

N-Methyl-piperidin-4-carbonsäure-äthylester (IX) aus Isonicotin-säure-äthylester-methiodid (X)²⁾. 50 g (X) wurden in 40 cm³ Wasser gelöst und mit 0,5 g Pt-Katalysator (auf Kiesel-Gel 17%) bei 80° und 100 atü hydriert. Die Wasserstoffaufnahme war nach ca. 1 Std. beendet. Man filtrierte vom Katalysator ab, sättigte das Filtrat mit Ammonchlorid und machte mit konz. Natronlauge stark alkalisch. Der Ester wurde sofort in Äther aufgenommen. Sdp. 94–96°/12 mm, $n_D^{24} = 1,4473$, Ausbeute 31 g.

Pikrat: Aus heissem Wasser gelbe Nadeln vom Smp. 181–184°.

$C_{15}H_{20}O_9N_4$	Ber. C 45,00	H 5,04	N 14,00%
(400,34)	Gef. „ 44,69	„ 5,10	„ 13,78%

Jodmethylat: Aus abs. Alkohol-Äther farblose Nadeln vom Smp. 149–150°.

$C_{10}H_{20}O_2NJ$	Ber. C 38,34	H 6,43	N 4,47%
(313,19)	Gef. „ 38,45	„ 6,63	„ 4,39%

Zusammenfassung.

Es wird die Synthese des N-Methyl-piperidin-4,4-dicarbon-säure-diäthylesters (VII) über das N-Methyl-N-benzyl-piperidinium-4,4-dicarbon-säure-diäthylester-bromid (V) beschrieben. Der Diäthylester VII liess sich in den N-Methyl-piperidin-4-carbonsäure-äthylester (IX) überführen.

Forschungsinstitut der Dr. A. Wander AG., Bern.

206. Eine pasteurisierbare humane Plasmaproteinlösung (PPL), erhalten durch Entsalzung von Plasma mittels Ionenaustauschern

von Hs. Nitschmann und P. Kistler.

(25. VIII. 54.)

Einleitung.

Da ein bestimmter, wenn auch kleiner Prozentsatz aller Blutspender Träger des Virus der sog. Serum- oder Inokulationshepatitis (Gelbsucht) ist, besteht für den Empfänger von Blut, Plasma oder Serum eine gewisse Gefahr, infiziert zu werden¹⁾. Das Hepatitisproblem hat sich besonders beim Trockenplasma als ein sehr ernstes erwiesen.

Bei der Trockenplasmafabrikation wird im allgemeinen das Plasma einer grösseren Anzahl von Spendern gemischt. Da die Verdünnung des Virus ohne grosse Bedeutung zu sein scheint, steigt die Infektionsrate bei Infusion von gepooltem Trockenplasma fast proportional mit der Poolgrösse. Die Letalität bei der Inokulationshepatitis ist beträchtlich, und es hat deshalb nicht an Bemühungen gefehlt, diese Infektionsgefahr zu bannen. Ultraviolett-Bestrahlung des Plasmas schien nach amerikanischen Versuchen die Möglichkeit zu bieten, das Virus abzutöten, ohne die Plasmaproteine zu denaturieren

¹⁾ Die Angaben für die Infektionsrate bei Einzelbluttransfusionen variieren zwischen 0,1 und 0,8%

und wurde deshalb vor einigen Jahren in USA obligatorisch erklärt. Der Blutspendedienst des Schweiz. Roten Kreuzes führte hierauf vor etwa 2 Jahren ebenfalls die UV.-Bestrahlung vor der Trocknung des gepoolten Plasmas ein¹⁾. Leider haben statistische Erhebungen bei Empfängern von bestrahltem Trockenplasma sowohl in USA als auch in der Schweiz²⁾ ergeben, dass die Bestrahlung das Hepatitisrisiko höchstens etwas zu verringern, keinesfalls aber zu beseitigen vermag. Der Schweizer Blutspendedienst wird deshalb sobald als möglich nur noch ungepooltes Trockenplasma aus einzeln zentrifugierten Blutspenden abgeben. Bei Infusion von solchem Plasma ist das Hepatitisrisiko nicht grösser, aber auch nicht kleiner, als bei Vollbluttransfusionen. Die Herstellung wird bedeutend teurer als die von gepooltem Trockenplasma. Zudem dürfen Plasmen, die Isoimmunantikörper Anti-A bzw. Anti-B enthalten, wegen der Gefahr von inversen, hämolytischen Transfusionsreaktionen nur an gruppengleiche Empfänger verabreicht werden. Als endgültige Lösung kann die Einzelzentrifugierung deshalb nicht angesehen werden.

Viele Versuche sind besonders in USA gemacht worden, um Plasma durch Zusatz chemischer Reagenzien zu sterilisieren³⁾. Die praktische Bewährungsprobe solcher Methoden steht allerdings noch aus.

Eine andere Lösung haben *E. J. Cohn* und Mitarbeiter mit ihrer Stable Plasma Protein Solution (SPPS) gesucht⁴⁾. SPPS wird gewonnen, indem die besonders wärmeempfindlichen Globuline mit Zinkionen ausgefällt werden. Die verbleibende Lösung wird mittels Ionenaustauscher vom Zink befreit und lässt sich dann 10 Stunden bei 60° pasteurisieren. Für diese Wärmebehandlung haben *Gellis* und Mitarbeiter⁵⁾ mit Hilfe freiwilliger Versuchspersonen⁶⁾ nachgewiesen, dass sie den Virus der Inokulationshepatitis abtötet. Trotzdem SPPS als ein ideales hepatitissicheres Transfusionsmittel erscheint, ist sie unseres Wissens aus dem Versuchsstadium noch nicht herausgekommen. Nach unseren eigenen Erfahrungen stösst die Entfernung des zugesetzten Zinks bis auf den physiologischen Wert des Blutes auf Schwierigkeiten.

Die pasteurisierbare Plasmaprotein-Lösung⁷⁾, über die im folgenden berichtet wird, hat mit *Cohn's* SPPS die Wärmestabilität gemeinsam und bietet somit die geforderte Hepatitissicherheit. Zur

¹⁾ *H. Sager*, Schweiz. Apoth.-Ztg. **90**, 813 (1952).

²⁾ *P. Dubs, H. Fellmann, A. Hässig, U. Heim, U. Portmann & W. Schreiner*, Zur Frage der Hepatitisübertragung durch ultraviolett bestrahltes, lyophilisiertes Mischplasma. Schweiz. Med. W'schr., im Druck.

³⁾ *F. W. Hartmann, G. LoGrippo & R. R. Kelly*, Am. J. Clin. Pathol. **24**, 339 (1954). Dort weitere Literatur.

⁴⁾ *E. J. Cohn, J. L. Tullis, D. M. Surgenor & M. D. D'hont*, Science **114**, 479 (1951). Buch: „Blood Cells and Plasma Proteins“, Memoirs of the University Laboratory of Physical Chemistry related to Medicine and Public Health, Harvard University, Nr. 2, edited by *J. L. Tullis*, p. 29—57 (1953).

⁵⁾ *S. S. Gellis, Neeffe, Stokes, Strong, Janeway & Scatschard*, J. Clin. Invest. **27**, 239 (1948).

⁶⁾ Inokulationshepatitis kann nicht auf Tiere übertragen werden.

⁷⁾ In dieser Arbeit verwendete Abkürzungen: PL = Plasmaprotein-Lösung, PPL Pasteurisierte Plasmaprotein-Lösung.

Entfernung der labilen Globuline gingen wir jedoch, inspiriert durch die Arbeiten von *Reid & Jones*¹⁾, den Weg der Total-Entsälzung des Plasmas, der uns ideal schien, um zu einer hitzestabilen Plasma-proteinlösung ähnlich *Cohn's* SPSS zu kommen, weil kein Reagens zugegeben werden muss, dessen nachträgliche Entfernung evtl. Schwierigkeiten bereiten könnte.

1. Prinzip der Methode.

Globuline sind definitionsgemäss Proteine, die in Wasser nur löslich sind, wenn dasselbe einen geeigneten, relativ kleinen Elektrolytgehalt aufweist. Sie können aus ihren Lösungen durch pH-Verschiebungen oder durch noch höhere Salzkonzentrationen ausgefällt werden (Aussalzen). Sie fallen aber auch aus, wenn man die Elektrolytkonzentration auf sehr kleine Werte erniedrigt. Die eleganteste Methode, um dies zu tun, ist heute die Entsälzung mit Ionenaustauschern. Sie hat gegenüber der früher viel angewandten Dialyse den Vorteil, dass eine Verdünnung der Lösung vermieden wird und dass sie viel rascher als jene ist, besonders wenn grosse Volumina zu verarbeiten sind. *Reid & Jones* haben in zwei Mitteilungen (1949 und 1951)¹⁾ gezeigt, dass man Plasma oder Serum durch Austauscherentsälzung fraktionieren kann.

Das Arbeiten mit einer gemischten Austauschersäule hat sich gegenüber dem sog. Batch-Verfahren als überlegen erwiesen. Wir entsälzen so weit, wie es mit dem betreffenden Austauschergemisch überhaupt möglich ist. Die nach dem Klären verbleibende Proteinlösung enthält nicht nur das Albumin, sondern auch noch eine beträchtliche Menge Globuline. Trotzdem zeigt sie nach Zusatz geeigneter Stabilisatoren die nötige Temperaturbeständigkeit, um die 10stündige Pasteurisierung bei 60° auszuhalten.

2. Vorbereitung der Austauschersäule.

Alle Entsälzungsversuche wurden mit dem stark sauren Kationenaustauscher IR 120 und dem stark basischen Anionenaustauscher IRA 410²⁾ durchgeführt. Das geeignete Mischungsverhältnis ist K : A = 1 : 1,91. Man hat dann ungefähr gleichviel Säure- wie Basenäquivalente. Die Verhältniszahlen beziehen sich auf die Sedimentationsvolumen, gemessen unter Wasser. Bei diesem Verhältnis wird die Kapazität des Harzgemisches voll ausgenützt, und die starken pH-Verschiebungen, die nach Erschöpfung nur eines Harzes auftreten müssen, werden vermieden.

Der Anionenaustauscher muss sich in der OH⁻, der Kationenaustauscher in der H⁺-Form befinden. Zur Gewährleistung von Sterilität und Pyrogenfreiheit werden die Austauscher nach dem Abmessen und frühestens 12 Std. vor dem Gebrauch mit NaOH bzw. HCl behandelt und dann mit frisch destilliertem, pyrogenfreiem (p. f.) Wasser erschöpfend ausgewaschen. Dann werden die Harze in p. f. Wasser gemischt, in die Säule eingefüllt und dort nochmals mit p. f. Wasser durchgespült. Die Harze sollen keine Luftblasen einschliessen, deshalb darf die Säule auch nie trockenlaufen.

¹⁾ *A. F. Reid & F. Jones*, Am. J. Clin. Path. **19**, 10 (1949); Ind. Eng. Chem. **43**, 1074 (1951).

²⁾ Beide von der Firma *Rohm and Haas Comp.*, Philadelphia, Pa., USA.

Für unsere grösseren Versuche verwendeten wir ein Pyrexglasrohr von 8 cm innerem Durchmesser und 100 cm Länge, das unten durch eine Porzellansiebplatte und einen Hahn abgeschlossen war. Die Füllung bestand aus 3,5 l der genannten Harzmischung, womit ca. 5 l Plasma entsalzt werden können¹⁾.

3. Durchführung der Entsalzung.

Die Durchflussgeschwindigkeit des Plasmas darf 0,6–0,7 cm³ pro cm² Rohrquerschnitt und Min. nicht überschreiten, damit die Säulenkapazität voll ausgenützt wird. Die Temperatur hat auf die Kapazität keinen merklichen Einfluss. Da die Entsalzung nicht lange dauert, muss sie nicht im Kühlraum vorgenommen werden. Unsere Arbeitstemperaturen schwankten zwischen 12 und 15°.

Beim Aufgiessen des Plasmas oder Serums wurde darauf geachtet, dass möglichst geringe Durchmischung mit dem Wasser in der Säule stattfand. Der wässrige Vorlauf wurde verworfen, die Proteinlösung steril aufgefangen.

Zur Überwachung des Vorgangs ist die Kontrolle des pH und des elektrischen Widerstandes der abfliessenden Lösung sehr geeignet. Sie kann so geschehen, dass man einzelne Fraktionen auffängt und misst, oder kontinuierlich, indem man die Elektroden in den Abfluss der Säule einbaut.

In Figur 1 ist der Gang des elektrischen Widerstandes (Ω/cm) und des pH (Glas-elektrode) der abfliessenden Lösung für einen Standardversuch wiedergegeben. Auf der Abszisse sind die Nummern der Fraktionen (je 250 cm³) aufgetragen. Kolonnenfüllung wie weiter vorne angegeben. Es wurde eine Lösung von unbestrahltem Trockenplasma verwendet, die 5% Protein, 5% Glucose, 0,64% Trinatriumcitrat und 0,188% Citronensäure enthielt.

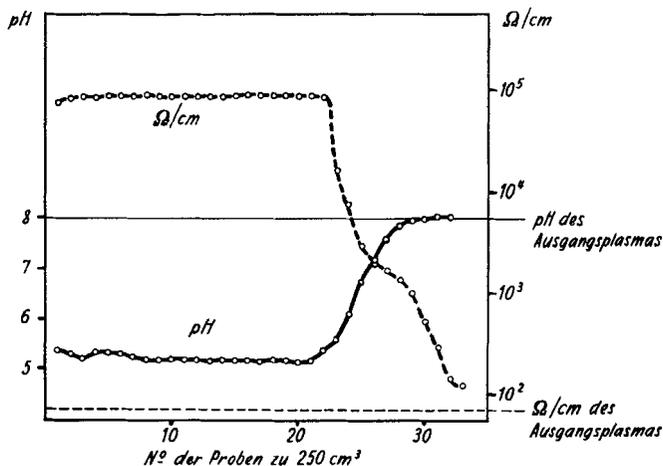


Fig. 1.

Gang des elektrischen Widerstandes und des pH bei der Entsalzung von Plasma (Gemischtbett-Verfahren mit IR 120 und IRA 410).

Widerstand und pH bleiben konstant, bis sie sich, nach Erschöpfung der Säule, gleichzeitig zu verändern beginnen, um rasch ihren Ausgangswerten zuzustreben. Das pH von 5,2, das sich stets von selber einstellt, rührt vom Eiweiss her. Es ist das mittlere isoelektrische pH des vorliegenden Proteingemisches. Dieses pH ist sehr willkommen,

¹⁾ Gegenüber einer reinen Salzlösung von gleicher Normalität ist die Kapazität dieser Harzmischung ca. 2,5mal grösser.

weil hier gerade die hitzelablen α - und β -Globuline ihr Löslichkeitsminimum besitzen und ausfallen. Der Proteingehalt ist auch der Grund, warum der Widerstand nicht so tief absinkt wie bei der gleichartigen Entsalzung von Brunnenwasser.

Wenn die Kapazität der Säule einmal durch einen Versuch, wie er in Figur 1 dargestellt ist, bestimmt worden ist, wird man bei Wiederholung nur noch so viel Plasma aufgießen, dass alles entsalzt abläuft.

4. Nachbehandlung der entsalzten Plasmaprotein-Lösung.

Die Lösung, die aus der Austauschersäule abfließt (pH 5,2–5,3; ca. 90000 Ω /cm), ist nur leicht getrübt, da die Hauptmenge der ausgefällten Globuline durch die Harzkörner abgefiltert wird. Sie wird zentrifugiert (vorzugsweise bei 0°) und ist dann nur schwach opaleszent. Sie wird nun durch sehr langsamen Zusatz von 1-n. NaOH bei guter Rührung auf pH 7,5 gebracht (pH des Blutes). Dabei wird die Lösung noch klarer. Nun setzt man 0,004 Mole Natriumcaprylat pro Liter zu. Es erhöht die Wärmestabilität der Proteine und wird auch von der Bostoner Schule bei ihrer „Stable Plasma Protein Solution“ verwendet. Falls das Ausgangsplasma nicht schon genügend Glucose enthielt, wird der Gehalt hier durch Zusatz einer 50-proz. sterilen, pyrogenfreien Lösung auf 5% gebracht. Dadurch wird die für eine Infusionslösung erforderliche Isotonie mit dem Blute erreicht. Falls medizinische Indikationen es wünschen lassen, kann auch mit Salz isotonisch gemacht werden. Die Lösung wird nun sofort in die endgültigen Behälter (z. B. Transfusionsblutflaschen) sterilfiltriert und verschlossen.

Die folgende Pasteurisation wird in einem vorgewärmten Wasserbad mit Thermostat vorgenommen. Die Temperaturkontrolle ($\pm 0,5^\circ$) erfolgt in einer gleichzeitig eingesetzten, gleichdimensionierten Flasche mit Wasser. Wenn 60° erreicht ist, wird 10 Std. auf dieser Temperatur gehalten.

Man kann auch zuerst pasteurisieren und dann sterilfiltrieren. Man muss dann aber dafür sorgen, dass die Aufheizung auf 60° rasch genug erfolgt, damit die noch nicht absolut keimfreie Lösung sich nur möglichst kurze Zeit bei Bruttemperatur befindet (Gefährdung der Pyrogenfreiheit).

Nach der Pasteurisierung zeigt die Lösung wieder eine ganz leichte Opaleszenz und manchmal (aber nicht immer) kaum wahrnehmbare Spuren eines Sedimentes, das sich beim Schwenken leicht dispergieren lässt und bei der Infusion ohne irgendeine Bedeutung ist (aufgelöstes Trockenplasma ist viel weniger homogen und stark getrübt! ¹⁾).

5. Elution und Regenerierung der Ionenaustauscher.

Die durch die Entsalzung ausgefällten und zum Teil wohl auch an der Oberfläche der Harzkörper adsorbierten Proteine können bei geeigneter Ionenstärke wieder in Lösung gebracht werden. Das Eluieren der Säule soll sofort nach der Passage des Plasmas vorgenommen werden, da das Fibrinogen allmählich unlöslich wird und die Elution erschwert. Diese Schwierigkeit ist bei Frischplasma geringer als bei Trockenplasma und fällt bei Serum ganz weg.

Wenn die eluierten Proteine Verwendung finden sollen, empfiehlt es sich, mehrmals mit kleineren Mengen Essigsäure/Acetat-Puffer (0,2-m. HAc – 0,5-m. NaAc) zu eluieren. Das Eluat, in dem man auch noch den auszentrifugierten Anteil der ausgefällten Proteine auflöst, kann nach irgendeiner der bekannten Methoden fraktioniert werden. Wir konnten beispielsweise nach der Methode von *Nitschmann, Kistler & Lergier*²⁾ den grössten Teil des γ -Globulins, das nicht in die Plasmaprotein-Lösung übergegangen war, zurückgewinnen. Die Frage, wie sich die für die Therapie wichtigen Antikörper auf die unlöslichen und auf die in der Plasmaproteinlösung verbleibenden γ -Globuline verteilen, harret noch der Abklärung.

¹⁾ Die Lösung lässt sich sogar im siedenden Wasserbad erhitzen, ohne auszuflocken oder zu gelieren. Das Elektrophoresediagramm lässt dann allerdings starke Assoziationen erkennen, indem nur noch eine breite Bande zu beobachten ist.

²⁾ *Hs. Nitschmann, P. Kistler & W. Lergier, Helv. 37, 866 (1954).*

Wenn nötig, können die Harze vor der Regenerierung von den letzten Resten denaturierter Proteine durch 24stündiges Stehenlassen mit einer sehr verdünnten Pilzproteasolösung¹⁾ (pH ca. 7) befreit werden. Dadurch wird auch denaturiertes Fibrinogen gelöst.

Die Harze werden nun mit gewöhnlichem Wasser gewaschen und dann in gesättigter Kochsalzlösung auf Grund ihrer unterschiedlichen Dichte quantitativ getrennt (IR 120 setzt sich ab, IRA 410 schwimmt). Man lässt sie dann am besten mit konzentrierter Kochsalzlösung befeuchtet stehen und regeneriert erst unmittelbar vor der nächsten Plasmaentsalzung. So lässt sich jedes Keimwachstum unterdrücken.

Wenn Plasmaproteinlösung im grossen dargestellt werden soll, wird man sich einer der technischen Apparaturen bedienen, wie sie heute für die Wasserentsalzung in den Handel gebracht werden. Die Regenerierung wird dann — den besonderen Erfordernissen angepasst — nach den beigegebenen Vorschriften durchgeführt.

6. Analytische und physikalisch-chemische Untersuchungen.

Diese Untersuchungen hatten den Zweck, die Plasmaproteinlösung mit dem Ausgangsplasma zu vergleichen und den Einfluss des Pasteurisierens auf die Lösung zu ermitteln. Schliesslich mussten mit der PPL die nötigen Sicherheitsteste durchgeführt werden, damit sie für klinische Versuche freigegeben werden konnte.

Ein Teil der Resultate ist in der Tab. I zusammengestellt. Es handelt sich um Mittelwerte von mehreren Versuchen. Wo die Resultate für die einzelnen Präparationen stark voneinander abwichen, wurden der tiefste und der höchste der gefundenen Werte eingesetzt.

Die Elektrophoresen wurden mit einer Apparatur nach *Tiselius* mit *Philpot-Svensson*-Optik sowie auch auf Papier ausgeführt. In Fig. 2 sind die Diagramme von frischer und von pasteurisierter Plasmaprotein-Lösung wiedergegeben.

Der Gesamtlipoidgehalt wurde wie folgt bestimmt. 10 cm³ der Lösung wurden mit 10 cm³ Alkohol und 40 cm³ Äther geschüttelt. Dann wurde filtriert und ein aliquoter Teil des Filtrates eingedampft. Der über H₂SO₄ getrocknete Rückstand wurde gewogen.

Cholesterol wurde nach *Zlatkis, Zack & Boyle*²⁾ bestimmt.

Der Cholinesterase-Gehalt wurde durch den in einer Acetylcholinlösung bewirkten pH-Abfall bestimmt.

Die Prothrombinzeiten wurden nach Beimischung einer Lösung von humanem Fibrinogen mit Thrombokinase der Firma *Geigy*, Basel, nach *Quick* bestimmt. Der Blindwert wurde erhalten mit der Fibrinogenlösung, welcher statt Plasmaproteinlösung nur 0,9-proz. Kochsalzlösung zugesetzt worden war.

Amino-N nach *van Slyke*.

Trübungsmessungen im *Zeiss-Pulfrich*-Nephelometer. Die abgelesenen Werte wurden in die in den Vorschriften der U. S. National Institutes of Health verwendeten NU-Einheiten umgerechnet.

1 NU = 1% der Trübung eines Standards mit der absoluten Trübung 0,0193.

Die onkotischen Drucke³⁾ wurden in Osmometern nach *Zimm*⁴⁾ gemessen. Als Membrane dienten Ausschnitte aus Cellophanschläuchen. Proteinkonzentration 0,5–2%. Phosphatpuffer, pH 7,2, Ionenstärke 0,1, Temp. 25,00 ± 0,02°. Fehlerbreite ± 5%.

Ausser den in Tabelle I zusammengestellten Analysen wurden noch folgende Prüfungen ausgeführt:

Sedimentation in einer mit *Philpot*-Optik ausgestatteten PHYWE Ultrazentrifuge bei 145000 g. Ein und dieselbe Plasmaproteinlösung wurde vor und nach dem Pasteurisieren untersucht. Die Lösungen enthielten 0,4% Protein, 1% Glucose und 1% NaCl

¹⁾ *Fermentchemie AG.*, Basel.

²⁾ *A. Zlatkis, B. Zack & A. J. Boyle, J. Lab. Clin. Med.* **41**, 486 (1953).

³⁾ Onkotischer Druck = unkorrigierter kolloidosmotischer Druck, d. h. reiner kolloidosmotischer Druck + Quellungsdruck.

⁴⁾ *B. H. Zimm & I. Myerson, Am. Soc.* **68**, 911 (1946).

Die Diagramme der nicht erwärmten Lösung (PL) zeigten: ca. 85% einer Komponente mit $S_{20} = 4,0 \cdot 10^{-13}$ (hauptsächlich Albumin); ca. 12% einer Komponente mit $S_{20} = 6,5 \cdot 10^{-13}$; ca. 3% einer Komponente mit $S_{20} = 16,6 \cdot 10^{-13}$.

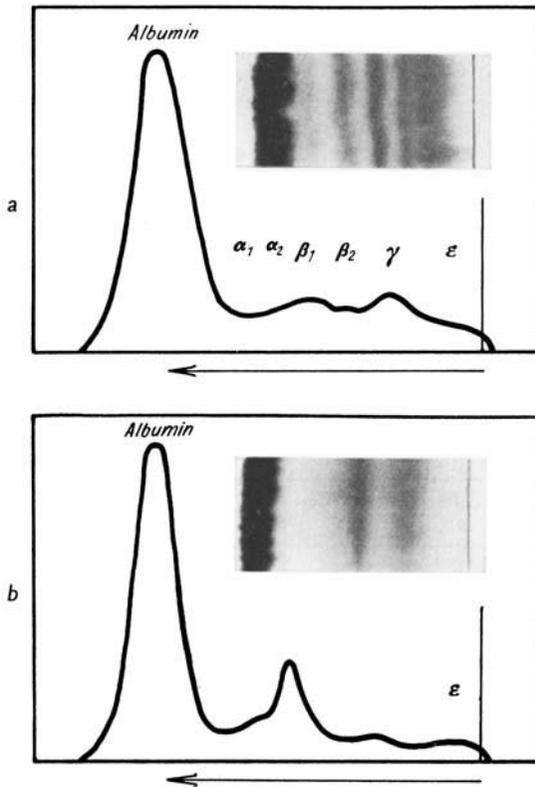


Fig. 2.

Papier- und *Tiselius*-Elektrophoresediagramme (absteigende Gradienten) von Plasma-proteinlösung: a) vor der Pasteurisation (PL); b) nach der Pasteurisation (PPL).

Die in einem gewöhnlichen Serum noch vorhandene sog. x-Komponente war nicht erkennbar, trotzdem die Dichte des Mediums gross genug war (1,04), um die Abtrennung vom Albumin zu ermöglichen. Die sehr lipoidreichen Lipoproteine sind demnach durch die Entsalzung entfernt worden (vgl. dazu die Verminderung des Gesamtlipoidgehaltes, Tab. 1, S. 1774).

Die Diagramme der pasteurisierten Lösung (PPL) zeigten die mit praktisch gleicher Geschwindigkeit sedimentierende und gut symmetrische Albuminspitze ($S_{20} = 4,1 \cdot 10^{-13}$). Die beiden anderen Komponenten waren nicht mehr zu sehen; dafür eilten dem Albumin einige kleine, gerade wahrnehmbare Zäckchen voraus mit S_{20} -Werten, die alle über $20 \cdot 10^{-13}$ lagen. Sie repräsentieren aber nur ca. 5% des gesamten Proteins. Diese grösseren Teilchen müssen durch Assoziation von Globulinmolekeln entstanden sein.

Ultraviolett-Absorption. Die PL zeigt ein Minimum bei 252 $m\mu$ und ein Maximum bei 278 $m\mu$. Nach der Pasteurisierung ist die Lage der Wendepunkte der Absorptionskurve unverändert, nur das Verhältnis der E-Werte an diesen Punkten hat sich etwas verschoben.

Tabelle 1.

Analytische Daten für Plasma, Plasmaprotein-Lösung (PL) und pasteurisierte Plasma protein-Lösung (PPL).

	Plasma ¹⁾	PL	PPL
Proteingehalt in % (% N × 6,25)	5,0-(7,4) ²⁾	3,5-(5,1) ³⁾	3,5-(5,1) ³⁾
Elektrophorese:			
Albumin	54%	66-72%	66-70%
α ₁ -Globulin	6%	2-3%	
α ₂ -Globulin	9%	4-5%	
β ₁ -Globulin	} 15%	7-8%	Rest 34-30%
β ₂ -Globulin		5-6%	
Fibrinogen	6%	—	
γ-Globulin	10%	7-8%	
Mit Thrombin fällbares Fibrinogen in % des Gesamtproteins	(4)-6%	0,4%	0
Gesamtlipoidgehalt in %, bezogen auf Gesamtprotein	11-15%	(3)-12%	(3)-12%
Cholesterolgehalt in %, bezogen auf Ge- samtprotein	4,0%	3,0%	3,0%
Cholinesterase-Aktivität, bezogen auf Plasma = 1	1	0,8	0
Prothrombinzeit	67 sec	> Blindwert	> Blindwert
Amino-N in % des Gesamt-N	10,7%	11,3%	11,3%
Trübung in Nephelometereinheiten bei gleichem Proteingehalt	unmessbar hoch	45-76 NU	90-148 NU
Viskosität, bezogen auf Wasser = 1 . . .	—	1,34-(1,48) ³⁾	1,36-(1,55) ³⁾
Onkotischer Druck, bez. auf den Druck von Plasma mit gleichem N-Gehalt . .	100%	120-135%	98-118%

Serologische Prüfungen. Der Einfluss der Pasteurisierung auf die *Antigeneigenschaften* der Plasmaproteine wurde mit der Agarröhrchen-Methode nach *Oudin*⁴⁾ geprüft. Eine in einem kleinen Reagenzglas erstarrte, das Antiserum enthaltende Agarsäule wird mit der Antigenlösung (hier PL oder PPL) überschichtet. Das Antiserum stammte von gegen humanes Serum immunisierten Kaninchen. Die Antigene diffundieren langsam in die Agarsäule hinein und erzeugen eine Reihe als trübe Streifen deutlich wahrnehmbare Präzipitationszonen, die sich mit der Zeit nach unten verschieben.

Die Front des obersten breiten Bandes, das dem Albumin zukommt, war bei PPL stets genau an der gleichen Stelle wie bei PL. Bei den Globulinstreifen waren zwischen PL und PPL gewisse Unterschiede festzustellen, die sich aber bei Präparationen von

¹⁾ Aufgelöstes Trockenplasma.

²⁾ Serum.

³⁾ Aus Serum.

⁴⁾ *J. Oudin*, *Methods in Medical Research*, Vol. 5, p. 335 (1952).

verschiedenen Runs und bei Verwendung verschiedener Kaninchenimmunsereen nicht immer gleich reproduzierten. Unser Versuchsmaterial gestattet es noch nicht, diese Unterschiede zu deuten. Wesentlich ist für uns die Feststellung, dass durch die Pasteurisierung auch bei der Hauptmenge der Globuline die Antigenstruktur nicht vernichtet wird.

Das Schicksal der *Antikörper* bei Entsalzung und Pasteurisierung wurde vorerst nur für die kompletten und die inkompletten Isoantikörper Anti A und B abgeklärt¹⁾. Zu diesem Zwecke wurde PL und PPL aus einem besonders hochtitrigen Plasma hergestellt. Das Plasma stammte von einem Individuum, welches vorgängig mit gelöster AB-Substanz (*Sharp & Dohm*) immunisiert worden war. Die beiden Lösungen waren 3,8-proz. und wurden mit dem auf gleiche Konzentration gebrachten Ausgangsplasma verglichen. Die Resultate der Agglutinationsversuche der geometrischen Verdünnungsreihen gegen A₁- und B-Erythrocyten sind abgekürzt in Tab. 2 zusammengestellt.

Tabelle 2.

Einfluss der Entsalzung und der Pasteurisierung auf die Isoantikörpertiter.

		Plasma	PL	PPL
Komplette Isoantikörper ²⁾	{ A ₁	1:512 ±	1:256 ±	1:256 ±
	{ B	1:128 ±	1: 32 ±	1: 16 ±
Inkomplette Isoantikörper ³⁾	{ A ₁	1: 32 ±	1: 4 —	1: 4 —
	{ B	1: 8 ±	1: 4 —	1: 4 —

Es zeigt sich, dass die kompletten Isoantikörper Anti-A und -B zur Hauptsache in der Plasmaproteinlösung verbleiben und auch durch die Pasteurisierung nur wenig abgeschwächt werden. Die inkompletten Isoantikörper dagegen werden schon durch die Entsalzung fast vollständig eliminiert.

7. Sicherheitsteste.

PPL-Präparate, die klinisch verwendet werden sollen, müssen nicht nur steril, sondern auch pyrogenfrei und nicht toxisch sein⁴⁾.

Für den Pyrogentest werden 3 Kaninchen je 5 cm³ PPL pro kg Lebendgewicht intravenös verabfolgt. Bei keinem unserer Präparate schwankten die rectal gemessenen Temperaturen der Tiere nach der Injektion um mehr als ± 0,2°.

¹⁾ Die Untersuchung soll noch auf weitere Antikörper ausgedehnt werden.

²⁾ Lösungen 1:1 mit 0,9-proz. NaCl-Lösung verdünnt und in geometrischer Verdünnungsreihe gegen A₁- und B-Erythrocyten angesetzt. Ablesung nach 4 Std. Stehenlassen bei 22°.

³⁾ Lösungen 1:1 mit gelöster AB-Substanz versetzt und in geometrischer Verdünnungsreihe gegen A₁- und B-Erythrocyten angesetzt. Nach 4 Std. Prüfung im indirekten *Coombs*-Test.

± bedeutet deutlich wahrnehmbare Agglutination, — eben wahrnehmbare, — keine. Fehlerbreite der Technik ± 1 Verdünnungsstufe.

⁴⁾ Vgl. die „Minimum Requirements“ für Albumin der U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.

Für den Toxizitätsdienst werden 3 Mäusen je 0,5 cm³ PPL intraperitoneal verabfolgt. Die Tiere sollen während 10 Tagen keinerlei Reaktion zeigen. Auch diese Forderung wurde stets erfüllt.

Da die Sterilität nicht an jeder Flasche bakteriologisch geprüft werden kann, lassen wir alle Flaschen mindestens 3 Wochen bei Zimmertemperatur stehen, bevor sie für klinische Versuche abgegeben werden. Tägliche Kontrolle lässt Flaschen, in denen Keime wachsen, sehr leicht als getrübt erkennen und hierauf eliminieren.

8. Diskussion der Ergebnisse.

Vergleich von Normal-Plasma und entsalzter Plasma-proteinlösung. Die Proteine von normalem gepooltem Plasma bestehen¹⁾ aus ca. 54 % Albumin, 40 % Globulinen und 6 % Fibrinogen.

Etwa 70 % des Gesamtproteins kann in Form von Plasma-proteinlösung gewonnen werden. Das darin enthaltene Protein besteht zu ca. 68 % aus Albumin und zu ca. 32 % aus Globulinen. Fibrinogen ist nur noch in Spuren vorhanden. Dass die Globuline nicht weitgehender ausgefällt werden, muss auf das Lösungsvermögen des Albumins zurückgeführt werden. Das durch die Entsalzung ausgefällte oder irgendwie in der Säule zurückgehaltene Protein besteht zu ca. 22 % aus Albumin und zu ca. 78 % aus Globulinen und Fibrinogen. Durch die Entsalzung werden also ca. 50 % der Globuline eliminiert. Der Verlust an Albumin ist teils auf kapillares Zurückhalten von PL, teils auf Adsorption, und teils vielleicht auch auf Komplexbildung mit basischeren Globulinen zurückzuführen.

Die Elektrophorese zeigt, dass sich der Verlust an Globulinen bei unsern Entsalzungsbedingungen auf alle Komponenten verteilt. Die Verhältnisse bleiben auch beim Entsalzen von glucosefreiem Citrat- oder Komplexon-Plasma ungefähr gleich. Die Zunahme des osmotischen Druckes und die geringe Trübung der PL deuten darauf hin, dass vorwiegend die grössten Teilchen ausgefällt werden. Von den γ -Globulinen bleiben ca. 70 % in der PL. Cholinesterase bleibt in Lösung, während Prothrombin ausgefällt oder absorbiert wird. Über das Verbleiben weiterer individueller Proteine müssen noch Versuche durchgeführt werden.

Wirkung der Pasteurisierung auf die Plasmaproteinlösung. Verschiedene Eigenschaften der PPL deuten darauf hin, dass die Wärmebehandlung bei den Globulinen zum Teil eine Assoziation zu grösseren Teilchen bewirkt. Die Nephelometer-Werte steigen, der osmotische Druck fällt etwas, und in der Ultrazentrifuge können rascher sedimentierende Anteile, die mengenmässig allerdings nur gering sind, direkt gesehen werden. Bei den Elektrophorese-diagrammen geht die scharfe Trennung zwischen den einzelnen Globulinen verloren²⁾, und es tritt eine erhöhte Zacke hervor, die etwa mit der Geschwindigkeit eines β -Globulins wandert.

¹⁾ Nach *J. T. Edsall*, Adv. Prot. Chem. III, 396.

²⁾ Besonders deutlich auf den Papierelektrophorese-Diagrammen sichtbar.

Für Veränderungen des Albumins liegen keine Anzeichen vor¹⁾. Aber auch bei den Globulinen kann nicht von einer allgemeinen Denaturierung die Rede sein. Wohl werden gewisse biologisch wirksame Komponenten, wie die Cholinesterase, inaktiviert. Antigen- und Antikörperfunktionen hingegen scheinen bei 60° nur geringen Schaden zu nehmen, doch sind hierüber weitere Untersuchungen erwünscht.

Eigenschaften der PPL im Hinblick auf ihre Verwendung als Transfusionsmittel. Sterilität, Pyrogenfreiheit und Isotonie lassen sich ohne Schwierigkeiten gewährleisten. Da das Präparat nur arteigene Blutproteine enthält, ist eine Sensibilisierung des Empfängers nicht zu befürchten.

Der Proteingehalt der PPL kann in weiten Grenzen manövriert werden. Wenn man, wie wir es meist taten, wiederaufgelöstes Trockenplasma mit 5% Protein verarbeitet, wird der Gehalt der PPL mit 3,5% etwas niedrig. Höhere Proteinkonzentrationen erhält man, wenn man Serum verarbeitet, oder Frischplasma, das ein minimales Volumen an Antikoagulanslösung²⁾ enthält oder evtl. sogar mit Trockenplasma aufkonzentriert worden ist. Glucosehaltiges Trockenplasma darf nicht zu beliebig höheren Konzentrationen aufgelöst und dann entsalzt werden, da parallel zur Proteinkonzentration auch der Glucosegehalt ansteigen würde (Überschreitung der Isotonie).

Der onkotische Druck der PPL ist wegen des grösseren Albumingehaltes eher etwas höher als der von gleich konzentriertem Plasma. PPL muss diesem deshalb als Kreislauffüllmittel mindestens ebenbürtig sein.

PPL ist gegenüber Plasma in der Zusammensetzung seines Eiweissbestandes etwas verschoben; einige Komponenten fehlen sogar ganz, doch dürfte dies für die meisten Indikationen, bei denen bisher Plasma gegeben wurde, ohne Bedeutung sein.

PPL hat dem Trockenplasma gegenüber aber einige eindeutige Vorteile. Der wichtigste ist seine durch die Pasteurisierung erreichbare Hepatitissicherheit, die besonders gegenüber Mischplasma ins Gewicht fallen muss.

Es kann ferner als flüssige Konserve aufbewahrt werden und ist als solche in der Anwendung noch rascher und einfacher als Trockenplasma.

Den durch das Verfahren bedingten Proteinverlusten steht die Möglichkeit gegenüber, dass als Nebenprodukt eine gewisse Menge γ -Globulin gewonnen werden kann.

¹⁾ Die gleiche Wärmebehandlung, wie sie hier zur Anwendung kommt, ist übrigens seit langem bei der Herstellung von Albuminlösungen für die Humantherapie üblich.

²⁾ Äthylendiamin-tetraessigsäure ist hier besonders geeignet. 20 cm³ einer 5-proz. Lösung des Dinatriumsalzes genügen für eine Blutentnahme von 500 cm³.

Das letzte Wort über den praktischen Wert der PPL hat der Arzt. Die *klinische Testung* am Menschen ist im Gang. Über die Ergebnisse, die den Erwartungen zu entsprechen scheinen, wird später von ärztlicher Seite gesondert berichtet. Es kann aber heute schon mitgeteilt werden, dass das Präparat bisher von allen Empfängern absolut reaktionslos aufgenommen wurde.

SUMMARY.

Human plasma or serum is desalted completely by passing through a column containing a suitable mixture of an anion exchanger (OH^- cycle) and a cation exchanger (H^+ cycle). At the resulting very low ionic strength and pH 5.2 part of the globulins is precipitated. The solution is neutralized. A stabilizer such as sodium caprylate and glucose if necessary to make an isotonic solution are added. Then the solution is filtered through a bacterial filter into the final containers. It can be pasteurized for 10 hours at 60°C without clotting, a treatment known to kill the homologous serum hepatitis virus which is frequently present in pooled plasma.

The results of analytical, physico-chemical, serological and biological investigations are reported. They show that in the pasteurized plasma protein solution (designated PPL) the albumin is unchanged and osmotically fully active. With the globulins some changes have occurred, mainly an association to larger particles.

The pasteurized plasma protein solution can be stored at room temperature or in the cold room without any visible change.

First clinical experiments have shown that the pasteurized glucose-containing plasma protein solution may be used safely for transfusions. PPL opens a possibility of solving one of the major problems with human plasma destined for clinical use, namely the elimination of the danger of transmission of homologous serum hepatitis.

Die vorliegende Arbeit wurde durch einen Kredit des *Schweizerischen Nationalfonds zur Unterstützung der wissenschaftlichen Forschung* ermöglicht.

Wir danken Herrn Dr. A. Hässig für die Durchführung der serologischen Versuche, Herrn Dr. R. Weber für die Durchführung der Ultrazentrifuguntersuchungen, Herrn Dr. L. Anker für Unterstützung und Beschaffung von Plasma und den Herren W. Lergier und P. Favaz für technische Mithilfe.

Bern, Institut für organische Chemie der Universität,
Theodor-Kocher-Institut u. d.
Zentrallaboratorium des Blutspendedienstes
des Schweizerischen Roten Kreuzes.
