

Laboratorio Biochimico dell'Ormoterapia Richter S. p. A.
Milano (Italia)

Purificazione della gonadotropina corionica mediante adsorbimento su caolino ed eluizione con soluzione alcoolica di ammonio acetato *

N. Toccaceli e L. Siena**

I metodi più comunemente usati per l'estrazione delle Gonadotropine urinarie in genere e della Gonadotropina Corionica (G.C.) in particolare sono basati su procedimenti di adsorbimento mediante vari adsorbenti, quali l'acido benzoico (KATZMAN e DOISY 1, 2), la Permutite (KATZMAN e coll., 3) e il Caolino (SCOTT, 4; LANDGREBE e SAMSON, 5; DEKANSKI, 6; BRADBURY e coll., 7; INGRAM e coll., 8; LORAIN e BROWN, 9, 10; ALBERT, 11).

Il metodo di adsorbimento su acido benzoico (1,2) ha il pregio di essere molto semplice e spedito, e sebbene conduca a prodotti di G.C. a bassa attività, può tuttavia essere ancora convenientemente usato a scopo preparativo. Il metodo di KATZMAN e coll. (3) porta invece a prodotti molto più puri del precedente; esso prevede l'uso della Permutite come adsorbente e di un eluente molto selettivo per la G.C.: una soluzione di ammonio acetato al 10 % in alcool etilico al 38 %. JOHNSON (12) tentò di sfruttare il metodo di KATZMAN e coll. (3) per estrarre le Gonadotropine da urina non gravidica, ma non ottenne buoni risultati, per cui abbandonò la Permutite e ricorse ad un altro adsorbente, la Cabunite.

* Comunicación 4-10 a las V Jornadas Bioquímicas Latinas, Barcelona, mayo 1959.

** Le presenti ricerche sono state eseguite in collaborazione con l'Istituto di Chimica Biologica dell'Università di Pavia (Italia).

ALBERT (11) fece uno studio sistematico delle varie tecniche di estrazione delle Gonadotropine urinarie, giungendo alla conclusione che l'uso della Permutite porta a recuperi di attività gonadotropa insoddisfacenti dal punto di vista analitico.

Il procedimento di adsorbimento con Caolino è forse quello più seguito per l'estrazione delle Gonadotropine urinarie e vari AA. (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) che lo hanno sperimentato, sostengono che il recupero dell'attività gonadotropa dall'urina è quantitativo.

Noi abbiamo ripreso in esame queste varie tecniche tentando di applicarle anche alla preparazione della G.C. su scala industriale. I risultati ottenuti hanno condotto a queste conclusioni:

a) Il metodo di adsorbimento su acido benzoico (1,2) è molto semplice, e porta ad un buon recupero dell'attività gonadotropa presente nell'urina (circa il 90 %).

b) Il metodo di KATZMAN e coll. (3) conduce a risultati soddisfacenti quando si usi urina raccolta durante i primi 3 mesi di gravidanza, periodo in cui la G.C. è presente nell'urina in quantità più elevata (15.000-40.000 U.I./l); in tal caso si ottiene, con recuperi soddisfacenti, un prodotto avente un titolo di 1.500.000 - 2.000.000 U.I./g. Applicando lo stesso metodo all'urina di donna gravida raccolta durante l'intero periodo di gravidanza (attività: 4.000 - 8.000 U.I./l), abbiamo notato perdite rilevanti di attività e il titolo del prodotto ottenuto è risultato più basso (800.000 - 1.000.000 U.I./g).

c) Il metodo di adsorbimento su Caolino porta a recuperi quantitativi della G.C. urinaria, ma il titolo del prodotto è molto basso, e grandi difficoltà tecniche insorgono quando si tenta di applicare tale metodo su scala industriale.

In base a questi risultati ci siamo proposti di elaborare un nuovo procedimento che consentisse di sfruttare l'alto potere adsorbente del Caolino e la selettività dell'eluente di KATZMAN e coll. (3) per la purificazione di prodotti di G.C. a basso titolo, preparati con una tecnica messa a punto da noi e descritta in altra sede (13).

Procedimento

A) ADSORBIMENTO

Il materiale di partenza a basso titolo (150.000 — 250.000 U.I./g) viene sciolto in acqua fredda (0 — 4° C) alla concentrazione di 5 mg/ml. La soluzione viene acidificata a pH 4,5 con acido acetico, eliminando per centrifugazione l'eventuale precipitato inattivo che si forma. Alla soluzione limpida si ag-

giunge il Caolino (*Bolus Alba*), previamente riscaldato in stufa a 120° C per 6 ore, nella proporzione di 10 g. di Caolino per 1 g. di prodotto di partenza. Si agita per 30 minuti a freddo e si centrifuga per 20-30 minuti a 3.000 giri/minuto. Il supernatante viene ripreso e sottoposto ad un secondo trattamento analogo. L'ultimo supernatante, ormai privo di attività gonadotropa, viene scartato, mentre i due residui costituiti dal Caolino che ha adsorbito la G.C., vengono riuniti e sottoposti al lavaggio.

B) LAVAGGIO

I due residui di Caolino riuniti vengono lavati due volte con 60 ml di acqua distillata fredda acidificata a pH 4,5 con acido acetico, centrifugando ogni volta per 30 minuti a 3.000 giri/minuto. Successivamente si esegue un lavaggio con alcool etilico al 38 % e si centrifuga come sopra.

Le acque di lavaggio sono prive di attività gonadotropa.

C) ELUIZIONE

L'eluizione viene eseguita sotto agitazione per 30 minuti con soluzione di ammonio acetato al 10 % in alcool etilico al 38 % in due tempi, usando la prima volta 200 ml e la seconda volta 100 ml di eluente. I due eluati vengono recuperati per centrifugazione a 3.000 giri/minuto per 30 minuti e quindi riuniti.

D) PRECIPITAZIONE

Agli eluati riuniti vengono aggiunti 4,7 volumi di alcool etilico al 95 %. Il precipitato attivo che si forma, viene lasciato in riposo per una notte a freddo e raccolto per centrifugazione; lo si lava con alcool etilico al 95 % (20 ml), indi con etere etilico anidro (20 ml) e infine si essicca nel vuoto.

Controllo biologico

Per il controllo biologico dei vari prodotti ottenuti si sono usati ratti impuberi di razza Sprague-Dawley, seguendo in alternativa due diversi metodi che si basano:

- a) sull'aumento del peso della prostata (test di LORAINÉ, 14);
- b) sulla comparsa di cellule cheratinizzate negli strisci vaginali (test di ALLEN e DOISY, 15; modificato secondo HAMBURGER, 16).

I prodotti in esame sono stati controllati contro Standard Internazionale di G.C.

a) METODO DELLA PROSTATA

Sono stati usati ratti maschi impuberi, a gruppi di 10-15 animali, dell'età di 22 giorni e del peso di 35-40 g.

A tre gruppi veniva somministrato sottocute lo Standard Internazionale di G.C. ai livelli di 8 — 4 — 2 U.I., per tre giorni consecutivi.

Ad altri tre gruppi veniva iniettato il prodotto in esame in quantità corrispondenti presumibilmente a 8 — 4 — 2 U.I.

Al quarto giorno si sacrificavano gli animali, si prelevava la prostata insieme alle strutture adiacenti e la si fissava in soluzione di Bouin per 24 ore. Nel giorno successivo gli organi, liberati dal grasso e dalle strutture adiacenti, venivano asciugati tra due fogli di carta da filtro e pesati su una bilancia a torsione.

b) METODO DEGLI STRISCI VAGINALI

Sono state usate ratte impuberi, a gruppi di 10-15 animali, dell'età di 22 giorni e del peso di 35-40 g.

A tre gruppi veniva iniettato sottocute lo Standard Internazionale di G.C. ai livelli di 0,9 — 0,6 — 0,4 U.I. per 2 giorni (tre iniezioni al primo giorno e due al secondo).

Analogamente ad altri tre gruppi veniva iniettato il prodotto in esame in quantità tale da corrispondere presumibilmente a 0,9 — 0,6 — 0,4 U.I.

Due strisci vaginali venivano prelevati al quarto giorno e uno al quinto.

Il reperto microscopico era considerato positivo quando lo striscio vaginale mostrava soltanto cellule cheratinizzate.

Risultati

I risultati ottenuti col nostro procedimento, applicato a piccoli quantitativi (1 — 6 g.) di materiale a basso titolo (150.000 — 250.000 U.I./g.) sono riportati nella tabella n. 1.

Tali dati dimostrano che il procedimento consente il recupero dell'83 % circa (valore medio) dell'attività ormonica. Il recupero minimo registrato fu del 72 %.

Dopo questo risultato incoraggiante, abbiamo applicato il procedimento alla purificazione di quantitativi molto maggiori di G.C. a basso titolo (13), ottenuti partendo da 2.000 — 3.000

TABELLA 1

Quantità e titolo della G.C. ottenuta col nostro procedimento applicato a piccoli quantitativi di G.C. a basso titolo

Prove n.°	Prodotto di Partenza			Prodotto Ottenuto			Recupero Attività %
	g usati	Attività U.I./g	Metodi di titolaz.	g	Attività U.I./g	Metodi di titolaz.	
1	1,42	200.000	S e P	0,202	1.000.000	P	72
2	5,87	150.000	S e P	0,525	1.200.000	P	72
3	5,87	150.000	S	0,585	1.500.000	P	98
					1.300.000	S	85
4	1,57	200.000	S e P	0,206	1.200.000	P	79
5	1,37	250.000	S e P	0,192	1.500.000	P	85
6	1,37	250.000	S e P	0,205	1.250.000	S	75
7	2,95	200.000	S	0,402	1.200.000	S	82
					1.500.000	P	102

S = Titolo determinato con il metodo degli strisci vaginali.

P = Titolo determinato con il metodo della prostata.

l di urina mista, raccolta dal secondo mese a termine di gravidanza. I risultati ottenuti, riportati nella tabella n. 2, mostrano che anche nelle prove su scala industriale il recupero medio dell'attività si aggira sull'80 % e il titolo medio dei prodotti finali oscilla intorno a 1.200.000 U.I./g., con valori estremi da 1.000.000 a 1.400.000 U.I./g.

TABELLA 2

Risultati ottenuti nella purificazione di cospicui quantitativi (28,8 - 67 g) di G.C. a basso titolo

Prova n.°	Prodotto di Partenza			Prodotto Ottenuto			Recupero Attività %
	g usati	Titolo U.I./g	Metodi di titolaz.	g	Titolo U.I./g	Metodi di titolaz.	
1	67,0	180.000	S e P	6,1	1.400.000	S	72
2	64,0	160.000	S	7,5	1.100.000	S	81
3	50,0	140.000	S	6,6	1.000.000	S	94
4	28,8	240.000	S e P	4,8	1.000.000	S	77
5	35,0	200.000	P	4,3	1.000.000	P	77

S = Titolo determinato con il metodo degli strisci vaginali.

P = Titolo determinato con il metodo della prostata.

Conclusioni

Dalla disamina di quanto sopra esposto noi pensiamo di poter dedurre che:

a) Prodotti di G.C. a basso titolo vengono adsorbiti quantitativamente dal Caolino, quando siano sciolti in acqua alla concentrazione di 5 mg/ml e a pH 4,5;

b) L'eluizione con acetato di ammonio al 10 % in alcool etilico al 38 % porta ad un recupero soddisfacente (80-85 %) dell'attività ormonica e consente di innalzare da 5 a 10 volte il titolo del prodotto iniziale;

c) Il procedimento di purificazione da noi elaborato e descritto sopra, non solo è utilizzabile per la lavorazione di piccoli quantitativi di prodotto a basso titolo, ma è applicabile anche alla lavorazione di cospicue quantità, raggiungendo in ambedue i casi risultati egualmente buoni.

Implicitamente è stata provata l'utilità d'impiegare il Caolino per la purificazione della G.C. a basso titolo, anche a scopo industriale, oltre che a scopo analitico come avevano proposto vari AA. già citati.

Nello stesso tempo è stata documentata la elevata selettività dell'acetato di ammonio al 10 % in alcool etilico al 38 % come eluente della G.C. adsorbita su Caolino.

Il nostro procedimento è risultato semplice, rapido ed economico anche quando sono state usate forti quantità di prodotto iniziale.

Non è escluso che, usando prodotti di partenza a titolo più elevato, si possa raggiungere un grado molto più alto di purificazione dell'ormone eluito, ottenendo sempre recuperi soddisfacenti di attività.

* * *

Si ringrazia il Sig. R. RESTELLI per la collaborazione nella messa a punto delle tecniche.

Riassunto

Sfruttando l'alto potere adsorbente del Caolino e l'alta selettività eluente della soluzione alcoolica di ammonio acetato (alcool al 38 % contenente il 10 % di ammonio acetato) è stato elaborato un procedimento di purificazione della Gonadotropina Corionica da preparati a basso titolo (150.000 - 250.000 U.I./g).

Il procedimento consente di elevare il titolo di 5-10 volte (punte massime raggiunte 1.500.000 U.I./g) con una resa dell'80-85 % circa. Il

procedimento è applicabile, senza grande difficoltà, alla lavorazione su scala industriale raggiungendo la stessa resa e lo stesso titolo trovati nelle prove di laboratorio.

Summary

Corionic gonadotropine purification by caolin adsorption and posterior elution with alcoholic solution of ammonium acetate.

A purification method of corionic gonadotropine from low title preparations (150 000 - 300 000 UI/g) has been established, based on the high adsorbing power of caolin and the high eluent capacity of the ammonium acetate in alcoholic solution (10 % ammonium acetate in 38 % alcohol).

The procedure allows purifications from 5 up to 10 times (maximum activity of 1.500.000 UI/g) with a yield of 80 % in respect to the initial activity.

The method is also useful, without great difficulties, in an industrial level, obtaining the same yield and enrichment as in the laboratory.

Bibliografia

- (1) KATZMAN, P. A., e DOISY, E. A. : *J. Biol. Chem.*, **98**, 739, 1932.
- (2) KATZMAN, P. A., e DOISY, E. A. : *J. Biol. Chem.*, **106**, 125, 1934.
- (3) KATZMAN, P. A., GODFRID, M., CAIN C. K., e DOISY, E. A. : *J. Biol. Chem.*, **148**, 501, 1943.
- (4) SCOTT, L. D. : *Brit. J. Exptl. Path.*, **21**, 320, 1940.
- (5) LANDGREBE, F. W., e SAMSON, L. : *J. Obst. Gyn. Brit. Emp.* **51**, 133, 1944.
- (6) DEKANSKI J. : *Brit. J. Exptl. Path.*, **30**, 272, 1949.
- (7) BRADBURY, J. T., BROWN, E. S., e BROWN, W. E. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **71**, 228, 1949.
- (8) INGRAM, J. D., BUTT, W. R., e CROOKE, A. C. : *Nature*, **173**, 85, 1954.
- (9) LORAIN, J. A., e BROWN, J. B. : *Acta Endocrinol.*, **17**, 250, 1954.
- (10) LORAIN, J. A., e BROWN, J. B. : *J. Clin. End. Met.*, **16**, 1180, 1956.
- (11) ALBERT, A., in PINCUS, G. : *Rec. Progr. Horm. Res.*, **XII**, 227, 1956.
- (12) JOHNSEN, S. G. : *Acta Endocrinol.*, **20**, 101, 1955.
- (13) *In corso di stampa.*
- (14) LORAIN, J. A. : *J. Endocrinol.*, **6**, 319, 1949-1950.
- (15) ALLEN, E., e DOISY, E. A. : *J. Amer. Med. Assoc.*, **81**, 819, 1923.
- (16) HAMBURGER, C. in EMMENS, C. : *Hormone Assay*, pag. 173, Academic Press Inc., Publishers - New York, 1950.

