(19) DANMARK

PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **158743 B**

(21) Patentansøgning nr.: **3431/79**

(22) Indleveringsdag: **16 aug 1979**

(41) Alm. tilgængelig: **18 feb 1980**

(44) Fremlagt: **09 jul 1990**

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: **17 aug 1978 US 934293**

(51) Int.Cl.[5] **C 12 N 7/08**
A 61 K 39/29

(71) Ansøger: ***Merck & Co. Inc.; Rahway; New Jersey, US**

(72) Opfinder: **Philip J. *Provost; US, Maurice R. *Hilleman; US**

(74) Fuldmægtig: **Hofman-Bang & Boutard A/S**

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af et levende, svækket hepatitis A virus og diagnostisk præparat opnået ved fremgangsmåden

(56) Fremdragne publikationer

US pat. nr. 3105011, 4031203

(57) Sammendrag:

3431-79

Hepatitis A virus modificeres ved dyrkning i cellekultur ved passage i aber, fortrinsvis mindst to passager i hver af to forskellige arter af aber, fjernelse af den inficerede lever, der bruges til podning af en in vitro cellekultur, som inkuberes, til der er dannet antigen, hvorpå viruset passeres mindst én gang yderligere i in vitro cellekultur.

Levende, svækket hepatitis A vaccine og inaktiveret hepatitis A vaccine kan fremstilles ud fra det modificerede hepatitis A virus.

Desuden kan der udvindes hepatitis A antigen til diagnostiske formål og til brug ved fremstilling af antigen, immunogen viralvaccine.

Det modificerede virus kan let og på ekonomisk måde i stor målestok dyrkes i forskellige celletyper, f.eks. celler afledt af primatlever eller -nyre, diploide lungeceller eller primære kyllingefostercellekulturer.

DK 158743 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af et levende, svækket hepatitis A virus og et diagnostisk præparat opnået ved fremgangsmåden.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte, og præparatet ifølge opfindelsen er ejendommeligt ved det i krav 8's kendetegnende del anførte.

I US-A-3 105 011 påstås det, at der tilvejebringes fremgangsmåder til propagering af såvel hepatitis A virus som hepatitis B virus i vævskultur. Den påståede lære er imidlertid blevet modbevist af nyere, yderst pålidelige undersøgelser af forskere med særligt kendskab til hepatitis. Der henvises i denne forbindelse til følgende artikler:

- Science, bind. 182, dec. 1973, pp. 1026-1028, især side 1027, anden spalte, sidste sætning af det fuldstændige afsnit;

- Purcelle et al., Am. J. Med. Sci., bind. 270, nr. 1, 1975, side 61-62;

- Cabasso et al., udg. Developments in Biological Standardization, bind. 30, pp. 390, 391 og 464, S. Karger Basel, 1975; og

- Lenette et al., udg. Diagnostic Procedures for: Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections, 5. udg., side 907, American Public Health Assoc. 1979.

Disse artikler modbeviser den påståede lære fra US patentskrift nr. 3 105 011 og viser utvetydigt, at den påståede propagering af hepatitis A virus som anført i denne reference er ukorrekt.

Det er endvidere kendt, at hepatitis A har en diameter på ca. 27 nm (Feinstone et al., J. Virology, juni 1974, pp. 1412-1414). I US patentskrift nr. 3 105 011 anføres, at levende virus blev passeret gennem en række filtre med en porediameter beliggende i intervallet 5,0 til 0,45 mμ, som er det samme som en porediameter på 5,0 til 0,45 nm. Da hepatitis A virus har en partikelstørrelse på 27 nm, er det fysisk umuligt for det at passere gennem filtre, hvis største porediameter er 5,0 nm. Det er derfor indlysende, at hvilket materialet, der end er opnået ved den i US patentskriftet beskrevne proces, var det helt indlysende ikke hepatitis A virus.

Det har vist sig, at hepatitis A virus, som er blevet adapteret ved mindst én passage i leveren af en modtagelig sub-human primat, f.eks. egernabe, ugleabe, afrikansk grøn abe, rhesusabe eller chimpanse, med held kan passeres i cellekultur. Der foretages foretrukkent mindst fem passager i den modtagelige sub-humane primat. Det foretrækkes også, at der anvendes mindst to sub-humane primatarter, og at der anvendes mindst to passager i hver art.

Efter den sidste passage fjernes den inficerede lever, og den homogeniseres og klares og anvendes til inokulering af cellekulturer.

Cellekulturerne kan være primære egernabe-levercellekulturer, primære afrikansk grøn abe-nyrecellekulturer, primære rhesusabe-nyrecellekulturer, primære cynomolgus abe-nyrecellekulturer, rhesusabefoster-nyrecellekulturer, cercopithecus-abefoster-nyrecellekulturer, rufiventer-egernabefoster-nyrecellekulturer, eller en vilkårlig, kontinuert eller transformeret nyre- eller levercellekultur afledt fra et menneske eller en sub-human primat, som er modtagelig for hepatitis A virus-infektion. Cellekulturerne kan også bestå af primære hele kyllingefostre el-

ler andefosterceller eller celler afledt fra nyrerne af nyfødte kyllinger eller ællinger.

Cellekulturen inkuberes ved ca. 33 °C til ca. 39 °C, foretrukkent ved ca. 35 °C til ca. 37 °C, indtil hepatitis A antigen kan påvises enten i cellelaget eller i vævskulturvæsken. Typisk kræves ca. 7 til ca. 35 dage for udvikling af påviseligt hepatitis A antigen. Antigenet påvises hensigtsmæssigt i cellelaget ved fluorescens-antistofmetoder, og i vævskulturvæsken enten ved immun-adhærens-hæmagglutinationsprøve eller ved radioimmun prøve.

Seriepassager in vitro kan udføres ubegrænset. Med efterfølgende passager opnås der bedre adaption af virus til in vitro dyrkning, hvilket sandsynliggøres ved hurtigere forekomst af hepatitis A antigen og produktionen af større mængder af det virale antigen.

Efter fem eller flere seriepassager in vitro af hepatitis A virus i de i det foregående nævnte celletyper viser det sig, at viruset modificeres således, at det let kan dyrkes i yderligere celletyper som følger: humane føtale diploide lungefibroblastceller, føtale rhesus-diploide lungeceller og føtale cercopithecus-diploide lungeceller. Disse celletyper er alle hensigtsmæssige til anvendelse ved fremstillingen af levende svækkede humane viralvacciner.

Det humane hepatitis A virus kan således modificeres ved seriepassager i levere fra sub-humane primater og påfølgende seriepassager i cellekulturen og kan anvendes til tilvejebringelse af en levende, svækket human viralvaccine og kan desuden dyrkes på økonomisk måde i så stor mængde i cellekultur, at det muliggør produktion af en tilstrækkelig mængde viralantigen til fremstilling af en antigen, immunogen viralvaccine og også til fremstilling af hepatitis A antigen til diagnostiske præparater. Hel

virus er fordelagtigt frem for virale underenheder ved diagnose og påvisning af hepatitis. Det er endvidere en fordel ved præparatet ifølge opfindelsen, at man undgår at anvende det farlige, patogene virus i diagnostiske laboratorier.

Hepatitis A antigenet kan inaktiveres til anvendelse som vaccine mod hepatitis A virus. Inaktivering af infektivitet kan opnås ved behandling med formalin. Den mængde formalin, der anvendes, er effektiv til at inaktivere infektiviteten af antigenet, mens det beholder immunogeniteten, så at materialet er effektivt som vaccine. Typisk fortyndes formalin, 37%'s formaldehydopløsning, i ca. 1000 til ca. 10 000 dele af antigenpræparatet, og der omrøres ved ca. 4 °C til ca. 60 °C i ca. 2 timer til ca. 30 dage, idet formalinen fortrinsvis fortyndes i ca. 2000 til ca. 6000 dele viruspræparat ved ca. 20 °C til ca. 45 °C i ca. 2 dage til ca. 6 dage, særligt foretrukkent ved ca. 37 °C i ca. 3 dage.

Vaccinen kan anvendes til at immunisere mod hepatitis A virus i modtagelige pattedyrearter, som f.eks. egernaber og chimpanser.

De efterfølgende eksempler forklarer opfindelsen nærmere.

EKSEMPEL 1

Seriepassage af hepatitis A virus i egernaber til fremstilling af en viral stamme til in vitro dyrkning

(1) Human hepatitis A virus, stamme CR326, overføres til en gruppe på 6 Saguinus mystax egernaber ved intravenøs inokulering af blod fra et akut sygt menneske med hepatitis A efter proceduren af Mascoli et al., P.S.E.B.M. 142, 276-282, 1973.

(2) Disse inokulerede egernaber udvikler forøgelse af serum-isocitrin-dehydrogenase (ICD) enzymværdier inden for 30-50 dage efter inokulationen såvel som histologiske ændringer i leveren på grund af viral hepatitis.

(3) En anden passage af CR326-midlet udføres i mystax egernaber ved intravenøs inokulering af serum taget fra dyr fra første passage i den periode, hvor ICD-forøgelsen finder sted, til en anden gruppe mystax egernaber. Denne procedure øger yderligere ICD-dannelsen og leverændringerne som angivet i det foregående.

(4) Tredje, fjerde og femte passage af CR326-midlet i mystax egernaber udføres på lignende måde. Ekstensive serumneutraliseringsprøver udføres for at bevise, at CR326-midlet som propageret i egernaberne faktisk er humant hepatitis A virus efter proceduren beskrevet af Provost et al., P.S.E.B.M. 142, 1267, 1973.

(5) Efter det femte passageniveau udtages levervæv fra en inficeret mystax egernabe på det tidspunkt, hvor den første igangsætning af serum-ICD-forøgelsen finder sted.

(6) En 1:1500 fortynding af den homogeniserede lever anvendes til at overføre CR326-infektionen til S. labiatus (rufiventer) egernaber ved intravenøs inokulering. Dette udgør den sjette seriepassage i egernaber, og den første passage i rufiventer egernaber. Levervæv udtages på det tidspunkt, hvor ICD-forøgelsen indtræder, efter den procedure, der beskrives af Provost et al., P.S.E.B.M. 155, 283-286, 1977.

(7) En 1:100 opløsning af den homogeniserede lever anvendes til at udføre en anden seriepassage af CR326-

midlet i en gruppe på 24 rufiventer-egernaber. Der udtages lever af disse dyr som angivet i det foregående.

(8) Der udføres ialt 26 seriepassager af CR326-midlet i rufiventer-egernaber ved gentagelse af leverudtagelse, homogenisering, fortynding og intravenøs injektion.

(9) CR326-midlet seriepasseres således ialt fem gange i mystax egernaber og yderligere ialt 26 gange i rufiventer egernaber som beskrevet i trin 1-8.

(10) Levervæv fra inficerede rufiventer egernaber ved den 24. til 31. egernabe-passage homogeniseres og klares. Dette homogeniserede og klarede levervævsprodukt tjener som podemedium til in vitro dyrkning af hepatitis A virus.

EKSEMPEL 2

Dyrkning af hepatitis A virus i egernabe levercellekulturer

(1) En rufiventer egernabe inokuleres intravenøst med 1 ml af en 1:100 fortynding af homogeniseret, klaret, inficeret levervæv i form af en vandig ekstrakt fremstillet som i eksempel 1.

(2) 24-48 timer efter inokulering, før sygdom indtræder, fjernes en del af leveren fra dyret kirurgisk.

(3) Levervævet hakkes fint på en plastoverflade med et barberblad med enkelt kant. Stykkerne vaskes omhyggeligt med celledyrkningsmedium indeholdende 20% kalvefosterserum. De vaskede stykker lægges på dyrkningsbeholdere af plast eller glas og tilføres tre

gange pr. uge et dyrkningsmedium indeholdende Williams medium E (indeholdende uorganiske salte, aminosyre, vitaminer, D-glucose, glutathion, methyllinoleat, phenolrødt og natriumpyruvat) plus 20% normal egernabeserum plus 10^{-6} molær glucagon plus glutamin, penicillin og streptomycin i de sædvanligt anvendte mængder. Dexamethason, 9-fluor-11β,17,21-trihydroxy-16α-methylpregna-1,4-dien-3,20-dion og insulin kan eventuelt være til stede i en koncentration på ca. 10^{-6} molær. Mediet anvendes i tynde lag, f.eks. 2 ml pr. 25 cm^2 dyrkningskolbe. Inkubering foretages ved 35 °C på en vippeplatform for at give maksimal luftning. Gasatmosfæren består af 5% carbondioxid i luft.

(4) I løbet af 7 dage begynder en voldsom udgroning af hepatocyt-lignende epitelceller. Denne udvækst af store øer af hepatocyt-lignende celler fra vævsstykkerne fortsætter langsomt i flere uger. Der kan vedligeholdes kulturer i yderligere mange uger. Hepatocyt-funktion identificeres ved iagttagelse af albumin-produktion og produktion af tyrosinaminotransferase.

(5) Beskrivelsen af egernabe levercellekulturer i 3 og 4 gælder, hvad enten leveren opås fra normale eller med hepatitis A inokulerede egernaber.

(6) Hepatitis A viral antigen bestemmes i de kulturer, der er fremstillet ud fra med virus inokulerede dyr, begyndende ca. 7 dage efter fremstillingen af kulturen. En sådan iagttagelse muliggøres ved påføring af fluorescein-mærket humant globulin fremstillet ud fra human sera fra hepatitis A rekonvalescent på acetone-fikserede dækglas-kulturer. Disse præparater undersøges i et lodret fluorescens-Zeiss mikroskop med et 63X planapochromat objektiv og 10X okularer.

(7) Hepatitis A viral antigen bestemmes som lysende grønne fluorescerende granuler lokaliseret i cellecytoplasmaet i hepatocyt-lignende celler. Både antallet af granuler og deres størrelse forøges i løbet af et tidsrum på ca. 10 uger efter kulturstart. Store mængder af antigenet forefindes i mindst 16 uger efter kulturstart.

(8) Forholdet mellem granulerne og hepatitis A virus bevises med de fakta, at a) leverkulturer fremstillet fra normale egernaber og ikke udsat for virus viser aldrig udvikling af den granulære fluorescens, og b) den granulære fluorescens blokeres specifikt ved forudgående tilførsel til de fikserede præparater af human konvalesens hepatitis A sera, men ikke ved sera fra samme patienter før sygdommen.

(9) Det vises også, at disse leverkulturer tilvejebringer in vitro mangfoldiggørelse af hepatitis A virus som følger. a) 4 uger efter etablering af kulturerne producerer såvel overliggende væsker som cellekulturekstrakter hepatitis A infektion ved intravenøs inokulering i rufiventer egernabe, b) efter 3 ugers forløb og senere kan der vises typiske hepatitis A viralpartikler, der har de egenskaber, der er beskrevet af Provost et al., P.S.E.B.M. 148, 532-533, 1975 i kulturekstrakter ved immun-elektronmikroskopi, og c) efter 3 ugers forløb og mere kan hepatitis A viral antigen bestemmes ved immun-adhærenshæmagglutination kulturekstrakter efter proceduren af Miller et al., P.S.E.B.M., 149, 254-261, 1975.

EKSEMPEL 3

Dyrkning og seriepassage af hepatitis A virus i egernabelevercellekulturer inokuleret in vitro

(1) Levervæv kirurgisk fjernet fra en normal rufiventer egernabe pakkes, og der fremstilles cellekulturer ved samme metode som anvendt for inficeret levervæv i eksempel 2.

(2) Ca. 7 dage efter fremstillingen af cellekulturerne, når udvæksten af hepatocyter er begyndt, inokuleres kulturerne i 25 cm^2 kolber med hepatitis A virus i form af 0,1 ml af en 4%'s vandig ekstrakt af inficeret egernabelever fremstillet som i eksempel 1.

(3) De med virus inokulerede levercellekulturer og som kontrol anvendte uinokulerede kulturer inkuberes ved 35 °C og behandles tre gange pr. uge som i eksempel 2.

(4) Dækglas fjernes, der acetone-fikseres, farves med fluorescein-mærket hepatitis A antistof-holdigt globulin og undersøges ved fluorescens-mikrokskopi som angivet i eksempel 2.

(5) Hepatitis A viral antigen bestemmes i virus-inokulerede kulturer, men ikke i kontrolkulturer, fra ca. 7 dage efter inokulering og i stigende grad en 3 ugers periode til 28 dage. Som i eksempel 2 er antigenet synligt som lysende grønne fluorescerende cytoplasmagranuler. Specificitet bevises som i eksempel 2.

(6) Celler og væsker fra såvel kontrolkulturer som virus-inokulerede kulturer høstes 3-4 uger efter inokulering ved frysning og tørring af kulturerne tre gange. Blandingen af brudte celler og dyrkningsvæske

klares ved centrifugering ved lav hastighed.

(7) En sådan kulturhøst vises yderligere at indeholde hepatitis A ved a) intravenøs inokulering og opnåelse af infektion på egernabe, b) elektronmikroskopi og c) immunadhærens-hæmagglutination som i eksempel 2. I alle tilfælde er høstede kontrolkulturer negative for hepatitis A virus aktivitet.

(8) En anden in vitro passage af viruset i levercellekultur foretages ved inokulering af 0,2 ml af høsten fra passage 1 (trin 6) i det foregående) i nye cellekulturer i 25 cm^2 kolber fremstillet ud fra normal abenyrelever. Et mønster af viral vækst og bestemmelse opnås, som i meget høj grad svarer til det, der skitseret i trin 5-7.

(9) En sådan seriepassage in vitro af viruset i egernabeleverkulturer udføres fem gange og kan udføres uendeligt. Med øget antal passager opnås bedre adaption af viruset til in vitro vækst med hurtigere tilsynekomst af store mængder cytoplasmiske fluorescerende granuler.

(10) Der anvendes også et yderligere kriterium for at vise, at det i denne cellekultur dannede stof rent faktisk er human hepatitis A virus. Høsten fra fjerde seriepassage får lov at reagere med serum fra human hepatitis A patienter på præsygdomsstadiet og ved rekonvalescensstadiet før inokulation af cellekulturer. Viruset neutraliseres, dvs. det overfører ikke infektion til cellekulturen, af rekonvalenscenssera, men ikke af præsygdomssera.

EKSEMPEL 4

Dyrkning og seriepassage af hepatitis A virus i primære afrikansk grøn abe-nyrecellekulturer

(1) Nyrer fjernes kirurgisk fra hepatitis A antistoffrie afrikanske grønne aber. Ved standardteknologi hakkes nyrerne og trypsiniseres, og der fremstilles enkeltlagscellekulturer.

(2) Cellekulturerne vokser næsten sammen i løbet af 5-7 dage på et medium bestående af Eagle minimal essential medium indeholdende 10% kalvefosterserum.

(3) Ved næsten sammenvoksning erstattes kulturmediet med samme medium, men kun med 0,5% kalvefosterserum. Hver 25 cm^2 kolbekultur indeholdende 5 ml medium inokuleres med 0,2 ml af en 4%'s vandig ekstrakt af egernabelever fremstillet som de i eksempel 1.

(4) Kulturerne inkuberes ved 35 °C og behandles en gang om ugen. Dækglas fjernes, der fikseres og undersøges ved immunofluorescens som i eksempel 2 med periodiske intervaller.

(5) Hepatitis A viral antigen bestemmes således i virusinokuleret, men ikke i uinokuleret kontrolkultur, begyndende ca. 7 dage efter inokulering og stigende i løbet af en 3 ugers periode til 28 dage. Som i eksempel 2 og 3 er antigenet synligt som lysende grønne fluorescerende cytoplastiske granuler. Specificitet bevises som i eksempel 2 og 3.

(6) Cellekulturer høstes som i eksempel 3.

(7) Tilstedeværelsen af hepatitis A virus vises yderligere i cellekulturhøst ved a) inokulering af egern-

aber med sygdom til følge, b) immun-elektronmikroskopi og c) immun-adhærenshæmagglutination som i eksempel 2 og 3. I alle tilfælde er produkter høstet fra uinokulerede kontrolkulturer frie for hepatitis A virus.

(8) Seriepassage in vitro af hepatitis A virus i primære grøn abe nyrecellekulturer udføres på samme måde som beskrevet for egernabe-leverkulturer i eksempel 3. Sådan seriepassage kan udføres uendeligt.

EKSEMPEL 5

Dyrkning og seriepassage af hepatitis A virus i andre cellekulturer

(1) Under anvendelse af metoder som beskrevet i eksempel 4 viser det sig, at hepatitis A virus også kan dyrkes og seriepasseres i cellekulturer af følgende typer: a) føtal rhesusabe-nyrecellelinie (FRhK-6), b) primære kyllingefoster-cellekulturer og c) føtal rufiventer egernabe-nyrecellelinie. Positive resultater i alle disse kulturer er baseret på inokulering af kulturerne med hepatitis A virus afledt som i eksempel 1.

(2) Hepatitis A virus seriepasseres fem gange i FRhK-6 cellelinie som i det foregående. Virushøsten fra femte passageniveau viser sig positivt at inficere humane diploide lungefibroblast-cellekulturer, baseret på kriterier som i eksempel 2, 3 og 4. Hepatitis A virus infektionen kan derefter seriepasseres i den humane diploide linie.

(3) Hepatitis A virus seriepasseres fem gange i FRhK-6 cellelinie som i (1). Den ved femte passageniveau opnåede virushøst findes positivt at inficere føtale

diploide rhesusabe-lungecellekulturer (FRhL-2), baseret på kriterier som i eksempel 2, 3 og 4. Hepatitis A virusinfektionen kan derefter seriepasseres i rhesus-diploidlinien.

EKSEMPEL 6

Fremstilling af vævskulturdyrket, levende, svækket hepatitis A viral vaccine

(1) Hepatitis A virus fremstillet som i eksempel 1 seriepasseres in vitro i primære afrikansk grøn abenyrecellekulturer som angivet i eksempel 4. Cellekulturhøst af viruset ved passageniveau 5 og derover vises at inducere hepatitis A antistof ved intravenøs inokulering i rufiventer egernaber i en mængde på 1000 50%'s vævskultur-infektionsdoser som fremstillet ved fortynding af høsten i fysiologisk saltvand, men ikke at bevirke åbenbar sygdom i dyrene som målt ved serum-isocitrindehydrogenase-værdier (ingen overskred 1500 sigmaenheder) og leverhistopathologien (der blev kun noteret mindre ændringer). De dyr, hvori hepatitis A antistof dannes mod det vævskulturdyrkede virus, bliver resistente over for infektion, hvilket infektionsforsøg med 1000 50%'s egernabe-infektionsdoser af hepatitis A virus injiceret intravenøst viser. Det vævskultur-passerede hepatitis A virus er modificeret således ved fremgangsmåden, at det udgør en levende, svækket hepatitis A viralvaccine.

(2) Hepatitis A virus, der på tilsvarende måde blev passeret in vitro i kulturer af føtale rhesusabe-nyreceller (FRhK-6) eller føtale rhesusabe-diploid lungeceller (FRhK-6) eller primære kyllingefosterceller eller humane diploide lungefibroblastceller (MRC5, WI-38) eller føtale rufiventer egernabe-nyrecel-

lelinier, blev tilsvarende svækket efter 5 eller flere seriepassager og kunne anvendes som en levende, svækket vaccine.

EKSEMPEL 7

Fremstilling af vævskulturdyrket, formalin-inaktiveret hepatitis A viral vaccine

(1) Hepatitis A virus fremstillet som i eksempel 1 og 6 udsættes for 5 seriepassager in vitro i cellekulturer i primære abenyreceller som i eksempel 4 og 5.

(2) Ved det femte passageniveau eller ved højere passageniveauer høstes cellekulturerne efter 3 ugers inkubering ved 35 °C, eller på et sådant tidspunkt, hvor indholdet af hepatitis A viral antigen fra den homogeniserede kultur er på ca. 8 eller flere enheder målt ved immun-adhærenshæmagglutination.

(3) Cellekulturhøst opnås ved frysetørring af de hele kulturer to gange, afstrygning af cellelagene over i kulturvæsken og homogenisering af hele blandingen ved udsættelse for ultralyd i 15 sekunder.

(4) Produktet klares ved centrifugering ved lav hastighed, opvarmes ved 60 °C i 1/2 time, og gencentrifugeres ved lav hastighed til yderligere klaring af væsken.

(5) Væsken filtreres derpå gennem 0,45 mikron kalve-infusionsbehandlet Millipore-filtre. Dette produkt behandles med 1:4000 formalin i 4 dage ved 35 °C under kontinuerlig omrøring. Formalinen neutraliseres delvis efter endt behandling med natriumbisulfit, hvilket giver et restformalinindhold på 10 µg/ml produkt.

(6) Produktet indstilles med phosphatpufret saltvand til at indeholde 10^{10} 27 nm hepatitis A virus partikler pr. ml og opbevares ved 4 °C.

(7) Produktet er fri for infektiøs hepatitis A virus, når det prøves ved intravenøs inokulering i rufiventer egernaber.

(8) Produktet er potent som hepatitis A viral vaccine, idet en eller flere subcutane injektioner på 1 ml i rufiventer egernaber bevirker dannelsen af påviseligt hepatitis A antistof, og dyrene gøres immune for udsættelse for 1000 50%'s egernabe-infektionsdoser af hepatitis A virus.

(9) Hepatitis A virus behandlet på tilsvarende måde, bortset fra, at det føres gennem 5 seriepassager in vitro i cellekultur i trin 1 i føtal rhesusabenyrecellelinie (FRhK-6) eller i primære kyllingefosterceller, eller i humane diploide lungefibroblastceller (MRC5 eller Wi-38), eller i føtale rhesusabe-diploid lungefibroblaster (FRhL-2) giver et tilsvarende produkt, der er frit for infektiøs hepatitis A virus, men er potent som hepatitis A viral vaccine.

EKSEMPEL 8

Et diagnostisk antigen omfattende enten levende hepatitis A virus fremstillet som i eksempel 1-7 eller samme virus efter formalininaktivering anvendes i serologiske tests (f.eks. radioimmunoprøven med hel virus som angivet i Purcelle et al., J. Immunol. 116, 349 (1976)) til diagnose af hepatitis A sygdom.

P a t e n t k r a v :

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et levende, svækket hepatitis A virus ved modificering og dyrkning af hepatitis A viruset i cellekultur, k e n d e t e g n e t ved, at man modificerer viruset ved mindst én passage deraf i en modtagelig sub-human primat, fjerner den inficerede lever, inokulerer en in vitro cellekultur med den inficerede lever, dyrker ved inkubering af cellekulturen, indtil hepatitis A antigen kan påvises i kulturcellerne eller -væsken, og passerer viruset yderligere mindst én gang in vitro i cellekultur.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den sub-humane primat er en egernabe, en ugleabe, en rhesusabe, en afrikansk grøn abe, en cynomolgus abe eller en chimpanse.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at egernaben er Saguinus mystax eller S. labiatus (rufiventer).

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man anvender mindst fem passager af hepatitis A virus i sub-humane primater.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at viruset passeres mindst to gange i hver af to forskellige arter af modtagelige sub-humane primater.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at cellekulturerne består af primære, kontinuerligt dyrkede eller transformerede celler afledt fra primat-lever eller -nyre.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at hepatitis A viruset seriepasseres mindst fem gange i en cellekultur, der er egnet til brug i forbindelse med human vaccine, hvilken cellekultur er valgt blandt humane diploide lungefibroblaster, primære afrikansk grøn abe nyreceller, primære kyllingefoster-fibroblaster eller føtale rhesus-diploide lungeceller.

8. Diagnostisk præparat omfattende et levende, svækket hepatitis A virus, k e n d e t e g n e t ved, at viruset er opnået ved fremgangsmåden ifølge krav 1.

9. Præparat ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t ved, at det er inaktiveret ved kontakt med et middel, der er i stand til at inaktivere viruset.