



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201202425 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：100114740

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 04 月 27 日

(51)Int. Cl.:

C12N7/00 (2006.01)

C07K14/11 (2006.01)

(30)優先權：2010/04/28

歐洲專利局

10161256.2

(71)申請人：亞培生物製劑公司 (荷蘭) ABBOTT BIOLOGICALS B. V. (NL)

荷蘭

(72)發明人：史密特 迪克 SMIT, DICK (NL)；歐勒曼 馬力努斯 亞卓努斯 OERLEMANS, MARINUS ADRIANUS (NL)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：27 項 圖式數：3 共 69 頁

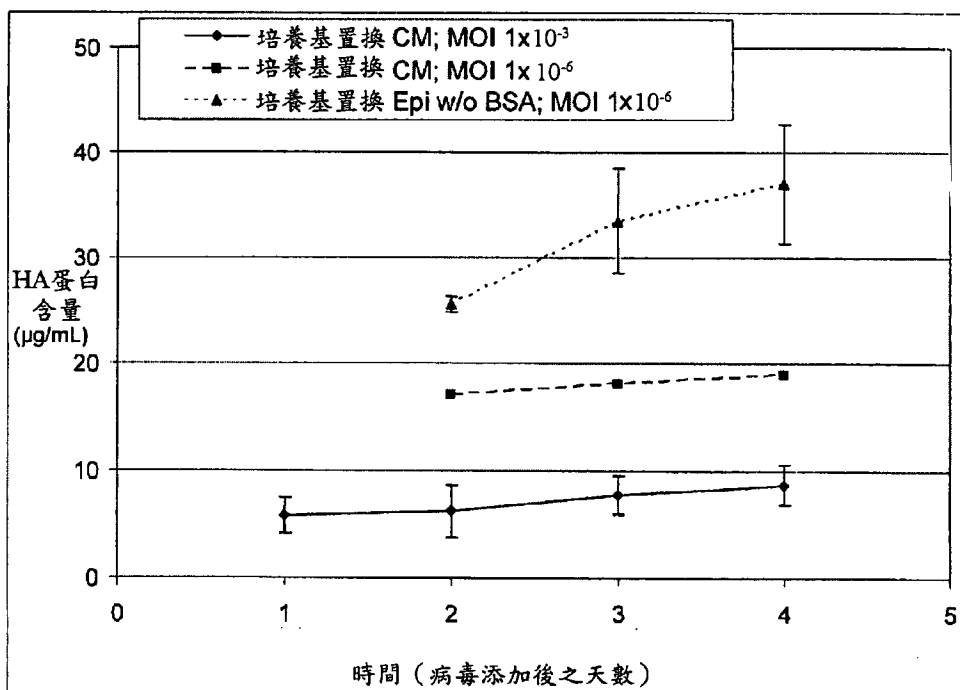
(54)名稱

病毒組分之製造

PRODUCTION OF VIRAL COMPONENTS

(57)摘要

本發明係關於一種繁殖流感病毒之方法，其中細胞培養組合物在病毒添加時於細胞培養物中含有至少 0.5×10^6 個細胞/毫升之量的細胞，且其中在病毒添加步驟期間所添加之感染性病毒粒子總數/細胞(MOI)小於 10^{-5} ，及關於該方法在流感疫苗製造中之用途。此外，本發明係關於一種測試添加極低數目感染性病毒粒子/細胞(MOI)之預選病毒株至用於繁殖病毒粒子之細胞培養組合物是否致使病毒粒子及/或加工病毒粒子產量增加的方法。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201202425 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：100114740

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 04 月 27 日

(51)Int. Cl.:

C12N7/00 (2006.01)

C07K14/11 (2006.01)

(30)優先權：2010/04/28

歐洲專利局

10161256.2

(71)申請人：亞培生物製劑公司 (荷蘭) ABBOTT BIOLOGICALS B. V. (NL)

荷蘭

(72)發明人：史密特 迪克 SMIT, DICK (NL)；歐勒曼 馬力努斯 亞卓努斯 OERLEMANS, MARINUS ADRIANUS (NL)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：27 項 圖式數：3 共 69 頁

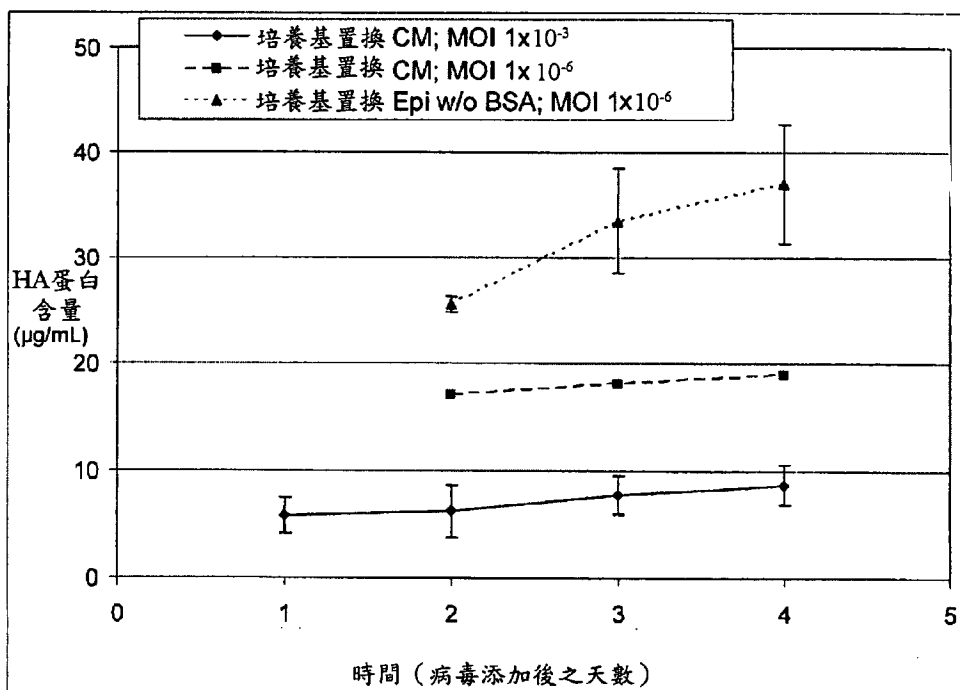
(54)名稱

病毒組分之製造

PRODUCTION OF VIRAL COMPONENTS

(57)摘要

本發明係關於一種繁殖流感病毒之方法，其中細胞培養組合物在病毒添加時於細胞培養物中含有至少 0.5×10^6 個細胞/毫升之量的細胞，且其中在病毒添加步驟期間所添加之感染性病毒粒子總數/細胞(MOI)小於 10^{-5} ，及關於該方法在流感疫苗製造中之用途。此外，本發明係關於一種測試添加極低數目感染性病毒粒子/細胞(MOI)之預選病毒株至用於繁殖病毒粒子之細胞培養組合物是否致使病毒粒子及/或加工病毒粒子產量增加的方法。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明屬於醫藥工業領域且係關於一種繁殖流感病毒之方法及該方法在流感疫苗製造中之用途。此外，本發明係關於一種測試添加極低感染性病毒粒子數目/細胞(MOI)之預選病毒株至用於繁殖病毒粒子之細胞培養組合物是否致使病毒粒子及/或加工病毒粒子產量增加的方法。

【先前技術】

疫苗係用於保護群體免於常見致病威脅，對於降低疾病負擔及增加預期壽命產生極大影響。疫苗之有效使用主要依賴於能夠快速產生大量疫苗材料及增加可用疫苗劑量數，其中不同疫苗材料為獲得可接受之產量需要不同生長條件。

在此方面，專利申請案US 2006/0188977 A1(2006年8月24日；「Non-tumorigenic MDCK cell line for propagating viruses」)尤其描述在細胞培養物中製造疫苗材料(諸如病毒)。在本文中，在培養基中繁殖MDCK細胞，用病毒感染且培養。之後分離所複製之病毒。在約0.0001至約10之MOI下，用病毒感染細胞。

Govorkova等人(「African Green Monkey Kidney (Vero) Cells Provide an Alternative Host Cell System for Influenza A and B Viruses」, Journal of Virology, 1996年8月, 第5519-5524頁)展示非洲綠猴腎細胞株(African green monkey kidney cell line, Vero)與馬丁達比犬腎(Madin-Darby

canine kidney, MDCK)細胞同樣適用作生產複製流感病毒之宿主細胞系統，因為Vero細胞株亦提供足夠數量之A型及B型流感病毒以滿足出現大流行病時所面臨之疫苗需求。為了用所測試之流感病毒感染兩種不同細胞株，用範圍介於每個細胞0.01至0.001 PFU之不同感染倍率(multiplicity of infection, MOI)感染細胞株。

Ozaki等人(「Generation of High-Yielding Influenza A Viruses in African Green Monkey Kidney (Vero) Cells by Reverse Genetics」, Journal of Virology, 2004年2月, 第1851-1857頁)描述經改質之流感病毒主要病毒株，其在Vero細胞株中具有經改良之病毒拯救及生長性質。其可展示經改良之性質為藉由PR8 NS基因取代Vero適應重配病毒(Vero-adapted reassortant virus)之PR8 NS基因(Eng53/v-a)所介導。藉由用Vero適應重配病毒以0.01之感染倍率(MOI)感染Vero細胞來檢定病毒複製。

Voeten 等人 (「Characterization of high-growth reassortant influenza A viruses generated in MDCK cells cultured in serum-free medium」, Vaccine 17, 1999, 1942-1950)描述連續細胞株(MDCK-SF1)之用途，其能夠在無胎牛血清之情況下生長以產生高生長重配A型流感病毒，該等病毒可用於在此等細胞中產生病毒抗原。重配病毒株之高生長表型可藉由比較由感染產生之重配病毒與相應野生病毒株之血球凝集單位(hemagglutinating unit, HAU)來證明。在96孔板(200微升/孔，細胞密度為約 2×10^5 個細胞/毫

升)中以範圍介於0.001至0.000001之不同MOI進行細胞感染。作者證明高生長表型可分別歸結於高生長實驗室病毒株PR 34或HK 68之基質蛋白(matrix protein)。Voeten等人以血球凝集單位(HAU)量測病毒繁殖動力學。然而，此測試以及各別實驗中使用低數目細胞(此測試在96孔板中約200 μ l體積之培養基中進行，其含有密度為約 0.2×10^6 個細胞/毫升之細胞)產生不展現顯著性之不準確結果。

Audsley及Tannock(「The growth of attenuated influenza vaccine donor strains in continuous cell lines」, Journal of Virological Methods 123 (2005), 187-193)在其研究中比較三種俄羅斯減毒活供體病毒株(Russian live attenuated donor strain)在不同MOI下於MDCK及Vero細胞培養物中之生長特性。在此研究中，其展示所有供體病毒株生長之最佳MOI為0.01。

EP 2 022 849 A1係關於一種大規模製造流感病毒之方法，其描述組織培養物可以0.00001至0.01之MOI感染。

WO 97/38094係關於高生長流感病毒株之複製，其中使哺乳動物細胞感染該等病毒株且培養，同時維持胰蛋白酶濃度在0.05-1.0 μ g/ml之範圍內。

Brands等人(「Influvac^{TC}: A Safe Madin Darby Canine Kidney (MDCK) Cell Culture-Based Influenza Vaccine」, Developments in Biological Standardization, 第98卷, 1999年1月1日)描述流感病毒疫苗Influvac^{TC}之總體製造方法。其中，MDCK實用種毒株(working seed virus, WSV)由

WHO指定之雞蛋適應流感病毒以低感染倍率於無血清培養基中之MDCK細胞培養物中製造。此外，描述疫苗製造期間所執行的後續加工(用病毒感染細胞、收集含有病毒之培養基、病毒純化、將病毒加工成疫苗)，以及已採用之安全措施(病毒不活化(inactivation)、病毒清除、假定存在宿主細胞污染物之測試)。Brands等人完全未提及特定MOI。

WO 2008/043805係關於大環內酯多烯抗生素或其衍生物或類似物之用途，其係作為培養補充劑用於病毒繁殖，以便增加連續細胞株中所繁殖之病毒的產量且提高其品質。WO 2008/043805之圖1展示，對於所測試之各MOI而言，在病毒生長培養基中存在兩性黴素B對病毒複製具有正面效應。WO 2008/043805揭示藉由使用大環內酯多烯抗生素或其衍生物或類似物，可使用0.001或0.0001以至0.00001或甚至更低之MOI感染細胞。WO 2008/043805例如未提及病毒添加時細胞培養物中之細胞量，以及在病毒添加後之特定時間點下確定之活細胞密度。

WO 96/15232係關於一種確保人類流感病毒在哺乳動物細胞株中以低感染倍率複製之方法，其中維持該培養基中始終最小的胰蛋白酶濃度(約0.05 µg/ml)。根據WO 96/15232，測試展示當MOI介於每個細胞約 1×10^{-5} 與 1×10^{-6} TCID₅₀之範圍時，約0.1 µg/ml之胰蛋白酶濃度最佳，且在每個細胞約 5×10^{-7} TCID₅₀下獲得令人滿意的結果。WO 96/15232既未揭示例如病毒添加之時間點下細胞培養物中

之細胞量，亦未揭示病毒添加後之特定時間點下活細胞之密度。

儘管上文描述用於在細胞培養物中繁殖病毒粒子之高生長病毒株及細胞株以及疫苗製造方法，但仍需要且因此存在改良病毒組分製造方法及改良用於製造病毒組分之細胞培養物的目標。

【發明內容】

本發明提供以下態樣、標的物及較佳實施例，其分別單獨或組合採用，有助於達成本發明之目標：

(1) 一種繁殖包含免疫原性血球凝集素(HA)之流感病毒的方法，其中細胞在第一步驟中培養於細胞培養物中且其中隨後在第二步驟中添加感染性流感粒子(諸如A型、B型或C型流感病毒)至該細胞培養物，其中用於培養細胞之培養基在病毒添加步驟之前或期間經置換為與先前用於培養細胞之培養基的重量莫耳滲透濃度(osmolality)相比具有至少80%、較佳至少85%、更佳至少90%且最佳至少95%之重量莫耳滲透濃度的培養基，且其與先前用於培養細胞之培養基相比不具有顯著較低量，較佳不少於50%、更佳不少於60%、甚至更佳不少於65%且最佳不少於75%之蛋白質、生長因子及/或無機鹽總量，其中在病毒添加時細胞培養物中之細胞量為至少 0.5×10^6 個細胞/毫升，其中在病毒添加後12至36小時內，活細胞之密度不低於感染時細胞密度之40%，

其中在病毒添加步驟期間所添加之感染性病毒粒子總數/

細胞(感染倍率, MOI)小於 10^{-5} 。

在本發明之含義中, 表述「用於培養細胞之培養基」、「用於培養細胞之細胞培養基」或「細胞培養基」表示在細胞培養物接種病毒之前所用之培養基。置換該細胞培養基之培養基(置換培養基)由術語「用於繁殖病毒之培養基」、「病毒培養基」或「病毒繁殖培養基」表示。其為病毒繁殖階段所用之培養基。

在一實施例中, 用於培養細胞之細胞培養基及用於繁殖病毒之培養基(亦即置換培養基)僅在存在/不存在BSA(牛血清白蛋白)上有差異(其他成分及成分之量基本上相同, 亦即所有個別物質之量差異不超過30%, 較佳不超過20%)。

在另一實施例中, 將蛋白質豐富的培養基用作用於培養細胞之細胞培養基且蛋白質缺乏的培養基用作用於繁殖病毒之培養基。術語「蛋白質豐富」及「蛋白質缺乏」定義蛋白質總量在「蛋白質豐富的培養基」中相比「蛋白質缺乏的培養基」中較高。或者或另外較佳言之, 用於繁殖病毒之培養基中所含之游離胺基酸總量不高於或基本上不高於用於培養細胞之細胞培養基中之胺基酸總量。

另外較佳言之, 用於繁殖病毒之培養基與用於培養細胞之細胞培養基相比, 不具有顯著較低量(例如不少於50%、更佳不少於60%、甚至更佳不少於65%且最佳不少於75%)之個別物質或物質群, 該等物質分別選自由蛋白質、生長因子及/或無機鹽組成之群。舉例而言, 在用於繁殖病毒

之培養基中，蛋白質之量較佳不少於50%、更佳不少於60%、甚至更佳不少於65%且最佳不少於75%。在比較屬於蛋白質群之個別物質的量時，不考慮BSA，然而在比較蛋白質總量時，考慮BSA。在本發明之含義中，術語「BSA」包括任何種類的BSA，諸如BSA Fraction V或Albumax I(牛類富含脂質之BSA)。在本發明之含義中，「物質群」，例如蛋白質，包含屬於該群之所有個別物質，例如乳白蛋白水解物。

此外，在本發明之含義中，術語「蛋白質、生長因子及/或無機鹽總量」一方面表示分別屬於蛋白質、生長因子或無機鹽之群之個別物質的總量(例如屬於蛋白質群之所有個別物質的總量，或屬於生長因子群之所有個別物質的總量)，且其在另一方面表示屬於蛋白質、生長因子及無機鹽之群之所有個別物質的總量。

在該方法之另一較佳實施例中，用於繁殖病毒之培養基與用於培養細胞之細胞培養基相比，不具有顯著較低量(小於75%之細胞培養基之量)之三種、兩種或一種選自由生長因子及/或無機鹽組成之群的物質。

為確定是否實現該準則，藉由常用於此領域之方法測定各別單個物質之量或物質群(諸如蛋白質群、生長因子群及/或無機鹽群)之量。隨後將病毒繁殖培養基之個別物質或物質群之各別量與細胞培養基之量進行比較。

在另一實施例中，細胞培養基未補充有抗生素。

在另一實施例中，病毒繁殖培養基未補充有抗生素。

在另一實施例中，細胞培養基及病毒繁殖培養基均未補充有抗生素。

詳言之，細胞培養基及/或病毒繁殖培養基未補充有大環內酯多烯抗生素或其衍生物或類似物。

(2) 如項目(1)之方法，其中該置換培養基不含BSA。

在另一較佳實施例中，置換培養基未補充有抗生素。

(3) 如項目(1)或(2)之方法，其中在添加感染性流感粒子後，將蛋白酶以1 $\mu\text{g/ml}$ 至50 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度範圍添加至該培養基。

(4) 如項目(3)之方法，其中蛋白酶以大於1.0 $\mu\text{g/ml}$ 至50 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度範圍、較佳1.5 $\mu\text{g/ml}$ 至50 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度範圍、更佳2.0 $\mu\text{g/ml}$ 至50 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度範圍且甚至更佳2.5 $\mu\text{g/ml}$ 至50 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度範圍添加至該培養基。

(5) 如項目(3)或(4)之方法，其中該蛋白酶為胰蛋白酶。

(6) 如項目(1)至(5)中任一項之方法，其中該等細胞為固著依賴性細胞(anchorage-dependent cell)。

(7) 如項目(1)至(6)中任一項之方法，其中在病毒添加步驟期間所添加之感染性病毒粒子總數/細胞(感染倍率，MOI)等於或小於 10^{-6} 。

(8) 如項目(1)至(6)中任一項之方法，其中在病毒添加步驟期間所添加之感染性病毒粒子總數/細胞(感染倍率，MOI)等於或小於 10^{-7} 。

(9) 如項目(1)至(6)中任一項之方法，其中在病毒添加

步驟期間所添加之感染性病毒粒子總數/細胞(感染倍率, MOI)等於或小於 10^{-8} 。

(10) 如項目(1)至(9)中任一項之方法，其中在病毒添加後12至36小時內，活細胞之密度不低於病毒添加時細胞密度之60%。

(11) 如項目(1)至(9)中任一項之方法，其中在病毒添加後12至36小時內，活細胞之密度不低於感染時細胞密度之80%。

(12) 如項目(1)至(9)中任一項之方法，其中在病毒添加後12至36小時內，活細胞之密度不低於感染時細胞密度之100%。

(13) 如項目(1)至(12)中任一項之方法，其中用於培養細胞之培養基在病毒添加步驟之前或期間經置換為與先前用於培養細胞之培養基的重量莫耳滲透濃度相比具有至少95%之重量莫耳滲透濃度的培養基(置換培養基)。

(14) 如項目(1)至(13)中任一項之方法，其中在病毒添加時該細胞培養物中之細胞的量為至少 3.0×10^6 個細胞/毫升。

(15) 如項目(1)至(13)中任一項之方法，其中在病毒添加時該細胞培養物中之細胞的量為至少 5.0×10^6 個細胞/毫升。

(16) 如項目(1)至(13)中任一項之方法，其中在病毒添加時該細胞培養物中之細胞的量為至少 7.0×10^6 個細胞/毫升。

(17) 如項目(1)至(13)中任一項之方法，其中在病毒添加時該細胞培養物中之細胞的量為至少 9.0×10^6 個細胞/毫升。

(18) 如項目(1)至(13)中任一項之方法，其中在病毒添加時該細胞培養物中之細胞的量為至少 11.0×10^6 個細胞/毫升。

(19) 如項目(1)至(13)中任一項之方法，其中在病毒添加時該細胞培養物中之細胞的量為至少 13.0×10^6 個細胞/毫升。

(20) 如項目(1)至(19)中任一項之方法，其中所用細胞為動物細胞，較佳為哺乳動物細胞。

在一較佳實施例中，哺乳動物細胞係選自由Vero、PerC6、BHK、293、COS、PCK、MRC-5、MDCK、MDBK及WI-38組成之群，細胞較佳為MDCK細胞。

在另一較佳實施例中，細胞係以黏附細胞之方式培養。

(21) 如項目(20)之方法，其中所用細胞為MDCK細胞。

(22) 如項目(1)至(21)中任一項之方法，其中該方法進一步包含一或多個進一步加工繁殖病毒粒子之步驟。

(23) 如項目(22)之方法，其中該等加工病毒粒子包含不活化(inactivated)病毒粒子，及/或減毒病毒粒子，及/或分裂病毒抗原，及/或次單位病毒抗原，及/或病毒體(virosome)。

(24) 如項目(23)之方法，其中該等加工病毒粒子包含一或多個流感抗原。在一較佳實施例中，加工病毒粒子包含

血球凝集素(HA)及/或神經胺糖酸苷酶(NA)。

(25) 如前述項目中任一項之方法，其係用於製造流感疫苗。

(26) 一種測試添加感染細胞所必需之極低感染性病毒粒子總數/細胞(「感染倍率」，MOI)之預選病毒株至用於繁殖病毒粒子之細胞培養組合物是否致使病毒粒子及/或加工病毒粒子產量增加的方法，其包含以下步驟：

- a) 使細胞在細胞培養組合物中生長，直至達到至少 0.5×10^6 個細胞/毫升之細胞密度，
- b) 將使用極低MOI之總數的預選病毒株感染性病毒粒子添加至該細胞培養組合物，其中該極低MOI為小於 10^{-5} 之MOI，
- c) 將步驟b)之添加該等感染性病毒粒子至該等細胞後所獲得之病毒粒子及/或加工病毒粒子的產量與在使用在等於或高於 10^{-5} 範圍內之參考MOI將相同類型感染性病毒粒子添加至相同類型細胞時所獲得之病毒粒子及/或加工病毒粒子之量進行比較。該參考MOI較佳為 10^{-3} 。

在另一較佳實施例中，在步驟a)中，使細胞生長，直至達到至少 3.0×10^6 個細胞/毫升、較佳至少 5.0×10^6 個細胞/毫升、進一步較佳至少 7.0×10^6 個細胞/毫升、甚至進一步較佳至少約 9.0×10^6 個細胞/毫升、較佳至少約 11.0×10^6 個細胞/毫升或進一步較佳至少 13.0×10^6 個細胞/毫升之細胞密度。

(27) 如項目(26)之測試方法，其中病毒添加後24小時之病毒粒子之量在以 $10 \log \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 形式量測時為至少6。

(28) 如項目(26)或(27)之測試方法，其中在步驟c)之前執行對所製造病毒粒子之收集及視情況選用之其他加工步驟。

(29) 如項目(26)至(28)中任一項之測試方法，其中步驟b)之感染性病毒粒子添加至該等細胞後所獲得的病毒粒子或加工病毒粒子之量為使用在至少 10^{-5} 或 10^{-5} 以上範圍內之參考MOI添加相同類型感染性病毒粒子至相同類型細胞後所獲得之病毒粒子或加工病毒粒子之量的至少1.2倍、較佳至少1.5倍、更佳至少2倍且最佳至少3倍，其中病毒粒子之量較佳在病毒添加後24小時測定。尤其較佳使用 10^{-3} 之MOI作為參考MOI。

(30) 如項目(26)至(29)中任一項之測試方法，其中在步驟a)之後，較佳在步驟a)之後且在步驟b)之前或期間，以極低MOI及參考MOI用於培養細胞之細胞培養基經置換為病毒繁殖培養基，其與先前用於培養細胞之細胞培養基的重量莫耳滲透濃度相比具有至少80%、較佳至少85%、更佳至少90%且最佳至少95%之重量莫耳滲透濃度。

關於較佳細胞培養基及用於繁殖病毒之培養基，參考本文所述之各別培養基。上述關於各別培養基之準則是否實現，可如本文別處所述進行判定。

(31) 如項目(26)至(30)中任一項之測試方法，其中該等細胞為如項目(20)或(21)中所定義之細胞。

(32) 如項目(26)至(31)中任一項之測試方法，其中該感染性病毒粒子為感染性流感粒子。

(33) 如項目(26)至(32)中任一項之測試方法，其中該加工病毒粒子為如項目(23)或(24)中所定義之加工病毒粒子。

(34) 如項目(1)至(25)中任一項之方法或如項目(26)至(33)中任一項之測試方法，其中該MOI等於或小於 1×10^{-6} ，視情況等於或小於 1×10^{-7} ，進一步視情況等於或小於 1×10^{-8} 。

(35) 如項目(1)至(25)中任一項之方法或如項目(26)至(33)中任一項之測試方法，其中該等病毒粒子或加工病毒粒子之量係藉由單向輻射免疫擴散(Single Radial Immuno Diffusion, SRID)檢定或藉由逆相高效液相層析(RT-HPLC)檢定來偵測。

(36) 一種用於製造病毒粒子及/或加工病毒粒子之細胞培養組合物，其中

a) 已藉由使用至少 0.5×10^6 個細胞/毫升之起始細胞量製備該細胞培養組合物，亦即在病毒添加時該細胞培養物中之細胞量為至少 0.5×10^6 個細胞/毫升，及

b) 已向步驟a)之細胞培養組合物中添加使用小於 10^{-5} 之極低MOI之總數的感染性病毒粒子，及

c) 在病毒添加後1天範圍內，步驟b)之細胞培養組合物中所存在之活細胞量相當於該細胞培養組合物中所存在之起始細胞量(亦即在病毒添加時該細胞培養物中之活細胞量)的至少約60%、較佳至少約70%、更佳至少約75%、甚至更佳至少約80%且最佳至少約85%。

在另一較佳實施例中，在病毒添加後24小時之範圍內，步驟b)之細胞培養組合物中所存在之活細胞量相當於該細胞培養組合物中所存在之起始細胞量的至少約100%或至少約110%。

在另一較佳實施例中，在病毒添加後48小時之範圍內，步驟b)之細胞培養組合物中所存在之活細胞量相當於在病毒添加時該細胞培養組合物中所存在之細胞量的至少約5%、較佳至少約10%、較佳至少約15%。

(37) 如項目(36)之細胞培養組合物，其中已藉由使用根據如項目(26)至(35)中任一項之測試方法所測試之MOI向步驟a)之細胞培養組合物中添加感染性病毒粒子。

(38) 如項目(36)或(37)之細胞培養組合物，其中病毒添加後4天之後的血球凝集素(HA)/ml比率高於15 $\mu\text{g/ml}$ ，較佳高於20 $\mu\text{g/ml}$ 。

(39) 一種用於繁殖病毒粒子之細胞培養組合物的用途，其中向在病毒添加時含有至少 0.5×10^6 個細胞/毫升之細胞量的細胞培養組合物中添加感染性病毒粒子，其中所用感染細胞所必需之感染性病毒粒子總數/細胞(「感染倍率」，MOI)小於 10^{-5} (極低MOI)。在另一較佳實施例中，MOI等於或小於 10^{-6} ，等於或小於 10^{-7} ，或等於或小於 10^{-8} 。亦參考如上所指出之極低MOI的較佳值。

(40) 一種製造包含免疫原性血球凝集素(HA)之病毒粒子或製造免疫原性HA蛋白之方法，其包含以下步驟：

a) 繁殖包含免疫原性HA之病毒粒子，其中向在病毒添加

時含有至少 0.5×10^6 個細胞/毫升之細胞量的細胞培養組合物中添加感染性病毒粒子，且其中所用感染細胞所必需之感染性病毒粒子總數/細胞(「感染倍率」，MOI)小於 10^{-5} ；及
b) 獲得繁殖病毒粒子，且視情況進一步加工該等繁殖病毒粒子以分離免疫原性血球凝集素(HA)蛋白及/或免疫原性神經胺糖酸苷酶(NA)蛋白。

(41) 如項目(40)之方法，其進一步如項目(1)至(25)中任一項所述來定義。

關於較佳起始細胞量，參考上述說明。在本發明之含義中，術語「起始細胞量」表示在病毒添加時細胞培養物中之細胞量。隨著病毒添加至細胞培養物，細胞之感染階段開始。

【實施方式】

本發明現藉由較佳實施例及實例進行更詳細描述，然而，其僅以說明性目的而呈現且不應理解為以任何方式限制本發明之範疇。

病毒(諸如流感病毒)為每年出現或季節性爆發之流行病或大流行病的病原體。該等疾病爆發造成相當大的發病率及死亡率，尤其在處於危險中之人群中，諸如罹患心臟病或肺病、糖尿病或免疫系統功能失調之人群。為了保護群體免於常見致病威脅且為了防止地方病或大流行病蔓延，使用疫苗。然而，例如在大流行病(諸如流感大流行)情況下，預期全球規模內疫苗製造量與疫苗需求量之間差距顯著。因此，亟需增加可用疫苗劑量之數目，其可例如藉由

在製造細胞株中改良，例如分別增加病毒產量或病毒組分產量來達成。

本發明提供一種繁殖流感病毒之方法，其致使繁殖病毒粒子(亦即繁殖流感病毒)及所獲得之病毒組分產量增加。在本發明之含義中，術語「病毒組分」表示加工病毒粒子。已驚奇地發現，當以特定最小細胞密度(亦即至少 0.5×10^6 個細胞/毫升，較佳至少 3.0×10^6 個細胞/毫升、 5.0×10^6 個細胞/毫升、 7.0×10^6 個細胞/毫升、 9.0×10^6 個細胞/毫升、 11.0×10^6 個細胞/毫升或 13.0×10^6 個細胞/毫升(起始細胞量))起始時，向該最小量細胞中添加小於 10^{-5} 之感染細胞所需之感染性病毒粒子總數/細胞(MOI)，可使病毒粒子或病毒組分產量顯著增加。雖然每既定量細胞使用相當低起始量之添加病毒，但是已意外地發現以上述極低MOI添加感染性病毒粒子至最小起始量細胞中尤其有利且可用於繁殖病毒粒子之方法，因為可獲得產量增加之繁殖病毒粒子及產量增加之病毒組分。其尤其有利於製造流感病毒組分，諸如製造如流感病毒抗原血球凝集素(HA)或神經胺糖酸苷酶(NA)之流感病毒組分。不欲為任何理論所束縛，似乎由於將病毒添加至細胞培養物且以該極低MOI感染細胞，在病毒添加後一定時段(例如多至約三天之時段)內，存活細胞之百分比較高。其似乎導致一種更有效的病毒繁殖方法，尤其在進行細胞感染之關鍵初期，造成更延長且更多產病毒產生，因而繁殖病毒粒子產量增加及病毒組分產量較高。當使用在 1×10^6 個細胞/毫升與 $4-5 \times 10^6$ 個細

胞/毫升之間的細胞密度(起始細胞量，亦即在病毒添加時細胞培養物中之細胞量)時，特別可獲得高增量之病毒血球凝集素(HA)，且其中MOI在小於 10^{-5} 至約 10^{-7} 之範圍內。

在迄今已知的使用等於或大於 10^{-5} 之MOI的方法中，當使用病毒繁殖培養基與用於培養細胞之細胞培養基相比具有較少如蛋白質、生長因子等物質時，獲得最大產量之繁殖病毒粒子。此意謂該病毒繁殖培養基較少增濃。然而，已意外地發現在本發明中，當根據本發明使用極低MOI時，在使用病毒繁殖培養基並不具有比細胞培養基顯著較少量物質時，病毒粒子產量甚至可進一步增加。

由於本發明之方法可在產量增加的情況下繁殖病毒粒子(例如流感病毒粒子)且製造病毒組分(亦即加工病毒粒子)，故其加速疫苗產生過程且減少疫苗投放前置時間。藉由應用本發明之方法，甚至可能增加來源於早已適應高生長之病毒株(例如重配病毒株或適應在特定細胞株中較佳生長之病毒株)的病毒組分產量。

一般而言，藉由使用特定MOI(感染倍率)之病毒株向製造細胞株中添加該病毒株，以便繁殖該病毒株。需要繁殖之病毒株在本文中亦稱為預選病毒株。特定MOI通常在等於或高於 10^{-5} 之範圍內且在本文中稱為「參考」MOI。所用較佳參考MOI為 10^{-3} 。然而，如在本發明之過程中已證明，該「參考」MOI並非所有欲繁殖病毒株之最有效MOI，但具有在低於 10^{-5} 範圍內之極低MOI提供較有效之病毒繁殖，藉此致使病毒粒子及/或病毒組分產量增加。

因此，本發明進一步提供一種測試添加極低感染性病毒粒子總數/細胞之預選病毒株至用於繁殖病毒粒子之細胞培養組合物是否分別致使病毒粒子或病毒組分產量增加的方法。藉由應用該方法可有利地確定各預選病毒株個體分別提供最大產量繁殖病毒粒子及病毒組分之MOI，且尤其在習知並未涵蓋於工業疫苗製造方法中之極低MOI範圍中。此外，其限制條件為觀察到上述最小起始細胞密度，可能偵測到無增量效應。此意謂在小規模或半工業規模下，例如在約3 l或3 l以下、或例如30 ml或30 ml以下之工作體積中獲得之結果可轉換為大/工業規模，諸如轉換為具有100 l以上(例如約1200 l)之工作體積的生物反應器。因此，例如可能同時在小規模下及/或在半工業規模下進行多次測試培養，以便測試使用極低MOI接種是否分別產生較高產量病毒粒子或病毒組分，且若分別產生較高產量病毒粒子或病毒組分，則該極低MOI為對於既定病毒株提供最高可能產量之MOI。此極低MOI可隨後用於在大/工業規模下繁殖預選病毒株。此外，如本文所述以最小細胞密度起始具有例如以下優點：與若起始細胞密度低於如本文所述之最小細胞密度時達到適合且用於接種之細胞密度之時段相比，達到適合且用於接種病毒粒子之特定細胞密度之時段較短。其亦加速疫苗產生過程，藉此減少疫苗投放前置時間。使用以下病毒繁殖培養基尤其有利，其與先前用於培養細胞之培養基相比，重量莫耳滲透濃度為細胞培養基之重量莫耳滲透濃度的至少80%、較佳至少85%、更佳至少

90%且最佳至少95%，且其不具有顯著較低量，較佳不少於50%、更佳不少於60%、甚至更佳不少於65%且最佳不少於75%之蛋白質、生長因子及/或無機鹽總量。其意謂不用重量莫耳滲透濃度顯著小於用於培養細胞之培養基之重量莫耳滲透濃度的病毒繁殖培養基置換欲用於培養細胞之細胞培養基(在病毒添加之前)為有利的。在另一實施例中，蛋白質豐富的培養基用作用於培養細胞之細胞培養基且蛋白質缺乏的培養基用作用於繁殖病毒之培養基。或者或另外較佳言之，用於繁殖病毒之培養基中所含的游離胺基酸總量不高於用於培養細胞之細胞培養基中之胺基酸總量。藉此可能額外增加病毒組分之產量。

不受任何理論所束縛，所用預選病毒株、添加有感染性病毒粒子之細胞的量(細胞/毫升)及所用MOI之平衡似乎使細胞培養組合物中之繁殖病毒粒子及所獲得之病毒組分之產量增加。

總而言之，藉由應用本發明之方法，可實現繁殖病毒粒子及病毒組分之產量增加，藉此加速疫苗產生過程且減少疫苗投放前置時間。

在一特定態樣中，本發明係關於一種繁殖包含免疫原性血球凝集素(HA)之病毒粒子(例如流感病毒)的方法，其中在第一步驟中將細胞培養於細胞培養物中且其中隨後在第二步驟中將感染性流感粒子添加至該細胞培養物，其中用於培養該等細胞之培養基在病毒添加步驟之前或期間經置換為與先前用於培養該等細胞之培養基的重量莫耳滲透濃

度相比具有至少80%之重量莫耳滲透濃度的培養基，且其與先前用於培養該等細胞之培養基相比不具有顯著較低量，較佳不少於50%之蛋白質、生長因子及/或無機鹽總量，其中在病毒添加時該細胞培養物中之起始細胞量為至少 0.5×10^6 個細胞/毫升，其中在病毒添加後12至36小時內，活細胞之密度不低於病毒添加時細胞密度之40%，其中在病毒添加步驟期間所添加之感染性病毒粒子總數/細胞(感染倍率，MOI)小於 10^{-5} 。在另一較佳實施例中，在病毒添加後12至36小時內活細胞之密度不低於病毒添加時細胞密度之60%。在另一較佳實施例中，在病毒添加後12至36小時內活細胞之密度不低於病毒感染時細胞密度之80%。在另一較佳實施例中，在病毒添加後12至36小時內活細胞之密度不低於病毒添加時細胞密度之100%。在另一較佳實施例中，MOI等於或小於 10^{-6} 、等於或小於 10^{-7} ，或等於或小於 10^{-8} 。

在本發明之含義中，術語「感染倍率」表示感染細胞所必需之感染性病毒粒子的數目/細胞。換言之，MOI為感染性病毒粒子與細胞之比率。因此，例如 10^{-5} 之MOI意謂每100000個細胞使用1個病毒粒子。

在本發明之情形中，已意外發現以小於 10^{-5} 之總MOI接種特定起始量之細胞可有效增加繁殖病毒粒子的量，其限制條件為以至少 0.5×10^6 個細胞/毫升之特定最小細胞密度起始，且由此產生欲製造之病毒組分。其可例如加速疫苗製備過程且減少疫苗投放前置時間。若出現病毒感染性疾

病之季節性、尤其流行性 or 大流行性蔓延或爆發，且尤其當出現病毒流感蔓延時，其為有利的。藉由應用本發明之方法，甚至可增加來源於早已適應滿足特定性質(諸如高生長或在無血清培養基中生長)之病毒株的病毒粒子及病毒化合物產量。其使提供疫苗組合物所需的時間進一步減少。此外，甚至可繁殖野生型病毒粒子，以便可獲得足以用於工業應用之病毒粒子及/或病毒組分之產量。

根據本發明，病毒粒子可適當地選自所需病毒粒子。

病毒粒子為僅可在宿主細胞內再生之感染性或非感染性病毒粒子。術語「感染性」表示病毒(或病毒粒子)在引入宿主細胞中時能夠產生繁殖性感染(productive infection)。非感染性病毒粒子或病毒分別不能產生該感染；然而此粒子將能表現其編碼之基因。病毒粒子較佳為感染性病毒粒子。

一般而言，病毒粒子含有可由衣殼包圍之核酸(去氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA))，其可由相同蛋白質次單位衣殼體形成。病毒粒子亦可具有可能來源於已感染病毒粒子之宿主細胞之膜的包膜。核酸可為線狀、環狀或分段之單股核酸、雙股核酸或其混合物，且該等股可為正義(positive-sense)或負義(negative-sense)。在一較佳實施例中，病毒粒子含有RNA。含有RNA且已發現在極低起始MOI下有效繁殖之病毒粒子為例如流感病毒。

流感病毒由含有分段單股RNA基因組之內部核糖核蛋白核心及由基質蛋白排列之外部脂蛋白包膜組成。流感病毒

成員為例如 A 型、B 型及 C 型流感病毒。A 型流感病毒及 B 型流感病毒各含有八個單股負義 RNA 區段。

病毒粒子較佳選自由以下病毒組成之群：正黏液病毒科 (Orthomyxoviridae)，諸如 A 型、B 型或 C 型流感病毒；副黏液病毒科 (Paramyxoviridae)，諸如麻疹病毒 (measles virus)、腮腺炎病毒 (mumps virus)、副流感病毒 (parainfluenza virus) 及呼吸道融合性病毒 (respiratory syncytial virus)；披膜病毒科 (Togaviridae)，諸如辛德畢斯病毒 (Sindbis virus) 及風疹病毒 (rubella virus)；疱疹病毒科 (Herpesviridae)，諸如單純性疱疹病毒 (Herpes Simplex virus)、艾伯斯坦-巴爾病毒 (Epstein-Barr virus) 及水痘帶狀疱疹病毒 (Varicella Zoster virus)；桿狀病毒科 (Rhabdoviridae)，諸如狂犬病毒 (rabies virus)；反轉錄病毒科 (Retroviridae)，諸如人類免疫缺乏病毒 (human immunodeficiency virus, HIV)；呼腸孤病毒科 (Reoviridae)，諸如輪狀病毒 (rotavirus) 及科洛拉多蜱傳熱病毒 (Colorado tick fever virus)；黃病毒科 (Flaviviridae)，諸如黃熱病毒 (yellow fever virus)；腺病毒科 (Adenoviridae)，諸如腺病毒 (adenovirus)；小核糖核酸病毒科 (Picornaviridae)，諸如脊髓灰質炎病毒 (poliovirus)；沙粒病毒科 (Arenaviridae)，諸如淋巴細胞性脈絡叢腦膜炎病毒 (lymphocytic choriomeningitis virus)；及痘病毒科 (Poxviridae)，諸如天花病毒 (variola virus)；感染性病毒粒子較佳係選自由諸如 A 型、B 型或 C 型流感病毒之正黏液病毒科組成之群。在另一較佳實施例中，病毒粒子為選自由

A型流感、B型流感或C型流感組成之群之流感病毒粒子。進一步較佳言之，病毒粒子亦可為含有不同親代基因區段組合之重配病毒粒子，諸如重配流感病毒粒子。

重配病毒包括彼等包括來源於一種以上親代病毒株或來源之遺傳及/或多肽組分之病毒。舉例而言，重配病毒在經批准之主要病毒株(亦稱為主要供體病毒(MDV))之情形下經製造以併入所選HA及NA抗原。舉例而言，7:1重配病毒包括7個來源於第一親代病毒之病毒基因組區段(或基因區段)及1個來源於第二親代病毒之例如編碼HA或NA之病毒基因組區段。6:2重配病毒包括6個來自第一親代病毒之基因組區段(最通常為6個內部基因)及2個來自第二親代病毒之基因組區段(例如HA及NA)。6:1:1重配病毒可包括6個來自第一親代病毒之基因組區段(最通常為6個內部基因)、1個編碼HA之來自第二親代病毒之基因組區段及1個編碼NA之來自第三親代病毒之基因組區段。該6個內部基因亦可為一種以上親代病毒之內部基因。

重配病毒可藉由熟習此項技術者已知的任何方法來產生，諸如藉由經典重配技術，諸如藉由協同感染方法或藉由質粒拯救技術。本發明之病毒粒子亦可為不活化或減毒病毒。感染性病毒粒子亦可稱為病毒粒(virion)。

在本發明之方法中，使用分別含有細胞及培養基之細胞培養組合物或細胞培養物。熟習此項技術者已知細胞培養組合物之組分可視所用細胞及預期用途而變化。在一較佳實施例中，細胞培養組合物係用於繁殖如本文所述之病毒

粒子及/或用於製造病毒組分。此外，可進一步加工繁殖病毒粒子，以用於製備不活化病毒粒子，及/或減毒病毒粒子，及/或分裂病毒抗原，及/或次單位病毒抗原，及/或病毒體。對於培養目的而言，例如細胞培養物可包含細胞及用於細胞生長之適合培養基。

一般而言，熟習此項技術者已知的任何合適細胞株之細胞可用於本發明之方法中。該等細胞可為真核細胞，諸如酵母細胞、昆蟲細胞、兩棲動物細胞、鳥類細胞或哺乳動物細胞(包括人類細胞)。在一較佳實施例中，細胞培養組合物中所含之細胞為動物細胞，該等細胞較佳為哺乳動物細胞。該等細胞較佳以黏附細胞之方式培養。

適合之細胞包括(但不限於)Vero(非洲綠猴腎)細胞、PerC6細胞(人類胚胎視網膜細胞)、BHK(幼倉鼠腎)細胞、原代雞腎(PCK)細胞、馬丁達比犬腎(MDCK)細胞、馬丁達比牛腎(MDBK)細胞、293細胞(例如293T細胞或HEK-293(人類胚腎細胞)細胞)、WI-38細胞(來源於獲自約三個月大女性胎兒之細胞的細胞株；正常人類胎兒肺纖維母細胞)、MRC-5細胞(來源於14週大男性胎兒之正常肺組織之細胞株，Nature 227: 168-170, 1970)及COS細胞(例如COS1、COS7細胞)。適合之細胞亦涵蓋細胞之組合或混合物，包括例如不同細胞類型或細胞株之混合培養物(例如Vero及CEK細胞)。該等細胞較佳為MDCK細胞。在另一較佳實施例中，本發明之細胞可為具有特定所需性質之細胞，例如可適應在特定所用培養基中(例如在無血清培養

基中)生長之細胞，或可展現經改質之倍增時間、經改質之致瘤概況及/或經改質之病毒製造行為之細胞。適應無血清生長之細胞株的一個實例為MDCK-SF細胞株。在一較佳實施例中，用於本發明之方法的細胞為允許及/或支持接種該等細胞之感染性病毒粒子複製及/或繁殖的細胞。細胞支持病毒複製及/或繁殖之能力的一個指標為分別由經接種細胞培養物及經感染細胞培養物獲得之病毒或病毒粒子的產量。一般而言，病毒產量，諸如病毒粒子之量或病毒組分之量，可分別藉由熟習此項技術者已知之任何合適方法來測定。病毒產量較佳藉由根據量測感染性病毒粒之半數組織培養感染劑量(TCID₅₀)檢定，分別測定存在於樣品中之病毒或病毒粒子濃度來定量。TCID₅₀，通常以log₁₀ TCID₅₀/ml形式表示，可藉由熟習此項技術者已知之任何方法來測定。諸如TCID₅₀檢定之終點稀釋技術為量測病毒群體之統計方法。分析該資料之若干統計方法可用，例如Spearman-Kärber、Reed & Muench或概率分析。舉例而言，向細胞(諸如MDCK細胞)中添加病毒之連續稀釋液。若干天後，記錄細胞病變效應(CPE)且可計算為組織培養半數感染劑量(TCID₅₀)。此外，亦可以pfu(空斑形成單位)/ml形式表示病毒粒子。

在一較佳實施例中，該等細胞支持病毒複製及/或繁殖，包括(但不限於)選自由以下組成之群之病毒：正黏液病毒科，諸如A型、B型或C型流感病毒；副黏液病毒科，諸如麻疹病毒、腮腺炎病毒、副流感病毒及呼吸道融合性

病毒；披膜病毒科，諸如辛德畢斯病毒及風疹病毒；疱疹病毒科，諸如單純性疱疹病毒、艾伯斯坦-巴爾病毒及水痘帶狀疱疹病毒；桿狀病毒科，諸如狂犬病毒；反轉錄病毒科，諸如人類免疫缺乏病毒(HIV)；呼腸孤病毒科，諸如輪狀病毒及科洛拉多蟬傳熱病毒；黃病毒科，諸如黃熱病毒；腺病毒科，諸如腺病毒；小核糖核酸病毒科，諸如脊髓灰質炎病毒；沙粒病毒科，諸如淋巴細胞性脈絡叢腦膜炎病毒；及痘病毒科，諸如天花病毒；該等細胞較佳支持選自由諸如A型、B型及/或C型流感病毒之正黏液病毒科組成之群的感染性病毒粒子之複製及/或繁殖。此外，用於本發明之方法的細胞亦支持重配病毒之複製及/或繁殖。用於本發明之方法的細胞可進一步為展現優越生物學性質(例如關於病毒製造、致瘤性概況及/或倍增時間)之細胞。可選殖展現該等優越性質之個別細胞。可在個別細胞選殖之前、同時或隨後使該等細胞適應特定培養條件，例如關於溫度、CO₂濃度、pO₂值、pH範圍及所用培養基之條件。

在本發明方法之一較佳實施例中，分別接種或感染之細胞培養物中所存在之起始細胞量為至少約 0.5×10^6 個細胞/毫升、較佳至少約 3.0×10^6 個細胞/毫升、進一步較佳至少約 5.0×10^6 個細胞/毫升、甚至進一步較佳至少約 7.0×10^6 個細胞/毫升、甚至更進一步較佳約 9.0×10^6 個細胞/毫升且最佳至少約 11.0×10^6 個細胞/毫升或至少約 13.0×10^6 個細胞/毫升。已出人意料地發現如本文所述藉由以極低MOI接種具

有該最小細胞密度之細胞培養組合物，可顯著增加繁殖病毒粒子之產量且由此可顯著增加所製造之病毒組分之量。若以極低MOI接種該細胞培養組合物，則繁殖病毒粒子及所獲得之病毒組分的產量可增加甚至更多。

用於本發明之方法中的細胞可懸浮培養或以黏附細胞之方式於其所黏附之表面上培養。該等細胞較佳以黏附細胞之方式培養。在另一較佳實施例中，該等細胞為固著依賴性細胞。細胞可生長之黏附表面為此項技術中所熟知。黏附表面包括(但不限於)經表面改質之聚苯乙烯塑料、蛋白質塗佈表面(例如纖維結合蛋白及/或膠原蛋白塗佈之玻璃/塑料)以及可例如獲自 Amersham Biosciences 之多種市售微載體(例如 Cytodex 3 微載體)。微載體珠粒為向每體積細胞培養物之黏附細胞生長提供較大表面積的小球體。黏附表面之選擇可受培養細胞(諸如 MDCK 細胞)所用方法的影響，且可由熟習此項技術者確定。可分別用於本發明之方法的適合培養器皿或容器可為熟習此項技術者已知的任何器皿或容器，諸如轉瓶(spinner bottle)、滾瓶(roller bottle)、發酵罐或生物反應器、或組織培養瓶。可例如在具有較小體積之器皿(諸如具有例如約 30 ml 之體積的組織培養瓶)中之小規模下進行本發明之方法，例如約 50 l 至例如約 100 l 之半工業規模下進行本發明之方法，及具有較大工作體積之器皿(諸如具有例如 1000 l 或 1000 l 以上之工作體積之發酵罐或生物反應器)中之工業規模下進行本發明之方法。

在一較佳實施例中，用於本發明之方法的細胞可在分批培養系統(諸如分批饋料培養系統)中培養。在另一較佳實施例中，該等細胞亦可在灌注培養系統中培養。

在本發明之一實施例中，用於本發明之方法的細胞係在特定條件下培養。熟習此項技術者已知何等各別條件適於何種細胞類型。各別適應條件例如係指CO₂濃度、pO₂值、pH值、溫度及所用培養基。細胞培養階段包括接種之前的細胞培養及接種之後的細胞培養(病毒繁殖)。

各別條件可保持相同；然而，當細胞培養條件在細胞培養階段期間，亦即分別在病毒添加之前(或期間)之細胞培養及接種/病毒繁殖之後之細胞培養期間改變或變化時亦為可能的且最終更有效。可在接種/病毒繁殖階段之前整個培養期間的任何時間改變該等細胞培養條件，且該等培養條件亦可在接種(亦即病毒添加)/病毒繁殖階段之前的細胞培養過程中不僅改變一次而且改變若干次。另一有效操作為使條件改變(尤其培養基改變)與病毒添加同時進行(亦即在病毒添加期間置換培養基)。可改變之細胞培養條件為任何細胞培養條件，例如關於溫度、CO₂濃度、pO₂值、pH範圍及所用培養基之條件。

在本發明方法之另一較佳實施例中，病毒繁殖培養基與細胞培養基(亦即先前用於細胞培養之培養基)之重量莫耳滲透濃度相比，具有至少80%、較佳至少85%、更佳至少90%且最佳至少95%之重量莫耳滲透濃度。此外，病毒繁殖培養基與先前用於培養細胞之培養基相比，不具有顯著

較低量，較佳不少於50%、更佳不少於60%、甚至更佳不少於65%且最佳不少於75%之蛋白質、生長因子及/或無機鹽之總量。其意謂不用重量莫耳滲透濃度顯著小於細胞培養所用培養基之重量莫耳滲透濃度且具有顯著較低量之蛋白質、生長因子及/或無機鹽之總量的病毒繁殖培養基置換欲用於培養細胞之細胞培養基(在感染性病毒粒子添加至該等細胞之前或期間)為有利的。在另一實施例中，蛋白質豐富的培養基用作用於培養細胞之細胞培養基且蛋白質缺乏的培養基用作用於繁殖病毒之培養基。或者或另外較佳言之，用於繁殖病毒之培養基中所含的游離胺基酸總量不高於用於培養細胞之細胞培養基中之胺基酸總量。

已意外發現(比較圖式)使用如本文所述(與細胞培養基中所存在之物質的量相比)不具有顯著減小量之物質及/或不具有重量莫耳滲透濃度小於80%、較佳小於85%、更佳小於90%且最佳小於95%之細胞培養基之重量莫耳滲透濃度的病毒繁殖培養基，與使用如本文所述重量莫耳滲透濃度小於80%、小於85%、小於90%或小於95%之細胞培養基之重量莫耳滲透濃度及/或具有顯著減小量之物質的繁殖培養基相比，提供產量增加之病毒粒子。細胞培養基之重量莫耳滲透濃度的測定描述於下文。

在本發明之另一較佳實施例中，用於繁殖病毒之培養基與先前用於培養細胞之細胞培養基相比，不具有顯著較低量(較佳不少於50%、更佳不少於55%、甚至更佳不少於60%且甚至最佳不少於65%，且在另一較佳實施例中較佳

不少於70%或75%)之蛋白質、生長因子及/或無機鹽之總量。

亦參考如上所述之實施例。

在另一較佳實施例中，用於培養細胞之培養基在用感染性病毒粒子將病毒添加至該等細胞之前或期間，經置換為用於病毒繁殖之培養基，其中該欲用於病毒繁殖之培養基具有與用於細胞培養之細胞培養基相同的類型，但不含BSA。

在本發明方法之另一較佳實施例中，用於繁殖病毒之培養基與用於培養細胞之細胞培養基相比，不具有較低量之選自由生長因子及/或無機鹽組成之群的三種、兩種或一種個別物質或物質群。

其意謂根據本發明，較佳藉由使用如上所述不具有顯著減少量之個別物質的病毒繁殖培養基進行繁殖步驟。換言之，與細胞培養基相比，儘可能一樣多的個別物質或物質群分別相同或至少並非顯著較低量包含於病毒繁殖培養基中。

置換培養基，例如由病毒繁殖培養基置換用於細胞培養之細胞培養基發生在某一時段內，其一般亦視細胞培養規模而定。若在小規模或半工業規模(例如約3 l或3 l以下，或例如30 ml或30 ml以下之工作體積)下進行細胞培養，則培養基置換相比在大/工業規模(諸如具有100 l以上工作體積之生物反應器)下之細胞培養物所需之置換時間快得多。

若已在工業規模或大規模下進行細胞培養，則術語「接種之前」或「病毒添加步驟之前」分別表示培養基置換發生在12小時或12小時以下，較佳10小時、9小時、8小時、7小時或6小時或6小時以下，更佳5小時或5小時以下，甚至更佳4小時或4小時以下之時段內。若已在小規模或半工業規模下進行細胞培養，則培養基置換發生在細胞開始接種之前5小時或5小時以下，較佳4小時、3小時、或2小時或2小時以下，更佳1小時或1小時以下，更佳30分鐘或30分鐘以下且甚至更佳15分鐘或15分鐘以下之時段內。或者可在病毒添加期間置換培養基，詳言之使兩種操作同時進行。

在本發明之方法中，可使用熟習此項技術者已知的任何合適細胞培養基。一般而言，合適的細胞培養基包含多種組分(亦分別表示為添加劑及物質)，諸如無機鹽、胺基酸、核酸、維生素、脂質、糖或碳源、蛋白質、生長因子、界面活性劑及pH值指示劑。

此外，可調配所用培養基，以使得所培養之細胞保留所需特徵，諸如一或多個以下特徵，其包括(但不限於)非致瘤、以黏附細胞之方式生長、在培養時支持感染性病毒粒子複製。

在一實施例中，熟習此項技術者已知的任何合適無機鹽可存在於細胞培養基中；無機鹽較佳選自由以下組成之群： CaCl_2 、 CuSO_4 、 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 、 FeSO_4 、 KCl 、 MgCl_2 、 MgSO_4 、 NaCl 、 NaHCO_3 、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、 Na_2SeO_3 、

乙酸鈉及 ZnSO_4 。

在另一較佳實施例中，熟習此項技術者已知的任何合適胺基酸可存在於細胞培養基中。胺基酸較佳選自由以下組成之群：L-丙胺酸、L-精胺酸-HCl、L-天冬醯胺(游離鹼)、L-天冬醯胺 $\times\text{H}_2\text{O}$ 、L-天冬胺酸、L-半胱胺酸-HCl(無水)、L-半胱胺酸-HCl- H_2O 、L-胱胺酸、L-胱胺酸 $\times 2\text{HCl}$ 、L-麩胺酸、L-麩胺醯胺、甘胺酸、L-組胺酸-HCl $\times\text{H}_2\text{O}$ 、L-異白胺酸、L-離胺酸、L-離胺酸-HCl、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、羥基-L-脯胺酸(非動物)、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-酪胺酸 $\times 2\text{Na}\times 2\text{H}_2\text{O}$ 及L-纈胺酸。

在另一較佳實施例中，熟習此項技術者已知的任何合適核酸可存在於細胞培養基中。核酸較佳選自由以下組成之群：硫酸腺嘌呤、腺苷-5-磷酸鹽、腺苷-5-三磷酸鹽、麩胱甘肽(還原)、鳥嘌呤斐波那契(guanine Fibonacci, FB)、鳥嘌呤HCl、D-核糖、2-去氧-D-核糖、胸腺嘧啶、尿嘧啶、黃嘌呤及次黃嘌呤。

在另一較佳實施例中，熟習此項技術者已知的任何合適維生素可存在於細胞培養基中。維生素較佳選自由以下組成之群：對胺基苯甲酸、抗壞血酸、D-泛酸鈣、D-生物素、氯化膽鹼、鱈魚肝油、麥角鈣化醇、葉酸、I-肌醇、甲萘醌、菸鹼醯胺、菸鹼酸、腐胺 2HCl 、吡哆醛-HCl、吡哆醇-HCl、核黃素、硫胺素-HCl、二硫辛酸、胸苷、生育酚磷酸二鈉、DL-生育酚乙酸酯、維生素A乙酸酯及維生

素 B₁₂。

在另一較佳實施例中，熟習此項技術者已知的任何合適脂質可存在於細胞培養基中。脂質較佳選自由以下組成之群：膽固醇、次亞麻油酸、亞麻油酸、棕櫚油酸、花生四烯酸、硬脂酸、肉豆蔻酸、棕櫚酸及油酸。

在另一較佳實施例中，熟習此項技術者已知的任何合適糖或碳源可存在於細胞培養基中。糖或碳源較佳選自由D-葡萄糖、D-果糖及丙酮酸鈉組成之群。

在另一較佳實施例中，熟習此項技術者已知的任何合適蛋白質可存在於細胞培養基中。蛋白質較佳選自由BSA(牛血清白蛋白；第V部分)(諸如Albumax I(牛類富含脂質之BSA))、乳白蛋白水解物及Primatone RL組成之群。

在另一較佳實施例中，熟習此項技術者已知的任何生長因子可存在於細胞培養基中。生長因子較佳選自由表皮生長因子(鼠類、重組鼠類或重組人類表皮生長因子)、胰島素(諸如人類胰島素(結晶生物合成人類胰島素))及轉鐵蛋白(完全牛類轉鐵蛋白)組成之群。

在另一較佳實施例中，可使用熟習此項技術者已知的任何合適界面活性劑。界面活性劑較佳選自由Pluronic F68及Tween 80組成之群。此外亦可使用乙醇。

在另一較佳實施例中，可使用指示劑，諸如pH值指示劑。可使用熟習此項技術者已知的任何合適指示劑。所用指示劑較佳為酚紅。

在一實施例中，細胞培養基進一步較佳補充有抗生素。

一般而言，熟習此項技術者已知的任何合適抗生素可以適合濃度單獨或與其他抗生素組合使用。在一較佳實施例中，未使用抗生素。

在另一實施例中，細胞培養基未補充有抗生素。

在另一實施例中，病毒繁殖培養基未補充有抗生素。

在另一實施例中，細胞培養基及病毒繁殖培養基均未補充有抗生素。

詳言之，細胞培養基及/或病毒繁殖培養基未補充有大環內酯多烯抗生素或其衍生物或類似物。

使細胞培養基及/或病毒繁殖培養基省去補充抗生素，尤其大環內酯多烯抗生素或其衍生物或類似物，提供一種經改良之病毒組分製造方法，其例如關於該方法之穩固性或操作經改良。藉由應用本發明之方法，儘管如上所述省去抗生素，甚至在如本文所述使用極低MOI時仍可實現病毒產量增加。

用於病毒繁殖之培養基(亦即置換培養基)較佳為無BSA或基本上無BSA之培養基。基本上無BSA意謂培養基中僅含有痕量BSA，其對於細胞培養及/或後續進行之加工及/或繁殖病毒粒子及/或病毒組分之預期用途不具有任何影響，較佳不具有任何負面影響。

此外，可使用上述組分及/或添加劑之任何合適組合。

可用於本發明方法之適合培養基的實例為例如Episerf，其為市售培養基(例如Invitrogen或Lonza)。含有BSA之Episerf及不含BSA之Episerf具有約360 mOsmol/kg之重量

莫耳滲透濃度。

在本發明之方法中，向在病毒添加時含有至少 0.5×10^6 個細胞/毫升之細胞量或如本文所定義之較佳量的細胞培養組合物中添加感染性病毒粒子。培養細胞直至已達到相應理想細胞密度所需的時段主要取決於細胞培養規模。因此，若以大/工業規模(參見上文)培養細胞，則用於本發明之方法的細胞增殖至多40天，較佳至多30天，直至達到至少 0.5×10^6 個細胞/毫升之細胞密度。因此，若以半工業/小規模培養細胞，則用於本發明之方法的細胞增殖至多20天，較佳至多10天或10天以下，直至達到所需細胞密度。然而，達到該細胞密度所需之相應必需時段為熟習此項技術者已知，因為例如培養物之細胞密度可容易由常規方法(諸如細胞計數)測定。在一較佳實施例中，所繁殖之細胞為MDCK細胞。在另一較佳實施例中，細胞以黏附細胞之方式培養於組織培養瓶中或黏附於微載體，諸如Cytodex 3微載體(例如可自Amersham Biosciences獲得)。每毫升細胞培養物之細胞密度可藉由熟習此項技術者已知的任何方法來測定。舉例而言，若在諸如微載體珠粒上之黏附細胞培養物中培養細胞，則可使用NucleoCounter(Chemometec)。使用此裝置可在未經酶促處理之樣品中測定總細胞濃度。各別細胞培養器皿之細胞密度可一天測定一次，視情況一天測定多次。

必要時，在細胞培養之過程中，可如本文所述更換細胞培養基。

在本發明方法之另一較佳實施例中，向至少約 0.5×10^6 之起始量細胞中添加小於 10^{-5} (以每個細胞之比率MOI表示；亦參見本說明書別處)之經使用且添加至該等起始量細胞中之感染性病毒粒子總數。術語「所用感染性病毒粒子之總數」在本發明之含義中表示外部給予細胞培養組合物之感染性病毒粒子的總數小於 10^{-5} 。術語「接種」或「病毒添加」在本發明之含義中分別表示將感染性病毒粒子外部添加至細胞培養組合物。在本發明之含義中，可將感染性病毒粒子的總數一步添加至細胞培養組合物。然而，本發明之MOI亦可分兩步或多步添加至細胞培養物，例如用感染性病毒粒子總數之一部分進行第一個病毒添加步驟，隨後用感染性病毒粒子之另一部分進行第二個或多個病毒添加步驟。各別接種步驟之間的時滯可變化。在一較佳實施例中，病毒添加作為整體一步進行及/或在2小時或2小時以下之時段內，較佳在1小時或1小時以下之時段內，甚至更佳在30分鐘或30分鐘以下之時段內且最佳在15分鐘或10分鐘或10分鐘以下之時段內完成。

一般而言，將病毒添加至細胞培養物中所存在之細胞可藉由熟習此項技術者已知的任何合適方法來進行。舉例而言，可藉由將病毒接種體簡單地添加至細胞培養物來接種細胞。在本發明之含義中，可在整個培養階段(接種及病毒繁殖之前的細胞培養)期間使用含有相同組分之細胞培養基，但亦可置換該培養基且使用與先前所用之培養基相比含有不同組分/添加劑/物質之培養基。關於此方面，參

考上文描述。

用於培養細胞之細胞培養基較佳經置換為病毒繁殖培養基，其重量莫耳滲透濃度為用於培養細胞之培養基之重量莫耳滲透濃度的至少95%(參見上文)：如例如由圖1及圖2可推斷出，若用於培養細胞之細胞培養基經置換為具有至少95%之用於培養細胞之細胞培養基之重量莫耳滲透濃度的病毒繁殖培養基，則該等細胞之蛋白質產量及生存率可增加。若細胞培養基經置換為與該細胞培養基相比不具有顯著較低總量之蛋白質、生長因子及/或無機鹽之病毒繁殖培養基，或若該病毒繁殖培養基同時具有兩種性質，則可發現類似有利作用。

在本發明之一較佳實施例中，接種或病毒添加分別進行如下：在細胞培養結束時、在添加感染性病毒粒子之前或期間，藉助於用熟習此項技術者已知的適合洗滌液進行洗滌步驟而將該細胞培養基置換為病毒培養基。將較佳在添加前1小時以內製備之病毒接種體添加至該細胞培養物。在已添加病毒接種體，視情況同時在此步驟中更換培養基之後，開始用病毒感染細胞且繁殖病毒。在本發明之含義中，術語「病毒添加後」或「接種後」表示以完成病毒接種體添加至細胞培養物起始之時段。此外，在本發明之含義中，術語「病毒添加步驟期間」表示進行接種期間之時段，或至少在時間上存在重疊。病毒添加步驟起始於添加感染性病毒粒子至細胞培養物且結束於完成整個病毒接種體添加時。病毒添加時之細胞密度可藉由熟習此項技術者

已知的任何合適方法來測定。

如上所述，可在與培養基之最終體積相比減小之培養基體積中用病毒(例如用感染性粒子，諸如流感粒子)接種細胞。舉例而言，減小之體積可相當於約70%、較佳約50%、更佳約40%且最佳約30%之該培養基的最終體積。在接種階段結束時，用病毒培養基將減少之細胞培養基補充至100%的最終濃度。如上所述，此補充所用之病毒培養基可為在接種階段期間所用之培養基，或其可為與在接種階段期間所用之培養基不同的培養基。其較佳為接種所用之培養基。

在已完成細胞接種(或分別用病毒懸浮液培養細胞)之後，其為剛完成病毒接種體添加至細胞培養物之情況(參見上文)，培養細胞另一特定時段(病毒繁殖階段)，直至可觀察到所需CPE(參見下文)。此外，亦可藉由熟習此項技術者已知的任何指示劑指示病毒製造步驟之結束，諸如藉由空微載體及/或藉由進入生物反應器之 pO_2 增加或 O_2 流減小。一般而言，其為約5小時至8天、較佳約10小時至約6天、約10小時至約5天、更佳約10小時至約4天且最佳約12小時至約3天之另一培養階段後的情況。CPE為一種致病效應，其轉而為對細胞生長或維持之不利效應，尤其與微生物及/或病毒感染有關之效應。致病效應包括(但不限於)致細胞病變效應、細胞破裂、抑制生長、抑制蛋白質合成或細胞凋亡。CPE為可觀察到的細胞結構之改變，其可隨細胞類型及死亡原因而變化，且可根據此項技術中確立之

知識來判定。舉例而言，一些最常見的病毒感染效應為形態變化，諸如細胞變圓且自基底脫離、細胞溶解、合胞體形成及包涵體形成。CPE可根據熟習此項技術者已知的任何合適方法來判定，例如藉由顯微鏡觀察及估計細胞覆蓋反應器皿及微載體之百分比。

在一較佳實施例中，本發明之方法進一步包含一或多個進一步加工繁殖病毒粒子之步驟，較佳用於製備經分離或經純化之繁殖病毒粒子(例如流感病毒粒子)。該等加工病毒粒子較佳包含不活化病毒粒子、及/或減毒病毒粒子、及/或分裂病毒抗原、及/或次單位病毒抗原、及/或病毒體。該加工病毒粒子進一步較佳包含一或多個流感病毒抗原，諸如HA及/或NA。

自細胞培養基分離繁殖病毒粒子可藉由熟習此項技術者已知的任何合適方法來進行。舉例而言，病毒粒子可藉由例如用分離器或過濾器使細胞或細胞殘餘物與培養基分離來收集。已知方法包括(但不限於)過濾、超濾、吸附於硫酸鋇上且溶離，及離心。舉例而言，來自經接種及感染之培養物的粗培養基可首先藉由在例如200至2000 g下(連續)離心約5分鐘以移除細胞碎片及其他顆粒物質來淨化。或者，經由例如0.8 μm 乙酸纖維素過濾器過濾培養基，以移除完整細胞及其他顆粒物質。隨後視情況使經淨化之培養基上清液在例如15,000 g下離心約3-5小時，以使病毒(諸如流感病毒)結成離心塊或藉由使用例如300 KD MWCO濾膜超濾濃縮。之後，可使病毒粒子離心塊再懸浮於適當緩

衝液中，諸如 STE 緩衝液 (0.01 M Tris-HCl ; 0.15 M NaCl ; 0.0001 M EDTA) 或在 pH 7.4 下之 PBS (磷酸鹽緩衝鹽水)，隨後可例如藉由蔗糖 (60%-12%) 或酒石酸鉀 (50%-10%) 之密度梯度超離心濃縮及 / 或進一步純化經分離之病毒粒子。在一定速度下離心梯度溶液且持續一段時間，以足以使病毒粒子濃縮為可見帶用於回收。可對繁殖病毒粒子進一步進行離子交換層析或尺寸排阻層析。此外，可酶促處理繁殖病毒粒子及 / 或所含之核酸。

此外，可根據熟習此項技術者已知的任何合適方法不活化、殺死或減毒繁殖病毒粒子。減毒可例如以化學方式或藉由標準連續傳代來實現，其中使用在敏感的細胞培養物中傳代足夠次數，直至使該病毒粒子在不損失免疫原性的情況下無致病性。此外，可例如藉由清潔劑或甲醛處理來不活化病毒粒子。

在本發明之另一較佳實施例中，可進一步加工所獲得之繁殖病毒粒子，以便獲得例如病毒抗原，諸如 HA 及 / 或 NA。在一較佳實施例中，獲得 HA。熟習此項技術者已知可如何獲得病毒抗原。所獲得之加工病毒粒子可用於製造流感疫苗。

其他加工步驟可視情況在上述收集及 / 或分離步驟之後進行，且可包括提取可與細胞或細胞片段締合之病毒組分、分隔病毒組分、分離病毒組分且將其純化，該等加工步驟描述於例如 Paul A. Belter (作者), E. L. Cussler (作者), WeiShou Hu (作者) 之 *Bioseparations: Downstream*

Processing for Biotechnology的一般教程中。

如上所述，本發明之病毒粒子(諸如流感病毒粒子)包含例如病毒體。病毒體為單層磷脂雙層小泡，其具有例如在約70 nm至約150 nm範圍內之合適平均直徑。病毒體本質上表示重構空病毒包膜，無包括源病毒之遺傳物質之核衣殼。病毒體不能複製，但為含有功能性病毒包膜糖蛋白(諸如流感病毒HA及NA)插入磷脂雙層膜中之純融合活性小泡。

此外，加工病毒粒子包含一或多個流感抗原，諸如HA及/或NA。此流感病毒抗原可來源於引起流感季節性、大流行性及/或流行性爆發之病毒株。

HA可例如發現於流感病毒表面上。其為負責使病毒結合至所感染之細胞的抗原性糖蛋白。迄今已知至少16種不同流感HA抗原。此等亞型命名為H1至H16。NA為裂解神經胺糖酸之糖苷鍵的酶。迄今已知至少9種流感神經胺糖酸苷酶之亞型。此等亞型可例如發現於熟習此項技術者已知的資料庫中，諸如PubMed資料庫(例如<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>及http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/145284465?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence_ResultsPanel.Sequence_RVDocSum)。流感病毒蛋白亦可能包含任何單獨或彼此組合之此等HA及/或NA編碼序列。流感病毒蛋白亦可能僅含有此等序列之一部分。流感病毒蛋白較佳含有編碼H1、H2、H3、

H5、H6、H7、N1、N2、N3或N7之完整序列或單獨或組合之該等序列的一部分，較佳含有編碼H5之序列。在另一較佳實施例中，聚核苷酸構築體包含編碼H1N1、H2N2、H3N2、H6N1、H7N3或H7N7之序列或該等序列之一部分，較佳包含編碼H5N1之序列或該等序列之一部分。

此外，上述本發明之方法可用於製造病毒疫苗，較佳製造流感病毒疫苗。為此，可進行將該等病毒粒子或該等病毒組分或病毒組分之一部分調配成疫苗組合物之步驟。

可藉由熟習此項技術者已知的適合方法調配病毒粒子或病毒組分或病毒組分之一部分，以提供用於投與個體之病毒疫苗。調配適用於病毒疫苗之病毒粒子及/或病毒組分或其部分可包含其他步驟，包括(但不限於)緩衝液更換及消毒步驟。一般而言，病毒疫苗可與適當載劑或賦形劑一起分別預防性或治療性投與。該載劑較佳為醫藥學上可接受之載劑，諸如無菌水、緩衝鹽水溶液、右旋糖溶液、甘油溶液或其組合。此外，一般選擇使過敏反應或其他不當效應減到最少且適於具體投藥途徑(例如皮下、肌內、鼻內等)之載劑。

在另一較佳實施例中，本發明之疫苗組合物可含有其他組分及/或添加劑，諸如佐劑。佐劑為增加免疫反應之物質，例如多種金屬之氫氧化物、細菌細胞壁成分、油或皂角苷。

此外，本發明亦關於一種測試添加感染細胞所必需之極低感染性病毒粒子總數/細胞(MOI)之預選病毒株至用於繁

殖病毒粒子之細胞培養組合物是否致使病毒粒子及/或加工病毒粒子產量增加的方法，其包含以下步驟：

- a) 使細胞在細胞培養組合物中生長，直至達到至少 0.5×10^6 個細胞/毫升之細胞密度，
- b) 將使用極低MOI之總數的預選病毒株感染性病毒粒子添加至該細胞培養組合物，其中該極低MOI為小於 10^{-5} 之MOI，或其中該MOI為如本文所定義之較佳MOI，
- c) 將步驟b)之添加該等感染性病毒粒子至該等細胞後所獲得之病毒粒子及/或加工病毒粒子的產量與在使用在等於或高於 10^{-5} 範圍內之參考MOI將相同類型感染性病毒粒子添加至相同類型細胞時所獲得的病毒粒子及/或加工病毒粒子之量進行比較。

在一較佳實施例中，在以該參考MOI接種細胞後獲得病毒粒子及/或病毒組分係在與以極低MOI接種細胞後獲得病毒粒子及/或病毒組分的相同條件下獲得。在本發明之含義中，術語「相同條件」表示使用相同細胞培養條件，例如關於溫度、CO₂濃度、pO₂值、pH範圍及培養基。如本文所述關於繁殖病毒粒子之方法的所有較佳實施例及參數亦適於本發明之測試方法。

已驚奇地發現，平衡(i)所用預選病毒株、(ii)添加感染性病毒粒子時之細胞密度(細胞/毫升)及(iii)用於接種細胞之MOI，使繁殖病毒粒子及/或病毒組分之產量增加，限制條件為在接種時細胞具有至少 0.5×10^6 個細胞/毫升之細胞密度，且限制條件為該MOI為小於 10^{-5} 之極低MOI。其他

合適MOIs描述在本文別處。在先前技術方法中，向細胞中添加「參考」MOI，其為等於或高於 10^{-5} 之MOI，該參考MOI較佳為 10^{-3} 。然而，已發現在本發明中以此參考MOI接種細胞未必分別產生繁殖病毒粒子或病毒組分之最大產量。反而，若以預選病毒株感染性病毒粒子之總數接種具有特定最小細胞密度之細胞，則可達到經改良之最佳化產量，其中該MOI為小於 10^{-5} 之極低MOI。藉由應用該測試方法，可確定各預選病毒株分別提供該改良產量之繁殖病毒粒子及病毒組分之MOI。此外，由於未出現增量效應，可藉由使用本發明之測試方法同時並行運行多次小規模測試培養，同時觀察本文中所揭示之最小細胞密度，以測試使用極低MOI接種是否分別產生較高產量病毒粒子或病毒組分，若是，則該極低MOI為提供最高可能產量之MOI。此極低MOI可隨後用於大/工業規模繁殖預選病毒株；無需重新測定適用於大規模方法之極低MOI。令人驚奇地，可在小規模細胞培養物中觀察到的關於所獲得之病毒粒子及/或病毒組分的正面效應相應地轉變至大規模細胞培養物中。

關於所接種之細胞、細胞培養組合物之接種、分別用於接種及添加之感染性病毒粒子、感染性病毒粒子的總數、繁殖之病毒粒子及病毒組分及細胞培養基，請參考以上說明書。

在該測試方法之一個較佳實施例中，在第一步驟a)中，使細胞在培養基中生長，直至達到至少 0.5×10^6 個細胞/毫

升之細胞密度。在另一較佳實施例中，細胞生長直至達到至少 3.0×10^6 個細胞/毫升、較佳至少 5.0×10^6 個細胞/毫升、進一步較佳至少 7.0×10^6 個細胞/毫升、甚至進一步較佳至少約 9.0×10^6 個細胞/毫升、較佳至少約 11.0×10^6 個細胞/毫升，或進一步較佳至少 13.0×10^6 細胞/毫升之細胞密度。

自培養器皿中獲得之樣品的細胞密度可藉由熟習此項技術者已知的任何方法來測定。若在黏附細胞培養物中培養細胞，則可藉由使用如實例1中所述之NucleoCounter測定細胞密度。

在一較佳實施例中，該等細胞可如上所述以黏附細胞之方式培養及增殖。

在該測試方法之一較佳實施例中，在步驟b)中，使用極低MOI向該等細胞中添加預選病毒株之感染性病毒粒子，較佳如上所述之感染性病毒粒子。該極低MOI為如上所述在小於 10^{-5} 之範圍內的MOI。可如上所述接種細胞，亦即添加感染性病毒粒子。

此外，藉由進行本發明之測試方法及(分別)繁殖流感病毒(或流感病毒粒子)之方法，可添加蛋白酶，其使HA之前驅蛋白裂解且由此使病毒粒子或病毒分別吸附於細胞上，藉此例如額外增加病毒組分之產量。可在病毒(例如流感病毒)添加至細胞之前不久、同時或之後不久，添加蛋白酶。亦可在病毒添加後8小時至10小時之時段後添加蛋白酶。若添加蛋白酶與接種同時進行，則該蛋白酶可直接添加至該細胞培養物，或例如以濃縮物形式與感染性病毒粒

子接種體一起添加至該細胞培養物。在一較佳實施例中，在感染性流感病毒粒子添加後，將蛋白酶以1 $\mu\text{g/ml}$ 至50 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度範圍添加至置換培養基。在另一較佳實施例中，蛋白酶以大於1.0 $\mu\text{g/ml}$ 至50 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度範圍、較佳1.5 $\mu\text{g/ml}$ 至50 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度範圍、更佳2.0 $\mu\text{g/ml}$ 至50 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度範圍及甚至更佳2.5 $\mu\text{g/ml}$ 至50 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度範圍添加至置換培養基。可添加之適合蛋白酶為熟習此項技術者已知，例如蛋白酶為絲胺酸蛋白酶、半胱胺酸蛋白酶或天冬醯胺蛋白酶。較佳的合適之蛋白酶實例為胰蛋白酶。

在另一較佳實施例中，在該測試方法之步驟a)之後，較佳在步驟a)之後且在步驟b)之前或期間，將以極低MOI及參考MOI用於培養細胞之培養基置換為病毒繁殖培養基。關於該病毒繁殖培養基，參考上文描述。可根據熟習此項技術者已知的任何合適方法置換培養基，例如其可如上所述進行。

此外，關於可分別用於細胞培養階段及病毒繁殖階段之培養基，參考上文描述。

接種細胞培養物以及在接種階段(病毒繁殖)後培養細胞培養物係如上所述進行。

在培養階段已達到結束後，視情況在該測試方法之步驟c)之前，進行收集及/或分離步驟。此/此等步驟可如本文別處所述來進行。

可進一步加工所獲得之繁殖病毒粒子。加工病毒粒子

(或病毒組分分別)包含不活化病毒粒子、及/或減毒病毒粒子、及/或分裂病毒抗原、及/或次單位病毒抗原、及/或病毒體。此外，可分別測定病毒粒子及/或病毒組分之量或產量。

一般而言，可藉由熟習此項技術者已知的任何合適方法測定繁殖病毒粒子之量。病毒產量較佳可如上所述藉由測定TCID₅₀來定量。所獲得之病毒組分的量可藉由熟習此項技術者已知的任何合適方法來測定。適合之方法之實例為單向輻射免疫擴散(SRID)測試，其可根據歐洲藥典(Monograph 2149 (04/2009:2149) Influenza Vaccine (surface antigen, inactivated, prepared in cell cultures))之說明書進行，用於測定HA。免疫化學法係基於抗體對抗原之選擇性、可逆且非共價結合。使用此等方法偵測或定量抗原或抗體。可偵測抗原-抗體複合物之形成，且可藉由多種技術量測所形成複合物的量。免疫沈澱法(SRID)為一種簡單的定量免疫擴散技術。當外部反應物與內部反應物之間已建立平衡時，起源於外部反應物部位之環形沈澱區與所用抗原之量成正比且與凝膠中之抗體濃度成反比。簡言之，在凝膠模中澆鑄含有預定量抗血清之瓊脂糖凝膠。使用每小瓶具有預定含量HA之各別適合病毒株之凍乾血球凝集素抗原試劑以及每毫升瓊脂糖具有預定含量之各別適合病毒株之凍乾抗血球凝集素綿羊血清。將參考抗原及單價本體稀釋至預定濃度且在室溫下用1%兩性洗滌劑(破壞病毒粒)處理30分鐘。隨後將經處理之抗原及本體接種至刺入

凝固凝膠中之孔中且在室溫下靜置擴散至少18小時隔夜。之後，在凝膠黏結膜上乾燥凝膠且用濾紙(諸如沃特曼濾紙(Whatman filter paper))及紙巾乾燥。一旦乾燥，即用考馬斯亮藍(Coomassie brilliant blue)G-250將凝膠染色，以便確定抗體/抗原凝集物之存在。使用適合軟體量測所得沈澱區之直徑。隨後藉由使用統計分析程式計算血球凝集素含量。

在該測試方法之步驟c)中，將步驟b)之感染性病毒粒子添加至該等細胞之後所獲得之病毒粒子及/或加工病毒粒子的產量與當使用在等於或高於 10^{-5} 範圍內之參考MOI添加相同類型感染性病毒粒子至相同類型細胞時所獲得之病毒粒子及/或加工病毒粒子之量進行比較。該參考MOI較佳為 10^{-3} 。

關於術語「參考MOI」，參考上文描述。

為測定最適於繁殖病毒粒子之方法的MOI，在含有相同培養基且使用相同加工條件之培養器皿中測試至少兩種不同MOI。為此，使用至少兩個培養器皿；第一培養器皿含有以如上所述之參考MOI接種之細胞培養組合物且第二培養器皿含有使用本發明之極低MOI接種之細胞培養組合物。然而，較佳測試一種以上本發明之極低MOI，以便發現最適於各別加工條件之MOI。因此，較佳以參考MOI進行一次以上接種及/或以極低MOI進行一次以上接種。此外，可同時使用本發明不同之極低MOI進行一系列培養程序。此外可在任何規模下進行該測試方法，該測試方法較

佳首先在小規模下進行，隨後使用極低MOI在半工業或大規模細胞培養物下進行。

在另一較佳實施例中，步驟b)之感染性病毒粒子添加至細胞後所獲得之病毒粒子或加工病毒粒子之量為使用在至少 10^{-5} 或 10^{-5} 以上範圍內之參考MOI添加相同類型感染性病毒粒子至相同類型細胞後所獲得之病毒粒子或加工病毒粒子之量的至少1.2倍、較佳至少1.5倍、更佳至少2倍且最佳至少3倍，其中病毒粒子之量較佳在病毒添加後24小時測定。可如上所述測定繁殖病毒粒子及病毒組分之量。

本發明亦關於一種用於製造病毒粒子及/或病毒組分之細胞培養組合物，其中

- a) 已藉由使用至少 0.5×10^6 個細胞/毫升之起始細胞量製備該細胞培養組合物，亦即在病毒添加時該細胞培養物中之細胞量為至少 0.5×10^6 個細胞/毫升，及
- b) 已向步驟a)之細胞培養組合物中添加使用小於 10^{-5} 之極低MOI之總數的感染性病毒粒子，及
- c) 在病毒添加後1天範圍內，步驟b)之細胞培養組合物中所存在之活細胞量相當於該細胞培養組合物中所存在之起始細胞量(亦即在病毒添加時該細胞培養物中之活細胞量)的至少約60%、較佳至少約70%、更佳至少約75%、甚至更佳至少約80%且最佳至少約85%。

在另一較佳實施例中，在病毒添加後1天範圍內，步驟b)之細胞培養組合物中所存在之活細胞量相當於該細胞培養組合物中所存在之起始細胞量的至少約100%或至少約

110%。

在另一較佳實施例中，在病毒添加後48小時之範圍內，步驟b)之細胞培養組合物中所存在之活細胞量相當於該細胞培養組合物中所存在之起始細胞量的至少約5%、較佳至少約10%、較佳至少約15%。

關於例如細胞培養組合物、病毒粒子及/或病毒組分、起始細胞量、接種細胞培養組合物(亦即添加病毒粒子至細胞培養物)、MOI及測定細胞培養物中所存在之細胞量的方法(細胞密度，以細胞/毫升表示)，參考上文描述。該細胞培養組合物可有利地改良病毒組分之製造，例如關於所獲得之產量及/或關於製造該等病毒組分所需要之時間。

在一較佳實施例中，步驟a)之細胞培養組合物已根據如本文所述之測試方法以所測試之MOI接種。

在另一較佳實施例中，該細胞培養組合物在病毒添加後4天之後展現高於8 $\mu\text{g/ml}$ 、較佳高於9 $\mu\text{g/ml}$ 、更佳高於10 $\mu\text{g/ml}$ 、甚至更佳高於15 $\mu\text{g/ml}$ 且最佳高於20 $\mu\text{g/ml}$ 之HA/ml比率。

關於術語「病毒添加後」，參考上文描述。

此外，本發明亦關於細胞培養組合物繁殖病毒粒子之用途，其中以感染性病毒粒子接種含有至少 0.5×10^6 個細胞/毫升之起始細胞量或如本文所定義之其他較佳細胞量之細胞培養組合物，其中所用感染細胞所必需之感染性病毒粒子總數/細胞(「感染倍率」，MOI)小於 10^{-5} 。如上所述關於病毒粒子繁殖方法或測試方法之其他較佳實施例亦適於

製備本發明之細胞培養組合物。

關於細胞培養組合物、病毒粒子、起始細胞量、接種細胞培養物、感染性病毒粒子及MOI，再次參考上文描述。此外，可如上所述收集及/或分離繁殖病毒粒子，且可視情況進行如上所述之其他加工步驟。

本發明亦關於一種製造免疫原性病毒抗原、較佳流感病毒抗原且更佳免疫原性血球凝集素(HA)蛋白之方法，其包含以下步驟：

- a) 繁殖包含免疫原性HA之病毒粒子，其中向在病毒添加時含有至少 0.5×10^6 個細胞/毫升之細胞量的細胞培養組合物中添加感染性病毒粒子，且其中所用感染細胞所必需之感染性病毒粒子總數/細胞(「感染倍率」，MOI)小於 10^{-5} ；及
- b) 獲得繁殖病毒粒子，且視情況進一步加工該等繁殖病毒粒子以分離免疫原性血球凝集素(HA)蛋白及/或免疫原性神經胺糖酸苷酶(NA)蛋白。

在一較佳實施例中，該其他加工步驟包含對繁殖病毒粒子之分離步驟及視情況選用之純化步驟。此步驟/此等步驟之後為免疫原性病毒抗原、較佳流感病毒抗原且更佳免疫原性血球凝集素(HA)蛋白之分離步驟。上述其他加工步驟為熟習此項技術者已知且為常規方法。其可為適於得到如上所述之經分離之免疫原性病毒抗原的任何加工步驟。在一較佳實施例中，藉由溶解進行以下繁殖病毒粒子之分離步驟及免疫原性HA蛋白之分離步驟，例如評述於Michael W. Wolff及Udo Reichl之「Downstream Processing:

From Egg to Cell Culture-Derived Influenza Virus Particles」, Chem. Eng. Technol. 2008, 31, 第6期, 846-857 中。

較佳首先分離該等病毒粒子且隨後自該等病毒粒子分別分隔或純化免疫原性血球凝集素(HA)蛋白，且接著分離免疫原性血球凝集素。如上文更詳細描述，其他加工步驟較佳在病毒粒子之收集及/或分離步驟之後進行，且可包括提取可與細胞或細胞片段締合之病毒組分、分隔病毒組分、分離病毒組分且將其純化。

另外，本發明係關於一種藉由本發明之方法製備之免疫原性血球凝集素(HA)。

以下圖式及實例更詳細地說明本發明，然而，其僅以說明性目的呈現且不應理解為以任何方式限制本發明之範疇。

方法

測定培養基之容積莫耳滲透濃度(osmolarity)及重量莫耳滲透濃度(osmolality)

可藉由使用任何已知方法(例如藉由使用滲透壓計)測定容積莫耳滲透濃度/重量莫耳滲透濃度，其限制條件為使用相同方法測定用於培養細胞之細胞培養基及用於病毒繁殖之培養基的容積莫耳滲透濃度/重量莫耳滲透濃度。

藉由量測凝固點降低測定重量莫耳滲透濃度。

測定培養基之蛋白質含量

可藉由使用任何已知方法測定培養基之蛋白質含量，其

限制條件為使用相同方法測定用於培養細胞之細胞培養基及用於病毒繁殖之培養基的蛋白質含量。若干方法可用，例如Lowry或Bradford檢定。

測定物質總量或個別物質之量

可藉由任何已知方法測定胺基酸、生長因子及無機鹽之量，其限制條件為使用相同方法測定用於培養細胞之細胞培養基及用於病毒繁殖之細胞培養基中的各別含量。

可例如藉由使用HPLC(高壓液相層析)測定胺基酸之量且可例如藉由質譜分析測定生長因子之量。可藉由用離子選擇性電極量測培養基中無機鹽之金屬離子濃度來測定無機鹽含量。

實例

實例1：培養MDCK細胞

在Cytodex 3微載體上以黏附細胞之方式培養MDCK細胞。

製備Cytodex 3微載體：

根據以下方案製備培養MDCK細胞之Cytodex 3微載體且滅菌：稱取所需量之乾燥微載體且添加至磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)溶液中，以溶脹微載體。溶脹後，用PBS洗滌微載體且隨後在121℃下滅菌。滅菌後，用細胞培養基置換PBS且備用。

在具有3 l工作體積之生物反應器中培養MDCK細胞如下：

在準備好(校正感測器且滅菌)用於細胞培養之生物反應器後，將細胞培養基及微載體添加至該生物反應器中。以

約 0.4×10^{-6} 個細胞/毫升之細胞密度將細胞接種至該生物反應器。溫度保持在 37°C ，pH 為 7.1 且溶解氧(DO)濃度大於 40% 之空氣飽和度。細胞將在 3 至 4 天內生長成單層細胞匯合。

置換細胞培養基

在用感染性病毒粒子接種 MDCK 細胞之前，用增濃細胞培養基置換該細胞培養基。根據以下方案置換培養基：停止攪拌且使微載體沈降在生物反應器底部。在微載體沈降後，藉由過壓經由 80% 浸漬管移除約 80% 之培養基，且隨後用增濃培養基再填充生物反應器。

測定細胞密度(細胞/毫升)

已藉由使用 NucleoCounter(Chemometec)測定各別細胞培養物中所存在之細胞的細胞密度。自生物反應器中獲取代表樣品且在微載體沈降於試管中後，移除培養基。隨後用溶解緩衝液及中和緩衝液處理微載體，使得能夠對細胞核計數。

實例 2：病毒培養：

在 35°C 、pH 7.1 及 $\text{DO} > 40\%$ 下培養病毒株 A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) X-161B。

分析病毒繁殖

在細胞密度達到約 3.0×10^6 個細胞/毫升與約 4.0×10^6 個細胞/毫升之範圍內之後，以病毒株 A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) X-161B 接種該細胞培養物。根據以下方案接種該細胞培養組合物：

在細胞培養基置換後，添加計算量之病毒且單獨添加少量胰蛋白酶(0.5 mL 2.5%胰蛋白酶溶液)。繼續繁殖病毒，直至達到約100%之細胞病變效應(CPE)，其通常需要約3天。可藉由顯微鏡目視檢查CPE，以估計微載體之細胞覆蓋率。隨後可收集病毒。

分析病毒樣品

TCID₅₀分析

以病毒之連續稀釋液感染MDCK細胞；若干天之後，記錄細胞病變效應(CPE)且可計算為組織培養半數感染劑量(TCID₅₀)。諸如TCID₅₀檢定之終點稀釋技術為量測病毒群體之統計方法。分析該等資料之若干統計方法可用，例如Spearman-Kärber、Reed & Muench或概率分析。

SRID分析(HA濃度)：

用兩性洗滌劑處理流感病毒，以便使HA抗原分裂成可擴散粒子。在擴散穿過含有特異性抗血清之瓊脂糖層之後，抗原與抗血清一起形成沈澱環。藉由用考馬斯亮藍染色，使此沈澱環顯而易見。將沈澱環直徑與以同樣方式處理之標準溶液進行比較。以HA/mL表示含量。(Monograph 2149 (04/2009:2149) Influenza Vaccine (surface antigen, inactivated, prepared in cell cultures))。免疫化學法係基於抗體對抗原之選擇性、可逆且非共價結合。使用此等方法偵測或定量抗原或抗體。可偵測抗原-抗體複合物之形成，且可藉由多種技術量測所形成複合物的量。免疫沈澱法(SRID)為一種簡單的定量免疫擴散技術。當外部反應物

與內部反應物之間已建立平衡時，起源於外部反應物部位之環形沈澱區與所用抗原量成正比且與凝膠中之抗體濃度成反比。

【圖式簡單說明】

圖1顯示藉由用病毒株 A/Wisconsin X-161B 感染細胞所產生之HA蛋白動力學(藉由SRID檢定獲得)。

上方的線為條件「培養基置換EPI w/o BSA， $MOI\ 1\times 10^{-6}$ 」。其意謂已使用本發明之極低MOI及不具有顯著較低量蛋白質、生長因子及/或無機鹽及/或具有用於細胞培養之培養基之至少95%重量莫耳滲透濃度的病毒繁殖培養基(EPI w/o BSA)(該病毒繁殖培養基中僅不含BSA)。此較佳方法提供最佳結果。

中間曲線為條件「培養基置換CM； $MOI\ 1\times 10^{-6}$ 」，其提供使用本發明之極低MOI的改良。在此條件下，細胞培養基已經置換為病毒繁殖培養基，病毒繁殖培養基與細胞培養基相比具有顯著較低量之蛋白質、生長因子及/或無機鹽，及/或此培養基之重量莫耳滲透濃度小於用於細胞培養之培養基之重量莫耳滲透濃度的95%。此病毒繁殖培養基稱為「CM」培養基。

下方曲線為條件「培養基置換CM； $MOI\ 1\times 10^{-3}$ 」。在此條件下，該細胞培養基已經置換為CM培養基且已以 1×10^{-3} 之MOI接種。此先前技術之方法提供最低HA蛋白含量。

條件「培養基置換Epi w/o BSA， $MOI\ 1\times 10^{-6}$ 」在感染後

第4天之平均血球凝集素蛋白產量為37.0 $\mu\text{g/ml}$ 。條件「培養基置換CM；MOI 1×10^{-6} 」在病毒添加後第4天產生19 $\mu\text{g/ml}$ 之HA產量，且條件「培養基置換CM；MOI 1×10^{-3} 」在病毒添加後第4天具有8.7 $\mu\text{g/ml}$ 之降低4倍之平均HA產量。

此圖顯示與以參考MOI(例如MOI 1×10^{-3} ，下方曲線)接種細胞相比，以極低MOI(例如MOI 1×10^{-6} ，中間曲線及上方曲線)接種細胞培養物後之HA產量顯著增加。此外，顯示此效應係歸因於MOI降低(HA產量增加，比較下方曲線與中間曲線)，且若已用於細胞培養之培養基不用CM培養基置換，而是用不具有顯著降低量蛋白質、生長因子及/或無機鹽及/或具有用於細胞培養之培養基之至少95%之重量莫耳滲透濃度的培養基置換，則此效應可進一步增加。

圖2顯示在病毒株A/Wisconsin X-161B繁殖期間黏附細胞之細胞動力學。

連續曲線為條件「培養基置換CM；MOI 1×10^{-3} 」。此條件顯示感染後第1天量測之細胞密度的較快且較大減小。

虛曲線表示條件「培養基置換CM；MOI 1×10^{-6} 」。此處可見所量測之細胞密度輕微減小。

點線為條件「培養基置換EPI w/o BSA，MOI 1×10^{-6} 」。此處可見感染後第1天所量測之細胞密度輕微增加。

此圖顯示，如各別細胞密度(細胞/毫升)所指示，與以參考MOI(例如MOI 1×10^{-3})接種細胞相比，在以極低MOI(例

如 MOI 1×10^{-6}) 接種細胞後，更多細胞存活。此外，顯示此效應係歸因於 MOI 降低，且根據本發明藉由在感染之前置換培養基可進一步增加此效應。

圖 3 顯示在病毒株 A/Wisconsin X-161B 繁殖期間之 TCID₅₀。

條件「培養基置換 CM；MOI 1×10^{-3} 」為最低處的連續曲線，且其他條件(「培養基置換 Epi w/o BSA，MOI 1×10^{-6} 」及「培養基置換 CM；MOI 1×10^{-6} 」)為具有類似值之上方兩條線。較高 TCID₅₀ 表明較高感染性病毒產量，其引起較高蛋白質產量。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： | 00114740

※ 申請日： (00.4.27)

※IPC 分類：C12N 7/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

C07K 14/11 (2006.01)

病毒組分之製造

PRODUCTION OF VIRAL COMPONENTS

二、中文發明摘要：

本發明係關於一種繁殖流感病毒之方法，其中細胞培養組合物在病毒添加時於細胞培養物中含有至少 0.5×10^6 個細胞/毫升之量的細胞，且其中在病毒添加步驟期間所添加之感染性病毒粒子總數/細胞(MOI)小於 10^{-5} ，及關於該方法在流感疫苗製造中之用途。此外，本發明係關於一種測試添加極低數目感染性病毒粒子/細胞(MOI)之預選病毒株至用於繁殖病毒粒子之細胞培養組合物是否致使病毒粒子及/或加工病毒粒子產量增加的方法。

三、英文發明摘要：

The present invention refers to a method for the propagation of influenza virus, wherein the cell culture composition contains an amount of cells in the cell culture at the time of virus addition of at least 0.5×10^6 cells/ml and wherein the total number of infectious viral particles per cell added during the virus addition step (MOI) is less than 10^{-5} , and to the use of said method in the production of influenza vaccine. Furthermore, the present invention relates to a process for testing whether the addition of a very low number of infectious virus particles per cell (MOI) of a pre-selected virus strain to a cell culture composition for the propagation of viral particles leads to an increased yield of the viral particles and/or processed viral particles.

七、申請專利範圍：

1. 一種繁殖包含免疫原性血球凝集素(HA)之流感病毒的方法，其中在第一步驟中於細胞培養物中培養細胞及其中隨後在第二步驟中添加感染性流感粒子至該細胞培養物，其中用於培養該等細胞之培養基在該病毒添加步驟之前或期間置換為與先前用於培養該等細胞之培養基的重量莫耳滲透濃度(osmolality)相比，具有至少80%之重量莫耳滲透濃度的培養基，且其與先前用於培養該等細胞之培養基相比不具有顯著較低量，較佳不少於50%之蛋白質、生長因子及/或無機鹽之總量，其中在病毒添加時該細胞培養物中之細胞量為至少 0.5×10^6 個細胞/毫升，其中在病毒添加後12至36小時內活細胞密度不低於病毒添加時該細胞密度之40%，其中

在該病毒添加步驟期間所添加之感染性病毒粒子總數/細胞(感染倍率(Multiplicity of Infection), MOI)小於 10^{-5} 。

2. 如請求項1之方法，其中該置換培養基不含BSA(牛血清白蛋白)。
3. 如請求項1或2之方法，其中該置換培養基不補充抗生素。
4. 如請求項1或2之方法，其中在感染性流感粒子添加之後，蛋白酶以1 $\mu\text{g/ml}$ 至50 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度範圍添加至該培養基。
5. 如請求項4之方法，其中蛋白酶以大於1.0 $\mu\text{g/ml}$ 至50 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度範圍、較佳1.5 $\mu\text{g/ml}$ 至50 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度範圍。

圍、更佳2.0 µg/ml至50 µg/ml之濃度範圍、甚至更佳2.5 µg/ml至50 µg/ml之濃度範圍添加至該培養基。

6. 如請求項4之方法，其中該蛋白酶為胰蛋白酶。
7. 如請求項1或2之方法，其中該等細胞為固著依賴性 (anchorage-dependent)細胞。
8. 如請求項1或2之方法，其中在該病毒添加步驟期間所添加之該感染性病毒粒子總數/細胞(感染倍率，MOI)等於或小於 10^{-6} 。
9. 如請求項1或2之方法，其中在該病毒添加步驟期間所添加之該感染性病毒粒子總數/細胞(感染倍率，MOI)等於或小於 10^{-7} 。
10. 如請求項1或2之方法，其中在該病毒添加步驟期間所添加之該感染性病毒粒子總數/細胞(感染倍率，MOI)等於或小於 10^{-8} 。
11. 如請求項1或2之方法，其中在病毒添加後12至36小時內該活細胞密度不低於病毒添加時該細胞密度之60%。
12. 如請求項1或2之方法，其中在病毒添加後12至36小時內該活細胞密度不低於病毒添加時該細胞密度之80%。
13. 如請求項1或2之方法，其中用於培養該等細胞之培養基在該病毒添加步驟之前或期間置換為與先前用於培養該等細胞之培養基的重量莫耳滲透濃度相比，具有至少95%之重量莫耳滲透濃度的培養基。
14. 如請求項1或2之方法，其中在病毒添加時該細胞培養物中之細胞量為至少 3.0×10^6 個細胞/毫升。

15. 如請求項1或2之方法，其中在病毒添加時該細胞培養物中之細胞量為至少 5.0×10^6 個細胞/毫升。
16. 如請求項1或2之方法，其中在病毒添加時該細胞培養物中之細胞量為至少 7.0×10^6 個細胞/毫升。
17. 如請求項1或2之方法，其中在病毒添加時該細胞培養物中之細胞量為至少 9.0×10^6 個細胞/毫升。
18. 如請求項1或2之方法，其中在病毒添加時該細胞培養物中之細胞量為至少 11.0×10^6 個細胞/毫升。
19. 如請求項1或2之方法，其中在病毒添加時該細胞培養物中之細胞量為至少 13.0×10^6 個細胞/毫升。
20. 如請求項1或2之方法，其中所用細胞為動物細胞，較佳為哺乳動物細胞。
21. 如請求項20之方法，其中所用細胞為MDCK細胞。
22. 如請求項1或2之方法，其中該方法進一步包含一或多個進一步加工該等繁殖病毒粒子之步驟。
23. 如請求項22之方法，其中該等加工病毒粒子包含不活化(inactivated)病毒粒子、及/或減毒病毒粒子、及/或分裂病毒抗原、及/或次單位病毒抗原、及/或病毒體(virosomes)。
24. 如請求項23之方法，其中該等加工病毒粒子包含一或多種流感抗原。
25. 如請求項1或2之方法，其係用於製造流感疫苗。
26. 如請求項1之方法，其中該置換培養基不含BSA(牛血清白蛋白)，其中該置換培養基不補充抗生素，且其中在添

加感染性流感粒子後將蛋白酶以1 $\mu\text{g/ml}$ 至50 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度範圍添加至該培養基。

27. 一種測試添加感染細胞所需之極低數目感染性病毒粒子/細胞(MOI)之預選病毒株至用於繁殖病毒粒子之細胞培養組合物是否致使該等病毒粒子及/或加工病毒粒子產量增加的方法，其包含以下步驟：

a) 使細胞在細胞培養組合物中生長，直至達到至少 0.5×10^6 個細胞/毫升之細胞密度，

b) 使用極低MOI將該預選病毒株之感染性病毒粒子總數添加至該細胞培養組合物，其中該極低MOI為小於 10^{-5} 之MOI，

c) 比較步驟b)之感染性病毒粒子添加至細胞後所獲得之該等病毒粒子及/或加工病毒粒子的產量與使用等於或高於 10^{-5} 範圍內之參考MOI將相同類型感染性病毒粒子添加至相同類型細胞時所獲得之病毒粒子及/或加工病毒粒子之量。

八、圖式：

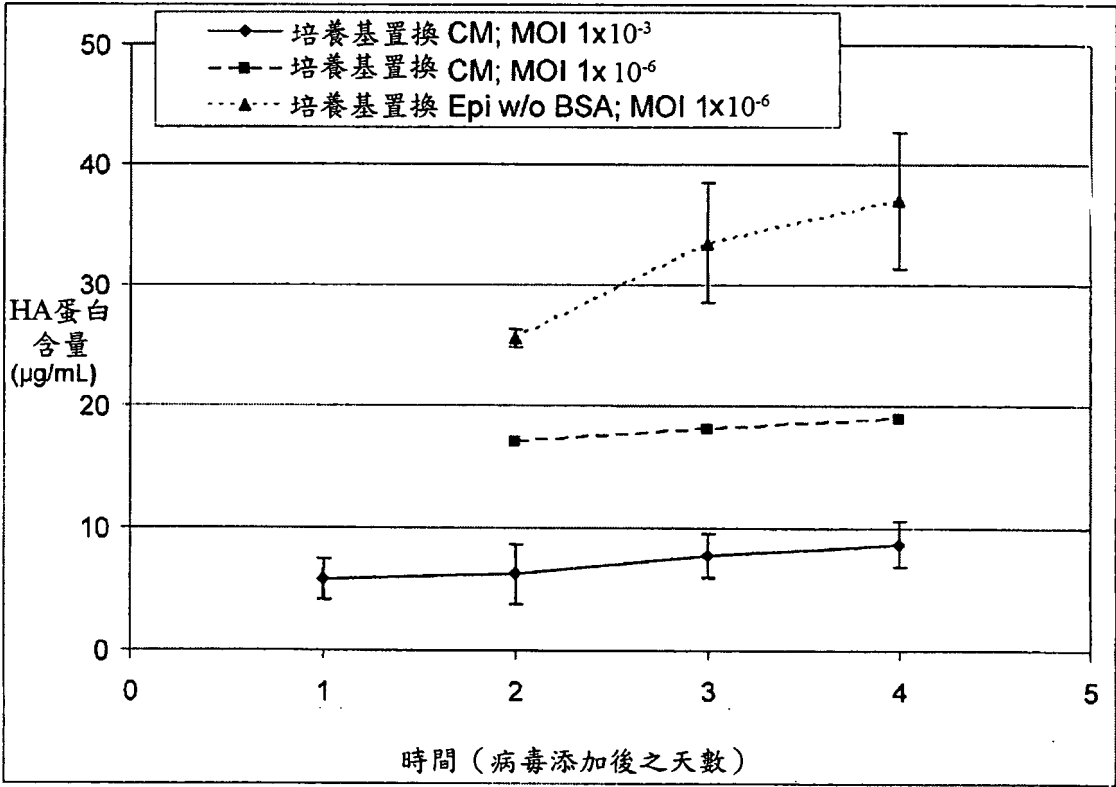


圖1

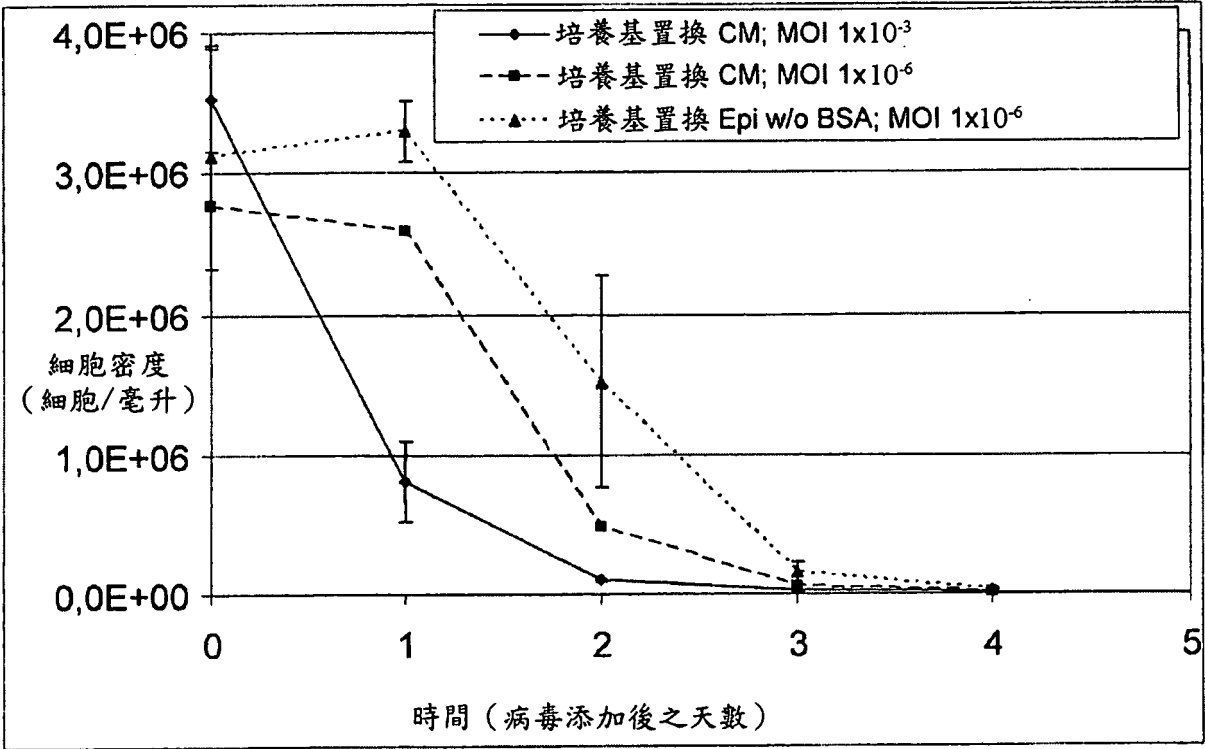


圖2

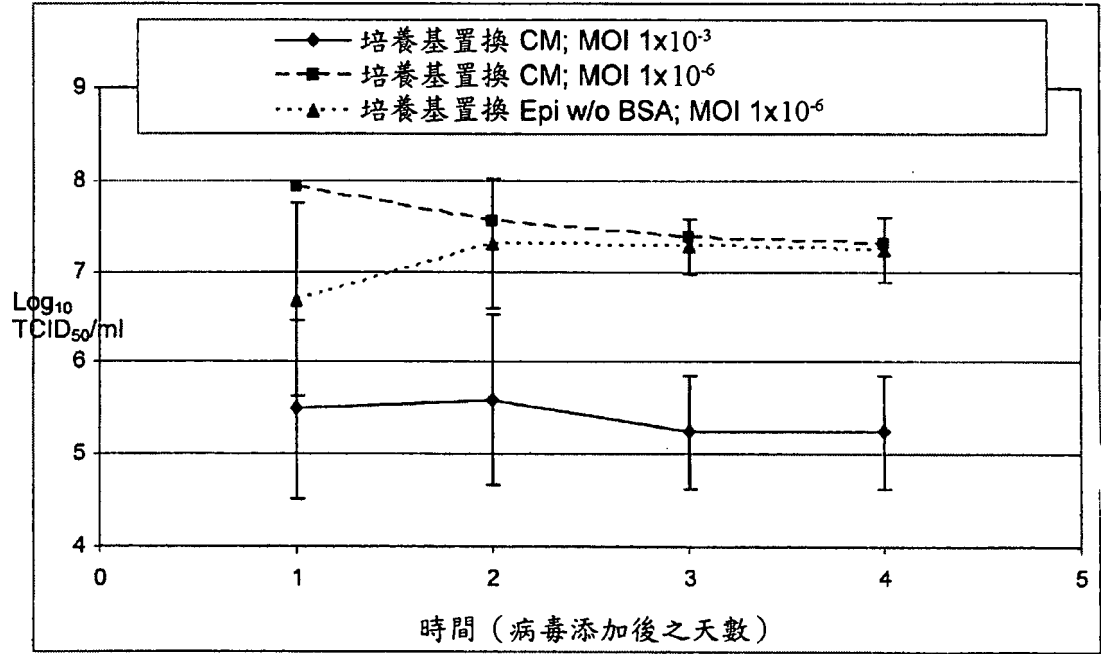


圖3

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)