



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 299 528**

51 Int. Cl.:
C07K 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01985190 .6**

86 Fecha de presentación : **26.10.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1366060**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2003**

54 Título: **Método de purificación de interferón-beta.**

30 Prioridad: **27.10.2000 US 243965 P**
09.04.2001 US 282607 P
18.10.2001 US 330375 P
25.10.2001 US 35420

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2008

73 Titular/es: **Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.**
4560 Horton Street
Emeryville, California 94608, US

72 Inventor/es: **Wolfe, Sid;**
Esikova, Irina;
Babuka, Susan;
Shirley, Bret, A. y
Fordham, Dennis

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 299 528 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de purificación de interferón-beta.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere al campo de la ingeniería bioquímica. Más particularmente, la invención concierne a un procedimiento de recuperación bioquímica mejorado en el que interferón-beta recombinante puede replegarse y recuperarse en forma sustancialmente pura y monómera. Esta composición puede usarse en formulaciones farmacéuticas.

10 **Fundamento de la invención**

Los interferones de origen natural son proteínas específicas para la especie producidas por diversas células por inducción con virus, ARNs de doble cadena, otros polinucleótidos, antígenos y mitógenos. Los interferones presentan múltiples actividades biológicas, incluyendo actividades antivírica, antiproliferativa, inmunomoduladora y anticelular. La investigación de estas actividades ha conducido a la identificación y caracterización de al menos tres tipos distintos de interferones humanos, de los que se ha informado que son proteínas diferentes codificadas por genes estructurales distintos. Los interferones, que son a menudo glicoproteínas, se clasificaron originalmente en base a su fuente de células y se reclasificaron más tarde como alfa, beta ("β") y gamma.

El interferón-beta ("IFN-β") se produce por fibroblastos y células epiteliales. El interferón-beta nativo se produjo sobreinduciendo cultivos de fibroblastos humanos con ácido polirribonucleico y ácido polirribocitidílico y aislando y purificando el(los) interferón(es) producido(s) así por técnicas cromatográficas y electroforéticas. El gasto y dificultad de purificación de interferones de esta manera imposibilitó un ensayo clínico dilatado y la evaluación del valor terapéutico de los interferones. El aislamiento de interferones de fuentes naturales permanece relativamente difícil y caro.

Más recientemente, se han clonado varios de los genes de interferones humanos usando tecnología de ADN recombinante ("rADN") y se han expresado en *E. coli* (Nagola *et al.* (1980) Nature 284:316; Goeddel *et al.* (1980) Nature 287:411; Yelverton *et al.* (1981) Nucleic Acids Res. 9:731; Streuli *et al.* (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2848). También pueden producirse proteínas o polipéptidos que presentan propiedades tipo interferón-beta nativo con tecnología de rADN extrayendo ARN mensajero 12S rico en poli A de células humanas inducidas víricamente, sintetizando cADN de doble cadena usando el mRNA como plantilla, introduciendo el cADN en un vector de clonación apropiado, transformando con el vector microorganismos adecuados, cosechando los microorganismos y extrayendo de ellos el interferón-beta. Véanse, por ejemplo, Solicitudes de Patente Europea N° 28033 (publicada el 6 de Mayo de 1981); 32134 (publicada el 15 de Julio de 1981); y 34307 (publicada el 26 de Agosto de 1981), que describen diversos métodos para la producción de interferón-beta empleando técnicas de rADN. Las proteínas o polipéptidos expresados a partir de clones de ADN recombinante se han purificado y ensayado, y se ha encontrado que presentan propiedades similares a las de los interferones nativos. Los interferones producidos bacterianamente tienen así uso terapéutico potencial como agentes antivíricos y antitumores. La producción de interferones mediante tales fermentaciones bacterianas produce grandes cantidades de interferón con un coste relativamente bajo, haciendo por ello al interferón disponible más extensamente para muchos usos, tales como estudios clínicos.

El interferón-beta de uso en estudios clínicos debe ser de pureza relativamente alta y sustancialmente no contaminado con constituyentes tóxicos de las células hospedantes, restos de células y otros compuestos químicos extraños introducidos durante las etapas de extracción y purificación. Hay varios métodos disponibles actualmente para la preparación, recuperación y purificación de IFN-β.

Los métodos de recuperación y purificación de IFN-β descritos en las Patentes de los EE.UU. N° 4.462.940 y 5.702.699, y métodos similares, producen una forma pura de IFN-β que tiende a formar agregados en ausencia de solubilizantes fuertes, por ejemplo, dodecilsulfato sódico ("SDS"). Además, tales métodos (1) exponen la proteína a condiciones de alto pH que pueden afectar adversamente a las propiedades biológicas de la proteína, y (2) producen composiciones que contienen cantidades residuales de SDS usado para solubilizar la proteína durante la purificación.

Por tanto, hay necesidad de un procedimiento de recuperación y purificación mejorado en el que el IFN-β no se someta a alta alcalinidad, la formulación esté libre o virtualmente libre de SDS, y la proteína sea soluble a un pH adecuado para administración parenteral. Un objeto de la presente invención es proporcionar una muestra aceptable farmacéuticamente de IFN-β que sea de pureza relativamente alta y se repliegue fácilmente durante el procedimiento de purificación y recuperación.

Lee *et al.*, Korean Biochemical Journal, 23(2), 161-171 (1990), describen la purificación de interferón-beta derivado de *Escherichia coli* recombinante por un método que comprende precipitación, solubilización y dilución de la proteína en tampón de fosfato sódico que tiene un pH de 7,2.

El documento EP-A-0 360 937 describe la purificación de interferón-beta recombinante por un método que comprende precipitación con sacarosa, solubilización del precipitado con HCl de guanidina y diálisis de la solución para separar la guanidina.

Pepinsky, Anal Biochem., 195(1), 177-181 (1991), describe la precipitación selectiva de proteínas de soluciones que contienen hidrocloreto de guanidina con etanol.

5 Van Oss, J. Protein Chem., 8(5), 661-668 (1989), describe un método para precipitar proteínas de plasma por el procedimiento de etanol frío.

10 Russel-Harde *et al.*, J. Interferon Cytokine Res., 15(1), 31-37 (1995), describen un método para la purificación de interferón-beta Ser-17 (Betaseron) recombinante. El Betaseron producido en bacterias se solubiliza con un detergente no desnaturante a pH 12. Después, se separa el detergente usando intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaños. Finalmente, el Betaseron purificado se repliega por diálisis frente a un tampón no reductor.

El documento WO 98/27211 describe la producción y purificación de interferón beta-cis humano recombinante por solubilización del interferón agregado con HCl de guanidina y subsiguiente cromatografía Ni-NTA.

15 Sumario de la invención

Se proporcionan métodos mejorados útiles en la preparación de formulaciones farmacéuticas de IFN- β . Los métodos proporcionan composiciones farmacéuticas líquidas, monómeras, que comprenden IFN- β . Los métodos incluyen condiciones que aumentan el repliegue de la proteína durante el procedimiento de recuperación.

20 Para conseguir el anterior y otros objetos, y según el propósito de la presente invención como se realiza y describe ampliamente aquí, la presente invención proporciona métodos mejorados para la recuperación y purificación de IFN- β .

25 En otra realización, el método mejorado de purificación y recuperación de IFN- β comprende obtener una muestra de IFN- β sustancialmente purificado y mezclar esta muestra con hidrocloreto de guanidina para formar una solución que comprende IFN- β desnaturizado solubilizado. Esta solución que comprende IFN- β desnaturizado solubilizado se diluye después en un primer tampón apropiado para obtener una solución que comprende IFN- β renaturalizado solubilizado. La solución de IFN- β renaturalizado solubilizado resultante se diafiltra o dializa después en un tampón
30 adecuado con fines farmacéuticos. Como se ha indicado antes, esta última etapa separa el hidrocloreto de guanidina residual, produciendo una formulación farmacéutica que comprende IFN- β sustancialmente monómero adecuado para administración parenteral.

Descripción breve de los dibujos

35 La Figura 1 muestra datos de cromatografía HPLC de dimensionamiento recogidos después de la dilución de IFN- β de la etapa de solubilización con hidrocloreto de guanidina en diversos tampones.

40 La Figura 2 muestra el efecto de sal y pH en la recuperación de IFN- β de HCl de guanidina 0,4 M, tampón de NaPO₄ 10 mM, pH 7,0.

La Figura 3 muestra el efecto de Tween 80 en la agregación de IFN- β renaturalizado preparado según los métodos de la invención.

45 Descripción detallada de la invención

La presente invención se dirige a nuevos métodos para preparar una forma sustancialmente monómera de IFN- β . Por “monómera” se quiere decir que la mayoría del IFN- β (en peso) presente en una preparación o composición es monómera en lugar de agregada. Por “agregada” se quiere decir una interacción física entre las moléculas de polipéptido que produce la formación de multímeros no covalentes que pueden permanecer solubles o que pueden precipitar de la solución. El porcentaje (en peso) de IFN- β que es monómero en una composición o formulación monómera puede variar desde el 51% o superior. Los métodos de la invención proporcionan la preparación de composiciones que comprenden IFN- β monómero que se hacen sin el uso del estabilizante HSA tradicional y que están libres o virtualmente
50 libres del solubilizante dodecilsulfato sódico (SDS) (es decir, que contienen menos de 10 microgramos de SDS por miligramo de IFN- β). Estas composiciones que comprenden IFN- β monómero son por tanto adecuadas para su uso en preparaciones farmacéuticas o terapéuticas. La forma monómera del polipéptido IFN- β permanece soluble, y se dice por ello que está “solubilizada” en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. La presente invención permite así la preparación de composiciones farmacéuticas de IFN- β libres de HSA y libres de SDS que comprenden al menos el 51% del IFN- β en su forma monómera, en oposición a su forma agregada, preferiblemente al menos 55%,
60 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, más preferiblemente al menos 90% o más del IFN- β en su forma monómera.

En un ejemplo, que se proporciona para un mejor entendimiento de la invención y que no se presenta como una realización de la invención, la composición que comprende IFN- β monómero se prepara precipitando de la solución IFN- β sustancialmente purificado, resuspendiendo el precipitado por disolución en hidrocloreto (HCl) de guanidina, separando todo SDS residual por filtración cuando la muestra de IFN- β inicial comprende SDS, y renaturalizando
65 después el IFN- β por dilución de la solución de HCl de guanidina-IFN- β resultante con una solución tampón apropiada. Por “sustancialmente purificado” quiere decirse que el IFN- β en el material de partida es o está esencialmente libre de componentes que acompañan o interactúan normalmente con la proteína como se encuentra en su ambiente de

origen natural, es decir, una célula nativa o célula hospedante en el caso de IFN- β producido recombinantemente. Un polipéptido IFN- β que está libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos del 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% o 1% (en peso seco) de proteína contaminante. Cuando el polipéptido IFN- β o una variante activa biológicamente del mismo se produce recombinantemente, el medio de cultivo representa preferiblemente menos del 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% o 1% (en peso seco) de precursores químicos o compuestos químicos que no son proteínas de interés. Así, se dice que un IFN- β “sustancialmente purificado” para su uso en los métodos de la presente invención tiene un nivel de pureza de al menos el 70%, preferiblemente un nivel de pureza de al menos el 75%, 80%, 85%, más preferiblemente un nivel de pureza de al menos el 90% o superior, determinado por análisis de SDS/PAGE.

En otra realización, la composición que comprende IFN- β monómero se prepara en ausencia de la etapa de precipitación señalada antes. De esta manera, una muestra que comprende IFN- β sustancialmente purificado se mezcla con HCl de guanidina para obtener una solución que comprende IFN- β desnaturalizado solubilizado; el IFN- β se re-naturaliza después por dilución de la solución de HCl de guanidina-IFN- β resultante con un tampón apropiado. Las ramificaciones de estas etapas de preparación son la base para los métodos de la presente invención, para preparar formulaciones inyectables que comprenden IFN- β sustancialmente monómero, que son útiles para terapia de IFN- β dirigida a enfermedades sensibles a IFN- β .

El término “IFN-beta” o “IFN- β ” según se usa aquí se refiere a IFN- β o variantes del mismo, a las que se hace referencia a veces como polipéptidos tipo IFN- β . Así, por ejemplo, variantes de IFN- β humano, que pueden ser de origen natural (por ejemplo, variantes alélicas que tienen lugar en el sitio de IFN- β) o producidas recombinantemente, tienen secuencias de aminoácidos que son las mismas, o similares a, o sustancialmente similares a, la secuencia de IFN- β humano nativo maduro. También se abarcan por el término “IFN- β ” o “IFN-beta” fragmentos de IFN- β o formas truncadas de IFN- β que conservan su actividad. Estos fragmentos o formas truncadas activos biológicamente de IFN- β se generan separando residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de IFN- β de longitud completa usando métodos de ADN recombinante muy conocidos en la técnica. Los polipéptidos IFN- β pueden ser glicosilados (IFN- β -1a) o no glicosilados (IFN- β -1b), ya que se ha informado en la bibliografía que ambos IFN- β s glicosilado y no glicosilado muestran actividades específicas cualitativamente similares y que, por tanto, los restos glicosilo no están implicados y no contribuyen a la actividad biológica de IFN- β .

Las variantes de IFN- β abarcadas aquí incluyen muteínas de la secuencia de IFN- β maduro nativo (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N° 5.814.485), en la que se han suprimido o sustituido deliberadamente con otros aminoácidos uno o más residuos de cisteína que no son esenciales para la actividad biológica, para eliminar lugares para reticulación intermolecular o formación de enlaces disulfuro intramolecular incorrecta. Las variantes de IFN- β de este tipo incluyen las que contienen una glicina, valina, alanina, leucina, isoleucina, tirosina, fenilalanina, histidina, triptófano, serina, treonina o metionina que sustituye a la cisteína encontrada en el aminoácido 17 de la secuencia de aminoácidos nativa madura. Serina y reonina son las sustituciones más preferidas por su analogía química con cisteína. Son más preferidas sustituciones de serina. Véase, por ejemplo, la variante de IFN- β en la que la cisteína encontrada en el aminoácido 17 de la secuencia nativa madura es sustituida por serina (Patente de los EE.UU. N° 5.814.485). La cisteína 17 puede suprimirse también usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N° 4.518.584), produciendo una muteína de IFN- β maduro que es un aminoácido más corta que el IFN- β maduro nativo. Véanse también, como ejemplos, las Patentes de los EE.UU. N° 4.530.787; 4.572.798 y 4.588.585. Así, también están abarcadas por la presente invención variantes de IFN- β con una o más mutaciones que mejoran, por ejemplo, su utilidad farmacéutica.

El técnico experto apreciará que pueden introducirse cambios adicionales por mutación en las secuencias de nucleótidos que codifican IFN- β , concidiendo por ello a cambios en la secuencia de aminoácidos de IFN- β , sin alterar la actividad biológica del interferón. Así, puede crearse una molécula de ácido nucleico aislada que codifique una variante de IFN- β que tenga una secuencia que difiera de la secuencia de aminoácidos para el IFN- β nativo introduciendo una o más sustituciones, adiciones o supresiones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos correspondiente que codifica el IFN- β nativo, de tal modo que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos en el IFN- β codificado. Pueden introducirse mutaciones por técnicas estándares, tales como mutagénesis dirigida por el lugar y mutagénesis mediada por PCR. Tales variantes de IFN- β también son abarcadas por la presente invención.

Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos conservadoras en uno o más residuos de aminoácidos predichos, preferiblemente no esenciales. Un residuo de aminoácido “no esencial” es un residuo que puede alterarse de la secuencia de tipo natural de IFN- β sin alterar su actividad biológica, mientras que se requiere un residuo de aminoácido “esencial” para actividad biológica. Una “sustitución de aminoácido conservadora” es una en la que el residuo de aminoácido es sustituido por un residuo de aminoácido que tiene una cadena secundaria similar. Se han definido en la técnica familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas secundarias similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas secundarias básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas secundarias ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas secundarias polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas secundarias no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas secundarias beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas secundarias aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Tales sustituciones no se harían para residuos de aminoácidos conservados, o para residuos de aminoácidos que residan dentro de un motivo conservado.

Alternativamente, pueden hacerse secuencias de nucleótidos de IFN- β variantes introduciendo mutaciones aleatoriamente a lo largo de la totalidad o parte de una secuencia de codificación de IFN- β , tal como mediante mutagénesis de saturación, y puede examinarse en los mutantes resultantes la actividad biológica de IFN- β para identificar mutantes que mantengan actividad. Tras la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse recombinantemente, y puede determinarse la actividad de la proteína usando técnicas de ensayo estándares descritas aquí.

Las variantes de IFN- β activas biológicamente tendrán generalmente al menos 80%, más preferiblemente del 90 al 95% o más, y aún más preferiblemente el 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la molécula de IFN- β de referencia, por ejemplo, el IFN- β humano nativo, que sirve como base de comparación. Por "identidad de secuencias" se quiere decir que se encuentran los mismos residuos de aminoácidos dentro del polipéptido variante y la molécula de polipéptido que sirve como referencia cuando se alinea y compara un segmento contiguo especificado de la secuencia de aminoácidos de la variante con la secuencia de aminoácidos de la molécula de referencia.

Con fines de alineamiento óptimo de las dos secuencias para determinar la identidad de secuencias, el segmento contiguo de la secuencia de aminoácidos de la variante puede tener residuos de aminoácidos adicionales o residuos de aminoácidos suprimidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la molécula de referencia. El segmento contiguo usado para comparación con la secuencia de aminoácidos de referencia comprenderá al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos. Pueden hacerse correcciones para identidad de secuencias aumentada asociada con inclusión de huecos en la secuencia de aminoácidos de la variante asignando penalizaciones por huecos. Los métodos de alineamiento de secuencias son muy conocidos en la técnica.

Así, la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias cualesquiera puede conseguirse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (1988) *Comput. Appl. Biosci.* 4:11-7. Tal algoritmo se utiliza en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineamiento GCG. Puede usarse una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalidad por hueco de 4 con el programa ALIGN cuando se comparan secuencias de aminoácidos. Otro ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático de uso para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877, modificado como en Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Tal algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Las búsquedas de secuencias de aminoácidos de BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener una secuencia de aminoácidos similar al polipéptido de interés. Para obtener alineamientos con huecos con fines de comparación, puede utilizarse BLAST con huecos como se describe en Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. Alternativamente, puede usarse PS1-BLAST para realizar una búsqueda integrada que detecta relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul *et al.* (1997) *supra*. Cuando se utilizan programas BLAST, BLAST con huecos o PS1-BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto. Véase la website para ncbi.nlm.nih.gov. Véase también el programa ALIGN (Dayhoff (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure* 5: Supl. 3, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.) y programas en el Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 (disponibles de Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin), por ejemplo, el programa GAP, en el que se utilizan parámetros por defecto de los programas.

Cuando se considera el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos, algunas posiciones de residuos de aminoácidos pueden diferir como resultado de sustituciones de aminoácidos conservadoras, que no afectan a propiedades de la función de la proteína. En estos casos, el porcentaje de identidad de secuencias puede ajustarse hacia arriba para dar cuenta de la similitud en aminoácidos sustituidos conservadoramente. Tales ajustes son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Myers y Miller (1988) *Comput. Appl. Biosci.* 4:11-17.

Las variantes activas biológicamente de IFN- β abarcadas por la invención deben conservar actividades de IFN- β , particularmente la capacidad para unirse a receptores de IFN- β . La actividad biológica de variantes de IFN- β puede medirse por cualquier método conocido en la técnica. Pueden encontrarse ejemplos de tales ensayos en Fellous *et al.* (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:3082-3086; Czerniecki *et al.* (1984) *J. Virol.* 49(2):490-496; Mark *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5662-5666; Branca *et al.* (1981) *Nature* 277:221-223; Williams *et al.* (1979) *Nature* 282:582-586; Herberman *et al.* (1979) *Nature* 277:221-223; y Anderson *et al.* (1982) *J. Biol. Chem.* 257(19):11301-11304.

Se indican ejemplos de polipéptidos IFN- β y polipéptidos variantes de IFN- β abarcados por la invención en Nagata *et al.* (1980) *Nature* 284:316-320; Goeddel *et al.* (1980) *Nature* 287:411-416; Yelverton *et al.* (1981) *Nucleic Acids Res.* 9:731-741; Streuli *et al.* (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2848-2852; documento EP028033B1 y EP109748B1. Véanse también las Patentes de los EE.UU. N° 4.518.584; 4.569.908; 4.588.585; 4.738.844; 4.753.795; 4.769.233; 4.793.995; 4.914.033; 4.959.314; 5.545.723; y 5.814.485. Estas citas proporcionan también una guía relativa a residuos y regiones del polipéptido IFN- β que pueden alterarse sin pérdida de actividad biológica.

Por "IFN- β producido recombinantemente" quiere decirse IFN- β que tiene actividad biológica comparable con IFN- β nativo y que se ha preparado por técnicas de ADN recombinante. Puede producirse IFN- β cultivando una célula hospedante transformada con un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido IFN- β . La célula hospedante es una que puede transcribir la secuencia de nucleótidos y producir la

proteína deseada, y puede ser procariota (por ejemplo, *E. coli*) o eucariota (por ejemplo, una células de levadura, insecto o mamífero). Se dan ejemplos de producción recombinante de IFN- β en Mantei *et al.* (1982) Nature 297:128; Ohno *et al.* (1982) Nucleic Acids Res. 10:967; Smith *et al.* (1983) Mol. Cell. Biol. 3:2156; y Patente de los EE.UU. N° 4.462.940, 5.702.699 y 5.814.485.

Véase también la Patente de los EE.UU. N° 5.795.779, en la que se produce recombinantemente IFN- β -1a en células de ovario de hámster chino (CHO). Se han clonado genes de interferón humano usando tecnología de ADN recombinante ("rADN") y se han expresado en *E. coli* (Nagola *et al.* (1980) Nature 284:316; Goeddel *et al.* (1980) Nature 287:411; Yelverton *et al.* (1981) Nuc. Acid Res. 9:731; Streuli *et al.* (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2848). Alternativamente, puede producirse IFN- β por un animal o planta transgénicos que se ha diseñado genéticamente para expresar la proteína IFN- β de interés según métodos conocidos en la técnica.

Pueden producirse también proteínas o polipéptidos que presentan propiedades tipo interferón-beta nativo con tecnología de rADN extrayendo ARN mensajero 12S rico en poli A de células humanas inducidas víricamente, sintetizando cADN de doble cadena usando el mRNA como plantilla, introduciendo el cADN en un vector de clonación apropiado, transformando microorganismos adecuados con el vector, cosechando los microorganismos y extrayendo de ellos el interferón-beta. Véanse, por ejemplo, Solicitudes de patente europea N° 28033 (publicada el 6 de Mayo de 1981); 32134 (publicada el 15 de Julio de 1981); y 34307 (publicada el 26 de Agosto de 1981), que describen diversos métodos de producción de IFN- β empleando técnicas de rADN.

Alternativamente, IFN- β puede sintetizarse químicamente, mediante alguna entre varias técnicas que son conocidas por los expertos en la técnica de péptidos. Véanse, por ejemplo, Li *et al.* (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2216-2220; Stewart y Young (1984) Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois) y Baraney y Merrifield (1980) The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, eds. Gross y Meinhofer, Vol. 2 (Academic Press, Nueva York, 1980), págs. 3-254, que discuten técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida; y Bodansky (1984) Principles of Peptide Synthesis (Springer-Verlag, Berlin) y Gross y Meinhofer, eds. (1980) The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology Vol. 1 (Academic Press, Nueva York), que discuten síntesis en solución clásica. También puede prepararse químicamente IFN- β por el método de síntesis de péptidos múltiple simultánea. Véanse, por ejemplo, Houghten (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5131-5135; y Patente de los EE.UU. N° 4.631.211.

La preparación de las composiciones que comprenden IFN- β monómero se realiza preferiblemente según uno de dos métodos de purificación. El primero de estos métodos de purificación, que se proporciona aquí para una mejor comprensión de la invención y no como una realización de la invención, comprende tres etapas básicas: (1) precipitación de IFN- β de una solución que comprende IFN- β purificado; (2) disolución del precipitado de IFN- β en hidrocloreuro (HCl) de guanidina para conseguir resolubilización del IFN- β ; y (3) renaturalización del IFN- β , preferiblemente mediante dilución o diálisis usando un tampón aceptable. Este método de purificación produce IFN- β que es soluble, estable y está en forma monómera. La composición resultante puede formularse como una composición farmacéutica por diafiltración o diálisis adicionales de esta composición con un tampón aceptable farmacéuticamente. Esta etapa final separa HCl de guanidina residual de la solución que comprende IFN- β renaturalizado y proporciona una formulación que tiene un pH que es aceptable para administración parenteral.

Usando este método de purificación de la invención, se prepara primero un precipitado de IFN- β precipitando IFN- β purificado de una solución. La precipitación se consigue reduciendo la solubilidad de IFN- β . La reducción de la solubilidad de IFN- β y la precipitación de IFN- β pueden conseguirse con el uso de un alcohol; por ejemplo, un alcohol alifático tal como etanol. Para algunas proteínas, la precipitación resulta de una reacción de desnaturalización y/o agregación que es irreversible, conduciendo a inactivación de proteínas, pero, en el caso del IFN- β precipitado de la presente invención, la reacción de precipitación es reversible. Así, el IFN- β soluble recuperado en las etapas subsiguientes de este método de purificación conserva su actividad biológica.

El precipitado resultante se disuelve después en HCl de guanidina para obtener una solución que comprende IFN- β desnaturalizado resolubilizado y HCl de guanidina. En aquellos casos en los que el IFN- β purificado se ha obtenido usando una etapa de purificación inicial que incluye el uso de SDS como solubilizante, el SDS permanece como un precipitado tras la disolución con HCl de guanidina. Este SDS precipitado se separa por filtración usando técnicas de filtración estándares conocidas en la técnica, preferiblemente antes de realizar las etapas subsiguientes de este método de purificación mejorado. La cantidad de HCl de guanidina a mezclar con el precipitado de IFN- β es una cantidad suficiente para solubilizar el IFN- β precipitado en la solución de HCl de guanidina-IFN- β resultante, es decir, HCl de guanidina 6 M a 10 M, preferiblemente 6 M a 9 M, más preferiblemente HCl de guanidina 6 M a 8 M en esta solución de HCl de guanidina-IFN- β resultante. Aunque esté solubilizado, el IFN- β de esta solución también está desnaturalizado. La renaturalización de la proteína se consigue por dilución de la solución de HCl de guanidina-IFN- β con una solución tampón, por lo que se obtiene una solución que comprende IFN- β renaturalizado resolubilizado e hidrocloreuro de guanidina residual. El IFN- β de esta solución resultante es monómero, es decir, al menos el 51% está en su forma monómera, preferiblemente al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, más preferiblemente al menos el 90% o más en su forma monómera, como se determina, por ejemplo, por HPLC de dimensionamiento.

Durante las etapas de resolubilización y renaturalización, el HCl de guanidina sirve como un agente solubilizante para aumentar la solubilidad de IFN- β . Por "aumentar la solubilidad" de IFN- β se pretende decir aumentar la cantidad de IFN- β que puede disolverse en solución a pH 3,0 a pH 9,0 en presencia de HCl de guanidina, en comparación con la cantidad de IFN- β que puede disolverse al mismo pH en una solución con los mismos componentes pero que carezca

de HCl de guanidina. La capacidad de HCl de guanidina para aumentar la solubilidad de IFN- β puede determinarse usando métodos muy conocidos en la técnica, incluyendo los descritos aquí.

Puede usarse cualquier tampón adecuado en la etapa de dilución de este método de purificación de la invención para conseguir la renaturalización del IFN- β . Los tampones adecuados de uso en esta etapa incluyen los descritos después, tales como acetato, citrato, fosfato y Tris HCl, cuya elección dependerá del pH deseado de la solución resultante tras la etapa de dilución. Cuando el método de purificación incluye la etapa de precipitación, preferiblemente el tampón usado para la etapa de dilución tiene un pH de 4,0 a 8,0, incluyendo 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 y 8,0, más preferiblemente un pH de 5,0 a 7,0. Después de esta etapa de dilución, preferiblemente la cantidad de HCl de guanidina residual que permanece en la solución de IFN- β renaturalizado resolubilizado es 1,6 M o menos, más preferiblemente 0,8 M o menos.

La solución de IFN- β renaturalizado resolubilizado resultante comprende el IFN- β en su forma monómera (es decir, más del 51% es monómero). Además, la solución de IFN- β renaturalizado resolubilizado comprende una cantidad residual de HCl de guanidina. Esta composición puede utilizarse para preparar formulaciones farmacéuticas que son adecuadas para administración parenteral. De esta manera, el aumentador de solubilidad HCl de guanidina residual puede separarse de la solución de IFN- β renaturalizado resolubilizado por diálisis o diafiltración de esta solución con un tampón aceptable farmacéuticamente. Por "separación de HCl de guanidina residual" se quiere decir que la formulación farmacéutica que comprende IFN- β sustancialmente monómero preparado usando las etapas de este método de purificación comprende HCl de guanidina en una concentración de 10 mM o menos, preferiblemente 5 mM o menos. Puede usarse cualquier tampón aceptable farmacéuticamente para fabricar la formulación farmacéutica en tanto en cuanto el IFN- β permanezca solubilizado y sustancialmente en su forma monómera. En una realización, el tampón aceptable farmacéuticamente comprende arginina o cloruro sódico en una cantidad suficiente para aumentar la producción de la forma monómera de IFN- β en comparación con la producción obtenida en ausencia de arginina o cloruro sódico en el tampón aceptable farmacéuticamente. Para arginina, la cantidad suficiente para aumentar la producción es de 0,2 M a 1,0 M, preferiblemente de 0,4 M a 0,8 M, incluyendo 0,4 M, 0,5 M, 0,6 M, 0,7 M y 0,8 M. En una realización, la cantidad de arginina presente en el tampón aceptable farmacéuticamente es 0,5 M. Para cloruro sódico, la cantidad suficiente para aumentar la producción es de 0,2 M a 1,2 M, preferiblemente de 0,2 M a 1,0 M, más preferiblemente 0,5 M a 1,0 M. En una realización, la cantidad de cloruro sódico presente en el tampón aceptable farmacéuticamente es 1,0 M.

El segundo método de purificación para preparar una composición que comprende IFN- β monómero es similar al primer método, pero proporciona un medio para preparar esta composición sin la etapa de precipitación. Este segundo método comprende dos etapas básicas: (1) mezclar una muestra que comprende IFN- β purificado con hidrocloreuro (HCl) de guanidina para obtener una solución que comprende IFN- β desnaturalizado solubilizado; y (2) renaturalizar el IFN- β , preferiblemente mediante dilución usando un tampón aceptable. El HCl de guanidina sirve como agente de aumento de la solubilidad como se ha indicado antes, y se usa en cantidades similares a las indicadas antes para el primer método de purificación. Así, después de la primera etapa, la cantidad de HCl de guanidina en la solución que comprende IFN- β desnaturalizado solubilizado es HCl de guanidina 6 M a 10 M, preferiblemente 6 M a 9 M, más preferiblemente HCl de guanidina 6 M a 8 M. Como se ha indicado antes, cuando el IFN- β sustancialmente purificado inicial contiene SDS, el SDS precipita en esta etapa y puede filtrarse de la solución usando técnicas de filtración estándares conocidas en la técnica.

Como en el primer método de purificación, el IFN- β de esta solución de HCl de guanidina-IFN- β se desnaturaliza. La renaturalización se consigue por dilución usando un tampón aceptable que tiene un pH en el intervalo de 3,0 a 5,0, preferiblemente 3,0 a 4,0, más preferiblemente 3,0. Los tampones adecuados para esta etapa de dilución para conseguir la renaturalización del IFN- β incluyen glicina, ácido aspártico, ácido glutámico y succinato, acetato, fosfato, formiato y citrato, así como cualesquiera sales de ellos. Después de esta etapa de dilución, preferiblemente la cantidad de HCl de guanidina residual que queda en la solución de IFN- β renaturalizado solubilizado es 1,6 M o menos, preferiblemente 0,8 M o menos, más preferiblemente 0,1 M o menos. Tras la renaturalización, la composición resultante comprende IFN- β sustancialmente monómero, es decir, al menos el 51%, preferiblemente al menos el 70%, está en su forma monómera, como se determina, por ejemplo, usando HPLC de dimensionamiento, usando preferiblemente ultracentrifugación analítica (véase, por ejemplo, Liu y Shire (1999) J. Pharm. Sci. 88:1237-1241, incorporado aquí como referencia). El HCl de guanidina residual de esta solución de IFN- β renaturalizado puede separarse de una manera similar a la indicada para el primer método de purificación para preparar una formulación farmacéutica que comprende IFN- β sustancialmente monómero. Puede utilizarse cualquier tampón aceptable farmacéuticamente como se ha indicado en otras partes aquí siempre que el IFN- β permanezca solubilizado y sustancialmente en su forma monómera. En una realización, el tampón aceptable farmacéuticamente se selecciona del grupo constituido por glicina, ácido aspártico y succinato sódico, preferiblemente glicina, de tal modo que la formulación farmacéutica tenga un pH de 3,0 a 5,0, preferiblemente 3,0 a 4,0, más preferiblemente 3,0.

Así, la forma sustancialmente monómera de IFN- β proporcionada por los métodos de purificación de la presente invención tiene varios usos como se describe en la presente invención. Por ejemplo, esta forma de IFN- β puede usarse directamente para formular composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral como se ha indicado aquí. Tras la etapa de diafiltración o diálisis con un tampón aceptable farmacéuticamente de elección para separar HCl de guanidina residual, las composiciones farmacéuticas resultantes pueden estabilizarse frente a desnaturalización y pérdida de actividad biológica por inclusión de un estabilizante en las composiciones farmacéuticas, que incluye, aunque sin limitarse a ellos, proteínas o hidratos de carbono, escogidos preferiblemente del grupo constituido

por manitol, sorbitol, glicerol, dextrosa, sacarosa y trehalosa, o una mezcla de ellos. En un aspecto adicional de la presente invención, la preparación de IFN- β obtenida de las etapas de diafiltración (o diálisis) y estabilización puede liofilizarse y reconstituirse en un medio vehículo compatible fisiológicamente, no tóxico e inerte para aplicaciones terapéuticas y clínicas.

Las composiciones farmacéuticas se formulan con una concentración conocida de la forma sustancialmente monómera de IFN- β , de tal modo que la administración de una dosis particular promueva una respuesta terapéutica deseada con respecto a un estado de respuesta a IFN- β particular que experimente terapia. Por “respuesta terapéutica deseada” se quiere decir una mejora en el estado o en los síntomas asociados con el estado.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden el IFN- β son útiles en terapia dirigida al tratamiento de estados de respuesta a IFN- β . Por “terapia” quiere decirse tratamiento de un estado normal existente que se aumenta por terapia con IFN- β , tratamiento terapéutico de un estado anormal que responda a IFN- β y procedimientos preventivos o profilácticos que comprenden tratamiento con IFN- β para prevenir o reducir la gravedad de la aparición de un estado anormal. Por “estado que responda a IFN- β ” se quiere decir cualquier estado que responda positiva o negativamente a IFN- β . Tal estado de respuesta a IFN- β puede ser un estado normal. Por ejemplo, un mamífero puede experimentar terapia con IFN- β para aumentar las características de respuesta y/o la capacidad de la respuesta inmune. Tales terapias abarcan el tratamiento para proporcionar protección contra, o modular, la gravedad de infecciones víricas, por ejemplo, virus Dengue o virus Sindbis. Como contraste, el estado de respuesta a IFN- β puede ser un estado anormal tal como melanoma maligno. Tales estados anormales pueden ser crónicos, y tener lugar así más o menos continuamente, o tales estados anormales pueden ser agudos. El estado de respuesta a IFN- β podría ser un estado que podría caracterizarse posiblemente como crónico y agudo, tal como esclerosis múltiple remitente-reincidente. Cualquier trastorno de respuesta a IFN- β puede beneficiarse de la administración de las composiciones farmacéuticas de IFN- β de la presente invención. Los estados de respuesta a IFN- β pueden incluir también trastornos inmunológicos, tales como inmunodeficiencias, incluyendo tolerancia inmune disminuida como resultado de enfermedad o infección o daño a la respuesta inmune resultante de efectos ambientales u otros, tales como quimioterapia u otra exposición a compuestos químicos tóxicos.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración.

Experimental

Los Ejemplos 1 a 7, así como la figura 3, no representan realizaciones de la presente invención, pero se proporcionan para una mejor comprensión de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de IFN- β

Se produjo en *E. coli* IFN- β para uso en estos experimentos esencialmente como se describe en la primera de varias etapas de purificación indicadas en las Patentes de los EE.UU. N° 4.462.940 y/o 4.816.400. Esto es, se usaron bacterias transformadas para producir IFN- β ; las células hospedantes se concentraron, y se rompieron sus paredes celulares. El IFN- β se preparó después según los métodos de la presente invención tras la preparación de un agrupamiento de IFN- β purificado.

El procedimiento básico fue como sigue:

1. Se precipita IFN- β del agrupamiento de IFN- β purificado usando etanol. Se usan seis partes del agrupamiento de IFN- β purificado por cuatro partes de etanol. Esta etapa produce más del 80% del interferón como un glóbulo que puede centrifugarse.
2. Se disuelve después el glóbulo en HCl de guanidina 8 M hasta una solución de aproximadamente 10 mg/ml de proteína. Esta solubilización es rápida; la pequeña cantidad de SDS presente no se solubiliza y se separa por filtración.
3. La solución de HCl de guanidina resultante se diluye después en un tampón 10 mM.

Ejemplo 2

Parámetros de dilución para la etapa de hidrocloreto de guanidina

Se realizaron experimentos iniciales para determinar los parámetros de dilución óptimos para la etapa de dilución de hidrocloreto de guanidina. Se realizó como se indica en la Tabla 1 un experimento a pequeña escala que medía producciones relativas; se obtuvieron los mejores resultados por encima de pH 4,0 y por debajo de hidrocloreto de guanidina 0,8 M después de diluir. La concentración del interferón-beta monómero se determinó usando HPLC de dimensionamiento con un tampón de glicina 400 mM pH 3,0. Los resultados de la Tabla 2 y un conjunto típico de cromatogramas en la Figura 1 muestran que, aunque se obtuvieron a bajos pHs multímeros no covalentes, se obtuvo interferón-beta monómero a pH 5,0 y superior.

ES 2 299 528 T3

TABLA 1

Producción relativa después de dilución de HCl de guanidina (8 M). IFN (~ 10 mg/ml) estimado por HPLC

Tampón 10 mM	pH	Concentración de HCl de guanidina después de dilución			
		0,2 M	0,4 M	0,8 M	1,6 M
Glicina	3	2	2,1	1	1
Acetato sódico	4	13	12,7	6	2
Acetato sódico	5	68	68	33	30
Citrato sódico	6	79	62	43	42
Fosfato sódico	7	82	71	41	48
Tris HCl	8	99	83	40	38

TABLA 2

Porcentaje de agregados después de dilución de HCl de guanidina (8 M). IFN (~ 10 mg/ml) determinado por HPLC

Tampón 10 mM	pH	Concentración de HCl de guanidina después de dilución			
		0,2 M	0,4 M	0,8 M	1,6 M
Glicina	3	78	51	35	39
Acetato sódico	4	<1	3	4	11
Acetato sódico	5	1	1	1	2
Citrato sódico	6	1	1	1	2
Fosfato sódico	7	1	1	1	3
Tris HCl	8	1	2	1	2

Ejemplo 3

Producción de la etapa de dilución de guanidina

El procedimiento se aumentó de escala para evaluar la producción de la etapa de dilución de guanidina. Los resultados de la Tabla 3 muestran que puede obtenerse una producción del 41% al 57% con una dilución de cuarenta veces a pH 6 a 8 con una concentración de proteína final de aproximadamente 0,15 mg/ml. Las concentraciones de SDS en muestras ensayadas fueron menores de 10 microgramos por miligramo de IFN.

TABLA 3

Recuperación de repliegue de HCl de guanidina 8 M (dilución 40x)

Tampón 10 mM	pH	[IFN] mg/ml	Producción %
Citrato sódico	6	0,12	41
Fosfato sódico	7	0,17	57
Tris HCl	8	0,15	52

Ejemplo 4

Separación del HCl de guanidina residual presente después de la dilución por diálisis

Se usó diálisis para separar HCl de guanidina residual presente después de la dilución. A pH 5, la mayor producción, 83%, se obtuvo sin NaCl adicional presente; y a pH 7,0, la mayor producción 70%, se obtuvo con NaCl 1000 mM presente como se muestra en la Figura 2. En todos los casos, hubo precipitación tras la diálisis, aunque la fracción soluble era monómera, como se valoró usando HPLC de dimensionamiento.

Ejemplo 5

Efecto de la agitación en material de IFN- β renaturalizado con hidrocloreuro de guanidina

Un pequeño volumen de IFN- β en tampón que contenía fosfato 1,0 mM (a pH 7,0) y NaCl 100 mM se puso en un tubo sobre un sacudidor de extremo a extremo. Después de aproximadamente 3 horas, alrededor del 50% del material de IFN- β había precipitado. Esto sugiere que se aumentará la estabilización por un tensioactivo adecuado, tal como Tween 80. La adición de Tween 80 estabiliza interferón y aumenta por ello la producción de la etapa de diálisis. Sin embargo, el Tween 80 puede inducir también agregación de una manera dependiente de la concentración, como se muestra en la Figura 3. Estos agregados son solubles. Otros tensioactivos pueden actuar más óptimamente.

Ejemplo 6

Renaturalización de proteína y optimización de la formulación usando un método diseñado factorial

Se evaluó una serie de experimentos para estimar la recuperación de IFN- β durante (1) la desnaturalización de IFN- β en hidrocloreuro de guanidina 8 M; (2) repliegue de IFN- β por una dilución rápida con tampón; y (3) diálisis para separar hidrocloreuro de guanidina residual con y sin arginina presente para obtener una formulación final. La composición de la formulación y las condiciones de las etapas 1-3 se optimizaron usando un experimento diseñado semifactorial. Los mejores resultados se obtuvieron con tampón de NaPO₄ 10 mM pH 7,0 que contenía arginina en la temperatura y concentración de arginina.

Se encontró que el pH, la concentración de IFN- β , la concentración de hidrocloreuro de guanidina después de la dilución y la concentración de arginina eran términos del modelo significativos. Las contribuciones más altas del modelo se obtuvieron de la concentración de IFN- β y arginina. La interacción entre arginina y pH jugó un papel significativo. Los mejores resultados se obtuvieron con tampón de NaPO₄ 10 mM pH 7,0 que contenía arginina en el tampón final. La producción total de las etapas 1-2 fue hasta el 80-100% y la producción de la etapa 3 fue 70-80%.

Ejemplo 7

Separación de SDS y formulación de IFN- β

Sin el uso de precipitación con etanol

Se guardó a 5°C IFN- β -1b purificado (1 l de 1,91 mg/ml en 0,4% de SDS, tampón de acetato 50 mM, pH 5,5). Durante el almacenamiento, parte del SDS presente precipitó. Se mezclaron 250 ml de este material (477,5 mg) con 229 g de hidrocloreuro de guanidina (6 M, volumen total 400 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos usando una barra de agitación magnética. La solución de hidrocloreuro de guanidina/proteína 6 M se filtró después con una Cápsula Sartobran® P (tamaño de poros 0,45 μ m) para separar el SDS precipitado. La concentración de proteína determinada por UV a 280 nm fue 1,02 mg/ml. La producción de proteína fue 406 mg u 85%.

ES 2 299 528 T3

Los 400 ml del material tratado con hidrocloreuro de guanidina se concentraron utilizando un sistema de diafiltración Millipore® Labsoale® TFF (Millipore, Inc.) con dos membranas de polisulfona de 10 kD de 0,1 cm² Pellicon® XL Biomass® (Millipore, Inc.). El volumen tras la etapa de concentración fue 37 ml con una concentración de proteína de 10,3 mg/ml para una producción post-concentración de 381 mg o 93%.

Usando una pipeta de transferencia, se añadieron gradualmente 10 ml (103 mg) de la solución concentrada de hidrocloreuro de guanidina/proteína a 590 ml de solución de glicina 5 mM, pH 3,2. El tampón fue a una agitación rápida usando una barra de agitación magnética; la solución de proteína se añadió directamente al vórtice. Esta dilución de 60 x de la solución de hidrocloreuro de guanidina/proteína 6 M produjo una solución de hidrocloreuro de guanidina/proteína 0,1 M con 0,17 mg/ml. Estos 600 ml se transfirieron a una unidad de diafiltración de escala 500 ml equipada con dos membranas de polisulfona de 10 kD de 0,1 m² Pellicon® II. Esta solución se concentró inicialmente hasta ~ 400 ml a una concentración de proteína de 0,23 mg/ml, y se diafiltró a continuación frente a 9 cambios de volumen (3,6 l) de glicina 5 mM a pH 3,2. El diafiltrado final (402 ml) se midió por UV a 280 nm para una concentración de proteína final de 0,23 mg/ml con una producción de 92,46 mg o el 90% para la etapa de diafiltración, y una producción total del 72% de proteína soluble para el procedimiento de purificación.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una composición que comprende interferón-beta (IFN- β) monómero, cuyo método comprende:

- a) preparar una muestra que comprende IFN- β purificado;
- b) mezclar dicha muestra con hidrócloruro (HCl) de guanidina para obtener una primera solución que comprende IFN- β desnaturalizado solubilizado; y
- c) renaturalizar dicho IFN- β por dilución de dicha primera solución con un primer tampón, en el que dicho primer tampón tiene un pH de 3,0 a 5,0, y en el que se obtiene una solución de IFN- β renaturalizado que comprende IFN- β monómero e HCl de guanidina residual.

2. El método de la reivindicación 1ª, en el que dicho HCl de guanidina residual está presente en dicha solución de IFN- β renaturalizado en una concentración de 1,6 M o menos.

3. El método de la reivindicación 1ª, en el que dicho HCl de guanidina residual está presente en dicha solución de IFN- β renaturalizado en una concentración de 0,8 M o menos.

4. El método de la reivindicación 1ª, en el que dicho HCl de guanidina residual está presente en dicha solución de IFN- β renaturalizado en una concentración de 0,1 M o menos.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, que comprende además la etapa de separar dicho HCl de guanidina residual de dicha solución de IFN- β renaturalizado por diafiltración o diálisis de dicha solución de IFN- β renaturalizado en un segundo tampón, en el que dicho segundo tampón tiene un pH de 3,0 a 5,0 y se selecciona del grupo constituido por glicina, ácido aspártico y succinato sódico.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª, en el que dicho IFN- β está glicosilado o no glicosilado.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, en el que dicho IFN- β se produce recombinantemente.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 7ª, en el que dicho IFN- β es IFN- β humano maduro o una variante del mismo, en el que dicha variante del mismo tiene al menos una identidad de secuencia de aminoácidos del 80% con la secuencia de aminoácidos del IFN- β humano maduro.

9. El método de la reivindicación 8ª, en el que dicha variante del mismo tiene la secuencia de aminoácidos de IFN- β humano maduro con un residuo de serina que sustituye al residuo de cisteína en posición 17 de la secuencia de IFN- β humano maduro.

Figura 1
Cromatogramas de HPLC de dimensionamiento de dilución de HCl de guanidina (8 M)
IFN (~10 mg/ml) hasta guanidina 0,2 M en diversos tampones

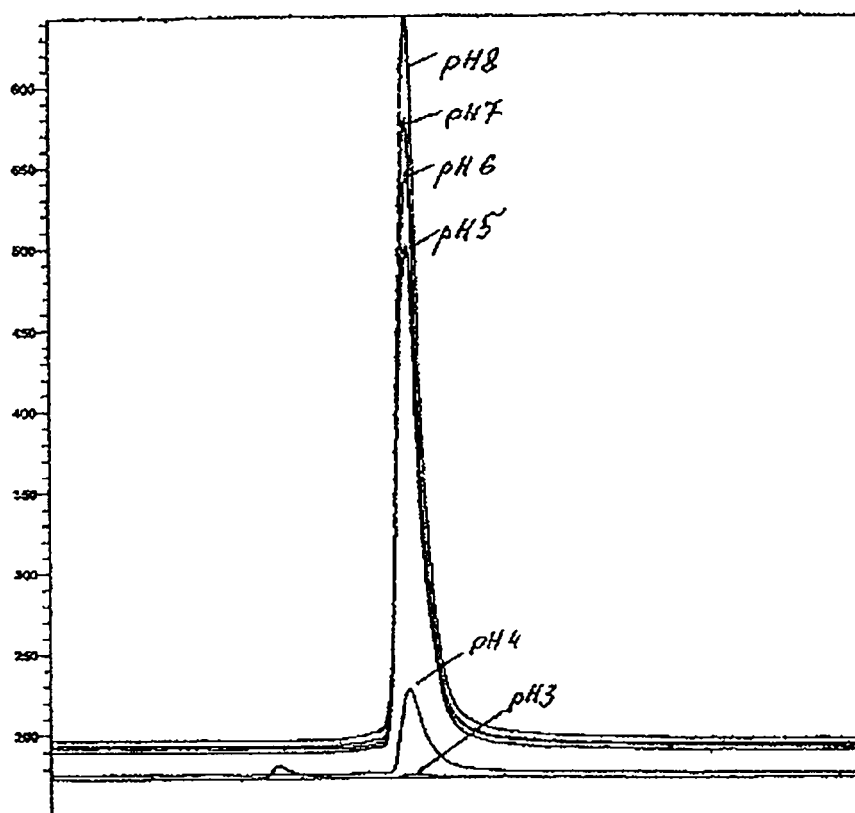


Figura 2
Efecto de sal y pH en la recuperación de IFN de HCl de guanidina 0,4 M,
tampon NaPO_4 10 mM pH 7,0

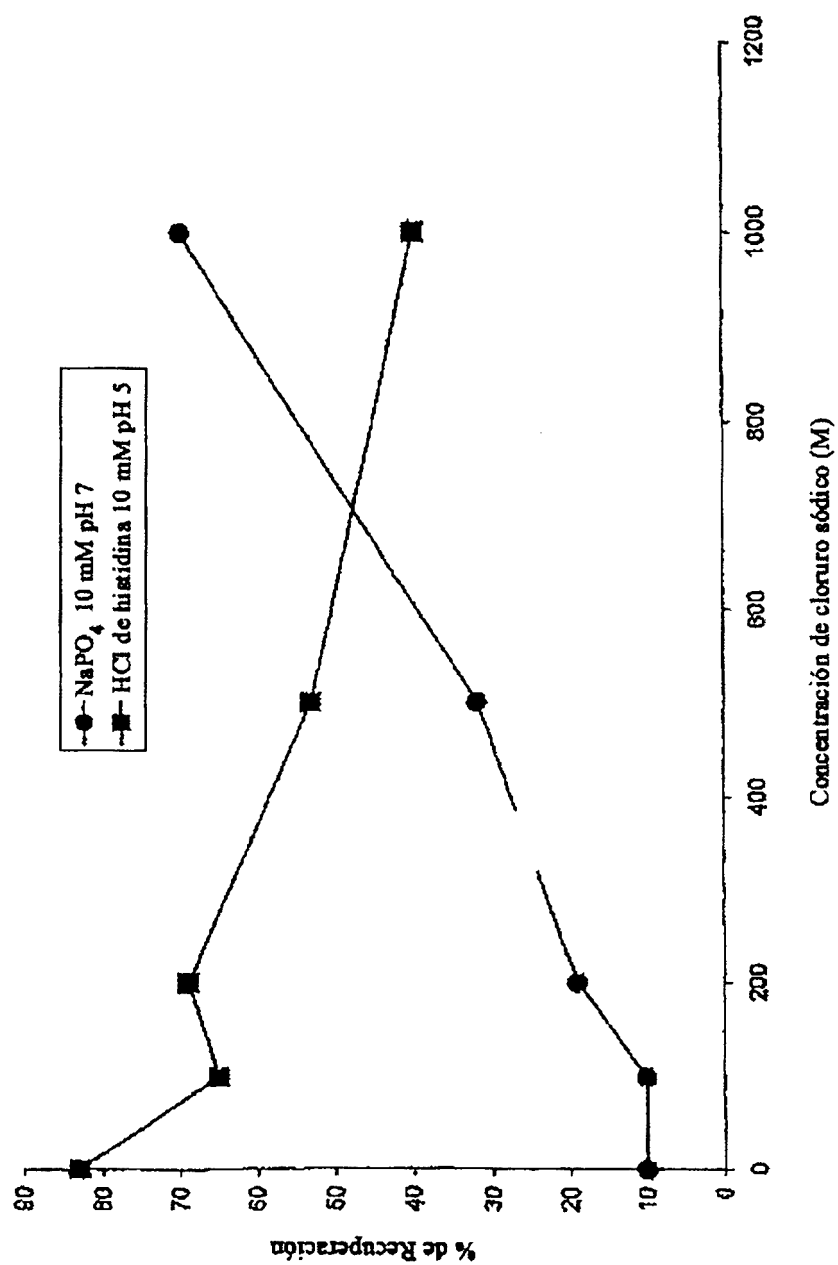


Figura 3
Efecto de Tween 80 (% de concentración) en la agregación de IFN renaturalizado

