



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **314068**

(13) B1

(51) Int Cl<sup>7</sup>

A 61 K 39/25

## Patentstyret

---

(21) Søknadsnr	19944654	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1993.05.26, PCT/US93/04986
(22) Inng. dag	1994.12.02	(85) Videreføringssdag	1994.12.02
(24) Løpedag	1993.05.26	(30) Prioritet	1992.06.04, US, 893295
(41) Alm. tilgj.	1995.02.03		1992.06.04, US, 894039
(45) Meddelt dato	2003.01.27		

(71) Patenthaver	Merck & Co Inc, P O Box 2000, Rahway, NJ 07065-0907, US
(72) Oppfinner	Philip J Provost, Lansdale, PA 19446, US David L Krah, Lansdale, PA 19446, US Paul A Friedman, Rosemont, PA 19010, US
(74) Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, 0306 Oslo

---

(54) **Benevnelse** **Fremgangsmåte for fremstilling av levende varicella zostervirusvaksiner og fremgangsmåte for dyrkning av celler i monolag samt medium som kan anvendes til slik dyrkning**

(56) **Anførte publikasjoner** Iscove (1984), "Culture of Lymphocytes and Hemopoietic Cells in Serum-Free Medium", i Methods for Serum-Free Culture of Neuronal and Lymphoid Cells, Alan R. Liss, Inc., side 169-185  
Takahashi et al. (1974), The Lancet, 30. november, side 1288-1291  
Iscove og Melchers (1978), J.Exp.Med., 147:923-933  
Grose et al. (1981), Intervirology, vol. 15, side 3103-3109  
US 4000256

(57) **Sammendrag**

Levende, svekket varicella zoster-virusvaksiner fremstilles med forøkt utbytte av VZV. Den nye fremgangsmåten muliggjør masseproduksjon av en levende VZV-vaksine på en mer praktisk måte. I tillegg gir optimaliserte monolagcellekulturbetingelser en fremgangsmåte for maksimalisering av mono- lagcelletetthet som er nyttig for å øke virusvaksineproduksjon. Ifølge denne fremgangsmåten oppnås rutinemessig celletettheter som nærmer seg 500.000 celler/cm<sup>2</sup>, i konvensjonelle dyrkningsbeholdere.

### Oppfinnelsens bakgrunn

Varicella zoster-virus (VZV) forårsaker kyllingkopper og zoster (helvetesild). Kyllingkopper er en svært smittsom sykdom som inntreffer hos personer uten noen VZV-immunitet. Mer enn 90% av befolkningen eksponeres i løpet av livets to første tiår. Sykdommen er en alvorlig trussel mot de som har undertrykket immunsystem og mot voksne. I mange tilfeller forblir VZV latent i gangliecellene i den nedre del av ryggen.

Helvetesild, en smertefull, kronisk tilstand, inntreffer når VZV reaktiveres fra den latente tilstand.

Forhindring av kyllingkopper ved vaksinasjon er et ønskelig mål, og man forestiller seg institusjon av universell barnevaksinasjon med en levende, svekket varicella-vaksine. Teknikkens stand har rapportert propageringen av VZV i forskjellige cellekultursystemer og bruken av levende, svekket, cellefritt VZV som vaksine. I US patentskrift nr. 3 985 615 beskrives fremstillingen av primære embryoceller fra marsvin av den svekkede Oka-stamme av VZV, egnet for vaksinebruk. I US patentskrift nr. 4 008 317 beskrives dyrkingen av en temperaturfølsom mutant av VZV i WI-38-celler for anvendelse som en vaksinstabilisator. Preparater som kan anvendes til opprettholdelsen av levedyktig VZV, slik som SPGA, er også kjent innen teknikken.

Hovedbegrensningen for kommersiell produksjon av en VZV-vaksine er utbyttet av cellefritt VZV fra celledyrkningsystemer som er kjent innen teknikken. Utbytter av cellefritt VZV forbedres med en faktor på ca. 5-20 ganger ved anvendelse av de nye fremgangsmåtene ifølge denne oppfinnelsen.

Foreliggende oppfinnelse vedrører således fremgangsmåter for fremstilling av levende, svekket, cellefri VZV-vaksine i høyt utbytte.

Monolagcellekulturmetoder kjent innen teknikken, gir vanligvis ca. 80.000 til 160.000 celler/cm<sup>2</sup> [Mann, Dev. Biol. Stand. 37, 149-152 (1977); Wood and Minor, Biologicals 18, 143-146 (1990)]. Anvendelse av monolagcellekulturer for fremstilling av virusantigener har vært hindret av den begrensede tetthet som disse monolagkulturene kan dyrkes til.

Forsøk på å øke cellekulturtettheter har tidligere vendt seg mot spesialiserte perfusjonskulturkar for å øke metningstettheter til ca.  $1 \times 10^6$  celler pr.  $\text{cm}^2$  [Mann, Dev. Biol. Stand. 37, 149-152 (1977)]. Foreliggende oppfinnelse gir et unikt middel for å øke celleutbytter samtidig som man bruker eksisterende celledyrkningssystemer.

Denne oppfinnelsen tilveiebringer således fremgangsmåter hvorved festede celler kan dyrkes til mye større tettheter enn det som hittil var mulig, hvorved det muliggjøres høyere utbytter av virus dyrket på cellemonolag for vaksineproduksjon.

Oppfinnelsen omfatter også et medium som kan anvendes til dyrkning av celler i monolagkultur.

#### 15 Oppsummering av oppfinnelsen

Denne oppfinnelsen vedrører en ny fremgangsmåte for fremstilling av en levende varicella zoster-virus (VZV) vaksine, som består av trinnene i den følgende rekkefølge:

- a) VZV-infeksjonsmottakelige celler valgt fra humane diploidceller, dyrkes til sammenflytning i monolagkultur under betingelser med tilstrekkelig høy næringstilførsel til å oppnå en høy grad av cellereplikasjon, og et ikke-metaboliserbart disakkarid tilføres,
- 20 b) cellene dyrket i henhold til trinn (a), infiseres så nært punktet for sammenflytning som mulig med så høy infeksjonsmultiplisitet med VZV-infiserte celler som praktisk mulig,
- c) den VZV-infiserte kultur holdes ved en tilstand av høy næringstilførsel i 22-96 timer, og det innhøstes på tidspunktet for toppproduksjon av infeksivest VZV,
- 30 d) den VZV-infiserte kultur vaskes med en fysiologisk oppløsning som eventuelt inneholder et lysosomotropt middel, slik som ammoniumklorid eller klorokin, før innhøsting av de VZV-infiserte celler,
- 35 e) de VZV-infiserte celler innhøstes i et minimalt volum av en stabiliserende oppløsning, og cellene brytes

enten opp umiddelbart eller cellene nedfryses for senere oppbrytning,

f) de VZV-infiserte celler oppbrytes inntil optimal frigjøring av celleforbundet VZV, og cellerestene fjernes, hvorved man får et cellefritt VZV-preparat.

Videre vedrører oppfinnelsen en ny fremgangsmåte for fremstilling av en levende, svekket, cellefri varicella-zoster-virus (VZV) vaksine, som består av trinnene i den følgende rekkefølge:

a) dyrkning av VZV-infeksjonsmottakelige celler inntil sammenflytning, hvor dyrkningen omfatter:

- 1) en celleinokulasjonsfase,
- 2) en celledyrkningsfase enten i et så stort volum minimalmedium som praktisk mulig eller i et mindre volum med høynæringsmedium, og
- 3) en forinfeksjonsfase som omfatter eksponering av cellene mot et ikke-toksisk, ikke-metaboliserbart disakkarid,

b) infeksjon av cellene dyrket i henhold til trinn a), så nært opptil punktet for sammenflytning som mulig, med så høy infeksjonsmultiplisitet med svekkede, VZV-infiserte celler som praktisk mulig,

c) opprettholdelse av den VZV-infiserte kultur i et stort volum minimalmedium eller et mindre volum rikt medium i 22-96 timer inntil punktet for topp-VZV-produksjon,

d) vasking av den VZV-infiserte kultur med en fysiologisk oppløsning som eventuelt inneholder et lysosomotrop middel, før innhøsting,

e) innhøsting av den VZV-infiserte kultur ved

- 1) fjerning av væske,
- 2) tilsetning av et minimalt volum stabiliseringsmiddelopløsning,
- 3) utskraping eller kjemisk frigjøring av de VZV-infiserte celler,
- 4) eventuelt nedfrysing av de frigjorte, VZV-infiserte celler ved ca.  $-70^{\circ}\text{C}$ ,

f) oppbrytning av de frigjorte, VZV-infiserte celler

inntil optimal frigjørelse av cellebundet VZV, og fjerning av cellerester, og eventuelt lyofilisering av det cellefrie VZV eller lagring i flytende, nedfrost form.

5 Oppfinnelsen vedrører også en ny fremgangsmåte for fremstilling av en levende, svekket, cellefri varicella-zoster-virus (VZV) vaksine, som består av trinnene i den følgende rekkefølge:

10 a) dyrkning av MRC-5-celler til sammenflytning, hvor dyrkningen omfatter:

- 1) en celleinokulasjonsfase i EBME,
- 2) en celledyrkningsfase i SRFE-2 supplert med ca. 0,2 mg/ml soyalipider, som starter ca. 3 dager etter celleinokulasjon,
- 15 3) en forinfeksjonsfase som omfatter eksponering av MRC-5-celleene mot 20-50 mM sukrose i 24-96 timer før infeksjon,

20 b) infeksjon av cellene dyrket i henhold til trinn a), så nært opptil punktet for sammenflytning som mulig, med så høy infeksjonsmultiplisitet med svekkede, VZV-infiserte MRC-5-celler som praktisk mulig,

c) opprettholdelse av den VZV-infiserte kultur i 37-96 timer, og innhøsting på tidspunktet for topp-VZV-produksjon,

25 d) vasking av kulturen med fosfatbufret saltoppløsning som eventuelt er supplert med 1-100 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  eller klorokin,

e) innhøsting av de VZV-infiserte MRC-5-celler ved:

- 1) fjerning av væske,
- 30 2) tilsetning av et minimalt volum stabiliseringsmiddel som eventuelt inneholder 1-100 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  eller klorokin ved ca. 230  $\mu\text{M}$ ,
- 3) utskraping av cellene eller frigjøring av cellene kjemisk,
- 35 4) eventuelt nedfrysing av de frigjorte, VZV-infiserte celler ved  $-70^\circ\text{C}$ ,

f) oppbrytning av de frigjorte, VZV-infiserte celler ved 1. Dounce-homogenisering, 2. pelletering av rester og

bibeholdelse av supernatanten, 3. sonikering av pelleten og nypelletering, og 4. kombinering av supernatantene fra trinnene f-2 og f-3,

- g) fortykning av produktet fra trinn (f) i stabiliseringsmiddel og påfylling av produktet i enhetsdoser for lyofilisering og lagring ved 4°C eller lavere, slik at ikke mindre enn ca. 1000 PFU er tilgjengelig pr. dose på tidspunktet for senere bruk.

Dessuten vedrører oppfinnelsen en ny fremgangsmåte for dyrkning av celler i monolag, som består av trinnene i følgende rekkefølge:

- a) inokulering av en dyrkningsbeholder med en celledmengde i et minimalt eller rikt medium, og cellene får inokuleres i 24-72 timer,
- b) fjerning av mediet fra kulturen ifølge trinn a) og erstatning med friskt, rikt medium, supplert med en optimalisert konsentrasjon av lipider, og som eventuelt også omfatter et serumsupplement, hvor lipid-supplementet tilveiebringes ved mellom 0,02 mg/ml og 0,4 mg/ml,
- c) dyrkning av kulturen av celler i rikt medium supplert med lipid,
- d) eventuelt erstatning av mediet fra trinn c) med friskt medium som ikke inneholder noe lipidsupplement, etter 24-72 timers vekst.

Endelig vedrører oppfinnelsen et medium som er kjennetegnet ved at det kan anvendes til dyrkning av celler i monolagkultur som omfatter SRFE-2-medium supplert med 0,02-0,4 mg/ml lipider.

#### Kort beskrivelse av tegningene

Fig. 1. VZV-PFU-utbytter i sukrosesupplert medium.

Fig. 2. Utbytter av cellefritt VZV-antigen.

Fig. 3. VZV-stabilitet i SPGA-stabilisator ved -20°C eller 4°C.

Fig. 4. VZV-PFU-utbytter oppnådd under anvendelse av forskjellige dyrkningsmedier.

Fig. 5. Effekt av tilførsel av celleforbundet MOI på utbytter av cellefritt VZV.

Fig. 6. VZV-virusantigenutbytter som funksjon av tilført MOI.

5 Nærmere beskrivelse av oppfinnelsen

Denne oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for dyrkning av celler i monolagkultur. Formålet ved oppfinnelsen er å oppnå forøkt celletetthet for festede kulturceller. Dette formålet oppnås ved tilveiebringelse av et anrikt dyrknings-  
10 medium supplert med et lipid, ved optimaliserte konsentrasjoner. Ved å dyrke monolagkulturer i henhold til denne oppfinnelsen i det nye medium-lipidpreparat ifølge denne oppfinnelsen, muliggjøres vesentlig forøkte utbytter av virusplakkdannende enheter (PFU-er) eller virusantigenproduksjon. Så-  
15 ledes har hepatitt A-virus-, varicella zoster-virus-, rubella-, rotavirus-, mesling-, polio-, kuma- og andre virusvaksiner nytte av anvendelse av celledyrkningsfremgangsmåten ifølge denne oppfinnelsen.

Et foretrukket, anrikt medium for anvendelse i denne fremgangsmåten er SRFE-2 (kommersielt tilgjengelig fra Sigma  
20 Chemical Co., St. Louis, MO, S2138 eller fra Serva Fine Chemicals, Heidelberg, Tyskland 47523). Dette mediet ble beskrevet av Weiss et al. [*In Vitro* 16(7), 616-628 (1980)]. Andre, ekvivalente medier eller små endringer i sammensetningen av SRFE-2  
25 anvendt på samme måte som her beskrevet, faller naturlig innenfor omfanget av denne oppfinnelsen.

Hvilket som helst av en rekke kjente lipidsupplementer kan anvendes med fordel ved denne oppfinnelsen. For eksempel ble kolesterolrike lipider fra serum fra utvokst  
30 storfe (Sigma Chemical Co., katalog nr. L-4646), "EX-CYTE"-lipid I eller "Very Low Endotoxin" (VLE)-lipid (Miles Inc., katalog nr. 82-004-7 - 8 og 82-019-1) funnet å være gunstige som supplementer til rikt medium. Et foretrukket lipidadditiv er den kommersielt tilgjengelige soyabønnelipidekstrakt som er  
35 tilgjengelig fra Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis IN, katalog nr. 1074 482. Dette materiale, eller et lignende materiale, er beskrevet av Iscove and Melchers [J. al. *Exp. Medicine*, 147, 923-933, (1979)] som en erstatning for

serum i en B-lymfocyttkultur. Det er ikke gjort noe forslag der, og heller ikke er det noe forslag i Boehringer Mannheims katalogproduktbeskrivelse om at soyabønnelipidsupplement ville være anvendbart for supplering av rikt medium. I henhold til disse kildene er lipidet ment for bruk som en serumerstatning i kulturer med minimalt medium. Slik det er brukt ved denne oppfinnelsen, er lipidet et supplement for rikt medium. I tillegg anvendes lipidet i henhold til publiserte kilder, ved en konsentrasjon på ca. 10-100 µg/ml. Ifølge foreliggende oppfinnelse anvendes lipidet optimalt ved en konsentrasjon som er 2-3 ganger høyere enn konsentrasjonene som er foreslått i litteraturen eller av produsenten. Dessuten kan, slik det er brukt ved denne oppfinnelsen, lipidsupplementet anvendes i tillegg til, og ikke i stedet for, serumsupplering.

Ved fremgangsmåten ifølge denne oppfinnelsen inokuleres MRC-5-celler, WI-38-celler, Vero-celler eller en annen celletype som kan anvendes for viruspropagering, i en dyrkningsbeholder. Den innledende celleutplantingsfase utføres enten i et minimalmedium kjent innen teknikken, slik som EMEM eller EBME, eller i et rikt medium, slik som SRFE-2-medium uten lipidsupplering. Ca. 10% kalvefosterserum (FCS), et slikt antibiotikum som neomycin (ca. 50 µg/ml er passende) og L-glutamin (ca. 2 mM) kan også med fordel tilføres. Cellene dyrkes ved en celle- og virusakseptabel temperatur, vanligvis 30-37°C, og fortrinnsvis ved ca. 35°C, avhengig av viruset som skal fremstilles, i flere dager.

Etter at cellene klart har festet seg og trives i monolagkultur, fjernes minimalmediet eller det anrikede medium og erstattes med nyfremstilt, rikt medium, supplert med en optimalisert konsentrasjon av lipid.

Etter en ytterligere dyrkningsperiode kan mediet igjen fjernes og erstattes med nyfremstilt, rikt medium uten lipidsupplering. Tilførsel av lipid etter at cellene har kommet til syne eller nådd sammenflytning, er blitt funnet å ikke være produktivt, idet den reduserer maksimale celleutbytter.

Når de dyrkede monolagcellene skal infiseres med et virusinokulum, fjernes lipidsupplementet, og virusmengden innføres i en nyfremstilt mengde rikt medium. Fraværet av



lipid i denne nye næringstilførselen muliggjør forlenget cellevekst uten problemet med lipidindusert cellereduksjon nevnt ovenfor.

Etter den ovenfor beskrevne fremgangsmåte oppnås  
5 vesentlige økninger i celle- og virusutbytte. For varicella-  
virus dyrket på MRC-5-celler, oppnås således en vesentlig  
økning i VZV-PFU-utbytte sammenlignet med når MRC-5-celler  
dyrkes i minimalmedium eller SRFE-2-medium alene. Likeledes  
vokser WI-38-celler som kan anvendes til varicelladyrkning  
10 eller rubellavirusproduksjon, til vesentlig større tettheter  
når de dyrkes i henhold til denne nye fremgangsmåten.

Når den anvendes til fremstillingen av en bestemt  
vaksine, omfatter den nye fremgangsmåten ifølge denne oppfin-  
nelsen propagering av VZV i cellekultur og innhøsting av det  
15 resulterende VZV under betingelser som optimaliserer virusut-  
bytte og -stabilitet. Fordelene som er beskrevet for fremstil-  
lingen av VZV, vil gjelde for fremstillingen av andre kapsel-  
virus, inkludert herpesvirus enn VZV, meslinger, kuma eller  
rubella.

20 Det endelige mål ved denne oppfinnelsen er å tilveie-  
bringe fremgangsmåter som muliggjør effektiv fremstilling av  
VZV for anvendelse som en vaksine. Fremgangsmåtenes suksess  
måles gjennom utbyttet av cellefritt VZV som oppnås til sist  
etter optimalisering av hvert trinn i fremgangsmåtene. Ut-  
25 byttet bestemmes ved infektivitetstiteren til det endelige  
cellefrie VZV-preparat. Infektivitetstitrene for preparater av  
varicella zoster-virus (VZV) ble oppnådd ved hjelp av en  
fremgangsmåte med agarosebelegg eller flytende belegg be-  
skrevet av Krah et al. (J. Virol. Methods, 1990, 27:319-326).  
30 I korte trekk omfatter denne fremgangsmåten dyrkning av MRC-5-  
celler som er mottakelige for VZV-infeksjon, til en aktivt  
replikerende tilstand, dvs. til et punkt hvor cellene er ca.  
50-80% sammenflytende. Virus belegges så på cellemonolaget i  
et minimalt volum, får feste seg til cellene og så tilsettes  
35 ytterligere dyrkningsmedium. Etter flere dagers dyrkning  
eksponeres cellene mot en proteinstamme, og klare områder,  
plakker, telles. For et kjent volum av virusinokulum utgjør  
således antallet plakkdannende enheter (PFU) pr. milliliter et

godt mål for virusutbytte. Multiplisert med det totale volum av cellefritt virus oppnådd fra hvilket som helst bestemt viruspreparat, kan det totale antall PFU beregnes.

På grunn av variasjon i selve analysen er økningen i PFU oppnådd ved hjelp av hvilken som helst bestemt fremgangsmåteoptimalisering, rapportert som et forhold til et mindre optimalisert fremgangsmåtetritt. Denne rapporteringen av ganger økningen i virusutbytte opphever derfor en eventuell variasjon i selve PFU-analysen. Fremgangsmåtetrittene som her er beskrevet, resulterer til sist kumulativt i mellom ca. en 16-20 gangers økning i VZV-utbytter oppnådd ved å bruke fremgangsmåter som er kjent innen teknikken. Denne økning er ikke rapportert i litteraturen, og den utgjør et betydelig bidrag til teknikken med VZV-vaksineproduksjon.

Etttersom VZV-plakkanalysen er tidkrevende, er den ikke særlig rimelig for kontroll under fremgangsmåten. En hurtig VZV-antigen-ELISA muliggjør måling av VZV-antigenmengder slik at overvåkning av virusvekst under fremstilling av levende varicellavaksine muliggjøres. I tillegg kan denne testen brukes til å beregne VZV-antigenmengder i klarede, sonikerte vaksinemengder, og muligens måle antigen i fylte, lyofiliserte vaksineampuller. I korte trekk utføres denne analysen ved inkubasjon av VZV-antigen fra testprøver med anti-VZV-serum i oppløsning. Gjenværende, fritt antistoff får bindes til VZV-antigen immobilisert på ELISA-mikrotiterplater. Mengden av antistoff som er i stand til å bindes til platene, er omvendt proporsjonal med mengden av antigen i testprøven. Antistoffbinding til platene kvantifiseres ved omsetning med et enzymbundet antihuman-antistoff og passende substrat, hvorved man får et farget produkt som kvantifiseres spektrofotometrisk.

VZV-antigen-ELISA- og VZV-plakkanalysene burde generelt gi data som kan korreleres, men det bør huskes på at VZV-antigenanalysen påviser både ikke-levedyktig og levedyktig VZV. Etttersom immunresponsen generert ved hjelp av drept VZV ikke er blitt påvist å være like effektiv som responsen mot levende, svekket virus, er plakkanalysen den avgjørende analyse for bestemmelse av virusinokulumdose for VZV-vaksiner. Antigenanalysen er imidlertid verdifull ved at den gir et mål

for den totale antigenmengde som administreres til en mottaker av VZV-vaksine, den er hurtigere enn PFU-analysen og muliggjør derfor overvåking av VZV-produksjon under fremgangsmåtene, og den korrelerer i det minste inntil punktet for topp-VZV-PFU-produksjon, noe som muliggjør beregning av det optimale tidspunkt for innhøsting.

Suksessen ved fremgangsmåtene ifølge denne oppfinnelsen økes trinnvis med hver av de følgende kritiske parametere som alle er innenfor omfanget av denne oppfinnelsen:

10

- a. Dyrkning av VZV-infeksjonsmottakelige celler, utvalgt fra humane diploidceller, slik som MRC-5, inntil sammenflytning i monolagkultur, under anvendelse av store kulturvolumer eller rikt dyrkningsmedium for å oppnå en høy grad av cellereplikasjon, og tilførsel av et ikke-metaboliserbart disakkarid, slik som sukrose

15

Hvilket som helst av en rekke forskjellige cellekultursystemer som er kjent innen teknikken for å være anvendbare for VZV-produksjon, kan anvendes. Således har Vero-celler, WI-38-celler, MRC-5-celler og en rekke andre celletyper blitt brukt for dette formål. Vi har i overensstemmelse med dette brukt MRC-5-celler som er akseptable for fremstilling av vaksiner ment for anvendelse på mennesker. Det er imidlertid ikke utenkelig at utbytter av cellefritt VZV vil kunne økes utover det omfang som her er rapportert, dersom det benyttes en særlig produktiv cellelinje som ikke er MRC-5. I den grad en slik cellelinje ville være tilpasningsdyktig for bruk ved den foreliggende fremgangsmåte, omfatter denne oppfinnelsen anvendelse av denne fremgangsmåten på slike celler.

20

Sammenligning av utbytter av cellefrie, levende virus i enten subsammenflytende eller sammenflytende MRC-5-cellemonolag inkubert ved 35°C under en atmosfære av 5% CO<sub>2</sub> i "Eagles Minimal Essential Medium" (EMEM) med 2% eller 10% kalvefosterserum (FCS), avslører effekten av cellesammenflytning på utbyttet av cellefrie, VZV-plakkdannende enheter (PFU) (se eksempel 2, tabell I).

25

30

Anvendelse av sammenflytende cellemonolag gir opphav til ca. en 2-3 gangers økning i cellefri PFU/ml sammenlignet med utbyttet oppnådd ved infeksjon av subsammenflytende monolag, uansett om de subsammenflytende kulturer prolifererer aktivt (10% serum) eller ikke (2% serum). Sammenflytende, men ikke aktivt prolifererende celler, synes derfor å være nødvendige for forøkte VZV-utbytter ved vaksinefremstillingsfremgangsmåten.

Prosentandelen av kalvefosterserum som er til stede under virusvekst, synes ikke å ha noen stor effekt på utbytter av cellefrie pfu. Således tilveiebringes vanligvis FCS under cellevekstfasen ved ca. 10%, mens FCS tilveiebringes ved ca. 2% under virusvekstfaser i fremgangsmåten, uansett om det anvendes et minimalmedium, slik som EMEM eller EBME, eller et rikt medium, slik som SRFE-2, for cellevekst og viruskultur.

I tillegg til FCS og mediet tilsettes det vanligvis et slikt antibiotikum som 50 µg/ml neomycin, og glutamin (ca. 2 mM) til celledyrknings- og virusvekstmediene.

#### 1. Celleinokulasjonsfase

Cellekulturbeholdere (kolber, rulleflasker eller funksjonelle ekvivalenter til disse kulturbeholderne) inokuleres med MRC-5 eller andre diploide celler slik at startkonsentrasjonen av celler er mellom ca. 10.000 og 40.000 celler/cm<sup>2</sup>. Cellene tilføres dyrkningsmedium supplert med ca. 10% kalvefosterserum, tilsatt 5% CO<sub>2</sub>, og inkuberes ved 30-37°C og fortrinnsvis ca. 35°C.

Cellene kan inokuleres ved et så lite volum som nødvendig for fullstendig å tildekke celler dyrket i stasjonær kultur. Et brukbart forhold mellom volum og overflateareal er ca. 0,5 ml dyrkningsmedium pr. cm<sup>2</sup> vekstoverflate. Når celler dyrkes i rulleflasker, kan det være passende med så lite som 125 ml pr. 850 cm<sup>2</sup>, men ca. 425 ml/cm<sup>2</sup> er foretrukket.

Kommersielt tilgjengelige minimalmedier kjent innen teknikken for celledyrkning, slik som "Eagles Minimal Essential Medium" (EMEM) eller "Eagles Basal Medium" supplert med "Earle's Salts" (EBME), kan anvendes med ca. 10% FCS for celleinokulasjonsfasen. Alternativt kan det med fordel brukes et

rikere medium i denne fasen. SRFE-medium [Weiss et al., *In Vitro* 16(7), 616-628 (1980)] tilgjengelig fra Sigma, er et rikt medium som kan anvendes med fordel på dette stadium, men et rikt medium er ikke av avgjørende betydning for dette stadium av fremgangsmåten.

## 2. Celledyrkningsfase

Det er av avgjørende betydning at tilstrekkelig næring tilveiebringes i denne fasen av fremgangsmåten for å sikre vekst av celler til tung sammenflytning. Dette kan oppnås ved å tilveiebringe et stort volum minimalmedium eller et mindre volum rikt medium. Cellene dyrkes ved 30-37°C og fortrinnsvis ved 32-35°C.

Etter at et passende tidsrom for cellefesting og cellevekst har fått passere, kan celler tilføres ny næring ved å fjerne og erstatte mediet og så fortsette inkubasjonen. Mediet kan fjernes ved aspirasjon eller dekantering, eller ved hvilket som helst annet middel så lenge som helheten til cellemonolaget ikke kompromitteres. For MRC-5-celler inokulert som beskrevet ovenfor, kan ny tilførsel av næring foretas ca. 72 timer etter innføring av cellene i kulturbeholderen.

Volumet av kulturmedium som erstattes, kan være det samme som volumet som brukes for celleinokulasjonsfasen. Fortrinnsvis tilveiebringes imidlertid et større volum under cellevekstfasen enn det som ble brukt under inokulasjon. Dette er særlig viktig når celler dyrkes i et slikt minimalmedium som EMEM eller EBME pluss FCS. Et stort kulturvolum er én måte å sikre at cellene får passe mye næring.

Behovet for stort volum kan reduseres når mediet som tilføres for vekstfasen, er et rikt medium. Et særlig foretrukket medium for dette formål er SRFE-2 (Sigma). Anvendelse av et rikt medium på dette stadium i stedet for et minimalmedium forøker i stor grad tettheten av cellemonolaget ved sammenflytning. Den forøkte celletetthet fører til økning av utbyttet av VZV som lar seg erholde fra en infisert cellekultur dyrket i anrikt medium. Anvendelse av anrikt medium under cellevekstfase har således gitt opphav til ca. en 2-4 gangers økning i slutt-VZV-utbytte sammenlignet med det som

ble oppnådd når celler dyrkes i minimalmedier på dette stadium.

Ved en foretrukket utførelsesform suppleres SRFE-2 med lipid. Hvilket som helst av en rekke lipidsupplementer kan anvendes. Således ble kolesterolrike lipider fra serum fra utvokst storfe (Sigma Chemical Co.), "EXCYTE"-lipid I eller "Very Low Endotoxin" (VLE)-lipid (Miles) funnet å være gunstig som supplementer til rikt medium eller minimalmedium. Kommer- sielt tilgjengelig soyabønnelipid (Boehringer Mannheim, se 10 også Iscove et al., J. Exp. Med. 147, 923-933 (1978)] har vist seg å være et svært gunstig supplement når det tilveiebringes ved ca. 0,2 mg/ml. Celletettheter som når opptil ca. 500.000/cm<sup>2</sup>, er blitt oppnådd under anvendelse av SRFE-2 pluss lipid og FCS. Forøkte VZV-utbytter oppnås når lipid tilveie- 15 bringes uansett hvorvidt celledyrkning skjer i minimalmedier eller anrikede medier. Kommersielt tilgjengelig materiale tilføres som en blanding av 20 mg/ml lipid, 100 mg/ml bovint serumalbumin. Dette materialet brukes passende ved en sluttfortynning på 1:100. Slutt-VZV-utbytte ble forøkt med ca. 20 9 ganger sammenlignet med VZV-utbyttet fra EMEM alene, og med ca. 3,3 ganger sammenlignet med SRFE-2-medium alene når SRFE-2 ble supplert med ca. 0,2 mg/ml soyabønnelipid under celle- dyrkningsfasen.

### 25 3. Forinfeksjonsfase

Vi har oppdaget at sluttutbyttet av VZV kan forøkes ytterligere når dyrkede celler eksponeres mot et ikke-metaboliserbart, ikke-toksisk disakkarid ved en optimal konsen- trasjon, før VZV-infeksjon. Én svært vellykket utførelsesform 30 gir 20-60 mM sukrose ca. 72 timer etter at cellene innføres i kulturbeholderen, og fortrinnsvis 24-96 timer før infeksjon av kulturen med VZV. Av praktiske grunner skal man her være oppmerksom på at tilveiebringelse av ca. 50 mM sukrose i mediet for ny tilførsel av næring ifølge trinn 2 ovenfor, 35 imøtekommer disse kriteriene og reduserer antallet sterile manipulasjoner som kreves, ved effektivt å utføre dette og de tidligere trinn samtidig.

Andre disakkarider, inkludert laktose, cellobiose og maltose, forøker også slutt-VZV-utbyttet, men sukrose er foretrukket. Monosakkarider som ble testet, slik som fruktose og ribose, forøkte ikke VZV-utbyttet (ribose kan til og med være toksisk). Det synes som om disakkaridene konsentreres i lysosymene til de voksende celler slik at disse svelles til vakuoler [DeCourcy and Storrie, Exp. Cell Res. 192, 52-60 (1991)]. Denne disakkarideffekten på VZV-utbytte kan skyldes svekking av lysosomal skade på VZV. I tillegg til disakkarider kan tri- og tetrasakkarider forventes å ha gunstige effekter ettersom Cohn and Ehrenreich [J. Exp. Med. 129, 201-222 (1969)] la merke til identisk vakuolisering når disse høyere sukkerer eller sukrose ble tilført makrofager, så lenge som sukkerne ikke ble metabolisert av cellene.

15

b. Infeksjon av cellene dyrket i henhold til trinn (a) så nært punktet for sammenflytning som mulig, med så stor infeksjonsmultiplisitet for VZV-infiserte celler som praktisk mulig

20

Ved gjentatte forsøk har vi funnet at celler som fikk bero i 48 timer etter at de var blitt sammenflytende, gjennomsnittlig ga bare ca. 50% av VZV-PFU/ml sammenlignet med utbyttet når nylig sammenflytende celler infiseres med VZV. Det er således viktig å tidfeste innføringen av VZV-inokulumet for så nært sammenfall som mulig med sammenflytning. Dessverre er sammenflytning en parameter som varierer etter typen av medium, celletypen som dyrkes, og andre dyrkningsbetingelser som brukes. For MRC-5-celler inokulert i henhold til trinn (a)(1) ovenfor, infiseres cellene vanligvis på det tidspunktet da sammenflytning oppnås.

30

Varicella-zoster-viruset (VZV) er fortrinnsvis Oka-stammen av svekket virus beskrevet i US patentskrift nr. 3 985 615, og som er deponert ved ATCC. Dette viruset tilpasses vekst i marsvinembryocellekulturer og humane diploidlungefibroblastcellekulturer (f.eks. MRC-5-celler).

35

Et forråd av infeksiøse, levedyktige, varicella-infiserte celler kan fremstilles ved å infisere MRC-5-celler ved en MOI på ca. 1:125, idet de infiserte cellene oppbevares

for å muliggjøre virusreplikasjon, cellene trypsineres, og de frigjorte celler brukes umiddelbart som et arbeidsinokulum, eller lagres for senere bruk og PFU-kvantifisering ved sakte nedfrysing med et slikt frysebeskyttelsesmiddel som DMSO eller glyserol, ved ca.  $10^7$  celler/ml. Det nedfryste, VZV-infiserte celleforråd kan tines opp og tilsettes til en sammenflytende cellekultur for å initiere VZV-infeksjon.

Alternativt kan VZV-infiserte celler lyofiliseres i henhold til fremgangsmåten beskrevet av Hondo et al., [Archiv für de gesamte Virusforschung 40, 397-399 (1973)] som muliggjør langvarig lagring av det lyofiliserte inokulum ved 4°C. Det er også mulig å bruke cellefritt VZV som et inokulum, men på grunn av tap i virusutbytte etter innhøsting er det foretrukket med bruk av et cellebundet inokulum.

En annen mulighet for fremstilling av det virus-infiserte inokulasjonsforråd er å initiere cellevekst for virusinokulasjonsproduksjon før inokulering av produksjons-celler. På tidspunktet for inokulumcelleinfeksjon med VZV-infiserte celler kan inokulering av produksjonsceller initieres for å oppnå sammenflytning på samme tidspunkt som virusinokulumet når topp-VZV-titere. Mindre optimalt, men mer bekvemt, kan inokulumcellene og hovedcellene alle inokuleres samtidig i et lite volum dyrkningsmedium (ca. 125 ml pr. 850 cm<sup>2</sup> rulleflaske). Etter ca. 2-3 dagers vekst økes flaskene for VZV-inokulumproduksjon i volum til ca. 425 ml, eller tilføres på nytt rikt medium for å muliggjøre vekst til sammenflytning. Produksjonscellene hensettes forholdsvis i en hvileperiode i et lite volum minimalmedium (inkludert ca. 10% FCS) inntil ca. 2 dager før inokulumcellene som skal brukes, infiseres med VZV-infiserte celler. På dette tidspunktet økes produksjonscellevolumet til ca. 425 ml eller tilføres på nytt rikt medium, slik som SRFE-2 pluss en optimal mengde soya-bønnelipid og kalvefosterserum. Produksjonscellene vil så vokse til tung sammenflytning. 2 dager etter tilførsel av næring til produksjonscellene infiseres inokulumcellene som skal anvendes, og som nå er ved sammenflytning, med VZV-infiserte celler ved en MOI på 1:125 eller høyere, og VZV-replikasjon får fortsette i ca. 2 til 3 dager. På det tids-



punktet da topp-VZV-produksjon i inokulumkulturene nås, vil produksjonscellene ha nådd sammenflytning. Så innhøstes inokulumcellene og tilsettes til produksjonscellene.

Uansett timingen for inokulumproduksjon aspireres mediet fra den VZV-infiserte inokulumkultur på et passende tidspunkt etter VZV-infeksjon, det VZV-infiserte inokulum innhøstes ved trypsinering (ca. 0,25% trypsin) eller annet, ikke-oppbrytende middel, og produksjonscellekulturene infiseres ved en kjent MOI.

Schmidt, N.S. and Lennette, E.H., [Infection and Immunity 14, 709-715 (1976)] la merke til viktigheten av høy MOI for høyt VZV-utbytte, men gjorde ingen nøye sammenligning med infeksjon ved lav MOI. Foreliggende oppfinnelse gjør nøyaktig denne sammenligning.

Celler infiseres med VZV ved å fjerne dyrkningsmediet fra cellekulturene og erstatte det med friskt medium som inneholder en kjent mengde VZV-infiserte celler fremstilt som beskrevet ovenfor. Virusforrådet titreres fortrinnsvis med hensyn på varicella-plakk-dannende enheter (PFU-er), og mottakercellene telles for å muliggjøre kvantifisering av infeksjonsmultiplisiteten (MOI). MOI-er uttrykkes som forholdet mellom VZV-infiserte celler i inokulumet og antallet ikke-infiserte monolagceller i kultur. En MOI på 1:10 er således høy, mens 1:625 er lav. En høy MOI er ønskelig, men i praksis kan gode VZV-utbytter oppnås med en MOI så lav som 1:125.

MOI-er på mellom 1:7 og 1:625 gir mellom ca. 500.000 PFU/ml ved den høye MOI og ned til ca. 100.000 PFU/ml ved den lave MOI-ende (se tabell 3 i eksempel 5). Dess høyere MOI, dess kortere er den påkrevde inkubasjonstid for å nå topp-PFU, og dess høyere er utbyttet. Omkring et 5 gangers område i slutt-PFU kan således oppnås avhengig av MOI og innhøstings-tidspunktet.

c. Opprettholdelse av den VZV-infiserte kultur i en tilstand av høy næring i 22-96 timer og innhøsting på tidspunktet for topp-VZV-produksjon

Dyrkningen av de VZV-infiserte celler fortsettes i 22 til 96 timer etter infeksjon. Det er av avgjørende betydning

at passe næringstilførsel opprettholdes på dette stadium av virusveksten. Enten tilveiebringelse av store kulturvolumer av et minimalmedium som EMEM pluss ca. 2-10% FCS, eller et mindre volum rikt medium, er ønskelig. Helst tilveiebringes SRFE-2  
5 pluss 2-10% FCS uten tilsetning av lipidsupplering. Det er blitt lagt merke til at lipidet reduserer VZV-utbytte når det inkluderes på dette stadium.

I løpet av de 22-96 timer med etterinfeksjonsdyrkning replikerer VZV i cellene som er blitt infisert og spres for å  
10 infisere tilgrensende celler. Gamle, infiserte celler vil imidlertid ikke gi gjenvinnbare, cellefrie PFU-er. VZV-vekstkurven og det etterfølgende fall kan være ganske skarpe. Korrekt timing av tidspunktet for innhøsting er derfor en avgjørende parameter for å maksimalisere infeksjøst VZV-utbytte og  
15 kan reproduseres nøyaktig ved opprettholdelse av nøye kontroll av input-MOI, næring og inkubasjonstid fra produksjonsforløp til produksjonsforløp. I tillegg kan den hurtige VZV-antigen-ELISA anvendes for å optimalisere innhøstingstidspunktet ettersom infeksjøst VZV-produksjon korrelerer med VZV-antigen-  
20 produksjon, i det minste inntil det punkt der virusdød begynner å inntre (se figurene 5 og 6).

For VZV-infiserte MRC-5-celler innhøstet ca. 72 timer etter infeksjon hvor hvert av de ovenfor nevnte trinn var optimalisert (dvs. vekst i rikt medium og preinfeksjonseksposering  
25 av cellene mot 50 mM sukrose i 72 timer), ble sluttutbyttet av cellefritt VZV økt med ca. 16 ganger sammenlignet med utbyttet oppnådd i minimalmedium og viral innhøsting etter 48 timer, og med en enda større margin enn når innhøsting er etter 96 timer (se eksempel 8, figur 1). Utbyttet av VZV under  
30 de samme optimaliserte betingelser var bare ca. 4 ganger over minimalmediumutbyttet når viruset ble innhøstet 48 timer etter infeksjon, men ble fortsatt mye forbedret sammenlignet med minimalmediumutbyttet etter 96 timer. Virusutbytte er således mye større, og virusdød reduseres mye i rikt medium, og det er  
35 ikke noe slikt brått fall i virusutbytte over tid. MOI blir også av mindre avgjørende betydning i rikt medium.

d. Vasking av den VZV-infiserte kultur med en fysiologisk oppløsning, eventuelt inneholdende et lysosomotropt middel, slik som ammoniumklorid eller klorokin, før innhøsting av de VZV-infiserte celler

5 For å fjerne serum, lipid og cellerester fra kulturen vaskes monolagkulturen med en fysiologisk buffer som ikke lyser cellene. Fosfatbufret saltoppløsning (PBS) er ganske akseptabel for dette formål. Cellene kan vaskes flere ganger, og vaskeoppløsningen dekanteres, aspireres eller fjernes ved  
10 hjelp av andre midler så lenge helheten til monolaget ikke kompromitteres.

Dersom cellene frigjøres kjemisk fra dyrkningsbeholderen, bør de konsentreres ved sentrifugering og den fysiologiske buffer erstattes med en stabiliserende oppløsning.

15 Tilveiebringelse av ammoniumklorid eller klorokin før celleinnhøsting er blitt funnet å forbedre slutt-VZV-utbytter. Kielian et al. [EMBO J. 5, 3103-3109 (1986)] brukte ammoniumklorid for å regulere den interne pH i celleendosomene hvor infiserende virus tilsynelatende tilbrakte en del av sitt  
20 intracellulære liv. Mekanismen med forøkt VZV-utbytte etter eksponering av celler mot lysosomotrope midler er muligens relatert til induksjon av et mindre krevende, endosomalt miljø. Førinfeksjonspåfyllingen av celler med ikke-toksiske, ikke-metaboliserbare disakkarider, slik som sukrose, og eks-  
25 poneringen av celler mot ammoniumklorid eller klorokin, kan derfor virke ved lignende mekanismer. I alle tilfeller er den observasjon at slutt-VZV-utbytter økes når ammoniumklorid tilveiebringes ved en sluttkonsentrasjon på mellom 1-100 mM, helst i området 20-50 mM, og fortrinnsvis tilveiebringes ved  
30 ca. 4°C i fra ca. 25-50 minutter, før celleoppbrytning, blitt bekreftet empirisk. Et andre lysosomotropt middel, klorokin, ved en konsentrasjon på ca. 230 µM, øker likeledes utvinning av VZV-pfu/ml.

e. Innhøsting av de VZV-infiserte celler i et minimalt volum av en stabiliseringsoppløsning, og enten oppbrytning av cellene umiddelbart eller nedfrysing av cellene for senere oppbrytning

5 Så snart de VZV-infiserte celler er blitt vasket, kan de innhøstes ved utskraping dersom dyrkningsbeholderen til- later dette, eller ved å løsrive cellene kjemisk. Enzymatisk frigjørelse av cellene er mindre ønskelig ettersom gjenværende enzym kan redusere virusutbytte så snart cellene brytes opp.  
10 Som angitt ovenfor, konsentreres cellene ved sentrifugering dersom cellene frigjøres i fysiologisk saltoppløsning, og den fysiologiske saltoppløsning erstattes med et minimalt volum av VZV-stabiliserende oppløsning. Et godt volum for overflate- areal av cellevekst er ca. 40 ml stabiliseringsmiddel pr.  
15 850 cm<sup>2</sup>.

Virusstabiliseringsmidler er kjent innen teknikken. Stabilisering med 5% sukrose i fosfatbufret saltoppløsning er således foreslått i US patentskrift nr. 3 985 615, mens andre rapporter anbefaler mer komplekse stabiliseringsmidler, slik  
20 som SPGA.

Etter at de VZV-infiserte celler er blitt oppslemmet på nytt i en stabiliseringsoppløsning, kan cellene brytes opp umiddelbart, eller i det tilfellet at store mengder VZV frem- stilles, fryses ned ved -70°C for senere bearbeiding. VZV-ut-  
25 byttet pr. cm<sup>2</sup> cellevekst vil være litt større dersom cellene oppbrytes umiddelbart, men frysetrinnet gir vanligvis ikke et tap på mer enn 10% av utbyttet beholdt ved umiddelbar be- arbeidelse.

30 f. Oppbrytning av de VZV-infiserte celler for på optimal måte å frigjøre cellebundet VZV, og fjerning av cel- lerester, hvorved det fås et cellefritt VZV-preparat  
Som beskrevet ovenfor, fjernes dyrkningsmediet for- trinnsvis fra cellene før oppbrytning og erstattes med et  
35 minimalt volum VZV-stabiliseringsmiddel som cellene skrapes ut i eller på annen måte frigjøres i. Cellesuspensjonen avkjøles til 0-4°C, og cellene brytes så opp på passende måte, slik som ved sonikering, Dounce-homogenisering, andre typer av skjær-

krefter som er bedre oppskalerbare enn Dounce, eller en kombinasjon av disse teknikkene.

Vi har bekreftet at sonikering alene ikke gir den beste utvinning av cellefritt VZV. Når Dounce-homogenisering anvendes som et innledende oppbrytningstrinn, etterfulgt av sentrifugering, retensjon av supernatanten som supernatant I, etterfulgt av sonikering av pelleten og sentrifugering for å oppnå supernatant II, økes faktisk VZV-utbyttet fra oppbrytningen mye. Det kombinerte utbytte av supernatant I og II har blitt så mye som fire ganger utbyttet når sonikering alene brukes som oppbrytningsteknikk.

Etter celleoppbrytning utføres fjerning av cellerester ved sentrifugering, filtrering eller hvilken som helst annen metode som er kjent innen teknikken for å fjerne cellerester mens VZV blir uskadet tilbake. Det cellefrie viruspreparat fortynnes så med stabiliseringsoppløsning og deles opp for anvendelse som vaksine. For langvarig lagring lyofiliseres fortrinnsvis VZV ved hjelp av én av metodene som er kjent innen teknikken.

For å oppsummere, er omtrentlige, potensielle utbytteøkninger ved å følge de optimaliserte trinn ifølge denne fremgangsmåten, sammenlignet ved VZV-produksjon ved cellevekst i minimalmedier, rapportert nedenunder:

<u>Fremgangsmåte</u> trinn	Antall ganger <u>PFU-økning</u>
Medium/suppleringer:	
1. MOI	2-5
2. Sammenflytning av celler	2-3
3. SRFE-2-medium + lipid	2-3
4. Sukrose i førinfeksjonsfase	2-5
5. Optimalt mediumvolum	1-2
Netto potensiell økning for kombinerte suppleringer av medium og stabiliseringsmiddel, og optimaliserte infeksjonsbetingelser	≥8

Observerert økning for kombinasjon av  
3, 4 og 5 i rulleflasker 16

5 6. Kombinert skjærkraft/sonikering for  
frigjørelse av cellebundet VZV 1,5

Total potensiell økning sammenlignet  
med ikke-optimalisert fremgangsmåte ≥18

10

#### Utnyttbarhet av denne fremgangsmåten for vaksineproduksjon

Utnyttbarheten av svekket, cellefritt VZV som vaksine  
for å forhindre kyllingkopper, er blitt vist. Multiple klin-  
iske undersøkelser har klart bevist denne utnyttbarheten, og  
15 slike bevis er nå en del av teknikkens stand [se f.eks. Pedia-  
trics 88 (3), 604-607 (1991); Pediatrics 87 (5), 604-610  
(1991)]. Det enorme bidrag som denne oppfinnelsen gir teknik-  
ken, er således at den tilveiebringer en svært virkningsfull  
fremgangsmåte for høyutbytteproduksjon av levende, svekket  
20 VZV. Virus fremstilt i henhold til denne oppfinnelsen, kan  
formuleres som en vaksine i henhold til fremgangsmåter som er  
kjent innen teknikken, og administreres i henhold til regimer  
som nå er godt etablerte. For eksempel kan det levende, svek-  
kede, cellefrie VZV-produkt ifølge denne oppfinnelsen fortyn-  
25 nes i stabiliseringsmiddel, fylles i flasker, lyofiliseres i  
éndoser slik at, etter lagring ved ca. 4°C eller lavere, vil  
en dose på ca. 1000 PFU være tilgjengelig på brukstidspunktet.  
VZV-vaksinen fremstilt i henhold til fremgangsmåten ifølge  
denne oppfinnelsen, kan anvendes i éndosepreparater for å  
30 inokulere mennesker slik at immunresponser som gir beskyttelse  
mot infeksjon av virulente stammer av VZV, induseres. For-  
trinnsvis administreres minst en dose på ca. 2000 PFU/ml  
(1000 PFU/0,5 ml dose) subkutant eller intramuskulært. Så høye  
doser som i alt 15.000 til 20.000 PFU er blitt administrert og  
35 er akseptable.

Ved å tilveiebringe en optimalisert fremgangsmåte for  
fremstillingen av et svekket VZV-virus gjør denne oppfinnelsen  
det mulig å anvende det som er kjent innen teknikken, for å

formulere en vaksine for forsterkning av anti-VZV-immun-responser slik at kyllingkopper forhindres.

De følgende eksempler er gitt for det formål å illustrere foreliggende oppfinnelse.

5

#### Eksempel 1

##### Analyse med hensyn på VZV-utbyttebestemmelse

Infektivitetstiterne for preparater av varicella zoster-virus (VZV) beregnes ved å bruke agarosebelegg- eller  
10 flytende beleggfrengangsmåten beskrevet av Kraha et al. (J. Virol. Methods, 1990, 27:319-326). Analysen utføres på følgende måte:

MRC-5-celler inokuleres i 60 mm vevskulturplater ved  $6 \times 10^5$  celler i 5 ml volumer av BME ("Basal Medium Eagle" med  
15 Hanks oppløsning av avveide salter) med 100 mg/l galaktose, 50 µg/ml neomycin, 2 mM L-glutamin, og inkuberes ved 35°C i en 5% CO<sub>2</sub>-atmosfære. Etter inkubasjon i 24-48 timer når cellene 50-80% sammenflytning. Dyrkningsmediet fjernes ved aspirasjon, og cellene infiseres med 100 µl VZV-oppløsning fortynnet i  
20 passende virusfortynningsmiddel, slik som SPGA-buffer, eller flytende opprettholdelsesmedium (LMM). SPGA-buffer inneholder 7,5% (vekt/volum) sukrose, 11 mM kaliumfosfat, 0,1% (vekt/volum) natriumglutamat og 1% humant serumalbumin. Virus får feste seg i ≥1 time ved 35°C i en 5% CO<sub>2</sub>-atmosfære.  
25 De VZV-infiserte cellekulturer tildekkes så med 5 ml agarosebeleggmedium (AOM) eller flytende opprettholdelsesmedium (LMM). Agarosebeleggmedium er en blanding av to oppløsninger, flytende beleggmedium (LOM) og agaroseoppløsning. LOM inneholder minimalt, essensielt medium med Earles salter  
30 (MEM), 2% varmeinaktivert kalvefostersserum, 50 µg/ml neomycin-sulfat og 2 mM L-glutamin. Agaroseoppløsning fremstilles ved å varme opp 4,5 g agarose med lav geldannelsestemperatur i 100 ml MEM i 15 minutter ved 121°C og la oppløsningen avkjøles til 45°C. AOM fremstilles ved å blande 1 volumdel agaroseoppløsning med 4 volumdeler av et 1,25 x konsentrat av LOM ved  
35 45°C. Platene avkjøles til 23-25°C for å la AOM størkne. Kulturere inkuberes for å muliggjøre plakkutvikling. Etter

6-7 dager belegges platene som fikk LOM, med 5 ml fosfatbufret saltoppløsning (PBS) og kantes med en Pasteur-pipette av glass for å løsne og fjerne agarosen. Medium suges bort fra platene som fikk LMM, og plakker synliggjøres ved å farge cellene med en oppløsning av 0,2% (vekt/volum) Coomassie Blue R-250 i etanol med 1% eddiksyre. Plakktellinger er gjennomsnittet av 4-5 replikaplater og uttrykkes som plakkdannende enheter pr. ml (PFU/ml).

På grunn av mulig variabilitet ved analysen er økninger i VZV-utbytte rapportert i forhold til ikke-optimaliserte betingelser analysert på identisk måte.

#### Eksempel 2

##### VZV-utbytte som funksjon av cellesammenflytning ved infeksjon

MRC5-celler ble platet ut ved  $4 \times 10^6$  celler/150 cm<sup>2</sup> og fikk vokse i 3 dager i Earles salter supplert med "Eagles Basal Medium" (EBME) i nærvær av 10% kalvefosterserum (FCS). Etter å ha nådd en sammenflytende celletetthet på ca.  $12 \times 10^6$  celler/150 cm<sup>2</sup> tilføres cellene på nytt friskt EBME supplert enten med 2% FCS eller 10% FCS. På dette tidspunkt fikk de sammenflytende celler vokse videre, enten i nærvær eller fravær av VZV-infeksjon (MOI=1:125), og økningen i celletetthet og virusutbytter etter 48 timer ble overvåket. Det ble funnet at ikke-infiserte celler i 2% FCS økte i tetthet med bare 33%, mens de økte med 92% i 10% FCS. Celler i de infiserte kulturer økte ikke i antall. Som vist i tabell I, ble virusutbyttene fra de sammenflytende celler ikke påvirket av kapasiteten med hensyn på cellereplikasjon i kulturrene, enten de var minimalt (2% FCS) eller maksimalt (10% FCS) supplert med FCS.

Andre cellekulturer ble dyrket i ytterligere 2 dager i 10% FCS til ca.  $20 \times 10^6$  celler/150 cm<sup>2</sup> kolbe (en sammenflytningsbetingelse), og så på nytt tilført nytt EBME supplert enten med 2% FCS eller 10% FCS og ble enten infisert med VZV (MOI 1:125) eller forble ikke-infisert. Økningen i celletetthet og virusutbytter ble overvåket etter 48 timer. Det ble funnet at ikke-infiserte celler i 2% FCS ikke hadde økt i tetthet, men celler i 10% FCS hadde økt med bare ca. 15%.



Ingen av betingelsene var således i stand til å gi noen særlig cellereplikasjon. Virusutbytter i enten 2% FCS eller 10% FCS var like, og begge ble økt med ca. tre ganger over utbyttet fra celler infisert ved subsammenflytning (se tabell I). Den foretrukne anvendelse av nylig sammenflytende cellemonolag i motsetning til aktivt replikerende, subsammenflytende cellemonolag for optimale utbytter av cellefritt VZV, fastslås således.

10

Tabell I

Tilstand for cellemonolag ved infeksjon	% FCS under virusvekst	Forsøk med cellefritt PFU/ml		Cellereplikasjonspotensial under virusvekst
		A	B	
Subsammenflytende	2	44.000	30.000	33%
	10	33.000	27.000	92%
Nylig sammenflytende	2	119.000	117.000	0%
	10	123.000	100.000	15%

15

Eksempel 3

Sammenligning av VZV-utbytte fra nylig sammenflytende og sammenflytende kulturer som har vært lagret

Rulleflasker (850 cm<sup>2</sup>) ble inokulert med MRC-5-celler ved en konsentrasjon på omtrent 26.500 celler/cm<sup>2</sup>. Alle cellene ble dyrket i EBME-medium inneholdende 10% (volum/volum) kalvefosterserum (FCS<sub>10</sub>) i en 5% CO<sub>2</sub>-atmosfære ved 35°C. Kolbene ble delt i to grupper basert på tidspunktet for infeksjon med VZV. Celler fra gruppe I ble dyrket i 5 dager på hvilket tidspunkt cellemonolagene ble sammenflyt-

25

ende. På dette tidspunktet ble mediet fjernet og cellene infisert med cellebundet VZV ved en MOI på 1:125, oppslemmet i EMEM + 2% FCS. Ytterligere medium ble tilsatt, og cellene ble inkubert i ytterligere 48 timer. Celler fra gruppe II ble oppbevart i ytterligere 48 timer før infeksjon ved en MOI = 1:125.

Fremstillingen av VZV ved hjelp av celler fra gruppene I og II ble bestemt på følgende måte: medium ble fjernet fra rulleflaskene, og cellene ble skyllet med fosfatbufret saltoppløsning, skrapet av med glasskuler i like store volumer stabiliseringsmiddel og avkjølt til 4°C. De kalde cellesuspensjonene ble brutt opp ved hjelp av sonikering. Cellerester ble fjernet fra virus ved hjelp av lavhastighetssentrifugering (325 x g i 10 minutter), og virussupernatanten ble beholdt. VZV-produksjon ble målt ved hjelp av plakkanalysen. Som vist i tabell 2, ble det oppnådd en økning i utbyttet på bortimot to ganger når nylig sammenflytende cellemonolag ble infisert med VZV.

20

Tabell 2

Betingelse	Forsøk 1	Forsøk 2
	PFU/ml	
Nylig sammenflytende	121.000	190.000
Lagret etter sammenflytning	82.000	85.000

25 Eksempel 4

Effekt av kulturvolum på VZV-PFU/ml-utbytte

MRC-5-celler (10 millioner) ble inokulert i 125 ml volumer EBME, 10% FCS, 50 µg/ml neomycin og 2 mM L-glutamin i 850 cm<sup>2</sup> rulleflasker, og inkubert ved 35°C i 3 dager. 300 ml

nytt medium ble tilsatt, og kulturene ble returnert til inkubasjon ved 35°C i 4 ytterligere dager. Medium ble så fjernet og erstattet med 125 eller 425 ml EMEM, 2% varmeinaktivert FCS, 50 µg/ml neomycin og 2 mM L-glutamin. VZV-infiserte MRC-5-celler ble tilsatt (MOI ca. 1:125), kulturene ble gasset med 5% CO<sub>2</sub> og returnert til inkubasjon ved 35°C i 46 timer. Medium ble fjernet, cellene ble vasket fire ganger med 100 ml volumer PBS og avskrapet ved hjelp av glasskuler i stabiliseringsmiddel i volumer på 43 ml. Celler ble nedfrost ved -70°C. Cellefritt virus ble fremstilt ved sonikering. Mengder av infeksiosøst virus i klarede (ved sentrifugering) sonikater ble målt i VZV-plakkanalysen.

#### Resultater:

	<u>Mediumvolum (ml)</u>	<u>VZV-PFU/ml*</u>
15	125	55.000; 45.000
	425	153.000; 103.000

\*Resultater av kulturer in duplo

20

Konklusjon: Anvendelsen av det største mediumvolum resulterer i ca. en to-gangers økning i utbytter av infeksiosøst VZV fra MRC-5-cellekulturer.

#### 25 Eksempel 5

##### Effekt av VZV-MOI på VZV-PFU/ml-utbytte

Rulleflasker ble inokulert med MRC-5-celler og dyrket til sammenflytning. Dyrkningsmediet ble fjernet, og celler ble infisert med VZV ved varierende MOI-er. Fremstillingen av VZV ved hjelp av de infiserte cellekulturer ble bestemt ved å bruke plakkanalysen ved periodevis innhøsting og analysering som i eksempel 1. Som vist i tabell 3 og i figur 5, var utvinning av cellefritt, infeksiosøst VZV større og ble oppnådd i løpet av en kortere inkubasjonsperiode når høyere MOI-er ble anvendt. Topp-antigennivåer oppnås også hurtigere med høyere MOI. Med svært lav MOI, slik som 1:625, forsinkes antigenproduksjonen og blir suboptimal (se figur 6).

Tabell 3  
Effekt av tilført, celleforbundet MOI på  
utbytter av cellefritt VZV fra monolag-MRC-5-kulturer

MOI	Titer for cellefritt VZV (PFU/mL) $\times 10^{-3}$				
	<u>Innhøstingstidspunkt</u>				
		<u>22 t</u>			<u>37 t</u>
<u>42 t</u>	<u>60 t</u>				
	1:25	100	450	50	nd
	1:125	nd	150	325	100
	1:625	nd	nd	100	90

Eksempel 6

Den økte stabilitet for VZV i et stabiliseringsmiddel ved -20°C

Infiserte cellekulturer ble sonikert i SPGA og vasket med fosfatbufret saltoppløsning. Cellebundet virus ble så frigjort ved sonikering, og celleresten ble fjernet ved sentrifugering. Konsentrasjonen av cellefritt virus ble regulert til en kjent PFU/ml-konsentrasjon, og aliquoter av viruset i stabiliseringsmiddel ble lyofilisert og lagret ved 4°C eller -20°C. Ved 1 måneds intervaller i løpet av i alt 14 måneder ble prøver rekondisjonert, og den gjenværende PFU/ml-titer ble bestemt. Resultatene av dette forsøket er vist i figur 3.

Den betydelige fordel for VZV-stabilitet oppnådd ved lagring ved -20°C i stedet for ved 4°C, er helt klar.

Eksempel 7

Effekt på slutt-VZV-utbytte av mengde og timing for sukrose-tilsetning under forinfeksjonsfase av cellevekst

1. Celleinokulasjonsfase

MRC-5-celler (5 ml) ble inokulert ved en konsentrasjon på 120.000 celler/ml (600.000 celler totalt) på 60 mm plater i EBME-medium inneholdende 10% FCS, 50 µg/ml neomycin og 2 mM L-glutamin, og inkubert ved 35°C under 5% CO<sub>2</sub>.

## 2. Cellevekst/forinfeksjonsfase

Cellene ble sammenflytende på den tredje dag etter inokulering. Inokuleringsmediet ble sugd bort fra 48 plater og ble erstattet med 8 ml volumer dyrkningsmedium inneholdende enten EBME eller SRFE-2 supplert med 10% FCS, 50 µg/ml neomycin, 2 mM L-glutamin og 0,2 mg/ml soyabønnelipid/1 mg/ml BSA enten med eller uten 50 mM sukrose. Etter tilsetning av det nye dyrkningsmedium ble cellene inkubert i ytterligere 3 dager ved 35°C under 5% CO<sub>2</sub>.

## 3. VZV-infeksjon

Mediet ble så fjernet fra hver plate og erstattet med 8 ml EMEM i stedet for EBME og SRFE-2 i stedet for SRFE-2 pluss soyabønnelipider. FCS ble redusert til 2% for alle platene, men de øvrige supplementene, neomycin, glutamin og sukrose, var som under vekstfasen. Hver plate fikk så 333 µl av en 1:16 fortykning av VZV-infiserte celler (47.000 PFU/ml) i EMEM, 2% FCS, neomycin og glutamin.

VZV fikk replikere ved 35°C under 5% CO<sub>2</sub> i 2 dager, og mediene fra 2 plater fra hver forskjellig betingelse ble fjernet. Cellene ble vasket fire ganger med PBS. Cellene ble skrapet av i 1,2 ml/plate iskaldt stabiliseringsmiddel. Innhøstingen fra platene in duplo ble slått sammen i 50 ml koniske sentrifugerør og nedfrost ved -70°C.

Den samme fremgangsmåte som beskrevet i avsnittet ovenfor, ble gjentatt for to plater fra hver betingelse på den tredje, fjerde og femte dag etter VZV-infeksjon, og den samenslåtte innhøsting fra hvert sett av to plater ble lagret ved -70°C.

Hver celleinnhøsting fremstilt som beskrevet ovenfor, ble senere opptint, sonikert på is i 30 sekunder pr. rør under anvendelse av en "cup-horn"-sonikator og klaret ved sentrifugering ved 1000 x g i 10 minutter ved 4°C. Aliquoter av supernatantene ble fjernet for plakkanalyse. Resultatene av plakkanalysen utført som beskrevet i eksempel 1, er vist i figur 1.

Dataene vist i figur 1, bekrefter flere konklusjoner:

1. Forinfeksjonsinkubasjon av celler med 50 mM sukrose er svært gunstig for slutt-VZV-utbyttet. I hvert medium, EMEM eller SRFE-2, var VZV-utbytter høyere når cellene ble behandlet med sukrose før infeksjon. 72 timer etter infeksjon ga VZV-utbyttet i SRFE-2-dyrkede celler eksponert mot sukrose, ca. 16 ganger VZV-utbyttet, målt som PFU, i forhold til det celler i minimalmedier uten sukrose ga!

2. Tilførselen av rikt medium (SRFE-2 pluss soyabønnelipider under dyrkning og SRFE-2 under virusvekst) er gunstig for VZV-utbyttet, men sammen med sukroseeffekten muliggjøres fremstilling av en størrelsesorden mer VZV. Det rike medium synes således å virke synergistisk sammen med sukroseeffekten.

3. Tidspunktet for VZV-innhøsting er svært betydningsfullt. Selv under de optimaliserte dyrkningsbetingelser, SRFE-2 og sukrose etc., er topp-VZV-utbyttet ikke oppnådd 48 timer etter infeksjon. På dette tidspunkt er det bare oppnådd en fire gangers økning over minimalmediumutbytte. 72 timer etter infeksjon er det imidlertid en 16 gangers økning i VZV-utbytte.

I separate forsøk ble VZV-utbyttet ikke økt så mye dersom 50 mM sukrose ble tilsatt på infeksjonstidspunktet i stedet for 72 timer før infeksjon, noe som viser viktigheten av en lang forinfeksjonsfase for intracellulær akkumulering av sukrose. Vi fant også at tilsetning av 25 mM eller 100 mM sukrose var mindre gunstig enn 50 mM sukrose. De samme omtrentlige konsentrasjoner gjelder for laktose, cellobiose og maltose.

### Eksempel 8

#### Effekter av flere forbedrede fremgangsmåteparametre på VZV-utbytte

Et rulleflaskeforsøk ble gjort for å bestemme effektene av forskjellige fremgangsmåteendringer (dyrkningsmedium, sukrosesupplering, tilsetning av  $\text{NH}_4\text{Cl}$  til stabiliseringsmidlet, Dounce-behandling eller sonikering for virusfrigjørelse fra celler) på utbytter av cellefrie VZV-PFU. Kulturer ble

inokulert ved  $80 \times 10^3$  celler/ml x 125 ml EBME, 10% FCS pr. rulleflaske. Disse ble regulert til 425 ml med EBME eller på nytt tilført SRFE + soyalipidmedium, og infisert med arbeidsinokulasjons-VZV i 125 ("lite volum") eller 425 ("stort volum") ml EMEM- eller SRFE-medium (uten soyalipid). Tidsberegningen for disse mediumendringene/infeksjon var som beskrevet i eksempel 7. På forskjellige tidspunkter før infeksjon (96 eller 24 timer før infeksjon, eller på tidspunktet for infeksjon) ble sukrose (suc) tilsatt til 50 mM. Kulturer som fikk sukrose før infeksjon, fikk også sukrose i virusinfeksjonsmediet. Alle kulturene ble infisert ved en omtrentlig  $MOI = 1:15$ , idet VZV-infiserte celler i EMEM-kulturer ble innhøstet 46 timer i etterinfeksjonsstabiliseringsmiddel inneholdende 20 mM  $NH_4Cl$  (N), eller uten noe supplement. Alle prøvene ble nedfrost ved  $-70^\circ C$ , og virus ble deretter frigjort fra celler enten ved sonikering eller Dounce-homogenisering. Alle prøvene ble klaret ved sentrifugering ved 1000 g i 10 minutter.

PFU-resultatene oppnådd for sonikerte prøver, ga de følgende konklusjoner:

1. Anvendelsen av det "høye" mediumvolum av EMEM økte VZV-PFU to ganger. Med SRFE synes det her og i andre forsøk som om optimale PFU-utbytter oppnås nær det "lave" mediumvolum. I noen tilfeller undertrykkes utbyttene av det "høye" mediumvolum.
2.  $NH_4Cl$  er ikke av avgjørende betydning for høye PFU-utvinninger.
3. Sukrose økte PFU-utbytter to ganger for EBME/EMEM- og 5 ganger for SRFE-kulturer. Det synes å være en effekt på tidspunktet for sukrosetilsetning på PFU. I en annen gren av dette forsøket var PFU-utbytter  $94 \times 10^3$  for SRFE + soya/SRFE-kulturer som ikke fikk sukrose, og  $296 \times 10^3$ ,  $427 \times 10^3$  og  $671 \times 10^3$  for kulturer som fikk sukrose henholdsvis ved infeksjon, 24 timer før infeksjon og 96 timer før infeksjon.

4. De sukrosebehandlede kulturer oppviste signifikant lavere cytopatiske effekter enn deres sukrosefrie motparter. Ved et annet forsøk oppviste sukrosebehandlede kulturer fortsatt ikke degenerative, cytopatiske effekter 1 uke etter infeksjon, mens deres sukrosefrie kontroller ble fullstendig lysert. Det er derfor mulig at de sukrosebehandlede celler vil akkumulere mer VZV (antigen og spesielt PFU) ved forlengede inkubasjonstider (utover de 46 timene med innhøsting fra rulleflaskeforsøket).

5. MOI ble i dette forsøket ikke regulert med hensyn på høyere cellekonsentrasjoner på tidspunktet for infeksjon på grunn av cellevekst i SRFE-medium. Selv høyere PFU-utbytter kunne således oppnås dersom denne parameteren ble optimalisert.

#### Eksempel 9

#### Utbytte av cellefritt VZV oppnådd ved hjelp av mekanisk skjærkraft, sonikering og en kombinasjon av disse

Et storskalaforsøk ble utført under anvendelse av flere forskjellige betingelser for VZV-produksjon, som var likt med forsøket beskrevet i eksempel 8. En ny parameter, celleoppbrytningsmåten, ble analysert i dette forsøket. Resultater er rapportert nedenunder hvor cellefritt VZV-utbytte oppnådd ved hjelp av Dounce-homogenisering alene, sonikering alene og en kombinasjon av Dounce og sonikering, ble sammenlignet. De rapporterte VZV-dyrkningsbetingelser er for celler dyrket i minimalmedium (EBME/EMEM) eller ved høy næringstilførsel (SRFE-2 pluss soyabønnelipider/SRFE-2 pluss 50 mM sukrose i forinkubasjonsfasen). Celler ble dyrket og innhøstet som beskrevet i eksempel 8, og VZV-pfu/ml ble bestemt ved hjelp av analysen beskrevet i eksempel 1:



Tabell 4  
Cellefri PFU/ml ( $\times 10^{-3}$ )

Betingelse	Dounce	Sonikert Dounce- pellet	Totalt	Bare sonikert
EBME/EMEM	42	7	49	38
EBME/EMEM	64	4	66	46
SRFE-2 + 154 sukrose	154	47	201	42

5

Fra disse dataene er det klart at en vesentlig forøkning av VZV-utbytte lar seg oppnå når mekanisk skjærkraft kombineres med sonisk oppbrytning av celler.

10

Eksempel 10

Anvendelse av SRFE-2-medium og soyabønnelipidsupplement for å oppnå forøket utvinning av levende varicella-vaksine fra MRC-5-celler

15

MRC-5-celler ble inokulert i 25 cm<sup>2</sup> T-kolber i EBME og inkubert i 3 dager ved 35°C. Medium ble fjernet og erstattet med 12,5 ml friskt EMEM-medium, eller SRFE-2-medium med 10% FCS, neomycin, glutamin og enten ikke noe soyabønnelipid eller en 1:200 fortykning av lipid. Kulturer ble inkubert i

20

ytterligere 3 dager ved 35°C. Media ble så fjernet, og celler mottok VZV-infiserte MRC-5-celler og 12,5 ml volumer av 2% kalvefosterserum, neomycin, glutamin i EMEM eller SRFE-2.

25

Dyrkningsbetingelsene angitt som "SRFE-2", mottok SRFE-2 under celledyrkning og virusdyrkning. "SRFE + soya"-betingelsen angir prøver som mottok SRFE-2-medium og en 1:200 fortykning av soyabønnelipid under celledyrkning, men bare SRFE-2-medium under virusdyrkning. Etter dyrkning i 48 timer ble media fjernet, celler ble skyllet 4 ganger med 5 ml volumer av PBS og

skrappt ut i 1,2 ml volumer stabiliseringsmiddel. Prøver fra kolber in duplo ble slått sammen og nedfrost ved -70°C. Etter påfølgende opptining ble celler brutt opp ved sonikering, klaret ved sentrifugering (1000 g i 10 minutter), og supernatanter ble nedfrost ved -70°C for senere analyse av virusinfektivitetstitere. Resultatene er vist i figur 4. Konklusjoner: Anvendelse av SRFE-2-medium i stedet for EMEM resulterte i en 2,5 gangers økning i utvinning av levende varicella. Anvendelse av soyabønnesupplert SRFE-2 under celledyrkning muliggjorde en ytterligere 2,7 ganger økning i virusutvinning, for en netto 7 ganger økning over det som ble oppnådd under anvendelse av EMEM-virusdyrkningsfremgangsmåten.

#### Eksempel 11

##### 15 Kompetitiv ELISA for kvantifisering av VZV-antigen

Ettersom VZV-plakkanalysen er tidkrevende, er den ikke særlig egnet for kontroll under fremgangsmåten. En hurtig VZV-antigen-ELISA muliggjør måling av VZV-antigenmengder som igjen muliggjør overvåkning av virusvekst under fremstilling av levende varicella-vaksine. I tillegg kan denne testen brukes til å beregne VZV-antigenmengder i klarede, sonikerte vaksinemengder, og eventuelt til å måle antigen i fylte, lyofiliserte vaksineglass. I korte trekk utføres denne analysen ved inkubasjon av VZV-antigen fra testprøver med anti-VZV-serum i oppløsning. Gjenværende, fritt antistoff får bindes til VZV-antigen immobilisert på ELISA-mikrotiterplater. Mengden av antistoff som er i stand til å bindes til platene, er omvendt proporsjonal med mengden av antigen i testprøven. Antistoffbinding til platene kvantifiseres ved reaksjon med et 25 enzytbundet anti-humanantistoff og passende substrat, hvorved man får et farget produkt som kvantifiseres spektrofotometrisk.

VZV-antigen-ELISA- og VZV-plakkanalysen burde generelt gi korrelative data, men det bør huskes på at VZV-antigenanalysen påviser både ikke-levedyktig og levedyktig VZV. Ettersom immunresponsen generert ved hjelp av drept VZV ikke er blitt påvist å være like effektiv som responsen på levende, svekket virus, er plakkanalysen den analysen som har avgjør-

ende betydning for bestemmelse av virusinokulumdose for VZV-vaksiner. Antigenanalysen er imidlertid også verdifull ved at den gir et mål for den totale antigenmengde som administreres til en VZV-vaksinemottaker.

5

Testprosedyre:

1. ELISA-plater belegges med glykoproteiner (gps) fra VZV-infiserte eller uinfiserte MRC-5-celler, og overdekkes med 1% bovint serumalbumin [fraksjon V, nr. A-9647, Sigma] og 0,1% NaN<sub>3</sub> for å redusere ikke-spesifikk adsorpsjon av antistoffer til platene. Annenhver rad belegges med VZV og kontrollantigen (dvs. radene A, C, E og G får VZV-gp, og radene B, D, F og H får uinfisert MRC-5-gp-antigen).  
10
2. Klaret (3250 g-min.) testantigen fortynnes i stabiliseringsmiddel i 12 x 75 mm rør eller mikrorør. Et standardvirusantigenpreparat (26 enheter/ml VZV-antigen ved "dot blot"-analyse) fortynnes i forholdet 1:10 og seriefortynnes så i forholdet 1:1,2 fem ganger, hvorved man får antigenkonsentrasjoner på 2,6, 2,1, 1,7, 1,3, 1,1 og 0,9 enheter/ml. Ytterligere fortynninger kan tas med, hvorved man får 0,7 og 0,5 enheter/ml antigen. Denne fortynningsserie brukes til å frembringe en standardkurve for målingen av antigenmengder i testprøver.  
15  
20  
25
3. Et humant anti-VZV-serum fortynnes i stabiliseringsmiddel til to ganger den endelige, ønskede fortynning.  
30
4. 300 µl volumer fortynnet antigen dispenseres i mikrorør, blandes med 300 µl fortynnet anti-VZV-serum og inkuberes ved 35°C i 15-22 minutter. En kontroll omfatter humant anti-VZV og fortynning (ikke noe antigen).  
35

5. Aliquoter à 100 µl fra hver serumantigenblanding tilsettes til 2 replikabrønner belagt med VZV-glykoprotein (VZV-gp) og 2 brønner belagt med MRC-5-gp (4 brønner pr. prøve) (f.eks.: eksempel 1 i kolonne 1, radene A, B, C og D; prøve 2 i kolonne 2, radene A, B, C og D; etc.).
6. Plater inkuberes i  $15 \pm 1$  minutt ved  $35^{\circ}\text{C}$  for å gjøre det mulig for fritt antistoff (ikke kompleksert til antigen i oppløsning) å binde seg til virusantigen immobilisert på platene.
7. Ubundet antistoff fjernes ved vasking, og brønnene får et alkalisk, fosfatasekonjugert geit-anti-human-IgG for å påvise bundet, humant antistoff.
8. Etter inkubasjon i  $15 \pm 1$  minutt ved  $35^{\circ}\text{C}$  fjernes ubundet konjugat ved vasking. Bundet konjugat påvises ved inkubasjon i 15 minutter ved  $35^{\circ}\text{C}$  med p-nitrofenylfosfatsubstrat oppløst i dietanolaminbuffer.
9. Etter avslutning av substratreaksjonen ved tilsetning av 50 µl/brønn 3 M NaOH, kvantifiseres fargefremkalling (OD ved 405 nm) ved å bruke et mikroplatespektrofotometer.

#### Testberegninger og fortolkning:

1. Gjennomsnittsverdien for de respektive replika-OD-verdier for de replika-VZV- og -MRC-5-belagte brønner beregnes. Erfaring har vist at MRC-5-OD er i overensstemmelse mellom forskjellige prøver og fortyninger. De gjennomsnittlige MRC-5-verdier for hele platen beregnes derfor å brukes til å korrigere for ikke-spesifikk binding av det primære antistoff eller konjugat til ikke-infiserte celleekstrakter. Den gjennomsnittlige MRC-5-OD trekkes fra de respektive, gjennomsnittlige VZV-OD-er, hvorved man får VZV-spesifikke OD-verdier ( $\Delta\text{OD}$ ).

2. Generering av en standardkurve for måling av antigenmengder:

Standardkurve- $\Delta$ OD-verdiene plottes mot de kjente antigenkonsentrasjoner (enheter VZV/ml).

5 Dataene innføres i et passende grafisk program (f.eks.: "Cricket Graph" versjon 1,3, Cricket Software, Malvern, PA), den lineære del av kurven identifiseres (må omfatte minst 4 punkter), og "line-fit formula" ( $y=a + bx$ ) fås.

10

3. Beregning av antigenmengder i testprøver:

Verdier for a og b fås ved hjelp av "line-fit formula", og y ( $\Delta$ OD) er kjent. Den gjenværende, ukjente verdi, x, som representerer antigenenhetene/ml, kan så beregnes og korrigeres ved hjelp av prøvefortynningen, hvorved man får antigenkonsentrasjonen i den ufortynnede prøve. En generell prøveberegning følger:

15

20

Prøve	Fortynning	$\Delta$ OD	antigenenheter/ml fra linjeformel	antigenenheter/ml korrigert for fortynning
A	1:2	Y	$X=(y-a)/b$	

25

30

(x) \* (fortynningsfaktor)

35

Den rapporterte antigenkonsentrasjon er den som oppnås med den minst fortynnede prøve som gir en  $\Delta$ OD-verdi innenfor den lineære del av standardkurven.

Eksempel 12VZV-antigen-ELISA og sammenligning med VZV-PFU-utbytte

Prøvene av cellefritt VZV generert i eksempel 7 for hvilke PFU/ml-utbytte er vist i figurene 1, ble analysert i henhold til VZV-antigen-ELISA vist i eksempel 11. Resultatene av denne analysen er vist i figur 2.

Det er verdt å legge merke til at VZV-antigenet fortsetter å øke etter 96 timer selv om PFU/ml avtar ifølge dataene i figur 1. Det er også verdt å legge merke til at VZV-antigennivået i SRFE-2 pluss soya pluss sukrose ingen steder er nær 16 ganger antigennivået i EMEM (figur 2), enda pfu/ml for levedyktig, cellefritt VZV er (figur 1). Av denne sammenligning fremgår det at sukroseeffekten er en hovedbidragsyter til opprettholdelse av levedyktig VZV 72 timer etter infeksjon.

Eksempel 13Økning av MRC-5-cellevekst under anvendelse av SRFE-2-medium og et soyabønnelipidsupplement

MRC-5-celler ble inokulert i 25 cm<sup>2</sup> T-kolber ved 53.000 celler/ml i 12,5 ml volumer EBME, 10% FCS, 50 µg/ml neomycin og 2 mM L-glutamin, og inkubert ved 35°C. Etter 2-3 dager ble mediet fjernet og erstattet (skifting 2) med 12,5 ml nytt medium eller SRFE-2-medium inneholdende 10% FCS, 50 µg/ml neomycin, 2 mM L-glutamin og forskjellige mengder soyabønnelipid. Ufortynnet soyabønnelipid inneholdt 20 mg/ml lipid og 100 mg/ml bovint serumalbumin.

Mediene ble fjernet 6 dager etter innledende celleinokulering og erstattet med 12,5 ml volumer av 2% FCS, 50 µg/ml neomycin, 2 mM L-glutamin i EMEM eller SRFE-2-medium supplert med forskjellige mengder soyabønnelipid. Celler ble dissosiert fra utvalgte kolber ved hjelp av trypsinbehandling, og celler ble tellt i et hemacytometer. Celletellinger ble bestemt for gjenværende kulturer etter ytterligere 2 dagers dyrkning ved 35°C, og oppsummering av resultatene er vist i tabell 5.

Tabell 5  
Anvendelse av SRFE-medium og soyabønne-  
lipider for å øke MRC-5-celletettheter

Medium	Forsøk 1	Forsøk 2
EMEM (E)	2,3	1,5
SRFE (S)	4,0	3,8
S + 1:100 soya	ND	7,6
S + 1:200 soya	7,9	7,6
S + 1:500 soya	5,9	3,7
S + 1:2000 soya	5,0	3,8

5

Medium-skifting 1 = medium erstattet med angitt medium supplert med 10% FCS 2-3 dager etter celleinokulasjon.

10 Medium-skifting 2 = medium erstattet med angitt medium supplert med 2% FCS 6 dager etter celleinokulasjon.

ND = ikke bestemt

15 Konklusjoner: Anvendelse av SRFE-2-medium uten et lipidsupplement resulterte i en omtrentlig 2 gangers økning i celleantall sammenlignet med det som ble oppnådd i EMEM alene. Celleutbytter ble ytterligere økt på en doseavhengig måte ved supplering av medium med soyabønnelipid. Maksimale celleutbytter ble oppnådd ved å bruke kombinasjonen av SRFE-2-medium og ca.  
 20 200-400 µg/ml lipid.

#### Eksempel 14

Dyrkning av WI-38-celler i henhold til fremgangsmåten ifølge denne oppfinnelsen

25 WI-38-celler inokuleres i 25 cm<sup>2</sup> T-kolber ved 53.000 celler/ml i 12,5 ml volumer av EBME, 10% FCS, 50 mg/ml neomycin og 2 mM L-glutamin, og det inkuberes ved 35°C. Etter

2 dager ble medium fjernet og erstattet med 12,5 ml SRFE-2-medium supplert med 50 mg/ml neomycin, 2 mM L-glutamin og en fortykning av soyabønnelipid i forholdet 1:200. Kontroller fikk medium uten et lipidsupplement. Etter 5 dagers dyrkning ved 35°C ble medium fjernet, cellene ble atskilt fra kolbene ved trypsinbehandling og tellet i et hemacytometer. Gjenværende kolber ble holdt i ytterligere 3 dager før telling av celler. En oppsummering av resultatene følger:

10

Tabell 6

Cellelinje	Lipid-supplement	Celler/kolbe x 10 <sup>-6</sup> etter	
		5 dager	8 dager
1	-	4,2	4,8
	+	9,5	10,2
3	-	4,1	4,9
	+	9,3	12,5

Konklusjon: Supplering av rike dyrkningsmedier med soyabønnelipid økte WI-38-celleutbytter med omtrent to ganger. Anvendelse av denne cellelinjen for VZV-produksjon forventes således å forløpe på samme måte som anvendelse av MRC-5-celler.

#### Eksempel 15

##### 20 Fremgangsmåte for evaluering av MRC-5-cellevekstforøkning

MRC-5-celler inokuleres i 25 cm<sup>2</sup> T-kolber ved ca. 53.000 celler/ml i 12,5 ml volumer "Basal Medium Eagle" med Earles salter (EBME), 10% FCS, 50 µg/ml neomycinsulfat (neo) og 2 mM glutamin (Gln). Kulturene inkuberes ved 35°C i 3 dager, hvoretter cellemonolagene vanligvis er ca. 50-75% sammenflytende. Medium fjernes og erstattes med 10-12,5 ml volumer 10% FCS, 50 µg/ml neo og 2 mM Gln ± soyabønne eller annet lipid, i SRFE-2-medium, og kulturene returneres til inkubasjon ved 35°C. Celletellinger bestemmes på forskjellige tidspunkter ved trypsinering av celler (2,5 ml volumer av

30



0,25% sitrattrypsinoppløsning) og telling i et hemacytometer. Cellelevedyktighet overvåkes ved hjelp av celleutelukkelse med 0,2% trypanblått. Celletellinger brukes til å utlede en cellekonsentrasjon som igjen korrigeres for totalvolumet av cellesuspensjon for å oppnå celleutbyttet pr. kolbe. I noen forsøk skiftes kulturer over i medium med 2% FCS 3-4 dager etter erstatning av medium, og celletellinger bestemmes etter inkubasjon i ytterligere 2 dager.

#### 10 Eksempel 16

##### Effekt av langvarig eksponering av dyrkede celler mot lipid-supplementer

MRC-5-celler ble inokulert i T25-kolber, tilført næring etter 3 dager (første nye næringstilførsel), og celletellinger ble bestemt etter ytterligere 3 dagers dyrkning. Ytterligere T25-kolber fikk fortsette dyrkning ved ny tilførsel av næring ± lipid (andre nye næringstilførsel) og fikk dyrkes i ytterligere 2 dager. Cellene ble utvunnet med trypsin. Utbytter var  $2,6 \times 10^6$  for celler inokulert i EBME og dyrket i EMEM, mens celler dyrket i SRFE-2 pluss fortykning av soya-bønnelipider i forholdet 1:100 nådde  $6,6 \times 10^6$  og  $7,7 \times 10^6$ . Celler dyrket i de ytterligere 2 dager, ga  $2,76 \times 10^6$  for EBME/EMEM-dyrkede celler, mens EBME/SRFE-2 uten noe soyabønnelipidsupplering ga  $9,2 \times 10^6$  og  $7,88 \times 10^6$  celler pr. T25-kolbe. Celler dyrket i EBME/SRFE-2 + soyabønnelipid i forholdet 1:100 ga bare  $2,48$  og  $2,28 \times 10^6$  celler. Disse dataene indikerer at langvarig eksponering (ca. 5 dager etter den andre nye tilførsel av næring) mot høye lipidkonsentrasjoner til sist kan føre til reduserte celleutbytter, sannsynligvis på grunn av celledød. Generelt tilføres celler således ny næring med rikt medium uten lipidsupplering. Denne skiftingen til et lipidfritt, rikt medium er særlig viktig når en virusvekstfase initieres, ettersom lipidet kan være toksisk for virusvekst eller fortsatt cellelevedyktighet i nærvar av kraftig virusangrep.

Eksempel 17Effekter av forskjellige lipidkonsentrasjoner på cellevekst i rikt og minimalmedium

Ved i hovedsak å følge den samme fremgangsmåte og plan for ny tilførsel av næring/cellekvantifisering beskrevet i eksempel 16 for MRC-5-kultur, ble de følgende celleutbytter oppnådd (anmerkning: +- og --symbolene etter mediumbeskrivelsen indikerer tilstedeværelse eller fravær av den angitte mengde soyabønnelipid(s)supplering i mg/ml i det andre medium med ny tilførsel av næring):

<u>Medium</u>	Totalt T25-kolber	
	<u>MRC-5-celleutbytte x 10<sup>-6</sup></u>	
	<u>Dager etter andre nytilførsel</u>	
	<u>av næringsmedium</u>	
	<u>3</u>	<u>5</u>
EBME/EMEM (3 forsøk)	4,3; 2,46; 1,52	2,94; 3,50
EBME/SRFE-2	3,80	
EBME/SRFE-2 - 0,4 s1.		13,69; 11,09
EBME/SRFE-2 + 0,4 s1.	11,7	11,65
EBME/SRFE-2 - 0,2 s1.	5,10	8,51; 6,27
EBME/SRFE-2 + 0,2 s1	7,62; 9,7	9,66
EBME/SRFE-2 - 0,1 s1.	3,52	
EBME/SRFE-2 + 0,1 s1.	4,94	
EBME/SRFE-2 - 0,04 s1.	3,10	
EBME/SRFE-2 + 0,04 s1.	3,16	
EBME/SRFE-2 - 0,01 s1.	2,90	
EBME/SRFE-2 + 1:01 s1.	3,82	

Dataene oppsummert ovenfor, er generelt i overensstemmelse med observasjonen anmerket i eksempel 16 om at langvarig eksponering av celler mot høye lipidkonsentrasjoner ikke er særlig gunstig selv om den toksiske effekt anmerket i eksempel 16, er mindre uttalt i disse dataene. Ved lavere lipidkonsentrasjoner er mer langvarig celleeksponering mot lipid

mindre skadelig og kan være gunstig for forøkt utbytte av celler/cm<sup>2</sup> av dyrkningsoverflaten.

#### Eksempel 18

##### 5 Effekt av kalvefosterserumkonsentrasjon på celleutbytter

Tilsetningen av 2 eller 10% kalvefosterserum i nærvær av lipidsupplementer ble testet i dette forsøket. MRC-5-celler ble inokulert i EBME, tilført ny næring 3 dager senere med SRFE-2 supplert med forskjellige mengder soyabønnelipid, på  
10 nytt tilført næring 2 dager senere med den samme konsentrasjon av lipid i SRFE-2 som tilveiebrakt ved den første nyttilførsel av næring. Celleutbytter i 10% FCS var 9,5, 11,3 og 12,2 x 10<sup>6</sup> for kulturer supplert med henholdsvis 0,1, 0,2 og 0,4 mg/ml lipid. Når det ble tilveiebrakt 2% FCS, var celleutbyttene  
15 henholdsvis 6,5, 8,8 og 3,2 x 10<sup>6</sup>. Dette forsøket fremhever den gunstige effekt på cellevekst av tilveiebringelse av FCS-supplering samt lipidsupplering. Uansett hvilke toksiske effekter cellene opplever ved forhøyede lipidkonsentrasjoner, så svekkes disse ved tilveiebringelse av tilstrekkelig FCS-  
20 supplering.

#### Eksempel 19

##### Effekter av forskjellige lipidsupplementer på MRC-5-cellevekst

MRC-5-celler ble inokulert i T25-kolber i EBME. På  
25 den tredje dag ble cellene på nytt tilført næring med SRFE-2-medium inneholdende 10% FCS, supplert med forskjellige lipidsupplementer. Soyabønnelipid fra Boehringer Mannheim, kolesterolrike lipider fra storfeserum fra Sigma, eller Miles/Pentex "EX-CYTE I" eller "Very Low Endotoxin" bovint lipoprotein ble tilveiebrakt ved de angitte konsentrasjoner. Celle-  
30 tellinger ved nyttilførsel av næring var i millioner: 1,19. Fem dager senere ble cellene tallet. Celler i EMEM var 2,97, i SRFE-2 eller SRFE-2 pluss 0,4 mg/ml, 0,2 mg/ml, og 0,1 mg/ml med soyabønnelipider frembrakte 4,83, 10,44, 8,67 og 8,04 millioner celler. "EX-CYTE I" ved 1:50, 1:100, 1:200 frembrakte  
35 henholdsvis 5,37, 4,80 og 4,74 millioner celler. "EX-CYTE VLE" ved 1:25, 1:50, 1:100 ga økning til henholdsvis 5,49, 7,23 og 7,92 millioner celler. Sigma-høykolesterolipider ved 1:25,

1:50, 1:100 ga økning til henholdsvis 6,87, 7,56 og 7,65 millioner celler. Soyabønnelipidene fra Boehringer Mannheim ga den største celleutbytteøkning selv om "EX-CYTE VLE" og Sigma-lipider var nesten like effektive. Økningseffekten er derfor  
5 ikke unik for soyabønnelipider.

#### Eksempel 20

#### Økning av MRC-5-cellevekst under anvendelse av høye konsentrasjoner av soyabønnelipid

10 MRC-5-celler ble inokulert i 25 cm<sup>2</sup> kolber og tilført ny næring på dagene 3 og 6 som i eksempel 13. Celleutbytter pr. kolbe på dag 6 for EBME/EMEM, SRFE-2 pluss 1/100 soyabønnelipid eller SRFE-2 pluss 1/50 soyabønnelipidkulturer var henholdsvis 4,3 millioner, 9,7 millioner og 11,7 millioner.  
15 Cellelevedyktighet var >99% (bedømt ved hjelp av trypanblåttutelukking) for alle kulturer. Celler ble på nytt tilført næring med medium ± soyabønnelipid inkubert i ytterligere 2 dager, og celleutbyttene ble bestemt. Celleutvinning pr. kolbe for disse kulturrene var 2,9 og 3,5 millioner for EBME/EMEM-kulturer in duplo; 11,65 millioner for SRFE-2 pluss 1/50  
20 soyabønnelipid under nytilførsel av næring med det samme medium, mens SRFE-2 pluss 1/50 soyabønnelipidkulturene (in duplo) tilført ny næring med SRFE-2-medium og ikke noe soyabønnelipid, ga 13,69 og 11,09 millioner celler; 9,66 millioner  
25 for SRFE-2 pluss 1/100 soyabønnelipid nytilført næring med det samme medium, mens nytilførsel av næring med SRFE-2 og ikke noe lipid ga 8,51 og 6,27 millioner i kulturer in duplo.

Av dette forsøket er det klart at MRC-5-celleutbytter ble økt med økende mengder av soyabønnelipid. Maksimale celle-  
30 utbytter ble oppnådd ved å bruke en fortynning av soyabønnelipid i forholdet 1:50 (høyeste konsentrasjon som ble testet). Innlemmelse av lipid i det andre nytilførte medium ga middels økte celleutbytter. Dataene viser imidlertid at maksimale celleutbytter kan oppnås gjennom bruken av lipid i forholdet  
35 1:50 i det første nytilførte medium. Lipidsupplementet kan så utelates fra det andre nytilførte medium. Ettersom høye konsentrasjoner av lipid kan være skadelige for virusproduksjon, kan det være ønskelig å utelate lipidet under virusdyrking.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av en levende varicella zoster-virus (VZV) vaksine,  
5 k a r a k t e r i s e r t v e d trinnene i den følgende rekkefølge:
- a) VZV-infeksjonsmottakelige celler valgt fra humane diploidceller, dyrkes til sammenflytning i monolagkultur under betingelser med tilstrekkelig høy næringstilførsel til å oppnå en høy grad av cellereplikasjon, og et ikke-metaboliserbart disakkarid tilføres,  
10
  - b) cellene dyrket i henhold til trinn (a), infiseres så nært punktet for sammenflytning som mulig med så høy infeksjonsmultiplisitet med VZV-infiserte celler som praktisk mulig,  
15
  - c) den VZV-infiserte kultur holdes ved en tilstand av høy næringstilførsel i 22-96 timer, og det innhøstes på tidspunktet for topproduksjon av infesiøst VZV,  
20
  - d) den VZV-infiserte kultur vaskes med en fysiologisk oppløsning som eventuelt inneholder et lysosomotropt middel, slik som ammoniumklorid eller klorokin, før innhøsting av de VZV-infiserte celler,  
25
  - e) de VZV-infiserte celler innhøstes i et minimalt volum av en stabiliserende oppløsning, og cellene brytes enten opp umiddelbart eller cellene nedfryses for senere oppbrytning,  
30
  - f) de VZV-infiserte celler oppbrytes inntil optimal frigjøring av celleforbundet VZV, og cellerestene fjernes, hvorved man får et cellefritt VZV-preparat.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at de VZV-infeksjonsmottakelige celler er MRC-5-celler, det svekkede VZV er Oka-stammen av varicella zoster-virus, dyrkningstemperaturen er mellom 30 og 37°C, disakkaridet er sukrose tilveiebrakt ved 20-60 mM, MOI er mellom 1:25 og 1:625, det lysosomotrope middel er

ammoniumklorid tilveiebrakt ved mellom 20 og 50 mM eller klorokin, tilveiebrakt ved ca. 230 µM.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 2,  
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at dyrkningstemperaturen er ca. 35°C.
4. Fremgangsmåte ifølge krav 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at høynæringsmediet er  
10 SRFE-2 eventuelt supplert med 0,02-0,4 mg/ml soyalipider, og viruset frigjøres fra cellene ved sonikering eller Dounce-homogenisering, eller begge deler.
5. Fremgangsmåte for fremstilling av en levende, svek-  
15 ket, cellefri varicella-zoster-virus (VZV) vaksine,  
k a r a k t e r i s e r t v e d trinnene i den følgende rekkefølge:
- a) dyrkning av VZV-infeksjonsmottakelige celler inntil sammenflytning, hvor dyrkningen omfatter:
- 20 1) en celleinokulasjonsfase,  
2) en celledyrkningsfase enten i et så stort volum minimalmedium som praktisk mulig eller i et mindre volum med høynæringsmedium, og  
3) en forinfeksjonsfase som omfatter eksponering av cellene mot et ikke-toksisk, ikke-metaboliserbart disakkarid,
- b) infeksjon av cellene dyrket i henhold til trinn a), så nært opptil punktet for sammenflytning som mulig, med så høy infeksjonsmultiplisitet med svekkede, VZV-  
30 infiserte celler som praktisk mulig,
- c) opprettholdelse av den VZV-infiserte kultur i et stort volum minimalmedium eller et mindre volum rikt medium i 22-96 timer inntil punktet for topp-VZV-produksjon,
- 35 d) vasking av den VZV-infiserte kultur med en fysiologisk oppløsning som eventuelt inneholder et lysosomotrop middel, før innhøsting,
- e) innhøsting av den VZV-infiserte kultur ved

- 1) fjerning av væske,
  - 2) tilsetning av et minimalt volum stabiliseringsmiddelopløsning,
  - 3) utskraping eller kjemisk frigjøring av de VZV-infiserte celler,
  - 4) eventuelt nedfrysing av de frigjorte, VZV-infiserte celler ved ca.  $-70^{\circ}\text{C}$ ,
- f) oppbrytning av de frigjorte, VZV-infiserte celler inntil optimal frigjørelse av cellebundet VZV, og fjerning av cellerester, og eventuelt lyofilisering av det cellefrie VZV eller lagring i flytende, nedfrost form.
6. Fremgangsmåte for fremstilling av en levende, svekket, cellefrie varicella-zoster-virus (VZV) vaksine, karakterisert ved trinnene i den følgende rekkefølge:
- a) dyrkning av MRC-5-celler til sammenflytning, hvor dyrkningen omfatter:
    - 1) en celleinokulasjonsfase i EBME,
    - 2) en celledyrkningsfase i SRFE-2 supplert med ca. 0,2 mg/ml soyalipider, som starter ca. 3 dager etter celleinokulasjon,
    - 3) en forinfeksjonsfase som omfatter eksponering av MRC-5-cellene mot 20-50 mM sukrose i 24-96 timer før infeksjon,
  - b) infeksjon av cellene dyrket i henhold til trinn a), så nært opptil punktet for sammenflytning som mulig, med så høy infeksjonsmultiplisitet med svekkede, VZV-infiserte MRC-5-celler som praktisk mulig,
  - c) opprettholdelse av den VZV-infiserte kultur i 37-96 timer, og innhøsting på tidspunktet for topp-VZV-produksjon,
  - d) vasking av kulturen med fosfatbufret saltoppløsning som eventuelt er supplert med 1-100 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  eller klorokin,
  - e) innhøsting av de VZV-infiserte MRC-5-celler ved:
    - 1) fjerning av væske,

2) tilsetning av et minimalt volum stabiliseringsmiddel som eventuelt inneholder 1-100 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  eller klorokin ved ca. 230  $\mu\text{M}$ ,

3) utskraping av cellene eller frigjøring av cellene kjemisk,

4) eventuelt nedfrysing av de frigjorte, VZV-infiserte celler ved  $-70^\circ\text{C}$ ,

f) oppbrytning av de frigjorte, VZV-infiserte celler ved 1. Dounce-homogenisering, 2. pelletering av rester og bibeholdelse av supernatanten, 3. sonikering av pelleten og nypelletering, og 4. kombineringsav supernatantene fra trinnene f-2 og f-3,

g) fortynning av produktet fra trinn (f) i stabiliseringsmiddel og påfylling av produktet i enhetsdoser for lyofilisering og lagring ved  $4^\circ\text{C}$  eller lavere, slik at ikke mindre enn ca. 1000 PFU er tilgjengelig pr. dose på tidspunktet for senere bruk.

7. Fremgangsmåte for dyrkning av celler i monolag,

karakterisert ved trinnene i følgende rekkefølge:

a) inokulering av en dyrkningsbeholder med en celledmengde i et minimalt eller rikt medium, og cellene får inokuleres i 24-72 timer,

b) fjerning av mediet fra kulturen ifølge trinn a) og erstatning med friskt, rikt medium, supplert med en optimalisert konsentrasjon av lipider, og som eventuelt også omfatter et serumsupplement, hvor lipid-supplementet tilveiebringes ved mellom 0,02 mg/ml og 0,4 mg/ml,

c) dyrkning av kulturen av celler i rikt medium supplert med lipid,

d) eventuelt erstatning av mediet fra trinn c) med friskt medium som ikke inneholder noe lipid-supplement, etter 24-72 timers vekst.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 7,



k a r a k t e r i s e r t v e d at det rike medium er SRFE-2, eventuelt supplert med kalvefostereserum, og cellene er MRC-5, WI-38 eller Vero-celler.

5 9. Medium,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det kan anvendes til dyrkning av celler i monolagkultur som omfatter SRFE-2-medium supplert med 0,02-0,4 mg/ml lipider.

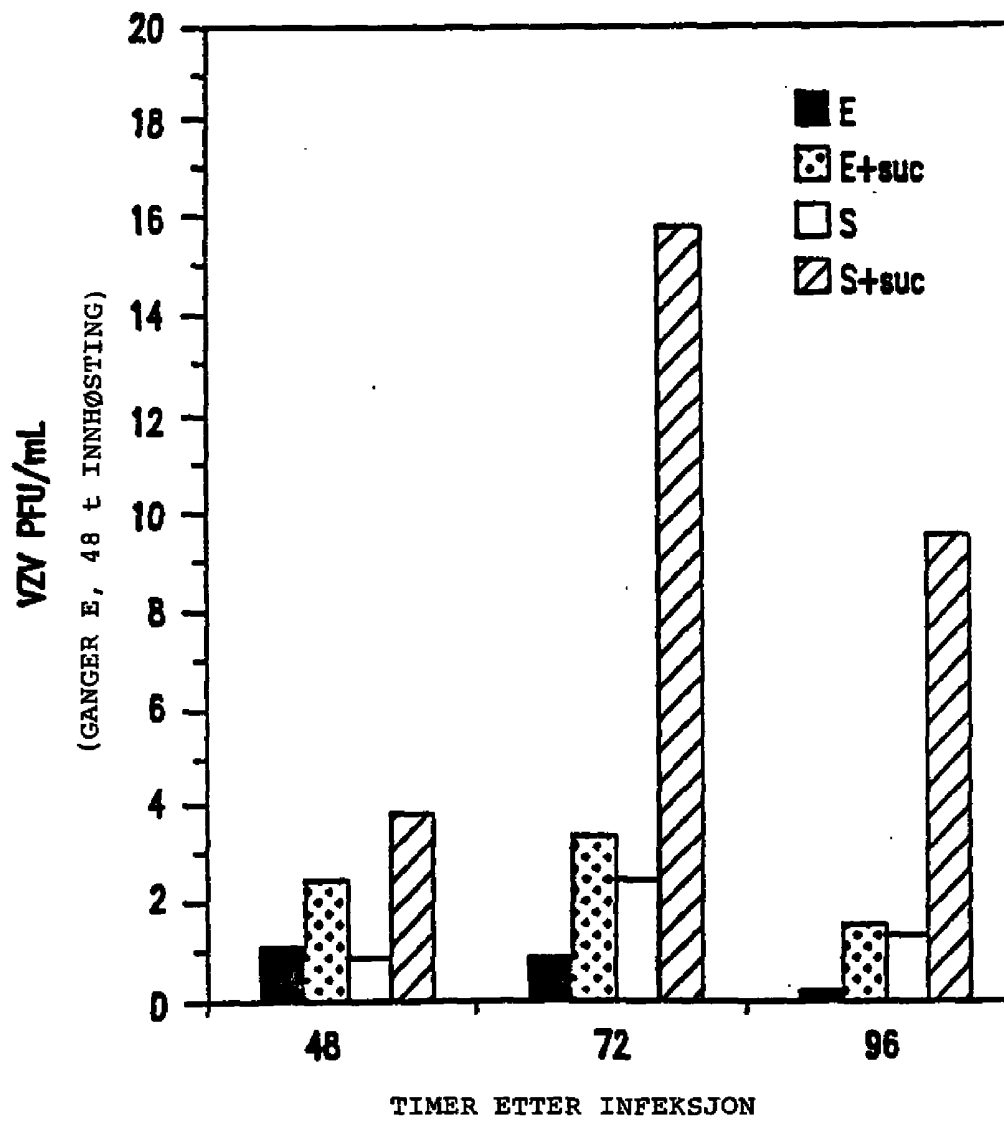


FIG.1

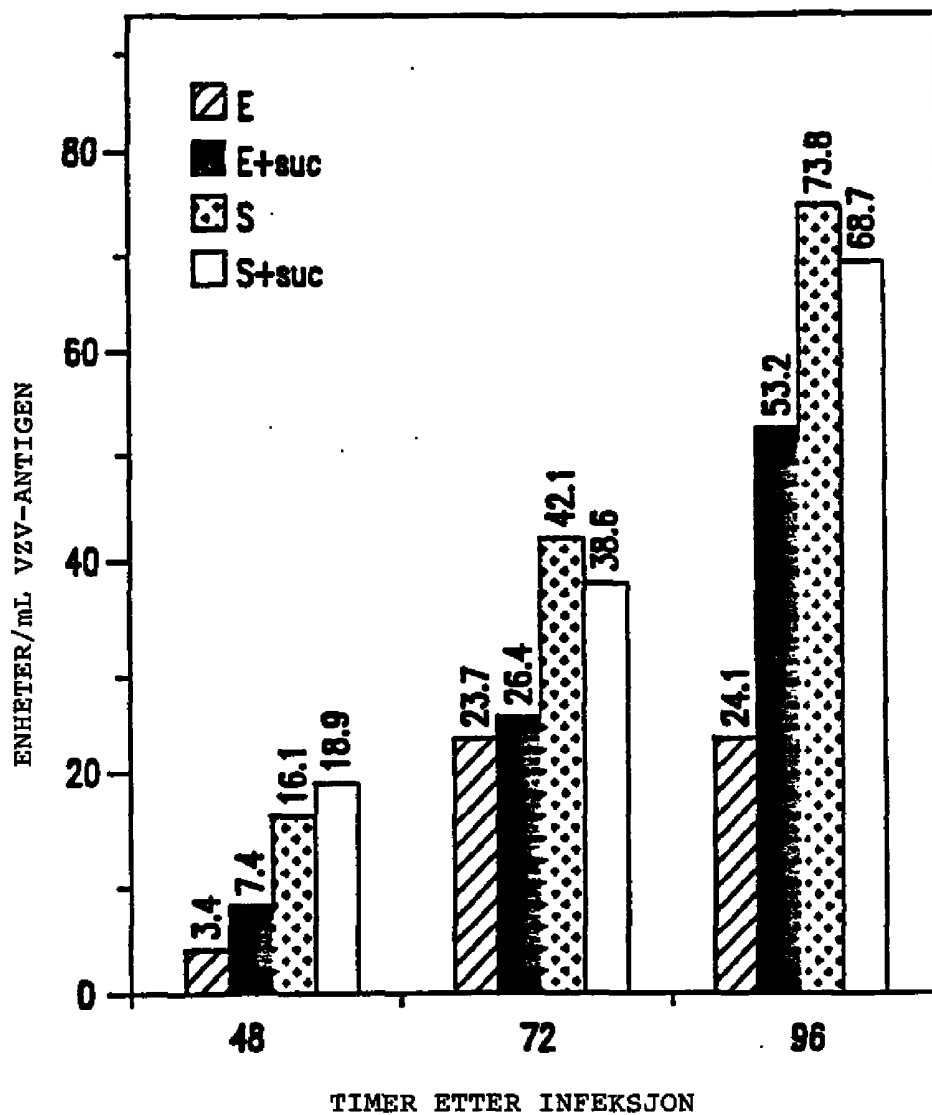


FIG.2

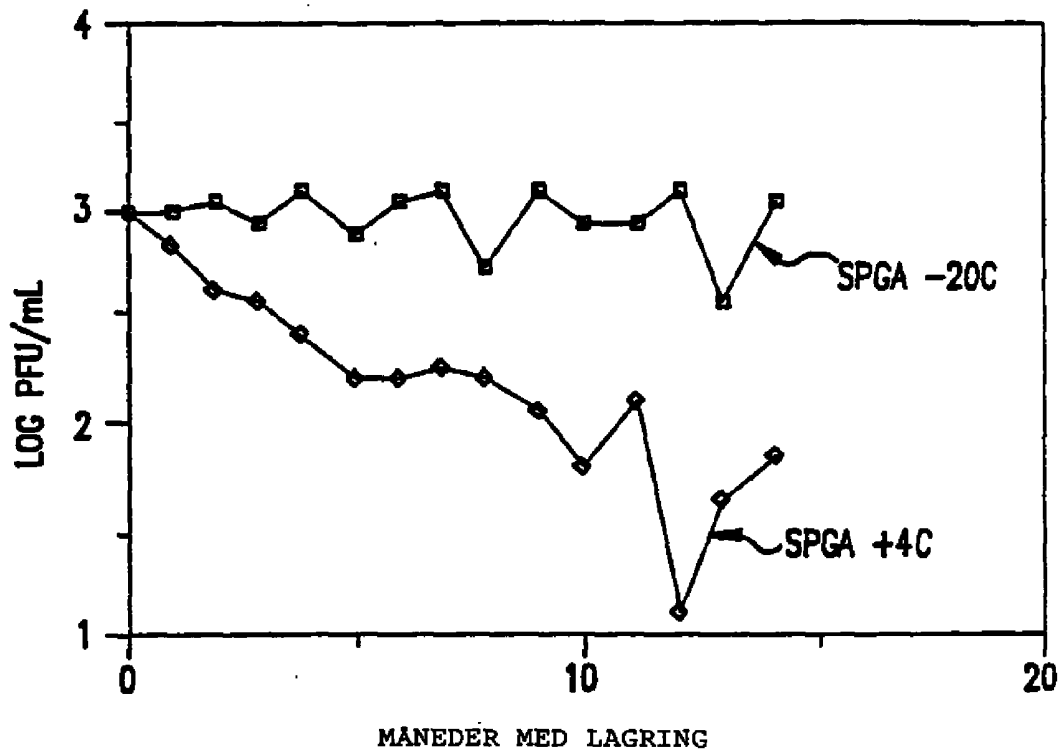


FIG.3

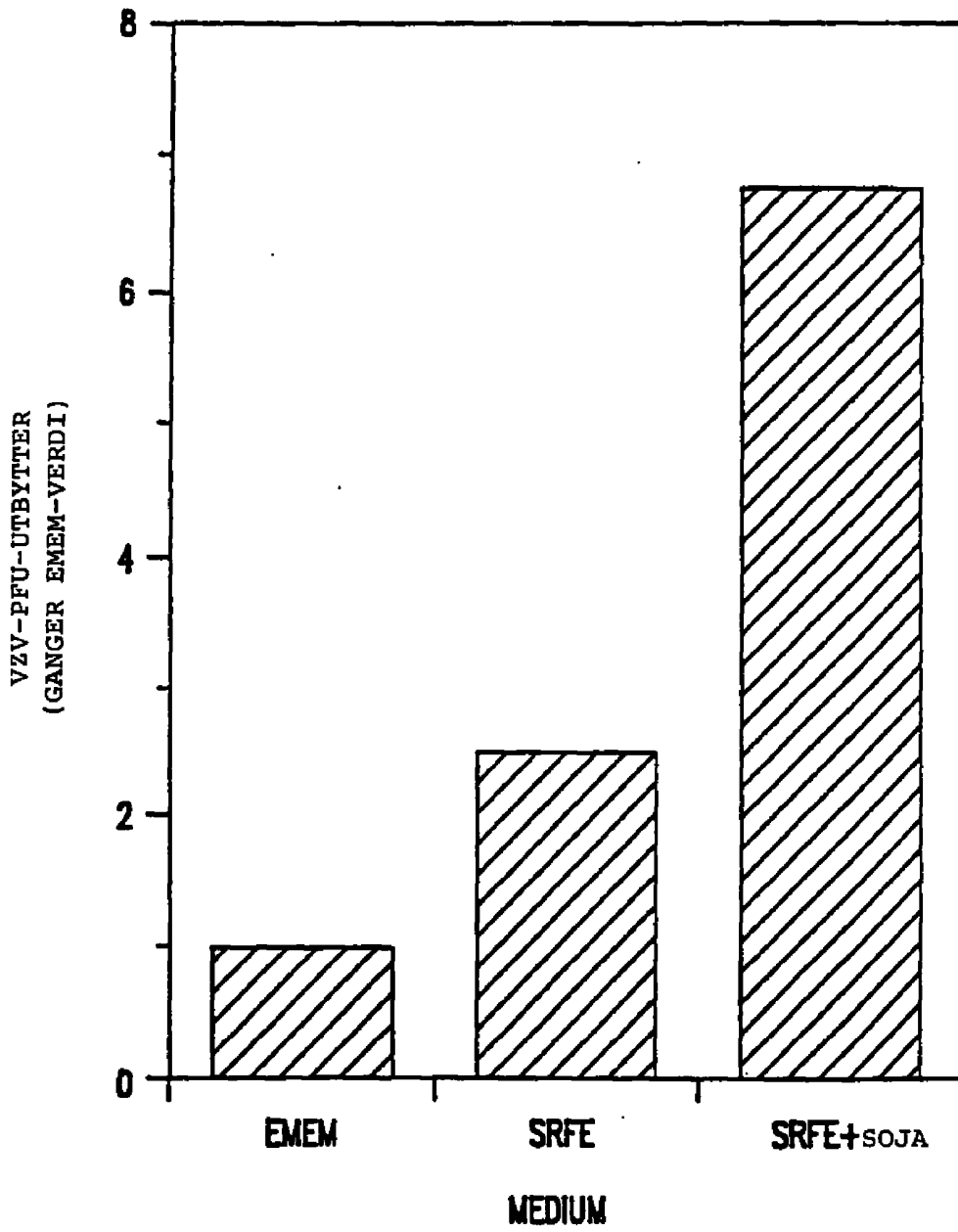


FIG.4

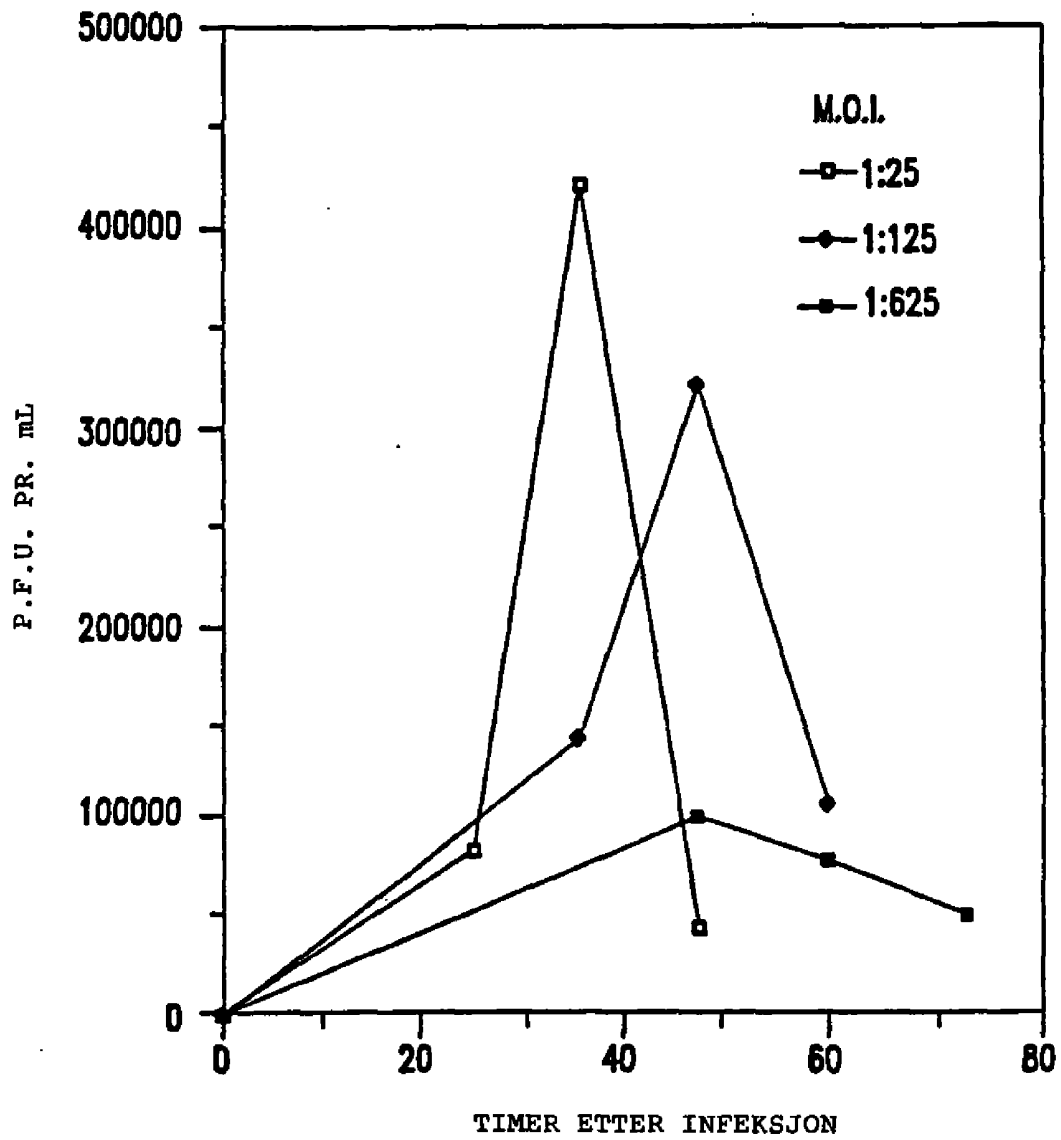


FIG.5