

(19) **KG** (11) **104** (13) **C2**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(51)⁵ **A61K 37/66**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ к патенту Кыргызской Республики

(10) 1523046

(21) 3593070/SU

(22) 16.05.1983

(31) 81505/82

(32) 17.05.1982

(33) JP

(46) 01.01.1996, Бюл. №4, 1996

(71) Торэй Индастриз Инк, JP

(72) Кацуо Хосои, Хитоси Озава, JP

(73) Торэй Индастриз Инк, JP

(56) Патент СССР 1389667, кл. A61K 45/02, C07K 15/28, 1988

(54) **Способ очистки человеческого β -интерферона**

(57) Изобретение относится к медицине и может быть использовано для очистки человеческого β -интерферона. Цель - повышение производительности процесса. Раствор сырого интерферона пропускают через обездвиженный синий агарозный гель, элюируют и элюат дополнительно пропускают через хелатметаллический носитель с остатком хелатирования, включающим, по меньшей мере, ион одного металла из группы Co^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} . pH контактирования с синим агарозным гелем 5-9. 10 табл., 8 пр.

Изобретение относится к медицине, а именно к способу очистки человеческого интерферона, особенно человеческого β -интерферона.

Цель изобретения - повышение производительности процесса.

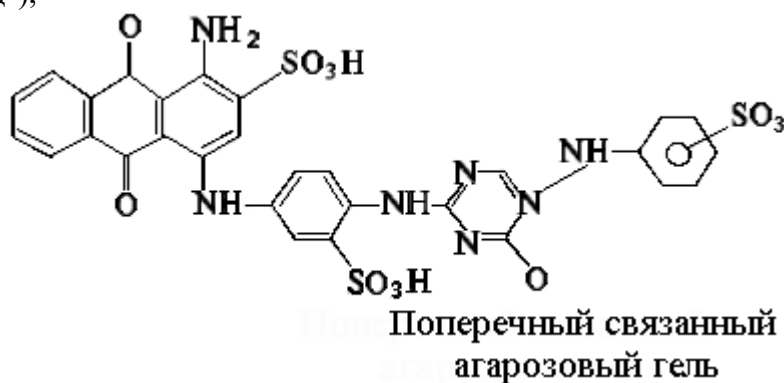
Способ осуществляют следующим образом.

Сырой интерферон, полученный в результате деятельности клеток человека, обрабатывают обездвиженным синим носителем. Интерферон, поглощенный на обездвиженном синем носителе, элюируют элюентом. Затем отбираемый раствор интерферона обрабатывают хелатметаллическим носителем с остатком хелатирования, включающим, по меньшей мере, ион одного металла, выбранный из группы, состоящей из Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} . Интерферон, поглощенный на хелатметаллическом носителе, отделяют от носителя, получая препарат интерферона большой чистоты и высокой концентрации.

Раствор сырого интерферона сначала приводят в контакт с обездвиженным синим носителем.

Синий краситель можно обездвиживать на любом из разнообразных обычно используемых носителей, способных соединяться с красителем. В число таких носителей входят (А) соединение красителя через аминогруппу антрахиноновой части с агарозой, активированной бромистым цианом; (В) соединение красителя с гелем поперечно связанной агарозы способом триазинового соединения через эфирную связь; (С) соединение синего декстрана R (декстран, соединенный с синим красителем, фирма "Фармесиэ") с агарозой, активированной бромистым цианом методом триазинового соединения; (Д) соединение синего красителя, связанного с боковой ® цепью Аффиа-геля 10® (фирмы "Био-Рад лэб", именуемой ниже "Био-Рад") через пептидную связь с полисахаридным носителем. Можно также использовать другие носители, например, поперечно связанный декстрано® вый гель, Сефадекс® (фирма "Фармесиэ"), и виниловый полимер с гидроксильными группами, который также можно использовать как носитель для хелатметаллической хроматографии в следующей стадии, предпочтителен гидрофильный гранулированный полимер, например, Тоиоперл® (фирма "Тойо сода комп.").

Предпочтительно использовать синий агарозовый гель, соответствующий (В), так как он весьма эффективно связывается с интерфероном, не вызывает отделения красителя от носителя, поскольку соединение красителя с носителем является весьма стабильным в условиях рН от 6 до 13, и он легкодоступен на рынке. Этот синий агарозовый гель имеет следующую структуру и реализуется под товарным наименованием "Блу сефароз CL-6В" (фирма "Фармесиэ"), "Матрекс гель блу А® (фирма "Амикон корп.") и "Аффи-гель блу ®" (фирма "Био-Рад"),



Для контактирования обездвиженного синего носителя с раствором сырого интерферона можно использовать либо порционный метод, либо колонный способ.

Пример 1. Раствор сырого интерферона был получен путем обработки человеческих фибробластовых клеток в среде МЕМ Игла, содержавшей 0.4 % метилцеллюлозы с поли 1; поли С, с последующей обработкой циклогексимином и актиномицином Д.

К 30 л раствора сырого интерферона с активностью интерферона 6.2×10^6 им.ед. было добавлено 21 мг белка и 100 мкг актиномицина Д на 1 л, 30 мл геля синей агарозы ("Аффи-гель блу®" фирмы "Био-Рад"). После перемешивания в течение 40 ч и выдерживания в течение 3 ч надосадочная жидкость была извлечена, и гель агарозы был перенесен в колонну с промывкой физиологическим раствором, содержащим фосфатнокислотный буфер. Надосадочная жидкость была извлечена снова. Колонну дважды промывали и элюировали. Использовали следующие промывочные растворы и элюент:

первый промывочный раствор (320 мл):

раствор 1.0 М хлористого натрия, содержащий 10 мМ фосфорнокислого натрия (рН 7.2);

второй промывочный раствор (280 мл):

25 %-ный раствор этиленгликоля, содержащий 10 мМ фосфорнокислого натрия и 1.0 М хлористого натрия (рН 7.2);

элюент (400 мл):

55 %-ный раствор этиленгликоля, содержащий 10 мМ фосфорнокислого натрия и 1.0 М хлористого натрия (рН 7.2). Получен выход частично очищенного интерферона в элюате (300 мл) 81 % от исходного раствора интерферона, очищение в 33 раза.

В колонну с хелатом цинка (10 мл) элюат (285 мл) и колонны геля синей агарозы пропустили при скорости потока 20 мл/г. После двойной промывки колонну элюировали. Использовали следующие промывочные растворы и элюент: первый промывочный раствор (300 мл):

дистиллированную воду и 0.1 М фосфорнокислого натрия (рН 6.7) использовали при скорости потока 30 мл/г в течение 1 ч поочередно;

второй промывочный раствор (50 мл): 20 мМ раствор лимонно-кислого натрия (рН 5.0);

элюент:

0.1 М буферный раствор уксусная кислота - уксусно-кислый натрий (рН 4.5).

Выход хелатцинковой хроматографии 87 %, а общий выход 70 %. Достигнута очистка в 330 раз.

Активность и выход интерферона, количество белка и удельная активность каждой стадии показаны в табл. 1.

Анализ активности интерферона посредством электрофореза полиакриламидного геля.

Часть конечного элюата подвергли диализу в присутствии додецилсульфата натрия (НДС) и лиофилировали. После восстановления лиофилированного диализата 2-меркаптоэтанолом восстановленный материал подвергли электрофорезу с использованием полиакриламидного геля в присутствии НДС согласно способу Лэмли (Нейчэр, 227, 680-685 (1970)) для проведения анализа активности интерферона и красителя с блестящей синью R 200.

В результате активность интерферона и темно-синяя полоса были обнаружены только в положении, соответствовавшем молекулярному весу примерно 23000.

Анализ актиномицина Д.

Анализ актиномицина Д был проведен способом биологической пробы.

Часть конечного элюата обессолили путем гель-хроматографии, используя Сефадекс G 25® после добавления сывороточного альбумина человека (1 мг/мл). Добавляя дополнительно небольшое количество сывороточного альбумина человека и лактозы обессоленный элюат профильтровали через фильтр 2 мкм и лиофилировали. Актиномицин Д был обнаружен в количестве не больше $0.0003 \text{ мкг}/10^6 \text{ им.ед.}$ активности интерферона.

Элюат из колонны геля синей агарозы содержал $0.7 \text{ мкг}/\text{м}$ актиномицина Д. Общее количество актиномицина Д составило 210 мкг. Кроме того, присутствие актиномицина Д в элюате из колонны геля синей агарозы было обнаружено по поглощению (430 нм) и путем биопробы.

Часть элюата из колонны геля синей агарозы обессолили способом гель-хроматографии с использованием Сефадекс G-25® после добавления человеческого сывороточного альбумина. Удаляя этиленгликоль, обессоленный элюат лиофилировали. Всего же было обнаружено около $0.7 \text{ мкг}/10^6 \text{ им.ед.}$ интерферонной активности актиномицина Д.

Пирогенное испытание на кроликах.

Полученный указанным выше способом из конечного элюата лиофилированный материал инъецировали внутривенно трем кроликам ($2 \cdot 10^5 \text{ им.ед.}/\text{кг}$ массы кролика). Суммирование пирексии для всех трех кроликов было 0.6°C . Интерферон, очищенный по предлагаемому способу, оказался отрицательным к пирогенному испытанию на кроликах.

Ллиофилированный материал, полученный из элюата колонны геля синей агарозы,

инъекцировали внутривенно трем кроликам ($2 \cdot 10^5$ им.ед./кг массы кролика). Суммирование пирексии для всех трех кроликов было 1.5°C . Интерферон, очищенный согласно способу хроматографии синей агарозы, оказался неопределенно отрицательным к пирогенному испытанию на кроликах.

Пример 2. В этом эксперименте использовали раствор сырого интерферона, подобный использовавшемуся в примере 1.

20 л раствора сырого интерферона пропустили через колонну синей агарозы объемом 20 мл (Матрекс гель блу А® фирмы "Амикон корп."). Колонну трижды промыли и элюировали. Использовали следующие промывочные растворы и элюент:

первый промывочный раствор (200 мл):

1 М хлористый натрий, содержащий 10 мМ фосфорнокислого натрия (рН 7.2);

второй промывочный раствор (200 мл):

25 %-ный раствор этиленгликоля, содержащий 10 мМ фосфорнокислого натрия и 1 М хлористого натрия (рН 7.2);

третий промывочный раствор (40 мл):

40 %-ный раствор этиленгликоля, содержащий 10 мМ фосфорнокислого натрия и 1 М хлористого натрия (рН 7.2);

элюент (200 мл):

55 %-ный раствор этиленгликоля, содержащий 10 мМ фосфорнокислого натрия и 1 М хлористого натрия.

Хелатцинковую колонну (5 мл) соединили с выходом колонны синей агарозы после начала элюирования, и элюат из колонны синей агарозы непосредственно пропускали через хелатцинковую колонну. Затем хелатцинковую колонну дважды промыли и элюировали.

Промывочные растворы и элюент были следующими: первый промывочный раствор (200 мл):

дистиллированная вода и 0.1 М фосфорнокислого натрия (рН 6.7) поочередно;

второй промывочный раствор (20 мл):

20 мМ лимонно-кислый натрий (рН 5.0);

элюент:

0.2 М буферный раствор уксусная кислота - уксусно-кислый натрий, содержащий 1 М хлористого натрия. Интерферонная активность, выход, количество белка и удельная активность каждой стадии показаны в табл. 2.

Пример 3. 20 л раствора сырого интерферона с интерферонной активностью $15 \cdot 10^6$ им.ед. и 60 мг/л общего белка контактировали с 40 мл сине-агарозного носителя (Матрекс гель Блу А® фирмы "Амикон корп."). Носитель, на который был адсорбирован интерферон, загрузили на колонну. Затем колонну дважды промыли и элюировали. Использовали следующие промывочные растворы и элюент:

первый промывочный раствор (400 мл):

раствор хлористого натрия 1 М, содержащий 10 мМ фосфорнокислого натрия (рН 7.2);

второй промывочный раствор (400 мл):

25 %-ный раствор этиленгликоля, содержащий 10 мМ фосфорнокислого натрия и 1 М хлористого натрия (рН 7.2);

элюент: (400 мл).

100 мл раствора интерферона, отобранного из колонны синей агарозы, пропустили через 5 мл хелатникелевую колонну. Использованная колонна хелата никеля была приготовлена так же, как в примере 1, за исключением того, что вместо раствора хлористого цинка использовали раствор хлористого никеля. Хелатникелевую колонну промыли и элюировали. Использовали следующие промывочный раствор и элюент:

промывочный раствор:

дистиллированная вода и 0.1 М фосфорнокислого натрия (рН 6.7),

использовали поочередно;

элюент:

0.2 М буферный раствор уксусная кислота - уксусно-кислый натрий, содержащий 1 М хлористого натрия (pH 4.5).

Интерферонная активность, выход, количество белка и удельная активность каждой стадии показаны в табл.3.

Конечный элюат содержал весьма малое количество пирогенных веществ и был отрицательным относительно испытания Лимулуса. В нем не было обнаружено актиномицина Д.

Пример 4. Была повторена процедура примера 3 за тем исключением, что хелаткобальтовую колонну использовали вместо хелатникелевой, причем хелаткобальтовую колонну приготовили как в примере 1, но вместо хлористого цинка использовали раствор хлористого кобальта.

Элюат (15 мл) содержал $4.5 \cdot 10^6$ им.ед. интерферона (выход 60 %) и 0.25 мг белка. Удельная активность составляла $1.8 \cdot 10^8$ им. ед./мг белка. Конечный элюат был отрицательным к испытанию Лимулуса. В нем не было обнаружено актиномицина Д.

Пример 5. Культивировали штамм Е.КОЛИ, в котором был интегрирован структурный ген β -интерферона, и культивированный штамм подвергли процедурам сбора бактерий, измельчения бактерий, удаления нуклеиновой кислоты и осаждения сульфатом аммония. Белковую фракцию, содержащую β -интерферон, полученный из штамма Е.коли, растворили в 25 %-ном растворе этиленгликоля, содержащем 1 М хлористого натрия и 10 мМ фосфорнокислого натрия (pH 7.2), с целью получения раствора сырого интерферона. Раствор сырого интерферона имел интерферонную активность $5 \cdot 10^6$ им. ед. и 20 мг белка на 1 мл.

40 мл раствора сырого интерферона пропустили через колонну 2 мл синей агарозы (Матрекс гель блу А® фирмы "Амикон корп."), уравновешенную буферным раствором фосфорнокислого натрия, содержащим 1 М хлористого натрия. Колонну дважды промыли с целью удаления примерно 95 % белка в растворе сырого интерферона, и элюировали с фракционированием в каждую фракцию 2 мл. Использовали следующие промывочные растворы и элюент:

первый промывочный раствор (10 мл):

25 %-ный раствор этиленгликоля, содержащий 1 М хлористого натрия и 10 мМ фосфорнокислого натрия;

второй промывочный раствор (10 мл):

40 %-ный раствор этиленгликоля, содержащий 1 М хлористого натрия и 10 мМ фосфорнокислого натрия;

элюент:

60 %-ный раствор этиленгликоля, содержащий 1 М хлористого натрия и 10 мМ фосфорнокислого натрия.

Элюат (12 мл) из колонны синей агарозы имел интерферонную активность $1.6 \cdot 10^7$ им.ед. (выход 80 %) и 4.6 мг белка. Средняя удельная активность в каждой фракции была $2.5 \cdot 10^7$ им.ед/мг белка (макс.: $5 \cdot 10$ им.ед./мг белка).

Элюат подвергли анализу так же, как в примере 1. В результате чистота интерферонной активности при молекулярном весе примерно 19000 составляла 10-50 % (средняя 25 %).

6 мл элюата из колонны синей агарозы пропустили через 1 мл хелатцинковой колонны, уравновешенной 60 %-ным раствором этиленгликоля, содержащим 1 М хлористого натрия и 1 мМ фосфорнокислого натрия. Колонну трижды промыли и элюировали. Использовали следующие промывочные растворы и элюент: первый промывочный раствор (6 мл):

60 %-ный раствор этиленгликоля, содержащий 1 М хлористого натрия и 10 мМ фосфорнокислого натрия;

второй промывочный раствор (6 мл):

дистиллированная вода;

третий промывочный раствор (6 мл):

220 мМ буферный раствор фосфорнокислого натрия, содержащий 2 М хлористого натрия (рН 6.0);

элюент:

0.1 М буферный раствор уксуснокислого натрия, содержащий 1 М хлористого натрия (рН 4.0).

Конечный элюат (4 мл) имел интерферонную активность $4.0 \cdot 10^7$ им.ед. (выход 50 %) и 0.4 мг белка. Удельная активность была $1 \cdot 10^8$ им. ед./мг белка.

Конечный элюат подвергли анализу, как и в примере 1, и обнаружили одну полосу в положении молекулярного веса примерно 19000. Чистота была больше 97 %.

Пример 6. Была повторена процедура примера 3, за тем исключением, что вместо хелатникелевой колонны использовали хелатцинковую колонну и в качестве элюента использовали 0.2 М раствор L-гистидин, уравновешенный хлористым натрием (рН 7.0).

Элюат (20 мл) имел $50 \cdot 10^6$ им.ед. интерферона (выход 67 %) и 50 г общего белка. Удельная активность была $1.0 \cdot 10^8$ им.ед./мг белка.

Пример 7. Использовали сырой интерферон, полученный из человеческих фибробластовых клеток, аналогичный интерферону, использованному в примере 1.

К 20 л раствора сырого интерферона с активностью интерферона $42 \cdot 10^6$ им.ед. и концентрацией белка 70 мг/л добавили 30 мл геля синей агарозы (Matrex Gel Blue A® Amicon corp.). После перемешивания смеси в течение 3 сут и выдержки в течение 3 ч удалили надосадочный слой и гель синей агарозы пропустили через колонну, промывая 200 мл 1.0 М раствора хлористого натрия, содержащего 10 мМ фосфата натрия с рН 7.2 (буфер А).

Затем колонну дважды промыли. Перед элюированием интерферона для улучшения очистки к выходу вышеуказанной колонки подсоединили колонку с 15 мл свежего геля агарозы, уравновешенного буфером А, содержащим 25 %-ный раствор этиленгликоля. После третьей промывки интерферон элюировали. Использовали следующие промывочные растворы и элюент:

первый промывочный раствор (200 мл):

буфер А;

второй промывочный раствор (300 мл):

буфер А, содержащий 25 %-ный раствор этиленгликоля;

третий промывочный раствор (120 мл):

3 М раствор хлористого натрия, содержащий 30 мМ фосфорнокислого натрия (рН 7.2) и 30 %-ный раствор этиленгликоля;

элюент (600 мл):

буфер А, содержащий 55 %-ный раствор этиленгликоля.

Раствор элюата фракционировали. Результаты представлены в табл. 4.

Фракцию второго элюирования подвергли дальнейшей очистке с помощью хелатцинковой хроматографии.

В колонну с хелатом цинка (15 мл) ввели буфер А, содержащий 50 %-ный раствор этиленгликоля. Часть (270 мл) фракции второго элюирования из вышеуказанной колонны синей агарозы развели 27 мл буфера А до получения 50 %-ного раствора этиленгликоля и пропустили через колонну с хелатом цинка при скорости потока 30 мл/ч. Все операции проводили при температуре 2-8°C. После двойной промывки колонну элюировали. Использовали следующие промывочные растворы и элюент:

первый промывочный раствор (200 мл):

дистиллированную воду и 0.1 М раствор фосфорнокислого натрия (рН 6.7) использовали при скорости потока 30 мл/ч в течение 1 ч поочередно;

второй промывочный раствор (30 мл):

2 М раствор хлористого натрия, содержащий 20 мМ фосфорнокислого натрия (рН 7.2);

элюент:

0.1 М уксусной кислоты - уксусно-кислого натрия буферный раствор, содержащий 0.1 М хлористого натрия (рН 7.4).

Активность, выход интерферона, количество белка и удельная активность этой процедуры очистки представлены в табл. 5.

Интерферон из колонны с хелатом цинка подвергли анализу посредством электрофореза полиакриламидного геля в присутствии додецил сульфата натрия (НДС) для определения чистоты. Элюат подвергли пирогенному испытанию с помощью теста Лимулуса, используя обнаруживающий эндотоксин реагент. Чистота интерферона 90 %, элюат отрицательный к испытанию Лимулуса при содержании интерферона $1.6 \cdot 10^6$ им. ед./мл.

Сравнительный пример 1. Во вторую колонну геля агарозы (Matrex Gel Blue A® 4 мл) загрузили 2 М раствор хлористого натрия, содержащий 20 мМ фосфорнокислого натрия, рН 7.2 (буфер В).

Часть фракции (45 мл) второго элюирования из колонны геля синей агарозы, описанной в примере 7, разбавили 5 мл буфера А и 75 мл буфера В и пропустили через вторую колонну геля синей агарозы при скорости потока 20 мл/ч. Все операции проводили при 15-25 °С.

Буфер, содержащий 30, 40 и 50 %-ный раствор этиленгликоля соответственно пропустили через колонну со скоростью потока 20 мл/ч.

Результаты второй хроматографии геля синей агарозы представлены в табл. 6. Интерферон из элюата, содержащего 40 %-ный раствор этиленгликоля, из которой колонны геля синей агарозы подвергли такому же анализу, как в примере 7, для определения его чистоты и проведения пирогенного испытания.

Чистота его была 60 % и результат испытания Лумулуса положительный.

Сравнительный пример 2. Колонну из хелата цинка (50 мл) уравнивали при помощи PBS. Неочищенный интерферон фибробласта человека, который имел активность интерферона 30×10^6 ме/мл и концентрацию протеина 70 мг/л, пропускали через колонну хелата цинка с объемной скоростью 100 мл/ч. После промывки колонну подвергали элюированию. При этом использовали следующие промывочный раствор и элюент: промывочный раствор (400 мл):

дистиллированную воду и 0.1 М раствор фосфата натрия (рН 6.7) использовали с объемной скоростью 100 мл/ч в течение 1 ч с чередованием;

элюент:

0.1 М буферный раствор уксусной кислоты - ацетата натрия, содержащий 1.0 М хлорида натрия (рН 4.7).

Фракцию элюирования на колонне хелата цинка использовали для последующей очистки при помощи хроматографии на голубом агаре.

Колонну из голубого агара (5 мл) уравнивали 0.1 М буфером уксусной кислоты - ацетата натрия, содержащим 1.0 М хлорида натрия. Фракцию элюирования из вышеупомянутой колонны хелата цинка пропускали через колонну с голубым агаром с объемной скоростью 10 мл/ч. После двухкратной промывки колонну подвергали элюированию. При этом использовали следующие промывочные растворы и элюант: первый промывочный раствор (50 мл):

1.0 М раствор хлорида натрия, содержащий 10 мМ фосфата натрия, рН 7.2 (буфер А);

второй промывочный раствор (50 мл):

буфер А, содержащий 25 % этиленгликоля;

элюант:

буфер А, содержащий 55 % этилен-гликоля.

Раствор элюата подвергали фракционированию. Результаты приведены в табл. 7.

Сравнительный пример 3. В качестве исходного материала использовали неочищенный интерферон фибробласта, который имел активность интерферона $7.7 \cdot 10^6$ ме/мл и концентрацию протеина 35 мг/л. Этот исходный раствор (2.0 л) смешивали с 5 г (17 мл) шариков "ЦРГ" (пористыми стеклянными шариками с размером пор 350 Å) и смесь энергично перемешивали в течение 13 ч. Затем смесь пропускали через стеклянный фильтр и шарики ЦРГ упаковывали в колонну (диаметр 0.9 см). Далее колонну промывали 100 мл PBS, а затем 0.01 М раствором глицина-HCl при pH 3.5, и элюировали 0.3 М буфером глицина-HCl при pH 2.0, содержащим 0.1 мг/мл альбумина сыворотки человека.

Элюаты подвергали диализу с использованием $4 \cdot 1$ л 1 М раствора NaCl, буферированного 0.02 М раствором фосфата (pH 7.4).

Диализированный раствор пропускали через колонну с хелатом цинка с размерами $0.6 \cdot 7$ см, затем колонну промывали 10 мл 1 М раствора хлорида натрия, буферированного 0.02 М раствором фосфата (pH 7.4) и 10 мл 0.1 М буфера ацетата натрия (pH 5.9). Затем колонну элюировали 0.1 М буфером ацетата натрия (pH 4).

Полученные результаты приведены в табл. 8.

Сравнительный пример 4. Используют сырой человеческий фибробластный интерферон, аналогичный используемому в примере 7.

Раствор сырого интерферона, имеющего активность интерферона $38 \cdot 10^6$ им.ед./л, концентрацию белка 63 мг/л и удельную активность $6 \cdot 10^5$ им.ед./мг белка, регулируют до pH 2 путем добавления 6 н. HCl и загружают в колонку SP-Сефадекса (20 мл, 2 см x 6.4 см). После загрузки 6 л раствора сырого интерферона со скоростью потока 40 мл/ч колонку промывают 200 мл дистиллированной воды. Затем колонку элюируют 320 мл 0.1 М буферного раствора фосфорнокислого натрия (pH 8.3). Раствор элюата фракционируют. Результаты приведены в табл. 9.

Вторую и третью фракции элюирования используют для последующего способа очистки путем хелатцинковой хроматографии.

Колонну с хелатом цинка (3 мл, 1 см \cdot 3.8 см) уравнивают 0.1 М буферным раствором фосфорнокислого натрия (pH 8.3). Вышеуказанные фракции (300 мл) из колонки SP-Сефадекса пропускают через хелатцинковую колонну со скоростью потока 6 мл/ч. После промывки дважды колонну элюируют. Используют следующие промывочные растворы и элюент:

первый промывочный раствор (40 мл):

дистиллированная вода и 0.1 М раствор фосфорнокислого натрия (pH 6.7), используемые поочередно со скоростью потока 6 мл/ч в течение 1 ч;

второй промывочный раствор (6 мл):

2 М хлористый натрий, содержащий 20 мМ фосфорнокислого натрия (pH 7.2);

элюент:

0.1 М буферный раствор уксусная кислота - уксусно-кислый натрий, содержащий 0.1 М хлористого натрия (pH 4.7).

Результаты этого способа очистки приведены в табл. 10.

Используемый в качестве исходного материала раствор сырого интерферона имеет pH 7.3. После отстаивания в течение 10 дней его интерферонная активность составляет $38 \cdot 10^6$ им.ед./л и никаких изменений в активности интерферона не обнаружено. Тогда как после отстаивания в течение 10 дней раствора сырого интерферона, имеющего pH 2, перед загрузкой его в колонку SP-Сефадекса, интерферонная активность снижается до $16 \cdot 10^6$ им.ед./л. Это означает, что раствор сырого интерферона неустойчив при pH 2.

Изобретение имеет следующие существенные признаки и преимущества по сравнению с известным техническим решением.

Способ очистки в соответствии с известным техническим решением включает SP-Сефадексовую хроматографию на колонках с последующей хелатметаллической хроматографией. Сырой интерферон, очищаемый в соответствии с известным способом,

имеет низкую концентрацию, например, используемый в примере 1 сырой интерферон имеет активность интерферона $3.2 \cdot 10^6$ им.ед./л и концентрацию белка 20 мг/л, а используемый в примере 2 сырой интерферон имеет активность интерферона $5 \cdot 10^6$ им.ед./л и концентрацию белка 25 мг/л. Известное техническое решение имеет в виду очистку сырого интерферона с относительно низкой концентрацией.

Предлагаемый способ очистки включает хроматографию на обездвиженном синем носителе с последующей хелатметаллической хроматографией. В соответствии с этим способом очистки сырой интерферон с высокой концентрацией (например, сырой интерферон, используемый в примере 7, имеет активность интерферона $42 \cdot 10^6$ им.ед./л и концентрацию белка 70 мг/л) может быть удовлетворительно очищен.

Кроме того, как видно из примера 7, в котором использовали сырой интерферон с высокой концентрацией, извлечение продукта по известному способу составило самое большое 47 %. Таким образом, известный способ непригоден для очистки сырого интерферона с высокой концентрацией. Это становится более очевидным из сравнения результатов примера 7 с результатами сравнительного примера 4 (в обоих примерах материалом для очистки был сырой интерферон с высокой концентрацией).

Извлечение, %	Пример 7	Сравнительный пример 4
1-я очистительная стадия	71	36
2-я очистительная стадия	69	20

Применение известного способа ограничивается сырым интерфероном с относительно низкой концентрацией. Предлагаемый способ применим к сырому интерферону, как с низкой концентрацией, так и с высокой концентрацией.

Известный способ имеет недостаток, заключающийся в том, что перед загрузкой колонки SP-Сефадекса сырой интерферон обязательно делают сильнокислотным, поскольку интерферонная активность при таком кислотном состоянии заметно теряется, как показано в сравнительном примере 4.

Этот недостаток известного способа не обнаруживается в изобретении, поскольку хроматографию на обездвиженном синем носителе осуществляют в условиях почти нейтрального pH.

Пример 8. Используемый раствор неочищенного интерферона получают путем обработки клеток человеческого фибробласта с использованием методики, аналогичной примеру 1.

К раствору неочищенного интерферона, который имеет активность интерферона, равную 30000 ед./л, белковую концентрацию, равную 0.11 мг/мл и pH 7.2, прибавляют 6 н. раствор HCl или 1 н. раствор NaOH с тем, чтобы довести pH до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

Устойчивость каждого раствора неочищенного интерферона испытывают путем определения титра, оставшегося после отстаивания каждого раствора неочищенного интерферона при температуре 4°C в течение 16 ч.

Ниже приведены результаты испытания, выраженные в процентном содержании:

pH	Устойчивость, %
2	83
3	69
4	80
5	90
6	97
7	100
8	98
9	94

10 80

Затем 15 мл каждого раствора неочищенного интерферона помещают в полипропиленовую центрифужную пробирку, в которую также помещают 0.05 мл синего красителя в качестве носителя (Matrex Gel Blue A®) и смесь перемешивают при 4°C в течение 16 ч. После удаления надосадочного слоя и промывания дважды 2.5 мл 10 мМ раствора фосфат натрия - 1 н. NaCl (pH 7.2) 2 мл 10 мМ фосфата натрия - 1 н. NaCl (pH 7.2), содержащего 55 %-ный этиленгликоль, прибавляют к носителю. После центрифугирования удаляют надосадочный слой, содержащий частично очищенный интерферон.

Затем определяют количество потерянного интерферона (общее содержание интерферона, не абсорбированного на носителе, и интерферона, содержащегося в промывном растворе) и восстановленного интерферона.

Ниже приведены результаты, выраженные в процентном содержании:

pH	Потеря, %	Восстановление, %
2	5	64
3	13	50
4	20	46
5	9	65
6	7	70
7	7	68
8	8	73
9	6	67
10	6	50

Как видно из вышеприведенных результатов, когда pH раствора неочищенного интерферона был доведен до 5-9, раствор неочищенного интерферона оставался устойчивым, и восстановление частично очищенного интерферона было высоким.

Формула изобретения

Способ очистки человеческого β -интерферона путем контактирования раствора неочищенного интерферона с сорбентом, обработки сигнала элюантом с последующей металл-хелатной хроматографией полученного элюата, при которой носитель содержит хелатообразующий остаток, а в качестве иона - CO^{+2} или Ni^{+2} или Zn^{+2} и элюции целевого продукта гистидином или кислотным буферным раствором, отличающийся тем, что, с целью повышения производительности процесса, в качестве сорбента используют синий агарозный гель, а контактирование проводят при pH 5-9.

Таблица 1

Характеристика	Объем, мл	Общая активность интерферона, (10^6 им.ед.)	Выход, %	Общий белок, мг	Удельная активность, им.ед./мг белка
Исходный материал					
Раствор сырого интерферона	30.000	186		630	$3.0 \cdot 10^5$
Колонны геля синей сахарозы					
Надосадочная жидкость	32.000	3		570	
1-й промывочный раствор	320	0.2		20	
2-й промывочный раствор	280	1.4		15	
Фракция элюирования	300	150	81	15	$1.0 \cdot 10^7$
Хелатцинковая колонна					
Загрузочный раствор	285	143		14	
Пропускаемый раствор	285	5		7	
1-й промывочный раствор	300	0.6		1.8	
2-й промывочный раствор	50	10		4	$2.5 \cdot 10^6$
1-я фракция элюата	10	60	32	1.0	$6 \cdot 10^7$
2-я фракция элюата	20	64	34	0.16	$4 \cdot 10^8$
Общая фракция элюата	30	124	10	1.2	$1.0 \cdot 10^8$

Таблица 2

Характеристика	Объем, мл	Общая интерферонная активность, (10^6 им.ед.)	Выход, %	Общий белок, мг	Удельная активность, им.ед./мг белка
Исходный материал					
Раствор сырого интерферона	20.000	142		1240	$1.1 \cdot 10^5$
Раствор, пропущенный через сине-агарозную колонну	20.000	10	7	1060	
1-й промывочный раствор	200	1	0.7	ПО	
2-й промывочный раствор	200	1	0.7	1	
3-й промывочный раствор	40	20	14	20	$1.0 \cdot 10^6$
Хелатцинковая колонна					
Пропущенный раствор	200	2	1.4	5	

Продолжение таблицы 2

1-й промывочный раствор	200	1.3	0.9	2	
2-й промывочный раствор	20	27	19	1	$2.7 \cdot 10^7$
Общая фракция элюирования	20	82	58	0.4	$2.1 \cdot 10^8$

Таблица 3

Характеристика	Объем, мл	Общая интерферонная активность, ($\cdot 10^6$ им.ед)	Выход, %	Общий белок, мг	Удельная активность, им.ед./мг белка
Исходный материал					
Раствор сырого интерферона	20.000	300		1200	$2.5 \cdot 10^5$
Колонна синей агарозы					
1-й промывочный раствор					
2-й промывочный раствор					
Элюент	400	260	87	270	$1.0 \cdot 10^7$
Хелатникелевая колонна					
Загрузочный раствор	100	65			
Пропущенный раствор		0.7			
1-й промывочный раствор					
2-й промывочный раствор					
Элюат	20	55	74	0.55	$1 \cdot 10^8$

Таблица 4

Характеристика	Объем, л	Общая интерферонная активность, ($\cdot 10^6$ им.ед.)	Выход, %	Общий белок, мг	Удельная активность, $\cdot 10^4$ им.ед./мг белка
Раствор сырого интерферона	20	840		1375	61
Надосадочный слой	20	20	2.4	1170	1.7
1-й промывочный раствор	0.4	1	0.1	14	7
2-й промывочный раствор	0.32	11	1.3	20	60

Продолжение таблицы 4

3-й промывочный раствор	0.12	12	1.4	13	90
1-я фракция элюирования	0.03	4	5	8	50
2-я фракция элюирования	0.42	600	71	24	2500
3-я фракция элюирования	0.12	11	1.3	2	550

Таблица 5

Характеристика	Объем, л	Общая интерферонная активность ($\cdot 10^6$ им.ед.)	Выход, %	Общий белок, мг	Удельная активность, $\cdot 10^4$ им.ед./мг белка
Раствор сырого интерферона	300	390		15.4	2500
Пропущенный через колонну	300	22	6	11	200
Промытый	248	52	13.5	1.0	5200
Фракция элюирования	77	270	69	0.9	30000

Таблица 6

Характеристика	Объем, мл	Общая интерферонная активность, ($\cdot 10^6$ им.ед.)	Выход, %	Общий белок, мг	Удельная активность, $\cdot 10^4$ им.ед./мг белка
Раствор сырого интерферона	125	62		2.5	2500
Пропущенный через колонну	125	1	1.6	1.7	60
Элюирование					
30 %-ным раствором этиленгликоля	16	7	11	0.21	3300
40 %-ным раствором этиленгликоля	16	26	42	0.15	17000
50 %-ным раствором этиленгликоля	16	5	8	0.07	7100

Таблица 7

Характеристика	Объем, мл	Общая активность ИНФ, $\cdot 10^6$ ЕИ	Общее содержание протеина, мг	Удельная активность, $\cdot 10^4$ ЕИ/мг протеина	Извлече ние, г
Колонна из хелата цинка					
Неочищенный ИФН	4000	120	280	43	100
Пропускается через	4000	12	240	5	10

Промывка	400	5	4	125	4
Фракция элюирования	300	90	2.4	3750	75
Колонна из голубого агара					
Пропускается через	200	0.12	<0.4	<30	0.1
1-я промывка	50	0.23	0.2	120	0.2
2-я промывка	50	2.5	0.8	310	2
Фракция элюирования					
1-я	30	40	0.75	5300	33
2-я	30	20	0.30	6700	17
Всего	60	60	1.05	5700	50

Таблица 8

Характеристика	Объем, мл	Общее содержание протеина, мг	Общая активность ИФН, ЕЙ	Удельная активность, ЕИ/мг	Извлечение, %
Исходный раствор	2000	64	$15.4 \cdot 10^6$	$2.4 \cdot 10^5$	100
СРГ	2210	50	$1.8 \cdot 10^6$		12
Пропускается через + промывка					
1-я фракция элюирования	45	3	$10.3 \cdot 10^6$	$1.3 \cdot 10^6$	69
2-я фракция элюирования	46	5	$0.2 \cdot 10^6$		
3-е элюирование	48	8	$0.1 \cdot 10^6$		
Диализированный раствор	109	8	$7.0 \cdot 10^6$	$0.9 \cdot 10^6$	45
Колонна из хелата цинка	125	8	0	0	0
Пропускается через + промывка					
Фракция элюирования	6.5	0.34	$5.1 \cdot 10^6$	$1.5 \cdot 10^7$	33

Таблица 9

Характеристика	Объем, мл	Общая активность интерферона, ($\cdot 10^6$ им.ед.)	Общий белок, мг	Удельная активность, $\cdot 10^4$ им.ед./мг белка	Извлечение, %
Внесенный раствор	6000	228	378	60	
Пропущенный + промытый	6200	6.8			3
Элюирование					
Фракция 1	20	0.4	2	20	0.2
Фракция 2	150	74	12.4	600	32.5
Фракция 3	150	8	2	400	3.5

Таблица 10

Характеристика	Объем, мл	Общая активность интерферон а, ($\cdot 10^6$ им.ед.)	Общий белок, мг	Удельная активность, $\cdot 10^4$ им.ед/ мг белка	Извлечение, %
Внесенный раствор	300	82	14.4	570	36
Пропущенный	300	0.9	9.3	10	0.4
Промытый	46	0.03	0.23	13	0.01
Элюирование					
Фракция 1	4	2.4	0.8	300	1
Фракция 2	20	45	0.45	10000	20

Ответственный за выпуск

Ногай С.А.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03