(19) DANMARK

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **148874 B**

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: **3084/76**

(22) Indleveringsdag: **08 jul 1976**

(41) Alm. tilgængelig: **10 jan 1977**

(44) Fremlagt: **04 nov 1985**

(86) International ansøgning nr.: –

(30) Prioritet: **09 jul 1975 SE 7507854** **18 maj 1976 SE 7605632**

(51) Int.Cl.[4]: **A 61 K 35/14**
A 61 K 37/00
C 12 N 7/00
G 01 N 33/50

(71) Ansøger: **AKTIEBOLAGET *KABI; Stockholm, SE.**

(72) Opfinder: **Lars-Olov *Andersson; SE, Håkan Gunnar *Borg; SE, Gudrun Monica *Einarsson; SE.**

(74) Fuldmægtig: **Kontor for Industriel Eneret**

(54) **Fremgangsmåde til fjernelse eller koncentrering af hepatitisvirus fra blandinger af biologiske materialer**

DK 148874 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde af den i krav 1's indledning angivne art til fjernelse eller koncentrering af hepatitisvirus fra blandinger af biologiske materialer.

Hepatitisvirus type B,også kendt som serumhepatitis, spredes af biologiske materialer såsom blod, plasma, serum, urin og fækalier. Type B hepatitis kan således spredes af plasmafraktioner der bruges i terapeutisk øjemed. Det kan også være til stede i kloakvand og andre slags spildmaterialer indeholdende biologiske materialer i tilstrækkelig mængde til at sprede sygdommen.

Hepatitisvirus type B kan opdages ved immunologiske metoder med relation til strukturen af virusets overfladeantigen, $HB_sAg$, hvilket antigen også kendes som Australia antigen, Au-antigen.

De metoder til opdagelse af Au-antigen, som har været anvendt under de arbejder der har ført til den foreliggende opfindelse, er følgende:

Ausria II 125, radioimmunologisk prøvesæt, Abbott Laboratories, North Chicago, USA;

Hepanosticon, reverseret hæmagglutinationsprøvesæt, Organon, Oss, Holland;

Immunodiffusion, ID, Berg et al., Vox Sang. Vol.22 (1972), side 1;

Immunoelectro-osmoforesis, IEOP, Hansson og Johnsson, Vox Sang. Vol.21 (1971), side 531.

Ved anvendelse til afprøvning af blodprøver har Ausria-testen den højeste følsomhed, men ved undersøgelse af fraktioner af biologisk materiale stiger nøjagtigheden ved vurderingen af virkningen af de gennemførte trin, hvis der udføres yderligere prøver med udnyttelse af et andet prøvesystem.

Ved at man i hospitalsrutiner kun forlader sig på godkendte bloddonorer som er hepatitisnegative i henhold til den mest følsomme prøvemetode, er det muligt at nedsætte risikoen for overførelse af hepatitis væsentligt. På denne måde forbliver en væsentlig del af de til rådighed stående mængder blod uudnyttede, og stoffer der kan tilpasses til teknologi i industriel målestok samt en metode der egner sig til industriel plasmafraktionering

til selektiv fjernelse af hepatitisvirus vil således kunne sikre en forbedret forsyning for hospitaler af blodserum, plasma og plasmafraktioner.

Selv om prøvefølsomheden er blevet væsentligt forbedret ved radioimmunoprøvningsteknikken, er der stadigvæk en risiko tilbage for at der kan være hepatitis til stede i blod- og plasmafraktioner, også efter et negativt prøveresultat. Koncentrering af hepatitisvirus i henhold til den foreliggende opfindelse gør det muligt at teste stærkt koncentrerede prøver, hvorved nøjagtigheden af det anvendte hepatitisprøvesystem forbedres stærkt. I et møde i New York i American Chemical Society i august 1972 præsenterede S. E. Charm og B. L. Wong en fremgangsmåde til fjernelse af hepatitisvirus fra blodplasma under anvendelse af gede-antistoffer mod hepatitisvirus. Denne undersøgelse er blevet offentliggjort i Biotech. Bioeng. bind 16 (1974), side 593. En udnyttelse i teknisk målestok af denne metode er kraftigt reduceret af den begrænsede tilgang af antistoffer. Desuden må risikoen for udludning af immunogent materiale fra antistofbæreren tages i betragtning i det omfang fremgangsmåden anvendes på fraktionering af plasma af human oprindelse og de resulterende plasmafraktioner skal bruges på hospitaler.

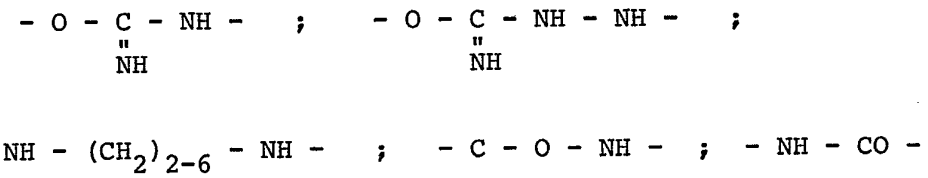
Fra en afhandling af Neurath et al. i J.gen.Virol. 19, 391-395 (1973) er det kendt at man kan fjerne eller koncentrere hepatitisvirus B fra blandinger af biologiske materialer ved at bringe den hepatitisvirusholdige blanding i berøring med et vandpermeabelt materiale hvortil der kovalent er bundet en ligand bestående af concanavalin A, et lectin der er isoleret fra frø af den ærteblomstfamilien tilhørende plante Canavalia ensiformis ("jack beans"). Concanavalin A er imidlertid stærkt toxisk, og af den grund samt på grund af risiko for lækage fra gelen kan en på basis af denne kendte teknik frembragt gel ikke bruges teknisk til fremstilling af proteinfraktioner befriet for hepatitisvirus og beregnet til klinisk anvendelse.

Det er opfindelsens formål af afhjælpe de beskrevne ulemper ved kendt teknik under anvendelse af substanserne der er let tilgængelige for fremstilling i teknisk målestok under anvendelse af i og for sig kendte syntesemetoder, stoffer der

ikke indeholder immunogent materiale har høj og specifik affinitet til hepatitisvirus og således at reaktionen mellem substanserne og hepatitisvirus er hurtig og irreversibel, hvorved der ikke er nogen risiko for udludning eller "lækning" i håndteringen af de i det følgende beskrevne præparater efter at hepatitisvirus er blevet bundet dertil.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte.

Alle de undersøgte kovalente bindinger



viste sig ækvivalente med hensyn til de opnåede resultater angående binding af viruset, og var afgjort mindre væsentlige for disse resultater end strukturen af liganden.

Også typen af det vandpermeable matrix-materiale, nemlig polyakrylamid eller agarose - eventuelt tværbundet med bisepoxyd, glutarsyrealdehyd, divinylsulfon, dibrompropanol eller epiklorhydrin - er mindre betydningsfuld end liganden.

I høj grad afgørende for affiniteten til hepatitisvirus er den hydrofobe karakter af liganden, hvilket fremgår af omstående tabel der summarisk gengiver resultater af undersøgelser over fjernelse af hepatitisvirus fra humant plasma forurenet dermed.

Særlig kraftig binding af hepatitisvirus opnås man hvis man ifølge opfindelsen anvender det i krav 2 angivne konjugat, det i krav 3 angivne konjugat, det i krav 4 angivne konjugat, det i krav 5 angivne konjugat, det i krav 6 angivne konjugat, det i krav 7 angivne konjugat eller det i krav 8 angivne konjugat. Denne kraftige binding ses af omstående tabel, der viser binding af hepatitisvirus fra stærkt Au-positivt humant plasma.

Der har været brugt nogle få matrixmaterialer, og liganderne har været stærkt varierede.

Affiniteten for hepatitisvirus til præparaterne bestemtes ved de ovenfor angivne immunologiske prøvemetoder. En kraftig og fuldstændig binding af hepatitisvirus til et præparat angives i tabellen ved tegnet -, hvilket betyder at der ikke er noget hepatitisvirus konstaterbart i plasmaprøven efter behandlingen. Angivelsen + angiver uvæsentlige tilbageværende mængde hepatitisvirus i plasmaprøven; ++ angiver uændret eller kun svagt nedsatte mængder Au-antigen i plasmaprøven efter behandlingen.

Resultaterne fremgår af nedenstående tabel. "Sepharose"® er et agaroseprodukt.

| Ligand/kulstofkæde | Au-antigen i plasmaprøven efter behandling |
|---|---|
| **Serie I; matrix: "Sepharose" ® 4B** | |
| glycyl-DL-fenylalanin | ++ |
| cykloheptylamin | ++ |
| fenylætylamin | ++ |
| hexametylendiamin-benzoesyre | ++ |
| hexametylendiamin-heptansyre | ++ |
| hexametylendiamin-ravsyre | ++ |
| hexametylendiamin-ftalsyre | ++ |
| oktylamin | - |
| decylamin | - |
| dodecylamin | - |
| oktadecylamin | - |
| hexametylendiamin-oktylravsyre | - |
| cysteamin-oktylravsyre (eks. 11) | - |
| hexametylendiamin-naftyleddikesyre (eks. 12) | - |
| hexametylendiamin-cholesterolhydrogen-succinat (eks. 13) | - |
| hexametylendiamin-cholsyre (eks. 14) | - |

Serie II; matrix: "Sepharose" ® 4B tværbundet på forskellige måder

ætylendiamin-oktylravsyre (eks. 1) -

butylendiamin-oktylravsyre (eks. 1) -

hexametylendiamin-oktylravsyre (eks. 1) -

hexametylendiamin-dodecylravsyre (eks. 2) -

kaprylhydrazid (eks. 3) -

tetradecylamin (eks. 6) -

(2-aminododekan) (eks. 7) -

ætylendiamin-undecen-10-syre (eks. 8) -

Serie III; matrix: polyakrylamid (fra Bio-Rad, Richmond, Californien, USA)

propylen-decylamin (eks. 10) -

Nogle eksempler tjener til nærmere belysning af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Eksempel 1

Fjernelse af Au-antigen fra plasma ved adsorption til "Sepharose" ® (ætylendiamin-oktylravsyre)-konjugat

Fremstilling af gelderivatet

Aktivering af "Sepharose" ® udførtes ved at man omhyggeligt vaskede 100 ml vel sedimenteret "Sepharose" ® 4B med vand. Overskuddet af væske fjernedes derefter ved sugningsfiltrering før gelen overførtes til en opløsning af 4 g cyanogenbromid i 100 ml destilleret vand. Efter ækvilibrering i 15 minutter under omrø-

ring og isafkøling aktiveredes gelsuspensionen ved pH 11,0 i 6-7 minutter. pH-Værdien holdtes konstant ved tilsætning af 4 M natriumhydroxyd.

Til tilkobling af ætylendiaminen vaskedes den aktiverede gel på et glasfilter med kold 0,5 M natriumbikarbonat/karbonatopløsning, pH 9,8, før overføring til en opløsning af 10 g ætylendiamin i 100 ml destilleret vand hvis pH-værdi var blevet reguleret til 9,8 med koncentreret saltsyre. Reaktionsblandingen henstod under omrøring i 20 timer ved stuetemperatur. Det resulterende gelprodukt vaskedes grundigt.

25 ml af den vandige suspension af den resulterende spacer-gel (gel med brodannende grupper) suspenderedes i 20 ml dioxan. Der tilsattes dråbevis en frisk opløsning af 6 g oktylravsyreanhydrid i 60 ml dioxan under omrøring ved stuetemperatur. pH-Værdien holdtes mellem 7,5 og 8 ved tilsætning af en tynd natriumhydroxydopløsning. Adsorbenten vaskedes grundigt med dioxan, dioxan/vand 2:1, vand, 1 M natriumklorid og en puffer bestående af 0,05 M TRIS, 0,02 M natriumcitrat og 0,10 M natriumklorid, pH 7,5. I det følgende omtales denne puffer som testpufferen.

Udbyttet af koblingen, regnet på mængden af oktylravsyre, bestemtes ved protonmagnetisk resonans (HA 100) og viste sig at være 4,8%.

Man kan bruge 1,4-diaminobutan eller 1,6-diaminohexan i stedet for ætylendiamin med tilsvarende resultater.

Au-antigen-test

Der brugtes en portion Au-antigen-positivt plasma med en titer på 1:64 ifølge IEOP og 1:32 ifølge ID som udgangsmateriale. Titerværdierne er anført i forhold til standardantigen.

I hver af seks reagensglas anbragtes der 2 ml Au-antigen-positivt plasma og 2 ml af en suspension af 3 dele grundigt sedimenteret adsorbent ækvilibreret med testpuffer og 1 del af samme puffer. Prøverne holdtes i bevægelse i henholdsvis 1, 2, 5, 10, 20 og 30 minutter og gelerne fraskiltes ved centrifugering. De ovenstående væsker bestemtes vor Au-antigen og viste

sig negative ved prøver i henhold til ID, IEOP og Hepanosticon.

Eksempel 2

Fjernelse af Au-antigen fra plasma ved adsorption til "Sepharose"® -(hexametylendiamin-dodecylravsyre)-konjugat

Fremstilling af gelderivatet

Til tværbinding af "Sepharose"® blandedes 100 ml af gelen med 2 ml epiklorhydrin med 0,5 g natriumborhydrid. Blandingen omrørtes kraftigt ved 60°C i en time. Gelen vaskedes grundigt med varmt vand og blandedes med en opløsning af 0,25 g natriumborhydrid opløst i 50 ml 2 M natriumhydroxyd. Blandingen autoklaveredes ved 120°C i en time. Derefter vaskedes gelen med en alkalisk natriumborhydridopløsning. Der tilsattes langsomt koncentreret eddikesyre indtil blandingens pH-værdi nærmede sig 4. Til slut vaskedes gelen med en betydelig mængde vand.

Fremstilling af "Sepharose"® -hexametylendiamin-gelen og med en brodannende gruppe skete analogt med det i eksempel 1 beskrevne.

25 ml af den resulterende gel overførtes til et glasfilter og vaskedes med dioxan/vand 2:1 før den blev sugetørret og overført til en frisk opløsning af 1 g dodecylravsyre, 1,5 g vandopløseligt karbodiimid, N-cyklohexyl-N'-/β-(N-metylmorfolinoætyl)/-karbodiimid-p-toluensulfonat i 60 ml dioxan/vand 2:1. Blandingen omrørtes ved stuetemperatur i en time før den overførtes til et glasfilter og vaskedes grundigt med dioxan, dioxan/vand 2:1, 1 M natriumklorid, vand og testpuffer.

Koblingsudbyttet beregnet på den anvendte mængde fedtsyre bestemtes ved protonmagnetisk resonans (HA 100) og viste sig at være 2,0%.

Au-antigen-test

Som udgangsmateriale anvendtes der Au-antigen-positivt plasma med titer 1:128 ifølge ID og IEOP. En kolonne med diameter 1,6 cm og højde 1,0 cm pakkedes med gelderivatet ækvilibreret i testpuffer. Der pumpedes 7 ml af det Au-antigen-positive plasma i kontakt med gelen med en strømningshastighed på 5 ml/time. Testpufferen tilsattes med pumpe indtil der ikke længer elueredes proteinmateriale, hvilket kontrolleredes ved UV-afsøgning. Det opsamlede eluat var negativt ifølge prøverne ID, IEOP og Hepanosticon. Ved hjælp af trykdialyse koncentreredes eluatet ti gange og var også herefter negativt ved hepatitisprøverne.

Eksempel 3

Fjernelse af Au-antigen fra plasma ved adsorption til "Sepharose"®-kaprylhydrazid-konjugat

Fremstilling af gelderivatet

Ætylkaprylat omdannedes til det tilsvarende hydrazid ved hydrazinolyse. 10 ml af ætylesteren blandedes med 10 ml 98%s hydrazinhydrat. Der tilsattes ætanol (22 ml) som opløsningsmiddel indtil reaktionsblandingen klarede, hvorefter opløsningen henstod ved stuetemperatur i 15 timer. Det krystalliserende hydrazid frafiltreredes og vaskedes med isvand og med vandigt metanol (1:1) ved stuetemperatur.

"Sepharose" ® 4B aktiveredes som beskrevet i eksempel 1.

Gelen vaskedes med en opløsning af koblingsmidlet og vakuumfiltreredes. Sammenkoblingen gennemførtes ved at man overførte den aktiverede gel til 100 ml mættet opløsning af kaprylhydrazid opløst i dimetylformamid (DMF)/0,2 M natriumbikarbonat 1:1. pH-Værdien holdt sig uændret under koblingsreaktionen, der fandt sted under omrøring ved stuetemperatur i 15 timer. Det resulterende produkt vaskedes grundigt med DMF, DMF/vand 1:1, 1 M

natriumklorid, vand og testpuffer.

Koblingsudbyttet, regnet på hydrazidet, bestemtes ved protonmagnetisk resonans (HA 100) og viste sig at være 2,3%.

Au-antigen-test

Au-antigen-positivt plasma, titer 1:128 ifølge ID og IEOP, brugtes som udgangsmateriale. Til 2 ml af en suspension bestående af 3 dele grundigt sedimenteret adsorbent ækvilibreret med testpuffer og 1 del af samme puffer sattes der 2 ml Au-antigen-positivt plasma. Blandingen holdtes i forsigtig bevægelse i 30 minutter og gelen fraskiltes ved centrifugering. Den ovenstående væske var negativ med hensyn til Au-antigen ved prøverne ID, IEOP og Hepanosticon.

## Eksempel 4

Fjernelse af Au-antigen fra albuminopløsning ved adsorption til "Sepharose"® -(ætylendiamin-oktylravsyre)-konjugat

Fremstilling af gelderivatet

Gelkonjugatet fremstilledes analogt med eksempel 1.

Au-antigen-test

Som udgangsmateriale anvendtes der en Au-antigen-positiv albuminopløsning, titer 1:64 ifølge ID og IEOP og vundet ved fraktionering af Au-antigen-positivt plasma. Adsorptionen foretoges portionsvis som beskrevet i eksempel 3. Den ovenstående væske prøvedes for Au-antigen og viste sig negativ ved prøverne ID, IEOP og Hepanosticon.

Eksempel 5

Fjernelse af Au-antigen fra et koaguleringsfaktorkoncentrat ved adsorption til et "Sepharose"® - (ætylendiamin-oktylravsyre)-konjugat

Fremstilling af gelderivatet

Gelkonjugatet fremstilledes analogt med eksempel 1.

Au-antigen-test

Der brugtes et Au-antigen-positivt plasma til fraktionering af et koncentrat indeholdende koagulationsfaktorerne II, VII, IX og X. Der fremstilledes en 1%s proteinopløsning og den viste sig ved ID-prøven at have en Au-antigentiter på 1:32. Til et glasfilter indeholdende et leje på 5 ml af gelderivatet ækvilibreret i testpuffer sattes der 10 ml af proteintestopløsningen, og gelen vaskedes med 3 x 5 ml testpuffer. Eluaterne bestemtes med hensyn til Au-antigen ved prøverne ID, IEOP og Hepanosticon og viste sig at være negative.

Eksempel 6

Fjernelse af Au-antigen fra plasma ved adsorption til et "Sepharose"®- tetradecylamin-konjugat

Fremstilling af gelderivatet

"Sepharose"® aktiveredes som beskrevet i eksempel 1.

Til koblingsreaktionen sattes 100 ml cyanogenbromid-aktiveret "Sepharose"®, der var blevet ækvilibreret med 95%s ætanol og sugningstørret, til en opløsning af 22 g tetradecylamin i 100 ml 95%s ætanol. Blandingen henstod ved stuetemperatur under omrøring i 48 timer. Gelen vaskedes grundigt med varm 95%s æta-

nol, vandig ætanol 1:1, 1 M natriumklorid, vand og testpuffer. Koblingsudbyttet bestemtes ved protonmagnetisk resonans (HA 100) og viste sig at være 4,3%.

Au-antigen-test

Au-antigen-positivt plasma, titer 1:128 ifølge ID og IEOP, anvendtes som udgangsmateriale. Til et glasfilter med et leje af 10 ml af gelderivatet ækvilibreret i testpufferen sattes der 35 ml plasma. Materialet vaskedes med 3 x 10 ml testpuffer og eluaterne bestemtes med hensyn til Au-antigen. Eluaterne viste sig negative ifølge prøverne ID, IEOP, Hepanosticon og Ausria.

Eksempel 7

Fjernelse af Au-antigen fra plasma ved adsorption til "Sepharose"® (2-aminododekan)-konjugat

Fremstilling af gelderivatet

2-dodekan omdannedes til den tilsvarende amin ved reaktion med hydroxylamin, hvilket resulterede i oximen, hvorpå der foretoges katalytisk hydrogenering og elimination af vand. Den anvendte "Sepharose"® var vundet i henhold til eksempel 1.

Til kobling sattes 100 ml cyanogenbromid-aktiveret gel, vasket med 95%s ætanol og sugetørret, til en opløsning af 10 g 2-aminododekan i 100 ml 95%s ætanol. Blandingen henstod under omrøring ved stuetemperatur i 48 timer, hvorefter gelen vaskedes grundigt med varm 95%s ætanol, vandig ætanol 1:1, 1 M natriumklorid, vand og testpuffer.

Koblingsudbyttet bestemtes ved protonmagnetisk resonans (HA 100) og viste sig at være 1,0%.

Au-antigen-test

Som udgangsmateriale anvendtes der Au-antigen-positivt plasma med titer 1:128 ifølge ID og IEOP. Prøven gennemførtes som

beskrevet i eksempel 3 og den ovenstående væske viste sig negativ ved prøvning i henhold til ID, IEOP og Hepanosticon.

Eksempel 8

Fjernelse af Au-antigen fra plasma ved adsorption til "Sepharose"®-(ætylendiamin-undecen-10-syre)-konjugat

Fremstilling af gelderivatet

"Sepharose"®-ætylendiaminen var fremstillet i analogi med det i eksempel 1 beskrevne.

Til en frisk opløsning af 1,85 g undecylensyre og 2,1 g dicyklohexylkarbodiimid opløst i 100 ml dioxan sattes der 100 ml "Sepharose"®-ætylendiamin-konjugat efter ækvilibrering med dioxan og vakuumfiltrering. Gelsuspensionen henstod under omrøring i 15 timer ved stuetemperatur, vaskedes med dioxan, dioxan/vand 1:1, 1 M natriumklorid og testpuffer.

Koblingsudbyttet, regnet på fedtsyren, bestemtes ved protonmagnetisk resonans (HA 100) og viste sig at være 2,3%.

Au-antigen-test

Som udgangsmateriale brugtes der Au-antigen-positivt plasma med titer 1:128 målt ved ID og IEOP. Prøven gennemførtes som beskrevet i eksempel 3. Den ovenstående væske viste sig ved ID, IEOP og Hepanosticon at være Au-antigen-negativ.

Eksempel 9

Fjernelse af Au-antigen fra plasminogenkoncentrat ved adsorption til "Sepharose"®-kaprylhydrazid-konjugat

Fremstilling af gelderivatet

Gelkonjugatet fremstilledes som beskrevet i eksempel 3.

Au-antigen-test

Til 2 ml plasminogenopløsning sattes der 0,5 ml stærkt Au-positivt plasma, og blandingen var i høj grad Au-positiv i henhold til prøverne ID og Ausria. Denne blanding førtes gennem en 4 cm kolonne hvori der var anbragt 10 ml gelkonjugat ækvilibreret testpuffer. Fraktionerne opsamledes og afprøvedes. Det plasminogenindeholdende eluat viste sig negativt ved afprøvning i henhold til ID og Ausria.

Eksempel 10

Fjernelse af Au-antigen fra plasma ved adsorption til polyakrylamid-(propylen-decylamin)-konjugat

Fremstilling af gelderivatet

Polyakrylamid ("Biogel" P 300; et i Danmark ikke indregistreret varemærke) henstod til kvældning i vand og vaskedes grundigt med 0,05 M natriumfosfatpuffer pH 7,0. Til aktiveringsprocessen blandedes 20 ml af gelsuspensionen i puffer (0,5 af den tørre gel/25 ml puffer) med 5,0 ml glutardialdehyd og inkuberedes ved 37°C i 18 timer. Derefter vaskedes gelen grundigt med dioxan, dioxan/vand 3:2, vand og testpuffer.

Koblingen gennemførtes ved at man satte den tørre gel til en opløsning af 3 g decylamin i 30 ml dioxan/vand (60-40%) pH 8. Blandingen henstod under omrøring ved 4°C i 18 timer hvorefter gelen vaskedes med dioxan, dioxan/vand 3:2, vand og testpuffer.

Au-antigen-test

Som udgangsmateriale brugtes der Au-antigen-positivt plasma med titer 1:128 ifølge ID og IEOP. Prøven gennemførtes på den i eksempel 3 beskrevne måde. Ved afprøvningen viste den ovenstående væske sig Au-negativ ved prøverne ID, IEOP og Hepanosticon.

Eksempel 11

Fjernelse af Au-antigen fra plasma ved adsorption til "Sepharose"®-(cysteamin-oktylravsyre)-konjugat

Fremstilling af gelderivatet

"Sepharose"®-cysteamin vandtes ved reduktion af "Sepharose"®-cystamin, fremstillet i analogi med eksempel 1, med 0,05 M merkaptoætanol i 0,1 M karbonatpuffer pH 8,5 i en time. Gelen vaskedes grundigt med karbonatpufferen, vand og til slut dioxan til en opløsning af 1,2 g oktylravsyre i 40 ml dioxan sattes der en opløsning af 1,84 g dicyklohexylkarbodiimid i 10 ml dioxan og 25 med "Sepharose"®-cysteamin. Efter to timer med omrøring ved stuetemperatur tilsattes der yderligere 1,84 g dicyklohexylkarbodiimid. To timer senere vaskedes gelen med dioxan. Denne reaktionsprocedure gentoges og fulgtes af grundig vask med dioxan, dioxan/vand, vand og 0,1 M karbonat pH 8,5. Tilbageværende tiolgrupper blokeredes ved behandling af gelen med 60 ml jodacetamid i 45 minutter. Til slut vaskedes gelen med testpuffer.

Au-antigen-test

Som udgangsmateriale brugtes der Au-antigen-positivt plasma med titer 1:32 ifølge ID. Adsorptionen skete portionsvis som beskrevet i eksempel 3. Den ovenstående væske afprøvedes for Au-antigen og viste sig at være negativ ved prøverne ID, IEOP og Hepanosticon.

Eksempel 12

Fjernelse af Au-antigen fra plasma ved adsorption til "Sepharose"®-(hexametylendiamin-naftyl-1-eddikesyre)-konjugat

Fremstilling af gelderivatet

"Sepharose"®-hexametylendiamin fremstilledes i analogi med det i eksempel 1 beskrevne.

25 ml af den resulterende spacergel overførtes til et glasfilter og vaskedes med dioxan/vand 3:2 før den sugningstørredes og overførtes til en frisk opløsning af 1,1 g naftyl-1-eddikesyre i 30 ml dioxan/vand 3:2. Til gelsuspensionen sattes der under omrøring 2,65 g vandopløseligt karbodiimid, N-cyklohexyl-N'-/β-(N-metylmorfolinoætyl)/-karbodiimid-p-toluensulfonat under omrøring, og derefter reguleredes pH til 4,8 med fortyndet saltsyre. Efter en time ved stuetemperatur sattes der endnu en gang 2,65 g vandopløseligt karbodiimid. Blandingen henstod yderligere en time under omrøring før den overførtes til et glasfilter og vaskedes grundigt med dioxan, dioxan/vand 3:2, 1 M natriumklorid, vand og testpuffer.

Koblingsudbyttet beregnet på den anvendte naftyl-1-eddikesyre bestemtes med protonmagnetisk resonans (HA 100) til 3,0%.

Au-antigen-test

Som udgangsmateriale anvendtes der Au-antigen-positivt plasma med titer 1:32 ifølge ID og titer 1:64 ifølge IEOP. Adsorptionen skete portionsvis som beskrevet i eksempel 3. Den ovenstående væske afprøvedes for Au-antigen og viste sig negativ ved prøverne ID, IEOP og Hepanosticon.

Eksempel 13

Fjernelse af Au-antigen fra plasma ved adsorption til "Sepharose"®-(hexametylendiamin-cholesterolhydrogensuccinat)-konjugat

Fremstilling af gelderivatet

"Sepharose"®-hexametylendiamin vandtes ligesom i eksempel 12.

20 ml af den resulterende spacergel overførtes til et

glasfilter og vaskedes med dioxan, 10% triætylamin i dioxan og pånyt dioxan, og derefter sugetørredes den og overførtes til en frisk opløsning af 0,5 g cholesterolhydrogensuccinat i 25 ml dioxan.

Reaktionen blev sat igang ved tilsætning af 0,35 g dicyklohexylkarbodiimid opløst i 1 ml dioxan. Koblingen gennemførtes under omrøring ved stuetemperatur. Efter to timer tilsattes der yderligere en portion karbodiimid og to timer senere vaskedes den koblede gel grundigt med dioxan, dioxan/vand, vand og til slut testpuffer.

Au-antigen-test

Som udgangsmateriale brugtes der Au-antigen-positivt plasma med titer 1:64 ifølge iD og 1:128 ifølge IEOP. Adsorptionen skete portionsvis som beskrevet i eksempel 3. Den ovenstående væske afprøvedes for Au-antigen og viste sig negativ i henhold til prøverne ID, IEOP og Hepanosticon.

Eksempel 14

Fjernelse af Au-antigen fra plasma ved adsorption til "Sepharose"®-(hexametylendiamin-cholsyre) -konjugat

Fremstilling af gelderivatet

"Sepharose"®-hexametylendiamin vandtes ligesom i eksempel 12 og 13.

Kobling af cholsyre til spacergelen gennemførtes som beskrevet i eksempel 13, dog med den forskel at 0,5 g cholsyre opløstes i 100 ml dioxan.

Koblingsudbyttet, beregnet på cholsyremængden, bestemtes ved protonmagnetisk resonans (HA 100) og viste sig at være 5,8%.

Au-antigen-test

Som udgangsmateriale brugtes der Au-antigen-positivt plasma med titer 1:32 ifølge ID. Adsorptionen skete portionsvis som beskrevet i eksempel 3. Den ovenstående væske prøvedes for Au-antigen og viste sig negativt ved prøverne ID, IEOP og Hepanosticon.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til fjernelse eller koncentrering af hepatitisvirus fra blandinger af biologiske materialer, ved hvilken man bringer den hepatitisvirus-indeholdende blanding i berøring med en adsorbent bestående af et vandpermeabelt matrixmateriale hvortil der kovalent er koblet en ligand, hvorefter adsorbenten fraskilles og hepatitisviruset derpå om ønsket fraskilles, k e n d e t e g n e t ved at der som adsorbent anvendes et matrixmateriale bestående af eventuelt tværbundet agarose eller polyakrylamid hvortil der, eventuelt over en bro, er koblet en hydrofob ligand bestående af en kulbrinte med 7-15 kulstofatomer, eventuelt substitueret med karboxy, hydrazinokarbonyl eller amino, eller et kondenseret ringsystem bestående af naftyleddikesyre, cholesterolhydrogensuccinat eller cholsyre.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at adsorbenten består af et agarose-(ætylendiamin-oktylravsyre)-konjugat.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at adsorbenten består af et agarose-(hexametylendiamin-dodecylravsyre)-konjugat.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at adsorbenten består af et agarose-(kaprylhydrazid)-konjugat.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at adsorbenten består af et agarose-tetradecylamin-konjugat.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at adsorbenten består af et agarose-(hexametylendiamin-naftyleddikesyre)-konjugat.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at adsorbenten består af et agarose-(hexametylendiamin-cholesterolhydrogensuccinat)-konjugat.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at adsorbenten består af et agarose-(hexametylendiamin-cholsyre)-konjugat.

Fremdragne publikationer:

Ann.Rev. of Biochem., bind 40 (1971), side 259 - 278,
P.Cuatrecasas & C.B.Anfinsen: Affinity Chromatography
Methods of Enzymology, bind 34, del B (1974), side 126 - 140,
Shmuel Shaltiel: Hydrophobic Chromatography
Biochimica et Biophysica, bind 372 (1974), side 218 - 224,
Anders Wichman & Lars-Olov Andersson: Purification of Human Serum Albumin by Affinity Chromatography
Vox Sanguinis, bind 23 (1972), side 23 - 25,
Björling: Plasma Fractionation Methods Used in Sweden
J.gen.Virol, bind 19 (1973), side 391 - 395,
A.R.Neurath et al.: Affinity Chromatography of Hepatitis B Antigen on Concanavalin A Linked to Sepharose.