

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19) ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **07.08.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **10.08.2000 18.01.2001**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/0019728 2001/0101334**

(33) Země priority: **GB GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18.06.2003**
(Věstník č. 6/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/EP01/09100**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/012287**

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 385

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 14/02

A 61 K 39/29

C 07 K 1/36

A 61 P 31/20

(71) Přihlašovatel:

**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:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob čištění antigenů HBV

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu výroby antigenu hepatitidy B, vhodného pro použití ve vakcíně, který zahrnuje čištění tohoto antigenu v přítomnosti cysteinu a dále se týká vakcín s obsahem takového antigenu.

Způsob čištění antigenů HBV

Oblast techniky

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.

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.

Podstata vynálezu

V prvním aspektu poskytuje předkládaný vynález způsob výroby antigenu hepatitidy B, vhodného pro použití ve vakcíně, přičemž tento způsob zahrnuje čištění antigenu v přítomnosti redukčního činidla, obsahujícího volnou skupinu -SH.

Předkládaný vynález s výhodou poskytuje způsob výroby stálého antigenu hepatitidy B bez stop thiomersalu, který zahrnuje vyčištění antigenu v přítomnosti redukčního činidla, majícího volnou skupinu -SH.

Antigenní prostředek je obecně beze stop thiomersalu, přičemž thiomersal není ve vyčištěném antigenním produktu detegovatelný za použití spektrofotometrie rtuti, jak je zde popsáno.

Antigenní prostředek hepatitidy s výhodou zahrnuje méně než 0,025 μg rtuti na 20 μg bílkoviny, jak je vhodně měřeno absorpční spektrofotometrií.

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

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

Antigen hepatitidy je s výhodou imunogenní.

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

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

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.

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

Cysteinem je s výhodou L-cystein.

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.

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.

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

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.

Redukčním činidlem je s výhodou cystein, dithiothreitol, glutathion nebo 2-merkapt ethanol.

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.

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.

Antigenem je s výhodou povrchový antigen hepatitidy B.

Příprava povrchového antigenu hepatitidy B je dobře doložena. 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.

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 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.

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-antigenu HBsAg, uvedeného výše.

Vakcína může s výhodou zahrnovat farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku, jako je vhodná adjuvantní látka. Vhodné adjuvantní látky jsou obchodně dostupné, jako například Freundovo 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 tyrosinu; acylované cukry; kationtově nebo aniontově derivatizované polysacharidy; polyfosfazen; 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.

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, favorizovat indukci buněčně zprostředkovaných imunitních odpovědí na podávaný antigen. V upřednostňovaném ztělesnění, při němž je imunitní odpověď převážně 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 v Ann. Rev. Immunol. 7, 145-173, 1989.

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 nemethylovaný. Takové oligonukleotidy jsou dobře známé a jsou popsány například ve WO 96/02555. Imunostimulační sekvence DNA jsou také popsány, například Satem se spoluautory v práci, uveřejněné ve Science 273, 352, 1996.

Jinou upřednostňovanou adjuvantní látkou je saponin, s výhodou saponinový produkt QS21 (dostupný od firmy Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), který může být použit 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 zhášěn 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.

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

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

Vakcína s výhodou navíc obsahuje saponin a lépe saponinový produkt QS21. Jiný zvláště vhodný adjuvantní 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.

Předkládaný vynález dále poskytuje vakcinační prostředek, obsahující povrchový antigen hepatitidy B podle tohoto vynálezu v kombinaci s adjuvantní látkou a navíc obsahující jeden nebo více antigenů, zvolených ze skupiny, sestávající ze záškrťového toxoidu (D), tetanového toxoidu (T), nebuněčných 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 pneumonie a neisserií. Ve vakcinačním prostředku podle předkládaného vynálezu mohou být rovněž kombinovány antigeny, poskytující ochranu vůči dalším chorobám.

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

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

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.

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 Developments in Vaccines" , vydavatelé Voller a spol., University Park Press, Baltimore, Maryland, USA, 1978. Opouzdření (enkapsulace) do liposomů je popsána například Fullertonem v patentu US č. 4 235 877. Spojování (konjugace) bílkovin do makromolekul je uvedeno například Likhitem v patentu US č. 4 372 945 a Armorem se spoluautory v patentu US č. 4 474 757. Použití látky Quil A je popsáno Dalsguaardem s spoluautory v Acta Vet. Scand. 18, 349, 1977. 3D-MPL je dostupný o dfirmy Ribí Immunochem, USA a je popsán v britské

patentové přihlášce č. 2220211 a v patentu US č. 4 912 094. QS21 je popsán v patentu US č. 5 057 540.

Předkládaný vynález je ozřejmen, ne však omezen, následujícími příklady.

Přehled obrázků na výkresech

V následujících příkladech provedení vynálezu:

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; 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. Polohy označovačů, markerů molekulové hmotnosti jsou vyznačeny černými skvrnami: 92 500, 66 200, 45 000, 31 000, 21 500, 14 400.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Způsob výroby povrchového antigenu hepatitidy B v přítomnosti thiomersalu

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

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% ethylenglykol, pH 7,0; 50 mg/l thiomersalu. Thiomersal je do tohoto pufru začleněn pro kontrolu biologického zatížení.

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

Krok iontově výměnné chromatografie se provádí za použití DEAE-matrixu 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.

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.

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 testováním naředění 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 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, jenž 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).

Podrobnosti o způsobu výroby jsou dále popsány v EP 0199698.

Příklad 2

Výroba a charakterizace HBsAg získaného z kvasinek postupem bez thiomersalu.

1. Výroba a čištění HBsAg, získaného z kvasinek

1.1. Přehled výrobního způsobu

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

Na konci kvašení rekombinantního kmene kvasinek ve velkém měřítku se buňky sklídí (shromáždí se) a otevřou se rozštěpením v přítomnosti jemné povrchově aktivní látky, jako je Tween 20. Povrchový antigen je pak izolován vícekrokovým extrakčním 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

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

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

2. Do eluovaných spojených podílů (poolu) z kroku aniontové výměnné chromatografie se přidá cystein (o konečné koncentraci 2 mmol.l⁻¹).

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

Přidání cysteinu v konečné koncentraci 2 mmol.l⁻¹ k eluovaným spojeným podílům z předchozího kroku aniontové výměnné chromatografie zabraňuje srážení a úbytku antigenu během odstředování v hustotním gradientu CsCl.

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, popsaným v Příkladu 1, už nedošlo k žádným jiným změnám výrobního postupu.

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

1.2a

Předpokládá se, že thiomersal, přidaný do pufru pro 4B gelovou chromatografii v koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$, 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.

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 - 0,6 μg rtuti. Tato rtuť není jednoduchou dialýzou plně odstraněna.

V jednom pokusu bylo v objemovém antigenním prostředí naměřeno 0,56 μg rtuti na 20 μg 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 naměřena koncentrace 0,33 μg rtuti na 20 μg bílkoviny.

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

Obsah rtuti byl stanoven za pomoci absorpční spektrofotometrie. Antigen byl naředěn v roztoku, obsahujícím 0,01 % (hmotnost/objem) dvojchromanu draselného, $K_2Cr_2O_7$ a 5 % (objem/objem) 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 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 rtuti na μg bílkoviny.

1.3. Výroba objemového antigenu bez thiomersalu

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

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.

Tabulka 1

složka	množství v ml
aktivní složka - bílkovina, tvořená z alespoň 95 % HBsAg	20 μg
hydroxid hlinitý (adsorbent), vyjádřený jako Al_2O_3	0,95 mg
chlorid sodný	9,0 mg (max)
dihydrát disodného fosfátu	0,98 mg

dihydrát dihydrogenfosfátu 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.

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

2.1. Testy a stanovení, prováděné u vyčištěného objemového antigenu

2.1.1. Základ srovnání

Postupem bez thiomersalu podle tohoto Příkladu (Příkladu 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.

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.

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

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).

Obsah HBsAg byl měřen obchodně dostupnou sadou AUSZYME od firmy Abbott Laboratories, One Abbott Park Road, 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.

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

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

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

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.

2.1.3. SDS-PAGE analýza

Prostředky objemového antigenu byly zkoumány za použití analýzy SDS-PAGE v redukčních podmínkách a barvení prostřednictvím modři "Coomassie 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.

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 vykazaly 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.

Identita polypeptidu 24 000, prokázaného barvivem Coomassie blue nebo sříbrným barvením, byla potvrzena metodou "Western blotting" s králíčími 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

antigenů. Nebyly nalezeny žádné rozdíly mezi objemovým antigenem, připraveným postupem bez použití thiomersalu a šarží HEP2055.

Přítomnost zbytkových kvasinkových bílkovin byla stanovována analýzou prostřednictvím SDS-PAGE v redukujících podmínkách a metodou "Western blotting" s králíčím polyklonálním antisérem 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 šarží HEP2055 je prokázán stálý profil proužků jen s jednou výjimkou.

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.

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 Thresholda	<1 pg	<1 pg	<1 pg	<1 pg

2.1.4. Další biochemické testy a stanovení

2.1.4.1. Obsah DNA

Obsah DNA byl u tří šarží objemového antigenu měřen prahovou metodou (Threshold method, Molecular Devices 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.

2.1.4.2. Aminokyselinové složení

Aminokyselinové složení tří šarží objemových antigenů HEF bylo určováno po kyselé hydrolýze 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.

Nalezená složení souhlasí se složením, určeným pro HEP2055 a s předpokládaným složením, odvozeným ze sekvence DNA. I když počet glycinových zbytků, naměřený pro HEP2055, je blízký očekávanému složení, hodnota 16 až 17 je obvykleji naměřena pro objemné antigeny

prostředky. Průměrný počet nalezených cysteinových zbytků se rovnal předpokládaným čtrnácti, což ukazuje, že v důsledku ovlivnění při kroku na gradientu CsCl se na částici nenavazují žádné další cysteiny.

2.1.4.3.

Množství volného cysteinu, přítomného v objemových antigenních prostředcích, získaných podle zde popsaného způsobu, bylo měřeno po oxidaci částic kyselinou permravní bez předchozí kyselé hydrolýzy. 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.

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.

2.1.4.4. Sekvenční analýza N-konce

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 rutinným postupem.

Tabulka 3: Aminokyselinové 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

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

Prostředky objemového antigenu byly testovány za použití elektronové mikroskopie po fixaci, znehybnění, a barvení uranylacetátem.

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 od částic HEP2055.

2.1.5. Imunologické analýzy

2.1.5.1. Reaktivita (schopnost reakce) s monoklonální protilátkou RF1

Tři prostředky objemového antigenu byly testovány vzhledem ke své schopnosti reagovat s monoklonální protilátkou prostřednictvím inhibice stanovení ELISA. Bylo prokázáno, že monoklonální protilátka RF1 chrání šimpanzy vůči napadení HBV a je 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 myší kmene Balb/c, nebo ve tkáňové kultuře.

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 1:1 s různými naředěními testovaných vzorků HBsAg v PBS (konečné koncentrace se pohybovaly v rozmezí od 100 µg do 0,05 µg/ml).

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.

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 přidavkem $1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$. 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.

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.

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

*IC₅₀ = koncentrace antigenu (ng/ml), inhibující z 50 % vazbu RF1 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.

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

2.1.5.2. Afinita k vazbě monoklonální RF1

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

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

kd: disociační konstanta (s^{-1})

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

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

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

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.

Zjištěné skutečnosti jsou v souladu s výsledky z inhibičního stanovení ELISA, které prokázalo, že antigen, připravený způsobem bez použití thiomersalu, vykazuje zvýšenou presentaci epitopu RF1.

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

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 μ g antigenní bílkoviny v 1 ml). Šrže byly označeny jako DENS001A4, DENS002A4 a DENS003A4.

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 μ g 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 μ g antigenní bílkoviny téměř dvojnásobné.

2.2.1. Reaktivita vakcíny DENS s monoklonální protilátkou RF1

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

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

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 peroxydázový 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 % H_2O_2 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} H_2SO_4 . Poté byly při vlnových délkách 490/630 nm měřeny optické hustoty O.D. a vyneseny do grafu.

Hodnota IC_{50} , 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.

Vakcína, vyrobená z objemového antigenu, získaného pozměněným způsobem, byla srovnána s vakcínou Engerix B™, 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 RF1 je ve srovnání s vakcínou Engerix B™ bez konzervační látky vyžadována přibližně polovina množství vakcíny DENS. To odráží zvýšenou presentaci epitopu RF1 na antigenu HEF/DENS a je v souladu s testy, prováděnými s protilátkou RF1 na vyčištěném objemovém antigenu.

Tabulka 7: Inhibice vazby RF1 formulovanou vakcínou

šarže vakcíny	IC50 (ng/ml) ⁽¹⁾			
	pokus			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 % vazbu protilátky RF1 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 B™, vyráběného podle běžného způsobu výroby antigenu a formulovaného s thiomersalem.

Testovány byly následující šarže:

DENS001A4

DENS002A4

DENS003A4

a ENG2953A4/Q pro srovnání.

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

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

Tabulka 8: Skupiny a dávky 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 μ l	2 μ g
4	- zředěná 5x v PO_4/NaCl	100 μ l	0,4 μ g
5	DENS003A4	100 μ l	2 μ g
6	- zředěná 5x v PO_4/NaCl	100 μ l	0,4 μ g
7	ENG2953A4/Q	100 μ l	2 μ g
8	- zředěná 5x v PO_4/NaCl	100 μ l	0,4 μ g

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

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 %.

VÝSLEDKY

Serologie

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. Analyzována byla pouze séra po imunizaci II (post II).

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

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 B™) v dávce 2 µg a GMT mezi 696 a 1182 EU/ml pro šarže DENS ve srovnání s 627 EU/ml pro monovalentní vakcínu vůči hepatitidě B od SB Biologicals (Engerix B™) 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 odpověď neposkytující myši (s titry menšími než 50 EU/ml) bez přímé vazby na dávky antigenů nebo šarže použité k injekci (ve skupinách 1, 2, 3 a 8 jedna myš na skupinu). Na základě statistické analýzy (Grubbsův test) byly tyto myši z další analýzy vyloučeny.

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

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

Statistická analýza

Dvojsměrná variační analýza byla provedena u titrů anti-HBs po logaritmické transformaci údajů po druhé imunizaci, za použití vakcín (4 šarže) a dávek antigenu (2 μ g a 0,4 μ g) 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 uspořádání 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

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

- 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.

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

skupina	vakcína	dávka	isotyp (%)		
			IgG1	IgG2a	IgG2b
1	DENS001A4	2 μ g	91	4	5
2		0,2 μ g	87	8	5

3	DENS001A4	2 μ g	97	2	1
4		0,2 μ g	87	6	7
5	DENS001A4	2 μ g	98	1	1
6		0,2 μ g	93	4	3
7	ENG2953A4/Q	2 μ g	88	8	4
		0,2 μ g	88	9	3

Příklad 3

Prostředky kombinovaných vakcín

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

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* (určení 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).

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 Biologicals je vyhovující (úbytek obsahu antigenu nepřevyšuje 10 % za rok skladování) bylo vyvozeno, že za nestálost IPV ve vakcíně vůči DTPa-HBV-IPV pravděpodobně zodpovídá složka HBV.

Složkou 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.

V prvním pokusu zjistit, který prvek složky HBV 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 DTP-IPV. Toto pozorování bylo uváženo výrobcí 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 úbytek účinnosti polyovirového antigenu typu 1 až k nedetegovatelným hodnotám (L.A. Sawyer se spoluautory, Vaccine 12, 851-856, 1994).

Za použití adsorpční atomové spektroskopie bylo v antigenu, čištěném podle Příkladu 1, 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.

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 $5,7 \text{ mmol.l}^{-1}$ cysteinu nebyla v zadrženém podílu detegována žádná rtuť (detekční limit testovací metody je $25 \text{ ng Hg}/20 \text{ } \mu\text{g HBsAg}$). Dialyzovaný antigen byl smíchán s objemovým koncentrátem IPV a stálost viru typu 1 byla hodnocena měřením obsahu D-antigenu po inkubaci v trvání 7 dnů při teplotě $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Jako kontroly byly použity objemový koncentrát IPV, nesmíšený s HBsAg a objemový koncentrát IPV, smíšený s HBsAg, neovlivněným cysteinem. Srovnávací titr ELISA byl získán u vzorků, skladovaných 7 dní při teplotě $+2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ až $+8 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 11.

Tabulka 11:

vzorek	obsah D-antigenu (typu 1) ⁽¹⁾		úbytek
	7 dní/ $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$	7 dní/ $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$	
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 ($1 \mu\text{g/ml}$)	30,5	11,0	74 %

(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.

Výše uvedené údaje také ukazují úbytek obsahu D-antigenu v rozsahu 23 % po sedmidenní inkubaci při $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.

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

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.

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.

Ve výrobním způsobu nejsou účinně 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.

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-koncové 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 obkasti 23 000, je ve třech šaržích HBsAg, vyrobených pozměněným způsobem výroby, silně omezeno.

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 standardnímu znehybněnému 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 plasmonové resonance. Vazebné afinity prostředků bez thiomersalu jsou trojnásobně až čtyřnásobně vyšší než u šarže klasického objemového antigenu.

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

Testování účinnosti *in vitro* za použití sady AUSZYME ELISA od firmy Abbott 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 μ g bílkoviny na ml.

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

Tato zvýšená antigennost vakcíny neobsahující thiomersal, vztahující se k RF1, je v souhlasu 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 μ g 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 závislost 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.

Zastupuje:

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob výroby vakcíny proti hepatitidě B, která obsahuje vyčištěný povrchový antigen hepatitidy B a tento antigen obsahuje méně než $0,025 \mu\text{g}$ rtuti na $20 \mu\text{g}$ bílkoviny, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tento antigen se čistí v přítomnosti redukčního činidla, majícího volnou skupinu -SH, a farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vakcína neobsahuje konzervační látku.

3. Způsob podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že konzervační látkou je thiomersal.

4. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že antigen hepatitidy se adsorbuje na hydroxid hlinitý.

5. Způsob podle kteréhokoli z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že surový přípravek antigenu hepatitidy B se

- (a) podrobí gelové permeační chromatografii;
- (b) podrobí iontově výměnné chromatografii; a
- (c) smísí s redukčním činidlem, majícím volnou skupinu -SH.

6. Způsob podle kteréhokoli z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako redukční činidlo se použije cystein, glutathion, dithiothreitol nebo β -merkapt ethanol.

7. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako redukční činidlo se použije cystein.

8. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že cystein se přidává do konečné koncentrace v rozmezí od 1 do 10 mmol.l⁻¹.

9. Způsob podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že cystein se přidává do konečné koncentrace přibližně 2 mmol.l⁻¹.

10. Způsob podle kteréhokoli z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že antigen se před ovlivněním redukčním činidlem čistí v přítomnosti thiomersalu.

11. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vyčištěný antigen je zcela bez obsahu thiomersalu.

12. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vakcína je vakcínou neobsahující thiomersal.

13. Vakcinační prostředek s obsahem vyčištěného antigenu hepatitidy B, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tento antigen obsahuje méně než 0,025 µg rtuti na 20 µg bílkoviny a je získán způsobem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 12.

14. Vakcinační prostředek podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je v kombinaci s adjuvantní látkou.

15. Vakcinační prostředek podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, že adjuvantní látkou je hlinitá sůl.

16. Vakcinační prostředek podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že hlinitou látkou je hydroxid hlinitý.

17. Vakcinační prostředek podle nároků 13 až 16, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje adjuvantní látku, indukující TH-1.

18. Vakcinační prostředek podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že adjuvantní látku, indukující TH-1, je zvolena ze skupiny, zahrnující 3-de-O-acylovaný monofosforyllipid A, saponinový produkt QS21, 3-de-O-acylovaný monofosforyllipid A a saponinový produkt QS21, a oligonukleotid CpG.

19. Vakcinační prostředek podle kteréhokoliv z nároků 13 až 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že nádavkem obsahuje jeden nebo více z antigenů, zvolených ze skupiny, sestávající ze záškrťového toxoidu, tetanového toxoidu, nebuněčných antigenů černého kašle, inaktivovaného viru dětské obrny, antigenu hemofilu influenzae, antigenu hepatitidy A, viru Herpes simplex, a antigenů chlamydií, streptokoka typu B, lidského papilomaviru, streptokoka pneumonie a neisserií.

20. Použití povrchového antigenu hepatitidy B, obsahujícího méně než 0,025 μg rtuti na 20 μg bílkoviny, k přípravě vakcíny vůči hepatitidě, neobsahující konzervační látku, přičemž se tento antigen získává čištěním v přítomnosti redukčního činidla, majícího volnou skupinu -SH.

21. Způsob výroby povrchového antigenu hepatitidy B, vhodného pro použití ve vakcíně, přičemž tento způsob zahrnuje čištění antigenu v přítomnosti redukčního činidla, majícího volnou skupinu -SH, v y z n a č u j í c í s e t í m, že antigen se před ovlivněním redukčním činidlem čistí v přítomnosti thiomersalu.

22. Způsob výroby antigenu hepatitidy B podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vyčištěný antigenní produkt obsahuje méně než 0,025 μg rtuti na 20 μg bílkoviny.

23. Způsob výroby antigenu hepatitidy B podle nároku 21 nebo 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že surový přípravek antigenu hepatitidy B se:

- (a) podrobí gelové permeační chromatografii;
- (b) podrobí iontové výměnné chromatografii; a
- (c) smísí s redukčním činidlem, majícím volnou skupinu -SH.

24. Způsob výroby antigenu hepatitidy B podle nároku 21 až 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako redukční činidlo se použije cystein, glutathion, dithiothreitol nebo β -merkapt ethanol.

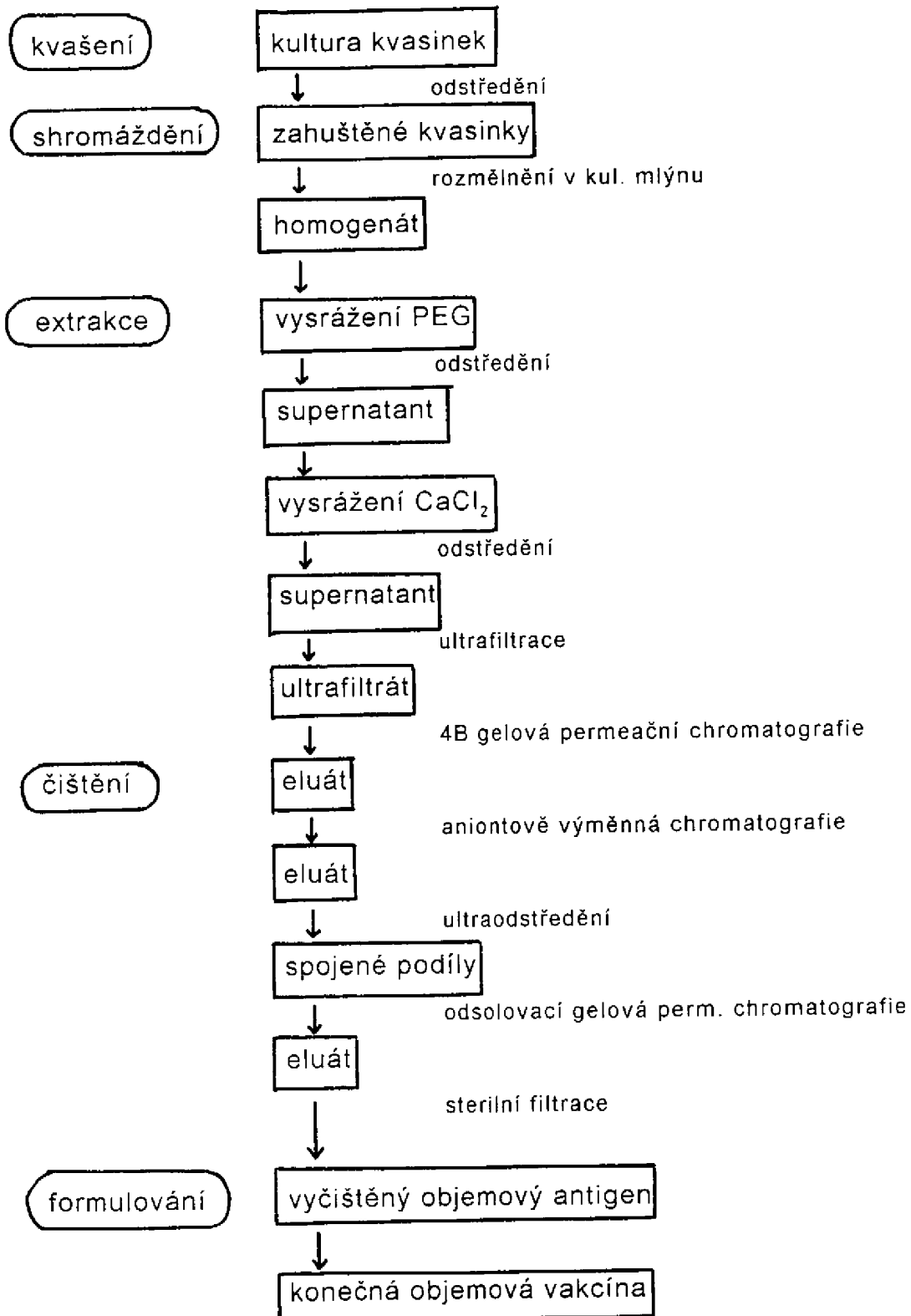
25. Imunogenní antigen hepatitidy B, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tento antigen obsahuje méně než 0,025 μg rtuti na 20 μg bílkoviny, je možné ho získat čištěním v přítomnosti redukčního činidla, majícího volnou skupinu -SH a je před ovlivněním redukčním činidlem čištěn v přítomnosti thiomersalu.

26. Vakcína, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje antigen hepatitidy B, jak je nárokován v nároku 25.

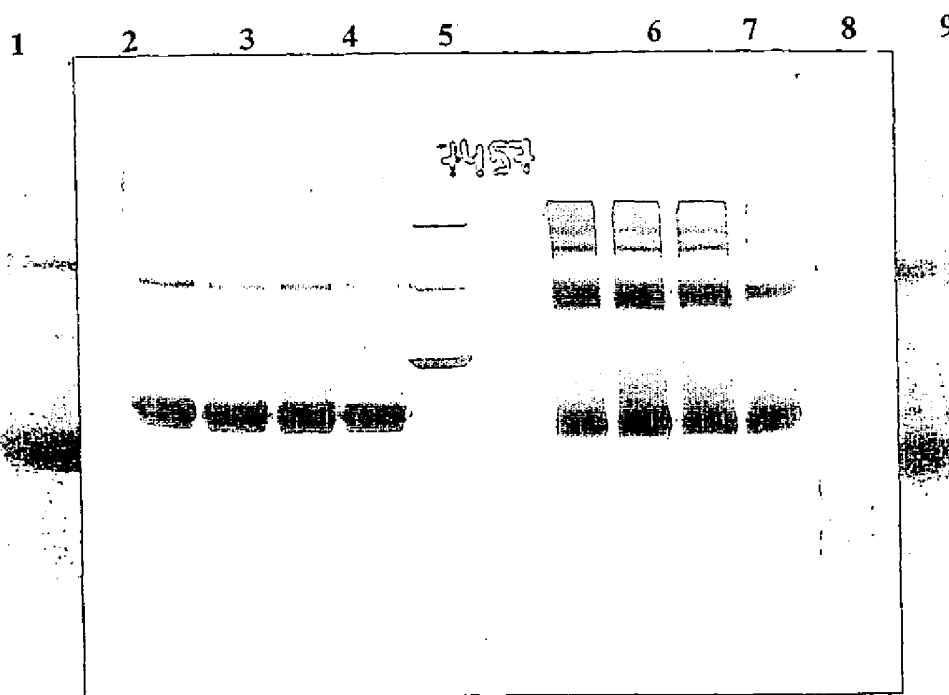
27. Způsob léčby a/nebo profylaxe infekcí vyvolaných virem hepatitidy B, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se lidskému nebo zvířecímu subjektu, trpícímu infekcí hepatitidy B nebo náchylnému k infekci hepatitidou B, podává bezpečné a účinné množství vakcíny podle kteréhokoliv z nároků 13 až 19 a 26.

Zastupuje:

Obr. 1



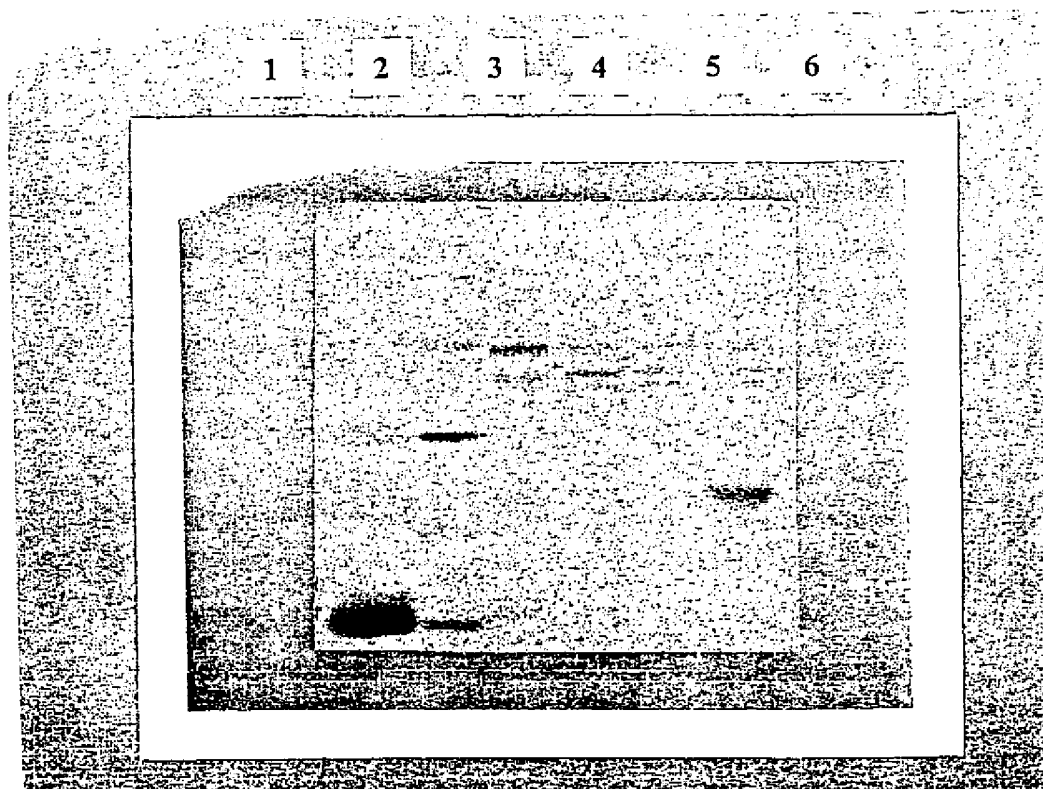
Obr. 2: analýza šarží objemových antigenů prostřednictvím SDS-PAGE (elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného); barvení stříbrem: 1 µg bílkoviny na vzorek.



- 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.