

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 911**

51 Int. Cl.:
C12P 21/02 (2006.01)
C07K 14/565 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04808310 .9**
96 Fecha de presentación: **04.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1697411**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.09.2006**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE PURIFICACIÓN DE INTERFERÓN BETA.**

30 Prioridad:
04.12.2003 KR 2003087552

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.12.2011

73 Titular/es:
**CJ CHEILJEDANG CORPORATION
500, NAMDAEMUNRO 5-GA
JUNG-GU SEOUL, KR**

72 Inventor/es:
**PARK, Ji-Sook;
CHUNG, Jong-Sang;
BAEK, Min-Ji;
AHN, Jee-Won;
KIM, Ki-Wan;
PARK, Hyung-Ki;
LEE, Dong-Eok y
OH, Myung-Suk**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 911 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Procedimiento de la purificación de interferón beta.

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la purificación de un interferón beta humano a partir de un cultivo que contiene interferón beta humano recombinante usando cromatografía de afinidad y cromatografía líquida de alta eficacia de fase inversa.

Antecedentes de la técnica

10 Los interferones en un sentido amplio son mensajeros extracelulares que median en la reactividad de los huéspedes y la evolución de las familias de proteínas conservadas que son liberadas en un tamaño relativamente pequeño a partir de células. Los interferones son liberados a partir de células que producen interferón en respuesta a la estimulación por virus, ARNs de doble hebra, diversos microorganismos, o citocinas tal como TNF o IL-1, y, a continuación, se unen a las superficies de células próximas con receptores de interferones. Posteriormente, los interferones inducen la síntesis de diversas proteínas de manera tal que se mantiene la reactividad y homeostasis de los huéspedes mediante el consiguiente señalamiento en las células. En consecuencia, los interferones actúan como proteínas
15 señal antivíricas, antiproliferativas, e inmunes en los cuerpos y tienen efectos de antiproliferación directos sobre células de cáncer, y por ello, han merecido mucha atención como agentes terapéuticos [Postka S., Langer, J.A. y Zoon, K.C., "Interferons and their actions", Annu. Rev. Biochem., vol. 56, págs. 727-777, (1987)].

20 Los interferones pertenecen a la clase de sustancias fisiológicamente activas, helicoidales. De acuerdo con las características y funcionalidades fisicoquímicas, existen dos clases de interferones: tipo 1 y 2. El interferón- alfa, -beta, -tau, y -épsilon son partes del interferón tipo 1 [Weissman, C y Weber, H, "The Interferon genes", Prog. Nucleic Acid. Res. Biol., vol. 33, págs. 251-300, (1986)] y el interferón gamma es una parte del interferón tipo 2. Entre ellos, los interferones betas que pertenecen al interferón tipo 1 son proteínas que muestran especificidad de especies. Los interferones betas son denominados igualmente como interferones fibroblastos considerando sus orígenes y como interferones estables a pH2, considerando las características biológicas. Los interferones betas se unen a los mismos
25 receptores de superficies de células, conjuntamente con interferones alfas que pertenecen al interferón tipo 1 y, a continuación, inducen la transcripción de factores antivíricos en respuesta a un consiguiente sistema de células señal.

30 Los interferones betas son glucoproteínas (aproximadamente 20% de resto azúcar) con una masa molecular de aproximadamente 20 kDa y proteínas de cadena sencilla que consisten en 166 aminoácidos. Se conoce un sitio de N-glucosilación que juega un papel en el incremento de la estabilidad o solubilidad del material en cuanto como funciones fisicoquímicas, más que como participante en la actividad biológica o la antigenicidad [Karpusas, M., Whytty, A., Runkel, L., y Hochman, P. The structure of human interferon-β: implications for activity CMLS, vol. 54, págs. 1203-1216, (1998)].

35 El avance en la tecnología de recombinación genética ha permitido la determinación de la secuencia de aminoácidos del interferón beta humano y la clonación y expresión del interferón beta humano en *E. coli* [Taniguchi, Gene, vol. 10, págs. 11-15, (1980)]. Además, se ha informado de la expresión de interferón beta en células de ovario de hámster chino (CHO) [Patente de EE.UU. 4.966.843, Patente de EE.UU. 5.376.567, y Patente de EE.UU. 5.795.779].

40 Actualmente, se fabrican interferones betas mediante tecnología de recombinación de genes y se encuentran comercialmente disponibles bajo el nombre comercial de Betaseron[®], Avone[®] y Rebit[®]. Es sabido que los interferones betas recombinantes son eficaces en el retraso de la progresión de la esclerosis múltiple en pacientes con los signos de la enfermedad y en el alivio de los dolores de la enfermedad. Además, los interferones betas recombinantes son ampliamente usados como agentes terapéuticos para la esclerosis múltiple, y al mismo tiempo son eficaces en la regulación no específica de la respuesta inmune humana, la respuesta inmune a infección vírica y la anti-
45 proliferación de células de cáncer.

Las tecnologías de purificación actualmente disponibles de interferones betas recombinantes expresados en células CHO implican 3-5 procedimientos de purificación que incluyen la purificación primaria mediante cromatografía de afinidad (Patente de EE.UU. 4.278.661, Patente de EE.UU. 4.289.689, Patente de EE.UU. 4.541.952, Patente de EE.UU. 4.808.523, etc.), cromatografía de quelato metálico (Patente de EE.UU. 4.257.938, Patente de EE.UU. 4.359.389, Patente de EE.UU. 4.541.952, Patente de EE.UU. 5.244.655, etc.), cromatografía CPG (vidrio de poro controlado) (Patente de EE.UU. 4.359.389, Patente de EE.UU. 5.066.786, Patente de EE.UU. 5.244.655, etc.), o cromatografía Concanavalin A (Patente de EE.UU. 4.289.689, Patente de EE.UU. 4.658.017, etc.), seguido de cromatografía de intercambio de cationes y cromatografía de fase inversa.

55 En las tecnologías de purificación comunes anteriormente descritas, la cromatografía de quelato metálico puede causar contaminación ambiental debido al uso de metal pesado. La cromatografía CPG o Concanavalin A tiene pobre especificidad de purificación. Es decir, la cromatografía Concanavalin A basada en la unión selectiva con muchas proteínas de cadena azúcar contenidas en un cultivo de células CHO muestra baja especificidad. Una co-

lumna CPG permite la separación por tamaño molecular después de unión con una proteína. Sin embargo, la eficacia y pureza de separación de los interferones betas son menores que los de la cromatografía de afinidad (por ejemplo, cromatografía de columna Blue Sepharose).

5 Además, las tecnologías de purificación comunes mediante cromatografía de afinidad implican el lavado y elución con etileno glicol usando un anticuerpo monoclonal y/o una resina coloreada. Sin embargo, la cromatografía de afinidad que usa un anticuerpo monoclonal de manera separada, requiere la eliminación de la forma no glucosilada del interferón beta, lo cual hace difícil la producción en masa. En particular, el etileno glicol usado en el lavado y la elución es muy tóxico en el cuerpo, lo cual restringe la aplicación de purificación real.

10 Mientras tanto, la Patente de EE.UU. No. 4.483.849 divulga un procedimiento para la purificación y estabilización de interferón beta que usa propileno glicol, en lugar de etileno glicol tóxico, mediante cromatografía de afinidad. El procedimiento divulgado en este documento de patente incluye la aplicación de un cultivo que contiene interferón a una columna de afinidad coloreada tal como Affi-Gel Blue equilibrada, el lavado de la columna con una solución tampón de NaCl/PO₄ 1,0 M y una solución tampón de NaCl/PO₄ 1,0 M que contiene 40% de propileno glicol, y la elución del interferón con 50% de propileno glicol. Incluso considerando que el procedimiento de este documento de patente
15 implica el lavado y la elución de la columna, coexiste un pico del producto final deseado y un pico de impureza, disminuyéndose, de esta forma, la pureza.

Divulgación de la invención

20 La presente invención proporciona un procedimiento para la purificación de interferón beta, el cual incluye la recuperación de un producto de purificación primaria de alta pureza de interferón beta mediante cromatografía de afinidad potenciada usando propileno glicol no tóxico, seguido de cromatografía líquida de alta eficacia de fase inversa (RP-HPLC).

En consecuencia, la presente invención proporciona un procedimiento para la purificación de interferón beta humano a partir de un cultivo que contiene interferón beta humano recombinante, que comprende la realización de cromatografía de afinidad y RP-HPLC, el cual incluye el lavado y elución con una solución tampón específica.

25 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la purificación de interferón beta humano a partir de un cultivo que contiene interferón beta humano recombinante mediante cromatografía de afinidad y RP-HPLC, en el que la cromatografía de afinidad incluye: adsorción del cultivo que contiene interferón beta en una columna de cromatografía de afinidad equilibrada, seguido de lavado con una solución tampón de equilibrado; lavado de la columna con una solución tampón de lavado A de pH 6,5-7,5 que contiene 30-60% en peso de propileno glicol y una solución tampón de lavado B de pH 6,5-7,5 que contiene 10-30% en peso de propileno glicol y NaCl 1-2 M; y elución de una fracción que contiene interferón beta humano con una solución tampón de pH 6,5-7,5 que contiene 40-60% en peso de propileno glicol y NaCl 1-2 M.
30

35 En el procedimiento de purificación de la presente invención, los ejemplos no limitativos del cultivo que contiene interferón beta humano recombinante usado como una muestra, incluyen células y cepas que producen interferón beta. Por ejemplo, el cultivo que contiene interferón beta humano recombinante puede ser un cultivo obtenido mediante un procedimiento conocido divulgado por Carter y Horoszewicz, en *Pharm. Ther.*, vol. 8, págs. 359-377, (1980); Strander y Cantell, *Ann. Med. Exp. Fenn.*, vol. 44, págs. 265-273, (1966); Wheelock, *Science*, vol. 149, págs. 310-311, (1965), y similares. Preferiblemente, el cultivo que contiene interferón beta humano recombinante es un cultivo libre de suero obtenido de células de ovario de hámster chino (CHO) que producen interferón beta humano recombinante.
40

45 En el procedimiento de purificación de la presente invención, la columna de cromatografía de afinidad usada en la cromatografía de afinidad puede ser una columna de afinidad coloreada común, por ejemplo una columna (por ejemplo, columna XK-50, Amersham biosciences, Suecia) empaquetada con Blue-Sepharose 6 (Amersham biosciences, Suecia) o una columna Affi-Gel Blue (Bio-Rad, Estados Unidos de América). La solución tampón de equilibrado para la columna de cromatografía de afinidad puede ser una solución tampón de fosfato sódico-EDTA (aproximadamente pH 7,2). La columna de cromatografía de afinidad puede equilibrarse con 3 volúmenes de columna (CV) de la solución tampón de equilibrado, por ejemplo a una velocidad lineal de aproximadamente 15-30 cm/h.

50 En el procedimiento de purificación de la presente invención, la cromatografía de afinidad incluye la adsorción del cultivo que contiene el interferón beta en la columna de cromatografía de afinidad equilibrada y la eliminación de una proteína unida no específicamente mediante lavado con la solución tampón de equilibrado.

55 La cromatografía de afinidad incluye igualmente el lavado multi-etapa, es decir, el lavado de la columna con una solución tampón de lavado A de pH 6,5-7,5 que contiene 30-60% en peso de propileno glicol y con una solución tampón de lavado B de pH 6,5-7,5 que contiene 10-30% en peso de propileno glicol y NaCl 1-2 M. Preferiblemente, la cromatografía de afinidad incluye además el lavado con una solución tampón de lavado C de pH 6,5-7,5 que contiene NaCl 1-2 M. Preferiblemente, cada lavado se realiza con 2-4 CV de cada solución tampón.

En el procedimiento de purificación de la presente invención, no existe limitación sobre el uso de la secuencia de las soluciones tampones de lavado. Es decir, el lavado puede realizarse usando la solución tampón de lavado A y, a

5 continuación, la solución tampón de lavado B o usando la solución tampón de lavado B y, a continuación, la solución tampón de lavado A. Además, el lavado puede realizarse usando la solución tampón de lavado A, la solución tampón de lavado C y, a continuación, la solución tampón de lavado B, o usando la solución tampón de lavado B, la solución tampón de lavado C y, a continuación, la solución tampón de lavado A. El lavado con la solución tampón de lavado A elimina de manera eficaz las impurezas con alta hidrofobicidad, el lavado con la solución tampón de lavado C elimina las impurezas hidrófilas, y el lavado con la solución tampón de lavado B elimina las proteínas impuras.

La recuperación del interferón beta puede realizarse mediante la elución de una fracción que contiene interferón beta humano con una solución tampón de pH 6,5-7,5 que contiene 40-60% en peso de propileno glicol, preferiblemente 50% en peso, y NaCl 1-2 M.

10 Preferiblemente, cada solución tampón usada en el lavado o la elución puede ser una solución tampón de fosfato sódico o una solución tampón de fosfato potásico.

15 En el procedimiento de purificación de la presente invención, el lavado con una solución tampón que contiene aproximadamente 50% de propileno glicol permite la eliminación de manera eficaz de picos de impurezas, lo cual contrasta con el procedimiento divulgado en la Patente de EE.UU. No. 4.483.849, en la cual el lavado y la elución se realizan con un gradiente de concentración de propileno glicol graduado.

20 En el procedimiento de purificación de la presente invención, la cromatografía de afinidad anteriormente descrita está seguida por RP-HPLC. Preferiblemente, antes de la realización de la RP-HPLC, se lleva a cabo la diafiltración de una solución eluída procedente de la cromatografía de afinidad con una membrana de ultrafiltración de corte de peso molecular de 10.000. Mediante la diafiltración, puede ajustarse el interferón beta con relativamente alta concentración en sal a una concentración en sal apropiada.

25 La RP-HPLC se realiza como sigue: una muestra obtenida mediante la diafiltración se carga sobre una columna y, a continuación, se eluye una fracción que contiene interferón beta humano a pH 2-5 mediante un gradiente de concentración de etanol que contiene HCl. De manera detallada, se equilibra una columna con HCl al 0,1% que contiene 0,1-20%, preferiblemente 5% o menos de propileno glicol, y a continuación, se carga sobre la columna una muestra, obtenida por diafiltración, que contiene 0,1-20%, preferiblemente 5% o menos de propileno glicol. A continuación, la columna se lava con HCl al 0,1% y las fracciones que contienen interferón beta son eluidas mediante un gradiente de concentración lineal de desde 30-50%, preferiblemente 45% de etanol que contiene HCl al 0,1% hasta 65-90%, preferiblemente etanol al 70% que contiene HCl al 0,1%.

30 Una columna para la RP-HPLC puede ser Protein C4 (10 µm de tamaño de esférulas, 30 Å de tamaño de poro, Vy-dac) y puede equilibrarse con aproximadamente 5 CV de solución de HCl 0,1% que contiene propileno glicol. En la RP-HPLC, la muestra obtenida mediante la diafiltración se permite que fluya a través de la columna equilibrada a una velocidad de flujo apropiada, se lava con 3 CV o más de solución tampón de HCl al 0,1%, y se eluye mediante un gradiente de concentración lineal de aproximadamente 10-20 CV de etanol que contiene HCl al 0,1%, separándose, de esta forma, las proteínas impuras y las proteínas diana.

35 Una fracción que contiene interferón beta obtenida mediante la RP-HPLC, puede someterse, además, a reemplazo con una solución tampón recién preparada. El reemplazo con una solución tampón recién preparada puede realizarse mediante filtración por gel o concentración y diafiltración.

40 Por ejemplo, en el caso de realizar la filtración por gel, las fracciones que contienen interferón beta obtenidas mediante la RP-HPLC se concentran hasta, por ejemplo, aproximadamente 200-1.000 µg/ml, se dializan con solución tampón de acetato sódico 10-50 mM (pH 3,5-5,5), y se cargan sobre una columna de cromatografía de filtración por gel (por ejemplo, Sephacryl S-200, Amersham biosciences) equilibrada con solución tampón de acetato sódico 10-50 mM, preferiblemente 20 mM (pH 3,5-5). A continuación, la solución tampón de acetato sódico 10-50 mM (pH 3,5-5,5) se deja fluir a través de la columna a una velocidad de flujo apropiada, dando como resultado, de esta forma, el reemplazo de la solución para proteínas diana y la separación y eliminación de polímeros.

45 En la FIGURA 1 se muestra un diagrama de flujo que ilustra el procedimiento de purificación de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La FIGURA 1 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento de purificación de la presente invención.

50 La FIGURA 2 es un cromatograma de análisis C4 RP-HPLC (Cromatografía líquida de alta eficacia de fase inversa) de interferón beta eluído en cromatografía de afinidad de acuerdo con un procedimiento de purificación de la presente invención.

La FIGURA 3 es un cromatograma de análisis C4 RP-HPLC de interferón beta eluído sin lavado con 50% de propileno glicol.

Las FIGURAS 4A y 4B son respectivamente un cromatograma de análisis C4 RP-HPLC de una solución tampón de filtración por gel y un cromatograma de análisis C4 RP-HPLC de una solución eluida después de filtración por gel.

Mejor modo de realizar la invención

5 A continuación, la presente invención se describirá más específicamente mediante Ejemplos. No obstante, los Ejemplos siguientes se proporcionan únicamente con fines ilustrativos, no estando por tanto limitada la presente invención a o por ellos.

Ejemplo 1: Cromatografía de afinidad

10 Se empaquetaron 300 ml de Blue-Sepharose 6 (Amersham biosciences, Suecia) en una columna XK-50 (Amersham biosciences, Suecia) para obtener una columna de cromatografía de afinidad. Se dejó que fluyera suficiente cantidad de solución tampón de fosfato sódico 20 mM conteniendo EDTA 1 mM a través de la columna como para equilibrar la columna. A continuación, se dejaron fluir 25 litros de un cultivo libre de suero de células de ovario de hámster chino (CHO) que contenía interferón beta a través de la columna a una velocidad de flujo de 5-10 ml/min y, a continuación, la columna se lavó con aproximadamente 3 volúmenes de columna (CV) de una solución tampón de equilibrado.

15 A través de la columna se dejaron fluir aproximadamente 3 CV de una solución tampón de fosfato sódico 20 mM (pH 7,2) que contenía 50% de propileno glicol a una velocidad de flujo de 5 ml/min para eliminar la impureza de proteínas, seguido de lavado con aproximadamente 3 CV de una solución tampón de equilibrado. A continuación, a través de la columna se dejaron fluir aproximadamente 3 CV de solución tampón de fosfato sódico 20 mM (pH 7,2) que contenía CINA 2 M a una velocidad de flujo de 5 ml/min para eliminar la impureza de proteínas. Finalmente, a través de la columna se dejaron fluir aproximadamente 3 CV de solución tampón de fosfato sódico 20 mM (pH 7,2) que contenía CINA 2 M y 20% de propileno glicol a una velocidad de flujo de 5 ml/min para eliminar la impureza de proteínas.

25 A través de la columna se dejaron fluir aproximadamente 3 CV de una solución tampón de elución (solución tampón de fosfato sódico 20 mM que contenía CINA 2 M y 50% de propileno glicol, pH 7,2) a una velocidad de flujo de 5 ml/min, para recuperar, de esta forma, una solución que contenía interferón beta. La pureza de la solución eluida así recuperada se midió usando cromatografía de análisis C4 HPLC y el resultado se muestra en la FIGURA 2. Con referencia a la FIGURA 2, la pureza del interferón beta fue de aproximadamente 85% o superior.

30 Como un control, se realizó una cromatografía de afinidad de acuerdo con la forma anteriormente descrita, excepto que se omitió el lavado con una solución tampón de fosfato sódico 20 mM (pH 7,2) que contenía 50% de propileno glicol. La pureza de la solución eluida resultante se midió usando cromatografía de análisis C4 HPLC y el resultado se muestra en la FIGURA 3. A partir de la FIGURA 3, puede observarse que la ausencia del lavado con solución tampón de fosfato sódico 20 mm (pH 7,2) que contenía 50% de propileno glicol disminuyó de manera importante la pureza del interferón beta.

Ejemplo 2: Cromatografía líquida de alta eficacia de fase inversa (RP-HPLC)

35 La solución que contenía interferón beta obtenida de acuerdo con la presente invención en el Ejemplo 1 se sometió a diafiltración usando un sistema de ultrafiltración (corte de peso molecular de 10.000) y, a continuación, se cargó sobre una columna RP-HPLC (Protein C4, 10 µm de tamaño de esférulas, 30 Å de tamaño de poro, Vydac) a una velocidad de flujo de 2 ml/min. A continuación, la columna se lavó con aproximadamente 3 CV de solución tampón de HCl al 0,1% (pH 2,1). La elución del interferón beta se realizó usando una solución de HCl al 0,1% (A) y una solución (B) de HCl al 0,1% en etanol al 90% mediante un gradiente de concentración lineal de desde una solución (B) al 45% hasta una solución (B) al 80% (aproximadamente 20 CV), separándose, de esta forma, impurezas de proteínas de proteínas diana.

Ejemplo 3: Cromatografía de filtración por gel

45 Una solución que contenía interferón beta obtenida en el Ejemplo 2 se concentró hasta 200 µg/ml y se reemplazó 500 veces o más por una solución tampón de acetato sódico 20 mM (pH 4,0). La solución resultante se cargó sobre una columna Sephacryl S-200 (1700 ml, XK-50/100, Amersham biosciences, Suecia) equilibrada con una solución tampón de acetato sódico 20 mM (pH 4,0) para obtener una solución que contenía interferón beta.

Ejemplo 4: Análisis por RP-HPLC

50 Cada solución obtenida en los Ejemplos 1, 2 y 3 se cargó sobre una columna C4 RP-HPLC (Vydac 214TP54, 4,6 mm de diámetro interior x 25 cm de longitud, 5 µm de tamaño de partícula, 300 Å de tamaño de poro) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. A continuación, se dejaron fluir 20 CV de un acrilonitrilo que contenía 0,1% de ácido trifluoroacético a través de la columna mediante un gradiente de concentración lineal de desde 30% de acetonitrilo que contenía 0,1% de ácido trifluoroacético hasta 80% de acetonitrilo que contenía 0,1% de ácido trifluoroacético, para analizar los patrones de los cromatogramas.

Las FIGURAS 4A y 4B muestran respectivamente un cromatograma de análisis C4 RP-HPLC de una solución tampón de cromatografía por filtración de gel y un cromatograma de análisis C4 RP-HPLC de una solución eluída después de cromatografía por filtración de gel. A partir de las FIGURAS 4A y 4B, puede observarse que la presente invención puede producir un interferón beta de alta pureza.

5 Aplicación industrial

De acuerdo con un procedimiento de purificación de la presente invención, puede purificarse interferón beta con alta pureza del 99% o más, usando propileno glicol no tóxico y cromatografía de afinidad potenciada.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la purificación de interferón beta humano a partir de un cultivo que contiene interferón beta humano recombinante, que comprende la realización de cromatografía de afinidad y cromatografía líquida de alta eficacia de fase inversa (RP-HPLC),
- 5 en el que la cromatografía de afinidad comprende:
- adsorción del cultivo que contiene interferón beta en una columna de cromatografía de afinidad equilibrada, seguido de lavado con una solución tampón de equilibrado;
- seguido de lavado de la columna con una primera solución tampón de lavado A de pH 6,5-7,5 que contiene 30-60% de propileno glicol;
- 10 seguido de lavado de la columna con una segunda solución tampón de lavado C de pH 6,5-7,5 que contiene NaCl 1-2 M;
- seguido de lavado de la columna con una tercera solución tampón de lavado B de pH 6,5-7,5 que contiene 10-30% de propileno glicol y NaCl 1-2 M y, a continuación,
- 15 elución de una fracción que contiene interferón beta humano con una solución tampón de pH 6,5-7,5 que contiene 40-60% de propileno glicol y NaCl 1-2 M.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que cada solución tampón usada en el lavado y la elución es una solución tampón de fosfato sódico o una solución tampón de fosfato potásico.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que una solución obtenida mediante la cromatografía de afinidad se somete a diafiltración con una membrana de ultrafiltración con un corte de peso molecular de 10.000 daltons antes de la RP-HPLC.
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que en la RP-HPLC, una muestra obtenida mediante la diafiltración se carga sobre una columna y, a continuación, se eluye una fracción que contiene interferón beta humano a pH 2-5 mediante un gradiente de concentración de etanol que contiene HCl.

FIG. 1

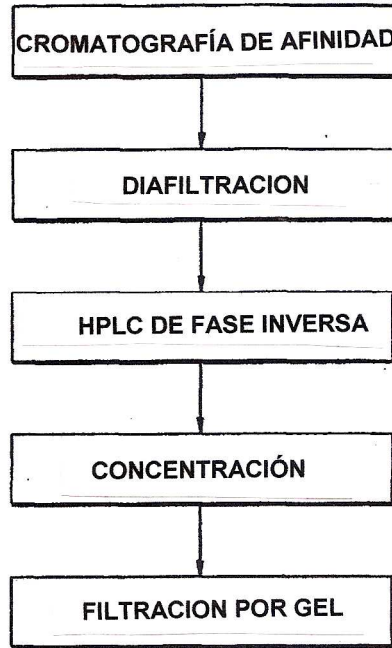


FIG. 2

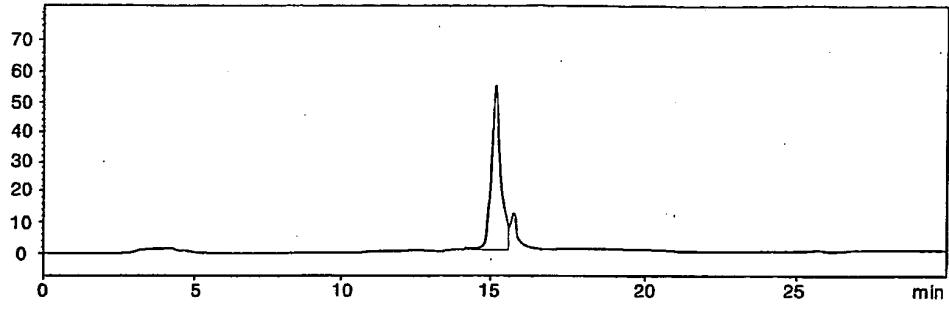


FIG. 3

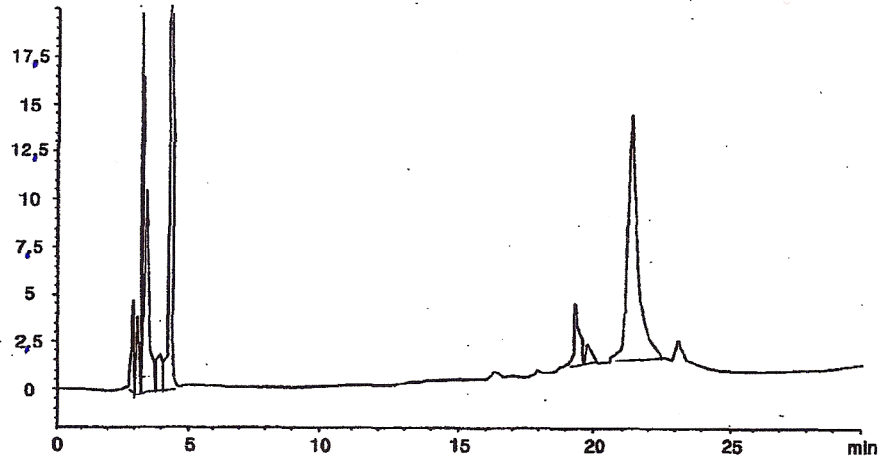


FIG. 4A

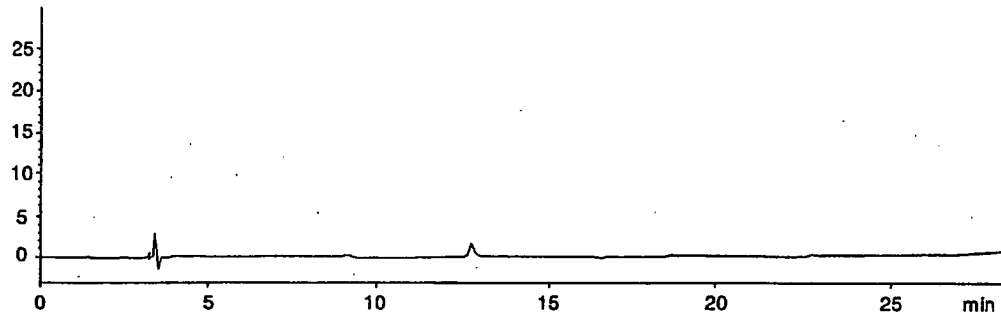


FIG. 4B

