

Brevet N° **8 19 1 8**  
du 22 novembre 1979

Titre délivré : **4 JUIN 1981**



Monsieur le Ministre  
de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes  
Service de la Propriété Industrielle  
LUXEMBOURG

## Demande de Brevet d'Invention

### I. Requête

La société dite: **F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AKTIENGESELL-SCHAFT**, à **4002 BALE**, Suisse, représentée par Monsieur Jacques de Muysen, agissant en qualité de mandataire (1)

dépose ce **vingt-deux novembre 1900 soixante-dix-neuf** (2)  
à **15** heures, au Ministère de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes, à Luxembourg: (3)

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant:  
"**Gereinigte Proteine und Verfahren zu deren Herstellung**". (4)

déclare, en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont):  
1.- **Sidney PESTKA**, **82, Brookside Terrace, à NORTH CALDWELL**, (5)  
**N.J., Etats-Unis d'Amérique**  
2.- **Menachem RUBINSTEIN**, **266 High Street, à PASSAIC, N.J.7**  
**Etats-Unis d'Amérique**

2. la délégation de pouvoir, datée de **BALE** le **25 octobre 1979**  
3. la description en langue **allemande** de l'invention en deux exemplaires;  
4. // planches de dessin, en deux exemplaires;  
5. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg,  
le **22 novembre 1979**

revendique pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de  
(6) **brevet** déposée(s)/en (7) **aux Etats-Unis d'Amérique**  
le **24 novembre 1978 (No. 963,257) et le 31 juillet 1979 (No. 62,374) et** (8)  
**le 21 septembre 1979 (No. 77,710)**

au nom de **s inventeurs** (9)  
**élit domicile** pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg  
**35, bld. Royal**

sollicite la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les annexes  
susmentionnées, — avec ajournement de cette délivrance à **18** mois.  
Le **mandataire**

### II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes, Service de la Propriété Industrielle à Luxembourg, en date du:

**22 novembre 1979**

à **15** heures

Pr. le Ministre  
de l'Économie Nationale et des Classes Moyennes,  
p. d.

BEANSPRUCHUNG DER PRIORITÄT

der Patent/~~Gbr.~~/ - Anmeldung

In: DEN VEREINIGTEN STAATEN VON AMERIKA

Vom: 24. NOVEMBER 1978

Vom: 31. JULI 1979

Vom: 21. SEPTEMBER 1979

PATENTANMELDUNG

in

Luxemburg

Anmelder: F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AKTIENGESELLSCHAFT

Betr.: "Gereinigte Proteine und Verfahren zu deren Herstellung".

Gereinigte Proteine und Verfahren zu deren Herstellung

5

Die Reinigung von Proteinen ist seit langem ein Problem in der Peptidchemie. Die zu diesem Zweck angewandten Techniken umfassen die Präzipitation, Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie, Gelelektrophorese, Affinitätschromatographie und viele andere. Verfahren zur Isolierung natürlich vorkommender, hochmolekularer Proteine, die in biologischem Material in extrem geringen Konzentrationen vorkommen, umfassen eine Vielzahl der vorstehend genannten Methoden. In vielen Fällen müssen ausserordentlich grosse Mengen des Rohmaterials eingesetzt und verarbeitet werden im Hinblick auf die grossen Verluste während des gesamten Prozederes. Daraus ergibt sich, dass die Reinigungsverfahren für derartige Proteine ausserordentlich aufwendig und teuer sind. Ein gutes Beispiel stellen diesbezüglich die verschiedenen Versuche der Isolierung und Charakterisierung des Interferons dar. Seit seiner Entdeckung durch Isaacs und Lindenmann im Jahre 1957, hat das Interferon, sowohl aus Leukozyten wie aus Fibroblasten, während zwei Jahrzehnten Versuchen von Forschern in der ganzen Welt erfolgreich widerstanden, die unternommen wurden, um es als homogenes Peptid in solchen Mengen zu isolieren, die eine Charakterisierung und Bestimmung seiner spezifischen biologischen und chemischen Eigenschaften erlauben würden.

Mez/15.10.79

35

Im U.S. Patent 3 699 222, welches die ersten Arbeiten von Isaacs und Lindenmann über das Interferon zum Gegenstand hat, besteht die Reinigung des aktiven Materials lediglich in einer Ammonsulfatfällung und anschließender Dialyse. Da ein derartiges Verfahren relativ un-  
5 spezifisch ist, ist das erhaltene Produkt noch ausserordentlich unrein.

Ein Mehrstufenverfahren zur Reinigung von Interferon  
10 wird in U.S. Patent 3 414 651 beschrieben, das die folgenden Schritte umfasst: selektive Adsorption an amorphem Alumino-silikat, Elution mit Jod- oder Thiocyanat-Lösung, weitere Fällung unerwünschter Proteine mit wässriger HCl und wässriger Natronlauge, Fällung des Interferons mittels  
15 mit Wasser mischbarer Lösungsmittel wie Methanol, Aethanol oder Aceton und schliesslich Chromatographie des wieder aufgelösten Interferons an einem Ionenaustauschharz wie 2-Diäthylaminoäthyl-cellulose. Durch dieses Reinigungsverfahren konnte die spezifische Aktivität des Interferons  
20 um den Faktor 6000 erhöht werden. Als spezifische Interferone wurden in dem U.S. Patent Kücken- und Affen-Interferon genannt.

Eine weitere Reinigungsmethode wird in U.S. Patent  
25 3 975 344 beschrieben, gemäss dem eine Lösung von unge-  
reinigtem Human-Fibroblasten-Interferon durch Dichtegradient-Ultrazentrifugation gereinigt wurde. Es wurde angegeben, dass nach dieser Methode eine höhere Ausbeute und  
Reinheit erzielt wird als nach der Methode unter Verwendung  
30 von Säulenchromatographie an Sephadex G-100.

Die im folgenden aufgeführten Publikationen beschäftigen sich ebenfalls mit der Reinigung und der versuchten  
Charakterisierung von Interferonen:

35

Knight, E., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 520-3 (1976);  
Törmä, E.T. et al., J. Biol. Chem. 251, 4810-6 (1976);

- Bridgen, P.J. et al., J. Biol. Chem. 252, 6585-7 (1977);  
DeMaeyer-Guignard, J. et al., Nature 271, 622-5 (1978);  
Kawakita, M. et al., J. Biol. Chem. 253, 598-602 (1978);  
Berthold, W. et al., J. Biol. Chem. 253, 5206-11 (1978);  
5 Jankowski, W.J. et al., J. Virology 16, 1124-30 (1975);  
Davey M.W. et al., J. Biol. Chem. 251, 7620-5 (1976);  
Chadha, K.C. et al., Biochemistry 17, 196-200 (1978).

Obwohl in zahlreichen der oben genannten Publikatio-  
10 nen behauptet wird, dass Mäuse- oder Human-Interferone  
bis zur Homogenität gereinigt werden konnten, ist weder  
einer der klassischen Nachweise der Homogenität von Pro-  
teinen angegeben noch sind die Eigenschaften der angeb-  
lich reinen Verbindungen beschrieben.

15

Die Anwendung der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromato-  
graphie (HPLC) zur Reinigung von Proteinen ist in der  
Fachwelt allgemein bekannt, wobei besonders Ionenaustausch-  
und Ausschluss-Chromatographie beschrieben werden [siehe  
20 z.B. Regnier, F.E. et al., J. Chromatog. Sci. 14, 316-20  
(1976) und Chang, S.-H. et al., Anal. Chem. 48, 1839-45  
(1976)].

In der Umkehrphasen-Chromatographie wurde z.B. Lichro-  
25 sorb RP-18 (Säulen auf der Basis von Octadecyl-modifizier-  
tem SiO<sub>2</sub>) erfolgreich zur Reinigung von Peptiden, wie  
β-Endorphin, verwendet [siehe z.B. Rubinstein, M. et al.,  
Proc. Natl. Acad. Sci., USA 74, 4969-72 (1977)].

Schliesslich wurde die teilweise Charakterisierung  
30 von drei Interferon-Spezies aus Ehrlich Ascites-Tumor-  
zellen von Mäusen (MW = 33'000, 26'000 und 20'000) durch  
Cabrer, B. et al., J. Biol. Chem. 254, 3681-4 (1979),  
beschrieben.

35

Im weitesten Sinne betrifft die vorliegende Erfin-  
dung ein verbessertes Verfahren zur Reinigung von Pro-

teinen mit einem Molgewicht über etwa 12'000 mit hoher  
Auflösung und guten Ausbeuten in präparativem Massstab.  
Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man eine  
wässrige Lösung des unreinen Proteins durch eine mit ei-  
5 nem Puffer äquilibrierte Säule auf der Basis einer durch  
Cyanopropyl-, Cyclohexyl-, Phenyl-, Octyl-, Octadecyl-  
oder Glycerylgruppen modifizierten porösen SiO<sub>2</sub>-Matrix  
unter HPLC-Bedingungen schickt, wobei das Protein zunächst  
adsorbiert und dann mit einem steigenden oder fallenden  
10 Gradienten eines mit Wasser mischbaren Lösungsmittels  
eluiert wird, so dass es schliesslich in bestimmten Frak-  
tionen des Eluats in reinerer Form erhalten wird. Diese  
Säulen, die nacheinander und unter verschiedenen Bedin-  
gungen bezüglich pH und organischen Lösungsmitteln verwen-  
15 det werden können, bieten die Möglichkeit, Proteine, die  
in natürlichem Material in extrem geringen Mengen vorkom-  
men, bis zur Homogenität zu reinigen.

In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die  
20 vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Reinigung von  
Interferon bis zur Homogenität und zwar in Mengen, die  
ausreichend sind, um erstmals eine chemische Charakteri-  
sierung dieser medizinisch wertvollen Substanz zu erlau-  
ben. Die Möglichkeit, Interferon chemisch zu charakteri-  
25 sieren, stellt einen bemerkenswerten Fortschritt in der  
Entwicklung dieser Substanz dar, da dies eine Voraussetzung  
dafür ist, die Substanz zu synthetisieren, sei es durch  
konventionelle Peptidsynthese, sei es auf dem Wege der  
Genmanipulation unter Zuhilfenahme geeigneter Organis-  
30 men, vorzugsweise von Bakterien.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Herstellung von  
Interferon als einheitliches Protein ist dadurch gekenn-  
zeichnet, dass man

35

A) eine wässrige Lösung von Interferon in unreinem Zu-  
stand unter HPLC-Bedingungen durch eine mit einem Puf-

fer äquilibrierte Säule auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten  $\text{SiO}_2$ -Matrix schickt, wobei das Interferon zunächst adsorbiert und dann mit einem steigenden Gradienten eines mit Wasser mischbaren Lösungsmittels in einem Puffer eluiert wird, so dass es in bestimmten Fraktionen des Eluats in reinerer Form erhalten wird;

B) diese in Schritt A) erhaltenen bestimmten Fraktionen durch eine mit einem Puffer äquilibrierte Säule auf der Basis einer durch Glycerylgruppen modifizierten  $\text{SiO}_2$ -Matrix schickt, wobei das Interferon zunächst adsorbiert und dann mit einem fallenden Gradienten eines mit Wasser mischbaren Lösungsmittels in einem Puffer eluiert wird, so dass es in ausgeprägten Hauptpeaks in bestimmten Fraktionen des Eluats in reinerer Form erhalten wird;

C) diese in Schritt B) erhaltenen Fraktionen, die den ausgeprägten Hauptpeaks entsprechen, unter HPLC-Bedingungen durch eine mit einem Puffer äquilibrierte Säule auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten  $\text{SiO}_2$ -Matrix schickt, wobei das Interferon zunächst adsorbiert und dann mit einem Gemisch eines mit Wasser mischbaren Lösungsmittels und eines wässrigen Puffers eluiert wird, so dass man es in einem einzigen, ausgeprägten Peak in bestimmten Fraktionen des Eluats als homogenes Protein erhält und gewünschtenfalls den Schritt C) wiederholt, um äusserste Reinheit des Produktes zu erzielen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die gemäss dem erfindungsgemässen Verfahren erhältlichen homogenen Interferon-Spezies.

HPLC-Säulen auf der Basis von durch Octyl- oder Glycerylgruppen modifizierter poröser  $\text{SiO}_2$ -Matrix (Partikelgrösse = 10  $\mu$ ; mittlere Porengrösse = 100  $\text{Å}$ ), die bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung benutzt werden,

sind Handelsartikel, erhältlich z.B. von EM Laboratories of Elmsford, N.Y., USA, unter der Markenbezeichnung Lichrosorb RP-8 und Lichrosorb-Diol. Aequivalente Octyl-modifizierte poröse  $\text{SiO}_2$ -Säulen (Chromegabond C-8 bezeichnet) sind erhältlich von E.S. Industries, Marlton, N.J., USA.

Ein geeignetes HPLC-System, in dem die vorstehend genannten Säulen verwendet werden können, sind in U.S. Patent No. 4 116 046 beschrieben.

In Ausführung des erfindungsgemässen Verfahrens wird die Lösung des unreinen hochmolekularen Peptids, vorzugsweise in Gegenwart eines wässrigen Puffers bei einem für das zur Diskussion stehende Protein geeigneten pH, durch die  $\text{SiO}_2$ -Säule geschickt. Normalerweise geschieht dies unter Druck, vorzugsweise im Bereich von etwa 50-5000 psi (3,4-340 Atm). Das auf der Säulenfüllung adsorbierte Protein wird dann schrittweise und selektiv unter Verwendung eines Gradienten eines mit Wasser mischbaren Lösungsmittels eluiert. Für diesen Zweck geeignete Lösungsmittel sind z.B. Alkanole, wie n-Propanol, 2-Propanol, Aethanol, Methanol, tert.-Butanol, oder cyclische Aether, wie Dioxan. Die Fraktionierung des Eluats erfolgt in an sich bekannter Weise, wobei der Gehalt der einzelnen Fraktionen an dem aktiven Protein durch hochempfindliche Monitoren bestimmt wird. Ein für diesen Zweck geeignetes System wird von Bohlen et al., Anal. Biochem. 67, 438 (1975), beschrieben. Es ist auch empfehlenswert, die Anwesenheit des Ziel-Proteins durch einen geeigneten Bioassay zu überwachen.

Die Entscheidung, welcher der beiden Säulentypen (Säule für normale Verteilungschromatographie oder Säule für Umkehrphasen-Chromatographie) und in welcher Reihenfolge die Säulen eingesetzt werden, hängt weitgehend von der Natur des zu reinigenden Proteins ab. Es wurde gefunden,

dass beispielsweise im speziellen Fall des Human-Leukozyten-Interferons die besten Ergebnisse erzielt werden, wenn man die unreine Interferon-Lösung zunächst durch eine Säule auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten  $\text{SiO}_2$ -Matrix (Umkehrphasen-Chromatographie) unter Verwendung eines Puffers mit einem pH von etwa 7,5 (vorzugsweise 1 M Natriumacetat/Essigsäure) schickt und mit einem steigenden n-Propanol-Gradienten eluiert, dann die gesammelten aktiven Fraktionen durch eine Säule auf der Basis einer mit Glycerylgruppen modifizierten  $\text{SiO}_2$ -Matrix in einem 0,1 M Natriumacetat-Puffer schickt und mit einem fallenden n-Propanol-Gradienten eluiert und schliesslich die getrennten Interferon-Komponenten auf eine Säule auf der Basis einer mit Octylgruppen modifizierten  $\text{SiO}_2$ -Matrix unter Verwendung eines Puffers mit einem pH von etwa 4,0, vorzugsweise 1 M Pyridin/2 M Ameisensäure, aufgibt und mit einem steigenden n-Propanol-Gradienten eluiert. Auf diese Weise kann jede der drei getrennten Human-Leukozyten-Interferone ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) weiteraufgetrennt werden, wobei im Chromatogramm scharf voneinander getrennte Peaks erhalten werden, die die homogenen Proteine darstellen. Durch das gesamte Reinigungsverfahren, beginnend mit dem Inkubationsmedium bis hin zur Chromatographie an der zweiten durch Octylgruppen modifizierten  $\text{SiO}_2$ -Matrix wurde eine Steigerung des Reinheitsgrades um den Faktor 60'000 bis 80'000 erreicht.

In einer speziellen Ausführungsform des Verfahrens zur Reinigung von Human-Leukozyten-Interferon werden die in Schritt B) erhaltenen Fraktionen, die den Hauptpeaks entsprechen, vereinigt, zur Entfernung des n-Propanols mit n-Hexan extrahiert und von Spuren n-Hexan befreit bevor Schritt C) durchgeführt wird.

Die erfindungsgemässen homogenen Human-Leukozyten-Interferon-Spezies sind gekennzeichnet durch einen scharfen Peak an den vorstehend genannten HPLC-Säulen sowie durch

eine einzige enge Bande bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese an Natriumdodecylsulfat ( $\text{NaDodSO}_4$ ) in Gegenwart von 2-Mercaptoäthanol. Die Extraktion des Gels lieferte einen einzigen scharfen Peak antiviraler Aktivität, der mit der Proteinbande übereinstimmte. Die spezifischen Aktivitäten der reinen Interferon-Spezies liegen im Bereich von etwa  $2,6 - 4,0 \times 10^8$  Einheiten/mg mit MDBK-Zellen (epitheliale Nierenzellen von Rindern) und im Bereich von  $1,5 - 4 \times 10^8$  Einheiten/mg mit der Human-Zelllinie Ag 1732. Die Molekulargewichte lagen zwischen etwa 16'000 und 21'000 (vgl. Tabelle 4, Seite 22). Die Ergebnisse der Aminosäureanalyse sind in Tabelle 5 zusammengefasst (Seite 24).

Interferone besitzen antivirale, antitumor-, wachstumshemmende- und immunsuppressive Aktivität. Diese Aktivitäten konnten sogar in klinischem Massstab festgestellt werden bei Verabreichung von  $1-10 \times 10^6$  Einheiten/Tag mit relativ unsauberem Präparaten, die weniger als 1 % Human-Interferon enthielten. Die gereinigten, homogenen Interferon-Spezies der vorliegenden Erfindung können in der gleichen Weise wie die bereits bekannten Interferon-Präparate verwendet werden unter Anpassung der Dosierung an den erreichten Reinheitsgrad. Die einzelnen Interferon-Spezies können einzeln oder in Gemischen miteinander verabreicht werden. Derartige Gemische können entweder durch Vermischen der isolierten Spezies erhalten werden oder durch Unterbrechung des Reinigungsverfahrens an einer Stelle, an der mehrere Interferon-Spezies aber keine Interferon-inaktive Proteine vorhanden sind.

Das erfindungsgemäße Reinigungsverfahren, obgleich lediglich an Human-Leukozyten-Interferon exemplifiziert, kann auch zur Reinigung anderer Interferone, z.B. von Human-Fibroblasten-Interferon und Interferonen aus tierischen Quellen sowie zur Reinigung anderer Proteine mit einem Molekulargewicht über 12'000 herangezogen werden.

So ist beispielsweise Pro-Opiocortin (MW ca. 30'000) unter Anwendung des erfindungsgemässen Verfahrens bis zur Homogenität gereinigt worden [vgl. Kimura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1756-9 (1969)]. Massnahmen, die geeignet sind, das erfindungsgemässe Verfahren optimal zur  
5 Reinigung anderer Proteine einzusetzen, liegen im Bereich des Fachwissens des Fachmannes.

Die Induktion der Interferon-Produktion, die Erst-  
10 konzentration und Fraktionierung des Interferons einschliesslich der Gelfiltration können nach an sich bekannten Methoden durchgeführt werden. Diese Verfahrensschritte, die eine wässrige Lösung von Interferonen in unreinem Zustand liefern, sind nicht Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

15

Die Verfahrens- und Produktaspekte der vorliegenden Erfindung werden durch die folgenden Beispiele illustriert.

20

25

30

35

## Beispiel 1

### Homogenes Human-Leukozyten-Interferon von normalen Spendern

5

#### A. Herstellung des Interferons

Interferon wurde hergestellt durch 16-stündige Inkubation von Human-Leukozyten aus dem Blut normaler Spender (10<sup>7</sup> Zellen/ml) mit Newcastle-Krankheit-Virus (15 Hämagglutinin-Einheiten/ml) in einem serumfreien Minimalmedium, das 10 mg/ml Casein enthielt. Es wurde ein mittlerer Interferon-Titer von 5000 Einheiten/ml erhalten. Die angewandten Methoden entsprachen den von Mogensen, K.E. et al., Pharmacology and Therapeutics A, 1977, 369-381; Wheelock, E.F., J. Bacteriol. 92, 1415-1421 (1966) und Cantell, K. et al., Appl. Microbiol. 22, 625-628 (1971) angegebenen mit einigen geringfügigen Änderungen. Die Interferon-Titer wurden mit einem Assay auf der Basis der Hemmung des cytopathischen Effekts, der innerhalb von 16 Stunden durchgeführt werden konnte, bestimmt. Alle Interferon-Titer sind in Einheiten/ml angegeben, kalibriert gegen den Referenzstandard für Human-Leukozyten-Interferon vom National Institute of Health (USA).

25

#### B. Konzentrierung und erste Fraktionierung von Interferon

Sofern nicht anders angegeben, wurde bei einer Temperatur von 0-4°C gearbeitet. Nach beendeter Inkubation wurden die Zellen und Zelltrümmer durch Zentrifugieren (15 Minuten, 500 x g) entfernt. Casein wurde durch Ansäuern mit HCl auf pH 4,0 präzipitiert. Nach 2 Stunden wurde das Gemisch zentrifugiert (10 Minuten, 12000 x g) und der Niederschlag verworfen. Der Ueberstand (10 l) wurde auf einen Gehalt von 1,5 % (w/v) Trichloressigsäure eingestellt. Nach 1 Stunde wurde das Präzipitat abzentrifugiert (10 Minuten, 12000 x g) und in 50 ml 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>

wieder aufgelöst. Nach Zusatz von 0,5 g Triton X-100 und 1,5 ml Essigsäure (tropfenweise unter Rühren) wurde das Gemisch 1 Stunde bei 0°C und anschliessend 16 Stunden bei -20°C aufbewahrt. Nach Auftauen wurde 10 Minuten mit 17000 x g zentrifugiert. Der Rückstand wurde verworfen und der Ueberstand auf 4 % Trichloressigsäure eingestellt. Nach 1 Stunde wurde das Gemisch 10 Minuten mit 12000 x g zentrifugiert und der Niederschlag in 5 ml 0,5 M NaHCO<sub>3</sub> aufgelöst.

10

#### C. Gelfiltration

Die erhaltene konzentrierte Interferon-Lösung wurde mit 1,5 g Harnstoff versetzt und auf eine Säule von Sephadex G-100 fein (2,6 x 90 cm), voräquilibriert mit 4 M Harnstoff/0,1 M Natriumacetatpuffer, aufgebracht. Die Säule wurde bei Raumtemperatur und einer Durchflussrate von 0,5 ml/Min. mit 4 M Harnstoff/0,1 M Natriumacetat, pH 7,5, eluiert. Es wurden Fraktionen von 12,5 ml gesammelt. Interferon-Aktivität wurde in den Fraktionen 19-23 eluiert.

20

#### D. HPLC

Die vereinigten Fraktionen 19-23 von der Sephadex G-100-Säule wurden direkt über die Pumpe auf eine Lichrosorb RP-8-Säule (10 µ, 4,6 x 250 mm) gegeben. Die Säule wurde voräquilibriert mit einem 1 M Natriumacetatpuffer (pH 7,5), der 0,01 % (v/v) Thiodiglycol enthielt, und mit einem linearen Gradienten von n-Propanol in dem gleichen Puffer [1 Stunde, 0-20 %; 3 Stunden, 20-40 % (v/v)] bei einer Durchflussrate von 0,25 ml/Min. eluiert. Es wurden Fraktionen von 0,75 ml gesammelt. Das Interferon wurde in den Fraktionen 23-40 [25-30 % (v/v) n-Propanol] eluiert.

35

Die Fraktionen 27-33, die den grössten Anteil der

Interferon-Aktivität enthielten, wurden kombiniert, mit n-Propanol bis zu einer Endkonzentration von 80 °/o (v/v) versetzt und direkt über die Pumpe auf eine Lichrosorb-Diol-Säule (10 µ, 4,6 x 250 mm) gegeben, die voräquiliбриert wurde mit einer Lösung von 0,1 M Natriumacetat mit einem Gehalt von 80 °/o (v/v) n-Propanol. Die Säule wurde dann während 4 Stunden mit einem linearen Gradienten von 72-50 °/o (v/v) n-Propanol in 0,1 M Natriumacetat bei einer Durchflussrate von 0,25 ml/Min. eluiert. Es wurden Fraktionen zu 0,75 ml gesammelt. Die Interferon-Aktivität wurde in Form von drei deutlichen Hauptpeaks, die quantitativ von Präparat zu Präparat variierten, eluiert. Diese Peaks wurden in der Reihenfolge ihrer Elution α, β und γ genannt. Die α-Fraktion wurde bei einer Konzentration von 68 °/o n-Propanol eluiert, die β-Fraktion bei einer Konzentration von 66,5 °/o n-Propanol und die γ-Fraktion bei einer Konzentration von 65,5 °/o n-Propanol. Die gesamte Ausbeute an Interferon-Aktivität war grösser als 80 °/o.

20

Die zu jedem Peak gehörenden Fraktionen wurden vereinigt und in Folgestufen weitergereinigt. Da der Peak γ der bei weitem grösste war und von anderen Komponenten am besten getrennt zu sein schien, wurde er für die weitere Reinigung ausgesucht. Die Fraktionen 54-56 von der Diolsäule, die den Peak γ enthielten, wurden vereinigt und das n-Propanol wurde durch zwei Extraktionen mit gleichen Mengen Hexan entfernt. Spuren von Hexan wurden unter einem Stickstoffstrom entfernt. Es wurde Pyridin und Ameisensäure zur Endkonzentration von 1 M bzw. 2 M zugesetzt und die Lösung wurde auf einer Lichrosorb RP-8-Säule (10 µ; 4,6 x 250 mm), voräquiliбриert mit 1 M Pyridin und 2 M Ameisensäure (pH 4,0), aufgegeben. Die Säule wurde während 3 Stunden mit einem linearen Gradienten von n-Propanol (20-40 °/o) in 1 M Pyridin/Formiat-Puffer bei einer Durchflussrate von 0,2 ml/Min. eluiert. Es wurden Fraktionen zu 0,6 ml gesammelt. Der Hauptpeak der Aktivität

stimmte überein mit einem Proteinpeak. Die Fraktionen  
45 und 46 (32 °/o (v/v) Propanol) die diesem Peak ent-  
sprachen, wurden vereinigt und unter gleichen Bedingungen  
rechromatographiert. Interferon wurde in Fraktion 31 elu-  
5 iert (32 °/o (v/v) Propanol). Die spezifische Aktivität  
dieser Fraktion wurde mit  $4 \times 10^8$  Einheiten/mg berechnet  
verglichen mit Rinderserumalbumin. Dieses Material wurde  
für die weitere Charakterisierung verwendet. Die  
Fluoreszenzprofile der HPLC waren so gut reproduzierbar,  
10 dass sie einen ständigen Fingerprint des gesamten Verfahrens  
lieferten.

Die Ergebnisse der Reinigung sind in Tabelle 1 zu-  
sammengefasst. Die gesamte Reinigung, ausgehend vom In-  
15 kubationsmedium bis zur zweiten RP-8-Säule war 60000-  
bis 80000-fach. Die kumulative Ausbeute von Stufe 1 bis  
zur Diolstufe lag bei 30-50 °/o. Nach dieser Stufe wur-  
de jeder der drei Interferon-Peaks separat weiter gerei-  
nigt.

20

25

30

35

Tabelle 1. Reinigung von Human-Leukozyten-Interferon

	Einheiten gefunden $\times 10^{-6}$	Protein gefunden [mg]	Relative spezifische Aktivität [Einh./mg]	Reinheits- grad	Ausbeute pro Stufe [%]
1. Inkubationsmedium	50	10,000	$5 \times 10^3$	1	-
2. pH 4 Ueberstand	50	2,000	$2,5 \times 10^4$	5	100
3. 1,5% Trichloressigsäure-Niederschlag	40	1,000	$4 \times 10^4$	8	80-100
4. Triton X-100/Essigsäure-Ueberstand	40	250	$1,6 \times 10^5$	32	70-100
5. 4% Trichloressigsäure-Niederschlag	35	175	$2 \times 10^5$	40	80-90
6. Sephadex G-100	32	57	$5,6 \times 10^5$	112	70-90
7. Lichrosorb RP-8 (pH 7,5)	28	11	$2,5 \times 10^6$	500	80-100
8. Lichrosorb-Diol					
Peak $\alpha$	11	1,1	$1 \times 10^7$	5,000	
Peak $\beta$	2,5	NB	NB	NB	70-90
Peak $\gamma$	12,5	0,21	$6 \times 10^7$	12,000	
9. Lichrosorb RP-8 (pH 4)	1,6	0,0064	$3 \times 10^8$	60,000	40-60
10. Lichrosorb RP-8 (pH 4)	8,2	0,021	$4 \times 10^8$	80,000	40-60

Zur Bestimmung des in dieser Fraktion enthaltenen Proteins wurde Rinderserumalbumin als Standard herangezogen. Die absolute spezifische Aktivität, die durch Aminosäureanalyse des homogenen Peaks von Stufe 10 bestimmt wurde, war  $2-4 \times 10^8$  Einheiten/mg (siehe Text). Stufe 9 wurde mit Peak  $\gamma$  aus Stufe 8 durchgeführt. Stufe 10 wurde mit dem vereinigten Material aus Stufe 9 von verschiedenen Präparaten durchgeführt. NB = nicht bestimmt.

E. Polyacrylamid Gel-Elektrophorese

Interferon-Proben ( $1,5 \times 10^5$  Einheiten) wurden mit NaDodSO<sub>4</sub> und 2-Mercaptoäthanol inkubiert und auf ein  
5 Plattengel aufgebracht. Nach der Elektrophorese wurde nach Färbung mit Coomassie-Blau eine einzige scharfe Bande erhalten. Das scheinbare Molekulargewicht wurde mit 17500 (im Vergleich zu Standardproteinen) bestimmt. Das Gel  
10 wurde in Streifen von 1 mm geschnitten, jeder Streifen wurde in 0,4 ml 0,5 M NaHCO<sub>3</sub>/0,1 % NaDodSO<sub>4</sub> homogenisiert und auf Interferon-Aktivität hin untersucht. Es wurde ein einziger Peak mit antiviraler Aktivität gefunden, der mit der einzigen Proteinbande übereinstimmte.

15 F. Aminosäureanalyse

Die Aminosäureanalyse des homogenen Human-Leukozyten-Interferons (Peak  $\gamma$ ) wurde mit dem Fluorescamin-Aminosäure-Analysator an 0,5 bis 1  $\mu$ g Proben von nativem und  
20 S-carboxymethyliertem Interferon durchgeführt. Zur Bestimmung des Cystein/Cystin-Verhältnisses wurde natives Interferon carboxymethyliert und dann in 6 M HCl unter reduzierenden Bedingungen (0,1 % Thioglycolsäure) hydrolysiert. Unter diesen Bedingungen wird Cystein als  
25 S-Carboxymethylcystein und Cystin als freies Cystein gemessen. Die Ergebnisse der Aminosäureanalyse sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die spezifische Aktivität, berechnet auf den Aminosäuregehalt, wurde mit  $2-4 \times 10^8$  Einheiten/mg  
bestimmt.

30

35

Tabelle 2

Aminosäurezusammensetzung von Human-Leukozyten-Interferon

5	<u>Aminosäure</u>	<u>Reste</u>
	Asx	15,2 $\pm$ 1,2
	Thr*	7,5 $\pm$ 0,5
	Ser*	8,0 $\pm$ 0,5
	Glx	24,0 $\pm$ 0,6
10	Pro	6,3 $\pm$ 0,3
	Gly	5,5 $\pm$ 0,5
	Ala	8,2 $\pm$ 0,2
	Cys (Total)	3,3 $\pm$ 0,7
	1/2 Cystin <sup>+</sup>	1,8 $\pm$ 0,2
15	Cystein <sup>+</sup>	1,5 $\pm$ 0,5
	Val	7,8 $\pm$ 0,2
	Met	3,9 $\pm$ 0,2
	Ile	8,9 $\pm$ 0,4
	Leu	21,8 $\pm$ 1,3
20	Tyr	5,1 $\pm$ 0,2
	Phe	9,1 $\pm$ 0,3
	His	3,3 $\pm$ 0,4
	Lys	11,6 $\pm$ 0,5
	Arg	7,3 $\pm$ 0,5
25	Trp <sup>++</sup>	0,7 $\pm$ 0,1

---

\* Korrigiert auf die Zeit 0.

+ Gemessen nach Carboxymethylierung von nativem Interferon.

30 ++ Gemessen nach Hydrolyse in 6 M HCl/4 <sup>o</sup>/o Thioglycolsäure.

Beispiel 2

Homogenes Human-Leukozyten-Interferon aus Leukozyten von leukämischen Patienten

5

Das Interferon wurde erhalten durch Inkubation von Human-Leukozyten, isoliert aus dem Blut von leukämischen Patienten (chronische myelogene Leukämie, CML) durch Leukophoresis mit Newcastle-Krankheit-Virus in einem serumfreien, caseinhaltigen Medium. Die Interferon-Titer lagen bei 10 5000-40000 Einheiten/ml.

Das Reinigungsverfahren war das gleiche wie das in Beispiel 1 beschriebene für Interferon aus Blut von normalen Spendern und umfasste die selektive Präzipitation 15 durch 0,5 M Essigsäure in Gegenwart von Triton X-100, Gelfiltration an Sephadex G-100 in 4 M Harnstoff, HPLC bei pH 7,5 an Lichrosorb RP-8, HPLC an Lichrosorb-Diol und HPLC an Lichrosorb RP-8 bei pH 4,0.

20

Die Fraktionen, die den  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Peaks der Lichrosorb-Diolsäule entsprachen, wurden zusammengefasst und dann getrennt voneinander in weiteren Schritten gereinigt.

25

Aus den vereinigten Fraktionen 43-46 ( $\alpha$ -Peak) wurde n-Propanol durch zwei Extraktionen mit gleichen Mengen n-Hexan entfernt. Spuren von Hexan wurden unter einem Stickstoffstrom entfernt. Es wurde Pyridin und Ameisensäure bis zur Endkonzentration von 1 M bzw. 2 M zugesetzt 30 und die Lösung auf eine Lichrosorb RP-8-Säule (10  $\mu$ , 4,6 x 250 mm), die voräquilibriert war mit 1 M Pyridin/2 M Ameisensäure (pH 4,0), aufgebracht. Die Säule wurde während 3 Stunden mit einem linearen n-Propanol-Gradienten (20- 35 40  $\circ$ /o, v/v) in 1 M Pyridinformiat-Puffer bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,2 ml/Min. eluiert. Es wurden Fraktionen zu 0,6 ml gesammelt. Die Interferon-Aktivi-

tät wurde in breiten Peaks bei Konzentrationen zwischen 31 und 35 °/o (v/v) n-Propanol eluiert. Diese Fraktionen wurden kombiniert und unter gleichen Bedingungen rechromatographiert. Die Interferon-Aktivität wurde in zwei Hauptpeaks ( $\alpha_1$  und  $\alpha_2$ ) bei 31 und 32 °/o (v/v) n-Propanol eluiert. Untergeordnete Komponenten wurden bei einer Konzentration von 34 °/o (v/v) n-Propanol eluiert.

Die vereinigten Fraktionen 47-50 (Peak  $\beta$ ) der Lichrosorb-Diolsäule wurden in der gleichen Weise aufgearbeitet und an Lichrosorb RP-8 chromatographiert wie sie für den Peak  $\alpha$  beschrieben wurde. Die Interferon-Aktivität wurde in zwei Hauptpeaks eluiert:  $\beta_2$  bei 32 °/o (v/v) n-Propanol und  $\beta_3$  bei 34 °/o (v/v) n-Propanol. Rechromatographie war in diesem Falle nicht nötig. In einigen Präparaten konnte ein Peak  $\beta_1$  bei 31 °/o (v/v) n-Propanol festgestellt werden.

Die vereinigten Fraktionen 52-54 (Peak  $\gamma$ ) der Lichrosorb-Diolsäule wurden in der gleichen Weise aufgearbeitet und an Lichrosorb RP-8 chromatographiert wie sie für den Peak  $\alpha$  beschrieben wurde. Die Interferon-Aktivität wurde in fünf Hauptpeaks eluiert:  $\gamma_1$  (bei 31 °/o n-Propanol, v/v),  $\gamma_2$  (bei 32 °/o n-Propanol, v/v),  $\gamma_3$  (bei 34 °/o n-Propanol, v/v),  $\gamma_4$  (bei 35 °/o n-Propanol, v/v) und  $\gamma_5$  (bei 35,5 °/o n-Propanol, v/v). Rechromatographie war in diesem Fall nicht notwendig.

Die Ergebnisse der Reinigung zur Herstellung der einzelnen Interferon-Spezies sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Die Spezies  $\alpha_2$  und  $\beta_2$  können ferner unterschieden werden durch ihre Elutionscharakteristiken an Lichrosorb-Diol:  $\alpha_2$  wird eluiert mit 68 °/oigem (v/v) n-Propanol und  $\beta$  mit 66,5 °/oigem (v/v) n-Propanol.

Proben der Interferon-Spezies ( $1,5 \times 10^5$  Einheiten)

wurden mit  $\text{NaDodSO}_4$  und 2-Mercaptoäthanol inkubiert und auf ein Plattengel aufgebracht. Nach Elektrophorese lieferten die Peaks  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  und  $\gamma_4$  jeweils eine einzige Bande, während die Peaks  $\beta_3$ ,  $\gamma_3$  und  $\gamma_5$  jeweils  
5 zwei Banden lieferten. Die scheinbaren Molekulargewichte lagen zwischen 16000 und 18000 mit Ausnahme von  $\beta_3$ , das eine Bande bei 16500 und eine bei 21000 aufwies und  $\gamma_4$ , das eine Bande bei 21000 lieferte (siehe Tabelle 4).

10

15

20

25

30

35

Tabelle 3. Reinigung von Leukozyten-Interferon aus CML-Zellen

Stufe	Einheiten gefunden $\times 10^{-6}$	Protein gefunden [mg]	Spezifische Aktivität**) [Einh./mg]	Reinheits- grad	Aus- beute [%]
1. Inkubationsmedium	800	$20 \times 10^3$	$4 \times 10^4$	1	100
2. pH 4 -Ueberstand	800	$4 \times 10^3$	$2 \times 10^5$	5	100
3. 1.5% Trichloressigsäure-Niederschlag	780	$2 \times 10^3$	$3.9 \times 10^5$	9.8	97
4. Triton X-100/Essigsäure-Ueberstand	760	510	$1.5 \times 10^6$	37.5	95
5. 4% Trichloressigsäure-Niederschlag	810	350	$2.3 \times 10^6$	57.5	100
6. Sephadex G-100	660	130	$5.1 \times 10^6$	128	82
7. Lichrosorb RP-8 (pH 7.5)	510	26	$2 \times 10^7$	500	64
(2 Ansätze)					
8. Lichrosorb-Diol					
Peak $\alpha$	149	5	$3 \times 10^7$	750	
Peak $\beta$	148	3	$5 \times 10^7$	1250	
Peak $\gamma$	<u>139</u>	1.7	$8 \times 10^7$	2000	
Total	436				<u>54</u>

Tabelle 3 (Forts.)

Stufe	Einheiten gefunden $\times 10^{-6}$	Protein gefunden [mg]	Spezifische Aktivität** [Einh./mg]	Reinheits- grad	Aus- beute [%]
9. Lichrosorb RP-8 (pH 4.0)					
Peak $\alpha_1^*$	9	$35 \times 10^{-3}$	$2.6 \times 10^8$	6,500	
Peak $\alpha_2^*$	26	$65 \times 10^{-3}$	$4.0 \times 10^8$	10,000	
Peak $\beta_2$	30	$75 \times 10^{-3}$	$4.0 \times 10^8$	10,000	
Peak $\beta_3$	13	$32 \times 10^{-3}$	$4.0 \times 10^8$	10,000	
Peak $\gamma_1$	15	$58 \times 10^{-3}$	$2.6 \times 10^8$	6,500	
Peak $\gamma_2$	31	$77 \times 10^{-3}$	$4 \times 10^8$	10,000	
Peak $\gamma_3$	26	$74 \times 10^{-3}$	$3.5 \times 10^8$	8,750	
Peak $\gamma_4$	3.5	$10 \times 10^{-3}$	$3.5 \times 10^8$	8,750	
Peak $\gamma_5$	4.5	$50 \times 10^{-3}$	$0.9 \times 10^8$	2,250	
Total	158				20

\* nach Rechromatographie

\*\* Aktivität bestimmt an MDBK-Zellen (Rind);  
Protein gemessen mit Serumalbumin als  
Standard

Tabelle 4

	MW <sub>r</sub> ± 1000	Spez. Akt. an MDBK (Rinderzellen, Einh./mg) ± 25%	Spez. Akt. an Ag 1732 (Human-Zellen; Einh./mg) ± 50%	Wachstumshemmende Aktivität**
α <sub>1</sub>	16,500	2.6 x 10 <sup>8</sup>	2.6 x 10 <sup>8</sup>	+
α <sub>2</sub>	16,200	4 x 10 <sup>8</sup>	3 x 10 <sup>8</sup>	+
β <sub>2</sub>	16,500	4 x 10 <sup>8</sup>	2 x 10 <sup>8</sup>	+
β <sub>3</sub> *	21,000	4 x 10 <sup>8</sup>	3 x 10 <sup>8</sup>	+
γ <sub>1</sub>	17,700	2.6 x 10 <sup>8</sup>	2 x 10 <sup>8</sup>	+
γ <sub>2</sub>	17,700	4 x 10 <sup>8</sup>	1.5 x 10 <sup>8</sup>	+
γ <sub>3</sub> *	17,200	3.5 x 10 <sup>8</sup>	1.5 x 10 <sup>7</sup>	+
γ <sub>4</sub>	21,000	3.5 x 10 <sup>8</sup>	4 x 10 <sup>8</sup>	+
γ <sub>5</sub> *	16,500	0.9 x 10 <sup>8</sup>	2 x 10 <sup>6</sup>	+

\* 2 Banden bei NaDodSO<sub>4</sub>-Polyacrylamidgelelektrophorese; MW der Hauptbande

\*\* Methode von Stewart et al., Nature 262, 300 (1976)

Die Aminosäureanalyse der gereinigten Human-Leuko-  
zyten-Interferon-Fractionen wurde mit einem Fluoresca-  
min-Aminosäure-Analysator an 0,1-1 µg Proben durchgeführt.  
Die Hydrolyse wurde in 6N HCl unter reduzierenden Bedin-  
5 gungen (0,1 % Thioglycolsäure) durchgeführt. Die Ergeb-  
nisse der Analysen sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

10

15

20

25

30

35

Tabelle 5. Aminosäureanalyse von Human-Leukozyten-Interferon

Species	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta_2$	$\beta_3^*$	$\gamma_1$	$\gamma_2$	$\gamma_3^*$	$\gamma_4$	$\gamma_5^*$
MW <sub>r</sub>	16,500	16,200	16,500	21,000	17,700	17,700	17,200	21,000	16,500
Reste	142	139	142	181	153	153	148	180	142
Asx	13.8	11.7	11.5	18.2	13.1	13.3	15.0	17.9	13.8
Thr	7.7	8.3	9.0	9.9	8.4	9.6	8.6	7.3	7.6
Ser	9.2	10.0	10.0	14.5	10.2	7.8	10.1	13.5	9.0
Glx	20.3	20.5	21.9	28.5	23.9	25.0	22.8	27.0	20.8
Pro	6.1	4.9	5.0	5.9	4.5	4.8	4.8	6.5	4.2
Gly	5.1	4.5	5.0	3.6	5.7	5.0	3.2	4.8	4.0
Ala	8.4	8.3	7.9	11.5	8.7	8.1	9.3	10.4	9.3
Val	7.4	6.2	6.7	7.5	7.3	7.0	5.5	7.9	5.1
Met	3.7	3.8	4.4	6.0	4.3	3.9	5.6	4.9	4.7
Ileu	7.4	7.0	7.4	9.5	7.9	8.0	6.8	9.7	6.6
Leu	18.0	18.0	18.9	24.4	20.3	20.1	20.5	24.1	19.6
Tyr	4.0	4.4	4.6	5.0	4.8	4.8	3.7	5.0	3.6
Phe	6.9	8.0	8.7	9.9	8.6	9.0	7.2	9.1	6.4
His	3.0	2.8	3.0	3.8	3.7	3.3	2.9	3.8	2.8
Lys	10.5	9.0	8.5	9.3	10.1	10.0	7.6	12.3	12.0
Arg	6.2	7.1	8.0	10.8	8.0	8.5	10.1	8.5	9.0
Cys	3.9	4.0	1.8	2.3	3.3	2.9	3.1	4.1	2.3

\* Gemische beider Banden

Genauigkeit  $\pm$  1,5 Reste

Trypsin-Spaltung und HPLC der Fragmente

Jeweils 300 pMol der gereinigten Human-Leukozyten-  
Interferon-Spezies wurden in wässrigem Natriumbicarbonat  
5 (50 mMol, pH 8, 50  $\mu$ l) gelöst. Nach Zusatz von jeweils  
0,1  $\mu$ g Trypsin in 2  $\mu$ l HCl (pH 3) wurde 14 Stunden bei  
37°C inkubiert, mit 5  $\mu$ l Essigsäure versetzt und das Gemisch  
auf eine Lichrosorb RP-8-Säule (Teilchengrösse 10  $\mu$ ; 4,6 x  
250 mm) aufgebracht. Die Säule wurde während einer Stunde  
10 mit einem linearen Gradienten von 0-40 °/o (v/v) n-Propanol  
in einem 0,1 M Ameisensäure/0,03 M Pyridin-Puffer (pH 3)  
bei einer Durchflussrate von 0,5 ml/min. eluiert.

Die Fragmente wurden nach der Fluorescamin-Methode  
15 nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammen-  
gefasst, wobei die Position der Peaks als °/o n-Propanol  
und die relative Grösse der Fragmente angegeben sind (S =  
klein; M = mittelgross; L = gröss):

20

25

30

35

Tabelle 6

Tryptische Peptide der Human-Leukozyten-Interferone

5	<u>Spezies</u>	<u>Elution bei °/o n-Propanol</u>
	$\alpha_1$	3L, 4L, 4,2M, 11,5M, 12,5S, 14,5M, 16S, 18M, 20S, 21S, 22,5S, 29M
10	$\alpha_2$	3L, 4L, 4,2M, 11,5M, 12,5S, 14,5M, 16S, 18M, 27S, 29M
	$\beta_2$	3L, 4L, 4,2M, 11,5M, 12,5S, 14,5M, 16S, 17,5S, 18M, 29M
	$\beta_3$	3L, 4L, 4,2M, 4,5S, 10M, 12,5S, 14S, 14,5M, 16S, 18L, 19,5M, 27M, 32M
15	$\gamma_1$	3L, 4L, 4,2M, 4,5S, 5S, 6,5S, 11,5S, 12,5S, 14,5M, 16S, 17,5M, 18M, 29M
	$\gamma_2$	3L, 4L, 4,2M, 4,5S, 5S, 11,5S, 12,5S, 14,5S, 16S, 18L, 29M
20	$\gamma_3$	3M, 4M, 4,2M, 11,5M, 12,5S, 13,5S, 14,5M, 16S, 18L, 20S, 32M
	$\gamma_5$	3L, 4L, 4,2M, 4,5M, 7S, 7,5S, 10S, 11,5L, 12,5S, 14S, 14,5M, 16S, 18L, 24,5S, 25,5S, 32S

25 Die gereinigten Human-Leukozyten-Interferon-Spezies wurden einer Aminosuckeranalyse unterworfen mit der Aminosucker im Bereich von 50-100 pMol festgestellt werden können. In allen Fällen wurde weniger als ein Rest Glucosamin, Galactosamin bzw. Mannosamin pro Molekül gefunden.

30 In den meisten Fällen interferierte eine Anzahl kleiner Peptide, die in der Nähe der Aminosucker eluiert wurden, mit der Analyse. Es ist daher möglich, dass die den Aminosuckern zugeordneten Peaks teilweise oder sogar ganz Peptiden zuzuordnen sind.

35

Schliesslich lieferte ein Versuch, 1 nMol reines  $\gamma_2$  Interferon durch einen manuellen Edman-Abbau, der Rückhy-

droyse und Aminosäureanalyse unter Verwendung von Fluorescamin beinhaltet, zu sequenzieren, keine Aminosäuren in den ersten beiden Zyklen. Die Behandlung von 100 pMol reinem  $\gamma_2$  Human-Leukozyten-Interferon mit Leucinamino-  
5 peptidase und Aminopeptidase M während 20 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  beeinflusste die biologische Aktivität nicht; im Inkubationsmedium konnten keine Aminosäuren festgestellt werden. Durch Behandlung des Ueberstandes eines Induktionsmediums (Leukozyten und Newcastle-Krankheit-Virus  
10 in Minimalmedium) mit Aminopeptidase M konnte ein Verlust an Interferon-Aktivität nicht beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass das Interferon-Molekül bereits vor dem Reinigungsverfahren eine blockierte aminoendständige Aminosäure enthält. Zur Kontrolle wurden rohes In-  
15 terferon, reines Interferon und die  $\beta$ -Kette von Insulin gemeinsam mit Aminopeptidase M inkubiert. Während Insulin teilweise abgebaut wurde (Aminosäuren nachweisbar) trat kein Verlust an Interferon-Aktivität auf.

20

### Beispiel 3

In Analogie zum in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren wurden Rinder-Leukozyten zur Interferon-Produktion angeregt und das Interferon bis zur Homogenität in Form  
25 einzelner Spezies homogener Proteine gereinigt.

### Beispiel 4

In Analogie zum in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren wurden Schweine-Leukozyten zur Interferon-Produktion  
30 angeregt und das Interferon bis zur Homogenität in Form einzelner Spezies homogener Proteine gereinigt.

### Beispiel 5

35

In Analogie zum in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren wurden Schafs-Leukozyten zur Interferon-Produktion

angeregt und das Interferon bis zur Homogenität in Form einzelner Spezies homogener Proteine gereinigt.

Beispiel 6

5

In Analogie zum in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren wurden Pferde-Leukozyten zur Interferon-Produktion angeregt und das Interferon bis zur Homogenität in Form einzelner Spezies homogener Proteine gereinigt.

10

Beispiel 7

In Analogie zum in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren wurden Hunde-Leukozyten zur Interferon-Produktion angeregt und das Interferon bis zur Homogenität in Form einzelner Spezies homogener Proteine gereinigt.

15

Beispiel 8

In Analogie zum in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren wurden Katzen-Leukozyten zur Interferon-Produktion angeregt und das Interferon bis zur Homogenität in Form einzelner Spezies homogener Proteine gereinigt.

20

Beispiel 9

In Analogie zum in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren wurden Affen-Leukozyten zur Interferon-Produktion angeregt und das Interferon bis zur Homogenität in Form einzelner Spezies homogener Proteine gereinigt.

25

Beispiel 10

(a) 3 mg homogenes Human-Leukozyten-Interferon mit einer spezifischen Aktivität von  $2 \times 10^8$  Einheiten/mg wurde in 25 ml 5 %igem normalem Human-Serumalbumin gelöst. Die Lösung wurde durch ein bakteriologisches Filter fil-

35

triert und auf 100 aseptische Ampullen verteilt. Jede Ampulle enthielt  $6 \times 10^6$  Einheiten reines Interferon, das sich für die parenterale Applikation eignet. Die Ampullen werden bis zum Gebrauch vorzugsweise in der Kälte (bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ) aufbewahrt.

5

(b) Eine wässrige Lösung, enthaltend 1,5 mg der vereinigten homogenen Human-Leukozyten-Interferon-Spezies  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma_1$  und  $\gamma_2$  (jedes etwa im Verhältnis zu seiner natürlichen Häufigkeit), mit einer spezifischen Aktivität von etwa  $2 \times 10^8$  Einheiten/mg, und 100 mg normales Human-Serumalbumin, wird durch ein bakteriologisches Filter gegeben und die Lösung aseptisch auf 100 Ampullen gleichmässig verteilt. Jede Ampulle enthält etwa  $3 \times 10^6$  Einheiten reines Human-Leukozyten-Interferon und 1 mg Serumalbumin. Die Ampullen, die für parenterale Applikation geeignetes Interferon enthalten, werden zweckmässigerweise kühl ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) gelagert.

20

25

30

35

Patentansprüche

1. Interferon als homogenes Protein.

5        2. Homogenes Interferon gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es Human-Interferon ist.

3. Homogenes Human-Interferon gemäss Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Leukozyten-Interferon handelt.  
10

4. Ein homogenes Human-Leukozyten-Interferon mit der Bezeichnung  $\alpha_1$ , welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es  
15

(a) durch Gradientenelution mit n-Propanol in einem wässrigen Puffer, enthaltend 1 Mol Pyridin und 2 Mol Ameisensäure pro Liter (Gradient 0-40 °/o (v/v), Raumtemperatur, Durchflussrate 0,2 ml/min), bei einer Konzentration von 31 °/o n-Propanol in einem einzigen Peak von einer  
20 4,6 x 250 mm HPLC-Säule auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten  $\text{SiO}_2$ -Matrix eluiert wird;

(b) durch Leucinaminopeptidase und Amino-peptidase M nicht  
25 inaktiviert wird;

(c) durch Behandlung mit Trypsin in Peptidfragmente gespalten wird, die durch Gradientenelution des Reaktionsgemisches mit n-Propanol in einem wässrigen Puffer (pH 3),  
30 enthaltend 0,03 Mol Pyridin und 0,1 Mol Ameisensäure pro Liter (Gradient 0-40 °/o (v/v), Raumtemperatur, Durchflussrate 0,5 ml/min) in Peaks bei Konzentrationen von 3, 4, 4.2, 11.5, 12.5, 14.5, 16, 18, 20, 21, 22.5 und 29 °/o n-Propanol von einer 4,6 x 250 mm HPLC-Säule (10  $\mu$   
35 Teilchengrösse) auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten  $\text{SiO}_2$ -Matrix eluiert werden; und das ferner charakterisiert ist durch

- (d) eine blockierte N-terminale Aminosäure;
- (e) eine spezifische Aktivität von etwa  $2,6 \times 10^8$  Einheiten/mg auf MDBK (Rinderzellen);
- 5 (f) eine spezifische Aktivität von etwa  $2,6 \times 10^8$  Einheiten/mg auf Ag 1732-Zellen (Human-Linie);
- (g) ein Molgewicht von etwa  $16,500 \pm 1000$  (Gelelektrophorese auf Polyacrylamid);
- 10 (h) einen Aminozuckergehalt von weniger als 1 Mol pro Mol;
- 15 (i) eine positive Wachstumshemmungsaktivität und
- (j) die folgende Aminosäurezusammensetzung ( $\pm 15$  %/o, berechnet auf ein Molgewicht von 16,500);

20

---

Asx	13,8	Ala	8,4	Phe	6,9
Thr	7,7	Val	7,4	His	3,0
Ser	9,2	Met	3,7	Lys	10,5
25 Glx	20,3	Ile	7,4	Arg	6,2
Pro	6,1	Leu	18,0	Cys	3,9
Gly	5,1	Tyr	4,0		

---

30 5. Ein homogenes Human-Leukozyten-Interferon mit der Bezeichnung  $\alpha_2$ , welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es

35 (a) durch Gradientenelution mit n-Propanol in einem wässrigen Puffer, enthaltend 1 Mol Pyridin und 2 Mol Ameisensäure pro Liter (Gradient 0-40 %/o (v/v), Raumtemperatur, Durchflussrate 0,2 ml/min), bei einer Konzentration

von 32 °/o n-Propanol in einem einzigen Peak von einer 4,6 x 250 mm HPLC-Säule auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten SiO<sub>2</sub>-Matrix eluiert wird;

5 (b) durch Leucinaminopeptidase und Aminopeptidase M nicht inaktiviert wird;

(c) durch Behandlung mit Trypsin in Peptidfragmente gespalten wird, die durch Gradientenelution des Reaktionsgemisches mit n-Propanol in einem wässrigen Puffer (pH 3),  
10 enthaltend 0,03 Mol Pyridin und 0,1 Mol Ameisensäure pro Liter (Gradient 0-40 °/o (v/v), Raumtemperatur, Durchflussrate 0,5 ml/min) in Peaks bei Konzentrationen von 3, 4, 4.2, 11.5, 12.5, 14.5, 16, 18, 27 und 29 °/o n-Propanol von einer 4,6 x 250 mm HPLC-Säule (10 µ Teilchengröße) auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten SiO<sub>2</sub>-Matrix eluiert werden;  
15

(d) durch Gradientenelution mit n-Propanol in wässrigem,  
20 1 molarem Natriumacetat-Puffer (Gradient 72,5-50 °/o (v/v), Raumtemperatur, Durchflussrate 0,25 ml/min) bei einer Konzentration von 68 °/o n-Propanol in einem einzigen Peak von einer 4,6 x 250 mm HPLC-Säule auf der Basis einer durch Glycerylgruppen modifizierten SiO<sub>2</sub>-Matrix eluiert  
25 wird; und das ferner charakterisiert ist durch

(e) eine blockierte N-terminale Aminosäure;

(f) eine spezifische Aktivität von etwa  $4,0 \times 10^8$  Einheiten/mg auf MDBK (Rinderzellen);  
30

(g) eine spezifische Aktivität von etwa  $3 \times 10^8$  Einheiten/mg auf Ag 1732-Zellen (Human-Linie);

35 (h) ein Molgewicht von etwa  $16,200 \pm 1000$  (Gelelektrophorese auf Polyacrylamid);

(i) einen Aminozuckergehalt von weniger als 1 Mol pro Mol;

(j) eine positive Wachstumshemmungsaktivität und

5

(k) die folgende Aminosäurezusammensetzung ( $\pm 15$   $\%$ , berechnet auf ein Molgewicht von 16,200):

10

---

Asx	11,7	Ala	8,3	Phe	8,0
Thr	8,3	Val	6,2	His	2,8
Ser	10,0	Met	3,8	Lys	9,0
Glx	20,5	Ile	7,0	Arg	7,1
15 Pro	4,9	Leu	18,0	Cys	4,0
Gly	4,5	Tyr	4,4		

---

6. Ein homogenes Human-Leukozyten-Interferon mit der  
20 Bezeichnung  $\beta_2$ , welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es

(a) durch Gradientenelution mit n-Propanol in einem wässrigen Puffer, enthaltend 1 Mol Pyridin und 2 Mol Ameisensäure pro Liter (Gradient 0-40  $\%$  (v/v), Raumtemperatur, Durchflussrate 0,2 ml/min), bei einer Konzentration von 32  $\%$  n-Propanol in einem einzigen Peak von einer 4,6 x 250 mm HPLC-Säule auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten  $\text{SiO}_2$ -Matrix eluiert wird;

30

(b) durch Leucinaminopeptidase und Aminopeptidase M nicht inaktiviert wird;

(c) durch Behandlung mit Trypsin in Peptidfragmente gespalten wird, die durch Gradientenelution des Reaktionsgemisches mit n-Propanol in einem wässrigen Puffer (pH 3), enthaltend 0,03 Mol Pyridin und 0,1 Mol Ameisensäure pro

35

Liter (Gradient 0-40 °/o (v/v), Raumtemperatur, Durchflussrate 0,5 ml/min) in Peaks bei Konzentrationen von 3, 4, 4.2, 11.5, 12.5, 14.5, 16, 17.5, 18 und 29 °/o n-Propanol von einer 4,6 x 250 mm HPLC-Säule (10 µ Teilchengrösse) auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten SiO<sub>2</sub>-Matrix eluiert werden;

(d) durch Gradientenelution mit n-Propanol in wässrigem, 1 molarem Natriumacetat-Puffer (Gradient 72,5-50 °/o (v/v), Raumtemperatur, Durchflussrate 0,25 ml/min) bei einer Konzentration von 66,5 °/o in einem einzigen Peak von einer 4,6 x 250 mm HPLC-Säule auf der Basis einer durch Glycerylgruppen modifizierten SiO<sub>2</sub>-Matrix eluiert wird; und das ferner charakterisiert ist durch

(e) eine blockierte N-terminale Aminosäure;

(f) eine spezifische Aktivität von etwa  $4,0 \times 10^8$  Einheiten/mg auf MDBK (Rinderzellen);

(g) eine spezifische Aktivität von etwa  $2 \times 10^8$  Einheiten/mg auf Ag 1732-Zellen (Human-Linie);

(h) ein Molgewicht von etwa  $16,500 \pm 1000$  (Gelelektrophorese auf Polyacrylamid);

(i) einen Aminozuckergehalt von weniger als 1 Mol pro Mol;

(j) eine positive Wachstumshemmungsaktivität und

(k) die folgende Aminosäurezusammensetzung ( $\pm 15$  °/o, berechnet auf ein Molgewicht von 16,500):

---

	Asx	11,5	Ala	7,9	Phe	8,7
	Thr	9,0	Val	6,7	His	3,0
5	Ser	10,0	Met	4,4	Lys	8,5
	Glx	21,9	Ile	7,4	Arg	8,0
	Pro	5,0	Leu	18,9	Cys	1,8
	Gly	5,0	Tyr	4,6		

---

10

7. Ein homogenes Human-Leukozyten-Interferon mit der Bezeichnung  $\beta_3$ , welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es

15

(a) durch Gradientenelution mit n-Propanol in einem wässrigen Puffer, enthaltend 1 Mol Pyridin und 2 Mol Ameisensäure pro Liter (Gradient 0-40 °/o (v/v), Raumtemperatur, Durchflussrate 0,2 ml/min), bei einer Konzentration von 32 °/o n-Propanol in einem einzigen Peak von einer

20

4,6 x 250 mm HPLC-Säule auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten  $\text{SiO}_2$ -Matrix eluiert wird;

(b) durch Leucinaminopeptidase und Aminopeptidase M nicht inaktiviert wird;

25

(c) durch Behandlung mit Trypsin in Peptidfragmente gespalten wird, die durch Gradientenelution des Reaktionsgemisches mit n-Propanol in einem wässrigen Puffer (pH 3), enthaltend 0,03 Mol Pyridin und 0,1 Mol Ameisensäure pro

30

Liter (Gradient 0-40 °/o (v/v), Raumtemperatur, Durchflussrate 0,5 ml/min) in Peaks bei Konzentrationen von 3, 4, 4.2, 4.5, 10, 12.5, 14, 14.5, 16, 18, 19.5, 27 und

35

32 °/o n-Propanol von einer 4,6 x 250 mm HPLC-Säule (10  $\mu$  Teilchengrösse) auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten  $\text{SiO}_2$ -Matrix eluiert werden; und das ferner charakterisiert ist durch

- (d) eine blockierte N-terminale Aminosäure;
- (e) eine spezifische Aktivität von etwa  $4,0 \times 10^8$  Einheiten/mg auf MDBK (Rinderzellen);
- 5 (f) eine spezifische Aktivität von etwa  $3 \times 10^8$  Einheiten/mg auf Ag 1732-Zellen (Human-Linie);
- (g) ein Molgewicht von etwa  $21,000 \pm 1000$  (Gelelektrophorese auf Polyacrylamid);
- 10 (h) einen Aminozuckergehalt von weniger als 1 Mol pro Mol;
- 15 (i) eine positive Wachstumshemmungsaktivität und
- (j) die folgende Aminosäurezusammensetzung:

---

20	Asx	18,2	Ala	11,5	Phe	9,9
	Thr	9,9	Val	7,5	His	3,8
	Ser	14,5	Met	6,0	Lys	9,3
	Glx	28,5	Ile	9,5	Arg	10,8
25	Pro	5,9	Leu	24,4	Cys	2,3
	Gly	3,6	Tyr	5,0		

---

8. Ein homogenes Human-Leukozyten-Interferon mit der  
30 Bezeichnung  $\gamma_1$ , welches dadurch gekennzeichnet ist, dass  
es

- (a) durch Gradientenelution mit n-Propanol in einem wässrigen Puffer, enthaltend 1 Mol Pyridin und 2 Mol Ameisensäure pro Liter (Gradient 0-40 °/o (v/v), Raumtemperatur, Durchflussrate 0,2 ml/min), bei einer Konzentration  
35 von 31 °/o n-Propanol in einem einzigen Peak von einer

4,6 x 250 mm HPLC-Säule auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten SiO<sub>2</sub>-Matrix eluiert wird;

(b) durch Leucinaminopeptidase und Amino-peptidase M nicht  
5 inaktiviert wird;

(c) durch Behandlung mit Trypsin in Peptidfragmente gespalten wird, die durch Gradientenelution des Reaktionsgemisches mit n-Propanol in einem wässrigen Puffer (pH 3),  
10 enthaltend 0,03 Mol Pyridin und 0,1 Mol Ameisensäure pro Liter (Gradient 0-40 % (v/v), Raumtemperatur, Durchflussrate 0,5 ml/min) in Peaks bei Konzentrationen von 3, 4, 4.2, 4.5, 6.5, 11.5, 12.5, 14.5, 16, 17.5, 18 und 29 % n-Propanol von einer 4,6 x 250 mm HPLC-Säule (10 µ  
15 Teilchengrösse) auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten SiO<sub>2</sub>-Matrix eluiert werden; und das ferner charakterisiert ist durch

(d) eine blockierte N-terminale Aminosäure;  
20

(e) eine spezifische Aktivität von etwa  $2,6 \times 10^8$  Einheiten/mg auf MDBK (Rinderzellen);

(f) eine spezifische Aktivität von etwa  $2 \times 10^8$  Einheiten/mg auf Ag 1732-Zellen (Human-Linie);  
25

(g) ein Molgewicht von etwa  $17,700 \pm 1000$  (Gelelektrophorese auf Polyacrylamid);

(h) einen Aminozuckergehalt von weniger als 1 Mol pro Mol;  
30

(i) eine positive Wachstumshemmungsaktivität und

(j) die folgende Aminosäurezusammensetzung ( $\pm 15$  %, berechnet auf ein Molgewicht von 17,700):  
35

---

	Asx	13,1	Ala	8,7	Phe	8,6
	Thr	8,4	Val	7,3	His	3,7
5	Ser	10,2	Met	4,3	Lys	10,1
	Glx	23,9	Ile	7,9	Arg	8,0
	Pro	4,5	Leu	20,3	Cys	3,3
	Gly	5,7	Tyr	4,8		

---

10

9. Ein homogenes Human-Leukozyten-Interferon mit der Bezeichnung  $\gamma_2$ , welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es

15

(a) durch Gradientenelution mit n-Propanol in einem wässrigen Puffer, enthaltend 1 Mol Pyridin und 2 Mol Ameisensäure pro Liter (Gradient 0-40 % (v/v), Raumtemperatur, Durchflussrate 0,2 ml/min), bei einer Konzentration von 32 % n-Propanol in einem einzigen Peak von einer

20

4,6 x 250 mm HPLC-Säule auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten  $\text{SiO}_2$ -Matrix eluiert wird;

25

(b) durch Leucinaminopeptidase und Amino-peptidase M nicht inaktiviert wird;

30

(c) durch Behandlung mit Trypsin in Peptidfragmente gespalten wird, die durch Gradientenelution des Reaktionsgemisches mit n-Propanol in einem wässrigen Puffer (pH 3), enthaltend 0,03 Mol Pyridin und 0,1 Mol Ameisensäure pro Liter (Gradient 0-40 % (v/v), Raumtemperatur, Durchflussrate 0,5 ml/min) in Peaks bei Konzentrationen von 3, 4, 4.2, 4.5, 5, 11.5, 12.5, 14.5, 16, 18 und 29 % n-Propanol von einer 4,6 x 250 mm HPLC-Säule (10  $\mu$  Teilchengrösse) auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten  $\text{SiO}_2$ -Matrix eluiert werden; und das ferner charakterisiert ist durch

35

(d) eine blockierte N-terminale Aminosäure;

(e) eine spezifische Aktivität von etwa  $4,0 \times 10^8$  Einheiten/mg auf MDBK (Rinderzellen);

5

(f) eine spezifische Aktivität von etwa  $1,5 \times 10^8$  Einheiten/mg auf Ag 1732-Zellen (Human-Linie);

10 (g) ein Molgewicht von etwa  $17,700 \pm 1000$  (Gelelektrophorese auf Polyacrylamid);

(h) einen Aminozuckergehalt von weniger als 1 Mol pro Mol;

15 (i) eine positive Wachstumshemmungsaktivität und

(j) die folgende Aminosäurezusammensetzung ( $\pm 15$  %/o, berechnet auf ein Molgewicht von 17,700):

20

---

Asx	13,3	Ala	8,1	Phe	9,0
Thr	9,6	Val	7,0	His	3,3
Ser	7,8	Met	3,9	Lys	10,0
25 Glx	25,0	Ile	8,0	Arg	8,5
Pro	4,8	Leu	20,1	Cys	2,9
Gly	5,0	Tyr	4,8		

---

30 10. Ein homogenes Human-Leukozyten-Interferon mit der Bezeichnung  $\gamma_3$ , welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es

35 (a) durch Gradientenelution mit n-Propanol in einem wässrigen Puffer, enthaltend 1 Mol Pyridin und 2 Mol Ameisensäure pro Liter (Gradient 0-40 %/o (v/v), Raumtemperatur, Durchflussrate 0,2 ml/min), bei einer Konzentration

von 34 <sup>o</sup>/o n-Propanol in einem einzigen Peak von einer 4,6 x 250 mm HPLC-Säule auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten SiO<sub>2</sub>-Matrix eluiert wird;

5 (b) durch Leucinaminopeptidase und Aminopeptidase M nicht inaktiviert wird;

(c) durch Behandlung mit Trypsin in Peptidfragmente gespalten wird, die durch Gradientenelution des Reaktionsgemisches mit n-Propanol in einem wässrigen Puffer (pH 3),  
10 enthaltend 0,03 Mol Pyridin und 0,1 Mol Ameisensäure pro Liter (Gradient 0-40 <sup>o</sup>/o (v/v), Raumtemperatur, Durchflussrate 0,5 ml/min) in Peaks bei Konzentrationen von 3, 4, 4.2, 11.5, 12.5, 13.5, 14.5, 16, 18, 20 und 32 <sup>o</sup>/o  
15 n-Propanol von einer 4,6 x 250 mm HPLC-Säule (10  $\mu$  Teilchengrösse) auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten SiO<sub>2</sub>-Matrix eluiert werden; und das ferner charakterisiert ist durch

20 (d) eine blockierte N-terminale Aminosäure;

(e) eine spezifische Aktivität von etwa  $3,5 \times 10^8$  Einheiten/mg auf MDBK (Rinderzellen);

25 (f) eine spezifische Aktivität von etwa  $1,5 \times 10^8$  Einheiten/mg auf Ag 1732-Zellen (Human-Linie);

(g) ein Molgewicht von etwa  $17,200 \pm 1000$  (Gelelektrophorese auf Polyacrylamid);

30

(h) einen Aminozuckergehalt von weniger als 1 Mol pro Mol;

(i) eine positive Wachstumshemmungsaktivität und

35

(j) die folgende Aminosäurezusammensetzung:

---

	Asx	15,0	Ala	9,3	Phe	7,2
	Thr	8,6	Val	5,5	His	2,9
5	Ser	10,1	Met	5,6	Lys	7,6
	Glx	22,8	Ile	6,8	Arg	10,1
	Pro	4,8	Leu	20,5	Cys	3,1
	Gly	3,2	Tyr	3,7		

---

10

11. Ein homogenes Human-Leukozyten-Interferon mit der Bezeichnung  $\gamma_4$ , welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es

15 (a) durch Gradientenelution mit n-Propanol in einem wässrigen Puffer, enthaltend 1 Mol Pyridin und 2 Mol Ameisensäure pro Liter (Gradient 0-40 °/o (v/v), Raumtemperatur, Durchflussrate 0,2 ml/min), bei einer Konzentration von 35 °/o n-Propanol in einem einzigen Peak von einer  
20 4,6 x 250 mm HPLC-Säule auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten SiO<sub>2</sub>-Matrix eluiert wird;

(b) durch Leucinaminopeptidase und Aminopeptidase M nicht  
25 inaktiviert wird; und das ferner charakterisiert ist durch

(c) eine blockierte N-terminale Aminosäure;

(d) eine spezifische Aktivität von etwa  $3,5 \times 10^8$  Einheiten/mg auf MDBK (Rinderzellen);  
30

(e) eine spezifische Aktivität von etwa  $4,0 \times 10^8$  Einheiten/mg auf Ag 1732-Zellen (Human-Linie);

(f) ein Molgewicht von etwa  $21,000 \pm 1000$  (Gelelektrophorese auf Polyacrylamid);  
35

(g) einen Aminozuckergehalt von weniger als 1 Mol pro Mol;

(h) eine positive Wachstumshemmungsaktivität und

5

(i) die folgende Aminosäurezusammensetzung ( $\pm 15$  0/o, berechnet auf ein Molgewicht von 21,000):

10

---

Asx	17,9	Ala	10,4	Phe	9,1
Thr	7,3	Val	7,9	His	3,8
Ser	13,5	Met	4,9	Lys	12,2
Glx	27,0	Ile	9,7	Arg	8,5
15 Pro	6,5	Leu	24,1	Cys	4,1
Gly	4,8	Tyr	5,0		

---

12. Ein homogenes Human-Leukozyten-Interferon mit  
20 der Bezeichnung  $\gamma_5$ , welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es

(a) durch Gradientenelution mit n-Propanol in einem wässrigen Puffer, enthaltend 1 Mol Pyridin und 2 Mol Ameisensäure pro Liter (Gradient 0-40 0/o (v/v), Raumtemperatur, Durchflussrate 0,2 ml/min), bei einer Konzentration  
25 von 31 0/o n-Propanol in einem einzigen Peak von einer 4,6 x 250 mm HPLC-Säule auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten SiO<sub>2</sub>-Matrix eluiert wird;

30

(b) durch Leucinaminopeptidase und Aminopeptidase M nicht inaktiviert wird;

(c) durch Behandlung mit Trypsin in Peptidfragmente gespal-  
35 ten wird, die durch Gradientenelution des Reaktionsgemisches mit n-Propanol in einem wässrigen Puffer (pH 3), enthaltend 0,03 Mol Pyridin und 0,1 Mol Ameisensäure pro

Liter (Gradient 0-40 % (v/v), Raumtemperatur, Durchflussrate 0,5 ml/min) in Peaks bei Konzentrationen von 3, 4, 4.2, 4.5, 7, 7.5, 10, 11.5, 12.5, 14, 14.5, 16, 18, 24.5, 25.5 und 32 % n-Propanol von einer 4,6 x 250 mm  
5 HPLC-Säule (10 µ Teilchengrösse) auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten SiO<sub>2</sub>-Matrix eluiert werden; und das ferner charakterisiert ist durch

10 (d) eine blockierte N-terminale Aminosäure;

(e) eine spezifische Aktivität von etwa  $0,9 \times 10^8$  Einheiten/mg auf MDBK (Rinderzellen);

15 (f) eine spezifische Aktivität von etwa  $2 \times 10^6$  Einheiten/mg auf Ag 1732-Zellen (Human-Linie);

(g) ein Molgewicht von etwa  $16,500 \pm 1000$  (Gelelektrophorese auf Polyacrylamid);

20 (h) einen Aminozucker Gehalt von weniger als 1 Mol pro Mol;

(i) eine positive Wachstumshemmungsaktivität und

25 (j) die folgende Aminosäurezusammensetzung:

---

30	Asx	13,8	Ala	9,3	Phe	6,4
	Thr	7,6	Val	5,1	His	2,8
	Ser	9,0	Met	4,7	Lys	12,0
	Glx	20,8	Ile	6,6	Arg	9,0
	Pro	4,2	Leu	19,6	Cys	2,3
35	Gly	4,0	Tyr	3,6		

---

13. Homogenes Interferon gemäss einem der Ansprüche 1-12 als pharmazeutischer Wirkstoff.

5 14. Homogenes Interferon gemäss einem der Ansprüche 1-12 als antiviraler Wirkstoff.

15 15. Homogenes Interferon gemäss einem der Ansprüche 1-12 als Antitumor-Wirkstoff.

10 16. Homogenes Interferon gemäss einem der Ansprüche 1-12 als wachstumshemmender Wirkstoff.

15 17. Homogenes Interferon gemäss einem der Ansprüche 1-12 als immunsuppressiver Wirkstoff.

18. Verfahren zur Reinigung von Proteinen mit einem Molgewicht über etwa 12,000, dadurch gekennzeichnet, dass man eine wässrige Lösung des unreinen Proteins durch eine mit einem Puffer äquilibrierte Säule auf der Basis einer durch Cyanopropyl-, Cyclohexyl-, Phenyl-, Octyl-, Octadecyl- oder Glycerylgruppen modifizierten porösen SiO<sub>2</sub>-Matrix unter HPLC-Bedingungen schickt, wobei das Protein zunächst adsorbiert und dann mit einem steigenden oder fallenden Gradienten eines mit Wasser mischbaren Lösungsmittels eluiert wird, so dass es schliesslich in bestimmten Fraktionen des Eluats in reinerer Form erhalten wird.

19. Verfahren zur Reinigung von Proteinen mit einem Molgewicht über etwa 12,000, dadurch gekennzeichnet, dass man eine wässrige Lösung des unreinen Proteins durch eine mit einem Puffer äquilibrierte Säule auf der Basis einer durch Octyl- oder Glycerylgruppen modifizierten porösen SiO<sub>2</sub>-Matrix unter HPLC-Bedingungen schickt, wobei das Protein zunächst adsorbiert und dann mit einem steigenden oder fallenden Gradienten eines mit Wasser mischbaren Lösungsmittels eluiert wird, so dass es schliesslich in bestimmten Fraktionen des Eluats in reinerer Form erhalten

wird.

20. Verfahren zur Herstellung von Interferon als homogenes Protein, dadurch gekennzeichnet, dass man

5

A) eine wässrige Lösung von Interferon in unreinem Zustand unter HPLC-Bedingungen durch eine mit einem Puffer äquilibrierte Säule auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten  $\text{SiO}_2$ -Matrix schickt, wobei das Interferon zunächst adsorbiert und dann mit einem steigenden Gradienten eines mit Wasser mischbaren Lösungsmittels in einem Puffer eluiert wird, so dass es in bestimmten Fraktionen des Eluats in reinerer Form erhalten wird;

15 B) diese in Schritt A) erhaltenen bestimmten Fraktionen durch eine mit einem Puffer äquilibrierte Säule auf der Basis einer durch Glycerylgruppen modifizierten  $\text{SiO}_2$ -Matrix schickt, wobei das Interferon zunächst adsorbiert und dann mit einem fallenden Gradienten eines mit Wasser mischbaren Lösungsmittels in einem Puffer eluiert wird, so dass es in ausgeprägten Hauptpeaks in bestimmten Fraktionen des Eluats in reinerer Form erhalten wird;

25 C) diese in Schritt B) erhaltenen Fraktionen, die den ausgeprägten Hauptpeaks entsprechen, unter HPLC-Bedingungen durch eine mit einem Puffer äquilibrierte Säule auf der Basis einer durch Octylgruppen modifizierten  $\text{SiO}_2$ -Matrix schickt, wobei das Interferon zunächst adsorbiert und dann mit einem Gemisch eines mit Wasser mischbaren Lösungsmittels und eines wässrigen Puffers eluiert wird, so dass man es in einem einzigen, ausgeprägten Peak in bestimmten Fraktionen des Eluats als homogenes Protein erhält und gewünschtenfalls den Schritt C) wiederholt, um äusserste Reinheit des Produktes zu erzielen.

35

21. Verfahren gemäss Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass man von Human-Interferon ausgeht.

22. Verfahren gemäss Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass man von Leukozyten-Interferon ausgeht.

23. Verfahren gemäss Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass man als mit Wasser mischbares Lösungsmittel  
5 ein Alkanol oder einen cyclischen Aether verwendet.

24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass man als mit Wasser mischbares Lösungsmittel n-Propanol,  
10 in Schritt A) einen Puffer mit einem pH von etwa 7,5 und in Schritt B) einen Puffer mit einem pH von etwa 4,0 verwendet.

25. Verfahren gemäss Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem in Schritt A) verwendeten Puffer  
15 um 1 M Natriumacetat/Essigsäure handelt und der n-Propanol-Gradient von 0 auf 40 °/o (v/v) ansteigt, dass es sich bei dem in Schritt B) verwendeten Puffer um 0,1 M Natriumacetat handelt und der n-Propanol-Gradient von  
20 72,5 auf 50 °/o (v/v) abnimmt und dass es sich bei dem in Schritt C) verwendeten Puffer um 1 M Pyridin/2 M Ameisensäure handelt und ein von 20 auf 40 °/o (v/v) ansteigender n-Propanol-Gradient eingestellt wird.

26. Verfahren gemäss Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die bestimmten, den ausgeprägten Hauptpeaks zuzuordnenden Fraktionen zusammengefasst werden, das n-Propanol durch Extraktion mit n-Hexan entfernt wird und vor  
25 Schritt C) Spuren von n-Hexan aus der wässrigen Phase entfernt werden.  
30

27. Arzneimittel auf der Basis eines homogenen Interferons gemäss einem der Ansprüche 1-12.

28. Antivirale Mittel auf der Basis eines homogenen Interferons gemäss einem der Ansprüche 1-12.  
35

29. Antitumor-Mittel auf der Basis eines homogenen Interferons gemäss einem der Ansprüche 1-12.

5 30. Wachstumshemmende Mittel auf der Basis eines homogenen Interferons gemäss einem der Ansprüche 1-12.

31. Immunsuppressive Mittel auf der Basis eines homogenen Interferons gemäss einem der Ansprüche 1-12.

10 32. Verwendung eines homogenen Interferons gemäss einem der Ansprüche 1-12 bei der Therapie bzw. Prophylaxe von Krankheiten.

15 33. Verwendung eines homogenen Interferons gemäss einem der Ansprüche 1-12 bei der Therapie bzw. Prophylaxe von viralen Infektionen.

20 34. Verwendung eines homogenen Interferons gemäss einem der Ansprüche 1-12 bei der Therapie bzw. Prophylaxe von Tumoren.

\*\*\*\*

25

30

35