

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2003-385**
(22) Přihlášeno: **07.08.2001**
(30) Právo přednosti: **10.08.2000 GB 0019728**
18.01.2001 GB 0101334
(40) Zveřejněno: **18.06.2003**
(Věstník č. 6/2003)
(47) Uděleno: **18.04.2012**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **30.05.2012**
(Věstník č. 22/2012)
(86) PCT číslo: **PCT/EP2001/009100**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/012287**

(11) Číslo dokumentu:

303 217

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/29 (2006.01)
C07K 14/02 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

US 4649192; US 4683294; WO 99/45957; EP 1307473.

(73) Majitel patentu:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.,
Rixensart, BE

(72) Původce:

De Heyder Koen, Rixensart, BE
Schu Peter, Rixensart, BE
Serantoni Michelle, Rixensart, BE
Van Opstal Omer, Rixensart, BE

(74) Zástupce:

JUDr. Zdeňka Korejzová, Spálená 29, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

Způsob výroby vakcíny proti hepatitidě typu B

(57) Anotace:

Způsob výroby vakcíny proti hepatitidě B, která obsahuje vyčištěný povrchový antigen hepatitidy B, který obsahuje méně než 0,025 µg rtuti na 20 µg bílkoviny a při jehož čištění nebyl použit thiomersal, a farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku, při kterém se antigen čistí tak, že se surový přípravek antigenu hepatitidy B (a) podrobí gelové permeační chromatografii, (b) podrobí iontové výměnné chromatografii a (c) smísí se s redukčním činidlem, majícím volnou skupinu -SH, v jehož přítomnosti se dále čistí, a antigen se po vyčištění formuluje s farmaceuticky přijatelnou pomocnou látkou do vakcíny, přičemž vakcína je prostá thiomersalu.

CZ 303217 B6

Způsob výroby vakcíny proti hepatitidě typu B

Oblast techniky

5

Tento vynález se týká nového způsobu výroby vakcíny vůči hepatitidě typu B pro použití při léčbě nebo profylaxi infekcí virem hepatitidy B (HBV). Dále se pak týká vakcíny vůči HBV, kterou lze získat novým způsobem podle vynálezu.

10

Dosavadní stav techniky

Infekce virem chronické hepatitidy B (HBV), pro kterou v současnosti existuje jen omezená léčba, představuje globální problém veřejného zdravotnictví a to problém ohromných rozměrů. Chroničtí přenašeči HBV, jejichž počet se celosvětově odhaduje na více než 300 milionů, jsou rizikem vývoje chronicky aktivní hepatitidy (zánětu jater), cirhózy a primárního hepatocelulárního karcinomu.

Mnohé vakcíny, které jsou běžně dostupné, vyžadují k prevenci zhoršení kvality konzervační látky. Často používanou konzervační látkou je thiomersal, což je sloučenina obsahující rtuť. Objevily se určité pochybnosti, které se týkaly použití rtuti ve vakcínách, ačkoli komentátoři zdůraznili, že možná rizika vakcín s obsahem thiomersalu by neměla být zveličována (P. A. Offit, JAMA 283 (16)). Přesto by bylo výhodné nalézt nové a případně bezpečnější způsoby výroby vakcín k nahrazení používání thiomersalu ve výrobním postupu. Existuje tedy potřeba vyvinutí vakcíny bez přítomnosti thiomersalu a zejména vakcíny vůči hepatitidě B.

25

Podstata vynálezu

Podstata vynálezu tvoří způsob výroby vakcíny proti hepatitidě B, která obsahuje vyčištěný povrchový antigen hepatitidy B, který obsahuje méně než 0,025 µg rtuti na 20 µg bílkoviny a při jehož čištění nebyl použit thiomersal a farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku, vyznačující se tím, že se antigen čistí tak, že se surový přípravek antigenu hepatitidy B

35 (a) podrobí gelové permeační chromatografii,

(b) podrobí iontové výměnné chromatografii a

40 (c) smísí se s redukčním činidlem, majícím volnou skupinu -SCH, v jehož přítomnosti se dále čistí, a

antigen se po vyčištění formuluje s farmaceuticky přijatelnou pomocnou látkou do vakcíny, přičemž vakcína je prostá thiomersalu.

45 Čištění se s výhodou provádí v nepřítomnosti thiomersalu a vyčištěný antigen neobsahuje vůbec žádný thiomersal.

Antigen je s výhodou stálá a vhodně v podstatě tak stálý, jako antigeny hepatitidy, vyčištěný v přítomnosti thiomersalu, jak je například ukázáno zde v Příkladu 1.

50

Antigen hepatitidy je s výhodou imunogenní.

Redukční činidlo se s výhodou přidává během postupu čištění antigenu, s výhodou po nárůstu buněk, exprimujících antigen.

55

Redukčním činidlem je s výhodou cystein, dithiothreitol, β -merkptoethanol nebo glutathion, přičemž nejvíce se upřednostňuje cystein.

5 Předkládaný vynález tedy v souladu s tím poskytuje způsob výroby stálého imunogenního antigenu hepatitidy B, beze stop thiomersalu, který zahrnuje čištění antigenu v přítomnosti cysteinu.

Čištění se s výhodou provádí v přítomnosti roztoku cysteinu.

10 Cystein, ať už ve formě roztoku nebo v práškové formě, se během takového způsobu přidává do konečné koncentrace do 1 do 10 mmol \cdot l⁻¹ a lépe od 1 do 5 mmol \cdot l⁻¹. Ještě lépe se cystein přidává až k dosažení konečné koncentrace přibližně 2 mmol \cdot l⁻¹.

Cystein je s výhodou L-cystein.

15 Vynález dále poskytuje způsob výroby stálého antigenu hepatitidy B beze stop thiomersalu, při němž se surový antigen podrobí gelové permeační chromatografii, iontově výměnné chromatografii a smíchá se s redukčním činidlem, které má volnou skupinu -SH.

20 Iontově výměnnou chromatografií je s výhodou aniontově výměnná chromatografie.

Vynález dále poskytuje antigen hepatitidy B, neobsahující thiomersal, který lze získat způsobem výroby podle předkládaného vynálezu, přičemž antigen je alespoň tak imunogenní a antigenní jako antigen, který byl vyrobený v přítomnosti thiomersalu.

25 Tento vynález dále poskytuje imunogenní antigen hepatitidy B, mající střední poměr bílkoviny, měřený postupem ELISA (enzymovým imunologickým stanovením), větší než 1,5 a obsahem RF1 s alespoň třikrát nižší hodnotou IC₅₀, než je tomu u povrchového antigenu hepatitidy B, vyrobeného v přítomnosti thiomersalu.

30 V dalším aspektu se tento vynález týká způsobu výroby antigenu hepatitidy, vhodného pro použití ve vakcíně, přičemž tento způsob zahrnuje čištění antigenu v přítomnosti thiomersalu a následnou úpravu antigenu v přítomnosti redukčního činidla, obsahujícího volnou skupinu -SH.

Po úpravě s výhodou následuje krok čištění, jako je dialyzační krok, k odstranění thiomersalu.

35 Redukčním činidlem je s výhodou cystein, dithiothreitol, glutathion nebo 2-merkptoethanol.

Antigen hepatitidy B podle vynálezu může být použit buď pro léčbu nebo profylaxi infekcí hepatitidy B, zvláště pak pro léčbu nebo profylaxi například chronických infekcí hepatitidy B.

40 Předkládaný vynález dále poskytuje vakcinační prostředek obsahující antigen hepatitidy B podle tohoto vynálezu ve spojení s adjuvantní látkou. Adjuvantní látkou je s výhodou hlinitá sůl nebo preferenční, přednostní stimulátor odpovědi buněk TH1.

45 Antigenem je s výhodou povrchový antigen hepatitidy B.

Příprava povrchového antigenu hepatitidy B je dobře doložená. Viz například Harford se spoluautory, *Develop. Biol. Standard* 54, 125, 1983; Gregg se spoluautory, *Biotechnology* 5, 479, 1987, EP-A-0 226 846, EP-A-0 229 108 a odkazy v uvedených publikacích.

50 Tak, jak je zde používán, zahrnuje výraz "povrchový antigen hepatitidy B" jakýkoli antigen HBsAg (povrchový antigen hepatitidy B) nebo jeho fragment, vykazující antigennost povrchového antigenu HBV (viru hepatitidy B). Bude zřejmé, že kromě sekvence 226 aminokyselin antigenu HBsAg (viz Tiollais se spoluautory, *Nature* 317, 489, 1985 a zde uvedené odkazy) může
55 HBsAg, jak je zde uveden, pokud je to žádoucí, obsahovat část sekvence pre-S či celou sekvenci

pre-S, jak je popsána ve výše uvedených odkazech a v EP-A-0 278 940. HBsAg, jak je zde uveden, může také odpovídat variantám, například "únikovému mutantu" (escape mutant), popsanému ve WO 91/14703.

- 5 HBsAg může také odpovídat polypeptidům, popsaným v EP 0 198 474 nebo v EP 0 304 578.

HBsAg bude normálně v částicové formě. Ve zvláště upřednostňovaném ztělesnění bude HBsAg sestávat zejména z S-antigenů HBsAg, uvedeného výše.

- 10 Vakcína může s výhodou zahrnovat farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku, jako je vhodná adjuvantní látka. Vhodné adjuvantní látky jsou obchodně dostupné, jako například Freudovo nekompletní adjuvans a Freundovo kompletní adjuvans (Difco Laboratories, Detroit, Mi); Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA); hlinité sole jako gel hydroxidu hlinitého (alum) nebo fosforečnan hlinitý; sole vápníku, železa či zinku; nerozpustná suspenze akrylovaného tyrodinu; acylované cukry; kationtově
15 nebo aniontově derivatizované polysacharidy; polyfosfazeny; biologicky odbouratelné (degradovatelné) mikrokuličky; monofosforyllipid A a quil A. Jako adjuvantní látky mohou být také použity cytokiny, jako GM-CSF nebo interleukin-2, interleukin-7 či interleukin-12.

- 20 V prostředcích podle tohoto vynálezu se upřednostňuje to, aby adjuvantní sloučenina indukovala imunitní odpověď převážně typu TH1. Vysoké hladiny cytokinů typu Th1 (například interferonu gama, faktoru nekrózy tumorů alfa, interleukinu 2 a interleukinu 12, tj. IFN- γ , TNF α , IL-2 a IL-12), mají sklon upřednostňovat, indukci buněčně zprostředkovaných imunitních odpovědí na podávaný antigen. V upřednostňovaném ztělesnění, při němž je imunitní odpověď převážně
25 typu TH1, se bude hladina cytokinů typu Th1 zvyšovat ve větším rozsahu než hladina cytokinů typu TH2. Hladiny těchto cytokinů mohou být snadno určeny za použití standardních stanovení. Pro přehled typů cytokinů viz práci Mosmanna a Coffmana a Ann. Rev. Immunol. 7, 145-173, 1989.

- 30 Vhodné adjuvantní látky pro vyvolání především odpovědi typu TH1 zahrnují například kombinaci monofosforyllipidu A, s výhodou 3-de-O-acylovaného monofosforyllipidu A (3D-MPL) spolu s hlinitou solí. Jiné známé adjuvantní látky, které indukují především imunitní odpověď typu TH1, zahrnují oligonukleotidy s obsahem CpG. Tyto oligonukleotidy jsou charakterizovány tím, že dinukleotid CpG je nemetylovaný. Takové oligonukleotidy jsou dobře známé a jsou
35 popsány například ve WO 96/02555. Imunostimulační sekvence DNA jsou také popsány, například Satem se spoluautory v práci, zveřejněné ve Science 273, 352, 1996.

- Jinou upřednostňovanou adjuvantní látkou je saponin, s výhodou saponinový produkt QS21 (dostupný od firmy Aquilla Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), který může být použit
40 buď samotný, nebo v kombinaci s jinými adjuvantními látkami. Posílený systém například zahrnuje kombinaci monofosforyllipidu A a saponinového derivátu, jako kombinaci QS21 a 3D-MPL, popsanou ve WO 94/00153, nebo méně reagující prostředek, v němž je QS21 zhasen cholesterolem, jak je popsáno ve WO 96/33739. Jiné upřednostňované prostředky obsahují emulzi typu oleje ve vodě a tokoferol. Zvláště silný adjuvantní prostředek zahrnující QS21, 3D-MPL a tokoferol v emulzi typu oleje ve vodě, je popsán ve WO 05/17210.
45

Zvláště silný adjuvantní prostředek zahrnující QS21, 3D-MPL a tokoferol v emulzi typu ve vodě, je popsán ve WO 05/17210 a je upřednostňovaným prostředkem.

- 50 Podle jednoho ztělesnění předkládaného vynálezu je zde poskytnuta vakcína, obsahující povrchový antigen hepatitidy B podle tohoto vynálezu, která nadto obsahuje adjuvantní látku, indukující TH1. Upřednostňovaným ztělesněním je vakcína, v níž je adjuvantní látka, indukující TH1, zvolena ze skupiny adjuvantních látek, obsahující 3D-MPL, QS21, směs QS21 a cholesterolu a oligonukleotid CpG. Jiným upřednostňovaným ztělesněním je vakcína, obsahující povrchový anti-

gen hepatitidy B, jehož účinek je zesílen monofosforyllipidem A nebo derivátem, QS21 a tokoferolem v emulzi typu oleje ve vodě.

5 Vakcína s výhodou navíc obsahuje saponin a lépe saponinový produkt QS21. Jiný zvláště vhodný adjuvanční prostředek, obsahující CPG a saponin, je popsán ve WO 00/09159 a je upřednostňovaným prostředkem. Saponinem je v tomto konkrétním prostředku QS21. Prostředek s výhodou navíc obsahuje emulzi typu oleje ve vodě a tokoferol.

10 Předkládaný vynález dále poskytuje vakcinační prostředek, obsahující povrchový antigen hepatitidy B podle tohoto vynálezu v kombinaci s adjuvanční látkou a navíc obsahuje jeden nebo více antigenů, zvolených ze skupiny, sestávající ze záškrťového toxoidu (D), tetanového toxoidu (T), buněčných antigenů černého kašle (Pa), inaktivovaného viru dětské obrny (IPV), antigenu hemophilus influenzae (Hib), antigenu hepatitidy A, viru herpes simplex (HSV), antigenů chlamydií, streptokoka typu B (GSB), lidského papilomaviru (HPV), streptokoka pneumoniae a neisserií.
15 Ve vakcinačním prostředku podle předkládaného vynálezu mohou být rovněž kombinovány antigeny, poskytující ochranu vůči dalším chorobám.

20 V jednom konkrétním ztělesnění vakcinační prostředek zahrnuje povrchový antigen hepatitidy B, který lze získat způsobem výroby podle tohoto vynálezu, společně s adjuvanční látkou a inaktivovaným virem dětské obrny.

25 Předkládaný vynález také poskytuje způsob léčby a/nebo profylaxe infekcí viru hepatitidy B, který zahrnuje podávání bezpečného a účinného množství vakcíny podle tohoto vynálezu v profylaxi anebo léčbě infekce hepatitidy B lidskému nebo živočišnému subjektu, trpícímu infekcí virem hepatitidy B, nebo náchylného k takové infekci.

30 Tento vynález dále poskytuje použití povrchového antigenu podle předkládaného vynálezu k výrobě léku pro léčbu pacientů trpících infekcí způsobenou virem hepatitidy B, jako je chronická infekce virem hepatitidy B.

Vakcína podle předkládaného vynálezu bude obsahovat imunoprotektivní množství antigenu (množství, dostačující k vyvolání imunitní ochrany) a může být vyráběna běžnými postupy.

35 Vakcinační prostředek je obecně popsán v: Pharmaceutical Biotechnology, dílu 61, "Vaccine Design – the subunit and adjuvant approach", vydavatelů Powella a Newmana, Plenum Press, 1995. "New Trends and Development in Vaccines", vydavatelé Voller a spol., University Parke Press, Baltimore, Maryland, USA, 1978. Opouzdření (enkapsulace) do liposomů je popsána například Fullertonem v patentu US 4 235 877. Spojení (konjugace) bílkovin do makromolekul je uvedeno například Likhitem v patentu US 4 372 945 a Armorem se spoluautory v patentu
40 SU 4 474 757. Použití látky Quill A je popsáno Daisguardem s spoluautory v Acta Vet. Scand. 18, 349, 1977. 3D-MPL je dostupný od firmy Ribi Immunochem, USA a je popsán v britské patentové přihlášce 2220211 a v patentu US 4 912 094. QS21 je popsán v patentu US 5 057 540.

45 Předkládaný vynález je zřejmý, ne však omezen, následujícími příklady.

Přehled obrázků na výkresech

V následujících příkladech provedení vynálezu:

- 5 Obr. 1 znázorňuje výrobní postup pro vakcínu Engerix B™ bez thiomersalu.
- Obr. 2 znázorňuje analýzu šarží objemových antigenů prostřednictvím SDS–PAGE (elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného); barvení bylo provedeno stříbrem; 1 µg bílkoviny na vzorek;
- 10 polohy označovačů, markerů molekulové hmotnosti jsou vyznačeny černými skvrnami: 92 500, 66 200, 45 000, 31 000, 21 500, 14 400.
- Obr. 3 znázorňuje zbytkové kvasinkové bílkoviny v šaržích objemových antigenů, vyráběných postupem bez thiomersalu. Jedná se o metodu "Western blotting" s králičím sérem proti kvasinkovým bílkovinám.
- 15 Polohy označovačů, markerů molekulové hmotnosti jsou vyznačeny černými skvrnami: 92 500, 66 200, 45 000, 31 000, 21 500, 14 400.
- 20

Příklady provedení vynálezu25 **Příklad 1**

Způsob výroby povrchového antigenu hepatitidy B v přítomnosti thiomersalu

30 Povrchový antigen hepatitidy b (HBsAg) z monovalentní vakcíny vůči hepatitidě B, poskytovaný firmou SB Biologicals (Engerix B™) se exprimuje jako rekombinantní bílkovina v *Saccharomyces cerevisiae* (viz Harford se spoluautory, zde již uvedeno jako citace). Bílkovina o velikosti 24 000 se vyrábí nitrobuněčně a hromadí se v rekombinantních buňkách kvasinek. Na konci kvašení se buňky kvasinek shromáždí (sklidí) a rozruší se v přítomnosti jemné povrchově aktivní látky, jako je Tween 20 (monolaurát polyoxyethylensorbitanu), k uvolnění požadované bílkoviny.

35 Následně se buněčný homogenát, obsahující rozpustné částice povrchového antigenu, přečistí v sérii srážecích kroků a poté se zahustí ultrafiltrací.

40 Další čištění rekombinantního antigenu se provádí následnými chromatografickými separacemi. V prvním kroku se koncentrát surového antigenu podrobí gelové permeační chromatografii na sloupci "Sephacrose 4B medium". Thiomersal je přítomný v elučním pufru pro krok permeační chromatografie na 4B gelu. Eluční pufr má následující složení: 10 mmol.l⁻¹ Tris, 5% ethylen-glykol., pH 7,0; 50 mg/l thiomersalu. Thiomersal je do tohoto pufru začleněn pro kontrolu biologického zatížení.

45 Většina uvedeného množství thiomersalu je odstraněna v následujících krocích čištění, které zahrnují iontové výměnnou chromatografii, ultracentrifugaci a odsolení (gelovou permeační chromatografií), takže vyčištěné objemové antigenní prostředky, připravené působením, originálním způsobem výroby, obsahují přibližně 1,2 µg a méně než 2 µg thiomersalu na 20 µg bílkoviny.

50

Krok iontové výměnné chromatografie se provádí za použití DEAE–martyxu a spojené podíly (pool) se potom podrobí ultracentrifugaci na cesiovém gradientu za použití čtyř předem připravených vrstev o různých koncentracích chloridu cesia. Antigenní částice jsou v gradientu odděleny od znečišťujících buněčných částic v závislosti na své hustotě a na konci postupu odstředování

jsou eluovány. Chlorid cesia je z tohoto podílu následně odstraněn druhým krokem gelové permeační chromatografie za použití gelu Sepharose.

5 Pokud se HBsAg připravuje způsobem, obsahujícím thiomersal ve 4B gelovém permeačním pufru, jsou ve spojených podílech z CsCl gradientu, obsahujících HBsAg, nalezeny koncentrace bílkovin vyšší než 30 mg/ml, odpovídající příslušným koncentracím HBsAg, stanoveným za použití sady AUSZYME od Abbott Laboratories.

10 Krok ultracentrifugace v gradientu CsCl obvykle z prostředku HBsAg eliminuje zbytkové tuky, DNA a menší bílkovinná znečištění. Provádí se zonálním odstředováním v rotoru Ti 15 od firmy Beckman Instruments, Fullerton, Kalifornie při rychlosti 30 000 otáček za minutu po dobu přibližně 40 až 60 hodin. Vzorek, který má být vyčištěn, se nanese na vrstvy roztoku CsCl o konečných koncentracích 0,75; 1,5; 2,5 a 3,25 mol.l⁻¹ CsCl. Na konci odstředování je gradient eluován do podílů. Podíly, obsahující HBsAg, mohou být určeny absorbcí UV světla při 280 nm nebo
15 testováním nařazení podílů pomocí sady AUSZYME. Pruh HBsAg se nachází v hustotě 1,17 až 1,23 g/cm³.

Roztok, obsahující vyčištěný HBsAg, je před použitím k výrobě vakcinačního prostředku sterilně
20 filtrován.

Čištění z buněčného lyzátu kvasinek je komplexní děj, neboť antigen je vytvářen nitrobuněčně a k získání čistého objemového antigenu je nezbytná celá série separačních (oddělovacích) technik, sestavená k odstranění různých typů (kvasinkového) znečištění. Kroky čištění jsou důležité, neboť produkt, jež má být vyčištěn, je lipoproteinová částice, obsahující mnohočetné kopie polypeptidu povrchového antigenu a tato struktura musí být během procesu čištění zachována. Je zvláštností tohoto procesu, že poskytuje částice povrchového antigenu, které jsou plně imunogenní bez nutnosti dalšího chemického ovlivnění ke zvýšení jejich imunogenity (srovnej EPO 135 435).

30 Podrobnosti o způsobu výroby jsou dále popsány v EP 0199698.

Příklad 2

35 Výroba a charakterizace HBsAg získaného z kvasinek postupem bez thiomersalu.

1. Výroba a čištění HBsAg, získaného z kvasinek

1.1. Přehled výrobního způsobu

40 Povrchový antigen hepatitidy B může být vyráběn kvašením vhodného kmene *Saccharomyces cerevisiae*, například takového, jaký popsal Harford se spoluautory (citováno výše).

45 Na konci kvašení rekombinantního kmene kvasinek ve velkém měřítku se buňky sklídí (shromáždí se) a otevrou se rozštěpením v přítomnosti jemné povrchově aktivní látky, jako je Tween 20. Povrchový antigen je pak izolován vícekrokovým exktraktním a purifikačním postupem přesně tak, jak bylo popsáno výše, v Příkladu 1, až do kroku první gelové permeace na Sepharose 4B.

1.2 Postup čištění bez thiomersalu

50 Do postupu bez přítomnosti thomersalu byly oproti postupu, popsanému v Příkladu 1, začleněny následující dvě změny.

55 1. Eluční pufr, používaný v kroku permeační chromatografie v gelu 4B, již neobsahuje thiomersal.

2. Do eluovaných spojených podílů (poolu) z kroku aniontově výměnné chromatografie se přidá cystein (o konečné koncentraci 2 mmol.l^{-1}).

5 Bylo zjištěno, že výsledkem odstranění thiomersalu z pufru pro permeační chromatografii v gelu 4B může být vysrážení částic BHsAg. během kroku odstředování v hustotním gradientu CsCl s úbytkem produktu a agregací či shlukováním získaného antigenu.

10 Přidání cysteinu v konečné koncentraci 2 mmol.l^{-1} k eluovaným spojeným podílům z předchozího kroku aniontově výměnné chromatografie zabraňuje srážení a úbytku antigenu během odstředování v hustotním gradientu CsCl.

15 Pro takové ovlivnění je cystein upřednostňovanou látkou, neboť se jedná o přirozeně se vyskytující aminokyselinu, která může být odstraněna v následujícím kroku odsolení na sloupci pro gelovou permeační chromatografii za použití Sepharose 4BCLFF jako matrixu sloupce.

Ve srovnání s postupem, popsáním v Příkladu 1, už nedošlo k žádným jiným změnám výrobního postupu.

20 Postup, při němž se nepoužívá thiomersal, poskytuje objemový antigen, mající čistotu a vlastnosti srovnatelné s antigenem, získaným postupem podle Příkladu 1.

1.2a

25 Předpokládá se, že thiomersal, přidáný do pufru pro 4B gelovou chromatografii v koncentraci $50 \text{ } \mu\text{g/ml}$, se rozkládá a výsledná ethylrtuť se může kovalentně vázat na volné sulfhydrylové skupiny na cysteinových zbytcích bílkoviny. Bílkovina obsahuje 14 cysteinových zbytků, z nichž 7 se nachází mezi polohami 101 a 150.

30 Tato oblast bílkoviny se pokládá za ležící na povrchu částice a obsahující hlavní antigenní oblast HBsAg, zahrnující imunodominantní a oblast a rozpoznávací místo pro monoklonální protilátku RF1 (J. Waters se spoluautory, Postgrad, Med. 63(2), 51–56, 1987 a Ashton–Rickardt a Murray, J. Med. Virology 29, 196, 1989). Antigen, čištěný s thiomersalem, přítomným v pufru pro 4B gelovou permeační chromatografii, obsahuje na konci postupu čištění přibližně $0,5$ až $0,6 \text{ } \mu\text{g}$ rtuti. 35 Tato rtuť není jednoduchou dialýzou plně odstraněna.

V jednom pokusu bylo v objemovém antigenním prostředí naměřeno $0,56 \text{ } \mu\text{g}$ rtuti na $20 \text{ } \mu\text{g}$ bílkoviny. Tento prostředek byl dialyzován 16 hodin při teplotě místnosti proti pufru o pH 6,9. Obsahujícímu 150 mmol.l^{-1} roztok NaCl a 10 mmol.l^{-1} roztok NaPO_4 . Na konci dialýzy byla 40 naměřena koncentrace $0,33 \text{ } \mu\text{g}$ rtuti na $20 \text{ } \mu\text{g}$ bílkoviny.

Naproti tomu dialýza v přítomnosti redukčního činidla, jako je L-cystein v koncentraci od $0,1$ do $5,0 \text{ mg/ml}$, dithiothreitol v koncentraci 50 mmol.l^{-1} nebo 2-merkptoethanol v koncentraci $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$, po níž následuje další dialýza k odstranění redukčního činidla, poskytuje snížení 45 obsahu rtuti v antigenním prostředí na méně než $0,025 \text{ } \mu\text{g}$ rtuti na $20 \text{ } \mu\text{g}$ bílkoviny. To je nejnížší detekční hranice této metody.

Obsah rtuti byl stanoven za pomoci absorpční spektrofotometrie. Antigen byl naředěn v roztoku, obsahujícím $0,01 \%$ (hmotnost/objem) dichromanu draselného, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ a 5% (objem/objem) 50 kyseliny dusičné. S thiomersalem jako zdrojem rtuti byly připraveny standardní roztoky atomová absorpce vzorku a standardních roztoků se měří po odpaření v generátoru páry, s katodou specifickou pro rtuť, při vlnové délce $253,7 \text{ nm}$. Atomová absorpce zředěného roztoku se měří jako slepý pokus (blank). Obsah rtuti ve vzorku se počítá pomocí kalibrační křivky, získané z hodnot, naměřených ve standardních roztocích. Výsledky jsou vyjádřeny jako μg titru na μg bílkoviny.

55

1.3 Výroba objemového antigenu bez thiomersalu

Výrobní kroky, týkající se čištění objemu antigenu, jsou znázorněny na obr. 1.

5 1.4. Složení vakcíny, formulované bez thiomersalu

Typické kvantitativní složení vakcíny proti hepatitidě B bez konzervační látky a formulované z antigenu, připraveného postupem bez thiomersalu, je uvedeno v Tabulce 1.

10

Tabulka 1

složka	množství v ml
aktivní složka - bílkovina, tvořená z alespoň 95 % HBsAg	20 µg
hydroxid hlinitý (adsorbent), vyjádřený jako Al ₂ O ₃	0,95 mg
chlorid sodný	9,0 mg (max)
dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného	0,98 mg
dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného	0,71 mg
voda pro injekce dle potřeby do	1,0 ml

Složení se může měnit přidáním 3D-MPL a/nebo jiných adjuvantních látek.

15

2. Charakterizace objemového antigenu a vakcíny, vyráběné postupem bez thiomersalu

2.1 Testy a stanovením prováděné u vyčištěného objemového antigenu

20 2.1.1. Základní srovnání

Postupem bez thiomersalu podle tohoto Příkladu (Příklad 1.2) byly připraveny tři šarže objemového antigenu a byly označeny jako HEF001, HEF002 a HEF003. Ty byly srovnávány s šarží objemového antigenu (HEP2055), připravenou předchozím postupem (popsaným v Příkladu 1) v přítomnosti thiomersalu.

25

2.1.2 Testy a stanovení, prováděné u objemového antigenu

Testovány byly tři šarže objemového antigenu, vyrobené postupem bez thiomersalu a výsledky jsou uvedeny v Tabulce 2.

30

Obsah bílkoviny byl měřen postupem podle Lowryho a spoluautorů (J. Biol. Chem. 193, 265, 1951).

35 Obsah endotoxinu byl měřen Limulusovým postupem hrudkovatění gelu (Limulus gel clotting technique) za použití obchodně dostupné sady od firmy Cape Cod Associates, 704 Main St., Falmouth, MA 02540, USA. Reakční činidlo je standardizováno vzhledem ke standardu "US Pharm. Endotoxin Reference Standard".

Tween 20 (monolaurát polyoxyethylensorbitanu) byl měřen postupem podle Huddlestona a Allreda (J. Amer. Oil Chemist Soc. 42 983, 1965).

5 Obsah HBsAg byl měřen obchodně dostupnou sadou AUSZYME od firmy Abbott Laboratories, Dne Abbott Park Rad, Abbott Park, IL 60064, USA. Použit byl postup B, uváděný výrobcem. Ke stanovení křivky závislosti na dávce byla jako standard použita šarže objemového antigenu, čištěného postupem, využívajícím thiomersal.

10 Polysacharidy byly měřeny postupem podle Dubiose a spoluautorů (Anal. Chem. 28, 350, 1956).

Lipidy byly měřeny za použité obchodně dostupné sady (Merkotest Total Lipids 3321) od firmy E. Merck, B. P. 4199, Darmstad D-6100, Německo.

15 Obsah DNA byl měřen prahovou metodou (Treshold method) za použití zařízení a reagensů, dostupných od firmy Molecular Devices Corp., Gutenbergstrasse 10, Ismanning, Mnichov, Německo.

20 Hodnoty, získané v testech a stanoveních, jsou v rozmezí, které se uplatňuje pro šarže objemových antigenů, vyrobené za použití thiomersalu v elučním pufru pro krok gelové permeační chromatografie na Sepharose 4B, s výjimkou antigenní aktivity, měřené testem ELISA. Hodnoty naměřené v tomto testu pro tři prostředky HEF jsou vyšší (1,63–2,25) než hodnoty, zjištěné pro šarži objemového antigenu HEP2055, kde byl poměr ELISA/bílkovina 1,13. Poměry ELISA/bílkovina, měřené pomocí sady AUSZYME u šarží objemového antigenu obsahujících thiomersal, jsou obecně přibližně 1,0 a v rozmezí od 0,8 do 1,2; velmi zřídka pak překračují hodnotu 1,4.

25 2.1.3 SDS-PAGE analýza

30 Prostředky objemového antigenu byly zkoumány za použití analýzy SDS-PAGE v redukčních podmínkách a barvení prostřednictvím modři "Coodmassie blue". Veškeré vzorky vykazovaly hlavní proužek o velikosti 24 000 se stopami dimerní bílkoviny. Vzorky byly posouzeny jako mající vysokou čistotu (> 99 % čistotu), jak bylo prokázáno nepřítomností viditelných proužků znečišťujících bílkovin.

35 Vzorky (1 µg) prostředků objemového antigenu byly testovány prostřednictvím SDS-PAGE v redukujících a neredukujících podmínkách a za barvení stříbrem (Obr. 2). V redukujících podmínkách vzorky vykazovaly intenzivní proužek, pohybující se v oblasti hodnoty 24 000 se stopami dimerních a multimerních forem. Vzorky gelů byly nerozlišitelné od vzorku HEP2055, použitého ke srovnání. Vzorky byly podrobeny také zkoumání v neredukujících podmínkách. Za takových podmínek se méně materiálu pohybovalo s oblastí 24 000 a množství polypeptidu, pohybujícího se v dimerních a multimerních polohách, vzrostlo. Šarže objemového antigenu bez thiomersalu se zdají mít poněkud vyšší stupeň polymerizace, než srovnávací šarže HEP2055.

45 Identita polypeptidu 24 000, prokázaného barvivem Coomassie blue nebo stříbrným barvením, byla potvrzena metodou "Western blotting" s králičími polyklonálními protilátkami vůči plasmatickému HBsAg. Prostředky objemového antigenu vykazují hlavní proužek v oblasti 24 000 spolu s dimerními a trimerními formami. Technika prokázala menší stopy rozpadových produktů bílkoviny povrchového antigenu. Nebyly nalezeny žádné rozdíly mezi objemovým antigenem, připraveným postupem bez použití thiomersalu a šarží HEP2055.

50 Přítomnost zbytkových kvasinkových bílkovin byla stanovována analýzou prostřednictvím SDS-PAGE v redukujících podmínkách a metodou "Western blotting" s králičím polyklonálním anti-sérem vůči kvasinkovým bílkovinám (Obr. 3). Tato technika je kvalitativní a neumožňuje kvantifikaci nečistot.

Pro tři šarže objemového antigenu, připravené postupem bez použití thiomersalu, i pro šarži HEP2055 je prokázán stálý profil proužků jen s jednou výjimkou.

- 5 Silně zbarvený proužek, přítomný v oblasti $\pm 23\ 000$ u objemového antigenu HEP2055, je prakticky nepřítomný u tří prostředků HEF. Metoda "Western blotting" prokázala, že výsledkem čistícího postupu bez thiomersalu je čistší antigenní produkt.

10 Tabulka 2: Výsledky testů a stanovení provedených na vyčištěném, objemovém antigenu bez thiomersalu

TEST	V Ý S L E D E K			
	HEF001	HEF002	HEF003	HEP2055
pH	6,8	6,8	6,8	6,8
obsah bílkoviny dle Lowryho metody	1312 $\mu\text{g/ml}$	888 $\mu\text{g/ml}$	913 $\mu\text{g/ml}$	995 $\mu\text{g/ml}$
obsah endotoxinu	< 0,25 EU	< 0,25 EU	< 0,25 EU	< 0,25 EU
obsah Tween 20	7,1 μg	6,6 μg	7,4 μg	5,8 μg
antigenní aktivita (v testu ELISA)	2957 $\mu\text{g/ml}$	1505 $\mu\text{g/ml}$	1486 $\mu\text{g/ml}$	1128 $\mu\text{g/ml}$
poměr ELISA/bílkovina	2,25	1,69	1,63	1,13
obsah polysacharidů	0,33 μg	0,35 μg	0,33 μg	0,34 μg
obsah tuků	13,7 μg	12,8 μg	12,9 μg	11,8 μg
obsah DNA dle Tresholda	<1 pg	<1 pg	<1 pg	<1 pg

2.1.4. Další biochemické testy a stanovení

15 2.1.4.1. Obsah DNA

Obsah DNA byl u tří šarží objemového antigenu měřen prahovou metodou (Treshol method, Molecular Davices Corp.). Měřená množství byla menší než 10 pg DNA na 20 μg bílkoviny (Tabulka 2); Stejná hodnota obsahu DNA byla pozorována u objemového antigenu, vyráběného běžně schváleným způsobem.

20

2.1.4.2. Aminokyselinové složení

5 Aminokyselinové složení tří šarží objemových antigenů HEF bylo určováno po kyselé hydrolyze s 6 mol.l⁻¹ roztokem HCl, chromatografií aminokyselin na iontově výměnném sloupci s detekcí ninhydrinem po opuštění sloupce. Prolin a tryptofan nebyly stanovovány. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 3.

10 Nalezená složení souhlasí se složením, určených pro HEPT2055 a s předkládaným složením, odvozeným ze sekvence DNA. I když počet glycinových zbytků, naměřený pro HEP 2055, je blízký očekávanému složení, hodnota 16 až 17 je obvykleji naměřena pro objemné antigenní prostředky. Průměrný počet nalezených cysteinových zbytků se rovnal předkládaným čtrnácti, což ukazuje, že v důsledku ovlivnění při kroku na gradientu CsCl se na částici navažují žádné další cysteiny.

15 2.1.4.3.

20 Množství volného cysteinu, přítomného v objemových antigenních prostředcích, získaných podle zde popsaného způsobu, bylo měřeno po oxidaci částic kyselinou permravenčí bez předchozí kyselé hydrolyzy. Oxidované volné cysteinové zbytky byly odděleny na iontově výměnném sloupci s detekcí ninhydrinem po opuštění sloupce. Detekční mez cysteinu při použití tohoto postupu je 1 µg na 1 ml.

25 U tří antigenních prostředků HEF nebylo možné během jejich testování při počátečních koncentracích bílkovin, uvedených v Tabulce 2, naměřit žádný volný cystein.

Tento postup měří jak volné cysteinové zbytky, přítomné v pufru, tak i cysteinové zbytky, které jsou připojeny na bílkovinu HBsAg disulfidickou vazbou, ale nevytvářejí část polypeptidové sekvence.

30 2.1.4.4. Sekvenční analýza N-konce

35 Přítomnost možných bílkovinných znečištění a degradačních produktů ve třech šaržích objemového antigenu, vyráběných modifikovaným způsobem, byla určována sekvenční analýzou N-konce na základě Edmanova odbourávání. N-koncová sekvence MENITS... bílkoviny HBsAg byla detegována bez interference s ostatními sekvencemi. Bylo také potvrzeno, že N-koncový methionin je z 60 až 75 % blokován acetylací, jak již bylo pozorováno dříve u polypeptidu HBsAg, vyráběného rutinním postupem.

40

Tabulka 3: Aminokyselinová složení HBsAg.

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

2.1.4.5. Analýza rozptylem laserového světla

- 5 U částic HBsAg, vyrobených za použití modifikovaného způsobu a u referenční šarže HEP2055 bylo provedeno srovnání velikosti částic za použití rozptylu laserového světla (Tabulka 4).

Stanovené střední molekulové hmotnosti prokázaly dobrou shodu mezi prostředky.

Tabulka 4: Molekulové hmotnosti částic HBsAg, stanovené rozptylem laserového světla

šarže antigenu	molekulová hmotnost
HEF001	$3,07 \cdot 10^6$
HEF002	$2,76 \cdot 10^6$
HEF003	$2,76 \cdot 10^6$
HEP2055	$3,34 \cdot 10^6$

2.1.4.6 Elektronová mikroskopie

5 Prostředky objemového antigenu byly testovány za použití elektronové mikroskopie pro fixaci, znehynění, a barvení uranylacetátem.

10 Pozorované částice byly ve všech vzorcích podobné a odpovídaly ± 20 nm téměř kulovitým (ve formě kočičích hlav) částicím, které jsou typické pro HBsAg. Částice, pozorované ve třech šaržích HEF, byly nerozlišitelné do částic HEP2055.

2.1.5. Imunologické analýzy

2.1.5.1. Reaktivita (schopnost reakce) s monoklonální protilátkou RF1

15 Tři prostředky objemového antigenu byly testovány vzhledem ke své schopnosti reagovat s monoklonální protilátkou prostřednictvím inhibice stanovené ELISA. Bylo prokázáno, že monoklonální protilátka RF1 chrání šimpanze vůči napadení HBV a předpokládá se, že rozpoznává ochranný konformační epitop na částici HBsAg (S. Iwarson se spoluautory, J. Med. Virol. 16, 89–96, 1985).

Hybridom (produkt fúze lymfocytů) RF1 může být množen v břišní dutině myši kmene Balb/c, nebo ve tkáňové kultuře.

25 Ascitická tekutina, naředěná v poměru 1:50 000 v saturačním pufru (fosfátem pufrovaný fyziologický roztok, PBS, s obsahem 1% hovězího sérového albuminu, BSA a 0,1% Tween 20), byla smíchána v poměru 11: s různými naředěními testovaných vzorků HBsAg v PBS (konečné koncentrace se pohybovaly v rozmezí od 100 μ g do 0,05 μ g/ml).

30 Směsi byly inkubovány v destičkách Nunc Immunoplates (o 96 jamkách) po dobu 1 hodiny a při teplotě 37 °C. Poté byly převedeny do destiček, potažených standardním prostředkem HBsAg, na 1 hodinu při 37 °C. Standardním prostředkem HBsAg byla šarže objemového antigenu (Hep 286), vyčištěná způsobem, využívajícím thiomersal. Po kroku promytí prostřednictvím PBS s obsahem 0,1 % Tween 20 byl přidán biotinem konjugovaný ovčí anti-myší IgG, naředěný v poměru 1:1 000 v saturačním pufru a inkubován 1 hodinu při teplotě 37 °C.

40 Po kroku promytí byl do stejných jamek přidán streptavidin–biotinylovaný peroxidázový komplex, naředěný v poměru 1:1 000 v saturačním pufru a inkubován 30 minut při 37 °C. Destičky byly promyty a inkubovány s roztokem 0,04 % OPDA a 0,03 % H₂O₂ v 0,1 mol.l⁻¹ citrátovém pufru o pH 4,5 po dobu 20 minut při teplotě místnosti. Reakce byla stanovena přidavkem 1 mol.l⁻¹ H₂SO₄. Poté byly při vlnových délkách 490/630 nm měřeny optické hustoty O.D. a vyneseny do grafu.

Hodnota IC₅₀, definovaná jako koncentrace antigenu (koncentrace inhibitoru), která inhibuje z 50 % vazbu protilátky na povlečený HBsAg, byla vypočítána za použití rovnice o 4 proměnných a byla vyjádřena v ng/ml.

- 5 Testovány byly rovněž série šarží HEP antigenu včetně HEP2055, spolu s antigenem Herpes simplex gD jako negativní kontrolou. Stanovení určuje schopnost každého testovaného antigenu inhibovat vazbu RF1 ke standardnímu antigennímu přípravku (HEP286), navázanému na mikrotitrační destičku.
- 10 Tabulka 5 udává koncentrace každého antigenu, u nichž bylo prokázáno, že z 50 % inhibují vazbu RF1 na znehybněný antigen.

Tabulka 5: Inhibice vazby monoklonální protilátky RF1 na HBsAg

objemový antigen	IC ₅₀ (ng/ml)*
HEP286	3834
HEP673	3437
HEP720	3150
HEP2055	2384
HEF001	468
HEF002	574
HEF003	540

15 *IC₅₀ = koncentrace antigenu (ng/ml), inhibující z 50 % vazbu RF na znehybněný antigen

Výsledky ukazují, že k inhibování vazby RF1 je potřeba čtyřnásobně až sedminásobně menší množství antigenu HEF (viz Tabulka 5). To ukazuje, že antigen, připravený modifikovaným, pozměněným způsobem, vykazuje ve srovnání s objemovým antigenem HEP zvýšenou presentaci epitopu RF1.

20 Stejný typ inhibičního stanovení byl proveden za použití lidského séra lidí, očkovaných místo fragmentem mAb RF1 prostředkem Engerix BTM, a v takovém případě nebyly zjištěny rozdíly mezi šaržemi angenu HEP a antigenu HEF.

2.1.5.2. Afinita k vazbě monoklonální RF1

30 Kinetické parametry vazba monoklonální protilátky RF1 ke třem šaržím antigenu HEF a k HEP2055 byly měřeny povrchovou plasmovou rezonancí za použití zařízení Biacore 2000 od firmy Amersham Pharmacia Biotech, Amershyrn Place, Little Chalfont, Bucks, Velká Británie. měřenými kinetickými parametry byly:

ka: asociační konstanta ($m^{-1}s^{-1}$)

35 kd: disociační konstanta (s^{-1})

Ka: rovnovážná nebo afinitní konstanta (m^{-1})

$$\text{přičemž } K_a = \frac{k_a}{k_d}$$

5 Nalezené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Afinitní konstanty vazby RF1 k HBsAg

objemový antigen	k_a ($\times 10^{-3}$)	k_d ($\times 10^5$)	K_a ($\times 10^{-7}$)
HEF001	6,81	3,21	21,97
HEF002	6,89	3,73	18,83
HEF003	7,39	4,67	15,80
HEP2055	3,31	6,30	5,31

10 Tři šarže antigenu HEF poskytují podobné asociační/disociační konstanty a hodnoty vazebné afinity. Na rozdíl od nich má HEP2055 slabší afinitu pro vazbu k RF1.

15 Zjištěné skutečnosti jsou v souladu s výsledky z inhibičního stanovení ELISA, které prokázalo, že antigen, připravený způsobem bez použití thiomersalu, vykazuje zvýšenou prezentaci epito-
pu RF1.

2.2. Test a stanovení za použití vakcíny, formulované s antigenem, vyrobeným pozměněným způsobem

20 Tři šarže antigenu HEF byly adsorbovány na hydroxid hlinitý a formulovány jako vakcína o složení, uvedeném v Tabulce 1. Balením je dávka pro dospělé v lahvičkách (20 μg antigenní bílkoviny v 1 ml). Šarže byly označeny jako DENS001A4, DENS002A4 a DENS003A4.

25 Síla (účinnost) vakcíny byla měřena stanovením obsahu antigenu *in vitro* za použití sady od Abbott Laboratories "AUSZYME ELISA kit" a klasické šarže vakcíny, formulované s 50 μg thiomersalu v 1 ml, jako standardu. Účinnost vakcíny byla měřena za použití metody B, popsané v PharmaEuropa Special Issue Bio97-2 (prosinec 1997). Tři šarže HEF poskytly vyšší hodnoty obsahu antigenu, které byly ve srovnání s určeným obsahem 20 μg antigenní bílkoviny téměř dvojnásobné.

30 2.2.1 Reaktivita vakcíny DENS s monoklonální protilátkou RF1

35 Antigennost adsorbované vakcíny byly dále testována v inhibičním stanovení s monoklonální protilátkou RF1. Stanovení měří schopnost vzorku vakcíny inhibovat vazbu RF1 na znehynbný objemový antigen (HEP286).

40 Ascitická tekutina, naředěná v poměru 1 : 50 000 v saturačním pufru (PBS, obsahující 1% BSA a 0,1% Tween 20), byla v pomru 1 : 1 smíchána s různými zředěnými vzorků vakcín, které měly být testovány, v PBS (koncentrace se pohybovaly od 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Směsi byly za protřepávání inkubovány v destičkách Nunc Immunoplates (o 96 jamkách) po dobu 2 hodin a při teplotě 37 °C. Poté byly převedeny do destiček, potažených prostředkem HBsAg. Prostředkem HBsAg, použitým pro potažení, byla šarže objemového antigenu (Hep

286), vyčištěná způsobem, využívajícím thiomersal. tyto destičky pak byly za protřepávání inkubovány 2 hodiny při 37 °C. Po kroku promytí prostřednictvím PBS s obsahem 0,1 % Tween 20 byl přidán biotinem konjugovaný ovčí anti-myší IgG, naředěný v poměru 1:1 000 v saturačním pufru a inkubován 1 hodinu při teplotě 37 °C. Po kroku promytí byl do stejných jamek přidán streptavidin-biotinylovaný peroxidázový komplex, naředěný v poměru 1:1 000 v saturačním pufru a inkubován 30 minut při 37 °C. Destičky byly promyty a inkubovány s roztokem 0,04 % OPDA a 0,03 % H₂O₂ v 0,1 mol.l⁻¹ citrátovém pufru o pH 4,5 po dobu 20 minut při teplotě místnosti. Reakce byla zastavena přidávkem 1 mol.l⁻¹ H₂SO₄. Poté byly při vlnových délkách 490/630 nm měřeny optické hustoty O.D. a vyneseny do grafu.

Hodnota ID₅₀, definovaná jako koncentrace antigenu (koncentrace inhibitoru), která inhibuje z 20 % vazbu protilátky na povlečený HBsAg, byla vypočítána za použití rovnice o 4 proměnných a byla vyjádřena v ng/ml.

Vakcína, vyrobená z objemového antigenu, získaného pozměněným způsobem, byla srovnána s vakcínou Engerix BTM, formulovanou za použití klasického objemového antigenu HEP a bez thiomersalu jako konzervačního činidla.

Stanovení bylo prováděno trojmo.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7 a ukazují, že k dosažení 50% inhibice vazby RFI je ve srovnání s vakcínou Engerix BTM bez konzervační látky vyžadována přibližně polovina množství vakcíny DENS. To odráží zvýšenou prezentaci epitopu RFI na antigenu HEF/DENS a je v souladu s testy, prováděnými s protilátkou RFI na vyčištěném objemovém antigenu.

Tabulka 7: Inhibice vazby RFI formulovanou vakcínou

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

(1) koncentrace vakcíny, inhibující z 50 % vazby protilátky R1 na znehybněný antigen

2.2.2. Imunogennost vakcíny DENS u myší

Studie byla provedena na myších kmene Balb/C pro srovnání imunogennosti tří šarží DENS a prostředku Engerix BTM, vyráběného podle běžného způsobu výroby antigenu a formulovaného s thiomersalem.

Testovány byly následující šarže:

DENS001A4

DENS002A4

5 DENS003A4

a ENG2953A4/Q pro srovnání.

10 Stručně uvedeno, skupiny 12 myší byly dvakrát v intervalu 2 týdnů intramuskulárně imunizovány dávkami vakcíny, které odpovídaly 1/10 (2 µg) nebo 1/50 (0,4 µg) dávky pro dospělého člověka. Ze séra, odebraného v den 28, byly určeny protilátková odpověď vůči HBsAg a isotypový profil, indukovaný očkováním.

Uspořádání pokusu

15 Skupiny 12 myší kmene Balb/C byly v den 0 a v den 15 intramuskulárně imunizovány do obou zadních tlapek (2 x 50 µg) následujícími dávkami vakcíny:

Tabulka 8: Skupiny a dávka vakcíny

skupina	vakcína	objem	dávka antigenu
1	DENS001A4	100 µl	2 µg
2	- zředěná 5x v PO ₄ /NaCl	100 µl	0,4 µg
3	DENS002A4	100 µl	2 µg
4	- zředěná 5x v PO ₄ /NaCl	100 µl	0,4 µg
5	DENS003A4	100 µl	2 µg
6	- zředěná 5x v PO ₄ /NaCl	100 µl	0,4 µg
7	ENG2953A4/Q	100 µl	2 µg
8	- zředěná 5x v PO ₄ /NaCl	100 µl	0,4 µg

V den 15 (2 týdny po imunizaci I) a v den 28 (2 týdny po imunizaci I) a v den 28 (2 týdny po imunizaci II) byla odebrána krev z retroorbitální dutiny.

25 Pro uspořádání tohoto pokusu (4 prostředky x 2 dávky a 12 myší na skupinu) byla kapacita *a priori* odhadnuta statistickým programem PASS. Statistický program PASS (Power and Sample Size, Účinnost a velikost vzorku) byl získán z NCSS, 329 North 1000 East, Kaysville, Utah 84037. Pro dvoucestnou variační analýzu by měl být 2,5 násobný rozdíl v titru protilátek, GMT, mezi prostředky s chybou alfa ve výši 5 % detegován s účinností vyšší než 90 %.

30

Výsledky

Serologie

5 Humorální odpovědi (celkové Ig a isotypy) byly měřeny stanovením ELISA za použití HBsAg (Hep286) jako povlékacího antigenu a biotinem konjugovaných anti-myších protilátek k prokázání vazby anti-HBs protilátky. A analyzována byla pouze séra po imunizaci II (post II).

10 Tabulka 9 znázorňuje průměr a GMT protilátkové odpovědi anti-HBs Ig, měřených v jednotlivých sérech 2 týdny po imunizaci II.

15 Prostředkem DENS a klasickými prostředky vůči hepatitidě B jsou indukovány srovnatelné protilátkové odpovědi, a to: GMT mezi 2304 a 3976 EU/ml pro šarže DENS ve srovnání s 2882 EU/ml pro monovalentní vakcínu vůči hepatitidě B od SB Biologicals (Engerix BTM) v dávce 2 µg a GMT mezi 696 a 182 EU/ml pro šarže DENS ve srovnání s 627 EU/ml pro monovalentní vakcínu vůči hepatitidě B od SB Biological (Engerix BTM) v dávce 0,4 µg.

- Podle předpokladu je jasný účinek antigenní dávky zjištěn u všech prostředků v dávkách 2 µg a 0,4 µg s tří- až šestinásobným rozdílem v hodnotách GMT.
- Pozorovány byly čtyři odpovědi neposkytující myši (s titry menšími než 50 EU/ml) bez přímé vazby na dávky antigenů nebo šarže použité k injikaci (ve skupinách 1, 2, 3 a 8 jedna myš na skupinu). Na základě statistické analýzy (Grubbsův test) byly tyto myši z další analýzy vyloučeny.

25

Tabulka 9: Protilátková odpověď u myši v den 28 (2 týdny po imunizaci II)

skupina	vakcína	dávka	počet	titry ELISA (Ig)	
				průměr	GMT
1	DENS001A4	2 µg	11	3466	2971
2		0,2 µg	11	1283	1182
3	DENS001A4	2 µg	11	2436	2304
4		0,2 µg	12	984	786
5	DENS001A4	2 µg	12	4583	3976
6		0,2 µg	12	997	696
7	ENG2953A4/Q	2 µg	12	3999	2882
		0,2 µg	11	737	627

Statistická analýza

30

Dvojsměrní variační analýza byla provedena u titrů anti-HBs po logaritmické transformaci údajů po druhé imunizaci, za použití vakcín (4 šarže) a dávek antigenu (2 µg a 0,4 µg) jako faktorů. Tato analýza potvrdila, že statisticky významný rozdíl bylo možné pozorovat mezi oběma dávkami antigenu (hodnota $p < 0,001$) a žádný významný rozdíl se neobjevil mezi jednotlivými šaržemi (hodnota $p = 0,2674$). Jak bylo uvedeno výše, účinnost (síla) byla odhadnuta *a priori* a uspořádá-

35

ní pokusu bylo takové, že mezi prostředky s účinností vyšší než 90 % lze detegovat 2,5 násobný rozdíl v GMT s 0,5% chybou alfa.

Isotypový profil

5

Tabulka 10 znázorňuje isotypové rozdělení (IgG1, IgG2a a IgG2b), vypočtené z analýzy spojených vzorků séra po imunizaci II.

10

- Podle očekávání je jasná odpověď TH2 indukována vakcínami na bázi hydroxidu hlinitého, neboť byly pozorovány zejména protilátky IgG1.
- Žádný rozdíl, týkající se isotypového profilu, nebyl pozorován mezi šaržemi DENS nebo monovalentní vakcínou proti hepatitidě B od SB Biologicals.

15

Tabulka 10: Rozdělení isotypů IgG ve spojených sérech, odebraných v den 28

skupina	vakcína	dávka	isotyp (%)		
			IgG1	IgG2a	IgG2b
1	DENS001A4	2µg	91	4	5
2		0,2 µg	87	8	5
3	DENS001A4	2µg	97	2	1
4		0,2 µg	87	6	7
5	DENS001A4	2µg	98	1	1
6		0,2 µg	93	4	3
7	ENG2953A4/Q	2µg	88	8	4
		0,2 µg	88	9	3

Příklad 3

20

Prostředky kombinovaných vakcín

Objemový antigen podle tohoto vynálezu se zvláště hodí pro formulování do kombinované vakcíny, obsahující IPV (inaktivovaný virus dětské obmy).

25

Studie zabývající se stálostí, prováděné na výchozích šaržích kombinované vakcíny vůči DTPa-HBV-IPV prokázaly pokles účinnosti IPV složky, zvláště antigenu poliomyelitidy typu 1, za použití imunitního stanovení *in vitro* (určený obsahu D-antigenu pomocí ELISA) a testu *in vivo* účinnosti u krys. Žádný úbytek účinnosti nebyl pozorován u typu 3. U typu 2 byl úbytek účinnosti v očekávaném rozmezí (ne více než 10% úbytek za rok skladování).

30

Byly zahájeny studie, mající určit příčiny této ztráty účinnosti, pozorované u kombinované vakcíny vůči DTPa-HBV-IPV. Ze zjištění, že stálost IPV ve vakcíně DTPa-IPV od firmy SB Biological je vyhovující (úbytek obsahu antigenu nepřevyšuje 10 % za rok skladování) bylo vyvoze-

no, že za nestálost IPV ve vakcíně vůči DTPa–HBV–IPV pravděpodobně zodpovídá složka HBV.

5 Složka HBV, použitou v původním vakcinačním prostředku vůči DTpa–HBV–IPV, je čištěná rDNA, tedy z kvasinek získaný HBsAg, používaný také pro výrobu monovalentní vakcíny proti hepatitidě B firmou SB Biologicals a připravený tak, jak je popsáno v Příkladu 1.

10 V prvním pokusu zjistit, který prvek složky BHV byl škodlivý vůči IPV, byl HBsAg analyzován vzhledem k přítomnosti thiomersalu. Již dříve bylo zjištěno (Davisson se spoluautory, J. Lab. Clin. Med. 47 8–19, 1956), že thiomersal, používaný jako konzervační látka ve vakcínách vůči DTP, "byl na újmu viru poliomyelitidy" v kombinaci DTPIPV. Toto pozorování bylo uváženo výrobci vakcín, kteří při vytváření svých vakcín s obsahem IPV nahradili thiomersal jinými konzervačními látkami. V nedávné době byl znovu zkoumán vliv thiomersalu na účinnost IPV za podmínek dlouhodobého skladování při teplotě +4 °C. Po 4 až 6 měsících skladování byl popsán
15 úbytek účinnosti polyovirového antigenu typu 1 až k nedetegovaným hodnotám (L.A. Sawyer se spoluautory, Vaccine 12, 851–856, 1994).

20 Za použití adsorpční atomové spektroskopie bylo v antigenu, čištěném podle Příkladu, nalezeno přibližně 0,5 µg rtuti (Hg) na 20 µg HBsAg.

Toto množství rtuti (v podobě thiomersalu a chloridu ethylrtuti, degradačního produktu thiomersalu), může redukovat odpověď ELISA vůči obsahu D–antigenu typu 1 v objemovém koncentrátu IPV, inkubovaném 7 dní při teplotě 37 °C, až na nedetegovatelnou úroveň.

25 Pro uvolnění rtuti, přítomné v objemu HBsAg, byla vyvinuta metoda. Předpokládalo se, že rtuť může být vázána na thiolové skupiny částice HBsAg a může tedy být uvolněna v přítomnosti redukčních činidel. Po pokusech, prováděných i s jinými redukčními činidly, byl jako činidlo pro uvolňování rtuti z částice HBsAg vybrán L–cystein. Po dialýze objemu HBsAg proti solnému roztoku s obsahem 5,7 mmol.l⁻¹ cysteinu nebyla v zadrženém podílu detegována žádná rtuť
30 (detekční limit testovací metody je 25 ng Hg/20 µg HBsAg). Dialyzovaný antigen byl smíchan s objemovým koncentrátem IPV a stálost viru typu 1 byla hodnocena měřením obsahu D–antigenu po inkubaci v trvání 7 dnů při teplotě 37 °C. Jako kontroly byly použity objemový koncentrát IPV, nesmíšený s HBsAg a objemový koncentrát IPV, smíšený s HBsAg, neovlivněným cysteinem. Srovnávací titer ELISA byl získán u vzorků, skladovaných 7 dní při teplotě +2 °C až +8 °C.
35 Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 11.

Tabulka 11

vzorek	obsah D-antigenu (typu 1) ⁽¹⁾		úbytek
	7 dní/4 °C	7 dní/37 °C	
IPV (nesmíchaný)	31,6	24,2	23 %
IPV + HBsAg (neupravený)	31,1	18,1	42 %
IPV + HBsAg upravený cysteinem	31,4	27,6	12 %
IPV + thiomersal (1µg/ml)	30,5	11,0	74 %

40 (1) vyjádřeno v jednotkách D–antigenu (DU)

Údaje, získané za použití těchto laboratorních prostředků, jasně ukazují, že stálost polioviru typu 1 je významně zlepšena, pokud je HBsAg ovlivněn cysteinem k odstranění zbytkové rtuti ještě před smícháním s IPV.

5 Výše uvedené údaje také ukazují úbytek obsahu D-antigenu v rozsahu 23 % po sedmidenní inkubaci při 37 °C u srovnávacího prostředku IPV. To potvrzuje přirozenou nestálost Mahoneyho polioviru typu 1, která byla popsána dříve L. A. Sawyerem a spoluautory ve *Vaccine* 12, 851–856, 1994.

10 Ačkoli komerční šarže vakcín vůči DTpa–HBV–IPV a DTPa–HBV–IPV/Hib byly již vyrobeny za použití dialyzačního postupu s 5,7 mmol.l⁻¹ cysteinem k odstranění zbytkové rtuti a k ochraně stálosti IPV, pro výrobu ve velkém měřítku není dialyzační postup vhodný a k přípravě HBsAg bez přítomnosti thiomersalu nebo bez přítomnosti rtuti zahrnuje série doplňkových kroků. Naproti tomu HBsAg podle tohoto vynálezu, připravený bez thiomersalu, lze přímo použít v prostředcích kombinovaných vakcín a zvláště těch s obsahem IPV.

4. Souhrn

20 Dříve používaný postup pro vyčištění kvasinkového povrchového antigenu obsahuje krok gelové permeace (zachycení v gelu), při němž je v elučním pufru zahrnuta protimikrobiální sloučenina thiomersal s obsahem rtuti, ke kontrole biologického zatížení.

Thiomersal se během následujících kroků postupu úplně neodstraní, takže ve vyčištěném objemovém antigenu je nadále přítomno přibližně 1,2 µg thiomersalu na 20 µg bílkoviny.

25 Pro výrobu objemového antigenu zcela bez obsahu thiomersalu (rtuti) byl způsob jeho čištění ve dvou krocích pozměněn.

- Thiomersal je z elučního pufru v permeačním kroku na 4B gelu vypuštěn.
- K eluátu, shromážděnému z kroku aniontové výměnné chromatografie, se přidá cystein (v konečné koncentraci 2 mmol.l⁻¹). To zabraňuje srážení antigenu během odstředování v hustotním gradientu CsCl.

35 Ve výrobním způsobu nejsou učiněny žádné další změny.

Objemový antigen, vyrobený modifikovaným způsobem, byl již charakterizován. Fyzikálně chemické testy a stanovení ukazují, že antigen bez přítomnosti thiomersalu je nerozlišitelný, pokud se týká jeho vlastností, od antigenu, vyrobeného dříve používaným způsobem výroby. Antigenní částice mají stejné složky.

45 Identita a celistvost (integrita) polypeptidu HBsAg je pozměněním způsobu výroby neovlivněna, což bylo prokázáno analýzou pomocí SDS–PAGE, postupem "Western blotting" za použití polyklonálních protilátek vůči HBsAg, analýzou N–koncev sekvence a složení aminokyselin. Elektronová mikroskopie a rozptylová analýza laserového světla prokázaly, že částice mají svou typickou formu a velikost, očekávanou u HBsAg z kvasinek. Analýza postupem "Western blotting" s protikvasinkovým bílkovinným sérem prokázala, že antigen, vyrobený způsobem bez přítomnosti thiomersalu, má podobný vzorek znečišťujících kvasinkových bílkovin. Ovšem množství znečišťujícího proužku, pohybujícího se v oblasti 23 000, je ve třech šaržích HBsAg, vyrobených pozměněným způsobem výroby, silně omezeno.

55 Imunologické analýzy ukazují, že částice bez thiomersalu vykazují zvýšenou antigennost. Tyto částice jsou reaktivnější při použití sady AUSZYME (obsahující směs monoklonálních protilátek), přičemž poskytují poměry bílkoviny/ELISA od 1,6 do 2,25. Tato zvýšená antigennost se rovněž projevuje s chránicí monoklonální protilátkou RF1. Pro inhibici vazby RF1 ke standard-

nímu znehyněnému antigenu je potřeba přibližně čtyřikrát až sedmkrát méně antigenu bez thiomersalu. Křivky inhibice vazby pomocí antigenu bez thiomersalu a klasického antigenu patří do dvou odlišných podskupin. Tento rozdíl je rovněž prokázán měřením vazebné afinitní konstanty pro RF1 za použití povrchové plazmové rezonance. Vazebné afinity prostředků bez thiomersalu jsou trojnásobně až čtyřnásobně vyšší než u šarže klasického objemového antigenu.

Prostředky objemového antigenu byly formulovány jako vakcíny adsorpci na hydroxid hlinitý a bez konzervační látky.

Testování účinnosti *in vitro* za použití sady AUSZYME ELISA od firmy Abbt a monovalentní vakcíny vůči hepatitidě b s obsahem thiomersalu od firmy SB Biologicals jako standardu prokázalo získání vysokých hodnot účinnosti *in vitro*. Obsah antigenu, měřený tímto testem, byl téměř dvojnásobkem uvedené hodnoty 20 μg bílkoviny na ml.

Zvýšená reaktivita vakcíny, připravené z antigenu neobsahujícího thiomersal, byla pozorována také v inhibičním stanovení s monoklonální protilátkou RF1 pro vazbu na znehyněný antigen. k 50% inhibici vazby RF1 na znehyněný antigen bylo potřeba přibližně polovičního množství vakcíny bez thiomersalu ve srovnání s antigenem, vyčištěným dříve používaným způsobem a formulovaným bez konzervační látky.

Tato zvýšená antigenost vakcíny neobsahující thiomersal, vztahující se k RF1, je v souladu s výsledky testu účinnosti *in vitro* (obsahu antigenu) a testů protilátky RF1, prováděných na prostředcích objemového antigenu.

Test imunogenity u myší byl prováděn za použití základního očkování (priming) a zesilovacího očkování (booster) o dva týdny později v dávkách 2,0 a 0,4 μg antigenu. Myším byla odebrána krev v den 28, 14 dní po zesilovacím očkování. Séra byla analyzována vzhledem k titru protilátek a isotypovému složení. U obou podávaných látek byla pozorována jasná nezávislost účinku na dávce antigenu, ale nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v odpovědi pokud se týká titru protilátek (GMT) u vakcín bez obsahu thiomersalu a u vakcín bez konzervační látky.

Žádné podstatné rozdíly nebyly pozorovány v isotypových profilech.

35

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob výroby vakcíny proti hepatitidě B, která obsahuje vyčištěný povrchový antigen hepatitidy B, který obsahuje méně než 0,025 μg rtuti na 20 μg bílkoviny a při jehož čištění nebyl použit thiomersal, a farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se antigen čistí tak, že se surový přípravek antigenu hepatitidy B

(a) podrobí gelové permeační chromatografii,

(b) podrobí iontově výměnné chromatografii a

(c) smísí se s redukčním činidlem, majícím volnou skupinu $-\text{SH}$, v jehož přítomnosti se dále čistí, a

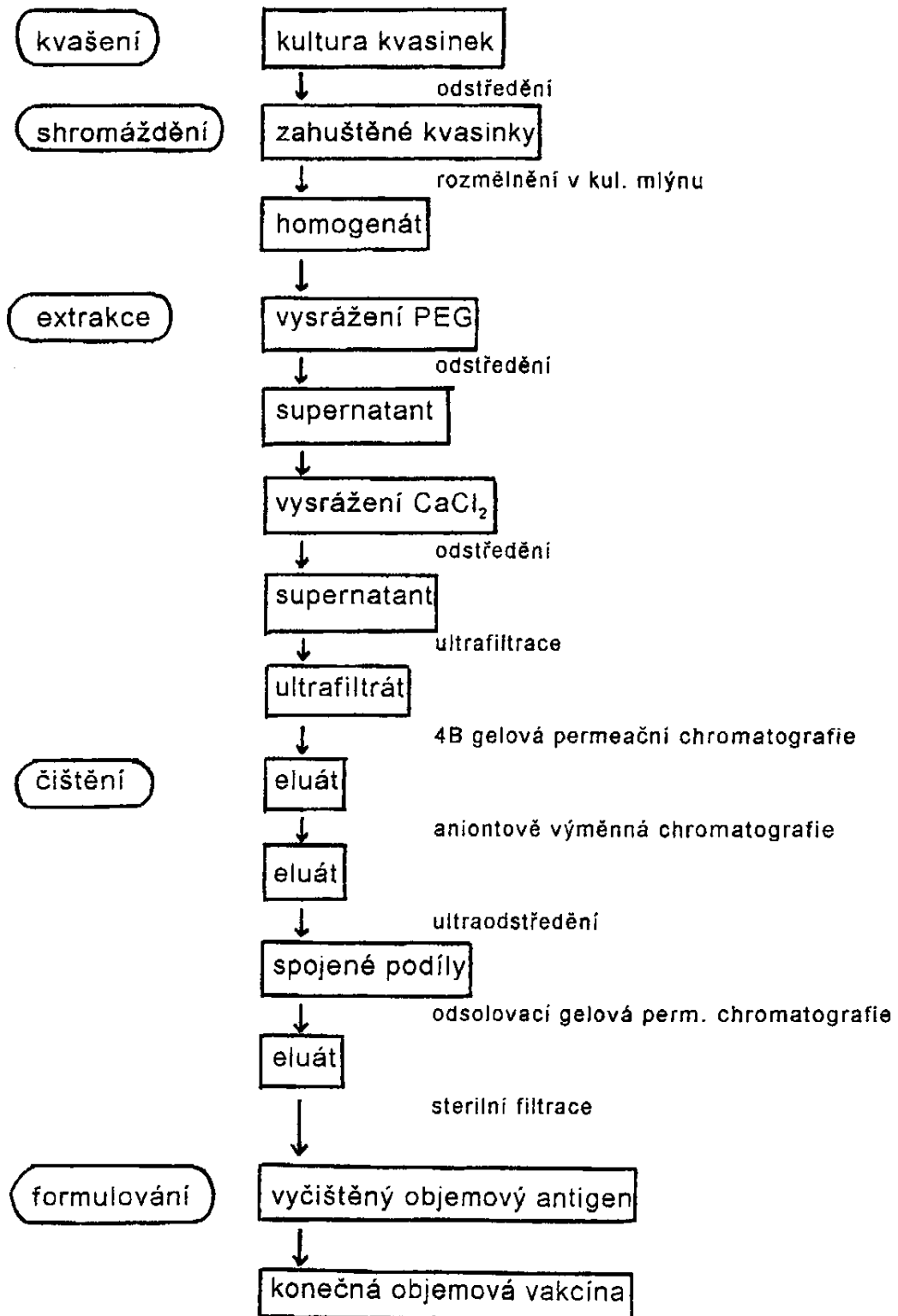
antigen se po vyčištění formuluje s farmaceuticky přijatelnou pomocnou látkou do vakcíny, přičemž vakcína je prostá thiomersalu.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se antigen hepatitidy adsorbuje na hydroxid hlinitý.
3. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že se jako redukční činidlo použije cystein, glutathion, dithiothreitol nebo β -merkapt ethanol.
4. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že se jako redukční činidlo použije cystein.
5. Způsob podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že se cystein přidává do konečné koncentrace 1 až 10mM.
6. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že cystein přidává do konečné koncentrace 2mM.
7. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že se přidá adjuvantní látka pro vytvoření vakcíny.
8. Způsob podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že adjuvantní látkou je hlinitá sůl.
9. Způsob podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že hlinitou sloučeninou je hydroxid hlinitý.
10. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 7 až 9, **vyznačující se tím**, že adjuvantní látkou, je látka indukující TH-1.
11. Způsob podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že se adjuvantní látka, indukující TH-1 volí ze skupiny zahrnující 3-de-O-acylovaný monofosforyllipid A, saponin QS21, 3-de-O-acylovaný monofosforyllipid A a QS21 a oligonukleotid CpG.
12. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 7 až 11, **vyznačující se tím**, že pro výrobu vakcíny se kromě povrchového antigenu hepatitidy B použije jeden nebo větší počet antigenů ze skupiny, zahrnující záškrťový toxoid (D), tetanový toxoid (T), nebuněčné antigeny černého kašle (Pa), inaktivovaný poliovirus (IPV), antigen Haemophilus influenzae (Hib), antigen hepatitidy A, viru herpes simplex (HSV), antigeny chlamydií, HPV, Streptococcus pneumoniae a Neisseria.

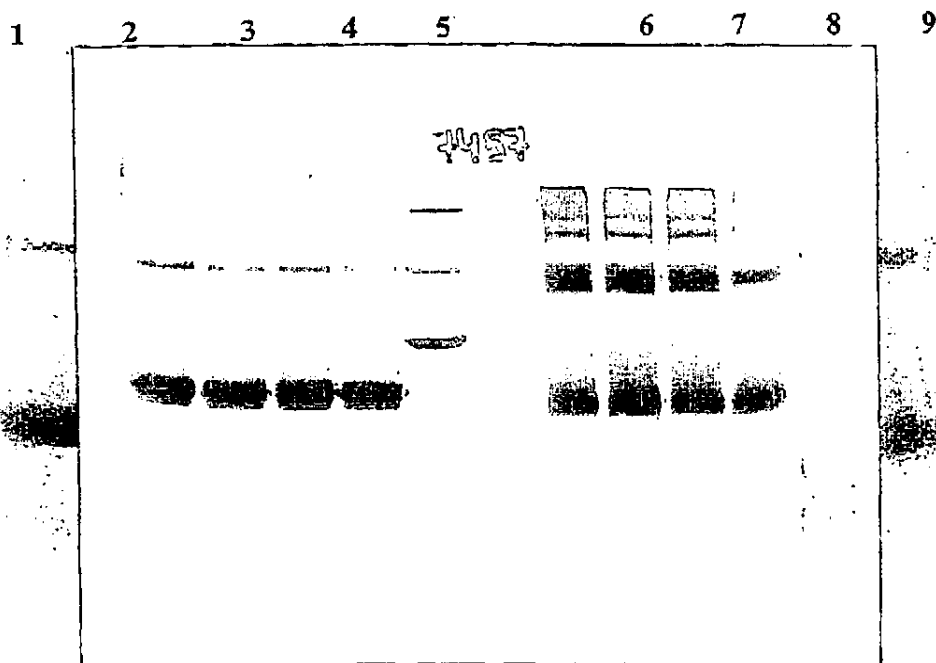
40

3 výkresy

Obr. 1



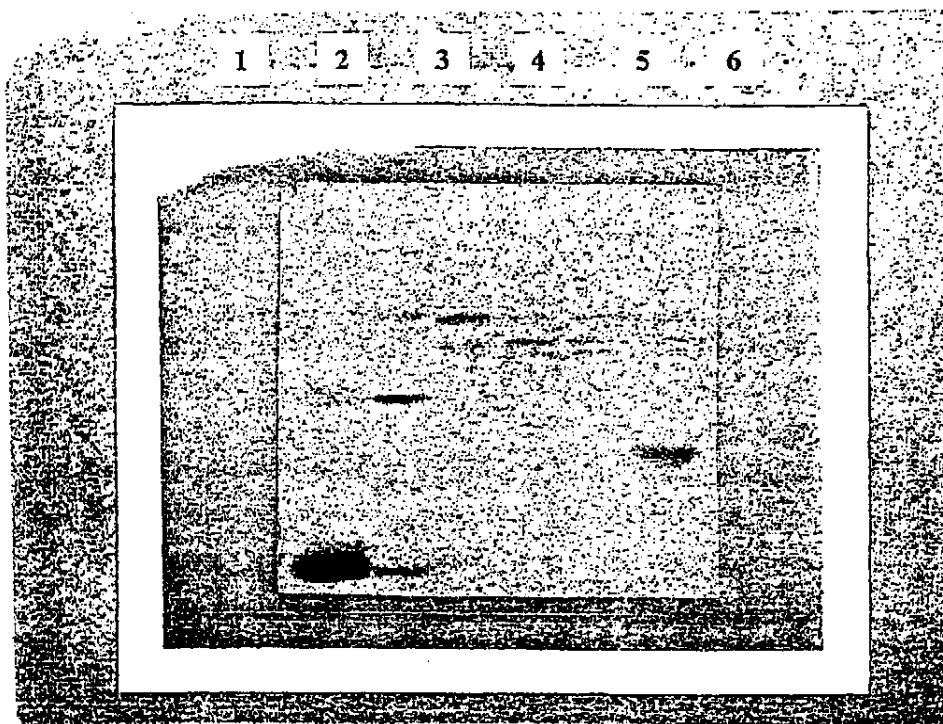
Obr. 2: analýza šarží objemových antigenů prostřednictvím SDS-PAGE (elektrogotézy v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného); barvení stříbrem: 1 μ g bílkoviny na vzorek.



- proužek 1: HEF001, redukční podmínky
- proužek 2: HEF002, redukční podmínky
- proužek 3: HEF003, redukční podmínky
- proužek 4: HEP2055, redukční podmínky
- proužek 5: markery molekulové hmotnosti
- proužek 6: HEF001, neredukováno
- proužek 7: HEF002, neredukováno
- proužek 8: HEF003, neredukováno
- proužek 9: HEP2055, neredukováno

Polohy označovačů, markerů molekulové hmotnosti :
 92 500, 66 200, 45 000, 31 000, 21 500, 14 400.

Obr. 3: Zbytkové kvasinkové bílkoviny v šaržích objemových antigenů, vyráběných postupem bez thiomersalu: metoda "Western blotting" s králičím sérem proti kvasinkovým bílkovinám.



- proužek 1: markery molekulové hmotnosti, předem zabarvené
proužek 2: markery malé molekulové hmotnosti (biotinylované) redukční podmínky
proužek 3: HEF001, 20 μ g bílkoviny
proužek 4: HEF002, 20 μ g bílkoviny
proužek 5: HEF003, 20 μ g bílkoviny
proužek 6: HEP2055, 20 μ g bílkoviny

Polohy označovačů, markerů molekulové hmotnosti:

92 500, 66 200, 45 000, 31 000, 21 500, 14 400.

Konec dokumentu
