et lavé par de l'acétone à 66 %, refroidie à -10°C. Il est finalement dissous dans de l'eau distillée, et séché à l'état congelé (lyophilisation). Une perte apparente d'activité est due à l'élimination d'un activateur, soluble dans l'acétone à 66 %, et probablement identique à celui qui est éliminé au stade I.

Le tableau suivant précise la pureté des fractions (exprimée par l'activité rapportée à 1 mg d'azote total (A_{Nt}) et à 1 mg d'azote protéique (A_{Np}) et le rendement obtenu à chaque stade.

Table

Stades Opératoires	A _{Nt}	A _{Np}	Rendements %
I	25 000		100
II			90-95
III			85
IV	180 000	320 000	75-80
V	400 000	650 000	25-30
VI	500 000	1 200 000 à 1 500 000	50
VII			
VIII	500 000 à 700 000	500 000 à 700 000	25-30

L'azote total N_t est titré par microkjeldhal, l'azote ammoniacal des prises étant éliminé avant la désagrégation organique par un entraînement à la vapeur en présence de magnésie.

L'azote protéique N_p est déterminé par microkjeldhal sur le précipité obtenu en traitant un volume de la prise d'essai par un volume d'acide trichloracétique à 20 %, et après lavage par une solution à 10 % du même acide.

La fraction obtenue au stade VIII peut être considérée comme une pénicillinase très purifiée; elle donne des cristaux dans une solution de sulfate d'ammonium, à froid; les propriétés de cette fraction ainsi que les détails sur sa cristallisation seront publiés ultérieurement.

La pénicillinase de *Bacillus cereus* est très stable jusqu'au stade V, le précipité V présentant même, en solution, une certaine activation.

Par contre, la fraction obtenue au cours du stade VI est très instable; en effet, des solutions de concentrations diverses entre pH 5,5 et 6,8 se désactivent de 50 % en 24 h. Les solutions de pénicillinase du stade VIII (pénicillinase purifiée) sont plus stables.

La pénicillinase du stade I se désactive au cours des dialyses contre de l'eau distillée ou permutée; le dialysat ne réactive pas l'enzyme. La rapidité de la désactivation dépend de la porosité de la membrane semi-perméable utilisée.

L'activateur présent dans les solutions acétoniques (stade I) est complexe. Une fraction organique est responsable d'une partie de l'effet; un métal (autre que Ca⁺⁺) de l'autre partie. Le complexe activateur est présent dans les peptones du bouillon de culture de *Bacillus cereus*. Le Cl⁻ n'a aucun effet activateur.

¹ GABOR B. LEVY, Nature 166, 740 (1950).

² H. PÉNAU, J. PHILIPPE et D. BENOIST, Ann. Pharm. Fr. 9, 419 (1951).

³ P. BAUDET et E. CHERBULIEZ, Helv. chim. Acta 36, 2056 (1953).

⁴ G. HAGEMANN, P. BAUDET, W. TSIN, D. BENOIST, résumé des communications du II^e Congrès international de Biochimie, Paris, juillet 1952, p. 246.

La pénicillinase purifiée (VIII) présente un pH situé entre 4,8 et 5,2. Elle se dénature lentement (insolubilisation irréversible) dans la limite de ces pH. Les protéines de la fraction VI et de la fraction VIII représentent environ 1% et 0,5% respectivement du poids de la poudre acétonique (stade I).

On peut augmenter le rendement en produit purifié ($A_{N_1} = 500\,000$ à $700\,000$) en reprenant la fraction insoluble du stade V dans du sulfate d'ammonium à 0,60 de saturation et la fractionner à nouveau par addition de sulfate d'ammonium en solution saturée.

La présence d'une quantité notable de Ca^{++} (provenant de la peptone bactériologique UCLAF, Romainville, Seine, France, utilisée pour la production de la pénicillinase) dans la poudre acétonique (stade I) détermine pour une part la qualité du fractionnement. Il semble que la solubilité de l'enzyme dans le sulfate d'ammonium soit augmentée de ce fait, facilitant ainsi sa purification.

La méthode de purification de la pénicillinase de *Bacillus cereus* que nous venons d'exposer permet d'obtenir l'enzyme sous une forme très purifiée, avec des rendements élevés.

P. BAUDET et G. HAGEMANN

Laboratoire de Chimie organique et pharmaceutique, Ecole de Chimie, Genève (Suisse) et Laboratoires de Recherches Roussel-Sofrapen, Romainville, Seine (France), le 24 février 1954.

Summary

A method for purification of Penicillinase from *Bacillus cereus* is described whereby we obtain the enzyme in a very pure form and in excellent yields. Starting from a crude acetone precipitate, the purification is obtained by using successive separations with ammonium sulphate, in controlled conditions, and final ion exchange.

Spezifische Wirkung einiger tierischer und bakterieller Polysaccharide auf Leucocyten *in vitro*

Nachdem es gelungen war, in Fraktionen von *Proteus*-kulturen¹, die KAHNT in unserer chemischen Abteilung bearbeitet hat, solche zu finden, die in Konzentrationen bis zu 10^{-8} eine starke emigrationsfördernde Wirkung auf Leucocyten ausüben, schien es interessant, in der Literatur beschriebene, zum Teil hochgereinigte polysaccharidartige Bakterienprodukte und analoge Gewebefaktoren zu prüfen. Dank dem Entgegenkommen verschiedener Forscher konnten wir eine grössere Reihe derartiger Stoffe untersuchen: Polysaccharide, Mucopolysaccharide, Phosphatide und einzelne Kohlehydratsulfosäuren.

Arbeiten über die Wirkung von Bakterienextrakten auf die Emigration von Leucocyten *in vitro* ergeben nur wenige Befunde. MEIER² hat den Nachweis chemotaktisch wirksamer Produkte in Bakterienkulturen erbracht³. LASFARGUES⁴ beschreibt Emigrationsförderung mit cytotoxischen, hitzelabilen Fraktionen aus grampositiven Bakterien. KUNA und CHAMBERS⁵ erwähnen eine 1%-Endotoxinlösung aus pyrogenen Bakterien als

chemotaktisch wirksam (siehe auch zusammenfassende Arbeit von McCUTCHEON¹). Chemotaxis wie planimetrisch erfasste Leucocytenmigration charakterisieren offenbar die gleiche Wirkung.

Für *Fibroblasten* sind alle untersuchten Substanzen, mit Ausnahme von Pyromen (Ampullenware), bei kurzer Einwirkungsdauer wenig wirksame Produkte. Eine morphologisch sichtbare Schädigung der Mitosen und Interphasenzelle liess sich nicht nachweisen. Über Einzelheiten wird später in anderem Zusammenhang berichtet. Das Ergebnis der *Leucocyten*-versuche zeigt eindeutig, dass unter den geprüften Substanzgruppen nur eine Gruppe eine ausserordentlich hohe spezifische Wirkung auf Wanderzellen ausübt. Die Polysaccharide aus *S. marcescens*, Shiga und *Proteus* wirken über einen breiten Konzentrationsbereich wanderungsfördernd, wobei mit abnehmender Konzentration die Wirkungsstärke zuerst zunimmt, nach Erreichung eines charakterisierten Maximums (im Mittel bei 10^{-6} g/cm³) fällt die Wirkung mit weiterer Konzentrationsabnahme zum Werte der Kontrolle wieder ab. Lipopolysaccharide und Phosphatide aus Mycobakterien zeigen im Vergleich mit den Polysacchariden aus gramnegativen Keimen keine oder nur geringe Wirksamkeit (siehe dazu WARTMAN und INGRAHAM²).

Mucin, Mucopolysaccharid und Mucoprotein haben keine Wirkung auf die Auswanderung; Chondroitinschwefelsäureester und Polysaccharid A (Heparin) zeigen eine mässig fördernde Wirkung. Heparin³ wirkt an menschlichen Leucocyten nur unter besonderen Versuchsbedingungen. Nach CHAMBERS ist es 1%ig ohne Wirkung. Schwangernharnextrakt⁴ ist die wirksamste der geprüften «körpereigenen» Substanzen. Auf Grund der vorliegenden Befunde lassen sich folgende, allgemeine Schlussfolgerungen ziehen. Nur bestimmte Bakterien-Polysaccharide sind emigrationsfördernd hochwirksam. Dass sowohl Shigaantigen wie Polysaccharid wirken, spricht dafür, dass zum mindesten Teilkomponenten beider Stoffe identisch sein müssen. Ob die Unterschiede zwischen Extrakten aus gramnegativen Bazillen und Mycobakterien bereits so zu deuten sind, dass nur die Bakterien, die auch lebend chemotaktische Wirksamkeit besitzen, die hier nachgewiesenen Stoffe enthalten, während Tuberkelbazillen, die lebend diese Wirkung nicht haben, solche nicht besitzen, mag vorläufig dahingestellt bleiben. Die ausserordentlich hohe Wirksamkeit von Polysacchariden aus gramnegativen Keimen, verglichen mit der relativ geringen oder fehlenden Wirksamkeit anderer «Mucopolysaccharide», lässt annehmen, dass es sich bei den wirksamen Stoffen um andersgeartete chemische Individuen handeln muss.

Wegen der Konzentrationsverhältnisse ist anzunehmen, dass für die Verhältnisse bei Infektion im Gewebe nur die hochwirksamen Bakterienstoffe und analoge Stoffe als massgebend für direkte chemotaktische Wirkung in Frage kommen.

Wir sind verschiedenen Forschern, Prof. W. P. J. MORGAN, Dr. M. J. SHEAR, Dr. E. LEDERER, Dr. J. F. MCCREA, Dr. A. GOTTSCHALK, Dr. H. SMITH, für die Zurverfügungstellung von Substanzen, die diese Untersuchung ermöglicht hat, zu grösstem Dank verpflichtet.

R. MEIER und B. SCHÄR

Wissenschaftliche Laboratorien der Ciba-Aktiengesellschaft Basel, den 15. Juli 1954.

¹ R. MEIER und B. SCHÄR, Exper. 9, 93 (1953).

² R. MEIER, Z. exp. Med. 87, 283 (1933).

³ R. MEIER, Helv. chim. Acta 24, 134 E (1941).

⁴ E. LASFARGUES, Rev. Immunol. 10, 45 (1946).

⁵ A. KUNA und R. CHAMBERS, J. Clin. Invest. 32, 436 (1953).

¹ M. McCUTCHEON, Phys. Rev. 26, 319 (1946).

² W. B. WARTMAN und E. S. INGRAHAM, Arch. Path. 29, 773 (1940).

³ M. ALLGÖWER, Schweiz. med. Wschr. 77, 131 (1947).

⁴ R. MEIER und B. SCHÄR, Exper. 7, 308 (1951).