



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 647 158 A5

⑤① Int. Cl.<sup>4</sup>: B 01 D 15/08

**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑳ Gesuchsnummer: 7806/80

㉔ Anmeldungsdatum: 20.10.1980

㉓ Priorität(en): 23.10.1979 NL 7907791

㉒ Patent erteilt: 15.01.1985

④⑤ Patentschrift  
veröffentlicht: 15.01.1985

㉗ Inhaber:  
Stichting Rega V.Z.W., Leuven (BE)

㉚ Erfinder:  
Heine, Jochen Wilhelm, North Chicago/IL (US)  
Billiau, Alfons Josef Denis Alida, Linden (BE)

㉛ Vertreter:  
Ammann Patentanwälte AG Bern, Bern

⑤④ **Verfahren zur Reinigung von Interferon.**

⑤⑦ Eine wässrige Lösung von menschlichem Fibroblasten-Interferon wird bei neutralem oder schwach alkalischem pH mit porösen Glasperlen zur selektiven Adsorption von Interferon in Berührung gebracht, die Glasperlen gewaschen und das Interferon in saurem pH-Bereich eluiert. Das resultierende Eluat wird nach einer Dialyse mit immobilisiertem Zinkchelate zur erneuten selektiven Adsorption von Interferon bei neutralem oder schwach alkalischem pH in Kontakt gebracht, das Zinkchelate gewaschen und das Interferon im sauren pH-Bereich eluiert. Die wiedergefundene Interferonaktivität nach dem zweiten Schritt beträgt 45 - 67 % bezüglich der Ausgangslösung, in welcher die verunreinigenden Proteine einen Anteil von bis über 85 % ausmachen können. Das vorliegende einfache zweistufige Reinigungsverfahren, bei welchem die verwendeten Reagentien wiedergewonnen und regeneriert werden können, lässt sich auch im grossen Massstab verwenden und liefert Interferon von hohem Reinheitsgrad.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Reinigung von Interferon, dadurch gekennzeichnet, dass man (a) eine wässrige Lösung von menschlichem Fibroblasten-Interferon an porösen Glasperlen und (b) anschliessend an einem immobilisierten Zink-chelat chromatographiert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass im Schritt (a) die wässrige Interferon-Lösung bei neutralem oder schwach alkalischem pH mit porösen Glasperlen zur selektiven Adsorption von Interferon in Kontakt gebracht wird und anschliessend das an diesen Perlen adsorbierte Interferon bei saurem pH eluiert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die Glasperlen nach der Adsorption und vor dem Eluieren mit einer phosphatgepufferten Solelösung von ungefähr neutralem pH und anschliessend mit einer Pufferlösung deren pH-Wert niedriger als jener der ungefähr neutralen Solelösung aber mindestens pH 3 ist, wäscht.

4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die zum Eluieren verwendete Lösung einen pH-Wert zwischen 1.5 und 2.7 und eine Ionenstärke von 0.05 bis 0.5 m hat.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Eluieren mit einem 0.3 m Glycin-HCl Puffer vom pH. 2.0 durchgeführt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Eluat aus dem Schritt (a) zur Vorbereitung für den Schritt (b) gegen eine phosphatgepufferte Solelösung dialysiert wird.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass dialysiertes Eluat aus Schritt (a) im Schritt (b) bei neutralem oder schwach alkalischem pH mit einem immobilisierten Zink-chelat zur selektiven Adsorption von Interferon in Kontakt gebracht wird und anschliessend das an diesem Adsorbens haftende Interferon bei saurem pH eluiert wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Adsorbens ein Chelat zwischen Zink und einer iminodiacetat-verknüpften epoxy-aktivierten Agarose ist.

9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das immobilisierte Zink-chelat nach der Adsorption und vor dem Eluieren mit einer phosphatgepufferten Solelösung von ungefähr neutralem pH und anschliessend mit einer Pufferlösung deren pH-Wert niedriger als jener der ungefähr neutralen Solelösung aber mindestens pH 5.9 ist, gewaschen wird.

10. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die zum Eluieren verwendete Lösung einen pH-Wert zwischen 6.0 und 4.0 und eine Ionenstärke von 0.05 bis 0.5 m hat.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Eluieren mit einer 0.1 m Natriumacetatlösung vom pH 4.2 durchgeführt wird.

12. Nach dem Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1-11 gereinigtes Interferon.

Interferon ist ein Glycoprotein, welches zum Schutz gegen Virus-Infektionen von lebenden Zellen gebildet wird. Seine chemische Struktur kann in Abhängigkeit des Zelltyps, welcher für die Herstellung verwendet wurde, etwas variieren. Dieses Interferon zeigt verschiedene biochemische Aktivitäten, wie eine solche gegen Viren, Protozoen, Zellwachstum sowie eine immunosuppressive Aktivität und kann folglich in der Medizin erfolgreich verwendet werden. Für ei-

nen generellen Überblick über das heutige Wissen bezüglich Interferon kann das folgende Buch angegeben werden: Interferons and their actions, von W.E. Stewart II, CRC Press, Inc., Cleveland, Ohio.

5 Für eine Anwendung in der Humanmedizin, sollte das Interferon durch menschliche Zellen hergestellt werden, wozu heute folgende Verfahren gebräuchlich sind:

1. Herstellung durch Infektion von frisch gesammelten Leukocyten von menschlichen Blutspendern durch Sendai-Viren. Daraus geht das sogenannte Leukocyten Interferon wie von Cantell et al, In Vitro, 3, 35-38, (74) beschrieben hervor.

2. Herstellung auf kultivierten diploiden menschlichen Fibroblasten mit Hilfe des sogenannten «Poly-I : C-Induktionsverfahren». Das resultierende Fibroblasten Interferon unterscheidet sich vom Leukocyten Interferon durch einige biologische und physikalischchemische Kriterien (vgl. A. Billiau et al, J. Gen. Virol., 19, 1-8, (73)).

3. Herstellung in Lymphoblastoid ähnlichen Zellen durch virale Induktion. Das resultierende Lymphoblastoid Interferon zeigt starke Ähnlichkeit zum Leukocyten Interferon (vgl. Strander et al, J. Clin. Microbiol., 1, 116-117, (75)).

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Reinigung von menschlichem Fibroblasten-Interferon, bevorzugt von 25 solchem, welches nach der oben beschriebenen zweiten Methode hergestellt worden ist, und auf nach diesem Verfahren gereinigtem Interferon.

Die Reinigung von Interferon ist notwendig sowohl für das Studium des chemischen Charakters von Interferon als 30 auch für dessen klinische Anwendung, da eine rohe Interferonlösung verunreinigende Proteine enthalten kann, welche negative Effekte auf solche Studien und Anwendungen haben können.

Für beide Zwecke werden grosse Mengen von gereinigtem Interferon benötigt. Obwohl viele Verfahren zur teilweisen Reinigung und einige Verfahren zur vollständigen Reinigung von Interferon beschrieben worden sind, weisen alle 35 Mängel auf. Diese Unzulänglichkeiten sind im allgemeinen entweder die Notwendigkeit von komplexen Adsorbentien und Reagentien oder die Verwendung von Verfahren mit mehreren Schritten, was für die Herstellung in grossem Massstab nicht brauchbar ist, oder aber die Tatsache, dass nach der Reinigung nur noch ein kleiner Teil der anfänglich vorhandenen Interferonaktivität wiedergefunden wird.

40 Deshalb besteht ein Bedürfnis nach einem Verfahren zur Reinigung von Interferon, und im speziellen ein Verfahren zur Reinigung von menschlichem Fibroblasten-Interferon, welches eine hohe Ausbeute an Aktivität in gereinigter Form liefert, welches keine komplexen Reagentien und Schrittfolgen verlangt und welches für eine Verwendung in grossem 45 Massstab tauglich ist.

Als Resultat einer ausgedehnten Forschung wurde gefunden, dass eine hohe Interferon Aktivität von vollständig gereinigtem Interferon wiedererhalten werden kann, indem 55 man menschliches Fibroblasten-Interferon in einem einfachen Zweischrittverfahren reinigt, welches eine Kombination von zwei früher bekannten Verfahren ist. Dieses Zweischrittverfahren besteht (a) aus einer Chromatographie von wässriger Interferonlösung an porösen Glasperlen und (b) 60 aus einer Chromatographie der resultierenden wässrigen Interferonlösung an immobilisierten Zink-chelat.

Wenn im ersten Schritt eine Interferonlösung, welche verunreinigende Proteine enthält, bei neutralem oder 65 schwach alkalischem pH mit porösen Glasperlen in Berührung gebracht wird, wird das Interferon selektiv an diesen Perlen adsorbiert und der Hauptteil der verunreinigenden Proteine bleibt in Lösung und kann ausgewaschen werden.

Das absorbierte Interferon kann danach bei saurem pH von den Glasperlen eluiert werden.

Wenn danach im zweiten Schritt die eluierte Interferonlösung bei neutralem oder schwach alkalischem pH mit einem immobilisierten Zink-chelat Gel in Berührung gebracht wird, wird das Interferon selektiv an diesem Zink-chelat adsorbiert und die allfällig noch vorhandenen verunreinigenden Proteine bleiben in Lösung und können ausgewaschen werden. Das adsorbierte Interferon kann danach bei saurem pH vom Zink-chelat eluiert werden und man erhält ein Endprodukt von extrem hohem Reinheitsgrad.

Durch Verwendung dieses Zweischrittverfahrens erzielt man einen so hohen Reinheitsgrad, dass man sagen kann, das Produkt ist in seiner Substanz vollständig rein. Im weiteren wird ein hoher Anteil der anfänglich vorhandenen Interferon Aktivität wiedergefunden: im ersten Schritt 50–70%, im zweiten Schritt 90–95%, über beide Schritte 45–67%.

Ein spezieller Vorteil liegt darin, dass das Endprodukt der vorliegenden Reinigungsmethode bei der Anwendung keine Hautreaktionen mehr auslöst. Die Produkte aus früheren Reinigungsmethoden führten in der klinischen Anwendung zu Hautreaktionen bei den Patienten und es zeigte sich, dass das Produkt der vorliegenden Erfindungen frei ist von solchen Nebenwirkungen, was für eine klinische Verwendung sehr wichtig ist.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die Reagentien leicht erhältlich sind und mehrmals hintereinander wiederverwendet werden können, denn sowohl die Glasperlen als auch das immobilisierte Zink-chelat können nach Gebrauch zurückgewonnen oder regeneriert werden. Im weiteren verwendet das Verfahren der vorliegenden Erfindung nur zwei Stufen. Alle diese Tatsachen führen zu einer einfachen Methode, welche auch in grossem Massstab verwendet werden kann.

Somit liefert die Erfindung ein Reinigungsverfahren für Interferon, bei welchem eine wässrige Lösung von menschlichem Fibroblasten-Interferon (a) an porösen Glasperlen und die resultierende Interferonlösung (b) an immobilisierten Zink-chelat chromatographiert wird.

Man sollte hier bemerken, dass beide Schritte dieser Erfindung einzeln bekannt sind und früher zur Reinigung von menschlichem Fibroblasten-Interferon verwendet wurden. Vergleiche A. Billiau et al, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 16, 49–55 (1979) für den ersten Schritt und V. G. Edy et al, *J. Biol. Chem.* 252, 5934–5935 (1977) für den zweiten Schritt. Zur Zeit dieser Publikation jedoch werden die genannten Schritte völlig unabhängig voneinander verwendet und es gab keine Andeutungen, dass durch die Kombination dieser beiden Schritte zu einem einfachen Zweistufenverfahren eine vollständige Reinigung erreicht würde.

Überdies sind weitere Reinigungsverfahren für Interferon bekannt und es ist unmöglich vorauszusagen, dass die beiden vorgenannten Schritte ohne weiteres Hinzutun zum gewünschten Resultat führen. Im weiteren ist die Abwesenheit jeglicher Hautreaktion überraschend und unerwartet, weil bis jetzt alle gereinigten Fibroblasten-Interferone bei der klinischen Anwendung bei den Patienten solche Hautreaktionen auslösten (vgl. A. Billiau et al, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 16, 56–63 (1979)).

Im weiteren muss bemerkt werden, dass die Kombination beider Schritte zu einem Zweischrittverfahren zu einer kleinen Modifikation des ersten Schrittes führte; bis jetzt wurde entsprechend der obgenannten ersten Billiau Publikation das Eluat der Glasperlen in einem Natriumacetatpuffer gegen Polyäthylenglykol dialysiert, um es für die Lyophilisation und den klinischen Gebrauch vorzubereiten; bei der vorliegenden Erfindung jedoch wird gegebenenfalls das Eluat zur Vorbereitung für den nächsten Reinigungsschritt, wel-

cher später beschrieben werden soll, gegen einen Phosphatpuffer dialysiert.

Eine Ausführungsform der Erfindung wird nun etwas mehr im Detail beschrieben.

Die am Anfang des vorliegenden Reinigungsverfahrens verwendete Lösung kann irgend eine wässrige Lösung von menschlichem Fibroblasten-Interferon sein, welche verunreinigende Proteine enthalten kann und einer Reinigung bedarf. Eine solche Lösung kann von einer konventionellen Interferonherstellung stammen. Es muss bemerkt werden, dass das Verfahren nur auf menschliches Fibroblasten-Interferon anwendbar ist und dass andere Interferontypen andere Reinigungsverfahren brauchen.

Obwohl als Startlösung verschiedene wässrige Medien verwendet werden können, um das Interferon in Lösung zu halten, wurden durch Verwendung von Eagle's MEM Kulturmedium gute Resultate erzielt (vgl. *Science*, 130, 432 (1959)). Diesem Medium kann ein Stabilisator beigelegt werden; bevorzugt wird eine menschliche Plasma Proteinfraction, wie sie bei Blutbanken verwendet wird.

Der anfängliche Proteingehalt und die Interferonaktivität der Startlösung ist nicht an bestimmte Grenzen gebunden. Jedoch kann die Lösung verdünnt werden, falls der Proteingehalt so gross ist, dass eine Ausfällung riskiert werden muss oder sie kann eingengt werden, falls der Proteingehalt so klein ist, dass das Verfahren unökonomisch wird. Es kann hier bemerkt werden, dass der Gehalt an verunreinigendem Protein den Gehalt an Interferon übersteigen kann und dass er über 85% der Gesamtmenge an gelösten Substanzen ausmachen kann.

Der erste Schritt des Verfahrens der vorliegenden Erfindung besteht in einer Chromatographie an porösen Glasperlen. Solche Glasperlen sind im Handel unter verschiedenen Markenzeichen erhältlich, häufig mit definierter Porengrösse, z. B. mit ziemlich einheitlicher Porengrösse gehäuft um einen mittleren Wert. Ein solcher Mittelwert kann z. B. 350 oder 900 Å sein, obwohl im allgemeinen jeder Wert zwischen 170 und 1700 Å verwendet werden kann (vgl. W. Haller, *Nature*, 206, 693–696 (1965) und H. G. Bock et al, *Science*, 191, 380–383 (1976)). Der Perlendurchmesser kann weniger einheitlich sein und kann im allgemeinen zwischen 50 und 500 µm schwanken. Diese Perlen können in Kolonnen gepackt werden für kontinuierliche Verfahren oder aber frei für ganze Ansätze verwendet werden.

Im ersten Schritt des Verfahrens wird die anfänglich vorhandene Lösung mit den porösen Glasperlen in Berührung gebracht, wobei das Interferon spezifisch an den Perlen adsorbiert wird. Dies kann in sehr ökonomischer Weise geschehen, indem die Startlösung mit einer gewissen Menge Glasperlen in einem Gefäss geschüttelt wird; man kann die Startlösung aber auch durch eine mit Glasperlen gepackte Säule laufenlassen. Der Kontakt führt zur Adsorption von Interferon aus der Lösung an den Glasperlen, während die Hauptmenge des anfänglich vorhandenen verunreinigenden Proteins durch die Perlen nicht gebunden wird und in Lösung bleibt.

Der pH-Wert während der Behandlung ist mit dem pH-Wert der Startlösung identisch und beträgt im Normalfall ungefähr 7.4, falls das MEM Kulturmedium von Eagle verwendet wird. Das System arbeitet aber auch bei anfänglichen pH-Werten zwischen 7.0 und 8.2 gut. Über einem pH von 8.2 werden Teile von Interferon inaktiviert und unterhalb 7.0 wird viel Interferon an den Glasperlen nicht adsorbiert.

Die Dauer des Kontaktes ist nicht an kritische Grenzen gebunden, doch sollte sie genügend gross sein, damit fast alles Interferon adsorbiert werden kann; im Normalfall beträgt sie zwischen 0.5 und 26 Stunden.

Nach erfolgter Adsorption wird die verbleibende Lösung z. B. durch Dekantieren abgetrennt. Dann werden die Glasperlen mit einer konventionellen Waschflüssigkeit wie einer phosphatgepufferten Solelösung mit neutralem pH gewaschen, um alles ungebundene Protein zu entfernen. Die molare Stärke dieser Lösung sollte ziemlich klein sein, um adsorbiertes Interferon nicht auszuwaschen. Gute Resultate beim Waschen wurden durch die Verwendung einer phosphat-gepufferten Solelösung, welche Ca und Mg Salze enthielt, erhalten (vgl. R. Dulbecco et al, J. Exp. Med., 99, 167–182 (1954)); aber auch andere Waschflüssigkeiten führen zu ähnlichen Resultaten. Weiter wird gewaschen mit einer speziellen Pufferlösung von kleinerem pH wie einem 0.01 m Glycin-HCl Puffer von pH 3.5, um versehentlich adsorbiertes verunreinigendes Protein zu entfernen. Der pH-Wert dieser Waschflüssigkeit sollte nicht kleiner als 3.0 sein und deren Ionenstärke nicht grösser als ungefähr 0.05 m, da kleinere pH-Werte und grössere Ionenstärken ein Eluieren von grossen Mengen an Interferon provozieren.

Nach dem Waschen wird das adsorbierte Interferon mittels eines sauren wässrigen Puffers von den Glasperlen eluiert. Die Lösung sollte im allgemeinen einen pH-Wert zwischen 1.5 und 2.7 aufweisen, vorzugsweise einen pH von 2.0. Über einem pH von 2.7 ist das Auswaschen ungenügend und unterhalb eines pH von 1.5 ist das eluierte Interferon instabil. Die Ionenstärke (Molarität) der Lösung ist weniger kritisch und bewegt sich zwischen 0.05 und 0.5 m. Werte unter 0.05 m ergeben ungenügende Pufferung, wodurch man die Kontrolle über den pH verliert, und Werte über 0.5 m bewirken ein Auskristallisieren von Bestandteilen.

Alle geeigneten wasserlöslichen Puffer oder Puffergemische können zum Eluieren verwendet werden, sofern sie den Anforderungen an pH und Ionenstärke genügen. So kann die eluierende Lösung eine Aminosäure und eine anorganische Säure oder ein anorganisches Salz und eine anorganische Säure oder jede andere Kombination oder auch einzelne Substanzen enthalten. Gute Resultate wurden durch Verwendung einer 0.1 m KCl-HCl Pufferlösung mit pH 2.0 und noch bessere Resultate mit einer 0.3 m Glycin-HCl Pufferlösung vom pH 2.0 erreicht. Ferner kann diese Lösung einen Stabilisator enthalten, z. B. wie eingangs erwähnt eine Proteinfraktion aus menschlichem Plasma.

Mit Hilfe einer solchen sauren Lösung kann das gesamte adsorbierte Interferon von den Glasperlen eluiert werden.

Nach dem Eluieren können die Glasperlen gewaschen und zurückgewonnen werden; z. B. können sie mit starken Säuren während einiger Tage gespült werden oder man kann sie mit 10%iger Salpetersäure auf einem Dampfbad erhitzen und in beiden Fällen werden sie anschliessend mit Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Danach können sie erneut zur Chromatographie von Interferon in der oben beschriebenen Weise verwendet werden.

Das Resultat der eben beschriebenen Chromatographie ist eine wässrige Interferonlösung, welche den grössten Teil der ursprünglichen Interferonaktivität besitzt und nur noch kleine Mengen an verunreinigenden Proteinen enthält. Praktisch beträgt die Ausbeute an Interferonaktivität in diesem ersten Schritt 50–70% und die spezifische Aktivität des Produktes pro Milligramm Protein bezüglich des Ausgangsmaterials konnte wesentlich erhöht werden.

Das aus diesem ersten Schritt erhaltene Eluat ist sauer und enthält Glycin oder andere Verbindungen, was für eine sofortige Weiterverwendung im zweiten Schritt weniger geeignet ist. Vor einer Weiterverwendung sollte sie also neutralisiert und von Glycin befreit werden. Dies kann erreicht werden durch Dialyse gegen eine phosphatgepufferte Solelösung von neutralem pH. Gute Resultate wurden durch Verwendung einer Pufferlösung, welche 0.02 m Natriumphos-

phat (Dinatrium und Mononatrium) und 1.0 m Natriumchlorid enthielt und einen pH von 7.4 zeigte, erzielt; aber auch andere Pufferlösungen sind geeignet. Der hohe Natriumchloridgehalt in dieser Pufferlösung wird auf die Interferonlösung übertragen und zeigt im nächsten Schritt einen günstigen Effekt.

Der zweite Schritt der vorliegenden Erfindung beinhaltet eine Chromatographie an immobilisierten Zinkchelat.

Die Ausgangslösung in diesem zweiten Schritt ist eine wässrige Lösung von menschlichem Fibroblasten-Interferon, wie sie aus dem oben beschriebenen ersten Schritt nach Neutralisation und Entfernung von Glycin erhalten worden ist. Diese Lösung kann je nach Bedarf verdünnt oder eingengt werden, jedoch ist ein solcher Schritt im Normalfall nicht nötig.

In diesem zweiten Schritt kann jede Art von Zinkchelat, welches an einen geeigneten Träger gebunden ist, verwendet werden; das bevorzugte Material jedoch ist ein an Sepharose<sup>®</sup> gebundenes Zinkchelat aus Iminodiacetat (vgl. J. Porath et al, Nature, 258, 598–599 (1975) und V. G. Edy et al, J. Biol. Chem., 252, 5934–5935 (1977), welche hier als Referenz aufgenommen werden). Ein solches Adsorbens kann hergestellt werden, indem zunächst das Dinatriumsalz der Iminodiessigsäure an epoxy-aktivierte Sepharose<sup>®</sup> gebunden wird (z. B. Agarose mit einer endständigen Epoxygruppe in der Seitenkette) und dann die Zinkionen eingeführt werden, welche durch die Iminodiacetatgruppen chelatisiert werden. Wenn das Zwischenprodukt in eine Säule gepackt wird, kann das Zink eingeführt werden, indem man eine Zinkchloridlösung durch die Säule laufen lässt. Das Produkt ist sofort für den weiteren Gebrauch bereit. In diesem Produkt sind die Zinkionen durch starke Bindungen gebunden und sind fähig, in Abhängigkeit des pH-Wertes Interferonmoleküle reversibel zu binden.

Die chelatisierten und immobilisierten Zinkionen können spezifisch menschliches Fibroblasten-Interferon bei neutralem oder schwach alkalischem pH und kleiner Ionenstärke der mineralischen Zusätze selektiv binden. Bei einer Reduktion des pH-Wertes und einer Erhöhung der Ionenstärke wird das Interferon eluiert. Gutes Eluieren wird erreicht bei Verwendung eines pH-Gradienten bei konstant hoher Ionenstärke (vgl. die vorgenannte Publikation von Edy).

Im zweiten Schritt des Verfahrens der vorliegenden Erfindung wird die Ausgangslösung mit dem immobilisierten Zinkchelat in Berührung gebracht, um daran das Interferon selektiv zu adsorbieren. Dies kann dadurch geschehen, dass man die zu reinigende Lösung entweder durch eine mit Adsorbens gefüllte Säule schickt oder in einem Gefäss in Gegenwart einer bestimmten Menge des Adsorbens schüttelt. Die Verwendung der Säule wird hier bevorzugt, da wie oben erwähnt, das Adsorbens in dieser Form einfach hergestellt werden kann. Der Kontakt führt zur Adsorption des Interferons aus der Lösung am Zinkchelat, während noch vorhandenes verunreinigendes Protein nicht gebunden wird und in Lösung bleibt.

Der pH während der Chromatographie beträgt normalerweise 7.4, wenn die Ausgangslösung wie erwähnt gegen eine phosphatgepufferte Solelösung dialysiert wurde; das System arbeitet aber auch bei anfänglichen pH-Werten zwischen 7.0 und 8.2 gut. Über einem pH von 8.2 geht etwas Aktivität verloren und unterhalb 7.0 geht viel Interferon durch die Säule und wird nicht adsorbiert.

Die Dauer des Kontaktes ist nicht an kritische Grenzen gebunden, doch sollte sie genügend gross sein, damit das gesamte Interferon adsorbiert werden kann; sie variiert zwischen 0.5 und 26 Stunden.

Nach erfolgter Adsorption wird die verbleibende Lösung entfernt, und die Kolonne kann mit einem konventionellen

Waschmittel, wie einer phosphat-gepufferten Lösung von pH 7.4 gewaschen werden, um zurückgebliebenes nicht adsorbiertes Protein zu entfernen. Um versehentlich gebundenes Protein zu entfernen kann weiter mit einer Pufferlösung von kleinerem pH, wie einer 0.1 m Natriumacetat/Essigsäurelösung von pH 5.9, gewaschen werden. Der pH dieser Pufferlösung sollte nicht kleiner als 5.9 sein, um ein Auswaschen von Interferon zu verhindern. All diese Waschlösungen können wie die oben erwähnte Dialyseflüssigkeit 1.0 m an Natriumchlorid sein, um nichtspezifische Proteinbindungen auf der Kolonne zu vermeiden.

Nach dem Waschen kann das Interferon vom Zinkchelat Adsorbens mit einer sauren wässrigen Lösung eluiert werden. Im allgemeinen kann der pH dieser Lösung zwischen 4.0 und 6.0 sein und um sehr gute Resultate zu erhalten, kann ein pH-Gradient von 6.0 bis 4.0 verwendet werden. Kein vollständiges Eluieren wird bei pH-Werten über 6.0 erreicht und unterhalb 4.0 erhält man ein instabiles Interferon.

Die Ionenstärke (Molarität) der eluierenden Flüssigkeit ist nicht kritisch und kann zwischen 0.05 und 0.5 m variieren. Kleinere Werte ergeben ungenügende Pufferwirkung mit Verlust der pH Kontrolle und höhere Werte können durch Auskristallisieren von Bestandteilen Schwierigkeiten ergeben. Gute Resultate wurden durch Verwendung einer 0.1 m Natriumacetatlösung erzielt, bei welcher der pH mittels Eisessig auf 4.2 eingestellt wurde; andere Lösungen wie sie in der Publikation von Edy erwähnt werden, sind hiermit aber nicht ausgeschlossen. Wird diese Lösung von pH 4.2 direkt nach der Waschflüssigkeit von pH 5.9 verwendet, wird automatisch ein pH-Gradient erreicht. Als Alternative kann eine 0.1 m Natriumacetatlösung mit allmählich sinkendem pH-Wert verwendet werden. All diese Lösungen sollten 1.0 m an Natriumchlorid sein, um das Natriumchloridgegewicht auf der Kolonne zu erhalten.

Mit Hilfe einer solchen eluierenden Lösung kann das gesamte Interferon vom Zinkchelatadsorbens ausgewaschen werden.

Nach erfolgter Chromatographie kann das Adsorbens gewaschen und regeneriert werden; z. B. kann die Kolonne mit gepufferter Äthylendiamintetraacetat (EDTA) Lösung gewaschen, das EDTA mit phosphatgepufferter Solelösung von pH 7.4 ausgewaschen, die Kolonne mit saurer Zinkchloridlösung, bis das Chelat wieder mit Zink gesättigt ist, behandelt, das überschüssige Zinkchlorid mit Natriumacetatpufferlösung ausgewaschen und die Kolonne bis zum neutralen pH äquilibriert werden.

Das Resultat dieser Chromatographie ist eine wässrige Lösung von Interferon, welche noch die gesamte oder den grössten Teil der ursprünglichen Interferonaktivität besitzt und welche nur noch sehr kleine Mengen an verunreinigten Proteinen enthält. Die wiedergefundene Interferonaktivität in diesem zweiten Schritt kann bis 90–95% gesteigert werden, was gesamthaft für beide Schritte eine Ausbeute von 45–67% ausmacht.

Die spezifische Aktivität des Produktes kann bis  $10^9$  Einheiten/mg Protein gesteigert werden, was höher ist, als jeder bis jetzt gefundene Wert. Die Reinheit der erhaltenen Interferonlösung kann mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden. Eine dieser Methoden ist die normale Proteinbestimmung, z. B. mit Fluorescamin. Eine andere Methode besteht in der Markierung des gereinigten Interferons mit einem radioaktiven Tracer wie  $^{125}\text{I}$  und anschliessender Elektrophorese an Acrylamidgel und X-Ray Autoradiographie. Dies zeigt, ob das gereinigte Interferon ein einheitliches Produkt ist oder nicht. Ferner kann geprüft werden, ob das Endprodukt auf der menschlichen Haut Reaktionen auslöst oder nicht.

All diese Methoden zeigen, dass das aus dem Reinigungsverfahren der vorliegenden Erfindung erhaltene Endprodukt einen sehr hohen Reinheitsgrad aufweist. So wird in den Beispielen gezeigt, dass noch verbleibende Verunreinigungen mit der Proteinbestimmung nicht nachgewiesen werden konnten und das Endprodukt in der Elektrophorese den Anschein eines homogenen Produktes machte. Im weiteren verursachte das Produkt bei der Anwendung am Menschen weder Fieber noch irgendwelche Hautreaktionen.

Das Zweischrittreinigungsverfahren der vorliegenden Erfindung führt zu einem Wiederauffinden eines Grossteils der ursprünglichen Interferonaktivität in einer sehr reinen Form. Das Produkt ist dank der Abwesenheit von Hautreaktionen für eine klinische Therapie geeignet. Dank der guten Zugänglichkeit und der Regenerierbarkeit der Reagentien ist die Herstellung in grossem Massstab möglich geworden. Das bedeutet, dass in Zukunft grosse Mengen an menschlichem Fibroblasten-Interferon für die chemische Charakterisierung und die klinische Verwendung bereitgestellt werden können. Die folgenden Beispiele illustrieren das Verfahren der vorliegenden Erfindung.

#### Beispiel I.

Das Ausgangsmaterial war eine wässrige Interferonlösung, welche durch Stimulation von menschlichen Embryozellen des Fibroblasttyps mit Polyinosin-polycytidin Ribonucleinsäure abgeleitet wurde. Das Interferon war in Eagle's MEM Kulturmedium von pH 7.4, welches 1 Volumenprozent menschliche Plasmaproteinfraktion (vom belgischen Roten Kreuz geliefert) enthielt. In Tabelle A wird die Interferonaktivität und der Proteingehalt dieser Lösung eines in kleinem Massstab durchgeführten Experimentes festgehalten.

Diese Ausgangslösung wurde mit porösen Glasperlen (Electro-Nucleonics Inc) mit einer Porengrösse von ungefähr 350 Å und einer Perlengrösse von 75–120 µm im Verhältnis von 30 ml Lösung zu ungefähr 1 ml Glasperlen gemischt. Diese Mischung wurde während 2 Stunden mässig bewegt, um die Perlen in Suspension zu halten und um eine selektive Adsorption von Interferon aus der Lösung an den Glasperlen zu bewirken. Danach liess man die Glasperlen sich setzen und entfernte die darüberstehende Lösung durch Dekantieren. Die Glasperlen wurden dann mit einer phosphatgepufferten Solelösung, welche pro Liter 8 g NaCl, 1.15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 g KCl, 0.12 g  $\text{MgSO}_4$  und 0.1 g  $\text{CaCl}_2$  (vgl. Dulbecco et al, J. Exp. Med. 99, 167–182 (1954)) enthielt, im Verhältnis von 20 ml Lösung pro ml Glasperlen zweimal gewaschen. Danach wurden sie ein Mal im gleichen Verhältnis mit einem 0.01 m Glycin-HCl Puffer von pH 3.5 gewaschen. Das Eluieren der Glasperlen erfolgte durch  $2 \times 5$ - und  $2 \times 30$ minütiges Rühren mit einer 0.3 m Glycin-HCl Pufferlösung von pH 2.0 jedesmal im Verhältnis von 2 ml Pufferlösung pro ml Perlen. Diese Pufferlösung enthielt als Stabilisator 0.09 mg menschliche Plasmaproteinfraktion pro ml. In Tabelle A wird der Proteingehalt und die Interferonaktivität, welche zu 68% wiedererhalten wurde, festgehalten.

Nach dem Eluieren wurden die Glasperlen durch mehrtägiges Spülen mit starken Säuren und anschliessendem Waschen mit destilliertem Wasser bis zur Neutralität regeneriert. Vor dem Wiedergebrauch wurden sie im Autoklaven sterilisiert.

Ein Teil der vereinigten Eluate wurde gegen  $4 \times 500$  ml einer phosphatgepufferten Solelösung, welche 0.02 m Natriumphosphat und 1.0 m Natriumchlorid enthielt und einen pH-Wert von 7.4 hatte dialysiert. Die Pufferlösung wurde alle 6–8 Stunden gewechselt. Als Resultat erreichte der pH den Wert 7.4 und die Glycinkonzentration verringerte sich

von 0.3 m auf ungefähr 0.0001 m, währenddem ein Natriumchloridgehalt von 1.0 m eingeführt wurde.

Die resultierende Interferonlösung wurde mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 20 ml/Std. durch eine mit immobilisierte Zinkchelate gefüllte Säule von der Dimension  $0.9 \times 8$  cm geschickt. Das unlösliche Zinkchelate wurde durch Kupplung von Iminodiacetat an epoxyaktivierte Sepharose 6 B und anschliessendes Zufügen von Zinkchloridlösung, wie von Edy et al, in J. Biol. Chem. 252, 5934–5935 (1977) vorgeschlagen, hergestellt.

Nach dem Auftragen des Interferons wurde die Säule mit 10 ml phosphatgepufferter Solelösung (wie sie für die Dialyse verwendet wurde), um ungebundenes Protein zu entfernen, und mit  $3 \times 10$  ml einer 1.0 m Natriumchlorid enthaltenden 0.1 m Natriumacetatpufferlösung von pH 5.9, um gebundenes ungewünschtes Protein zu entfernen, gewaschen.

Danach wurde die Säule mit  $2 \times 10$  ml einer 0.1 m Natriumacetatpufferlösung, welche 1 m Natriumchlorid enthielt und einen pH-Gradienten von 6–4 zeigte, eluiert. Die Fraktionen im pH-Bereich von 5.2–4.5 wurden gesammelt, da sie den Hauptteil der Interferonaktivität enthielten.

In Tabelle A wird der Proteingehalt und die Interferonaktivität der resultierenden Lösung festgehalten. Die Interferonaktivität, welche in diesem zweiten Schritt wiedergefunden wurde, betrug 94%, was einer Gesamtausbeute über beide Stufen von 64% entspricht.

Das Eluat zeigte eine spezifische Interferonaktivität von ungefähr  $1.1 \times 10^9$  Einheiten/mg, was bedeutet, dass das Produkt eine sehr hohe Reinheit aufwies.

Die Zinkchelatsäule wurde durch Waschen mit  $5 \times 10$  ml einer 0.05 m EDTA phosphatgepufferter Lösung von pH 7.4 regeneriert. Das verbliebene EDTA wurde durch Waschen mit  $5 \times 10$  ml phosphatgepufferter Solelösung (pH 7.4) entfernt. Dann wurde erneut Zink eingeführt durch Waschen bis zur Sättigung mit einer 0.1 m Natriumacetatlösung (pH 4.0), welche 1 m Natriumchlorid und 0.001 m  $ZnCl_2$  enthielt. Der Sättigungspunkt wurde durch die Beobachtung einer Fällung festgestellt, welche entsteht, wenn man einen Tropfen Eluat mit einer kleinen Menge Natriumcarbonatlösung mischt. Danach wurde der Zinküberschuss mit Natriumacetatpufferlösung von pH 4 ausgewaschen und die Kolonne für den Wiedergebrauch auf pH 7.4 äquilibriert, indem man mit  $5 \times 10$  ml phosphatgepufferter Solelösung gewaschen hat.

Die Reinheit des Endprodukts wurde durch Proteinbestimmung, Acrylamid Gelelektrophorese und Applikation an menschlicher Haut getestet. In der Proteinbestimmung (Fluorescaminmethode) war die Proteinmenge fast unmessbar (der Grenzwert in dieser Methode beträgt ungefähr  $2 \mu\text{g}$  pro ml). Nach Markierung mit einem radioaktiven Isotop und anschliessender Autoradiographie zeigte die Elektrophorese an Acrylamidgel nur eine einzige radioaktive Zone mit einem Molekulargewicht von ungefähr 22 000. Bei der Prüfung am Menschen zeigte sich keine Hautreaktion. Dies führt zum Schluss, dass das Produkt dieses Beispiels einen hohen Reinheitsgrad aufweist und man es für vollständig rein halten kann.

Tabelle A

Material	Volumen ml	Total Protein mg	Total Aktivität Einheiten	spez. Aktivität Einheiten/mg
Startlösung	125	67.92	$4 \times 10^6$	$5 \times 10^4$
Glasperlen				
nicht adsorbiert				
+ Waschphasen	300	60.81	0	0
Eluate	34	2.04	$2.7 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$
dialysierte Lösung	34	2.04	$2.7 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$
Zinkchelate:				
nicht adsorbiert				
+ 1. Waschphase	44	2.03	0	0
2. Waschphase	30	0	0	0
Eluate	3	$\sim 0.002$	$2.55 \times 10^6$	$\sim 1.1 \times 10^9$

## Beispiel II

Für zwei Versuche in grossem Massstab wurde das gleiche Ausgangsmaterial wie in Beispiel I verwendet. Die Versuchsbedingungen waren ähnlich wie die in Beispiel I mit Ausnahme der Dialyse, in welcher  $4 \times 4$  lt einer phosphatgepufferter Solelösung verwendet wurden und der Zinkchelatekolonne, welche die Abmessungen  $1.5 \times 16$  cm aufwies. Die Zinkchelatekolonne wurde zuerst mit  $1 \times 30$  ml phosphatgepufferter Solelösung und dann mit  $5 \times 30$  ml Natriumacetatpufferlösung gewaschen. Das Eluieren wurde mit  $2 \times 30$  ml einer 0.1 m Natriumacetatpufferlösung von pH 4.2, welche 1.0 m Natriumchlorid enthielt, durchgeführt, was sich in einem pH-Gradienten im Eluat auswirkte. Die Frak-

tionen im pH-Bereich von 5.2–4.5 wurden gesammelt und enthielten die Hauptmenge an Interferon.

Der Proteingehalt und die Interferonaktivität der Startlösung werden in Tabelle B aufgeführt. Aus dieser Tabelle geht hervor, dass die wiedergefundene Interferonaktivität im ersten Schritt 57.5 resp. 58% und im zweiten Schritt 91.4 resp. 91.6% und für das gesamte Verfahren 52.6 resp. 53.2% betrug.

Die Eluate zeigten eine spezifische Interferonaktivität von ungefähr  $1.7 \times 10^9$  und  $2 \times 10^9$  Einheiten/mg, was einer hohen Reinheit entspricht. Die Reinheit wurde ferner wie in Beispiel I getestet und ergab ähnliche Resultate. Dies bedeutet, dass das vorliegende Verfahren effektiv für grosse Ansätze verwendbar ist.

Tabelle B

Material	Volumen ml	Total Protein mg	Total Aktivität Einheiten	spez. Aktivität Einheiten/mg
Startlösung	3200	1075.2	$64 \times 10^7$	$5.9 \times 10^4$
	3200	1462.9	$1.5 \times 10^8$	$10.3 \times 10^4$
Glasperlen				
nicht adsorbiert	4700	—	—	—
+ Waschphasen	4700	—	—	—
Eluate	280	124.6	$3.68 \times 10^7$	$2.96 \times 10^5$
	280	169.54	$8.7 \times 10^7$	$5.13 \times 10^5$
dialysierte Lösung	100	44.46	$1.32 \times 10^7$	$2.96 \times 10^5$
	100	60.55	$3.11 \times 10^7$	$5.14 \times 10^5$
Zinkchelat:				
nicht adsorbiert	130	42.51	0	0
+ 1. Waschphase	130	60.01	0	0
2. Waschphase	150	1.60	$0.76 \times 10^6$	$0.47 \times 10^6$
	150	0.48	—	—
Eluate	10	~0.007	$12.02 \times 10^6$	$\sim 1.7 \times 10^9$
	10	0.014	$2.85 \times 10^7$	$2 \times 10^9$

25

30

35

40

45

50

55

60

65