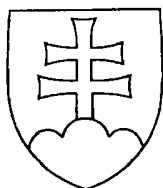


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **7. 8. 2001**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **0019728.5**
0101334.1
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **10. 8. 2000**
18. 1. 2001
(33) Krajina alebo regionálna
organizácia priority: **GB, GB**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **5. 8. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **8/2003**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **PCT/EP01/09100**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **WO02/12287**

(11), (21) Číslo dokumentu:

169-2003

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

**C07K 14/02,
A61K 39/29,
C07K 1/36**

(71) Prihlasovateľ: **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S. A., Rixensart, BE;**

(72) Pôvodca: **De Heyder Koen, Rixensart, BE;
Schu Peter, Rixensart, BE;
Serantoni Michelle, Rixensart, BE;
Van Opstal Omer, Rixensart, BE;**

(74) Zástupca: **Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob výroby hepatitídovej B vakcíny, vakcína a jej použitie**

(57) Anotácia:
Je opísaný spôsob výroby hepatitídového B antigénu vhodného na použitie vo vakcíne, ktorý sa purifikuje v prítomnosti redukčného činidla obsahujúceho voľnú –SH skupinu, a vakcína s obsahom uvedeného antigénu.

Spôsob výroby hepatitídovej B vakcíny, vakcína a jej použitie

Oblasť techniky

Tento vynález sa týka nového spôsobu výroby vakcíny proti hepatitíde B na použitie na liečenie alebo profylaxiu infekcií vírusom hepatitídy B (HBV). Ďalej sa týka HBV vakcíny, ktorú je možné získať novým spôsobom podľa vynálezu.

Doterajší stav techniky

Chronická infekcia vírusom hepatitídy B (HBV), pre ktorú je v súčasnosti dostupná obmedzená liečba, predstavuje globálny problém verejného zdravotníctva s enormným rozsahom. Počet chronických prenášačov HBV na celom svete sa odhaduje na 300 miliónov, a je u nich riziko vývoja chronickej aktívnej hepatitídy, cirhózy a primárneho hepatobunkového karcinómu.

Mnohé vakcíny, ktoré sú v súčasnosti dostupné, vyžadujú konzervačnú látku na zabránenie ich zničeniu. Často používanou konzervačnou látkou je tiomerzal, ktorý je zlúčeninou obsahujúcou ortuť. Boli vznesené určité obavy v súvislosti s používaním ortute vo vakcínach, hoci komentátori zdôraznili, že potenciálne riziká vakcín obsahujúcich tiomerzal by nemali byť zveličované (Offit; P.A. JAMA zv. 283; č. 16). Bez ohľadu na to by bolo výhodné nájsť nové a potenciálne bezpečnejšie spôsoby prípravy vakcín na nahradenie používania tiomerzalu vo výrobnom procese. Preto existuje potreba vývoja vakcín, ktoré neobsahujú tiomerzal, najmä vakcín proti hepatitíde B.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je spôsob výroby antigénu hepatitídy B, ktorý je vhodný na použitie vo vakcíne, pričom tento spôsob zahŕňa purifikáciu antigénu v prítomnosti redukčného činidla obsahujúceho voľnú -SH skupinu.

Predložený vynález výhodne poskytuje spôsob výroby stabilného antigénu hepatitídy B bez stôp tiomerzalu, pričom tento spôsob zahŕňa purifikáciu antigénu

v prítomnosti redukčného činidla majúceho voľnú -SH skupinu.

Antigénový prípravok je vo všeobecnosti bez stôp tiomerzalu, keď tiomerzal nie je detegovateľný v purifikovanom antigénovom produkte použitím absorpčnej spektrofotometrie ortute, ako je tu opísaná.

Hepatitídový antigénový prípravok výhodne obsahuje menej ako 0,025 μg ortute na 20 μg proteínu, vhodne podľa merania prostredníctvom absorpčnej spektrofotometrie.

Výhodne sa purifikácia uskutočňuje bez tiomerzalu a purifikovaný antigén je úplne bez tiomerzalu.

Výhodne je antigén stabilný, vhodne v podstate rovnako stabilný ako hepatitídový antigén purifikovaný v prítomnosti tiomerzalu, ako je napríklad uvedené nižšie, v príklade 1.

Hepatitídový antigén je výhodne imunogénny.

Redukčné činidlo sa výhodne pridáva v priebehu procesu purifikácie antigénu, výhodne po raste buniek exprimujúcich antigén.

Redukčným činidlom je výhodne cysteín, ditiotreitol, β -merkaptetoetanol alebo glutatión, pričom cysteín je najvýhodnejší.

Z toho vyplýva, že predložený vynález výhodne poskytuje spôsob produkcie stabilného imunogénneho antigénu hepatitídy B bez stopy tiomerzalu, pričom tento spôsob zahŕňa purifikáciu antigénu v prítomnosti cysteínu.

Purifikácia sa výhodne uskutočňuje v prítomnosti cysteínového roztoku.

Cysteín, v roztoku alebo práškovej forme, sa výhodne pridáva v priebehu procesu do konečnej koncentrácie 1 až 10 mM, výhodne 1 až 5 mM. Výhodnejšie sa cysteín pridáva do konečnej koncentrácie približne 2 mM.

Cysteínom je výhodne L-cysteín.

Vynález ďalej poskytuje spôsob výroby stabilného antigénu hepatitídy B bez stopy tiomerzalu, v ktorom sa surový antigén podrobuje gélovej permeačnej chromatografii, iónovo-výmennej chromatografii a zmieša sa s redukčným činidlom, ktoré má voľnú -SH skupinu.

Iónovo-výmennou chromatografiou je výhodne aniónovo-výmenná chromatografia.

Vynález ďalej poskytuje antigén hepatitídy B bez tiomerzalu, získateľný spôsobom výroby podľa predloženého vynálezu, pričom tento antigén je aspoň tak imunogénny a antigénny, ako antigén hepatitídy B vyrobený v prítomnosti tiomerzalu.

Vynález ďalej poskytuje imunogénny antigén hepatitídy B, ktorý má priemerný ELISA proteínový pomer vyšší ako 1,5 a RF1 obsah s IC50 hodnotou nižšou aspoň o 3 rády ako sú hodnoty povrchového antigénu hepatitídy B vyrobeného v prítomnosti tiomerzalu.

Ďalej sa vynález týka spôsobu výroby hepatitídového antigénu vhodného na použitie vo vakcíne, ktorý zahŕňa purifikáciu antigénu v prítomnosti tiomerzalu a následne spracovanie antigénu v prítomnosti redukčného činidla obsahujúceho voľnú -SH skupinu.

Po spracovaní vhodne nasleduje purifikačný krok, ako napríklad dialyzačný krok, na odstránenie tiomerzalu.

Redukčným činidlom je výhodne cysteín, DTT, glutatión alebo 2-merkaptometanol.

Antigén hepatitídy B podľa vynálezu sa môže používať buď na liečenie, alebo na profylaxiu infekcií hepatitídy B, najmä na liečenie alebo profylaxiu napríklad chronických infekcií vírusom hepatitídy B.

Predložený vynález ďalej poskytuje vakcínový prostriedok, ktorý obsahuje antigén hepatitídy B podľa predloženého vynálezu spolu s adjuvans. Výhodným adjuvans je hliníková soľ alebo preferenčný stimulátor TH1 bunkovej odpovede.

Antigénom je výhodne povrchový antigén hepatitídy B.

Príprava povrchového antigénu hepatitídy B je dobre dokumentovaná. Pozri napríklad Harford a ďalší v Develop. Biol. Standard 54, strana 125 (1983), Gregg a ďalší v Biotechnology, 5 strana 479 (1987), EP-A-0 226 846, EP-A-0 299 108 a tam citované publikácie.

Tak ako sa používajú tu, zahŕňajú výrazy „povrchový antigén hepatitídy B“ alebo „HBsAg“ akýkoľvek HBsAg antigén alebo jeho fragment, ktorý vykazuje antigénnosť HBV povrchového antigénu. Bude zrejmé, že okrem 226-amino-kyselinovej sekvencie HBsAg S antigénu (pozri Tiollais a ďalší, Nature, 317, 489 (1985) a tam uvedené publikácie) môže HBsAg, ako je tu opísaný, zahŕňať, ak je to

želateľné, celú alebo časť pre-S sekvencie, ako je opísaná vo vyššie uvedených citáciách a v EP-A-0 278 940. HBsAg, tak ako je tu opísaný, môže označovať aj varianty, napríklad „únikový mutant“ opísaný vo WO 91/14703.

HbsAb môže označovať aj polypeptidy opísané v EP 0 198 474 alebo EP 0 304 578.

Normálne bude HBsAg v časticovej forme. Vo výnimočne výhodnom uskutočnení bude HbsAg pozostávať v podstate z HBsAg S antigénu uvedeného vyššie.

Vakcína môže výhodne zahŕňať farmaceuticky prijateľný excipient, ako napríklad vhodný adjuvans. Vhodné adjuvans sú komerčne dostupné, ako napríklad Freundovo nekompletné adjuvans a kompletné adjuvans (Difco Laboratories, Detroit, MI); Merck adjuvans 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA); hlinité soli, ako napríklad gél z hydroxidu hlinitého (kamenec) alebo fosforečnan hlinitý; soli vápnika, železa alebo zinku; a nerozpustná suspenzia acylovaného tyrozínu; acylované sacharidy; kationovo alebo aniónovo derivatizované polysacharidy; polyfosfazény; biodegradovateľné mikrosféry; monofosforyl lipid A a quil A. Ako adjuvans môžu byť použité aj cytokíny, ako napríklad GM-CSF alebo interleukín-2, -7 alebo -12.

Vo formuláciách podľa vynálezu je výhodné, aby adjuvantný prostriedok indukoval predominantne imunitnú odpoveď typu TH1. Vysoké hladiny cytokínov Th1-typu (napr. IFN- γ , TNF α , IL-2 a IL-12) majú tendenciu zvýhodňovať bunkami sprostredkované imunitné odpovede na podaný antigén. Vo výhodnom uskutočnení, pri ktorom je odpoveď predominantne Th1-typu, sa bude hladina cytokínov Th1-typu zvyšovať vo väčšom rozsahu ako hladina cytokínov Th2-typu. Hladiny týchto cytokínov je možné jednoducho stanoviť použitím štandardných testov. Zhrnutie rodín cytokínov je uvedené v Mosmann a Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7: 145-173, 1989.

Z toho vyplýva, že vhodné adjuvans na použitie na predominantné vyvolanie odpovede Th-1-typu zahŕňajú napríklad kombináciu monofosforyl lipidu A, výhodne 3-de-O-acylovaného monofosforyl lipidu A (3D-MPL) spolu s hlinitou soľou. Iné známe adjuvans, ktoré preferenčne indukujú imunitnú odpoveď Th1-typu, zahŕňajú oligonukleotidy obsahujúce CpG. Oligonukleotidy sa vyznačujú tým, že v CpG

dinukleotide nie sú metylované. Takéto oligonukleotidy sú dobre známe a sú opísané napríklad vo WO 96/02555. Imunostimulačné DNA sekvencie sú opísané napríklad aj v Sato a ďalší, Science 273: 352, 1996. Iným výhodným adjuvans je saponín, výhodne QS21 (Aquilla Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), ktorý sa môže používať samostatne alebo v kombinácii s iným adjuvans. Posilňovací systém zahŕňa napríklad kombináciu monofosforyl lipidu A a saponínového derivátu, ako napríklad kombináciu QS21 a 3D-MPL, ako je opísaná vo WO 94/00153, alebo menej reaktívny prostriedok, kde je QS21 oslabený cholesterolom, ako je opísané vo WO 96/33739. Iné výhodné formulácie obsahujú emulziu oleja vo vode a tokoferol. Výnimočne účinná adjuvantná formulácia zahŕňa QS21, 3D-MPL a tokoferol v emulzii oleja vo vode, ako je opísaná vo WO 95/17210.

Výnimočne účinná adjuvantná formulácia, zahŕňajúca QS21, 3D-MPL a tokoferol v emulzii oleja vo vode, je opísaná vo WO 95/17210 a je výhodnou formuláciou.

V súlade s jedným uskutočnením predloženého vynálezu je poskytnutá vakcína obsahujúca povrchový antigén hepatitídy B podľa predloženého vynálezu a TH-1 indukujúci adjuvans. Výhodným uskutočnením je vakcína, v ktorej je TH-1 indukujúci adjuvans vybraný zo skupiny, ktorá obsahuje: 3D-MPL, QS21, zmes QS21 a cholesterolu, a CpG oligonukleotid. Iným výhodným uskutočnením je vakcína, ktorá obsahuje povrchový antigén hepatitídy B spolu s nasledujúcimi adjuvans: monofosforyl lipidom A alebo jeho derivátom, QS21 a tokoferolom v emulzii oleja vo vode.

Vakcína okrem toho výhodne obsahuje saponín, výhodnejšie QS21. Iná výnimočne vhodná adjuvantná formulácia zahŕňa CpG a saponín opísané vo WO 00/09159 a je výhodnou formuláciou. Najvýhodnejšie je v tejto konkrétnej formulácii saponínom QS21. Výhodne formulácia ďalej obsahuje emulziu oleja vo vode a tokoferol.

Predložený vynález ďalej poskytuje vakcínovú formuláciu obsahujúcu povrchový antigén hepatitídy B podľa predloženého vynálezu spolu s adjuvans a okrem toho obsahujúcu jeden alebo viacero antigénov vybraných zo skupiny zahŕňajúcej: diptheria toxoid (D), tetanus toxoid (T), mimobungové pertussis antigény (Pa), inaktivovaný polio vírus (IPV), haemophilus influenzae antigén (Hib),

antigén hepatitídy A, antigény vírusu herpes simplex (HSV), chlamydia antigén, GSB, HPV, streptococcus pneumoniae antigény a neisseria antigény. Vo vakcínovej formulácii podľa predloženého vynálezu môžu byť kombinované aj antigény poskytujúce ochranu voči iným ochoreniam.

V jednom konkrétnom uskutočnení vakcínová formulácia obsahuje povrchový antigén hepatitídy B, ktorý je možné získať spôsobom výroby podľa predloženého vynálezu, spolu s adjuvans a inaktivovaným polio vírusom.

Predložený vynález poskytuje aj spôsob liečenia a/alebo profylaxie infekcií vírusom hepatitídy B, ktorý zahŕňa podávanie bezpečného a účinného množstva vakcíny podľa predloženého vynálezu na profylaxiu a/alebo liečenie infekcie hepatitídou B človeku alebo zvieratú, ktorý trpí alebo je náchylný na infekciu vírusom hepatitídy B.

Vynález ďalej poskytuje použitie povrchového antigénu hepatitídy B podľa predloženého vynálezu na výrobu lieku na liečenie pacientov trpiacich infekciou vírusom hepatitídy B, ako napríklad chronickou infekciou vírusom hepatitídy B.

Vakcína podľa predloženého vynálezu bude obsahovať imunoprotektívne množstvo antigénu a môže byť pripravená bežnými technikami.

Vakcínový prostriedok je vo všeobecnosti opísaný v Pharmaceutical Biotechnology, zv. Vaccine Design – the subunit and adjuvant approach, vyd. Powell a Newman, Plenum Press, 1995; v New Trends and Developments in Vaccines, vyd. Voller a ďalší, University Park Press, Baltimore, Maryland, USA 1978. Enkapsulácia vo vnútri lipozómov je opísaná napríklad Fullertom v US patente 4235877. Konjugácia proteínov s makromolekulami je opísaná napríklad Likhitom v US patente 4372945 a Armorom a ďalšími v US patente 4474757. Použitie Quil A je opísané v Dalsgaard a ďalší, Acta Vet Scand, 18: 349 (1977). 3D-MPL je dostupný od Ribi immunochem, USA a je opísaný v britskej prihláške vynálezu č. 2220211 a v US patente 4912094. QS21 je opísaný v US patente č. 5057540.

Predložený vynález je ilustrovaný, ale nie je obmedzený nasledujúcimi príkladmi.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1 znázorňuje diagram spôsobu produkcie Engerix B™ bez tiomerzalu.

Obrázok 2 znázorňuje SDS-PAGE analýzu celkových antigénových sérií: farbenie striebrom: 1 µg proteínu na vzorku.

Obrázok 3 znázorňuje zvyškové kvasinkové proteíny v celkových antigénových sériách produkovaných spôsobom bez tiomerzalu: Western blot s králičím anti-kvasinkovým proteínovým sérom.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Spôsob výroby povrchového antigénu hepatitídy B v prítomnosti tiomerzalu

Povrchový antigén hepatitídy B (HBsAg) SB Biologicals monovalentnej vakcíny hepatitídy B (Engerix B™) sa exprimuje ako rekombinantný proteín v *Saccharomyces cerevisiae* (pozri Harford a ďalší, *loc. cit.*). 24kD proteín sa produkuje intracelulárne a akumuluje sa v rekombinantných kvasinkových bunkách. Na konci fermentácie sa kvasinkové bunky odoberú a rozrušia sa v prítomnosti mierneho povrchovo aktívneho činidla, ako napríklad Tween 20, aby sa uvoľnil požadovaný proteín. Následne sa bunkový homogenát, obsahujúci rozpustné povrchové antigénové častice, predčisťuje v sériách precipitácií a potom sa skoncentruje prostredníctvom ultrafiltrácie.

Ďalšia purifikácia rekombinantného antigénu sa uskutočňuje v následných chromatografických separáciách. V prvom kroku sa surový antigénový koncentrát podrobí gélovej permeačnej chromatografii na Sepharose 4B médiu. Tio-merzal je prítomný v elučnom tlmivom roztoku v 4B permeačnom chromatografickom kroku. Elučný tlmivý roztok má nasledujúce zloženie: 10mM Tris, 5% etylénglykol, pH 7,0, 50mg/l tiomerzal. Tio-merzal je v tomto tlmivom roztoku prítomný na kontrolu množstva biologických škodlivých látok v tele. Väčšina tiomerzalu sa odstráni v priebehu nasledujúcich purifikačných krokov zahŕňajúcich výmennú chromato-

grafiu, ultracentrifugáciu a odsol'ovanie (gélová permeácia), takže purifikované celkové antigénové prostriedky pripravené originálnym spôsobom obsahujú približne 1,2 μg a menej ako 2 μg tiomerzalu na 20 μg proteínu.

Iónovo-výmenný chromatografický krok sa uskutočňuje použitím DEAE-matrice a táto zásoba sa potom podrobí ultracentrifugácii v céznom gradiente v 4 vopred stanovených vrstvách s rozličnými koncentráciami chloridu cézneho. Antigénové častice sa v gradiente separujú z kontaminovaných bunkových zložiek podľa ich hustoty a na konci centrifugačného procesu sa eluujú. Potom sa z tejto zásoby odstráni chlorid cézny sekundárnou gélovou permeáciou na Sepharose géli.

Keď sa HBsAg antigén pripravuje spôsobom zahŕňajúcim tiomerzal v 4B gélovom permeačnom tlmivom roztoku, získajú sa proteínové koncentrácie vyššie ako 30 mg/ml v zásobnom HBsAg obsahujúcom frakcie z CsCl gradientu, čo zodpovedá ekvivalentnej koncentrácii HBsAg ako je testovaná AUSZYME kitom od Abbott Laboratories.

CsCl ultracentrifugačný krok užitočne eliminuje reziduálne lipidy, DNA a minoritné proteínové kontaminanty z HBsAg prípravku. Táto sa uskutočňuje zonálnou centrifugáciou v Ti 15 rotore od Beckman Instruments, Fullerton, Kalifornia pri rýchlosti 30000 ot./min počas približne 40 až 60 hodín. Vzorka, ktorá sa má purifikovať sa naniesie na vrstvy CsCl roztoku s konečnými koncentráciami 0,75, 1,5, 2,5 a 3,25 M CsCl. Na konci centrifugácie sa gradient eluuje do frakcií. Frakcie obsahujúce HBsAg môžu byť identifikované prostredníctvom UV absorpcie pri 280 nm alebo testovaním riedení frakcií s AUSZYME kitom. HBsAg pás je pri hustote 1,17 až 1,23 g/cm³.

Roztok obsahujúci purifikovaný HBsAg sa pred použitím na výrobu vakcínovej formulácie sterilne prefiltruje.

Purifikácia z kvasinkového bunkového lyzátu je zložitá, keďže antigén sa produkuje intracelulárne a je nevyhnutná séria separačných techník na elimináciu rôznych typov (kvasinkových) kontaminantnov, aby sa získal čistý celkový antigén. Purifikačné kroky sú dôležité, keďže produktom, ktorý sa má purifikovať, je lipoproteínová častica obsahujúca viacero kópií povrchového antigénového polypeptidu a táto štruktúra musí ostať zachovaná v priebehu purifikačného procesu. Výhodnou tohto spôsobu je, že jeho výsledkom sú povrchové antigénové

častice, ktoré sú úplne imunogénne bez toho, aby bolo potrebné ďalšie chemické spracovanie na posilnenie imunogénnosti (porovnaj EPO135435).

Detaily tohto produkčného procesu sú podrobnejšie opísané v európskom patente 0199698.

Príklad 2

Produkcia a charakterizácia od kvasiniek odvodeného HBsAg spôsobom bez tiomerzalu

1. Produkcia a purifikácia od kvasiniek odvodeného HBsAg

1.1 Prehľad produkčného spôsobu

Povrchový antigén hepatitídy B sa môže produkovať fermentáciou príslušného kmeňa *Saccharomyces cerevisiae*, napríklad kmeňa opísaného v Harford a ďalší (*loc. cit.*).

Na konci fermentácia rekombinantného kvasinkového kmeňa vo veľkom meradle sa bunky zozbierajú a rozrušia sa v prítomnosti mierneho povrchovo aktívneho činidla, ako napríklad Tween 20. Povrchový antigén sa potom izoluje multikrokovým extrakčným a purifikačným postupom, presne ako je opísané v príklade 1, až do kroku prvej gélovej permeácie na Sepharose 4B.

1.2 Purifikačný spôsob bez tiomerzalu

V spôsobe bez tiomerzalu boli zahrnuté nasledujúce dve zmeny v porovnaní so spôsobom opísaným v príklade 1.

1. Elučný tlmivý roztok pri 4B gélovom permeačnom chromatografickom kroku už neobsahuje tiomerzal.
2. Do eluátovej zásoby z aniónovo-výmenného chromatografického kroku sa pridáva cysteín (2mM konečná koncentrácia).

Zistilo sa, že vynechanie tiomerzalu zo 4B gélového permeačného tlmivého roztoku môže viesť k precipitácii HBsAg častíc v priebehu CsCl hustotného gradientového centrifugačného kroku, pričom dochádza k strate produktu a agregovaniu alebo zhlukovaniu izolovaného antigénu

Pridávanie cysteínu v 2mM konečnej koncentrácii do eluátovej zásoby z predchádzajúceho aniónovo-výmenného chromatografického kroku zabraňuje precipitácii a strate antigénu v priebehu CsCl hustotnej centrifugácie.

Cysteín je výhodnou látkou na toto spracovanie, pretože je prirodzene sa vyskytujúcou aminokyselinou a je možné ho odstrániť v následnom odsoľovacom kroku na gélovej permeačnej kolóne použitím Sepharose 4B CLFF ako kolónovej matrice.

V porovnaní so spôsobom opísaným v príklade 1 tento spôsob výroby nezahŕňa žiadne iné zmeny.

1.2a

Predpokladá sa, že tiomerzal, pridávaný do 4B tlmivého roztoku v koncentrácii 50 µg/ml, sa rozkladá a výsledný etyl ortute sa môže kovalentne viazať na voľné sulfhydrylové skupiny cysteínových zvyškov proteínu. Proteín obsahuje 14 cysteínových zvyškov, z ktorých 7 je umiestnených medzi polohami 101 a 150.

Verí sa, že táto oblasť proteínu je lokalizovaná na povrchu častice a obsahuje hlavný antigénny región HBsAg vrátane imunodominantného a regiónu a miesta rozoznávaneého RF1 monoklonálnou protilátkou (Waters J a ďalší, Postgrad. Med. J., 1987:63 (dod. 2): 51-56; a Ashton-Rickardt a Murray, J. med. Virology, 1989:29: 196). Antigén purifikovaný s tiomerzalom nachádzajúcim sa v 4B gélovom permeačnom tlmivom roztoku obsahuje približne 0,5 až 0,6 µg ortute na konci purifikačného procesu. Táto ortuť sa úplne neodstráni jednoduchou dialýzou.

V jednom experimente sa v celkovom antigénovom prípravku nameralo 0,56 µg ortute na 20 µg proteínu. Tento prípravok sa dialyzoval 16 hodín pri laboratórnej teplote oproti 150mM NaCl, 10mM NaPO₄ tlmivému roztoku, pH 6,9. Na konci dialýzy sa namerala koncentrácia 0,33 µg ortute na 20 µg proteínu.

Na rozdiel od toho, dialýza v prítomnosti redukčného činidla, ako napríklad L-cysteínu, v koncentrácii 0,1 až 5,0 mg/ml, DTT v koncentrácii 50 mM alebo 2-merkaptóetanolu v koncentrácii 0,5 M, nasledovaná sekundárnou dialýzou na odstránenie redukčného činidla, viedla k redukcii obsahu ortute v antigénovom prípravku na menej ako 0,025 µg ortute na 20 µg proteínu. To je najnižší limit pre detekciu týmto spôsobom.

Obsah ortute sa stanovoval absorpčnou spektrofotometriou. Antigén sa nariesdil v roztoku obsahujúcom 0,01 % hmotnosť/objem chrómanu draselného ($K_2Cr_2O_7$) a 5 % obj. kyseliny dusitej. Pripravili sa štandardné roztoky s tiomerzalom ako zdrojom ortute. Atómová absorpcia vzorky a štandardných roztokov sa merala po vaporizácii v generátore pary s katódou špecifickou pre ortuť, pri 253,7 nm. Atómová absorpcia riediacej kvapaliny sa merala ako blank. Obsah ortute vo vzorke sa vypočítal prostredníctvom kalibračných kriviek získaných zo štandardných roztokov. Výsledky sú uvedené ako μg ortute na 20 μg proteínu.

1.3 Produkcia celkového antigénu bez tiomerzalu

Kroky spôsobu purifikácie celkového antigénu sú znázornené na obrázku 1.

1.4 Zloženie vakcíny formulovanej bez tiomerzalu

V tabuľke 1 je uvedené typické kvantitatívne zloženie vakcíny hepatitídy B bez konzervačnej látky a formulovanej z antigénu pripraveného spôsobom bez tiomerzalu.

Tabuľka 1

Zložka	Množstvo zložky na ml
Aktívna zložka - proteín, z ktorého aspoň 95 % tvorí HBsAg	20 μg
Hydroxid hlinitý (adsorbent) (ako Al_2O_3)	0,95 mg
Chlorid sodný	9,0 mg (maximum)
Dihydrát fosforečnanu sodného	0,98 mg
Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného	0,71 mg
Voda pre injekcie	do 1,0 ml

Zloženie sa môže meniť pridaním 3D-MPL a/alebo iného adjuvans.

2. Charakterizácia celkového antigénu a vakcíny produkovanej spôsobom bez tiomerzalu

2.1 Testovanie purifikovaného celkového antigénu

2.1.1 Základné porovnanie

Pripravili sa tri série celkového antigénu spôsobom bez tiomerzalu podľa tohto príkladu (príklad 1.2) a označili sa ako HEF001, HEF002 a HEF003. Tieto sa porovnávali so sériou celkového antigénu (HEP2055) pripravenou predchádzajúcim spôsobom (ako je opísaný v príklade 1) v prítomnosti tiomerzalu.

2.1.2 Testy celkového antigénu

Testovali sa tri série celkového antigénu pripraveného spôsobom bez tiomerzalu a výsledky sú zhrnuté v tabuľke 2.

Obsah proteínu sa meral spôsobom podľa Lowryho a ďalších (J. Biol. Chem. 1951: 193: 265).

Obsah endotoxínu sa meral Limulus gélovou zrážacou technikou použitím komerčne dostupného kitu od Cape Cod Associates, 704 Main St., Falmouth, MA 02540, USA. Reakčné činidlá sú štandardizované vzhľadom na US Pharm. Endotoxin Reference Standard.

Tween 20 sa meral spôsobom podľa Huddlestona a Allreda (J. Amer. Oil Chemist Soc., 1965: 42: 983).

Obsah HBsAg sa meral prostredníctvom komerčne dostupného AusZYME kitu od Abbott Laboratories, One Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, USA. Využil sa testovací postup B podľa výrobcu. Vzorka celkového antigénu purifikovaného spôsobom zahŕňajúcim tiomerzal sa použila ako štandard na stanovenie dávkovej odpovedovej krivky.

Polysacharidy sa merali spôsobom podľa Dubois a ďalších (Anal. Chem. 1956: 28: 350).

Lipidy sa merali použitím komerčne dostupného kitu (Merkotest Total Lipids 3321) od E. Merck, B. P. 4119, Darmstad D-6100, Germany.

Obsah DNA sa meral prahovou metódou použitím zariadenia a reakčných činidiel dostupných od Molecular Devices Corp., Gutenbergstrasse 10, Ismaning, Munich, Nemecko.

Hodnoty zistené v testoch sú v rozsahu hodnôt zistených pre série celkového antigénu vyrobeného použitím tiomerzalu v elučnom tlmivom roztoku Sepharose 4B gélového permeačného kroku, s výnimkou výsledkov antigénnej aktivity získaných prostredníctvom ELISA. Hodnoty tohto merania pre tri HEF prípravky boli vyššie (1,63 až 2,25) ako hodnoty zistené pre HEP2055 sériu celkového antigénu, ktorá mala pomer ELISA/proteín 1,13. Pomery ELISA/proteín merané prostredníctvom AUSZYME kitu pre vzorky celkového antigénu obsahujúce tiomerzal boli vo všeobecnosti približne 1,0 a v rozsahu 0,8 až 1,2 a veľmi zriedka presiahli 1,4.

2.1.3 SDS-PAGE gélová analýza

Celkové antigénové prípravky sa testovali SDS-PAGE analýzou v redukčných podmienkach a s Coomassie blue farbením. Všetky vzorky vykazovali hlavný pás v oblasti 24K so stopami dimérneho proteínu. Vzorky sa vyhodnotili ako veľmi čisté (> 99%), čo sa stanovilo prostredníctvom neprítomnosti viditeľných pásov kontaminačných proteínov.

Vzorky (1 µg) celkových antigénových prípravkov sa testovali prostredníctvom SDS-PAGE v redukčných a neredukčných podmienkach a s farbením striebrom (obrázok 2). V redukčných podmienkach vzorky vykazovali intenzívny pás migrujúci v oblasti 24 K so stopami dimérnej a multimérnej formy. Gélové vzory sú nerozlíšiteľné od vzoru HEP2055, ako porovnávacej vzorky. Vzorky sa nechali zbahnúť aj v neredukujúcich podmienkach. V týchto podmienkach menej materiálu migruje v oblasti 24K a je zvýšené množstvo polypeptidu migrujúceho v dimérnej a multimérnej polohe. Zdá sa, že série celkového antigénu bez tiomerzalu majú o niečo vyšší stupeň polymerizácie ako porovnávacia séria HEP2055.

Identita 24K polypeptidu odhaleného Coomassie blue alebo strieborným farbením bola potvrdená Western blotom s králičími polyklonálnymi protilátkami vyvolanými proti plazmatickému HBsAg.

Celkové antigénové prípravky vykazovali hlavný pás v oblasti 24K spolu s dimérnou a trimérnou formou. Technika odhalila minoritné stopy zlámaných

produktov povrchového antigénového proteínu. Nie sú žiadne rozdiely medzi celkovým antigénom pripraveným spôsobom bez tiomerzalu a HEP2055 sériou.

Prítomnosť zvyškových kvasinkových proteínov sa testovala SDS-PAGE analýzou v redukčných podmienkach a Western blotom s králičím polyklonálnym antisérom vyvolaným proti kvasinkovým proteínom (obrázok 3). Technika je kvalitatívna a neumožňuje kvantifikáciu nečistôt.

Dokázaný je konštantný vzor pásov pre tri celkové antigénové série pripravené spôsobom bez tiomerzalu a pre HEP2055 sériu s jednou výnimkou.

Ťažko farbiteľný pás, nachádzajúci sa v oblasti 23K pri HEP2055 celkovom antigéne, v skutočnosti chýba v 3 HEF prípravkoch. Western blot dokazuje, že purifikačný proces bez tiomerzalu vedie k čistejšiemu antigénovému produktu.

Tabuľka 2

Výsledky testov purifikovaného celkového antigénu bez tiomerzalu

	Výsledky testov			
	HEF001	HEF002	HEF003	HEP2055
pH	6,8	6,8	6,8	6,8
Obsah proteínu (Lowry)	1312 g/ml	888 g/ml	913 g/ml	995 g/ml
Obsah endotoxínu	< 0,25 EU	< 0,25 EU	< 0,25 EU	< 0,25 EU
Tween 20 obsah	7,1 µg	6,6 µg	7,4 µg	5,8 µg
Antigénna aktivita prostredníctvom ELISA	2957 µg/ml	1505 µg/ml	1486 µg/ml	1128 µg/ml
ELISA/proteín pomer	2,25	1,69	1,63	1,13
Obsah polysacharidov	0,33 µg	0,35 µg	0,33 µg	0,34 µg
Obsah lipidov	13,7 µg	12,8 µg	12,9 µg	11,8 µg
Obsah DNA prostr. Prahovej metódy	< 1 pg	< 1 pg	< 1 pg	< 1 pg

2.1.4 Iné biochemické testy

2.1.4.1 Obsah DNA

Obsah DNA v 3 celkových antigénových sériách sa meral prahovým spôsobom (Molecular Devices Corp). Namierané množstvá boli nižšie ako 10 µg DNA na 20 µg proteínu (tabuľka 2), pričom rovnaká úroveň DNA obsahu bola namieraná pri celkovom antigéne produkovanom v súčasnosti zavedeným spôsobom.

2.1.4.2 Aminokyselinové zloženie

Aminokyselinové zloženie troch HEF celkových antigénových dávok sa determinovalo po kyslej hydrolýze s 6N HCl prostredníctvom chromatografie aminokyselín na iónovo-výmennej kolóne s postkolónovou ninhydrín detekciou. Nedeterminoval sa prolín a tryptofán. Výsledky sú uvedené v tabuľke 3.

Zistené zloženia boli v dobrom súlade so zložením determinovaným pre HEP2055 a so zložením očakávaným na základe DNA sekvencie. Hoci počet glycínových zvyškov namieraný pre HEP2055 je blízky očakávanému zloženiu, hodnota 16 až 17 zvyškov sa zvyčajnejšie namerala pre celkové antigénové prípravky. Zistený priemerný počet cysteínových zvyškov je očakávaných 14, z čoho vyplýva, že na časticu nie sú naviazané žiadne extra cysteíny ako výsledok spracovania v CsCl gradientovom kroku.

2.1.4.3 Kvantifikácia voľného cysteínu

Meralo sa množstvo voľného cysteínu nachádzajúce sa v celkových antigénových prípravkoch získaných tu opísaným spôsobom po oxidácii častíc s kyselinou permravčou bez predchádzajúcej kyslej hydrolýzy. Oxidované voľné cysteínové zvyšky sa separovali na iónovo-výmennej kolóne s post kolónovou detekciou prostredníctvom ninhydrínu. Limit pre detekciu cysteínu týmto spôsobom je 1 µg na ml.

Nebolo možné namerať žiadny cysteín v 3 HEF antigénových prípravkoch, keď sa testovali v počiatočných proteínových koncentráciách uvedených v tabuľke 2. Táto technika meria tak voľné cysteínové zvyšky prítomné v tlmivom roztoku, ako aj cysteínové zvyšky, ktoré sú pripojené na HBsAg proteín prostredníctvom disulfidovej väzby, ktoré ale netvoria časť polypeptidovej sekvencie.

2.1.4.4 N-koncová sekvenčná analýza

Prítomnosť možných proteínových kontaminantov a degradačných produktov v troch celkových antigénových sériách vyrobených modifikovaným spôsobom sa hodnotili N-koncovou sekvenčnou analýzou založenou na Edmanovej degradácii. N-koncová sekvencia MENITS... HBsAg proteínu bola detegovaná bez interferencie s inými sekvenciami. Potvrdilo sa tiež, že N-koncový metionín je na 60 až 75% blokovaný acetyláciou, ako sa pozorovalo predtým pre HBsAg polypeptid vyrobený rutinným spôsobom.

Tabuľka 3 - Aminokyselinové zloženie HBsAg

Amino-kyseliny	HEF001	HEF002	HEF003	Priemer	HEP2055	Očakávané
Asp	11,3	11,3	11,3	11,3	11,5	10
Thr	17,5	17,4	17,2	17,4	17,8	17
Ser	21,4	21,6	21,4	21,5	20,9	23
Glu	11	11	11	11,0	10,5	9
Pro	nd	nd	nd		nd	24
Gly	17,1	16,8	16,7	16,9	14,6	14
Ala	7,5	7,4	7,4	7,4	7,2	6
Cys	12,3	14,95	14,9	14,1	13,2	14
Val	10,9	11	10,9	10,9	10,7	11
Met	6,8	6,7	7,1	6,9	7,1	6
Ile	12,3	12,4	12,5	12,4	12,2	16
Leu	26,3	26,6	26,2	26,4	26,7	33
Tyr	6,8	6,8	6,8	6,8	7	6
Phe	13,8	13,9	13,8	13,8	13,9	15
His	3	2,8	3,3	3,0	3,3	1
Lys	4	4	3,9	4,0	4,2	3
Arg	5,7	5,8	5,7	5,7	6,1	5
Trp	nd	nd	nd		nd	13

2.1.4.5 Laserová svetelná rozptylová analýza

Robili sa porovnávania veľkosti častíc medzi HBsAg časticami vyrobenými použitím modifikovaného spôsobu a HEP2055 referenčnou sériou prostredníctvom laserového svetelného rozptylu (tabuľka 4). Determinované molekulové hmotnosti vykazujú dobrý súlad medzi prípravkami.

Tabuľka 4

Molekulové hmotnosti HBsAg častíc prostredníctvom laserového svetelného rozptylu

Antigénová séria	Molekulová hmotnosť (Daltony)
HEF001	$3,07 \times 10^6$
HEF002	$2,76 \times 10^6$
HEF003	$2,76 \times 10^6$
HEP2055	$3,34 \times 10^6$

2.1.4.6 Elektrónová mikroskopia

Celkové antigénové prípravky sa skúmali elektrónovou mikroskopiou po fixácii a farbení s uranyl acetátom.

Pozorované častice boli podobné vo všetkých vzorkách a súhlasili s ± 20 nm subsférickými alebo dlaždicovými časticami v podobe mačacích hláv typických pre HBsAg. Častice pozorované v 3 HEF sériách boli rozlíšiteľné od HEP2055.

2.1.5 Imunologické analýzy

2.1.5.1 Reaktivita s RF1 monoklonálnou protilátkou

Tri celkové antigénové prípravky sa testovali z hľadiska ich reaktivity s RF1 monoklonálnou protilátkou ELISA inhibičným testom. Bolo dokázané, že RF1 monoklonálna protilátka chráni šimpanzov pred infikovaním s HBV, a je považovaná za protilátku rozoznávajúcu ochranný konformačný epitop HBsAg častice (Iwarson S a ďalší, 1985, J. Med. Virol., 16: 89-96).

RF1 hybridóm sa môže rozmnožovať v peritoneálnej dutine BalbC myší alebo v tkanivovej kultúre.

Ascitická tekutina nariadená v pomere 1/50000 v saturačnom tlmivom roztoku (PBS obsahujúcom 1% BSA, 0,1% Tween 20) sa zmiešala v pomere 1:1 s rôznymi riedeniami HBsAg vzoriek, ktoré sa mali testovať, v PBS (konečné koncentrácie v rozsahu od 100 µg do 0,05 µg/ml).

Zmesi sa inkubovali v Nunc Immunoplatniach (96U) 1 hodinu pri 37 °C pred tým ako sa preniesli na 1 hodinu (pri 37 °C) na platne pokryté štandardným prípravkom HBsAg. Štandardným HBsAg prípravkom bola séria celkového antigénu (Hep 286) purifikovaná spôsobom zahŕňajúcim tiomerzal. Po premývanom kroku s PBS obsahujúcim 0,1% Tween 20 sa pridal ovčí anti-myšací IgG konjugovaný s biotínom a nariadený v pomere 1/1000 v saturačnom tlmivom roztoku a nasledovalo inkubovanie, 1 hodinu pri 37 °C. Po premývanom kroku sa do rovnakej jamky pridal komplex streptavidínu a biotinylovanej peroxidázy nariadený v pomere 1/1000 v saturačnom tlmivom roztoku a nasledovalo inkubovanie, 20 minút pri 37 °C. Platne sa premyli a inkubovali sa s roztokom OPDA 0,04%, H₂O₂ 0,03% v 0,1M citrátovom tlmivom roztoku, pH 4,5, 20 minút pri laboratórnej teplote. Reakcia sa zastavila 2N H₂SO₄ a zmerali sa optické hustoty (O.D.) pri 490/630 nm a zaznamenali sa do grafu.

Testovali sa aj série HEP antigénových dávok, vrátane HEP2055, spolu s *Herpes simplex* gD antigénom ako negatívnou kontrolou. Test meral schopnosť každého testovaného antigénu inhibovať viazanie RF1 na štandardný antigénový prípravok (HEP286) naviazaný na mikrotitračných platniach.

Tabuľka 5 poskytuje koncentrácie inhibujúce 50 % RF1 viazania na fixovaný antigén pre každý antigén.

Tabuľka 5

Inhibícia viazania RF1 monoklonálnej protilátky na HBsAg

Celkový antigén	IC50 (ng/ml)*
HEP286	3834
HEP673	3437
HEP720	3150
HEP2055	2384
HEF001	468
HEF002	574
HEF003	540

*IC50 = koncentrácia antigénu (ng/ml) inhibujúca 50 % RF1 viazania na fixný antigén

Výsledky dokazujú, že na inhibíciu RF1 viazania (tabuľka 5) je potrebných 4 až 7 krát menej HEF antigénu. To dokazuje, že antigén pripravený modifikovaným spôsobom má zvýšenú prezentáciu RF1 epitopu v porovnaní s HEP celkovým antigénom.

2.1.5.2 Afinita viazania na monoklonálnu RF1

Kinetické parametre viazania RF1 monoklonálnej protilátky na 3 HEF antigénové série a na HEP2055 sa merali povrchovou plazmónovou rezonanciou použitím Biacore 2000 zariadenia od Amersham Pharmacia Biotech, Amersham Place, Little Chalfont, Bucks, UK. Meranými kinetickými parametrami boli:

ka: asociačná rýchlostná konštanta ($M^{-1}S^{-1}$)

kd: disociačná rýchlostná konštanta (S^{-1})

Ka: rovnovážna alebo afinitná konštanta (M^{-1})

kde

$$K_a = k_a/k_d$$

Zistené hodnoty sú uvedené v tabuľke 6.

Tabuľka 6

Afinitné konštanty RF1 viazania na HBsAg

Celkový antigén	$k_a (x10^{-3})$	$k_d (x10^5)$	$K_a (x10^{-7})$
HEF001	6,81	3,21	21,97
HEF002	6,89	3,73	18,83
HEF003	7,39	4,67	15,80
HEP2055	3,31	6,30	5,31

Tri HEF antigénové série mali podobné hodnoty asociačných/disociačných konštánt a väzobnej afinity. Na rozdiel od nich mal HEP2055 slabšiu afinitu pri viazaní RF1.

To je v súlade s výsledkami z ELISA inhibičného testu, ktorý ukazuje, že antigén pripravený spôsobom bez tiomerzalu má zlepšenú prezentáciu RF1 epitopu.

2.2 Testy vakcín formulovaných s antigénom produkovaný modifikovaným spôsobom

Tri HEF antigénové série sa adsorbovali na hydroxid hlinitý a formulovali sa ako vakcína v súlade so zložením uvedeným v tabuľke 1. Formulované boli v dávke pre dospelých v liekovkách (20 μ g antigénového proteínu v 1 ml). Série sa označili ako DENS001A4, DENS002A4 a DENS003A4.

Účinok vakcíny sa meral prostredníctvom *in vitro* testu obsahu antigénu použitím Abbott Laboratories AUSZYME ELISA kitu a klasickej série vakcíny formulovanej s 50 μ g/ml tiomerzalu ako štandardom. Účinok vakcíny sa meral použitím metódy B opísanej v Pharmal Europa Special Issue Bio97-2 (December 1997). Tri HEF série poskytujú vysoké hodnoty antigénového obsahu, takmer dvojnásobok 20 μ g, stanoveného obsahu antigénového proteínu.

2.2.1 Reaktivita DENS vakcíny s RF1 monoklonálnou protilátkou

Antigénnosť adsorbovanej vakcíny sa ďalej testovala v inhibičnom teste s RF1 monoklonálnou protilátkou. Test meria schopnosť vakcínovej vzorky inhibovať RF1 viazanie na fixovaný celkový antigén (HEP286).

Ascitická tekutina nariedená v pomere 1/50000 v saturačnom tlmivom roztoku (PBS obsahujúcom 1% BSA, 0,1% Tween 20) sa zmiešala v pomere 1:1 s rôznymi

riedeniami vakcínových vzoriek, ktoré sa mali testovať, v PBS (koncentrácie v rozsahu od 20 µg do 0,05 µg/ml).

Zmesi sa inkubovali v Nunc Immunoplatniach (96U) 2 hodiny pri 37 °C s pretrepávaním, pred tým ako sa preniesli na platne pokryté s HBsAg. HBsAg prípravkom použitým na pokrytie bola séria celkového antigénu (Hep 286) purifikovaného spôsobom zahŕňajúcim tiomerzal. Tieto platne sa potom inkubovali 2 hodiny pri 37 °C s pretrepávaním. Po premývacom kroku s PBS obsahujúcim 0,1% Tween 20 sa pridal ovčí anti-myšací IgG konjugovaný s biotínom a nariedený v pomere 1/1000 v saturačnom tlmivom roztoku a nasledovalo inkubovanie, 1 hodinu pri 37 °C. Po premývacom kroku sa do rovnakej jamky pridal komplex streptavidínu a biotinylovanej peroxidázy nariedený v pomere 1/1000 v saturačnom tlmivom roztoku a nasledovalo inkubovanie, 30 minút pri 37 °C. Platne sa premyli a inkubovali sa s roztokom obsahujúcim OPDA 0,04%, H₂O₂ 0,03% v 0,1M citrátovom tlmivom roztoku, pH 4,5, 20 minút pri laboratórnej teplote. Reakcia sa zastavila 2N H₂SO₄ a zmerali sa optické hustoty (O.D.) pri 490/630 nm a zaznamenali sa do grafu.

IC₅₀, definovaná ako koncentrácia antigénu (koncentrácia inhibítora), ktorá inhibuje 50 % viazania protilátky na naviazaný HBsAg, sa vypočítala použitím 4-parametrovej rovnice a vyjadřila sa v ng/ml.

Vakcína pripravená z celkového antigénu vyrobeného modifikovaným spôsobom sa porovnávala s Engerix BTM vakcínou formulovanou z klasického HEP celkového antigénu a bez tiomerzalu ako konzervačnej látky. Testy bežali trojmo.

Výsledky sú uvedené v tabuľke 7 a dokazujú, že na 50% inhibíciu RF1 viazania je potrebné približne polovičné množstvo DENS vakcíny v porovnaní s Engerix BTM vakcínou bez konzervačnej látky. To odráža zvýšenú prezentáciu RF1 epitopu na HEF/DENS antigéne a je v súlade s testami uskutočnenými s RF1 protilátkou na purifikovanom celkovom antigéne.

Tabuľka 7

Inhibícia RF1 viazania formulovanou vakcínou

Vakcínová séria	IC-50 (ng/ml) ⁽¹⁾			
	Experiment			Priemer
	1	2	3	
DENS001A4	913	662	603	726
DENS002A4	888	715	521	708
DENS003A4	817	685	582	695
ENG5100A2	1606	1514	1481	1534
ENG3199B9	1329	1170	1286	1262
ENG3328A9	1417	1194	1334	1315

⁽¹⁾ Koncentrácia vakcíny inhibujúca 50 % viazania RF1 protilátky na fixovaný antigén

2.2.2 Imunogénnosť DENS vakcíny u myší

Štúdia sa uskutočňovala na Balb/C myšiach, aby sa porovnala imunogénnosť troch DENS súhlasných dávok s Engerix BTM vyrobenou podľa v súčasnosti používaného spôsobu na výrobu antigénu a formulovanou s tiomerzalom.

Testované boli nasledujúce série:

- DENS001A4
- DENS002A4
- DENS003A4
- ENG2953A4/Q ako štandard

V stručnosti, skupiny po 12 myší sa imunizovali intramuskulárne dvakrát v dvojtýždňovom intervale s vakcínovými dávkami zodpovedajúcimi 1/10 (2 µg) alebo 1/50 (0,4 µg) dávky pre dospelého človeka. Protilátková odpoveď na HBsAg a izotypový profil indukovaný očkovaním sa monitorovali zo séra odobratého na 28. deň.

Návrh experimentu

Skupiny 12 Balb/C myší sa imunizovali intramuskulárne do oboch nôh (2x50 µl) v deň 0 a 15 s nasledujúcimi vakcínovými sériami:

Tabuľka 8

Skupiny a vakcínové série

Skupina	Vakcína	Objem	Antigénová dávka
1	DENS001A4	100 µl	2 µg
2	→ nariedená 5x v PO ₄ /NaCl	100 µl	0,4 µg
3	DENS002A4	100 µl	2 µg
4	→ nariedená 5x v PO ₄ /NaCl	100 µl	0,4 µg
5	DENS003A4	100 µl	2 µg
6	→ nariedená 5x v PO ₄ /NaCl	100 µl	0,4 µg
7	ENG2953A4/Q	100 µl	2 µg
8	→ nariedená 5x v PO ₄ /NaCl	100 µl	0,4 µg

Na 15. deň (2 týždne po I) a na 28. deň (2 týždne po II) sa z retroorbitálneho sínusu odobrala krv.

Pri návrhu tohto experimentu (4 formulácie x 2 dávky s 12 myšami na skupinu) bola sila odhadnutá *a priori* s PASS štatistickým programom. PASS (Power and Sample Size) štatistický program sa získal od NCSS, 329 North 1000 East, Kaysville, Utah 84037. Pre dvojfaktorovú disperznú analýzu by sa mal detegovať 2,5 násobný rozdiel GMT medzi formuláciami s 5% alfa chybou so silou viac ako 90 %.

Výsledky

Sérológia

Humorálne reakcie (celkové Ig a izotypy) sa merali ELISA testom použitím HBsAg (Hep286) ako pokrývacieho antigénu a anti-myšacích protilátok konjugovaných s biotínom na odhalenie anti-HBs protilátkového viazania. Analyzovali sa len post II séra.

Tabuľka 9 znázorňuje priemer a GMT anti-HBs Ig protilátkové reakcie merané v jednotlivých sérach 2 týždne post II.

DENS a klasickými hepatitídovými B formuláciami sa indukujú porovnateľné protilátkové reakcie: GMT v rozsahu od 2304 do 3976 EU/ml pre DENS série v

porovnaní s 2882 EU/ml pre SB Biologicals hepatitídovú B monovalentnú vakcínu (Engerix B™) v dávke 2 µg, a GMT v rozsahu 696 až 1182 EU/ml pre DENS série v porovnaní s 627 EU/ml pre SB Biologicals hepatitídovú B monovalentnú vakcínu (Engerix B™) v dávke 0,4 µg.

Ako sa očakávalo, pozoruje sa jasný antigénový dávkový rozsahový efekt pre všetky formulácie v dávkach 2 µg a 0,4 µg s 3 až 6 násobným rozdielom v GMTs.

Pozorovali sa štyri nereagujúce myši (titre menej ako 50 EU/ml) bez jasných spojení s antigénovými dávkami alebo sériami použitými pre injekciu (skupiny 1, 2, 3 a 8; jedna myš na skupinu).

Na základe štatistickej analýzy (Grubbsov test) boli tieto myši vylúčené z ďalšej analýzy.

Tabuľka 9

Protilátková reakcia u myší v deň 28 (2 týždne post II)

Skupina	Vakcína	Dávka	Počet	ELISA titre (lg)	
				Priemer	GMT
1	DENS001A4	2 µg	11	3466	2971
2		0,4 µg	11	1283	1182
3	DENS002A4	2 µg	11	2436	2304
4		0,4 µg	12	984	786
5	DENS003A4	2 µg	12	4583	3976
6		0,4 µg	12	997	696
7	ENG2953	2µg	12	3999	2882
		0,4 µg	11	737	627

Štatistická analýza

Uskutočnila sa dvojfaktorová disperzná analýza anti-HBs titrov po log transformácii post II údajov, použitím vakcín (4 typy) a antigénových dávok (2 µg, 0,4 µg) ako faktorov. Táto analýza potvrdila, že sa pozoroval štatisticky významný rozdiel medzi dvoma antigénovými dávkami (p hodnota < 0,001) a nedokázala

žiadny významný rozdiel medzi vakcínovými sériami (p hodnota = 0,2674). Ako bolo uvedené vyššie, sila sa odhadla *a priori* a návrh experimentu bol taký, aby bolo možné detegovať 2,5 nádobný rozdiel GMT s alfa chybou 5 % medzi formuláciami so silou >90 %.

Izotypový profil

Tabuľka 10 uvádza izotypové rozdelenie (IgG1, IgG2 a IgG2b) vypočítané z analýzy spojených sér v post II.

Ako sa očakávalo, pozorovalo sa, že tieto vakcíny založené na kamenci indukujú jasnú TH2 odpoveď vo forme najmä IgG1 protilátok.

Nepozoroval sa žiadny rozdiel medzi DENS sériami alebo SB Biologicals hepatitídovou B monovalentnou vakcínou čo sa týka izotypového profilu.

Tabuľka 10

Rozdelenie IgG izotypov v spojených sérach z 28. dňa

Skupina	Vakcína	Dávka	Izotyp (%)		
			IgG1	IgG2a	IgG2b
1	DENS001A4	2 µg	91	4	5
2		0,4 µg	87	8	5
3	DENS002A4	2 µg	97	2	1
4		0,4 µg	87	6	7
5	DENS003A4	2 µg	98	1	1
6		0,4 µg	93	4	3
7	ENG2953A4/Q	2 µg	88	8	4
		0,4 µg	88	9	3

Príklad 3

Formulovanie kombinovaných vakcín

Celkový antigén podľa vynálezu je výnimočne vhodný na formulovanie kombinovaných vakcín obsahujúcich IPV.

Štúdie stability uskutočňované na počiatkových sériách kombinovanej DTPa-HBV-IPV vakcíny indikovali pokles účinnosti IPV komponentu, najmä poliomyelitídového antigénu typu 1, keď sa použil *in vitro* imunotest (determinácia obsahu D-antigénu prostredníctvom ELISA) a *in vivo* test účinnosti na potkanoch. Pre typ 3 nebola pozorovaná žiadna strata účinnosti. Pre typ 2 bola strata účinnosti v očakávanom rozsahu (nie väčšia ako 10% strata na rok skladovania).

Iniciovali sa štúdie na determináciu príčiny tejto straty účinnosti v kombinovanej DTPa-HBV-IPV vakcíne. Z pozorovania, že stabilita IPV v SB Biologicals DTPa-IPV vakcíne je uspokojivá (nie viac ako 10% strata obsahu antigénu na rok skladovania), sa vyvodilo, že HBV komponent je pravdepodobne zodpovedný za nestabilitu IPV v DTPa-HBV-IPV vakcíne.

HBV komponent použitý v počiatkovej DTPa-HBV-IPV formulácii je purifikovaná rDNA, z kvasinky odvodený HBsAg používaný aj na výrobu SB Biologicals hepatitídovej B monovalentnej vakcíny, a je pripravený ako je opísané v príklade 1.

Ako prvý pokus o určenie toho elementu v HBV komponente, ktorý je škodlivý pre IPV, sa analyzoval celkový HBsAg z hľadiska prítomnosti tiomerzalu. Predtým sa zistilo (Davisson a ďalší, 1956, J. Lab. Clin. Med 47: 8-19), že tiomerzal používaný ako konzervačná látka v DTP vakcínach „je škodlivý pre poliomyelitídový vírus“ v kombinácii DTP-IPV. Toto pozorovanie bolo brané do úvahy výrobcami vakcín, ktorí nahradili tiomerzal inými konzervačnými látkami pri formulovaní ich vakcín obsahujúcich IPV. V bližšej minulosti sa znova skúmal vplyv tiomerzalu na IPV účinok v podmienkach dlhotrvajúceho skladovania pri +4 °C. Publikovaná bola strata účinku polio vírusového antigénu typu 1 na nedetegovateľnú úroveň po 4 až 6 mesiacoch (Sawyer, L.A. a ďalší, 1994, Vaccine 12: 851-856).

Použitím atómovej adsorpčnej spektroskopie sa detegovalo približne 0,5 µg ortute (Hg) na 20 µg HBsAg v antigéne purifikovanom podľa príkladu 1.

Toto množstvo ortute (vo forme tiomerzalu a chloridu etylortuťnatého, degradačného produktu tiomerzalu) môže znížiť ELISA reakciu na obsah D-antigénu typu 1 v IPV celkovom koncentráte, inkubovanom pri 37 °C 7 dní, na nedetegovateľnú úroveň.

Zaviedol sa spôsob na uvoľnenie ortute nachádzajúcej sa v celkovom HBsAg. Určilo sa, že ortuť by sa mohla viazať na tiolové skupiny HBsAg častice, a preto by bolo možné ju uvoľniť v prítomnosti redukujúcich činidiel. Po experimentovaní s inými redukčnými činidlami sa L-cysteín vybral ako činidlo na uvoľnenie ortute z HBsAg častice. Po dialýze celkového HBsAg oproti soľanke obsahujúcej 5,7mM L-cysteín nebola v retenáte detegovaná žiadna ortuť (detekčný limit testovacej metódy: 25 ng Hg/20 µg HBsAg). Dialyzovaný antigén sa zmiešal s IPV celkovým koncentrátom a stabilita vírusu typu 1 sa stanovovala meraním obsahu D-antigénu po inkubovaní pri 37 °C, 7 dní. IPV celkové koncentráty nezmiešané a zmiešané s HBsAg, na ktoré sa nepôsobilo cysteínom, sa použili ako kontroly. Referenčný ELISA titer sa získal zo vzoriek uskladnených pri +2 °C až 8 °C, 7 dní. Výsledky sú sumarizované v tabuľke 11.

Tabuľka 11

Vzorka	Obsah D-antigénu (typ 1) ¹		Strata
	7 dní/4 °C	7 dní/37 °C	
IPV (nezmiešaný)	31,6	24,2	23 %
IPV + HBsAg neošetrený	31,1	18,1	42 %
IPV + HBsAg ošetrený s cysteínom	31,4	27,6	12 %
IPV + tiomerzal (1 µg/ml)	30,5	11,0	74 %

(1) vyjadrené v jednotkách D-antigénu (DU)

Údaje získané pri týchto laboratórnych prípravkoch jasne demonštrujú, že stabilita polio vírusu typu 1 sa významne zlepší, ak sa na HBsAg pôsobí cysteínom, aby sa odstránila zvyšná ortuť, pred zmiešaním s IPV.

Vyššie prezentované údaje tiež dokazujú 23% stratu obsahu D-antigénu v porovnaní s IPV prípravkom po 7 dňovom inkubovaní pri 37 °C. Toto potvrdzuje charakteristickú nestabilitu Mahoney polio vírusu typu 1, ako už bolo predtým publikované (Sawyer, L.A. a ďalší (1994), Vaccie 12: 851-856).

Hoci komerčné šarže DTPa-HBV-IPV a DTPa-HBV-IPV/Hib vakcín boli pripravené použitím dialyzačného procesu s 5,7mM L-cysteínom na odstránenie zvyškovej ortute a na zachovanie stability IPV, dialyzačný proces nie je vhodný na produkciu vo veľkom meradle a zahŕňa série dodatočných krokov, aby sa pripravil HBsAg bez tiomerzalu alebo ortute. Na rozdiel od toho, HBsAg podľa predloženého vynálezu, pripravený bez tiomerzalu, sa môže priamo použiť vo formuláciách kombinovaných vakcín, najmä vakcín obsahujúcich IPV.

4. Zhrnutie

Predtým používaný spôsob purifikácie povrchového antigénu odvodeného z kvasinky zahŕňa gélový permeačný krok, pri ktorom sa v elučnom tlmivom roztoku nachádza anti-mikrobiálna zlúčenina tiomerzal, obsahujúca ortuť, na kontrolu biologických škodlivín v tele.

Tiomerzal v priebehu nasledujúcich krokov procesu nevymizne úplne, takže v purifikovanom celkovom proteíne sa nachádza približne 1,2 µg tiomerzalu na 20 µg proteínu.

Na produkciu celkového antigénu úplne bez tiomerzalu (ortute) sa purifikačný proces menil v dvoch krokoch.

- Tiomerzal sa vynecháva z elučného tlmivého roztoku pri 4B gélovom permeačnom kroku.
- Do eluátovvej zásoby z aniónovo-výmenného chromatografického kroku sa pridáva cysteín (2mM konečná koncentrácia). To zabraňuje precipitácii antigénu v priebehu centrifugácie v CsCl hustotovom gradiente.

Žiadne ďalšie zmeny sa do produkčného procesu nezavádzajú.

Bol charakterizovaný celkový antigén produkovaný modifikovaným spôsobom. Fyzikálno-chemické testy ukázali, že vlastnosti antigénu bez tiomerzalu sú nerozlíšiteľné od vlastností antigénu produkovaného predtým používaným spôsobom. Antigénové častice majú rovnaké súčasti.

Identita a integrita HBsAg polypeptidu nie je ovplyvnená modifikovaným procesom, čo sa dokázalo SDS-PAGE analýzou, Western blotom použitím polyklonálnych anti-HBsAg protilátok, N-koncovej sekvenčnej analýzy a aminokyselinovým zložením. Elektrónová mikroskopia a laserová svetelná rozptylová

analýza dokazujú, že častice majú typickú formu a veľkosť očakávanú pre HBsAg odvodený z kvasiniek. Analýza prostredníctvom Western blotu s anti-kvasinkovým proteínovým sérom dokazuje, že antigén produkovaný spôsobom bez tiomerzalu má podobný vzor kontaminujúcich kvasinkových proteínov. Avšak množstvo kontaminujúceho pásu migrujúceho v oblasti 23K je značne redukované pri 3 HBsAg šaržách produkovaných použitím modifikovaného spôsobu.

Imunologické analýzy dokazujú, že častice bez tiomerzalu majú zvýšenú antigénnosť. Častice sú reaktívnejšie s Abbott AUSZYME kitom (obsahujúcim zmes monoklonálnych protilátok), pričom poskytujú ELISA/proteínový pomer 1,6 až 2,25. Toto zvýšenie antigénnosti je dokázané aj s ochrannou RF1 monoklonálnou protilátkou. Približne 4 až 7 krát menej antigénu bez tiomerzalu je potrebného na inhibovanie RF1 viazania na štandardný fixovaný antigén. Inhibície viazania antigénom bez tiomerzalu a klasickým antigénom spadajú do dvoch rozličných kategórií. Tento rozdiel je dokázaný aj meraniami väzobnej afinitnej konštanty pre RF1 použitím povrchovej plazmónovej rezonancie. Väzobné afinity prípravkov bez tiomerzalu sú 3 až 4 krát vyššie v porovnaní so šaržou klasického celkového antigénu.

Celkové antigénové prípravky boli formulované ako vakcína prostredníctvom adsorpcie na hydroxid hlinitý a bez konzervačnej látky.

Testovanie *in vitro* účinnosti použitím Abbott AUSZYME ELISA kitu a SB Biologicals hepatitídovej B monovalentnej vakcíny obsahujúcej tiomerzal ako štandardu, dokázalo, že sa získali vysoké hodnoty *in vitro* účinnosti. Obsah antigénu meraný týmto testom bol takmer dvakrát taký ako stanovená hodnota 20 µg proteínu na ml.

Zvýšená reaktivita vakcíny pripravenej z antigénu bez tiomerzalu sa pozorovala aj v inhibičnom teste s RF1 monoklonálnou protilátkou pri viazaní sa na fixovaný antigén. Približne polovičné množstvo vakcíny bez tiomerzalu bolo potrebné na poskytnutie 50% inhibície RF1 viazania na fixovaný antigén v porovnaní s antigénom purifikovaný predtým používaným spôsobom a formulovaný bez konzervačnej látky.

Zvýšená antigénnosť vakcíny bez tiomerzalu s ohľadom na RF1 je v súlade s výsledkami testu *in vitro* účinnosti (obsah antigénu) a s RF1 protilátkovými testami uskutočňovaných na celkových antigénových prípravkoch.

Myšací test imunogénnosti sa uskutočňoval prostredníctvom primárneho a boosterového očkovania, s dvojtýždňovým odstupom a dávkami 2 a 0,4 µg antigénu. Myšiam sa odobrala krv na 28. a 14. deň po boosterovej injekcii. Séra sa analyzovali na protilátkový titer a izotypové zloženie. Pozoroval sa jasný na dávke závislý efekt pre dve podávané dávky, ale nebol žiadny štatisticky významný rozdiel v odpovedi, čo sa týka protilátkových titrov (GMT) medzi vakcínou bez tiomerzalom a vakcínou bez konzervačných látok.

Žiadne podstatné zmeny sa nepozorovali v izotypových profiloch.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob výroby hepatitídovej B vakcíny obsahujúcej purifikovaný hepatitídový B povrchový antigén, ktorý obsahuje menej ako 0,025 μg ortute na 20 μg proteínu, vyznačujúci sa tým, že antigén sa purifikuje v prítomnosti redukčného činidla majúceho voľnú -SH skupinu a farmaceuticky prijateľného excipienta.

2. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že vakcína je bez konzervačnej látky.

3. Spôsob podľa nároku 2, vyznačujúci sa tým, že konzervačnou látkou je tiomerzal.

4. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 3, vyznačujúci sa tým, že hepatitídový antigén je adsorbovaný na hydroxide hlinitom.

5. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 4, vyznačujúci sa tým, že surový hepatitídový B antigénový prípravok sa:

(a) podrobí gélovej permeačnej chromatografii;

(b) podrobí sa iónovo-výmennej chromatografii; a

(c) zmieša sa s redukčným činidlom majúcim voľnú -SH skupinu.

6. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 5, vyznačujúci sa tým, že redukčným činidlom je cysteín, glutatión, ditiotreitol alebo β -merkaptetoetanol.

7. Spôsob podľa nároku 6, vyznačujúci sa tým, že redukčným činidlom je cysteín.

8. Spôsob podľa nároku 7, vyznačujúci sa tým, že cysteín sa pridáva do konečnej koncentrácie 1 mM až 10 mM.

9. Spôsob podľa nároku 8, vyznačujúci sa tým, že cysteín sa pridáva do konečnej koncentrácie približne 2 mM.

10. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 9, vyznačujúci sa tým, že antigén sa purifikuje v prítomnosti tiomerzalu pred spracovaním s redukčným činidlom.

11. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 9, vyznačujúci sa tým, že purifikovaný antigén je úplne bez tiomerzalu.

12. Spôsob podľa nároku 11, vyznačujúci sa tým, že vakcínou je vakcína bez tiomerzalu.

13. Vakcínový prostriedok, vyznačujúci sa tým, že obsahuje purifikovaný hepatitídový B antigén, ktorý obsahuje menej ako 0,025 µg ortute na 20 µg proteínu a je získaný spôsobom podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 12.

14. Vakcínový prostriedok podľa nároku 13, vyznačujúci sa tým, že obsahuje adjuvans.

15. Vakcínový prostriedok podľa nároku 14, vyznačujúci sa tým, že adjuvans je hlinitá soľ.

16. Vakcínový prostriedok podľa nároku 15, vyznačujúci sa tým, že hlinitou soľou je hydroxid hlinitý.

17. Vakcínový prostriedok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 13 až 16, vyznačujúci sa tým, že obsahuje TH-1 indukujúci adjuvans.

18. Vakcínový prostriedok podľa nároku 17, vyznačujúci sa tým, že TH1 indukujúci adjuvans je vybraný zo skupiny, ktorá obsahuje: 3-DMPL, QS21, 3-DMPL a QS21, a CpG oligonukleotid.

19. Vakcínový prostriedok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 13 až 18, vyznačujúci sa tým, že obsahuje jeden alebo viacero antigénov vybraných zo skupiny zahŕňajúcej: diptheria toxoid (D), tetanus toxoid (T), bezbunkové pertussis antigény (Pa), inaktivovaný polio vírus (IPV), haemophilus influenzae antigén (Hib), hepatitídový A antigén, herpes simplex vírus (HSV), chlamydia antigén, GSB, HPV, streptococcus penumoniae antigény a neisseria antigény.

20. Použitie hepatitídového B povrchového antigénu obsahujúceho menej ako 0,025 μg ortute na 20 μg proteínu na prípravu hepatitídovej vakcíny bez konzervačných látok, pričom antigén sa získava purifikáciou v prítomnosti redukčného činidla majúceho voľnú -SH skupinu.

21. Spôsob výroby hepatitídového B povrchového antigénu vhodného na použitie vo vakcíne, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa purifikáciu antigénu v prítomnosti redukčného činidla majúceho voľnú -SH skupinu, kde pred spracovaním s redukčným činidlom sa antigén purifikuje v prítomnosti tiomerzalu.

22. Spôsob výroby hepatitídového B antigénu podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že purifikovaný antigénový produkt obsahuje menej ako 0,025 μg ortute na 20 μg proteínu.

23. Spôsob výroby hepatitídového B antigénu podľa nároku 21 alebo 22, vyznačujúci sa tým, že surový hepatitídový B antigénový prípravok sa:

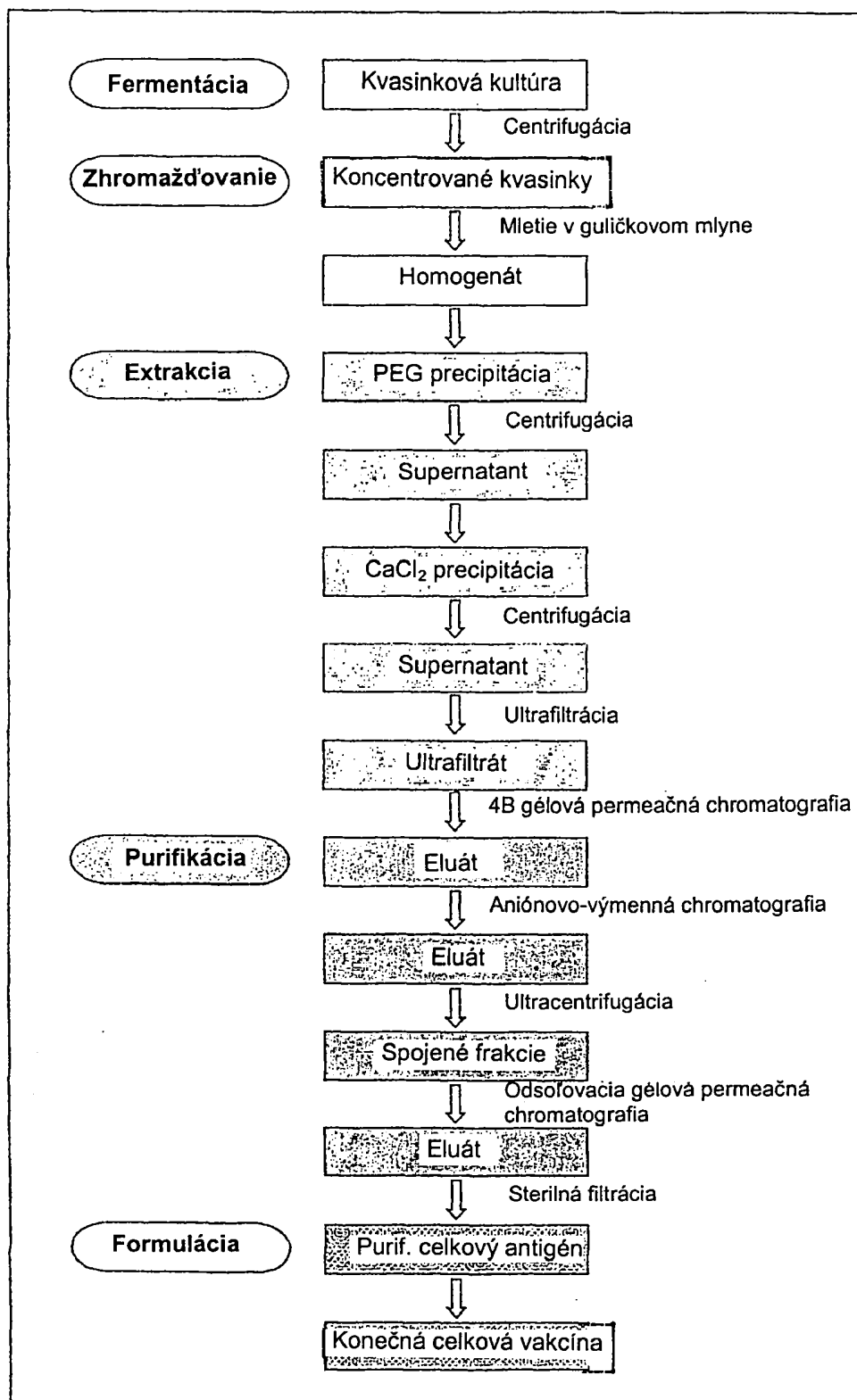
- (a) podrobí gélovej permeačnej chromatografii;
- (b) podrobí iónovo-výmennej chromatografii; a
- (c) zmieša sa s redukčným činidlom majúcom voľnú -SH skupinu.

24. Spôsob výroby hepatitídového B antigénu podľa nárokov 21 až 23, vyznačujúci sa tým, že redukčným činidlom je cysteín, glutatión, ditiotreitol alebo β -merkaptoetanol.

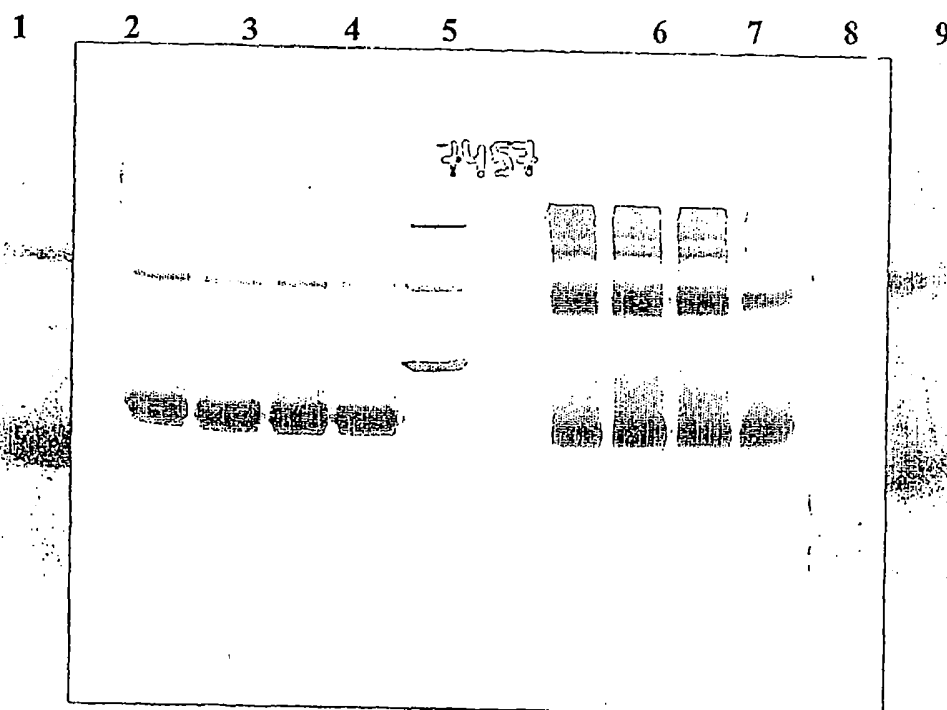
25. Imunogénny hepatitídový B antigén obsahujúci menej ako 0,025 µg ortute na 20 µg proteínu, získateľný purifikáciou v prítomnosti redukčného činidla majúceho voľnú -SH skupinu, kde sa pred spracovaním s redukčným činidlom purifikuje v prítomnosti tiomerzalu.

26. Vakcína, vyznačujúca sa tým, že obsahuje hepatitídový B antigén podľa nároku 25.

27. Spôsob liečby a/alebo profylaxie hepatitídových B vírusových infekcií, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa podávanie bezpečného a účinného množstva vakcíny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 13 až 19 a 26 človeku alebo zvieratú trpiacemu hepatitídovou B infekciou alebo náchylnému na hepatitídovú B infekciu.



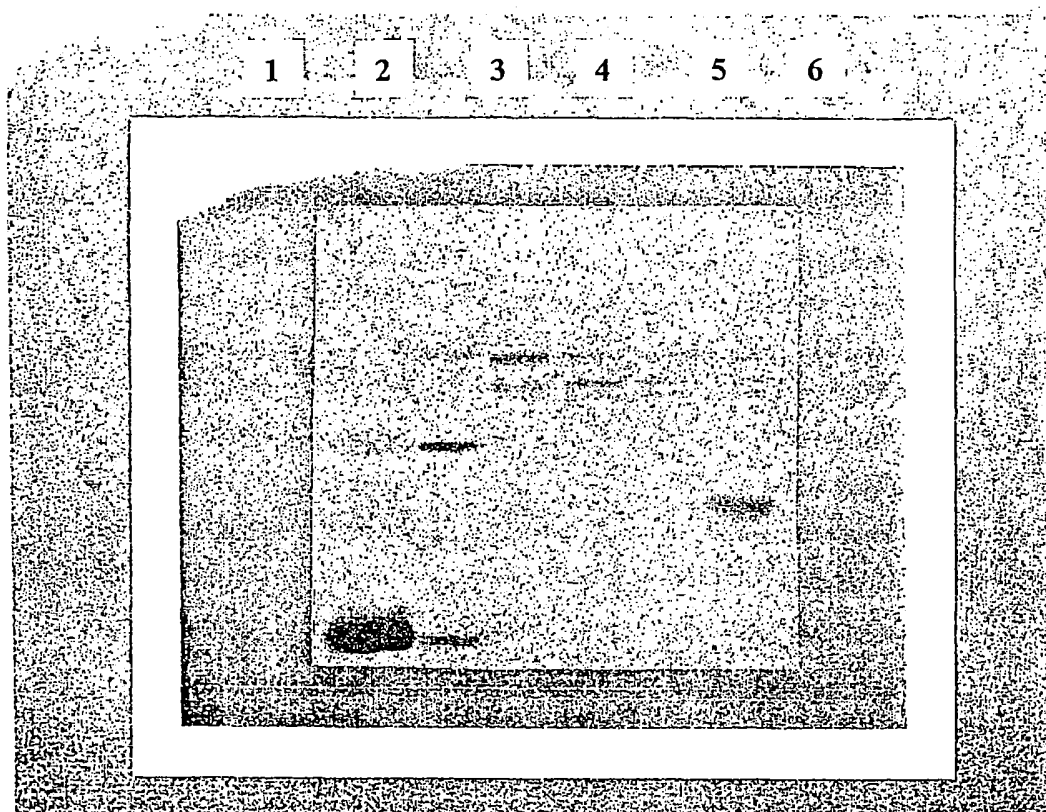
Obr. 1



- Dráha 1: HEF001, redukčné podmienky
- Dráha 2: HEF002, redukčné podmienky
- Dráha 3: HEF003, redukčné podmienky
- Dráha 4: HEP2005, redukčné podmienky
- Dráha 5: markery molekulovej hmotnosti
- Dráha 6: HEF001, neredukovaný
- Dráha 7: HEF002, neredukovaný
- Dráha 8: HEF003, neredukovaný
- Dráha 9: HEP2055, neredukovaný

Polohy markerov molekulovej hmotnosti sú označené čiernymi bodkami: 92500, 66200, 45000, 31000, 21500, 14400

Obr. 2



- Dráha 1: Markery molekulových hmotností (predfarbené)
 Dráha 2: Markery nízkych molekulových hmotností (biotinylované)
 Dráha 3: HEF001, 20 μ g proteín
 Dráha 4: HEF002, 20 μ g proteín
 Dráha 5: HEF003, 20 μ g proteín
 Dráha 6: HEP2055, 20 μ g protín

Polohy markerov molekulovej hmotnosti sú označené čiernymi bodkami: 92500, 66200, 45000, 31000, 21500, 14400

Obr. 3