



SUOMI—FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU**
UTLÄGGNINGSSKRIFT 70721

C (45) Patentti myönnetty
Patent publicerat 06 10 1986

(51) Kv.lk./Int.Cl. C 07 K 15/26, A 61 K 45/02

(21) Patentihakemus — Patentansökning 802400

(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag 31.07.80

(23) Alkupäivä — Giltighetsdag 31.07.80

(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig 01.02.81

(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. —
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 26.06.86

(86) Kv. hakemus — Int. ansökan

(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet 31.07.79,
14.03.80 USA(US) 62371, 130635

(71) F.Hoffmann-La Roche & Co. Aktiengesellschaft, Grenzacherstrasse
124-184, 4002 Basel, Sveitsi-Schweiz(CH)

(72) Heinz-Jürgen Friesen, Paterson, New Jersey, Sidney Pestka, North
Caldwell, New Jersey, USA(US)

(74) Oy Kolster Ab

(54) Menetelmä ihmisen fibroblasti-interferonin valmistamiseksi homogeeni-
sena proteiinina - Förfarande för framställning av mänskligt fibro-
blast-interferon som homogent protein

Keksinnön kohteena on menetelmä ihmisen fibroblasti-interferonin valmistamiseksi homogeenisena proteiinina. Menetelmässä käytetään affiniteettikromatografiaa ja suurpaine-nestekromatografiaa (HPLC).

Interferonin keksimisestä lähtien (Isaacs ja Lindenmann vuonna 1957) on sekä leukosyyteistä että fibroblasteista eristettyä interferonia yritetty kaikkialla maailmassa eristää homogeenisena peptidinä sellaisissa määrin, että niiden avulla on mahdollista suorittaa interferonin spesifisten, sekä biologisten että kemiallisten ominaisuuksien karakterisointi ja määrittäminen. Samalla kun useat tutkijat vaativat, että hiiren tai ihmisen interferoni on puhdistettava homogeeniseksi, ei heistä kukaan esitä yhtään klassista todistetta proteiinin homogeenisuuden puolesta tai kuvaa luultavasti puhtaita yhdisteitä.

HPLC:n (suurpaine - nestekromatografia) käyttö proteiinien puhdistamiseen on yleisesti tunnettua. Kirjallisuudessa on erityisesti kuvattu ioninvaihto- ja eksklusiokromatografiaan käytettäviä pylvästyyppejä, jotka soveltuvat proteiinien puhdistukseen [esim. Regnier ja Noel, J. Chromatog. Sci. 14 (1976) 316 ja Chang et al., Anal. Biochem, 48 (1976) 1839]. Käänteisfaasikromatografiassa on käytetty menestyksellisesti esim. Lichrosorb RP-18-pylväitä, joiden pohjana on oktadekyylillä modifioitu SiO_2 , peptidien, kuten β -endorfiinin puhdistukseen [katso esim. Rubinstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 4969-72].

On edelleen tunnettua, että ihmisen fibroblasti-interferonin puhdistukseen voidaan käyttää affiniteettikromatografiaa. Davey et al., J. Biol. Chem. 251 (1976) 7620, kuvaavat Concanavalin A-Sepharose 4B:n käyttöä puhdistetun ihmisen fibroblasti-interferonin valmistukseen. Jankowski et al., Biochemistry 15 (1986) 5182, käyttävät Blau Dextran Sepharosea samaan tarkoitukseen. US-patenttijulkaisun 4 172 071 (de Maeyer et al.) mukaisesti onnistuu leukosyytti- ja fibroblasti-interferonia sisältävien erilaisten raakojen liuosten puhdistus affiniteettikromatografialla Blau Dextran Sepharose-pylväessä, jolloin saadaan valmisteita, joiden spesifinen aktiivisuus on $1-5 \times 10^8$ kansainvälistä interferoni-yksikköä. Muita puhdistusvaiheita ei esitetä, ja saadut interferoni-valmisteet sisältävät vielä suuressa osassa tuotteita interferonin kaltaista aktiivisuutta, tosin ne ovat suureksi osaksi vapaita epäpuhtaista proteiineista.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle ihmisen fibroblasti-interferonin valmistamiseksi homogeenisena proteiinina on tunnusomaista, että

A. epäpuhtaan, ihmisen fibroblasti-interferonin vesiliuos pannaan affiniteettikromatografia-pylväeseen, johon interferoni adsorboituu, interferoni eluoidaan ja se saadaan eluaatin tietyissä fraktioissa erittäin puhtaana, ja

B. saadut interferoni-fraktiot pannaan HPLC-olosuhteiden mukaisesti yhteen tai useampaan puskurilla tasapainoitettuun kromatografia-pylväeseen, jonka perustana on sykloheksyyli-, fenyyl-, difenyyl-, oktyyli-, oktadekyyli- tai syanopropyyliryhmiä sisältävä SiO_2 -matriisi, jolloin interferoni adsorboituu

ja se eluoidaan kussakin tapauksessa veden kanssa sekoittuvan liuottimen gradientilla, joka liuotin on puskuroidussa, happamassa, vettä sisältävässä järjestelmässä, niin että interferoni saadaan eluaatin tietyissä fraktioissa yhden ainoan selväpiirteisen piikin muodossa.

Menetelmän affiniteettikromatografia-vaiheissa voidaan käyttää Concanavalin A-Sepharose 4B:tä tai Blau Dextran Sepharosea, jolloin viimeksimainittua pidetään parempana oleellisesti korkeampien saantojen sekä kestävämmän lopputuotteen vuoksi.

Affiniteettikromatografian suorittamiselle voidaan antaa seuraava yleinen työhohje, kun käytetään Concanavalin A-Sepharose 4B:tä:

(a) 20-30 pylvääntilavuutta raakaa ihmisen fibroblasti-interferonia (spesifinen aktiivisuus noin 10^4 yksikköä/mg), joka on Eaglen "minimalmediumissa" sisältäen 5 % vasikan sikiön serumia, pumpataan Concanavalin A-Sepharose 4B-pylvääseen läpivirtausnopeuden ollessa 30-60 cm/tunti;

(b) pestään fosfaatilla puskuroidulla keittosuolaliuoksella (PPK), pH 7,2;

(c) pestään PPK-0,1 M α -metyylimannosidilla (α -MM) ja

(d) eluoidaan PPK-0,1 M α -MM:lla, joka sisältää 50 % etyleeniglykolia (tilav./tilav.).

Vaiheen (d) jälkeen saatu, puhdistettu interferoni sisältää spesifistä aktiivisuutta noin 10^7 yksikköä/mg saannon ollessa noin 10-30 %.

Affiniteettikromatografian suorittamiselle voidaan antaa seuraava yleinen työhohje, kun käytetään Blau Dextran Sepharosea:

(a) 10-40 pylvääntilavuutta viljelmän yläpuolella olevaa liuosta ($1-3 \times 10^4$ yksikköä/ml, 0,2-1 mg proteiinia/ml), jonka NaCl sisältö säädetään 1,25 M:ksi lisäämällä kyllästettyä NaCl-liuosta, pumpataan pylvääseen käyttäen lineaarista läpivirtausnopeutta 20-40 cm/tunti;

(b) pylväs pestään 5-15 pylvääntilavuudella 1M NaCl/0,02-0,05 M fosfaattia ja sen jälkeen 5-15 pylvääntilavuudella 1 M NaCl/0,02-0,05 M fosfaattia, joka sisältää 15 % (tilav./tilav.) etyleeniglykolia (pH 7,2) ja

(c) interferoni eluoidaan 1 M NaCl/0,02-0,05 M fosfaatilla, joka sisältää 50 % (tilav./tilav.) etyleeniglykolia (pH 7,2).

Saadun interferonin spesifinen aktiivisuus on noin 3×10^6 yksikköä/mg, ja tässä vaiheessa sen saanto voi olla noin 80 %.

Affiniteettikromatografiassa käytettyä Blau Dextran Sepharosea voidaan saada kytkemällä Blau Dextrania (Dextraniin kytkettyä Cibacron Blau F3GA:a) CNBr-aktivoituun Sepharose 4B:hen pH 9,5:ssä.

Tällä kytkemismenetelmällä, samoinkuin hartsin pesemisellä ja vanhentamisella sekä pylvään kuormittamisella sekä eluoinnilla on ratkaiseva merkitys maksimaalisten saantojen sekä erittäin puhtaan ihmisen fibroblasti-interferonin saamiseksi.

Jos interferoni on peräisin seerumittomasta elatusaineesta, se saadaan puhtaaksi käyttämällä yhtä tai kahta työvaihetta Blau Sepharose 4B-pylväessä sekä eluointia etyleeniglykolin puskuroidulla vesiliuoksella (30-50 % tilav./tilav., pH 7,2).

Interferonin jatkopuhdistusta varten sitä käsitellään affiniteettikromatografian jälkeen yhden tai useamman kerran preparatiivisella HPLC:llä, jolloin interferonin liukoisuus on suuri ja saanto korkea. HPLC:ään käytetään pylväitä, joiden perustana on huokoinen SiO_2 -matriisi, johon on sidottu sykloheksyyli-, oktyyli-, oktadekyyli-, fenyyli-, difenyyli- tai syanopropyyli-ryhmä. Näillä pylväillä, joita voidaan käyttää peräkkäin sekä erilaisissa pH-olosuhteissa samoinkuin voidaan eluoida orgaanisen eluentin erilaisilla gradientteilla, voidaan ihmisen fibroblasti-interferoni puhdistaa homogeeniseksi. Interferonin homogeenisuus on saavutettu silloin, kun natriumdodekyyli-sulfaatti (NaDodSO_4)-polyakryyliamidi-geelielektroforeesilla saadaan yksi ainoa vyöhyke, saavutetaan vakio spesifinen aktiivisuus ja HPLC:llä saadaan yksi ainoa huippu, jolloin aktiivisuus- ja proteiinivyöhykkeet ovat yhtäpitävät.

Kaupallisesti on saatavissa kromatografia-pylväitä, joiden pohjana on epäsäännöllisen muotoinen, täysin huokoinen SiO_2 -matriisi (partikkelikoko noin 10^{-5} mm), joka sisältää sykloheksyyli-, oktyyli-, oktadekyyli-, fenyyli- tai syanopropyyli-ryhmiä. Erästä soveliaasta HPLC-järjestelmää on kuvattu US-patenttijulkaisussa

4 116 046 (Stanley Stein).

Keksinnön mukaisesti ihmisen fibroblasti-interferonin affiniteettikromatografialla puhdistettu liuos pannaan vettä sisältävässä puskurissa, jonka pH on 4-8, SiO_2 -pylvääseen. Tähän tarkoitukseen edullinen puskuri on pyridiini/muurahaishappo/vesiseos (8:8:84, tilav./tilav.). Tavallisesti työskennellään paineen alla, edullisesti paineessa 0,34-34 MPa. Pylvääseen sidottu interferoni eluoidaan tämän jälkeen selektiivisesti ja käytetään vettä sisältävää puskuriseosta sekä veden kanssa sekoittuvan orgaanisen liuottimen gradienttia. Sopivana, veden kanssa sekoittuvana orgaanisena liuottimena tulevat ennen kaikkea kysymykseen alkanolit, kuten n-propanoli, isopropanoli, n-butanoli, tert.-butanoli, etanoli ja metanoli. Erityisen hyvin ihmisen fibroblasti-interferonin eluointiin soveltuu propanolin ja butanolin seos.

Eluaatti fraktioidaan tavalliseen tapaan, ja yksittäisten jakeiden proteiinisäältä rekisteröidään erittäin herkin tarkistuslaitteen avulla. Erästä tähän soveltuva järjestelmä ovat kuvanneet Bohlen et al., Anal. Biochem. 67 (1975) 438 (vrt. myös patenttijulkaisu 3 876 881).

HPLC:hen soveltuvan hartsin valinta riippuu ihmisen fibroblasti-interferonin alkuperästä ja puhtaudesta. Materiaali, joka on peräisin Concanavalin A-Sepharose-pylväästä, puhdistetaan tarkoituksenmukaisesti HPLC:n avulla sykloheksyyllillä modifioidussa SiO_2 -pylväässä ja tämän jälkeen oktyylillä modifioidussa SiO_2 -pylväässä, kunnes se on homogeenista. Toisaalta Blau Dextran-pylväästä peräisin oleva aine puhdistetaan homogeenisesti yhden tai useamman työvaiheen avulla käyttämällä oktyylillä modifioitua SiO_2 -pylvästä tai kuljettamalla aine yhden oktyylillä modifioidun sekä yhden syanopropyylillä modifioidun SiO_2 -pylvään läpi sekä lopuksi, tarvittaessa, yhden difenyyllillä modifioidun SiO_2 -pylvään läpi. Jos aine on peräisin valmisteesta, jossa ei ole seerumia, suoritetaan affiniteettikromatografia Blau Sepharose-4B-pylväässä, ja tällöin riittää yksi oktyylillä modifioidulla SiO_2 -pylväällä suoritettu työvaihe homogeenisuuden saavuttamiseksi.

Koska ihmisen fibroblasti-interferoni on herkkä orgaanisille liuottimille, kuten propanolille, butanolille tai 2-metoksi-

etanolille neutraalissa pH:ssa, suoritettiin kromatografia happamella pH-alueella. Koska ihmisen fibroblasti-interferoni on hydrofobisempi kuin leukosyytti-interferoni ja koska edelleen muita, hydrofobisempia proteiineja on osittain puhdistetuissa fibroblasti-interferoni-valmisteissa, osoittautuu propanolin ja butanolin seos eluutioaineena parhaimmaksi HPLC:ssä käytetyissä käänteisfaaseissa. Tämän seoksen avulla oli mahdollista rajoittaa orgaanisen liuottimen tilavuutta ja saada täten vähemmän artefakteja eluaatista.

Kyseessä olevan keksinnön mukaisesti saatu, homogeeninen ihmisen fibroblasti-interferoni eristettiin kulloinkin viimeisen HPLC-pylvään jälkeen yksittäisen huipun muodossa, ja se tuotti yhden, yksittäisen, kapean vyöhykkeen NaDodSO_4 -polyakryyliamidigeelielektroforeesissa 2-merkaptoetanolin läsnäollessa. Geelin uutto tuotti yhden ainoan huipun, jolla oli virusten vastaista aktiivisuutta ja joka oli yhtäpitävä proteiinivyöhykkeen kanssa. Tähän tarkoitukseen voidaan käyttää kaikkia tavallisia, ihmisen fibroblasti-interferonin aktiivisuusmäärittäjiä.

Homogeenisen ihmisen fibroblasti-interferonin molekyyli-paino polyakryyliamidigeelielektroforeesilla määritettynä nousi noin 20500:aan. Puhdistetun aineen spesifinen aktiivisuus oli noin 4×10^8 yksikköä/mg.

Seuraava N-terminaalinen osittaissekvenssi voitiin määrätä homogeenisesta ihmisen fibroblasti-interferonista suoritettussa kokeessa: Met¹-Ser-Tyr-Asn-Leu⁵-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln¹⁰-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe¹⁵-Gln-...-Gln-Lys¹⁹-...

Interferonilla on virusten ja tuumoreiden vastaista sekä immunosuppressiivista aktiivisuutta. Nämä aktiivisuudet voitiin määrittää vieläpä kliinisessä mittakaavassa antamalla $1-10 \times 10^6$ yksikköä/päivä suhteellisen epäpuhtaita valmisteita, jotka sisälsivät vähemmän kuin 1 % ihmisen interferonia. Puhdistettua, homogeenista, tämän keksinnön mukaisesti saatua ihmisen fibroblasti-interferonia voidaan käyttää samalla tavalla, kuten jo interferoni-valmisteista on tunnettua, mukauttamalla annostus lisääntyvään puhdistusasteeseen.

Kyseessä olevaa keksintöä valaistaan seuraavin esimerkein. Kaikki yksikköinä/ml tai yksikköinä/mg ilmaistut interferonitiit-

terit viittaavat US National Institutes of Healthin ihmisen leukosyytti-interferoni standardiin (GO 23-901-527).

Esimerkki 1

Concanavalin A-affiniteettikromatografia

50 ml Concanavalin A-Sepharose 4B:ä (tasapainoitettu PPK:lla, pH 7,2, sisältäen 0,1 M α -MM:a) pakattiin 50 ml:n polypropyleenipylvääseen, joka oli varustettu polyetylenei-sinterillä. Siihen pantiin 1,25 l raakaa interferoniliuosta (2×10^7 yksikköä, spesifinen aktiivisuus 2×10^4 yksikköä/mg) virtausnopeuden ollessa 180 ml/tunti (35,5 cm/tunti). Pylväs pestiin sitten 150 ml:lla PPK:a ja 600 ml PPK:a, joka sisälsi 0,1 M α -MM. Interferoni eluoitiin lopulta yllämainitulla puskurilla, joka sisälsi 50 % (tilav./tilav.) etyleeniglykolia. Saanto 9 % ($1,8 \times 10^6$ yksikköä, spesifinen aktiivisuus noin 1×10^7 yksikköä/mg). Huipun vyöhykkeen leveyden ollessa suurempi saatiin, ottamalla mukaan muita jakeita, saannoksi 15 % (3×10^6 yksikköä, spesifinen aktiivisuus $2-4 \times 10^6$ yksikköä/mg).

HPLC

Concanavalin A-Sepharose 4B-pylvään eluaattia 120 ml ($2,5 \times 10^6$ yksikköä, noin $2-4 \times 10^6$ yksikköä/mg) pantiin virtausnopeudella 0,4 - 0,8 ml/min suoraan pylvääseen, jonka koko oli $4,6 \times 300$ mm ja jonka pohjana oli sykloheksyyli-ryhmiä sisältävä SiO_2 -matriisi (Chromegabond 10 μ), joka oli aiemmin tasapainoitettu pyridiini/muurahaishappo/isopropanoli/vesi-seoksella (8:8:20:64, tilav./tilav., puskuri A), ja maksimaalinen paine oli alle 306 atm (31 MPa). Systemi vastasi olennaisesti Bohlen et al. Anal. Biochem. 67 (1975) 438 kuvaamaa järjestelmää.

Läpivirtausnopeudella 0,4 ml/min käytettiin seuraavaa gradienttia, alkaen puskurista A, puskurille B (pyridiini/muurahaishappo/isopropanoli/n-butanoli/vesi, 8:8:25:20:39, tilav./tilav.): 0-25 % B, 32 min; 25-60 % B, 225 min, 60-100 % B, 63 min. Koottiin 2,0 ml:n jakeet. Yhdistetyt jakeet 26-29 (2×10^6 yksikköä) laimennettiin 4 ml:lla pyridiini/muurahaishappo-seosta ja pantiin suoraan pylvääseen, jonka koko oli $4,6 \times 300$ mm ja jonka pohjana oli oktyyli-ryhmiä sisältävä SiO_2 -matriisi (Chromegabond 10 μ). Se eluoitiin sykloheksyyli-pylväälle ilmoitetuissa olosuhteissa. Spesifinen

aktiivisuus aktiivisuushuipun keskellä oli noin 4×10^8 yksikköä/mg puhdistetun ihmisen fibroblasti-interferonin kokonaissaannon ollessa 10^6 yksikköä.

Concanavalin A-pylväessä puhdistettu interferoni eluoidaan HPLC:n avulla sykloheksyyli- tai oktyyli-ryhmiä sisältävässä pylväessä. Kun eluoidaan HPLC:llä ensin oktyyli-pylväessä, niin interferoni eluoituu suoraan ennen päähuippua, kun se taas, käytettäessä sykloheksyyli-pylvästä ensimmäisenä pylväänä, eluoituu välittömästi pääpiikin jälkeen. HPLC:llä puhdistetun ihmisen fibroblasti-interferonin näytteet tutkittiin elektroforeesilla, jossa käytettiin 12,5 tai 15 %:ista NaDodSO_4 -polyakryyliamidigeeliä Tris/glysiinipuskurissa (1 mg proteiinia). Coomassie Blaulalla (sinisellä) suoritetun värjäyksen jälkeen saatiin yksi ainoa vyöhyke. Määrittämällä virusten vastainen aktiivisuus todettiin, että pääosa tästä aktiivisuudesta oli värjäytyneen vyöhykkeen keskustassa. Molekyylipainoksi saatiin noin 20 500 käyttämällä naudanseerumin albumiinia, kymotrypsiiniä, sytokromi c:tä ja ribonukleasia vertailuaineina. Ihmisen fibroblasti-interferoni-vyöhykkeen suhteellinen liikkuvuus ei ollut riippuvainen merkaptetaanolin läsnäolosta näytteessä.

Esimerkki 2

Blau Dextran-Sepharose 4B-pylvään valmistus

50 g kuormitettua Sepharose 4B:tä pestiin 1 l:lla vettä, ja suspendoitiin vielä kerran 50 ml:aan tislattua vettä. Lisättiin 15 g hienojakoista CNBr:a kevyesti sekoittaen ja pH-arvo säädettiin $11^{+}0,2$:een lisäämällä pisaroittain 10N NaOH:ta. Lämpötila pidettiin jäätä lisäämällä $20^{+}5^{\circ}\text{C}$:ssa. 15-20 minuutin kuluttua sekoitettiin yhden tilavuuden kanssa jäävettä, ja suspensio pestiin Buchner-suppilossa vielä kerran 5 tilavuudella 0,01 N HCl:a.

Aktivoitu hartsi suspendoitiin heti 50 ml:aan 0,4 M natriumkarbonaattipuskuria (pH 9,5), joka sisälsi 1,00 g liuotettua Blau Dextrania, ja ravistettiin yön yli 4°C :ssa pyöreäpohjaisessa pullossa. Se pestiin 10 tilavuudella 1 M NaCl:a, 2 tilavuudella 50 % (tilav./tilav.) etyleeniglykolia, joka sisälsi 1 M NaCl:a ja 0,05 M natriumfosfaattia (pH 7,2), jätettiin seisomaan yön yli 50 % (tilav./tilav.) etyleeniglykoliin, pestiin yhdellä tilavuus-

70721

osalla 80 %:ista (tilav./tilav.) etyleeniglykolia ja 5 tilavuudella Gibco nro 11 minimaalinelatusainetta (MEM) ja säilytettiin tässä elatusaineessa yli yön 50°C:ssa. Pestiin vielä 3 tilavuudella 80 %:ista (tilav./tilav.), vettä sisältävää etyleeniglykolia, joka sisälsi 1 M NaCl:a ja tämän jälkeen 2 tilavuudella MEM:a, minkä jälkeen hartsi lietetettiin MEM:hen ja siirrettiin pylvääseen.

Affiniteetti-kromatografia

Seos, jossa oli 1,5 l raakaa ihmisen fibroblasti-interferonia (2×10^4 yksikköä/ml, 1 mg proteiinia/ml, spesifinen aktiivisuus 2×10^4 yksikköä/mg proteiinia) ja 0,27 tilavuutta kyllästettyä NaCl-liuosta (noin 6,3 M) pantiin 50 ml:n polypropyleenipylvääseen, jossa oli polyetyleenisintteri ja joka sisälsi 35 ml Blau Dextran-Sepharose 4B:tä, käyttäen läpivirtausnopeutta 100 ml/tunti (20 cm/tunti). Pylväs pestiin peräkkäin 200 ml:lla 1 M NaCl:a, joka sisälsi 0,05 M natriumfosfaattipuskuria (pH 7,2) sekä 500 ml:lla 1 M NaCl:a, joka sisälsi 0,05 M natriumfosfaattia (pH 7,2) sekä 75 ml:lla etyleeniglykolia sekä lopuksi eluotitiin 500 ml:lla 1 M NaCl:a, joka sisälsi 0,05 M natriumfosfaattia (pH 7,2) sekä 250 ml:lla etyleeniglykolia. Noin 90 % interferonista eluotui yhdessä ainoassa piikissä 50 % etyleeniglykolia sisältävän liuottimen adsorptiosyklin kriittisessä pisteessä. Spesifinen aktiivisuus piikin huipussa, jossa oli enemmän kuin 50 % koko interferonista, oli noin 1×10^7 yksikköä/mg.

HPLC

(A) 125 ml Blau Dextran-Sepharose 4B-pylväästä eluotitua interferoni-liuosta (3×10^7 yksikköä, 1×10^7 yksikköä/mg), pumattiin 4,6 x 300 mm:n pylvääseen, jonka pohjana oli oktyyli-ryhmiä sisältävä SiO₂-matriisi (Chromegabond 10 μ), joka oli esitasapainoitettu 1 M NaCl/50 % (tilav./tilav.) etyleeniglykoli-seoksella. Virtausnopeudella 0,45 ml/min, lähtien puskurista A (pyridiini/muurahaishappo/isopropanoli/n-butanoli/vesi, 8:8:20:3,3:60,7 tilav./tilav.), pidettiin yllä seuraavaa gradienttia siirtymällä puskuuriin B (pyridiini/muurahaishappo/isopropanoli/n-butanoli/vesi, 8:8:25:20:39, tilav./tilav.): 0-25 % B, 30 min; 25-55 % B, 190 min; 55-100 % B, 20 min, 100 % B, 60 min. Interferoni-aktiivisuus oli

70721

olennaisesti yhtäpitävä fraktioissa 18-23 (jokainen fraktio sisälsi 1,5 ml eluutioliuosta) sijaitsevan yhden ainoan proteiini-
piikin kanssa.

(B) Kun applikoitiin noin neljäsosa vaiheessa (A) aplikoi-
dusta määrästä samaan pylvääseen sykloheksyyli-pylväälle esimer-
kissä 1 kuvatuissa olosuhteissa, interferoni-aktiivisuus oli
yhtäpitävä fraktioissa 24-26 sijaitsevan yhden proteiinipiikin
kanssa.

(C) Käyttämällä samanlaisia olosuhteita kuormituksen,
gradientin sekä virtausnopeuden suhteen kuten (A):ssa sekä saman-
laisia puskureita A ja B kuten (B):ssä oktyyliryhmiä sisältävässä
pylväässä (9,6 x 500 mm, Chromegabond), niin että tuloksena oli
1/9 kuormituksesta kolonnin tilavuutta kohti, saavutettiin parempi
erottumiskyky.

(D) Aine, jolla oli menetelmävaiheessa (A) suurin spesifi-
nen aktiivisuus (4×10^8 yksikköä/mg) kromatografoitiin uudelleen
syanopropyyliryhmiä sisältävässä pylväässä käyttäen pyridiini/muu-
rahaishappo/vesi (8:8:84 tilav./tilav.)-eluenttia ja yksituntista
gradienttia n-propanolin (0-40 %, tilav./tilav.) suhteen, virtaus-
nopeuden ollessa 0,3 ml/min. Saatiin symmetrinen pääpiikki.

NaDodSO₄-polyakryyliamidi-geelielektroforeesi

Esimerkissä 1 kuvatulla tavalla interferoninäytteistä, jotka
saatiin menetelmävaiheessa (A), (B) ja (C), suoritettu elektro-
foreesi tuotti päävyöhykkeen, jonka molekyyllipaino oli 20 000 ja
joka interferonin aktiivisuuden määrittämisessä piti yhtä aktiivisuus-
piikin keskuksen kanssa. Toinen vyöhyke, jonka molekyyllipainoksi
osoittautui noin 10 500 ja jossa oli väri-intensiteettiä nähden
20-50 % koko materiaalista, vaihteli näytteestä toiseen, eikä sillä
ollut virusten vastaista aktiivisuutta. Kun näytteitä ei käsitelty
merkaptotoetanolilla, havaittiin vyöhyke, jonka molekyyllipaino oli
40 000, mutta jolla oli vain toissijaista aktiivisuutta. Vyöhykkei-
den, joiden molekyyllipainot olivat 20 000 ja 40 000, aminohappo-
analyysit eivät eronneet toisistaan, kun taas sen vyöhykkeen,
jonka molekyyllipaino oli 10 000, analyysi oli hyvin selvästi
erilainen.

70721

Menetelmän (D) mukaan saadun interferoni-näytteen elektroforeesi tuotti yhden vyöhykkeen, jonka molekyylipaino, joka oli noin 20 500, sekä spesifinen aktiivisuus 4×10^3 yksikköä/mg.

Tämän homogeenisen peptidin aminohappoanalyysi tuotti 24-tuntisen, $6N$ HCl:ssä suoritettun hydrolyysin jälkeen, seuraavat, leusiinin 25,0:aan verratut arvot:

Asx	15,4 \pm 0,2	Ala	11,8 \pm 0,4	Tyr	9,6 \pm 0,2
Thr ^x	7,8 \pm 0,3	Cys	ei määritetty	Phe	7,3 \pm 0,1
Ser ^x	7,7 \pm 0,2	Val	6,9 \pm 0,1	His	4,5 \pm 0,1
Glx	24,1 \pm 0,4	Met	2,8 \pm 0,4	Lys	11,6 \pm 0,4
Pro	2,8 \pm 0,4	Ile	8,7 \pm 0,1	Arg	8,8 \pm 0,4
Gly	4,9 \pm 0,3	Leu	25,0	Trp	ei määritetty

x korjattu arvo

Esimerkki 3

Blau Dextran-Sepharose-affiniteettikromatografia

(a) 5 l viljelmää, joka sisälsi 19 400 yksikköä/ml fibroblasti-interferonia, suodatettiin 0,3 μ :n suodattimen läpi ja pantiin sitten pylvääseen, jossa oli 275 ml Blau Dextran-Sepharosea. Liuoksen NaCl-konsentraatio säädettiin ennen pylvääseen panoa 1,25 M:ksi NaCl:a lisäämällä 1350 ml kyllästettyä NaCl-liuosta (6,3 M), ja se pumpattiin pylvääseen läpivirtausnopeudella 360 ml/ tunti. Noin 4-6 % interferonista kulki pylvään kautta adsorboitumatta siihen.

(b) Pylväs pestiin sitten läpivirtausnopeudella 420 ml/tunti 1300 ml:lla vesiliuosta, joka sisälsi 15 % (tilav./tilav.) etyleeniglykolia, 1 M NaCl:a sekä 0,02 M natriumfosfaattia (pH 7,2). Noin 1 % adsorboituneesta interferonista eluoitui pylväästä.

(c) Interferoni eluoitui sitten läpivirtausnopeudella 420 ml/tunti käyttäen vesiliuosta, joka sisälsi 50 % (tilav./tilav.) etyleeniglykolia, 1 M NaCl:a ja 0,02 M natriumfosfaattia (pH 7,2). Eluaatin ensimmäisen 200 ml:n mukana eluoitui vähän interferonia. Suurin osa interferonista eluoitui eluaatin seuraavaa 300 ml:n mukana, kuten seuraava taulukko osoittaa:

70721

Fraktio nro.	Fraktio tilavuus [ml]	Proteiini [$\mu\text{g/ml}$]	Interferonitiitteri [yks./ml]	Spesif. aktiivisuus [yks./mg]
1	200	ei määritetty	122	-
2	50	43	$3,8 \times 10^5$	$9,02 \times 10^6$
3	50	82	$11,64 \times 10^5$	$1,42 \times 10^7$
4	50	63	$7,72 \times 10^5$	$1,23 \times 10^7$
5	50	62	$1,94 \times 10^5$	$3,13 \times 10^6$
6	50	49	$9,7 \times 10^4$	$1,97 \times 10^6$
7	50	41	$3,64 \times 10^4$	$8,87 \times 10^5$

Hyväksikäytetystä interferoniaktiivisuudesta saatiin kaikkiaan 114 % takaisin.

HPLC

Blau Dextran-Sepharose-kolonniin fraktiot 2-6 (250 ml; 13×10^7 yksikköä, spesifinen aktiivisuus $8,12 \times 10^6$ yksikköä/mg) pumpattiin pylvääseen (9,5 x 500 mm), jonka pohjana oli oktyyli-ryhmiä sisältävä SiO_2 -matriisi, ja käytettiin läpivirtausnopeutta 4 ml/min. 12 minuutin aikana pumpattiin puskuria A (pyridiini/muurahaishappo/2-propanoli/n-butanoli/vesi, 8:8:20:2,5:61,5, tilav./tilav.) läpivirtausnopeudella 2 ml/min pylvään läpi. Tämän jälkeen eluoitiin puskurin B suhteen (pyridiini/muurahaishappo/1-propanoli/n-butanoli/vesi, 8:8:25:25:34, tilav./tilav.) seuraavin gradienttein käyttäen virtausnopeutta 1,25 ml/min : 0-20 % B, 18 min, 20-29 % B, 57 min; 29 % B isokraattisesti 27 minuutin aikana; 29-30 % B, 3 min; 30-100 % B, 36 min; 100 % B, 54 min.

Interferoni-aktiivisuus eluoitiin gradientin isokraattisella alueella ja vieläpä yhdessä piikin kanssa, joka havaittiin Fluorescamin-tarkkailu-järjestelmän avulla. 45×10^6 yksikköä interferonia (saanto 35 %), jonka spesifinen aktiivisuus oli 2×10^8 yksikköä/mg, yhdistettiin pooliksi (50 ml). Kaksi kuukautta kestäneen säilytyksen jälkeen -20°C :ssa, suljetussa polypropyleeni-ampullissa oli aktiivisuus laskenut 10 %:iin HPLC:n jälkeisestä aktiivisuudesta. Proteiinitappiota ei ilmennyt.

Tämä 50 ml:n suuruinen pooli (spesifinen aktiivisuus noin $0,2 \times 10^8$ yksikköä/mg) laimennettiin 1 ml:lla tiodiglykolia ja 20 ml:lla n-propanolia. Määrityksen perusteella tämä seos sisälsi kaikkiaan $4,26 \times 10^6$ yksikköä. Seokseen lisättiin 100 ml 0,1 % Triton X-100/0,3 % tiodiglykoli-seosta. Tämä seos, joka määrityksen mukaan sisälsi kaikkiaan $5,1 \times 10^6$ yksikköä, pumpattiin 30 minuutin kuluessa pylvääseen, jonka pohjana oli CN-ryhmiä sisältävä SiO_2 -matriisi (4,6 x 250 mm, $5 \mu/8 \times 10^6$ mm, Spherisorb) ja joka oli tasapainoitettu pyridiini/muurahaishappo/vesi-seoksella (8:8:84, tilav./tilav., puskuri A). Käytettiin seuraavaa gradienttia puskurin B suhteen (pyridiini/muurahaishappo/n-propanoli/vesi, 8:8:50:34, tilav./tilav.) sekä virtausnopeutta 0,5 ml/min: 0-25 % B, 30 min; 25-50 % B, 210 min. Interferoni-aktiivisuus eluoitui ainoan määritetyn piikin mukana. $4,2 \times 10^6$ yksikköä (82 %) saatiin takaisin kolmessa 1 ml:n fraktiossa.

Tämä pooli, joka muodostaa 69 % ensimmäiseen CN-pylvääseen pannusta proteiinin kokonaismäärästä, sekoitettiin 2 ml:n kanssa 0,1 % Triton X-100:a ja pantiin vielä kerran samaan CN-pylvääseen. Se eluoitui samoja gradientteja käyttäen puolessa ajassa. Kokonaisaktiivisuus ($11,75 \times 10^6$ yksikköä, saanto 280 %) eluoitui yhdessä ainoassa piikissä.

Toisen CN-pylvään interferoni-aktiivisuutta sisältävät fraktiot (4 ml) pumpattiin virtausnopeudella 1,5 ml/min pylvääseen, jonka koko oli 4,6 x 250 mm, ja jonka pohjana oli difenyyli-ryhmiä sisältävä SiO_2 -matriisi ja joka aiemmin oli käsitelty kaksituntisella, lineaarisella gradientilla puskurista A puskuriin B (sama puskuri kuin CN-pylväälle) sekä tasapainoitettu puskurilla A.

Käytettiin seuraavaa gradienttia sekä virtausnopeutta 0,5 ml/min: 0-25 % B, 22 min; 25-50 % 98 min. Toinen piikki, joka eluoitui, kun gradienttilaite osoitti 33 %:a puskuria B, piti yhtä interferoni-aktiivisuus-piikin kanssa. Tämän piikin mukana eluoitui kaikkiaan $2,6 \times 10^6$ yksikköä (22 %) sekä 40 mg proteiinia.

Difenyyli-ryhmiä sisältävä SiO_2 -pylväs valmistettiin seuraavalla tavalla:

SiO_2 :a (10^{-2} mm, 10^{-5} mm huokoskoko) liuotettiin pehmeäksi 6N HCl:ssa (10:1, tilav./paino) 24 tunnin ajan sopivasti ravistelun. Sitten se pestiin vedellä neutraaliksi, ja tämän jälkeen vesi poistettiin pesemällä asetonilla ja metanolilla. Yli yön alennetussa

70721

paineessa suoritettua kuivauksen jälkeen palautusjäähdytettiin piihappoa (10 g) 6 tunnin ajan 100 ml:ssa kuivaa tolueenia, joka sisälsi 10 ml diklooridifenyyylisilaania. Näin muunneltu piihappo pestiin seuraavaksi 200 ml:lla tolueenia ja tämän jälkeen Soxhlett-uuttimessa peräkkäin 250 ml:lla tolueenia, asetonia sekä metanolia kulloinkin 8 tunnin ajan. Lopuksi käsiteltiin trimetyylikloorisilaanilla edellä kuvatulla tavalla.

Sitten suspendoitiin 3 g:n kantaja-aine eriä kukin 10,7 ml:aan kloroformia ja 2,3 ml:aan n-butanolia, ja täytettiin 340 atm:n (34 MPa) paineessa ruostumattomasta teräksestä valmistettuja pylväitä, joiden koko oli 4,6 x 250 mm. Pylväät pestiin tämän jälkeen 75 ml:lla etanolia.

Saadun interferoni-piikin keskifraktion aminohappoanalyysit tuottivat 5,7 N HCl:ssä suoritettua hydrolyysin jälkeen seuraavat tulokset:

Asx	15,4	17,6	17,95	15,2 Thr ^x
	7,8	8,6	8,4	7,3 Ser ^x
	7,7	8,3	9,1	9,9 Glx
	24,1	21,1	21,4	n.b. Pro
	2,8	n.b.	n.b.	3,36 Gly
	4,9	6,9	6,6	7,4 Ala
	11,8	10,7	10,7	9,9 Cys
	n.b.	3,96	3,4	n.b. Val
	6,9	7,84	8,2	6,9 Met
	2,8	4,5	4,5	3,7 Ile
	8,7	8,6	8,9	7,8 Leu
	25,0 ^{xx}	25 ^{xx}	25 ^{xx}	25 ^{xx} Tyr
	9,6	10,3	9,0	8,1 Phe
	7,3	9,5	9,8	9,0 His
	4,5	7,5	6,9	6,1 Lys
	11,6	12,3	11,8	11,25 Arg
	8,8	11,25	10,6	8,8 Trp
	<u>n.b.</u>	<u>n.b.</u>	<u>n.b.</u>	<u>2,93</u>
	24 h.	24 h.	48 h.	24 h.
	TGS	TGS	TGS	TGS

TGS tioglykolihiappo
 x korjaamaton arvo
 xx vertailuarvo
 n.b. ei määritetty

70721

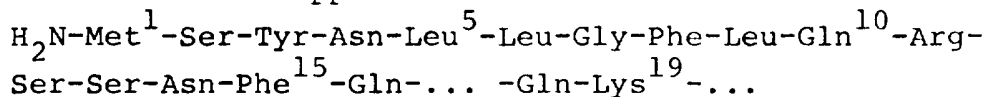
6-, 14- ja 24-tuntisen, 5,7 N HCl:lla, joka sisälsi 0,02 % tioglykoliyhappoa, 110°C:ssa suoritettua hydrolyysin jälkeen, kun käytettiin difenyyli-pylvästä saadun interferoni-piikin keski-fraktiota, kaksoisamiinianalyysi tuotti 3 glukosamiinitähdettä molekyyliä kohti.

Ei löydetty galaktosamiinia eikä mannosamiinia.

Pääteryhmämääritys tehtiin 90 p molaarisella näytteellä difenyyli-pylvästä saadun interferoni-piikin keskifraktiosta, ja määrityksen perusteella Met oli N-terminaalinen aminohappo.

150 pmolaariset sekä fibroblasti- että leukosyytti-interferoni-näytteet pilkottiin trypsiinillä ja kromatografoitiin. Kummastakaan näytteestä ei löydetty yhtään identtistä peptidifragmenttia.

Määrittämällä 1,25 nmolaarisen fibroblasti-interferonin sekvenssi valmistettiin Met N-terminaaliseksi aminohapoksi, samoin todettiin oikeaksi Hunkapillarin ja Hoodin, Biochemistry 17, (1978) 2124 esittämä sekvenssi 3-10, nimittäin Tyr³-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln¹⁰. Sekvenssin määrittäminen erästä toisesta 5,9 nmolaarisesta fibroblasti-interferoninäytteestä tuotti seuraavan N-terminaalisen aminohapposekvenssin:



Esimerkki 4

Raaka interferoni saatiin ihmisen fibroblasteista (solu-linja GM 2504A). Raaka materiaali tehtiin 1 molaariseksi natriumkloridin suhteen lisäämällä kyllästettyä natriumkloridiliuosta. Tämä materiaali laskettiin Blau Sepharose-4B -pylvään läpi (tilavuus 20-25 ml), läpimitta 2,5 cm, läpivirtausnopeus 2,5 ml/min). Kuormituksen aikana raaka materiaali jäähdytettiin jäiden avulla. Kuormituksen jälkeen pylväs pestiin 250 ml:lla seuraavaa liuosta (2,5 ml/min):

30 % etyleeniglykolia, 1 M NaCl, 50 mM Na₂HPO₄ (pH 7,2).

Lopuksi interferoni eluoitiin virtausnopeudella 2,5 ml/min käyttäen 250 ml seuraavaa liuosta:

70721

50 % etyleeniglykolia, 1 M NaCl:a, 50 mM Na₂HPO₄ (pH 7,2).
Määritykselle luonteenomaiset tulokset olivat:

5 % aktiivisuudesta läpivirtauksessa

10 % aktiivisuudesta 30 %:isessä etyleeniglykoli-liuoksessa

85 % aktiivisuudesta 50 %:isessä etyleeniglykoli-liuoksessa

Ensimmäisen Blau Sepharose-pylvään interferoni-piikin fraktiot koottiin yhteen ja seuraavan liuoksen kanssa etyleeniglykolipitoisuus säädettiin 10 %:ksi (tilav./tilav.):

2 M NaCl, 50 mM Na₂HPO₄ (pH 7,2).

Tämä materiaali pantiin Blau Sepharose-pylvääseen (tilavuus 29-25 ml, läpimitta 2,5 cm, läpivirtausnopeus 2,5 ml/min). Se pestiin 250 ml:lla liuosta, joka sisälsi 2 M NaCl:a, 50 mM Na₂HPO₄:a (pH 7,2) sekä 30 % (tilav./tilav.) etyleeniglykolia sekä eluoitiin liuoksella, jossa oli 2 M NaCl:a, 50 mM Na₂PO₄:a (pH 7,2) sekä 50 % (tilav./tilav.) etyleeniglykolia.

Interferoni-määrityksen luonteenomaiset tulokset olivat:

10 % aktiivisuutta läpivirtauksessa

30 % aktiivisuutta 30 %:isessä etyleeniglykoli-liuoksessa

60 % aktiivisuutta 50 %:isessä etyleeniglykoli-liuoksessa

HPLC

Seuraavaksi tutkittiin Blau Sepharosea 50 %:isen (tilav./tilav.) etyleeniglykolieluaatin näyte. Sitä seurasivat näytteet, jotka pantiin kaksi kertaa Blau Sepharose-pylvääseen, missä tapauksissa voitiin käyttää 30 %:ista tai 50 %:ista etyleeniglykolieluaattia.

Käytettiin pylvästä, jonka koko oli 25 x 0,46 cm ja jonka pohjana oli oktyyliryhmin modifioitu SiO₂-matriisi (Lichrosorb RP-8). Seuraavaksi pylväs pestiin vedellä ja kuormitettiin sitten Blau Sepharose-pylvään eluaatilla. Pumpun eteen kytkettiin sekoituskammio (5 ml). Työskenneltiin läpivirtausnopeudella 22 ml/tunti käyttäen seuraavaa, asteittaista n-propanolin gradienttia vakio pH 4,2:ssa, joka saatiin aikaan 1 M muurahaishappo/0,8 M pyridiini-suhteen avulla:

0 % 10 min, 30 % 40 min; 32 % 40 min.

Lopuksi pylväs pestiin 60 %:isella n-propanolilla ja tasapainoitettiin ennen seuraavaa käyttöä 1 M muurahaishapolla ja 0,8 M pyridiinillä.

Interferoni eluointiin 32 %:isella n-propanoli-eluaatilla (80. ja 90. minuutin välillä). Tämä materiaali oli homogeenista NaDodSO₄-akryyliamidi-geelielektroforeesin perusteella (värjäys Coomassie Blauilla tai näytteen edeltävä merkitseminen fluramilla).

Aminohappoanalyysi (24-tuntinen hydrolyysi, 0,2 % TGS (= tioglykolihamppu), 5,7 N HCl) suoritettiin yhdeksästä uudesta erilaisesta näytteestä, jotka oli otettu neljästä erilaisesta valmistuksesta. Keskimääräinen aminohappokoostumus leusiinin arvon 22,0 suhteen käy ilmi seuraavasta taulukosta.

Asx	15,1 ± 0,7	Met	4,5 ± 0,7
Thr ^x	7,0 ± 0,5	Ile	9,4 ± 0,1
Ser ^x	7,5 ± 0,5	Leu	22,0
Gly	22,2 ± 0,5	Tyr	8,8 ± 0,2
Pro	ei määritetty	Phe	8,0 ± 0,3
Cys	3,0 ± 0,3	His	4,5 ± 0,1
Gly	6,9 ± 0,7	Lys	11,0 ± 0,6
Ala	7,4 ± 1,0	Arg	11,9 ± 0,7
Val	5,7 ± 0,5	Trp	ei määritetty

x korjaamaton arvo

Eri näytteistä (24-tuntinen hydrolyysi 6N HCl:ssa 0,2 % tioglykolihampon, TGS kanssa), jotka oli saatu tässä sekä edellä esitettyssä esimerkissä kuvatuilla menetelmillä, eri aikoina suoritettujen analyysien perusteella homogeenisella ihmisen fibroblasti-interferonilla on seuraava aminohappokoostumus ([±] 15 %).

Asx	15,1	Gly	6,9	Tyr	8,8
Thr ^x	7,0	Ala	7,4	Phe	8,0
Ser ^x	7,5	Val	5,7	His	4,5
Glx	22,2	Met	4,5	Lys	11,0
Pro	3,0	Ile	9,4	Arg	11,9
Cys	3,0	Leu ^{xx}	22,0	Trp	3,0

x korjaamaton arvo

xx vertailuarvo

Esimerkki 5

Homogeeninen ihmisen fibroblasti-interferoni (1,5 mg), jonka spesifinen aktiivisuus oli 4×10^8 yksikköä/mg, liuotettiin 25 ml:aan 5 %:ista normaalia ihmisen seerumialbumiinia. Liuos suodatettiin bakteriologisella suodattimella ja jaettiin 100 aseptiseen ampulliin. Jokainen ampulli sisälsi 6×10^6 yksikköä interferonia, joka soveltui parenteraaliseen annosteluun. Ampullit säilytettiin käyttöön saakka etupäässä kylmässä (-20°C :ssa).

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä ihmisen fibroblasti-interferonin valmistamiseksi homogeenisena proteiinina, t u n n e t t u siitä, että

A. epäpuhtaan, ihmisen fibroblasti-interferonin vesiliuos pannaan affiniteettikromatografia-pylvääseen, johon interferoni adsorboituu, interferoni eluoidaan ja se saadaan eluaatin tietyissä fraktioissa erittäin puhtaana, ja

B. saadut interferoni-fraktiot pannaan HPLC-olosuhteiden mukaisesti yhteen tai useampaan, puskurilla tasapainoitettuun kromatografia-pylvääseen, jonka perustana on sykloheksyyli-, fenyyli-, difenyyli-, oktyyli-, oktadekyyli- tai syanopropyyli-ryhmiä sisältävä SiO_2 -matriisi, jolloin interferoni adsorboituu ja se eluoidaan kussakin tapauksessa veden kanssa sekoittuvan liuottimen gradientilla, joka liuotin on puskuroidussa, happamessa, vettä sisältävässä järjestelmässä, niin että interferoni saadaan eluaatin tietyissä fraktioissa yhden ainoan selväpiirteisen piikin muodossa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että

A. epäpuhtaan, ihmisen fibroblasti-interferonin vesiliuos pannaan affiniteettikromatografia-pylvääseen, johon interferoni adsorboituu, interferoni eluoidaan ja saadaan eluaatin tietyissä fraktioissa erittäin puhtaana, ja

B. saadut interferoni-fraktiot pannaan HPLC-olosuhteiden mukaisesti yhteen tai useampaan puskurilla tasapainoitettuun kromatografia-pylvääseen, jonka perustana on sykloheksyyli-, fenyyli-, oktyyli-, oktadekyyli- tai syanopropyyli-ryhmiä sisältävä SiO_2 -matriisi, jolloin interferoni adsorboituu ja se eluoidaan kulloinkin veden kanssa sekoittuvan liuottimen gradientilla, joka liuotin on puskuroidussa, happamassa, vettä sisältävässä järjestelmässä, niin että interferoni saadaan yhden ainoan selväpiirteisen piikin muodossa eluaatin tietyissä fraktioissa.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että suoritetaan affiniteettikromatografia Concanavalin A-Sepharosella sekä HPLC ensin sykloheksyyli-ryhmiä sisältävässä

SiO₂-pylväessä nousevilla n-butanolin gradientteilla pyridiini/muurahaishappo/2-propanoli/n-butanoli/vesi-seoksessa sekä tämän jälkeen oktyyli-ryhmiä sisältävässä SiO₂-pylväessä samoissa olosuhteissa.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t - t u siitä, että HPLC:n yhteydessä eluenttina käytettävän seoksen lähtökoostumus on 8:8:20:0:64, tilav./tilav. ja sen loppukoostumus on 8:8:25:20:39, tilav./tilav.

5. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t - t u siitä, että suoritetaan affiniteettikromatografia Blau Dextran-Sepharosella sekä HPLC oktyyliryhmiä sisältävässä SiO₂-pylväessä nousevilla n-butanoli-gradienteilla pyridiini/muurahaishappo/2-propanoli/n-butanoli/vesi-seoksessa.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t - t u siitä, että HPLC:n yhteydessä eluenttina käytettävän seoksen lähtökoostumus on 8:8:20:3,3:60,7, tilav./tilav., ja sen loppukoostumus on 8:8:25:20:39, tilav./tilav.

7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t - t u siitä, että oktyyli-ryhmiä sisältävästä SiO₂-pylväestä eluoi-tuvat, yhdistetyt interferoni-aktiiviset fraktiot tämän jälkeen uudelleen kromatografoidaan syanopropyli-ryhmiä sisältävässä SiO₂-pylväessä nousevilla n-propanoli-gradienteilla pyridiini/muurahaishappo/n-propanoli/vesi-seoksessa.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t - t u siitä, että eluenttina käytettävän seoksen lähtöainekoostumus on 8:8:0:84, tilav./tilav. ja sen loppukoostumus on 8:8:40:44, tilav./tilav.

9. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t - t u siitä, että HPLC:n yhteydessä eluenttina käytettävän seoksen lähtöainekoostumus on 8:8:20:0:64, tilav./tilav. ja sen loppukoostumus on 8:8:25:20:39, tilav./tilav.

10. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t - t u siitä, että syanopropyyliryhmiä sisältävästä SiO₂-pylväestä eluoidut, yhdistetyt interferoni-aktiiviset fraktiot uudelleen kromatografoidaan samanlaisessa pylväessä ja kromatografoidaan tämän jälkeen uudelleen difenyyli-ryhmiä sisältävässä SiO₂-pylväessä.

11. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että raa'alle ihmisen fibroblasti-interferonille,
joka on peräisin seerumittomasta valmisteesta, suoritetaan affi-
niteettikromatografia Blau Sepharose 4B:llä sekä HPLC oktyyli-
ryhmiä sisältävässä SiO_2 -pylväässä käyttäen pyridiini/muurahais-
happo/n-propanoli/vesi-seosta sekä epäjatkovaa, portaittaista
n-propanoli-gradienttia.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että noudatetaan seuraavaa n-propanoli-gradienttia
(tilav./tilav.): 10 minuuttia 0 %, 40 minuuttia 30 % ja 40 mi-
nuuttia 32 %, jolloin interferoni eluoituu 80. ja 90. minuutin
välillä.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av mänskligt fibroblast-interferon som homogent protein, k ä n n e t e c k n a t därav, att

A. en vattenlösning av mänskligt fibroblast-interferon leds i orent tillstånd upp på en affinitets-kromatografikolonn, på vilken interferonet adsorberas, interferonet elueras och det erhålls i bestämda eluatfraktioner i högst rent tillstånd, och

B. de erhållna interferon-fraktionerna leds under HPLC-betingelser över en eller flera med en buffert avbalanserade kromatografikolonner på basis av en cyklohexyl-, fenyl-, difenyl-, oktyl-, oktadecyl, eller cyanopropylgrupper innehållande SiO_2 -matris, varvid interferonet adsorberas, och det i vart och ett fall elueras med en gradient av ett med vatten blandbart lösningsmedel, som innehålles i ett buffertförsett, surt, vattenhaltigt system, så att interferonet erhålls i form av en enkel utpräglad topp i bestämda fraktioner av eluatet.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att

A. en vattenlösning av mänskligt fibroblast-interferon leds i orent tillstånd upp på en affinitets-kromatografikolonn, på vilken interferonet adsorberas, interferonet elueras och erhålls i bestämda eluatfraktioner i högst rent tillstånd, och

B. de erhållna interferon-fraktionerna leds under HPLC-betingelser över en eller flera med en buffert avbalanserade kromatografikolonner på basis av en cyklohexyl-, fenyl-, oktyl-, oktadecyl- eller cyanopropylgrupper innehållande SiO_2 -matris, varvid interferonet adsorberas, och det i vart och ett fall elueras med en gradient av ett med vatten blandbart lösningsmedel, som innehålles i ett buffertförsett, surt, vattenhaltigt system, så, att interferonet erhålls i form av en enkel utpräglad topp i bestämda fraktioner av eluatet.

3. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att affinitets-kromatografin utföres på Concanavalin A-Sepharose och HPLC först på en cyklohexylgrupper innehållande

SiO₂-kolonn med stigande n-butanol-gradienter i en blandning av pyridin/myrsyra/2-propanol/n-butanol/vatten och sedan en oktylgrupper innehållande SiO₂-kolonn under samma förhållanden.

4. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k - n a t därav, att vid HPLC är utgångssammansättningen hos den som elueringsmedel använda blandningen 8:8:20:0:64, volym/volym, och slutsammansättningen 8:8:25:20:39, volym/volym.

5. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k - n a t därav, att affinitets-kromatografin utföres på Blau Dextran-Sepharose och HPLC på en oktylgrupper innehållande SiO₂-kolonn med stigande n-butanol-gradienter i en blandning av pyridin/myrsyra/2-propanol/n-butanol/vatten.

6. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k - n a t därav, att vid HPLC är utgångssammansättningen hos den som elueringsmedel använda blandningen 8:8:20:3,3:60,7, volym/volym, och slutsammansättningen 8:8:25:20:39, volym/volym.

7. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k - n a t därav, att de från oktylgrupper innehållande SiO₂-kolonnen eluerade, förenade interferon-aktiva fraktionerna återkromatograferas sedan på en cyanopropylgrupper innehållande SiO₂-kolonn med stigande n-propanolgradienter i en blandning av pyridin/myrsyra/n-propanol/vatten.

8. Förfarande enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k - n a t därav, att utgångssammansättningen hos den som elueringsmedel använda blandningen är 8:8:0:84, volym/volym, och slutsammansättningen 8:8:40:44, volym/volym.

9. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k - n a t därav, att vid HPLC är utgångssammansättningen hos den som elueringsmedel använda blandningen 8:8:20:0:64, volym/volym, och slutsammansättningen 8:8:25:20:30, volym/volym.

10. Förfarande enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k - n a t därav, att de från cyanopropylgrupper innehållande SiO₂-kolonnen eluerade, förenade interferon-aktiva fraktionerna återkromatograferas på en likartad kolonn och återkromatograferas sedan på en difenylgrupper innehållande SiO₂-kolonn.

11. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k - n a t därav, att för den råa mänskliga fibroblastinterferonen,

som härstammar från ett serumfritt preparat, utförs affinitets-kromatografin på Blau Sepharose 4B och HPLC på en oktylgrupper innehållande SiO_2 -kolonn med en blandning av pyridin/myrsyra/n-propanol/vatten och en diskontinuerlig, stegformad n-propanol-gradient.

12. Förfarande enligt patentkravet 11, k ä n n e t e c k - n a t därav, att följande n-propanolgradient (volym/volym) iakt-tages: 10 minuter 0 %, 40 minuter 30 % och 40 minuter 32 %, var-vid interferonet elueras mellan 80. och 90. minuten.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: Suomi-Finland(FI) 60 501 (A 61 K 45/02), 69 476 (C 07 K 15/26).

Muita julkaisuja:-Andra publikationer: Chem. Abstr., vol. 86 (1977), 3409b. Chem. Abstr., vol. 91 (1979), 138673g ja 206607r. Chem. Abstr., vol. 93 (1980), 202441a.