

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 86 321

REQUERENTE: PASTEUR VACCINS, francesa, industrial e comercial, com sede em 1 Boulevard Raymond Poincaré, 92 430 MARNES-LA-COQUETTE, França

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DUMA VACINA CONTRA A HEPATITE B"

INVENTORES: PHILIPPE JEAN ADAMOWICZ, MARIE NOELLE MEVELEC e MARC GIRARD

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

Em França em 10 de Dezembro de 1986, sob o N.º 86 17 265

Wifama

P.I.Nº. 86 321

MEMÓRIA DESCRITIVA DO INVENTO
para
"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DUMA VACINA CONTRA
A HEPATITE B"
que apresenta

PASTEUR : VACCINS, francesa, industrial,
e comercial, com sede em Boule-
vard Raymond Poincaré, 92430
MARNES-LA-COQUETTE,
FRANÇA.

RESUMO

Preparam-se partículas de antígenos superficiais (HBsAg) do vírus da hepatite B por expressão a partir duma cultura de células de ovário de criceto chinês (CHO) transfectadas por um plasmídeo recuperando o sobrenadante da cultura que, depois de filtração esterilizante, se concentra e se submete a uma precipitação fraccionada com polietilenoglicol (PEG), sendo o precipitado depois de retomado submetido a uma centrifugação zonal de flutuação, depois do que se procede a uma cromatografia com um meio permutador de aniões. A vacina é notável pela sua pureza e pela sua imunogenicidade, nomeadamente, pelo seu poder indutor de anticorpos anti-pré-S2.

A presente invenção refere-se a um processo para a preparação duma vacina contra a hepatite B assim como à va-



cina obtida por realização prática do referido processo.

As dificuldades de todas as naturezas encontradas na preparação industrial das vacinas contra a hepatite B por purificação do antígeno HBsAg a partir de sangue humano conduziram naturalmente a investigar a expressão de proteínas antigénicas a partir de microrganismos transfectados por genes que codificam vírus da hepatite B.

M. Michel e col. exprimiram antígenos do invólucro do vírus da hepatite B a partir de células do ovário de criceto chinês (CHO) (ver referência 1) transfectadas por um plasmídeo que contém o gene HBsAg completo. Estas células segregam, de maneira contínua e para o meio de cultura celular, partículas de HBsAg que contêm também proteínas pré-S2 e S.

No entanto, a quando desta expressão, as partículas de HBsAg encontram-se num meio de cultura de células que contêm substâncias indesejáveis tais como proteínas de soro de vitelo utilizado para o crescimento de células, proteínas e ADN celulares e partículas retrovirais. Estas partículas retrovirais são fornecidas pela célula de origem antes da transfecção.

A presente invenção tem como objectivo remediar estes inconvenientes e proporcionar um processo para a preparação duma vacina contra a hepatite provocada por vírus B mediante a expressão do gene HBsAg introduzido em células CHO que permite produzir, à escala industrial, uma vacina contra a hepatite B.

Um outro objectivo da presente invenção é proporcionar um processo de preparação que permita preparar uma tal vacina com um grau de pureza extremamente elevado, nomeadamente pelo que diz respeito ao ADN ou aos fragmentos de ADN celular e ainda aos retrovírus que contaminam as células CHO.

Um outro objectivo da presente invenção consiste



em realizar uma vacina do tipo mencionado que apresente um poder de protecção particularmente elevado.

O objecto da presente invenção é constituído por um processo para a preparação duma nova vacina recombinante contra a hepatite B, em que se produzem partículas antigénicas de superfície da hepatite B por expressão a partir duma cultura de células CHO transfectadas por um plasmídeo que possui o gene HBsAg de maneira a libertar as partículas de superfície antegénicas para o meio de cultura, caracterizado pelo facto de

- se recuperar o meio sobrenadante de cultura proveniente de, pelo menos, uma cultura, de preferência, efectuada com um pequeno teor em soro animal;

- se efectuar uma filtração esterilizante do sobrenadante;

- se proceder a uma concentração, de preferência igual a cinquenta vezes, de preferência, por ultrafiltração;

- se efectuar uma precipitação do concentrado com o auxílio dum agente de precipitação não degradante em condições em que precipitam as classes pesadas de ADN, envolvendo a referida precipitação igualmente as partículas retrovirais assim como proteínas;

- se efectuar uma nova concentração da preparação antigénica, de preferência, com um agente de precipitação não degradante em condições em que precipitam as partículas antigénicas de superfície HBsAg e depois se retomar o precipitado num pequeno volume;

- se efectuar uma centrifugação zonal de velocidade num gradiente de densidade não caotrópico para os retrovirus de tal maneira que a sua integridade seja conservada pa-



ra permitir a sua separação das partículas HBsAg de acordo com os seus tamanhos e densidade, de preferência obtendo também uma discriminação entre as partículas antigénicas HBsAg por um lado e uma separação entre HBsAg, ADN e proteínas por outro lado;

- se efectuar uma centrifugação zonal isopícnica de flutuação eliminando os ácidos nucleicos leves e pesados e as proteínas; e

- se efectuar uma cromatografia em permutador de aniões para adsorver os vestígios de ácidos nucleicos e de proteínas não de HBsAg restantes.

Por agentes precipitantes não degradantes, entendem-se os agentes que evidentemente não degradam os antígenos HBsAg e nomeadamente os do tipo S e pré-S mas que também não têm efeito caotrópico ou dissociante em relação às partículas retrovirais. O agente preferido é o polietilenoglicol ((PEG). Entre outros agentes pode citar-se nomeadamente o sulfato de amónio.

As operações de purificação não desnaturam portanto as partículas HBsAg e nomeadamente não desnaturam as proteínas pré-S que são as mais expostas. Entre os agentes precipitantes convenientes, prefere-se o polietileno-glicol (PEG) escolhendo nomeadamente um peso molecular da ordem de 4 000 a 20 000, o que permite, em condições convenientes, tais como nomeadamente uma concentração de PEG da ordem de 5 %, precipitar as partículas retrovirais permitindo igualmente precipitar fundamentalmente as classes pesadas de ADN, conservando as partículas de HBsAg no sobrenadante do precipitado. Estas podem ser recuperadas num volume muito pequeno, de preferência, depois de as ter precipitado por adição de PEG com uma concentração mais forte.

O gradiente de densidade no qual se efectua a

Wifama

centrifugação zonal de velocidade é igualmente previsto de maneira a não se alterar o antigene HBsAg, incluindo a antigenicidade S e pré-S. Além disso, este gradiente é previsto de maneira a não ter efeito caotrópico sobre as partículas retrovirais e de maneira a que a sua integridade seja conservada. De preferência, este gradiente com pequena força iónica é um gradiente de sacarose. Como variante, é também possível utilizar outros gradientes de densidade, nomeadamente, o glicérol.

A centrifugação zonal de velocidade que assim se efectua num tal gradiente de densidade permite eliminar assim de maneira extremamente eficaz as partículas retrovirais. Ao mesmo tempo, pode-se conseguir obter uma certa purificação em ADN, nomeadamente em cadeias pesadas, e em proteínas.

A centrifugação zonal isopícnica de flutuação realizada num gradiente salino de densidade, tal como KBr, efectua-se assim com uma preparação praticamente desprovida de maneira completa de partículas retrovirais. No entanto, se partículas retrovirais contaminassem a amostra a purificar, o efeito caotrópico do sal que constitui o gradiente de densidade destruiria a estrutura viral e libertaria o genoma viral com ARN na zona densa do gradiente em que estacionaria, permitindo assim a sua separação do antigene HBsAg.

Esta operação permite fazer uma eliminação da quase totalidade das proteínas assim como de vestígios de ADN leve ou pesado subsistentes.

Enfim, a cromatografia com permuta de aniões permite adsorver os eventuais vestígios de ácidos nucleicos tanto de ADN como de ARN ainda restantes e de proteínas.

Outras vantagens e características da presente invenção serão evidenciadas mediante a leitura da descrição seguinte feita a título de exemplo não limitativo.

Wifama

6

1. PREPARAÇÃO DA CULTURA DE CÉLULAS

Um clone da linha de células CHO transfectadas por um plasmídeo recombinante (pedido de patente francesa FR-A-84.03564, publicado sob o número 2 560 890) compreendendo o gene do vírus da hepatite B codificando o antígeno HBS (regiões pré-S e S) é multiplicado a partir duma ampola dum banco de células em unidades de fermentação de volumes crescentes. A última multiplicação realiza-se em fermentador de 300 litros, propagando-se as células sobre microesferas em suspensão no meio de cultura. Para estas operações de multiplicação, o meio de crescimento contém 4 a 10 % de SV (soro de vitelo), preferivelmente, 5 %.

2. CULTURAS, COLHEITAS E CONCENTRAÇÃO

A primeira colheita efectua-se ao fim de 3 a 4 dias de cultura no fermentador de 300 litros: depois de decantação das esferas que suportam as células, retiram-se 250 litros de meio sobrenadante e substituem-se por um volume equivalente de meio novo que contém entre 0,2 e 4 % de SV, preferivelmente, 1 a 2 %. A cultura de células prossegue no fermentador durante 3 a 4 dias ao fim dos quais se efectua uma nova colheita de 250 litros. Pode-se operar assim até efectuar 10 colheitas sucessivas que são conservadas a +4°C com o fim de serem purificadas. Como regra geral, a primeira colheita e a colheita n.º 7 e seguintes têm um fraco título em antígeno HBS, de maneira que não são retidas para as operações de purificação.

No presente exemplo, as colheitas n.º 2 a n.º 6 foram conservadas para ser purificadas e continham 1 % de SV.

Depois de se misturarem as colheitas, filtra-se a

Wifama

7

preparação com um volume de 1250 litros através de uma membrana com 0,2 μ m e depois concentra-se cerca de 50 vezes por ultrafiltração através de membrana com o ponto de corte igual a cerca de 100 000 dalton, o que origina a colheita concentrada R.

3. PRECIPITAÇÕES FRACCIONADAS

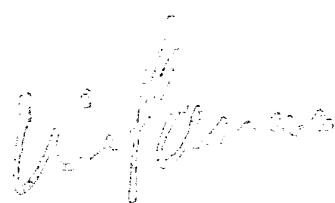
A colheita concentrada R é submetida a um fracionamento por precipitação selectiva, num primeiro tempo, dos componentes de pesos moleculares elevados, particularmente das classes pesadas de ADN e das partículas retrovirais, ficando o antigene HBs em solução e, num segundo tempo, do antigene Hbs. O agente precipitante é escolhido de tal maneira que as partículas retrovirais conservam o seu tamanho e a sua densidade por um lado e, por outro lado, a antigenicidade das partículas HBs não é alterada. O agente precipitante preferido é o polietilenoglicol de peso molecular igual a 6 000.

Para a primeira precipitação, utiliza-se uma concentração de PEG 6 000 igual a 5 % e o precipitado obtido é eliminado por centrifugação. Ao sobrenadante S adiciona-se PEG 6 000 de forma a obter-se uma concentração final igual a 9,5 %; depois da centrifugação, o precipitado é totalmente dissolvido num volume igual a cerca de 1/625 do volume total de colheitas tratado, ou seja 2 litros, aproximadamente, de preparação antigénica EC.

Nesta fase, os rendimentos de eliminação do ADN celular e das proteínas não de HBsAg são os indicados na Tabela seguinte:

	Volume em litros	ADN		Proteínas não de HBSAg	
		$\mu\text{g/ml}$	μg totais %	$\mu\text{g/ml}$	μg totais %
Mistura	1250	520×10^{-3}	650000 100	740	925×10^6 100
Colheita R	25,15	41×10^{-3}	1031 0,16	14860	374×10^6 40,4
Sobrena- dante S	27,84	$1,3 \times 10^{-3}$	36,25 0,0056	8666	241×10^6 26,0
EC	2,03	$7,67 \times 10^{-3}$	15,6 0,0024	11850	$24,06 \times 10^6$ 2,6

Vifama



Enquanto a taxa de recuperação do antígeno HBS era igual a 80 %, verificaram-se factores de eliminação de 42 000 para o ADN e de 38,5 para as proteínas.

A actividade de transcriptase inversa que reflecte o título em retrovirus não é detectável nas colheitas e por vezes ligeiramente positiva na colheita concentrada 50 vezes e, em todos os casos, é negativa no sobrenadante depois do tratamento com PEG a 5 %.

O poder de eliminação dum retrovirus nesta operação de tratamento com PEG a 5 % foi medido suplementando uma colheita concentrada com MuLV (virus de leucemia murina). Obteve-se um factor de eliminação igual a 7.

4. CENTRIFUGAÇÃO ZONAL DE VELOCIDADE

Num rotor K2 Electronics (referência 2) forma-se um gradiente de sacarose; quando a velocidade de rotação atinge 35 000 rotações/minuto, o rotor é alimentado em primeiro lugar com 500 mililitros de amostra EC a purificar (concentrado) com um débito contínuo de 2 litros/hora e depois, durante os 30 minutos seguintes, com um tampão de fosfato 65 mM de pH 6,8. Depois da paragem do rotor, o seu conteúdo é fraccionado e as fracções tituladas relativamente ao seu teor em antígeno HBS. As fracções ricas em HBSAg encontram-se nas camadas menos densas do gradiente que contêm menos do que 25 % de sacarose; elas são misturadas com as das saídas do tratamento em condições idênticas, das outras fracções de 500 mililitros de concentrado.

A mistura destas fracções é dialisada para eliminar a sacarose e, em seguida, concentrada por ultrafiltração até um volume de 0,36 litro. Obtém-se uma preparação Z10. O rendimento em HBSAg é igual a 80 %. Os rendimento de elimina-

Wifama

ção do ADN e das proteínas não HBsAg foram os seguintes:

	Volume em litros	ADN			Proteínas não de HBsAg		
		$\mu\text{g/ml}$	μg totais	%	$\mu\text{g/ml}$	μg totais	%
EC	2,03	$7,67 \times 10^{-3}$	15,6	0,0024	11850	$24,06 \times 10^6$	
Z10	0,36	$16,2 \times 10^{-3}$	5,825	0,00093	17330	$6,24 \times 10^6$	2,6 0,67

Muito embora dê resultados apreciáveis de eliminação do ADN e das proteínas não HBsAg, esta centrifugação de velocidade é sobretudo interessante pelo seu poder de discriminação entre o antigene e as partículas retrovirais.

Com efeito, quando o concentrado é deliberadamente contaminado com um retrovirus murino (virus de leucemia murina) e depois submetido a esta centrifugação nas condições acima mencionadas, as partículas retrovirais tituladas em transcriptase inversa encontram-se nas camadas densas do gradiente com um pico de actividade a cerca de 33 - 35 % de sacarose.

As partículas retrovirais reuniram-se na sua zona isodensa do gradiente, percorrendo a maior parte do gradiente enquanto ao mesmo tempo as partículas HBsAg, de constante de sedimentação mais pequena (40 segundos), só poderem percorrer um percurso pequeno no gradiente. A sua separação é garantida por um tempo de centrifugação curto.



A actividade de transcriptase inversa medida na mistura das fracções ricas em HBsAg representa 0,013 % da encontrada no pico retroviral ou seja um factor de eliminação igual a 77.

5. CENTRIFUGAÇÃO ISOPÍCNICA DE FLUTUAÇÃO

O rotor é um rotor zonal do tipo Til5-Beckman vendido pela sociedade Beckman, Palo Alto, California, Estados Unidos da América, com a capacidade total igual a cerca de 1700 mililitros (referência 3). Constitui-se um gradiente de densidade introduzindo pela periferia do rotor volumes sucessivos de solução de brometo de potássio (KBr) de maneira a constituir um gradiente de densidades compreendidas entre 1,17 e 1,35. Uma das camadas introduzidas é constituída pela amostra adicionada de KBr para que a densidade da camada seja igual a 1,25, de tal maneira que, no início da centrifugação, todas as impurezas e o antigene se encontram na parte densa do gradiente.

Depois da centrifugação a 31 000 rotações/minuto durante 20 horas e depois do fraccionamento do conteúdo do rotor, as partículas de HBsAg encontram-se na sua zona isodensa ($d = 1,22 - 1,23$), enquanto a quase totalidade das outras proteínas e do ADN se encontra nas camadas densas do gradiente. A mistura das fracções ricas em HBsAg é dialisada contra tampão de fosfato 65 mM de pH 6,8 para eliminar o KBr e equilibrar a amostra no tampão que será utilizado para a cromatografia. Obtém-se a preparação Z_{20} .

Enquanto o rendimento em HBsAg nesta centrifugação é próximo de 100 %, obtém-se factores de eliminação de ADN e de proteínas não de HBsAg muito importantes:

Wifama

	Volume em litros	ADN			Proteínas não de HBsAg		
		$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g totais}$	%	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g totais}$	%
Z ₁₀	0,360	0,0162	5,825	$9,3 \times 10^{-4}$	17330	$6,24 \times 10^6$	0,67
Z ₂₀	0,458	36×10^{-6}	0,0166	$2,7 \times 10^{-6}$	234	107×10^3	0,011

Eles são, respectivamente, iguais a 350 para o ADN e a 58 para as proteínas não de HBsAg.

Não foi possível calcular nesta fase um factor de eliminação de retrovirus porque a actividade de transcriptase inversa é totalmente destruída em meio de KBr. Esta inactivação é provavelmente devida ao efeito caotrópico do sal sobre o virus. É interessante assinalar-se que este efeito caotrópico deverá libertar o genoma viral (ARN) para o meio que se encontra, depois da centrifugação, nas camadas densas do gradiente, como o ADN celular e assim separado do pico do antígeno.

6. CROMATOGRAFIA COM PERMUTA DE ANIÕES

A preparação antigénica Z₂₀ dialisada depois da centrifugação isopícnica é passada através de resina permutadora de aniões, preferivelmente, através de celulose DE-52 Watman equilibrada com tampão de fosfato 65 mM de pH 6,8. Nestas condições, o antígeno HBs não é adsorvido pela resina permutadora, enquanto os vestígios de ADN residual e as proteínas contaminadas são fixados pela resina permutadora de aniões:

Wifana

	Volumen em li- tros	ADN			Proteínas não de HBsAg		
		$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g totais}$	%	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g totais}$	%
Z ₂₀	0,458	36×10^{-6}	0,0166	$2,7 \times 10^{-6}$	234	107×10^3	0,011
Depois da cro- mato- grafia	0,600	$12,5 \times 10^{-6}$	<0,0075	$1,2 \times 10^{-6}$	7 4200	$4,3 \times 10^{-4}$	

Obtém-se um factor importante de eliminação das proteínas não de HBsAg igual a 25 vezes, enquanto o ADN deixa de ser detectável pela técnica "dot-blot" depois da hibridação com uma sonda marcada com P32 (limite de sensibilidade = 12,5 pg/ml).

Para medir o factor de eliminação do ADN, a uma preparação Z₂₀ adicionou-se uma quantidade conhecida de ADN e cromatografou-se através de resina permutadora de aniões. A taxa de ADN encontrado no efluente da coluna era 1 000 a ... 10 000 vezes inferior ao título inicial.

A preparação antigénica assim obtida depois da purificação possui as seguintes características:

- . Proteína HBsAg..... 1 μg
- . Proteína não de HBsAg..... ~ 50 ng
- . ADN..... ~ 10^{-5} pg

Depois de electroforese sobre gel de poliacrilamida em meio dissociante, os polipéptidos corados pelo nitra-



to de prata distribuem-se por três bandas mais importantes:

- . P22 de peso molecular aparente igual a 22 000 dalton
 - . P26 de peso molecular aparente igual a 26 000 dalton
 - . P34 de peso molecular aparente igual a 34 000 dalton
- que são reconhecidos por imuno-impressão com um anticorpo monoclonal anti-S e cujo único péptido P34 é reconhecido por imuno-impressão com um anticorpo monoclonal anti-pré-S2.

7. PREPARAÇÃO DE VACINAS E IMUNOGENICIDADE

Filtra-se a preparação cromatografada através de membrana esterilizante, depois aquece-se a $+60^{\circ}\text{C}$ durante 60 minutos e, após arrefecimento, adiciona-se aldeído fórmico ($100\text{ }\mu\text{g/ml}$) e incuba-se durante 48 horas a $+30^{\circ}\text{C}$. Dilui-se esta preparação antigénica com tampão fisiológico e adiciona-se um aditivo tal como hidróxido de alumínio para se obter vacinas.

Por via subcutânea, injectaram-se doses diferentes de antigene HBs em cobaias e mediram-se os anticorpos de resposta (anti-S e anti-pré-S2) e compararam-se com os obtidos em animais injectados com doses iguais de antigene derivado do plasma humano (vacina Hévac B - Pasteur Vaccins - MARNES-LA-COQUETE - França).

ANIMAIS QUE RESPONDEM. / ANIMAIS INJECTADOS				
Resposta anti-S			Resposta anti-pré-S2	
	HEVAC B	CHO	HEVAC B	CHO
10 µg	5/10	8/10	7/10	10/10
5 µg	4/9	4/10	2/10	10/10
2,5 µg	1/10	0/10	2/10	5/10
Potência	1,0	1,2	1,0	3,0

Os anticorpos anti-S, geralmente designados anti-HBsAg, foram determinados pela técnica de Ausab-Abbot (Abbot Laboratories, Estados Unidos da América) e os anticorpos anti-pré-S2 foram determinados por um método imuno-enzimático utilizando um péptido sintético com 31 aminoácidos sobre a fase sólida, compreendendo o epítipo pré-S2, para captar os anticorpos que eram reconhecidos num segundo tempo por um anti-corpo anti-IgG conjugado com a peroxidase; depois da adição do substrato (H_2O_2) e dum reagente cromogénico (ortofenileno-diamina), mediu-se a coloração desenvolvida a 492 nm, cuja intensidade é proporcional à quantidade de anticorpos captados.

Como os resultados da tabela indicam, obtém-se uma resposta equivalente em anti-S com os dois tipos de vacina da hepatite B, enquanto se observa uma resposta mais forte de



— anti-pré-S2 com a vacina recombinada (CHO).

Referências

1. M. Michel, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81,7708-7712.
2. Progress In Separation and Purification, editado por Perry and Van Oss, Copyright 1971 por John Wiley & Sons Inc, Estados Unidos da América
3. A. Fritsch, Les Centrifugations Préparatives en Gradient de densité, 2ª. edição.

REIVINDICAÇÕES

1ª. - Processo para a preparação duma nova vacina recombinada contra a hepatite B, por meio do qual se produzem partículas antigénicas superficiais da hepatite B por expressão a partir duma cultura de células de ovário de cricete chinês (CHO) transfectadas por um plasmídeo que possui o gene HBsAg de maneira a libertar as partículas superficiais antigénicas para o meio de cultura, caracterizado pelo facto de

- se recuperar o meio sobrenadante de cultura proveniente de, pelo menos, uma cultura, nomeadamente, num meio com um pequeno teor em soro animal,

- se efectuar uma filtração esterilizante do sobrenadante,



- se proceder a uma concentração do sobrenadante,
- se efectuar uma precipitação do concentrado com o auxílio dum agente de precipitação não degradante em condições em que precipitam as classes pesadas de ADN, as partículas retrovirais assim como proteínas,
- se efectuar uma nova concentração,
- se efectuar uma centrifugação zonal de velocidade num gradiente não caotrópico para as partículas retrovirais e escolhido para permitir a sua separação das partículas de HBsAg de acordo com os seus tamanhos e densidade,
- se efectuar uma centrifugação zonal isopícnica de flutuação que elimina os ácidos nucleicos leves e pesados e proteínas e
- se efectuar uma cromatografia num meio permutador de aniões para se adsorver os vestígios de ácidos nucleicos restantes e as restantes proteínas não-HBsAg.

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se efectuar a precipitação com polietilenoglicol (PEG), nomeadamente, PEG 6000.

3ª. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de se efectuar uma primeira precipitação a uma concentração de PEG da ordem de 5 %.

4ª. - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo facto de se efectuar a nova concentração com o auxílio dum agente não degradante que precipita as partículas HBsAg antigénicas, depois do que se retoma o precipitado num pequeno volume.



5ª. - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto de se efectuar esta precipitação com PEG nomeadamente, PEG 6000 a 9,5 %.

6ª. - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo facto de se efectuar a centrifugação zonal de velocidade em gradiente de sacarose.

7ª. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de a centrifugação se fazer a 35 000 rotações por minuto.

8ª. - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 6 e 7, caracterizado pelo facto de se escolherem as fracções que têm um teor de sacarose inferior a 25 %, sendo rejeitadas as outras fracções.

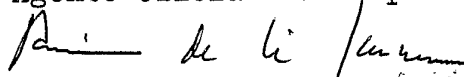
9ª. - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo facto de a centrifugação zonal de flutuação se fazer em gradiente de KBr.

10ª. - Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo facto de se recolherem as fracções que correspondem ao pico de densidade de 1,22 - 1,23.

11ª. - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo facto de se efectuar a cromatografia sobre celulose DE 52.

Lisboa, 9 de Dezembro de 1987

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



Agente Oficial da Propriedade Industrial
Agente Oficial da Propriedade Industrial
Rua Castilho, 201-3.º Esq.
Telef. 65 13 39 - 1000 LISBOA