



(51) МПК

C07K 14/565 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2008139497/13, 06.10.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.10.2008

(45) Опубликовано: 20.06.2010 Бюл. № 17

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: 2006123543, 10.01.2008. WO 2005054289 A1,
16.06.2005. WO 2005054288 A1, 16.06.2005.
RUSSELL-HARDE D. ET AL., The use of
Zwittergent 3-14 in the purification of
recombinant human interferon-beta Ser17
(Betaseron), J Interferon Cytokine Res., 1995,
v.15, n.1, p.31-37.

Адрес для переписки:

117997, Москва, ГСП-7, В-437, ул. Миклухо-
Маклая, 16/10, ИБХ РАН, патентный отдел

(72) Автор(ы):

Воробьев Иван Иванович (RU),
Пономаренко Наталья Александровна (RU),
Мирошников Анатолий Иванович (RU),
Смирнов Иван Витальевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Учреждение Российской академии наук
Институт биоорганической химии им.
академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН (RU),
Российская Федерация, от имени которой
выступает Федеральное агентство по науке
и инновациям (RU)

(54) СПОСОБ ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА β -1b

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к способу получения рекомбинантного интерферона бета-1b человека. Предложенный способ очистки рекомбинантного интерферона бета-1b человека (рИФН бета-1b) предусматривает оптимизацию процессов отмывания тел включения, их растворения и рефолдинга целевого белка. Очистка рИФН бета-1b человека ведется с использованием в качестве основного детергента цвиттергента 3-14 для отмывки и растворения тел включения E.coli с последующим рефолдингом рИФН бета-1b, после чего осуществляют прехроматографическую обработку образца.

Далее проводят хроматографию на Ceramic S, хроматографию на Source S30 и окисление с использованием смеси цистеамин/цистамина, после чего делают гель-фильтрацию на Superdex 75 Prep grade, хроматографию на Source Q30, гель-фильтрацию на Sephacril S200HR и в конце осуществляют контроль эффективности очистки целевого белка методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Предложенный способ очистки позволяет обеспечить 10% выход целевого белка и получить рИФН бета-1b человека, отвечающий требованиям нормативных документов с высоким уровнем удельной противовирусной активности. 5 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C07K 14/565 (2006.01)*C07K 1/18* (2006.01)*C07K 1/36* (2006.01)*A61K 38/21* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2008139497/13, 06.10.2008**(24) Effective date for property rights:
06.10.2008(45) Date of publication: **20.06.2010 Bull. 17**

Mail address:

117997, Moskva, GSP-7, V-437, ul. Miklukho-Maklaja, 16/10, IBKh RAN, patentnyj otdel

(72) Inventor(s):

**Vorob'ev Ivan Ivanovich (RU),
Ponomarenko Natal'ja Aleksandrovna (RU),
Miroshnikov Anatolij Ivanovich (RU),
Smirnov Ivan Vital'evich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Uchrezhdenie Rossijskoj akademii nauk Institut
bioorganicheskoj khimii im. akademikov M.M.
Shemjakina i Ju.A. Ovchinnikova RAN (RU),
Rossijskaja Federatsija, ot imeni kotoj
vystupaet Federal'noe agentstvo po nauke i
innovatsijam (RU)****(54) METHOD FOR PURIFICATION OF RECOMBINANT INTERFERON β -1b**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: proposed method of purification of human recombinant interferon beta-1b (rIFN beta-1b) provides for optimisation of processes of purification of inclusion bodies, their dissolution and refolding of target protein Purification of human rIFN beta-1b is conducted with zwittergent 3-14 as a main detergent for purification and dissolving of inclusion body of Ecoli with the following refolding of rIFN beta-1b. After that prechromatographic processing of a sample is conducted and after that chromatographic processing of Ceramic S and of

Source S30 and oxidation using a mixture of cysteamine/cystamine are performed. Then gel-filtration on Superdex 75 Prep grade, chromatographic processing on Source Q30, gel-filtration on Sephacril S200HR are made and finally the effectiveness of purification of the target protein by high performance liquid chromatography is monitored.

EFFECT: raise of the target protein yields and obtaining human rIFN beta-1b which meets the requirements of normative documents with high levels of specific antiviral activity.

5 tbl, 3 ex

R U 2 3 9 2 2 8 2 C 1

R U 2 3 9 2 2 8 2 C 1

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к технологии получения рекомбинантного интерферона бета-1b человека, в частности к способу его очистки.

Интерфероны (ИФН) - гетерогенные гликопротеины иммунной системы, обладающие противовирусными, противоопухолевыми и иммуномодулирующими эффектами и различающиеся между собой как источником клеточной продукции, так и проявлениями функциональной активности. ИФН бета с самых первых шагов внедрения его рекомбинантных препаратов был предназначен, главным образом, для противоопухолевой терапии [C. Angelucci et al. Recombinant human IFN-beta affects androgen receptor level, neuroendocrine differentiation, cell adhesion, and motility in prostate cancer cells. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2007, 27(8): 643-52; S. Kohashi et al. Interferon-beta inhibits liver metastases from murine colon 26 carcinoma and its highly metastatic variant. *Surg. Today*, 2007, 37(6): 474-481]. Помимо этого, препараты ИФН бета востребованы для лечения вирусных инфекций, в частности гепатита С, везикулярного стоматита и других [I.M. Pedersen et al. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature*, 2007, 449 (7164): 919-22; J. Feher, G. Lengyel. Interferon in the treatment of viral hepatitis. The interferon was discovered 50 years ago. *Orv. Hetil.*, 2007, 148(33): 1539-43; M.D. Trottier, D.S. Lyles, C.S. Reiss. Peripheral, but not central nervous system, type I interferon expression in mice in response to intranasal vesicular stomatitis virus infection. *J. Neurovirol.*, 2007, 13(5): 433-445]. В последние годы основным направлением применения рИФН бета-1b стали неврологические заболевания, в первую очередь рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания нервной системы, болезнь Бехтерева [M. Kremenchutzky, S. Morrow, C. Rush. The safety and efficacy of IFN-beta products for the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin. Drug Saf.*, 2007, 6(3): 279-88; S. Pay et al. Dendritic cell subsets and type I interferon system in Behçet's disease: does functional abnormality in plasmacytoid dendritic cells contribute to Th1 polarization? *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2007, 25 (4 Suppl 45): S34-40]. Отмечена клиническая эффективность рИФН бета-1b при терапии стероидоустойчивого язвенного колита, гломерулонефрита, хронического панкреатита [S.C. Satchell et al. Interferon-beta Reduces Proteinuria in Experimental Glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2007, 18(11): 2875-84; R. Talukdar, R.K. Tandon. Pancreatic stellate cells: New target in the treatment of chronic pancreatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2007].

Среди препаратов ИФН бета наибольшее признание на мировом фармацевтическом рынке заслужили рекомбинантный ИФН бета-1b, или Бетаферон (Schering AG, Germany), и в меньшей степени ИФН бета-1a, в частности Авонекс (Gedeon Richter, Hungary). Помимо особенностей фармакологического действия каждого из этих препаратов, имеющих свою фармадинамику и свои показания для назначения пациентам, следует отметить, что у препарата ИФН бета-1b есть определенные преимущества, которые определили на него больший спрос. При оценке этих преимуществ исследователи отмечают, в частности, его неспособность, в отличие от ИФН бета-1a, к индукции нейтрализующих антител [P. Barbero et al. Every-other-day interferon beta-1b versus once-weekly interferon beta-1a for multiple sclerosis (INCOMIN Trial) II: analysis of MRI responses to treatment and correlation with Nab. *Mult. Scler.*, 2006, 12(1): 72-76], меньшую выраженность болевых ощущений и местной реакции на инъекционное введение ИФН бета-1b [K. Baum et al. Comparison of injection site pain and injection site reactions in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1a or 1b. *Mult. Scler.*, 2007, 13(9): 1153-1160], а также различия в технологии получения этих препаратов: рекомбинантный ИФН бета-1a получают на клетках яичника китайских хомячков, то есть в эукариотической системе, а

рекомбинантный ИФН бета-1b можно получать и в прокариотической системе с использованием штамма-продуцента E.coli [F.P. McCormick et al. Human interferon-.beta. (IFN-.beta.) produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells. United States Patent 5,795,779 August 18, 1998; A. Whitty et al. Interferon-beta fusion proteins and uses. United States Patent 6,800,735, October 5, 2004].

Технологии получения и очистки рИФН β -1b посвящено много патентных исследований, в их числе: US Patent 5,795,779, August 18, 1998 (McCormick et al. Human interferon-.beta. (IFN-.beta.) produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells); US Patent 6,323,006, November 27, 2001 (Peregrino Ferreira et al. Recombinant human beta-CIS interferon); US Patent 4,894,330, January 16, 1990 (Hershenson et al. Purification of recombinant beta-interferon incorporating RP-HPLC); US Patent 5,004,605, April 2, 1991 (Hershenson et al. Low pH pharmaceutical compositions of recombinant .beta.-interferon); US Patent 6,923,956, August 2, 2005 (Tschope et al. Liquid interferon-.beta. formulations); RU 2006 123 539 А (Парк Дзи-Соок и др. Способ очистки интерферона бета).

Известен способ получения рекомбинантного интерферона бета-1b (рИФН бета-1b) человека в нерастворимой форме - в виде тел включения (пат. РФ № 2261913, МПК C12N 15/22, опубл. 2005)

По сравнению с растворимой формой экспрессия белка в виде тел включения имеет ряд преимуществ - нерастворимые агрегаты белка не проявляют токсического действия, практически не атакуются протеазами, с высоким выходом выделяются центрифугированием. В то же время существуют проблемы низкого выхода активного корректно сложенного белка после проведения рефолдинга в процессе очистки рИФН бета-1b, что определяется пространственной структурой последнего [M. Karpusas et al. The crystal structure of human interferon b at 2.2-Å resolution. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1997. Vol.94. P.1 1813-11818].

Известен способ очистки рИФН бета-1b и использованием детергента додецилсульфат натрия при его получении в нерастворимой форме (Патент США 4,530,787, 1985).

Однако при относительно низкой токсичности этого препарата использование додецилсульфата натрия в технологическом процессе сопряжено с целым рядом препятствий: это соединение вызывает значительную денатурацию целевого белка, его не удается удалить из раствора, что в свою очередь делает невозможной последующую ионообменную хроматографию, необходимую для дальнейшего процесса очистки рИФН бета-1b.

Известен способ очистки рИФН бета-1b, позволяющий избежать указанных недостатков применением в качестве детергента цвиттергента 3-14, который не обладает денатурирующими свойствами, не образует ионных связей, является рН-независимым, может быть удален из раствора, делает возможной ионообменную хроматографию [Russell-Harde D., Knauf M., Croze E. The use of Zwittergent 3-14 in the purification of recombinant human interferon-beta Ser17 (Betaseron). // J. Interferon Cytokine Res. - 1995. - Vol.15(1). - P.31-37].

Известен наиболее близкий к заявленному способ очистки рИФН бета-1b из растворимого состояния с использованием аффинной хроматографии, катионно-обменной хроматографии и диафильтрации (Заявка РФ № 2006123543. «Способ очистки интерферона бета»).

Однако в этом способе не учитывается возможность получения названного препарата из тел включения E.coli и не охарактеризованы связанные с этим особенности его очистки.

Изобретение решает задачу оптимизации условий очистки рИФН бета-1b на этапах отмывки и растворения тел включения E.coli, продуцирующей рекомбинантный интерферон бета-1b человека, в ходе технологического процесса рефолдинга целевого белка, а также при окислении последнего.

Заявляемый способ очистки рекомбинантного интерферона бета-1b из тел включения E.coli предусматривает следующие основные стадии: (1) отмывка тел включения; (2) растворение тел включения; (3) рефолдинг целевого белка; (4) прехроматографическая подготовка образца; (5) хроматография на Ceramic S; (6) хроматография на Source S30; (7) окисление; (8) гель-фильтрация на Superdex 75 Prep grade; (9) хроматография на Source Q30; (10) гель-фильтрация на Sephacril S200HR; (11) контроль эффективности очистки целевого белка методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с последующим стандартным определением его противовирусной активности.

Отличительными особенностями заявляемого способа являются:

- в ходе отмывки тел включения навеску размороженных тел включения ресуспендировали в 10 мл 2% водного раствора цвиттергента 3-14;

- раствор для рефолдинга целевого белка содержит 20 мМ Трис-HCl, pH 9.0, 0,2% полиэтиленгликоль (PEG) 3550, 300 мМ NaCl, 2 мМ восстановленного глутатиона (GSH), 1 мМ окисленного глутатиона (GSSG), 2 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), 0,05% цвиттергента 3-14;

- в ходе предхроматографической подготовки образца используют буфер Б следующего состава: 25 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 0,05% цвиттергент 3-14, 0,5 мМ фенилметансульфонил-флуорида (PMSF);

- в процессе хроматографии используют буферы: (1) 25 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 0,05% цвиттергент 3-14, 0,5 мМ PMSF; (2) 25 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 50 мМ NaCl, 0,05% цвиттергент 3-14, 0,5 мМ PMSF; (3) 25 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 1 М NaCl, 0,05%

Цвиттергент 3-14, 0,5 мМ PMSF;

- для окисления целевого белка используют смесь цистеамин/цистамина в концентрации 1 мМ/0,1 мМ.

Контроль выхода и активности рекомбинантного интерферона бета-1b после очистки показал соответствие следующим критериям: выход 10%, мультимеры по гель-фильтрации <5%, родственные белки по обращенно-фазовой хроматографии <5%, родственные белки по электрофорезу в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ) <5%, белки штамма-продуцента по иммуноферментному анализу (ИФА) <5 нг/мг, эндотоксины по LAL-тесту (тесту с применением "Limulus Amebocyte Lysate" - лизата клеток краба-мечехвоста) <5 ЭЕ/мг (эквивалентных единиц на 1 миллиграмм), удельная активность интерферона бета-1b 32 млн МЕ/мг (Международных Единиц на 1 миллиграмм).

Изобретение иллюстрируют примеры.

Пример 1. Оптимизация рефолдинга и окисления рекомбинантного интерферона бета-1b из тел включения E.coli с использованием цвиттергента 3-14

Целесообразность использования цвиттергента 3-14 в процессе растворения и рефолдинга рекомбинантного интерферона бета-1b из тел включения E.coli потребовала оптимизации условий их выполнения. С этой целью были составлены полуэмпирические формулы, и на их основе осуществлен подбор оптимального соотношения ингредиентов в процессе рефолдинга целевого белка и его окисления из предполагаемого интервала значений, как это представлено в таблицах 1-2 и формулах 1-2.

Таблица 1

Определение общего соотношения параметров ингредиентов в процессе рефолдинга рИФН бета-1b

Переменная	Описание	Верхнее значение	Нижнее значение
A	pH	7,5	9,0
B	Полиэтиленгликоль 3550	0%	0,1%
C	Мочевина	0 М	
D	NaCl	50 мМ	300 мМ
E	Цистеамин/цистамина	1 мМ/0,3 мМ	1 мМ/0,1 мМ
F	Цвиттергент 3-14		25%
G	Температура	10°C	

Формула 1. Общее соотношение параметров ингредиентов с обозначением их взаимозависимости:

$$R = 0,26 - \boxed{0,003 \cdot A + 0,01 \cdot B} - \boxed{0,02 \cdot C} + 0,01 \cdot E + \boxed{0,26 \cdot F} - \boxed{0,01 \cdot G} - \boxed{0,02 \cdot A \cdot B}$$

Таблица 2

Определение соотношения параметров ингредиентов в процессе окисления ИФН бета-1b

Переменная	Описание	Верхнее значение	Нижнее значение
A	pH	7,5	9,0
B	Полиэтиленгликоль 3550	0%	0,1%
D	NaCl	50 Мм	300 Мм
E	Цистеамин/цистамина	1 Мм/0,3 Мм	1 Мм/0,1 Мм

Формула 2. Соотношение изолированной группы параметров с обозначением их взаимозависимости:

$$R = 0,5 + \boxed{0,001 \cdot A} + \boxed{0,01 \cdot B + 0,03 \cdot C} - \boxed{0,01 \cdot D + 0,03 \cdot A \cdot D} - \boxed{0,02 \cdot B \cdot C}$$

В конечном итоге были установлены следующие финальные параметры выполнения рефолдинга и окисления ИФН бета-1b:

- Цвиттергент 3-14: 0,05%;
- Трис-НСl, 10 мМ: pH 7,5;
- Температура: +10°C;
- Nacl: 50 мМ;
- ЭДТА-Na: 1 мМ;
- Цистеамин/цистамина: 1 мМ/0,1 мМ.

Соблюдение этих условий позволяло добиваться 70% выхода целевого белка после осуществления рефолдинга и 10% выхода после полного цикла очистки.

Пример 2. Очистка рекомбинантного интерферона бета-1b из тел включения E.coli. Отмывка, растворение и рефолдинг тел включения. В процессе растворения и рефолдинга тел включения использовался буфер А следующего состава: 7 М гуанидин хлорид, 20 мМ дитиотреитол (DTT), 0,5 мМ PMSF.

Навеску размороженных тел включения (500 мг) ресуспендировали в 10 мл 2% водного раствора цвиттергента 3-14, суспензию перемешивали в течение 10-15 мин при комнатной температуре и центрифугировали при ускорении 500g и температуре 4°C 15 минут. Супернатант удаляли и повторяли процедуру центрифугирования. Выход по белку на этой стадии ~50-60%.

250 мг отмытых телец включения ресуспендировали в 2,5 мл буфера А, суспензию инкубировали 2 часа при 60°C. Нерастворившийся материал удаляли центрифугированием с ускорением 12000g при температуре 4°C 10 мин.

Готовили раствор для рефолдинга (указаны конечные концентрации компонентов, конечный объем 50 мл) - 20 мМ Трис-НСl, pH 9,0, 0,2% PEG 3550, 300 мМ NaCl, 2 мМ

восстановленного глутатиона (GSH), 1 мМ окисленного глутатиона (GSSG), 2 мМ ЭДТА, 0,05% цвиттергент 3-14 - и добавляли в него растворенные в буфере А тела включения. Полученный раствор перемешивали и инкубировали при 10°C в течение

ночи.

Предхроматографическая подготовка образца. Использовался буфер Б следующего состава: 25 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 0,05% цвиттергент 3-14, 0,5 мМ PMSF.

Полученный в растворе образец разбавляли буфером Б в 6 раз, выпавший осадок удаляли центрифугированием (14000g, 20 мин, 4°C). В супернатанте доводили рН и проводимость до соответствующих значений буфера Б, после чего его концентрировали до исходного объема на ультрафильтрационной ячейке Amicon (мембрана РМ-10) и затем центрифугировали (14000g, 10 мин, 4°C).

Хроматографическая очистка рИФН бета-1b, его окисление и гель-фильтрация. Для стабильности процесса очистки на данном этапе использовались буферы: Б - 25 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 0,05% цвиттергент 3-14, 0,5 мМ PMSF; В - 25 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 50 мМ NaCl, 0,05% цвиттергент 3-14, 0,5 мМ PMSF; Г - 25 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 1 М NaCl, 0,05% цвиттергент 3-14, 0,5 мМ PMSF.

Подготовленный образец растворенных тел включения вводили (3 мл/мин) на колонку HyperD Ceramic S (Ciphergen, 10/100 мм, максимальное давление 30 атм), уравновешенную 10 объемами буфера Б. Оптическую плотность элюата контролировали спектрофотометрически на длине волны 280 нм. Проскок в объеме нанесенного образца (50 мл) собирали и связавшиеся примесные вещества удаляли промывкой 3 объемами буфера Г. Колонку регенерировали 1 объемом 100 мМ NaOH и уравнивали стартовым буфером (Б).

Порцию образца (10 мл) наносили на колонку Source S30 (10/100 мм, максимальное давление 30 атм, 2,5 мл/мин), уравновешенную 10 объемами буфера Б, собирая проскок. Колонку промывали 2-5 объемами буфера Б и элюировали связавшийся материал градиентом концентрации NaCl (0-500 мМ, 5 объемов колонки, 3 мл/мин). Оптическую плотность элюата контролировали спектрофотометрически на длине волны 280 нм. Собирали фракцию, выходящую в 150-200 мМ NaCl. Перед нанесением следующей порции образца колонку регенерировали 1 объемом 100 мМ NaOH и уравнивали стартовым буфером (Б). Процедуру повторяли для объединенного проскока с колонки Source S30.

Собранные фракции рИФН бета-1b объединяли и в полученный раствор добавляли цистеамин/цистамин до концентрации 1 мМ/0,1 мМ. Образец инкубировали в течение ночи при 4°C, центрифугировали (12000g, 4°C, 10 мин) и супернатант концентрировали до 1,5 мл на ультрафильтрационной ячейке Amicon (мембрана РМ-10).

Образец окисленного рИФН бета-1b (1,5 мл) вводили на колонку Superdex 75 Prep grade (16/500 мм, 13000 т.т./м, максимальное давление 5 атм), уравновешенную буфером В. Разделение вели в буфере В, на скорости 30 см/ч. Оптическую плотность элюата контролировали спектрофотометрически на длине волны 280 нм (нанометров). Собирали основную фракцию (время удерживания 39,25 мин).

Образец рИФН бета-1b наносили на колонку Source Q30 (10/100 мм, максимальное давление 30 атм (атмосфер), 2,5 мл/мин), уравновешенную 10 объемами буфера В, собирая проскок. Колонку промывали 2-5 объемами буфера В и элюировали связавшийся материал градиентом концентрации NaCl (50-1000 мМ, 10 объемов колонки, 4 мл/мин). Оптическую плотность элюата контролировали спектрофотометрически на длине волны 280 нм. Собирали фракцию, выходящую в 200-300 мМ NaCl. Колонку регенерировали промывкой 1 объемом 100 мМ HCl.

Собранную фракцию концентрировали до 1 мл на ультрафильтрационной ячейке Amicon (мембрана PM-10).

Образец рИФНβ-1b (1 мл) вводили на колонку Sephacryl S200HR (16/600 мм, >5000 т.т./м, максимальное давление 1,5 атм), уравновешенную буфером В. Разделение вели в буфере В на скорости 15 см/ч. Оптическую плотность элюата контролировали спектрофотометрически на длине волны 280 нм. Собирали основную фракцию (время удерживания 95,3 мин).

Пример 3. Контроль эффективности способа очистки рекомбинантного интерферона β-1b из тел включения E.coli

Эффективность предложенного способа очистки рИФНβ-1b контролировалась в процессе получения 11 партий опытных образцов препарата с последующим определением их противовирусной активности. Протоколы получения двух опытных партий представлены в таблицах 3 и 4.

При получении опытной партии S4/2401 количество тел включения E.coli до отмывки составляло 500 мг, после отмывки - 230 мг. Конечное содержание рИФН бета-1b составляло 1,88 мг (10%).

В процессе получения опытной партии S4/1301 количество тел включения E.coli до отмывки составляло 1000 мг, после отмывки - 460 мг. Конечное содержание рИФН бета-1b составляло 3,76 мг (10%).

Оценку биологической (антивирусной) активности 11 образцов рекомбинантного ИНФ бета-1b проводили в диплоидной культуре фибробластов человека M27 (НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова РАМН). В качестве тест-вируса использовали вирус энцефаломиокардита мышей (ЕМС) в количестве 100 ЦТД₅₀ (цитотоксическая доза, вызывающая цитотоксический эффект у 50% образцов клеточных культур). За единицу активности ИФН принимали величину, обратную его разведению, при которой наблюдается 50% защита клеток от цитодеструктивного действия, вызванного репликацией тест-вируса. Контролем служил образец препарата «Бетаферон» (Schering AG, USA). Протокол титрования представлен в таблице 5.

Таблица 3								
Протокол получения опытной партии S4/2401 рИФН бета-1b								
№ п/п	Объем, мл	Стадия процесса	Чистота по ВЭЖХ, %	Кол-во по ВЭЖХ, мг	Выход стадии по ВЭЖХ, %	Общий выход, %	LAL, ЕЭ/мг	Белки E.coli, нг/мг
1	20	Исходные тела включения	-	18,8	-	100%	-	-
2	9	Отмытые тела включения	-	11,1	59%	59%	-	-
3	211	Солюбилизация в цвиттергенте 3-14	-	5,6	51%	30%	-	29472
4	40	Хроматография на Source S30	-	4,0	72%	22%	-	1705,1
5	40	Окисление	91%	3,9	96%	21%	-	897,63
6	15	Гель-фильтрация на Superdex 75	95,6%	2,4	62%	13%	-	1532,6
7	24	Хроматография на Source Q30	95,1%	2,4	97%	12%	-	1645,6
8	8	Гель-фильтрация на Sephacryl S200HR	97,9%	2,1	88%	11%	-	1413,7
9	50	Хроматография на Source C4/G25	-	1,88	71%	10%	-	-
10	Готовая форма						3	3,4

Таблица 4								
Протокол получения опытной партии S4/1301 рИФН бета-1b								

№ п/п	Объём, мл	Стадия процесса	Чистота по ВЭЖХ, %	Кол-во по ВЭЖХ, мг	Выход стадии по ВЭЖХ, %	Общий выход, %	LAL, ЕЭ/мг	Белки E.coli, нг/мг
1	40	Исходные тела включения	-	37,6	-	100%	-	-
2	18	Отмытые тела включения	-	22,2	59%	59%	-	-
3	200	Рефолдинг	-	18,2	82%	48%	-	-
4	200	Обессоливание/концентрирование	-	16,3	90%	43%	-	29472
5	20	Хроматография на Source S30	-	11,3	69%	30%	-	1705
6	5,5	Окисление/концентрирование	59,8	12,0	107%	32%	-	897,6
7	27	Гель-фильтрация на Superdex 75	90,7	8,4	70%	22%	-	1533
8	30	Хроматография на Source Q30	87,9	6,7	79%	18%	-	1646
9	7,5	Гель-фильтрация на Sephacril S200HR	97,0	4,7	71%	13%	-	1414
10	4,5	Хроматография на Source C4/G25	96,5	3,76	68%	10%	-	-
11	5	Готовая форма					3	3,4

Таблица 5

Результаты титрования образцов рИФНβ-1b				
Образцы рИФНβ-1b	Содержание ИФН	В объеме	Титр интерферона, Ед/0,2 мл	Средняя удельная активность
№1	0,023 мг	0,5 мл	6,4×10 ⁵	32×10 ⁶ МЕ/мг
№2	0,023 мг	0,5 мл	7,56×10 ⁵	
№3	0,023 мг	0,5 мл	6,4×10 ⁵	
№4	0,023 мг	0,5 мл	7,56×10 ⁵	
№5	0,023 мг	0,5 мл	8,2×10 ⁵	
№6	0,023 мг	0,5 мл	7,56×10 ⁵	
№9	0,023 мг	0,5 мл	7,56×10 ⁵	
№10	0,023 мг	0,5 мл	7,56×10 ⁵	
№11	0,023 мг	0,5 мл	6,4×10 ⁵	
Контроль (Бетаферон)	0,023 мг	0,5 мл	6,4×10 ⁵	30×10 ⁶ МЕ/мг

Как показывают протоколы исследований, предлагаемый оптимизированный способ очистки позволяет получить субстанцию рИФН бета-1b в полной мере отвечающей требованиям нормативных документов, при этом полученный рИФН бета-1b по удельной противовирусной активности не уступает зарубежному аналогу Бетаферону. В целом предлагаемый способ очистки тел включения E.coli позволяет получить субстанцию рИФН бета-1b со следующими показателями:

- выход целевого белка: 10%;
- мультимеры по гель-фильтрации: <5%;
- родственные белки по обращенно-фазовой хроматографии: <5%;
- родственные белки по ДСН-ПААГ: <5%;
- белки штамма-продуцента по ИФА: <5 нг/мг;
- эндотоксины по ЛАЛ-тесту: <5 ЭЕ/мг;
- удельная активность: 32 млн МЕ/мг.

Формула изобретения

Способ очистки рекомбинантного интерферона β-1b из тел включения E.coli, включающий отмывку тел включения в 10 мл 2%-ного водного раствора цвиттергента 3-14 с последующим удалением нерастворившегося материала центрифугированием с использованием промывочного буферного раствора с pH 7,5, растворение тел включения в буфере, содержащем 7 М гуанидинхлорида, 20 мМ дитиотреитола и 0,5 мМ фенилметансульфонилфлуорида, рефолдинг целевого белка в

растворе, содержащем 20 мМ Трис-НСl, рН 9,0, 0,2% полиэтиленгликоля 3550, 300 мМ NaCl, 2 мМ восстановленного глутатиона, 1 мМ окисленного глутатиона, 2 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты и 0,05% Цвиттергента 3-14 с последующими
5 прехроматографической подготовкой образца с использованием буфера, содержащего 25 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 0,05% Цвиттергент 3-14, 0,5 мМ фенилметансульфонилфлуорида, хроматографией на Ceramic S с использованием буфера, содержащего 25 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 0,05% Цвиттергента 3-14, 0,5 мМ фенилметансульфонилфлуорида, хроматографией на Source S30 с использованием
10 буфера, содержащего 25 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 0,05% Цвиттергента 3-14, 0,5 мМ фенилметансульфонилфлуорида, окислением смесью цистеаминна с цистамином в концентрации 1 мМ/0,1 мМ соответственно, гель-фильтрацией на Superdex 75 Prep grade с использованием буфера, содержащего 25 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 50 мМ NaCl, 0,05% Цвиттергента 3-14, 0,5 мМ фенилметансульфонилфлуорида, хроматографией на Source
15 Q30 с использованием буфера, содержащего 25 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 50 мМ NaCl, 0,05% Цвиттергента 3-14, 0,5 мМ фенилметансульфонилфлуорида и гель-фильтрацией на Sephacril S200HR с использованием буфера, содержащего 25 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 50 мМ NaCl, 0,05% Цвиттергента 3-14, 0,5 мМ фенилметансульфонилфлуорида, а
20 контроль эффективности очистки целевого белка методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с последующим стандартным определением его противовирусной активности.

25

30

35

40

45

50