



ESPAÑA

480535

ES	11	NUMERO	AI
	21		
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		14.5.79	

PATENTE DE INVENCION

FE 16-11-79

④⑥ PRIORIDADES:		④② FECHA	④③ PAIS
④① NUMERO			
P 28 21 466.6		17.5.78	Rep. Fed. Al.
P 29 06 160.7		17.2.79	"
④⑦ FECHA DE PUBLICIDAD	④⑤ CLASIFICACION INTERNACIONAL	④⑧ PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA	
	C12K 9-00; A61K 4/02. C07G 7-00		
④④ TITULO DE LA INVENCION			
"PROCEDIMIENTO MEJORADO PARA LA PREPARACION DE INTERFERON"			
④⑦ SOLICITANTE (S)			
DR. KARL THOMAE GESELLSCHAFT MIT BESCHRANKTER HAFTUNG			
DOMICILIO DEL SOLICITANTE			
Biberach an der Riss, República Federal Alemana			
④② INVENTOR (ES)			
Dr. Peter Swetly, Mag. Günther Rainer Adolf, Doz. Dr. Gerhard Bodo, Dr. Silvia Jutta Lindner-Frimmel, Dr. Peter Meindl y Prof. Dr. Hans Tuppy			
④③ TITULAR (ES)			
④④ REPRESENTANTE			
D. ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.- 71.701)			

1 La preparación de interferón humano a partir de
células de origen humano ha encontrado consideración univer-
sal debido a la importancia medicinal de los interferones en
el tratamiento de infecciones víricas agudas y crónicas así
5 como en la terapia anticancerosa en seres humanos y anima-
les. Las cantidades de interferones necesarias para ello no
pueden ponerse a disposición, sin embargo, por medio de los
procedimientos conocidos hasta ahora para su preparación,
dado que en éstos después de inducción de células de culti-
10 vo tisular sólo puede lograrse una pequeña concentración de
interferones humanos.

 La preparación de los interferones se efectúa en
los procedimientos conocidos hasta ahora mediante incuba-
ción de células tratadas con un inductor de interferón, por
15 ejemplo un inductor viral o un inductor de ácido nucleico
en un medio de cultivo de células. A continuación son sepa-
radas las células y eventualmente son destruidos los virus
inductores empleados mediante adición de un ácido mineral y
reposo durante varios días. La solución de interferón bruto
20 obtenida de esta manera es concentrada y purificada a con-
tinuación por medio de etapas de purificación habituales (vé-
se por ejemplo DE-OS 2.724.918).

 Como células para la inducción de interferón se
emplean en tal caso usualmente o bien una línea de células,
25 permanentemente cultivable, de origen linfoblastoide, por
ejemplo células Hamalwa (véase G.Klein y otros en Intern.
J. Cancer 10, 44-57 (1972)), o células humanas de fibroblas-
tos o con grupo diploide de cromosomas y limitada duración
en condiciones de cultivo celular o con grupo heteroploide
30 de cromosomas y divisibilidad permanente.

1 Como virus inductores se utilizan usualmente para-
mixovirus tales como virus hemaglutinante Japan (virus HWJ-
-Sendai) o virus de enfermedad de Newcastle, rhabdovirus ta-
les como virus de estomatitis vesicular, virus del saram-
5 pión o virus del grupo reovirus tales como reovirus o Blue
tongue virus, como inductores de ácido nucleico se emplea
por ejemplo un ácido ribonucleico de doble haz tal como po-
li I:C, eventualmente en combinación con inhibidores meta-
bólicos y/o policaciones.

10 Sorprendentemente se ha hallado ahora que la adi-
ción de una llamada sustancia estimuladora o de una mezcla
de tales sustancias a células adecuadas conduce a un aumen-
to de la cantidad de interferón producida a un múltiplo, por
ejemplo a 4 hasta 60 veces, del rendimiento sin tratamiento
15 previo. La adición del estimulador se efectúa en tal caso
preferentemente antes de la preparación de interferón con
inductores de interferón, pero ésta puede efectuarse también
antes y durante la adición del estimulador. En tal caso es
especialmente sorprendente que el aumento de rendimiento de
20 interferón, conforme a la invención, se basa tanto en un
incremento del porcentaje de células que producen interfe-
rón como también en un aumento del rendimiento de interfe-
rón por cada célula.

25 Como estimuladores se han acreditado en tal caso
especialmente las sustancias por medio de cuya adición al
medio de cultivo celular se aumenta el porcentaje de las
células que producen interferón. Por tales han de entender-
se las sustancias cuya adición al medio de cultivo celular
hace que células, que se encuentran en fase de crecimiento
30 logarítmico, pasen en óptimas condiciones de crecimiento

1 desde la fase de crecimiento a una fase de reposo, que está
definida por el hecho de que las células, en lo que se re-
fiere a su contenido de ácido desoxirribonucleico (DNA), co-
rresponden a células postmitóticas (fase G1) y no se desa-
5 rrolla ninguna síntesis de DNA.

Como sustancias estimuladoras se han manifestado
como idóneas especialmente ácidos carboxílicos alifáticos,
saturados, por ejemplo ácidos alcanóicos con 3-6 átomos de
10 carbono, tales como ácido propiónico, ácido n-butírico, áci-
do isobutírico, ácido n-valérico, ácido caproico y sus sales
con bases inorgánicas u orgánicas, diaminas N,N'-diacetila-
das con 4 hasta 8 átomos de carbono, pero especialmente sus
derivados α, ω tales como por ejemplo pentametilénbisaaceta-
15 mida hexametilénbisaacetamida o heptametilénbisaacetamida, con
puestos de azufre orgánicos, por ejemplo sus sulfóxidos ta-
les como dimetilsulfóxido, o glucocorticoides, que están sus-
tituidos en posición 11 β con un grupo hidrófilo tal como un
átomo de halógeno, por ejemplo un átomo de flúor, cloro o
bromo, o con un grupo hidroxilo o hidroximetilo, por ejemplo
20 hidrocortisona, dexametasona, perdnisolona, aldosterona,
triamcinolona, cortexolona. La concentración final de estos
estimuladores es convenientemente de 0,01 micromoles/litro -
300 milimoles/litro. La concentración final preferida en el
caso de un ácido alcanóico empleado como estimulador es no
25 obstante de 0,5 - 5 milimoles/litro, en el caso de una diamina
diacetilada de 1-10 milimoles/litro, en el caso de un compues-
to de azufre orgánico tal como dimetilsulfóxido de 50-300
milimoles/litro y en el caso de glucocorticoides de 0,01 mi-
cromoles a 10 micromoles.

30 Como estimuladores especialmente adecuados se han

1 manifestado en tal caso ácido propiónico, ácido n-butírico,
ácido n-valérico y sus sales de metales alcalinos tales co-
mo sales sódicas, hexametilbisacetamida, dimetilsulfóxido,
dexametasona, triancinolona, hidrocortisona y prednisona.

5 El procedimiento conforme a la invención se rea-
liza no obstante, de manera especialmente preferida, del
siguiente modo:

Células Hanalwa se reproducen en un medio de cre-
cimiento, preferentemente en el medio RPMI 1640 (Firma Gib-
co, Estados Unidos, o firma Flow, Gran Bretaña), el cual
10 contiene como aditivos 10-25% en volumen, pero preferente-
mente 20 % en volumen, de caldo de fosfato de triptosa y
1 - 10 % en volumen, pero preferentemente 2 - 6 % en volu-
men, de suero humano previamente purificado. En tal caso pue-
15 de emplearse alternativamente con respecto al suero humano
también una adición de suero o fracciones de suero de otras
especies, por ejemplo suero vacuno fetal en una concentra-
ción de 5 - 15 % en volumen.

Las células cultivadas de tal manera son mezcladas
20 en suspensión con una densidad de $0,2 - 5 \times 10^6$ células/ml,
pero preferentemente con una densidad de $0,5 - 1 \times 10^6$ cé-
lulas/ml, con un compuesto estimulador, por ejemplo una sal
de metal alcalino de ácido n-butírico, en una concentración
final de convenientemente 1 milimol/litro, y son incubadas
25 convenientemente a una temperatura de 35 - 37°C. Después de
un espacio de tiempo de 6 - 72 horas, pero preferentemente
de 24 - 48 horas, se obtienen las células mediante centri-
fugación y se suspenden convenientemente con una densidad
de 50×10^6 células/ml de medio, con o sin sustancia estimu-
30 ladora. Esta suspensión es infectada por ejemplo con virus

1 IVI como inductor de interferón, e incubada. Después de apro-
ximadamente 1-3 horas las células infectadas son recogidas
mediante centrifugación e incubadas con una densidad de
5 - 10 x 10⁶ células/ml en un medio de cultivo celular exen-
5 to de suero, por ejemplo en medio de cultivo celular "Minimum
Essential Medium-Eagle"- (Firma Gibco, Estados Unidos, o
firma Flow, Gran Bretaña), durante un espacio de tiempo de
15-24 horas, pero preferentemente de 18 - 20 horas, en pre-
sencia o ausencia de la sustancia estimuladora a 35 - 39°C
10 y con un valor de pH del medio de cultivo tisular de 6,7-8,0,
pero preferentemente de 7,3. La solución del interferón bru-
to linfoblastoide obtenida es separada mediante centrifuga-
ción de las células Namalwa y para la inactivación de los
restantes virus inductores se ajusta mediante adición de
15 ácido mineral, por ejemplo de ácido clorhídrico, a un valor
de pH de preferentemente 2,0 y es incubada durante varios
días, por ejemplo 3 - 5 días, a 0 - 4°C.

Para la purificación adicional, la solución de in-
terferón bruto linfoblastoide obtenida de esta manera puede
20 someterse por ejemplo a las siguientes etapas de purifica-
ción.

a) La solución obtenida es neutralizada por ejemplo con le-
jía de sosa y el interferón es precipitado con una sal de
zinc, por ejemplo acetato de zinc, y separada por medio de
25 centrifugación. El precipitado obtenido es llevado a diso-
lución en ácido clorhídrico diluido frío, por ejemplo ácido
clorhídrico 0,1 N.

b) Después de clarificar la solución en ácido clorhídrico
por medio de renovada centrifugación, ésta es mezclada con
30 un intercambiador de iones, preferentemente el intercambia-

- 1 dor de iones SP-Sephadex G-25 de la firma Pharmacia Fine
Chemicals (Uppsala) y es agitada durante varias horas. Des-
pués de que el interferón hubo sido recogido por el intercambiador de iones, éste es lavado varias veces para la eliminación total de iones de zinc con un tampón, por ejemplo 3 veces con 0,1 moles/litro con tampón de glicina/ácido clorhídrico de pH 2,5 y tres veces con 0,1 moles/litro de citrato de potasio de pH 4,0, al que se habían añadido 0,005 moles/litro de etilendiaminotetraacetato disódico. A continuación el intercambiador de iones con el tampón de citrato se carga en una columna de cromatografía y se eluye el interferón con un tampón débilmente básico, por ejemplo con 0,1 moles/litro de fosfato de potasio de pH 8, al que se había añadido 1 mol/litro de cloruro de potasio.
- 5
- 10
- 15 c) Los eluatos que contienen proteínas, recogidos, son ajustados con ácido clorhídrico a bajas temperaturas convenientemente a pH 3,5 y después de eliminar el enturbiamiento resultante por medio de centrifugación, se añade para la precipitación del interferón una solución de tiocianato de potasio. El precipitado formado se deja sedimentar, se recoge mediante centrifugación y se recoge en un volumen lo más pequeño posible de un tampón débilmente básico, por ejemplo 0,1 moles/litro de fosfato de potasio de pH 8, y la solución es ultracentrifugada.
- 20
- 25 d) La solución obtenida de esta manera es purificada adicionalmente sobre una columna de cromatografía. Para ello se emplea convenientemente un tamiz molecular tal como Sephadex G-100 de la firma Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala) con el tamaño de partículas de 40 - 120 μ y como agente eluyente solución fisiológica de sal común tamponada con fosfato,
- 30

P-
1 a la que se ha añadido 0,001 moles/litro de etilendiamino-tetraacetato disódico. En tal caso es conveniente, antes del uso de la columna, calibrar a ésta con proteínas de peso molecular conocido. Se recogen las fracciones del eluato, que
5 corresponden a un peso molecular de 10.000 - 35.000 daltones.

10 e) Las fracciones recogidas son ajustadas, por medio de ácido clorhídrico, preferentemente a pH 3 y conducidas sobre una pequeña columna, llena con un intercambiador de iones tal como SP-Sephadex C-25 (véase punto b), la cual se lava previamente de manera conveniente con 0,1 moles/litro citrato de potasio de pH 3,0. Con este pH se retiene el interferón de la columna y a continuación, después de un breve lavado con el tampón de citrato, se eluye con un tampón de
15 fosfato, por ejemplo 0,1 moles/litro fosfato de potasio de pH 8. Las fracciones que contienen proteínas son recogidas y dializadas frente a solución fisiológica de sal común tamponada con fosfato.

20 Los ejemplos siguientes han de explicar más detalladamente la invención, pero no limitan el alcance de la invención:

Observación previa:

25 Las "células Namalwa" son reproducidas en cultivo en suspensión en un fermentador. En tal caso se emplea como medio de crecimiento el medio RPMI 1640, al que se ha añadido 20 % en volumen de caldo de fosfato de triptosa y 2 - 4% en volumen de suero humano previamente purificado. El suero humano, previamente purificado, es preparado mediante precipitación de una parte de las seroproteínas con 6 % de polietilenglicol 6000 (véase Inglet y otros en Acta Virol 19, 250 - 254 (1975)). Las densidades celulares conseguidas se en-

1 encuentran en $2 - 7 \times 10^6$ células/ml.

El "virus de Sendai" es reproducido en huevos de gallina embrionados, la purificación se efectúa por medio de una centrifuga de alta velocidad y la suspensión en el medio de crecimiento se realiza por medio de tratamiento con ultrasonidos. El "virus de Sendai" es conservado a -70°C .

Ejemplo 1

10 Células Namalwa, en la etapa de crecimiento exponencial, fueron suspendidas en 85 litros de medio de crecimiento con una densidad de 5×10^5 células/ml. La sustancia estimuladora fue añadida durante un espacio de tiempo de t horas a 37°C en una concentración de g milimoles/litro al medio de cultivo. Durante este tiempo de tratamiento previo el grado de la síntesis de DNA, referida a la síntesis de DNA en células no tratadas, vuelve a menos de 2 % y las células están en un estado de reposo, definido en relación con la síntesis de DNA, el cual corresponde a la fase G-1 del ciclo celular. Después del tiempo de tratamiento previo, 15 las células fueron recogidas mediante centrifugación ($700 \times g$, 15 minutos) e incubadas con una densidad de 5×10^7 células/ml en 1,7 litros de medio de crecimiento a 37°C durante 2 horas en botellas de cultivo rodante con 2^{10} unidades de hemaglutinación de HVJ/ml. Las células inducidas de esta manera fueron recogidas mediante centrifugación e incubadas con una densidad de 5×10^6 células/ml en 17 litros de "Eagle's-Minimum Essential Medium" exento de suero (con solución salina Earle) a $35,5^{\circ}\text{C}$ durante 20 horas a pH 7,3. 25 Para ello se utilizaron matraces con sistemas de agitación de 20 litros. La solución bruta (=porción sobrenadante de 30

1 células), después de separar las células por centrifugación
 (2.000 x g, 30 minutos), a una temperatura de como máximo
 10°C, fue ajustada a pH2 con ácido clorhídrico 5N y fue al-
 macenada durante 3 - 5 días a 4°C para la inactivación del
 5 HIV empleado.

La siguiente tabla contiene el aumento de rendi-
 miento hallado de interferón en el caso de adición de μ mi-
 limoles/litro de ácido n-butírico como estimulador:

Concentración c milimoles/- litro	Duración del tra- tamiento previo t horas	UI/10 ⁶ C ⁺	Factor
0		280	1
1	26	7 270	26
0		1 480	1
2	40	55 550	38
0		1 100	1
1	48	36 000	33
2,5	48	65 520	60
0		1 630	1
1	68	44 000	27

+ Unidades internacionales de interferón por cada 10⁶ cé-
 lulas.

25 Ejemplo 2

Células Homalwa fueron cultivadas como cultivo en
 suspensión en 85 litros de medio de crecimiento hasta alcan-
 zar una densidad celular de 5×10^5 células/ml. En esta eta-
 pa las células se encuentran en la fase de crecimiento expo-
 nencial, la cual se distingue por un máximo de síntesis

1 de DNA por cada célula. La sustancia estimuladora fue afi-
cida entonces en forma de solución acuosa durante un espa-
cio de tiempo de t horas a $35,5 - 37^{\circ}\text{C}$ en una concentración
de c milimoles/litro al medio de cultivo celular. Después
5 de este tiempo de tratamiento previo, dentro del cual el gra-
do de síntesis de DNA había descendido a menos de 12 % de
un cultivo testigo no tratado con sustancia estimuladora, y
la mayor parte de las células estaba acumulada en una fase
de reposo correspondiente a la fase G1 del ciclo celular,
10 las células fueron sedimentadas en un procedimiento conti-
nuo de centrifugación con circulación. Las células recogidas
de tal manera fueron suspendidas con una densidad de 1×10^7
células/ml en 9 litros de medio de cultivo, el cual contenía
 c milimoles/litro de sustancia estimuladora, y fueron incu-
15 badas durante 4 horas a $35,5 - 37^{\circ}\text{C}$ en un matraz con sis-
tema de agitación con 2×10^8 unidades de hemoaglutinación
de HWJ/ml.

Las células inducidas de esta manera fueron reco-
gidas mediante centrifugación y suspendidas con una densi-
20 dad de 5×10^6 células/ml en 18 litros de "Eagle's Minimum
Essential Medium" exento de suero (con sales Earle) e incu-
badas a 36°C durante 24 horas a pH 7,1 en un matraz con sis-
tema de agitación de 20 litros. Después de separar por cen-
trifugación las células ($2.000 \times g$, 30 minutos) la porción
25 sobrenadante de células representa la solución bruta de in-
terferón. Esta fue ajustada a pH 2 con ácido clorhídrico 5 N
y almacenada durante 3 - 5 días a 4°C para la inactivación
del inductor viral.

La tabla siguiente contiene los aumentos de ren-
30 dimiento de interferón hallados en el caso de adición de c

1 milimoles/litro de hexametilenbisacetamida como estimulador:

Concentración e milimoles/- litro	Duración del trata- miento previo + horas	UI/10 ⁶ C ⁺	Factor
0	72	2 400	1
2,5		10 400	4
0	40	1 480	1
5		29 800	20

+ Unidades internacionales de interferón por cada 10⁶ cé-
lulas.

Ejemplo 3

15 Células Hamalwa fueron cultivadas como cultivo
en suspensión en 85 litros de medio de crecimiento hasta
alcanzar una densidad celular de 1×10^6 células/ml. Las
células se encuentran en la fase de crecimiento exponencial,
la cual se distingue por un óptimo grado de síntesis de DNA.
20 Sustancias estimuladoras fueron añadidas al medio de creci-
miento en forma de una solución neutra durante un espacio
de tiempo de 48 horas a 35,5 - 37°C en la siguiente mezcla:
ácido propiónico 2,5 milimoles/litro, hidrocortisona 1 mi-
cromoles/litro. El grado de síntesis descendió en el espe-
cio del tiempo de tratamiento de 48 horas a menos de 5 % de
25 un cultivo testigo no tratado con la mezcla de sustancias
estimuladoras y la mayor parte de las células se acumuló en
una fase de reposo correspondiente a la fase G1 del ciclo
celular. Después del tiempo de tratamiento previo las célu-
las se sedimentan con 700 x g en un procedimiento continuo
de centrifugación con circulación. Las células recogidas

1 de tal manera fueron suspendidas con una densidad de $4,5 \times 10^7$ células/ml en 2 litros de medio de crecimiento e incubadas durante 2 horas con 2^{10} unidades de hemaglutinación de HIV/ml en botellas de cultivo rodante a 37°C . Después de
5 este tiempo fueron recogidas las células y suspendidas con una densidad de 1×10^6 células/ml en 85 litros de medio de crecimiento exento de suero y se mantuvieron durante 36 horas a pH 7,3 en cultivo en suspensión a $35,5 - 37^\circ\text{C}$. Después de separar las células a $2.000 \times g$ en un procedimiento
10 continuo de centrifugación con circulación fue recogida la porción sobrenadante celular, ajustada a pH 2 con ácido clorhídrico 5N a como máximo 10°C y almacenada durante 3 - 5 días a 4°C . La solución de interferón bruto obtenida de esta manera se distingue por un aumento de rendimiento en un
15 factor de 22 frente a un cultivo testigo no tratado previamente (cultivo testigo: 1.050 unidades internacionales de interferón/ 10^6 células; cultivo tratado con ácido propiónico e hidrocortisona: 23.200 unidades internacionales de interferón/ 10^6 células.

20 Ejemplo 4

Análogamente a los ejemplos anteriores se consiguió con una densidad celular de 5×10^5 células Namelwa/ml y un tiempo de tratamiento previo de 48 horas con las siguientes sustancias estimuladoras un aumento de rendimiento
25 en el factor X frente a cultivos testigo:

1

Estimulador	Concentración milimoles/litro	Factor (X)
Acido propiónico	1	4
Acido n-butírico	1	29
Acido n-valérico	1	4
Acido propiónico	2,5	8
Acido propiónico	5	31
Acido n-butírico	5	29
Acido n-valérico	5	22
Acido caproico	5	8
Dimetilsulfóxido	140	4
Dimetilsulfóxido	280	16

5

10

15

Ejemplo 5

Por analogía a los ejemplos anteriores, células Namalwa fueron tratadas con una densidad de 5×10^5 células/ml con las siguientes sustancias estimuladoras, con lo que se obtuvo un aumento del rendimiento de interferón, frente a cultivos no tratados, en el factor X:

20

Estimulador	Concentración micromoles/litro	Factor X
Prednisolona	10	36
	1	40
	0,1	6
Dexametasona	10	44
	1	29
	0,1	31
	0,01	14

25

30

1

Estimulador	Concentración micromoles/litro	Factor K
Triancinolona	10	19
	1	16
	0,1	12
Hidro cortisona	10	50
	1	17
	0,1	4
Cortexolona	10	4
Prednisona	10	3,5

15

El interferón bruto preparado conforme a los ejemplos 1 - 5 puede ser separado y/o purificado por ejemplo tal como sigue:

a) Concentración con acetato de zinc

20

17,2 litros de interferón bruto son neutralizados con lejía de sosa 2N, se añade con agitación 1 mol/litro de acetato de zinc hasta una concentración de 0,02 moles/litro, y el pH se ajusta a 7,2 con lejía de sosa. El precipitado resultante contiene el interferón. Se deja sedimentar durante 2 horas y la porción sobrenadante es filtrada con succión tan ampliamente como sea posible. El precipitado se obtiene luego mediante centrifugación y se digiere con 640 ml de ácido clorhídrico 0,1 N enfriado con hielo hasta la disolución, ajustándose el pH a 2,5. La solución turbia es clarificada en la centrifuga (a 2.000 x g, 60 minutos).

25

b) 1ª cromatografía en presencia del intercambiador de iones.

30

A 653 ml de la solución ácida del interferón se

02059

1 añaden 25,8 g de intercambiador de iones SP-Sephadex C-25
(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala) y la mezcla es agitada
durante la noche en una cámara frigorífica. El interferón
es recogido en tal caso por el intercambiador de iones. Des-
5 pués éste es decantado 3 veces con en cada caso 1 litro de
tampón de 0,1 moles/litro de glicina/ácido clorhídrico de
pH 2,5 y a continuación 3 veces con en cada caso 1 litro de
tampón de 0,1 moles/litro citrato de potasio de pH 4,0 (al
que se ha añadido 0,005 moles/litro de etilendiamino tetra-
10 acetato disódico), hasta que ya no es detectable con di-
tina ningún ión zinc en el agua de lavado. El intercambiador
de iones se carga luego con el tampón de citrato en una co-
luma de cromatografía y el interferón es eluido con 0,1 mo-
les/litro de fosfato de potasio de pH 8,0, el cual contiene
15 1 mol/litro de cloruro de potasio. Las fracciones que con-
tienen proteínas son recogidas (210 ml) empleándose como in-
dicador la extinción a 280 nm ($E_{280 \text{ nm}}$).

c) Concentración con tiocianato de potasio

Las fracciones recogidas (210 ml) son ajustadas
20 a pH 3,5 con ácido clorhídrico a 4°C y el enturbiamiento re-
sultante es eliminado mediante centrifugación. A la solu-
ción se añade después de ello 1/10 del volumen de solución
de 10 moles/litro de tiocianato de potasio. El precipitado
resultante, que contiene el interferón, se deja sedimentar
25 durante 30 minutos, se reune mediante centrifugación, y se
recoge en 3 ml de solución de 0,1 moles/litro de fosfato de
potasio de pH 8. La solución es clarificada mediante ultra-
centrifugación (con 70.000 x g, 80 minutos).

d) Filtración a través de gel

Una columna de cromatografía de 5 x 50 cm es lle-

1 nada con Sephadex C-100 (tamaño de partículas 40-120 μ , fir-
ma Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala), el cual fue hinchado
con solución fisiológica de sal común tamponada con fosfato
5 (PBS) con adición de 0,001 moles/litro de etilendiamino-te-
traacetato disódico. La cromatografía se efectúa en una cá-
mara frigorífica con solución fisiológica de sal común tam-
ponada con fosfato/etilendiamino tetraacetato como agente
eluyente y con una velocidad de circulación de 40 ml/hora.
Cada una de las columnas rellenas es calibrada antes del
10 uso con proteínas de peso molecular conocido. El concentra-
do de interferón (3,5 ml) es fraccionado en las mismas con-
diciones según el tamaño molecular de los componentes y se
recogen las fracciones del eluato, que corresponden a un pe-
so molecular de 10.000 - 35.000 Daltones (30,5 ml). En este
15 margen está contenida toda la actividad de interferón (peso
molecular aproximadamente 22.000).

e) 2ª cromatografía en presencia del intercambiador de iones

Las fracciones reunidas (30,5 ml) son ajustadas
con ácido clorhídrico a pH 3 y bombeadas sobre una pequeña
20 columna (1 x 7 cm) de SP-Sephadex C-25, la cual fue lavada
previamente con 0,1 moles/litro de citrato de potasio de pH
3,0. El interferón es retenido por la columna a este pH.
Después de lavar brevemente con el tampón de citrato, el in-
terferón es diluido con 0,1 moles/litro de fosfato de pota-
sio de pH 8. Las fracciones que contienen proteínas son re-
25 cogidas después de la E_{280} del eluato, dializadas frente
a solución fisiológica de sal común tamponada con fosfato y
conservadas a -20°C . El volumen del concentrado purificado
es de 3,9 ml.

30

02059

1

REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Procedimiento mejorado para la preparación de interferón, que se caracteriza porque antes de que, o antes y mientras que células de una línea celular de origen linfoblastoide, permanentemente cultivable, o células fibroplásticas humanas con grupo diploide de cromosomas y limitada duración o con grupo heteroploide de cromosomas y limitada divisibilidad sean incubadas con inductores de interferón, estas células son tratadas con estimuladores adecuados y, si se desea, el interferón formado en la incubación es separado y/o purificado según métodos conocidos en sí.

15

20

2ª.- Procedimiento conforme a la reivindicación 1ª, que se caracteriza porque como estimuladores se emplean las sustancias cuya adición al medio de cultivo celular hace que células, que se encuentran en fase de crecimiento logarítmico, pasen en condiciones óptimas de crecimiento desde la fase de crecimiento a una pausa de reposo, la cual está definida porque las células corresponden a células post mitóticas (fase G1) en lo que se refiere al contenido de ácido desoxirribonucléico y no se desarrolla ninguna síntesis de DNA.

25

30

3ª.- Procedimiento conforme a las reivindicaciones

1 1ª y 2ª, que se caracteriza porque como estimulador se em-
pkea un ácido alifático saturado y sus sales, diaminas dia-
acetiladas, compuestos de azufre orgánicos o un glucocorti-
coida, el cual está sustituido en posición 11^β con un gru-
5 po hidrófilo, así como sus mezclas.

4ª.- Procedimiento conforme a la reivindicación
3ª, que se caracteriza porque como estimulador se emplea
un ácido alcanoico con 3 - 6 átomos de carbono o sus sales,
α,ω-diaminas N,N'-diacetiladas con 4 - 8 átomos de carbono,
10 dimetilsulfóxido o glucocorticoides, los cuales están
sustituídos en posición 11 con un átomo de halógeno, un
grupo hidroxil o hidroximetilo, así como sus mezclas.

5ª.- Procedimiento conforme a las reivindicaciones
1ª y 2ª, que se caracteriza porque como estimulador se
15 emplea ácido propiónico, ácido n-butírico, ácido isobutíri-
co, ácido n-valérico, ácido caproico y sus sales con bases
inorgánicas u orgánicas, pentametilénbisacetamida, hexame-
tilénbisacetamida, heptametilénbisacetamida, dimetilsulfó-
xido, prednisolona, dexametasona, triamcinolona, hidrocor-
20 tisona, cortexolona, aldosterona y prednisolona, así como
sus mezclas y el estimulador es añadido a las células du-
rante un espacio de tiempo de 6-72 horas, pero preferente-
mente de 24-48 horas, antes de la adición de los inductores
de interferón.

6ª.- Procedimiento conforme a las reivindicaciones
1ª-5ª, que se caracteriza porque la concentración final
del estimulador es de 0,01 micromoles - 300 milimoles/li-
tro.

7ª.- Procedimiento conforme a las reivindicaciones
1ª-6ª, que se caracteriza porque como estimulador se em-
30

1 emplea un ácido alcanoico con 3 hasta 5 átomos de carbono o
sus sales, diaminas N,N'-diacetiladas con 4 hasta 6 átomos
de carbono y/o dimetilsulfóxido en una concentración final
de 0,1 micromoles/litro - 250 milimoles/litro.

5 8ª.- Procedimiento conforme a las reivindicacio-
nes 1ª y 2ª, que se caracteriza porque como inductor de in-
terferón se emplea un inductor viral o un inductor de ácido
nucleico.

10 9ª.- Procedimiento mejorado para la preparación
de interferón.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que ante-
cede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de DIECINUEVE hojas escritas
a máquina por una sola cara.

15

Madrid, 14. MAY 1979

P.A.

Alberto de Eizaburu
Por Poder



20

25

30

02059

VAL