



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(10) Identifikator
dokumenta:



HR P931103 A2

HR P931103 A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) MKP⁶: **A 61 K 39/29**
C 12 N 7/02

(21) Broj prijave: P931103A

(22) Datum podnošenja prijave patenta: 06.08.1993.

(43) Datum objave prijave patenta: 28.02.1995.

(31) Broj prve prijave: 926,873

(32) Datum podnošenja prve prijave: 10.08.1992.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US

(62) Broj i datum prvobitne prijave u slučaju podjele patenta:

(71) Podnositelj prijave:

(72) Izumitelj:

Merck & Co. Inc., P. O. Box 2000, Rahway 07065-0907, NJ, US
Robert A. Aboud, 705 Elmway Circle, 19422 Blue Bell, PA, US
John G. Aunins, 2069 Dogwood Drive, 07090 Scotch Plains, NJ, US
Barry C. Buckland, 626 Boulevard, 07090 Westfield, NJ, US
Peter A. Dephillips, 577 Hidden Valley Road, 19406 King of Prussia, PA, US
Anna J. Hagen, 4 Belmont Square, 18901 Doylestown, PA, US
John P. Hennessey jr., 114 Fox Hollow Road, 18917 Dublin, PA, US
Beth Junker, 1009 Cranford Ave., 07090 Westfield, PA, US
John A. Lewis, 2610 Skippack Pike, 19403 Norristown, PA, US
Cynthia Newell Oliver, 12220 Ambleside Drive, 20854 Potomac, MD, US
Charles J. Orella, 646 Store Road, 19438 Harleysville, PA, US
Robert D. Sitrin, 237 Emerson Drive, 19444 Lafayette Hill, PA, US
CPZ - CENTAR ZA PATENTE d.o.o., Zagreb, HR

(74) Zastupnik:

(54) Naziv izuma: **CJEPIVO ZA VIRUS HEPATITISA A**

(57) Sažetak: Kompletan, visoko reproduktivan postupak komercijalnih razmjera za proizvodnju stabilnog virusa hepatitisa A obuhvaća optimalne uvjete rasta, sakupljanja i prečišćavanja antigena, da bi se dobio >95% čist HAV na bazi proteina. Dalji stupnjevi prerade daju inaktiviranu formulaciju HAV cjepiva koje je imunogeno, dobro se podnosi i efikasno je u zaštiti protiv infekcije virulentnim HAV. U proizvodu je određen sadržaj proteina, ugljikohidrata, lipida, DNK i RNK.

HR P931103 A2

Ovo je djelomičan nastavak neriješene prijave serijski broj 07/926,873, podnijete 08/10/92, čiji je prioritet zahtjevan pod 35 USC § 120.

5 Oblast ovog izuma je proizvodnja visoko prečišćenog cjepiva za virus hepatitisa A. 1973 Feinstone i surad., /Science 182, str. 1026/ identificirali su etiološki agens infektivnog hepatitisa, kasnije poznatog kao virus hepatitisa A, koristeći se imunom elektronskom mikroskopijom.

10 In vitro kulturu virusa hepatitisa A (HAV) prvi su saopćili Provost i surad., /P.S.E.B.M. 160, str. 213, 1979/ prema postupku u kome se jetra inficiranih marmozeta koristi kao inokulum za eksplantnu kulturu jetre i kulturu ćelija fetalnog bubrega rezusa (FRhk6) /U.S. Patent 4,164,566/.

15 U jednom kasnijem izumu, uspješno je korištena direktna inokulacija HAV koji nije prethodno prošao kroz subhumani primat radi iniciranja in vitro razmnožavanja HAV (Provost i surad., P.S.E.B.M. 167, str. 201 (1981): U.S. Patent 5,021,348.

20 Iz ovog rada, prikazano je slabljenje HAV preko in vitro kulture. Pored ovoga, pokazano je da ponovljenim prolaskom in vitro kulture HAV postaju produktivnije i brzina replikacije se povećava kako je virus postajao adaptiraniji na kultivirane ćelije. Dalji razvoj je bila demonstracija zaštitne efikasnosti kod subhumanih primata oba, i živog oslabljenog virusa (Provost, i surad., J. Med Virol. 20, str. 165 (1986)/ i formalinom inaktiviranog HAV /U.S. Patent 4,164,566; U.S. Patent 5,021,348; Provost i surad., u *Viral Hepatitis and Liver Diseases*, str. 83-86, 1988-Alan R. Liss. Inc/. Iz prethodnih radova, postalo je jasno da su ili inaktivirani ili oslabljeni, imunogeni HAV mogući kandidati za cjepivo. Međutim, za humanu upotrebu potreban je reproduktivan postupak komercijalnih razmjera za proizvodnju antigena visoke čistoće kao bezbjedne HAV vakcine koja treba da bude komercijalno dostupna.

25 Opisani su različiti postupci za djelomično prečišćavanje HAV virusa (viriona) za ispitivanje i početnu karakterizaciju virusa. Vidjeti, na primjer, Hornbeck, C.L. i surad., Intervirology 6; 309-314 (1975); Locarnini, S.A. i surad., Intervirology 10; 300-308 (1978); Siegl, G. i surad., J. Virol. 26, 40-47 (1978); Siegl, G. i surad., J. Gen. Virol. 57, 331-341 (1981); Siegl, G. i surad., Intervirology 22, 218 (1984); Hughes, J.V. i surad., J. Virol. 52, 465 (1984); i Wheeler, C.M. i surad., J. Virol. 58, 307 (1986).

35 Svi ovi postupci koriste glomazne, nepraktične i pretjerano skupe stupnjeve, kao što su gradijentno centrifugiranje saharoze ili gradijentno centrifugiranje CsCl-gustine. Osim toga, ovi postupci su prilagođeni na relativno male proizvodne razmjere, i mada su neki radnici objavili da je njihov proizvod bio visoko prečišćen, pažljiva analiza rada, pokazala je da je nedovoljno parametara ispitano da bi se podržao zahtjev za bilo kakav apsolutni nivo čistoće. Tako Lewis i surad., (Evropska patentna prijava 0302692 objavljena 8. veljače 1989) opisuje postupak koji obuhvaća a) razaranje HAV inficiranih ćelija, ekstrakciju i koncentriranje; (b) propuštanje kroz anjonsku izmjenjivačku kolonu pri visokoj koncentraciji soli, da bi se uklonili kontaminanti nukleinske kiseline; i (c) gel filtracionu kromatografiju. U kasnijem radu, Lewis i surad., (Evropska patentna prijava 0468702, objavljena 18. srpnja 1989) su modificirali ovaj postupak uključivanjem jednog iono izmjenjivačkog absorpciono/desorpcionog stupnja da bi se uklonili kontaminirajući ugljikohidrati. U oba ova objavljena rada, razmjera pri kojoj se proizvodi HAV je relativno mala i problemi upućeni ovim izumom za proizvodnju velikih razmjera, komercijalno povećanih razmjera nisu uzeti u obzir. Pored toga, čistoća proizvoda je određena pomoću komasija ili bojenjem srebrom gel elektroforeziranog proizvoda. Ovaj postupak analize obezbjeđuje jednu mjeru za čistoću proteina, ali nije kvantitativan, i ne obezbjeđuje nikakvu informaciju kao što je o prisustvu ili odsustvu drugih kontaminanata kao što su lipidi, ugljikohidrati, nukleinske kiseline, ili organske supstance niskih molekulskih težina.

40 U obje EPO468702A2 i EP0302692A2 publikacije iznijeto je, da raniji postupci za sakupljanje i prečišćavanje HAV koriste jedan ili više stupnjeva koji vjerojatno sprečavaju odobrenje od strane Food and Drug Administration (Uprave za hranu i lijekove), zbog njihove upotrebe deterdženata i ekzogenih enzima. U ovom izumu se upotrebljavaju i deterdženti i ekzogeni enzimi, ali izum opisuje postupke za uklanjanje ovih korisnih reagenasa, i demonstrira da proizvod sadrži manje nego što se može detektirati ovih dodatnih supstanci, dok je isto toliko čist ili i čistiji od HAV proizvoda prikazanih u objavljenoj literaturi.

45 Isto tako, Moritsugu i surad., (Evropska patentna prijava 0339668, objavljena 2. studenog 1989), opisuju postupak koji obuhvaća:

- (a) rastvaranje, ekstrakciju, koncentriranje DNase/RNase, i tretiranje proteinazom;
- (b) frakcioniranje po gustoći saharoze (koje odvaja RNK koja sadrži prazne kapside); i
- (c) gel filtracionu kromatografiju.

Još jednom, ovaj postupak je ograničen u razmjerima proizvodnje, naročito s obzirom na stupanj frakcioniranja po gustoći saharoze. Pored toga, čistoća proizvoda se teško određuje i nije navedena u bilo kojem apsolutnom smislu u toj publikaciji.

- 5 Lino i surad., /Vaccine, vol # 10, str. 5-10 (1992)/ su objavili poboljšanja Moritsugu-evog postupka. Proizvod iz njihovog postupka je određen pomoću SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom i denzitometrijom da bi se pokazalo da ima manje od 1.9% zaostalih ekzogenih proteina u njihovom prečišćenom HAV. Oni su također zaključili da je bilo manje od 5 pg zaostalih nukleinskih kiselina ćelija domaćina u 0.5µg njihovog prečišćenog HAV. Međutim, zbog ograničenja njihovog proizvodnog postupka, proizvodnja u velikim razmjerima HAV je nepraktična, i nije navedena apsolutna čistoća na osnovu više parametara.

10 U jednom drugom radu, Kusov i surad., /Vaccine, 9, 540 (1991)/ kultivirali su HAV u Vero-sličnim ćelijama, i prečistili su virus organskom ekstrakcijom, DNase tretiranjem i kromatografijom na slojevima poroznog silicij dioksida. Ponovo, ovdje nema nikakvih indikacija o apsolutnoj čistoći proizvoda, niti ima indikacija o razmjerima.

15 I pored neodređenosti u objavljenoj literaturi u pogledu čistoće vakcine za HAV, moguće je da se uporede proizvodi cjepiva na bazi relativne antigenosti (vidjeti Tabelu 1, Primjer 11) koja pokazuje uporedne količine HAV u različitim proizvodima navedenim od strane njihovih proizvođača, u poređenju sa proizvodom iz ovog izuma.

20 Proizvod iz ovog izuma je imunogen sa karakteristikama apsolutne čistoće opisanim u ovom otkriću, predstavljajući nivo HAV čistoće i razmjere proizvodnje kojima se ranije samo težilo. Ovaj izum je daleko iznad nivoa polupogonskih postupaka malih razmjera, objavljenih za dobivanje cjepiva za HAV, i prvi put je realnost za komercijalnu proizvodnju reproduktivne visoko kvalitetne, visoko prečišćene, bezbjednog cjepiva za HAV.

25 Postupak koji obuhvaća kultiviranje HAV u bioreaktoru sa stacionarnom površinom velikih razmjera, sakupljanje virusa deterđentom, tretiranje nukleazom, koncentriranje, ekstrakciju organskim otapalom, iono-izmjenjivačku kromatografiju, i gel filtracionu kromatografiju, obezbjeđuje reproduktivne načine proizvodnje stabilnog cjepiva za HAV proizvode sa HAV proteinskom čistoćom od > 95%. Nivoi DNK, ugljenog hidrata, RNK i lipida određuju se za cjepivo.

30 Sl. 1 Složeni procesni dijagram glavnih postupaka upotrebljenih za proizvodnju cjepiva za hepatitis A za kliničke probe. Lijeva strana predstavlja postupak prema ranijoj tehnici upotrebljen za faze I/II kliničke probe koje koriste postupak sa kotrljajućom bocom. Novi postupak upotrebljen za Monroe-vu studiju efikasnosti (New England J. of Med., 327:453-457 1992) je sa desne strane, a proizvodni postupak prema ovom izumu je prikazan u sredini.

35 Sl. 2 Analiza analitičkom granulacijom u toku postupka upotrebljavajući HPSEC TSK PW 4000 kolonu eluiranu sa fosfatom puferiranim slanom otopinom, PBS. Ova analiza je kalibrirana prema visoko molekulskim standardima i predstavlja linearni površinski odgovor sa razblaženjem virusa hepatitisa A. Analiza je naročito korisna u kasnijim stupnjevima prečišćavanja. Ovdje su prikazana četiri kromatograma iz posljednja četiri stupnja proizvodnog postupka.

40 Kromatografija se registrira pomoću dvostruke UV detekcije na 214 nm (gornji trag pomoću indikatora), i odnosno 260 nm (donji trag pomoću indikatora). Upotrebljavajući ovu analizu, pik koji odgovara virusu hepatitisa A je prvo vidljiv poslije ponovnog suspendiranja PEC peleta (panel A). Stupanj ekstrakcije kloroformom uklanja mnogo od materijala visoke molekulske težine, koji apsorbiraju UV (panel B). Anjonska izmjenjivačka kromatografija služi da se koncentrira virus (panel C) i preparativna ekskluziona kromatografija po veličini daje preparat visoko prečišćenog virusa (panel D).

45 Prečišćeni virus hepatitisa ima lošu absorpciju u oblasti 260 ili 280 nm tako da je prisutan samo trag pomoću indikatora na 214 nm. Pod uvjetima ove analize HAV proizvod je dat kao jedinstven, simetričan pik i stoga analiza obezbjeđuje mjeru za čistoću HAV, nezavisno od analize pomoću SDS PAGE.

50 Sl. 3 Rast MRC-5 ćelija na staklu, polistirolu i 316 nerđajućem čeliku. Koncentracija površina ćelija se nanosi kao funkcija vremena. Ćelije se inokuliraju na kuponima svakog od materijala pri gustini približno od 10.000/cm² i kupon se žrtvuje svakodnevno radi brojanja ćelija. Ćelije na kuponima od staklenih pokrivnih pločica (mikroskopskih) i na kuponima od 316 nerđajućeg čelika se kultiviraju u petri zdjelama od 150 cm² koje sadrže 90 ml medija (0.6 ml/cm²); ćelije gajene u T-bocama od 25 cm² se kultiviraju sa 7.5 ml medija (0.3 ml/cm²).

55 Sl. 4 Rast MRC-5 ćelija i koncentracija preostale glukoze za ćelije gajene na kuponima od 316 nerđajućeg čelika. Koncentracija površine ćelija (ćelije/cm²) i koncentracija glukoze (mg/cm²) nanose se kao funkcija od vremena (d) za ćelije gajene na kuponima od 25 cm² nerđajućeg čelika.

60 Sl. 5 Svjetlosni mikrogram MRC-5 ćelija gajenih na mreži od nerđajućeg čelika. Ćelije su inokulirane pri 5,000-10,000 ćelija/cm² i kultivirane u višku od 2 nedjelje. Uveličanje 40X.

Sl. 6 Bojenje sposobnih za život i ne-sposobnih za život MRC-5 ćelija gajenih na mreži od 316 nerđajućeg čelika. Ćelije su bojene sa fluorescein diacetatom (FDA) i etidij bromidom (EB) prema protokolu opisanom u odjeljku Materijali i Postupci iz Primjera 14, i zatim su posmatrane upotrebljavajući skeniranje laserski konfokalni mikroskop; materijal je skeniran (razlagan) u inkrementima od 57 μm . Slika 6A odgovara fluorescenciji od fluoresceina i pokazuje za život sposobne ćelije. Slika 6B je fluorescencija uslijed etidij bromida bojenja DNK, pokazujući skoro kompletnu sposobnost za život ćelija. Pozitivna kontrola za etidij bromid je prikazana na Slici 7.

Sl. 7 Bojenje etidij bromidom za život ne-sposobnih MRC-5 ćelija. Ćelije gajene na mreži od 316 nerđajućeg čelika su učinjene ne-sposobnim za život tretiranjem sa 100% metanolom. Poslije dobrog pranja sa PBS i ostavljanja da se osuše, ćelije su obojene sa FDA/EB da bi služile kao negativna kontrola za FDA i kao pozitivna kontrola za etidij bromid (naslikano). Nikakva fluorescencija nije uočena uslijed proizvodnje fluoresceina za negativnu kontrolu.

Sl. 8 Efikasnost sijanja je nanijeta za svaki element u mikser reaktoru sa statičkom mrežom (dauze static mixer reactor) za protokole koji koriste gravitacionu sedimentaciju ili recirkulaciju medija. Elementi su numerirani od 1 do 5 pri čemu je 1 element na vrhu a 4 ili 5, su elementi na dnu elementa su upotrebljena u eksperimentima gravitacione sedimentacije i 3 za recirkulacione eksperimente).

Efikasnosti sijanja prikazane ovdje su postotak ukupnog zasijavanja; ukupne efikasnosti sijanja su reda veličine od 90%. Podaci za recirkulaciju su prosječna vrijednost iz 3 eksperimenta, dok je vrijednost za gravitacionu sedimentaciju iz jednog eksperimenta. Recirkulacione brzine su bile približno 6 cm/h.

Sl. 9 Brzine preuzimanja glukoze (GUR) kao funkcija od vremena za reaktore koji sadrže elemente čvrstog titana i mreže od 316 nerđajućeg čelika. GUR na bazi cm^2 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{d}$) prema vremenu (d) je prikazano u Slici 9A, dok je GUR na bazi zapremine reaktora nanijeta na Slici 9B. Rezultati na Slici 9A su u zavisnosti od utvrđenih površinskih oblasti elemenata, dok Slika 9B ne predstavlja nikakvo utvrđivanje pošto su oba reaktora iste zapremine.

Sl. 10 Postotak ukupnog proteina promatran u narednim lizatima za postojan mikser sa statičkom mrežom. Protokoli za lizate 1-4 su opisani u tekstu. Mikroskopskim promatranjem, su bili bez ćelijskog debrisa, dok su elementi mreže sadržavali znatno ćelijskog debrisa poslije četiri lizisa.

Sl. 11 Brzine preuzimanja glukoze kao funkcija od vremena za mikser reaktor sa statičkom mrežom od 316 nerđajućeg čelika. Reaktor je inficiran sa MOI od 1 na dan 7 i sakupljanje je izvršeno na dan 28.

Sl. 12 Postotak ukupnog proteina HAVAg u narednim lizatima za mikser sa statičkom mrežom prikazan na Slici 11. Protokoli za lizate 1-4 su opisani u tekstu. Ukupan protein lizata 1 je bio umjetan visok zbog neefikasnog PBS pranja.

Sl. 13 Efekat MOI na rast ćelija i potrošnju glukoze. Ćelije su inficirane sa MOI od 0. 1, i 10 sa HAV CR326FP28. Nisu uočene razlike u gustoći ćelija (13A) i preostaloj glukozi (13B) sve do 8 dana poslije infekcije ovog sistema. Potpuno ponovno šaržiranje medija izvršeno je na dan 8.

Sl. 14 Ćelijski protein izmjeran prema BSA standardu prema broju ćelija. Najpogodnija interpolaciona linija je opisana jednačicom: $Y(10^4) = -0.09 + 0.42X$, $r=0.99$. Ova slika pokazuje da jedna kriva obezbjeđuje načine za mjerenje broja MRC-5 ćelija pomoću ukupnog proteina, bez obzira na "stanje" ćelija.

Sl. 15 Slika 14 je ponovo nanijeta, pokazujući vrijeme za svaku točku rezultata.

Sl. 16 Konverzija ukupnog proteina prema broju ćelija blisko podsjeća na gustoću ćelija dobivenu upotrebljavajući Coulter brojač (Coulter Counter). Vjeruje se da su neslaganja uslijed malih zapremina lizis pufera upotrebljenog u sakupljanju T-25a ($2 \times 0.08 \text{ ml}/\text{cm}^2$ je upotrebljeno radi konzistencije).

Sl. 17 Prečišćavanje preko stupnja ekstrakcije otapalom, HPSEC profila (proizvodne serije konzistencije).

Sl. 18 Prečišćavanje preko stupnja ekstrakcije otapalom, HPSEC profili (probne serije).

Sl. 19 Efekat vremena mješanja na odnos Hep A/nečistoće.

Sl. 20 Efekat vremena mješanja na površine Hep A i nečistoća (mućkalica, boce od 50 ml, 6 minuta).

Sl. 21 Efekat vremena mješanja na površine Hep A i nečistoća (Mućkalica, boce od 500 ml, 2 minute).

Sl. 22 Efekat vremena mješanja i zapremine epruvete na površine Hep A i nečistoća (Mućkalica).

Sl. 23 Efekat odnosa otapala /vode na odnos Hep A/ nečistoće.

5 Sl. 24 Efekat odnosa otapalo/voda na odnos površina Hep A i nečistoća (Mućkalica).

Sl. 25 Efekat vremena mješanja i tipa na odnos Hep A/nečistoće.

Sl. 26 Stabilnost uzorka hepatitisa A određena pomoću HPSEC.

10 Sl. 27 Efekat soli na otopljivost hepatitisa A (na 4 stupnjeva).

Sl. 28 Efekat soli na otopljivost hepatitisa A (na 4 stupnjeva).

15 Sl. 29 Kalibraciona kriva molekulskih težina, PW4000xl.

Sl. 30 Log površine pika hepatitisa A prema log koncentraciji hepatitisa A.

Sl. 31 Kalibracione krive hepatitisa A.

20 Sl. 32 Poređenje uzoraka filtriranog lizata i nukleazom tretiranog lizata, UV na 214 nm.

Sl. 33 Poređenje uzoraka filtriranog lizata i nukleazom tretiranog lizata. UV na 260 nm.

25 Sl. 34 Uzorak ponovo suspendiranih PEG peleta. UV na 214 nm.

Sl. 35 Uzorak kloroformom ekstrahirane vodene faze iz Rx2011008. UV na 214 nm.

Sl. 36 Uzorak proizvoda anjonske izmjene iz Rx2009854. UV na 214 nm.

30 Sl. 37 Proizvod ekskluzione kromatografije po veličini. UV na 214 nm.

Sl. 38 Uzorak proizvoda ekskluzione kromatografije po veličini (SEC) iz Rx2011008. UV na 214 nm.
Zadržani pik vidljiv na oko 49 minuta.

35 Sl. 39 Korelacija EIA i HPSEC rezultata iz uzoraka iz 11 serija.

Sl. 40 Vrijednosti postotaka površine iz 4 uzoraka iz 13 hepatitis A serija.

40 Komercijalno prilagodljiv postupak prečišćavanja prema ovom izumu obuhvaća prečišćavanje bilo kojeg virusa hepatitisa A (HAV), bilo da je izveden iz oslabljenog ili virulentnog HAV, proizvedenog u bilo kojem soju ćelija, liniji ili kulturi sumnjivoj na infekciju sa HAV. Pored toga, svi HAV kapsidi, bilo prazni (bez virusnih nukleinskih kiselina) ili kompletni (koji sadrže virusne nukleinske kiseline) su obuhvaćeni unutar postupka prema ovom izumu.

45 HAV na pasažu dvadeset i osam (P28CR326F'; radi klasificiranja varijanti koje nastaju iz CR326, kao što je soj CR326F i CR326F', i srodnosti ove nomenklature prema apsolutnom nivou pasaža, vidjeti Provost i surad., J. Med Virol., 20: 165-175, 1986) se upotrebljava za inficiranje MRC-5 ćelija u ovom izumu, samo radi ilustrativnih ciljeva, a proizvodni materijal se kultivira na P29. P28CR326F' je oslabljeni HAV soj. Drugi sojevi HAV su obuhvaćeni ovim izumom, uključujući HAV sojeve koji se mogu oslabiti uobičajenim tehnikama: Druge pogodne linije ćelija za HAV razmnožavanje uključuju Vero, FL, WI-38, BSC1, i FRhK6 ćelije. Ovi i drugi sistemi za HAV razmnožavanje i kulture ćelija su prodiskutirane u Gerety, R.J. "Active Immunization Against Hepatitis u Gerety, R.J. (izd) Hepatitis A Academic Press 1984, str. 263-276; i Ticehurst. J.R.. Seminars in Liver Disease 6, 46-55 (1986). U principu, bilo koja linija ćelija kao što je bilo koja humana diploidna fibroblastna linija ćelija, može da služi kao ćelija domaćina za HAV pod uvjetom da je osjetljiva na HAV infekciju. Prvenstvena linija ćelija za proizvodnju vakcine je MRC-5.

55 Postupak komercijalnih razmjera prema ovom izumu obuhvaća stupnjeve:

(a) Kultiviranje velike količine hepatitisa A virusa (HAV) u pogodnom reaktoru za kulturu i medijumu

60 Prvenstveni načini za postizanje ovog obuhvaćaju, ali nisu ograničeni na, upotrebu HAV adaptiranog na rast u humanim diploidnim plućnim ćelijama pogodnim za proizvodnju cjepiva. Pogodne su WI3B ćelije ili MRC-5: Ove ćelije se gaje na

mikro-nosačima ili slojevima ćelija u balonima ili okretnim bocama. Postupak prema ovom izumu koristi velike površinske oblasti, multilamelarnih bioreaktora kao što su "NUNC CELL FACTORY, COSTAR CUBE Static Surface Reactor (SSR) static mixer reaktor" NUNC ćelijska Tvornica, COSTAR kubični reaktor sa statičkom površinom (SSR), ili statički mikser reaktor kao što je opisano u U.S. Patentima 4,296,204, 4,415,670, ili kao što je ovdje dalje opisano u mikseru sa statičkom površinom sa mrežom od nerđajućeg čelika, u zavisnosti od željenih razmjera proizvodnje. Prema tome, u prvenstvenoj realizaciji ovog izuma, MRC-5 ćelije se gaje u slojevima ćelija u COSTAR kubičnom SSR od 85,000 cm², ili SSR sa mrežom čak i veće površine, inficirane pri multiplicitetu infekcije (MOI) HAV dovoljnoj da se postigne efikasna infekcija kulture ćelija. MOI od oko 0.01 - 10 je pogodna. Šarža sjemena se pogodno dobiva upotrebom HAV iz frakcije gornjeg sloja tečnosti (supernatanta) SSR inkubiranog oko 28 dana.

U prvenstvenoj realizaciji, HAV se kultivira na MRC-5 ćelijama gjenim na mreži od nerđajućeg čelika. (Vidjeti Primjer 14). Prema ovoj realizaciji, upotrebljava se bioreaktor u kome su elementi smjese napravljeni od bilo kojeg pogodnog, netoksičnog materijala na kojem ćelije mogu da rastu. Takvi elementi mogu da budu napravljeni od nerđajućeg čelika, titana, plastičnih ili sličnih materijala koji mogu da budu pripremljeni u regularnoj trodimenzionalnoj površini. Prvenstveno se upotrebljavaju elementi smjese od 316 nerđajućeg čelika kao što su oni dostupni od Sulzer Biotech Systems (naročito SMV, SMX, EPack EX, DX, BX, CY). Svaki element se sastoji od uniforme površinske oblasti slojeva smjese na kojima mogu da se gaje ćelije. Svaki element regularne mreže smjese je orijentirana pod kutevima od 0-90° jedan prema drugome u sterilnom reaktorskom sistemu. Konfiguracija može da bude linearna kolona ili bilo koji drugi geometrijski oblik podešen da može da se smjeste elementi smjese i koji dobro koristi zapreminu. Ćelije se tada zasijavaju i ostave se da se pričvrste (vežu) na veliku površinu obezbjeđenu smjesom. Jednom kada su ćelije dobro uspostavljene u kulturi, one mogu da se napajaju pri brzini prskanja dovoljnoj da se održava izmjena hranljivih materija i da se uklanjaju otpadni proizvodi. Pri bilo kojoj pogodnoj gustoći ćelija, ćelije se inficiraju sa HAV kao što je opisano kasnije.

Prednost meš elemenata je ta, što vlaknasti sloj omogućava više površinske oblasti na jedinicu zapremine. Geometrijski precizna smjesa omogućava uniformni rast fibroblasta preko površine, do poznatih i konstantnih dubina, što omogućava kontrolu uručivanja hranljivih materija. Uniformnost smjesa također omogućava predvidljive točke kontakta između vlakana, što omogućava brzu migraciju ćelija tako da pokriju mrežu od vlakana. Konfiguracija statičkog miksera kontrolira neposrednost površina rasta jedne prema drugoj tako da se sprečava prirodan biološki rast i "prljanje" reaktora. Ovo je ozbiljan problem koji se javlja u nasumce pakiranim reaktorima sa slojevima, gdje ne-uniformnost pakiranja omogućava lokalizirane regione rasta ćelija koji tada izazivaju opadanje toka hranljivih materija i kasnije gladovanje ćelija.

Razumljivo je da okvir ovog izuma obuhvaća, pored pasaža 18, P18, p28, p29, p72 soja CR326F Hav-a, i bilo koju HAV varijantu soja, bilo da je oslabljena ili virulentna. Oslabljene varijante sojeva mogu da se izoliraju serijskim pasažom u ćelijama, životinjama ili drugim postupcima. Vidjeti, na primjer Provost, P.J i surad., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 170,8 (1982); Provost, P.J. i surad., J. Med. Virol. 20, 165 (1986); U.S. Patent 4,164,566 i 5,021,348 za detalje oslabljivanja. Postupci prečišćavanja su brzo i lako prilagodljivi za oslabljene ili virulentne HAV sojeve.

Ostavi se da se HAV replicira u SSR do pika proizvodnje virusa. Za oslabljenu kulturu ćelija adaptirani HAV kao što je CR326FP28, uzima se od 7-35 dana, u zavisnosti od početne MOI i gustoće ćelija, tokom kojeg vremena hranljivi medij konstantno cirkulira kroz otvor koji omogućava izmjenu, plina. Medij kulture ćelija može da bude bilo koji medij koji omogućava aktivan rast MRC-5 ćelija i replikaciju HAV. Prvenstveno, medij kulture se ponovno doprema i uklanjanje brzinom između oko 0.010 i 0.3 ml/cm²/dan. Ova brzina je fleksibilna pošto je brzina dobivanja mase ćelija potpuno izlaganje mediju.

Prema tome, u prvenstvenoj realizaciji ovog izuma, MRC-5 ćelije se gaje na slojevima ćelija u SSR od 340.000 cm² (na primjer, upotrebljavajući četiri elementa od 85,000 cm²) ili mrežu SSR čak i veće površine, inficiranim pri multiplicitetu infekcije (MOI) HAV od oko 0.1 - 1.0, i ostavi se da se HAV replicira do pika proizvodnje virusnog antigena. Za ovo je potrebno oko 28 dana, u toku kojeg vremena se ponovno dodaje hranljivi medij i cirkulira kroz reaktor za kulturu i otvor koji omogućava izmjenu plina. Medij kulture može da bude bilo koji medij koji potpomaže rast ili održavanje MRC-5 ćelija i replikaciju HAV. Mi smo utvrdili da je najpogodniji medij, onaj koji sadrži osnovni medij, kao što je William-sov Medij E, dopunjen sa pogodnim faktorima rasta. Kao izvor faktora rasta mi smo utvrdili da je najpogodniji teleći serum dopunjen gvoždem.

(b) Sakupljanje kultiviranog HAV

Postupak sakupljanja kultiviranog HAV će biti diktiran, do neke mjere, geometrijom reaktora kulture. Uglavnom, poslije kultiviranja za oko 28 dana sa zamjenom hranljivog medija, medij kulture se ispušta i sakuplja se HAV. Ranije, za razmnožavanje virusa u malim razmjerima, ovo se postiže struganjem, a zatim zamrzavanjem dovodi do semitečnog stanja i opciono tretiranjem sa ultrazvukom, da bi se optimiziralo oslobađanje ćelijski vezanog virusa. U postupku prema ovom izumu, ćelijski vezani HAV se oslobađa u minimalnu zapreminu otopine od sakupljanja. Prvenstveno, otopina od sakupljanja sadrži komponentu efikasnu da učini ćelije propustljivim za HAV. Takve komponente su poznate u tehnici.

Prvenstveno se dodaje deterdžent kao što je Triton X-100, NP-40, ili jedan ekvivalent pri najmanjoj mogućoj efikasnoj koncentraciji, da pomogne kasnije uklanjanje. Nađeno je da je snabdjevanje od oko 0.05-0.5%, i prvenstveno 0.1% Tritona X-100 odgovarajuće za postizanje efikasne ekstrakcije HAV iz ćelija kultiviranih u NUNC ćelijskim tvornicama, COSTAR kubičnim, ili bilo kojoj kulturi ćelija za slojeve. Prednost upotrebe ekstrakcije deterdžentom, naročito iz SSR kao što je COSTAR kubični je ta da je geometrija takvog reaktora kulture takva da ne omogućava sakupljanje mehaničkim načinima, osim do opsega da se HAV nalazi u gornjoj tečnosti kulture koja se može izdvojiti i HAV koncentrirati i regenerirati. Međutim razmjera HAV nađenog u gornjem sloju tečnosti kulture je obično samo jedan mali dio ukupnog HAV koji se može regenerirati iz ćelija. Sakupljanje HAV pomoću deterdženta iz kultiviranih ćelija je visoko efikasno.

(c) Tretiranje sakupljenog HAV

Jednom kada je HAV sakupljen suštinski u obliku bez ćelija iz gornjeg sloja tečnosti kulture, iz ćelija, ili oba, poželjno je da se koncentrira HAV, da bi se omogućila prerada i prečišćavanje tokom na dolje. U postupku prema ranijoj tehnici prečišćavanja HAV, gdje je HAV sakupljen mehaničkim načinima i gdje su samo male količine materijala bile prečišćavane, HAV je ekstrahirano sa organskim reagensom kao što je metilen klorid ili metilen klorid: izoamil alkohol (24:1, zap/zap), a zatim koncentriranjem vodene faze dodatkom u vodi otopljenog sintetskog polimera, kao što je polietilenglikol. Sada je otkriveno da deterdženti i ekzogeni enzimi mogu da se upotrijebe u postupku komercijalnih razmjera za proizvodnju cjelokupnog cjepiva za HAV sa uklanjanjem dodatnih materijala do točke kada se tragovi ne mogu detektirati u prečišćenom proizvodu.

U jednoj realizaciji ovog izuma, deterdžent, kao što je Triton X-100, koji je upotrijebljen za sakupljanje HAV, uklanja se koncentriranjem/diafiltracijom, a zatim se uklanja preostali deterdžent, na primjer sa AMBERLITNIM neionskim polimernim adsorbentom kao što je XAD. Koristan postupak koji pokazuje uklanjanje Tritona X-100 ispod oko 10 µg/ml, objavili su Hurni, W.M., i Miller W.J. /Journal of Chromatography, 559, 337-343 (1991)/. Deterdžent koji je upotrijebljen za sakupljanje HAV se ne može detektirati ovom analizom u proizvodu prema realizaciji ovog postupka. Pored toga, mnogi drugi kontaminanti se uklanjaju, dajući djelomično prečišćen HAV proizvod.

U jednoj drugoj realizaciji izuma, poslije sakupljanja deterdžentom, za koncentriranje se upotrebljava tretiranje sa nukleazom, a zatim stupanj anjonskog izmjenjivačkog vezivanja, prije nego koncentracija/diafiltracija, a zatim XAD tretiranje.

U ovoj realizaciji, prvenstveno se upotrebljava nespecifična nukleaza visoke specifične aktivnosti, i visoko homogena. Nespecifičnost osigurava cjepanje i DNK i RNK, a homogenost enzima osigurava da se dodaje samo jedan enzim, bez dodatka drugih proteinskih kontaminanata. Osim toga, pogodno je, da je u postupku prema ovom izumu, nukleaza rezistentna na deterdžent, tako da se može dodati direktno u deterdžentom sakupljeni HAV. Bilo koja od broja nukleaza može da odgovara ovom kriteriju. Nađeno je, da je BENZONASA, dobivena kao rekombinantni protein od strane firme Nycomed Pharma A/S (Denmark), naročito pogodna za ovu svrhu. Nađeno je da je dodatak od između 0.1 µg - 100 µg/l sakupljenog HAV, a prvenstveno 10 µg/l prihvatljiv za uklanjanje kontaminirajuće slobodne nukleinske kiseline.

Dodatak minimalne količine enzima je važan da bi se olakšalo naknadno uklanjanje enzima u stupnjevima prerade na dolje, pri čemu se dobiva proizvod sa nivoima preostalog enzima, koji se ne mogu detektovati (manje nego 10 pg/ml).

Pošto se tretiranje nukleazom dešava u relativno razblaženom otapalu, mi smo otkrili da je pogodno da se veže HAV anjonskom izmjenjivačkom kromatografijom u razblaženom (90 do 150 mM) otapalu soli, i da se zatim eluira HAV stupnjem dodavanja oko 1.5 zapremina kolone otapala veće ionske jačine ($\geq$ oko 0.3 M). HAV se bitno koncentrira pomoću ovog stupnja vezivanja i, pored toga, najviše deterdženta, BENZONASE i mnogih drugih kontaminanata protiče kroz kolonu. Zbog toga je HAV koji se eluira iz vezujuće kolone djelomično prečišćen. Bilo koja od brojnih iono izmjenjivačkih smola poznatih u tehnici može da se upotrijebi za ovaj stupanj, uključujući i one navedene u EPO468702A2. Mi smo otkrili da je naročito pogodna smola za ovu svrhu upotreba DEAE TOYOPEARL-a 650M (Tosohaas).

(d) Koncentriranje HAV

Poslije sakupljanja HAV i koncentriranja /diafiltracije/ XAD ili tretiranja nukleazom/vezivanjem, HAV se koncentrira sa u vodi otopljenim sintetskim polimerom efikasnim da koncentrira proteine. Za ovu svrhu je efikasan polietilen glikol (PEG), koji ima molekulsku težinu od između približno 2,000 daltona i 12,000 daltona. Tipično, se dodaje NaCl u djelomično prečišćeni HAV do finalne koncentracije od između približno 150 mM i 500 mM. PEG se tada dodaje do finalne koncentracije od između približno 2% (tež/zap) i 10% (tež/zap), a prvenstveno oko 4%. Dobiveni 4% PEG staloženi djelomično prečišćeni HAV se koncentrira i centrifugira se, gornji sloj tečnosti se odvaja i pelete se ponovno

suspendiraju radi dalje prerade. Mi smo otkrili da se glavni kontaminant uklanja u odvojenom gornjem sloju tečnosti iz ovog stupnja. Uklanjanje proteaze povećava prinos, stabilnost, i čistoću HAV proizvoda u toku daljeg prečišćavanja. Ponovno suspendirane PEG pelete se opcionalno podvrgavaju djelovanju ultrazvuka da bi se potpomoglo otapanje prije organske ekstrakcije, kao što je opisano niže.

(e) Organska ekstrakcija

Ponovno suspendirane PEG pelete iz gornjeg se ekstrahiraju dodatkom smjese halogeniranih nižih alkana koji sadrže 1-6 ugljika, kao što su metilen klorid, kloroform, tetrakloretan, ili slični i antipjenušca, kao što je izoamil, alkohol. Odnos zapremine prema zapremini halogeniranog nižeg alkana prema antipjenušcu je između približno 15:1 i 50:1 i prvenstveno je između oko 20:1 i 30:1. Prijavioci su otkrili da organska ekstrakcija bitno povećava čistoću finalnog HVA proizvoda. Kloroform je bolji od metilen klorida za organsku ekstrakciju na ovom stupnju.

Takva ekstrakcija uklanja, pored drugih kontaminanata, lipid i lipidu slične supstance. Prema tome, ponovno suspendirane PEG pelete se razblažuju sa bilo kojim različitim puferom, uključujući fosfatno puferovani slano otapalo. TRIS, karbonatne, bikarbonatne, ili acetatne pufere. Pošto su HAV kapsidi stabilni u blago kiselim uvjetima, prihvatljivi su puferi u slabo kiseloj pH oblasti. Jedan prvenstven pufer je TNE (10 mM TRIS-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA). Fosfat može da bude upotrijebljen umjesto TRIS-HCl.

Prvenstveno se, ponovno suspendirane PEG pelete organski ekstrahiraju dodatkom kloroforma/izoamil alkohola (24:1, zap/zap) sa organskim prema vodenom odnosu između oko 0.5:1 i 3:1. uz snažno vrtloženje. Ovaj ekstrakt se tada izbistrava centrifugiranjem pri 4.000 g 10 minuta na 20°C. Vodena faza se ostavlja, a razdjelna površina i organska faza se ponovno ekstrahiraju zapreminom TNE ili ekvivalentom pufera jednakom između 0.3 i 0.6 od originalne zapremine uzorka, i obje vodene faze se sjedinjavaju, dajući ekstrahirane PEG pelete.

Stupanj ekstrakcije otapalom igra ključnu ulogu u postupku prečišćavanja Hepatitisa A taloženjem proteinskih nečistoća na razdjelnoj površini kao i ekstrahiranjem lipida u fazu otapala. Znatno prečišćavanje koje je postignuto ovom ekstrakcijom tokom proizvodnih postojanih serija može se vidjeti iz HPSEC kromatograma na slici 17, gdje je pik nečistoće na 23 min koristan marker za proučavanje uklanjanja nečistoće u toku ovog stupnja. Nasuprot ovome, u toku manjih polupogonskih serija, značajna proporcija ovog pika je zadržana u ekstrahiranom proizvodu (slika 18). Nekoliko promjenljivih je ispitano u cilju da se razumije i kontrolira ovaj stupanj pri povećavanju proizvodnje. Proučavani su: odnos zapremina otapala prema vodi, tip mućkanja, vrijeme mješanja i intenzitet mješanja u nekoliko epruveta i veličina boca (Vidjeti Primjer 15).

(f) Iono izmjenjivačka kromatografija

Ekstrakt iz gornjeg se podvrgava anjonskoj izmjenjivačkoj kromatografiji na smoli, gelu ili matrici. Tipične anjonske izmjenjivačke matrice obuhvaćaju, ali nisu ograničene na,

DEAE celulozu;
DEAE agarozu;
DEAE Biogel;
DEAE dekstran;
DEAE Sefadeks;
DEAE Sefarozu;
Aminoheksil Sefarozu;
Ecteola celulozu;
TEAE celulozu;
QAE celulozu;
mono-Q; ili
Benzoiliranu dietilaminoetil celulozu;

Jedna prvenstvena anjonska izmjenjivačka matrica je DEE TOYOPEARL 650M (Tosohaas). Opća osnovna informacija o iono izmjenjivačkoj kromatografiji može se naći, na primjer, u E.A. Peterson, "Cellulosic Ion Exchangers" u Work, T.S. i surad. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Vol. 2, dio II, strane 223 i slijedećim. North-Holland 1970.

Organski ekstrahirane ponovno suspendirane PEG pelete se razblažuju, ako je potrebno, sa 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 7.5, ili ekvivalentnim puferom, i dodaje se NaCl da bi se dobila koncentracija NaCl između približno 0.3 M i 0.35 M ako je potrebno da se ukloni kontaminirajuća slobodna nukleinska kiselina. Pod ovim uvjetima, HAV prolazi kroz kolonu

na filtracioni način. Međutim, ako je HAV preparat ranije bio tretiran sa nukleazom, organski ekstrakt se podešava na između 0.1 M i 0.15 M NaCl, prvenstveno sa 0.12 M NaCl, prije slijedećeg stupnja.

Pri molaritetu NaCl opisanom gore, HAV kapsidi se vezuju na anjonsku izmjenjivačku matricu dok izvjesni preostali kontaminanti kao što su ugljeni hidrati prolaze kroz matricu. Kolona se pere sa nekoliko zapremina kolona 0.12 M NaCl da bi se dalje uklonili preostali kontaminanti. HAV kapsidi se tada eluiraju sa anjonske izmjenjivačke kolone koristeći jednu zapreminu kolone plus zapreminu originalnog uzorka 0.35 M NaCl. Alternativno i pogodnije, HAV se eluira pomoću gradijentne elucije sve do oko 1 M NaCl ili ekvivalentne soli, sa HAV elucijom pri oko 0.3 M NaCl.

(g) Gel filtracija

Finalni stupanj gel filtracione kromatografije dolazi poslije anjonske izmjenjivačke kromatografije. Tipično se upotrebljava Sefaroz CL-4B (Pharmacia, ali se može zamijeniti mnogobrojnim drugim tipovima gel filtracionih matrica. Vidjeti na primjer, Fischer, L., "Gel Filtration Chromatography" u Work, T.S. i surad., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Elsevier (1980). Mi smo otkrili naročito pogodan postupak za primjenu ekskluzione kromatografije po veličini za prečišćavanje HAV na ovom stupnju. Ovo obuhvaća eluiranje što je moguće manje zapremine uzorka anjonskom izmjenom prečišćenog HAV na tandem kolonama od TOYOPEARL HW55S i HW65S.

Dok su određene sekvence kromatografskih stupnjeva anjonske izmjene koje prati gel filtracija tipični protokoli za prečišćavanje HAV kapsida u ovom izumu, razumljivo je da se sekvence mogu mjenjati. Na primjer, gel filtracija može da prethodi stupnju anjonske izmjene. Mi smo našli da je ranije spomenuta sekvenca pogodnija.

(h) Taloženje HAV

Potpuno neočekivano otkriće u toku proizvodnje HAV u velikim razmjerima, koje se odnosi na otopljivost virusa, nastalo je kao rezultat velikih količina HAV proizvedenih prema ovom izumu. Mi smo otkrili da se pri koncentraciji soli od 0.25-0.30 M pri kojoj se eluira HAV iz iono izmjenjivačke kolone, javlja taloženje virusa ako je koncentracija HAV iznad oko 10-20 µg/ml.

Ovo je otkriveno pomoću HPSEC analize reprezentativnih uzoraka, koja je pokazala da su proizvod kloroformom ekstrahirane vodene faze (AQX) (od Chloroform Extracted Aqueous Phase) i ekskluzivni proizvod po veličini (SEC) (od Size-Exclusion Product) veoma stabilni na odlaganje na 4°C; ali proizvod anjonske izmjene (IEX) (od Anion Exchange Product) je pokazivao izrazit gubitak hepatitisa A poslije odlaganja na 4°C.

Da bi se potvrdio ovaj nalaz, započeta je studija stabilnosti sa drugim setom uzoraka. AQX, IEX proizvod, i SEC proizvod su svaki analizirani (u triplicatu) pomoću HPSEC odmah poslije geneze. Koncentracija hepatitisa A je tada određena usporedivanjem površina dobivenih pikova prema SEC hepatitis A kalibracionoj krivoj. Pored toga, alikvot IEX proizvoda je razblažen 1 u 5 sa fosfatom puferiranom slanom otopinom (0.12 M NaCl, 6 mM natrij fosfata, pH 7.2) i odmah izvršena kvantitativno određivanje. Stabilnost ova 4 uzorka na 4°C je registrirana pomoću HPSEC u toku nekoliko dana.

Niže su dati početna koncentracija hepatitisa A i vrijednost dobivena 4 do 5 dana kasnije za nekoliko od ovih uzoraka prečišćenih tokova hepatitisa A.

<u>Uzorak</u>	Početna konc. Hepatitisa A (µg/ml)	Dan 4 konc. Hepatitisa A (µg/ml)
AQX	23	21
IEX proizvod	59	50
IEX proizvod razblažen 1 u 5	12	10
SEC proizvod	12	12

Potpuni rezultati, uključujući intermedijarne točke vremena, prikazani su na slici 26.

Kao što se vidi sa prvom serijom, IEX proizvod pokazuje izrazit gubitak hepatitisa A, sa gubitkom od oko 25% koji se događa prilikom odlaganja preko noći (koncentracija hepatitisa A opada sa 59 na 45 µg/ml).

Razblaženi IEX proizvod i AQX proizvod pokazuju mnogo veću stabilnost, sa gubitcima hepatitisa A od samo oko 10% u toku prvih 100 sati odlaganja. SEC proizvod ne pokazuje gubitak hepatitisa A, suštinski isti rezultat je dobiven za prvu seriju.

Jedna razlika između ove dvije serije je obrazovanje vidljivog taloga koje nastaje kod druge serije. Prisustvo taloga zahtijeva centrifugiranje cjelokupnog IEX proizvoda prije SEC stupnja. Ovo centrifugiranje dovodi do velikih gubitaka staloženog hepatitisa A; koncentracija poslije centrifugiranja je bila 29 µg/ml. Tabela prinosa izračunatih iz HPSEC podataka prikazana je niže.

5

<u>Uzorak</u>	Ukupno mg hepatitisa A	Prinos stupnja	mg hepatitisa A poslije uzorkovanja
AQX proizvod	12.9		11.7
INEX proizvod	12.3		
	(početna količ.)	105%	8.7
Centrifugirani			
IEX proizvod	4.2	48%	4.2
SEC proizvod	2.0	49%	1.4

Neočekivano nizak SEC prinos nagovještava da može da dođe do agregacije ili taloženja na SEC koloni. Ustvari nešto agregata je uočeno pomoću HPSEC. Uzorak od 7 ml IEX proizvoda koji se kromatografira na manjem setu tandem SEC kolona (odmah pošto je završeno dobivanje IEX) pokazuje regeneraciju hepatitisa A od 71%, što je mnogo tipičnije za ovaj stupanj. Pošto kod ovog uzorka nije došlo do gubitka hepatitisa A pri centrifugiranju (pošto se još nije bio staložio) prinos od 71% je oko 3 puta od onoga koji je dobiven u proizvodnim razmjerama idući od IEX do SEC proizvoda. Tandem SEC manjih razmjera je dao mnogo veći faktor razblaženja, što može da bude objašnjenje za veći prinos.

15

Talog uočen u toku prečišćavanja ovih serija što se podudara sa gubitkom virusa, određenim pomoću HPSEC, iznenađujuće je utvrđeno da je otopljen u vodenim otapalima niske ionske jačine (na pr., 6 mM natrij fosfat), tako da je taloženje reverzibilno. Talog se ponovo otapa dodavanjem 6 mM natrij fosfata, koji dovodi do brzog otapanja. Nasuprot ovome, ponovo suspendirani talog u 120 mM natrij klorida sa 6 mM natrij fosfata ili u otapalima veće ionske jačine dovodi do male promjene. Na bazi HPSEC retencionih vremena, talog koji je otopljen u 6 mM natrij fosfata bio je iste veličine kao monomerni hepatitis A, dok SDS-Page obojen sa srebrom pokazuje da otopljeni talog ima iste proteinske trake vidljive u finalnom SEC proizvodu. Na osnovu ovih podataka, prečišćavanje hepatitisa A je modificirano tako da uključi razblaživanje iono izmjenjivačkog proizvoda da bi se spriječili gubici taloga (Vidjeti Primjer 16), tako da 1:1 razblaženje daje koncentraciju soli od oko 0.15 M ili nižu. Također je poželjno da se postigne koncentracija HAV niža od 20 µg/ml.

25

(i) HPSEC konzistenciona analiza

Analiza visoko performantnom ekskluzivnom kromatografijom po veličini (HPSEC) (High Performance Size Exclusion Chromatography) je razvijena radi kvantitativnog određivanja koncentracija hepatitisa A i nivoa nečistoća u uzorcima iz postupka prečišćavanja hepatitisa A.

30

Analizirani su uzorci hepatitisa A iz postupka iz ukupno 14 serija dobivenih prema ovom izumu; dobivena baza podataka je bila upotrijebljena za karakteriziranje nivoa hepatitisa A i profila kontaminanata za svaki od stupnjeva prečišćavanja. Uvjeti HPSEC analize, sigurnost podataka koji pokazuju točnost i preciznost analize, uspoređenje HPSEC i EIA podataka, i rezultati iz HPSEC analiza 10 serija, prikazni su u Primjeru 17 i slikama 29-46.

35

(j) Inaktivacija i formulacija cjepiva

Dodatni stupnjevi postupka konvencionalnog i dobro poznatog karaktera su ili mogu da budu potrebni za dobivanje prečišćenih HAV kapsida za upotrebu za cjepivo. Na primjer, tretiranje sa formalinom, sterilna filtracija i absorpcija na nosače ili adjuvante su tipični osnovni stupnjevi za dobivanje formalinom-inaktiviranog cjepiva.

40

Vidjeti, na primjer, Provost, P. J. i surad., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **160**, 213 (1979); Provost, P. J., i surad., J. Med. Virol. **19**, 23 (1986). HAV može da se inaktivira pomoću topline, promjenama pH, ozračivanjem, tretiranjem sa organskim otapalima kao što su formalin ili paraformaldehid: Tipično se, HAV inaktivacija vrši pri odnosu od 1/4000 formalina. Mi smo otkrili da inaktivacija formalinom protiče mnogo brže i efikasnije pri četiri puta od standardne koncentracije, i koncentracija formalina od 1/1000 smanjuje vrijeme inaktivacije za faktor 4 bez suprotnog utjecaja na imunogenost. Inaktivirani HAV se tada absorbuje ili ko-taloži sa aluminij hidroksidom da bi se obezbjedio efekat adjuvanta i nosača.

50

Pošto je doza potrebna za imunološku efikasnost ovog proizvoda veoma niska, pogodno je da se kompleksira ili absorbira inaktivirani HAV na nosač. Nađeno je da je aluminij hidroksid potpuno prihvatljiv za ovu svrhu pošto formira čvrst kompleks sa HAV i sprečava gubitak virusa na zidove kontejnera.

Prema tome ovaj izum obezbeđuje postupak za dobivanje u komercijalnim razmjerima virusa hepatitisa A veće od 95% čistoće HAV proteina, koji obuhvaća stupnjeve:

- (a) kultiviranje virusa hepatitisa A u velikoj količini u slojevima ćelija u velikim površinskim oblastima reaktora sa statičkom površinom,
- (b) uklanjanje virusa hepatitisa A iz kulture ćelija, pomoću propuštanja deterdženta u slojeve ćelija tako da se virus hepatitisa A oslobađa iz slojeva ćelija bez stvarnog uklanjanja, lizisa ili razaranja kulture ćelija u slojevima,
- (c) opciono uklanjanje na ovom stupnju za nehepatitis A virus specifičnih nukleinskih kiselina od sakupljenog HAV, ili tretiranjem sa nukleazom ili iono izmjenjivačkom absorpcijom nukleinske kiseline,
- (d) koncentriranje virusa hepatitisa A uklonjenog iz kulture ćelija, upotrebljavajući membrane i diafiltraciju, ili vezivanjem pomoću iono izmjenjivača,
- (e) uklanjanje preostalih za ne-hepatitis A virus specifičnih proteina iz koncentriranog virusa hepatitisa A iz stupnja (d) pomoću kombinacije organske ekstrakcije, PEG taloženja, ion izmjenjivački, uključujući uklanjanje kontaminirajuće nukleinske kiseline, ako nije prethodno završeno u stupnju (c), a zatim gel permeacionom kromatografijom kao finalni stupanj,
- (f) regeneriranje prečišćenog virusa hepatitisa A iz stupnja (e).

U prvenstvenoj realizaciji ovog izuma, postupak za proizvodnju u komercijalnim razmjerima inaktivirane vakcine za hepatitis A obuhvaća stupnjeve:

- (a) Kultiviranje velike količine virusa hepatitisa A (HAV) u tvornicama NUNC ćelija, (NUNC, CELL FACTORIES) COSTAR kubičnim (COSTAR CUBES), ili u bioreaktorima sa statičkom površinom čak i većih površinskih oblasti u kojima je sloj ćelija MPC-5 ćelija postavljen na regularnoj čvrstoj rešetki smjesa od čvrstog nerđajućeg čelika, titana ili titan nerđajućeg čelika;
- (b) Sakupljanje kultiviranog HAV uklanjanjem medija kulture i dodavanjem otopine za sakupljanje koji sadrži oko 0.05 do 0.5% Tritona X-100, prvenstveno 0.1%;
- (c) Tretiranje sakupljenog HAV sa nukleazom da bi se fermentovale kontaminirajuće ćelijske nukleinske kiseline;
- (d) Koncentriranje nukleazom tretiranog HAV vezivanjem na ionsku izmjenjivačku kolonu i eluiranjem vezanom HAV sa oko 0.35 M NaCl, a zatim taloženjem sa polietilen glikolom;
- (e) Ekstraktiranje koncentriranog HAV sa kloroformom/izoamil alkoholom (24:1, zap/zap) sa snažnim mješanjem, i odvajanjem i zadržavanjem vodene faze;
- (f) Kromatografiranje vodene faze iz organske ekstrakcije na iono izmjenjivačkoj matrici pri oko 0.12 M NaCl, i eluiranje HAV sa gradijentom do veće koncentracije NaCl (1 M je adekvatna) i odmah razblaživanje sakupljene otopine od eluiranja HAV do koncentracije soli od oko 0.15 M ili niže, a prvenstveno do koncentracije HAV od oko 20 µg/ml ili niže;
- (g) Kromatografiranje HAV eluiranog iz ionske izmjene na kromatografskoj smoli ekskluzionom po veličini, prvenstveno na tandem uređaju od TOYOPEARL HW55S i HW65S u koji HAV ulazi u zapreminu matrice;
- (h) Inaktiviranje gel filtriranog HAV tretiranjem sa formalinom pri 1/1000, a zatim sterilnom filtracijom, ko-taloženjem sa aluminij hidroksidom i raspodjeljivanje u ekvivalente jediničnih doza do oko 25 ng - 100 ng inaktiviranog prečišćenog HAV po dozi.

HAV dobiven u ovom izumu je visoko prečišćen i visoko antigen. Proizvod je prečišćeni preparat virusa hepatitisa A gdje je više od 95% proteina virus hepatitisa A specifično bazirano na SDS PAGE i analizi bojenjem srebrom i manje od 0.1% mase preparata je ne-HAV nukleinska kiselina i manje od 4% je lipid. Nivo ugljenog hidrata koji se detektira kao glukoza u hidroliziranom uzorku proizvoda je između oko 0% i 200% od mase prisutnog proteina, sa ne-glukozičnim ugljenim hidratom koji je prisutan pri manje od 15% od mase proteina. U prvenstvenim realizacijama, glukoza i ne-glukozični ugljeni hidrati, kao što je riboza, su prisutni pri manje nego oko 20% od mase proteina. Preparat zadržava njegovu antigenost kada se inaktivira sa formalinom.

Male količine inaktiviranog virusa su adekvatne za izazivanje zaštitnih imunih odgovora. Prvenstveno, doza od 25-100 ng se primjenjuje jednom, dva puta ili tri puta u toku perioda od nekoliko mjeseci, ako je potrebno da se izazovu visoki titri anti-HAV imunih odgovora.

Prečišćeni preparat virusa hepatitisa A ima slijedeće karakteristike, pri čemu je svaka karakteristika iznijeta na bazi Eig proteina. Za određivanje ovih karakteristika je korišten postupak dat u zgradama:

5	a)	sadržaj lipida (plinska kromatografija):	< 0.1 µg
	b)	ugljeni hidrat detektiran kao glukoza (TFA hidroliza, Dione)	< 0.1 µg 2.5 µg;
	c)	ne-glukozni ugljenihidrat: (TFA hidroliza, Dionet)	< 0.2 µg;
10	d)	specifični protein cjepiva hepatitisa A (amino kiselinska analiza i "western blot"),	< 0.95 µg;
	e)	specifična RNK virusa hepatitisa A	0.1-0.2 µg
	f)	kontaminirajuća DNK	< 0.0004 µg

15

Prisustvo u proizvodu ugljovodične komponente koja se sastoji primarno od glukoze, smatra se beznačajnim u pogledu tolerantnosti, imunogenosti i zaštitne efikasnosti inaktivirane adjuvantiranog cjepiva. Međutim, važno je da su u proizvodu nivoi ne-glukoznog ugljenog hidrata (vjerojatno riboze iz degradacije specifične RNK za HAV) veoma niski. Također je značajno da se naglasi da je postalo moguće da se definiraju karakteristike navedene ovdje tek od otkrića postupka sposobnog da proizvede dovoljno velike količine proizvoda, tako da omogućiti da se izvedu relevantne analize.

20

U jednoj specifičnoj formulaciji ovog izuma cjepivo za virus hepatitisa A ima slijedeći nominalni sastav na 25-100 jedinica/0.1-1 ml dozu:

KOMPONENTA	KOLIČINA
Natrijum hlorid	900-9000 µg
Aluminijum	50-500 µg
Natrijum tetraborat	3.8-38 µg
Formaldehid	< 0.4 µg
Glukoza (polimer)	0-1000 ng
Protein	25-100 ng
Hloroform	< 44 ng
HAV RNK	2-20 ng
Ne-glukozni karbo.	0-20 ng
Masna kiselina	< 20 ng
Neomicin	< 4 ng
MRC-5 DNK	< 3.03 ng
Albumin goveđeg seruma	< 0.1 ng
BENZONASA	< 0.0001 ng

25

U jednoj drugoj specifičnoj formulaciji, cjepivo za virus hepatitisa A ima slijedeći nominalni sastav na 25 jedinica/0.5 ml dozu:

KOMPONENTA	KOLIČINA
Natrijum hlorid	4,500 µg
Aluminijum	250 µg
Natrijum tetraborat	19 µg
Formaldehid	< 200 ng
Glukoza (polimer)	< 20 ng
Protein	25 ng
Hloroform	< 22 ng
HAV RNK	5 ng
Ne-glukozni karbo.	4 ng
Masna kiselina	< 1 ng
Neomicin	< 0.5 ng
MRC-5 DNK	< 0.005 ng

Albumin goveđeg seruma	< 0.02 ng
BENZONASA	< 0.0002 ng

Nađeno je da je prečišćeni inaktivirani virus hepatitisa A prema ovom izumu efikasan u prevenciji infekcije kada se primjeni uzorak od 25 ng (ekvivalent sa 25 jediničnih doza jedne od gornjih formulacija) na bazi EIA analize u odnosu na referentni standard koji se karakterizira amino kiselinskom analizom. Nikakva ozbiljna suprotna iskustva nisu uočena među zdravim odraslim, adolescentnim ljudima ili djecom, za koje se može smatrati da su vezana sa cjepivom. Doze koje se kreću od 6 do 50 jedinica su primjenjivane na odrasle, adolescente i djecu. Uočene su brže, veće serokonverzivne brzine kod odraslih kada se primjenjene doze povećavaju. Ovaj fenomen je manje izražen kod djece.

Jedan mjesec poslije jedne doze od 25 jedinica, 83% odraslih (≥ 18 godina) i 97% djece i adolescenata (2 do 17 godina) su serokonvertirani. Dvije doze od 25 jedinica date u razmaku od dvije nedjelje povećavaju serokonverzivnu brzinu kod odraslih do 93%. Serokonverzija sedam mjeseci poslije druge ili treće doze od 25 jedinica dovodi do veće od 99% serokonverzije u obje starosne grupe. Postojanost u seropozitivnosti je oko 100% sve do 12 mjeseci i 36 mjeseci u obje starosne grupe. Prema tome, jasno je da je jedna doza od 25 jedinica dovoljna da se postigne serokonverzija kod najmanje 80% bilo koje primajuće populacije u toku jednog mjeseca od imunizacije. Imunizacija sa većim dozama pokazuje serokonverziju u većem postotku kod primalaca.

Na bazi doze od 25 ng, jedna "COSTAR KOCKA" može da se sakupi prema postupku iz ovog izuma, pri čemu se dobiva između oko 5.000 i 10.000 doza ili više. Postupak je također pogodan za sakupljanje i preradu nekoliko "COSTAR" kocki istovremeno. Jedan SSR sa ili bez mreže, radi povećanja površine daje znatno veći broj doza koje se sakupljaju po proizvodnom toku.

Slijedeći primjeri su dati da bi se prikazale specifične realizacije ovog izuma ali primjeri ne treba da se smatraju kao jedini način izvođenja različitih stupnjeva ovog izuma.

PRIMJER 1

PROIZVODNJA OSNOVNOG SJEMENA VIRUSA HEPATITISA A

Postupak za proizvodnju u velikim razmjerima sjemena za virus obuhvaća infekciju monoslojeva MRC-5 ćelija u tvornicama za NUNC ćelije (NUNC CELL FACTORIES) (NFC) od 6000 cm². MRC-5 ćelije se gaje u tvornicama do konfluentnih monoslojeva, i zatim se inficiraju sa virusom pri MOI od 0.1. Poslije infekcije ćelije se inkubiraju 28 dana sa nedjeljnom zamjenom medija koji sadrži 10% zap/zap fetalnog telećeg seruma. Nađeno je da visoke koncentracije seruma, 2-10% zap/zap omogućavaju veću proizvodnju virusa nego niski nivoi, od 0.5 do 2% zap/zap. Na kraju ovog ciklusa, gornji sloj tečnosti sadrži velike količine infektivnog virusa, u ovom primjeru 10^{7.3} TCID₅₀ na mililitar, koji se sakuplja direktno iz NFC, bez lizisa ćelija, i upotrebljava se kao izvor osnovnog sjemena virusa. Na ovaj način se dobivaju velike količine infektivnog virusa potrebne za proizvodnju postupkom u velikim razmjerima, koji je reproduktivniji i lakši nego pomoću kotrljajućih boca ili balona, - ili mehaničkim sakupljanjem ćelija.

PRIMJER 2

POVEĆANJE PROIZVODNJE CJEPIVA

Da bi se potpomogla faza III kliničkih ispitivanja, povećanje laboratorijskog postupka je postao važan faktor razmatranja za proizvodnju cjepiva za hepatitis A. Da bi se potpomoglo povećanje razmjera proizvodnog postupka, potrebne su modifikacije ranije poznatih postupaka razmnožavanja i prečišćavanja HAV. Upotrijebljena su dva osnovna postupka za razmnožavanje ćelija, tvornice NUNC ćelija (NUNC CELL FACTORIES), i reaktori sa statičkom površinom, kao što su COSTAR kubični (COSTAR CUBE). Ovaj primjer opisuje postupak tvornice NUNC ćelija (NUNC CELL FACTORY). Primjer 3 opisuje COSTAR kubični SSR postupak.

Fabrike NUNC ćelija upotrijebljene za Monroe-vu studiju efikasnosti

Razvijen je revidiran postupak koji omogućava poboljšano povećanje razmjera postupka za razmnožavanje većih količina oslabljenog cjepiva hepatitisa A nego što je ranije bilo moguće. Ovo je u početku bilo postignuto zamjenom standardnih kotrljajućih boca sa tvornicama NUNC ćelija (NCF). Osnovna jedinica tvornice NUNC ćelija (NCF) (NUNC CELL FACTORY) je posuda sa površinom kulture od 600 cm². Posude koje formiraju NCF proizvode se od polistirola, tretiranog za optimalno vezivanje i rasprostiranje ćelija (Maroudas, 1976, J. Cell Physiol. Vol. 90, str. 511-520. 10 jedinica posuda opisanih ovdje imaju 10 identičnih jedinica kulture (posuda) sa ukupnom površinskom oblašću

(površinom) od 6,000 cm². U dva ugla su specijalno konstruirana otvora koja formiraju vertikalne cijevi koje spajaju posude u više slojeva. Ove vertikalne cijevi završavaju u dva adaptera koji primaju zračne filtre i specijalno konstruiran teflonski konektor. Sve jedinice su sterilizirane ozračivanjem i dobivene su od proizvođača već spremne za upotrebu. Sredina u NCF za MRC-5 ćelije je veoma slična onoj dobivenoj u kotrljajućim bocama. Ćelije se gaje u statičkoj kulturi sa ćelijama vezanim za čvrst substrat pokriven sa tečnim medijem i snabdjevanje ćelija sa hranljivim materijama i kisikom je preko difuzije. Upotreba NCF-a tvornica povećava reproduktivnost operacija, dok podražava uvjete upotrijebljene u proizvodnji kotrljajućim bocama. Međutim, postupak sakupljanja i prerada tokom na dolje je različita, kao što je dalje opisano niže.

PRIMJER 3

COSTAR kubični (COSTAR CUBE) reaktor sa statičkom površinom upotrijebljen za proizvodni postupak komercijalnih razmjera

Dalje povećanje je bilo izazov da se dobije što je moguće veća površina po reaktoru, dok je omogućena dobra kontrola sredine kroz bioreaktor. NUNC ćelijske tvornice (NUNC CELL FAKTORIES) omogućile su djelomično rješenje ovog izazova. Bolja rješenja su obezbjeđena pomoću COSTAR kubičnog (COSTAR CUBE) i STATIČKOG MIKSER reaktora sa statičkom površinom (SSR-a). Prethodni se sastoji od gusto pakiranih polistirolnih slojeva u plastičnoj kocki koja se može sterilizirati (COSTAR CS2000). Ukupno je dostupno 85,000 cm² korisne površine za rast u jednoj kocki (u poređenju sa 6,000 cm² za 10 posuda u NUNC ćelijskoj tvornici. U posljednjem reaktoru, opisanom u U.S. patentima 4,296,204 i 4,415,670, metalni, keramički, stakleni ili plastični statički elementi mješanja formiraju gusto pakiranu površinu rasta; ovi elementi mogu da se izrađuju i raspoređuju tako da obezbjeđe veće površine nego (COSTAR CUBE) COSTAR kocka u jednom reaktoru, za velike proizvodne postupke. HAV se uspješno kultivira u oba tipa reaktora. SSR ima cirkulacioni otvor koji omogućava recirkulaciju medija i ponovno napajanje hranljivim materijama kroz saturator, u cilju da se kontrolira pH i nivoi otopljenog plina u mediju, da bi se postigao zahtjev kulture za kisik, i da bi se postiglo rasprašivanje medija. Ova optimizacija nije moguća u kotrljajućim bocama ili u NCF. Pored toga, izmjenjena medija se vrši u cilju da se poboljša dostupnost velikih količina ključnog sirovog materijala. Željezom obogaćeni teleći serum (Cat. A-2151, Hyclone Laboratories, Inc., Logan, UT ili ekvivalent) sa uspješno upotrebljava da zamijeni fetalni goveđi serum.

PRIMJER 4

Sakupljanje virusa hepatitisa A iz NUNC ćelijskih tvornica ili reaktora sa statičkom površinom pomoću lizisa Tritonom

Ni NUNC ćelijska tvornica niti reaktor sa statičkom površinom nisu pogodni za mehaničko struganje radi oslobađanja slojeva MRC-5 inficiranih ćelija. Ćelijski vezani virus hepatitisa A se efikasno regenerira upotrebljavajući lizis ćelija Tritonom, i prečišćava se koristeći novi postupak. Otopina dobivena postupkom lizisa Tritonom bio je razblaženiji nego preparat dobiven iz mehaničkog struganja kotrljajućih boca. Otopina dobivena sakupljanjem Tritonom, koncentrira se diafiltracijom, a zatim tretiranjem sa absorbentom, XAD, da bi se uklonio preostali Triton.

Odstranjivanje Tritona do manje od 10 µg/ml prikazano je upotrebljavajući analizu kapilarnom zonskom elektroforezom u toku postupka. HAV se zatim taloži sa polietilen glikolom (PEG), ekstrahira se sa kloroformom : izoamil alkoholom. Kontaminirajuća DNK se uklanja upotrebljavajući filter kolonu za DNK, a zatim anjonsku izmjenjivačku kromatografiju i ekskluzivnu kromatografiju po veličini. Postupak koji obuhvaća i NCF rast i lizis Tritonom nije značajno utjecao na imunosnost prečišćene formalinom inaktiviranog cjepiva za hepatitis A.

PRIMJER 5

Tretiranje nukleazom i vezujuća kromatografija

Mogućnost povećanja razmjera, produktivnosti i konzistencije postupka su povećani tretiranjem Tritonom sakupljenog materijala sa endonukleazom, a zatim vezivanjem anjonskom izmjenjivačkom kromatografijom da bi se koncentrirao virus (vidjeti sliku 1). Ova modifikacija eliminira potrebu za stupnjem koncentriranja/diafiltracije, XAD tretiranjem i filter kolonom za DNK.

Odabrana je ne-specifična endonukleaza koja je aktivna protiv obje i RNK i DNK. Ova endonukleaza, BENZONASA je izolirana iz Serratia marcescens i klonirana u Escherichiacoli. Proizvodi se kao veoma dobro prečišćen, dobro okarakteriziran rekombinantni protein od strane Nycomed Pharma A/S (Denmark). Ova određena endonukleaza je odabrana, djelomično zbog toga pošto ima veoma visoku specifičnu aktivnost i može da se doda direktno u sirovi materijal sakupljen Tritonom u veoma malim količinama (10 mcg BENZONASE/l sakupljenog materijala). Razvijeni su test postupci, koji koriste "WESTERN Blot" za specifični protein BENZONASE i kinetičku analizu za aktivnost enzima,

radi mjerenja uklanjanja enzima postupkom prečišćavanja. Najviše (> 90%) dodate aktivnosti endonukleaze može se smatrati da ima u frakcijama od pranja i frakcijama koje protiču kroz stupanj vezivanja anjonske izmjenjivačke kromatografije (opisane niže). Nivo BENZONASE se smanjuje za faktor od više nego 100 u proizvodu vezujuće kolone.

PRIMJER 6

DODATNI STUPNJEVI POSTUPKA

a) Stupanj vezivanja

Virus hepatitisa A se koncentrira iz nukleazom tretiranog Tritonom sakupljenog materijala na anjonskoj izmjenjivačkoj koloni nanošenjem pri niskoj ionskoj jačini i stupnjem eluiranja u 0.35-0.5 M natrij klorida u fosfatnom puferu. Virus hepatitisa A se koncentrira 30 puta ovim stupnjem vezivanja i Triton se smanjuje do nivoa koji se ne mogu detektirati, kao što je određeno analizom CZE u toku postupka.

b) Taloženje sa PEG i ekstrakcija kloroformom

Virus hepatitisa A iz koncentriranja/diafiltracije/ XAD ili onaj eluiran iz vezujuće kolone, taloži se sa polietilen glikolom (PEG). Pod pogodnim uvjetima ovaj stupanj je visoko selektiran i glavni kontaminant, koji se drugačije koprečišćava sa virusom, ostaje otopljen i odbacuje se u frakciji gornjeg sloja tečnosti. PEG talog koji sadrži virus, ponovo se suspendira i ekstrahira sa kloroformom : izoamil alkoholom (24:1), da bi se uklonili otopljeni lipidi i proteini denaturirani sa kloroformom koji ostaju na graničnoj površini između vodene i organske faze.

c) Anjonska izmjenjivačka kromatografija i ekskluziona kromatografija po veličini

Vodeni ekstrakt iz stupnja ekstrakcije kloroformom nanosi se na anjonsku izmjenjivačku kolonu pri niskom sadržaju soli i zatim se eluira sa NaCl gradijentom do 1.0 M soli. Finalni stupanj ekskluzione kromatografije po veličini daje visoko prečišćeni preparat virusa (vidjeti Sliku 2).

d) Inaktivacija

Formalinom inaktiviranje virusa hepatitisa A ranije je vršeno upotrebljavajući 93 µg/ml formaldehida/ml (1:4000 formalina i na temperaturi od 37°C za koncentracije antigena blizu nivoa doza. Pod ovim uvjetima inaktiviranje virusa slijedi kinetike razlaganja prvog reda sa vremenom poluraspada od približno 2 sata, što odgovara gubitku od oko 3.5 log₁₀ TCID₅₀ (50% infektivne doze kulture tkiva) na dan. Smanjenje od 7 loga infektivnosti virusa postiže se za oko 2 dana, ali za vrijeme inaktiviranja produžava do dvadeset dana da bi se osigurao veliki koeficijent sigurnosti da je virus potpuno inaktivan.

Eksperimenti u malim razmjerima su potvrdili da se sa povećanjem koncentracije formaldehida povećava brzina inaktiviranja, kako je mjereno gubitkom TCID₅₀. Brzina inaktiviranja varira proporcionalno sa koncentracijom formaldehida, kao što je očekivano za kinetiku inaktiviranja pseudo-prvog reda. Ispitivanje kulture tkiva na dvije stotine ekvivalenata doze potvrđuje potpuno inaktiviranje kada je virus inkubiran sa 370 µg/ml formaldehida (1:1000 formalina) virus na 37°C 5 dana. Prema tome, ovi modificirani uvjeti inaktiviranja obezbjeđuju koeficijent sigurnosti kao što je onaj kod ranije upotrebljenih uvjeta. Ovo je potvrđeno sa tri inaktivacije velikih polupogonskih razmjera izvedenih pod identičnim uvjetima, a zatim absorpcijom pomoću aluminij hidroksida, pri čemu se dobiva cjepivo za klinička ispitivanja. Brzina inaktiviranja je bila oko četiri puta veća od brzine ranije posmatrane pri nižim koncentracijama formaldehida, što je u odličnoj suglasnosti sa ispitivanjima u malim razmjerima. Uzorci ova dva cjepiva absorbirane aluminij hidroksidom ispitani su na imunogenost kod miševa, sa ED₅₀ za svaku sličnim sa onim za ranija cjepiva (manje nego 2 ng).

e) Absorpcija aluminij hidroksida

Absorpcija na aluminij hidroksid vrši se ko-taloženjem formalinom inaktiviranog virusa sa aluminij hidroksidom. Postupak upotrijebljen za sve kliničke preparate bio je suštinski isti, pri čemu je jedina promjenljiva bila koncentracija virusa u formalinom inaktiviranom sirovom otapalu. Direktno taloženje inaktiviranog virusa na aluminij hidroksid izvršeno je prvo dodavanjem kalij aluminij sulfata u formalinom inaktiviranu sirovu otopinu. Najzad, talog se formira dodatkom natrij hidroksida. Formaldehid i preostale soli se eliminiraju uklanjanjem gornjeg sloja tečnosti iz suspenzije i zamjenjujući ga sa fiziološkom slanom otopinom.

PRIMJER 7

ČISTOĆA HAV PROIZVODA

Analitička ekskluziona kromatografija po veličini (HPSEC), EIA i protein kao i SDS-PAGE su upotrijebljeni za registriranje postupka prečišćavanja da bi se obezbjedili konzistentni prinosi cjepiva visoke čistoće. HPSEC obezbjeđuje načine za registriranje gubitaka nukleinske kiseline u toku tretiranja nukleazom kao i za određivanje čistoće u kasnijim stupnjevima postupka. Kromatogrami na slici 2 pokazuju da je pik koji odgovara hepatitisu A jasan u PEG talogu. Virus hepatitisa A se obogaćuje u stupnju ekstrahiranja otapalom i zatim se koncentrira u stupnju ionske izmjenjivačke kromatografije. Finalna gel filtracija daje preparat hepatitisa A visoke čistoće (> 95% pomoću SDS-PAGE i bojenjem srebrom). Kao nezavisna mjera čistoće preparata HAV je jedinstveno obuhvaćen pik u HPSEC analizi (vidjeti slike 2, 37 i 38).

II. Odstranjivanje nečistoća

CZE analiza uzoraka u toku postupka ukazuje da se Triton uklanja stupnjem koncentriranja diafiltracije u Monroe-ovom postupku i vezujućom kolonom u proizvodnom postupku. Pored toga BENZONASA teče kroz vezujuću kolonu. Količina BENZONASE prisutna u stupnju anjonske izmjene proizvoda je ispod nivoa detekcije (< 18 femtograma aktivnosti i manje nego 13 pg BENZONASE mase/25 jedinične doze hepatitisa A; limit detekcije u ovoj analizi je 12.5 pg).

PRIMJER 8

Prečišćavanje virusa hepatitisa A sakupljenog iz NUNC ćelijskih tvornica ili bioreaktora sa statičkom površinom lizisom Tritonom: Monroe-va studija

HAV se razmnožava suštinski kao što je opisano u Primjeru 2 koristeći NCF-e. MRC-5 ćelije se gaje u šaržama od šezdeset 6000 cm² NCF-a na 37°C dana upotrebljavajući medij koji se sastoji od Williams-ovog Medija E dopunjenog sa 10% zap/zap fetalnog telećeg seruma i neomicinsulfatom. Na dan 7, ćelije se ponovo hrane (snabdjevaju) sa svježim medijem koji sadrži dovoljno virusa da inficira kulture pri oko 0.1 MOI, i prebacuju se u sredinu na 32°C. Kulture se dalje inkubiraju na 32°C 21 dan uz ponovno hranjenje jedanput nedjeljno. HAV se sakuplja tretiranjem slojeva ćelija sa lizis puferom koji sadrži 0.1% Tritona X-100, 10 mM TRIS, 1 mM MgCl₂ pH 7.5. Dobiveni lizat iz NCF-a se sakuplja i zamrzava do dalje prerade.

Četiri litra zamrznutog virusa hepatitisa A sakupljenog iz kulture NUNC ćelijske tvornice tretiranjem sa TRITONOM X-100 se otkrave u vodenoj kupaoi na 20-30°C 4 sata i zatim se filtrira. Profiltrirani lizat se koncentrira desetostruko na Pellicon aparaturi upotrebljavajući odsječak membrane od 300.000 molekulske težine. Koncentrirani lizat, približno 400 ml, se zatim diafiltrira prema 10 mM Tris-HCl pufera, pH 7.5 koji sadrži 150 mM NaCl i 1 mM EDTA. Triton se uklanja šaržnim tretiranjem sa AMBERLITOM XAD-4- (Rohm and Haas Company) polimernom smolom pri 30 mg/ml lizata. Poslije filtracije da bi se uklonio XAD-4, lizat se podesi na 510 mM NaCl i zatim se taloži dodatkom polietilen glikola (PEG 8000, Sigma) do 5% (zap/zap) finalne koncentracije. Smjesa se snažno mješa, inkubira se na 4°C 1 sat i zatim se centrifugira pri 1000 x g na 4°C 10 minuta. Poslije centrifugiranja gornji sloj tečnosti se uklanja i odbacuje. Talog se tada otapa u 6.2 mM natrij fosfatnom puferu, pH 7.2 koji sadrži 120 mM NaCl i 1 mM EDTA. Ponovno suspendirane pelete se tada ekstrahiraju sa jednakom zapreminom smjese kloroforma: izoamil alkohola (24:1 zap/zap). Smjesa se snažno mućka i zatim centrifugira na 3000 x g 10 minuta na 20°C. Razdjelna površina koja sadrži nerastopljeni materijal se ponovno ekstrahira u istoj smjesi organskih otapala upotrebljavajući 30% početne zapremine. Poslije centrifugiranja, dvije vodene faze se spoje. Kloroformski ekstrakt se tada podešava na 350 mM NaCl i kromatografira se na DEAE-Sefarози CL6B (Pharmacia) na filtracioni način da se absorbira DNK. Frakcija koja protiče kroz kolonu, koja sadrži HAV se sakuplja i razblažuje faktorom od tri sa 6.2 mM natrij fosfatnim puferom, pH 7.5 i kromatografira se na TOYOPEARL DEAE 650M (Toso Haas) sa gradijentom elucije do 1 M NaCl. Hepatitis A eluiran na 15-30% 1 M pufera, što odgovara 15-30 mS. Frakcije izdvojene iz ovog regiona bile su poslije toga kromatografirane na Sefarози (Sephacrose) CL4B (Pharmacia) u 6.2 mM natrij fosfatnom puferu sa 120 mM NaCl. Punjenje ove kolone je podešeno tako da je veće nego 1% ali manje nego 5% od zapremine kolone. Proizvod je eluiran između 46 i 64% od ukupne zapremine kolone.

Finalna prečišćena šarža je sterilno filtrirana na 0.22 mikrona i inaktivirana sa 1:4000 formalinskog reagensa (formalin je 37-40% težinski formaldehida) na 37°C 20 dana. Ovi uvjeti pokazuju kinetiku razlaganja prvog reda sa poluperiodom od 2 sata i gubitkom od približno 3.5 log₁₀ TCID₅₀/24 sata. Inaktivacioni period je produžen do 20 dana da bi se osigurao veliki stupanj sigurnosti. U inaktivirani hepatitis A se dodaje kalij aluminij sulfat i zatim se otopina taloži dodatkom natrij hidroksida do pH 6.6-6.8. Formaldehid i preostale soli se uklanjaju centrifugiranjem pri čemu se gornji sloj tečnosti uklanja i zamjenjuje sa fiziološkom slanom otopinom.

PRIMJER 9

Prečišćavanje hepatitisa A sakupljenog iz COSTAR kocki sa Tritonom X-100, upotrebljavajući tretiranje nukleazom i vezujuću kromatografiju: Postupak proizvodnih razmjera

Materijal proizvodnih razmjera se dobiva koristeći SSR postupak za razmnožavanje virusa. U ovom postupku COSTAR kocka se upotrebljava kao površina rasta ćelija; kocka se vezuje u COSTAR CS2000 saturator upotrebljavajući vanjski otvor i pumpu koja tjera tok medija, kao što je opisano u Primjeru 3. MRC-5 ćelije se inokuliraju u COSTAR KOCKU SSR, i gaje se na 37°C 7 dana. Rasprašivanje je započeto dva dana poslije unošenja ćelija. Reaktor je kontinualno prskan sa Williams-ovim Medijem E dopunjenim sa 10% zap/zap gvoždem dopunjenog telećeg seruma i neomicin sulfatom. pH reaktor se kontrolira između 6.9 i 7.6, i otopljen kisik u reaktoru dostiže između 15 i 100% zasićenja zrakom u mediju. Dopusšteno je da rast ćelija teče ukupno 7 dana, i virus se unosi u reaktor pri približno 0.1 MOI, upotrebljavajući šaržu virusa dobivenu prema postupku iz Primjera 1. SSR temperatura se smanjuje do 32°C, i napajanje se nastavlja 21 dan. SSR se tada ispušta i medij se ponovo puni sa 0.1% tež/zap TRITONA^R, 10 mM TRIS^R, pH 7.5 pufera da bi se oslobodio HAV. Za četiri serije virusa proizvedenog ovim postupkom u COSTAR kocka sistemima kao što je prikazano u Primjeru 10, HAVAg proizvodnja prosječno je bila 2,8 puta veća od historijske prosječne vrijednosti u NCF reaktorima koristeći Monroe-ov postupak razmnožavanja na bazi površine. Povećana SSR produktivnost omogućila je lako povećanje razmjera postupka razmnožavanja do proizvodnih razmjera.

Sirovi lizat se tretira sa BENZONASOM da bi se oslobodio virus iz adukata nukleinske kiseline i zatim se vezuje virus na anjonskoj izmjenjivačkoj kromatografiji. Tretiranje BENZONASOM eliminira potrebu za stupnjem koncentriranja/diafiltracije, tretiranja sa XAD-4 i DNK filter kolonom (Vidjeti Primjer 8).

Dvadeset i pet litara iz COSTAR kocke Tritonom X-100 sakupljenog materijala se tretira sa 5-25µg BENZONASE/1 lizata u prisustvu 1 mM MgCl₂ i zatim se filtrira kroz filter od 0.22 mikrona. Smjesa se inkubira 18 sati na 25°C. Enzimom tretirani lizat se nanosi na TOYOPEARL DEAE 650 M anjonsku izmjenjivačku kolonu uravnoteženu sa 4.7 mM natrij fosfatnog pufera, pH 7.2 koji sadrži 90 mM NaCl.

Hepatitis A se eluira (prosječno 800 ml) sa 6.2 M natrij fosfatnog pufera koji sadrži 0.35 M NaCl i 1 mM EDTA. Test postupci koji koriste kinetičku analizu za aktivnost enzima, razvijeni su radi registriranja uklanjanja enzima u toku postupka. Rezultati pokazuju da se >90% aktivnosti endonukleaze može pripisati frakcijama od pranja i frakcijama koje protiču kroz vezujuću kolonu. Osim toga, ukupna aktivnost nukleaze, uključujući i onu od dodate BENZONASE, u proizvodu iz vezujuće kolone smanjuje se za faktor od > 100 u usporedbi sa količinom prisutnom u početku u lizatu.

Koncentracija NaCl hepatitisa A proizvoda iz vezujuće kolone podešava se na 420 mM i virus se taloži sa polietilen glikolom (PEG 8000, Sigma) pri finalnoj koncentraciji od 4.5%. Smjesa se snažno mješa i zatim se inkubira 1 sat na 4°C. Poslije inkubacije, talog se sakuplja centrifugiranjem pri 1000 x g 10 minuta na 4°C. Gornji sloj tečnosti se uklanja i odbacuje. PEG talog se ponovno suspendira u 6.2 mM natrij fosfatnog pufera, pH 7.2 koji sadrži 120 mM NaCl i 1 mM EDTA. Organska ekstrakcija ponovno suspendiranog PEG taloga se vrši dodatkom 1.5 zapremina kloroforma : izoamil alkohola (24:1, zap/zap). Odvajanje faza se potpomaže centrifugiranjem na 3000 x g 10 minuta na 20°C i gornja, vodena faza se zadržava. Razdjelna površina se ponovno ekstrahira sa 30% od originalne zapremine organske smjese, centrifugira se i druga vodena faza se spaja sa prvom.

Vodeni ekstrakt se kromatografira na TOYOPEARL DEAE 650 M (Toso Haas) anjonskoj izmjenjivačkoj matrici i eluira se sa gradijentom od 1 M NaCl. Virus hepatitisa A se eluira na 15-30%c od 1 M gradijenta što odgovara 15-30 mS. Izdvojene su frakcije iz ovog regiona i podvrgnute ekskluzionoj kromatografiji po veličini. Ekskluzionna kromatografija po veličini koristila je dvije kolone, TOYOPEARL HW55S i HW65S. Pod ovim uvjetima virus hepatitisa A je bio u inkludiranoj zapremini za obje matrice i uređaj tandem kolona je upotrebljen da bi se razdvojile nečistoće i viših i nižih molekularnih težina iz virusa hepatitisa A. Kolone su uravnotežene sa 6.2 mM natrij fosfatnim puferom, pH 7.2, koji sadrži 120 mM NaCl. Sakupljeni su eluirani hepatitis A u simetričnom piku i frakcije proizvoda.

Sterilni profiltrirani proizvod na 0.22 mikrona iz ekskluzione kromatografije po veličini je inaktiviran pri približno 500 jedinica/ml (jedna jedinica odgovara oko 1 ng virusnog proteina) sa 370 µg/ml (1:1000 razblaženje formalina što je 37-40% težinski formaldehida) 5 dana na 37°C. Inaktivirani virus hepatitisa A je sterilno filtriran na 0.22 mikrona. Ko-taloženje sa aluminij hidroksid vrši se dodavanjem na početku kalij aluminij sulfata i zatim titracijom do pH 6.6-6.8 sa natrij hidroksidom.

Preostale soli i formaldehid se uklanjaju postupkom taloženja/dekantiranja u kojem se gornji sloj tečnosti uklanja i zamjenjuje sa fiziološkom slanom otopinom.

PRIMJER 10

Proizvod dobiven postupkom, kao što je opisano gore, analizira se na: protein pomoću amino kiselinske analize (hidrolizom plinske faze i zatim PITC obilježavanjem i reverzno-faznom visoko-rezolucijom tečnom kromatografijom); HAV antigen pomoću HAV antigen imunoanalizom enzima na čvrstoj fazi (antigen vezan koristeći preparat humanog poliklonalnog antitijela, a zatim detekciju sa mišjim monoklonalnim antitijelom i kozjim-anti-mišjim antitijelo/peroksidaza konjugatom) ugljenhidrat (uključujući detekciju glukoze i neglukoznog ugljenog hidrata; ne-glukozni ugljenhidrat je bio prisutan u proizvodu na nivou od manje nego 0.1 na µg proteina proizvoda) pomoću anjonske izmjenjivačke kromatografije pri visokom pH i pulzirajuće amperometrijske detekcije (HPAEC-PAD, kisela

hidroliza upotrebljavajući 2 N TFA, a zatim HPLC analizu). DNK ćelije domaćina pomoću hibridizacije ("dot blot" postupak upotrebljavajući Alu DNK fragment kao hibridizacionu probu); masnu kiselinu pomoću plinske kromatografije (metil esterifikacijom masnih kiselina, a zatim kapilarnom plinskom kromatografijom); RNK hidrolizom i reverzno-faznom HPLC analizom ribonukleotida.

- 5 Pored toga, rezultati prikazani niže, dobiveni prema prethodnim postupcima, SDS-PAGE analize i detekcije proteina pomoću bojenja srebrom ili pomoću "western blot" sa anti-HAV antitijela otkrili su samo prisustvo HAV specifičnih proteina nanošenjem 50-300 ng proteina. Pored toga, prisustvo punih kapsida je demonstrirano pomoću analize HAV specifične RNK hibridizacijom sa HAV specifičnim DNK probama, gradijenata gustoće saharoze i reverznofazne HPLC. Nađeno je da je HAV specifična RNK prisutna u proizvodu pri oko 0.1-0.2 µg na µg proteina. Ovaj nivo HAV specifične
- 10 RNK je u suglasnosti sa odnosom od oko 1/3 punih kapsida do oko 2/3 praznih HAV kapsida. Najzad, nezavisna mjera HAV čistoće je obezbjeđena pomoću analize prikazane u Slici 2, upotrebljavajući HPLC analizu, koja pokazuje jedan pik HAV proizvoda.

- Apsolutne koncentracije proteina, ugljenog hidrata, lipida i DNK predstavljene su niže u odjeljku A. Podaci iz odjeljka A su transformirani niže u odjeljku B normalizacijom u mikrograme proteina, a u odjeljku C, kao težinski postotak proteina (što označava odnos mase prisutnog ugljenog hidrata, na primjer, i mase prisutnog proteina, pomnoženo sa 100).
- 15 Rezultati ovih analiza su prikazani niže za osam preparata HAV dobivenih prema postupku komercijalnih razmjera prema ovom izumu.

A. Analiza sastava

<u>Serijski br.</u>	<u>Protein (mg/ml)</u>	<u>RNK (mg/ml)</u>	<u>Ukupni uglj.hidr. (mg/ml)</u>	<u>DNK*</u> (mg/ml)	<u>Masna kiselina (mg/ml)</u>
1	14.7	2.4	3.4	< 0.0045	< 0.3
2	8.0	1.1	3.7	< 0.0003	< 0.3
3	18.9	2.1	0.9	< 0.0003	< 0.3
4	17.0	1.5	2.5	< 0.0003	< 0.3
5	16.6	2.5	2.2	< 0.0003	< 0.3
6	8.4	1.5	1.1	< 0.0003	< 0.3
7	14.5	1.4	1.5	< 0.0003	< 0.3
8	14.6	1.8	1.2	< 0.0003	< 0.3

* Limit detekcije (LOD) za prvi uzorak je bio 0.0045 µg/ml.

5 Za naredne uzorke je povećana osjetljivost tako da je LOD iznosio 0.003 µg/ml.

Težinski % proteina

10

<u>Serijski br.</u>	<u>RNK</u>	<u>Uglj.hidr.</u>	<u>DNK</u>	<u>Masna kiselina</u>
1	16	23	< 0.036	< 2.0
2	14	46	< 0.004	< 3.8
3	11	5	< 0.002	< 1.6
4	9	15	< 0.002	< 1.8
5	15	13	< 0.002	< 1.8
6	18	13	< 0.004	< 3.6
7	10	10	< 0.002	< 2.1
8	12	8	< 0.002	< 2.1

Prethodni podaci karakteriziraju proizvod prema ovom izumu, prije inaktivacije i ko-taloženja sa aluminij hidroksidom, kao HAV preparat koji ima slijedeće karakteristike, na mikrogram na bazi proteina (sa proteinom koji je više od 95% čist HAV protein pomoću SDS PAGE i bojenjem srebrom):

15

Ugljeni hidrat koji se sastoji od glukoze	0.1 - 2.5 µg
Ne-glukozni ugljeni hidrat	0.2 µg
DNK	0.004 µg
Lipid	0.1 µg
20 HAV RNK	0.1- 0.2 µg

25

Prvenstveno, se ova analiza izvodi na prečišćenom HAV proizvodu prema ovom izumu, kada je HAV proizvod najkoncentriraniji, prije inaktiviranja i formulacije. Međutim, snabdjevena sa dovoljnim količinama inaktivirane ili finalno formuliranog cjepiva, ova analiza će sigurno dati suštinski slične rezultate. U jednoj posebno pogodnoj realizaciji, cjepivo prema ovom izumu ima slijedeći nominalni sastav na 25 jedinica/0.5 ml doze:

KOMPONENTA	KOLIČINA
Natrijum hlorid	4,500 µg
Aluminijum	250 µg
Natrijum tetraborat	19 µg
Formaldehid	< 200 ng#
Glukoza (polimer)	< 20 ng*#
Protein	25 ng*#
Hloroform	< 22 ng*#
HAV RNK	5 mg*#
Ne-glukozni ugljovodonik	< 4 ng*#
Masna kiselina	< 1 ng*#
Neomicin	< 1 ng*#
MRC-5 DNK	< 0.005 ng*
Albumin goveđeg seruma	< 0.02 ng*#
BENZONASA	< 0.0002 ng*#&

* Ekstrapolisano iz analiza prečišćene šarže virusa

Iz analiza demonstracionih uzoraka serije.

5 & Bazirano na analizi aktivnosti.

PRIMJER 11

10 Uspoređenje različitih HAV preparata

Prečišćen HAV proizvod prema ovom izumu uspoređen je sa opisom drugih HAV proizvoda kao što su opisani od strane njihovih proizvođača. Rezultati ovog uspoređenja prikazani su u Tabeli 1:

15 TABELA 1

USPOREĐENJE INAKTIVIRANIH CJEPIVA

ZA HEPATITIS A

Cjepivo	Ukupan protein (ng/doza)	Protein virusa (ng/doza)	Čistoća virusa
Ovaj izum	25 ^b -100	25 ^c -100	> 95 ^{e,f}
SmithKline Beecham	2000 ^b	300-500 ^d	≤ 25 ^f
Japan ^a	-----	1000 ^d	> 95 ^e

20

a) Udružen napor Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute Chiba Serum Institute, i Denka Bio-Research Institute.

b) Bazirano na podacima amino kiselinske analize (AAA) (amino acid analysis).

25

c) Definirano pomoću imunoanalize enzima HAV antigena; kalibracioni standard je bio prečišćeni virus, čistoće 90% pomoću SDS-PAGE/bojenjem srebrom, protein definiran pomoću AAA.

d) Definirano pomoću imunoanalize enzima HAV antigena; kalibracioni standard nedefiniran.

e) Definirano pomoću SDS-PAGE analize.

f) Definirano pomoću HAV antigena prema odnosu ukupnog proteina.

30 Iz ovih podataka i informacije date gore u Primjeru 10, očividno je da je proizvod iz ovog izuma mnogo čistiji (bazirano na HAV antigenu prema odnosu ukupnog proteina i amino kiselinskoj analizi), kompletnije karakteriziran, i sadrži najnižu količinu proteina virusa efikasnu da se postigne serokonverzija i zaštita nego bilo koji proizvod koji je ranije opisan za koji su dostupni analitički podaci.

PRIMJER 12

Efikasnost cjepiva - Monroe-ova studija

5 Cjepivo je dobiveno infekcijom slojeva MRC-5 ćelija kultiviranih u NUNC ćelijskim fabrikama sa CR326F HAV. Kultura je održavana nekoliko nedjelja pomoću regularnog napajanja. U pogodno vrijeme inficirani monoslojevi MRC-5 ćelija su sakupljeni tretiranjem deterdžentom i HAV je prečišćen prema postupku iz ovog izuma, što je prikazano na slici 1 za NCF-e. Vodeni virus se absorbira na aluminij hidroksid i odlaže se na 2-8 C. Doze 0.6 ml svaka sadrže 25 jedinica antigena virusa hepatitisa A, bazirano na radioimunoanalizi prema prečišćenoj standardnoj referenci virusa, i 300 µg aluminij hidroksida. Placebo je sadržao 300 µg aluminij hidroksida i timerosal pri 1:20,000 razblaženju. Zdravi, seronegativni primaoci cjepiva pri visokom riziku od dobivanja HAV infekcije, dobili su ili jednu dozu od 0.6 ml placeba cjepiva. Na dan cjepljenja i jedan mjesec kasnije uzeti su uzorci krvi. Skoro 100% primalaca cjepiva bilo je bez HAV infekcije pošto je vrijeme čekanja od 50 dana uzet u obzir za pretraživanje pojedinaca koji su dobili HAV infekciju prije cjepljenja. S druge strane, značajan broj placebo primalaca je dobio HAV infekciju poslije perioda od 50 dana pretraživanja.

Proučavana populacija je bila dovoljno velika tako da je zaštita primalaca cjepiva statistički značajna.

PRIMJER 13

20 Proizvodnja virusa u statičkom mikser reaktoru

Virus hepatitisa A je razmnožavan u SSR koji se sastoji od statičke mikser kolone vezane za saturator pomoću vanjskog otvora i sistema pumpe (Charles River Biological Systems CRBS 5300). Statički mikser reaktor se proizvodi od elemenata metalnog titana koji imaju ukupnu površinsku oblast od oko 260,000 cm², u koloni od 8" prečnika 40" dugačjoj. MRC-5 ćelije se unose u reaktor i gaje se 7 dana na 37°C u Williams-ovom Mediju E dopunjenom sa 10% zap/zap fetalnog telećeg seruma i Neomicin sulfatom. Ostavi se da rast ćelija teče 7 dana, i dio medija se mjenja tri puta nedjeljno, pri čemu se dobiva brzina napajanja jednaka sa NCF Monroe-ovim postupkom. Virus se unosi u reaktor pri približno 0.1 MOI. SSR temperatura se smanjuje na 32°C i napajanje se nastavlja kao gore 22 dana. Iz SSR se tada ispušta medij i ponovno se puni sa 0.1% tež/zap Triton^R pufera da bi se oslobodio HAV. Ovaj reaktor proizvodi približno 50% više HAVAg na bazi površine nego kontrolna T-boca inokulirana upotrebljavajući iste reagense, napajanje (hranu), razmnožavanja i sakupljanja na sličan način. HAV proizvodnja reaktora je također uspoređena pogodno sa NUNC ćelijskim fabrikama iz Primjera 2.

PRIMJER 14

HAV PROIZVODNJA NA STATIČKIM MIKSER ELEMENTIMA MREŽE OD NERĐAJUĆEG ČELIKA

40 14.1 MATERIJALI I POSTUPCI

Kultura ćelija

U svim studijama su upotrijebljene MRC-5 ćelije pri PDL ≤ 40. Ćelije su kultivirane u Williams-ovom E mediju koji sadrži 10% željezom obogaćenog telećeg seruma, 2 mM glutamina, i 50 ml/1 neomicin sulfata na 37°C. U studijama u kojima se koristi tank reaktor koji se prska i mješa, u medij se dodaje Pluronic F-68. Gustoća ćelija od 10,000 ćelija/cm² je upotrijebljena da se inokuliraju nove površine kulture. Prebrojavanje ćelija je izvršeno upotrebljavajući Coulter brojač i/ili hemacitometar sa bojenjem Tripa ("Trypan") plavim radi određivanja sposobnosti za život.

50 Kultura ćelija na metalnim kuponima

Kupon od čvrstog metala ili metalne mreže oko 5 cm x 5 cm, stavi se u staklenu petri zdjelu od 150 cm² i sterilizuju se. Poslije dopuštanja da se ohladi, u zdjelu se stavlja 90 ml medija i zatim se dodaje inokulum ćelija. Količina medija je dovoljna da potpuno prekrije metalne površine. Poslije 1 dana na 37°C metalni dio se uklanja koristeći sterilni forceps, i stavlja u novu sterilnu petri zdjelu (da bi se spriječio rast ćelija na staklenoj površini) koja sadrži 90 ml medija. Čvrsti slojevi se tretiraju tripsinom, pranjem dva puta sa fosfatno puferiranim slanim otopom (PBS) i dodavanjem 2 ml tripsina na metal. Poslije uočavanja oslobađanja ćelija, tripsin se pažljivo pipetira nekoliko puta iznad površine da bi se osiguralo potpuno uklanjanje.

60 Sirovina za virus i infekcija

U svim studijama je upotrijebljena sirovina za virus hepatitisa A, CR326F P28, sa titrom od 10^8 TCID₅₀/ml. MOI vrijednosti prikazane ovdje, izračunate su kao TCID₅₀/ćelije, a ne kao PFU/ćelije. Kulture su inficirane dodavanjem sirovine za virus u svjež medij i dodavanjem ovoga u kulturu. Poslije inficiranja kulture su inkubirane na 32°C.

Bojenje sposobnosti za život na kuponima mreže

Sposobnost za život ćelija je registrirana upotrebom za bojenje fluorescein diacetata (FDA) i etidij bromida (EB). U ćelijama sposobnim za život FDA se cijepa esterazom u citoplazmi pri čemu se dobiva slobodan fluorescein koji fluorescira zeleno. EB se brzo interkalira u DNK jezgra ćelija ne-sposobnih za život i fluorescira crveno. Ćelije su obilježavane sa obje boje jednovremeno. Otopina za bojenje sastojao se od 100 µl FDA sirovine (5 mg/ml u acetonu) i 200 µl EB sirovine (10 mg/ml u PBS) u 50 ml PBS. Materijal mreže je tada inkubiran u 5 ml ove otopine 5-6 minuta. Poslije obilježavanja, nosač je opran dva puta u PBS (20 ml po pranju) i postavljen između donje pločice i gornje pokrivne pločice mikroskopskih stakala. Uzorci su zatim posmatrani koristeći BioRad MRC-600 konfokalni mikroskop.

Statički mikser reaktor

Mreža (poznata kao "E-pak") i čvrsta ploča od 316 nerđajućeg čelika elementi statičkog miksera (SMV konfiguracije) dobiveni su od firme Koch Engineering (Wichita, KS). Svi elementi su bili približno 2" x 2", konstruirani od tipa 316 nerđajućeg čelika ili titana. Površina čvrstih elemenata je tako određena da bude 1300 cm², a elementi mreže su tako određeni da budu 2300 cm². Površina tečnog zapreminskog odnosa ovih posljednjih elemenata je bila približno 26 cm²/ml (oko 24 cm²/ml na bazi ukupne zapremine reaktora). Pet elemenata se nominalno postavlja u obliku niti staklenu kolonu od 5 cm x 26.5 cm sa PTFE djelovima za spajanje na kraju. Elementi su postavljeni u konfiguraciji sa smjerovima mješanja perpendikularno u uzastopne elemente. Kolona sa elementima sačinjava reaktor za rast ćelija. Tank satelitne posude koje se mješaju, vezane za elektronske kontrolore, upotrijebljene su za kontroliranje pH medija na 7.2-7.3 i do na 80-90%. Medij se recirkulira iz tanka koji se mješa u reaktor upotrebom peristaltične pumpe.

Zasijavanje reaktora je izvršeno obezbjeđivanjem niske brzine cirkuliranja da bi se omogućilo ćelijama da se vežu. Inokulum je stavljen u sistem i tipično recirkuliran pri 100 ml/min 5 minuta da bi se izmješale ćelije i medij. Veoma malo vezivanja ćelija se dogodilo u toku ovog brzog recirkulacionog perioda. Brzina protoka je zatim smanjena na oko 2 ml/min, što je obezbjedilo linearnu brzinu kroz reaktor približnu brzini sedimentacije ćelija. Nađeno je da su brzine oko brzine sedimentacije ćelija optimalne za brzine vezivanja i podjednaku distribuciju ćelija kroz reaktor.

Postupak lizisa ćelija

Ćelije su lizirane u Tritonskom puferu za lizis, koji je sadržavao 0.1% Tritona X-100, 10 mM Tris, i 1 mM MgCl₂. T-boce su oprane dva puta sa 0.3 ml/cm² PBS, i lizirane dva puta sa 0.1 ml/cm² pufera za lizis 1 sat. Protokoli za reaktore za liziranje opisani su u tekstu.

Analitički postupci

Ćelijski metabolizam je mjeran upotrebljavajući Kodak Ektachem DT60 analizator. Virusni antigen hepatitisa A (HAVAg) je analiziran upotrebljavajući imunoanalizu na bazi enzima monoklonalnog antitijela. Ukupni protein lizata ćelija je određen kvantitativno upotrebljavajući Coomassie plav Bio-Rad analizu proteina (Cat #500-0001) prema standardu albumina goveđeg seruma.

REZULTATI I DISKUSIJA

Rast MRC-5 ćelija na kuponima od čvrstog metala

Prije ove studije rad na statičkom mikseru je vršen na elementima od titana. Bilo je poželjno da se ispita rast ćelija na površinama od različitih legura, koje, pored toga što su jeftinije nego titan, obezbjeđuju veću plastičnost (rastezljivost) za lakoću proizvodnje statičkog miksera. Ispitivano je dvije vrste svakog od nerđajućeg čelika i Hastelloy vrste B i C. Kuponi od metala su inokulirani sa približno 10,000 ćelija/cm². Poslije 4 dana, ćelije su tripsinizirane (tretirane tripsinom) i registrirana je finalna gustoća ćelija:

Materijal	Ćelija/cm ²
Titan	1.4×10^5
316 nerđajući čelik	1.6×10^5
316L nerđajući čelik	1.2×10^5

Hastelloy B	2.2×10^3
Hastelloy C	1.3×10^4

Rast na obje vrste nerđajućeg čelika je bio sličan sa onim na titanu; ćelije nisu rasle na Hastelloy B, a rasle su loše na Hastelloy C. Razlike u gustoćama ćelija za nerđajući čelik i titan ne treba da se smatraju da je jedan bolji prvenstveniji; razlike su vjerovatno zbog različitosti analize.

Najviše podataka za postupke za virus hepatitisa A dobiveno je za rast ćelija na plastičnim držačima, npr., bocama za kulturu od polistirolnog materijala. Radi upoređenja, krive rasta MRC-5 ćelija na polistirolu, staklu i 316 nerđajućem čeliku prikazane su na Slici 3. Ćelije su rasle slično na svim površinama. Maksimalne specifične brzine rasta su slične (0.034 h^{-1} za plastiku, 0.032 h^{-1} za staklo, i 0.039 h^{-1} za 316 nerđajući čelik). Niža finalna gustoća ćelija dobivena za plastiku je vjerovatno zbog ograničenja hranljivih materija. Rast na plastici je izvođen u T-bocama, dok je rast na staklu i nerđajućem čeliku izvođen u petri zdjelama. Uslijed razlike u zapremini medija po cm^2 u svakom sistemu dolazi do neravnoteže u rezultatima dostupnih hranljivih materija. Rast ćelija i potrošnja glukoze za kupone od nerđajućeg čelika prikazani su na Slici 4.

Rast MRC-5 ćelija na kuponima od metalne mreže

U pokušaju da se maksimizira površina na jedinicu zapremine, metalni materijal mreže je ispitivan u petri zdjelama za rast MRC-5 ćelija. Za izvjesne kombinacije promjera žice i razmaka, komad sa istom projektiranom površinom kao čvrst kupon može da predstavlja veću ukupnu površinu za rast ćelija. Slojevi mreža mogu tada da budu formirani ili raspoređeni u reaktoru na takav način da se maksimizira raspoloživa površina na jedinicu zapremine reaktora. Da bi se ispitao rast ćelija, jedna površina mreže, MRC-5 kultura je vođena pomoću tehnika opisanih u odjeljku Materijali i Postupci.

Rast MRC-5 ćelija je ilustriran na mreži konstruiranoj bilo od 316 nerđajućeg čelika ili titana. Kuponi od mreže sa prečnicima žice koji se kreću od $100 \mu\text{m}$ do $400 \mu\text{m}$, tkanjima od 14×100 , 120×110 , 40×200 , i 107×59 žica na inč su ispitivani. Ćelije su rasle na svim uzorcima, do većih ili manjih opsega. U ranim stupnjevima, ćelije su rasle na površini žice. Ubrzo poslije toga, ćelije počinju da premošćavaju međušupljinske razmake, naročito u kutevima. Vremenom ćelije potpuno ispunjavaju međušupljinske razmake i formiraju višeslojne konstrukcije. Vizualnim ispitivanjem, mreža nosi veoma velike gustoće ćelija, koje su više nego povećane u razmjerima pomoću površine. Direktne koncentracije površine ćelija nisu dostupne pošto višeslojni rast na mreži nije podložan tripsinizaciji. Preliminarni rezultati pokazuju da je međušupljinska veličina važan faktor, pošto ćelije nisu sposobne da premoste velike međušupljine, a mreža sa malim međušupljinama smanjuje površinu do limita iste površine kao što je površina glatke ploče. Konstrukcioni materijal nije utjecao na rast ćelija, i zaključeno je da je bilo koji biokompatibilni materijal koji se može tkati u slojeve mreže, pogodan za upotrebu. Metalne mreže, koje se mogu tkati imaju to preimućstvo da se mogu lako čistiti i ponovno upotrijebiti za mnoge cikluse rasta ćelija, kao što je opisano niže.

Odavde na dalje, bit će citirana samo mreža od nerđajućeg čelika sa tkanjem od 107 žica $\times$ 59 žica na inč, i prečnikom žice od $160 \mu\text{m}$ (što daje razmak žice od $77 \mu\text{m} \times 270 \mu\text{m}$). Elementi statičkog miksera sa mrežom koji su diskutirani niže, konstruirani su od ovog materijala. Pored toga što je obezbjeđena povećana površina, mreža omogućava ćelijama da rastu u više slojeva. Mikrograf višeslojnog rasta ćelija na ovoj mreži prikazan je na Slici 5. Bilo je interesantno da se odredi da li su ćelije kroz slojeve sve sposobne za život, ili da li su ćelije u centru više slojeva nekrotične. Za ovu svrhu su upotrebljeni fluorescein diacetat i etidij bromid, kao što je detaljno opisano u odjeljku Materijali i Postupci. Ispitivanjem efikasnih presjeka mreže, upotrebljavajući laserski konfokalni mikroskop, očividno je da je daleko najveći dio ćelija bio sposoban za život na bazi činjenica da etidij bromid nije interkalirao DNK jezgra i da se fluorescein diacetat cjepao, pri čemu je dao slobodan fluorescein. Slika 6A prikazuje signal fluoresceina za seriju efikasnih presjeka kroz slojeve ćelija. Slika 6B prikazuje signal etidij bromida za iste presjeke. Odvojeni kuponi ćelija koji su učinjeni ne-sposobnim za život tretiranjem sa metanolom služili su kao pozitivna kontrola za etidij bromid i kao negativna kontrola za fluorescein diacetat u ovim eksperimentima. Ova kontrola je prikazana na Slici 7.

Sijanje ćelija na elemente mreže statičkog miksera

Uniformno sijanje je važno za optimalnu proizvodnost i za održavanje niskog, uniformnog udvostručavanja nivoa za proizvodnju bioloških preparata. Dobiveni su elementi mreže statičkog reaktora koji se sastoje od istog materijala ispitivanog gore. Cilindrični reaktor je orijentiran sa vertikalnom osi. Premda su ranije studije provođene sa reaktorom sa horizontalnom osi da bi se povećala sedimentacija ćelija na površinu za rast, nađeno je da je vezivanje na vertikalnu površinu isto toliko efikasno i predstavlja prvenstveni način rada. U toku ovog rada ćelije su zasijavane pri približno $10,000 \text{ cm}^2$. Ćelije su zasijavane u reaktorima sa višestrukim elementima, gdje su osi miješanja individualnih elementa bilo gdje između paralelnih ili devedeset stupnjeva jednog prema drugome. Radi svrhe miješanja tečnosti i optimalnog rada reaktora, prvenstvena je vertikalna konfiguracija.

Ćelije se nisu zasijavale u ranijim ispitivanjima gdje su korištene necirkulacione brzine koje su dale površinsku brzinu od 5 cm/min . Efikasnost zasijavanja je povećana punjenjem reaktora i dopuštanjem ćelijama da se zasijavaju gravitacionom

sedeimentacijom 2 sata. Ovo je rutinski obezbjedilo efikasnost zasijavanja veće od 90% (efikasnost zasijavanja - broj zasijanih ćelija/ukupan broj ćelija u inokulumu x 100%), međutim zasijavanje je bilo neuniformno.

Kao što je prikazano na Slici 8, element na dnu sadrži najviše ćelija, dok element na vrhu sadrži najmanje. Iz ovih podataka, izračunato je da prosječna brzina taloženja preparata MRC-5 ćelija iznosi 6 cm/h. U daljnjem eksperimentu koji koristi četiri elementa, medij se recirkulira radi zasijavanja pri brzini približno jednakoj sa brzinom taloženja. Dobiva se uniformno zasijavanje sa efikasnošću zasijavanja većom nego 90% za ove uvjete (Slika 8). Gornji rezultati demonstriraju da površinska brzina medija kroz reaktor utiče i na brzinu vezivanja ćelija i na krajnju distribuciju ćelija u reaktoru.

Uspoređenje rasta ćelija na čvrstom sloju i na elementima mreže statičkog mikser reaktora

Dva reaktora su postavljena i radila su istovremeno da bi se opisale razlike između čvrstog sloja i elemenata mreže. Čvrsti elementi su konstruirani od titana, a elementi mreže su konstruirani od nerđajućeg čelika. Određeno je da je površina 1300 cm² za čvrste elemente i 2300 cm² za mrežu, što pokazuje da je odnos mreže prema čvrstoj površini 1.8. Elementi čvrstog sloja rade združeno sa elementima mreže obezbjeđuju kontrolu za sve eksperimente. Reaktori su zasijani sa približno 10,000 - 20,000 ćelija/cm². Reaktori su radili na šaržni način sve dok koncentracija glukoze nije pala ispod 120 mg/dl, kada je započeto raspršivanje medija. Oba reaktora su inokulirana sa istim sakupljenim MRC-5 ćelijama, i napajanja su iz zajedničkog rezervoara za medij da bi se eliminirale bilo koje razlike ovih promjenljivih. Brzina preuzimanja glukoze (GUR) (glucose uptake rate) za svaki reaktor prikazana je na Slici 9. Slika 9A uspoređuje reaktore prema cm² upotrebljavajući površine navedene gore; ove površine se smatraju približnim. Slika 9B uspoređuje sisteme na bazi zapremine medija reaktora pošto je svaki reaktor bio iste veličine, tj., pet 2" elemenata sa 1 l satelitne posude za medij. Slika 9B ne uključuje aproksimacije s obzirom na površinu. Brzina preuzimanja glukoze se koristi kao mjera rasta ćelija i upotrebljava se za određivanje početak stacionarne faze. Posljednja točka na slici 9 pokazuje vrijeme kada su reaktori sakupljeni lizisom tritonom. Čelije su bile vizualno konfluentne sa čvrstom matricom i međušupljine na mreži su bile skoro popunjene na elementima mreže, što ukazuje da je moguće još rasta. Tada se raspršava medij pri brzini od 0.19 l/h za čvrst reaktor, i koncentracija glukoze u mediju u ovoj točki je bila 1.16 g/l. Brzina raspršavanja je bila 0.26 l/h za reaktor sa mrežom, i koncentracija glukoze u mediju je bila 0.69 g/l. Ovi rezultati demonstriraju bolju metaboličku aktivnost koja je dobivena za reaktor sa mrežom prema čvrstom reaktoru za fazu rasta (gajenja) ćelija.

Ovi reaktori su ispušteni i ćelije su lizirane upotrebljavajući deterdžent pufer za ekstrahiranje ćelijskog proteina, mjera za masu ćelija u reaktoru. Za ove eksperimente, postupak lizisa za sakupljanje proteina vezanog za ćeliju iz svakog reaktora bio je identičan: 2 l PBS na sobnoj temperaturi se cirkulira kroz reaktore pri 100 ml/min 5 minuta i zatim se ispušta. Ovaj postupak pranja radi uklanjanja proteina ponavlja se dva puta. Zatim se recirkulira 1 l pufera lizisa, iz odjeljka Materijali i Postupci, kroz reaktor pri 400-500 ml/min, 37°C, 1 sat. Ovo se ponavlja još jednom (lizat 1 i 2) i naredni lizati cirkuliraju duže 2 h za lizat 3, i 4 sata za lizat 4. Postotak proteina uklonjenog u svakom lizatu predstavljen je na Slici 10. Kada se izračunavanja proteina konvertiraju na gustoću ćelija pomoću korelacija predstavljenih u Dodatku 1, elementi čvrstog statičkog miksera sadržali su 3x10⁵ ćelija/cm², dok su elementi mreže sadržali 6x10⁵ ćelija/cm². Vjeruje se da je prethodni broj reprezentativan za reaktor sa čvrstim slojem, pošto su sve ćelije uklonjene tokom lizisa kako je demonstrirano brisanjem elemenata i posmatranjem obrisanog materijala pod mikroskopom. Međutim, nije uklonjen cjeli debris ćelija sa elemenata mreže kao što je promatrano pomoću mikroskopa, tako da je posljednji broj nizak prema predviđanjima. Na bazi reaktora, elementi gaze nose veću nego 3 koncentraciju od čvrstih elemenata. Pod uvjetom da su izračunavanja površine točna, ova razlika u ukupnom proteinu je veća od odnosa površina i dokaz je za višeslojni rast ćelija.

Proizvodnja HAVAg na elementima mreže statičkog miksera

HAVAg proizvodnja je demonstrirana za reaktor koji koristi elemente mreže statičkog miksera. Predmet ovog eksperimenta je bio da se odredi virusno razmnožavanje koje se događa na elementima mreže od nerđajućeg čelika koji nose višeslojni rast: ovo nije optimizirani sistem za proizvodnju HAVAg. Za ovaj eksperiment, upotrebljene su potpune zamjene medija, prije nego raspršivanje medija. GUR profil za ovaj eksperiment prikazan je na Sl. 11; GUR-i izračunati iz ove slike baziraju se na vrijednostima glukoze dobivenim na dan poslije ponovnog napajanja medija. Čelije su inficirane sa MOI od oko 1 na dan 7. Gustoća ćelija za MOI izračunavanja određena je na bazi brzine potrošnje glukoze u vrijeme infekcije. Kao što je promatrano sa postupcima kao što je u Primjeru 9, brzina preuzimanja glukoze je zaravnjena kratko poslije infekcije i poslije toga dolazi do opadanja, što je u suglasnosti sa infekcijom ćelija. Promatrano opadanje na Slici 10 je okomitije nego ono promatrano sa postupkom iz Primjera 9, i vjerovatno je uslijed uniformnijeg stupnja infekcije (Primjer 9 upotrebljeno MOI od 0.1). Virusni antigen se sakuplja 21 dana poslije infekcije pomoću lizisa Triton deterdžentom. Protokol za liziranje ćelija je iznijet niže.

Lizat 1: recirkuliranje pufera lizisa kroz statički mikser 1 sat na 37°C

Lizat 2: recirkuliranje pufera lizisa kroz statički mikser 1 sat na 37°C

Lizat 3: tretiranje ultrazvukom 1 sat u Branson kupaoni za tretiranje ultrazvukom 0.7 l pufera lizisa

Lizat 4: zamrzavanje elemenata u 1 l pufera lizisa 12 sati, rastapanje i tretiranje ultrazvukom 1 sat.

Postotak ukupnog proteina i HAVAg oslobođenih u ovim pranjima je prikazan na Slici 12. Prva dva lizata koji koriste recirkulaciju su bila veoma efikasna u uklanjanju HAVAg iz ćelija. Ovaj eksperiment je upotrebljavao samo 2 PBS pranja prije lizisa, i nije bio potpuno efikasan, zbog toga je postotak ukupnog proteina lizata 1 umjetno visok, a onaj kod 2, 3 i 4 su niski. Jedan sakupljeni uzorak je analiziran za HAVAg pomoći EIA prije zamrzavanja. Na osnovu postotaka svakog lizata određenih kasnije, ovo je odgovaralo prinosu antigena na površinu dvostruko onom iz Primjera 9. Cilj ovog eksperimenta je realiziran time što je došlo do virusnog rasta kao što je pokazano pomoću HAVAg. Ovaj eksperiment demonstrira korisnost statičkog mikser reaktora sa mrežom za proizvodnju HAV.

Mada je reaktor vjerojatno sakupljen kasno na osnovu GUR profila, prinosi antigena su bili relativno visoki, ukazujući na osjetljivost više slojeva na infekciju. Podaci također pokazuju značaj MOI u proizvodnji HAV; infekcijom pri MOI 1, izgleda da proces trajanja treba da bude smanjen za više od jedne nedjelje i sakupljen na dan 20. Na osnovu različitih podataka, vrijeme infekcije i MOI su važne promjenljive za postupak proizvodnje; ovi parametri su važni u smanjenju dužine kulture. Eksperimenti rasta ćelija, pokazuju da inficirane ćelije nastavljaju da rastu pri istoj brzini sličnoj ne-inficiranim ćelijama, čak za kulture inficirane pri visokim MOI sa CR326F P28 (Slika 13). Ovo je usprkos infekcije i temperature do 32°C, temperatura koja je dopuštena za rast za ovaj soj virusa. Maksimalna specifična brzina rasta izračunata iz ovih krivih je 0.015 h⁻¹ približno polovica brzine rasta neinficiranih ćelija na 37°C.

Činjenica da se ćelije ponašaju slično tokom prve nedjelje HAV infekcija je važna u radu reaktora, pošto se želi da se postigne najveća moguća koncentracija ćelija bez obzira na vrijeme infekcije i MOI. Ovaj eksperiment demonstrira da su optimizacija trajanja rasta ćelija, trajanje infekcije, i MOI isprepleteni.

Čišćenje elemenata statičkog miksera

Poželjno je da se posjeduje površina rasta koja se može ponovno upotrijebiti za biološku proizvodnju, da bi se eliminiralo odstranjivanje otpada, omogućila automatizacija reaktorskog postupka, i povećala reproduktivnost kulture. Obično se, elementi mreže peru sa destiliranim vodom da bi se uklonile soli medija (500 ml/min 1 sat), stavljaju se u 1 l 5% (tež/zap NaOH otopine i autoklaviraju 45 minuta. Poslije hlađenja, elementi se peru sa destiliranom vodom sve dok se ne oslobode od NaOH (kako je određeno pomoću pH otopine od pranja). Ovaj postupak je izuzetno efikasan u otklanjanju debris ćelija pomoću mikroskopskog provjeravanja. Smatra se da će biti potrebno mnogo manje neprijatnih tretiranja za dobivanje ekvivalentnog čišćenja, i da je mnogo pogodnije za samočišćenje proizvodnog reaktora. Elementi mreže tretirani ovim postupkom ponovo su upotrebljeni za posljednjih deset ciklusa bez promjene u osobinama rasta ćelija. Elementi u gornjoj studiji rasta virusa dobiveni su na ovaj način, demonstrirajući korisnost upotrebljenih, očišćenih elemenata za razmnožavanje HAV.

ZAKLJUČCI

Ove studije su pokazale da su elementi statičkog miksera konstruirani od nerđajuće čelične mreže sposobne da nosi višeslojni rast MRC-5 ćelija. Pokazano je da su višeslojni elementi-sposobni za život, bez indikacije nekroze. Ispitivanja infekcije pokazuju da su ovi višeslojni elementi osjetljivi na infekciju hepatitisom A i u ne-optimiziranom sistemu proizvode antigen u višku od onoga što se uobičajeno realizira upotrebljavajući čvrste podloge kao što su u Primjeru 9. Sa mikronosačem kulture, može da dođe do zgrudnjavanja ćelija u loše definiranim višeslojevima; statički mikser sa mrežom obezbjeđuje dobro definirane višeslojne elemente uslijed majstorske geometrije i zbog toga ograničenja u hranljivim materijama i akumulacija otpada predstavljaju manji problem. Rast ćelija unutar međusupljina smjesa zatvara međusupljine i stvara zapašeni uzorak sličan onome kod elemenata čvrstog sloja. Zbog toga sistem koristi pogodnosti mješanja statičke mikser tehnologije i dovodi do predvidljive i uniformne ishranjenosti ćelija. Ovo je u suprotnosti sa drugim tipovima punjenih reaktora sa slojevima kao što su nasumično pakirani slojevi od vlakana, pakirani slojevi od staklenih kuglica, reaktori sa šupljim valnima, ili keramički monolitni reaktori. U ovim tipovima reaktora rast ćelija izaziva pogoršanje modela toka medija i stvara loše ishranjene džepove ćelija. Ukupno, ponovno upotrebljivi reaktor koji sadrži elemente statičkog miksera sa mrežom združuje veći potencijal za kultiviranje MRC-5 ćelija i proizvodnju antigena hepatitisa A.

PRIMJER 14 - DODATAK 1

IZVOD

Ukupan protein iz lizata MRC-5 ćelija je određen kvantitativno i uspoređen sa direktnim brojanjem ćelija (pomoću hemacitometra i upotrebom Coulter Brojača). Zdrave ćelije u ranim eksponencijalnim, kasnom eksponencijalnim, i stacionarnim fazama rasta, kao i ćelije na 1, 2 i 3 nedjelje poslije infekcije pokazuju da se mjerenja ukupnog proteina iz svake kulture lizata mogu direktno usporediti sa gustoćom ćelija upotrebom jednog nacrt. Ova jednostavna korelacija obezbjeđuje načine za određivanje gustoće ćelija u reaktorima koji nisu primjenljivi za tehnike direktnog brojanja.

DISKUSIJA

Analiza proteina i dobivanje uzorka

Bio-Rad analiza proteina (Cat.# 500-0001) je brza, osjetljiva analiza za kvantitativno određivanje ukupnog proteina. Rani eksperimenti su prikazali da se sadašnji pufer lizisa (0.1% Tritona X-100, 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM $MgCl_2$) ne sukobljava sa analizom na bazi Coomassie plavog. Radi postojanosti, sva razblaženja, uključujući i ona standardnog proteina (albumin goveđeg seruma) načinjeni su u tritonskom lizis puferu. Činjenica da su lizati ćelija tritonom često flokulentni u prirodi pokazuje da uzorci mogu da zahtijevaju dalje tretiranje prije nego što se analiziraju. Veliki flokulirani talog dovodi do visokih titara proteina. Međutim, poslije dva ciklusa brzog zamrzavanja (u etanolu na 70°C) i rastapanja, veličina flokuliranog taloga se smanjuje do stupnja kada se dobiva homogena suspenzija. Osim toga, analizirajući nekoliko razblaženja jednog uzorka, mogu da se javne nebitne točke koje potiču od loše pripremljenog uzorka koje se lako detektiraju. Uzorci su također centrifugirani i upotrebljen je izbistren gornji sloj tečnosti; ovo tretiranje je obezbjedilo slične rezultate ali je smatrano nepotrebnim. Rezultati koji su ovdje prikazani su za lizate ćelija zamrznute minimum dva puta i dobro mješanje prije nego što su analizirani.

Koncentracija proteina kao funkcija gustoće ćelija

Za jednu standardnu krivu koja dopušta konverziju ukupnog proteina u specifičan broj ćelija, ćelije kroz postupak mora da se sastoje od približno jednake količine proteina. Da bi se ovo odredilo, T-boce su inokulirane sa jednakim brojem ćelija. U određenim intervalima u postupku, dvije boce su žrtvovane. Jedna boca je tretirana tripsinom (tripsinizirana) i ćelije su izbrojane pomoću hemacitometra i Coulter brojača, dok je druga boca podvrgnuta lizisu deterdžentom, tj., oprana je dva puta sa 0.3 ml/cm² PBS, lizirana dva puta sa 0.08 ml/cm² bufera za lizis. Ovo je urađeno za kulture u ranoj eksponencijalnoj fazi rasta, kasnoj eksponencijalnoj fazi rasta, stacionarnoj fazi rasta kao i za kulture na 1, 2 i 3 nedjelje poslije infekcije. Kumulativni rezultati za ove eksperimente prikazani su na Slici 14. Najbolja interpolaciona linija je opisana jednačinom: $Y(10^4) =$

$-0.09 + 0.42X$. Ovaj obračun pokazuje da jedna kriva obezbjeđuje načine za određivanje broja ćelija pomoću mjerenja ukupnog proteina, bez obzira na "stanje" ćelija.

Ćelije u ovom eksperimentu su inficirane sa HAV CR326F P28 pri MOI od 1. Na 3 nedjelje poslije infekcije tripsinizacija je potvrdila ne-efikasnost u sakupljanju ćelija. Međutim, pošto su gustoće ćelija na 1 i 2 nedjelje poslije infekcije bile približno jednake, i vidljivi lizis ćelija na 3 izgleda da ne postoji, gustoće ćelija upotrijebljene za 3 nedjelje, bazirane su na podacima dobivenim na 2 nedjelje. Slika 14 je ponovo nanijeta, pokazujući vrijeme za svaku točku specifičnog podatka. Određivanjem podataka na 3 nedjelje poslije infekcije, na nagib i prekid krive nije bilo velikog utjecaja (vidjeti Sliku 15). Upotrebljavajući gornju korelaciju, podaci o ukupnom proteinu za nekoliko lizata kulture kao u Primjeru 9, dalo je prosječno 490 µg/ml proteina. Ovo se prevodi u približno $3,3 \times 10^5$ ćelija/cm², i uglavnom je u suglasnosti sa gustoćama ćelija određenim upotrebljavajući hemacitometar u kontrolnim T bocama. Zbrojeno, vjeruje se da ukupan protein iz lizata ćelija Tritonom obezbjeđuje korisnu apsoksimaciju gustoće ćelija u vrijeme sakupljanja virusa.

PRIMJER 15

Ispitivanje mješanja ekstrakcionog stupnja otapalom

Izvod

Tokom prečišćavanja hepatitisa A, stupanj ekstrakcije otapalom je bio kritičan u uklanjanju još prisutnih nečistoća na PEG pelete stupnju. U cilju da se potpuno razumije i kontrolira ovaj stupanj, izvršena je serija eksperimenata da bi se odredili važni parametri za ekstrakciju otapalom. Identificirane su dvije ključne promjenljive: trajanje mješanja i intenzitet mućkanja, što je određeno veličinom upotrebljenih boca. Odnos zapremine otapala prema vodi nije bio bitan faktor u toku ispitivanja, niti je bila upotreba mehaničke mućkalice kao što je suprotno ručnom mućkanju ili vrtloženju.

Materijali i Postupci

Uzorci ponovno suspendiranog PEG taloga su mješani sa otapalom kloroforma i izo-amil alkohola (24:1 $CHCl_3$: IAA) u različitim proporcijama od 0.5:1 do 3:1 (odnosi faza otapala prema vodi). Mješanje je vršeno ručno snažnim mućkanjem, vrtloženjem (za epruvete od 15 ml) ili na 3D mehaničkoj mućkalici (Glas-Col, Terre Haute Ind) pri brzini motora od 100 (sa epruvetama postavljenim horizontalno za epruvete od 15 ml i 50 ml). Vremena mješanja su se kretala od 20 sekundi do 1 sata.

Poslije mješanja, uzorci su centrifugirani da bi se odvojile faze. Za epruvete od 50 ml i boce od 500 ml upotrijebljen je Beckman J6-MI centrifugiran sa JS 4,2 oscilirajućim rotorom pri 3800 opm 10 minuta. Za male epruvete, u početku je

upotrijebljena Dynac II centrifuga pri 1000 opm 5 minuta, zatim za naredne eksperimente, uzorci su prebačeni u epruvete od 50 ml za centrifugiranje kao gore.

Vodene faze su uklonjene sa staklenom pipetom i analizirane pomoću HFLC po veličini pod slijedećim uvjetima: dvije TSK P4000x1 kolone (TosoHaas) u serijama, mobilna faza je bila RCM 8 (također navedena i kao CM563, koja je 150 mM NaCl u 6,2 mM fosfatnog pufera, pH 7.2) na 0.32 ml/min, registrirano na 214 i 260 nm (80 minuta vrijeme proticanja). Rezultati su izraženi kao oblasti pika ili odnosi oblasti pika na bazi 214 nm UV absorpcije. Za početne eksperimente u epruvetama od 15 ml, upotrijebljena je jedna TSK kolona (vrijeme proticanja 40 minuta). Zatim su upotrebljene dvije kolone postavljene da bi se dobila bolja rezolucija između pikova za HAP A i nečistoća.

Eksperimenti su u početku izvedeni u epruvetama od 15 ml na skali od 2-6 ml i uzorci su mješani ručno mućkanjem ili vrtloženjem. Kada su dobiveni rasijsani rezultati iz prvih nekoliko serija mješanje je izvođeno sa većim zapreminama (u epruvetama od 50 ml, napunjenim do maksimuma od 24 ml) na mehaničkoj mućkalici. Uzorci su također uzeti iz boca od 500 ml u toku prerade i proizvodnje serija. Boce su mućkane kratko vrijeme (na primjer 20 sekundi). Faze su ostavljene da se odvoje stajanjem oko 1 minute i uzorci od 600 µl su uklonjeni iz gornje faze. Boca je vraćena na mućkalicu još jedno kratko vrijeme, a zatim je ponovo uzorkovano. Ovi uzorci su kasnije rotirani u mikro centrifugi 2 minute pri maksimalnoj brzini.

REZULTATI

1. Vrijeme mješanja

Iz preliminarne eksperimenata malih razmjera u epruvetama od 15 ml, izgledalo je da je vrijeme mješanja važna promjenljiva, pri čemu je pri produženom vremenu mješanja došlo do boljeg uklanjanja nečistoća. Iz slike 6, jasno je da je odnos HepA prema nečistoćama povećan dužim vremenima mješanja. Pored toga, na Slici 20, može se vidjeti da se površina pika nečistoća znatno smanjuje sa vremenom mješanja.

Sa epruvetama od 50 ml, pokazano je da je vrijeme mješanja bilo krajnje važno, sa 3 minuta zahtjevanih u ovom primjeru za najveće uklanjanje nečistoća (Slika 20). U ovom slučaju, analiza se izvodi sa tandem kolonama radi bolje rezolucije i promatran je samo mali pad površine Hep A.

Efekat vremena mješanja je također proučavan kod boca od 540 ml upotrebljenih u proizvodnji. Uzorci su uzimani svakih 20 sekundi u toku od 2 minuta ukupnog vremena mješanja. Ovaj eksperiment je izveden sa dva različita odnosa otapala: 2:1 i 3:1, što također odgovara dvjema različitim zapreminama vodene faze u bocama (oko 60 ml i 90 ml, zapremina otapala je ostajala konstantnom na 180 ml).

Slika 21 pokazuje da se nivo nečistoća smanjuje sa vremenom mješanja, a da su potpuno uklonjene poslije 1 minuta i 40 sekundi. Vrijeme upotrebjeno u proizvodnji je bilo 2 minuta, što osigurava znatno uklanjanje nečistoća. Radi još potpunijeg uklanjanja produžava se na 3 minuta. Razlike u zapreminama i odnosima otapala izgleda da imaju malo efekta u upotrebnoj oblasti.

Ovaj eksperiment je produžen na duže vrijeme mješanja i u epruvetama od 50 ml i u epruvetama od 15 ml. Slika 22 pokazuje da se eventualno isti stepen čistoće postiže u svim upotrebljenim epruvetama, ali da je potrebno 6-8 minuta u manjim epruvetama i manje od 2 minuta u bocama za centrifugu od 500 ml. Ove razlike će biti prodiskutirane dalje u odjeljku 3. U cilju da se odredi da li na virus utiče produženo mućkanje, epruveta od 50 ml se mješa 1 sat na mehaničkoj mućkalici. HPSEC rezultati nisu pokazivali nika-kvo dalje opadanje površine pika Hep A i EIA rezultati (tabela 1) pokazuju da je antigenost ista za 1 sat kao i za 2 minuta mješanja. Tok iz postupka iz iste serije pokazuje sličnu EIA vrijednost. Zbog toga, da bi se osiguralo potpuno uklanjanje nečistoća u proizvodu, minimum vremena mješanja, kao što se vidi iz dijagrama, može da se produži bez smanjenja prinosa virusa.

TABELA 1

Efekat produženog mućkanja na Hep A pomoću HPSEC i EIA (epruvete od 50 ml)

Dužina mješanja	Odnos Hep A/nečistoće	EIA (J/ml)
2 minuta	0.74	23,800
1 sat	nečistoće se ne mogu detektirati	24,500
Procesni tok (2 minuta, boce od 500 ml)	8.6	20,000±16%

2. Odnos zapremine

Odnos zapremina otapala prema vodenoj fazi za jednu ekstrakciju bio je 1.5 za polupogonske serije (mješano u jednoj boci sa magnetnom mješalicom), i između 2 i 3 za demonstracione serije (mućkanje u bocama od 500 ml). Stoga je ispitan efekat odnosa zapremina između 0.5 i 3 na čistoću. Početni eksperimenti u malim razmjerima (u epruvetama od 15 ml, mješanje 1 minut) izvršeni su sa četir različite proizvodne šarže od početnog PEG taloga, slika 23 pokazuje da nikakva

jasna korelacija nije uočena između odnosa otapala i vodene faze i uklanjanja nečistoća. Rasipanje rezultata je vjerojatno zbog promjenljivih u polaznom materijalu i nekonzistentnost mućkanja.

Veličina uzorka je povećana u razmjerima do epruveta od 50 ml i mehanička mućkalica je upotrebljena 2 minute sa epruvetama postavljenim horizontalno. Rezultati su prikazani na Slici 24. Ponovo, iako postoji rasipanje podataka, nema jasnog trenda na bazi odnosa otapala prema vodi. Ovo je potvrđeno eksperimentima vremena mješanja u bocama od 500 ml sa 2:1 i 3:1 odnosom otapala (slika 21) pokazujući veoma malu razliku u uklanjanju nečistoća. Stoga izgleda da odnos otapala nije važna promjenljiva, i da povećanje u odnosu otapala nije doprinjelo povećanoj čistoći koja se vidi kod postojanih serija.

3. Tip mješanja i veličina posude

Nikakav trend nije mogao biti uočen za efekat ručnog mućkanja prema vrtloženju u malim (15 ml) epruvetama, pošto su rezultati rasuti za eksperimente iz različitih proizvodnih serija (slika 23). Jedna točka podatka na slici 19 također pokazuje dobro slaganje između ručnog mućkanja i vrtloženja. U većim epruvetama, uspoređeni su ručno mućkanje i mehaničko mućkanje. Na slici 25, se može vidjeti da ručno mućkanje daje samo malo različite rezultate od mućkalice za istu veličinu i punjenje epruveta. Tabela 2 prikazuje rezultate iz eksperimenata u bocama od 500 ml. Iz serije od šest boca, jedna se mješa ručno dok su ostale mućkane mehanički. Za svaki tip mješanja uzet je uzorak i HPLC analiza je pokazala da su veoma slični, oba daju visoku čistoću, potvrđujući da tip mućkanja nije kritičan, ali da je veličina upotrebene boce veoma važna, i da su boce od 500 ml bolje od epruveta od 50 ml za isto vrijeme mješanja na mućkalici, ovo je također ilustrirano podacima na slici 22.

TABELA 2

Efekat različitih tipova mješanja na odnos Hep A/nečistoće (2 minuta)

Tip mješanja	Odnos HEP A/nečistoće
Mehaničko mućkanje	2.47
Ručno mućkanje	2.69

Također je uzet u razmatranje nivo punjenja epruveta. Epruvete od 50 ml napunjene do nivoa od 10.5 ml (otapalo + voda) daju veoma slične rezultate sa tipičnim punjenjem od 21 ml. slično, boce od 500 ml napunjene sa 240 ili 275 ml pokazuju ekvivalentne količine uklanjanja nečistoća. (Slika 21). U toku svih eksperimenata mješanja, epruvete od 15 ml se pune ili sa 0.13 ili 0.4 od njihovog punog kapaciteta. Za epruvete od 50 ml, većina je napunjena do 0.53 kapaciteta (sa jednim eksperimentom pri 0.26), i boce od 500 ml su napunjenje između 0.48 i 0.57 od punog kapaciteta. Pošto su upotrebjeni slični nivoi za tri tipa epruveta i rezultati koji su dobiveni nisu mogli biti dovedeni u vezu sa nivoom punjenja, vjerojatno nema jak efekat u ovoj oblasti. Vjerojatno je, međutim, da ako su epruvete potpuno napunjene, neće biti gornjeg prostora i bit će teško da se mješaju. Kao rezultat ovo će smanjiti efikasnost uklanjanja nečistoća.

Još jedan faktor koji se mjenja, a koji može da bude važan je odnos širine prema visini epruveta: 0.13 za epruvete od 15 ml, 0.26 za epruvete od 50 ml i 0.58 za boce od 500 ml. Vjerojatno je veći odnos širine prema visini koristan za mješanje pošto dobiveni model za mućkanje dovodi do pojave veće međupovršinske oblasti.

Podaci iz ranijih polupogonskih serija sa istom prisutnom nečistoćom u PEG peletama su također ispitani. Četiri serije je ekstrahirano sa otapalom 1 minut u jednoj boci snabdjevenoj sa magnetnom mješalicom ili obrtnom mješalicom. Otopina je tada raspoređena u boce za centrifugu radi odvajanja faza centrifugiranjem. Odnos otapala prema vodi je bio 1.5. Dobiveni odnosi Hep A prema nečistoćama dostizali su od 0.48 do 2.7. Dodatna polupogonska šarža ja mućkana u koničnim bocama za centrifugu od 250 ml 1 minut sa odnosom otapala prema vodi od 1. Dobiveni odnos čistoće (Hep A/nečistoće) je bio 0.87. Svi ovi rezultati se mogu usporediti sa onima dobivenim u epruvetama od 15 ili 50 ml pod sličnim uvjetima, ali su mnogo niži nego tipične oblasti od 4 do 21 (za 8 šarži) dobiveni u demonstracionim serijama punih razmjera. Ovo je u suglasnosti sa dužim vremenom mješanja i većim bocama upotrebjenim u proizvodnim razmjerima.

Zaključak

Možemo zaključiti iz ovih podataka da je razlika u čistoći između demonstracionih serija punih razmjera i ranijih polupogonskih serija u tome što se mućkanje vrši u većim (500 ml) bocama i duže vrijeme (2 minuta prema 1 minuti). Efekat zapremine je vjerojatno uslijed veće međupovršinske oblasti koja nastaje od mućkanja u ovim bocama. Boce od 500 ml se tipično pune do nivoa manjeg od 300 ml, što dovodi do velike gornje oblasti koja se napuni u toku mješanja, što dovodi do značajne međupovršinske oblasti otapala/vode/zraka. Vjerojatno je da smanjena međupovršinska oblast može da bude odgovorna za nižu čistoću otapalom ekstrahiranog proizvoda dobivenog u malim epruvetama. Međutim, pošto je vrijeme mješanja važna promjenljiva, čistoća u epruvetama od 50 ml eventualno dostiže isti nivo kao i u bocama od 500 ml.

Za ostale promjenljive koje su ispitivanje, odnos otapala prema vodi i tip mućkanja, nije nađeno da su važne u ispitivanoj oblasti.

PRIMJER 16**Rastvorljivost virusa hepatitisa A**

- 5 Kao što je ranije opisano, znatan gubitak hepatitisa A je uočen na bazi HPSEC analize procesnih tokova iz produktivnih serija. Tokom prečišćavanja je određeno upotrebljavajući HPSEC kvantitativno određivanje da se više od 50% virusa gubi u toku noći između stupnjeva prečišćavanja iono-izmjenjivačkom kromatografijom i ekskluzivnom kromatografijom po veličini. Jednovremeno sa ovim gubitkom bila je pojava taloga koji se uklanja centrifugiranjem.
- 10 Postavljena je hipoteza da je talog bio hepatitis A i da je taloženje izazvano visokom ionskom jačinom pufera upotrebljenog za eluiranje virusa iz iono-izmjenjivačke kolone. Učinjeni su pokušaji da se talog otopi sa vodenom otopinom natrij klorida i natrij fosfata. Na bazi gubitka virusa upotrebljavajući HPSEC kvantitativno određivanje koncentracije taloga (stvarno mulj taloga) određeno je na nekoliko mg/ml, žalikvoti mulja taloga su pomješani bolo sa 6 mM natrij fosfata, 0.15 N natrij klorida u 6 mM natrij fosfata, 0.3 N natrij klorida u 6 mM natrij fosfata, 0.5 N natrij klorida u 6 mM natrij fosfata, ili 1 N natrij klorida u 6 mM natrij fosfata.
- 15 Kada se pomješa čak i sa manjom količinom 6 mM natrij fosfata talog se otapa u toku nekoliko sekundi. Međutim, kada se pomješa sa otopinom koja sadrži natrij klorid nije uočena nikakva velika razlika u izgledu (osim očevidnog razblaženja). Otopina sirovine za dobivanje otopine sirovine za hepatitis A dobiva se otapanjem 0.35 ml suspenzije sa 5,65 ml 6 mM natrij fosfata. Uočeno je da je do potpunog otapanja vidljivih čestica došlo poslije dodatka od samo oko 0.5 ml, natrij fosfatnog otapala. Uzorci otapala sirovine su pomješani sa različitim količinama 1 N natrij klorida u 6 mM natrij fosfata da bi se dostigla ciljana koncentracija od 0.15 N, 0.3 N, ili 0.5 N natrij klorida (Tabela I).
- 20

TABELA 16-I

Zapremina otapala sirovine	Zapremina 1N natrij klorida u natrij fosfatu	Razblaženje antigena	Natrij klorid molarost
1.5	.27	1.2	.15
1.5	.65	1.43	.30
1	1	2	.50

25

Koncentracije ovih otapala su zatim određene kvantitativno upotrebljavajući HPSEC, a zatim određene kvantitativno dvije nedjelje kasnije pomoću HPSEC. Ovi podaci su prikazani u Tabeli II i nanijeti na Slikama 27 i 28.

- 30 Slika 27 prikazuje početne koncentracije hepatitisa A izmjerene u otapalu približno jedan dan poslije dodatka soli. Pomoću HPSEC je određeno da otapalo sirovine ima koncentraciju od oko 100 mog/ml, što odgovara sa oko 2 mg/ml u staloženom mulju. (Količina hepatitisa A u ovom mulju tada grubo odgovara onom gubitku uočenom u toku proizvodnje. Pošto je uočeno da se talog otapa sa samo malom količinom dodatog fosfatnog otapala, otopljivost u otapalima sa malo slane otopine je određena kao veća od ili jednaka sa oko 1 mg/ml). Koncentracija antigena u otapalima koji sadrže natrij klorid je bila mnogo niža nego što odgovara za razblaženje otopine sirovine sa slanom otopinom. Pored toga, HPSEC
- 35 analiza otapala koji sadrže slano otapalo pokazuje da je agregirani materijal prisutan u velikim proporcijama u onim otapalima koji sadrže sol (Tabela II).

TABELA 16-II

40 **HPSEC REZULTATI ZA HEPATITIS A U SLANIM OTAPALIMA (DAN 1)**

Koncentracija natrij klorida	Antigen (kao monomer)	Agregat: monomer (Odnos površine)
0(otopina sirovine)	106 mog/ml	0
0.15 N	64	0.05
0.30	11	0.52
0.50	6.6	0.52

- Ovo pokazuje da se hepatitis A agregira i zatim taloži iz otopine čak pri koncentracijama ispod 50 mog/ml kada je u slanom otapalu. Slika 27 također prikazuje približni sastav proizvoda eluiranog iz iono-izmjenjivačke kolone (predstavljeno kao točka IEP). Ona je znatno iznad nivoa antigena koja se može održavati u otapalu čak jedan dan, i to bez znatnih izmjena u postupku prečišćavanja, potrebno je da se proizvod razblaži odmah pošto je eluiran iz iono-izmjenjivačke kolone. Da bi se smanjilo razblaženje na minimum, i da se smanji na minimum zapremina koja će se zatim nanijeti na preparativnu ekskluzionu kolonu po veličini, razblaženje treba da se dobije sa 6 mM natrij fosfatom da bi

se održala nominalna pH kontrola, dok se smanjuje ionska jačina i koncentracija antigena. Određeno je da jedan prema jedan razblaženje smanjuje koncentraciju antigena do točke koja je bila ispod krive na Slici 27 predstavljena pomoću IEP* na oko 25 mg/ml i 150 mM natrij klorida u fosfatu. Na bazi ovih podataka razblaživanje je uključeno u postupak prečišćavanja.

- 5 Slika 28 prikazuje koncentracije izmjerene u otapalima opisanim na dan 1 i dan 14. Očigledno je da su koncentracije antigena spale u toku vremena između dana 1 i dana 14, i da jedna prema jedan razblaženja ne razblažuje antigen ispod krive otopljivosti, već samo stabilizira otopinu virusa i služi da uspori, napad agregacije i taloženja. Moguće je da će dalja optimizacija razblaženja dovesti do daljeg poboljšanja prinosa proizvoda.
- 10 Najzad, kao provjera da otopina sirovine sadrži hepatitis A, a ne neki drugi materijal koji će ko-eluirati na HPSEC sa otapalom sirovine je predmet za SDS-PAGE i bojenje srebrom. Kada se uspoređi sa SEC proizvodom, jasne su iste trake za protein.

PRIMJER 17

15 **VISOKO REZOLUCIONA EKSKLUZIONA KROMATOGRAFIJA PO VELIČINI ZA REGISTRACIJU UZORAKA PREČIŠĆAVANJA HEPATITISA A**

Uvod

- 20 Razvijen je postupak za karakteriziranje i registriranje proizvodne performanse u toku prečišćavanja hepatitisa A. Analitička visoko rezoluciona ekskluziona kromatografija po veličini (HPSEC). (High Performance Size Exclusion Chromatography) sa UV detekcijom na 214 nm i 260 nm obezbjeđuje analizu relativnih količina virusa hepatitisa A i ključnih nečistoća (agregata, adukta nukleinske kiseline, hepatitisa A i 660 kDa nečistoće) u proizvodnim uzorcima.
- 25 Pored toga, HPSEC je upotrijebljena da bi se odredila kvantitativno koncentracija hepatitisa A u uzorcima iz posljednja 3 stupnja prečišćavanja (ekstrakcija, ionska izmjena i preparativna SEC). Ova analiza je upotrebljena da se registrira performansa hidrolize BENZONASE i da se obezbjedi otisak profila nečistoća Hep A na svakom proizvodnom stupnju za reference poslije toka postupka.
- Procesni uzorci hepatitisa A iz 10 proizvodnih serija analizirano je pomoću HPSEC da bi se obezbjedili podaci procesne performanse za sve stupnjeve prečišćavanja. Podaci iz ovih analiza zajedno sa dodatnom stabilnošću i studijama
- 30 obezbjeđuju i potvrdu HPSEC analize i jasnu indicaciju o konzistentnosti postupka za hepatitis A.
- Ovaj Primjer zbraja i podatke potvrde HPSEC analize, i rezultate analize 10 proizvodnih serija. Izvještaj je organiziran u slijedeće odjeljke:

35	ODJELJAK I	Instrumentacija i kromatografski uvjeti Opis HPSEC kolone i HPLC instrumentacija i radni uvjeti
40	ODJELJAK II	Analiza i kalibracioni postupci Opis dobivanja kalibracionih standarda i postupci analize
45	ODJELJAK III	Linearnost, točnost i reproduktivnost statističko određivanje
50	ODJELJAK IV	Analiza rezultata Prikazan je set kromatograma iz jedne serije, zajedno sa opisom tipa podataka sakupljenih za svaki proizvodni uzorak i preporučeni oprežan limit
55	ODJELJAK V	Uvjeti skladištenja uzorka Proučavanja skladištenja za svaki tip proizvodnog uzorka su izvršena da bi se odredila stabilnost na 4-6 C
	ODJELJAK VI	Uspoređenje EIA i HPSEC rezultata
	ODJELJAK VII	Procesna performantna konzistencija
60	DODATAK A	Rezultati HPSEC analize procesnih uzoraka iz 10 serija

ODJELJAK I Instrumentacija i kromatografski uvjeti

Materijali i reagensi

CM 80 (MMD) fosfatno puferirano slano otapalo koje sadrži 6 mM natrij fosfata 120 mM natrij klorida; pH 7.2

Instrumentacija

(Može se izvršiti ekvivalentna zamjena osim sa kolonom)

HPLC Sistem; RAININ Rabbit pumpa opremljena sa 10 ml glavom za pranje soli

Autouređaj za uzimanje uzoraka:

RAININ AI-1 snabdjeven je recirkulacionim hladnjakom za održavanje uzorka na 2-6 C

Detektor: RAININ UV-M dvo-kanalni UV detektor

Ak-vizicioni sistem podataka: Dynamax HPLC Method Manager,
Verzija 1.1 radi na Apple Macintosh SE

Kolona: TosoHaas TSK PW4000x1, 7.8 x 300 mm L
HPLC mikroampule - staklo ili poliipropilen.

Kromatografski uvjeti

Kolona: TosoHaas TSK PW4000x1, 7.8 x 300 mm L

Mobilna faza: CM 80 (6 mM natrij fosfata 120 mM natrij klorida, pH 7.2)

Brzina protoka: 0.32 ml/min

Detekcija: UV 214 nm i 260 nm S IV izlaz detektora

Injekciona zapremina: 50 ul

Vrijeme koje protekne između injekcija: 55 minuta

TSK PW4000x1 kolona

Upotrijebljena kolona je TSK PW4000x1, koja sadrži podlogu na bazi metakrilata od 5 um. Kalibraciona kriva dobivena iz polietilen oksidnih (PEO) standarda prikazana je niže. Točkaste linije pokazuju retencionna vremena 3 otopljen materijala od interesa; hepatitis A agregata, Hepatitis A, i 660 kDa kontaminanta. Također su točkastim linijama prikazana retencionna vremena 2 niskih molekularnih težina hidrofobnih spojeva, vitamina B12 i acetona. Oba jedinjenja su na desnoj strani kalibracione krive; retencija ovih spojeva pokazuje hidrofobnu prirodu polimerne podloge. Zadržani pikovi se vide u nekoliko procesnih uzoraka (vidjeti Sliku 29). Oni se uglavnom eluiraju u blizini pika soli i pretpostavlja se da su spojevi niskih molekularnih težina.

ODJELJAK II Analiza i kalibracioni postupci

Dobivanje kalibracionih standarda

Kalibraciona krivulja od šest nivoa upotrebljena je za kvantitativno određivanje hepatitis A. Kalibracioni standardi se dobivaju razblaživanjem prečišćenog hepatitis A proizvoda. SEC proizvod sa koncentracijom od 12 ug/ml je upotrebljen kao standard. Šest kalibracionih standarda koji pokrivaju oblast koncentracija od 0.75 do 12 ug/ml dobivaju se razblaživanjem SEC proizvoda sa CM80 kao što je prikazano niže.

Kalibrac. Standard	Hep A Konc. (ug/mL)	uL Hep A	uL CM80
1	12	250uL 9854 SECProd	0
2	9	180uL 9854 SECProd	60
3	6	250uL 9854 SECProd	250

4	3	250uL ^K al Stan 3	250
5	1.5	250uL ^K al Stan 4	250
6	0.75	250uL ^K al Stan 5	250

Standardi se dobivaju dodatak otopine hepatitisa A i CMBO direktno u HPLC mikroampule. Kalibraciona krivulja za hepatitis A dobiva se nanošenjem log hepatitisa A oblasti pika prema log koncentraciji. Tipična kalibraciona krivulja je prikazana na Slici 30.

- 5 Log-log transformacija podataka kalibracione krivulje je izvršena da bi se smanjila zavisnost kalibracione krivulje od visokih koncentracija kalibracionostandarda. Za kromatografiju bioloških makromolekula, promjenljiva podataka ima tendenciju da se povećava kako se koncentracije povećavaju. Za HPLC kalibracione krivulje, nagib regresione linije se zato primarno određuje pomoću najvećeg standarda koncentracije, koji je također najvarijabilniji.
- 10 Dijagrami 13 kalibracionih krivulja za hepatitis A (dobiveni kao što je opisano gore u toku 2 mjeseca perioda) prikazani su na slici 31. Na lijevoj strani je linearni dijagram 13 krivulja, a na desnoj strani je log-log transformacija istih 13 krivulja. Linearni dijagram pokazuje izraženo "razbuktavanje" krivulja od uobičajenog porijekla, jasno demonstrirajući povećanje varijanti oblasti pika hepatitisa A kako raste koncentracija. Rezultat je varijanta interkrivulje u vrijednostima nagiba.
- log-log transformacija ovih kalibracionih krivulja čini varijabilnost (RSD) konstantnom kroz cjelokupnu oblast koncentracija. Rezultat je smanjena interkrivulja varijacija nagiba, kao što je prikazano na slici 31B.

15 Postupci za dobivanje uzorka

A. Proizvodni uzorci hepatitisa A:

20 Analizirani su proizvodni uzorci iz slijedećih stupnjeva:

1. Filtrirani lizat
2. Nukleazom tretirani filtrirani lizat
3. PEG talog ponovno suspendiran
- 25 4. Kloroformon ekstrahirana vodena faza
5. Proizvod anjonske izmjene
6. Ekskluzioni proizvod po veličini

30 Uzorci filtriranog lizata, nukleazom tretiranog lizata i ekskluzionog proizvoda po veličini ne treba da se razblažuju prije injekcije. Uzorak PEG taloga ponovo suspendiranog treba da se centrifugira (10,000 x g 5 minuta) da bi se uklonile preostale čestice, prije injekcije. Uzorak PEG taloga ponovo suspendiranog razblažuje se 1:4 (zap/zap) sa CM80 prije injekcije. Kloroformon ekstrahirana vodena faza i proizvod anjonske izmjene analiziraju se ne-razblaženi i analiziraju se razblaženi 1:1 (zap/zap) sa CM80 prije injekcije da bi se dobila koncentracija u okviru kalibracione krivulje. Za sve uzorke, analiza se vrši u triplicatu i rezultati iz tri analize uzimaju se kao prosječni. Uzorci se skladište u auto uređaju za

35 uzimanje uzoraka na 2-6°C dok se čeka injekcija. Triton se slabo zadržava na TSK PW4000 x 1 koloni, i dodatni eluat je potreban da ga ukloni. Zbog toga, uzorci koji sadrže Triton (filtrirani lizat i nukleazom tretiran profiltrirani lizat) treba da se podvrgnu injekciji CM80 slijepe probe kako bi se osiguralo uklanjanje prije injekcije drugih uzoraka. Uzorci mogu da se obrađuju obrnutim redoslijedom polazeći sa SEC proizvodom da bi se spriječilo kasno eluiranje interferentnih pikova.

40 Postupak analize

1. Injektirati po 50 ul svakog od šest kalibracionih standarda. Retenciono vrijeme hepatitisa A treba da bude 19.0 +/- 1 minut.

45 2. Pripremiti uzorke kao što je gore opisano. Injektira se 50 µl. Svaki uzorak se analizira u triplicatu.

ODJELJAK III Linearnost točnost i reproduktivnost

50 Trinaest kalibracionih krivih koje pokrivaju oblast od 0.75 do 12.0 µg/ml dobivene su na 13 različitih dana u toku vremenskog perioda od 5 nedjelja. Regresiona jednačba dobivena za svaku krivu upotrebljena je za izračunavanje koncentracije svakog od kalibracionih standarda koji obuhvaćaju tu krivulju. Rezultati izračunati iz 13 krivulja su uspoređeni sa nominalnim koncentracijama za ovih 6 kalibracionih standarda kao što je prikazano niže u Tabeli 1.

55 TABELA 17-1

Uspoređenje izmjerenih prema nominalnim koncentracijama čistog
hepatitisa A. Izračunavanje bazirano na regresionoj liniji

5

NOMINALNE KONCENTRACIJE HEPATITISA A
KALIBRACIONI STANDARDI

10 kalibraciona
krivulja

	mm/dd	12ug/ml	9ug/ml	6ug/ml	3ug/ml	1.5ug/ml	0.75ug/ml
Krivulja 1	(10/6)	11.91	8.93	6.03	3.03	1.54	0.73
Krivulja 2	(10/7)	11.88	8.88	6.00	3.04	1.52	0.74
Krivulja 3	(10/8)	12.26	8.81	5.95	3.00	1.49	0.76
Krivulja 4	(10/10)	11.97	9.04	6.00	3.04	1.45	0.76
Krivulja 5	(10/13)	11.89	8.97	6.06	3.02	1.52	0.74
Krivulja 6	(10/14)	11.75	9.08	6.07	3.06	1.47	0.75
Krivulja 7	(10/20)	11.94	8.98	5.96	2.98	1.60	0.72
Krivulja 8	(10/21)	11.99	8.95	5.99	3.01	1.53	0.74
Krivulja 9	(10/22)	11.98	8.94	5.90	2.97	1.45	0.70
Krivulja 10	(10/26)	12.08	-9.05	6.00	2.98	1.48	0.76
Krivulja 11	(10/28)	12.01	9.05	6.00	2.95	1.51	0.75
Krivulja 12	(11/18)	11.48	9.23	6.14	3.00	1.52	0.73
Krivulja 13	(12/3)	11.88	8.90	6.10	3.04	1.50	0.74
Prosječno		11.92	8.98	6.02	3.01	1.51	0.74
Stan.devijac.		0.17	0.10	0.06	0.03	0.04	0.02
RSD		0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.03

15

Između dana reproduktivnost je veoma dobra za svih šest kalibracionih nivoa, sa RSD vrijednostima manjim nego 3% preko cjelokupnog opsega koncentracija. Točnost je također veoma dobra; za 12, 9, 6, 3, 1.5 ug/ml i 0.75 ug/ml standarda sve izmjerene koncentracije su bile unutar 5% od nominalne koncentracije.

Studija označavanja pika

Za daljnje određivanje specifičnosti i točnosti HPSEC analize izvršen je eksperiment označavanja pika. Anjonski izmjenjivački proizvod i kloroformom ekstrahirana vodena faza se obilježavaju sa jednakom zapreminom SEC proizvoda iz iste serije. Rezultati su prikazani u Tabeli 2 niže. Svi uzorci su analizirani u triplicatu.

TABELA 17-2

Regeneriranje hepatitisa A obilježenog u proizvodnim uzorcima

UZORAK	Izmjerena koncentracija (ug/ml)	Teorijska koncentrac. (ug/mm)	% pika regener.
Kloroformom ekstr.voda	7,27		
Anjonski izm. proizvod	8.87		
SEC proizvod	5.40		
OBILJEŽENI UZORCI			
Kloroform. ekst.voda 1:1 tež.			
1:1 tež/SEC	6.40	6.33	101
Anjonski izm. proizvod			
1:1 tež/SEC	7.18	7.14	101

Za obadva uzorka, potpuno regeneriranje je dobiveno, pokazujući specifičnost i točnost pomoću HPSEC određivanja koncentracije.

ODJELJAK IV Analiza rezultata

Izvod

Kao serija, HPSEC kromatografni obezbjeđuju sliku postupka prečišćavanja hepatitisa A. Uspoređivanje filtriranog lizata prema nukleazom tretiranog lizata obezbjeđuje potvrdu aktivnosti BENZONASE. Za ove uzorke, dobiveni su kromatogrami i na 214 nm i na 260 nm i integrirani.

Uspoređivanje posljednja 4 proizvodna uzorka, PEG pelete ponovno suspendirane, kloroformom ekstrahirana vodena faza, anjonski izmjenjivački proizvod i SEC proizvod pokazuju oslobađanje od 2 glavna proizvodna kontaminanta; agregiranog materijala 660 kDa kontaminanta proteina 660kDa. Izračunavanje postotka površine hepatitisa A za ove uzorke obezbjeđuje potvrdu da svaki stupanj postupka funkcionira kao što je planirano za uklanjanje ovih kontaminanata. Najzad, HPSEC analiza se upotrebljava za izračunavanje koncentracije hepatitisa A u finalna 3 stupnja postupka.

Analizirani su pomoću HPSEC uzorci filtriranog lizata, nukleazom tretiranog lizata, PEG peleta ponovno suspendiranih, kloroformom ekstrahirane vodene faze, anjonskog izmjenjivačkog proizvoda i SEC proizvoda iz 10 serija hepatitisa A proizvedenog u MMD. Kromatografski profil za svaki uzorak postupka je bio veoma reproduktivan kroz ovih 10 serija. U ovom odjeljku prikazan je kromatogram za svaki od 6 proizvodnih uzoraka, zajedno sa opisom informacija dobivenih za svaki uzorak, i tipični rezultati analize u triplicatu.

Filtrirani lizat i nukleazom tretirani lizat

Kromatogrami uzoraka filtriranog lizata i nukleazom tretiranog lizata dobiveni su na valnim dužinama od 214 nm i 260 nm. Za svaki od ovih uzoraka, kromatografski profil dobiven na 214 nm potpuno je različit od profila dobivenog na 260 nm. Komparativna analiza ovih kromatograma odražava svrhu HPSEC analize ovih uzoraka: da se nađe razlika koja se može kvantificirati između filtriranog lizata i nukleazom tretiranog lizata koja će pokazivati potpunost hidrolize BENZONASE. Zbog toga su u ovom odjeljku uspoređeni profili filtriranog lizata i nukleazom tretiranog lizata; prvo na 214 nm, a zatim je izvršeno isto uspoređivanje na 260 nm. Predstavljani su karakteristični podaci dobiveni za svaki uzorak kao i preporuku za kvantivno određivanje potpunosti aktivnosti BENZONASE.

Filtrirani lizat i nukleazom tretirani lizat na 214 nm

Kromatogrami filtriranog lizata i nukleazom tretiranog lizata na 214 nm prikazni su na slici 32. Na 214 nm, oba uzorka pokazuju seriju djelomično razdvojenih pikova. Zbog niske rezolucije dobivene za ove uzorke, integracija individualnih pikova u oblasti hepatitisa A je nemoguća; jedina informacija dobivena iz ovih uzoraka na 214 nm je ukupna UV površina za sve pikove. Rezultati triplikatne analize uzoraka također su prikazani na Slici 32. Ova ukupna UV_{214 nm} površina ne obuhvaća zadržani pik na 36 minuta. Ukupna UV_{214 nm} površina nukleazom tretiranog uzorka lizata je 15% niža ne o uzorka filtriranog lizata kao rezultat hidrolize BENZONASOM; kao vizualno uspoređenje 2 kromatograma (Slika 32) pokazuje gubitak absorpcije u regiji hepatitisa A. Međutim, definirana mjera ove hidrolize nije moguća pošto je uključena niska rezolucija pikova. Ukupna UV_{214 nm} površina dobivena je za 9 serija, ove vrijednosti su date u Dodatku A. Ove ukupne UV_{214 nm} površine ne obezbjeđuju nikakvu direktnu ili jedinstvenu procesnu performansnu informaciju, njihova upotreba je bila samo u registriranju stabilnosti uzorka, zato izračunavanje ukupne UV₂₁₄ površine nije potrebno za rutinsko objavljivanje.

(A) FILTRIRANI LIZAT

<u>Filtrirani lizat</u>	<u>Ukupna UV površina 214 nm (uV)</u>
1	27,248,238
2	26,404,744
3	<u>26,782,947</u>
Prosječno	26,811,976
Stan. Dev.	344,966

(B) NUKLEAZOM TRETIRANI LIZAT

<u>Nukleazom tretirani lizat</u>	<u>Ukupna UV površina 214 nm (uV)</u>
1	22,728,263
2	22,841,564
3	<u>22,784,419</u>
Prosječno	22,784,749
Stan. Dev.	46,256

Filtrirani lizat i nukleazom tretirani lizat na 260 nm

Kromatogrami filtriranog lizata i nukleazom tretiranog lizata na 260 nm prikazani su na Slici 33. Na 260 nm filtrirani lizat pokazuje određeniji profil, sa do 6 razdvojenih pikova. Prva dva pika, sa retencionim vremenima od 17.2 i 19.1 minuta, obuhvaćaju adukt hepatitis A-nukleinska kiselina i hepatitis A. Pošto obadva pika imaju neki stupanj nukleinskih kiselina vezanih sa njima, oni dominiraju 260 nm HPSEC profil.

Uspoređivanje uzorka filtriranog lizata sa nukleazom tretiranim lizatom na 260 nm (Slike 33A i 33B) obezbjeđena je jasna i nedvosmislena potvrda aktivnosti BENZONASE. Istaknuti pikovi očigledni u uzorku filtriranog lizata su potpuno uklonjeni hidrolizom sa BENZONASON, Slika 33B ne prikazuje nikakve raspoznatljive pikove na 17 i 19 minuta.

Potvrda hidrolize BENZONASOM

Analiza uzoraka filtriranog lizata i nukleazom tretiranog lizata iz 9 serija prikazano je niže u Tabeli 17-3. UV_{260 nm} površina za 17 i 19 minuta pikove za ovih uzoraka pokazuje da adicija BENZONASE dovodi od potpunog uklanjanja ovih pikova za sve ispitivane serije. Zbog toga, za ovaj uzorak preporučeni kriterij za određivanje aktivnosti BENZONASE bit će smanjenje 17+19 minuta pika UV_{260 nm} u nukleazom tretiranom lizatu na manje od 10% od onog u filtriranom lizatu.

TABELA 17-3

Smanjenje UV_{260 nm} površine pomoću BENZONASE za 9 serija.

FILTRIRANI LIZAT (A)	NUKLEAZOM TRETIRANI LIZAT (B)	PREOSTALI
POVRŠ. 17+19 min Pikovi	POVRŠINA 17-19 min Pikovi	A260
Seriya # (260 nm)	(260 nm)	(B/A X 100)
984	1,240,987	0

	985	947,988	0	0
	1047	1,085,719	0	0
	102	708,663	0	0
	101	831,179	0	0
5	108	1,060,441	0	0
	100	895,005	0	0
	139	1,377,974	0	0
	236	1,281,608	0	0
	Prosječno =	1,018,495	0	0
10	Stan Dev =	205,034		

SLIKA 33 (A) FILTRIRAM LIZAT

Filtrirani Površina 17+ 19 min pikovi (UV) Ukupno UV Površina i(UV) 260 nm lizat

15				
	1	1,192,597		3,193,055
	2	1,259,216		3,034,891
	3	<u>1,271,147</u>		<u>3,094,820</u>
20	Prosječno	1,240,987	Prosječno	3,107,589
	StanDev	34,562	StanDev	65,198

25 SLIKA 33 (B) NUKLEAZOM TRETIRANI LIZAT

	<u>Nukleazom tretirani lizat</u>	<u>Površina 17+ 19 min pikova (UV)</u>
	1	0
	2	0
30	3	0

Prosječno i StanDev =0

35

Ponovno suspendirani uzorak PEG peleta

Niže u Slici 34 je prikazan kromatogram ponovno suspendiranog uzorka PEG peleta na 214 nm. Karakteristični profil ovog uzorka sastoji se od nekoliko djelomično razdvojenih pikova: agregiranog materijala; hepatitis A pik, 660 kDa kontaminant, drugi kontaminanti niske molekularne težine i pik soli.

Postotak površine hepatitisa A izračunava se za ovaj uzorak (površina Hep A pika) ukupna površina pika s 100) ukupna površina ne obuhvaća pik soli. Rezultati za trostruku analizu ponovno suspendiranog uzorka PEG peleta prikazani su niže.

Ponovmo suspend. PEG pelete:	Postotak površine Hep A
1	25.9
2	27.0
3	27.4
Prosječno	26.8
Stan.Dev.	0.7

Tipični profil za ovaj uzorak ima 660 kDa kontaminant kao glavnu komponentu, sa količinom agregata koji je najvarijabilnija od komponenata.

Količina agregata u tipičnoj seriji je niži od one koja se vidi. Rezultati HPSEC analize ponovno suspendiranih uzoraka PEG peleta iz 10 serija prikazani su u Tabeli A2 Dodatka A. Vrijednosti postotka površine hepatitisa A kreću se od 18.5% do 32.0%; pri čemu su sve bile uspješno prečišćene slijedećim proizvodnim stupnjevima.

Zbog toga nije potreban strog oprezan limit za ovaj uzorak; izvjesne vrijednosti postotka površine veće od 18% su prihvatljive, međutim efekat postojanja nižih vrijednosti postotka površine neće biti poznat; sve dok se oni ne susretnu u postupku za hepatitis A.

Uzorak kloroformom ekstrahirane vodene faze

Kromatogram za uzorak kloroformom ekstrahirane vodene faze prikazan je niže u Primjeru 35. Pik hepatitisa A je glavni pik u ovom uzorku (isključujući pik soli) i dobro je odvojen od 660 kDa kontaminanta u malim količinama agregata.

Za ovaj uzorak određena je koncentracija hepatitisa A i izračunat je postotak površine hepatitisa A. Izračunavanje postotka površine ne obuhvaća pik soli. Rezultati trostruke analize uzorka kloroformom ekstrahirane vodene faze prikazani su niže.

Kloroformom ekstr. vodena faza	Koncentracija hepatitisa A ug/ml	Postotak povr. hepa- titisa A
1	28.64	61.0
2	29.76	62.8
3	30.65	61.2
Prosječno	29.68	Prosječno 61.7
Stan.Dev.	0.82	Stan.Dev. 0.8

Rezultati HPSEC analize uzoraka kloroformom ekstrahirane vodene faze iz 10 serija prikazani su u Tabeli A2 Dodatka A. Vrijednosti postotka površine hepatitisa A za pune serije kretale su se od 60.0 do 72.8%; dvije poluserije su bile znatno više, sa vrijednostima postotka površine od 79.4 i odnosno 85.2. Koncentracije hepatitisa su bile varijabilnije, i kretale su se od 14.4 do 29.7 ug/ml. Varijabilnost koncentracija hepatitisa A može da bude srodna varijaciji u zapreminama uzoraka koji teku na gore kroz postojeće serije.

Uspoređivanje HPSEC profila PEG peleta (Slika 34) prema kloroformom ekstrahirane vodene faze (Slika 35) obezbjeđuje jasnu indikaciju značaja ovog stupnja na postupak za hepatitis A; ovaj, stupanj selektivno uklanja velike količine 660 kDa kontaminanta bez značajnog gubitka prinosa hepatitisa a. Mada se 660 kDa kontaminant može ukloniti u dva naredna stupnja kromatografije, u oba slučaja ako je 660 kDa glavna komponenta hranljivih otapala, potrebna je strategija smanjenja pika što će dovesti do smanjenja prinosa hepatitisa a. Pored toga obimni eksperimenti za optimizaciju pokazali su da je efikasnost ekstrakcije dosta osjetljiva na promjene u vremenima mješanja (vidjeti Primjer 15). Vrijednost postotka površine hepatitisa A za kloroformom ekstrahiranu fazu obezbjeđuje kvantitativnu verifikaciju u toku postupka o uspješnoj ekstrakciji i uklanjanju nečistoća.

Zbog toga se preporučje oprezan limit vrijednosti postotka površine hepatitisa A od >60% za uzorak kloroformom ekstrahirane vodene faze. Vrijednosti postotka površine ispod 60% treba da se smatraju kao potencijalno indikativnim o procesnim problemima (kao što su oni sa aparaturama za mješanje postupka), naročito ako se ovo javlja regularno.

Proizvod anjonske izmjene

Na slici 36 je prikazan uzorak proizvoda anjonske izmjene. Pik hepatitisa A je glavna komponenta ovog uzorka sa također prisutnim malim količinama agregata, 660 kDa kontaminanta, i kontaminanata niske molekulske težine.

Za ovaj uzorak, određena je koncentracija hepatitisa A, kao i postotak površine hepatitisa A, isključujući pik soli i zadržani pik. Rezultati trostruke analize za uzorak proizvoda anjonske izmjene iz Rx2009854 prikazani su niže.

Proizvod anjonske izmjene	Koncentracija hepatitisa A (ug/ml)	Postotak površine hepatitisa
1	31.98	82.8
2	32.63	81.4
3	32.37	81.6
Prosječno	32.32	81.9
Stan.Dev	0.27	0.6

Rezultati HPSEC analize uzorka proizvoda anjonske izmjene iz 10 serija prikazni su u Tabeli A2 Dodatka A. Vrijednosti postotka površine koji su dobiveni kreću se za pune serije od 78.6 do 87.4%, sa vrijednostima za poluserije većim od 90%. Povećane vrijednosti postotka površine nađene za polu-serije nisu iznenađujuće s obzirom na povećanu čistoću sredstva za napajanje.

Vrijednosti koncentracija su se znatno povećale (preko 2 puta) za ove serije; ova varijacija, kao i ona posmatrana kod ekstrakcionog stupnja je vjerojatno uslijed varijacije u uzorkovanju za ove serije.

U postupku za hepatitis A, anjonska izmjenjivačka kromatografija funkcionira kao završni dotjerujući stupanj; ona uklanja nešto 660 kDa kontaminanta i drugi spojevi niskih molekulskih težina, ali čistoća proizvoda anjonske izmjene zavisi od čistoće napajanja za ovaj stupanj, ovaj stupanj ne može da ukloni velike količine 660 kDa bez gubitka prinosa uslijed smanjivanja pika. Zato ovaj stupanj ne može da kompenzira greške u prethodnoj preradi. Tipično postotak površine hepatitisa A se povećava za 10-20% kroz stupanj anjonske izmjenjivačke kromatografije, što je veća čistoća sredstva za napajanje to je veća i čistoća dobivenog proizvoda. Za ovaj uzorak preporučuje se da oprezan limit budu vrijednosti postotka površine od >75% sa povećanjem u postotku površine od > 10% kroz ovaj stupanj. Kada su oba kriterija zadovoljena, postupak i stupanj anjonske izmjene oba funkcioniraju kao što je otkriveno. Nemogućnost da se postigne vrijednost postotka površine 75% sama po sebi je moguća za stupanj anjonske izmjene ako prethodni stupnjevi zataje, nemogućnost da se postigne povećanje postotka površine od > 12% vjerojatno će ukazivati na problem u postupku veoma specifičan za stupanj anjonske izmjene, kao što je stvaranje bregova, disfunkcija ili stvaranje kanala u koloni.

Proizvod ekskluzione kromatografije po veličini (SEC)

Profil SEC proizvoda pokazuje visoko prečišćeni hepatitis A kao što je prikazano na Slici 37 za SEC proizvod. Za ovaj uzorak određuje se koncentracija hepatitisa A. Rezultati dvostruke analize SEC proizvoda prikazani su niže.

Analiza uzorka	Koncentracija hepatitisa A (ug/ml)
1	17.34
2	16.34
Prosječno	16.84
Stan.Dev.	0.50

Rezultati HPSEC analize SEC proizvoda iz 10 serija prikazani su u Tabeli A2 Dodatka A. Za ovaj uzorak, nisu izračunate vrijednosti postotka površine. Profil prikazan na Slici 37 jasno pokazuje proizvod visoke čistoće, bez količina agregata koje se mogu detektirati i 660 kDa kontaminanta.

Međutim, analiza SEC proizvoda u toku perioda od 60 minuta je pokazala prisustvo malog zadržanog pika na oko 49 minuta kao što je prikazano na Slici 38. Veličina ovog pika se mijenja od serije do serije, sa serijom koja je prikazana (Slika 38) koja ima najveću količinu posmatranih podataka. Identifikacija ovog zadržanog pika treba da se izvrši prije izračunavanja vrijednosti postotka površine za ovaj uzorak, što je indikativno za njegovu čistoću. Dok se vrši ova

identifikacija, vrijednosti postotka površine za ovaj uzorak uključivat će samo pikove između isključenih i obuhvaćenih zapremina (retenciona vremena od 16-32 minuta). Sa ovim restrikcijama, vrijednosti postotaka površine za sve ispitivane serije bile su 100%.

5 ODJELJAK V Stabilnost uzorka

Uzorci iz postupka su se pokazali stabilnim sve do nekoliko mjeseci kao što je izmjereno pomoću HPSEC i EIA. Mali gubici mogu da se uoče na stupnju ionske izmjene, uglavnom manje od 10% u toku perioda od dvije nedjelje. Međutim, poslije ovog početnog opadanja, čak su i ovi uzorci ostali stabilni. Pored toga, finalni SEC proizvod je stabilan za periode od jedne godine.

ODJELJAK VI Uspoređivanje EIA i HPSEC rezultata

15 EIA i HPSEC rezultati dobiveni za 3 uzorka (kloroformom ekstrahiranu vodenu fazu, proizvod anjonske izmjene i SEC proizvod) iz 11 serija (serije 2 do 12) su uspoređeni.
Dijagram log HPSEC koncentracije nanijet prema log EIA koncentracije prikazan je za ova 33 uzorka prikazan je niže na Slici 45. Interpolaciona regresivna linija za ove podatke ima nagib od 0.88 i koeficijent korelacije (r) od 0.94. Vrijednost nagiba približava se 1, a r vrijednost od 0.94 ukazuje da veoma dobra korelacija postoji između ove dvije analize, naročito razmatrajući inherentnu varijabilnost svakog mjerenja.

ODJELJAK VII Održavanje konzistentnosti postupka

25 HPSEC analiza serija 2 do 14 otkriva veoma stabilan i reproduktivan postupak. Na bazi obimnih HPSEC analiza uzoraka u toku postupka uzetih iz šarži proizvedenih pri proizvodnji, postupak prečišćavanja obezbjeđuje odličnu reproduktivnost za odstranjivanje glavnih kontaminanata. Slika 46 obezbjeđuje jednu mjeru ovoga, gdje je % površine monomernog virusa nanijeta za šarže. Ova mjera sastava toka za posljednja stupnja prečišćavanja pokazuje veliku konzistentnost kroz ove šarže. Serije 10 i 11 koje pokazuju veću čistoću na stupnjevima ekstrakcije i anjonske izmjene, su obje serije polu-veličina.

PRIMJER 17; DODATAK A

TABELA 17-A1

5

Pregled podataka za uzorke lizata i nukleazom tretiranog lizata. Svi uzorci su analizirani u triplikatu, i rezultati tri analize su prosječni.

UZORCI FILTRIRANOG LIZATA			
SERIJA #	UKUPNA POVRŠINA (214 nm)	UKUPNA POVRŠINA (260nm)	POVRŠINA 17+19m U (260nm)
1	26,811,976	3,107,589	1,240,987
2	22,032,023	2,722,501	947,988
3	24,322,218	2,696,138	1,085,719
4	19,934,657	1,588,166	708,663
5	23,633,378	1,657,484	831,179
6	26,311,501	2,590,678	1,060,441
7	20,336,561	2,225,138	895,005
8	27,019,891	3,195,019	1,377,974
9	25,671,116	2,804,591	1,281,608
Prosječno =	23,800,264	2,472,839	1,018,495
StdDev =	2,648,361	565,612	205,034

10

UZORCI NUKLEAZOM TRETIRANOG LIZATA		
SERIJA #	UKUPNA POVRŠINA(214 nm)	POVRŠINA 17+19m U(260nm)
1	22,784,749	0
2	21,417,391	0
3	22,658,768	0
4	17,766,458	0
5	17,984,377	0
6	23,280,554	0
7	17,231,064	0
8	23,218,865	0
9	21,797,999	0
Prosječno =	20,904,469	
StdDev =	2,491,146	

DODATAK A (NASTAVAK)

15 TABELA 17-A2

Pregled podataka za uzorke ponovno suspendiranih PEG peleta kloroformom ekstrahirane vodene faze, proizvoda anjonske izmjene i SEC proizvoda. Svi uzorci su analizirani u triplikatu, a rezultati tri analize su prosječni.

Serija #	Pon. sus. PEG	Kloroformna faza eks vode		Razb. proizvod anjonske ekstrak		SEC proizvod	
	Procent. površine	Procent površine	Konc. (ug/ml)	Procent površine	Konc (ug/ml)	Proc. površine	Konc. (ug/ml)
2	29.6±0.6	64.7±1.7	22.12±0.35	80.6±0.1	28.46±0.21	100	10.01±0.09
3	26.8±0.7	61.7±0.8	29.68±0.82	81.9±0.6	32.32±0.27	100	16.84±0.50
4	32.0±2.3	64.7±0.4	23.72±0.01	83.7±0.9	29.12±0.48	100	14.57±0.18
5	31.2±2.6	60.0±0.2	25.89±0.26	78.6±0.3	35.74±0.89	100	18.22±0.75
6	25.9±0.3	67.1±1.3	15.90±0.26	82.9±0.3	16.39±0.09	100	7.96±0.18
7	29.4±0.9	66.7±1.6	19.10±0.30	84.2±0.3	15.73±0.26	100	7.80±0.20
8	29.2±0.7	70.8±1.1	16.40±0.10	87.4±0.5	20.01±0.07	100	9.68±0.12
9	20.7±1.4	72.8±3.4	14.32±0.28	85.7±0.5	14.61±0.05	100	8.05±0.01
10	23.7±0.1	85.2±1.3	10.02±0.06	97.0±0.3	10.24±0.04	100	6.24±0.06
11	18.5±0.7	79.4±0.5	7.32±0.42	90.5±1.0	8.62±0.10	100	5.24±0.00

* pola vel. serije

PRIMJER 18

5

REZULTATI KLIMČKOG ISPITIVANJA

10 Prečišćeno cjepivo prema ovom izumu primjenjeno je na zdrave ljude. Nikakvi ozbiljni štetni efekti koji se mogu pripisati cjepivu nisu identificirani.

15 Efikasnost jedne doze od 25 jedinica cjepiva prikazana je kod djece u Monroe-ovoj studiji, rezultati ovoga su publicirani u Kolovoskom izdanju od 13. kolovoza, 1992 izd. New England Journal of Medicine, /Wertzberger i surad., NEJM 327 (no. 7); 453-457, (13. kolovoz 1992)/. Razlike između materijala Monroe-ve studije i proizvodnog materijala, od kojih oba formiraju dio ovog izuma, su rasvijetljene na Slici I, i oba su u kontrastu sa studijama faza I/II, materijalom proizvedenim u kotrljajućim bocama i sakupljenim pomoću mehaničkih načina, sa prisutnim ograničenjima u razmjerima proizvodnje sadržanim u ovom postupku. Jedna doza od 25 jedinica (25 ng HAV proteina) prečišćenog preparata virusa hepatitisa A prema ovom izumu je dovoljna da se postigne preko 95% serokonverzije kod djece i adolescenata 2-16 godina u toku 4 nedjelje imunizacije. Ova ista doza obezbjeđuje 100% zaštite kod djece i adolescenata počevši od 21 dan poslije primjene jedne doze cjepiva.

20 Težina i starost su sada identificirani kao odgovorni za varijabilnosti kod odraslih. Za jedan mjesec poslije jedne doze od 25 jedinica, 83% odraslih (≥ 18 godina) i 97% djece i adolescenata (2 do 17 godina) su serokonvertirali. Dvije doze od 25 jedinica date u razmaku od dva tjedna povećale su brzinu serokonverzije kod odraslih do 93%. Serokonverzija sedam mjeseci poslije druge ili treće doze od 25 jedinica je veća od 99% serokonverzije kod obje starosne grupe. Postojanost u seropozitivnosti je oko 100% do 12 mjeseci i 36 mjeseci u obje starosne grupe. Prema tome, jasno je da je jedna doza od 25 jedinica dovoljna da se postigne serokonverzija kod najmanje 80% bilo koje primajuće populacije u toku jednog mjeseca imunizacije. Ovi podaci su dati u Tabeli 18-1 (način liječenja pokazuje dozu od 25 jedinica datu na 0 i 24 tjedna ili 0, 2, i 24 tjedna: GMT = geometrijskom srednjem anti-HAV antitijelo titru). Imunizacija sa većim dozama izaziva serokonverziju u većem postotku primalaca.

30 Tabela 18-1
Serokonverzija na prikazanom tjednu poslije

početne imunizacije

Način liječenja	Starost	4	24	28
0 & 24	18-29	83% (100/120)	87% (33/38)	100% (24/24)
G MT-responder		21	41	2132

0, 2, 24	18-29	98% (115/118)	100% (33/33)	100% (24/24)
GMT-responder		33	90	4379
0 & 24	30-89	72% (265/370)	80% (111/138)	100% (71/71)
GMT-responder		22	34	1332
0, 2, 24	30-89	85% (321/380)	89% (118/132)	100% (75/75)
GMT-responder		28	59	1796

5 Pored gornjih podataka, nađeno je da je jedna desetina pacijenata (cohorta) seronegativna na 4 nedjelje (ukupno 23 slučaja) ponovno su testirani na 24 tjedna i izmamljen je anamnestički odgovor (> 10-to struko u titru antitijela) na 28 tjedana. Dva pojedinca su pokazivala približno šesto-struko povećanje u titru poslije šest mjeseci od doze. Preostali 21 po jedinici, 91% pokazivali su serokonverziju i anamnestički odgovor. Prema tome, ovi pojedinci su trajno serokonverteri i vjerojatno su zaštićeni imunizacijom cjepiva prema ovom izumu, čak i kada su jasno seronegativni za produženi period poslije imunizacije.

PATENTNI ZAHTEJEVI

1. Postupak za proizvodnju virusa hepatitisa A u komercijalnim razmjerima sa više od 95% čistoće s obzirom na protein prema SDS poliakrilamidnoj gel elektroforezi i analizi bojenjem sa srebrom, **naznačen time**, što obuhvaća stupnjeve:
 - a) kultiviranje virusa hepatitisa A u velikoj količini u slojevima ćelija u statičkom površinskom reaktoru sa velikom površinom (SSR);
 - b) uklanjanje virusa hepatitisa A iz slojeva kulture ćelija pomoću permentacije deterdženta iz inficiranih slojeva ćelija, tako da se virus hepatitisa A oslobađa iz kulture ćelija;
 - c) optimalno uklanjanje za virus ne-hepatitisa A specifičnih nukleinskih kiselina na ovom stupnju iz sakupljenog virusa hepatitisa A, pomoću tretiranja nukleazom;
 - d) koncentriranje virusa hepatitisa A uklonjenog iz kulture ćelija, pomoću membrana i diafiltracijom, ili vezivanjem pomoću ionske izmjene;
 - e) uklanjanje za virus ne-hepatitisa A specifičnih proteina iz koncentriranog virusa hepatitisa A iz stupnja (b) kombinacijom organske ekstrakcije PEG taloženja, ionske izmjene, uključujući uklanjanje kontaminirajuće slobodne nukleinske kiseline ako nije ranije završeno u stupnju c), i stupanj gel permentacione kromatografije; i
 - f) regeneriranje prečišćenog virusa hepatitisa A iz stupnja (e).
2. Prečišćeni virus hepatitisa A, **naznačen time**, što je dobiven postupkom prema zahtjevu 1.
3. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što stupanj a) obuhvaća inokulaciju virusa A dobivenog iz gornjeg sloja tečnosti HAV inficiranog SSR u reaktor sa statičkom površinom u kojoj se ćelije kultiviraju u slojeve ćelija, i medij kulture konstantno cirkulira kroz reaktor sa statičkom površinom i otvorom u kojem se postiže kontrola reaktora, saturacija i dopunjavanje komponenata kulture.
4. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što stupanj b) obuhvaća sakupljanje virusa hepatitisa A tretiranjem slojeva ćelija inficiranih sa virusom hepatitisa A sa između oko 0.05% do 1% otopine Tritona-X 100 da bi se oslobodio virus hepatitisa A.
5. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što stupanj c) obuhvaća hidrolizu sa BENZONASOM.
6. Postupak proizvodnje u komercijalnim razmjerima inaktiviranog cjepiva za virus hepatitisa A, koja je više nego 95% čist HAV, na bazi proteina, **naznačen time**, što obuhvaća
 - a) kultiviranje velike količine virusa hepatitisa A (HAV) u NUNC ĆELIJSKIM FABRIKAMA, COSTAR KOCKAMA ili REAKTORIMA SA STATIČKOM POVRŠINOM (SSRa), uključujući SSR obuhvaćajuće regularne elemente na kojima su ćelije sposobne da rastu pri visokim gustoćama po jedinici zapremine, u kojima je ustanovljen sloj ćelija od MRC-5 ćelija;
 - b) sakupljanje kultiviranog HAV uklanjanjem medija kulture i dodatkom otopine za sakupljanje koji sadrži 0.1% Tritona X-100;
 - c) tretiranje sakupljenog HAV sa BENZONASOM da bi se hidrolizirale kontaminirajuće nukleinske kiseline;
 - d) koncentriranje BENZONASOM tretiranog HAV vezivanjem na iono izmjenjivačku kolonu i eluiranje vezanog HAV sa oko 0.35 M NaCl, a zatim taloženjem sa polietilen glikolom;
 - e) ponovno suspendiranje HAV staloženog sa PEG i ekstrahiranje koncentriranog HAV sa kloroformom/izoamil alkoholom (24:1 zap/zap) uz snažno mješanje, i odvajanje preostale vodene faze;
 - f) kromatografiranje vodene faze iz organske ekstrakcije na DEAE TOYOPEARL 650 M anjonskoj izmjenjivačkoj matrici na oko 90 do 150 mM NaCl, i eluiranjem HAV sa gradijentom do oko 1 M NaCl, i razblaživanje sakupljenih frakcija HAV do koncentracije soli ispod oko 150 mM i koncentracije HAV ispod oko 20 µg/ml tako da se taloženje HAV smanjuje na minimum ili eliminira;
 - g) sakupljanje frakcija pika HAV iz stupnja f) i kromatografiranje HAV na tandemu ekskluzionih kolona po veličini od TOYOPEARL HW55S i HW65S;
 - h) inaktiviranje gel filtriranog HAV tretiranjem sa formalinom pri koncentraciji od 1/1000 pet dana, a zatim sterilnom filtracijom, apsorpcijom sa ili ko-taloženjem sa aluminij hidroksidom, i raspodjeljivanje u jedinične doze, ekvivalentne sa 25-100 ng/dozi inaktiviranog prečišćenog HAV.
7. Postupak za prevenciju HAV infekcije, **naznačen time**, što obuhvaća imunizaciju sa imunološki efikasnom količinom proizvoda prema postupku iz zahtjeva 6.
8. HAV vakcina, **naznačen time**, što se proizvodi prema postupku iz zahtjeva 6.

9. Postupak za kultiviranje HAV, **naznačen time**, što obuhvaća gajenje HAV u COSTAR KOCKI ili REAKTORU SA STATIČKOM POVRŠINOM, opcionalno uključujući regularne meš elemente mreže od titana ili nerđajućeg čelika.
10. Postupak prema zahtjevu 9, **naznačen time**, što obuhvaća proizvodnju između oko 5,000 i 50,000 doza od 25 ng inaktiviranog HAV više od 95% čistog HAV po dozi cjepiva, iz posude za kulturu sa jednom COSTAR kockom.
- 5 11. Prečišćeni preparat virusa hepatitisa A, **naznačen time**, što je više od 95% proteina specifično za virus hepatitisa A, a manje od 7% od mase proteina preparata je ne-HAV nukleinska kiselina ili lipid i između oko 0-180% preparata je ugljeni hidrat koji se sastoji od glukoze.
12. Preparat prema zahtjevu 11, **naznačen time**, što se virus hepatitisa A inaktivira formalinom.
- 10 13. Preparat prema zahtjevu A, **naznačen time**, što je formuliran kao 25-100 ng doze HAV na bazi proteina sa oko 100-1000 ug aluminij hidroksid.
14. Prečišćeni preparat virusa hepatitisa A, **naznačen time**, gdje je svaka karakteristika navedena po ug proteinske baze, a postupak u zgradama je upotrijebljen za određivanje karakteristika:

15	a) sadržaj lipida (plinska kromatografija):	< 0.1 µg;
	b) ugljovodik detektiran kao glukoza:	0.1-2.5 µg;
	ne-glukozni ugljeni hidrat (TFA hidroliza, Dionex)	< 0.1 µg;
	c) specifični protein za virus hepatitisa A (amino kiselinska analiza i "western blot")	> 0.95 µg;
20	d) specifična RNK za virus hepatitisa A	0.1-0.2 µg;
	e) kontaminirajuća DNK	< 0.001 µg.
15. Preparat prema zahtjevu 14, **naznačen time**, što je virus hepatitisa A i aktiviran formalinom.
16. Preparat prema zahtjevu 15, **naznačen time**, što je absorbiran na aluminij hidroksid.
- 25 17. Prečišćeni preparat inaktiviranog virusa hepatitisa A, **naznačen time**, što je jedna doza od 25 jedinica, ekvivalent sa oko 25 ng proteina virusa hepatitisa A na bazi amino kiselinske analize, dovoljno da se postigne 95% ili veća serokonverzija kod djece i adolescenata 2-16 godina starosti unutar 4 nedjelje od imunizacije.
18. Prečišćen preparat inaktiviranog virusa hepatitisa A, **naznačen time**, što je jedna ili tri doze od 25 do 100 jedinica, ekvivalent sa oko 25 ng do 100 ng virusa hepatitisa A na bazi amoni kiselinske analize dovoljno da se postigne 80-95% serokonverzije kod primajuće populacije unutar 4-28 nedjelja od imunizacije.
- 30 19. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što obuhvaća kulturu virusa hepatitisa A u reaktoru sa statičkom površinom, i pogodan medij kulture se zamjenjuje i uklanja pri brzini od oko 0.010 i 0.3 ml/cm²/dan.
20. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što obuhvaća kulturu virusa hepatitisa A u reaktoru sa stacionarnom površinom, i medij kulture se mjenja i uklanja konstantnom brzinom.
21. Cjepivo za virus hepatitisa A, **naznačen time**, što ima slijedeći nominalni sastav po dozi od 25-200 jedinica/0.1-1 ml:

KOMPONENTA	KOLIČINA
Natrijum hlorid	900-9000 µg
Aluminijum	50-500 µg
Natrijum tetraborat	38-38 µg
Formaldehid	< 0.4 µg
Glukoza (polimer)	0-1000 ng
Protein	25-100 ng
Hloroform	< 44 ng
HAV RNK	2-20 ng
Ne-glukozni ugljeni hidrat	0-20 ng
Masna kiselina	< 20 ng
Neomicin	< 4 ng
MRC-5 DNK	< 0.02 ng
Albumin goveđeg seruma	< 0.1 ng
BENZONASA	< 0.0001 ng

22. Cjepivo za virus hepatitisa A, **naznačen time**, što ima slijedeći nominalni sastav po dozi od 25 jedinica/0.5 ml:

KOMPONENTA	KOLIČINA
Natrijum hlorid	4,500 µg
Aluminijum	250 µg
Natrijum tetraborat	19 µg
Formaldehid	< 200 ng
Glukoza (polimer)	< 20 ng
Protein	25 ng
Hloroform	< 22 ng
HAV RNK	5 ng
Ne-glukozni ugljeni hidrat	< 4 ng
Masna kiselina	< 1 ng
Neomicin	< 1 ng
MRC-5 DNK	< 0.005 ng
Albumin goveđeg seruma	< 0.02 ng
BENZONASA	< 0.00002 ng

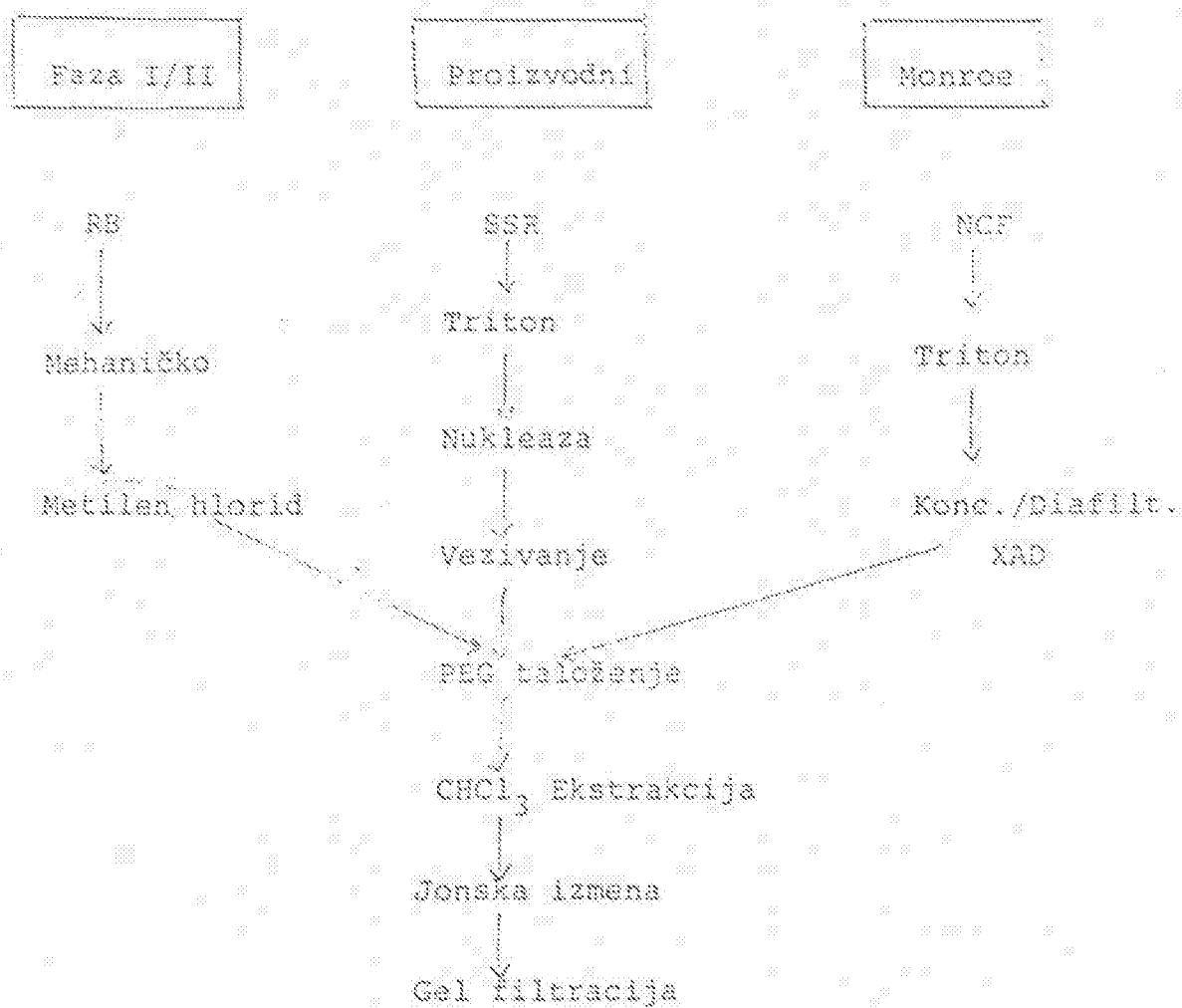
23. Prečišćeni preparat inaktiviranog virusa hepatitisa A, **naznačen time**, što je jedna doza od 25 jedinica, ekvivalent sa 25 ng proteina virusa hepatitisa A na bazi amino kiselinske analize, dovoljno da se postigne 95% ili veća zaštita kod djece i adolescenata 2-16 godina starosti već poslije 21 dana poslije imunizacije.

SAŽETAK

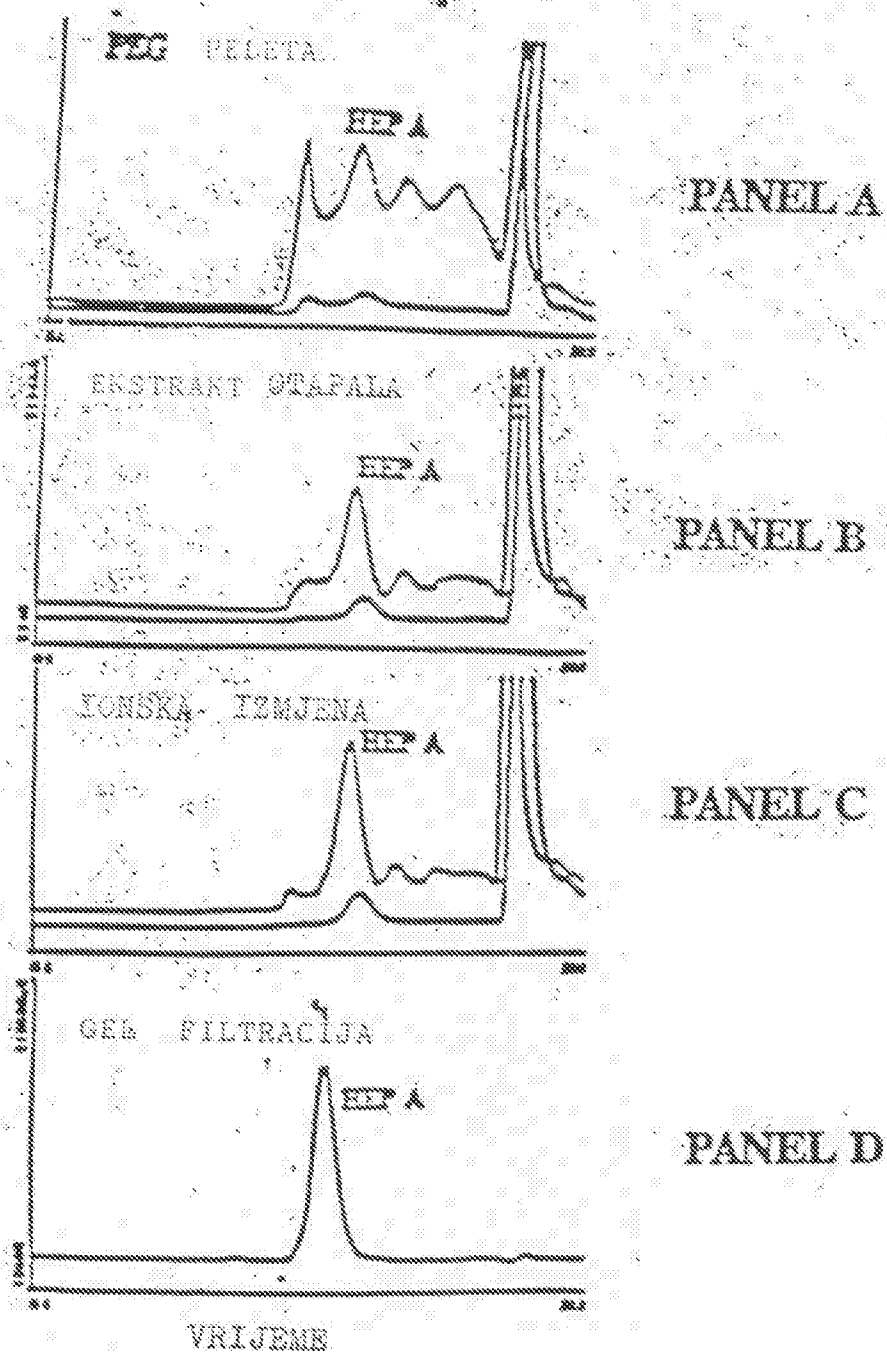
Kompletan, visoko reproduktivan postupak komercijalnih razmjera za proizvodnju stabilnog virusa hepatitisa A obuhvaća optimalne uvjete rasta, sakupljanja i prečišćavanja antigena, da bi se dobio >95% čist HAV na bazi proteina. Dalji stupnjevi prerade daju inaktiviranu formulaciju HAV cjepiva koje je imunogeno, dobro se podnosi i efikasno je u zaštiti protiv infekcije virulentnim HAV. U proizvodu je određen sadržaj proteina, ugljikohidrata, lipida, DNK i RNK.

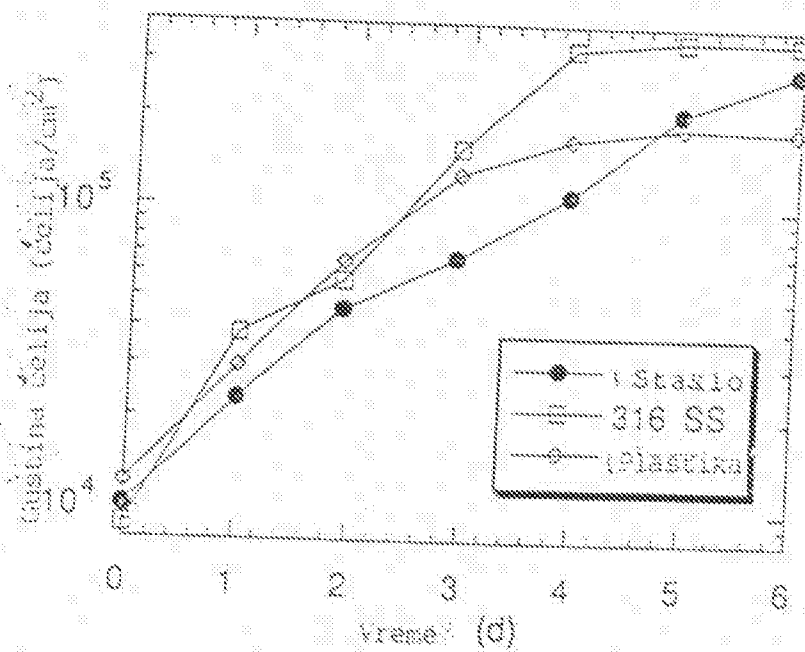
SLIKA 1

POSTUPAK PREČIŠĆAVANJA
UPOTREBLJEN U PROIZVODNJI CJEPIVA

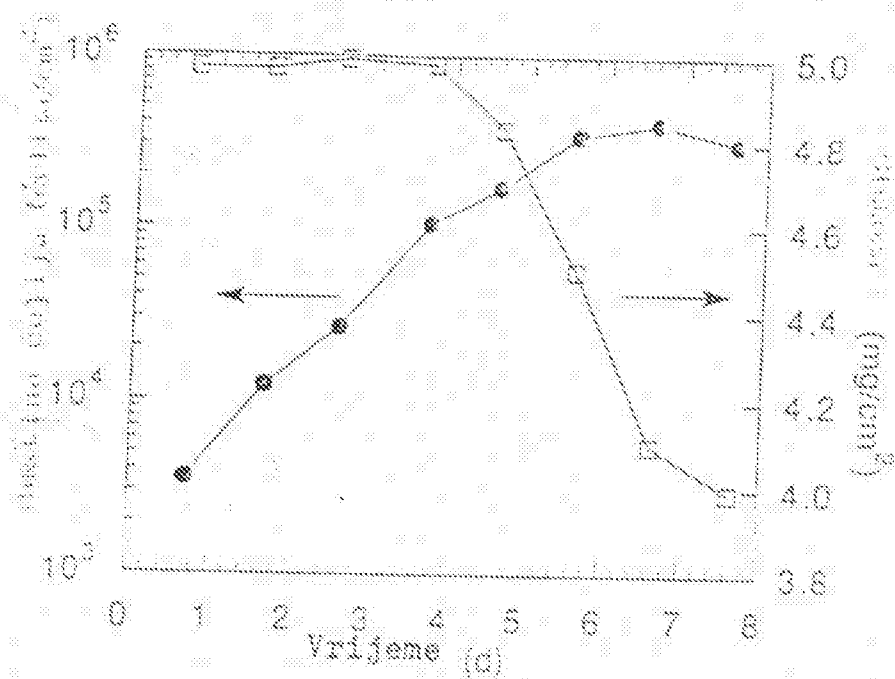


SLIKA II

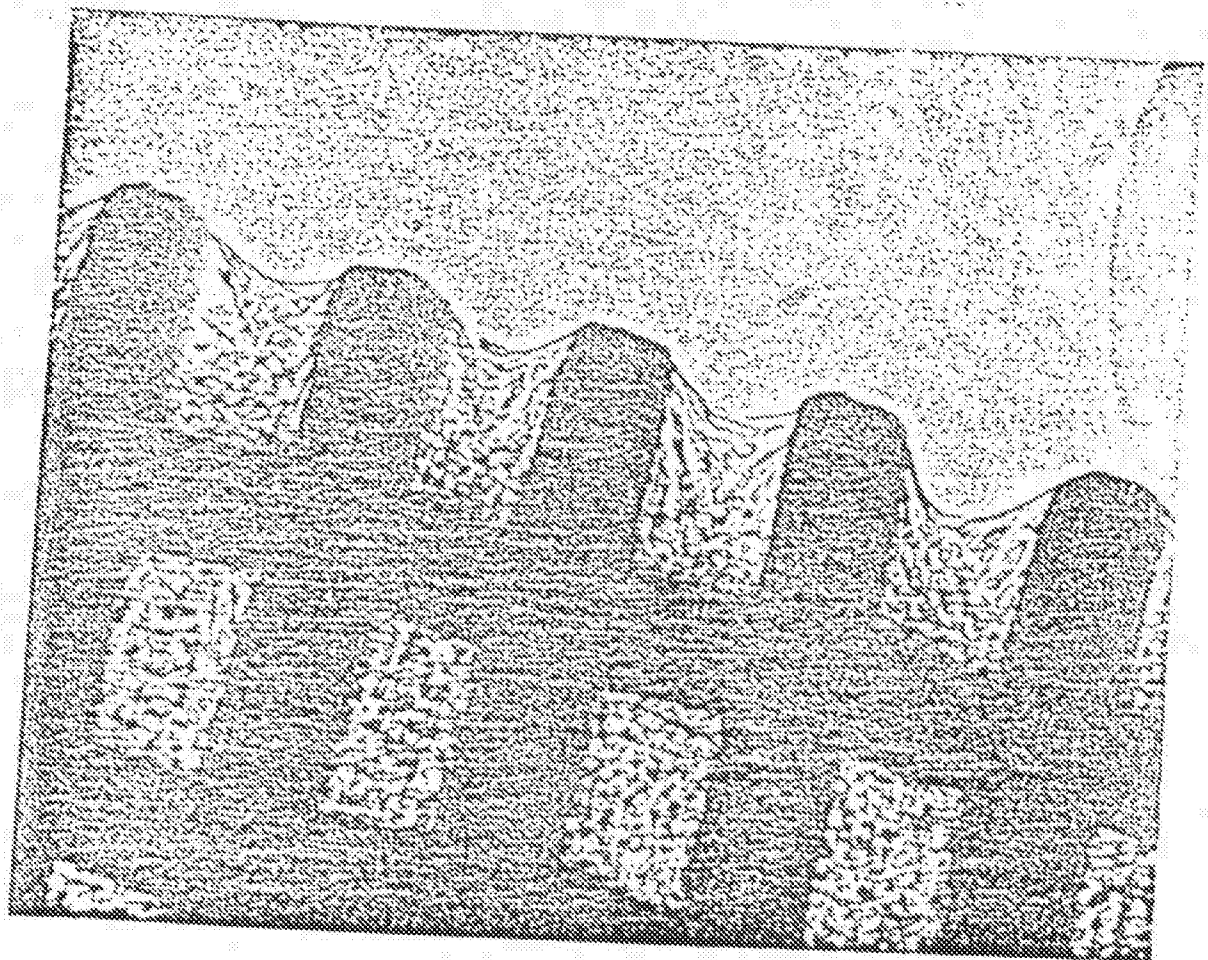




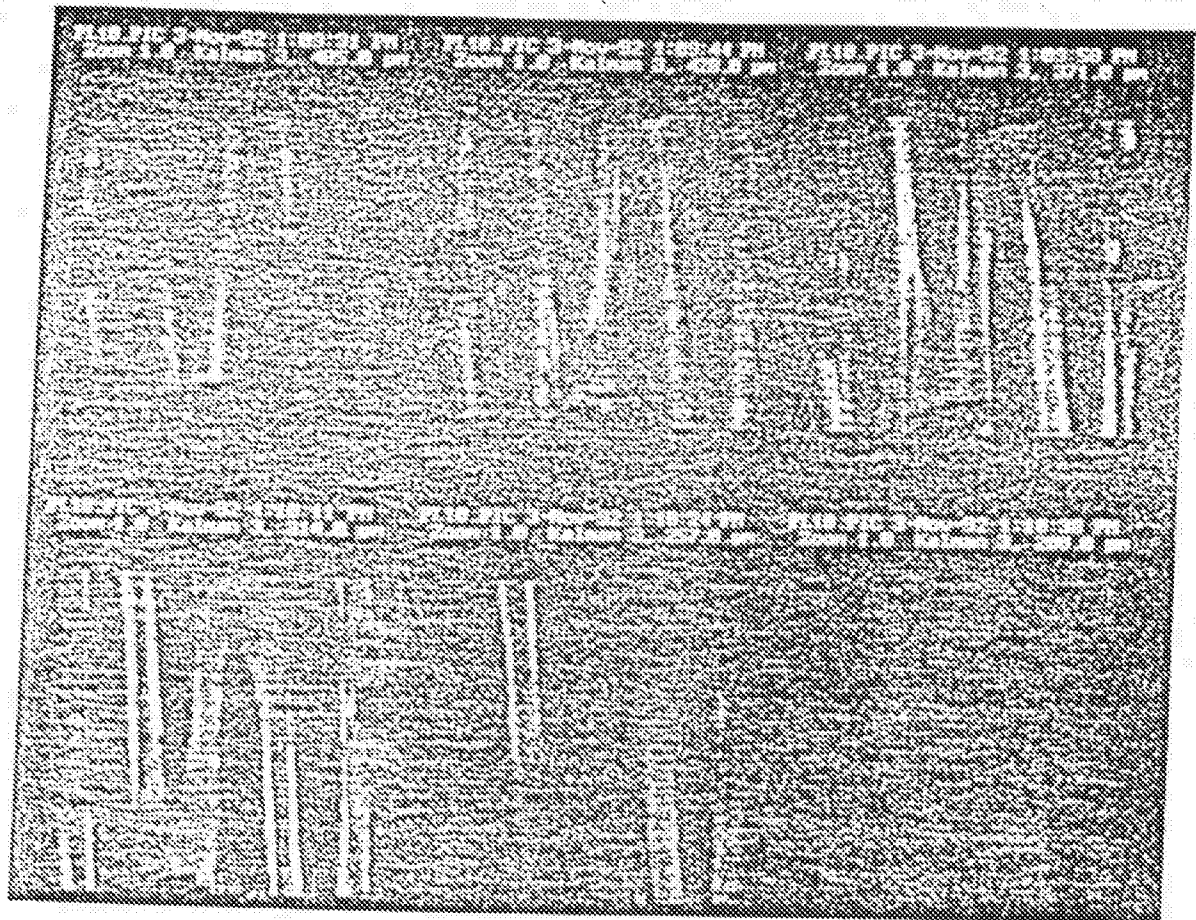
SLIKA 3



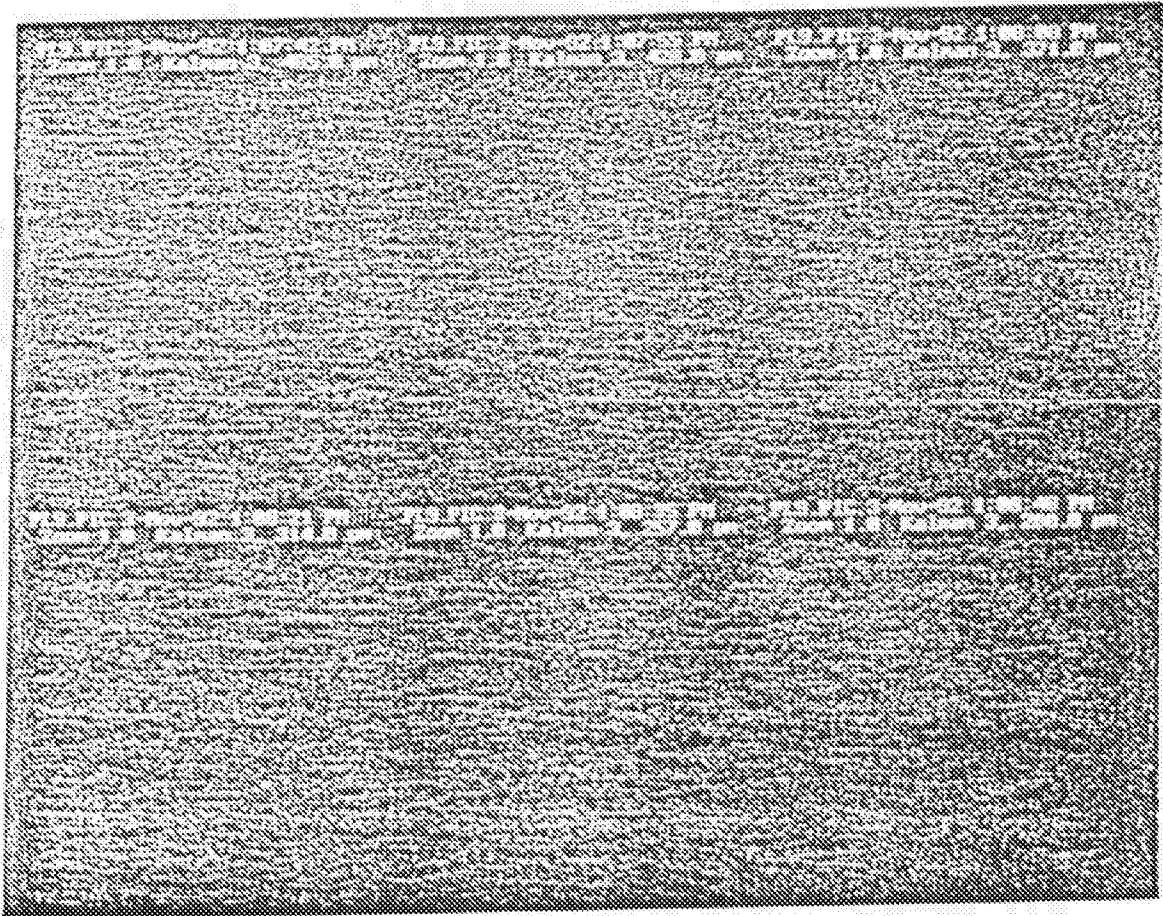
SLIKA 4



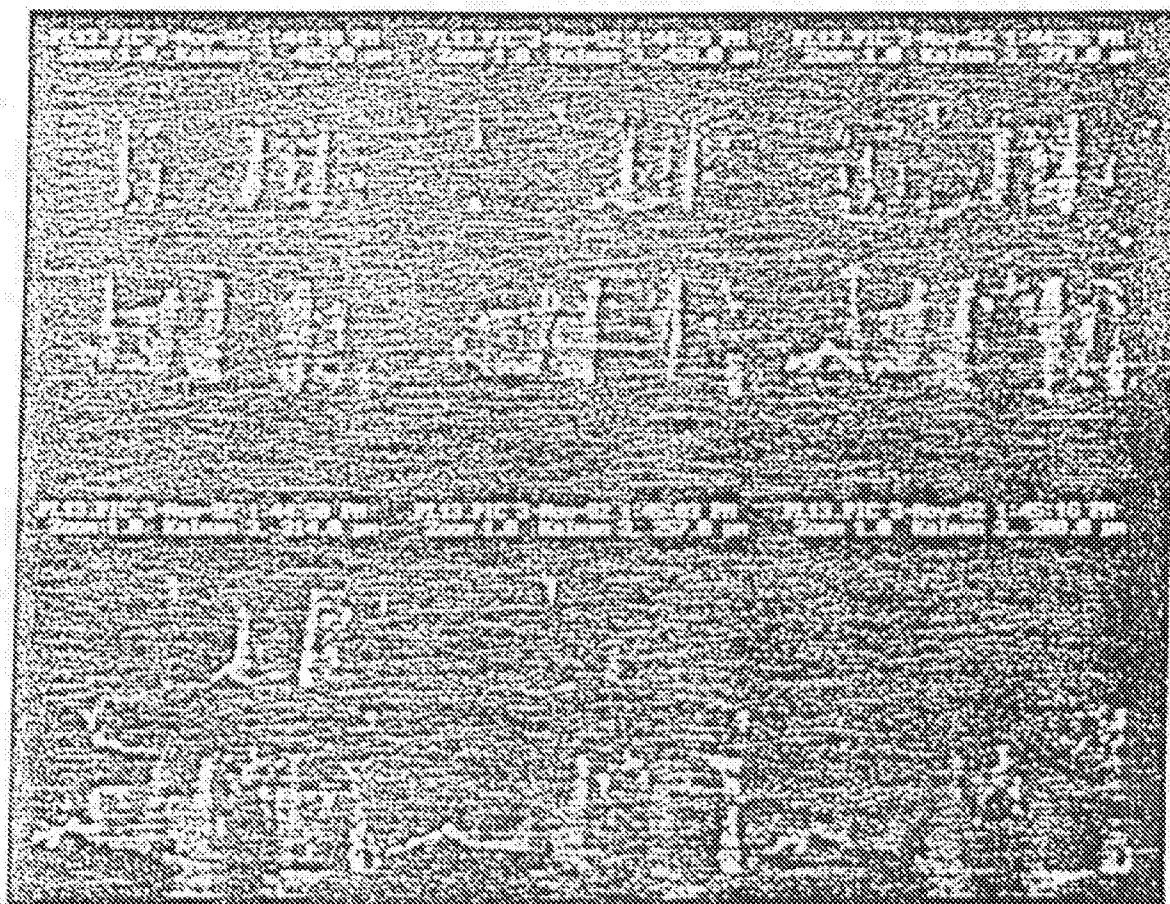
SLIKA 5.



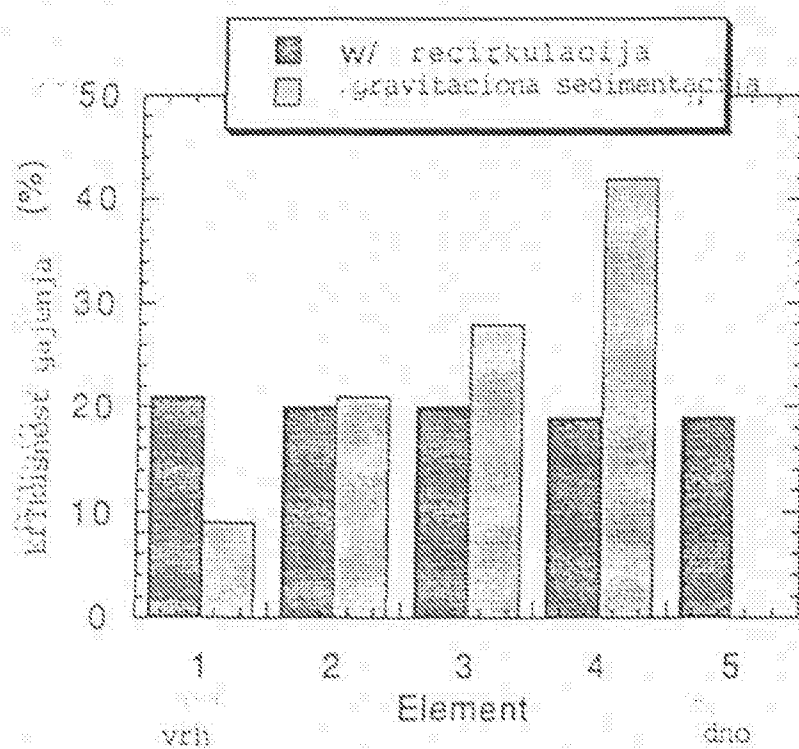
SLIKA: 6A



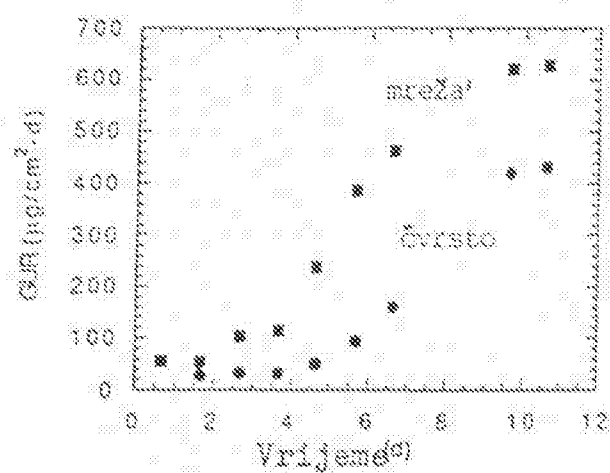
SLIGA 6B



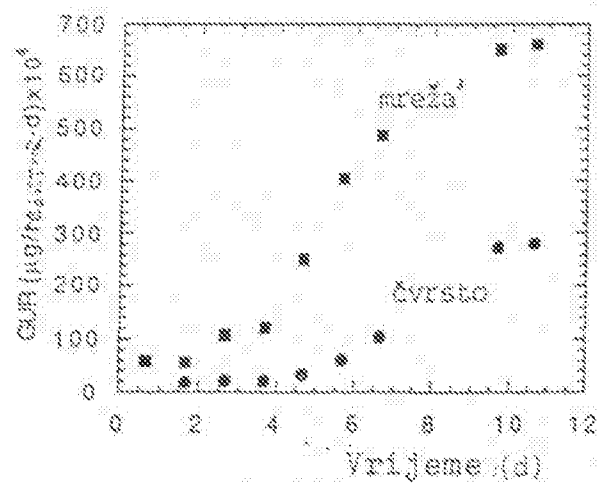
SLIKA 7.



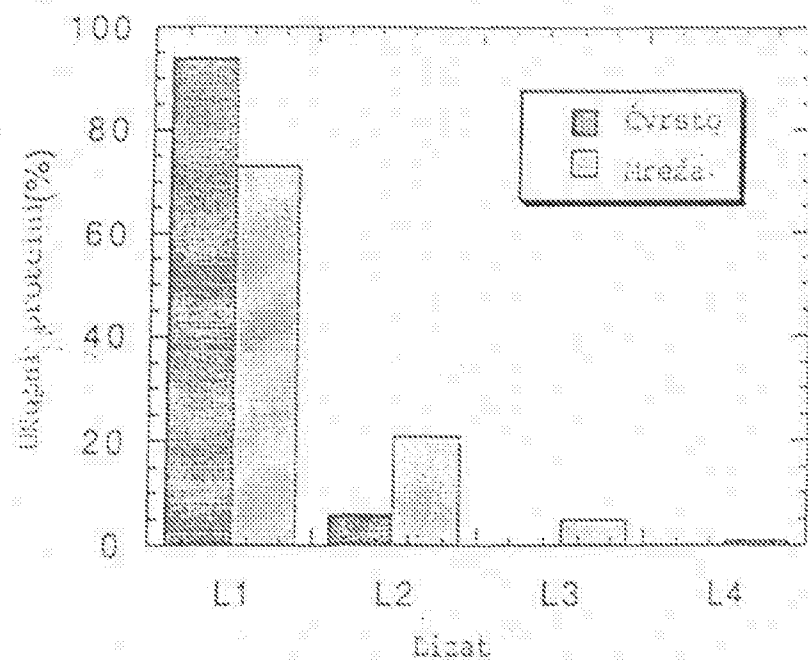
SLIKA: 8.



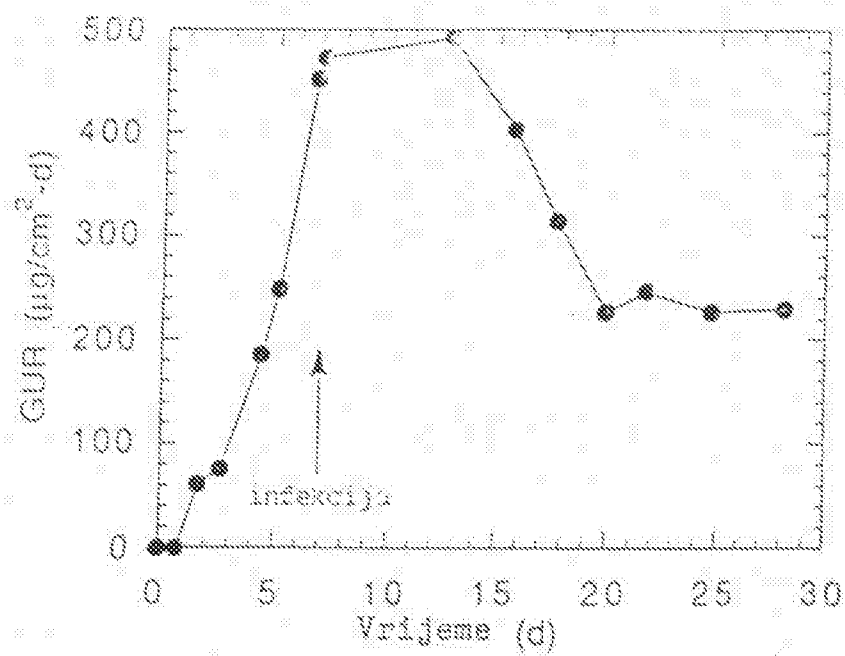
slika : 9A



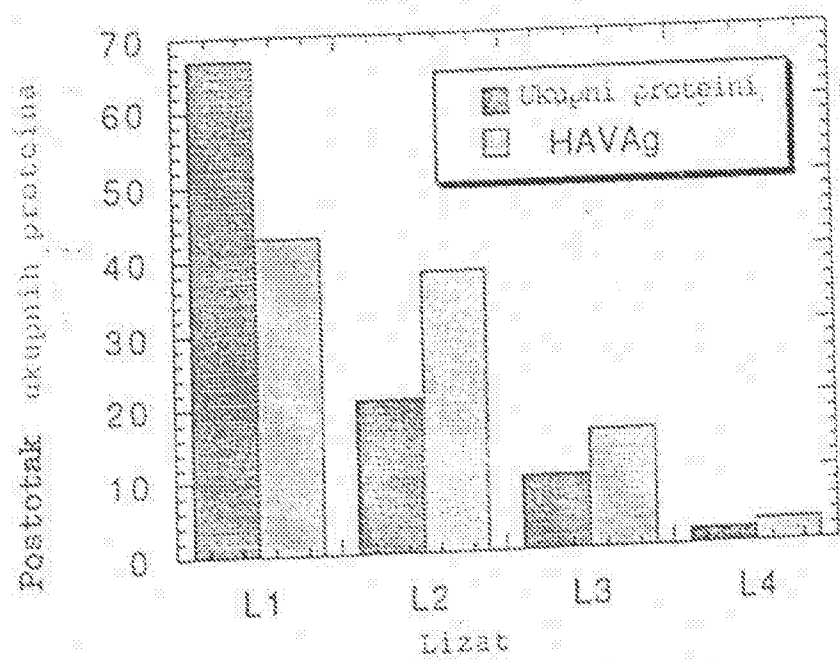
slika: 9B



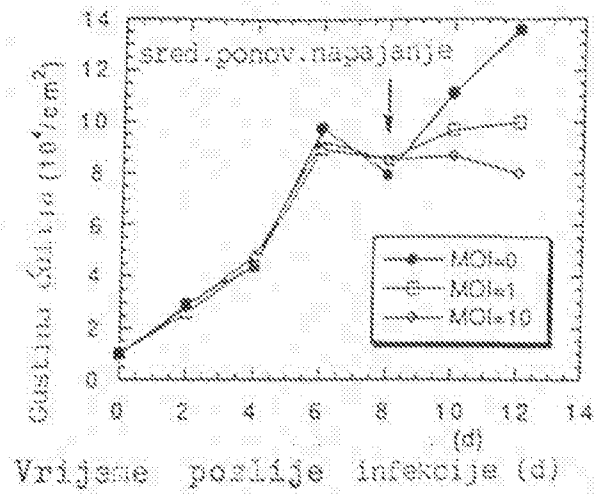
SLIKA 10.



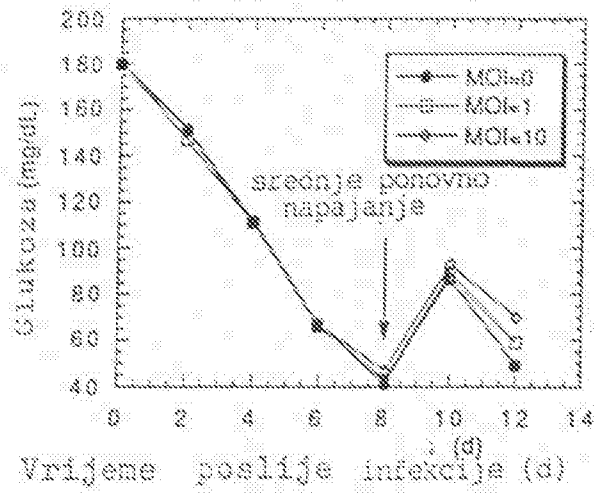
SLIKA 11.



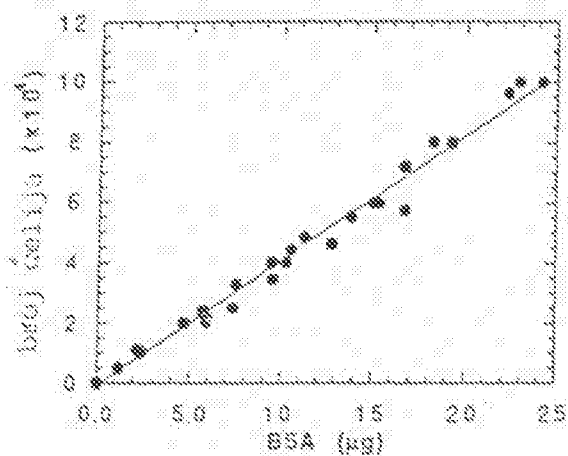
SLIKA 12.



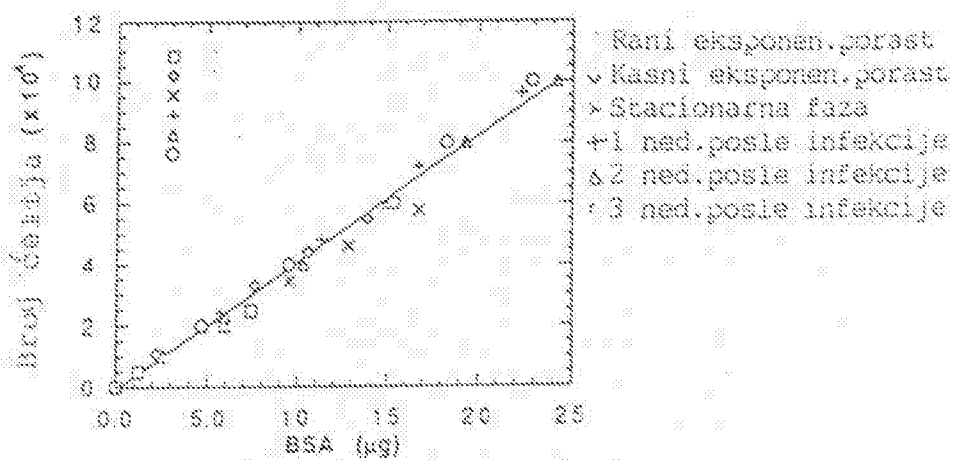
SLIKA 13A



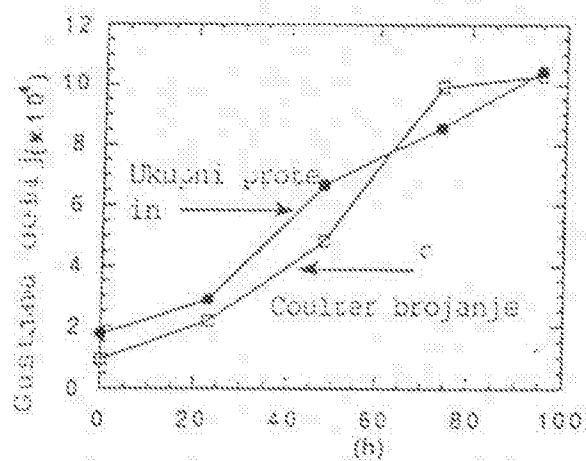
SLIKA 13B



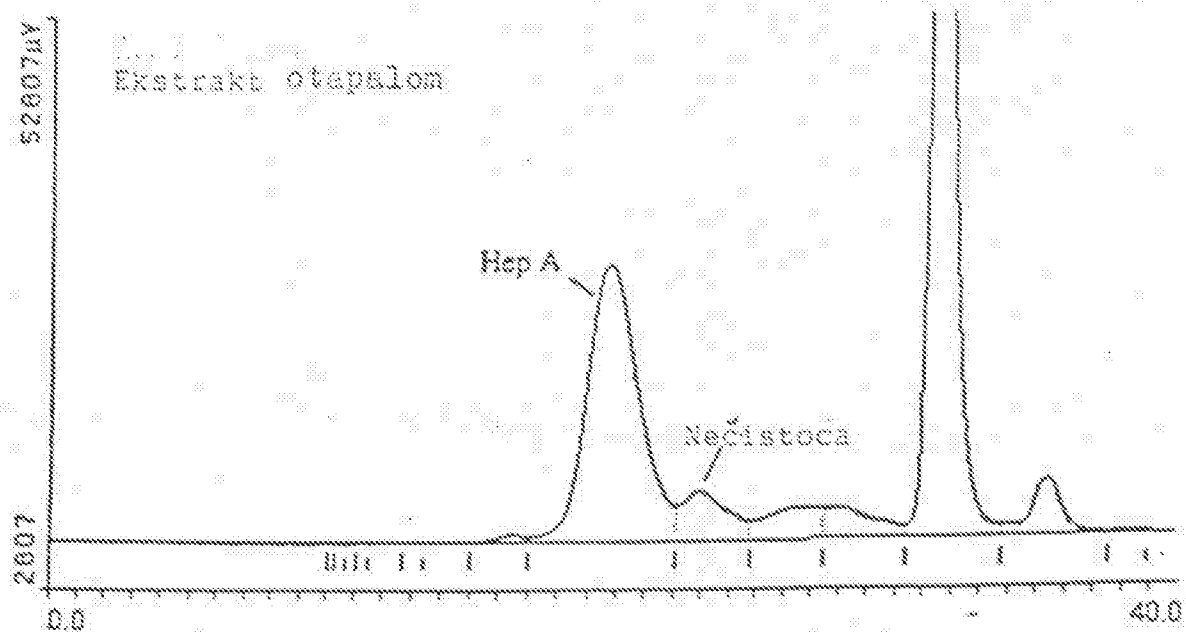
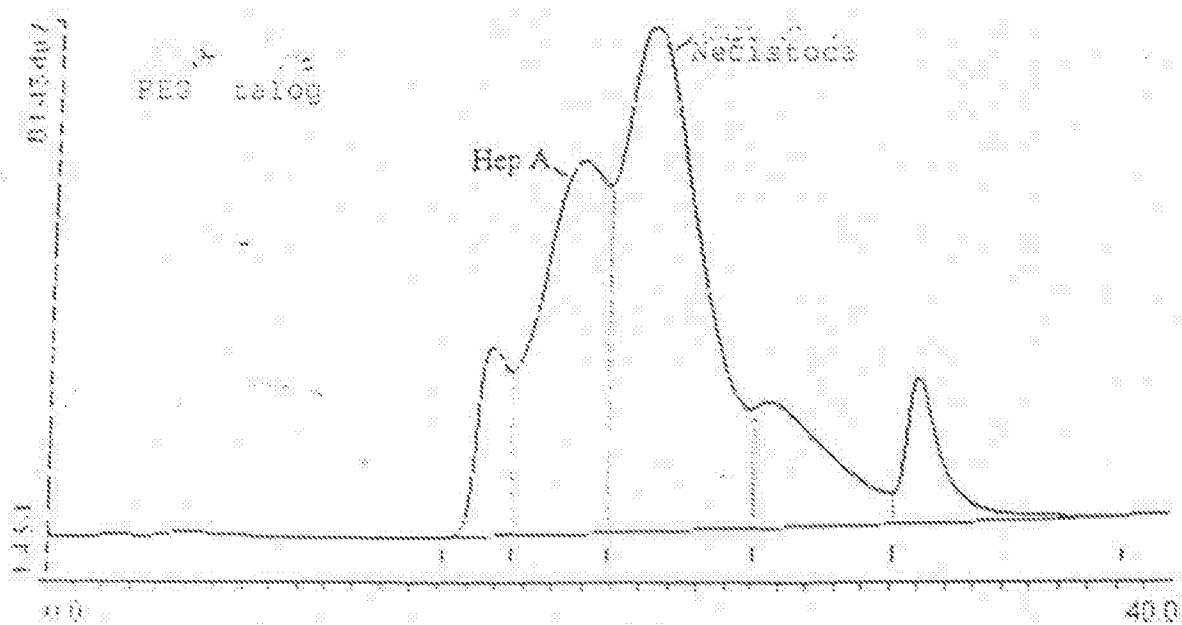
SLIKA 14



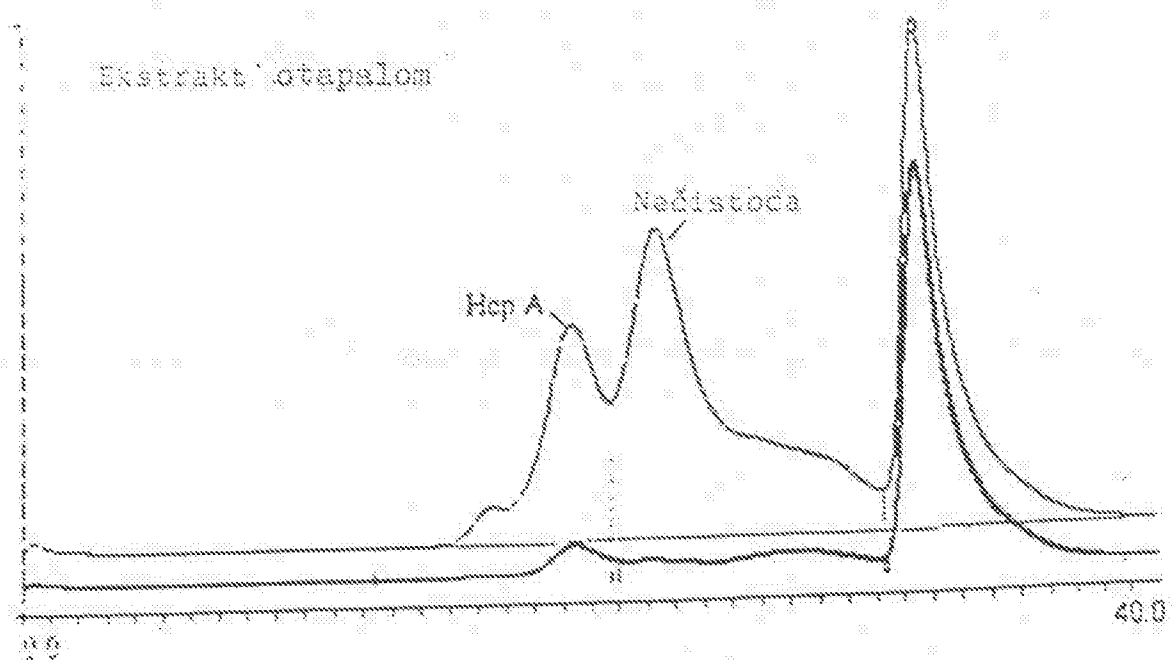
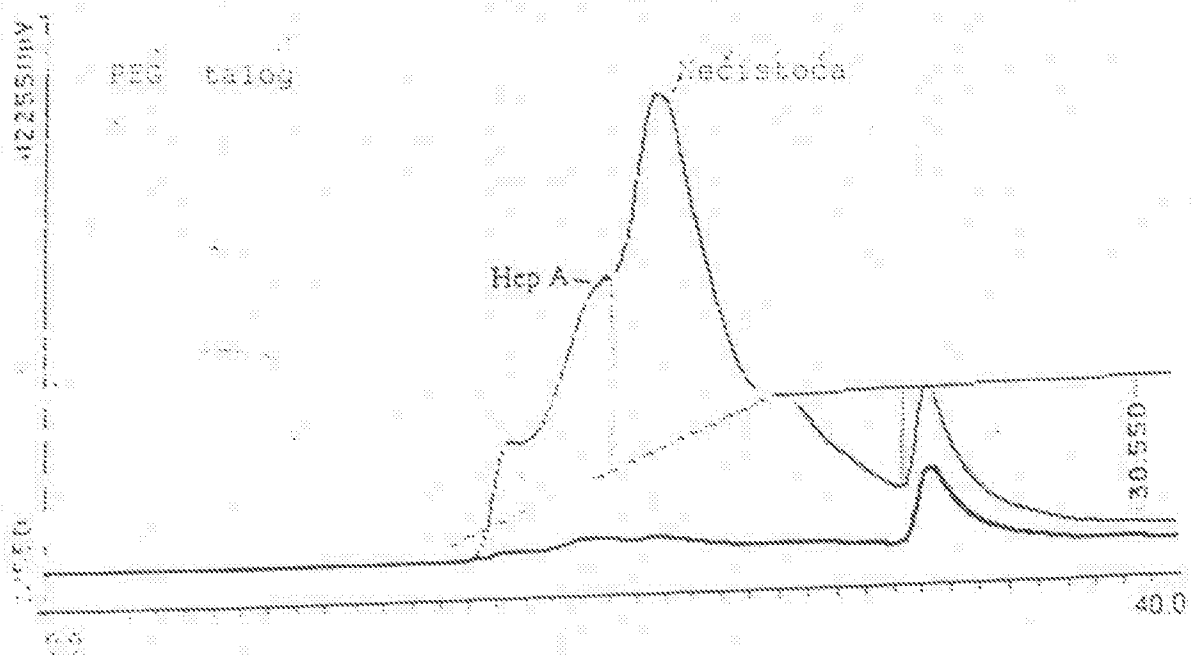
SLIKA 15



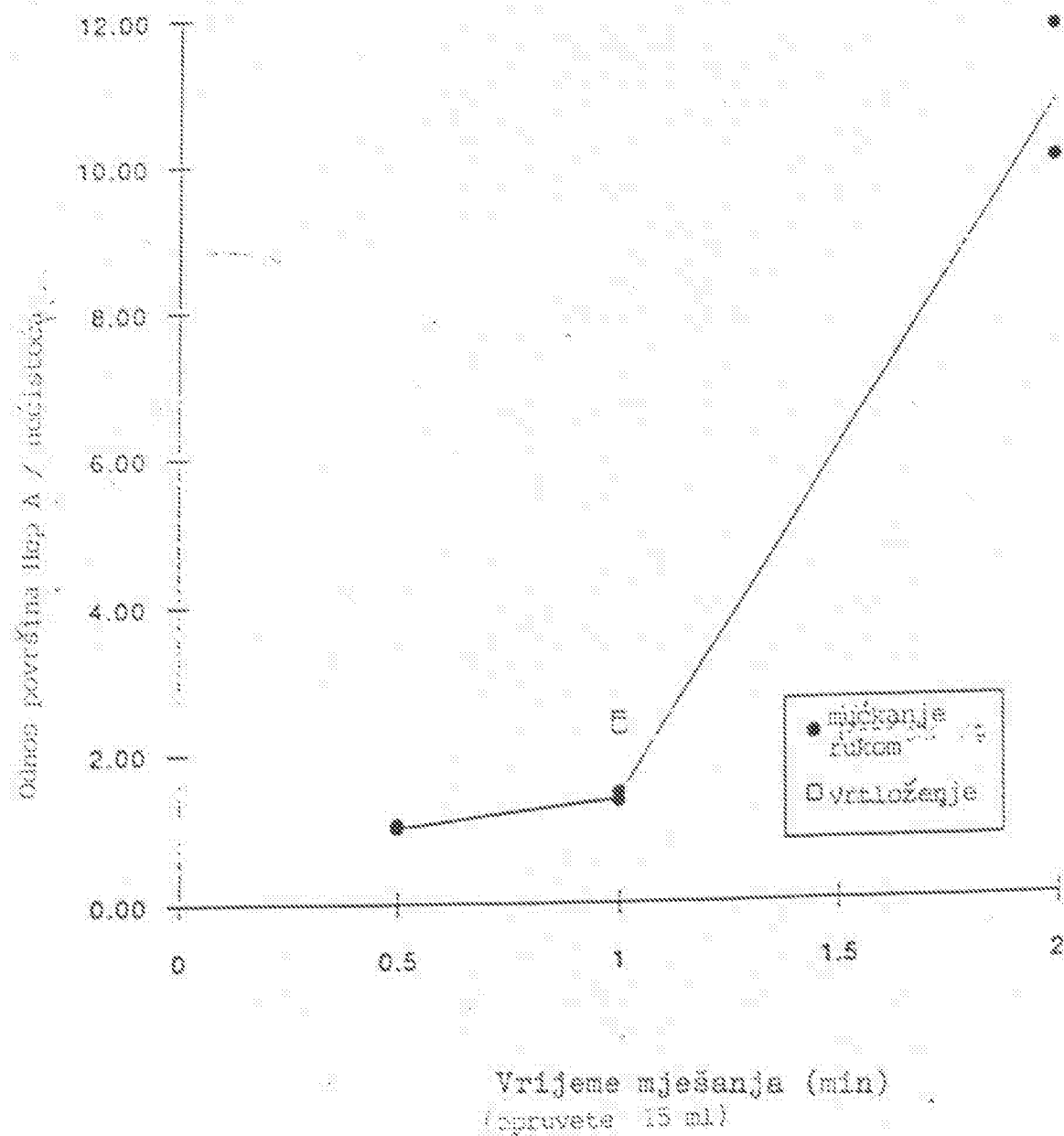
SLIKA 16



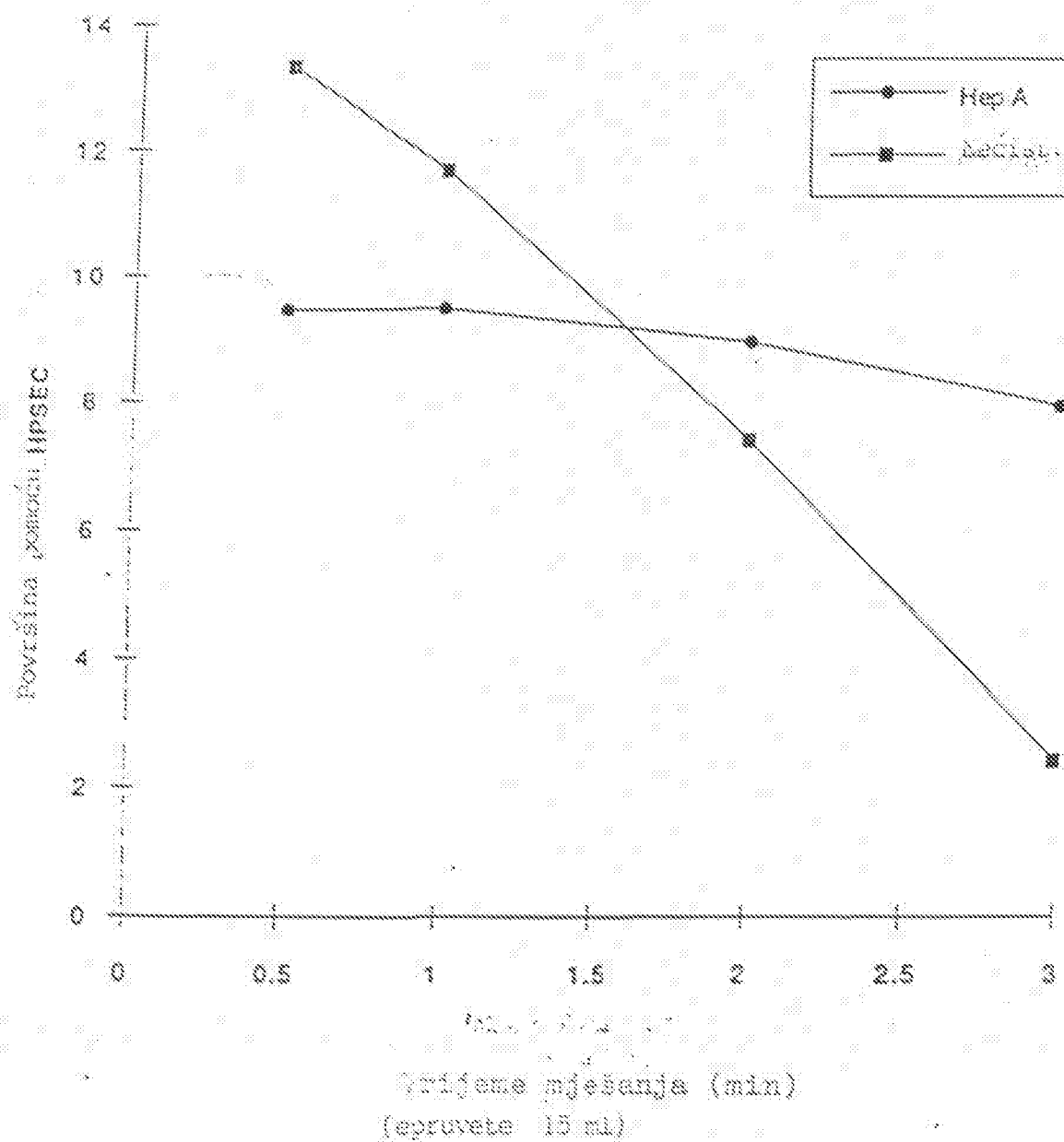
SLIKAC 18



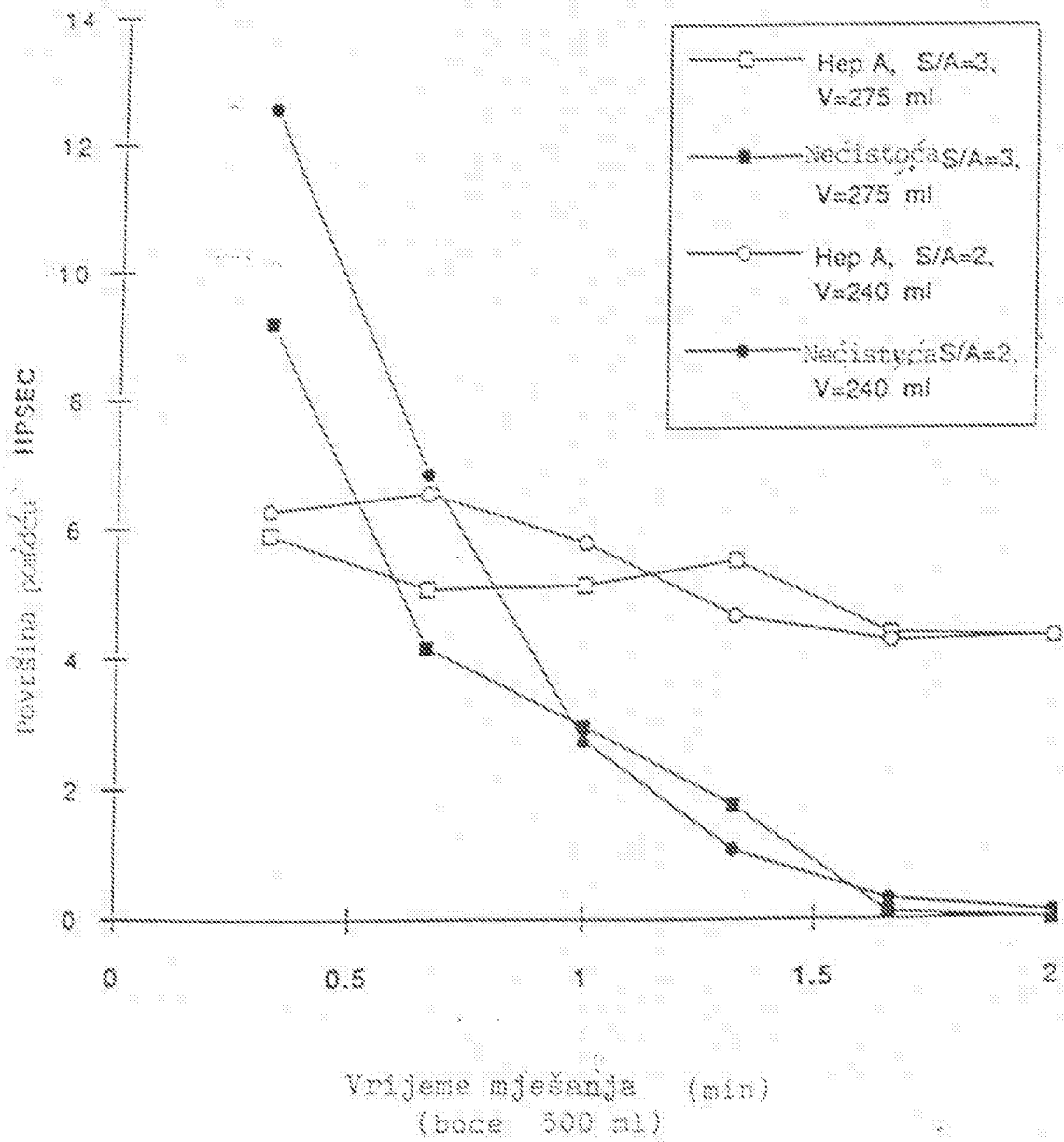
SLIKA 19



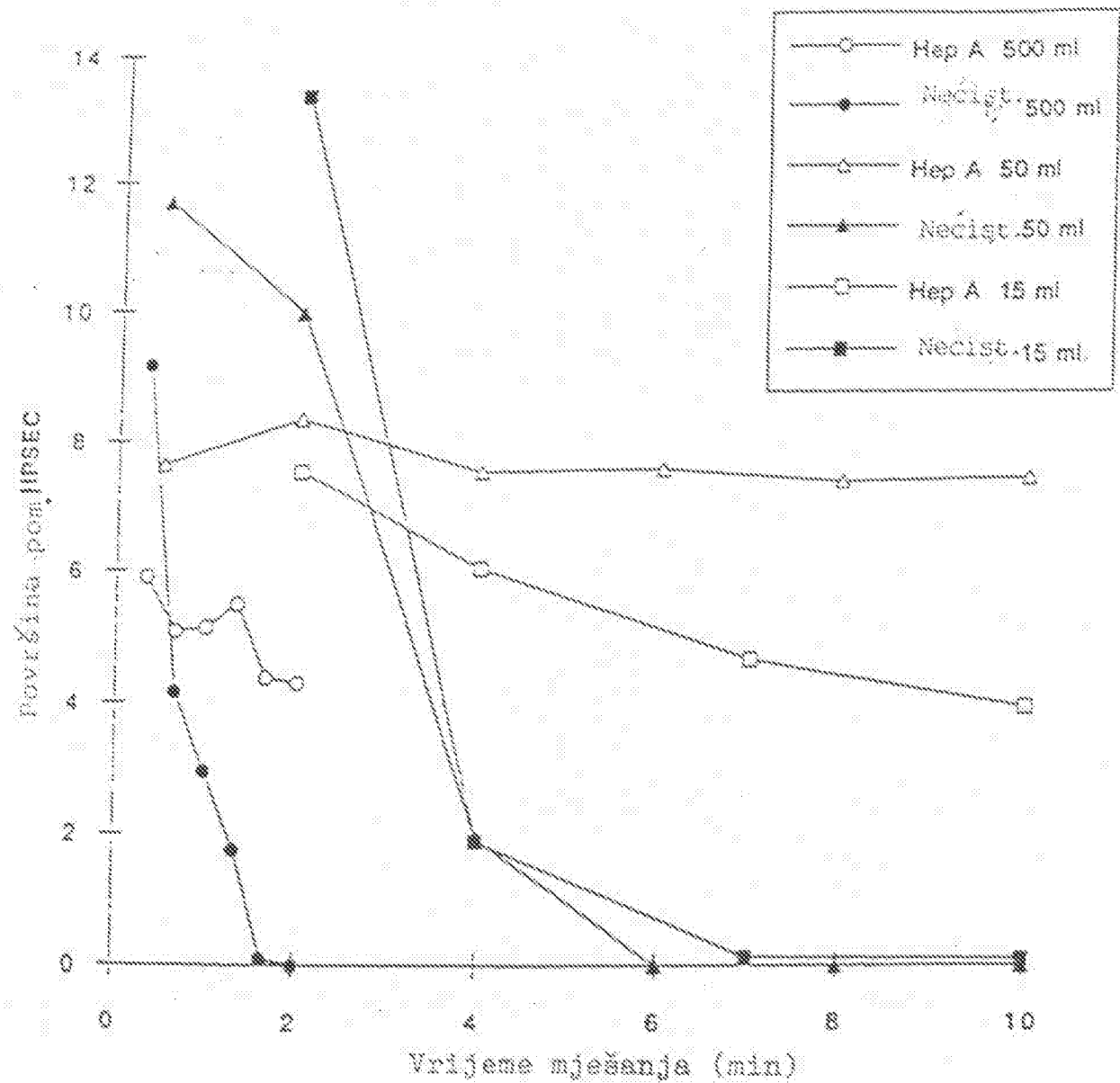
SLIKA 20



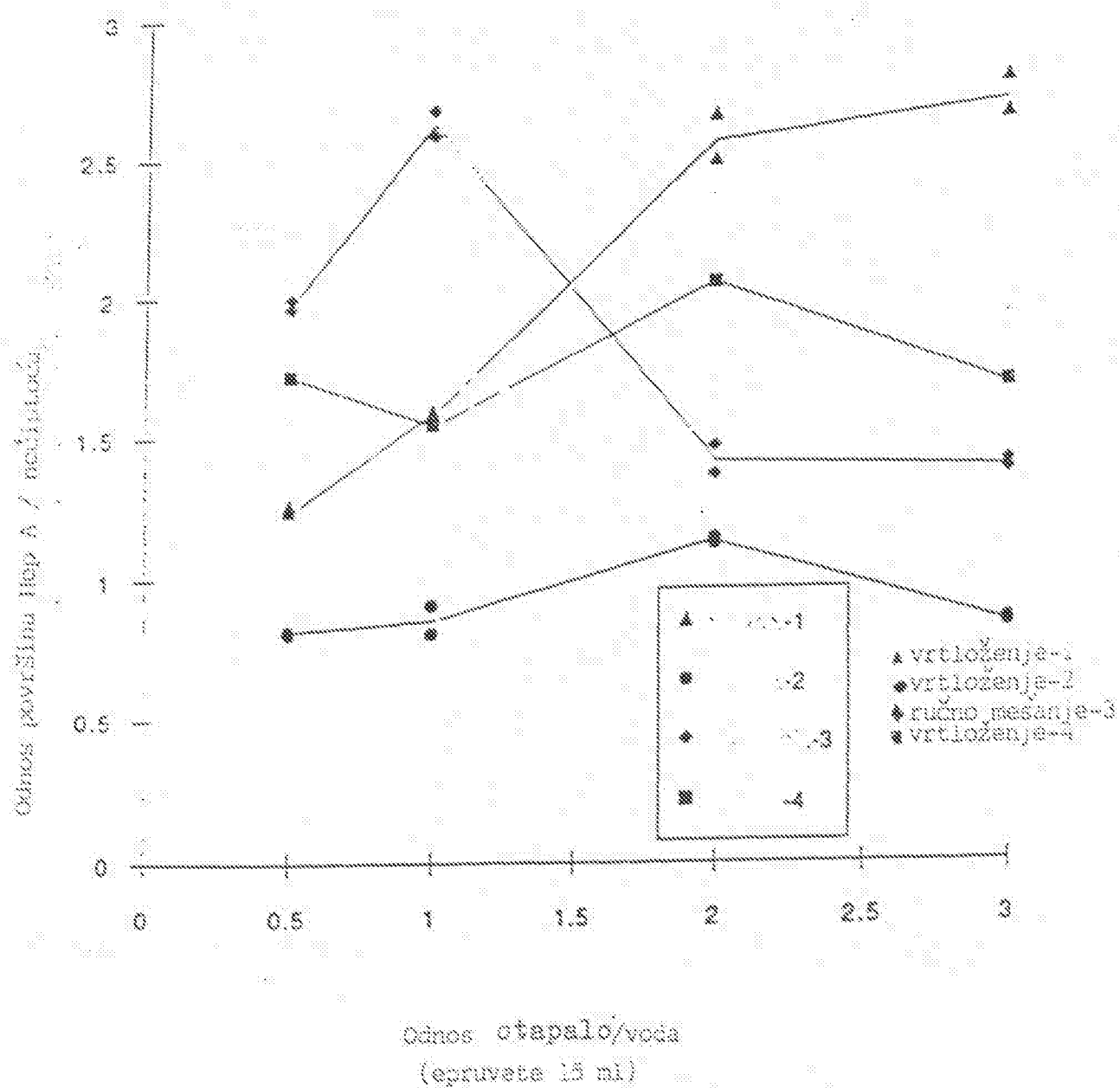
Slika 21



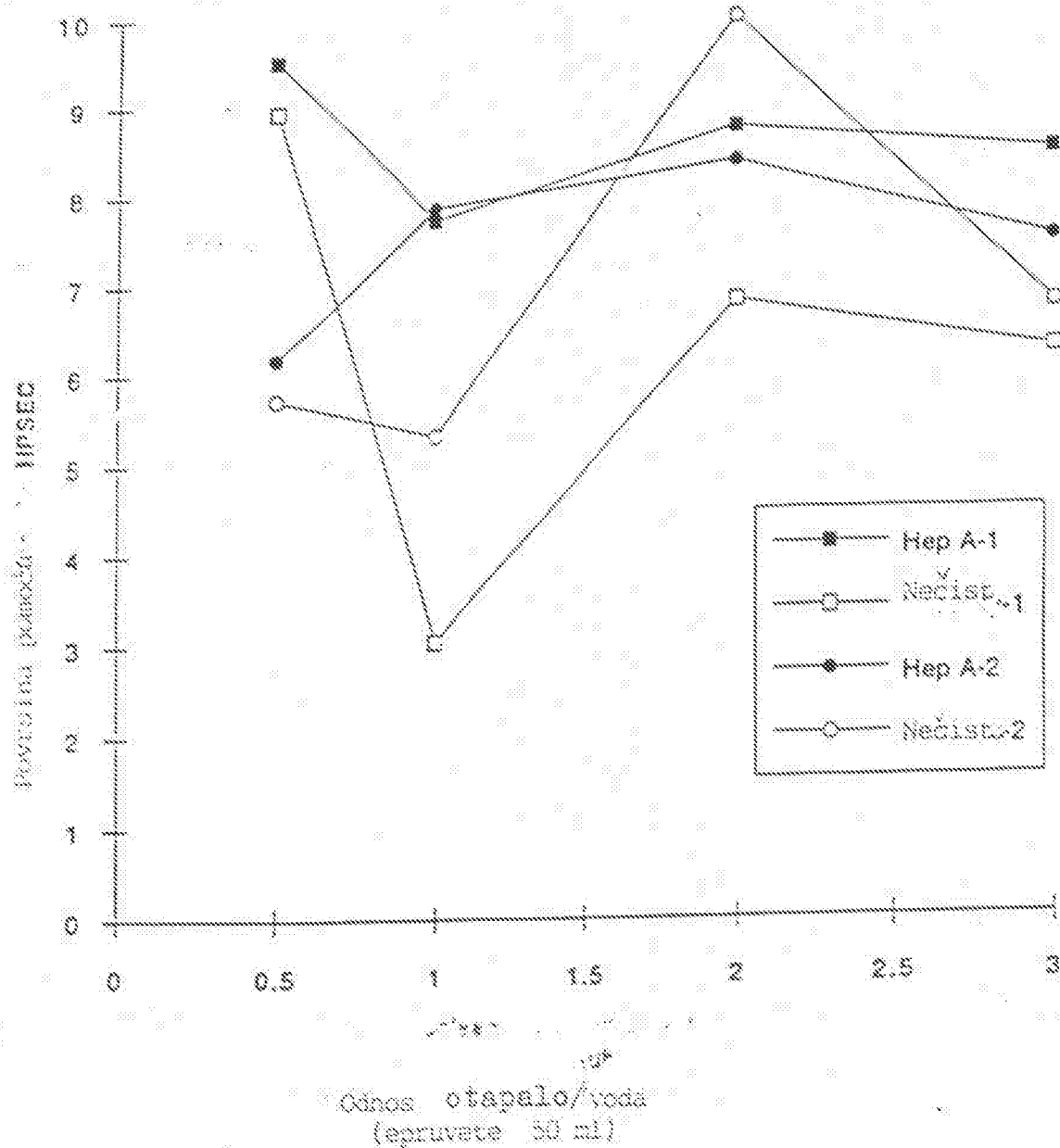
SLIKA 22



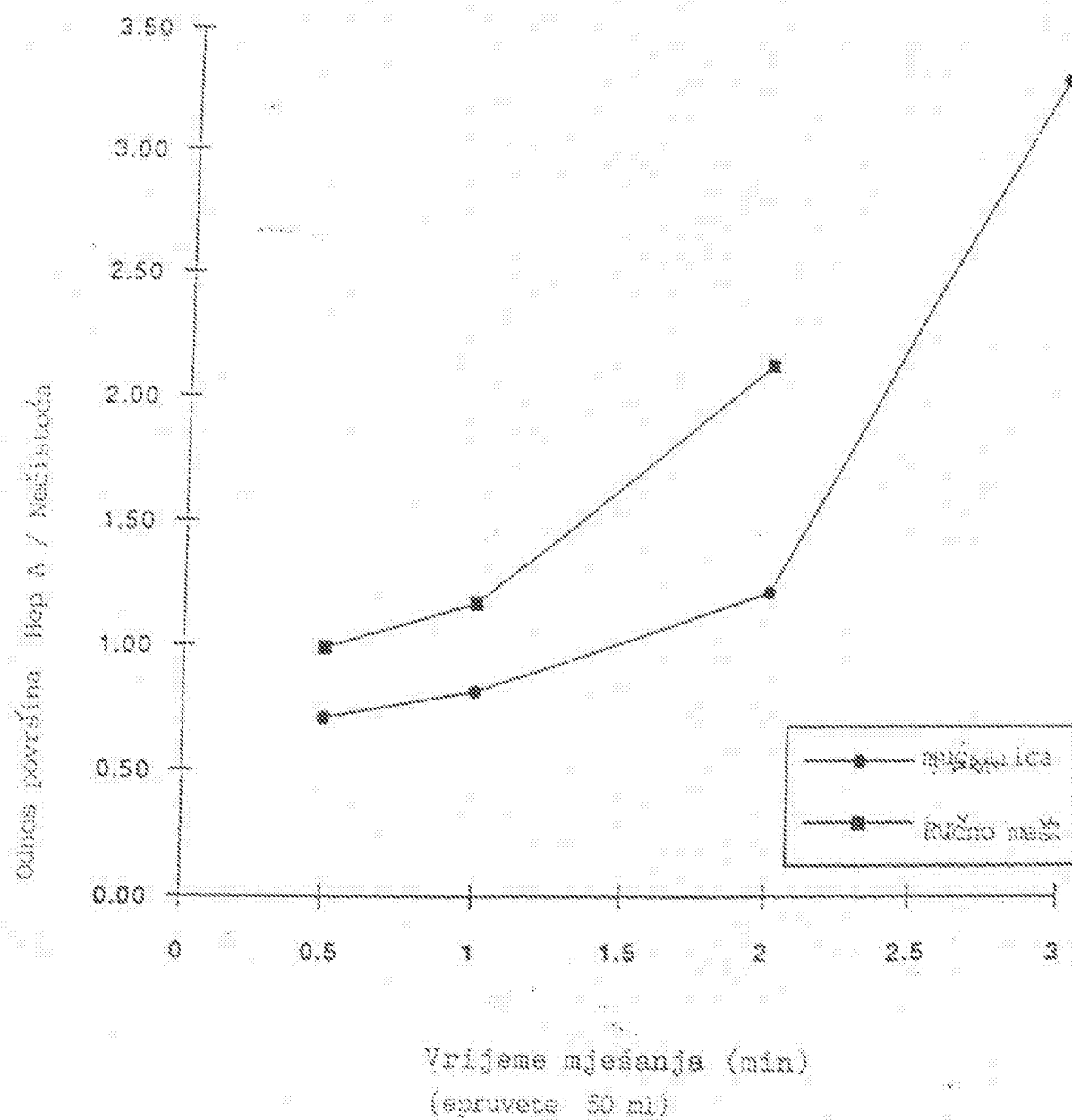

 23



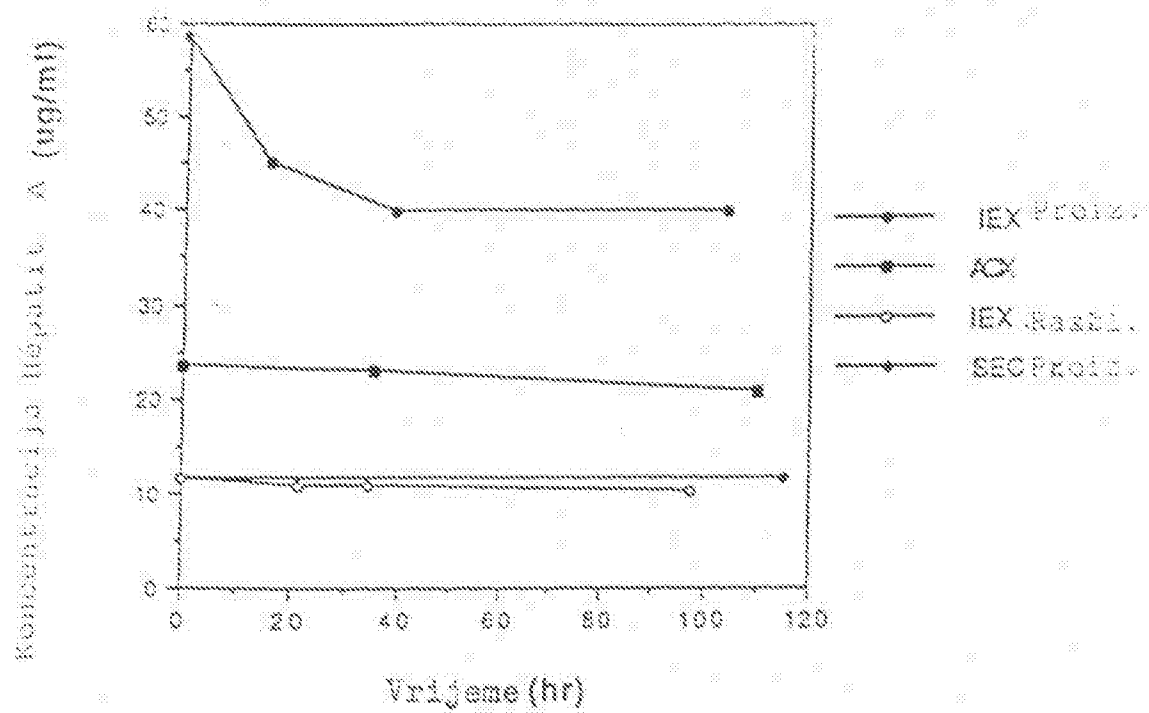
grapes 24



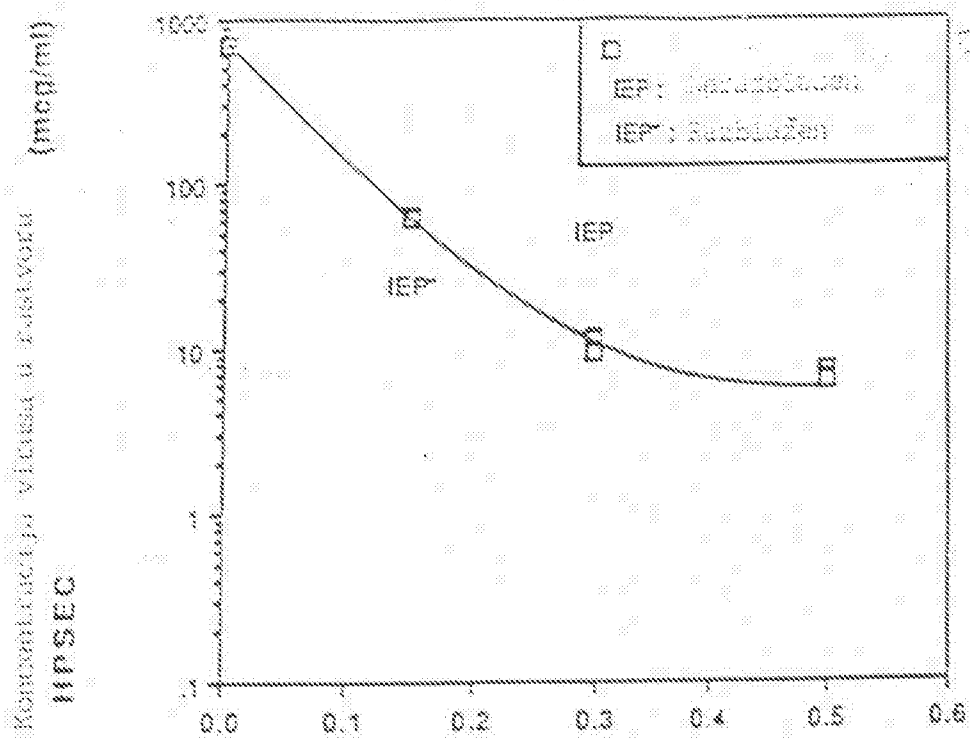
SLIKA 25



SLIKA 26

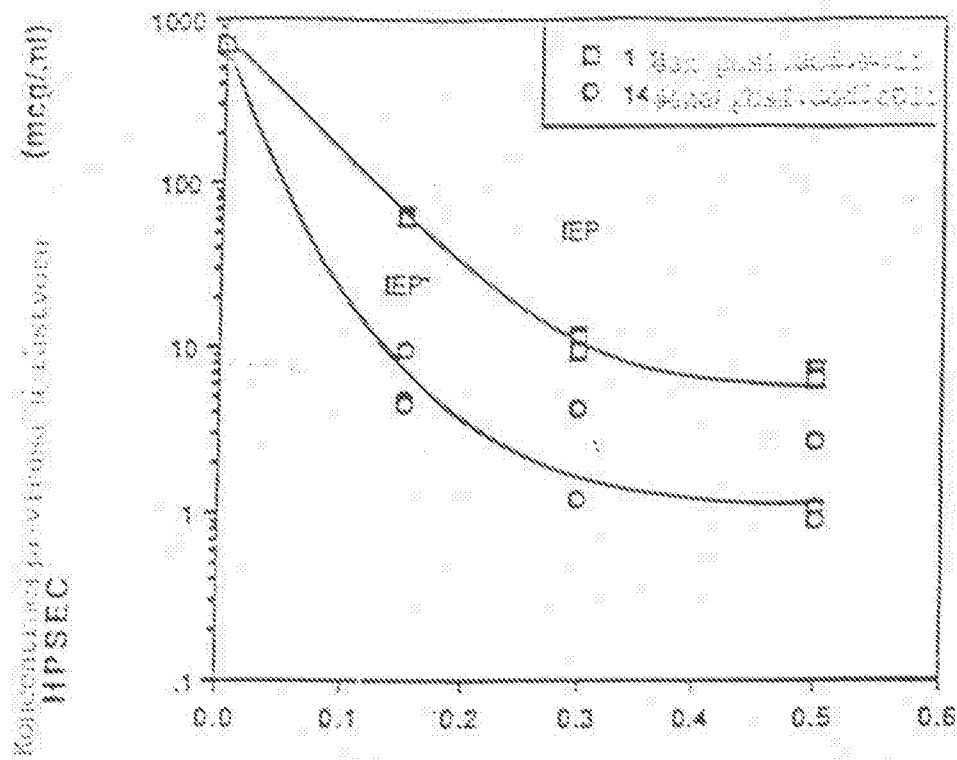


SLIKA 27



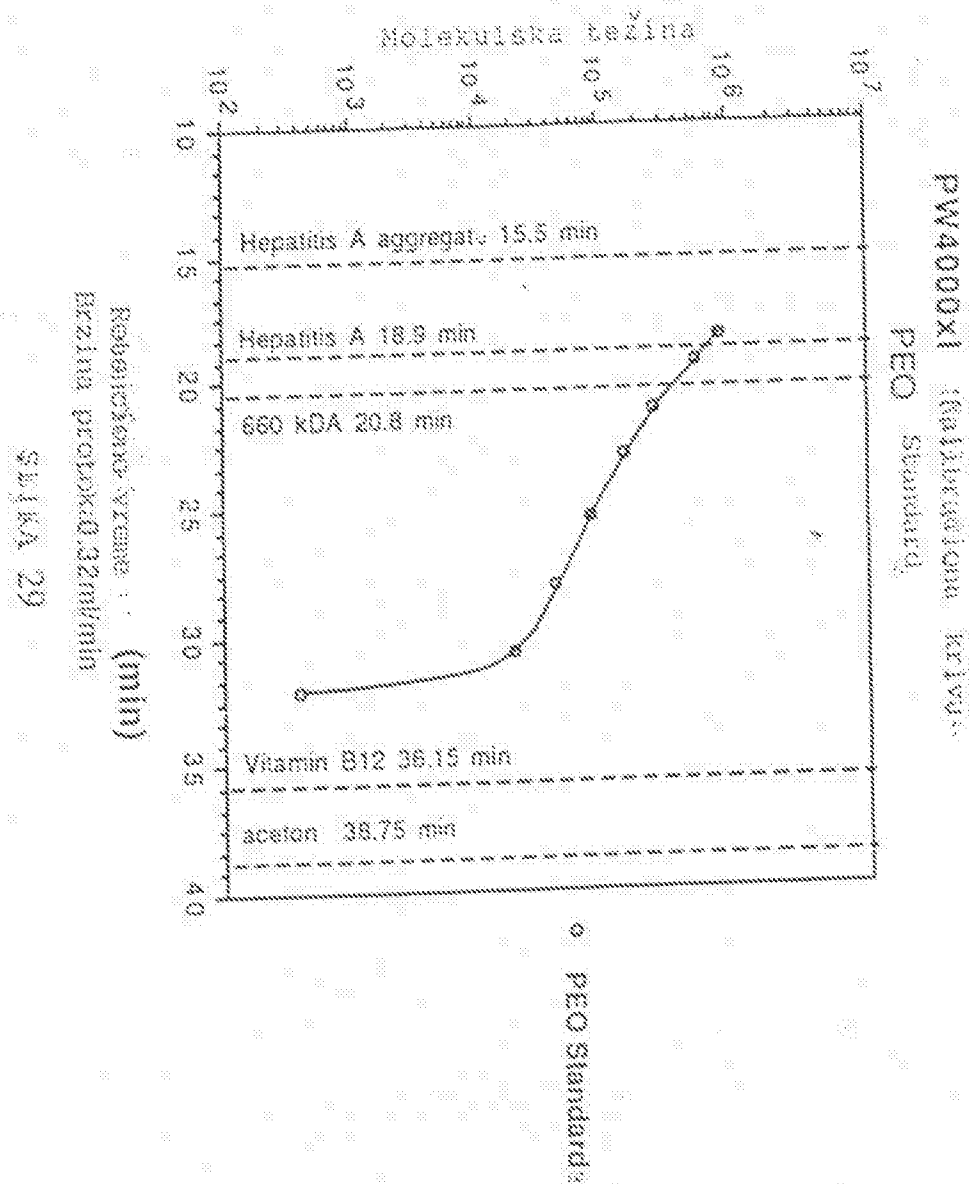
op 2-90/92
41210-106

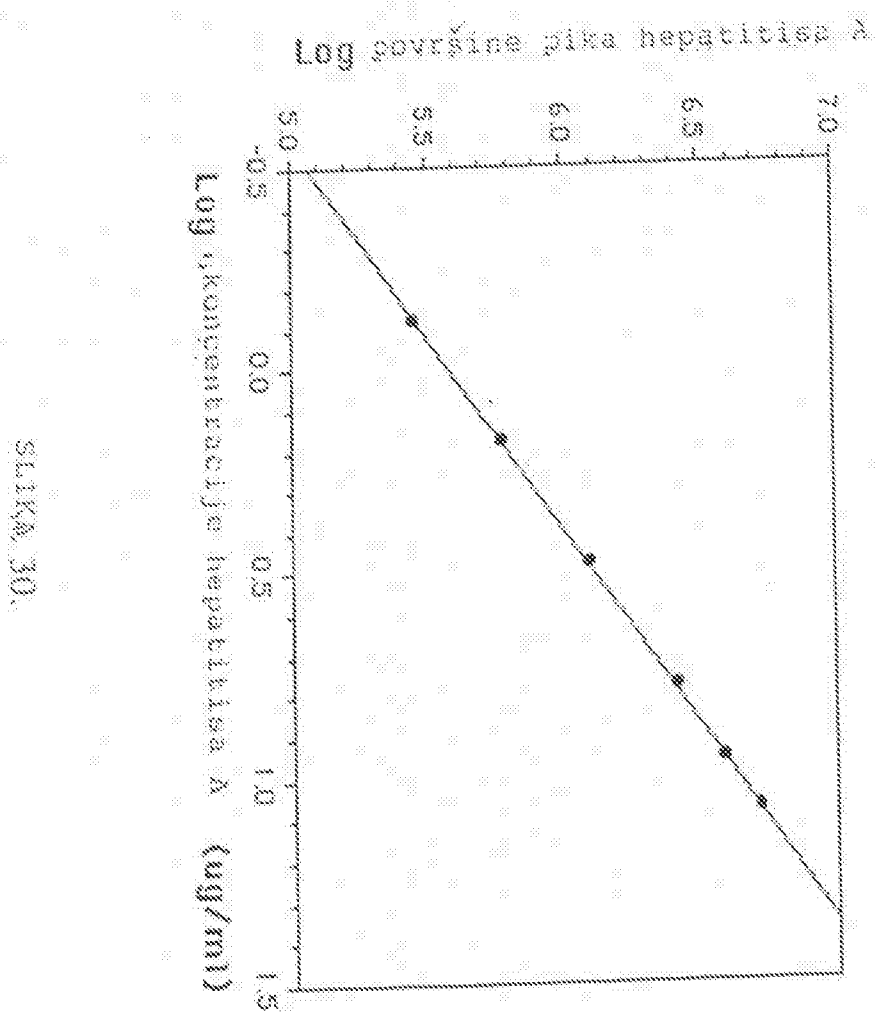
SLIKA 28



Molarnost natrij klorida
(u 6 ml natrij fosfata)

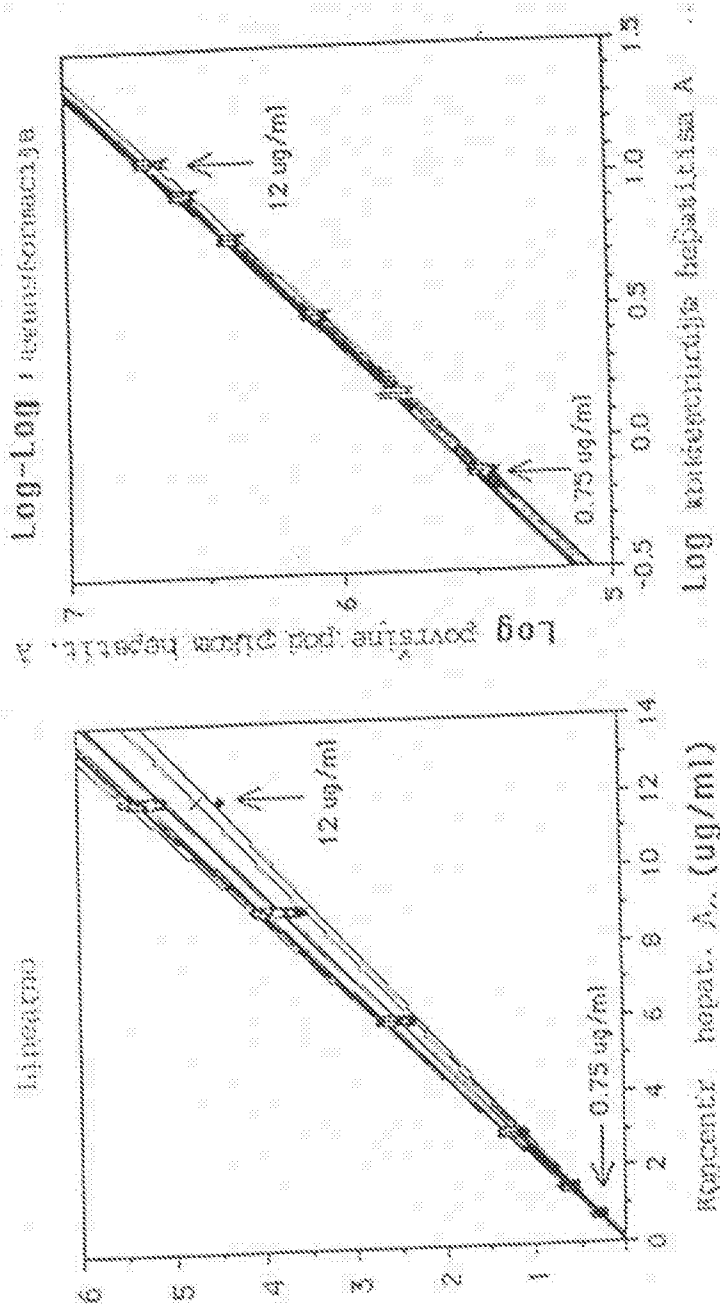
GP 935/92
J1210-106





Kalibracione krivulje hepatitisa A 13 kalibracionih krivulja generiranih tokom 2 mjeseca

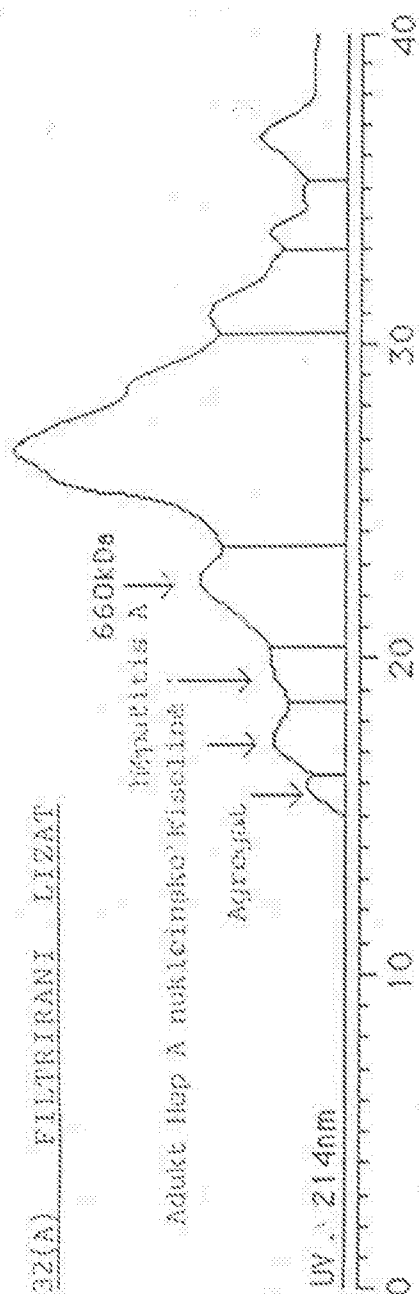
Površina pod pikom hepatitisa A
(u milijunima)



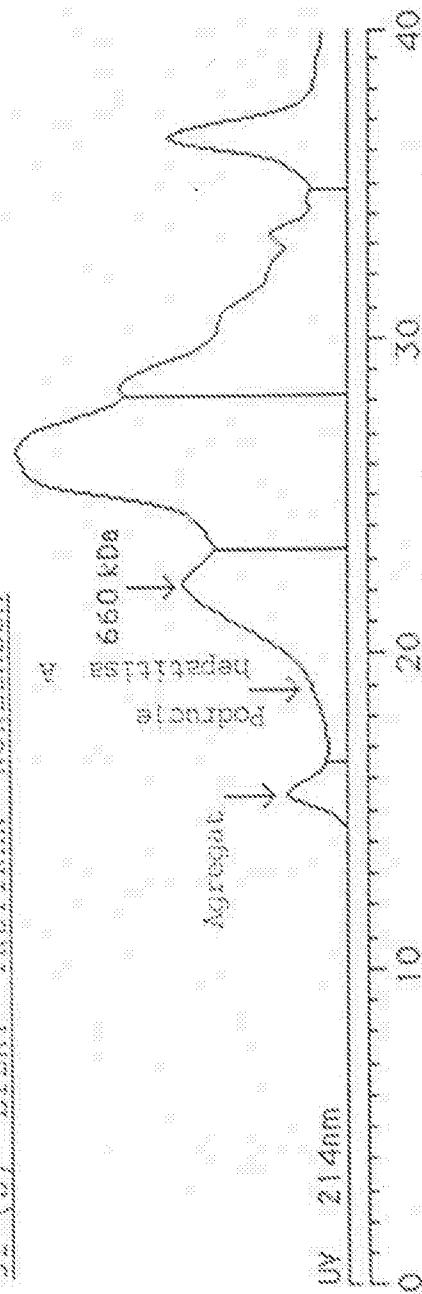
SLIKA 31A

SLIKA 31B

32(A) FILTRIRANI LIZAT

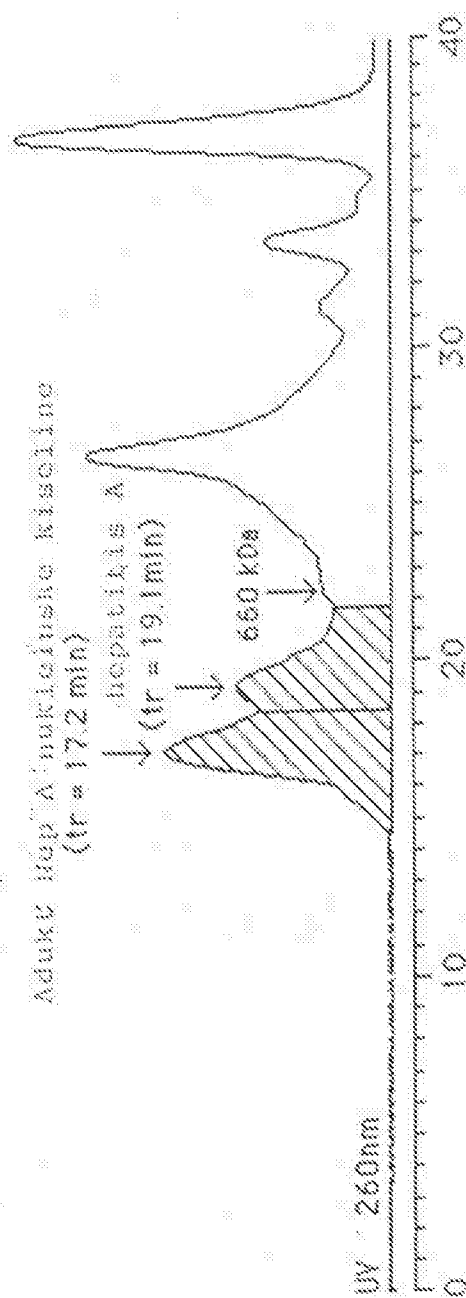


32 (B) LIZAT TRETIKIRAN NUKLEAZOM

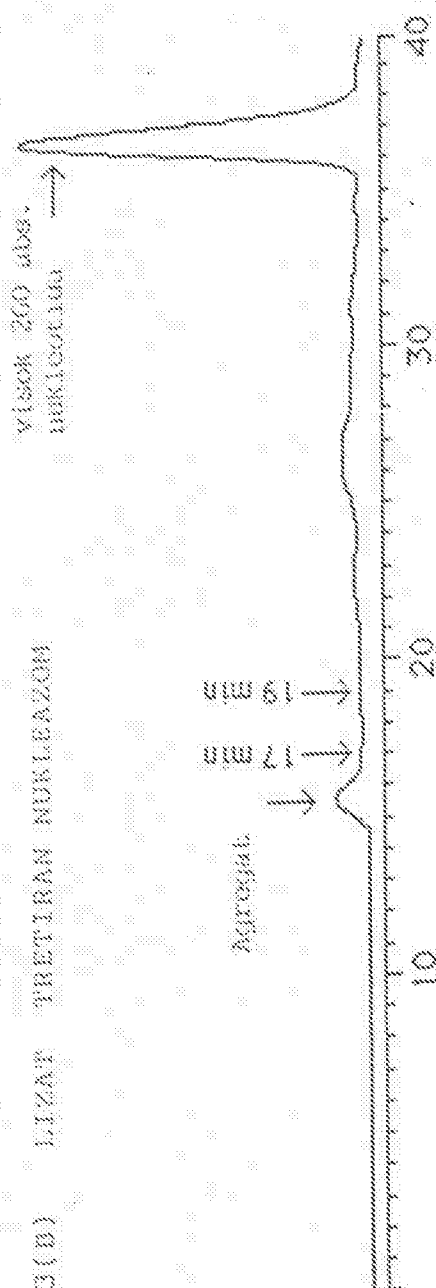


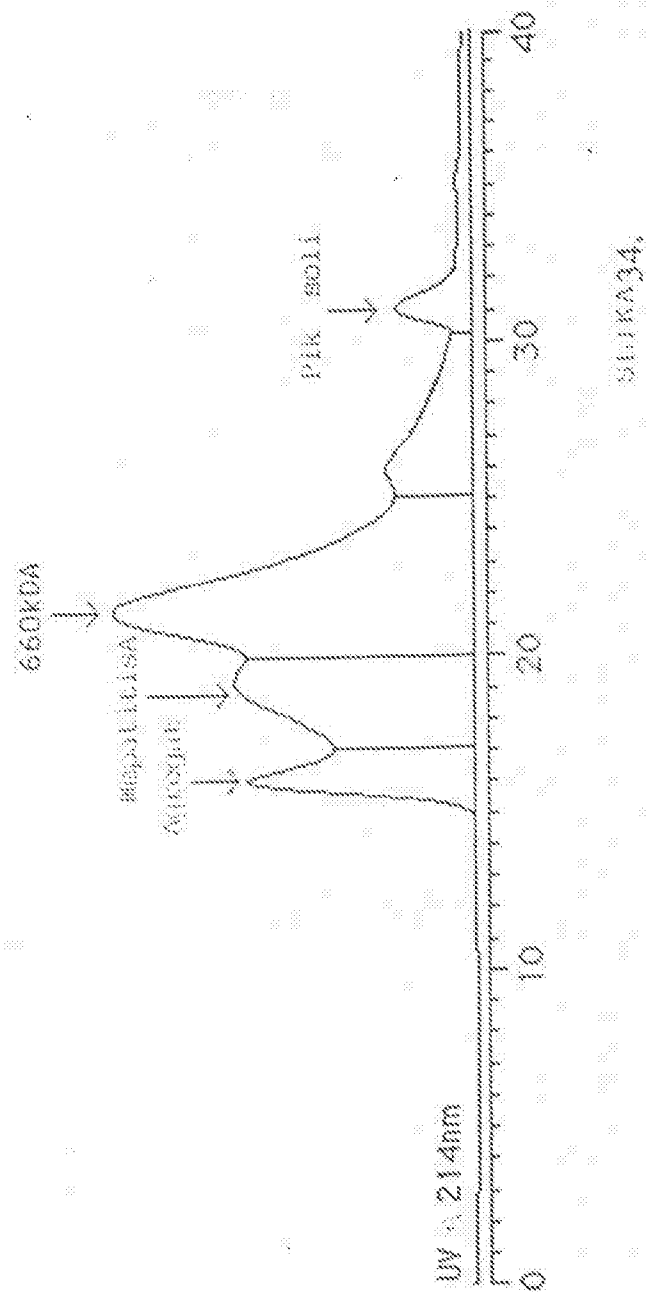
SLIKA 32

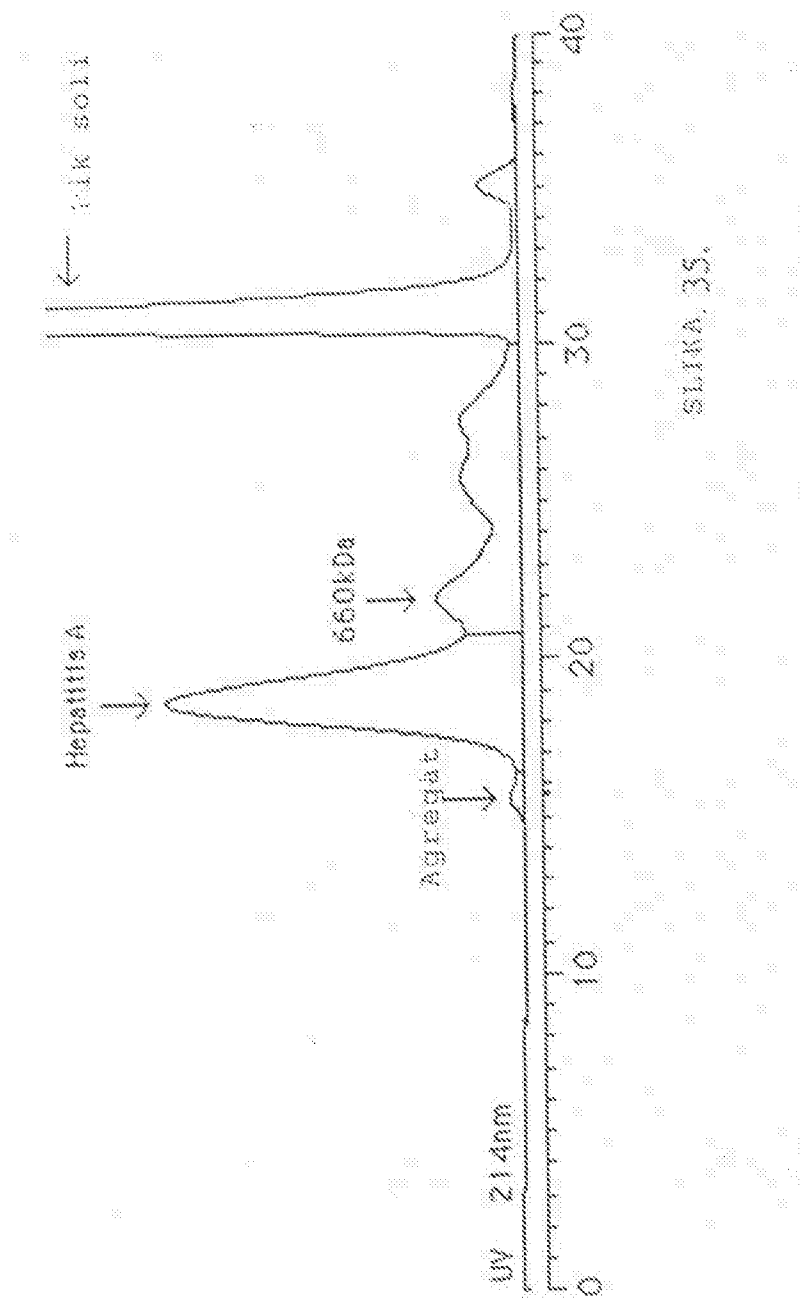
33(A) FILTRIRANI LIZAT

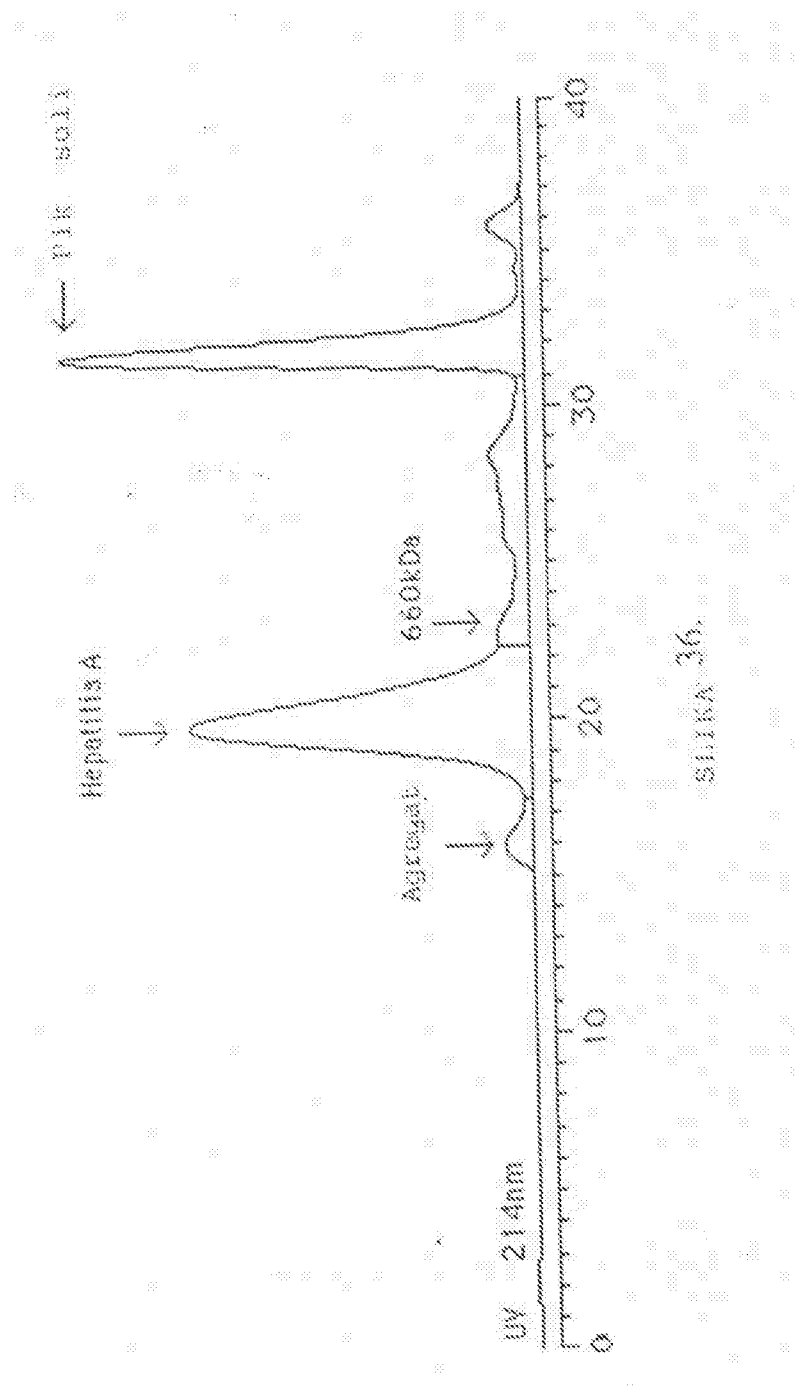


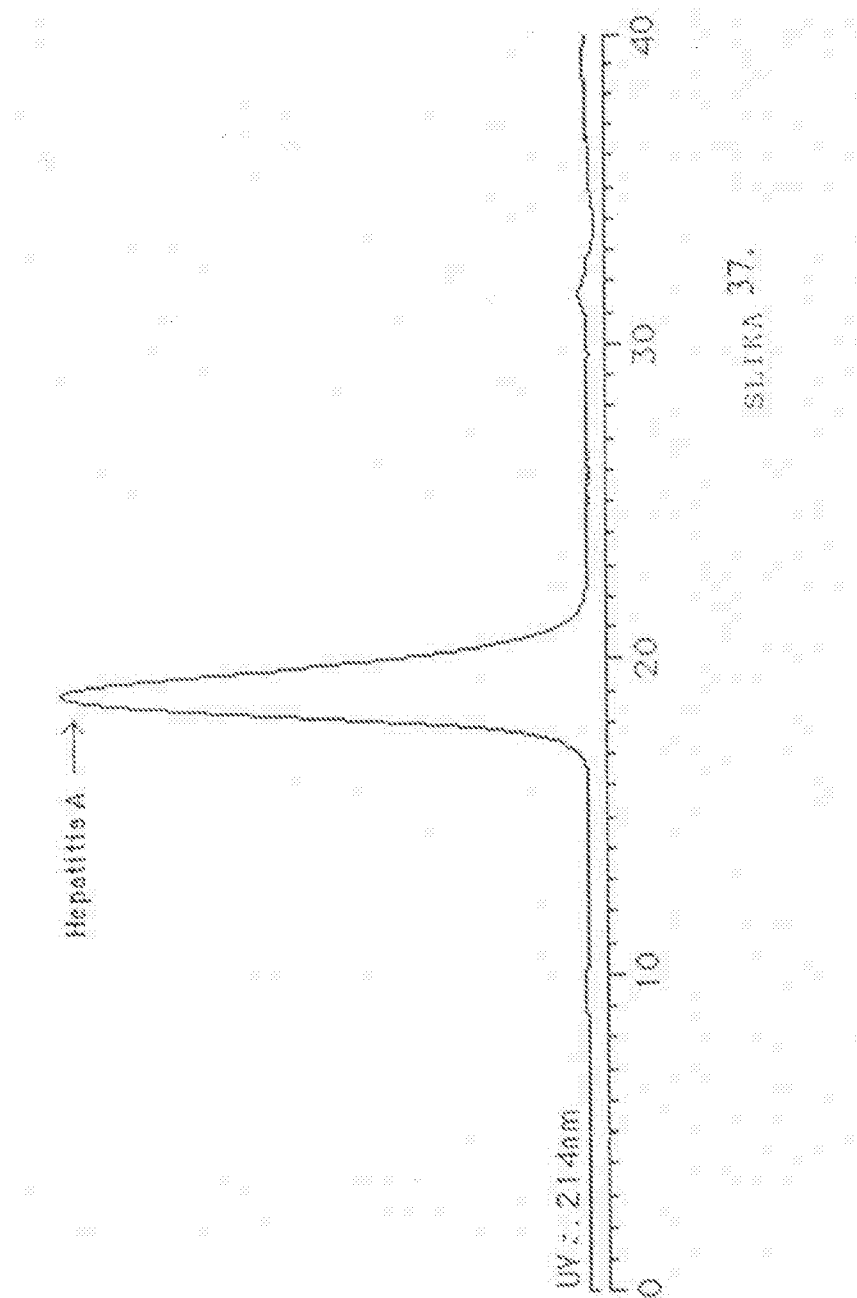
33(B) LIZAT TRETIRAN NUKLEAZOM

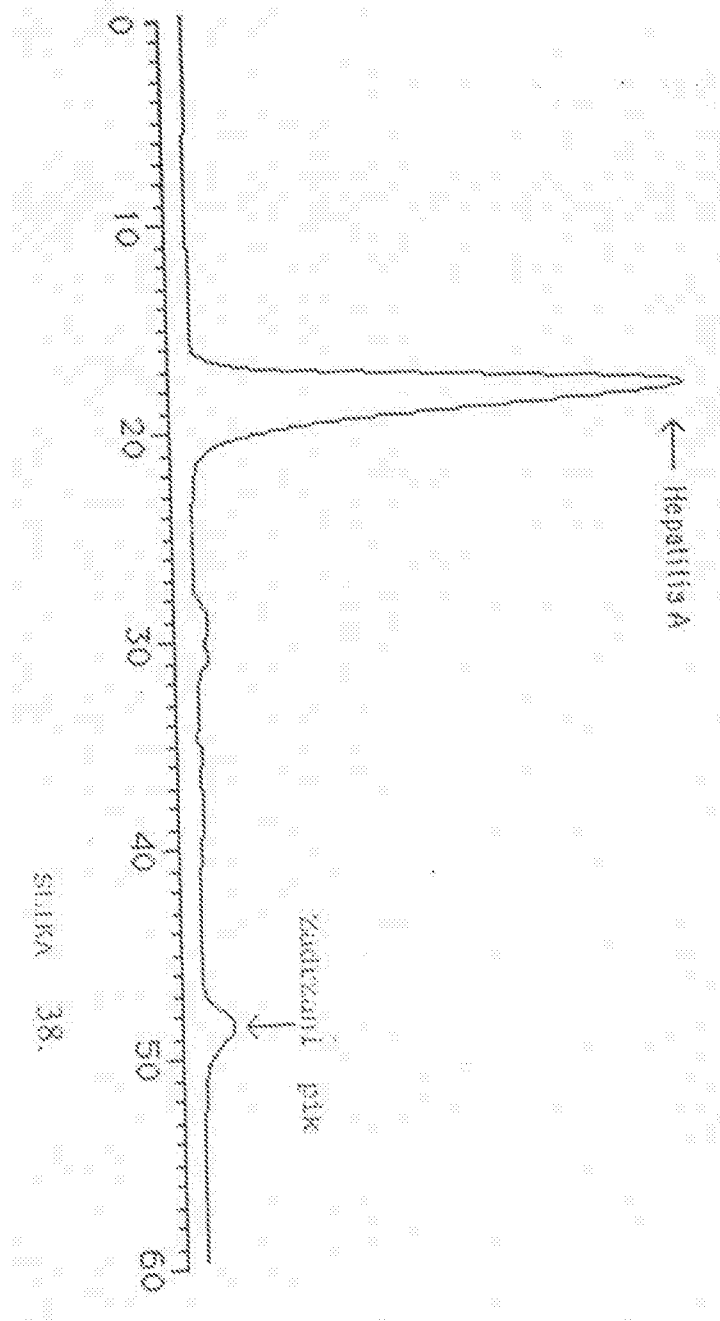




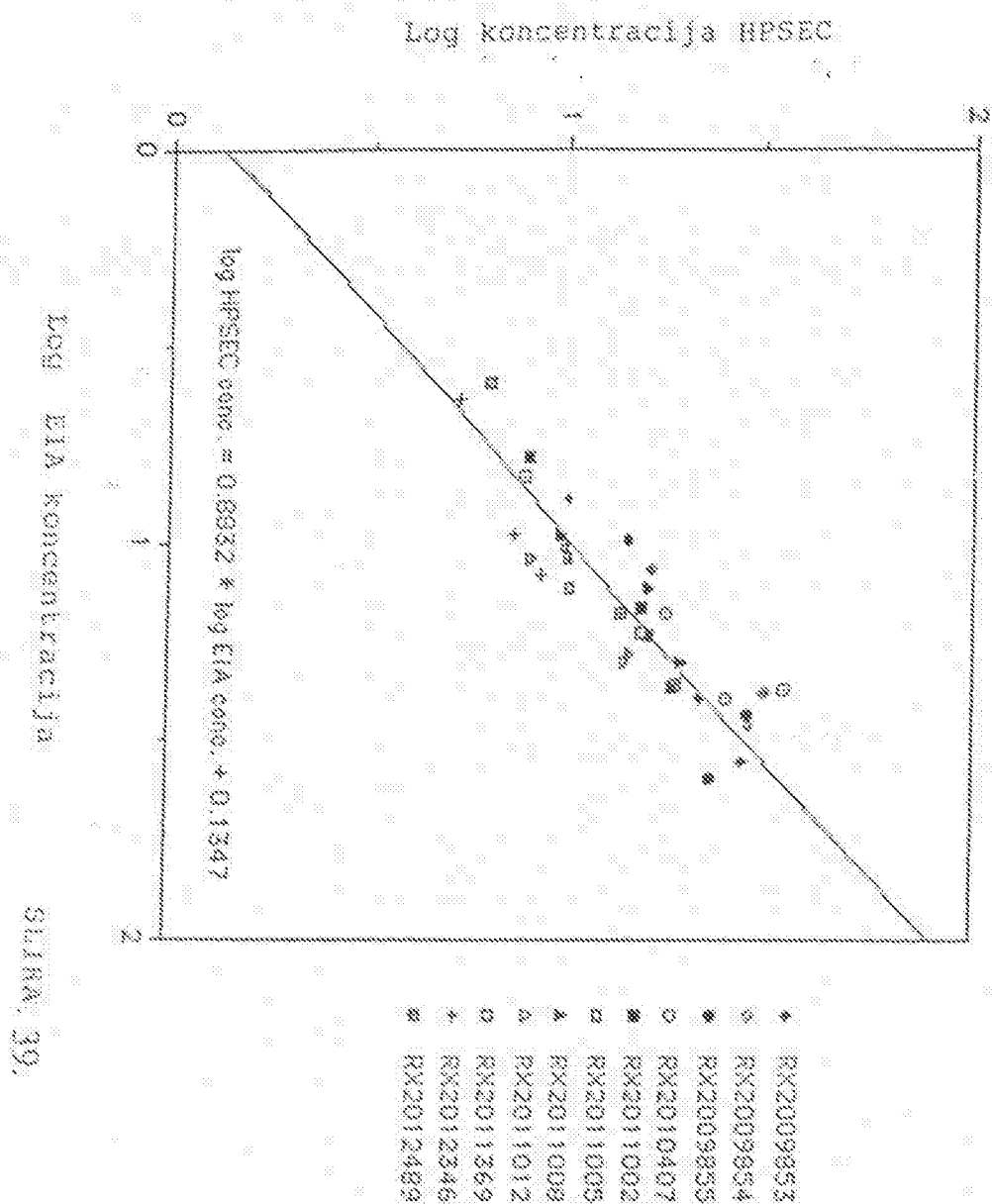




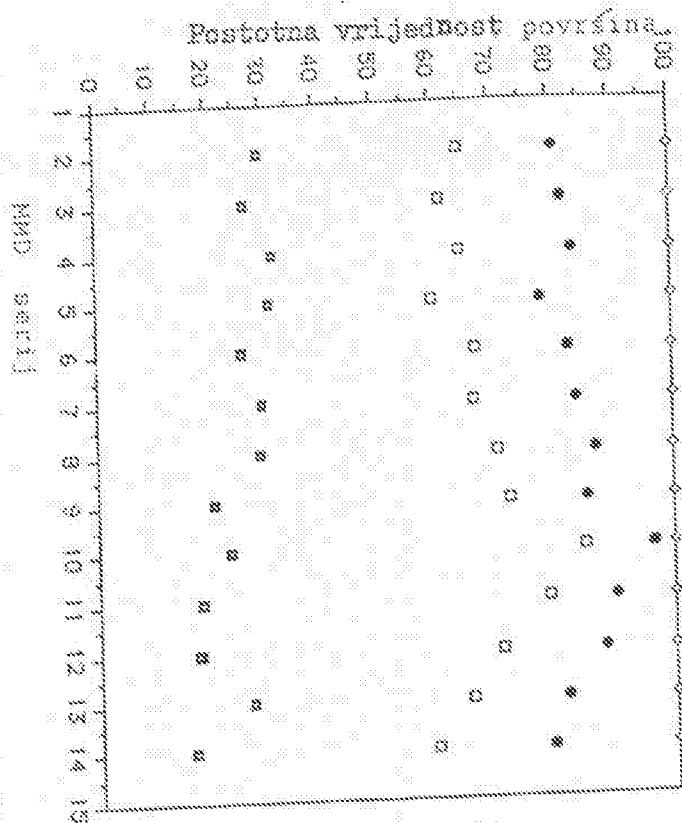




Usporedjenje rezultata EIA i HPSEC
podaci MHD serija 2 do 12



Konverzivnost postupka za hepatitis A
MM serija 2 do 14



Slika 40.

Uzorci postupka

SEC proizvod

Proizvod ionске krmice (anionske)
Baktericidna vod. faza kloroformom
Površnu suopredvozanje 800 pelata