

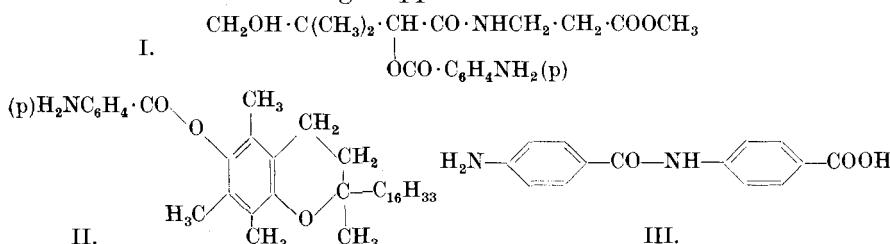
## 212. Versuche zur Bildung von Antikörpern gegen Vitamine

von P. Karrer und R. Schwyzer.

(27. VIII. 47.)

Gegenstand der vorliegenden Untersuchung bildete die Frage, ob es möglich ist, aus gewissen Vitamin-Derivaten und Eiweißstoffen durch Kuppelung Verbindungen zu erzeugen, welche die Eigenschaften von Antigenen besitzen. Wenn es gelänge, im Organismus eine Antikörperbildung gegen Vitamine hervorzurufen, müsste sich dieser Umstand sowohl auf das Befinden des Versuchstieres als auch auf die Abwehr von Infektionen auswirken können.

Als Vitaminderivate benutzten wir N-[*d,l*-p-Amino-benzoyl- $\beta,\beta$ -dimethyl- $\gamma$ -oxybutyroyl]- $\beta$ -alanin-methylester (p-Amino-benzoyl-*d,l*-pantothensäure-methylester) (I), p-Amino-benzoyl-*d,l*- $\alpha$ -tocopherol (II) und p-Aminobenzoyl-p-aminobenzoësäure (III), die diazotiert und hierauf mit Eiweiss gekuppelt wurden.



Die Verbindungen I und II und ihre Vorstufen waren noch nicht bekannt und werden im experimentellen Teil dieser Mitteilung beschrieben.

Die serologischen Versuche, die Prüfung der Kupplungsprodukte mit Eiweiss auf Antigen-Eigenschaften, hat Herr Prof. *H. Mooser* (Bakteriologisches Institut der Universität Zürich) ausgeführt. Wir danken ihm auch an dieser Stelle bestens für die uns gewährte Hilfe.

Diese Versuche haben indessen am Kaninchen nur eine wenig spezifische Antikörperbildung bei Verwendung der erwähnten Eiweisskupplungsprodukte als „Antigene“ erkennen lassen. Das Problem sollte aber auf breiterer Basis verfolgt werden, da seine Lösung neue Erkenntnisse verspricht.

### Experimenteller Teil.

N-[*d,l*- $\alpha$ -p-Nitrobenzoyloxy- $\beta,\beta$ -dimethyl- $\gamma$ -oxybutyroyl]- $\beta$ -alanin  
(p-Nitrobenzoësäure-ester der *d,l*-Pantothensäure).

1. Darstellung des *d,l*- $\alpha$ -[p-Nitrobenzoyl]- $\beta,\beta$ -dimethyl- $\gamma$ -butyrolactons.

5 g  $\alpha$ -Oxy- $\beta,\beta$ -dimethyl- $\gamma$ -butyrolacton wurden nach zweistündigem Trocknen im Vakuum bei 50° mit 15 g p-Nitrobenzoylchlorid und 50 cm<sup>3</sup> Pyridin nach den Angaben

von *Stiller*<sup>1)</sup> verestert und aufgearbeitet. Die erhaltene Verbindung (9 g) schmolz nach zweimaligem Umkristallisieren aus Alkohol bei 138° und bildete farblose Nadeln. Als Nebenprodukt (1 g) wurde eine tiefer schmelzende Substanz beobachtet.

C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> N	Ber. C 56,11	H 4,36	N 4,81%
	Gef. „ 55,75	„ 4,47	„ 5,10%

## 2. N-[*d,l*-*α*-p-Nitrobenzoyloxy-*β,β*-dimethyl-*γ*-oxybutyroyl]-*β*-alanin-methylester.

Die Lösung von 6,7 g des *d,l*-*α*-[p-Nitrobenzoyloxy]-*β,β*-dimethyl-*γ*-butyrolactons und 3,0 g *β*-Alanin-methylester<sup>2)</sup> in 5 cm<sup>3</sup> trockenem Benzol wurde unter Feuchtigkeitsausschluss 1½ Stunden auf 75–80° erhitzt. Nach dem Abkühlen setzte man 70 cm<sup>3</sup> absoluten Äther hinzu und stellte die Lösung in den Eisschrank. Dabei krystallisierten 6,1 g einer Substanz aus, die sehr unscharf zwischen 90–120° schmolz. Die Mutterlauge wurde eingedampft und mit etwas Äthanol versetzt, wobei sich 0,7 g einer feinkristallinen Verbindung vom Smp. 144° ausschieden. Die äthanolische Mutterlauge hinterliess nach dem Verdampfen des Lösungsmittels ein Öl, das z. T. krystallisierte. Es wurde mit Äther ausgekocht, wobei ein Teil der Krystalle in Lösung ging. Nach dem Ausschütteln des Ätherextraktes mit verd. Salzsäure, Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser und nach dem Trocknen hat man die ätherische Lösung eingeengt, wobei sich eine kleine Menge einer Substanz vom Smp. 88–100° ausschied.

Die Verbindung vom Smp. 144° schmolz nach dem Umkristallisieren aus Äthanol bei 147°. Ihre Natur ist bisher nicht aufgeklärt. (Analyse C 57,32 H 4,49 N 7,00%).

Die Krystallfraktionen vom Smp. 90–120° und 88–100° hat man vereinigt und hierauf dreimal mit 40–50 cm<sup>3</sup> Äther ausgekocht. Es blieb ein ungelöster Rückstand, der 3,8 g wog und bei 105° schmolz. — Die Ätherauszüge lieferten 1,7 g Nadeln vom Smp. 92–100°.

Die letzte Fraktion (1,7 g, Smp. 92–100°) wurde aus Äther fraktioniert krystallisiert. Dabei erhielt man zuerst ein Krystallisat von kugeligen Nadelbüscheln mit Smp. 110°, hierauf Nadeln vom Smp. 92–96° (Hauptmenge) und schliesslich lange dünne Nadeln vom Smp. 115°. Die Mittelfraktion (Smp. 92–96°) schmolz nach dem Umkristallisieren aus Tetrachlorkohlenstoff bei 93–95°.

Die oben erwähnten 3,8 g Substanz vom Smp. 105° wurden aus 95-proz. Äthylalkohol fraktioniert. Nach mehrmaligem Umkristallisieren besass die schwerer lösliche Fraktion (1,8 g) den Smp. 113–114°. Sie erwies sich als der gesuchte *d,l*-p-Nitrobenzoylpantothensäure-methylester.

C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub> N <sub>2</sub>	Ber. C 53,39	H 5,79	N 7,33	OCH <sub>3</sub> 8,11%
	Gef. „ 53,08	„ 5,58	„ 7,29	„ 8,06%

Die Krystallfraktion vom Smp. 115° erwies sich mit N-p-Nitrobenzoyl-*β*-alanin-methylester identisch. (Die Verbindung wurde aus *β*-Alanin-methylester und p-Nitrobenzoylchlorid in Pyridin dargestellt und mit der Verbindung vom Smp. 115° identifiziert.)

Die Krystallfraktion vom Smp. 93–95° erwies sich als ein Gemisch von *d,l*-p-Nitrobenzoylpantothensäure und N-p-Nitrobenzoyl-*β*-alanin-methylester.

## p-Aminobenzoyl-*d,l*-pantothensäure-methylester.

Diese Verbindung wurde aus 1,6 g p-Nitrobenzoyl-*d,l*-pantothensäure-methylester in 25 cm<sup>3</sup> Alkohol durch Reduktion mit Wasserstoff und Platinoxyd bei Zimmertemperatur erhalten. Sie erstarrte bei gewöhnlicher Temperatur nicht, sondern bildete ein klares, viskoses Öl, das sich in Alkohol und Äther leicht löst. Auch das hygrokopische Hydrochlorid, das man durch Einleiten von Chlorwasserstoff in die ätherische Lösung der Base darstellte, wurde nicht krystallisiert erhalten.

C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> O <sub>6</sub> N <sub>2</sub> Cl	Ber. N 7,16	Gef. N 6,81%
--	-------------	--------------

<sup>1)</sup> Am. Soc. **62**, 1779, 1782 (1940).

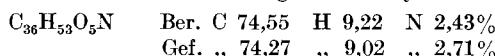
<sup>2)</sup> B. **73**, 972 (1940).

**p-Nitrobenzoësäure-ester des *d,l-α*-Tocopherols.**

In der Literatur findet sich der p-Nitrobenzoësäure-ester des natürlichen  $\alpha$ -Tocopherols beschrieben<sup>1)</sup>.

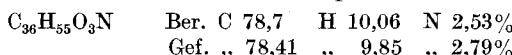
3 g *d,l-α*-Tocopherol, gelöst in 35 cm<sup>3</sup> trockenem Pyridin, wurden mit 3 g p-Nitrobenzoylchlorid 1 Stunde bei Raumtemperatur, hierauf 1 Stunde bei 50—60° gehalten. Dann goss man auf Eiswasser, zog mit Äther aus, wusch die Ätherextrakte mit verd. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser und verdampfte das Lösungsmittel. Der Rückstand wurde zuerst mit wenig Methanol ausgekocht und nachher in heissem Äthylalkohol gelöst. Nach dem Reiben der Gefäßwand begann beim Abkühlen die Krystallisation des p-Nitrobenzoësäure-*d,l-α*-tocopherol-esters. Aus den Mutterlaugen liess sich eine weitere Menge gewinnen. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Äthanol schmolz die Verbindung bei 46—47°.

Nach dem Trocknen im Hochvakuum ergab die Analyse:

**p-Aminobenzoësäure-ester des *d,l-α*-Tocopherols.**

2,2 g p-Nitrobenzoësäure-*d,l-α*-tocopherol-ester wurden in Hexan mit Wasserstoff und 150 mg Platinoxyd reduziert. Während der Reduktion schied sich ein Teil des Amins aus, das man durch Ätherzusatz nachher in Lösung brachte. Nach der Filtration wurde die Flüssigkeit eingedampft und der Rückstand dreimal aus absolutem Alkohol umkristallisiert.

Der p-Aminobenzoësäure-ester des *d,l-α*-Tocopherols schmolz bei 158°.



**Kupplung der Diazoniumsalzlösungen von N-p-Aminobenzoyl-p-aminobenzoësäure, p-Aminobenzoyl-pantothenäure-methylester-hydrochlorid und p-Aminobenzoyl-*d,l-α*-tocopherol mit Casein und Bereitung der Stammlösung des künstlichen Antigens.**

Sodaalkalische Lösungen von Casein wurden bei 0—5° mit den Diazoniumsalzlösungen versetzt und nach 30 Minuten durch Zusatz verd. Salzsäure bei p<sub>H</sub> = 6 ausgeflockt. Den rotgelben Niederschlag löste man unter Zusatz von wenig Soda in Wasser. Nach mehrmaligem Ausfällen wurde er erneut in Wasser und etwas Soda in Lösung gebracht, 0,5% Phenol zugefügt und die Flüssigkeit mit Salzsäure neutralisiert; Auffüllung auf 80 cm<sup>3</sup> = 5% Eiweissgehalt.

Trockenes Casein	5 g	5 g	5 g
Diazotiertes Amin	0,2 g	0,2 g	0,1 g
Lösungsfarbe	rot	rot	gelb
	N-p-Aminobenzoyl-p-aminobenzoësäure	Aminobenzoyl-pantothenäure-methylester-hydrochlorid	p-Aminobenzoyl- <i>d,l-α</i> -tocopherol

Durch den Alkoholgehalt der Lösung des Diazoniumsalzes des  $\alpha$ -Tocopherolderivates wurde ein Teil des Eiweisses denaturiert, was durch das grosse Volumen der Lösung, in der die Kupplung ausgeführt wurde (800 cm<sup>3</sup>) nicht verhindert werden konnte. Dies bedingte, dass der Niederschlag, welcher bei der endgültigen Klärung der Stammlösung ausfiel, etwa der Hälfte der eingesetzten Eiweissmengen entsprach. Dasselbe wurde bei den anderen beiden Eiweiss-Sorten beobachtet.

<sup>1)</sup> D.R.P. 724 268 (1942).

## Kupplung mit Eialbumin.

Die Kupplungen und die Bereitung der Stammlösungen wurden in gleicher Weise wie unter Verwendung von Casein ausgeführt. Der einzige Unterschied bestand darin, dass man die Fällung des Proteins durch Sättigung mit Ammoniumsulfat vornahm.

## Kupplung mit Pferde-Serum.

Anstelle der 5 g trockenen Proteins wurden hier dreimal je 70 cm<sup>3</sup> eines 7-proz. Pferdeserums verwendet, die verdünnt und sodaalkalisch gemacht worden waren. Die Fällung erfolgte durch Einstellen auf pH = 6 und Halbsättigung mit Ammoniumsulfat.

## Die Ergebnisse der Immunisierungsversuche.

Zur Immunisierung wurden Kaninchen während 5 Tagen je 2 cm<sup>3</sup> der künstlichen Antigenlösungen intravenös eingespritzt und nach siebentägiger Ruhezeit das Blut auf Antikörpergehalt untersucht. Nötigenfalls wurde die Immunisierung in der genau gleichen Weise mehrmals wiederholt.

Die beschriebenen künstlichen Antigene scheinen eine nur sehr schwache immunisierende Wirkung auf den Körper auszuüben, da es nur in einer Versuchsreihe gelang, aktive Immunsera zu erhalten. Wiederholte und lange fortgesetzte Versuche an 12 Kaninchen konnten die Ergebnisse jener Versuchsreihe nicht mehr bestätigen.

Nachstehend seien die Ergebnisse der positiv ausgefallenen Immunisierungsversuche kurz skizziert.

Verdünnte Lösungen der künstlichen Antigene wurden mit den Immunsera vermischt und beobachtet, ob dabei eine sichtbare Reaktion stattfand oder nicht.

## Bezeichnung der Antigene:

A<sub>1</sub> = Protein—N=N—C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>—COOH

A<sub>2</sub> = Protein—N=N—C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>—CO—NH—C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>—COOH

A<sub>3</sub> = Protein—N=N—C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>—CO—Pantothensäure-methylester

## Bezeichnung der Immunsera:

S<sub>1</sub> = Antikörper gegen A<sub>1</sub>

S<sub>2</sub> = Antikörper gegen A<sub>2</sub>

S<sub>3</sub> = Antikörper gegen A<sub>3</sub>

	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>
A <sub>1</sub>	±	0	0
A <sub>2</sub>	0	++	0
A <sub>3</sub>	0	0	+++

## Bezeichnung der Reaktion:

0 = keine Reaktion

± = leichte Trübung

+= Trübung

++ = Trübung + leichte Fällung

+++ = vollständige Fällung

Während das Serum S<sub>2</sub> das Antigen A<sub>2</sub> sofort und eindeutig ausfällte, ergab es mit A<sub>1</sub> vermischte nicht einmal eine leichte Trübung. Diese Tatsache spricht gegen die Annahme einer Verseifung der Benzoylaminobenzoësäure-Gruppierung des Antigens A<sub>2</sub> im Körper während der Immunisierung, denn sonst wären im Serum auch Antikörper gegen das Verseifungsprodukt (A<sub>1</sub>) zu erwarten.

Die Hemmungsreaktion nach *Landsteiner* versagte bei diesen Versuchen, wenn als Hemmstoffe p-Aminobenzoësäure, Aminobenzoyl-p-aminobenzoësäure oder Pantothensäure zugesetzt wurden. Es scheint also nicht möglich, mit den gewonnenen Antisera die freien Vitamine p-Aminobenzoësäure und Pantothensäure zu binden. Offenbar spielt die Azobindung bei der Reaktion zwischen Antigenen und Antikörpern in diesen Fällen eine wichtige und spezifische Rolle.