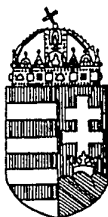


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

206 125 B

(21) A bejelentés száma: 1411/86
(22) A bejelentés napja: 1986. 04. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
719 601 1985. 04. 03. US

(51) Int. Cl.⁵

C 07 K 3/12
A 61 K 39/29

(40) A közzététel napja: 1987. 02. 27.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1992. 08. 28. SZKV 92/08

(72) Feltalálók:

Gilles, Daniel, Genval (BE)
Simonet, Guy, Perwez (BE)
van Wijnendaele, Franz, Ottenburg (BE)

(73) Szabadalmaz:

Smithkline Biologicals S. A., Rixensart
(Genval) (BE)

(54) **Eljárás hepatitis B felületi antigén termelő tápközegből történő
kinyerésére és tisztítására, valamint hatóanyagként ezt tartalmazó
gyógyszerkészítmények előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás biotechnológiai úton módosított élesztők által termelt, sejthez kötött hepatitis B felületi antigén (HBsAg) kinyerésére a sejtek nem-ionos detergens jelenlétében végzett elroncsolása után kapott felülúszóból, valamint a HBsAg tisztítására. A

találmány értelmében a szennyeződések polietilén-glikollal kicsapják, és a felülúszót vagy kétértékű kationnal, vagy – adott esetben ultraszűrés után – ammónium-szulfáttal kezelik, majd a HBsAg-t tisztítják, és gyógyszerkészítmények hatóanyagaként alkalmazzák.

A találmány tárgya eljárás hepatitis B felületi antigén termelő tápközegből történő kinyerésére és tisztítására. Közelebbről: a találmány hepatitis B vírus felületi antigén javított kinyerési és tisztítási eljárására vonatkozik. A hepatitis B vírus felületi antigént rekombináns DNS technikával módosított sejtek tenyésztésével, közelebbről: módosított élesztők tenyésztésével termeljük.

Speciális proteinek kódoló nukleotid-szekvenciát magában foglaló DNS-t tartalmazó plazmidok gazdaszervezeteként különböző mikroorganizmusok, ezek közül is baktériumok és élesztők használhatók. Ezek közül előnyösek az élesztők. A 0 106828 sz. európai szabadalmi bejelentésben hepatitis B vírus felületi antigén (HBsAg) termelésére szolgáló eljárást ismertetnek *Saccharomyces cerevisiae* segítségével, míg a 0 103409 sz. európai szabadalmi bejelentésben alfa-1-antitripszin élesztő-plazmid segítségével történő előállítását ismertetik.

Proteinek élesztőkben történő előállítása valóban előnyösebb, mint a baktériumokban történő előállítás. Az egyik előny az, hogy az élesztők nagyméretű fermentorokban igen könnyen tenyészthetők, másik előny az, hogy az élesztők az emlőssejtekhez hasonlóan képesek szénhidrát csoportot kapcsolni az újonnan szintetizált proteinekhez.

A protein kinyerése és tisztítása az élesztőtenyésztésből azonban jelentős technikai problémát képez, mivel az élesztősejt kémiaiilag igen összetett, és különösen azért, mert ha az élesztőtermelést a polipeptidtermelés fokozása érdekében növeljük, nagyon sok lipid van jelen.

A *Saccharomyces* sejtfaala például három rétegből áll: (a) egy belső rétegből, amely lúgban oldhatatlan β -glükánból épül fel, (b) egy közbülső rétegből, amely lúgban oldható β -glükánból épül fel, és (c) egy külső rétegből, amelyben a szénhidrát foszforilezett mannánból áll. A sejtfaalon belül helyezkedik el a citoplazma membrán, amely semleges lipidek (mono-, di- és trigliceridek), szabad és észterezett szterolok, komplex szfingolipid, glicerofoszfátidok és semleges, valamint savas glikolipidek nagyon összetett elegyből áll; a nukleusz, amely DNS-t, különböző RNS fajtaikat és polifoszfátot tartalmaz; a vakuolumok, amelyek sokféle nagy és kis molekulatömegű komponenset tartalmaznak, ezek számos hidrolizáló enzim tárolószerveként szolgálnak; a mitokondriumok, amelyek lipidben, foszfolipidben és ergoszterol komponensekben gazdagok, és a citoplazma, amely egyebek között nagy mennyiségű riboszómát, polifoszfátokat, glikogént és számos glikolitikus enzimet tartalmaz. Az élesztő sejtek legtöbbje (például a *Saccharomyces* fajok) bizonyos mennyiségű lipidet is tartalmaznak globulák formájában, amelynek a mennyisége a tenyésztés során növekszik.

Számos többlépcsős eljárás ismeretes proteinek különböző forrásokból történő extrakciójára és tisztítására. Biotechnológiai úton átalakított mikroorganizmusok segítségével történő proteintermelést ismertetnek például Th. Staehelin és munkatársai [J. Biol. Chem. 256, 9750–57 (1981)], K. Murray és munkatársai [The

EMBO J. 3, 645–650 (1984)], R. A. Hitzeman és munkatársai [Nucl. Ac. Res. 11, 2745–2763 (1983)].

Ha a termelt protein sejthez van kötve, ezek a különböző eljárások általában három lépéssorozatot foglalnak magukban.

Az első lépéssorozatban az előállítandó fehérjét eltávolítják a sejt belsejéből. E célból a sejtet vagy kémiai, illetve biológiai úton (például enzimátikus kezeléssel), vagy fizikai úton roncsolják (például mechanikai úton, pl. nyíróerővel, pl. keresztsajtóval vagy francia sajtóval), vagy üveggyönggyel – adott esetben detergens jelenlétében – összerázzák (l. pl. K. Murray és munkatársai, id. h. és R. A. Hitzeman és munkatársai, id. h.).

A második lépéssorozatban a közegben feldúsítják az előállítandó proteint, pl. frakcionált kicsapással ammónium-szulfát segítségével polietilén-glikol jelenlétében vagy anélkül.

Végül az utolsó lépéssorozatban a közegből eltávolítják lényegében véve az összes szennyezőanyagot, például a következő eljárási lépések közül egynek vagy többnek a végrehajtásával: ultraszűrés, ioncsere, gél-szűrő kromatográfia, izochor gradiens centrifugálás.

Ilyen esetekben nyilvánvaló, hogy az olyan szennyezések, mint például fehérjék (R. A. Hitzemann és munkatársai id. h.), nukleinsavak és lipidek, különösen a nagy mennyiségű lipid károsan befolyásolják a harmadik lépéssorozat legalább egyik lépését (pl. ultraszűrést és az oszlopkromatográfiát), továbbá az, hogy a proteolitikus enzimeket gyorsan el kell távolítani a közegből. Meg kell továbbá jegyezni, hogy ammónium-szulfátos kicsapást nem lehet előzetes lipidmentesítés nélkül végezni, mert ebben a kicsapásban a lipidek zavar-
nak.

Ezért elsődleges fontosságú, hogy olyan módszer álljon rendelkezésre, amely szerint a szennyezőanyagok lehető legnagyobb része eltávolítható a harmadik lépéssorozat előtt.

Az ismert módszerek közül néhány a proteinek szelektív kicsapására polietilén-glikolt javasol, a lipoproteinek plazmából történő kicsapására pedig polianionok használatát javasolják.

Proteinek frakcionált kicsapásának módszerét nemionos vízdoldható polimer, különösen polietilén-glikol (PEG) segítségével Polson és munkatársai vezették be [Biochem. Biophys. Acta 82, 463–475 (1964)] és számos szerző tárgyalta. Ezek közül W. Honig és munkatársai említik [Analyt. Biochem. 72, 502–512 (1976)], hogy a kicsapás specifikussága, azaz az előállított protein aránya a teljes proteintartalomra vonatkoztatva fokozható, ha kisebb átlag molekulatömegű PEG frakciókat alkalmazunk, mint az általában használt PEG 6000. Mindazonáltal a pH manipulálásával egyes plazma-proteinek koncentrártuma nyerhető, a szerzők hozzátesszik, hogy összetettebb protein-elegyek, pl. sejt-homogenizátumok felülúszójának tisztítása azonban jelentősen gyengébb eredménnyel végezhető.

P. R. Foster és munkatársai [Biochem. Biophys. Acta 317, 505–516 (1973)] ismertetnek egy módszert, amely szerint *Saccharomyces cerevisiae* sejt-extrakumból enzimeket PEG segítségével csapnak ki. Víru-

sok és bakteriofágok PEG segítségével történő koncentrálására és tisztítására módszereket ismertetnek B. P. Vajda [Folia Microbiol. 23, 88–96 (1978)] és G. J. Lancz [Arch. Virusforsch. 42, 303–306 (1973)]. A hepatitis antigén izolálás területén Ph. Adamowicz és munkatársai ismertetnek módszert a hepatitis B felületi antigén tisztítására [Inserm Symposium No. 18, 37–49. oldal, Hepatitis B Vaccine, kiadó: Elsevier, Amsterdam, Hollandia (1981)], amely szerint két egymást követő kezelést végeznek PEG 6000-rel. Ebben a módszerben, amely a hepatitis B felületi antigén (HBsAg) plazmától való megtisztítására szolgál, az immun-komplexeket és a lipoproteinek nagy részét első lépésben a szérumból 5,5% PEG 6000-rel kicsapják, majd a második lépésben a HBsAg-t a felülúszóból PEG 10% végső koncentrációig történő adagolásával elválasztják.

A szabadalmi irodalomból még a következő módszerek ismeretesek:

- 3 790 552 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás olyan módszert ismertet, amely szerint egy protein-frakcióból hepatitis-antigént úgy választanak el, hogy 12–30 töm/térf%, 200–6000 molekulatömegű PEG-t használnak az antigén kicsapására;
- a 3 951 937 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás szerint hepatitis B antigént (HBsAg) úgy tisztítanak, hogy a HBsAg-t kétszer csapják ki 4,0–4,5 töm% legalább 600 molekulatömegű PEG segítségével;
- a 3 994 870 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás hepatitis B antigén (HBsAg) tisztítására szolgáló eljárást ismertet, amely szerint a HBsAg-t 4,0–4,5 töm% PEG segítségével kicsapják, majd affinitás-kromatográfiának vetik alá, ahol kromatográfiás adszorbenként oldhatatlan konkavalin A-t alkalmaznak;
- a 0 112 506 számon közrebocsátott európai szabadalmi bejelentésben eljárást ismertetnek hepatitis B fertőzést megelőző vakcina plazmából történő előállítására, amely szerint ammónium-szulfátos kicsapást, majd koloid szilikáton történő adszorpciót és ezután két egymást követő kicsapást végeznek 2000–10 000 molekulatömegű PEG segítségével, 3–7 töm/térf%-nál kicsapják a hepatitis B vírust és az immun-komplexeket, majd 15–20 töm/térf%-nál a felülúszóból kicsapják a HBsAg-t.

Amint már említettük, a lipoproteinek kicsapására a lipoprotein-polianionfém hatást szintén ismertették már [pl. M. Burstein és munkatársai, Adv. Lip. Res. 11, 67–108 (1973)] és A. Van Dalen és munkatársai Biochem. et Biophys. Acta 147, 421–427 (1967)]. A módszert úgy hajtják végre, hogy a lipoproteineket kétértékű fémiont és savas poliszacharidot tartalmazó reagenssel kezelik, ilyen körülmények között a csapadék mennyisége a kétértékű kationnak a közegben mérhető koncentrációjától függ.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazott kiindulási anyag (a továbbiakban „nyers extraktum”-ként is

említjük) biotechnológiai úton átalakított olyan élesztősejtek felülúszója, amelyek sejthez kötött proteint termelnek, és amely sejteket nemionos felületaktív anyag jelenlétében ismert módon elroncsoltunk.

- 5 A találmány értelmében azután frakcionált kicsapást végzünk PEG segítségével (ezt a továbbiakban első lépésként említjük), majd vagy frakcionált kicsapást végzünk kétértékű fém, például kalcium vagy magnézium sója segítségével, vagy ammónium-szulfátos kezelést hajtunk végre, amely előtt az első lépés felülúszóját ultraszűrésnek vetjük alá.

- 10 A találmány szerinti eljárás azon a felismerésen alapszik, hogy ha a nemionos detergens jelenlétében elroncsolt biotechnológiai úton átalakított élesztősejtekből történő HBsAg kinyeréséhez 6–12 töm/térf% szilárd PEG-t (pl. PEG 6000) alkalmazunk, a HBsAg nem csapódik ki. Ezenkívül az azutáni ammónium-szulfát-adagolás hatására kétfázisú rendszer alakul ki, amelyre az jellemző, hogy a HBsAg a PEG-fázisban, míg a szennyeződések a vizes fázisban vannak jelen. Ez az eredmény azért meglepő, mert a technika állása szerinti általános kitanítások szerint más nyers közegekben ezzel a módszerrel eljárva a HBsAg kicsapódik.

- 25 A fentieknek megfelelően a találmány tárgya PEG felhasználása élesztő sejtek tenyésztésével termelt proteinek oldószereként, amikor a szennyeződések nagy részét kicsapással távolítjuk el a közegből.

- 30 Molekulatömeg szerint a PEG vagy szilárd vagy folyékony formában létezik, a két forma között a határ az 1500 molekulatömeg körül van.

- A találmány szerinti eljárás első lépésében (amely tisztítási lépésnek is tekinthető) különböző molekulatömegű PEG-féleségek alkalmazhatók, amikor a koncentrációt a megfelelő molekulatömeg alapján állítjuk be.

- Például ha szilárd PEG-t (pl. PEG 6000) használunk, a koncentráció előnyösen 6–12 töm/térf%, míg ha folyékony PEG-t (pl. PEG 300 vagy 400) használunk, a koncentráció 10–35 térf/térf%, előnyösen 20–30 térf/térf%. Mindazonáltal technikai okokból, többek között a későbbi ultraszűrés megkönnyítése miatt előnyös folyékony PEG-t használni.

- 45 A találmány tárgya tehát eljárás HBsAg kinyerésére és tisztítására élesztősejtek felülúszójából, amelyeket nemionos detergens (előnyösen poliszorbát detergens) jelenlétében elroncsoltunk. A felülúszót a továbbiakban „nyers extraktum”-ként említjük. A módszer abban áll, hogy az első lépésben a 6 ($\pm 0,1$) pH-jú nyers extraktumhoz 6–12 töm/térf% szilárd PEG-t, vagy előnyösen 10–35 térf/térf% folyékony PEG-t adagolunk. A PEG említett koncentrációhatárait az elért tisztulási pont alapján határozzuk meg, mivel PEG további adagolása káros hatású, nevezetesen növekszik a közeg viszkozitása, és a HBsAg nemkívánt kicsapódása következhet be.

- 50 A találmány szerinti eljárásban a PEG polimerizált szerves oldószerek tekinthető, amely többek között elősegíti a lipoproteinek kicsapását, amelyek izoelektromos pontja a 6-os pH közelében van, valamint a

többi lipoproteinek oldását, azaz azokét, amelyeknek izoelektromos pontja jelentősen eltér azokétól, amelyek erősen hidrofóbok.

Megfigyeltük, hogy a PEG-gel végzett tisztítási lépésben a szennyező proteineknek mintegy 75%-a, a poliszacharidok 90%-a, a nukleinsavak 94%-a és a lipidek 45%-a kicsapódik, míg lényegében véve a teljes HBsAg-tartalom a felülúszóba kerül.

Ahogy már említettük, a találmány szerinti eljárás olyan lépések kombinációja, amelyek közül az első egy tisztítási lépés, amely az előállítandó protein részben tisztított és adott esetben kissé opálos oldatát eredményezi.

A találmány szerinti eljárás második lépésében a kapott, részben tisztított oldatot vagy kétértékű fémsóval, például kalcium- vagy magnézium-klorid vizes oldatával 30 mmól/l végső koncentrációig, vagy ammónium-szulfáttal kezeljük. Az ammónium-szulfátos kezelést végezhetjük úgy, hogy az opálos oldathoz ultraszűrés után szilárd ammónium-szulfátot adunk a telítési érték 40–50%-áig, a klasszikus kisézési módszer szerint, amikor az előállítandó proteint így csapjuk ki, és foszfát-pufferrel vesszük fel. Eljárhatunk azonban úgy is, hogy a PEG-tartalmú felülúszóhoz a telítettségi érték 40–50%-ának megfelelő mennyiségű ammónium-szulfátot adunk, így kétfázisú rendszer képződik, ahol az előállítandó protein a PEG-tartalmú fázisban található.

A második lépés említett variációi mind az előállítandó HBsAg tiszta oldatát eredményezik, amely lényegében poliszacharidoktól, nukleinsavaktól, lipidektől és szennyező proteinektől mentes.

Az így kapott oldatot azután a fent említett, szokásos harmadik lépéssorozatban dolgozzuk fel, például adott esetben ultraszűrésnek, géliszűrésnek és oszlopkromatográfiának vetjük alá. A találmány szerinti eljárás egyik előnyös megvalósítási módja szerint ez a harmadik lépéssorozat egymást követő ultraszűrés, első géliszűrés, oszlopkromatográfia egy gyengén anionos, dietil-amino-etil-csoportokat (DEAE) tartalmazó ioncserélő gyantán és második géliszűrés vagy cézium-klorid-gradienscentrifugálás, amelynek eredményeképpen nagy tisztaságú HBsAg-t kapunk oldat formájában, amely gyógyászati felhasználásra alkalmas.

A második géliszűréssel kapott szűrt poliakrilamid-gélelektroforézissel (nátrium-dodecilszulfát) végzett vizsgálata azt mutatta, hogy a termék tisztasága nagyobb, mint 98% a 23 K sávra nézve, amely az élesztő eredetű HBsAg-ra jellemző.

A találmány szerinti módszer előnye tehát, hogy segítségével el lehet távolítani lényegében véve minden poliszacharidot, nukleinsavat, lipidet és proteinszerű anyagot, másrészt az előállítandó HBsAg viszonylag nagy hozammal különíthető el.

Ha a találmány szerinti eljárással biotechnológiai úton módosított élesztősejtekből nyert nyers HBsAg-extraktumot kezelünk, a kapott HBsAg detergenshez van kötve, és azzal mintegy 17–20 nm átmérőjű összetett micellákat képez. Úgy találtuk, hogy a nemionos detergens mennyisége a proteinek, a poliszorbáttal

alkotott micellákban levő lipidek és poliszorbát együttesére vonatkoztatva 15–35 töm/térf%-nak adódik a kolorimetriás vizsgálatokban a proteinek (LOWRY), teljes lipidre (ZOLLNER), és nemionos detergensre (HUDDLESTON és ALLRED) vonatkozóan.

A találmány szerinti eljárással, poliszorbát mint nemionos detergens használatával kapott összetett micellák új vegyületek. Ezek immunogének, és hepatitis B vírus vakcinákká alakíthatók, ismert módon.

A találmány szerinti eljárást a következő példákkal szemléltetjük.

1. példa

Biotechnológiai úton módosított, HBsAg-t kifejező, literenként 30 g sejttömeg szárazanyagtartalomig tenyésztett élesztősejtekből nyert 3850 g pelletet szuszpendálunk 7,12 l Na_2HPO_4 -ben (7,098 g/l).

A szuszpenziót 142,5 ml 4%-os (töm/térf) EDTA oldattal, 38,5 ml poliszorbát 20-szal és 385 ml, 2,7 g fenil-metil-szulfonil-fluoridot tartalmazó izopropanollal egészítjük ki. A pH-t 8,1 $\pm$ 0,1-re állítjuk be 10 töm/térf%-os vizes nátrium-hidroxid oldattal. A szuszpenziót jégen lehűtjük, és üveggyöngy homogenizátorban két menetben összekeverjük. A homogenizátumot (nyers extraktum) 30 percig 13 000 g-vel centrifugáljuk.

7,7 l nyers extraktumhoz, amelyet 15 °C alatti hőmérsékleten tartunk, hozzáadunk 2,5 l PEG 400-at. A pH-t 5 móll-es ecetsavval 6 $\pm$ 0,1-re állítjuk be, és a közeget egy óra hosszat 4 °C-on tartjuk, majd 45 percig 7400–11 000 g-vel centrifugáljuk.

A felülúszó pH-ját 1 n NaOH-val 7,0 $\pm$ 0,05-re állítjuk, és 300 ml 1 móll-es CaCl_2 -t adunk hozzá, azaz 30 ml-t felülúszó-literenként. A pH-t újra 7 $\pm$ 0,05-re állítjuk 1 n NaOH-val, és az elegyet egy éjszakán át 4 °C-on tartjuk, majd 3600 g-vel centrifugáljuk 45 percig. A felülúszót egy, 100 000 daltonig áteresztő szűrőbetéttel ellátott AMICON DC berendezésen (forgalomba hozza: AMICON CORP., DANVERS, MA, USA) ultraszűrjük, így a kezdeti térfogat 1/4-ére koncentrálnuk (1500 ml). Az oldatot ezután folyamatosan mossuk 12,5 l 10 mmól/l-es trometamollal, melynek pH-ját 1 n sósavval 8 $\pm$ 0,1-re állítottuk (ezt a puffert a továbbiakban „trometamol pH 8”-ként fogjuk említeni), és ki-egészítjük fenil-metil-szulfonil-fluoriddal (PMSF) 1 mmól/l-re, izopropanollal 2,5 térf/térf%-ra és EDTA-val 2 mmól/l-re (végső koncentrációk). A visszamaradt részt továbbkoncentrálnuk 350 ml-re.

A koncentrált oldatot 7 l FRACTOGEL^R TSK HW65(F)-et tartalmazó, 10 mmól/l-es, 7 $\pm$ 0,01 pH-jú, 5 térf/térf% etilén-glikollal kiegészített trometamol/HCl pufferrel kiegyenlített oszlopra (átm. 10 cm, hossz 100 cm) vesszük fel. A FRACTOGEL^R TSK HW65(F) fényszilárd gél, amely a mátrix felületen számos hidroxilcsoportot tartalmazó hidrofíl vinil-polimerből áll, részecskemérete 32–63 μm , gyártó és forgalmazó E. Merck, Darmstadt, NSZK.

A HBsAg-t tartalmazó frakciót egy, 300 ml FRACTOGEL^R TSK DEAE 650 (M)-et tartalmazó, trometamol pH 8 pufferrel kiegyenlített oszlopra (átm. 5 cm,

hossz 30 cm) visszük fel 4 °C-on. A FRACTOGEL^R TSK DEAE 650 (M) enyhén bázikus anioncserélő gyanta, amelyben a dietil-amino-etil-csoportok éterkötéssel a FRACTOGEL^R TSK HW-65 mátrix hidroxilcsoportjaihoz vannak kötve, gyártó és forgalmazó E. Merck, Darmstadt, NSZK. Az oszlopot 0,05 mól/l NaCl-ot tartalmazó trometamol pH 8 pufferrel mossuk, és a HBsAg-t 0,15 mól/l NaCl-ot tartalmazó trometamol pH 8 pufferrel eluáljuk.

Az eluátumot egy FRACTOGEL^R TSK HW65(F)-et

tartalmazó, 150 mmól/l NaCl-ot tartalmazó 10 mmól/l-es, 6,8 pH-jú Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pufferrel kiegyenlített oszlopra visszük fel, amelyről HBsAg/poliszorbát összetett micellákat tartalmazó oldatot nyerünk.

Az I. táblázat mutatja az egyes lépésekkel elért tisztasági fokot.

A II. táblázatban megadjuk az összetett micellák összetételét három különböző vakcina esetén, amelyeket a fenti módszerrel, poliszorbát 20 felhasználásával kaptunk.

I. táblázat

Lépés	Térfogat (l)	Teljes HBsAg RIA-val (mg)	Összes fehérje (g)	Összes poliszorbát (g)	Összes nukleinsav (g)	Összes lipid (g)
Nyers extraktum	7,7	1232	259	114	32500	104
PEG felülúszó	8,02	1100	64	9,5	641	53,7
CaCl ₂ felülúszó	8	1190	37	3,8	512	27,2
Maradék	0,350	1320	26,7	0,744	37,6	3,596
HBsAg csúcs TSK	1,06	736	0,935	0,014	16	0,352
TSK-DEAE eluátum	0,15	722	0,428	0,0084	2,6	0,275
HBsAg csúcs TSK	0,45	1117	0,244	0,0094	2	0,179

RIA: Radio Immuno Assay = radioimmunvizsgálat

II. táblázat

Tétel	Proteinek (μg/ml) (A)	Összes lipid (μg/ml) (B)	Poliszorbát 20 (μg/ml) (C)	$\frac{C}{A/B/C}$ arány
I.	20	20	8,5	18
II.	20	16	8,4	19
III.	20	14,5	15,6	31

2. példa

2,650 l, az 1. példában előállított nyers extraktumhoz lassan hozzáadunk 882 ml PEG 400-at, és a pH-t 6,0±0,1-re állítjuk. A keveréket egy óra hosszat 4 °C-on tartjuk, majd 7400 g-vel centrifugáljuk. A felülúszót 1000 ml-re töményítjük egy 100 000 daltonig áteresztő szűrőbetéttel ellátott AMICON DC készüléken, majd háromszoros térfogatú 20 mmól/l-es trometamol pH 8 pufferrel mossuk. A maradékhoz ezután 4 °C-on, keverés közben lassan hozzáadunk 277 g ammónium-szulfátot. Egy óra múlva a csapadékot 15 percig centrifugáljuk 1000 g-vel. A felülúszót leöntjük, és a csapadékot feloldjuk 400 ml 20 mmól/l-es trometamol pH 8 pufferben, amely 1 mmól/l PMSF-et tartalmaz. Az oldatot leszűrjük egy 10⁶ daltonig áteresztő szűrőbetéttel ellátott AMICON DC berendezésen. A visszamaradt részt (500 ml) kétszeres térfogatú trometamol pH 8

pufferrel mossuk, és egy 300 ml TSK-DEAE 650 M gélt tartalmazó, trometamol pH 8 pufferrel kiegyenlített oszlopra visszük fel. A minta felvitele után az oszlopot 0,05 mól/l NaCl tartalmú trometamol pH 8 pufferrel mossuk, és lineáris NaCl-gradienst (0,05 mól/l–0,5 mól/l) alkalmazunk. A 0,15 mól/l NaCl-dal eluált frakció tartalmazza a HBsAg-t. Ezt a frakciót 50 ml-re töményítjük egy 10 000 daltonig áteresztő szűrőbetéttel ellátott AMICON DC készüléken, és Sepharose 4B-Cl gélt (anaróz gél, gyártó és forgalmazó Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Svédország) tartalmazó oszlopra (átm. 50 cm, hossz 100 cm) visszük fel, amelyet 20 mmól/l-es, 5% etilén-glikollal kiegészített trometamol pH 8 pufferrel kiegyenlítettünk, így HBsAg/poliszorbát összetett micellák oldatát kapjuk. Az egyes lépésekkel elért tisztasági fokot a III. táblázat tartalmazza.

III. táblázat

Lépés	Térfogat (ml)	Teljes HBsAg RIA-val (mg)	Összes fehérje (g)	Összes polisza- charid (g)	Összes nuklein- sav (mg)
Nyers extraktum	2650	188	114,721	36,9	9250
PEG felülúszó	2530	160	22,755	3,321	536
Visszamaradt rész 10 ⁵	1000	150	7,468	0,181	175
AMS-pellet	400	80,8	1,248	0,0248	160
Visszamaradt rész 10 ⁶	1000	72,4	0,529	0,029	88
TSK-DEAE eluátum	560	44	0,157	0,073	3
Sepharose 4B-CL HBsAg csúcs	200	23	0,030	0,0003	0,05

RIA: Raido Immuno Assay

3. példa

2 liter nyers HBsAg extraktumot az 1. példában leírt módon tisztítunk PEG 400-zal. Keverés közben hozzáadunk 450 g por alakú ammónium-szulfátot (AMS), a végső koncentráció megfelel 45% AMS-telítettségnek. Az AMS feloldása után az oldatot három óra hosszat 4 °C-on tartjuk, ezután két fázist kapunk, amelyeket választótölcsérben elválasztunk: tiszta (sárga) felső fázis (PEG 400 fázis) és tiszta alsó fázis (vizes fázis),

mindkét fázis kb. az eredeti 50%-ának felel meg. A vizes fázist eldobjuk, és a felső fázist AMICON DC készüléken ultraszűrjük az 1. példában a CaCl₂-os felülúszó kezelésénél leírt módon. A tisztítást azután az 1. példában leírt módon folytatjuk, és HBsAg/poliszorbát összetett micellák oldatát kapjuk.

Az egyes lépésekkel elért tisztasági fokot a IV. táblázat tartalmazza.

IV. táblázat

Lépés	Térfogat (ml)	Teljes HBsAg RIA-val (mg)	Összes fehérje (g)	Összes polisza- charid (g)	Összes nuklein- sav (mg)
Nyers extraktum	2000	99	55	22	5588
PEG felülúszó	2000	92	13,2	5,68	243
PEG fázis	1000	98	2,8	1,536	98
Visszamaradt rész	50	98	1,5	0,14	6,66
HBsAg csúcs TSK	123	52	0,288	0,0077	2,84
TSK-DEAE eluátum	25	54	0,0377	0,0011	0,44
HBsAg csúcs TSK	60	35	0,0207	0,00154	0,39

RIA: Radio Immuno Assay

4. példa

2 liter nyers HBsAg extraktumot az 1. példában leírt módon tisztítunk PEG 400-zal. Keverés közben hozzáadunk 450 g por alakú ammónium-szulfátot (AMS), a végső koncentráció megfelel 45% AMS-telítettségnek. Az AMS feloldása után az oldatot három óra hosszat 4 °C-on tartjuk, ezután két fázist kapunk, melyeket választótölcsérben elválasztunk: tiszta (sárga) felső fázist (PEG 400 fázis) és tiszta alsó fázist (vizes fázis), mindkettő kb. az eredeti 50%-ának felel meg. A vizes fázist eldobjuk, és a PEG-os fázisból kivett 1 liter alikvotot kétszeresére hígítjuk 10 mmól/l-es trometamol pH 8 pufferrel, és felvisszük egy oszlopra, amely 300 ml FRACTOGEL TSK-DEAE 650(M) gélt tartalmaz, és amelyet 100 ml/óra

átfolyási sebességgel trometamol pH 8 pufferrel egyenlítettünk ki. A gélt 0,05 mól/l NaCl-ot tartalmazó trometamol pH 8 pufferrel mossuk, és a HBsAg-t NaCl-gradienssel (0,05–0,5 mól/l NaCl trometamol pH 8 pufferben) eluáljuk. A HBsAg csúcs 0,15 mól/l NaCl koncentrációnál eluálódik. Ezt a frakciót egy 10 000 daltonig áteresztő szűrőbetéttel felszerelt AMICON DC készüléken koncentrálnak, és a visszamaradt részt egy Sepharose 4B-Cl töltet tartalmazó, 5 térf./térf% etilén-glikollal kiegészített trometamol pH 8 pufferrel kiegyenlített oszlopra visszük fel (átm. 5 cm, hossz 100 cm), így HBsAg/poliszorbát összetett micellák oldatát kapjuk.

Az egyes lépésekkel elért tisztasági fokot az V. táblázatban foglaljuk össze.

V. táblázat

Lépés	Térfogat (ml)	Teljes HBsAg RIA-val (mg)	Összes fehérje (g)	Összes poliszacharid (g)	Összes nukleinsav (mg)
Nyers extraktum	2100	200	60,600	19,000	4860
PEG fázis	1200	210	3,100	1,436	80
TSK-DEAE eluátum	460	134	0,750	0,0048	05
Sepharose 4B-CL HBsAg csúcs	150	110	0,120	0,0014	0,3

RIA: Radio Immuno Assay

5. példa

500 ml nyers HBsAg extraktumhoz 4 °C-on, keverés közben lassan hozzáadjuk 50 g PEG 6000 160 ml vízzel készült oldatát. A pH-t 5 mól/l-es ecetsavval 6,1-re állítjuk. Egy óra hosszat 4 °C-on állni hagyjuk, majd 15 percig centrifugáljuk 7000 g-vel. A felülúszóhoz keverés közben hozzáadjuk 157 g porított ammónium-szulfátot (végső koncentráció a telített ammónium-szulfát 50%-a). Oldódás után az oldatot 4 °C-on tartjuk 3 óra hosszat, így két fázist kapunk, amelyeket választótölcsérben elválasztunk. A felső fázist, (PEG fázis, amely a HBsAg-t tartalmazza) kétszeresére hígítjuk trometamol pH 8 pufferrel, és 300 ml TSK-DEAE 650(M) gélt tartalmazó, 100 ml/óra átfolyási sebesség-

gel trometamol pH 8 pufferrel kiegyenlített oszlopra visszük. A gélt 0,05 mól/l NaCl-ot tartalmazó trometamol pH 8 pufferrel mossuk, és a HBsAg-t 0,15 mól/l NaCl-ot tartalmazó trometamol pH 8 pufferrel eluáljuk, 10 000 daltonig átengedő szűrőbetéttel ellátott AMICON DC készüléken koncentrálnuk, a visszamaradt részt 2 literes, FRACTOGEL TSK-HW65(F) töltetet tartalmazó, 10 térf/térf% etilén-glikollal kiegészített trometamol pH 8 pufferrel kiegyenlített oszlopra (átm. 5 cm, hossz 100 cm) visszük, így HBsAg/poliszorbát összetett micellák oldatát kapjuk.

Az egyes lépésekkel elért tisztasági fokot a VI. táblázatban foglaljuk össze.

VI. táblázat

Lépés	Térfogat (ml)	Teljes HBsAg RIA-val (mg)	Összes fehérje (g)	Összes poliszacharid (g)	Összes nukleinsav (mg)
Nyers extraktum	500	123	22,600	6,400	1200
PEG felülúszó	490	100	4,153	0,509	24
PEG fázis	270	110	1,820	0,2096	5,3
TSK-DEAE eluátum	150	66	0,258	0,028	0,4
HBsAg csúcs TSK	60	68	0,065	0,00048	0,084

RIA: Radio Immuno Assay

7. példa

Az 1. példa szerinti eljárást végezzük, azzal a különbséggel, hogy 300 ml 1 mól/l-es CaCl₂ helyett 300 ml 1 mól/l-es MnCl₂-t használunk. A kapott termék jellemzői megegyeznek az 1. példa termékeivel.

8. példa

Az 1. példa szerinti eljárást végezzük, de a 38,5 ml poliszorbát 20 helyett 20 ml Triton X-100-at használunk (gyártó Rohm and Haas, Darmstadt, NSZK). A kapott termék jellemzői megegyeznek az 1. példa termékeivel.

9. példa

Az 1. példa szerinti eljárást végezzük, azzal a különbséggel, hogy poliszorbát 20 helyett poliszorbát 80-

at használunk ugyanolyan mennyiségben. A kapott termék jellemzői megegyeznek az 1. példa termékeivel.

10. példa

Az 1. példa szerinti eljárással előállított HBsAg összetett micella oldatból NaCl, foszfát puffer (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄) és ALHYDROGEL^R (alumínium-hidroxid gél, gyártó és forgalmazó SUPERPHOS Export Co., Koppenhága, Dánia) adagolásával olyan készítményt állítunk elő, melynek összetétele a következő: proteintartalom 10 µg/ml, NaCl tartalom 0,9 töm/térf%, puffer 20 mmól/l és Al(OH)₃ tartalom 0,15 töm/térf%, végső pH 6,9.

A készítményt sterilizzuk, és 2 ml-es üvegampullákba 1-1 ml-t töltünk.

11. példa

A 10. példa szerint előállított dóziségségnyi vakcinát intramuszkuláris úton adagoltuk két sorozatban szeronegativ egyéneknek 2 egymást követő alkalommal, egy hónapos intervallummal. Bár ez az injekció alapozó adagnak tekinthető, amelyet az első adagolást követően pl. 2 hónappal egy erősítő adagnak kellett volna követnie, pozitív antitest reakció volt megfigyelhető már egy és két hónappal az első injekció adagolása után.

Az első sorozatban (amely 32 szeronegativ egyént foglalt magában) egy hónappal az első adagolás után a szerokonverziós arány 20/32 volt, azaz 62,5% 9,95 milliNE geometriai átlagtiterrel, és egy hónappal a második adagolás után a szerokonverziós arány 31/32 volt, azaz 96,9% 36 milliNE geometriai átlagtiterrel.

A második sorozatban (amely 46 szeronegativ egyént foglalt magában) egy hónappal az első adagolás után a szerokonverziós arány 31/46 volt, azaz 67,4% 13/6 milliNE geometriai átlagtiterrel.

A klinikai vizsgálatok nem mutattak hőemelkedést és a vakcinálás helyénél észrevehető helyi reakciót.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás biotechnológiai úton módosított élesztő által termelt, hepatitis B felületi antigén (HBsAg) kinyerésére a sejtek nemionos detergens jelenlétében végzett eltroncsolása utáni felülúszóból, valamint a HBsAg tisztítására, *azzal jellemezve*, hogy a felülúszó pH-ját $6 \pm 0,1$ értékre állítjuk, 10–35 térf% folyékony vagy 6–12 töm/térf% szilárd polietilén-glikolt adunk hozzá, a képződött csapadékot eldobjuk, és az így tisztított felülúszóhoz vagy 40 mmól/l végső koncentrációig valamely kétértékű fém-só-ját, vagy – kívánt esetben ultra-szűrés után – a telítési érték 40–50%-áig ammónium-szulfátot adunk, és a HBsAg-t elválasztjuk, majd kívánt esetben tisztítjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy folyékony polietilén-glikolt alkalmazunk 10 és 35 térf% közötti koncentrációnak megfelelő mennyiségben.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*,

hogy szilárd polietilén-glikolt alkalmazunk 6 és 12 töm/térf% közötti koncentrációnak megfelelő mennyiségben.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a felülúszó kezelésére kétértékű fém-só-ját alkalmazzuk.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kétértékű fém-só-ként kalcium- vagy magnéziumsót alkalmazunk.

6. A 4. vagy 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a HBsAg tisztítását úgy végezzük, hogy a HBsAg-t tartalmazó oldatot ultraszűrjük, a visszamaradt részt gélszűrjük, a HBsAg-t tartalmazó frakciót ioncserélő kromatográfiának vetjük alá, adott esetben másodszor gélszűrjük vagy cézium-klorid gradien-szentrifugálásnak vetjük alá.

7. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a tisztított felülúszót ammónium-szulfáttal kezeljük, és az elválasztott HBsAg-t tisztítjuk.

8. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a tisztított felülúszót ultraszűrjük, a visszamaradt részt szilárd ammónium-szulfáttal kezeljük és az elválasztott HBsAg-t tisztítjuk.

9. A 7. vagy 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a HBsAg tisztítását úgy végezzük, hogy a polietilén-glikol-fázist adott esetben még ultraszűrjük, gélszűrésnek, majd ioncserélő kromatográfiának vetjük alá.

10. A 7. vagy 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a HBsAg tisztítását úgy végezzük, hogy a polietilén-glikol-fázist adott esetben még ultraszűrjük, ioncserélő kromatográfiának, majd gélszűrésnek vetjük alá.

11. Az 1–10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy nemionos detergensként poliszorbátot alkalmazunk.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy poliszorbátként poliszorbát 20-at alkalmazunk.

13. Eljárás gyógyszerkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1. igénypont szerinti eljárással kinyert és tisztított hepatitis B felületi antigént a gyógyszerkészítésben szokásos hordozó-, hígító- és/vagy egyéb segédanyagokkal összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.