

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

291 024

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1995 - 3247

(22) Přihlášeno: 08.12.1995

(30) Právo přednosti:
10.12.1994 KR 1994/9433594

(40) Zveřejněno: 12.06.1996

(Věstník č. 6/1996)

(47) Uděleno: 02.10.2002

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 11.12.2002
(Věstník č. 12/2002)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷:

A 61 K 39/29

C 07 K 14/02

(73) Majitel patentu:

LG Chemical Ltd., Seoul, KR;

(72) Původce vynálezu:

Park Soon-Jae, Daejeon, KR;
Lee Young-Mee, Daejeon, KR;
Yoon Kyung-Hee, Daejeon, KR;
Lim Kook-Jin, Daejeon, KR;
Kwon Young-Sun, Daejeon, KR;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273, Praha 4,
14021;

(54) Název vynálezu:

**Způsob izolace povrchového virového antigenu
hepatitidy B obsahujícího peptid preS2 a vakcína
tento antigen obsahující**

(57) Anotace:

Způsob izolace virového povrchového antigenu hepatitidy B
obsahujícího peptid preS2 z buněk rekombinovaných
organismů, který je charakterizován rozrušením těchto buněk
pomocí pufry obsahujícího chaotropní sůl.

CZ 291024 B6

Způsob izolace povrchového virového antigenu hepatitidy B obsahujícího peptid preS2 a vakcína tento antigen obsahující

5 Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu izolace virového povrchového antigenu hepatitidy B obsahujícího peptid preS2, konkrétně způsobu izolace virového povrchového antigenu hepatitidy B obsahujícího peptid preS2 z rekombinovaných buněk kvasinek, který zahrnuje krok rozrušení, 10 kdy se předchází ztrátě preS2 peptidu použitím chaotropní soli, následnou extrakci, srážení, adsorpci na silikagelu a kolonovou chromatografií.

15 Dosavadní stav techniky

Hepatitida B je jedním z celosvětových problémů lidského zdraví a 200 až 300 milionů lidí jsou nositeli viru hepatitidy B ("HBV"). Nakažení HBV často přechází v cirhózu a hepatocelulární karcinom vedoucí k možné smrti pacienta.

20 Dosud nebyl vyvinut léčebný prostředek k léčení hepatitidy B a byla zdůrazňována důležitost očkování.

Blumberg a kol. objevili v roce 1955 Australský antigen v krvi pacientů s hepatitidou B; Krugman a kol. v roce 1971 oznámili aktivní imunizaci za použití tepelně zpracovaného lidského séra obsahujícího HBV, čímž se nabídla možnost vývoje vakcíny proti hepatitidě B. Nato byla 25 komercializována první generace vakcín proti hepatitidě B, která byla připravena izolací a čištěním virového povrchového antigenu hepatitidy B (HBsAg) z krevní plazmy pacientů s hepatitidou B (M. R. Hilleman a kol., Develop. Bio. Standard, 54, 3-12 (1983)).

30 Nicméně vakcíny odvozené z krevní plazmy jsou problematické: způsoby jejich izolace a inaktivace jsou těžkopádné a vyžadují vysoké náklady; zásoby lidské krve jsou omezené a očkované osoby mohou být infikovány patogeny ze zdroje krve.

Proto byly za účelem řešení výše zmíněných problémů při vývoji vakcíny proti hepatitidě B 35 testovány přístupy genetického inženýrství.

Např. Valenzuela a kol. vyvinuli způsob výroby HBsAg kvasinkami (Nature, 293, 347-350 (1982)).

40 Rekombinovaný HBsAg (r-HBsAg) obsahuje zejména S protein (P25) s 226 aminokyselinami a po izolaci vytváří částice povrchového antigenu, které jsou téměř identické se separovanými z krevní plazmy.

K.H. Heermann a kol. uvedli, že virový obalový protein hepatitidy B obsahuje značné množství 45 L-proteinu (preS1 + preS2 + S: p39) a M-proteinu (preS2 + S: p31) a také S-proteinu (J. Virol., Nov., 396-402 (1984)). Bylo známo, že preS1 peptid hraje důležitou úlohu s ohledem na atak viru hepatitidy B na játra po infikování lidského těla. Při experimentech se zvířaty bylo dokázáno, že peptid preS2 skládající se z 55 aminokyselin pomáhá při tvorbě protilátek proti povrchovému antigenu (D.R. Milich a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8168-8172 (1985)).

50 Kromě toho bylo známo, že protilátky vytvořené proti peptidu preS2 vykazují obrannou aktivitu proti virové infekci (Y. Ito a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 9174-9178 (1986)). Proto je tedy vakcína obsahující peptid preS2 platná u lidí, kteří nemohou vytvářet protilátky proti dříve

existujícímu povrchovému antigenu. Vývoj této vakcíny je rovněž důležitý pro ochranu proti infekci nedávno objevenou virovou formou hepatitidy B.

5 Ačkoli je peptid preS2 velmi citlivý k proteázám přítomným v buňkách kvasinek, setkala se
příprava povrchového antigenu hepatitidy B obsahujícího peptid preS2 s různými obtížemi. Za
účelem překonání těchto obtíží připravil Kobayashi a kol. vakcínu pomocí geneticky modifiko-
vaných proteáza-senzitivních oblastí mezi preS2 a S peptidy (J. Bacteriology, 8, 1-22 (1988))
a US 4 742 158 odkrývá způsob přípravy vakcíny obsahující peptid preS2, kdy je peptid chráněn
10 před atakem proteázy použitím inhibitoru proteázy ve stadiu rozrušení buněk. Ale provedení
genetické modifikace aktivity peptidu preS2 Kobayashim nebylo plně charakterizováno a násled-
ující způsob není praktický, protože inhibitory proteázy jsou příliš drahé pro použití při izolaci
velkých množství. A dále nemůže být obsah peptidu preS2 udržen na určité hladině bez množství
přidaných inhibitorů proteázy, když se prodlužuje doba izolace s úrovní nebo rostoucími nároky.

15 EP číslo 0 337 492 A1 poskytuje způsob izolace HBsAg z kultury *Pichia* sp. s použitím thio-
kvanidu draselného. Thiokyanid draselný se používá pro zvýšení výtěžku lipofilních proteinů
a celý proces je zaměřený na izolaci HBsAg obsahujícího pouze S peptid. Pokud HBsAg
obsahuje dále peptid preS2 skládající se z 55 aminokyselin vedle S peptidu skládajícího se z 226
aminokyselin, jeho imunologické vlastnosti jsou podobné povrchovému antigenu obsahujícímu
20 pouze S peptid, protože antigenicita i imunogenicita S peptidové části jsou zachovány. Ale tyto
dva povrchové antigeny mají nevyhnutelně jiné fyzikálně chemické vlastnosti. Konkrétně je
peptid preS2 dost hydrofilní na to, aby byl nechráněný na povrchu částic antigenu a to má
následně důležitý vliv na proceduru izolace.

25 A tak byly vyvinuty různé způsoby izolace povrchového antigenu hepatitidy B obsahujícího
peptid preS2.

EP číslo 0 130 178 A1 popisuje způsob izolace HBsAg obsahujícího peptid preS2, který je
30 charakterizován separací povrchového antigenu použitím dvou kapalných fází, které jsou přípra-
veny přidáním vhodného množství dextranu a glykolu k extraktu kvasinek. Ale tento způsob je
problematický: separovaný povrchový antigen není dostatečně čistý a není vhodný pro izolaci ve
velkém množství, protože dextran i ethylenglykol jsou drahé a ekonomicky nevhodná je i nutnost
dodatečného odstranění použité povrchově aktivní látky.

35 US 4 742 158 popisuje způsob izolace HBsAg obsahujícího peptid preS2, který zahrnuje přípra-
vu kvasinkového extraktu za přítomnosti různých proteáz inhibitorů a izolaci povrchového
antigenu od těchto látek sérií kolonových chromatografií za použití afinitní kolony připravené
zakotvením albuminového polymeru z lidského séra na gelovou matici a hydrofobní kolonovou
40 eluci povrchově aktivní látkou. Ale tento způsob má některé nevýhody: inhibitory proteázy
použité při tomto způsobu jsou velmi drahé, afinitní kolona není vhodná k dělení velkých
množství a k odstranění povrchově aktivní látky použité při hydrofobní kolonové chromatografii
je zapotřebí speciální metody.

45 M Kobayashi a kol. rovněž zveřejnili způsob izolace HBsAg obsahujícího peptid preS2
(J. of Biotechnology, 8, 1-22 (1988)). Ale tento způsob není vhodný pro izolaci velkých
množství, protože používá imunoafinitní kolonovou chromatografii, jejímž výsledkem je malý
výtěžek.

50 Korejský patent 065305 uvádí způsob izolace HBsAg, který zahrnuje pH srážení, iontově
výměnnou a kolonovou chromatografii na silikagelu. Tento způsob má tu nevýhodu, že je těžké
udržet obsah preS2 peptidu na uspokojivé hladině, protože je částečně odbouráván proteázou
v inicializačním stadiu procesu.

Z těchto důvodů stále existuje potřeba efektivního způsobu izolace HBsAg obsahujícího peptid preS2.

5 Podstata vynálezu

Primárním předmětem předkládaného vynálezu je získání způsobu izolace virového povrchového antigenu hepatitidy B obsahujícího peptid preS2 z kvasinkových buněk v dostatečné čistotě k přímému použití do vakcíny.

10

Ve shodě s jedním aspektem předkládaného vynálezu je získání způsobu izolace virového povrchového antigenu hepatitidy B obsahujícího peptid preS2, který je přenesen do rekombinovaného organismu a je charakterizován:

15

(a) rozrušením buňky pomocí pufru obsahujícího chaotropní sůl, čímž se získá buněčný homogenát;

(b) přidáním povrchově aktivní látky k buněčnému homogenátu získanému v kroku (a), čímž se extrahuje povrchový antigen z buněčné membrány buněk;

20

(c) alkalizací extraktu se zvýší rozpustnost a podpoří se vznik částic povrchového antigenu v extraktu získaném v kroku (b);

25

(d) vysrážením a odstraněním buněčných zbytků, lipidů a kontaminujících proteinů z extraktu z kroku (c), okyselením a odstředěním extraktu, čímž se získá roztok obsahující povrchový antigen;

30

(e) uvedením roztoku z kroku (d) do kontaktu se silikagelem, čímž dojde k adsorpci povrchového antigenu na silikagel, vmytím kontaminujících proteinů a desorpcí povrchového antigenu ze silikagelu za použití pufru, čímž se získá frakce čištěného povrchového antigenu;

(f) provedením hydrofobní kolonové chromatografie s frakcí čištěného povrchového antigenu získaného v bodu (e), čímž se získá frakce obsahující povrchový antigen; a

35

(g) čištěním frakce získané v kroku (f) gelovou filtrační chromatografií se separací podle velikosti, čímž se získá povrchový antigen v čisté formě.

Stručný popis schématu

40

Následující a jiné objekty a hlavní body předkládaného vynálezu budou zřejmé z následujícího popisu vynálezu ve spojení s doprovodným schématem, kde:

45

obr. 1 ukazuje výsledek 15 % dodecylsírán sodný polyakrylamid gelové elektroforézy (SDS-PAGE), který potvrzuje přítomnost preS2 peptidu v HBsAg, po izolaci povrchového antigenu obsahujícího peptid preS2 v přítomnosti thiokyanidu sodného jako chaotropní soli.

Podrobný popis vynálezu

50

Předkládaný vynález zahrnuje způsob izolace virového povrchového antigenu hepatitidy B obsahujícího peptid preS2, který je přenesen do rekombinovaného organismu a je charakterizován rozrušením rekombinovaných buněk puftrem obsahujícím chaotropní sůl což vede k minimalizaci ztráty peptidu preS2. Použití pufru obsahujícího chaotropní sůl pro rozrušení buněk podporuje tvorbu částic HBsAg a chrání peptid preS2 před atakem proteázy, který obecně

nastává během inicializačního stadia izolace, čímž je zvýšen obsah peptidu preS2 na konstantní úroveň až do konce izolace.

5 Způsob, kterého se týká předkládaný vynález, je aplikován na způsob izolace HBsAg, který je produkován v jakémkoli vhodném rekombinovaném organismu, zvláště v buňkách kvasinek např. *Saccharomyces cerevisiae*.

10 Vhodná chaotropní sůl v předkládaném vynálezu zahrnuje thiokyanid sodný, thiokyanid draselný, thiokyanid amonný, guanidium hydrochlorid a močovinu, s výhodou thiokyanid sodný.

Pro rozrušení buněk ve způsobu v předkládaném vynálezu byly použity běžné pufrů, např. fosforečnanový a Tris pufr. Nastavené pH bylo mezi 6 a 8. Koncentrace chaotropní soli v pufru byla 1 až 8 M, s výhodou 1 až 3 M.

15 Pokud byly rekombinované buňky rozrušeny pufrům obsahujícím chaotropní sůl, jak je popsáno výše, byl zbytek čistícího způsobu proveden kombinací běžných čistících postupů, třebaže nejčastěji zahrnuje kroky:

20 b) přidání povrchově aktivní látky k buněčnému homogenátu z rekombinovaných buněk, za účelem extrakce povrchového antigenu z buněčné membrány;

c) zvýšení rozpustnosti a podpora tvorby částic povrchového antigenu v extraktu získaném v kroku b) alkalizací extraktu;

25 d) srážení a odstranění buněčných zbytků, tuků a kontaminujících bílkovin z extraktu upraveného v c) okyselením a následným odstředěním extraktu za získání roztoku obsahujícího povrchový antigen;

30 e) spojení roztoku získaného v kroku d) se silikagelem k adsorbci povrchového antigenu na silikagelu, vymytí kontaminujících bílkovin a desorpce povrchového antigenu ze silikagelu použitím pufru za získání frakce izolovaného povrchového antigenu;

f) podrobení frakce izolovaného povrchového antigenu získané v kroku e) hydrofobní kolonové chromatografii za získání frakcí obsahujících izolovaný povrchový antigen; a

35 g) čištění frakcí získaných v kroku f) gelovou filtrační chromatografií se separací podle velikosti za získání povrchového antigenu v čisté formě.

40 Typická povrchově aktivní látka použitá ve výše uvedeném kroku b) pro extrakci povrchového antigenu z buněk zahrnuje: polysorbát 20 (Tween 20), polysorbát 80 (Tween 80), polyoxyethylen-oktylfenylether (Triton X-100) a deoxycholát sodný, přednostně však polysorbát 20. Povrchově aktivní látka byla použita v množství 0,1 až 0,5 g na 100 cm³ buněčného homogenátu, s výhodou 0,1 až 0,2 g na 100 cm³ buněčného homogenátu.

45 Za účelem zvýšení rozpustnosti povrchového antigenu v buněčném homogenátu a podpory tvorby částic, je nejlepší zvýšit pH extraktu povrchového antigenu na 11,0 až 13,5 použitím báze, s výhodou hydroxidu sodného a hydroxidu draselného. Tento způsob alkalizace byl zvolen za účelem podpory tvorby částic HBsAg za zesílení intermolekulární disulfidické vazby a disociace kontaminujících proteinů z HBsAg prostřednictvím zvýšení rozpustnosti. Následně byl extrakt 50 ponechán stát při teplotě od 0 do 30 °C po dobu 0,5 až 1 hodiny.

Pak byl extrakt okyselen za vysrážení buněčných zbytků, tuků a kontaminujících proteinů, kdy je pH sníženo na 4,5 až 6,0. V tomto kroku byly použity organické i anorganické kyseliny, s výhodou 10 až 30 % octová kyselina. Okyselení bylo provedeno při 0 až 30 °C po dobu 0, 5 až

2 hodin, s výhodou za míchání. Okyselený extrakt byl odstředěn za odstranění vzniklé sraženiny a získání roztoku obsahujícího povrchový antigen. Tato procedura je výhodná tím, že se v jednom kroku odstředění odstraní buněčné zbytky, tuky a kontaminující bílkoviny zároveň a výtěžek povrchového antigenu je vysoký následkem předešlého kroku rozpuštění povrchového antigenu v oblasti vysokého pH.

Zvýšení a následné snížení pH buněčného extraktu stabilizuje schopnost povrchového antigenu tvořit částice a je velmi účinné při odstraňování tuků a kontaminujících bílkovin.

Bohužel pokud je v kroku rozrušování buněk jako chaotropní sůl použit thiokyanid, dochází při okyselení k uvolnění odporného zápachu. Thiokyanidová sůl je sama o sobě neškodná látka bez barvy a zápachu a thiokyanidový iont je v roztoku stabilní. A tedy zápach uvolněný v kroku okyselení vzniká zřejmě v souvislosti s reakcí thiokyanidu s některou z látek v buněčném extraktu. Tento zápach je pro pracovníky snesitelný, pokud se jedná o izolaci v malém měřítku, ale při zpracování velkých množství je vhodné zmíněný thiokyanid před okyselením odstranit.

Thiokyanid byl s výhodou odstraněn přidáním vhodné soli k buněčnému extraktu za vysrážení thiokyanidu spolu s některými kontaminujícími proteiny ihned po výše zmíněném kroku b), odstředěním a diafiltrací vzniklého roztoku. Povrchový antigen se v průběhu této procedury nesráží. Dále je odstranění thiokyanidu spojeno s odstraněním části kontaminujících proteinů, které usnadňuje následující procedury izolace.

K odstranění zápachu byly s výhodou přidány soli vícemocných aniontů, např. síran sodný a síran amonný na koncentraci 8 až 15 g na 100 cm³ buněčného extraktu. Sůl se přidává po extrakci povrchového antigenu z buněčné membrány a směs se nechá reagovat za laboratorní teploty 0,5 až 2 hodiny bez míchání. Vzniklá sraženina se odstraní běžnými způsoby, např. odstředěním, za získání roztoku obsahujícího povrchový antigen. Vzniklý roztok se podrobí opakované diafiltraci za odstranění thiokyanidu a síranu. V tomto kroku se s výhodou používá pufr s pH 6 až 8. Po přidání soli, odstředění a diafiltrací byl vzniklý roztok podroben krokům c) a d).

Roztok získaný v kroku d), který obsahuje povrchový antigen, byl podroben chemickému působení silikagelu za použití kolonové nebo dávkové metody, s výhodou dávkové metody. Pro tento krok je vhodný mikrokrytalický silikagel s povrchem 100 až 500 m²/g, s výhodou byl použit Aerosil 380 (Degussa, Germany). Roztok obsahující povrchový antigen se spojí s vodnou suspenzí silikagelu při pH 6 až 8 a při teplotě 4 až 30 °C se intenzivně míchá 2 až 16 hodin. Množství suchého silikagelu pro adsorpci povrchového antigenu bylo s výhodou 5 % (hmotnostní) z váhy buněčného koláče jako základu. Komplex povrchový antigen-silikagel se z roztoku oddělí běžnými metodami, např. odstředěním.

Následně byl komplex promyt např. pufrům s pH 6 až 8, s výhodou pufrům fosforečnan sodný - chlorid sodný, za odstranění zbytku kontaminujících proteinů ze silikagelu. Povrchový antigen byl ze silikagelu desorbován vhodným pufrům za 2 hodiny. Konkrétně byl v tomto kroku použit pufr s pH 8,8 až 11,0, s výhodou uhličitan sodný - hydrogenuhličitan sodný. Pufr dále obsahoval močovinu v koncentraci 1 až 8 M a povrchově aktivní látku, s výhodou deoxycholát sodný v koncentraci 0,1 až 0,3 g na 100 cm³ pufru. Silikagel pak byl z roztoku odstraněn použitím běžných způsobů, např. odstředěním, za získání roztoku obsahujícího povrchový antigen. Bohužel, pokud se použije při desorpci deoxycholát sodný, je nezbytné jej odstranit opakovanou diafiltrací.

Roztok získaný předcházejícím postupem, který obsahuje povrchový antigen, byl dále čištěn hydrofobní kolonovou chromatografií, kde byl s výhodou jako hydrofobní fáze použit agarózový gel s fenyllovými zbytky. Před spojením roztoku s hydrofobní fází byla tato ekvilibrována pufrům s pH 8,8 až 11,0 který byl stejný jako v předešlém kroku. Pufr s výhodou obsahoval močovinu

v koncentraci 1 až 4 M za účelem maximálního odstranění kontaminujících bílkovin, které jsou méně hydrofobní než povrchový antigen.

5 Následně byl roztok obsahující povrchový antigen nalit na kolonu za spojení s její náplní. Kolona byla důkladně promyta rovnovážným pufrům obsahujícím 10 až 40 hmotn. % ethylenglykolu za odstranění poměrně slabě adsorbovaných kontaminujících proteinů z materiálu náplně. Povrchový antigen navázaný na hydrofobní fázi byl vymyt rovnovážným pufrům obsahujícím 60 až 80 hmotn. % ethylenglykolu.

10 Tato hydrofobní kolonová chromatografie představuje velmi účinný čisticí krok, kdy byla odstraněna většina zbylých nečistot roztoku po adsorpci na silikagelu. Touto metodou byly odstraněny především pyrogenní látky, které se jinak běžnými metodami odstraňují těžko. Močovina a ethylenglykol, obsažené ve frakcích obsahujících povrchový antigen byly odstraněny např. dialýzou nebo opakovanou diafiltrací, kdy byl s výhodou použit pufr s pH 6 až 8.

15 Frakce obsahující povrchový antigen, získané hydrofobní kolonovou chromatografií, byly dále čištěny gelovou filtrační chromatografií se separací podle velikosti až do té míry, že izolovaný antigen mohl být použit pro přípravu vakcíny.

20 Příkladem polární matrice, která byla použita jako náplň do kolony je agarózový gel, dextranový gel a polyakrylamid s maximální propouštěnou hodnotou molekulové hmotnosti 1 000 000, s výhodou 5000 až 500 000. Gelová filtrační chromatografie se separací podle velikosti byla provedena nalitím frakcí obsahujících povrchový antigen na kolonu ekvilibrovanou Tris nebo fosforečnanovým pufrům s pH 6 až 8, který obsahoval chlorid sodný v koncentraci 0,1 až 25 0,2 M, a elucí povrchového antigenu stejným pufrům.

30 Frakce obsahující povrchový antigen byly spojeny a čistota povrchového antigenu a přítomného peptidu preS2 byla zjištěna pomocí SDS-PAGE. Jak bylo ověřeno různými experimenty v následujících Příkladech, povrchový antigen izolovaný způsobem, jehož se týká předkládaný vynález, je tak čistý a obsah peptidu preS2 je tak vysoký, že izolovaný antigen může být přímo použit pro přípravu vakcíny.

Příklady provedení vynálezu

35 Následující Příklady a Srovnávací příklady jsou určeny pouze pro ilustraci a prezentaci předkládaného vynálezu a nelze je pokládat za omezení rámce vynálezu.

40 Kromě toho procentuální obsahy uvedené níže pro pevnou látku v pevné směsi, kapalinu v kapalně a pevnou látku v kapalně směsi jsou hmotn. % a hmotn./objem % bez jinak určené specifikace.

Příklad 1

45 (Krok 1) Rozrušení kvasinkových buněk

50 Rekombinované *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 0098BP, které jsou schopné poskytnout povrchový antigen hepatitidy B obsahující peptid preS2, byly kultivovány při 27 °C v 30 l YEPD prostředí (1 % kvasinkového extraktu, 2 % kvasinkové peptonové výživy, 1,6 % glukózy). Takto získaný 70 g kvasinkový buněčný koláč byl smísen se 140 ml pufru 1 (50mM Tris, pH 7,2; 1M thiokyanid sodný, 0,15M chlorid sodný, 10mM ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) a 1mM fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)) a směs byla přidána do kontejneru kuličkové

třepačky (Biospec Products. OKLA, USA) obsahujícího 210 ml skleněných kuliček s průměrem 0,5 mm.

5 Kontejner byl ponořen do lázně led-voda a kuličková třepačka byla třikrát zapnuta v 15minutových intervalech pokaždé na 5 minut. Vzniklý buněčný homogenát byl oddělen od skleněných kuliček, skleněné kuličky byly promyty 210 ml pufru 1 a takto získaný roztok byl spojen s buněčným homogenátem.

(Krok 2) Extrakce a rozpuštění povrchového antigenu

10

K buněčnému homogenátu získanému v Kroku 1 bylo přidáno 0,1 g polysorbátu 20 na 100 cm³ buněčného homogenátu a směs byla míchána za laboratorní teploty 2 hodiny.

15 Roztok byl alkalizován přidávkem 5N hydroxidu sodného na pH 11,5 a míchán za laboratorní teploty 1 hodinu. Vzniklý roztok byl okyselen přidávkem 20 % octové kyseliny na pH 5,2 a míchán za laboratorní teploty 30 min a pak ponechán stát 30 min.

Roztok byl odstředěn při 8 °C za odstranění buněčných zbytků a sraženiny.

20 Roztok obsahující povrchový antigen byl neutralizován přidávkem 5N hydroxidu sodného na pH 7,2. Objem roztoku v této fázi postupu byl 300 ml.

(Krok 3) Adsorpce a desorpce za použití silikagelu

25

Suchý silikagel byl smíšen s vodou za přípravy 5 % suspenze (suchá váha/objem suspenze), 70 ml této suspenze bylo přidáno k roztoku získanému v Kroku 2 a tato směs byla míchána za laboratorní teploty 2 hodiny. Vzniklý roztok byl odstředován při 5500 otáčkách.min⁻¹ 10 min za odstranění kapalného podílu a usazený silikagel s adsorbovaným povrchovým antigenem byl dvakrát promyt fosforečnanovým pufrům (pH 7,2) obsahujícím 0,15M chlorid sodný.

30

Promytý silikagel byl přidán k 70 ml 50mM uhličitanového pufru obsahujícího 1 M močovinu a směs byla míchána za laboratorní teploty 1 hodinu za desorpce povrchového antigenu ze silikagelu. V tomto stadiu měl pufr pH 9,2. Roztok byl odstředován (Beckman JA14 rotor) při 12 000 otáčkách.min⁻¹ 30 min za získání kapaliny obsahující povrchový antigen.

35

Množství povrchového antigenu hepatitidy B v roztoku bylo 6,5 mg podle Auzyne aparátu (Abbot. USA).

40

Srovnávací příklad

Stejná procedura jako v Příkladu 1 byla zopakována s tím, že pufr 1 neobsahoval thiokyanid sodný za získání roztoku izolovaného povrchového antigenu. Následkem toho množství povrchového antigenu hepatitidy B v roztoku bylo 7,1 mg podle Auzyne aparátu.

45

Roztoky povrchového antigenu získané v Příkladu 1 a Srovnávacím příkladu byly podrobeny 15 % dodecylsírán sodný polyakrylamid gelové elektroforéze (SDS-PAGE) a následnému vyvolání stříbrem. Výsledek je na obr. 1, kde dráhy 1 a 2 představují roztoky povrchového antigenu získané v Příkladu 1 a Srovnávacím příkladu. A zde ukazuje proužek nedotčeného proteinu a B a C proteinové fragmenty jako výsledek ataku proteázy.

50

Jak je vidět na obr. 1, byl způsobem, kterého se týká předkládaný vynález, ve vysokém výtěžku izolován z kvasinkových buněk povrchový antigen s vysokým obsahem peptidu preS2.

Příklad 2

(Krok 1) Rozrušení kvasinkových buněk

5

Rekombinované *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 0098BP, které jsou schopné poskytnout povrchový antigen hepatitidy B obsahující peptid preS2, byly kultivovány při 27 °C v 300 l YEPD prostředí. Takto získaný 3kg kvasinkový buněčný koláč byl smíchán se 6 l pufru 1 a směs byla dvakrát prolita přes Dynamill (Glenmills, Japan) obsahující 3 l skleněných kuliček s průměrem 0,5 mm při 10 °C a průtoku 650 ml/min za rozrušení kvasinkových buněk. Vzniklý buněčný homogenát byl oddělen od skleněných kuliček, skleněné kuličky byly promyty 9 l pufru 1 a takto získaný roztok byl spojen s buněčným homogenátem. Množství HBsAg v roztoku bylo 754 mg podle Auzyne aparátu.

10

15 (Krok 2) Extrakce a rozpuštění povrchového antigenu

K buněčnému homogenátu získanému v Kroku 1 bylo přidáno 0,1 g polysorbátu 20 na 100 cm³ buněčného homogenátu a směs byla míchána za laboratorní teploty 2 hodiny.

20

Roztok byl alkalizován přidávkem 5 N hydroxidu sodného na pH 11,5 a míchán za laboratorní teploty 1 hodinu. Vzniklý roztok byl okyselen přidávkem 20 % octové kyseliny na pH 5,2 a míchán za laboratorní teploty 30 min a pak ponechán stát 30 min.

Roztok byl odstředěn při 8 °C za odstranění buněčných zbytků a sraženiny.

25

Roztok obsahující povrchový antigen byl neutralizován přidávkem 5 N hydroxidu sodného na pH 7,2. Objem roztoku byl nakonec 12 l a množství HBsAg v roztoku bylo 1250 mg podle Auzyne aparátu.

30

Výtěžek povrchového antigenu byl 165,8 hmotn. % vzhledem k základnímu množství povrchového antigenu zjištěnému v Kroku 1. Tento neočekávaně vysoký výtěžek je výsledkem vlivu povrchově aktivní látky a báze, který zvyšuje antigenicitu a podporuje rozpustnost povrchového antigenu.

35

(Krok 3) Adsorpce a desorpce za použití silikagelu

Roztok získaný v Kroku 2 byl zředěn dvojnásobným objemem 0,15 M chloridu sodného a pak adsorbován na silikagelu (Aerosil 380) v souladu s následující procedurou. Suchý silikagel byl smíšen s vodou za přípravy 10 % suspenze (suchá váha/objem suspenze), 1,5 l této suspenze bylo 40 přidáno k roztoku získanému v Kroku 2 a tato směs byla míchána při 4 °C přes noc.

Vzniklý roztok byl odstřeďován 10 min při 5500 otáčkách.min⁻¹ za odstranění kapalného podílu a usazený silikagel s adsorbovaným povrchovým antigenem byl dvakrát promyt fosforečnanovým pufrem (pH 7,2) obsahujícím 0,15M chlorid sodný.

45

Promytý silikagel byl přidán k 3 l 50mM uhličitánového pufru (pH 9,5) obsahujícího 1M močovinu a směs byla míchána za laboratorní teploty 2 hodiny za desorpce povrchového antigenu ze silikagelu. V tomto stadiu měl pufr pH 9,2. Roztok byl odstřeďován při 8700 otáčkách.min⁻¹ 30 min za získání kapaliny obsahující povrchový antigen.

50

Množství HBsAg v roztoku bylo 895 mg podle Auzyne aparátu (výtěžek: 118,7 hmotn. %).

(Krok 4) Hydrofobní kolonová chromatografie

5 K roztoku získanému v Kroku 3 obsahujícímu povrchový antigen byla přidána močovina tak, že její koncentrace byla 4M a vzniklý roztok byl nalit na fenylagarózovou kolonu ekvilibrovanou 50mM uhličitanovým pufrům (pH 9,2) obsahujícím 4M močovinu. Kolona byla promyta stejným pufrům obsahujícím 20 % ethylenglykolu a pak byl přidán stejný pufr obsahující 60 % ethylenglykolu za účelem vymytí povrchového antigenu.

10 Frakce obsahující povrchový antigen byly spojeny a zfiltrány přes Amicon diafiltrační systém (Amicon, USA) s maximální molekulovou hodnotou 100 000 za odstranění močoviny a ethylenglykolu z eluátu a vzniklý roztok byl zakonzentrován pomocí stejného systému.

Množství HBsAg ve filtrátu bylo 546 mg podle Auzyne aparátu (výtěžek: 72,4 hm. %).

15 (Krok 5) Gelová filtrační chromatografie

20 Kolona byla naplněna 8 l Sepharosy CL-48 (Pharmacia, USA) a ekvilibrována fosforečnanovým pufrům (pH 7,2) obsahujícím 0,15M chlorid sodný. Koncentrát obsahující povrchový antigen, který byl získán v Kroku 4 byl nalit na kolonu a eluován stejným pufrům, za získání frakcí obsahujících povrchový antigen.

25 Množství HBsAg (zahrnující nedotčený antigen i fragmenty po ataku proteázy) ve spojených frakcích bylo 540 mg podle Auzyne aparátu (výtěžek: 71,6 hm. %) a čistota povrchového antigenu byla 98,2 %. Obsah peptidu preS2 ve veškerém povrchovém antigenu byl podle SDS-PAGE 75 %. Roztok takto získaného izolovaného povrchového antigenu byl zfiltrován přes filtr mající velikost pórů 0,2 μ m (Corning, USA) a filtrát byl uložen při 4 °C.

30 Příklad 3

(Krok 1) Rozrušení kvasinkových buněk

35 Rekombinované *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 0098BP byly kultivovány při 27 °C v 300 l YEPD prostředí. Takto získaný 4 kg kvasinkový buněčný koláč byl smíchán s 8 l pufru 1 a směs byla dvakrát prolita přes Dynamill (Glenmills, Japan) obsahující 3 l skleněných kuliček s průměrem 0,5 mm při 10 °C a průtoku 650 ml/min za rozrušení kvasinkových buněk.

40 Vzniklý buněčný homogenát byl oddělen od skleněných kuliček, skleněné kuličky byly promyty 12 l pufru 1 a takto získaný roztok byl spojen s buněčným homogenátem.

(Krok 2) Extrakce a rozpuštění povrchového antigenu

45 K buněčnému homogenátu získanému v Kroku 1 bylo přidáno 0,1 g polysorbátu 20 na 100 cm³ buněčného homogenátu a směs byla míchána za laboratorní teploty 2 hodiny.

Ke směsi byl přidán nasycený roztok síranu amonného na konečnou koncentraci 10 g na 100 cm³ a směs byla míchána za laboratorní teploty 1 hodinu. Vzniklý roztok byl odstředěn při 8 °C za odstranění buněčných zbytků a sraženiny.

50 Roztok byl zfiltrován na Amicon diafiltračním systému (Amicon, USA) s maximální molekulovou hodnotou 100 000 za použití 20mM Tris pufru (pH 7,5) za účelem odstranění thiokyanidu a síranu sodného a zkonzentrován za použití stejného systému na konečný objem 6 l.

Koncentrát byl alkalizován přidavkem 5N hydroxidu sodného na pH 11,5 a míchán za laboratorní teploty 1 hodinu. Vzniklý roztok byl okyselen přidavkem 20 % octové kyseliny na pH 5,2 a míchán za laboratorní teploty 30 min a pak ponechán stát 30 min. Roztok byl odstředěn při 8 °C za odstranění buněčných zbytků a sraženiny.

5

Roztok byl neutralizován přidavkem 5N hydroxidu sodného na pH 7,2 a množství HBsAg v roztoku bylo 1400 mg podle Auzyne aparátu.

(Krok 3) Adsorpce a desorpce za použití silikagelu

10

Roztok získaný v Kroku 2 byl adsorbován na silikagelu (Aerosil 380) v souladu s následující procedurou. Suchý silikagel byl smísen s vodou za přípravy 10 % suspenze (suchá váha/objem suspenze), 2 l této suspenze byly přidány k roztoku získanému v Kroku 2 a tato směs byla míchána při 4 °C přes noc.

15

Vzniklý roztok byl odstředován 10 min při 5500 otáčkách.min⁻¹ za odstranění kapalného podílu a usazený silikagel s adsorbovaným povrchovým antigenem byl dvakrát promyt fosforečnanovým pufrům (pH 7,2) obsahujícím 0,15M chlorid sodný.

20

Promytý silikagel byl přidán k 4 l 50mM uhličitanového pufru (pH 9,5) obsahujícího 1M močovinu a směs byla míchána za laboratorní teploty 2 hodiny za desorpce povrchového antigenu ze silikagelu. V tomto stadiu měl pufr pH 9,2. Roztok byl odstředován při 8700 otáčkách.min⁻¹ 30 min za získání kapaliny obsahující povrchový antigen.

25

Množství HBsAg v roztoku bylo 840 mg podle Auzyne aparátu (výtěžek: 118,7 %).

(Krok 4) Hydrofobní kolonová chromatografie

30

K roztoku získanému v Kroku 3 obsahujícímu povrchový antigen byla přidána močovina tak, že její koncentrace byla 4 M a vzniklý roztok byl nalit na fenylagarózovou kolonu ekvilibrovanou 50mM uhličitanovým pufrům (pH 9,2) obsahujícím 4M močovinu. Kolona byla promyta stejným pufrům obsahujícím 20 % ethylenglykolu a pak byl přidán stejný pufr obsahující 60 % ethylenglykolu za účelem vymytí povrchového antigenu.

35

Frakce obsahující povrchový antigen byly spojeny a zfiltrány přes Amicon diafiltrační systém (Amicon, USA) s maximální molekulovou hodnotou 100 000 za odstranění močoviny a ethylenglykolu z eluátu a vzniklý roztok byl zakoncentrován pomocí stejného systému.

Množství HBsAg ve filtrátu bylo 527 mg podle Auzyne aparátu (výtěžek: 72,4 hm. %).

40

(Krok 5) Gelová filtrační chromatografie

45

Kolona byla naplněna 8 l Sepharosy CL-48 (Pharmacia, USA) a ekvilibrována fosforečnanovým pufrům (pH 7,2) obsahujícím 0,15M chlorid sodný. Koncentrát obsahující povrchový antigen, který byl získán v Kroku 4, byl nalit na kolonu a eluován stejným pufrům, za získání frakcí obsahujících povrchový antigen.

50

Množství virového povrchového antigenu hepatitidy B ve spojených frakcích bylo 480 mg podle Auzyne aparátu (výtěžek: 71,6 hm. %) a čistota povrchového antigenu byla 98,9 %. Obsah peptidu preS2 ve veškerém povrchovém antigenu byl podle SDS-PAGE 75 %. Roztok takto získaného izolovaného povrchového antigenu byl zfiltrován přes filtr mající velikost pórů 0,2 µm (Corning, USA) a filtrát byl uložen při 4 °C.

Příklad 4

5 Imunogenicitu peptidů S a preS2 v povrchových antigenech získaných v Příkladech 2 a 3 (dále značených "povrchový antigen 2" a "povrchový antigen 3") byla potvrzena v souladu s následujícími pokusy na morčatech.

10 1 ml (200 g/ml) povrchového antigenu 2 nebo 3 byl smísen s 18 ml fosforečnanového pufru (pH 7,2) obsahujícího 0,15M chlorid sodný a směs byla zfiltrována pomocí filtrační stříkačky mající vnitřní průměr 0,2 µm. Filtrát byl smíchán s 1 ml 3 % alhydrogelu (Superfos Biosector, Dánsko). Tato procedura byla provedena ve sterilních podmínkách na čistém stole.

15 Každému z jedenácti morčat vážících 350 g byl dvakrát v intervalu 15 dnů podán pod kůži 1 ml dříve připraveného kompozita povrchového antigenu 2 nebo 3. Po 30 dnech po první injekci byly morčatům odebrány krevní vzorky a byla z nich připravena séra. Séra byla analyzována pomocí Ausab aparátu a byla zjištěna 100 % tvorba protilátek proti S peptidu povrchového antigenu 2 nebo 3 a GMTs hodnoty povrchového antigenu 2 a 3 byly 33,38 a 29,77 mIU/ml.

20 Stupeň tvorby protilátek proti peptidu preS2 byl zjišťován v souladu s následující procedurou. 50 µl (1 mg/ml) peptidu preS2 s 26 N-koncovými aminokyselinami, který byl připraven pomocí peptidového syntetizátoru (Applied Biosystems, USA) za použití automatizované syntézy peptidu na pevné fázi, a 20 µl (10 mg/ml) poly L-lysinu bylo přidáno k 200 µl 50mM octanového pufru (pH 4,5). Ke směsi bylo přidáno 10 µl 1 % EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid) a vzniklá směs byla reagována 1 hodinu při 37 °C. Tato směs pak byla zředěna 20 ml
25 10mM uhličitanového pufru (pH 9,6) a nanášena na mikrotitrační desku ELISA s 96 jamkami, 200 µl do každé jamky. Deska byla inkubována 20 h za laboratorní teploty za adsorpce peptidu na povrchu jamek a pak třikrát omyta destilovanou vodou.

30 Do jamek bylo přidáno 250 µl/jamku PBS obsahujícího 0,5 % kaseinu a mikrotitrační deska byla inkubována přes 2 h za laboratorní teploty za účelem prevence jakýchkoli nespecifických reakcí, ke kterým později dochází. Do každé jamky byl přidán pozitivní a negativní regulátor a 200 µl/jamku sér morčat, která byla postupně desetkrát zředěna PBS (pokusná skupina). Mikrotitrační deska byla inkubována 4 h za laboratorní teploty a pak pětkrát omyta TTBS
35 pufrům (0,9 % chlorid sodný, 0,05 % polysorbátu 20, 10 mM Tris, pH 7,5). Roztok obsahující morčecí anti-morče protilátku značenou křenovou peroxidázou (HRP), který byl zředěn 4000-násobným objemem PBS obsahujícím 0,5 % kaseinu byl nanášen do jamek (200 µl/jamku). Výsledná mikrotitrační deska s jamkami byla inkubována při 37 °C 1 hodinu a pětkrát omyta TTBS pufrům.

40 Nato bylo přidáno do každé jamky 200 µl živného roztoku pro křenovou peroxidázu, který byl připraven rozpuštěním 200 µg tetramethylbenzidinu (TMB) v 20 µl DMSO, přidáním 10 ml 0,1M octanového pufru (pH 5,1) a 20 µl 30 % peroxidu vodíku a doplněním objemu roztoku na 20 ml destilovanou vodou, a reagováno do vývoje zbarvení. Dále bylo do každé jamky přidáno
45 50 µl 1 N kyseliny sírové k zastavení vývoje zbarvení a byla změřena optická hustota každé jamky při 450 nm Microplate snímačem (Dynatech MR5000, USA).

Pokud byla optická hustota pokusné skupiny větší než určitá hodnota (dvojnásobek hodnoty optické hustoty negativního provedení), bylo stanoveno, že se vytvořily protilátky proti peptidu preS2 a byla spočtena morčata s pozitivní protilátkovou reakcí.

50 Výsledkem toho bylo, že povrchové antigeny 2 i 3 vyvolaly 100 % tvorbu protilátek.

Příklad 5

Za účelem zjištění imunogenicity peptidu S a preS2 v povrchových antigenech 2 a 3 byly provedeny následující pokusy na myších, 1 ml (200 µg/ml) povrchového antigenu 2 nebo 3 byl smíšen s 18 ml fosforečnanového pufru (pH 7,2) obsahujícího 0,15M chlorid sodný a směs byla zfiltrována pomocí filtrační stříkačky mající vnitřní průměr 0,2 µm. Filtrát byl smíšen s 1 ml 3 % alhydrogelu (Superfos Biosector, Dánsko).

Vzniklý roztok obsahující 10 µg/ml povrchového antigenu 2 nebo 3 byl zředěn alhydrogelovým ředidlem (přípraveným rozpuštěním alhydrogelu) na konečnou koncentraci 0,15 % a fosforečnanovým pufrům (pH 7,2) obsahujícím 0,15M chlorid sodný za přípravy 4 vzorků (0,01; 0,03; 0,09; 0,27 ng/ml) povrchového antigenu. Kontejnery obsahující vzorky byly dostatečně míchány, aby se předešlo srážení alhydrogelu. Tato procedura byla provedena ve sterilních podmínkách na čistém stole.

Osmdesát 5 týdnů starých myší bylo rozděleno do osmi skupin po deseti a každé myši byl peritoneálně (pobřišnice) podán dříve připravený zředěný roztok povrchového antigenu 2 nebo 3. Po 28 dnech od podání byly od všech myší odebrány krevní vzorky a byla z nich připravena séra. Tvorba protilátek proti S peptidu v povrchovém antigenu 2 nebo 3 byla analyzována pomocí Ausab aparátu (Abbot, USA) a stupeň jejich tvorby je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1

Koncentrace povrchového antigenu (ng/ml)	Stupeň tvorby protilátek proti povrchovému antigenu (%)	
	Povrchový antigen 2	Povrchový antigen 3
0,01	10	10
0,03	20	40
0,09	80	60
0,27	90	100

Protilátky proti preS2 peptidu v povrchovém antigenu 2 nebo 3 byly stanoveny v souladu s postupem v Příkladu 4 a stupeň jejich tvorby je uveden v Tabulce 2.

Tabulka 2

Koncentrace povrchového antigenu (ng/ml)	Stupeň tvorby protilátek proti povrchovému antigenu (%)	
	Povrchový antigen 2	Povrchový antigen 3
0,01	10	10
0,03	20	40
0,09	80	60
0,27	90	100

Efektivní dávka 50 (ED₅₀) peptidu S a preS2 byla kalkulována podle příslušného způsobu (Finney. D. J., Probit Analysis, 1971) za použití výše získaného stupně tvorby protilátek. Výsledkem toho byla ED₅₀ v povrchovém antigenu 2 peptidu S 0,0580 ng/ml a peptidu preS2 0,0577 ng/ml a v povrchovém antigenu 3 peptidu S 0,0455 ng/ml a peptidu preS2 0,0469 ng/ml. Protože je ale obsah peptidu preS2 v povrchovém antigenu 2 nebo 3 75 %, ED₅₀ peptidu preS2 se považuje za nižší než jsou spočtené hodnoty získané výše.

Jak ukazují výše uvedené Příklady, může být v souladu s předkládaným vynálezem z rekombinovaných kvasinkových buněk získán povrchový antigen hepatitidy B s vysokým obsahem peptidu preS2 a s vysoce imunogenními peptidy S a preS2.

5

Srovnávací příklad

Postup podle příkladu 1 byl zopakován s tím rozdílem, že krok přidání 5M hydroxidu sodného, kterým se pH roztoku upravilo na hodnotu 11,5 (v kroku 2), byl vynechán. Antigenicita roztoku získaného po odstředění byla pouze 63 % antigenicity pozorované v příkladu 1, zatímco optická hustota při 600 nm měla hodnotu 1,76, což je významně více než hodnota optické hustoty 0,07 pozorovaná v příkladu 1. Tyto výsledky ukazují, že pokud se vynechá krok alkalizace, antigenicita se sníží a množství kontaminujících proteinů se zvýší.

Konkrétně má krok získaný v příkladu 1 o 47 % vyšší antigenicitu než roztok získaný ve srovnávacím příkladu. Toto zvýšení antigenicity je způsobeno zvýšením výtěžku HbsAg-PreS2, zatímco způsob podle srovnávacího příkladu produkuje hlavně HbsAg obsahující peptid S s nízkou antigenicitou.

Ačkoli byl vynález popsán s ohledem na výše zmíněnou specifickou konkretizaci, tímto se říká, že ve vynálezu mohou být provedeny různé modifikace a změny technikami používanými v tomto oboru, na které se vynález rovněž vztahuje jak je uvedeno v připojených nárocích.

25

P A T E N T O V É N Á R O K Y

30 1. Způsob izolace povrchového virového antigenu hepatitidy B obsahujícího peptid preS2 z buněk rekombinovaného organismu, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se

(a) rozruší buňky pomocí pufru obsahujícího chaotropní sůl, čímž se získá buněčný homogenát;

35 (b) přidá povrchově aktivní látka k buněčnému homogenátu získanému v kroku (a), čímž se extrahuje povrchový antigen z buněčné membrány buněk;

(c) alkalizací extraktu zvýší rozpustnost a podpoří se vznik částic povrchového antigenu v extraktu získaném v kroku (b);

40

(d) vysráží a odstraní se buněčné zbytky, lipidy a kontaminující proteiny z extraktu z kroku (c) okyselením a odstředěním extraktu, čímž se získá roztok obsahující povrchový antigen;

45 (e) uvádí roztok z kroku (d) do kontaktu se silikagelem, čímž dojde k adsorpci povrchového antigenu na silikagel, vymyjí se kontaminující proteiny a desorbují se povrchový antigen ze silikagelu za použití pufru, čímž se získá frakce čištěného povrchového antigenu;

(f) provádí hydrofobní kolonová chromatografie s frakcí čištěného povrchového antigenu získaného v kroku (e), čímž se získá frakce obsahující povrchový antigen; a

50

(g) čistí frakce získané v kroku (f) gelovou filtrační chromatografií se separací podle velikosti, čímž se získá povrchový antigen v čisté formě.

2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že v kroku (a) se použije pufr obsahující chaotropní sůl vybranou ze skupiny skládající se z thiokyanidu sodného, guanidiumchloridu a močoviny.
- 5 3. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že v kroku (a) se použije pufr s koncentrací chaotropní soli 1 až 8 M.
- 10 4. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se dále přidá síran sodný nebo síran amonný k buněčnému extraktu získanému v kroku (b) nebo (c) v koncentraci 8 až 15 g na 100 cm³ buněčného extraktu, a následně se odstraní buněčné zbytky a kontaminující příměsi; a roztok se podrobí diafiltraci ještě před krokem (d).
- 15 5. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se v kroku (b) použije povrchově aktivní látka, kterou je polysorbát 20, polysorbát 80, polyoxyethylen-oktylfenylether nebo deoxycholát sodný.
6. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se v kroku (b) použije povrchově aktivní látka v koncentraci 0,1 až 0,5 g na 100 cm³ buněčného homogenátu.
- 20 7. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se v kroku (c) alkalizuje buněčný extrakt získaný v kroku (b) na pH 11,0 až 13,5.
8. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se v kroku (d) upraví pH buněčného extraktu na 4,5 až 6,0.
- 25 9. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že v kroku (e) se použije silikagel s povrchem 100 až 500 m²/g.
- 30 10. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se v kroku (e) desorbuje povrchový antigen ze silikagelu za použití pufru s pH 8,8 až 11,0 a obsahem močoviny, jejíž koncentrace je 1 až 8 M, a povrchově aktivní látky v množství 0,1 až 0,3 g na 100 cm³ pufru.
- 35 11. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se jako povrchově aktivní látka použije deoxycholát sodný.
- 40 12. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se jako hydrofobní stacionární fáze v kroku (f) použije agarózový gel s fenylovými skupinami.
- 45 13. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že hydrofobní kolonová chromatografie v kroku (f) se provádí nanesením frakce obsahující povrchový antigen na kolonu ekvilibrovanou vyrovnávacím pufrem s pH 8,8 až 11,0 obsahujícím močovinu, jejíž koncentrace je 1 až 4 M; promyje se kolona vyrovnávacím pufrem obsahujícím 10 až 40 % hmotnostních ethylenglykolu; a eluuje se povrchový antigen vyrovnávacím pufrem obsahujícím 60 až 80 % hmotnostních ethylenglykolu.
- 50 14. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se gelová filtrační chromatografie se separací podle velikosti v kroku (g) provádí pomocí dextranového gelu nebo polyakrylamidu s maximální propouštěnou hodnotou molekulové hmotnosti 1 000 000.
15. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se gelová filtrační chromatografie se separací podle velikosti v kroku (g) provádí nanesením frakce obsahující povrchový antigen na kolonu ekvilibrovanou Tris nebo fosforečnanovým pufrem s pH 6 až 8 obsahujícím chlorid

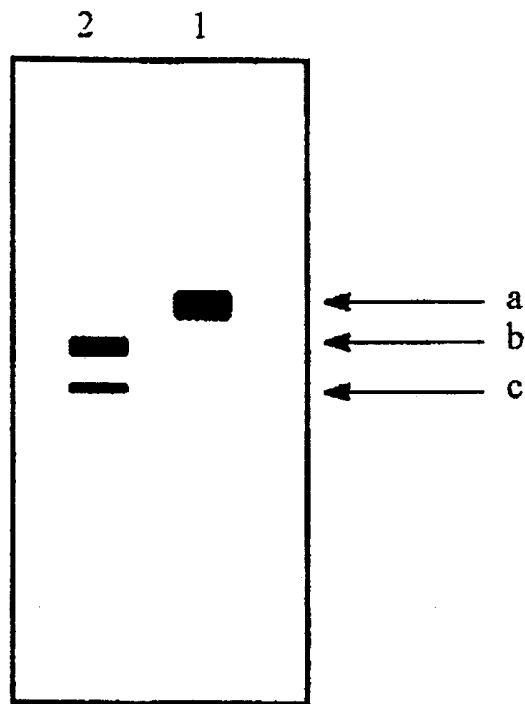
sodný, jehož koncentrace je 0,1 až 0,2 M; a následně se eluuje povrchový antigen stejným pufrem.

5 16. Vakcína proti viru hepatitidy B, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje povrchový antigen izolovaný způsobem podle nároku 1.

10

1 výkres

Obr. 1



Konec dokumentu
