

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 22617

(54) Procédé pour la purification d'interféron et interféron ainsi obtenu.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). A 61 K 45/02.

(22) Date de dépôt..... 22 octobre 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : Pays-Bas, 23 octobre 1979, n° 79.07791.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 18 du 30-4-1981.

(71) Déposant : Fondation dite : STICHTING REGA VZW, résidant en Belgique.

(72) Invention de : Jochen Wilhelm Heine et Alfons Josef Denis Alida Billiau.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Bureau D. A. Casalonga,
8, av Percier, 75008 Paris.

Procédé pour la purification d'interféron et
interféron ainsi obtenu.

5 L'interféron est une glycoprotéine produite par les
cellules vivantes pour se défendre contre les infections
virales. Sa structure chimique peut varier légèrement en
fonction du type de cellule qui est utilisée pour sa produc-
tion. Cet interféron a diverses activités biochimiques telles
10 que des activités antivirales, antiprotozoaires, inhibitrices
de la croissance des cellules et immunosuppressives et peut
par conséquent être appliqué avec succès en médecine. En ce
qui concerne une revue générale des connaissances actuelles
sur l'interféron, on peut se référer au livre "Interferons
15 and their actions" by W.E. Stewart II, CRC Press, Inc.,
Cleveland, Ohio.

Pour l'application médicale chez l'homme, l'interféron
doit être préparé à partir de cellules humaines et les
procédés suivants pour cette préparation sont utilisés actu-
20 ellement :

1. Production par infection de leucocytes fraîchement
recueillis provenant de donneurs de sang humains avec le virus
Sendai. Ceci donne ce qu'on appelle "l'interféron de leucocytes"
comme décrit par Cantell et collaborateurs, In Vitro, 3 35-38,
25 (1974).

2. Production sur des cellules de fibroblastes diploïdes
humaines cultivées à l'aide de ce qu'on appelle "plan de
super-induction poly-I:C". L'interféron de fibroblastes résul-
tant diffère de l'interféron de leucocytes par plusieurs
30 critères biologiques et physicochimiques (voir A. Billiau et
coll., J. Gen. Virol., 19, 1-8, (1973)).

3. Production dans les lignes de cellules lymphoblas-
toïdes d'un inducteur d'interféron viral. L'interféron de
lymphoblastes résultant ressemble fortement à l'interféron
de leucocytes (voir Strander et coll., J. Clin. Microbiol.,
35 1, 116-117, (1975)).

La présente invention concerne l'interféron de fibro-
blastés humain, c'est-à-dire l'interféron produit par le

deuxième des procédés mentionnés ci-dessus, et plus spécifiquement elle concerne un procédé pour la purification de cet interféron.

5 La purification de l'interféron est nécessaire à la fois pour étudier les propriétés chimiques de l'interféron et pour son application clinique puisque une solution d'interféron brute peut contenir des protéines contaminantes qui ont un effet négatif sur les résultats de ces études et de cette application.

10 Pour les deux buts envisagés, il faut d'assez grandes quantités d'interféron purifié. Bien qu'un grand nombre de techniques pour la purification partielle et quelques procédés pour la purification complète de l'interféron aient été décrits, tous comportent des défauts. Ces défauts sont en général soit
15 l'obligation d'utiliser des absorbants ou des réactifs complexes, soit d'utiliser un procédé à nombreux stades, qui n'est pas applicable à une production à grande échelle, soit le fait que seulement une petite fraction de l'activité initiale totale de l'interféron est récupérée sous forme purifiée.

20 Par conséquent, on a besoin d'avoir un procédé de purification d'interféron, et particulièrement un procédé de purification d'interféron de fibroblastes humain qui conduit à une grande récupération de l'activité sous forme purifiée, qui ne nécessite pas de réactifs complexes ou une complexité
25 de stades, et qui est capable d'être utilisé sur une échelle assez grande.

Comme résultat de leurs recherches intenses, les auteurs de la présente invention ont maintenant découvert qu'une récupération élevée de l'activité interféron sous la
30 forme d'interféron complètement purifié peut être obtenu en traitant l'interféron de fibroblastes humain avec un procédé de purification simple en deux stades qui est une combinaison des deux premières méthodes connues. Ce procédé de purification en deux stades consiste (a) à soumettre une solution aqueuse
35 d'interféron à la chromatographie sur perles de verre poreuses, et (b) à soumettre la solution aqueuse d'interféron résultante à la chromatographie sur un chélate de zinc immobilisé.

Si, dans le premier stade, une solution d'interféron

contenant des protéines contaminantes est mise en contact avec les perles de verre poreuses à pH neutre ou légèrement alcalin, l'interféron sera sélectivement adsorbé sur ces perles de verre et l'ensemble des protéines contaminantes restera dans la solution et pourra être éliminé par lavage. L'interféron adsorbé pourra être élué ensuite des perles de verre à un pH acide.

Si ensuite, dans le second stade, la solution d'interféron éluée est mise en contact avec un gel de chélate de zinc immobilisé à pH neutre ou légèrement alcalin, l'interféron sera sélectivement adsorbé sur ce chélate de zinc et les protéines contaminantes qui pourraient être encore présentes resteront en solution et pourront être éliminées par lavage. L'interféron adsorbé peut ensuite être élué du chélate de zinc à pH acide et il en résultera un produit final extrêmement pur.

En utilisant ce procédé de purification en deux stades, un haut degré de purification peut être atteint puisque le produit final possède une si grande pureté qu'il peut être considéré comme étant pratiquement complètement pur. En outre, une récupération importante de l'activité interféron initiale peut être obtenue. Cette récupération sera d'environ 50 à 70% dans le premier stade, et de 90 à 95% dans le second stade donnant ainsi une récupération totale d'environ 45 à 67%.

Un avantage spécial est dû au fait que le produit final du procédé de purification de la présente invention sera exempt de tout agent réactif pour la peau. Les produits obtenus avec les premier procédés de purification entraînent toujours des réactions de la peau après application clinique aux malades, mais il est apparu que le produit de la présente invention n'entraîne pas de telles réactions et ceci est extrêmement important pour l'utilisation clinique.

Un autre avantage provient du fait que les réactifs sont facilement accessibles et peuvent être utilisés un grand nombre de fois successives puisque aussi bien les perles de verre que le chélate de zinc immobilisé peuvent être récupérés ou régénérés après usage. En outre, le procédé de la présente invention n'utilise que deux stades et tous ces faits donnent

un procédé simple qui peut être utilisé sur une assez grande échelle.

Donc la présente invention fournit un procédé pour la purification d'interféron qui consiste (a) à soumettre
5 une solution aqueuse d'interféron de fibroblastes humain à la chromatographie sur perles de verre poreuses, et (b) à soumettre la solution d'interféron obtenue à la chromatographie sur chélate de zinc immobilisé.

Il faut remarquer ici que les deux stades du procédé
10 de la présente invention sont connus par eux-mêmes et ont été utilisés antérieurement pour la purification d'interféron de fibroblastes humain. Voir A. Billiau et coll., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 16, 49-55 (1979) pour le premier stade, et V.G. Edy et coll., J. Biol. Chem. 252, 5934-5935 (1977) pour le
15 second stade. Au moment de ces publications, cependant, lesdits stades étaient utilisés complètement séparés et il n'y avait rien qui puisse faire penser qu'une purification pratiquement complète pouvait être réalisée en combinant ces stades dans un procédé simple à deux stades.

En outre, plusieurs autres procédés étaient connus
20 pour la purification d'interféron mais il était difficile de prévoir qu'une combinaison des deux stades susmentionnés conduirait au résultat désiré sans être obligé d'ajouter des stades supplémentaires. De plus, l'absence de toute réactivité
25 avec la peau dans les produits finis du procédé de la présente invention peut être considérée comme surprenante et inattendue parce que jusqu'ici tout interféron de fibroblastes purifié montrait encore cette réactivité de la peau par application clinique au malade (Voir A. Billiau et coll., Antimicrobial
30 Agents and Chemotherapy, 16, 56-63 (1979)).

En outre, il faut remarquer que la combinaison des deux stades dans un procédé à deux stades a conduit à une légère modification du premier; dans la mesure où l'éluat des perles de verre est concerné, dans le premier article de Billiau
35 mentionné ci-dessus cet éluat est dialysé contre le polyéthylène-glycol dans un tampon acétate de sodium afin de le préparer pour la lyophilisation et à l'usage clinique; toutefois, dans la présente invention cet éluat sera dialysé contre

un tampon phosphate afin de le préparer pour la chromatographie dans le stade de purification suivant comme on le décrit plus loin dans la présente spécification.

5 On va maintenant décrire en détail le procédé de la présente invention.

La solution de départ pour le procédé de purification de la présente invention peut être une quelconque solution aqueuse d'interféron de fibroblastes humain qui renferme des protéines contaminantes et qui a besoin d'être purifiée. Cette
10 solution peut provenir d'un procédé de préparation classique de l'interféron et d'un quelconque stade de ce procédé. Il faut remarquer que le procédé n'est applicable qu'à l'interféron de fibroblastes humain et que d'autres types d'interféron nécessiteront un procédé différent de purification.

15 Bien que la solution de départ puisse renfermer un quelconque milieu aqueux pour conserver l'interféron en solution, on obtient de bons résultats avec une solution d'interféron dans le milieu essentiel minimal de Eagle (voir Science 130, 432 (1959)). Un stabilisant peut être ajouté
20 à ce milieu si on le désire, et le stabilisant préféré sous ce rapport est une fraction protéinique de plasma humain telle qu'elle est fournie par les banques de sang.

La teneur initiale en protéines et l'activité interféron de la solution de départ ne sont pas liées à des
25 limites critiques. Cependant, la solution peut être d'abord diluée ou concentrée si on estime que la teneur en protéine est si élevée qu'il y a un risque de précipitation ou au contraire, si on pense qu'elle est si basse qu'elle rende le procédé non économique. Il faut noter ici que la quantité
30 de protéines contaminantes peut dépasser celle de l'interféron et qu'elle peut être supérieure à 85% de la quantité totale des substances dissoutes.

Le premier stade du procédé de la présente invention comprend la chromatographie sur perles de verre poreuses. Ces
35 perles de verres poreuses sont vendues sous plusieurs marques déposées et sont fréquemment indiquées comme ayant "une taille contrôlée des pores", c'est-à-dire une taille de pores assez uniforme rassemblée autour d'une valeur moyenne spécifique.

Cette valeur moyenne peut être par exemple 350 ou 900 Å bien qu'en général une valeur quelconque de 170 à 1700 Å où davantage puisse être utilisée (voir W. Haller, *Nature*, 206, 693-696 (1965) et H.G. Bock et coll., *Science*, 191, 380-383 (1976)).

5 Le diamètre des perles peut être moins régulier et peut être compris en général entre environ 50 µm et environ 500 µm. Ces perles peuvent être empilées dans des colonnes, mais il sera plus facile de les utiliser non empilées pour une opération du type par charge.

10 Dans le premier stade du procédé, la solution de départ est mise en contact avec les perles de verres poreuses en vue d'une adsorption sélective d'interféron sur les perles. Ce contact peut être effectué avec le maximum d'économies en secouant la solution de départ avec une certaine quantité
15 de perles de verre dans un récipient, mais le passage de la solution de départ sur une colonne remplie de perles de verre est également possible. Le contact conduit à une adsorption d'interféron sur les perles de verre à partir de la solution tandis que l'ensemble des protéines contaminantes présentes
20 dans la solution de départ ne se fixe pas aux perles et reste en solution.

Le pH pendant le contact est celui de la solution de départ. Ce pH est normalement d'environ 7,4 si le milieu essentiel minimal de Eagle est utilisé bien qu'en général
25 le système travaille bien pour un pH de départ compris entre 7 et 8,2. A un pH supérieur à 8,2, une partie de l'interféron est rendue inactive et pour un pH inférieur à 7, une grande partie de l'interféron appliqué n'est pas adsorbée sur les perles de verre.

30 La durée du contact n'est pas liée à des limites critiques bien qu'il faut qu'elle soit naturellement suffisante pour que presque tout l'interféron soit adsorbé sur les perles; cette durée peut varier normalement entre 0,5 et 26 heures.

Après le contact, la solution restante peut être
35 éliminée, par exemple par décantation ou par vidange. Ensuite, les perles de verre peuvent être lavées avec un liquide de lavage classique tel qu'une solution saline de pH sensiblement neutre tamponnée au phosphate pour éliminer d'éventuelles

protéines contaminantes non liées. La concentration molaire de ce liquide doit être assez faible afin d'empêcher l'élution de l'interféron adsorbé. De bons résultats de lavage ont été obtenus avec une solution saline tamponnée au phosphate contenant des sels de calcium et de magnésium (voir R. Dulbecco et coll., J. Exp. Med., 99, 167-182 (1954)) mais d'autres liquides peuvent être utilisés avec le même effet. En outre, des lavages peuvent être effectués avec une solution tampon spécial à pH plus faible, telle que le tampon 0,01 M glycine-HCl de pH 3,5 pour éliminer toutes les protéines contaminantes qui ont été liées sur la colonne par mégarde. Le pH de ce liquide de lavage ne doit pas être inférieur à environ 3, et sa concentration ionique ne doit pas être supérieure à environ 0,05 M puisque des valeurs de pH plus faibles et des concentrations ioniques plus élevées provoquent l'élution d'une grande quantité d'interféron.

Après le stade du lavage, l'interféron adsorbé peut être élué des perles de verre à l'aide d'une solution tampon aqueuse acide. Cette solution doit en général avoir un pH compris entre 1,5 et 2,7 et de préférence un pH de 2. On ne peut pas obtenir une bonne élution à des valeurs de pH supérieures à 2,7, et l'instabilité de l'interféron élué se produit à des pH inférieurs à 1,5. La concentration ionique (molarité) de la solution d'élution est sensiblement moins critique et peut varier en pratique entre 0,05 M et 0,5 M. Des valeurs inférieures à 0,05 M tendent à produire un effet tampon insuffisant, entraînant ainsi un défaut de réglage du pH, et des valeurs supérieures à 0,5 M tendent à entraîner la cristallisation des constituants.

Tout agent, ou des combinaisons d'agents, tampons solubles dans l'eau appropriés, peuvent être utilisés à des fins d'élution, pourvu que les conditions susmentionnées de pH et de concentration ionique soient satisfaites. Donc, la solution d'élution peut contenir une combinaison d'un amino-acide et d'un acide minéral, ou une combinaison d'un sel minéral et d'un acide minéral, ou tout autre combinaison ou bien une seule substance. De bons résultats ont été obtenus avec une solution tampon de 0,1 Mole KCl-HCl de pH 2, et

encore de meilleurs résultats avec une solution tampon de 0,3 mole glycine-HCl de pH 2,0. La solution d'élution peut contenir un stabilisant approprié, par exemple se trouvant sous la forme d'une fraction protéinique de plasma humain telle que mentionnée ci-dessus.

A l'aide de cet éluant acide, l'interféron adsorbé peut être élué presque en totalité des perles de verre.

Après l'élution, les perles de verre peuvent être lavées et régénérées, par exemple en les rinçant avec des acides forts pendant plusieurs jours ou en les chauffant sur un bain de vapeur avec l'acide nitrique à 10%, dans les deux cas en les lavant ensuite plusieurs fois avec de l'eau jusqu'à neutralité. Ensuite, elles peuvent être ré-utilisées pour la chromatographie d'interféron de la façon décrite ci-dessus.

Le résultat du traitement d'élution est une solution aqueuse d'interféron qui comprend la plus grande partie de l'activité interféron de la solution de départ et qui, en outre, ne renferme qu'une petite proportion des protéines contaminantes. En pratique, la récupération de l'activité interféron dans ce premier stade du procédé de la présente invention va de 50 à 70% et l'activité spécifique du produit par mg de protéine est sensiblement augmentée par rapport à la matière de départ.

L'éluat ainsi obtenu dans le premier stade possède un pH acide et comprend de la glycine ou une autre substance qui le rend moins propre à être utilisé immédiatement dans le second stade. Par conséquent, il faut neutraliser cet éluat et le débarrasser de la glycine avant le traitement ultérieur. Ceci peut être réalisé en dialysant l'éluat contre une solution saline de pH sensiblement neutre tamponnée au phosphate. De bons résultats ont été obtenus dans la présente invention en utilisant une solution tampon contenant 0,02 mole de phosphates de sodium (phosphate disodique et phosphate monosodique) et 1 mole de chlorure de sodium et ayant un pH de 7,4, mais d'autres solutions tampons peuvent convenir également. La teneur élevée en chlorure de sodium dans cette solution tampon est transmise à la solution d'interféron et un effet

favorable pendant le deuxième stade.

Le second stade du procédé de la présente invention comprend la chromatographie sur chélate de zinc immobilisé.

La solution de départ pour ce second stade est une
5 solution aqueuse d'interféron de fibroblastes humain telle que provenant du premier stade mentionné ci-dessus après neutralisation et élimination de la glycine. Cette solution peut être diluée ou concentrée si on le désire mais normalement ces traitements ne seront pas nécessaires.

10 Un type quelconque de chélate de zinc immobilisé sur un support approprié peut être utilisé pour le second stade du procédé de la présente invention mais la matière préférée est un chélate de zinc d'iminodiacétate immobilisé sur le Sépharose (voir J. Porath et coll., *Nature*, 258, 598-599 (1975)
15 et V.G. Edy et coll., *J. Biol. Chem.* 252, 5934-5935 (1977) qui dans la présente mémoire sont incorporés à titre de référence). Cet adsorbant peut être préparé en couplant d'abord l'imino-
diacétate disodique sur le sépharose à activation époxy (c'est-à-dire l'agarose ayant une chaîne latérale avec un
20 groupe terminal époxy) puis en introduisant les ions zinc à chélater par le groupe iminodiacétique. Si la matière couplée est empilée déjà dans une colonne, le zinc peut être introduit facilement en faisant passer une solution de chlorure de zinc à travers la colonne et le produit est immédiatement prêt
25 à être utilisé. Dans ce produit, les ions zinc sont liés par de fortes liaisons et sont capables de lier d'une façon réversible les molécules d'interféron, ce dernier procédé dépendant du pH.

Plus spécifiquement, les ions zinc chélatés et immo-
30 bilisés sont capables de lier l'interféron de fibroblastes humain d'une façon tout à fait sélective à pH neutre ou légèrement alcalin et avec une concentration ionique faible en additifs minéraux. Cependant, en diminuant le pH et en augmentant la concentration ionique, l'interféron est élué.
35 Une bonne élution peut être obtenue en utilisant un gradient de pH à une concentration ionique constamment élevée, (voir l'article d'Edy susmentionné).

Dans le second stade du procédé de la présente

invention, la solution de départ est mise en contact avec le chélate de zinc immobilisé en vue d'absorber sélectivement l'interféron. Ce contact peut être effectué en faisant passer la solution de départ sur une colonne remplie d'adsorbant ou
5 en agitant cette solution avec une certaine quantité d'adsorbant dans un récipient. L'utilisation d'une colonne est préférée dans ce cas puisque l'adsorbant peut facilement être préparé sous la forme indiquée ci-dessus. Le contact conduit à une adsorption de l'interféron à partir de la solution sur
10 le chélate de zinc tandis que les protéines contaminantes, dans la mesure où elles sont encore présentes, ne seront pas liées et resteront en solution.

Le pH est normalement de 7,4 pendant le contact si la solution de départ est dialysée contre la solution saline
15 tamponnée au phosphate susmentionnée bien qu'en général le système travaille avec un pH de départ de 7 à 8,2. A un pH supérieur à 8,2 une certaine activité est perdue et pour un pH inférieur à 7, une grande quantité d'interféron n'est pas adsorbée et passe directement à travers la colonne.

20 La durée de contact n'est pas liée à des limites critiques bien qu'elle doit être naturellement suffisante pour que l'interféron soit adsorbé presque en totalité. Cette durée peut varier entre 0,5 et 26 heures.

Après contact, la solution restante est éliminée et
25 la colonne peut être lavée avec un agent de lavage classique tel qu'une solution tamponnée au phosphate ayant un pH de 7,4 pour enlever de la colonne les protéines résiduelles non adsorbées. De plus, des lavages peuvent être effectués avec une solution tampon à pH plus faible telle qu'une solution
30 0,1 mole acétate de sodium/acide acétique ayant un pH de 5,9 pour enlever d'éventuelles protéines qui ont été liées par mégarde sur la colonne. Le pH de cette solution tampon ne doit pas être inférieur à environ 5,9 pour empêcher l'élution de l'interféron. Tous ces fluides de lavage peuvent contenir
35 1 mole de chlorure de sodium, exactement comme le fluide dialyseur mentionné ci-dessus, afin d'empêcher une fixation non spécifique des protéines sur l'adsorbant.

Après lavage, l'interféron peut être élué de l'adsorbant chélate de zinc à l'aide d'une solution aqueuse acide.

Cette solution peut avoir en général un pH compris entre 4 et 6 et pour de meilleurs résultats un gradient de pH de 6 descendant à 4 peut être utilisé. On n'obtiendra pas de bonne élution avec des valeurs de pH supérieures à 6,0 et l'interféron élué deviendra instable aux valeurs du pH inférieures à 4.

La concentration ionique (molarité) de l'agent d'élution n'est pas très critique et peut varier en pratique entre 0,05 mole et 0,5 mole. Des valeurs inférieures tendent à donner un effet tampon insuffisant entraînant ainsi un défaut de réglage du pH, et des valeurs supérieures tendent à augmenter les difficultés par suite de la cristallisation des constituants. On obtient de bons résultats avec une solution d'acétate de sodium 0,1 mole réglée à pH 4,2 avec de l'acide acétique glacial bien que d'autres solutions comme celles mentionnées dans l'article de Edy ne soient pas exclues. Si cet agent d'élution ayant un pH de 4,2 est utilisé immédiatement après le liquide de lavage de pH 5,9, un gradient de pH sera automatiquement réalisé. En variante, des solutions d'acétate de sodium 0,1 mole à pH graduellement décroissant pourront être utilisées successivement. Toutes ces solutions d'élution devront contenir 1 mole de chlorure de sodium afin de maintenir l'équilibre de NaCl dans la colonne.

A l'aide d'un tel agent d'élution, pratiquement tout l'interféron adsorbé peut être élué de l'adsorbant chélate de zinc.

Après l'élution, l'adsorbant peut être lavé et régénéré, par exemple en rinçant la colonne avec une solution tamponnée d'éthylènediaminetétracétate (EDTA), en éliminant par lavage l'EDTA avec une solution saline tamponnée au phosphate ayant un pH de 7,4, en traitant la colonne avec une solution acide de chlorure de zinc jusqu'à ce que le chélate soit saturé de zinc et en éliminant l'excès de chlorure de zinc par lavage avec une solution tampon d'acétate de sodium et en équilibrant la colonne à des valeurs de pH sensiblement neutres.

Le résultat du traitement d'élution est une solution aqueuse d'interféron qui comprend encore la totalité ou une

grande partie de l'activité interféron de la solution de départ et où la teneur en protéines contaminantes a été réduite à une valeur très petite. La récupération de l'activité interféron dans le second stade peut aller de 90 à 95%,
5 donc la récupération totale du procédé complet à deux stades atteint environ 45 à 67%.

L'activité spécifique du produit peut s'élever jusqu'à 10^9 unités/mg de protéine, activité qui est supérieure à celle de toute autre valeur obtenue jusqu'à présent. La
10 pureté de la solution finale d'interféron peut être déterminée par plusieurs procédés. Un de ces procédés est un dosage normal de protéine, par exemple avec la fluorescamine. Un autre procédé comprend le marquage de l'interféron purifié avec un marqueur radio-actif tel que l' ^{125}I et en soumettant
15 l'interféron à une électrophorèse dans le gel d'acrylamide suivie d'une autoradiographie aux rayons X. Ceci indique si l'interféron purifié est un produit simple ou multiple. De plus, on peut essayer de voir si le produit final entraîne une réaction de la peau en l'appliquant sur le corps humain.

20 Tous ces procédés donnent une très grande pureté quand ils sont appliqués aux produits finis du procédé de purification de la présente invention. Ainsi, il est montré par exemple dans les exemples de la présente invention que les impuretés restantes ne pourront pas être mesurées par
25 des dosages de protéines et que les produits finis paraissent être des produits homogènes au moyen de l'électrophorèse. De plus, les produits ne donnent pas du tout de fièvre ni aucune réaction avec la peau quand on les applique à l'homme.

En conclusion, le procédé de purification à deux stades de la présente invention conduit à une récupération importante
30 de l'activité interféron initiale sous une forme très pure. Le produit est approprié pour la thérapie clinique parce qu'il n'entraîne pas de réactivité de la peau. Une production à grande échelle est rendue possible maintenant puisque les réactifs sont très accessibles et facilement régénérables.
35 Ceci signifie que de grandes quantités d'interféron de fibroblastes humain peuvent être fournies à l'avenir, au fur et à mesure que l'exigent la caractérisation chimique et

l'utilisation clinique.

La présente invention est illustrée par les exemples descriptifs et non limitatifs ci-après.

Exemple I

5

La matière de départ est une solution aqueuse d'interféron provenant de cellules du type fibroblaste d'embryon humain, stimulées avec l'acide poly-inosinique-polycytidylique. L'interféron est dans un milieu essentiel minimal de Eagle à pH 7,4 contenant 1% en volume d'une fraction protéique de plasma humain fourni par la Croix Rouge Belge. L'activité interféron et le taux de protéine de cette solution, dans une expérience à petite échelle, sont établis sur le tableau A.

10

Cette solution de départ est mélangée avec des perles de verre poreuses (électro-Nucléonic Inc) ayant une dimension des pores d'environ 350 Å et une grosseur des perles de 75 à 120 µm, dans un rapport d'environ 30 ml de solution pour environ 1 ml de perles de verre. Le mélange est agité doucement pendant 2 heures afin de maintenir les perles en suspension et de provoquer une adsorption sélective de l'interféron sur les perles à partir de la solution. Ensuite on laisse déposer les perles et le liquide surnageant est éliminé par décantation. Les perles sont lavées deux fois avec une solution saline tamponnée au phosphate contenant 8 ml NaCl, 1,15 g de Na_2HPO_4 , 0,2 g KH_2PO_4 , 0,2 g KCl, 0,12 g MgSO_4 et 0,10 g CaCl_2 par litre (voir Dulbecco et coll., J. Exp. Med., 99, 167-182 (1954)) à raison de 20 ml de solution par ml de perles. Ensuite, elles sont lavées une fois avec une solution tampon 0,01 mole glycine-HCl ayant un pH de 3,5 dans les mêmes proportions. Les perles sont éluées en les agitant deux fois 5 minutes avec une solution tampon 0,3 mole glycine-HCl de pH 2, et en les agitant 2 fois 30 minutes avec la même solution tampon, chaque fois à raison de 2 ml de solution tampon par ml de perles. Cette solution tampon contient 0,09 mg/ml de fraction protéique de plasma humain comme stabilisant. Le taux de protéines et l'activité interféron des éluats combinés sont indiqués sur le tableau A et on voit que la récupération de l'activité interféron dans cette expérience

20

25

30

35

est de 68%.

Après l'élution les perles de verre sont régénérées en les rinçant avec des acides forts pendant plusieurs jours puis en les lavant avec de l'eau distillée jusqu'à neutralité. Avant d'être ré-utilisées elles sont stérilisées par chauffage en autoclave.

Une partie des éluats combinés est dialysée contre 4 x 500 ml d'une solution saline tamponnée au phosphate contenant 0,02 mole de phosphate de sodium et 1 mole de chlorure de sodium et ayant un pH 7,4. Cette solution tampon est changée toutes les 6 à 8 heures. Il en résulte que le pH devient égal à environ 7,4 et que la concentration de la glycine est ramenée de 0,3 mole à environ 0,0001 mole, tandis qu'une quantité de chlorure de sodium égale à 1 mole est introduite.

La solution résultante d'interféron est passée avec un débit de 20 ml/h à travers une colonne de chélate de zinc immobilisé ayant 0,9 x 8 cm. Le chélate de zinc immobilisé a été préparé en couplant l'iminodiacétate sur le "Sépharose à activation époxy 6 B" et en ajoutant une solution de chlorure de zinc comme décrit par Edy et Coll. dans J. Biol. Chem. 252, pages 5934-5935 (1977).

Après l'application de l'interféron, la colonne est lavée avec un volume de 10 ml (égal à une "couche") d'une solution saline tamponnée au phosphate (la même que celle utilisée pour la dialyse) pour éliminer les protéines non adsorbées. Ensuite, elle est lavée avec 3 volumes d'une "couche" d'un tampon acétate de sodium à 0,1 mole ayant un pH de 5,9 contenant 1 mole de chlorure de sodium pour éliminer d'éventuelles protéines adsorbées non désirées.

Ensuite, la colonne est éluée avec 2 volumes d'une "couche" d'une solution tampon d'acétate de sodium à 0,1 mole contenant 1 mole de chlorure de sodium et montrant un gradient de pH de 6 à 4. Les fractions comprises dans une gamme de pH de 5,2 à 4,5 sont recueillies car elles contiennent l'ensemble de l'activité interféron.

Le taux de protéine et l'activité interféron de l'éluat résultant sont montrés dans le tableau A. On voit que la

récupération de l'activité interféron dans ce second stade est de 94% donnant ainsi une récupération totale de 64%.

L'éluat montre une activité interféron spécifique d'environ $1,1 \times 10^9$ unités/mg, ce qui signifie que le produit possède une grande pureté.

La colonne de chélate de zinc est régénérée en la lavant avec 5 volumes d'une "couche" de 0,05 mole d'EDTA dans une solution saline tamponnée au phosphate ayant un pH de 7,4. L'EDTA restant est éliminé par lavage avec 5 volumes d'une "couche" d'une solution saline tamponnée au phosphate (pH 7,4). Ensuite, le zinc est introduit de nouveau par lavage avec une solution de 0,1 mole d'acétate de sodium (pH 4) contenant 1 mole de NaCl et 1 mmole de $ZnCl_2$ jusqu'à saturation. Le point de saturation est déterminé en mélangeant une goutte de l'éluat provenant de la colonne avec une petite quantité d'une solution de carbonate de sodium et en observant la formation d'un précipité. Ensuite, l'excès de zinc est éliminé par lavage avec un tampon d'acétate de sodium (pH 4) et la colonne est équilibrée à pH 7,4 en vue de l'application d'un nouvel échantillon par lavage avec 5 volumes d'une couche de solution saline tamponnée au phosphate.

La pureté du produit final est déterminée par dosage des protéines par électrophorèse dans un gel d'acrylamide et en l'appliquant sur la peau humaine. Dans le dosage des protéines (procédé à la fluorescamine) la quantité de protéines est presque non mesurable (la valeur limite dans ce procédé est d'environ 2 μg par millilitre). L'électrophorèse dans un gel d'acrylamide après marquage avec un marqueur radio-actif puis autoradiographie aux rayons X révèle l'existence d'une seule bande radio-active qui correspond à un poids moléculaire d'environ 22 000. On ne remarque aucune réaction avec la peau par application à l'homme. Ceci conduit à la conclusion que le produit de cet exemple possède une grande pureté et peut être considéré comme étant entièrement pur.

TABLEAU A

Matière	Volume ml	Protéine totale mg	Activité totale unités	Activité spécifique unités/mg
Solution de départ	125	67,92	4×10^6	5×10^4
Perles de verre : non adsorbé + lavages	300	60,81	0	0
Eluats	34	2,04	$2,7 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
Solution dialysée	34	2,04	$2,7 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
Chélate de zinc : non adsorbé + 1ers lavages	44	2,03	0	0
2èmes lavages	30	0	0	0
Eluats	3	$\sim 0,002$	$2,55 \times 10^6$	$\sim 1,1 \times 10^9$

Exemple II

On utilise la même matière de départ que dans l'exemple 1 pour deux expériences à grande échelle. Le procédé est similaire à celui de l'exemple I, sauf que les éluats provenant des perles de verre sont dialysés contre 4 x 4 litres d'une solution saline tamponnée au phosphate et qu'une colonne de chélate de zinc de 1,5 x 16 cm est utilisée. Cette colonne de chélate de zinc (volume d'une "couche" égale 30 ml) est lavée d'abord avec un volume d'une "couche" de solution saline tamponnée au phosphate puis avec 5 volumes d'une "couche" de tampon à l'acétate de sodium. L'élution est effectuée avec 2 volumes d'une "couche" de solution tampon à 0,1 mole d'acétate de sodium ayant un pH de 4,2 contenant 1 mole de chlorure de sodium, qui donne un gradient de pH dans l'éluat. Les fractions dans la gamme de pH de 5,2 à 4,5 sont recueillies et contiennent l'ensemble de l'activité interféron.

Les taux de protéines et les activités interféron de la solution de départ et de ses produits sont indiqués dans le tableau B. D'après ce tableau, on voit que la récupération de l'activité interféron dans le premier stade est de 57,5% et 58% respectivement, et dans le second stade de 91,4% et 91,6% respectivement, entraînant ainsi une récupération totale de 52,6% et 53,2% respectivement.

Les éluats montrent une activité interféron spécifique d'environ $1,7 \times 10^9$ et de 2×10^9 unités/mg, ce qui signifie que le produit possède une grande pureté. De plus, la pureté des produits finis est essayée de la même façon que dans l'exemple 1 et donne des résultats similaires. Cela signifie que le procédé de la présente invention est approprié en effet pour une opération à grande échelle.

TABLEAU B

Matière	Volume ml	Protéine totale mg	Activité totale unités	Activité spécifique unités/mg
Solution de départ	3200 3200	1075,2 1462,9	64×10^7 $1,5 \times 10^8$	$5,9 \times 10^4$ $10,3 \times 10^4$
Perles de verre non adsorbé + lavages	4700 4700	- -	- -	- -
Eluats	280 280	124,6 169,54	$3,68 \times 10^7$ $8,7 \times 10^7$	$2,96 \times 10^5$ $5,13 \times 10^5$
Solution dialysée	100 100	44,46 60,55	$1,32 \times 10^7$ $3,11 \times 10^7$	$2,96 \times 10^5$ $5,14 \times 10^5$
Chélate de zinc non adsorbé + 1er lavages	130 130	42,51 60,01	0 0	0 0
2èmes lavages	150 150	1,60 0,48	$0,76 \times 10^6$ -	$0,47 \times 10^6$ -
Eluats	10 10	$\sim 0,007$ 0,014	$12,02 \times 10^6$ $2,85 \times 10^7$	$\sim 1,7 \times 10^9$ 2×10^9

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour la purification d'interféron qui
consiste (a) à soumettre une solution aqueuse d'interféron
5 de fibroblastes humain à la chromatographie sur des perles
de verre poreuses et (b) à soumettre la solution d'interféron
résultante à la chromatographie sur chélate de zinc immobilisé.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par
10 le fait que le stade (a) comprend la mise en contact de la
solution aqueuse d'interféron avec des perles de verre
poreuses, à pH neutre ou légèrement alcalin en vue d'une
adsorption sélective de la solution d'interféron sur les perles
puis la mise en contact des perles avec un agent d'élution,
15 à pH acide, afin d'éluer l'interféron adsorbé à partir des
perles.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé par
le fait que les perles de verre, après l'adsorption et avant
l'élution, sont lavées avec une solution saline tamponnée au
20 phosphate ayant un pH voisin de la neutralité, puis sont
lavées avec une solution tampon ayant un pH plus faible allant
jusqu'à pH 3.

4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé par
25 le fait que l'agent d'élution a un pH compris entre 1,5 et 2,7
et une concentration ionique comprise entre 0,05 mole et 0,5
mole.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé par le
30 fait que l'élution à partir des perles de verre est effectuée
avec une solution tampon 0,3 mole glycine-HCl ayant un pH de 2.

6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par
le fait que l'éluat provenant du stade (a) est dialysé contre
une solution saline tamponnée au phosphate en vue de la
35 préparation du stade (b).

7. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par
le fait que le stade (b) comprend la mise en contact de l'éluat
dialysé du stade (a) avec un chélate de zinc immobilisé, à

pH neutre ou légèrement alcalin, en vue de l'adsorption sélective de l'interféron à partir de l'éluat sur l'adsorbant, et la mise en contact du chélate de zinc avec un agent d'élution à pH acide, en vue de l'élution de l'interféron à partir de l'adsorbant.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé par le fait que l'adsorbant est un chélate de zinc et un imino-diacétate couplé sur le "Sépharose" à activation époxy.

9. Procédé selon la revendication 7, caractérisé par le fait que le chélate de zinc immobilisé, après l'adsorption et avant l'élution, est lavé avec une solution saline tamponnée au phosphate ayant un pH voisin de la neutralité, puis est lavé avec une solution tampon avant un pH plus faible allant jusqu'à 5,9.

10. Procédé selon la revendication 7, caractérisé par le fait que l'agent d'élution a un pH compris entre 6 et 4 et que sa concentration ionique est comprise entre 0,05 Mole et 0,5 Mole.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé par le fait que l'élution à partir du chélate de zinc est effectuée avec une solution d'acétate de sodium à 0,1 Mole ayant un pH de 4,2.

12. L'interféron purifié avec le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11.