

Zur Reinigung von Hühner-Interferon

Von

G. Bodo

Chemisches Laboratorium der Arzneimittelforschung GmbH., Wien*

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 14. September 1967)

Interferon wurde aus der Allantois-Flüssigkeit von Hühnerembryos, welche mit Influenza B Lee-Viren infiziert worden waren, etwa 6000fach angereichert. Die Reinigungsmethode umfaßte Fällungen mittels HClO_4 und Zinkacetat, Chromatographie an CM-Sephadex C-25 und Gelfiltration an Biogel P-200. Die erhaltenen Interferon-Präparate zeigten eine spezifische Aktivität von bis zu 200 000 Einheiten je mg Protein. Zum Vergleich wurde dieselbe Reinigungsmethode auch auf die Allantois-Flüssigkeit nicht infizierter Hühnereier angewendet. Das hierbei erhaltene „Mock“-Interferon besaß praktisch keine antivirale Aktivität

Disc-Elektrophoresen in zwei verschiedenen Systemen zeigten, daß die Interferon-Präparate nicht einheitlich waren. Eine Haupt-Proteinkomponente wurde von mehreren Nebenbanden begleitet. Die Interferon-Aktivität fiel mit einer der Nebenkomponenten zusammen. Als jedoch „Mock“-Interferon der Disc-Elektrophorese unterworfen wurde, ergab sich ein Proteinstreifen, welches von dem aus Interferon-Präparaten nicht zu unterscheiden war.

Aus diesen Resultaten wurde geschlossen, daß zur Herstellung von reinem Hühner-Interferon eine weitere Erhöhung der spezif. Aktivität um mindestens eine Größenordnung erforderlich wäre.

Interferon was purified about 6000 fold from the allantoic fluid of embryonated chicken eggs infected with Influenza B Lee virus. The fractionation procedure involved precipitations with HClO_4 and zinc acetate, chromatography on CM-Sephadex C-25, and gel filtration on Biogel P-200. The interferon preparations obtained exhibited a specific activity of up to 200 000 units per mg of protein. For comparison, the same fractionation procedure

* A-1121 Wien XII, Laskegasse 5—11.

was also applied to the allantoic fluid of uninfected chicken eggs, yielding „mock“-interferon virtually devoid of antiviral activity.

Disc electrophoresis in two different systems showed the interferon preparations to be inhomogeneous, a main protein component being accompanied by several minor bands. The antiviral activity coincided with one of the minor protein bands. However, when „mock“-interferon was subjected to disc electrophoresis, a protein pattern indistinguishable from that of the interferon preparations was obtained.

It was concluded from these results that in order to prepare pure chicken interferon a further increase in specific activity by at least one order of magnitude would be required.

Einleitung und Allgemeines

Interferon wurde im Jahre 1957 von *Isaacs* und *Lindenmann*¹ entdeckt. Es bildete sich in Hühnerzellen nach Behandlung mit inaktivierten Influenza-Viren und besaß antivirale Eigenschaften.

In den folgenden Jahren zeigte sich, daß die Interferon-Bildung durch Zellen nach Infektion mit nativen oder vorsichtig inaktivierten Viren eine häufige Erscheinung ist. Neben Hühnerzellen konnten auch eine Reihe anderer Zellarten zur Bildung von Interferonen angeregt werden². Heute kennt man neben den virus-induzierten Interferonen noch eine Reihe anderer, welche durch Einwirkung nicht-viraler Substanzen auf Zellen entstehen³.

Interferone sind makromolekulare Verbindungen. Sie werden durch proteolytische Fermente inaktiviert und besitzen daher, zumindest teilweise, Proteinnatur. Im Vergleich zu den meisten Proteinen sind sie in auffälliger Weise gegen Behandlung mit verdünnten Säuren oder Laugen stabil.

Werden Zellen vor Virusinfektion mit arteigenem Interferon behandelt, so wird die Vermehrung der meisten Viren unterbunden. Nur wenige Viren sind fast resistent gegen die Wirkung von Interferon. Der genaue Wirkungsmechanismus der Interferone ist noch nicht geklärt. Doch scheinen sie die Ribosomen der behandelten Zellen so zu verändern, daß zwar die Translation von zelleigenen Messenger-Nukleinsäuren unbehindert bleibt, die Translation von viralen Nukleinsäuren aber verhindert wird^{4, 5, 6}. Es können daher keine viralen Frühenzyme entstehen, wodurch eine Vermehrung von viralen Nukleinsäuren und Virusproteinen unterbunden wird.

Interferone zeigen Artspezifität. Das heißt, daß sie nur in der Tierart wirksam sind, aus deren Zellen sie gewonnen wurden. Es gibt daher eine große Anzahl verschiedener Interferone, von denen das mit Hilfe von Viren aus Hühnerzellen gewonnene Interferon weitaus am besten charakterisiert ist. Virusinduziertes Hühnerinterferon ist unserem heutigen Wissen nach ein

¹ *A. Isaacs* und *J. Lindenmann*, Proc. Roy. Soc., London, **B 147**, 258 (1957).

² *M. Ho*, New England J. Med. **266**, 1258 (1962).

³ *S. Baron* und *H. B. Levy*, Ann. Rev. Microbiol. **20**, 291 (1966).

⁴ *W. A. Carter* und *H. B. Levy*, Science **155**, 1254 (1967).

⁵ *P. I. Marcus* und *J. M. Salb*, Virology **30**, 502 (1966).

⁶ *W. K. Joklik* und *T. C. Merigan*, Proc. Natl. Acad. Sci. **56**, 558 (1966).

Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 35000 und einem isoelektrischen Punkt von etwa pH 6,5⁷.

Der erste Versuch, virusinduziertes Interferon aus Hühnereiern zu reinigen, wurde im Jahre 1961 von *Burke*⁸ unternommen. Das damals als einheitlich betrachtete Produkt war jedoch nur ganz wenig angereichert (etwa 20fach) und keineswegs rein. Die erste brauchbare Reinigungsmethode wurde 1963 von *Lampson* und Mitarbeitern⁹ veröffentlicht. Dieses Verfahren gestattete eine Erhöhung der spezif. Aktivität bis zum 4500fachen Wert des Ausgangsmaterials. Aber auch hier zeigte sich, daß das zunächst als einheitlich angesehenes Produkt noch keineswegs reines Interferon darstellte. So ergaben sich aus den Versuchen von *Merigan*¹⁰, der das Verfahren von *Lampson* und Mitarbeitern modifizierte und bis zu einer etwa 6500fachen Anreicherung gelangte, daß das von ihm erhaltene Material noch nicht einheitlich war.

Eine neue Reinigungsmethode wurde von *Fantes* und Mitarbeitern angegeben^{7, 11, 12}. Das Verfahren soll bei Rohinterferon aus Hühnereiern eine bis zu 14500fache Erhöhung der spezif. Aktivität ermöglichen. Von den als einheitlich angesehenen Präparaten wurden bereits Aminosäureanalysen durchgeführt⁷. Aber auch hier zeigte *Fantes* selbst, daß das von ihm beschriebene Verfahren kein homogenes Präparat lieferte^{12, 13}.

Es war das Ziel dieser Arbeit, das nach *Merigan* modifizierte Verfahren von *Lampson* zu verbessern. Hierbei wurde vor allem auf eine Erhöhung der Ausbeute hingearbeitet. Darüber hinaus wird die Wirkung eines weiteren Reinigungsschrittes beschrieben. Die neue Reinigungsmethode wurde zur Darstellung von hochgereinigtem Interferon aus der Allantois-Flüssigkeit virusinfizierter Hühnereier verwendet.

Zu Vergleichszwecken wurde auch die Allantois-Flüssigkeit nicht infizierter Hühnereier in derselben Weise aufgearbeitet. Die hierbei erhaltenen Produkte („Mock“-Interferone) wurden mit den gereinigten Interferonpräparaten durch Disc-Elektrophorese verglichen.

Auch das Verfahren von *Fantes* wurde verwendet, und die gereinigten Präparate ebenfalls durch Disc-Elektrophorese und durch Bestimmung der spezifischen Aktivität charakterisiert.

Material und Methoden

Hühnereier

Hühnereier des Typs Leghorn wurden in einem Brutapparat 11 Tage lang bebrütet und nur die Eier mit normal entwickelten Embryos verwendet.

⁷ *K. H. Fantes*, in „Interferons“ (Hrsg.: *N. B. Finter*) S. 117, North Holland Publishing Co., Amsterdam 1966.

⁸ *D. C. Burke*, *Biochem. J.* **78**, 556 (1961).

⁹ *G. P. Lampson*, *A. A. Tytell*, *M. M. Nemes*, und *M. R. Hilleman*, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **112**, 468 (1963).

¹⁰ *T. C. Merigan*, *C. A. Winget* und *C. B. Dixon*, *J. Molec. Biol.* **13**, 679 (1965).

¹¹ *K. H. Fantes*, *Nature* **207**, 1298 (1965).

¹² *K. H. Fantes*, *J. Gen. Virology* **1**, 257 (1967).

¹³ *K. H. Fantes* und *I. G. S. Furminger*, *Nature* **216**, 71 (1967).

Viren

Influenza B Lee-Virus wurde von der American Type Culture Collection erhalten und in 11 Tage lang bebrüteten Hühnereiern vermehrt. Die zentrifugierten Rohlösungen wurden bei -80°C aufbewahrt. Der Hämagglutinationstiter betrug 2^{11} bis 2^{12} Einheiten/ml.

Cowpox-Virus Stamm *Brighton* (American Type Culture Collection) wurde in der Allantois-Membran von 11 Tage lang bebrüteten Hühnereiern vermehrt. Die Reinigung erfolgte nach *Joklik*¹⁴ durch Extraktion mit Geneton 113 (1,1,2-Trichlortrifluoräthan, Fluka) und Ultrazentrifugierung. Die Präparate wurden bei -80°C aufbewahrt. Sie zeigten auf Hühnerfibroblasten einen Titer von etwa 10^8 Plaque-bildenden Einheiten pro ml.

Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von *Lowry* und Mitarbeitern¹⁵ vorgenommen. Kristallisiertes Rinder-Serumalbumin (Sigma, USA) diente hierbei als Standard.

Auch die Extinktionsmessung bei 210 m μ wurde zur Abschätzung des Proteingehaltes sehr verdünnter Proteidlösungen herangezogen. Die Referenzsubstanz Rinder-Serumalbumin zeigte in 0,25 *m*-Borsäure/0,038 *n*-NaOH (pH 8,1) eine Extinktion von $E_{210} = 0,20$ (1 cm) bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$.

Disc-Elektrophorese

Die Versuche wurden mit Hilfe des Apparates der Fa. Shandon, England, durchgeführt. Sowohl das System von *Ornstein* und *Davis*¹⁶ mit 7,5proz. Polyacrylamid-Gel, pH 8,5 als auch das System von *Reisfeld* und Mitarbeitern¹⁷ mit 15proz. Gel, pH 4,5 wurden verwendet.

Um Interferon-Verluste zu vermeiden, wurde die Polymerisation des 15proz. sauren Acrylamides nicht mit Ammoniumpersulfat, sondern durch Photopolymerisation (2 Std.) mit Hilfe von Riboflavin (Endkonzentration 0,45 mg/100 ml) durchgeführt. Die 2,5proz. Zwischengele wurden ebenfalls zur Erhöhung der Ausbeute weggelassen und die Substanz (in 0,01 *m*-K-Phosphat-Puffer, pH 7,0), gemischt mit einem gleichen Volumen 40proz. Saccharose-lösung, einfach über das Trenngel geschichtet (*Fantes*¹³). Die hierbei erreichte Trennschärfe stand derjenigen bei gewöhnlicher Arbeitsweise nicht merklich nach. Zur Markierung der Pufferfronten wurde Methylgrün (pH 4,5 System) oder Bromphenolblau (pH 8,5 System) verwendet.

In zwei parallel durchgeführten Elektrophoresen wurde das eine Gel mit Hilfe von Amidoschwarz 10 B (1proz. Lösung in 7proz. Essigsäure) gefärbt, das andere zur Bestimmung der antiviralen Aktivität in 20–25 Fraktionen zerschnitten und diese 24–48 Std. mit 0,1 *m*-K-Phosphat-Puffer, pH 8, welcher 0,05% Rinder-Serumalbumin enthielt, eluiert.

In einigen Versuchen wurde zur Färbung der Proteinbanden auch Coomassie Brilliant Blue R 250 (ICI, England) verwendet. Hierzu wurde die Gele über Nacht in einer 1proz. Lösung des Farbstoffes in 10proz. Trichloressigsäure, welche mit Pyridin auf pH 2 eingestellt worden war, gefärbt und der

¹⁴ W. K. *Joklik*, *Virology* **18**, 9 (1962).

¹⁵ O. H. *Lowry*, N. J. *Rosebrough*, A. L. *Farr* und R. J. *Randall*, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).

¹⁶ L. *Ornstein* und B. J. *Davis*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404 (1964).

¹⁷ R. A. *Reisfeld*, U. J. *Lewis* und D. E. *Williams*, *Nature* **195**, 281 (1962).

überschüssige Farbstoff in einem Gemisch aus 3 Vol. Methanol, 1 Vol. Eisessig und 7 Vol. Wasser entfernt. Zur Aufbewahrung der Gele diente 7proz. Essigsäure.

Darstellung von Interferon

Interferon wurde aus 11 Tage bebrüteten Hühnereiern mit Hilfe von Viren des Typs Influenza B Lee nach der Methode von *Cantell* und Mitarbeitern¹⁸ gewonnen. Die Eier wurden mit je 0,1 ml Viruslösung (Stammlösung 1:1000 mit physiolog. Kochsalzlösung verdünnt) infiziert, 72 Stdn. bei 37° inkubiert und die Allantois-Flüssigkeit nach Kühlung auf 4° C geerntet.

Zur Bestimmung der antiviralen Aktivität wurde eine Probe der Allantois-Flüssigkeit 1 Stde. auf 65° C erhitzt und eine Verdünnungsreihe in *Parker*-Medium 199, das 0,05% Rinder-Serumalbumin enthielt, hergestellt.

Bestimmung der antiviralen Aktivität

Der Interferon-Test erfolgte in Carrel-Flaschen von 5 cm Durchmesser im wesentlichen nach *Lindenmann* und *Gifford*¹⁹. Primäre Hühnerembryo-Fibroblasten wurden aus 11 Tage alten Embryos nach der üblichen Methode mit Hilfe von Trypsin gewonnen und als Monolayer-Kulturen gezüchtet. Sie wurden nach 48 Stdn. verwendet. Das Wachstum-Medium bestand aus 90% *Parker*-Medium 199 und 10% hitze-inaktiviertem Kalbserum.

Vor dem Test wurden die Zellen einmal mit *Parker*-Medium gewaschen. Beim Test erhielt jede Carrel-Flasche 2,0 ml *Parker*-Medium 199, 0,3 ml Testmaterial verdünnt in *Parker*-Medium (welches 0,05% Rinder-Serumalbumin enthielt) und 0,2 ml einer Suspension von Cowpox-Viren in Gelatine-Kochsalz-Puffer²⁰, entsprechend etwa 100—200 Plaque-bildenden Einheiten. Nach 44—48 stdg. Inkubation bei 37° C wurden die Zellen mit Gentianaviolett gefärbt, die Plaques mit Hilfe eines Kleinbild-Diaprojektors etwa 20fach vergrößert und gezählt.

Alle Gewebekultur-Medien enthielten Antibiotica in einer Endkonzentration von 120 µMol/ml Penicillin G (Na-Salz), 100 µg/ml Streptomycinsulfat und 200 µg/ml Kanamycinsulfat.

Die Interferon-Präparate wurden in mehreren Verdünnungsstufen und diese stets in 3facher Wiederholung getestet. Diejenige Interferon-Menge, welche eine 50proz. Reduktion der Plaque-Zahl gegenüber den Kontrollen bewirkte, wurde als eine biologische Einheit festgesetzt.

Reinigung von Interferon

Alle Reinigungsoperationen wurden bei 4—6° C durchgeführt.

Die rohe Allantois-Flüssigkeit wurde nach *Lampson* und Mitarbeitern⁹ mit 2*n*-HClO₄ bis zu einer Konzentration von 0,15*n* versetzt und der Niederschlag sofort abzentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde neutralisiert, mit 1*m*-Zinkacetat bis zu einer Konzentration von 0,02*m*

¹⁸ *K. Cantell, M. Valle, H. Schakir, J. J. Saukkonen* und *E. Uroma*, *Ann. Med. Exp. Fenn.* **43**, 125 (1965).

¹⁹ *J. Lindenmann* und *G. E. Gifford*, *Virology* **19**, 302 (1963).

²⁰ *S. Fazekas De St. Groth, D. M. Graham* und *I. Jack*, *J. Lab. Clin. Med.* **51**, 883 (1958).

versetzt und auf pH 7,2 eingestellt. Der nach 2—3stdg. Stehen gesammelte Niederschlag wurde in 1*m*-Glykokoll—Salzsäure-Puffer pH 2,5 gelöst (etwa $\frac{1}{10}$ des ursprünglichen Volumens) und die klarzentrifugierte Lösung zuerst gegen 0,9proz. NaCl-Lösung und sodann gegen 0,1*m*-K-Phosphat-Puffer, pH 5,5, dialysiert. Ein auftretender Niederschlag wurde verworfen.

Die weitere Reinigung erfolgte auf chromatographischem Wege. Hierbei wurden die Glasröhrchen der Fraktionssammler vor Gebrauch durch Ausspülen mit einer 1proz. Lösung von Siliconöl Bayer M 300 000 in CHCl_3 und anschließendes mehrstündiges Erhitzen auf 180° C siliconiert. Die Interferon-Lösungen wurden über eine mit 0,1*m*-K-Phosphat-Puffer, pH 5,5, äquilibrierte Säule von CM-Sephadex C-25 (2 × 15 cm; Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden) filtriert (maximal etwa 1500 ml Lösung; 40 ml/Stde.) und mit demselben Puffer nachgewaschen. Anschließend wurde die Säule mit 0,1*m*-K-Phosphat pH 6,0 behandelt, bis eine Messung des Eluates eine Extinktion bei 280 μ von weniger als 0,020 ergab (1 cm-Küvetten). Interferon wurde schließlich mit Hilfe von 0,1*m*-K-Phosphat, pH 8,0, von der Säule eluiert, das Eluat in einem Dialysierschlauch mittels eines elektrischen Föhns auf etwa 5—10 mg Protein/ml konzentriert und nach Dialyse gegen phosphatgepufferte physiol. Kochsalzlösung (pH 7,3) bei —20° C eingefroren. Es war in diesem Zustand mindestens ein Jahr lang ohne Aktivitätsverlust haltbar.

Die weitere Reinigung erfolgte nach Sammeln mehrerer Präparate mit etwa 100—200 mg Protein, entsprechend etwa 250 000—500 000 Interferon-Einheiten. Nach Verdünnen der Sammelpräparate auf 3 mg Protein/ml und Dialyse gegen 0,1*m*-K-Phosphat-Puffer, pH 5,5, wurde die Chromatographie an CM-Sephadex C-25 an einer kleinen Säule (1 × 10 cm) wiederholt. Das Auftragen bei pH 5,5 und das Waschen bei pH 6,0 erfolgte in genau gleicher Weise wie oben beschrieben (10 ml/Stde.). Die Elution des Interferons erfolgte dagegen nicht bei pH 8,0, sondern mit Hilfe von 0,1*m*-K-Phosphat, pH 7,0. Das gesammelte Eluat wurde gegen 0,9proz. NaCl-Lösung dialysiert, die Proteine mit Zinkacetat (Endkonzentration 0,02*m*) bei pH 7,2 gefällt und der Niederschlag in möglichst wenig 1*m*-Glykokoll—HCl-Puffer pH 2,5 gelöst (1—2 ml). Die Lösung wurde sodann gegen 0,9proz. NaCl-Lösung und schließlich gegen 0,25*m*-Borat-puffer, pH 8,1 (s. unten), dialysiert.

Der letzte Reinigungsschritt bestand aus einer Gelfiltration an Biogel P-200 (100/200 mesh; Fa. Biorad, Richmond, Californien). Das gequollene Säulenmaterial wurde mit Borat-Puffer pH 8,1 (0,25*m*-Borsäure; 0,038*m*-NaOH) solange gewaschen, bis der Überstand bei 210 μ keine meßbare Extinktion mehr zeigte und sodann in eine Chromatographiesäule von 2 × 150 cm eingebracht. Die Chromatographie des Interferons (10—30 mg) erfolgte in demselben Puffer mit einer Elutionsgeschwindigkeit von

2 bis 5 ml/Stde. Die Extinktion des Eluates wurde sowohl bei 280 als auch bei 210 μ gemessen. Die Konzentrierung der biologisch aktiven Fraktionen wurde nach Dialyse gegen 0,9proz. NaCl-Lösung mit Hilfe von Zinkacetat in der bereits beschriebenen Weise durchgeführt. Zur Charakterisierung durch Disc-Elektrophorese wurde das Konzentrat zuerst gegen 0,9proz. NaCl-Lösung und sodann gegen 0,01 *m*-K-Phosphat, pH 7,0, dialysiert.

Darstellung und Reinigung von „Mock“-Interferon

Die Herstellung von „Mock“-Interferon erfolgte aus der Allantois-Flüssigkeit von 14 Tage lang bebrüteten Hühnereiern, welche jedoch nicht mit Viren infiziert worden waren. Die Rohlösungen wurden in genau gleicher Weise wie die antiviral aktiven Präparate vorgereinigt sowie anschließend zweimal an CM-Sephadex C-25 und an Biogel P-200 chromatographiert. Auch die Sammlung und Konzentrierung der Eluate erfolgte in genau gleicher Weise.

Reinigung von Interferon nach dem Verfahren von Fantès^{7, 11, 12, 21}

Die Allantois-Flüssigkeit der virusinfizierten Eier wurde auf pH 2,0 eingestellt, nach 16 Stdn. (4° C) klarzentrifugiert und auf pH 5,0 gebracht. Die weiteren Schritte waren: Adsorption des Interferons an Alusil (4 mg/ml; Fa. J. Crosfield and Sons, Warrington, England); Elution des Interferons mit Hilfe von 0,5 *m*-KCNS bei pH 7,5; Säurebehandlung bei pH 3,5 und 2,0; Fällung von Verunreinigungen bei pH 2,0 mit 5 Vol. Methanol bei 0° C und Fällung des Interferons durch Einstellen der methanol. Lösung auf pH 7,5. Der Protein-Niederschlag wurde mit 0,01 *m*-K-Phosphat-Puffer, pH 7,5, extrahiert (1/100 des Volumens der Rohlösung) und die klarzentrifugierte Lösung gesammelt.

Die weitere Reinigung erfolgte an DEAE-Zellulose (Fa. Serva, Heidelberg; 0,9 mÄquiv./g), wobei bis zu 150 ml Lösung (entsprechend etwa 100 mg Protein) in 0,01 *m*-K-Phosphat, pH 7,5, über eine Säule der Dimension 1 × 25 cm filtriert wurden. Das Eluat wurde mit 1 *m*-Phosphorsäure auf pH 5,5 eingestellt und das Interferon an einer Säule von CM-Sephadex C-25 (1 × 10 cm), welche mit 0,1 *m*-K-Phosphat, pH 5,5, äquilibriert war, adsorbiert. In bereits beschriebener Weise wurde diese mit 0,1 *m*-K-Phosphat, pH 6,0, gewaschen und das Interferon mit 0,1 *m*-K-Phosphat, pH 7,0, eluiert. Die antiviral aktiven Fraktionen wurden im Dialysierschlauch vor einem elektrischen Föhn auf wenige ml konzentriert, gegen 0,01 *m*-K-Phosphat, pH 7,0, dialysiert und bei 4° C aufbewahrt.

Resultate und Diskussion

Die Interferon-Reinigungsmethode

Die Vorreinigung vor den chromatographischen Schritten erfolgte im wesentlichen nach der Methode von *Lampson* und Mitarbeitern⁹. Die erste Fällung des Interferons mit Zinkacetat bei pH 6,0 wurde jedoch weggelassen, da sie unserer Erfahrung nach Verluste bis zu etwa 50%

²¹ *K. H. Fantès, C. O'Neill und P. J. Manson, Biochem. J. 91, 20 P (1964).*

ergab. So bestand die Vorreinigungs-Prozedur nur aus der Fällung von Verunreinigungen mit $0,15n\text{-HClO}_4$ und einer Fällung des Interferons mit Zinkacetat bei pH 7,2, welche vor allem eine Konzentrierung bewirkte.

Der von *Merigan* und Mitarbeitern¹⁰ vorgeschlagene Kationenaustauscher CM-Sephadex C-25 wurde zur weiteren Reinigung benützt, da er bessere Ausbeuten als die von *Lampson* und Mitarbeitern verwendete CM-Cellulose ergab. Doch wurde die von *Merigan* beschriebene Gradienten-Elution nicht beibehalten. Die Gradienten-Elution bot nur dann den Vorteil einer besseren Reinigung, wenn der Verlust eines großen Teiles der antiviralen Aktivität in Kauf genommen werden konnte. Zur Elution des gesamten Interferons war ein großes Volumen an Lösungsmittel erforderlich und die hierbei insgesamt erreichte Reinigung wesentlich schlechter als diejenige der besten Fraktionen. Da wir auf hohe Ausbeute Wert legten, zogen wir ein zweistufiges Verfahren vor, bei dem erst in der zweiten Stufe eine schärfere Fraktionierung an einer kleineren Säule erfolgte. Bei der ersten Chromatographie an CM-Sephadex C-25 erwies es sich als notwendig, die Elution des Interferons bei pH 6—8 vorzunehmen. Bei der Wiederholung der Chromatographie an der kleineren Säule war dagegen die Elution des Interferons bei pH 6—7 praktisch vollständig. Nur mehr wenige Prozente der antiviralen Aktivität waren bei pH 7—8 zusätzlich eluierbar. Durch die Verwendung einer kleineren Säule wurde außerdem eine konzentrierte Interferon-Lösung erhalten.

Die nach dieser Stufe insgesamt erzielte Erhöhung der spezifischen Aktivität war in der Regel 600 bis 1000fach, bei einer Ausbeute von 20 bis 30%. Nach *Lampson* und Mitarbeitern⁹ betrug der Reinigungsfaktor nach zweimaliger Chromatographie an CM-Cellulose 1750 (Ausb. 8%). *Merigan* und Mitarbeiter¹⁰ gaben für die besten durch Gradienten-Elution an CM-Sephadex gewonnenen Fraktionen eine etwa 6500fache Reinigung, jedoch keine Ausbeute, für die gesamte eluierbare Aktivität eine Ausbeute von 35%, aber keinen Reinigungsfaktor an. Es ist offensichtlich, daß bei der von uns verwendeten Methode eine verhältnismäßig hohe Ausbeute an Interferon mit einer Verminderung des Reinigungsfaktors erkauft worden ist.

Aus diesem Grunde waren wir bemüht, einen möglichst verlustfreien und trotzdem wirkungsvollen weiteren Reinigungsschritt aufzufinden. Es zeigte sich, daß Gelfiltration an Biogel P-200 in Boratpuffer diese Anforderung erfüllte. Wie Abb. 1 erkennen läßt, wurde Interferon als scharfer Gipfel von einer solchen Säule eluiert. Die Reinigung war 8 bis 10fach, die Ausbeute quantitativ. Durch die Eliminierung der Eluatfraktionen mit nur geringer Aktivität und durch die Konzentrierung der Lösungen mit Hilfe von Zinkacetat ergaben sich jedoch Verluste (Tab. 1). Ein besseres Verfahren zur Konzentrierung konnte jedoch nicht gefunden

werden. Wie aus Abb. 1 ersichtlich ist, ließ sich die Interferon-Aktivität keinem der Proteingipfel zuordnen.

Die antivirale Aktivität der Rohlösungen betrug gewöhnlich 25 bis 200 Einheiten/ml bei einem mittleren Proteingehalt von etwa 1,9 mg/ml. Die Berechnung der spezifischen Aktivität ergab in den meisten Fällen 15–100 Einheiten/mg Protein. Die gereinigten Präparate zeigten nach

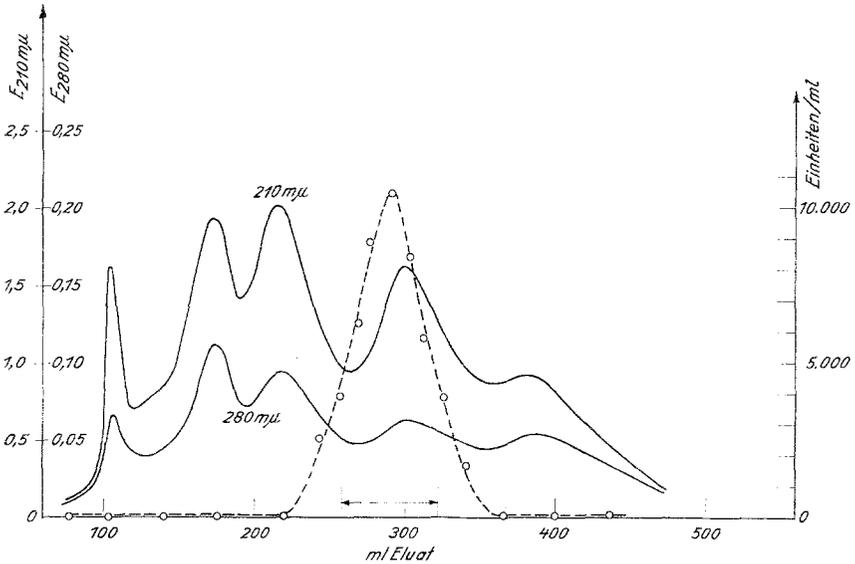


Abb. 1. Gelfiltration von zweimal an CM-Sephadex vorgereinigtem Interferon (500 000 Einheiten, 25 mg Protein) an Biogel P-200 (Säulendimension 2 x 144 cm). Volle Kurven: Extinktion bei 280 und 210 m μ (1 cm-Küvetten). Gestrichelte Kurve: Antivirale Aktivität in Einheiten/ml. Der Pfeil bezeichnet die für die Interferon-Gewinnung verwendeten Anteile des Eluates

Gelfiltration an Biogel P-200 und Konzentrierung eine spezifische Aktivität von 125 000–200 000 Einheiten/mg Protein, was einem mittleren Reinigungsfaktor von etwa 6000 entsprach. Die Ausbeuten betragen in der Regel 15–20%.

Tab. 1 gibt eine Übersicht über die Wirkung der chromatographischen Reinigungsschritte. Bei dem angeführten Versuch wurden 12 Rohlösungen mit einer spezifischen Aktivität von im Mittel 25 Einheiten/mg in der beschriebenen Weise aufgearbeitet und nach der ersten Chromatographie an CM-Sephadex vereinigt. Das Sammelpräparat besaß nur noch 30% der antiviralen Aktivität der Rohlösungen. Demgegenüber waren die Verluste bei den weiteren Reinigungsschritten relativ gering. Diese Ver-

luste entstanden zum großen Teil bei der Konzentrierung nach der zweiten Chromatographie an CM-Sephadex und nach der Gelfiltration an Biogel P-200 (s. Abb. 1).

Ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten unserer Präparate mit denen von *Merigan* und Mitarb.¹⁰ und *Lampson* und Mitarb.⁹ läßt sich wegen der Verschiedenheit der verwendeten Testmethoden nur schwer anstellen. Es hat jedoch den Anschein, daß die erreichten spezifischen Aktivitäten nur wenig von einander abweichen. Bei spezifischen Aktivitäten der Rohlösungen von 13 bis 45 Einheiten/mg Protein (*Merigan*), 52 Einheiten/mg (*Lampson*) und 15—100 Einheiten/mg (diese Arbeit) wurden folgende Werte erreicht: 106 000 Einheiten/mg von *Merigan* und

Tab. 1. Reinigung von Hühner-Interferon

	Spezif. Aktivität, Einheiten/mg Protein	Reinigungs- faktor	Ausb., %
1. Rohlösung (Mittel der Präparate)	25	1	100
2. Nach Vorreinigung und 1. Chromatographie an CM-Sephadex C-25 (konzentriertes Sammel- präparat)	2 500	100	30
3. Nach 2. Chromatographie an CM-Sephadex C-25	16 500	660	24
4. Nach Gelfiltration an Biogel P-200	145 000	5800	15
Beste Fraktion	200 000	8000	—

Mitarb. (keine Ausbeute angegeben), 236 000 Einheiten/mg von *Lampson* und Mitarb. (keine Ausbeute angegeben, aber sicher nur in der Größenordnung von etwa 1%) und 125 000—200 000 Einheiten/mg bei 15—20% Ausbeute in dieser Arbeit. Wir sind daher der Meinung, daß unsere Methode eine etwa ebenso gute Reinigung wie die anderen beiden Verfahren ergab, daß aber die Ausbeuten bedeutend verbessert werden konnten.

Versuche zur weiteren präparativen Reinigung der etwa 6000fach angereicherten Sammelpräparate wurden angestellt; so z. B. Gelfiltration bei saurem pH, Säulenelektrophorese an verschiedenen Trägermaterialien oder präparative Disc-Elektrophorese. Bei diesen Reinigungsversuchen wurde zwar eine Aufspaltung der Präparate in mehrere Protein-Komponenten erreicht, es war jedoch nicht möglich, die spezifische Aktivität wesentlich weiter zu erhöhen. Dies war durch die stets hohen Verluste an Interferon bei allen weiteren Reinigungsoperationen bedingt.

Disc-Elektrophorese der hochgereinigten Präparate in Polyacrylamid bei pH 4,5 und 8,5 (Abb. 2) zeigte eine Haupt-Proteinkomponente und

einige schwächere Proteinbanden. Bei pH 8,5 wanderte die antivirale Komponente als eine ziemlich breite Zone, die sich keiner der Proteinbanden eindeutig zuordnen ließ. Bei pH 4,5 war die biologische Aktivität weniger ausgebreitet und an derselben Stelle wie eine der Nebenkomponten. Die Ausbeute an Interferon bei pH 4,5 war schlecht (3—5%), solange Ammoniumpersulfat zur Polymerisation des Acrylamides verwendet wurde. Dieses wurde daher durch Riboflavin ersetzt. Die Ver-

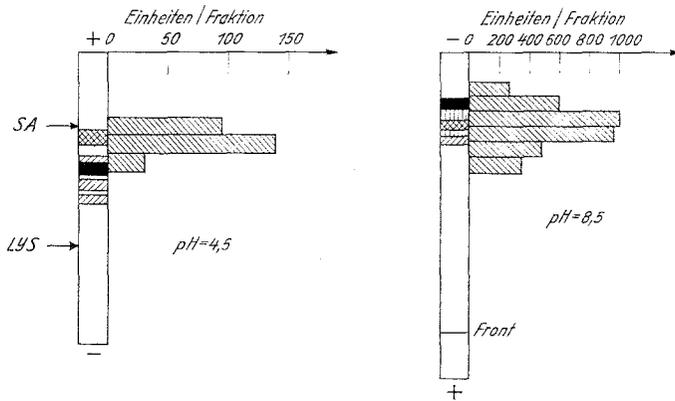


Abb. 2. Disc-Elektrophorese von an Biogel P-200 gereinigtem Interferon bei pH 4,5 und 8,5 (je 13 000 Einheiten, 87 μ g Protein). Polyacrylamid-Gele (Durchmesser 5 mm, Auftragstelle oben) nach Anfärbung mit Amidoschwarz 10 B (vertikal); im rechten Winkel hierzu die nach Zerschneiden und Elution der Fraktionen bestimmte antivirale Aktivität in Einheiten/Fraktion. Bei pH 4,5 wurde die Lage der Banden von Rinder-Serumalbumin (Sa) und Hühnerei-Lysozym (Lys) vergleichsweise durch Pfeile angedeutet. Bei pH 8,5 wurde die Pufferfront bezeichnet

wendung des Proteinfarbstoffes Coomassie Brilliant Blue an Stelle von Amidoschwarz ergab dieselben Proteinmuster, wobei die starken Banden etwas weniger scharf begrenzt und die schwächeren Banden stärker betont waren. Ein Zusatz des Farbstoffes Lipid Crimson (E. Gurr, London) vor der Disc-Elektrophorese bei pH 8,5 nach der Methode von Raymond und Mitarb.²² ergab keine Lipoproteidbanden.

Aus diesen Befunden ergab sich eindeutig, daß die 6000fach angereicherten Interferon-Präparate noch keineswegs homogen waren und daß die Hauptkomponente nicht dem Interferon entsprach. Dies stimmt mit Resultaten von Merigan und Mitarb.¹⁰ überein, nach denen 6500fach angereicherte Interferon-Präparate ebenfalls uneinheitlich waren.

²² S. Raymond, J. L. Miles und J. C. J. Lee, Science **151**, 346 (1966).

Die Reinigung von „Mock“-Interferon

Die aus nichtinfizierten Eiern erhaltenen Rohlösungen waren in der Mehrzahl inaktiv, doch konnte gelegentlich eine sehr geringe Aktivität (weniger als 2 Einheiten/ml) beobachtet werden. Bei der Reinigungsprozedur verhielten sich die „Mock“-Interferone ebenso wie die entsprechenden Interferon-Präparate. Auch die Protein-Elutionsprofile bei den drei chromatographischen Schritten waren nicht von denen aktiver Präparate zu unterscheiden. Durch Sammlung und Konzentrierung jener Fraktionen, die bei der Reinigung von Interferon-Präparaten die antivirale Aktivität enthielten, wurden gereinigte „Mock“-Interferone gewonnen, deren spezifische Aktivität höchstens 0,1% der spezifischen Aktivität entsprechender Interferon-Präparate erreichte.

Tabelle 2. Reinigung von Interferon nach *Fantes*
In Klammern: Angaben von *Fantes*⁷

	Einheiten/mg	Protein	Reinigungsfaktor		Ausb., %
Rohlösung	85	(82)	1	(1)	100 (100)
Überstand pH 3,5	1 120	(1 310)	13	(16)	35 (72)
Extrakt pH 7,5 vor Chromatographie an DEAE-Cellulose	2 850	(6 900)	34	(84)	25 (53)
Nach Chromatographie an DEAE-Cellulose	10 000	(69 000)	118	(840)	20 (35)
Nach Chromatographie an CM-Sephadex	91 000	(623 000)	1070	(7600)	16 (19)

Disc-Elektrophorese von „Mock“-Interferonen, welche 6000fach angereicherten Interferon-Präparaten entsprachen, zeigte hinsichtlich der Protein-Zusammensetzung sowohl bei pH 4,5 als auch bei pH 8,5 keine Unterschiede zu den Interferon-Präparaten. Es waren stets dieselben Proteinbanden nachweisbar, wenn auch manchmal Differenzen hinsichtlich des Mengenverhältnisses der einzelnen Komponenten zu beobachten waren.

Aus diesen Befunden geht klar hervor, daß die Interferon-Komponente trotz 6000facher Anreicherung noch soweit verunreinigt war, daß sie bei der Disc-Elektrophorese weder bei pH 4,5 noch bei pH 8,5 als eigene Proteinbande sichtbar gemacht werden konnte. Unter der wohlbegründeten Voraussetzung, daß dem virusinduzierten Hühnerinterferon Eiweißnatur zukommt, muß die spezifische Aktivität reinen Interferons weit über 200 000 Einheiten/mg Protein liegen. Bei einer vorsichtigen Schätzung kann man den Interferon-Gehalt der 6000fach angereicherten Prä-

parate auf höchstens 10% veranschlagen. Dies würde auf eine spezifische Aktivität des reinen Interferons von mindestens 2×10^6 Einheiten/mg Protein hinweisen.

Die Reinigung nach dem Verfahren von Fantès

Bei der Interferon-Reinigung nach *Fantès*^{7, 12} erhielten wir Präparate mit spezifischen Aktivitäten von maximal 100 000 Einheiten/mg Protein.

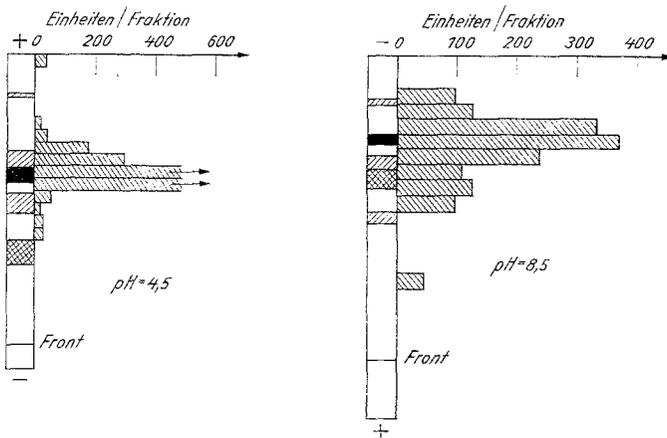


Abb. 3. Disc-Elektrophorese von nach der Methode von *Fantès* gereinigtem Interferon bei pH 4,5 und 8,5 (je 6000 Einheiten, 200 μ g Protein).

Art der Darstellung wie bei Abb. 2. Die Pufferfront wurde in beiden Fällen bezeichnet. Die Pfeile deuten an, daß die biologische Aktivität über 500 Einheiten/Fraktion betrug

In Tab. 2 ist das Ergebnis eines solchen Versuches mit den publizierten Werten verglichen. Auch durch mehrmaliges Nacharbeiten wurden die in der Originalvorschrift angegebenen Reinigungsfaktoren nicht erreicht. Es ergaben sich wiederholt Verluste von mehr als 90% schon vor der Chromatographie an DEAE-Cellulose. Die Ursachen dieser oftmals sehr hohen Verluste konnten bisher nicht festgestellt werden.

Disc-Elektrophoresen der gereinigten und konzentrierten Präparate bei pH 4,5 und pH 8,5 ergaben mehrere Proteinbanden (Abb. 3). Bei pH 8,5 waren neben einer starken Hauptkomponente auch einige schwächere Banden erkennbar. Die antivirale Aktivität erstreckte sich über eine breite Zone, doch fiel das Maximum der Aktivität mit der starken Proteinbande zusammen. Bei pH 4,5 zeigten sich im wesentlichen zwei starke Eiweiß-Komponenten, von denen die eine von der biologischen Aktivität begleitet war. Als diese Komponenten voneinander durch Gelfiltration an Biogel P-200 getrennt wurden, erwiesen sie sich beide als biologisch in-

aktiv. Somit ließ sich auch in diesem Falle die Interferon-Aktivität keiner der anfärbbaren Proteinbanden zuordnen. *Fantes*^{12, 13} konnte die Interferon-Aktivität in den von ihm selbst gereinigten Präparaten ebenso wenig einer Proteinbande zuschreiben.

Es sei zum Schluß festgestellt, daß die Reinigung von virusinduziertem Hühnerinterferon heute ein noch ungelöstes Problem darstellt. Dies ist freilich verständlich, wenn man bedenkt, daß die aus einem Hühnerei maximal gewinnbare Interferonmenge von etwa 2000 Einheiten bei einer geschätzten Aktivität des reinen Interferons von 10^7 Einheiten/mg nur 0,2 μg Protein entspricht, wogegen die inaktiven Begleitproteine der Allantois-Flüssigkeit etwa 20 mg ausmachen. Zur Reindarstellung wäre daher eine rund 100 000fache Anreicherung erforderlich. Es wird noch vieler Anstrengungen bedürfen, um dieses Ziel zu erreichen.

Herrn Prof. *H. Tuppy*, Institut für Biochemie der Universität Wien, sei an dieser Stelle für wertvolle Diskussionen gedankt. Fr. *U. Neumayer*, Fr. *L. Dantine*, Fr. *E. Löwy* und Herrn *W. Scheirer* danke ich für ausgezeichnete technische Mitarbeit.