

## Informations - Informationen - Informazioni - Notes

### STUDIORUM PROGRESSUS

#### Die Gamma-Globulinfabrikation in der Tschechoslowakei nach der modifizierten 10. Cohnschen Fraktionierungsmethode

Von Z. FOUKAL, J. PROSEK, und A. VEPREKOVÁ\*, Praha

$\gamma$ -Globulin, ein hochwirksames Präparat gegen verschiedene Viruskrankheiten, steht gegenwärtig im Vordergrunde des Interesses der ganzen Fachwelt. Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit der Auffindung wirtschaftlicher Verfahren für eine möglichst schonende Isolierung dieses wichtigen Bluteiweißes.

Im Januar 1950 wurde eine Mitteilung über die 10. Cohnsche Fraktionierungsmethode veröffentlicht<sup>1</sup>, welche die Trennung aller Proteinkomponenten des menschlichen Plasmas erlaubt. Dieses Vorgehen zur Gewinnung von Blutbestandteilen aus kleinen Mengen (25 ml) Plasma wurde von Fachleuten als sehr vorteilhaft anerkannt<sup>2</sup>.

Nach der ursprünglichen 10. Cohnschen Methode wird die Fraktionierung von  $\gamma$ -Globulin nur so weit geleitet, bis sich  $\gamma$ -Globulin sozusagen als einziger Eiweißstoff in Lösung (etwa 0,3%) befindet. Ein praktisches Isolierungsverfahren für  $\gamma$ -Globulin aus dieser Lösung wurde von mehreren Autoren gesucht, aber allen verwendeten Methoden haften verschiedene Nachteile an.

Nach unseren Erfahrungen ist die bekannte, modifizierte Harvard-Methode<sup>3</sup>, wie sie für die Plasma-Analyse (mit 5 ml Plasma) beschrieben wurde, technisch am besten durchführbar und erzielt die grösste Ausbeute. Zum Vergleich bringt die Tabelle eine Übersicht der Erträge, die sich bei den verschiedenen Verfahren der  $\gamma$ -Globulin-Produktion ergaben.

#### A. Produktion von $\gamma$ -Globulin

1. *Plasmafraktionierung nach der 10. Cohnschen Methode.* Die Fraktionierung der Plasmaproteine erfolgt auf der I. Stufe im pH-Bereich von 5,8 bis 5,9; bei dieser Wasserstoffionenkonzentration besitzen die  $\gamma$ -Globuline eine positive, die  $\beta$ -Lipoproteine dagegen eine negative Ladung. Beide Proteine bilden zusammen einen Komplex, ähnlich einer anorganischen Salzbindung, der nur sehr wenig löslich ist und bei einer Alkoholkonzentration von 19% bei niedriger Temperatur ausfällt. Auf der II. Stufe des Fraktionierungsprozesses wird durch Zugabe von Glyzin (Aminoessigsäure) die Dielektrizitätskonstante der Lösung erhöht; da die Grösse der elektrostatischen Anziehungskraft der Dielektrizitätskonstanten umgekehrt proportional ist, wird dadurch die Bindung zwischen dem  $\gamma$ -Globulin und dem  $\beta$ -Lipoprotein gespalten, worauf das freie  $\gamma$ -Globulin in Lösung geht.

2. *Isolierung von  $\gamma$ -Globulin.* Die Isolierung von  $\gamma$ -Globulin aus der Lösung II wird nach der modifizierten Harvard-Methode mit Hilfe von zweiwertigen Anionen durchgeführt, was die Verwendung einer niedrigen, kein Ausfallen von Glyzin bewirkenden Alkoholkonzentra-

tion ermöglicht. Das gefällte  $\gamma$ -Globulin wird nach Zentrifugieren als zähe Paste erhalten; diese führt etwa 75% Mutterlauge mit, worin Glyzin und weinsaures Natrium vorhanden sind. Die genaue Menge dieser beiden Salze muss in jeder Charge analytisch bestimmt werden. Der Glyzingehalt im trockenen Präparat bewegt sich gewöhnlich um 7%, so dass für Injektionslösungen noch ein Zusatz von Glyzin nötig ist, um eine isotonische Lösung zu erhalten. Die Tartratkonzentration beträgt gewöhnlich bei einer 10prozentigen Injektionslösung um 0,3%, bei einer 16prozentigen Lösung etwa 0,5%. Die Anwesenheit dieses vollkommen harmlosen Salzes hat keine grössere Bedeutung als zum Beispiel diejenige von schwefelsaurem Ammonium in einem gereinigten Serum.

#### B. Analytische Methoden

Der richtige Verlauf des ganzen Produktionsprozesses wird analytisch genau kontrolliert, ebenso werden alle dazu nötigen Chemikalien, Reagenzien und vorbereiteten Lösungen nach geläufigen analytischen Methoden geprüft. An dieser Stelle soll nur auf einige der verwendeten Kontrollmethoden kurz eingegangen werden.

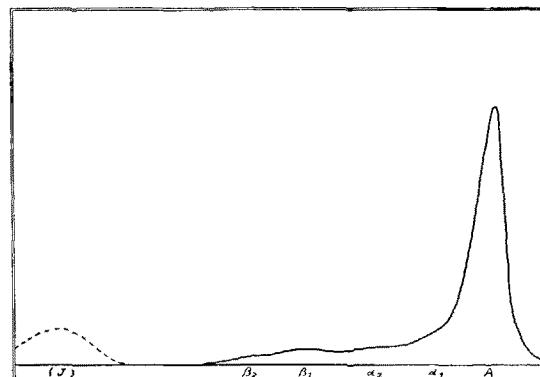


Abb. 1. Die Abfallflüssigkeit nach der I. Fraktionierungsstufe. Nach Aufnahme mit Fokal-F-Apparatur. pH = 8,6,  $\mu = 0,1$ . Rising boundary, 6900 s.

Im Ausgangsmaterial, im Plasma, wird der Proteingehalt durch Stickstoffbestimmungen nach der Kjehldal-methode (Semimikro-Ausführung) festgestellt. Der gefundene Stickstoffwert, multipliziert mit dem Faktor 6,25, wird als Gesamtprotein gehalt angenommen. Zum Aufschluss wird ein Selen-Katalysator mit Zusatz von Kaliumbisulfat, gelbem Quecksilberoxyd und wasserfreiem Kupfersulfat im Verhältnis 4:100:16:2 verwendet; diese Mischung hat sich gut bewährt.

Die Analyse wird nach einer Aufschlusszeit von 12 bis 16 h in üblicher Weise durchgeführt.

Auf der I. Fraktionierungsstufe wird speziell die Zusammensetzung der Abfallflüssigkeit (IV + V + VI) elektrophoretisch kontrolliert, entweder nach der klassischen Methode von TISELIUS oder vorteilhafter mit Papier-elektrophorese. In beiden Fällen wird mit Veronal-Zitrat-Pufferlösung von pH = 8,6,  $\mu = 0,1$  gearbeitet. Die Papierelektrophorese erfolgt in einem nach eigenen Angaben konstruierten Apparat, der die gleichzeitige Durchführung von 6 Messungen gestattet. Es wird Whatman-Papier Nr. 1 verwendet. Das Elektropherogramm wird mit Bromphenolblau entwickelt; die einzelnen

\* Biogena, Praha, Tschechoslowakei.

<sup>1</sup> E. J. COHN *et al.*, J. Amer. chem. Soc. 72, 465 (1950).

<sup>2</sup> R. STRÄSSLE, Exper. 9, 242 (1958). – HS. NITSCHMANN, P. KISTERLER und W. LERGIER, Helv. chim. Acta 37, 666 (1954). – D. M. SURGENOR, Chem. Eng. News, May 19, 2098 ([1952]).

<sup>3</sup> W. F. LEVER *et al.*, J. clin. Invest. 30, 99 (1950).

## Ausbeuten der verschiedenen Methoden

	6. + 9. Cohnsche Methode*	Methode von CHOLČEV und KOLESNIKOVÁ, modifiziert von ČSÁV**	10. Cohnsche Methode, modifiziert von NITSCHMANN*	10. Cohnsche Methode, modifiziert von DEUTSCH*	10. Cohnsche Me- thode, modifiziert durch die Harvard- gruppe, verwendet in der ČSR	Methode von HOREJŠI***
Ausbeute in % des gesamten $\gamma$ - Globulins des Plasmas . . . .	50–60	72–76	60–70	70–80	80–85	78–81
Durchschnittliche Ausbeute aus 1 l Plasma . . . .	4,5 g	5,7 g	4,92 g	6,25 g	6,44 g	6,19 g

\* Angaben über die 6. + 9. Cohnsche Methode sowie über die Modifikationen von NITSCHMANN und DEUTSCH siehe Tafel 2 in Helv. chim. Acta 37, 666 (1954).

\*\* Die Methode von CHOLČEV und KOLESNIKOVÁ wurde in Z. Mikrob. Epidem. Immunobiolog. 1947, 6 veröffentlicht.

\*\*\* Die Methode von HOREJŠI ist in Čas. lék. čes. 91, 704 (1952) beschrieben.

Komponenten werden entweder kolorimetrisch oder mit einem für diesen Zweck modifizierten Photometer in Gauss-Kurven aufgenommen und rechnerisch bestimmt. Mit dieser Analyse soll in der Abfallflüssigkeit zurückgebliebenes  $\gamma$ -Globulin nachgewiesen werden.

der Proteine mit 10prozentiger Trichloressigsäure in einem Equivalentteil des Filtrats der Gehalt an Nichtproteinstickstoff untersucht. Durch Subtraktion dieses Wertes vom Gesamtstickstoffgehalt erhält man die Menge des Proteinstickstoffs, welche durch Multipli-

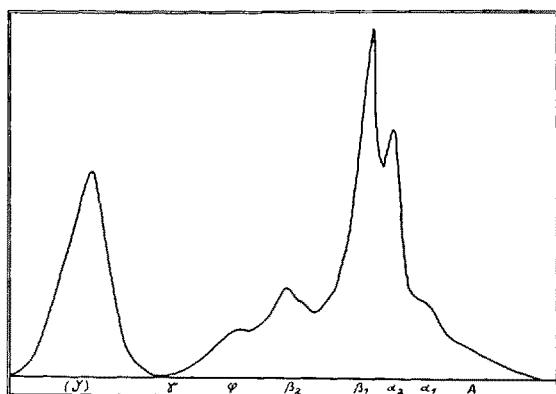


Abb. 2. Abfallproteine nach der Extraktion (II. Stufe).  
Nach Aufnahme mit Fokal-F-Apparatur. pH = 8,6.  $\mu = 0,1$ .  
Rising boundary, 7350 s.

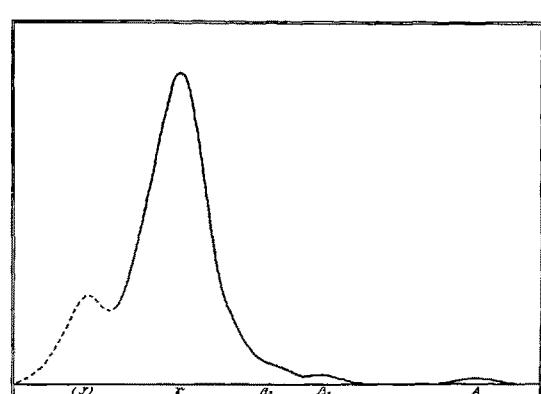
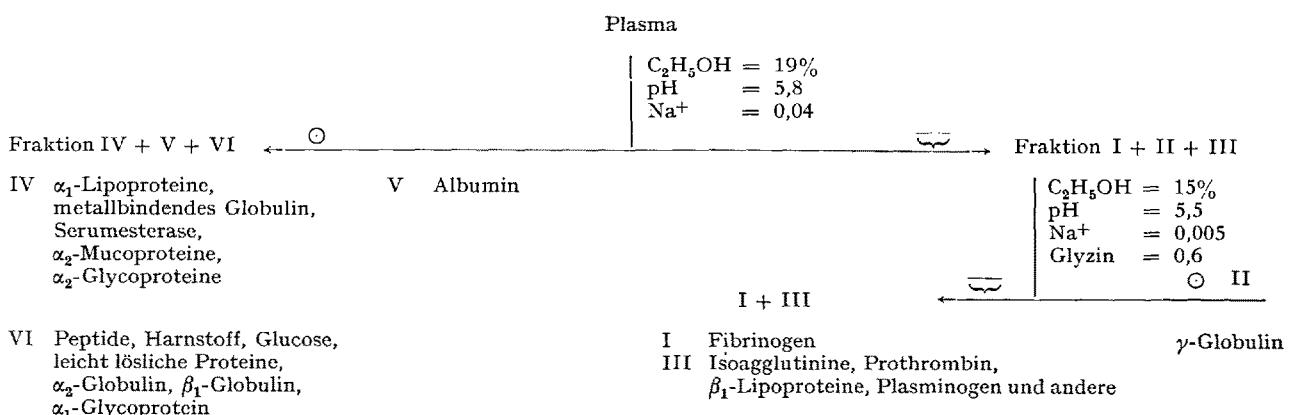


Abb. 3. Proteine in der Extraktionsglyzinlösung (II. Stufe).  
Nach Aufnahme mit Fokal-F-Apparatur. pH = 8,6.  $\mu = 0,1$ .  
Rising boundary, 7200 s.

Auf der II. Stufe wird die Gesamtproteinmenge bestimmt, welche in die glyzhinhalige Extraktionslösung übergegangen ist. Protein- und Nichtproteinstickstoff werden mit der Kjehldalmethode (Semimikro-Ausführung) ermittelt. In einem Teil der Probe wird der gesamte Stickstoff bestimmt, im anderen Teil nach Fällung

zieren mit dem Faktor 6,25 den gesuchten Proteingehalt ergibt. Diese Methode liefert bei vorschriftsmässiger Durchführung recht zuverlässige Resultate.

Auf der III. Stufe wird die Abfallflüssigkeit nach dem Entfernen des  $\gamma$ -Globulins entweder elektrophoretisch oder mit einer nephelometrischen Näherungs-Methode



auf ihren Proteingehalt geprüft. (Die nach Zugabe von Trichloressigsäure entstandene Trübung wird gemessen.)

Im getrockneten  $\gamma$ -Globulin-Präparat wird zuerst die Reinheit qualitativ und quantitativ elektrophoretisch kontrolliert und dann der Gehalt an Protein, Glyzin und Tartrat bestimmt.

Die elektrophoretische Analyse wird in üblicher Weise nach der klassischen Küvettenmethode durchgeführt (Fokal-F-Apparatur von Strübin & Co., Basel, mit 5 ml-Küvette). Dabei hat sich am besten die von COHN *et al.* empfohlene Veronal-Zitrat-Pufferlösung ( $\text{pH} = 8,6$ ;  $\mu = 0,1$ ) bewährt; sie enthält:

Diäthylbarbitursäure p.a. . . . .	11,05 g
Natrium citricum cryst. (2 H <sub>2</sub> O) . . . . .	2,45 g
n-NaOH . . . . .	50,00 ml

gelöst in Wasser und auf 1000 ml aufgefüllt.

Die Gradientenkurve wird auf Kinofilm aufgenommen, das Bild auf das Format 300 × 200 mm photographisch vergrößert und entweder planimetrisch oder mit rechnerischen Methoden quantitativ ausgewertet. Eine qualitative Analyse wird durch Bestimmung der Beweglichkeiten der einzelnen Komponenten durchgeführt.

Protein- und Glyzininhalt im getrockneten  $\gamma$ -Globulin werden mit der indirekten Methode ermittelt, wie sie für die Extraktionslösung nach der II. Fraktionierungsstufe beschrieben wurde.

In einem äquivalenten Teile des Filtrates wird nach Abtrennung der Proteine auch der Tartratgehalt kolorimetrisch nach der modifizierten Methode von UNDERHILL *et al.*<sup>4</sup> bestimmt. Dabei reagieren Tartrate mit Natriummetavanadat in Gegenwart von Essigsäure, wodurch eine rote Färbung entsteht. Der Blindversuch ohne Tartrat ergibt nur eine gelbe Färbung. Die Farbintensität wird mit einem Pulfrich-Photometer in Kleinküvetten gemessen und mit Hilfe einer Vergleichsstandardkurve ausgewertet. Die Methode gibt genaue Resultate, die gut reproduzierbar sind.

### C. Klinische Ergebnisse

Nach dem beschriebenen Verfahren hergestelltes  $\gamma$ -Globulin wird unter klinischer Kontrolle in der Tschechoslowakei laufend angewendet. Nach den bisherigen Ergebnissen bewirkt es weder Lokal- noch Gesamtreaktionen, und seine Wirksamkeit wurde an mehreren, von Infektionshepatitis bedrohten Kollektiven einwandfrei bewiesen. Neben den schon heute bekannten Anwendungsmöglichkeiten gegen Viruskrankheiten kann das Präparat auch bei Areakтивität des Organismus mit gutem Erfolg benutzt werden<sup>5</sup>.

**Schlusswort.** Die Harvardsche Modifikation der 10. Cohnschen Methode zur Isolierung von  $\gamma$ -Globulin hat sich nach der oben beschriebenen Abänderung für Herstellung von  $\gamma$ -Globulin zu therapeutischen Zwecken gut bewährt. Wie die Tabelle zeigt, gibt sie bis jetzt die grössten Ausbeuten. So dargestelltes  $\gamma$ -Globulin entspricht allen klinischen Forderungen und enthält aktive Blutproteine mit der elektrophoretischen Beweglichkeit bis zu  $2,8 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ Volt}^{-1}$ , bezogen auf Veronal-Zitrat-Puffer,  $\text{pH} = 8,6$ ;  $\mu = 0,1$ . Das technische Verfahren gestattet auch die Produktion aller übrigen Blutproteinederivate nach dem Prinzip der 10. Cohnschen Methode. Darüber hinaus liegen sehr gute Erfahrungen über die Isolierung von Albumin für bakteriologische Zwecke mittels einer Zinkmethode vor.

Die Autoren sind dankbar für Anfragen und Mitteilungen über Probleme auf dem Gebiet der Blutproteine.

### Summary

The new industrial production of gamma-globulins based on the principles of Cohn's method 10 is discussed. The modified production method has some advantages in comparison with the classical methods 6 + 9. Analytical methods used for the control of the production process and of the final product are shortly described.

<sup>4</sup> F. P. UNDERHILL *et al.*, J. Pharm. exp. Therap. 43, 351 (1931).

<sup>5</sup> F. PROKŠAN *et al.*, Čs. Hyg. Epid. Mikrobiol. 3, 158 (1954).