



ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения**
К ПАТЕНТУ

(60) 1523046 SU, 16.05.83

(21) 94000099

(22) 13.12.94

(31) 81505/82

(32) 17.05.82

(33) JP

(46) 16.07.96, Бюл № 2

(71) Торей Индастриз, Инк (JP)

(72) Кацуо Хосои и Хитоси Озава (JP)

(73) Торей Индастриз, (JP)

(56) Положительное решение по заявке № 2838809, кл. А 61 К 45/02, 29.07.85

(54) СПОСОБ ОЧИСТКИ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО β -ИНТЕРФЕРОНА

(57) Изобретение относится к медицине и может быть использовано для очистки человеческого β -интерферона, Цель - повышение производительности процесса. Раствор сырого интерферона пропускают через обездвиженный синий агарозный гель, элюируют и элюат дополнительно пропускают через хелатметаллический носитель с остатком хелатирования, включающим по меньшей мере ион одного металла из группы Co^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} . рН контактирования с синим агарозным гелем 5-9. 10 табл.

Изобретение относится к медицине, а именно к способу очистки человеческого интерферона, особенно человеческого β -интерферона.

Цель изобретения - повышение производительности процесса.

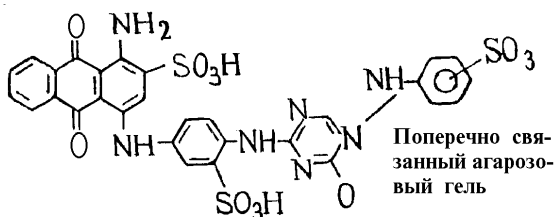
Способ осуществляют следующим образом.

Сырой интерферон, полученный в результате деятельности клеток человека, обрабатывают обездвиженным синим носителем. Интерферон, поглощенный на обездвиженном синем носителе, элюируют элюентом. Затем отбираемый раствор интерферона обрабатывают хелатметаллическим носителем с остатком хелатирования, включающим по меньшей мере ион одного металла, выбранный из группы, состоящей из Co^{2+} , Ni^{2+} и Zn^{2+} . Интерферон, поглощенный на хелатметаллическом носителе, отделяют от носителя, получая препарат интерферона большой чистоты и высокой концентрации.

Раствор сырого интерферона сначала приводят в контакт с обездвиженным на любом из разнообразных обычно используемых носителей, способном соединяться с красителем. В число таких носителей входят (А) соединение красителя через амино-группу антрахиноновой части с агарозой, активированной бромистым цианом; (В) соединение красителя с гелем поперечно связанной агарозы через эфирную связь; (С) соединение синего декстрана R (декстран, соединенный с синим красителем, фирма "Фармесиэ") с агарозой, активированной бромистым цианом методом триазинового соединения; (Д) соединение синего красителя, связанного с боковой цепью Аффия-геля 10[®] (фирмы "Био-Рад лэб", именуемой ниже "Био-Рад") через пептидную связь с полисахаридным носителем. Можно также использовать другие носители, например поперечно связанный декстрановый гель,

например Сефадекс® (фирма “Фармезис”), и виниловый полимер с гидроксильными группами, который также можно использовать как носитель для хелатметаллической хроматографии в следующей стадии, предпочтителен гидрофильный гранулированный полимер, например, Тойопёрл® (фирма “Тойо сода комп.”).

Предпочтительно использовать синий агарозовый гель, соответствующий (В), так как он весьма эффективно связывается с интерфероном, не вызывает отделения красителя от носителя, поскольку соединение красителя с носителем является весьма стабильным в условиях pH от 6 до 13, и он легко доступен на рынке. Этот синий агарозовый гель имеет следующую структуру и реализуется под товарным наименованием “Блу сефароз CL-6В” (фирма “Фармезис”) “Матрекс гель блу А®” (фирма “Амикон корп.”) и “Аффи-гель блу®” (фирма “Био-Рад”),



Для контактирования обездвиженного синего носителя с раствором сырого интерферона можно использовать либо порционный метод, либо колонный способ.

Пример 1. Раствор сырого интерферона был получен путем обработки человеческих фибробластовых клеток в среде MEM Игла, содержащей 0,4% метилцеллюлозы с поли 1; поли С, с последующей обработкой циклогексимином и актиномицином Д.

К 30 л раствора сырого интерферона с активностью интерферона $6,2^x \times 10^6$ им.ед. было добавлено 21 мг белка и 100 мкг актиномицина Д на 1 л, 30 мл геля синей агарозы (Аффигель блу® фирмы “Био-Рад”). После перемешивания в течение 40 ч и выдерживания в течение 3 ч надсадочная жидкость была извлечена, и гель агарозы был перенесен в колонну, с промывкой физиологическим раствором, содержащим фосфатнокислотный буфер, Надсадочная жидкость была извлечена снова,, Колонну дважды промывали и элюировали. Использовали следующие промывочные растворы и элюент:

первый промывочный раствор (320 мл):

раствор 1,0 М хлористого натрия, содержащий 10 мм фосфорнокислого натрия (pH 7,2)

второй промывочный раствор (280 мл):

25%-ный раствор этиленгликоля, содержащий 10 мм фосфорнокислого натрия и 1,0 М хлористого натрия (pH 7,2)

элюент (400 мл):

55%-ный раствор этиленгликоля, содержащий 10 мм фосфорнокислого натрия и 1,0 М хлористого натрия (pH 7,2).

Получен выход частично очищенного интерферона в элюате (300 мл) 81% от исходного раствора интерферона, очищение в 33 раза.

В колонну с соплом Линка (10 мл) элюат (285 мл) и колонны геля синей агарозы пропустили при скорости потока 20 мл/г. После двойной промывки колонну элюировали. Использовали следующие промывочные растворы и элюент:

первый промывочный раствор (300 мл):

дистиллированную воду и 0,1 М

фосфорнокислого натрия (pH 6,7)

использовали при скорости потока 30 мл/г в течение 1 ч поочередно

второй промывочный раствор (50 мл):

20 мм раствор лимоннокислого натрия (pH 5,0)

элюент:

0,1 М буферный раствор уксусная кислота - уксуснокислый натрий (рН 4,5).

Выход хелатцинковой хроматографии 87%, а общий выход 70%. Достигнута очистка в 330 раз.

Активность и выход интерферона, количество белка и удельная активность каждой стадии показаны в табл 1.

Анализ активности интерферона посредством электрофореза полиакриламидного геля.

Часть конечного элюата подвергли диализу в присутствии додецилсульфата натрия (НДС) и лиофилировали. После восстановления лиофилированного диализата 2-меркаптоэтанолом восстановленный материал подвергли электрофорезу с использованием полиакриламидного геля в присутствии НДМ согласно способу Лэмли (Нейчэр, 227, 680-685 (1970)) для проведения анализа активности интерферона и красителя с блестящей синью R 200. В результате активность интерферона и темно-синяя полоса были обнаружены только в положении, соответствовавшем молекулярному весу примерно 23000.

Анализ актиномицина Д.

Анализ актиномицина Д был проведен способом биологической пробы.

Часть конечного элюата обессолили путем гель-хроматографии, используя Сефадекс G-25[®] после добавления сывороточного альбумина человека (1 мг/мл). Добавляя дополнительно небольшое количество сывороточного альбумина человека и лактозы обессоленный элюат профильтровывали через фильтр 2 мкм и лиофилировали. Актиномицин Д был обнаружен в количестве не больше 0,0003 мкг/10⁶ им.ед. активности интерферона.

Элюат из колонны геля синей агарозы содержал: 0,7 мкг/м актиномицина Д. Общее количество актиномицина Д составляло 210 мкг. Кроме того, присутствие актиномицина Д в элюате из колонны геля синей агарозы было обнаружено по поглощению (430 нм) и путем биопробы.

Часть элюата из колонны геля синей агарозы обессолили способом гельхроматографии с использованием Сефадекс G-25[®] после добавления человеческого сывороточного альбумина. Удаляя этиленгликоль, обессоленный элюат лиофилировали. Все же было обнаружено около 0,7 мкг/10⁶ им. ед. интерферонной активности актиномицина Д.

Пирогенное испытание на кроликах.

Полученный указанным выше способом из конечного элюата лиофилированный материал инъецировали внутривенно трем кроликам (2·10⁵ им.ед./кг массы кролика). суммирование пирексии для всех трех кроликов было 0,6⁰С. Интерферон, очищенный по предлагаемому способу, оказался отрицательным к пирогенному испытанию на кроликах.

Леофилированный материал, полученный из элюата колонны геля синей агарозы, инъецировали внутривенно трем кроликам (2·10⁵ им.ед./кг массы кролика). Суммированием пирексии для всех трех кроликов было 1,5⁰С. Интерферон, очищенный согласно способу хроматографии синей агарозы, оказался неопределенно отрицательным к пирогенному испытанию на кроликах.

Пример 2. В этом эксперименте использовали раствор сырого интерферона, подобный использовавшемуся в примере 1.

20 л раствора сырого интерферона пропустили через колонну синей агарозы объемом 20 мл (Матрекс гель блу А[®], фирмы "Амикон корп"). Колонну трижды промыли и элюировали. Использовали следующие промывочные растворы и элюент:

первый промывочный раствор (200 мл):

1 М хлористый натрий, содержащий 10 мм фосфорнокислого натрия (рН 7,2).

второй промывочный раствор (200 мл):

25%-ный раствор этиленгликоля, содержащий 10 мм фосфорнокислого натрия и 1 М хлористого натрия (рН 7,2).

третий промывочный раствор (40 мл):

40%-ный раствор этиленгликоля, содержащий 10 мм фосфорнокислого натрия и 1 М хлористого натрия (рН 7,2).

элюент (200 мл):

55%-ный раствор этиленгликоля, содержащий 10 мм фосфорнокислого натрия и 1 М хлористого натрия.

Хелатцинковую колонну (5 мл) соединили с выходом колонны синей агарозы после начала элюирования, и элюат из колоны синей агарозы непосредственно пропускали через хелатцинковую колонну. Затем хелатцинковую колонну дважды промыли и элюировали. Промывочные растворы и элюент были следующими:

первый промывочный раствор (200 мл):

дистиллированная вода и 0,1 М фосфорнокислого натрия (рН 6,7) поочередно

второй промывочный раствор (20 мл):

20 мм лимоннокислый натрий (рН 5,0):

0,2 М буферный раствор уксусная кислота - уксуснокислый натрий, содержащий 1 М хлористого натрия.

Интерферонная активность, выход, количество белка и удельная активность каждой стадии показаны в табл. 2.

Пример 3. 20 л раствора сырого интерферона с интерферонной активностью $15 \cdot 10^6$ им. ед. и 60 мг/л общего белка контактировали с 40 мл синеагарозного носителя (Матрекс гель Блу А® фирмы "Амикон корп."). Носитель, на который был адсорбирован интерферон, загрузили на колонну. Затем колонну дважды промыли и элюировали. Использовали следующие промывочные растворы и элюент:

первый промывочный раствор (400 мл):

раствор хлористого натрия 1 М, содержащий 10 мм фосфорнокислого натрия (рН 7,2).

второй промывочный раствор (400 мл):

25%-ный раствор этиленгликоля, содержащий 10 мм фосфорнокислого натрия и 1 М хлористого натрия (рН 7,2).

элюент (400 мл).

100 мл раствора интерферона, отобранного из колонны синей агарозы, пропустили через 5 мл хелатникелевую колонну. Использованная колонна хелата никеля была приготовлена так же, как в примере 1, за исключением того, что вместо раствора хлористого цинка использовали раствор хлористого никеля. Хелатникелевую колонну промыли и элюировали. Использовали следующие промывочный раствор и элюент:

промывочный раствор:

дистиллированная вода и 0,1 М фосфорнокислого натрия (рН 6,7) использовали поочередно

элюент:

0,2 М буферный раствор уксусная кислота - уксуснокислый натрий, содержащий 1 М хлористого натрия (рН 4,5).

Интерферонная активность, выход, количество белка и удельная активность каждой стадии показаны в табл. 3.

Конечный элюат содержал весьма малое количество пирогенных веществ и был отрицательным относительно испытания Лимулуса. В нем не было обнаружено актиномицина Д.

Пример 4. Была повторена процедура примера 3 за тем исключением, что хелаткобальтовую колонну использовали вместо хелатникелевой колонны, причем хелаткобальтовую колонну приготовили как в примере 1, но вместе хлористого цинка использовали раствор хлористого кобальта.

Элюат (15 мл) содержал $4,5 \cdot 10^6$ им. ед. интерферона (выход 60%) и 0,25 мг белка. Удельная активность составляла $1,8 \cdot 10^8$ им.ед./мг белка. Конечный элюат был отрицательным к испытанию Лимулуса. В нем не было обнаружено актиномицина Д.

Пример 5. Культивировали штамм Е. коли, в котором был интегрирован структурный ген β -интерферона, и культивированный штамм подвергали процедурам сбора бактерий, измельчения бактерий, удаления нуклеиновой кислоты и осаждения сульфатом аммония. Белоковую фракцию, содержащую β -интерферона, полученный из штамма Е. коли, растворяли в 25%-ном растворе этиленгликоля, содержащем 1 М хлористого натрия и 10 мм фосфорнокислого натрия (рН 7,2), с целью получения раствора сырого интерферона. Раствор сырого интерферона имел интерферонную активность $5 \cdot 10^6$ им.ед. и 20 мг белка на 1 мл.

40 мл раствора сырого интерферона пропустили через колонну 2 мл синей агарозы (Матрекс гель блу А® фирмы “Амикон корп.”), уравновешенную буферным раствором фосфорнокислого натрия, содержащим 1 М хлористого натрия. Колонну дважды промыли с целью удаления примерно 95% белка в растворе с фракционированием в каждую фракцию 2 мл. Использовали следующие промывочные растворы и элюент:

первый промывочный раствор (10 мл):

25%-ный раствор этиленгликоля, содержащий 1 М хлористого натрия и 10 мм фосфорнокислого натрия

второй промывочный раствор (10 мл)

40%-ный раствор этиленгликоля, содержащий 1 М хлористого натрия и 10 мм фосфорнокислого натрия

элюент:

60%-ный раствор этиленгликоля, содержащий 1 М хлористого натрия и 10 мм фосфорнокислого натрия.

Элюат (12 мл) из колонны синей агарозы имел интерферонную активность $1,6 \cdot 10^7$ им.ед. (выход 80%) и 4,6 мг белка. Средняя удельная активность в каждой фракции была $2,5 \cdot 10^7$ им.ед./мг белка (макс.: 5-10 им.ед./мг белка).

Элюат подвергли анализу так же, как в примере 1. В результате чистота интерферонной активности при молекулярном весе примерно 19000 составляла 10-50% (средняя 25%).

6 мл элюата из колонны синей агарозы пропустили через 1 мл хелатцинковой колонны, уравновешенной 60%-ным раствором этиленгликоля, содержащим 1 М хлористого натрия и 1 мм фосфорнокислого натрия. Колонну трижды промыли и элюировали. Использовали следующие промывочные растворы и элюент:

первый промывочный раствор (6 мл):

60%-ный раствор этиленгликоля, содержащий 1 М хлористого натрия и 10 мм фосфорнокислого натрия

второй промывочный раствор (6 мл):

дистиллированная вода

третий промывочный раствор (6 мл):

220 мм буферный раствор фосфорнокислого натрия, содержащий 2 М хлористого натрия (рН 6,0).

элюент:

0,1 М буферный раствор уксуснокислого натрия, содержащий 1 М хлористого натрия (рН 4,0).

Конечный элюат (4 мл) имел интерферонную активность $4,0 \cdot 10^7$ им.ед. (выход 50%) и 0,4 мг белка. Удельная активность была $1 \cdot 10^8$ им.ед./мг белка.

Конечный элюат подвергли анализу как и в примере 1 и обнаружили одну полосу в положении молекулярного веса примерно 19000. Чистота была больше 97%.

Пример 6. Была повторена процедура примера 3, за тем исключением, что вместо хелатникелевой колонны использовали хелатцинковую колонну и в качестве элюента использовали 0,2 М раствор L-гистидин, уравновешенный хлористый натрием (рН 7,0).

Элюат (20 мл) имел $50 \cdot 10^6$ им.ед. интерферона (выход 67%) и 50 г общего белка. Удельная активность была $1,0 \cdot 10^8$ им.ед./мг белка.

Пример 7. Использовали сырой интерферон, полученный из человеческих фибробластовых клеток, аналогичный интерферону, использованному в примере 1.

К 20 л раствора сырого интерферона с активностью интерферона $42 \cdot 10^6$ им.ед. и концентрацией белка - 70 мг/л добавили 30 мл геля синей агарозы (Matrex Gel Blue A® "Amicon corp"). После перемешивания смеси в течение 3 сут и выдержки в течение 3 ч удалили надосадочный слой и гель синей агарозы пропустили через колонну, промывая 200 мл 1,0 М раствора хлористого натрия, содержащего 10 мм фосфата натрия с рН 7,2 (буфер А).

Затем колонну дважды промыли. Перед элюированием интерферона для улучшения очистки к выходу вышеуказанной колонки подсоединили колонку с 15 мл свежего геля агарозы, уравновешенного буфером А, содержащим 25%-ный раствор этиленгликоля. После третьей промывки интерферон элюировали. Использовали следующие промывочные растворы и элюент:

первый промывочный раствор (200 мл)

буфер А

второй промывочный раствор (300 мл): буфер А, содержащий 25%-раствор этиленгликоля,

третий промывочный раствор (120 мл):

3 М раствор хлористого натрия, содержащий 30 мм фосфорнокислого натрия (рН=7,2) и 30%-ный раствор этиленгликоля,

элюент (600 мл):

буфер А, содержащий 55%-ный раствор этиленгликоля.

Раствор элюата фракционировали. Результаты представлены в табл. 4.

Фракцию второго элюирования подвергли дальнейшей очистке с помощью хелат-цинковой хроматографии.

В колонну с хелатом цинка (15 мл) ввели буфер А, содержащий 50%-ный раствор этиленгликоля. Часть (270 мл) фракции второго элюирования из вышеуказанной колонны синей агарозы развели 27 мл буфера А до получения 50%-ного раствора этиленгликоля и пропустили через колонну с хелатом цинка при скорости потока 30 мл/ч. Все операции проводили при температуре 2-8°C. После двойной промывки колонну элюировали. Использовали следующие промывочные растворы и элюент:

первый промывочный раствор (200 мл)

дистиллированную воду и 0,1 М раствор фосфорнокислого натрия (рН=6,7) использовали при скорости потока 30 мл/ч в течение 1 ч поочередно:

второй промывочный раствор (30 мл):

2 М раствор хлористого натрия, содержащий 20 мм фосфорнокислого натрия (рН=7,2)

элюент:

0,1 М уксусной кислоты - уксуснокислого натрия буферный раствор, содержащий 0,1 М хлористого натрия (рН=7,4).

Активность, выход интерферона, количество белка и удельная активность этой процедуры очистки представлены в табл. 5.

Интерферон из колонны с хелатом цинка подвергли анализу посредством электрофореза полиакриламидного геля в присутствии додецилсульфата натрия (НДС) для определения чистоты. Элюат подвергли пирогенному испытанию с помощью теста Лимулуса, используя обнаруживающий эндотоксин реагент. Чистота интерферона 90%, элюат отрицательный к испытанию Лимулуса при содержании интерферона $1,6 \cdot 10^6$ им.ед./мл.

Сравнительный пример 1. Во вторую колонну геля агарозы (Matrex Gel Blue A® 4 мл) загрузили 2 М раствор хлористого натрия, содержащий 20 мм фосфорнокислого натрия, рН=7,2 (буфер В).

Часть фракции (45 мл) второго элюирования из колонны геля синей агарозы, описанной в примере 7, разбавили 5 мл буфера А и 75 мл буфера В и пропустили через вто-

рую колонну геля синей агарозы при скорости потока 20 мл/ч. Все операции проводили при 15-25°C.

Буфер, содержащий 30, 40 и 50%-ный раствор этиленгликоля соответственно пропустили через колонну со скоростью потока 20 мл/ч.

Результаты второй хроматографии геля синей агарозы представлены в табл. 6.

Интерферон из элюата, содержащего 40%-ный раствор этиленгликоля, из которой колонны геля синей агарозы подвергли такому же анализу, как в примере 7, для определения его чистоты и проведения пирогенного испытания

Чистота его была 60% и результат испытания Лимулуса положительный.

Сравнительный пример 2. Колонну из хелата цинка (50 мл) уравнивали при помощи PBS. Неочищенный интерферон фибробласта человека, который имел активность интерферона 30х10⁶ ме/мл и концентрацию протеина 70 мг/л, пропустили через колонну хелата цинка с объемной скоростью 100 мл/ч. После промывки колонну подвергли элюированию. При этом использовали следующие промывочные раствор и элюент:

промывочный раствор (400 мл)

дистиллированную воду и 0,1 М раствор фосфата натрия (pH=6,7) использовали с объемной скоростью 100 мл/ч в течение 1 ч, с чередованием

элюент:

0,1 М буферный раствор уксусной кислоты - ацетата натрия, содержащий 1,0 М хлорида натрия (pH=4,7).

Фракцию элюирования на колонне хелата цинка использовали для последующей очистки при помощи хроматографии на голубом агаре.

Колонну из голубого агар (5 мл) уравнивали 0,1 М буфером уксусной кислоты - ацетата натрия, содержащим 1,0 М хлорида натрия. Фракцию элюирования из вышеупомянутой колонны хелата цинка пропускали через колонну с голубым агаром с объемной скоростью 10 мл/ч. После двукратной промывки колонну подвергли элюированию. При этом использовали следующие промывочный раствор и элюант:

первый промывочный раствор (50 мл):

1,0 М раствор хлорида натрия, содержащий 10 мм фосфата натрия, pH=7,2 (буфер А);

второй промывочный раствор (50 мл):

буфер А, содержащий 25% этиленгликоля:

элюант:

буфер А, содержащий 55% этиленгликоля.

Раствор элюата подвергли фракционированию. Результаты приведены в табл. 7.

Сравнительный пример 3. В качестве исходного материала использовали неочищенный интерферон фибробласта, который имел активность интерферона 7,7·10⁶ ме/мл и концентрацию протеина 35 мг/л. Этот исходный раствор 92,0 л) смешивали с 5 г (17 мл) шариков "ЦРГ" (пористыми стеклянными шариками с размером пор 350 Å) и смесь энергично перемешивали в течение 13 ч. Затем смесь пропускали через стеклянный фильтр и шарики ЦРГ упаковывали в колонну (диаметр 0,9 см). Далее колонну промывали 100 мл PBS, а затем 0,01 М раствором глицина-HCl при pH=3,5, и элюировали 0,3 М буфером глицина-HCl при pH=2,0, содержащим 0,1 мг/мл альбумина сыворотки человека.

Элюаты подвергли диализу с использованием 4·1 л 1 М раствора NaCl, буферированного 0,02 М раствором фосфата (pH=7,4).

Диализированный раствор пропускали через колонну с хелатом цинка с размерами 0,6-7 см, затем колонну промывали 10 мл 1 М раствора хлорида натрия, буферированного 0,02 М раствором фосфата (pH=7,4) и 10 мл 0,1 М буфера ацетата натрия (pH=5,9). Затем колонну элюировали 0,1 М буфером ацетата натрия (pH=4).

Полученные результаты приведены в табл. 8.

Сравнительный пример 4. Используют сырой человеческий фибробластный интерферон, аналогичный используемому примеру 7.

Расвор сырого интерферона, имеющего активность интерферона $38 \cdot 10^6$ им.ед./л, концентрацию белка 63 мг/л и удельную активность $6 \cdot 10^5$ им.ед./мг белка, регулируют до рН=2 путем добавления 6 н HCl и загружают в колонку SP-Сефадекса (20 мл, 2 смх6,4 см). После загрузки 6 л раствора сырого интерферона со скоростью потока 40 мл/ч колонку промывают 200 мл дистиллированной воды. Затем колонку элюируют 320 мл 0,1 М буферного раствора фосфорнокислого натрия (рН=8,3). Раствор элюата фракционируют. Результаты приведены в табл.9.

Вторую и третью фракции элюирования используют для последующего способа очистки путем хелатцинковой хроматографии.

Колонну с хелатом цинка (3 мл, 1 смх3,8 см)) уравнивают 0,1 М буферным раствором фосфорнокислого натрия (рН=8,3). Вышеуказанные фракции (300 мл) из колонки SP-Сефадекса пропускают через хелатцинковую колонну со скоростью потока 6 мл/ч. После промывки дважды колонну элюируют. Используют следующие промывочный раствор и элюент:

первый промывочный раствор (40 мл):

дистиллированная вода и 0,1 М раствор фосфорнокислого натрия (рН=6,7), используемые поочередно со скоростью потока 6 мл/ч в течение 1 ч;

второй промывочный раствор (6 мл):

2 М хлористый натрий, содержащий 20 мм фосфорнокислого натрия (рН=7,2);

элюент:

0,1М буферный раствор уксусная кислота - уксуснокислый натрий, содержащий 0,1 М хлористого натрия (рН=4,7).

Результаты этого способа очистки приведены в табл. 10.

Используемый в качестве исходного материала раствор сырого интерферона имеет рН=7,3. После отстаивания в течение 10 дней его интерферонная активность составляет $38 \cdot 10^6$ им.ед./л и никаких изменений в активности интерферона не обнаружено. Тогда как после отстаивания в течение 10 дней раствора сырого интерферона, имеющего рН=2, перед загрузкой его в колонку SP-Сефадекса, интерферонная активность снижается до $16 \cdot 10^6$ им.ед./л. Это означает, что раствор сырого интерферона неустойчив при рН=2.

Изобретение имеет следующие существенные признаки и преимущества по сравнению с известным техническим решением.

Способ очистки в соответствии с известным техническим решением включает SP-Сефадексовую хроматографию на колонках с последующей хелатметаллической хроматографией. Сырой интерферон, очищаемый в соответствии с известным способом, имеет низкую концентрацию, например используемый в примере 1 сырой интерферон имеет активность интерферона $3,2 \cdot 10^6$ им.ед./л и концентрацию белка 20 мг/л, а используемый в примере 2 сырой интерферон имеет активность интерферона $5 \cdot 10^6$ им.ед./л и концентрацию белка 25 мг/л. Известное техническое решение имеет в виду очистку сырого интерферона с относительно низкой концентрацией.

Предлагаемый способ очистки включает хроматографию на обездвиженном синем носителе с последующей хелатметаллической хроматографией. В соответствии с этим способом очистки сырой интерферон с высокой концентрацией (например, сырой интерферон, используемый в примере 7, имеет активность интерферона $42 \cdot 10^6$ им.ед./л и концентрацию белка 70 мг/л) может быть удовлетворительно очищен.

Кроме того, как видно из примера 7, в котором использовали сырой интерферон с высокой концентрацией, извлечение продукта по известному способу составило самое большое 47%. Таким образом, известный способ непригоден для очистки сырого интерферона с высокой концентрацией. Это становится более очевидным из сравнения результатов примера 7 с результатами сравнительного примера 4 (в обоих примерах материалом для очистки был сырой интерферон с высокой концентрацией).

Извлечение, %	Пример 7	Сравнительный пример 4
1-я очистительная стадия	71	36

Применения известного способа ограничивается сырым интерфероном с относительно низкой концентрацией. Предлагаемый способ применим к сырому интерферону как с низкой концентрацией, так и с высокой концентрацией.

Известный способ имеет недостаток, заключающийся в том, что перед загрузкой колонки SP-Сефадекса сырой интерферон обязательно делают сильнокислотным, поскольку интерферонная активность при таком кислотном состоянии заметно теряется, как показано в сравнительном примере 4.

Этот недостаток известного способа не обнаруживается в изобретении, поскольку хроматографию на обездвиженном синем носителе осуществляют в условиях почти нейтрального pH.

Пример 8. Используемый раствор неочищенного интерферона получают путем обработки клеток человеческого фибробласта с использованием методики, аналогичной примеру 1.

К раствору неочищенного интерферона, который имеет активность интерферона, равную 30000 ед./л, белковую концентрацию, равную 0,11 мг/мл и pH 7,2, прибавляют 6 н раствор HCl или 1 н раствор NaOH с тем, чтобы довести pH до 2,3,4,5,6,7,8,9 или 10.

Устойчивость каждого раствора неочищенного интерферона испытывают путем определения титра, оставшегося после отстаивания каждого раствора неочищенного интерферона при температуре 4°C в течение 16 ч.

Ниже приведены результаты испытания, выраженные в процентном содержании

pH	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Устойчивость, %	83	69	80	90	97	100	98	94	80

Затем 15 мл каждого раствора неочищенного интерферона помещают в полипропиленовую центрифужную пробирку, в которую также помещают 0,05 мл синего красителя в качестве носителя (Matrex Gel Blue A®) и смесь перемешивают при 4°C в течение 16 ч. После удаления надосадочного слоя и промывания дважды 2,5 мл 10 mM раствора фосфат натрия - 1 н NaCl (pH 7,2) 2 мл 10 mM фосфата натрия - 1 н NaCl (pH 7,2), содержащего 55%-ный этиленгликоль, прибавляют к носителю. После центрифугирования удаляют надосадочный слой, содержащий частично очищенный интерферон.

Затем определяют количества потерянного интерферона (общее содержание интерферона, не абсорбированного на носителе, и интерферона, содержащегося в промывочном растворе) и восстановленного интерферона.

Ниже приведены результаты, выраженные в процентном содержании.

pH	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Потеря, %	5	13	20	9	7	7	8	6	6
Восстановление, %	64	50	46	65	70	68	73	67	50

Как видно из вышеприведенных результатов, когда pH раствора неочищенного интерферона был доведен до 5-9, раствор неочищенного интерферона оставался устойчивым и восстановление частично очищенного интерферона было высоким.

Формула изобретения

Способ очистки человеческого β -интерферона путем контактирования раствора неочищенного интерферона с сорбентом, обработки сигнала элюантом с последующей металл-хелатной хроматографией полученного элюата, при которой носитель содержит хе-

латообразующий остаток, а в качестве иона - Co^{+2} или Ni^{+2} или Zn^{+2} и элюции целевого продукта гистидином или кислотным буферным раствором, *отличающийся* тем, что с целью повышения производительности процесса, в качестве сорбента используют синий агарозный гель, а контактирование проводят при pH 5-9.

Таблица 1

Характеристика	Объем, мл	Общая активность интерферона, $\times 10^6$ им.ед.	Выход, %	Общий белок, мг	Удельная активность, им.ед./мг белка
Исходный материал					
Раствор сырого интерферона	30,000	186		630	$3,0 \cdot 10^5$
Колонны геля синей сахарозы					
Надосадочная жидкость	32,000	3		570	
1-й промывочный раствор	320	0,2		20	
2-й промывочный раствор	280	1,4		15	
Фракция элюирования	300	150	81	15	$1,0 \cdot 10^7$
Хелатцинковая колонна					
Загрузочный раствор	285	143		14	
Пропускаемый раствор	285	5		7	
1-й промывочный раствор	300	0,6		1,8	
2-й промывочный раствор	50	10		4	$2,5 \cdot 10^6$
1-я фракция элюата	10	60	32	1,0	$6 \cdot 10^7$
2-я фракция элюата	20	64	34	0,16	$4 \cdot 10^8$
Общая фракция элюата	30	124	10	1,2	$1,0 \cdot 10^8$

Таблица 2

Характеристика	Объем	Общая интерферонная активность $\times 10^6$ им.ед.	Выход, %	Общий белок, мг	Удельная активность, им.ед./мг белка
Исходный материал					
Раствор сырого интерферона	20,000	142	-	1240	$1,1 \cdot 10^5$
Раствор, пропущенный через синеагарозную колонну	20,000	10	7	1060	
1-й промывочный раствор	200	1	0,7	110	
2-й промывочный раствор	200	1	0,7	1	
3-й промывочный раствор	40	20	14	20	$1,0 \cdot 10^6$
Хелатцинковая колонна					
Пропущенный раствор	200	2	1,4	5	
1-й промывочный раствор	200	1,3	0,9	2	
2-й промывочный раствор	20	27	19	1	$2,7 \cdot 10^7$
Общая фракция элюирования	20	82	58	0,4	$2,1 \cdot 10^8$

Таблица 3

Характеристика	Объем, мл	Общая интерферонная активность ($\times 10^6$ им.ед.)	Выход, %	Общий белок, мг	Удельная активность, им.ед./мг белка
Исходный материал					
Раствор сырого интерферона	20,000	300		1200	$2,5 \cdot 10^5$

Колонна синей агарозы					
1-й промывочный раствор					
2-й промывочный раствор					
Элюент	400	260	87	270	$1,0 \cdot 10^7$
Хелатникелевая колонна					
Загрузочный раствор	100	65			
Пропущенный раствор		0,7			
1-й промывочный раствор					
2-й промывочный раствор					
Элюат	20	55	74	0,55	$1 \cdot 10^8$

Таблица 4

Характеристика	Объем,	Общая интерферонная активность, $\times 10^6$ им.ед.	Выход,	Общий белок, мг	Удельная активность, $\times 10^4$ им.ед./мг белка
Раствор сырого интерферона	20	840		1375	61
Надосадочный слой	20	20	2,4	1170	1,7
1-й промывочный раствор	0,4	1	0,1	14	7
2-й промывочный раствор	0,32	11	1,3	20	60
3-й промывочный раствор	0,12	12	1,4	13	90
1-я фракция элюирования	0,03	4	5	8	50
2-я фракция элюирования	0,42	600	71	24	2500
3-я фракция элюирования	0,12	11	1,3	2	550

Таблица 5

Характеристика	Объем,	Общая интерферонная активность, $\times 10^6$ им.ед.	Выход,	Общий белок, мг	Удельная активность, им.ед./мг белка
Раствор сырого интерферона	300	390		15,4	2500
Пропущенный через колонну	300	22	6	11	200
Промытый	248	52	13,5	1,0	5200
Фракция элюирования	77	270	69	0,9	30000

Таблица 6

Характеристика	Объем, мл	Общая интерферонная активность, $\times 10^6$ им.ед.	Выход,	Общий белок, мг	Удельная активность, $\times 10^4$ им.ед./мг белка
Раствор сырого интерферона	125	62		2,5	2500
Пропущенный через колонну	125	1	1,6	1,7	
Элюирование:					
30%-ным раствором этанол-глицерина	16	7	11	0,21	3300
40%-ным раствором этанол-глицерина	16	26	42	0,15	17000
50%-ным раствором этанол-глицерина	16	5	8	0,07	7100

Таблица 7

Характеристика	Объем	Общая актив- ность ИФ x10 ⁶ ЕИ	Общее содер- жание протеина, мг	Удельная актив- ность, x10 ⁴ ЕИ/ протеина	Извле- чение, г
Колонна из хелата цин- материал					
Неочищенный ИФН	4000	120	280	43	100
Пропускается через	4000	12	240	5	10
Промывка	400	5	4	125	4
Фракция элюирования	300	90	2,4	3750	75
Колонна из голубо- агара					
Пропускается через	200	0,12	<0,4	<30	0,1
1-я промывка	50	0,23	0,2	120	0,2
2-я промывка	50	2,5	0,8	310	2
Фракция элюирования					
1-я	30	40	0,75	5300	33
2-я	30	20	0,30	6700	17
Всего	60	60	1,05	5700	50

Таблица 8

Характеристика	Объем, мл	Общее содер- жание протеина, мг	Общая актив- ность ИФН, ЕИ	Удельная актив- ность, ЕИ/мг	Извле-чени- е, %
Исходный раствор	2000	64	15,4·10 ⁶	2,4·10 ⁵	100
СРГ	2210	50	1,8·10 ⁶		12
Пропускается через					
промывка					
1-я фракция элюиров- ания	45	3	10,3·10 ⁶	1,3·10 ⁶	69
2-я фракция элюиров- ания	46	5	0,2·10 ⁶		
3-е элюирование	48	8	0,1·10 ⁶		
Диализированный ра- твор	109	8	7,0·10 ⁶	0,9·10 ⁶	45
Колонна из хелата ци- нка	125	8	0	0	0
Пропускается через					
промывка					
Фракция элюирования	6,5	0,34	5,1·10 ⁶	1,5·10 ⁷	33

Таблица 9

Характеристика	Объем, мл	Общая активнос- ть интерферона, им.ед.	Общий со- дер- ж., мг	Удельная актив- ность, x10 ⁴ им.ед./ белка	Извлече- ние, %
Внесенный раствор	6000	228	378	60	
Пропущенный + про- мытый	6200	6,8	-	-	3
Элюирование:					
Фракция 1	20	0,4	2	20	0,2
Фракция 2	150	74	12,4	600	32,5

Фракция 3	150	8	2	400	3,5
-----------	-----	---	---	-----	-----

Таблица 10

Характеристика	Объем, мл	Общая активнос интерферона, х1 им.ед.	Общий б лок, мг	Удельная акти ность, х10 ⁴ им.ед./ белка	Извлече- ние, %
Внесенный раствор	300	82	14,4	570	36
Пропущенный	300	0,9	9,3	10	0,4
Промытый	46	0,03	0,23	13	0,01
Элюирование:					
Фракция 1	4	2,4	0,8	300	1
Фракция 2	20	45	0,45	10000	20