



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

236 992

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 24 03 84
(21) PV 2048-84

(51) Int. Cl.³
A 61 K 39/12

(40) Zveřejněno 19 11 84
(45) Vydáno 01 10 86

(75)
Autor vynálezu

BENDA RUDOLF MUDr. CSc.,
KÖNIG JAROSLAV RNDr.,
HELM RUDOLF RNDr.,
MANČAL PETR RNDr.,
HRUDKOVÁ MARIE RNDr., PRAHA

(54)

Způsob purifikace povrchového antigenu
hepatitidy B

Vynález se týká výroby standartního imunizačního antigenu hepatitidy B (HBsAg), určeného k přípravě imunoreagencí pro průkaz HBs-antigenu a anti-HBs protilátek citlivými metodami 3. generace, popřípadě k jiným účelům, jako je příprava různých typů vakcín k sérové žloutence, monoklonálních protilátek k determinantům HBsAg aj.

Technologie izolace a purifikace HBsAg je koncipována od zpracování výchozí suroviny (plazmy, séra) přes přípravu hrubě purifikovaného koncentrátu až k přípravě a provedení finální purifikace. Postup zabezpečuje vysokou výtěžnost a zachovává antigenicitu HBsAg. Velká péče je věnována zajištění bezpečnosti práce s virulentním materiálem.

V následných purifikačních krocích jsou selektivně odstraňovány infekční viriony a purifikační postup je možno provádět v uzavřených systémech.

Oprava ve vytištěných popisech vynálezu

U popisu vynálezu k autorskému osvědčení č. 236 992 (PV 2048 - 83)
je chybně vytištěn rok PV a datum přihlášení.

Správně: PV 2048-83

Přihlášeno: 24 03 83

TS

My

Vynález se týká přípravy standardního purifikátu povrchového antigenu hepatitidy B /HBsAg/, určeného k imunizaci a přípravě imunoreagencií pro průkaz HBs- antigenu a anti- HBs protilátek citlivými metodami třetí generace, popřípadě k jiným účelům, jako je příprava různých typů vakcín k hepatitidě B, monoklonálních protilátek a biochemickým a imunochemickým studiím.

Pro výrobu standardního imunizačního materiálu HBsAg se používá jako výchozí surovina lidské sérum nebo konvertovaná plazma nosičů HBsAg vybraných převážně ze záchytů transfuzní služby, nebo kultivační médium produkčních linií tkáňových kultur.

Biochemická hodnota výchozích materiálů pro purifikaci HBsAg je určována titrem HBsAg v protisměrné imunoэлектрофорéze, který je minimálně 1:4 a vyšší, nebo stanovením koncentrace HBsAg v radiální imunodifuzi, která musí být minimálně 0,05 mg HBsAg v 1ml.

Purifikáty HBsAg nejvyšší parciální čistoty a přitom nejméně denaturované, pokud se týká antigenních vlastností, jsou získávány různými precipitačními, centrifugačními, příp. chromatografickými metodami. Vzhledem ke komplexnímu složení výchozí suroviny, lze dosáhnout žádanou kvalitu purifikátu HBsAg pouze kombinovanou technologií uvedených metod, třebaže se nám nabízí využití jednoduchého principu afinitní chromatografie. Využití afinitní chromatografie v provozních podmínkách by bylo příliš náročné a neekonomické.

V námi navrženém purifikačním postupu je brán zřetel na proměnlivé

složení výchozí suroviny, především plazmy nebo séra získaných od nosičů HBsAg. Počítáme s proměnlivým zastoupením imunokomplexů a heterogenním profilem vysokomolekulárních a lipidických složek plazmy nebo séra. Uvedené komponenty mohou svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi významně interferovat s chováním HBsAg a ovlivňovat tak účinnost purifikačního postupu.

Technologie izolace a purifikace HBsAg je koncipována od zpracování výchozí suroviny přes přípravu hrubě purifikovaného koncentráту získaného pomocí polyethylenglykolu až k provedení finální purifikace pomocí hustotní a rychlostní frakcionace. Navrženým postupem lze dosáhnout morfologicky homogenního, imunochemicky čistého, imunogenního a vysoce koncentrovaného purifikátu HBsAg.

Postup zabezpečuje 15 a 25% výtěžnost, plně zachovává antigenicitu HBsAg, protože denaturační desintegrace částic je omezena na minimum. Velkou péči jsme též věnovali zajištění bezpečnosti práce s tímto virulentním materiálem, kde potenciálně infekční virióny jsou selektivně odstraňovány během purifikace jako složky balastních frakcí. Postupně dojde k jejich úplnému odstranění, a to při nezměněné výtěžnosti žádaného produktu, kterým je neinfekční HBsAg.

Pracovní postup se skládá z následujících etap:

- defibrinogenace HBsAg pozitivní plazmy rekalcifikací za přítomnosti trombinu s následným oddělením vytvořeného fibrinu centrifugací.

Při použití séra defibrinogenace samozřejmě odpadá.

- opracování supernatantu polyethylenglykolem 6000, který je přidán

do konečné koncentrace 4 až 7 objemových procent, s výhodou 5,5 objemových procent, za pH 6,8 až 7,4, s výhodou pH= 7,0. V tomto kroku je z výchozí suroviny odstraněna větší část vysokomolekulárních složek, včetně infekčních virionů a imunokomplexů. Uvedené nežádoucí složky jsou součástí precipitátu, který je odstraněn centrifugací. Dále zpracováváme supernatant, který dosytíme přidáním polyethylenglykolu na finální koncentraci 6 až 15 objemových procent, s výhodou 7,9 objemových procent, a pH upravíme na hodnotu 3,5 až 6,5, s výhodou pH=4,5. Po centrifugaci této směsi je HBsAg přítomen v sedimentu a dochází tak k jeho koncentrování. Hlavní součástí supernatantu jsou nízkomolekulární bílkoviny, především albumin.

delipidace a hustotní frakcionace v prostředí chloridu cesného o hustotě 1,2 až 1,35 g/cm³ je nejefektivnější etapou purifikačního postupu a je v ní dosaženo nejvyšší purifikační účinnosti. Vysoké efektivnosti hustotní frakcionace je dosaženo aplikací roztoku HBsAg, kterým podvrstvujeme gradient chloridu cesného. Působením gravitačního pole centrifugy tak dochází k oddělení HBsAg od rezidua balastních bílkovin flotací. HBsAg putuje v oblasti vysoké hustoty proti směru působení odstředivé síly a balastní bílkoviny, které mají podstatně vyšší hustotu putují směrem opačným. Pro přípravu gradientu chloridu cesného můžeme použít kryogenní způsob, který je též součástí předkládaného vynálezu.

rychlostní frakcionace v sacharozovém médiu je posledním purifikačním stupněm, ve kterém dosahujeme konečného odstranění balastních složek na základě rozdílných sedimentačních konstant.

Vysoká výtěžnost navrhovaného purifikačního postupu a dosažená

čistota produktu, to je povrchového antigenu hepatitidy B /HBsAg/, je během purifikace zabezpečována průběžnou analýzou frakcí jak na obsah HBsAg, tak sérových bílkovin metodou jednoduché radiální imunodifuze. Frakce, které nevyhovují čistotou a obsahují HBsAg, jsou použity pro refrekcionaci.

Využitím výrobního postupu podle vynálezu je vyřešen základní problém výroby purifikovaného, imunogenního antigenu HBsAg, nezbytného pro přípravu avidních a specifických protilátek.

Získaná antiséra jsou svou aviditou vhodná pro využití v enzymoimunoanalýze nebo radioimunoanalýze. Jsou vhodná pro konjugaci s křenovou peroxidázou i pro značení radioaktivním jodem ze účelem detekce HBsAg, event. protilátek anti-HBsAg metodami třetí generace.

Purifikovaný HBsAg se může stát rovněž východiskem při případném vývoji různých typů vakcín proti hepatitidě B nebo jiným účelům, například k přípravě monoklonálních protilátek nebo imunochemických a biochemických analýzám.

Příklad provedení

Purifikační postup je rozdělen na pět stupňů o deseti pracovních krocích. Materiály od jednotlivých dárců - s výhodou až do kroku 3.2 včetně - jsou zpracovávány separátně, aby nedocházelo k rušivým interakcím bílkovinného materiálu získaného od různých dárců. Od kroku 3.3. je výhodné semipurifikáty z jednotlivých výchozích plazem či sér zpracovávat společně.

Výchozí surovina

238 892

K purifikaci HBsAg z lidské plazmy nebo séra nosičů HBsAg, musí být titr HBsAg v protisměrné imuno elektroforéze minimálně 1:4, případně v radioimunostanovení alespoň 0,05 mg v 1 ml.

Defibrinogenace HBsAg - pozitivní plazmy

- 1.1. Ke 100 ml plazmy jsou přidány 4 ml jednomolárního chloridu vápenatého a 1 ml roztoku srážedla Topostazinu^R / 70 N.I.H./ml/ -trombinu. Po 30 minutách inkubace při 37°C je směs uchovávána 16 hodin při +4°C. Po následující centrifugaci / Janetzki K 60, 5.000 ot/min., 60 minut, +4°C/ je dále zpracováván pouze supernatant.

Diferenciální precipitace polyethylenglykolem 6000 /PEG 6000/

- 2.1. Ke 100 ml supernatantu 1.1. je za stálého míchání přidáno 37,93 ml 20% ních objemových procent roztoku polyethylenglykolu 6000 v destilované vodě, takže vznikne v séru koncentrace 5,5 objemových procent polyethylenglykolu 6000, pH směsi je neutrální. Směs je míchána 60 minut při laboratorní teplotě a potom ponechána přes noc v klidu při +4°C. Po následující centrifugaci za stejných podmínek jako u kroku 1.1. je dále zpracováván supernatant označený "PEG A".
- 2.2. Ke 100 ml supernatantu 2.1. "PEG A" je za míchání pozvolna přidáno 20 ml roztoku polyethylenglykolu 6000 v destilované vodě, o koncentraci 20 objemových procent. Dojde tak k dosycení na koncentraci

7,9 objemových procent polyethylenglykolu 6000. Po dokonalém promíchání obou složek je přidáním 4 N kyseliny octové sníženo pH na hodnotu 4,5 / průměrná spotřeba kyseliny octové je 1,4ml na 100 ml objemu výchozí plazmy/. Směs je dále ještě míchána 60 minut při laboratorní teplotě a potom ponechána v klidu 16 hodin při +4°C.

Po následující centrifugaci za stejných podmínek jako u kroku 1.1. je dále zpracováván pouze sediment, který je resuspendován v pufru 0,01 M trihydroximetylamínometan/TRIS/, 0,15 M chlorid sodný, 0,001 M kyseliny etylendiaminotetraoctové, pH 7,2 /pufr TENa/ do 1/50 výchozího objemu suroviny a dialyzován při pokojové teplotě proti destilované vodě / 2 krát vyměněný objem destilované vody je shodný s objemem výchozí plazmy nebo séra/.

Po následující centrifugaci /Janetzki K 27,7000 ot/min, 90 minut, +4°C/ je zpracováván supernatant, který je možno spojit s vodným proplachem sedimentu / k dosažení vyšší výtěžnosti/.

Získaný supernatant je do dalšího zpracování uložen při -20°C a je označen "PEG B".

Delipidace a frakcionace v hustotním gradientu chloridu cesného /CsCl/

- .1. K 260 ml supernatantu 2.2. "PEG B" je přidáno 110 g pevného chloridu cesného/ vznikne 288 ml roztoku/. Po rozpuštění je materiál rozplněn 8 krát po 36 ml do centrifugačních zkumavek úhlového rotoru Beckman typ:42.1. a k doplnění objemu centrifugy je převrstven vodou/ 3ml/.

Po následující centrifugaci /25 000 ot/min, +10°C, 60 minut/ je z každé kyvety odebrán pouze čistý, delipidovaný supernatant, který je použit pro následující přípravu gradientu chloridu cesného.

- 3.2. Delipidovaný supernatant z bodu 3.1. je rozplněn po 28ml do osmi zatavovacích kyvet vertikálního rotoru Beckman typ:VTi 50 a protilehlé dvojice jsou pečlivě vyváženy.

Následuje kryogenní příprava gradientu chloridu cesného "in situ": centrifugační kyvety s rozplněným roztokem jsou uloženy ve vertikální poloze na 24 hodin při -20°C. Před centrifugací jsou kyvety přeneseny na 16 hodin do +10°C, kdy volným rozmrazením vznikne gradient chloridu cesného.

Vytvořený gradient je převrstvením doplněn do konečného objemu kyvety /39ml/ roztokem chloridu cesného v pufru TENa/ složení stejné jako v kroku 2.2./ o 24 hmotnostních procentech chloridu cesného. Po zatavení kyvet je materiál připraven pro hustotní frakcionaci při 35 000 ot/min, +10°C, 8 hodin ve vertikálním rotoru Beckman typ: VTi 50.

Po skončení centrifugace je od vrcholu centrifugační zkumavky odebrán roztok až do hustoty 1,25 g/cm³, obsahující HBsAg, označen "CsCl A".

Materiál o vyšší hustotě obsahuje většinu nežádoucích sérových bílkovin a není dále zpracováván.

- 3.3. Do centrifugačních kyvet rotoru Beckman typ: SW 40 je připraveno po 10 ml lineárního gradientu chloridu cesného v pufru TENa /složení shodné jako u kroku 2.2./, 8 až 32 hmotnostních procent chloridu cesného.

Takto připravený gradient je podvrstven 3 ml aktivní frakce "CsCl A" z kroku 3.2., zahuštěné na jednu pětinu získaného objemu a předem doupravené přidáním pevného chloridu cesného na hustotu $1,32 \text{ g/cm}^3$.

Vzorky jsou centrifugovány v rotoru SW 40 při 35 000 ot/min, $+5^\circ\text{C}$, po dobu 20 hodin.

Alternativně lze použít při větších objemech s výhodou vertikální rotor VTi 50. Do centrifugačních kyvet o deklarovaném objemu 39ml je připraveno po 30 ml lineárního gradientu chloridu cesného /8 až 32 váhových procent/. Gradient je podvrstven 9ml aktivní frakce "CsCl A", předem doupravené jako v předchozím případě na hustotu $1,32 \text{ g/cm}^3$. Takto je možno frakcionovat při 35 000 ot/min 8 hodin, $+10^\circ\text{C}$, najednou 72 ml aktivní frakce "CsCl A".

Po skončení centrifugace je materiál frakcionován odběrem shora na 50 frakcí. Jednotlivé frakce jsou analyzovány na přítomnost HBsAg a sérových bílkovin metodou radiální imunodifuze.

Aktivní frakce s minimálním obsahem sérových bílkovin jsou spojeny a dialyzovány proti TENa pufru /složení shodné jako v kroku 2.2./ a koncentrovány na 1/20 objemu spojených frakcí. Získaný koncentrát je označen "CsCl B" a je uchováván při -20°C .

Rychlostní frakcionace v sacharózovém gradientu

- 4.1. Aktivní koncentrát "CsCl B" je nanesen v objemech 0,2 ml na vrchol stabilizovaného /18 až 24 hodin při $+4^\circ\text{C}$ / lineárního sacharozového gradientu /9 až 21 objemových procent sacharózy v TENa pufru/stejného složení jako v kroku 2.2.//, připraveného v polyallomerových

nebo nitrocelulózových zkumavkách rotoru Beckman typ: SW 40.

Po následující centrifugaci v rotoru SW 40 při 40 000 ot/min, $+5^{\circ}\text{C}$, w^2t 300×10^9 , je materiál frakcionován buď odběrem shora jako v předchozím případě, nebo ode dna a analyzován stejným způsobem jako v kroku 3.3.

Aktivní frakce neobsahující sérové bílkoviny jsou spojeny a dialyzovány proti pufru: 0,01 M fosfát, 0,15 M chlorid sodný, pH 7,2 /PBS/.

Adjustace a analýza purifikátu HBsAg

5.1. Konečný purifikát po dialýze proti PBS pufru/složení stejné jako v kroku 4.1./ je analyzován spektrofotometricky a adjustován na obsah bílkovin: $1\text{mg}/1\text{ml}$ / $E_{10\text{mg}/\text{ml}}^{280\text{nm}} = 37,3\%$, rozplněn po alikvótech 1mg a uchováván při -20°C .

5.2. Kvalita purifikátu je ověřena spektrofotometricky stanovením poměru aminokyselin tryptofan/tyrosin, stanovením koncentrace bílkovin metodou Lowry, koncentrace HBsAg metodou radioimunodifuze a specifické koncentrace HBsAg v produktu.

Vysoký obsah detekovaného tryptofanu, vysoký extinkční koeficient a vysoká specifická koncentrace jsou ukazateli vysoké kvality purifikátu.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

238 992

1. Způsob purifikace povrchového antigenu hepatitidy B / HBsAg/, vyznačující se tím, že na povrchový antigen hepatitidy B z lidského séra, konvertované plazmy nebo kultivačního média produkčních linií tkáňových kultur se působí polyethylenglykolem o výsledné koncentraci 4 až 7 objemových procent, při pH 6,8 až 7,4 a po odstředění se působí polyethylenglykolem o výsledné koncentraci 6 až 15 objemových procent, při pH 3,5 až 7,0 a po odstředění se sediment zpracovává dvakrát hustotní frakcionací v médiu chloridu cesného o hustotě 1,2 až 1,35 g/cm³ a po odstředění se sediment zpracovává rychlostní frakcionací v médiu sacharózy.
2. Způsob purifikace podle bodu 1, vyznačující se tím, že při prvním působení polyethylenglykolu je jeho výsledná koncentrace 5,5 objemových procent při pH 7,2.
3. Způsob purifikace podle bodu 1, vyznačující se tím, že při druhém působení polyethylenglykolu je jeho výsledná koncentrace 7,9 objemových procent při pH 4,5.
4. Způsob purifikace podle bodu 1, vyznačující se tím, že při hustotní frakcionaci je frakcionovaný materiál podvrstvený tak, aby frakcionace se dosáhla flotací.
5. Způsob purifikace podle bodu 1, vyznačující se tím, že gradient hustotního média chloridu cesného se připravuje zmrazením média na teplotu nižší než -10°C a následným rozmrazením při teplotě -5 až +50°C, s výhodou při +10°C.