



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006123539/13, 04.12.2004

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.12.2004

(30) Конвенционный приоритет:
04.12.2003 KR 10-2003-0087552

(43) Дата публикации заявки: 10.01.2008

(45) Опубликовано: 10.02.2009 Бюл. № 4

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 4483849, 20.11.1984. US 5244655,
14.09.1993. US 4808523, 28.02.1989.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
04.07.2006

(86) Заявка РСТ:
KR 2004/003179 (04.12.2004)

(87) Публикация РСТ:
WO 2005/054288 (16.06.2005)

Адрес для переписки:
103735, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент", пат.пов. А.Ю.Соболеву

(72) Автор(ы):

ПАРК Дзи-Соок (KR),
ЧЮНГ Дзонг-Санг (KR),
БЭК Мин-Дзи (KR),
АН Дзи-Вон (KR),
КИМ Ки-Ван (KR),
ПАРК Хунг-Ки (KR),
ЛИ Донг-Эок (KR),
О Мунг-Сюк (KR)

(73) Патентообладатель(и):

СиДжей ЧейлДжеданг Корпорейшн (KR)

(54) СПОСОБ ОЧИСТКИ ИНТЕРФЕРОНА БЕТА ЧЕЛОВЕКА

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Предложен способ очистки интерферона бета человека из рекомбинантной культуры, содержащей интерферон бета человека, включающий проведение аффинной хроматографии и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ). Аффинная хроматография включает адсорбцию культуры, содержащей интерферон бета, на уравновешенной хроматографической колонке, промывание колонки промывочным буферным раствором А с pH 6,5-7,5, содержащим 30-60 мас.% пропиленгликоля, и промывочным

буферным раствором В с pH 6,5-7,5, содержащим 10-30 мас.% пропиленгликоля и 1-2 М NaCl, с элюцией фракции, содержащей интерферон бета человека, буферным раствором с pH 6,5-7,5, содержащим 40-60 мас.% пропиленгликоля и 1-2 М NaCl. Полученный раствор подвергают диафильтрации и осуществляют ОФ-ВЭЖХ, элюируя интерферонсодержащую фракцию градиентом концентраций этанола от 30-50% до 65-90% при pH 2-5, с последующим концентрированием и гель-фильтрацией продукта. Получаемый интерферон бета характеризуется высокой степенью чистоты (99%) при упрощении технологии выделения. 3 з.п. ф-лы, 4 ил.



Фиг. 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2006123539/13, 04.12.2004**

(24) Effective date for property rights: **04.12.2004**

(30) Priority:
04.12.2003 KR 10-2003-0087552

(43) Application published: **10.01.2008**

(45) Date of publication: **10.02.2009 Bull. 4**

(85) Commencement of national phase: **04.07.2006**

(86) PCT application:
KR 2004/003179 (04.12.2004)

(87) PCT publication:
WO 2005/054288 (16.06.2005)

Mail address:
**103735, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO
"Sojuzpatent", pat.pov. A.Ju.Sobolevu**

(72) Inventor(s):

**PARK Dzi-Sook (KR),
ChJuNG Dzong-Sang (KR),
BEhK Min-Dzi (KR),
AN Dzi-Von (KR),
KIM Ki-Van (KR),
PARK Khung-Ki (KR),
LI Dong-Ehok (KR),
O Mung-Sjuk (KR)**

(73) Proprietor(s):

SiDzhej ChejiDzhedang Korporejshn (KR)

(54) METHOD OF PURIFYING HUMAN INTERFERON BETA

(57) Abstract:

FIELD: chemistry, biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology. Method of purifying human interferon beta from a recombinant culture containing human interferon beta, which includes carrying out affinity chromatography and is treated to phase high-efficiency liquid chromatography (HELC). Affinity chromatography adsorption of the culture, which contains interferon beta, in a balanced chromatograph column, rinsing the column using a liquid buffering solution A with a pH 6.5-7.5, containing 30-60 wt % of propylene-glycol, and liquid buffering solution B with a pH 6.5-7.5,

containing 10-30 wt % of propylene-glycol and 1-2 M NaCl, with elution fraction, containing human interferon beta, with a buffering solution with pH 6.5-7.5, containing 40-60 wt % propylene-glycol and 1-2 M NaCl. Solution obtained is subjected to diafiltration and phase HELC is carried out, elute the interferon-containing fraction with a gradient of concentrated ethanol from 30-50% to 65-90% with a pH 2.5, followed by concentration and gel-filtration of the product.

EFFECT: obtaining interferon beta characterised with a high level of purity (99%) with a simplified method of separation.

4 cl, 5 dwg, 4 ex



Фиг. 1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается способа очистки интерферона бета человека из культуры, содержащей рекомбинантный интерферон бета человека, с использованием аффинной хроматографии и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Уровень техники

Интерфероны в широком смысле слова являются внеклеточными мессенжерами, опосредующими реакцию организма-хозяина, и эволюционно консервативными семействами белков, которые выделяются в относительно небольших количествах из клеток. Интерфероны освобождаются из продуцирующих интерфероны клеток в ответ на стимуляцию вирусами, двухцепочечными РНК, различными микроорганизмами или цитокинами, такими как фактор некроза опухолей (TNF) или интерлейкин 1 (IL1), и затем связываются с рецепторами интерферона, локализованными на поверхности соседних клеток. После этого интерфероны индуцируют синтез различных белков, так что реакционная способность и гомеостаз организма-хозяина поддерживаются за счет последовательной передачи сигнала клетками. Таким образом, интерфероны действуют в организме как противовирусные, антипролиферативные и иммунные сигнальные белки и обладают прямым антипролиферативным действием на раковые клетки, вследствие чего привлекают пристальное внимание как терапевтические агенты [Postka S., Langer J. A. and Zoon K. C (1987) Interferons and their actions, Annu. Rev. Biochem. 56:727-777].

Интерфероны принадлежат к классу спиральных физиологически активных веществ. Согласно физико-химическим характеристикам и функциональной активности выделяют два класса интерферонов: тип 1 и 2. Интерфероны альфа, бета, тау и эпсилон являются представителями интерферонов типа 1 [Weissman C and Weber H. (1986) The Interferon genes, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 33:251-300], а интерферон гамма является представителем интерферонов типа 2. Среди них интерфероны бета, относящиеся к интерферонам типа 1, являются белками, демонстрирующими видовую специфичность. Интерфероны бета также называют интерферонами фибробластов в соответствии с их источником и рН2-стабильными интерферонами согласно их биологическим характеристикам. Интерфероны бета связываются с теми же рецепторами на поверхности клеток, что и интерфероны альфа, принадлежащие к интерферонам типа 1, и затем индуцируют транскрипцию противовирусных факторов в ответ на активацию соответствующих сигнальных систем клетки.

Интерфероны бета представляют собой гликопротеины (около 20% сахарных остатков) с молекулярной массой около 20 кДа и одноцепочечные белки, состоящие из 166 аминокислотных остатков. Известно, что один участок N-гликозилирования играет роль в увеличении стабильности или растворимости, т.е. в улучшении физико-химических функций, скорее, чем участвует в биологической активности или антигенности [Karpusas M., Whytty A., Runkel L, and Hochman P. The structure of human interferon- β : implications for activity CMLS, 54:1203-1216 1998].

Достижения в генетической рекомбинантной технологии сделали возможным определение аминокислотной последовательности интерферона бета человека, а также клонирование и экспрессию интерферона бета человека в *E. coli* [Taniguchi, Gene 10:11-15, 1980]. Более того, сообщалось также об экспрессии интерферона бета в клетках яичников китайского хомячка (Chinese hamster ovary (CHO) cells) [USP4,966,843, USP5,376,567 и USP5,795,779].

В настоящее время интерфероны бета производятся по технологии генетической рекомбинации и коммерчески доступны под торговыми названиями Betaseron®, Avonex® и Rebif®. Известно, что рекомбинантные интерфероны бета являются эффективными в замедлении развития рассеянного склероза у пациентов с симптомами заболевания и в снятии болевого синдрома при болезни. Более того, рекомбинантные интерфероны бета широко используются как терапевтические агенты при рассеянном склерозе и в то же

время являются эффективными в неспецифической регуляции иммунного ответа человека, иммунного ответа на вирусные инфекции и в подавлении пролиферации раковых клеток.

Доступные в настоящее время технологии очистки рекомбинантных интерферонов бета, экспрессируемых в клетках CHO, состоят из 3-5 процедур очистки, включая первичную
5 очистку методом аффинной хроматографии (USP4,278,661, USP4,289,689, USP4,541,952, USP4,808,523 и т.д.), металл-хелатную хроматографию (USP4,257,938, USP4,359,389, USP4,541,952, USP5,244,655 и т.д.), хроматографию на пористом стекле с контролируемым
10 размером пор (CPG, controlled pore glass chromatography) (USP4,359,389, USP5,066,786, USP5,244,655 и т.д.), или хроматографию на Конканавалине А (USP4,289,689, USP4,658,017 и т.д.) с последующей катионообменной хроматографией или обращенно-фазовой хроматографией.

В описанных выше обычных технологиях очистки металл-хелатная хроматография может привести к загрязнению окружающей среды из-за использования тяжелых металлов. Хроматография на пористом стекле или хроматография на Конканавалине А обладает
15 низкой специфичностью. То есть хроматография на Конканавалине А основана на избирательном связывании многих содержащих сахара белков, которые присутствуют в культуре клеток CHO, что приводит к низкой специфичности. Хроматография на пористом стекле позволяет производить разделение молекул по размеру после связывания с белком. Однако эффективность разделения и чистота интерферонов бета ниже, чем при аффинной
20 хроматографии (например, при хроматографии на колонке с Blue-Сефарозой).

Более того, обычные технологии очистки с помощью аффинной хроматографии включают промывание и элюцию с этиленгликолем с использованием моноклональных антител и/или смол, содержащих красители. Однако аффинная хроматография с использованием моноклональных антител требует отдельной стадии удаления
25 негликозилированной формы интерферона бета, что делает массовое производство затруднительным. В частности, используемый для промывания и элюции этиленгликоль является очень токсичным для организма, что ограничивает применение этого способа очистки.

В то же время U.S. Patent No. 4,483,849 раскрывает способ очистки и стабилизации
30 интерферона бета с использованием пропиленгликоля вместо токсичного этиленгликоля при аффинной хроматографии. Способ, раскрываемый в этом патентном документе, включает нанесение интерферон-содержащей культуры на аффинную колонку с красителем, такую как уравновешенный Affi-Gel Blue, промывание колонки 1,0 М буфером NaCl/PO₄ и 1,0 М буфером NaCl/PO₄, содержащим 40% пропиленгликоля, и затем элюцию
35 интерферона 50% пропиленгликолем. Хотя описываемый в этом патентном документе процесс включает промывку колонки и элюцию, пик желаемого конечного продукта и пик загрязнений накладываются друг на друга, что приводит к снижению чистоты продукта.

Раскрытие изобретения

Настоящее изобретение предлагает способ очистки интерферона бета, который
40 включает получение с высокой чистотой продукта первичной очистки интерферона бета с помощью усиленной аффинной хроматографии с использованием нетоксичного пропиленгликоля с последующей обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ОФ-ВЭЖХ).

Таким образом, настоящее изобретение предлагает способ очистки интерферона бета
45 человека из рекомбинантной культуры, содержащей интерферон бета человека, включающий проведение аффинной хроматографии и ОФ-ВЭЖХ, которая включает промывку и элюцию специфическим буферным раствором.

Согласно одному из аспектов настоящего изобретения предлагается способ очистки интерферона бета человека из культуры, содержащей рекомбинантный интерферон бета
50 человека, с помощью аффинной хроматографии и ОФ-ВЭЖХ, при котором аффинная хроматография включает: адсорбцию культуры, содержащей интерферон бета человека, на предварительно уравновешенную колонку для аффинной хроматографии, последующую промывку колонки буферным раствором для уравнивания, промывку колонки

промывочным буферным раствором А с рН 6,5-7,5, содержащим 30-60% (по весу) пропиленгликоля и промывку колонки промывочным буферным раствором В с рН 6,5-7,5, содержащим 10-30% (по весу) пропиленгликоля и 1-2 М NaCl; и элюцию содержащей интерферон бета человека фракции буферным раствором с рН 6,5-7,5, содержащим 40-60% (по весу) пропиленгликоля и 1-2 М NaCl.

В способе очистки по настоящему изобретению нелимитирующие примеры культуры, содержащей рекомбинантный интерферон бета человека, используемые в качестве образца, включают продуцирующие интерферон бета клетки и штаммы. Например, содержащая рекомбинантный интерферон бета человека культура может быть получена известным методом, описываемым в Carter and Horoszewicz, Pharm. Ther. 8, 359-377, 1980; Strander and Cantell, Ann. Med. Exp. Fenn. 44, 265-273, 1966; Wheelock, Science, 149, 310-311, 1965, и тому подобное. Предпочтительно культура, содержащая рекомбинантный интерферон бета человека, является бессывороточной культурой, полученной из продуцирующих интерферон бета человека рекомбинантных клеток яичников китайского хомячка (СНО).

В способе очистки по настоящему изобретению используемая для аффинной хроматографии хроматографическая колонка может быть обычной аффинной колонкой с красителем, например колонкой (например, колонкой XK-50 column, Amersham biosciences, Sweden), заполненной Blue-Sepharose 6 (Amersham biosciences, Sweden), или колонкой Affi-Gel Blue (Bio-Rad, America). Буферный раствор для уравнивания колонки для аффинной хроматографии может быть буферным раствором натрий-фосфат-ЭДТА (рН около 7,2). Аффинная колонка может быть уравновешена 3 объемами колонки (CV) буферного раствора для уравнивания, например, при линейной скорости около 15-30 см/час.

В способе очистки по настоящему изобретению аффинная хроматография включает адсорбцию культуры, содержащей интерферон бета, на уравновешенной аффинной колонке и удаление неспецифически связанного белка путем промывки буферным раствором для уравнивания.

Аффинная хроматография также включает многоступенчатую промывку, то есть промывку колонки промывочным буферным раствором А с рН 6,5-7,5, содержащим 30-60% (по весу) пропиленгликоля и промывку колонки промывочным буферным раствором В с рН 6,5-7,5, содержащим 10-30% (по весу) пропиленгликоля и 1-2 М NaCl. Предпочтительно аффинная хроматография также включает промывку колонки промывочным раствором С с рН 6,5-7,5, содержащим 1-2 М NaCl. Предпочтительно каждая промывка проводится с использованием 2-4 объемов колонки (CV) каждого буферного раствора

В способе очистки по настоящему изобретению нет ограничений в последовательности использования промывочных буферных растворов. Например, промывка может быть проведена с использованием промывочного буферного раствора А и затем промывочного буферного раствора В или с использованием промывочного буферного раствора В, а затем промывочного буферного раствора А. Кроме того, промывка может быть проведена с использованием промывочного буферного раствора А, промывочного буферного раствора С и затем промывочного буферного раствора В или с использованием промывочного буферного раствора В, промывочного буферного раствора С и затем промывочного буферного раствора А. Промывка с использованием промывочного буферного раствора А эффективно удаляет загрязнения с высокой гидрофобностью, промывка с помощью промывочного буферного раствора С удаляет гидрофильные загрязнения, а промывка с помощью промывочного буферного раствора В удаляет белковые примеси.

Снятие интерферона бета с колонки может быть осуществлено путем элюции фракции, содержащей интерферон бета человека, буферным раствором с рН 6,5-7,5, содержащим 40-60% (по весу) пропиленгликоля, предпочтительно 50% (по весу), и 1-2 М NaCl.

Предпочтительно каждый используемый для промывки или элюции буфер может быть натрий-фосфатным буферным раствором или калий-фосфатным буферным раствором.

В способе очистки по настоящему изобретению промывка буферным раствором,

содержащим около 50% пропиленгликоля, позволяет эффективно удалить пики загрязнений в отличие от способа, раскрываемого в U.S. Patent No. 4,483,849, в котором промывка и элюция проводятся ступенчатым градиентом концентрации пропиленгликоля.

5 В способе очистки по настоящему изобретению вслед за вышеописанной аффинной хроматографией проводится ОФ-ВЭЖХ. Предпочтительно до проведения ОФ-ВЭЖХ полученный при элюции при аффинной хроматографии раствор подвергают
10 диафильтрации на мембране для ультрафильтрации с пределом пропускания по молекулярному весу 10000. При диафильтрации интерферон бета с относительно высокой концентрацией соли может быть доведен до подходящей концентрации соли.

ОФ-ВЭЖХ проводили следующим образом: образец, полученный после диафильтрации, наносили на колонку, и затем фракцию, содержащую интерферон бета человека, элюировали при pH 2-5 градиентом концентрации этанола, содержащим HCl. Более
15 подробно, колонку уравнивали 0,1% HCl, содержащим 0,1-20%, предпочтительно 5% или менее пропиленгликоля, после чего образец, полученный путем диафильтрации, содержащий 0,1-20%, предпочтительно 5% или менее пропиленгликоля, наносился на колонку. Затем колонку промывали 0,1% HCl, и фракции, содержащие интерферон бета, элюировали линейным градиентом концентрации от 30-50%, предпочтительно 45% этанола, содержащего 0,1% HCl до 65-90%, предпочтительно 70% этанола, содержащего
20 0,1% HCl.

Колонка для ОФ-ВЭЖХ может быть Protein C4 (размер частиц - 10 мкм, размер пор - 30 Å, Vydac) и может быть уравновешена примерно 5 CV 0,1% раствора HCl, содержащего пропиленгликоль. При ОФ-ВЭЖХ образец, полученный при диафильтрации, пропускали
25 через уравновешенную колонку при подходящей скорости потока, промывали 3 CV или более буферным раствором 0,1% HCl и элюировали линейным градиентом концентрации этанола объемом примерно 10-20 CV, содержащего 0,1% HCl, чтобы таким образом разделить белковые примеси и целевые белки.

Во фракции, содержащей интерферон бета, полученной посредством ОФ-ВЭЖХ, может быть затем проведена замена на новый буферный раствор. Замена на новый буферный
30 раствор может осуществляться посредством гель-фильтрации или концентрирования и диафильтрации.

Например, в случае проведения гель-фильтрации фракции, содержащие интерферон бета, полученные при ОФ-ВЭЖХ, концентрируют до, например, около 200-1000 мкг/мл, диализуют против 10-50 mM натрий-ацетатного буферного раствора (pH 3,5~5,5) и
35 наносят на хроматографическую колонку для гель-фильтрации (например, Sephacryl S-200, Amersham biosciences), уравновешенную 10-50 mM, предпочтительно 20 mM натрий-ацетатным буферным раствором (pH 3,5~5,5). Затем 10-50 mM натрий-ацетатный буферный раствор (pH 3,5-5,5) пропускают через колонку при подходящей скорости потока, обеспечивая, таким образом, смену раствора искоемых белков и отделение и
40 удаление полимеров.

Блок-схема, иллюстрирующая способ очистки по настоящему изобретению, показана на фигуре 1.

Краткое описание фигур

Фигура 1 представляет собой блок-схему способа очистки по настоящему изобретению.

45 Фигура 2 представляет собой C4 ОФ-ВЭЖХ (обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография) аналитическую хроматограмму интерферона бета, элюируемого при аффинной хроматографии согласно способу очистки по настоящему изобретению.

Фигура 3 представляет собой C4 ОФ-ВЭЖХ аналитическую хроматограмму интерферона
50 бета, элюируемого без промывки с 50% пропиленгликоля.

Фигуры 4А и 4В представляют собой соответственно C4 ОФ-ВЭЖХ аналитическую хроматограмму буферного раствора для гель-фильтрации и C4 ОФ-ВЭЖХ аналитическую хроматограмму раствора, элюируемого после гель-фильтрации.

Осуществление изобретения

Далее настоящее изобретение будет описано более детально с помощью примеров. Однако нижеследующие примеры приводятся исключительно в качестве иллюстрации и, следовательно, настоящее изобретение не ограничивается ими.

5 Пример 1: аффинная хроматография

Blue-Sepharose 6 (Amersham biosciences, Sweden) в количестве 350 мл была внесена в колонку XK-50 (Amersham biosciences, Sweden) для изготовления колонки для аффинной хроматографии. Для уравнивания колонки через нее пропускали в достаточном количестве 20 мМ натрий-фосфатный буферный раствор, содержащий 1 мМ ЭДТА. После
10 этого через колонку пропускали 25 л бессывороточной культуры клеток яичников китайского хомячка (СНО), содержащей интерферон бета, при скорости потока 5-10 мл/мин, после чего колонку промывали 3 объемами колонки (CV) раствора для уравнивания.

Около 3 CV 20 мМ натрий-фосфатного буферного раствора (рН 7,2), содержащего 50% пропиленгликоля, пропускали через колонку при скорости потока 5 мл/мин для удаления примесных белков, после чего промывали колонку примерно 3 CV буферного раствора для уравнивания. Затем около 3 CV 20 мМ натрий-фосфатного буферного раствора (рН 7,2), содержащего 2 М NaCl, пропускали через колонку при скорости потока 5 мл/мин для удаления примесных белков. И, наконец, около 3 CV 20 мМ натрий-фосфатного буферного
20 раствора (рН 7,2), содержащего 2 М NaCl и 20% пропиленгликоля, пропускали через колонку при скорости потока 5 мл/мин для удаления примесных белков.

Около 3 CV буферного раствора для элюции (20 мМ натрий-фосфатный буферный раствор, содержащий 2 М NaCl и 50% пропиленгликоля, рН 7,2) пропускали через колонку при скорости потока 5 мл/мин, чтобы получить раствор, содержащий интерферон бета.
25 Чистота полученного элюируемого раствора была протестирована С4 ВЭЖХ аналитической хроматографией, результаты которой представлены на фигуре 2. Согласно данным фигуры 2 чистота интерферона бета составляла около 85% или более.

В контрольном эксперименте аффинную хроматографию проводили согласно описанному выше протоколу за исключением того, что промывка колонки 20 мМ натрий-фосфатным буферным раствором (рН 7,2), содержащим 50% пропиленгликоля, была пропущена. Чистота полученного при элюции раствора была проанализирована с помощью С4 ВЭЖХ аналитической хроматографии, результаты которой представлены на фигуре 3. Как видно из фигуры 3, в отсутствие промывки 20 мМ натрий-фосфатным буферным
30 раствором (рН 7,2), содержащим 50% пропиленгликоля, значительно снижается чистота интерферона бета.

Пример 2: обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ-ВЭЖХ)

Интерферон бета-содержащий раствор, полученный по настоящему изобретению в примере 1, подвергнутый диафильтрации с использованием ультрафильтрационной системы (отсекаемый молекулярный вес 10000), был нанесен на колонку для ОФ-ВЭЖХ (Protein C4 (размер частиц -10 мкм, размер пор - 30 Å, Vydac) при скорости потока 2
40 мл/мин. Затем колонку промывали примерно 3 CV 0,1% буферным раствором HC1 (рН 2,1). Элюцию интерферона бета проводили, используя 0,1% раствор HC1 (А) и раствор (В) - 0,1% HC1 в 90% этаноле, с помощью линейного градиента концентрации от 45% раствора (В) до 80% раствора (В) (около 20 CV) для того, чтобы отделить примесные белки от целевых белков.

Пример 3: гель-фильтрация

Раствор, содержащий интерферон бета, полученный в примере 2, был сконцентрирован до 200 мкг/мл и содержащийся в концентрате этанол был заменен 500 раз или более на 20
50 мМ натрий-ацетатный буферный раствор (рН 4,0). Получившийся раствор был нанесен на колонку с Sephacryl S-200, (1700 мл, XK-50/100, Amersham biosciences, Sweden), уравновешенную 20 мМ натрий-ацетатным буферным раствором (рН 3,0) для получения раствора, содержащего интерферон бета.

Пример 4: анализ с помощью ОФ-ВЭЖХ

Каждый из растворов, полученных в примерах 1, 2 и 3, был нанесен на колонку С4 ОФ-ВЭЖХ (Vydac 214TP54, внутренний диаметр 4,6 мм x 25 см в длину, размер частиц 5 мкм, размер пор 300 Е) при скорости потока 1 мл/мин. После этого через колонку пропускали 20 CV раствора ацетонитрила, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты, в виде линейного градиента от 30% ацетонитрила, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты, до 80% ацетонитрила, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты, для анализа хроматографической картины.

Фигуры 4А и 4В соответственно демонстрируют С4 ОФ-ВЭЖХ аналитическую хроматограмму буферного раствора для гель-фильтрационной хроматографии и С4 ОФ-ВЭЖХ аналитическую хроматограмму раствора, элюируемого после гель-фильтрационной хроматографии. Из фигур 4А и 4В можно видеть, что настоящее изобретение позволяет получить интерферон бета высокой степени чистоты.

Промышленная применимость

Согласно способу очистки по настоящему изобретению интерферон бета может быть очищен до высокой степени чистоты, составляющей 99% или более, при использовании нетоксичного пропиленгликоля и усовершенствованной аффинной хроматографии.

Формула изобретения

1. Способ очистки интерферона бета человека из культуры, содержащей рекомбинантный интерферон бета человека, включающий проведение аффинной хроматографии и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ), где аффинная хроматография включает:

адсорбцию культуры, содержащей интерферон бета, на уравновешенной колонке для аффинной хроматографии с последующим промыванием уравнивающим буферным раствором;

промывание колонки промывочным буферным раствором А с pH 6,5-7,5, содержащим 30-60 мас.% пропиленгликоля, и промывочным буферным раствором В с pH 6,5-7,5, содержащим 10-30 мас.% пропиленгликоля и 1-2 М NaCl; и

элюцию фракции, содержащей интерферон бета человека, буферным раствором с pH 6,5-7,5, содержащим 40-60 мас.% пропиленгликоля и 1-2 М NaCl,

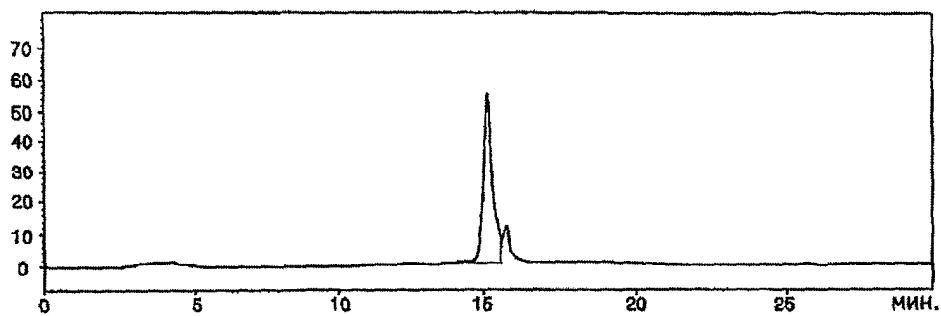
причем раствор, полученный после аффинной хроматографии, подвергают диафильтрации, полученный образец наносят на колонку для ОФ-ВЭЖХ, и затем фракцию, содержащую интерферон бета человека, элюируют при pH 2-5, используя растворы с градиентом концентраций этанола от 30-50% до 65-90%,

причем раствор, полученный ОФ-ВЭЖХ, концентрируют и подвергают гель-фильтрации.

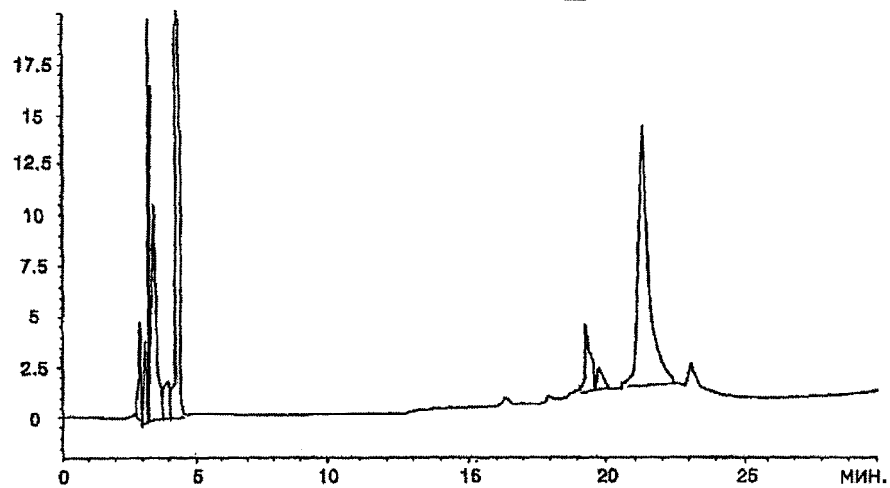
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что стадия промывки дополнительно включает промывку колонки промывочным буферным раствором С с pH 6,5-7,5, содержащим 1-2 М NaCl.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что каждый буферный раствор, используемый для промывки и элюции, является натрий-фосфатным буферным раствором или калий-фосфатным буферным раствором.

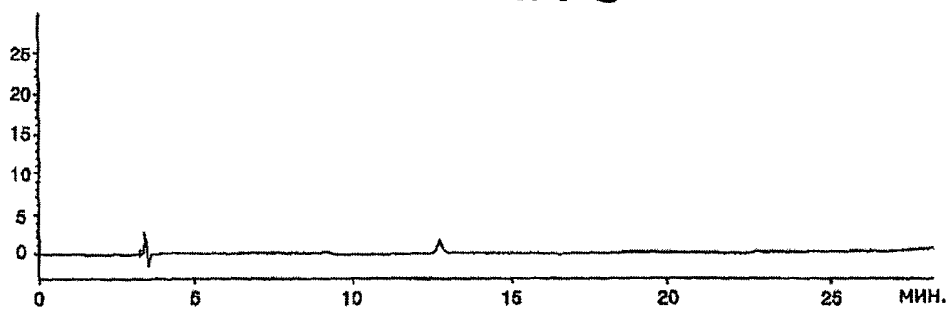
4. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что диафильтрацию проводят с использованием мембраны для ультрафильтрации с пределом пропускания по молекулярному весу 10000.



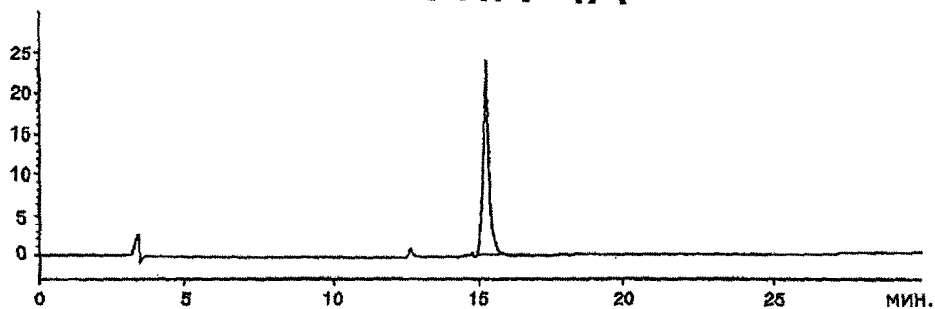
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4А



Фиг. 4В