



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-8461

(11)

215 319

Int.Cl.³

3(51)

C 07 G 7/00

A 61 K 45/02

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 07 G/ 2504 008

(22) 29.04.83

(44) 07.11.84

(71) ADW DER DDR; BERLIN, DD

(72) SCHADOW, DIETER, DIPL.-CHEM.; STEINBORN, EBERHARD, DIPL.-CHEM.; EICHMANN, EVELYN, DIPL.-BIOL.; DD;

(54) VERFAHREN ZUR ANREICHERUNG VON INTERFERONEN

(57) Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine möglichst proteasefreie Anreicherung von Interferonen unter industriellen Fertigungsbedingungen zu erreichen. Erfindungsgemäß wird zu einer Interferonlösung vorbehandelte hochdisperse Kieselsäure gegeben. Nach einer Einwirkungszeit des Proteins auf die vorbehandelte Kieselsäure von 1–20 h wird diese vom Überstand getrennt. Anschließend wird die hochdisperse Kieselsäure mit verschiedenen Pufferlösungen gewaschen, wobei verunreinigende Makromoleküle entfernt werden, an der sich die Elution des Interferons in Gegenwart von Kaliumthiocyanat bzw. Glycerin bzw. Äthylenglykol oder Tetraäthylammoniumchlorid in dem erwähnten Trispuffer anschließt.

Schadow
Steinborn
Eichmann

Verfahren zur Anreicherung von Interferonen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Anreicherung von Interferonen.

Anwendungsgebiet ist die Biochemie, speziell bei der Herstellung von Präparaten hoher spezifischer Aktivität.

Charakteristika der bekannten technischen Lösungen

Zur Reinigung von Proteinen sind Verfahren bekannt, die auf der Trennung nach dem Molekulargewicht der Molekülgröße bzw. der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Protein und Matrix beruhen. Hierzu benutzt man in den meisten Fällen Molekularsiebe (Sephadex), die im Falle des α -Interferons die Eigenschaft haben, solche Makromoleküle nach ihrer Größe zu trennen. (N. Fuchsberger: Acta biol. med. germ. 38, (1979), 795-800)

Des weiteren sind Verfahren bekannt, die auf hydrophobe Wechselwirkung der Proteine mit substituierten Agarosemolekülen (z.B. Octyl- oder Phenyl-Sephadex) beruhen um damit die stark hydrophoben Proteine, wie beispielsweise das α -Interferon von den weniger stark hydrophoben Proteinen zu separieren. (S. Yonehava, J. Biol. Chem. 256,8 (1981) 3770-3775)

Dazu gehört auch die Anreicherung von Interferon mit Hilfe

29 APR 1983 * 086410

der CPG-Glas-Säulenchromatographie. (J.E. Whitmann: J. Interferon Res. 1,2 (1981) 305-313; K.C. Chadka: Preparative Biochem. 11 (4), 1981 467-482; M. Wiranowska-Stewart; Mol. Immunol. 17 (5) (1980) 625-633; M. Rosenbergova: Acta virol. 25 (1981), 31-35).

Auf anderen Wirkungsmechanismen beruhen die Affinitätschromatographien, bei denen als Liganden Polyribonukleinsäurereste bzw. Dextranmoleküle Verwendung finden.

Die Methode der Hochdruckflüssigkeitchromatographie (HPLC₁), kann ebenfalls für die Trennung von Proteinen herangezogen werden, doch sind nur wenige Säulentypen zur Anreicherung hydrophober Proteine, wie z.B. das α -Interferon geeignet. (D.S. Hobbs: J. Biol. Chem. 257,8 (1982), 4071-4076; M. Rabenstein: Methods in Enzymol. 78, 464)

Nachteile dieser Verfahren sind einerseits die komplizierte Herstellung der Trägermaterialien, die geringe Ausbeute der gereinigten Proteine sowie die stark begrenzte Anwendbarkeit dieser Verfahren auf bestimmte makromolekulare Stoffe.

Andererseits sind Verfahren bekannt, die auf der unterschiedlichen Beweglichkeit der Makromoleküle in Acrylamidgelen unter dem Einfluß des elektrischen Feldes beruhen. Der begrenzende Faktor ist hier ebenfalls die Menge an Proteinen, die mit derartigen Methoden gereinigt werden können.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Anreicherung von Interferonen zu entwickeln. Das Verfahren soll ermöglichen, unter industriellen Fertigungsbedingungen Interferone, die in geringen Konzentrationen vorliegen, anzureichern.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Erfindungsgemäß wird eine Interferone, z.B. α -Interferon enthaltende Lösung (2-100ml) mit einer Proteinkonzentration von 10^{-15} - 10^{-3} mol/l im Batch- oder Säulenchromatographieverfahren mit 0,5-10 g vorbehandelter hochdisperser Kieselsäure (0,2-10 m^2/g) versetzt. Die Vorbehandlung der Kieselsäure erfolgt mit 2-50%iger heißer Salpetersäure und anschließendem Neutralwaschen.

Nach einer Einwirkungszeit der Interferonlösung auf die Kieselsäure von ca. 1-20 Stunden unter zirkulierenden Bedingungen wird die Kieselsäure abzentrifugiert und der Proteingehalt des Oberstandes bestimmt. Nach weiteren Waschungen mit einer Pufferlösung im pH-Bereich 6-8 wird das angereicherte Interferon durch 0,6-3,5 M KCN-Lösung bzw. 20-50%iges Glycerin bzw. Polyäthylenglycol oder 0,2-0,4 M Tetraäthylammoniumchlorid in einem Puffer pH 6-9 eluiert. Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wird das Interferon 10-100 fach angereichert.

Ein großer Vorteil des Verfahrens liegt darin, daß amn auch im Batchverfahren zu hohen Ausbeuten gelangt.

Anschließend soll die Erfindung an einem Beispiel näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel

2 ml einer interferonhaltigen Lösung mit einer Extinktion $E_{280}=1-2$ und einer Masse an α -Interferon von 10pg bis 10 μg , wird zu 0,5-0,7 g vorbehandelter Kieselsäure gegeben. Man verwendet hochdisperse Kieselsäure vom VEB Chemiewerk Bad Köstritz. Die Vorbehandlung der Kieselsäure erfolgt durch:

1. Kochen in 5%iger Salpetersäure, 1 h
2. Neutralwaschen mit destilliertem Wasser
3. Waschen mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2.

Die Lösung wird 3-12h unter medium-zirkulierenden Bedingungen der hochdispersen Kieselsäure ausgesetzt. Nach Zentrifugation wird der Oberstand verworfen und das Kieselsäurepellet unter medium-zirkulierenden Bedingungen mit o.g. Phosphatpuffer so oft gewaschen, bis die Extinktion $E_{280} < 0,05$ ist. Danach wird die Kieselsäure mit 0,1 M Tris-Puffer pH 8,0 2-5 mal gewaschen. Die Elution des gebundenen hydrophoben Proteins Δ -Interferon erfolgt durch 2-4fache 3-60minütige Einwirkung von 0,25 M Tetraäthylammoniumchlorid in 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 unter mediumzirkulierenden Bedingungen. Der Nachweis der interferonspezifischen Aktivität und die Proteinbestimmung mit Fluram des dialysierten Eluates erbrachten eine 10-100fache Anreicherung des hydrophoben Proteins Δ -Interferon mit einer Ausbeute von 60-80%.

2. Ausführungsbeispiel

2 ml einer proteinhaltigen Lösung mit einer Extinktion $E_{280} = 1-2$ und einer Masse anhydrophober Proteine, beispielsweise α -Interferon von 10 pg bis 10 μ g wird zu 0,5 - 0,7 g vorbehandelter hochdisperser Kieselsäure gegeben. Man verwendet aktiven Füllstoff Suprasil vom VEB Chemische Fabrik Fährbrücke Langenbach/Sa.

Die Vorbehandlung der Kieselsäure erfolgt durch:

1. Kochen in 5 %iger Salpetersäure, 1 h
2. Neutral waschen mit destilliertem Wasser
3. Waschen mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2

Die proteinhaltige Lösung wird 3 - 12 h unter medium-zirkulierenden Bedingungen dem Suprasil ausgesetzt. Nach Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das Kieselsäurepellet unter medium-zirkulierenden Bedingungen mit o. g. Phosphatpuffer so oft gewaschen, bis die Extinktion $E_{280} < 0,05$ ist. Danach wird die Kieselsäure mit 0,1 M Trispuffer pH 8,0 2 - 5 mal gewaschen. Die Elution des gebundenen hydrophoben Proteins α -Interferon erfolgt durch 2 - 4fache 3 - 60minütige Einwirkung von 0,25 M Tetraäthylammoniumchlorid in 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 unter medium-zirkulierenden Bedingungen. Der Nachweis der interferonspezifischen Aktivität und die Proteinbestimmungen mittels Aminosäurenanalyse des Eluates erbrachten eine 100fache Anreicherung des hydrophoben Proteins α -Interferon mit einer Ausbeute von ~ 90 %.

Erfindungsanspruch

Verfahren zur Anreicherung von Interferonen , dadurch gekennzeichnet, daß im Batch- oder Säulenchromatographieverfahren eine Interferone enthaltende Lösung vom pH 6-8 mit hochdisperser Kieselsäure, die zuvor mit heißer Salpetersäure gewaschen und neutralisiert wurde, 1-20h unter zirkulierenden Bedingungen versetzt, anschließend die Kieselsäure abzentrifugiert, das angereicherte Interferon mit einer Pufferlösung gewaschen und mit Hilfe von Kaliumthiocyanat bzw. Glycerin oder Äthylenglykol oder Tetraäthylammoniumchlorid eluiert wird.