



(12) **PATENTSKRIFT**

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷: **C 12 N 7/02**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1988 04379**

(22) Indleveringsdag: **1988-08-05**

(24) Løbedag: **1988-08-05**

(41) Alm. tilgængelig: **1989-04-04**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2000-04-03**

(30) Prioritet: **1987-08-06 US 082720**

(73) Patenthaver: **Merck & Co. Inc., Rahway, New Jersey, USA**

(72) Opfinder: **John Alfred Lewis, 1229 Clearbrook Road, West Chester, PA 19380, USA**
Emilio A. Emini, 6 Faggs Manor Lane, Paoli, PA 19301, USA
Marcy Ellen Armstrong, 1080 Barnbridge Drive, Schwenksville, PA 19473, USA

(74) Fuldmægtig: **Hofman-Bang A/S, Hans Bekkevolds Allé 7, 2900 Hellerup, Danmark**

(54) Benævnelse: **Fremgangsmåde til rensning af hepatitis A vironer**

(56) Fremdragne publikationer:
Ingen

(57) Sammendrag:
Metoder til rensning af hepatitis A virus (HAV), der kan tilpasses kommerciel målestok, og fremstilling af specifikke HAV-vacciner, herunder formalin-inaktiveret HAV og svækket HAV.

- Hepatitis A virus (HAV) er et morfologisk, biokemisk og immunologisk særskilt picornavirus, der er det etiologiske middel for infektiøs hepatitis i mennesker. Som andre picornavira indeholder HAV et enkeltstrenget, positiv-sense, infektiøst RNA-genom. Der er beskrevet hovedcapsidproteiner, VP1 (32-33 kDa), VP2 (26-29 kDa), VP3 (22-27 kDa) og VP4 (10-14 kDa). HAV er nu blevet klonet og sekvenseret, se f.eks. Najarian, R. et al., Proc. Natl. Acad. Scia. 82, 2627 (1985). For nyere oversigter, se f.eks. Gerety, R.J. (udg.) Hepatitis A Academic Press 1984; Feinstone, S.M. Progress in Liver Diseases, 8, 299 (1986) og Mijch, A.M. et al., Seminars in Liver Diseases, 6, 52 (1986).
- 15 Forskellige metoder er blevet udarbejdet til delvis rensning af HAV-virioner med det formål at studere og indlede karakterisering. Se f.eks. Hornbeck, C.L. et al., Intervirology 6, 309-314 (1975); Locarnini, S.A. et al., Intervirology 10, 300-308 (1978); Siegl, G. et al., J. Virol. 26, 40-47 (1978); Siegl, G. et al., J. Gen. Virol. 57, 331-341 (1981); Siegl, G. et al., Intervirology 22, 218 (1984); Hughes, J.V. et al., J. Virol. 52, 465 (1984) og Wheeler, C.M. et al., J. Virol, 58, 307 (1986). Hver af disse metoder gør brug af et eller flere trin, der
- 25 næppe vil kunne godkendes af Food and Drug Administration i USA til afprøvningsformål og efterfølgende salg af vaccine mod HAV. F.eks. anvendes der hyppigt detergenter og/eller eksogene enzymer. Endvidere gør alle disse metoder brug af besværlige, upraktiske og for kostbare trin,
- 30 såsom saccharosegradient-centrifugering og CsCl-densitetsgradient-centrifugering.
- Det har nu overraskende vist sig muligt at tilvejebringe fremgangsmåder til opnåelse af meget rent HAV uden anvendelse af detergenter eller eksogene enzymer. Endvidere
- 35 kan de heri omhandlede metoder let udvides til kommerciel

produktion. Desuden er det lykkedes at tilpasse disse metoder til MRC-5 værtsceller, som er godkendt af Food and Drug Administration til produktion af human vaccine.

- 5 Den foreliggende opfindelse angår således metoder til i alt væsentligt at rense hepatitis A virus (HAV), hvilke fremgangsmåder omfatter følgende trin:

- 10 a) dyrkning og høst af celler inficeret med HAV,
b) lyse af de høstede celler ved lydbehandling,
c) ekstraktion af lysatet og bibeholdelse af den vandige fase,
15 d) koncentrering af den vandige fase med en vandopløselig syntetisk polymer, der kan udfælde HAV,
e) ekstraktion af det udfældede HAV og bibeholdelse
20 af den vandige fase,
f) underkastelse af den vandige fase for ionbytningschromatografi, og
25 g) gelfiltrering af fraktioner indeholdende HAV, hvilket giver i alt væsentligt rensset HAV.

Disse processer kan tilpasses kommerciel skala og er sandsynlige kandidater for kommerciel produktion af FDA-
30 godkendt, inaktiveret HAV såvel som svækket HAV, til vaccinationsformål.

De kommercielt tilpasselige rensningsprocesser ifølge opfindelsen omfatter rensning af et vilkårligt hepatitis
35 A virus, svækket eller ikke svækket, i en vilkårlig cel-
lelinie eller kultur, der er modtagelig for infektion med

hepatitis A virus. F-stammen af CR-326 isolatet propageret i MRC-5 celler blev anvendt i den foreliggende opfindelse for at forklare denne nærmere, og det er faktisk en svækket stamme. Andre stammer og/eller serotyper er omfattet af opfindelsen, herunder HAV-stammer, der kan svækkes ved konventionel teknik. Andre cellelinier omfatter Vero, FL, WI-38 og FRHk6-celler. Disse og andre systemer til HAV-propagering i cellekulturer er diskuteret i Gerety, R.J. "Aktive Immunization Against Hepatitis A", i Gerety, R.J. (udg.) Hepatitis A Academic Press 1984, s. 263-276 og Ticehurst, J.R. Seminars in Liver Disease 6, 46-55 (1986). I princippet kan enhver cellelinie, såsom enhver diploid fibroblastcellelinie, tjene som værtscelle, forudsat at den er modtagelig for HAV-infektion. Den foretrukne cellelinie er MRC-5.

I den efterfølgende beskrivelse svarer afsnitnummeret til nummeret på strømningsdiagrammet.

1. HAV-inficerede celler dyrkes og høstes ved en vilkårlig af en række forskellige konventionelle teknikker. Vækstbetingelser, herunder udvælgelse af medier, afhænger af de krav, den anvendte cellelinie har. For MRC-5 celler er tilknytningen til et substrat nødvendig, så skrabning af celler eller trypsinering er et krav for høst. Andre celletyper, der er nyttige i forbindelse med den foreliggende opfindelse, omfatter de, der er i stand til at gro i suspension. Suspensionscellekulturer centrifugeres normalt til dannelse af en pellet af cellerne.
2. Efter vækst og høst lyseres de HAV-inficerede celler ved en vilkårlig af en eller flere af forskellige teknikker, herunder, men ikke udelukkende, udsættelse for hypotonisk puffer, vortexbehandling, skiftende nedfrysning og optøning samt lydbehandling. Det har vist sig, at lysbehandling kræves til lyse af HAV-inficerede MRC-5

celler, hvilket resulterer i effektiv frigørelse af virioner fra cellen. Enhver frigørelse af HAV-virioner fra en sønderdelt værtscelle kaldes her "lyse". Det menes, at lydbehandling effektivt frigiver HAV-virioner fra den
5 subcellulære pseudokrystallinske tilstand i cellen. Det vil forstås, at foruden lydbehandling kan mange kombinationer med hyponisk lyse, vortexbehandling eller nedfrysning-optøning anvendes til opnåelse af passende og effektiv lyse af celler. Det foretrækkes for tiden især at
10 anvendes følgende trin til lyse af HAV-inficerede MRC-5 celler:

a) optøning af tidligere frosne, høstede celler i rør ved tilsætning af lysepuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5,
15 10 mM NaCl, 1,5 mM $MgCl_2$),

b) kraftig vortexbehandling (10-15 sekunder ved stilling 10 i en Vortex-Genie),

20 c) nedfrysning-optøning en eller flere gange ved successiv udsættelse hver gang for et bad med ethanol og tøris og et 37 °C varmt vandbad, og

d) lydbehandling en eller flere gange i 30 sekunder
25 ved den maksimale spænding fra en cuphornssonicator med et cirkulerende is-vandbad (Branson Sonifier Cell Disrupter 185 og Ultrasonics cuphorn),

hvilket gav et sonicat.

30

3. Efter lyse fortyndes HAV-inficerede celler, der nu er en lyseret suspension, eller et sonicat, med puffer og underkastes derpå organisk ekstraktion. Sådan ekstraktion fjerner blandt andre forureninger lipid og lipidlignende stoffer. Følgelig fortyndes sonicatet med en
35 vilkårlig af en række forskellige puffere, herunder

phosphatpuffret saltvand, Tris, carbonat, bicarbonat eller acetatpuffere. Da HAV-virioner sandsynligvis er syrestabile, kan puffere i et pH-område, der er surt, også udgøre mulige substitutter. Det har vist sig, at tilstedeværelsen af $MgCl_2$ i pufferen i alt væsentligt nedsætter virionudbytter. Den mest foretrukne puffer er TNE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA).

Sonicater fortyndet med puffer ekstraheres derpå ved tilsætning af en blanding af en halogeneret lavere alkan, såsom methylenchlorid, og et antiskumningsmiddel, såsom isoamylalkohol. Volumenforholdet mellem halogeneret lavere alkan og antiskumningsmiddel ligger mellem ca. 15:1 og ca. 50:1, foretrukket mellem ca. 20:1 og 30:1. Det har vist sig, at methylenchlorid er bedre end chloroform i dette trin. HAV-virioner forbliver i den vandige fase og grænsefladen.

Sonicatet ekstraheres mest foretrukket organisk ved tilsætning af et lige så stort volumen methylenchlorid:isoamylalkohol (24:1 efter volumen) med vortexbehandling i 1 minut og centrifugere ved 3 000 omdr./min. i 10 minutter ved 20 °C i en IEC-centrifuge (~3 000 g) for at opnå faseadskillelse. Den vandige fase gemmes, den organiske fase bortkastes, og den mellemliggende grænse genekstraheres med et volumet TNE-puffer lig med en tredjedel af det oprindelige prøvevolumen ved vortexbehandling og centrifugering som før. De to vandige faser samles, og volumen måles, hvilket giver hepatitis A virus i organisk ekstraherede cellelysater.

4. Næste trin involverer koncentration med en vandopløselig syntetisk polymer, der kan udfælde proteiner. Det foretrækkes at koncentrere de organisk ekstraherede cellelysater med polyethylenglycol (PEG) under anvendelse af en molekylvægt på mellem ca. 2 000 dalton og ca.

- 12 000 dalton. Typisk sættes der en NaCl til lysatet til en slutkoncentration på mellem ca. 150 mM og ca. 500 mM, hvorpå PEG tilsættes til en slutkoncentration på mellem ca. 2% efter vægt-volumen og ca. 10% efter vægt-volumen.
- 5 Det foretrækkes især at indstille organisk ekstraherede cellelysater til ca. 500 mM NaCl og derpå tilvejebringe ca. 4% efter vægt-volumen lysat i PEG (MW~8 000 dalton). Efter udfældning centrifugeres de resulterende 4% PEG-lysater, supernatanten bortkastes, og PEG-pellet re-
- 10 suspenderes til yderligere behandling. Den resuspenderede PEG-pellet lydbehandles foretrukket før den anden organiske ekstraktion som beskrevet i det følgende. Produktet fra trin 4 er resuspenderet, lydbehandlet PEG-pellet.
- 15 5. Resuspenderet, lydbehandlet PEG-pellet ekstraheres ved tilsætning af en blanding af en halogeneret lavere alkan, såsom chloroform, og et antiskumningsmiddel, såsom isoamylalkohol. Volumenforholdet mellem halogeneret lavere alkan og antiskumningsmiddel er mellem ca. 15:1 og
- 20 ca. 50:1, foretrukket mellem ca. 20:1 og 30:1. Det har nu overraskende vist sig, at denne anden organiske ekstraktion i alt væsentligt forbedrer renheden af det endelige HAV-produkt. I modsætning til den første organiske ekstraktion (se afsnit svarende til trin 3) har det end-
- 25 videre overraskende vist sig, at i den anden organiske ekstraktion er chloroform bedre end methylenchlorid.

Trinnene i den anden ekstraktion udføres foretrukket som følger:

30

- Det lydbehandlede, resuspenderede bundfald roteres ved 200 omdr./min. på en orbital platformsryster i 1 time ved 4 °C. Den resuspenderede PEG 8 000 pellet ekstraheres organisk ved tilsætning af et lige så stort volumen chloroform:isoamylalkohol (24:1 efter volumen) under kraftig vortexbehandling og klares derpå ved centri-
- 35

fugering ved 4 000 g i 10 minutter ved 20 °C. Den vandige fase gemmes, grænsemængden og den organiske fase genekstraheres med et volumen TNE-puffer lig med en tredjedel af volumenet af den oprindelige prøve, og de to vandige
5 faser kombineres, hvilket giver ekstraheret PEG-pellet.

6. I de fleste tilfælde er det ønskeligt at udføre mindst ét trin med anionbytningschromatografi efter den anden organiske ekstraktion. Ekstraheret PEG-pellet eller
10 ekstraheret polymer-pellet underkastes ionbygningschromatografi på en harpisk, gel eller matrix med positiv ledning. Typiske anionbyttermatricer omfatter, men er ikke begrænset til:

- 15 DEAE-cellulose
- DEAE-agarose
- DEAE-Biogel
- DEAE-dextran
- DEAE-Sephadex
- 20 DEAE-Sepharose
- Aminohexyl-Sepharose
- Ecteola-cellulose
- TEAE-cellulose
- QAE-cellulose
- 25 mono-Q eller
- benzoyleret diethylaminoethylcellulose.

Den foretrukne anionbytter er DEAE-Sepharose CL-6B (Pharmacia). Generel baggrundsinformation om ionbytningschromatografi kan f.eks. findes i E.A. Peterson,
30 "Cellulosic Ion Exchangers" i Work, T.S. et al., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, bind 2, del II, side 223 et seq. North-Holland 1970.

35 En overvejende virkning af anionbyttere på den ekstraherede PEG-pellet er fjernelsen af DNA. I princip-

pet kan anionbytning derfor erstattes med tilsætningen af og fjernelsen DNase eller ved alternative behandlinger til fjernelse af DNA ved dette trin af rensningsprocessen.

5

7. Et endeligt trin med gelfiltreringschromatografi følger anionbytning. Typisk anvendes Sepharose Cl-4B (Pharmacia), men talrige andre typer gelfiltreringsmatrixer kan anvendes i stedet for. Se f.eks. Fischer, L.,
10 "Gel Filtration Chromatography" i Work, T.S. et al., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Elsevier 1980.

15 Mens den særlige sekvens af chromatografiske trin af anionbytning efterfulgt af gelfiltrering er typiske for rensning af HAV ifølge opfindelsen, vil det forstås, at sekvensen kan varieres. F.eks. kan gelfiltrering gå forud for anionbytning.

20 Andre konventionelle eller kendte trin, der normalt anvendes ved rensning af virusproteiner eller virioner, kan tilføjes fremgangsmåden til rensning af HAV. Disse trin omfatter, men er ikke begrænset til:

25 a) selektiv adsorption eller fordeling på en fast fase, f.eks. silicagel, calciumphosphat-kul eller celit-aluminiumoxid,

b) hydrofob chromatografi med f.eks. butylagarose,
30 og

c) selektiv ekstraktion med andre opløsningsmidler eller reagenser.

35 d) En yderligere udfældning er et andet trin, der er nyttigt til isolering af HAV. Andre metoder omfatter

- e) chromatografi ved en vilkårlig standardmetode, herunder tyndtlag, gel, molekylsigte, molekyleksklusion, ionbytning, ligandaffinitet, immunoaffinitet, ved elektroforese,
- f) opløsningsmiddelfraktionering ved tofaseekstraktioner, f.eks. med PEG og dextran,
- g) dialyse, ultrafiltrering eller diafiltrering,
- h) densitetsgradientcentrifugering,
- i) elektrofokusering,
- j) frysetørring, lyofilisering eller
- k) krystallisation,
- l) tilsætning af proteaseinhibitorer og/eller chelateringsmidler til puffer eller
- m) substitution af en puffer med en anden.
- Denne liste er på ingen måde udtømmende. Rækkefølgen er ikke en indikation af den foretrukne rensningsrækkefølge. Det vil forstås, at en heldig rensning af HAV kan omfatte vilkårlige, nogle eller alle trin a)-m).
- Yderligere behandlingstrin af konventionel og velkendt karakter er eller kan være påkrævede for at fremstille rensset HAV til en vaccine. F.eks. er behandling med formalin, sterilfiltrering og adsorption til bærere eller adjuvanter typiske grundlæggende trin for fremstilling af formalin-inaktiveret vaccine. Se f.eks. Provost, P.J. et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 160, 213 (1979); Provost,

P.J. et al., J. Med. Virol. 19, 23 (1986). HAV kan inaktiveres med varme, ved pH-ændringer, behandling med organiske opløsningsmidler, ultraviolet bestråling eller udsættelse for formalin. Det vil forstås, at den foreliggende opfindelse foruden F-stammen af C-326 af HAV omfatter enhver anden HAV-stamme, hvad enten den er svækket eller ej. Svækkede stammer kan isoleres ved rækkepassage gennem celler, dyr eller ved andre metoder. Se f.eks. Provost, P.J. et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 170, 8 (1982); Provost, P.J. et al., J. Med. Virol. 20, 165 (1986) for detaljer vedrørende svækkelse. Rensningsmetoder i forbindelse med den foreliggende opfindelse kan let tilpasses svækkede eller usvækkede stammer.

I den foreliggende opfindelse indeholder lavere alkan 1-6 carbonatomer.

Opfindelsen forklares nærmere ved hjælp af det efterfølgende eksempel.

20

EKSEMPEL

Fremgangsmåde til rensning af hepatitis A virus (HAV) fra MRC-5 celler

25

A. Cellesønderdeling.

MRC-5 celler inficeret med svækket HAV (stamme F af CR-326) blev høstet ved skrabning og frysning ved -70 °C i fire rulleflaskeækvivalenser pr. rør. To rør blev optøet ved tilsætning af 3 ml lysepuffer pr. rør (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂) og ved kraftig vortexbehandling (10-15 sekunder ved stilling 10 i en Vortex-Genie) og blev derpå holdt på våd is i 15 minutter. Lysaterne blev to gange frosset og optøet i et bad af ethanol og tøris og et vandbad ved 37 °C, og hvert rør

blev lydbehandlet tre gange i 30 sekunder i maksimal spænding med en cuphorn sonicator med cirkulerende isvandbad (Branson Sonifier Cell Disrupter 185 og Ultrasonics cuphorn). Sonicaterne blev samlet og prøvet for protein under anvendelse af en Bradford-proteinprøve (Bio-Rad) med BSA (Bovine Serum Albumin) som standard og derpå indstillet til 3 mg protein pr. ml i TNE-puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA). Sonicatet blev organisk ekstraheret ved tilsætning af et lige så stort volumen methylenchlorid:isoamylalkohol (24:1 efter volumen) under vortexbehandling i 1 minut og blev centrifugeret ved 3 000 omdr./min. i 10 minutter ved 20 °C i en IEC-centrifuge (~3 000 g) til opnåelse af faseadskillelse. Den vandige fase blev gemt, den organiske fase blev bortkastet, og det mellemliggende blev genekstraheret med et volumen TNE-puffer lig med en tredjedel af det oprindelige prøvevolumen ved vortexbehandling og centrifugering som før. De to vandige faser blev samlet, og volumen blev målt, hvilket gav hepatitis A virus i organisk ekstraherede cellelysater.

B. Polyethylenglycol-(PEG)udfældning.

Hepatitis A virus i de organisk ekstraherede cellelysater blev koncentreret ved polyethylenglycoludfældning (PEG). Lysater blev indstillet til 500 mM NaCl og 4% efter vægtvolumen i PEG 8 000 ved tilsætning under kraftig omrøring af 40%'s efter vægtvolumen PEG 8 000 (fremstillet i 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA). 4%'s PEG-lysaterne blev holdt ved 4 °C i 1 time derpå centrifugeret ved 1 500 g i 10 minutter ved 4 °C i en Beckman HB-4 rotor. Supernatanten blev fjernet, og PEG-pellet blev gensuspenderet ved kraftig vortexbehandling i 10 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA og ved lydbehandling tre gange i 30 sekunder ved maksimal spænding i en cuphorn-sonicator med et cirkulerende isvandbad som

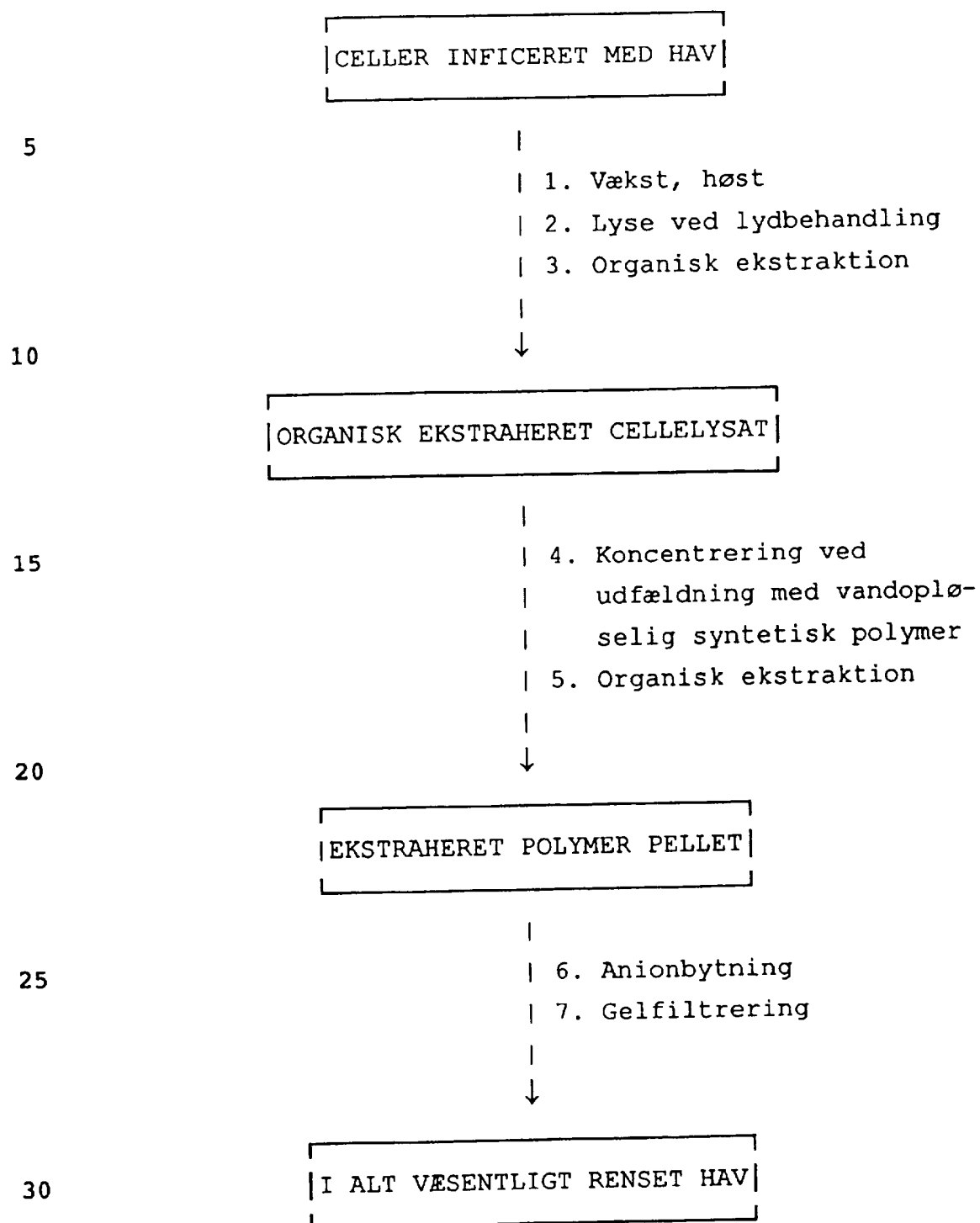
beskrevet i det foregående. Det lydbehandlede, gensuspenderede bundfald blev derpå roteret ved 2 000 omdr./min. på en orbital platformsryster i 1 time ved 4 °C. Den resuspenderede PEG 8 000-pellet blev organisk ekstraheret ved tilsætning af et lige så stort volumen chloroform:isoamylalkohol (24:1 efter volumen) med kraftig vortexbehandling og derpå klaret ved centrifugering ved 4 000 g i 10 minutter ved 20 °C. Den vandige fase blev gemt, den organiske fase og den mellemliggende del blev genekstraheret med et volumen TNE lig med en tredjedel af det resuspenderede PEG-pelletvolumen, og begge vandige faser blev kombineret, hvilket gav resuspenderet PEG-pellet.

15 C. Ionbytning og gelfiltreringschromatografi.

Den resuspenderede PEG-pellet blev indstillet til 350 mM NaCl og chromatograferet ved en pumpehastighed på 3 ml/minut over en 2 ml DEAE-Sepharose CL-6B (Pharmacia) søjle fremstillet i Kontex Flex søjle (1,0 x 5,0 cm) og bragt i ligevægt i 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 350 mM NaCl, 1 mM EDTA. De første 15 ml eluat blev samlet og chromatograferet gennem en Sepharose CL-4B (Pharmacia) søjle (2,6 x 95 cm), bragt i ligevægt i TNE-puffer drevet ved en pumpehastighed på 20 ml/time. Fraktioner på 5 ml blev samlet, hvilket gav i alt væsentligt rensset, svækket HAV. Fraktioner indeholdende HAV blev identificeret ved HAVAG RIA (Abbot Laboratories), kombineret, gjort steril ved filtrering gennem et Millex GV-0,22 µ filter (Millipore) og opbevaret ved 4 °C. Koncentrationen af HAV i den samlede portion blev bestemt ved kvantitativ HAVAG RIA, og prøven blev koncentreret (om nødvendigt) i en Amicon ultrafiltreringscelle udstyret med en YM100 membran.

Med en prøve på 6 µg rensat HAV detekterede SDS-polyacrylamidgel-elektroforese ikke nogen urenheder efter sølvfarvning og Western-blotting.

- 5 Det vil selvsagt forstås, at der kan foretages sædvanlige variationer, tilpasninger, modifikationer, udeladelser eller tilføjelser af procedurer og forskrifter beskrevet heri inden for opfindelsens rammer.
- 10 Opfindelsen forklares nærmere ved hjælp af strømningsdiagrammet:



P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til rensning af Hepatitis A virioner (HAV) i væsentlig grad, k e n d e t e g n e t ved, at den
5 omfatter følgende trin:

- a) dyrkning og høst af celler inficeret med HAV,
- b) lyse af de høstede celler ved lydbehandling,
10
- c) ekstraktion af lysatet og bibeholdelse af den vandige fase,
- d) koncentration af den vandige fase med en vandop-
15 løselig syntetisk polymer, der kan udfælde HAV,
- e) ekstraktion af det udfældede HAV og bibeholdelse af den vandige fase,
- 20 f) underkastelse af den vandige fase for ionbytningschromatografi, og
- g) gelfiltrering af fraktioner indeholdende HAV, hvilket giver i alt væsentligt rensset HAV.

25

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at de med HAV inficerede celler er MRC-5 celler.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t
30 ved, at HAV er F-stammen af CR-326.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at HAV er eller bliver svækket før dyrkning og høst ifølge trin a).

35

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
ved, at ekstraktionen i trin c) udføres ved tilsætning af
en blanding af isoamylalkohol og en halogeneret lavere
alkan, hvilken blanding omfatter ca. et volumen isoamy-
5 lalkohol og mellem ca. 20 og ca. 30 volumen halogeneret
lavere alkan.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t
ved, at den halogenerede lavere alkan er methylenchlorid.
10

7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
ved, at den vandopløselige syntetiske polymer i trin d)
er polyethylenglycol med en molvægt på mellem ca. 2 000
dalton og ca. 12 000 dalton, hvilken polyethylenglycol
15 har en slutkoncentration i den vandige fase på mellem ca.
2 og ca. 10% efter vægt/volumen.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
ved, at den vandopløselige syntetiske polymer i trin d)
20 er polyethylenglycol med en molekylvægt på ca. 8 000 dal-
ton, hvilken polyethylenglycol har en slutkoncentration i
den vandige fase på ca. 4% efter vægt/volumen.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
25 ved, at ekstraktionstrinnet e) udføres ved tilsætning af
en blanding af isoamylalkohol og en halogeneret alkan,
hvilken blanding omfatter ca. et volumen isoamylalkohol
og mellem ca. 20 og ca. 30 volumen halogeneret lavere
alkan.

30
10. Fremgangsmåde ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t
ved, at den halogenerede lavere alkan er chloroform.

11. Fremgangsmåde ifølge krav 1 til i alt væsentligt
35 rensning af svækket HAV til vaccinationsformål, k e n -
d e t e g n e t ved, at den omfatter følgende trin;

- a) dyrkning og høst af MRC-5 celler inficeret med svækket HAV,
- 5 b) lyse af de høstede MRC-5 celler ved lydbehand-
ling,
- c) ekstraktion af lysatet med en blanding af isoa-
mylalkohol og methylenchlorid og bibeholdelse af den van-
10 dige fase,
- d) koncentrering af den vandige fase i 4% PEG 8 000
efter vægt/volumen og resuspendering af den 4%'s PEG-
pellet,
15
- e) ekstraktion af den resuspenderede 4%'s PEG-
pellet med en blanding af isoamylalkohol og chloroform og
bibeholdelse af den vandige fase,
- 20 f) underkastelse af den vandige fase for ionbyt-
ningschromatografi, og
- g) gelfiltrering af fraktioner indeholdende HAV,
hvilket giver i alt væsentligt rensset svækket HAV til
25 vaccinationsformål.