200914616

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：97116166

※ 申請日期：97.5.2

※IPC 分類：C12N 7/02 (2006.01)
C12M 1/38 (2006.01)
A61K 31/145 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
C07K 14/11 (2006.01)
C07K 14/18 (2006.01)

一、發明名稱：（中文/英文）

用於增殖病毒之二步驟溫度型態

TWO-STEP TEMPERATURE PROFILE FOR THE PROPAGATION OF VIRUSES

二、申請人：（共 2 人）

姓名或名稱：（中文/英文）

1. 巴克斯特國際公司 / BAXTER INTERNATIONAL INC.
2. 巴克斯特保健公司 / Baxter Healthcare S.A.

代表人：（中文/英文）

1.2. 哈拉德 布斯 / BOOS, HARALD

住居所或營業所地址：（中文/英文）

1. 美國伊利諾州 60015，鹿場，巴克斯特公園路 1 號
   One Baxter Parkway, Deerfield, Illinois 60015, U.S.A.
2. 瑞士 8304 華利瑟倫 赫提斯街 2 號
   Hertistrasse 2, CH-8304 Wallisellen, Switzerland

國　籍：（中文/英文）

1. 美國 / U.S.A.
2. 瑞士 / Switzerland

三、發明人：（共 3 人）

姓　名：（中文/英文）

1. 曼費德 瑞特 / REITER, Manfred
2. 里歐波德 貴兒柏爵 / GRILLBERGER, Leopold
3. 沃夫根 穆迪 / MUNDT, Wolfgang

國　籍：（中文/英文）

1.~3. 奧地利 / Austria

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，

其事實發生日期為：　年　月　日。

☑ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號　順序註記】

☑ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

美國專利、2007.05.04、60/927,693

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料　【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

國外生物材料　【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【相關申請案之交互參照】

本申請案主張2007年5月4日申請之美國臨時申請案第60/927,693號的優先權益，將其內容全部以引用方式納入本文中。

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於病毒增殖的領域。

【先前技術】

在依據病毒之特徵和用以增殖之宿主系統的溫度條件下，在動物細胞培養物中進行病毒增殖。為了細胞的生長而選擇某種溫度(在細胞培養物中或胚胎卵的育種)，接著是為了病毒增殖而選擇的溫度。在大多數的情況下，病毒增殖的溫度比細胞繁殖的溫度更低。溫度敏感性病毒之增殖與影響病毒增殖之速度和抗原的形成有關，在昆蟲細胞培養物中是以20℃為中心之溫度範圍(例如桿狀病毒的生產)，而在哺乳動物細胞培養物中則是在高達大約37℃的溫度下產生病毒，每個病毒/宿主細胞組合都有特別適合其等的溫度範圍。較高的溫度影響感染動力學和病毒穩定性兩者。當病毒在37℃之溫度下增殖時，在病毒複製的晚期中經常觀察到降低的病毒力價和較低品質的病毒抗原。該影響可能對用以生產疫苗的大規模病毒增殖有不利的後果。

本發明之目標是提供經改良的生長條件，其不影響為了預防接種而生產之抗原的品質。

【發明內容】

發明概述

本發明係提供生產病毒的方法，其中藉著病毒感染一或多個宿主細胞，然後在第一個溫度下培養(例如在從 31℃到 37℃之溫度下 1 到 48 小時)，隨後在第二個溫度下培養，該第二個溫度比第一個溫度低(例如 1℃到 6℃)。然後收集藉著這些培養步驟所產生的病毒。

目前已經意外地發現，可藉著使用二步驟溫度型態，實質上改良許多病毒(包括流感病毒(正黏液病毒科(Orthomyxoviridae))、羅斯河病毒(Ross River Virus)(α病毒科(Alphaviridae))和西尼羅病毒(West Nile Virus)(黃病毒科(Flaviviridae)))的培養條件。較高的溫度適用於病毒增殖的第一階段，其加速傳染性病毒顆粒的形成。在第二階段，使用較低的溫度，以維持最初在較高溫度之增殖期間中所獲得的高力價，並允許形成穩定的抗原，其可進一步用來製造免疫原疫苗。

【實施方式】

發明之詳細說明

本發明一方面是察覺如在本文中描述之二步驟溫度型態，允許獨立最適化並控制(1)活性病毒的形成，以供宿主細胞的多-循環感染，(2)在複製晚期維持所獲得的高力價，並(3)在生產製程的晚期形成抗原。

在本發明較佳的具體事實中，該病毒為正黏液病毒、α病毒或黃病毒。

較佳的是，該病毒為流感病毒，且在某些具體事實中，該病毒係選自由A和B型流感病毒、羅斯河病毒和西尼羅病毒所組成之群組。雖然在本文中提供之實例，說明了使用本發明之二-溫度法，產生這些病毒經改良之抗原，但本發明亦考慮到其他病毒的非限制性實例，包括選自RNA病毒科，如呼腸孤病毒科(Reoviridae)、小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)、杯狀病毒科(Caliciviridae)、披蓋病毒科(Togaviridae)、沙粒病毒科(Arenaviridae)、逆轉錄病毒科(Retroviridae)、黃病毒科、正黏液病毒科、副黏液病毒科(Paramyxoviridae)、布尼亞病毒科(Bunyaviridae)、桿狀病毒科(Rhabdoviridae)、絲狀病毒科(Filoviridae)、冠狀病毒科(Coronaviridae)、星狀病毒科(Astroviridae)或玻那病毒科(Bornaviridae)，以及DNA病毒科，如腺病毒科(Adenoviridae)、乳頭狀多瘤空泡化病毒科(Papovaviridae)、細小病毒科(Parvoviridae)、疱疹病毒科(Herpesviridae)、痘病毒科(Poxviridae)或肝病毒科(Hepadnaviridae)之群組的病毒。在某些具體事實中，該病毒係選自由流感A/巴拿馬/2007/99、A/新喀里多尼亞/20/99、B/山東(Shangdong)/7/97、B/馬來西亞/2506/2004、A/廣島(Hiroshima)/52/2005和A/索羅門群島(Solomon Islands)/3/2006所組成之群組。

可在任何適合用來生產病毒的細胞中生產病毒。較佳的是，屬於動物細胞培養物或細胞株的細胞。這類細胞可得自特定的組織或胚胎細胞。該動物較佳的是哺乳動物或

鳥類。本發明的各種具體事實，可使用犬細胞株、嚙齒動物細胞株、禽類細胞株或靈長類組織細胞株。例如，在某些具體事實中，該細胞可以是 MDCK 細胞、CHO 細胞、perC6 細胞、HEK 293 細胞，或其他經常用在病毒增殖上的細胞。在某些特定的具體事實中，該細胞為上皮細胞，特別是腎臟上皮細胞，如非洲綠猴的 Vero 細胞。

在本發明的某些具體事實中，在不含動物血清蛋白質之培養基中培養該細胞。這類培養基不含，例如牛血清或其一部分，如胎牛血清。將這類培養基稱為"不含血清蛋白質之培養基"。在病毒增殖期間，可將病毒增殖所需之蛋白酶(如胰蛋白酶)加至該培養基中。在某些具體事實中，這類蛋白酶可衍生自非-動物來源，如細菌或重組來源，或可衍生自動物來源。在本文中使用該名詞的意義內，仍將這類經補充之培養基視為不含血清蛋白質之培養基。

在本發明較佳的具體事實中，以工業規模進行本發明之方法。在本發明的某些具體事實中，以超過 50 公升之細胞培養物、50 到 100 公升之細胞培養物、100 到 500 公升之細胞培養物、500 到 1000 公升之細胞培養物或超過 1000 公升之細胞培養物(例如以 6000 公升、10,000 公升或更大的生物反應器)來進行該方法。在本發明的某些具體事實中，在經攪拌之罐式生物反應器中進行本發明之方法。

在本發明較佳的方法中，第一個病毒增殖溫度低於給定宿主細胞類型之細胞培養物增殖溫度。在某些具體事實中，該第一個溫度是在 32℃到 37℃之間，較佳的是在 33

℃到 36℃之間，更佳的是在 34℃到 35.5℃之間，且特別是 35℃。在其他的具體事實中，該第一個溫度是在 30℃到 36℃之間，較佳的是在 30℃到 35℃之間，更佳的是在 31℃到 35℃之間，再更佳的是在 31℃到 34℃之間，再更佳的是在 32℃到 34℃之間，更佳的是在 32℃到 33.5℃之間，再更佳的是在 33℃到 34℃之間，而最佳的是 33.5℃，或在某些具體事實中是 33℃。特定而言，對於較大的細胞培養物體積(1000 公升和更大)，較低的第一個溫度範圍可能是較佳的。第一個溫度可以是至少 30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃或 36℃，或比 38℃、37.5℃、37℃、36℃、35.5℃或 35℃更低。在第一個溫度下培養細胞，可持續超過 1、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28 或 30 小時，或低於 60、58、56、54、52、50、48、46、44、42、40、38、36、34、32、30、28、26、24、22、20、18、16、14 或 12 小時。

在另外的具體事實中，與第一個溫度相比較，將第二個溫度降低 1.5℃到 5℃，較佳的是降低 2℃到 4℃，更佳的是降低 2.5℃到 3.5℃，而最佳的是降低 3℃。可降低至少 1℃、2℃、2.5℃、3℃或 4℃，或少於 6℃、5℃、4℃、3.5℃、3℃、2.5℃或 2℃。

在其他的具體事實中，第二個溫度的範圍是從 29℃到 35℃，較佳的是從 30℃到 34℃，更佳的是從 31℃到 33℃，再更佳的是從 31.5℃到 32.5℃，而最佳的是 32℃。第二個溫度可以在 28℃、29℃、30℃或 31℃以上，或在 35℃、34

℃、33℃或32℃以下。

亦可使用該方法來生產病毒抗原。因此，在另一方面本發明提供生產病毒或病毒抗原的方法，其中按照在本文中的描述產生病毒，並分離該病毒或病毒抗原。可使用標準程序進行分離以分離之，並可視需要藉著使細胞分解或收集細胞上清液，然後分離該抗原(例如離心或層析)以純化之。

在更進一步的具體事實中，在純化之前或之後使該病毒破碎或失活(例如根據在 WO 05/11800 中提出的方法)。此外，亦可製備該病毒的疫苗。疫苗是抗原性物質的免疫原組合物，其中該抗原性物質可以是非-傳染性的病毒、其莢膜、顆粒或其抗原。當投予疫苗時，其在宿主(例如哺乳動物，如人類或鳥類)中產生免疫作用。接種疫苗可引起對該疫苗的專一反應，以及一些次要的炎症反應，但通常與對藉由完全可存活病毒引起之感染的反應相比較，大大地降低了對接種疫苗的反應。

藉著下列的實施例進一步解釋本發明，該實施例僅作為範例，且無意以任何方式限制本發明。

實施例

許多病毒的膜蛋白需要轉譯後修改，以產生複製-勝任病毒。在流感病毒中，前驅物血球凝集素(HA)分子(HA0)的蛋白水解切開作用，成為 HA1 和 HA2 次單元，其在 HA2 的胺基終端區域產生促融合(fusogenic)功能部位，為病毒

進入細胞內所不可或缺的。因此，必須藉著加入蛋白酶催化，開始在細胞培養物中的感染循環。至於疫苗製造製程，使用得自豬來源的經γ輻射處理之胰蛋白酶。

使流感病毒生長在細胞培養物(如 Vero 細胞)中的傳統溫度型態為其中使溫度保持在 33℃(適合 B-品系)到 37℃(適合 A-品系)下不變的一種型態[參見，例如 Govorkava EA 等人 Journal of Virology, 第 70 冊，第 8 期，1996 8 月，第 5519-5524 頁]。本發明之觀點為察覺-雖然是在 10 公升生物反應器系統中的小規模實驗，在最初感染階段的期間內，升高溫度型態可能對流感病毒生產製程之整體循環時間有正面的影響。此外，可獲得對抗原純度的正面影響-以 Vero 蛋白質/SRD 比例來測量。欲證明該概念，進行 100 公升規模的實驗，如同本文之描述。

實施例 1：在 32 和 36℃下，生產流感 A/新喀里多尼亞/20/99

在 32℃和 36℃下，執行以 A/新喀里多尼亞/20/99 病毒感染生物反應器的 Vero 培養物。pH 值、pO_2、細胞密度和加至該培養物中之胰蛋白酶用量的參數設定，相當於並反映製造流感抗原的大規模條件。於表一比較增加溫度對於病毒產量及循環時間的影響。

表 1：HA 和殘餘氧攝取率("殘餘 OUR")的比較(與感染循環之第 0 天相比較*)

溫度	HA 第 2 天 (2^nHAU/50μL)	HA 第 3 天 (2^nHAU/50μL)	殘餘 OUR (%)*第 2 天	殘餘 OUR (%)*第 3 天
32℃	6	8	80	50
36℃	7	8	20	<5

在 2 天之後，36℃培養物觀察到 20%的殘餘氧攝取率，其在 3 天下降到 5%以下。在 36℃下流感病毒的增殖，結果產生高傳染性，並因此與 32℃條件相比較，降低了整個培養時間。相反的，32℃培養物結果在第 2 和第 3 天分別產生 80%和 50%的較高殘餘 OURs。最終的 HA 力價是類似的。然而，從藉著利用 NaBr 梯度之超離心的抗原分離實驗中，在 36℃條件之下在培養第 3 天，發生抗原的帶型轉變(圖 1B)，而藉著 UV 254 奈米偵測器測量到的沖提型態，結果產生可與 32℃培養物(圖 1A)同樣高但較對稱的高峰。從產量且主要是純度的觀點來看，36℃條件可能因此而有數個缺點。

關於目前的生產製程，從蔗糖梯度中收穫病毒抗原。因此對於 36℃實驗，可推論一部分抗原正轉變為低密度溶離份(圖 1B)。

實施例 2：在 32、33 和 34℃下生產流感 A/巴拿馬/2007/99

欲調查增加培養溫度對巴拿馬病毒產量和循環時間的

影響，分別以 32℃、33℃和 34℃的溫度設定，平行操作三個 10 公升生物反應器系統。所有其他的參數設定點都與在實施例 1 之下描述的實驗類似。

在表 2 中，提供三個生物反應器系統的循環處理時間。在達到 20%殘餘氧攝取率(代謝氧消耗降低 80%)之後，終止該培養物，並比較感染循環的動力學。對於 34℃實驗，可降低循環時間 21 小時。

表 2：以處理溫度為函數，達到 20%殘餘 OUR 所需之處理時間的比較(與感染循環之第 0 天相比較*)。

溫度	達到 20%殘餘 OUR 的處理時間(小時)
32℃	90
33℃	79
34℃	69

根據標準草案離心培養物上清液，並以核酸酶(Benzonase)和福馬林處理。藉著蔗糖梯度超離心純化經失活之收穫物(MVHs)(參見表 3)。

表 3：從來自溫度實驗之經蔗糖-梯度-純化之病毒中獲得的流感 A/巴拿馬/2007/99 抗原產量、SRD/蛋白質比例和 Vero-蛋白質雜質的比較。

生產條件	產量 (毫克 SRD)	SRD/蛋白質比例 (毫克/毫克)	Vero-蛋白質/SRD 比例 (毫克/毫克)
32℃	13.8	0.79	0.25
33℃	12.2	0.70	0.38
34℃	12.4	0.67	0.45

從表 2 中，可推論升高溫度條件結果導致降低循環時間。然而，如在表 3 中所示，升高溫度條件(例如 33℃和 34℃)對整體病毒抗原產量和經純化病毒之品質有負面的影響，如同藉著 SRD/蛋白質比例和 Vero-蛋白質/SRD 比例兩者所證明的。因此，觀察到在較高的溫度下，降低了病毒抗原的純度。

實施例 3：在 35℃下，利用早期病毒擴大生產流感 A/新喀里多尼亞/20/99

本實施例係關於在流感病毒生產製程的前 24 小時增加溫度設定的培養實驗。以 100 公升之規模，以 A/新喀里多尼亞/20/99 病毒感染 Vero 細胞培養物。

比較傳統的溫度型態(即在整個發酵製程中均為 32℃溫度設定點)和在 35℃下，利用早期病毒擴大的經修改製

程。該新穎製程之特徵在於在感染之後(p.i.)，在 35℃下進行最初的病毒複製 24 小時，接著在 32℃下培養直到 91 小時 p.i.。在表 4 中，提供得自以 100 公升規模進行之經蔗糖梯度純化之病毒的流感 A/新喀里多尼亞/20/99 抗原純度(SRD/蛋白質比例)和 Vero-蛋白質雜質的比較。

表 4：以不同的溫度型態為函數，流感 A/新喀里多尼亞/20/99 抗原純度(SRD/蛋白質比例)和 Vero-蛋白質雜質的比較。使用蔗糖梯度從溫度實驗中純化病毒。

生產條件	產量 (毫克 SRD/公升收穫物)	SRD/蛋白質比例(毫克/毫克)	Vero-蛋白質/SRD 比例(毫克/毫克)
32℃ 直到 95 小時 p.i.	1.4	0.24	0.59
35℃ 直到 24 小時 p.i./32℃ 直到 91 小時 p.i.	1.3	0.32	0.29

該數據清楚地證實發酵製程的前 24 小時在 35℃之溫度設定下，不僅對 SRD/蛋白質比例，還有對 Vero-蛋白質雜質均有正面的影響。隨著明顯經改良的雜質型態，可獲得類似的感染時間、類似的產量。

實施例 4：在 35℃下，利用早期病毒擴大生產流感 A/巴拿馬/2007/99

欲證實在實施例 3 中觀察到二-溫度製程的行為，使用相同的溫度型態，使流感 A/巴拿馬/2007/99 病毒在 100 公升 Vero 培養物中增殖。所有其他的條件和參數設定均根據實施例 3。

在表 5 中，比較來自以 100 公升規模進行之經蔗糖梯度純化之病毒的流感 A/巴拿馬/2007/99 抗原純度(SRD/蛋白質比例)和 Vero-蛋白質雜質。

表 5：流感 A/巴拿馬/2007/99 抗原純度(SRD/蛋白質比例)和 Vero-蛋白質雜質的比較。使用蔗糖梯度從溫度實驗中純化病毒。

生產條件	產量 (毫克 SRD/公升收穫物)	SRD/蛋白質 比例(毫克/毫克)	Vero-蛋白質/SRD 比例(毫克/毫克)
32℃直到 88 小時 p.i.	2.3	0.31	0.84
35℃直到 24 小時 p.i./32℃直到 67 小時 p.i.	1.9	0.45	0.11

在病毒複製的前 24 小時期間內，在 35℃下生產 A/巴拿馬/2007/99 病毒，隨後將溫度降低至 32℃，有數個勝過目前在 32℃之恆溫下處理的優點。通常，可改良流感病毒抗原的品質，如同藉著 SRD/蛋白質和 Vero-蛋白質/SRD 的比例所證明的。伴隨著明顯降低的感染時間，產量稍微降低，但雜質特徵，尤其是 Vero 細胞蛋白質之相對含量，明顯是更佳的。

流感病毒抗原純度是製造流感疫苗的重要因素。關於流感病毒在 Vero 細胞中的複製，通常認可用以切開前驅物血球凝集素的蛋白水解條件和適當的溫度條件，是某些重要的因素。在本文提出的代表性實驗中，證實在病毒複製的早期，使溫度升高的溫度型態，結果在蔗糖梯度步驟中產生了經改良之抗原。此外，在前 24 小時在 35℃下生產流感病毒，對循環時間而言符合較佳的製程性能。使用流感 A/巴拿馬/2007/99 和 A/新喀里多尼亞/20/99 作為模式系統，以證明二-溫度病毒增殖的有效。因此，得自以 10 和

100 公升規模之培養實驗的結果指出在病毒增殖製程的大約前 24 小時，從 32℃改變成 35℃的益處。

實施例 5：在 35℃下 18 小時 p.i.對 36 小時 p.i.，接著在 32℃下直到病毒增殖結束，利用早期病毒擴大生產流感 A/廣島/52/2005

本實施例顯示關於以流感 A/廣島/52/2005 病毒感染 50 公升 Vero 培養物，改變高-溫循環的期間，對抗原產量、SRD/蛋白質比例和 Vero 蛋白質/SRD 比例的影響。對於兩個不同的試樣，在將溫度降低至 32℃之前，分別維持 35℃之溫度 18 小時 p.i.和 36 小時 p.i.。收穫含有病毒的上清液，使其失活並藉著超離心純化。

在表 6 中，比較來自以 50 公升規模進行之經蔗糖梯度純化之病毒的流感 A/廣島/52/2005 抗原純度(SRD/蛋白質比例)和 Vero-蛋白質雜質。

表 6：流感 A/廣島/52/2005 抗原產量、純度(SRD/蛋白質比例)和 Vero-蛋白質雜質的比較。使用蔗糖梯度從溫度實驗中純化病毒。

生產條件	產量 (毫克 SRD/公升收穫物)	SRD/蛋白質 比例(毫克/毫克)	Vero-蛋白質/SRD 比例(毫克/毫克)
35℃18 小時 p.i./32℃ 直到結束(58 小時 p.i.)	3.7	1.16	0.02
35℃36 小時 p.i./32℃ 直到結束(58 小時 p.i.)	4.8	1.12	0.02

分別在 35℃18 小時和 36 小時 p.i.下生產流感 A/廣島/52/2005 病毒，結果產生類似的產量和純度型態(表 6)。從這些結果，可推論在雙重溫度型態中，可廣泛地改變在早期病毒增殖之期間增加溫度的期間，以及降低溫度直到收穫的期間。

實施例 6：在早期病毒擴大時利用不同的溫度(34℃、35℃和 36℃)18 小時 p.i.，接著降低 3℃(至 31℃、32℃和 33℃)直到結束病毒增殖，生產流感 B/馬來西亞/2506/2004

本實施例係關於在以流感 B/馬來西亞/2506/2004 病毒感染 32 公升到 80 公升 Vero 培養物時，在病毒增殖期間使用不同的雙重溫度型態。維持 34℃、35℃和 36℃之較高溫度 18 小時 p.i.，之後分別降低 3℃至 31℃、32℃和 33℃。收穫含有病毒之上清液，使其失活並藉著超離心純化。

在表 7 中，對於不同的溫度型態，比較來自以 32 公升至 80 公升規模進行之經蔗糖梯度純化之病毒的流感 B/馬

來西亞/2506/2004 抗原產量、純度(SRD/蛋白質比例)和 Vero-蛋白質雜質。

表 7：流感 B/馬來西亞/2506/2004 抗原產量、純度(SRD/蛋白質比例)和 Vero-蛋白質雜質的比較。使用蔗糖梯度從溫度實驗中純化病毒。

生產條件	產量 (毫克 SRD/公升收穫物)	SRD/蛋白質 比例(毫克/毫克)	Vero-蛋白質/SRD 比例(毫克/毫克)
36℃18 小時 p.i./33℃ 直到結束(69 小時 p.i.) (32 公升生物反應器)	7.3	0.31	0.06
35℃18 小時 p.i./32℃ 直到結束(70 小時 p.i.) (80 公升生物反應器)	8.0	0.39	0.05
34℃18 小時 p.i./31℃ 直到結束(70 小時 p.i.) (32 公升生物反應器)	7.3	0.36	0.04

在 34℃到 36℃下 18 小時 p.i.，接著降低 3℃直到病毒增殖結束，產生流感 B/馬來西亞/2506/2004 病毒，結果產生類似的產量和純度型態(表 7)。從這些結果中，可推論在雙重溫度型態中，可廣泛地改變在早期病毒增殖期間增加溫度的範圍，以及直到收穫時降低溫度的範圍。

實施例 7：在早期病毒擴大時利用不同的溫度(35.5℃、35℃和 36.5℃)18 小時 p.i.，接著降低 3℃(至 30.5℃、32℃和 33.5℃)直到結束病毒增殖，生產流感 A/索羅門群島/3/2006

本實施例係關於在以流感 A/索羅門群島/3/2006 病毒感染 32 公升到 50 公升 Vero 培養物時，在病毒增殖期間使用不同的溫度型態。維持 33.5℃、35℃和 36.5℃之較高溫度 18 小時 p.i.，之後分別降低 3℃至 30.5℃、32℃和 33.5℃。收穫含有病毒之上清液，使其失活並藉著超離心純化。

在表 8 中，比較來自以 32 公升至 50 公升規模進行之經蔗糖梯度純化之病毒的流感 A/索羅門群島/3/2006 抗原產量、純度(SRD/蛋白質比例)和 Vero-蛋白質雜質。

表 8：流感 A/索羅門群島/3/2006 抗原產量、純度(SRD/蛋白質比例)和 Vero-蛋白質雜質的比較。使用蔗糖梯度從溫度實驗中純化病毒。

生產條件	產量 (毫克 SRD/公升收穫物)	SRD/蛋白質比例(毫克/毫克)	Vero-蛋白質/SRD 比例(毫克/毫克)
36.5℃ 18 小時 p.i./33.5℃ 直到結束(54 小時 p.i.) (32 公升生物反應器)	4.0	0.53	0.05
35℃ 18 小時 p.i./32℃ 直到結束(55 小時 p.i.) (50 公升生物反應器)	3.2	0.72	0.03
33.5℃ 18 小時 p.i./30.5℃ 直到結束(69 小時 p.i.) (50 公升生物反應器)	3.0	0.74	0.02

在 33.5℃、35℃和 36.5℃下 18 小時 p.i.，接著分別降低 3℃直到病毒增殖結束，產生流感 A/索羅門群島/3/2006 病毒，結果產生類似的產量和純度型態(表 8)。在升高溫度下較高的產量，亦導致降低純度，然而這些雜質隨著降

低 3℃在病毒增殖結束時，仍維持相對較低的水平。利用降低溫度(例如 33.5℃/30.5℃)之雙重溫度型態，可達到類似的產量，然而達到這些類似產量卻需要較長的病毒增殖之循環時間(其仍低於 70 小時)。利用較低的溫度範圍，包括 3℃溫度轉變(亦參見表 7，關於在 34℃/31℃下的 B/馬來西亞)典型地改良了純度型態，尤其是宿主細胞專一的 Vero-蛋白質。從這些結果中，對於流感 A 和 B 品系兩者，皆可推論在雙重溫度型態中，可廣泛地改變在早期病毒增殖期間增加溫度的範圍，以及直到收穫時降低溫度的範圍。

實施例 8：生產羅斯河病毒

在不同的溫度下，在 2 公升反應器中生產羅斯河病毒("RRV")。所調查之溫度為 37℃、35℃、32℃，以及 35℃持續 30 小時，並在 30 小時後變成 32℃，直到在 90 小時 p.i. 之後的感染結束。決定動力學參數，並以下列的時間間隔(按小時計)收集試樣：I-18、I-42、I-42、I-54、I-66、I-76 和 I-90。以 20 微升/毫升福馬林 1.85%處理供 NaBr 分析用的試樣，並在 37℃下培養 48 小時。在病毒增殖期間測量殘餘氧攝取率(OUR)，以監視經感染細胞的代謝活性。藉著微載體培養物的顯微鏡影像，定量細胞脫離率。亦判定 TCID50(50%組織培養物感染劑量)。

在感染前的條件為 pH7.1 PBS 和 20%pO_2、1.0 克/公升葡萄糖。在 I-18 加入 1.0 克/公升葡萄糖，並停止灌注。若

葡萄糖降低至1.0克/公升以下，便在I-42之後加入葡萄糖。在表9中出示結果。

離心條件：　I-18：5000g

I-42到I-66：10000g

I-78到I-90：15000g

表 9：

RRV 37℃	葡萄糖 [克/公升]	HA [HAU/50 微升]	TCID50 [對數/毫升]	OD 254 奈米 [奈米]	OD 610 奈米 [奈米]	細胞脫離 [%]	殘餘 OUR [%]	峰高度 [1/10 寬度]
I-18	2.20	5	6.68E07			11.2		
I-42	1.65	8	1.46E09			100		
I-53	1.38	7	1.20E09	6.273	0.0158	100	50(±10%)	6.5
I-66	1.21	8	1.95E09	5.993	0.0113	100	15(±5%)	4.5
I-76	1.27	7	4.12E07	5.597	0.0260	100	2	5
I-90	1.25	7	6.68E06	5.811	0.0136	100	0	7
RRV 35℃	葡萄糖 [克/公升]	HA [HAU/50 微升]	TCID50 [對數/毫升]	OD 254 奈米 [奈米]	OD 610 奈米 [奈米]	細胞脫離 [%]	殘餘 OUR [%]	峰高度 [1/10 寬度]
I-18	2.38	4	1.46E08			18		
I-42	1.90	7	1.95E09			100		
I-53	1.95	6	4.37E08	5.894	0.0125	100	55(±10%)	5.5
I-66	1.63	7	1.46E08	7.187	0.0131	100	30(±5%)	4
I-76	1.72	7	1.10E08	5.942	0.0198	100	6	5
I-90	1.71	7	1.62E07	6.570	0.0160	100	0	2
RRV 32℃	葡萄糖 [克/公升]	HA [HAU/50 微升]	TCID50 [對數/毫升]	OD 254 奈米 [奈米]	OD 610 奈米 [奈米]	細胞脫離 [%]	殘餘 OUR [%]	峰高度 [1/10 寬度]
I-18	2.55	2	1.20E07			2		
I-42	2.35	8	3.12E09			14		
I-53	1.81	7	5.18E09	5.777	0.0118	49	75(±10%)	7
I-66	1.43	8	2.68E09	5.601	0.0107	100	50(±5%)	3.5
I-76	1.28	7	1.10E09	6.230	0.0173	100	20	7.5
I-90	1.13	6	6.68E08	5.042	0.0139	100	6	7
RRV 35/32℃	葡萄糖 [克/公升]	HA [HAU/50 微升]	TCID50 [對數/毫升]	OD 254 奈米 [奈米]	OD 610 奈米 [奈米]	細胞脫離 [%]	殘餘 OUR [%]	峰高度 [1/10 寬度]
I-18	2.42	5	8.86E07			7		
I-42	2.32	8	3.08E09			25		
I-53	1.89	8	4.37E09	5.540	0.0138	97	60(±10%)	8
I-66	1.68	8	4.12E09	5.991	0.0109	100	50(±5%)	5.5
I-76	1.51	8	2.67E09	6.513	0.0212	100	25	8
I-90	1.41	6	8.86E07	5.453	0.0622	100	5	7

按 4 個間隔，在圖 2 到 5 中提供所有四個培養的 NaBr 圖(A：54 小時，B：66 小時，C：78 小時，D：90 小時)。

利用下列的抗體進行西方墨點法：(1)RR (ATCCVR373)，高度免疫腹水液，老鼠；N.I.H.(1:1000)，和(2)抗-老鼠 IgG，Sigma，目錄第 A-4656 號，批號：63H8830 (1:5000)。在圖 6 中根據表 10 提供結果。

表 10：

跑道	探針	體積[微升]
1	標記	10
2	RRV 陽性對照組	20
3	RRV 37℃ I-54	20
4	RRV 37℃ I-66	20
5	RRV 37℃ I-78	20
6	RRV 35℃/32℃ I-54	20
7	RRV 35℃/32℃ I-66	20
8	RRV 35℃/32℃ I-78	20
9	RRV 35℃/32℃ I-90	20
10	陰性對照組(小球)	20

在兩個高溫接種(37℃和 35℃)下，隨著在 42 小時後的 100%細胞脫離率，以及在 53 小時後的大約 50%殘餘 O_2，大大地增加了感染動力學。利用較低溫度(32℃和 35℃/32℃)的方法，相比較之下是較低的。這在 I-18 時的力價分析上亦是明顯的。然而，在 I-42 之後，所有的方法均達到

大約 1E09 TCID50/毫升。利用較低溫度之方法，在接近感染結束時顯示較穩定的力價(>1E09 TCID50/毫升直到 I-76)。在兩個方法中，直到 I-76，可測量到 20%的殘餘 OUR。在所有的實驗中，均在 I-53 之後，在 NaBr-梯度中達到最大的峰高度，然而在 35℃接種時，在所有的 I-66 試樣以及 I-90 測量到較低的高峰。在 37℃和 35℃實驗的期間，因為增加溫度，使葡萄糖含量很快地下降。因為增加的感染動力學，之後可確定沒有代謝活性。在所有的實驗中，葡萄糖含量在結束時都是類似的。

僅在二階段溫度實驗(35℃直到 I-30，然後 32℃)的期間內，確立在開始時的快速病毒增殖，以及直到感染結束的穩定力價。在這些條件下，在直到 I-78 仍是穩定的 NaBr 梯度實驗中，測量到最高的高峰。對於 35℃/32℃實驗，亦在西方墨點法中偵測到較穩定的譜帶。

實施例 9：西尼羅病毒實驗

在不同的溫度下，在 2 公升反應器中生產西尼羅病毒。所調查之溫度為 35℃、32℃，以及 35℃持續 30 小時，並在 30 小時後變成 32℃，直到感染結束。收集 90 小時的動力學參數。以下列的時間間隔(按小時計)收集試樣：I-18、I-30、I-42、I-52、I-66、I-74 和 I-90。以 20 微升/毫升福馬林 1.85%處理供 NaBr 分析用的試樣，並在 37℃下培養 48 小時。在感染前的條件為 pH7.1、20%pO_2和 1.0 克/公升葡萄糖。在 I-18 加入 1.0 克/公升葡萄糖，並停止灌注。在表

11 和圖 7-9 中提供結果，顯示 NaBr 圖和顯微鏡影像。藉著微載體培養物的這些顯微鏡影像，定量細胞脫離率。

WN 35.0℃	葡萄糖 [克/公升]	TCID50 [對數/毫升]	殘餘福馬林 [微克/毫升]	細胞脫離 [%]
I-18	2.18	8.86E+07		14.9
I-30	2.75	1.46E+09	116	12.9
I-42	0.94	1.20E+10	137	32.9
I-52	0.21	6.68E+09	119	80.6
I-66	0.24	8.86E+09	127	98.4
I-74	0.00	3.12E+09	125	100.0
I-90	0.11	6.68E+06	130	100.0
WN 32℃	葡萄糖 [克/公升]	TCID50 [對數/毫升]	殘餘福馬林 [微克/毫升]	細胞脫離 [%]
I-18	2.37	5.16E+06		17.9
I-30	3.37	1.62E+08	127	9.9
I-42	2.34	5.18E+09	136	21.9
I-52	1.43	4.12E+09	117	26.9
I-66	0.22	8.86E+09		81.6
I-74	0.00	1.20E+10	116	92.9
I-90	0.37	6.38E+09	135	100.0
WN 35℃ /32℃	葡萄糖 [克/公升]	TCID50 [對數/毫升]	殘餘福馬林 [微克/毫升]	細胞脫離 [%]
I-18	2.12	5.18E+06		20.5
I-30	2.80	1.95E+09	118	13.9
I-42	1.56	1.10E+10	141	18.9
I-52	0.55	8.86E+09	118	35.0
I-66	0.00	8.86E+09	127	94.0
I-74	0.00	6.68E+09		100.0
I-90	0.19	1.46E+08		100.0

【圖式簡單說明】

圖 1：在(A)32℃和(B)36℃下，在 Vero 細胞中增殖之新喀里多尼亞病毒(New Caledonia Virus)的抗原染色體帶型。

圖 2：在 37℃下，在感染後的各種時間點，羅斯河病

毒感染的 NaBr 圖。

圖 3：在 35℃下，在感染後的各種時間點，羅斯河病毒感染的 NaBr 圖。

圖 4：在 32℃下，在感染後的各種時間點，羅斯河病毒感染的 NaBr 圖。

圖 5：在 35℃/32℃下，在感染後的各種時間點，羅斯河病毒感染的 NaBr 圖。

圖 6：在 37℃和 35℃/32℃下，感染之羅斯河病毒接種物的西方墨點。

圖 7：在 35℃下，在感染後的各種時間點，西尼羅病毒感染的 NaBr 圖，附帶顯微鏡影像。

圖 8：在 32℃下，在感染後的各種時間點，西尼羅病毒感染的 NaBr 圖，附帶顯微鏡影像。

圖 9：在 35℃/32℃下，在感染後的各種時間點，西尼羅病毒感染的 NaBr 圖，附帶顯微鏡影像。

【主要元件符號說明】

無

五、中文發明摘要：

本發明係提供生產病毒的方法。該方法包括提供一宿主細胞，其已經被該病毒感染，並在兩個不同的溫度下培養該經感染之宿主細胞。隨後收集藉著該培養步驟產生之病毒。藉著使用雙重溫度培養製程，可獲得高力價和經改良之純度。

六、英文發明摘要：

The present invention provides a method for the production of a virus. The method includes providing a host cell that has been infected by the virus and cultivating the infected host cell at two different temperatures. The virus produced by the cultivation steps is subsequently collected. By using the dual temperature cultivation process, high titer and improved purity can be obtained.

十、申請專利範圍：

1.一種生產病毒的方法，該方法包括

提供已經被該病毒感染之宿主細胞，

在範圍從 31℃到 37℃的第一個溫度下培養該經感染之宿主細胞 1 到 48 小時，

隨後在比該第一個溫度低 1℃到 6℃的第二個溫度下培養該經感染之宿主細胞，並

收集由該培養步驟產生的病毒副本。

2.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該病毒為正黏液病毒、α病毒或黃病毒。

3.如申請專利範圍第 2 項之方法，其中該病毒為流感病毒。

4.如申請專利範圍第 3 項之方法，其中該病毒係選自 A 型和 B 型流感病毒。

5.如申請專利範圍第 2 項之方法，其中該病毒為羅斯河病毒（Ross River Virus）。

6.如申請專利範圍第 2 項之方法，其中該病毒為西尼羅病毒（West Nile Virus）。

7.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該宿主細胞係動物細胞培養物或細胞株。

8.如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該宿主細胞為上皮細胞。

9.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該宿主細胞為腎臟上皮細胞。

10.如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該宿主細胞為 Vero 細胞。

11.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該第一個溫度範圍是從 32℃到 37℃。

12.如申請專利範圍第 11 項之方法，其中該第一個溫度範圍是從 33℃到 36℃。

13.如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該第一個溫度範圍是從 34℃到 35.5℃。

14.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該第二個溫度比該第一個溫度低 1.5℃到 5℃。

15.如申請專利範圍第 14 項之方法，其中該第二個溫度比該第一個溫度低 2℃到 4℃。

16.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該第二個溫度範圍是從 29℃到 35℃。

17.如申請專利範圍第 16 項之方法，其中該第二個溫度範圍是從 30℃到 34℃。

18.如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該第二個溫度範圍是從 31℃到 33℃。

19.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中在接種之後直接培養該宿主細胞。

20.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該病毒為破碎的。

21.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該病毒為失活的。

22.如申請專利範圍第 1 項之方法，更包括製備該病毒之疫苗的步驟。

23.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中在第一個溫度下的該培養持續至少 2 小時。

24.一種生產病毒或病毒抗原的方法，其中從根據申請專利範圍第 1 項生產之病毒中，獲得該所生產之病毒或病毒抗原，並分離該所生產之病毒或病毒抗原。

十一、圖式：

如次頁

22.如申請專利範圍第 1 項之方法，更包括製備該病毒之疫苗的步驟。

23.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中在第一個溫度下的該培養持續至少 2 小時。

24.一種生產病毒或病毒抗原的方法，其中從根據申請專利範圍第 1 項生產之病毒中，獲得該所生產之病毒或病毒抗原，並分離該所生產之病毒或病毒抗原。

十一、圖式：

如次頁

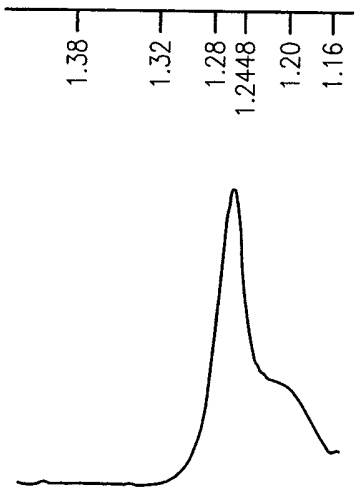


圖. 1A

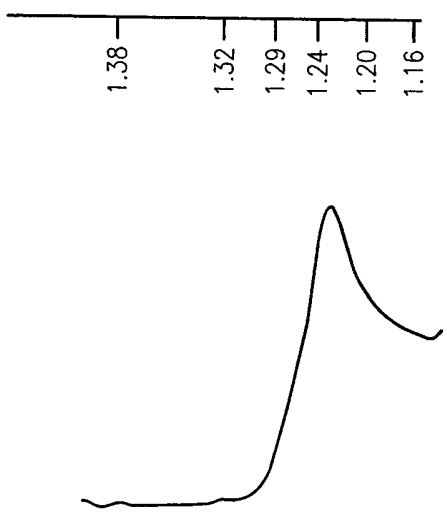


圖. 1B

RRV 37°C I-54

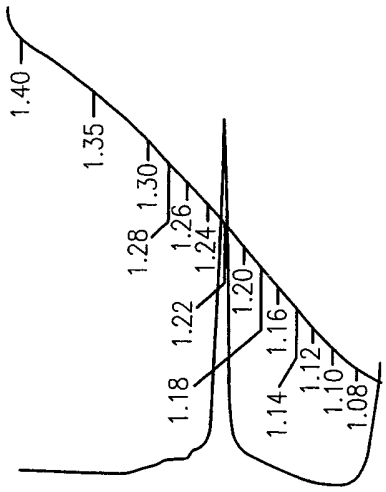


圖. 2A

RRV 37°C I-66

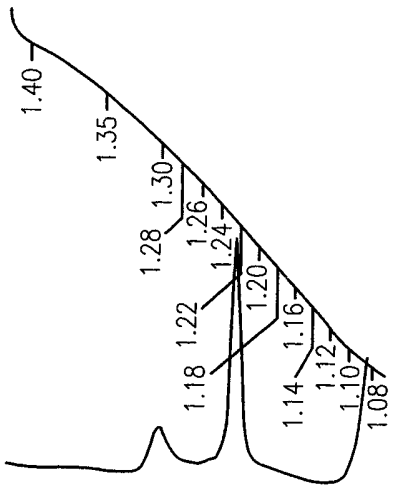


圖. 2B

RRV 37°C I-78

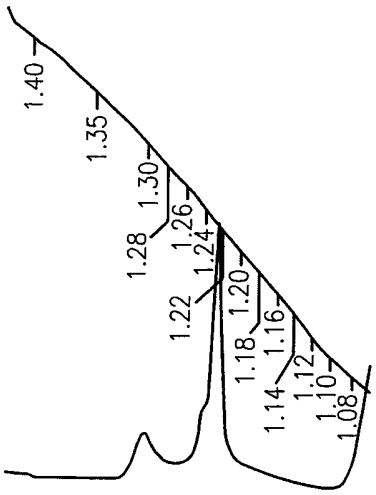


圖. 2C

RRV 37°C I-90

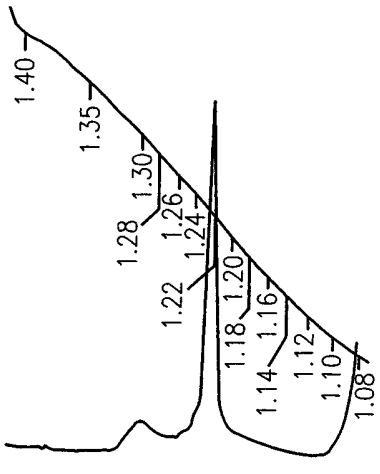


圖. 2D

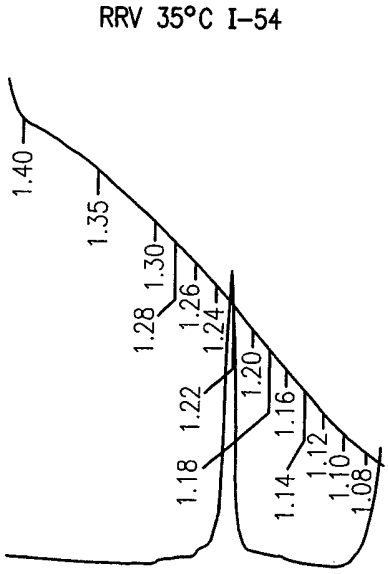


圖 . 3A

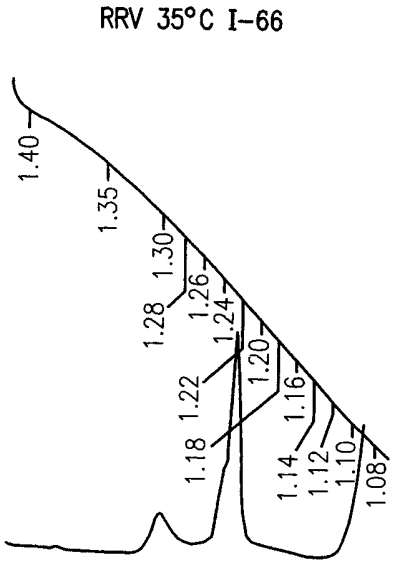


圖 . 3B

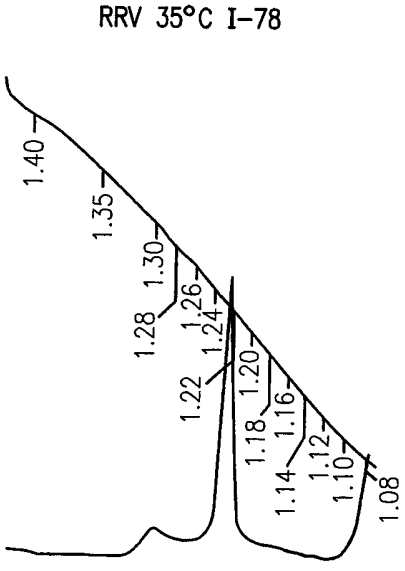


圖 . 3C

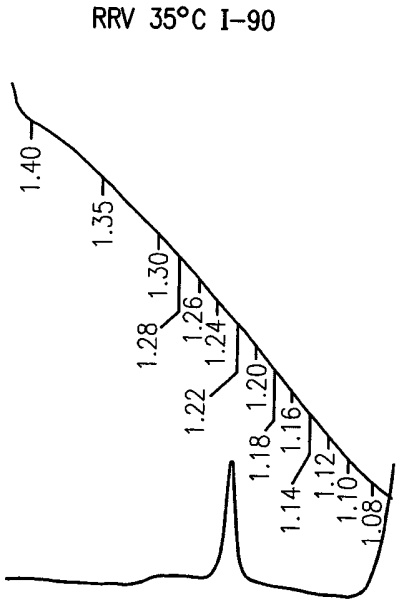


圖 . 3D

RRV 32°C I-54

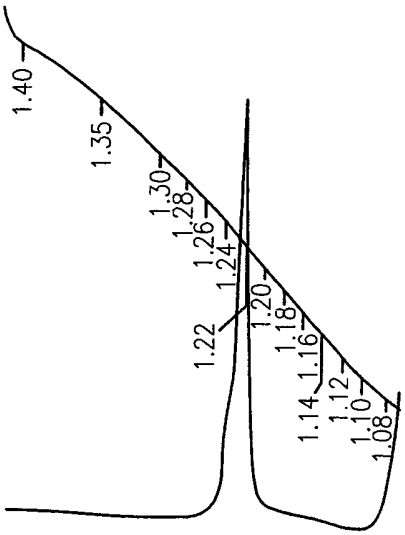


圖 .4A

RRV 32°C I-66

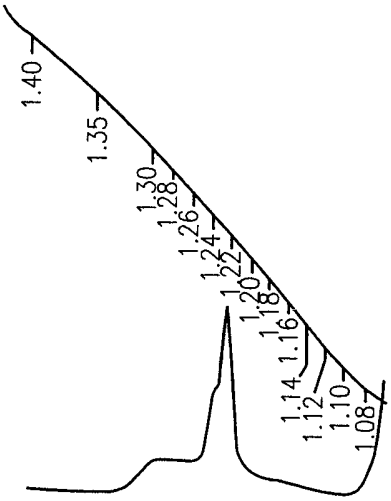


圖 .4B

RRV 32°C I-78

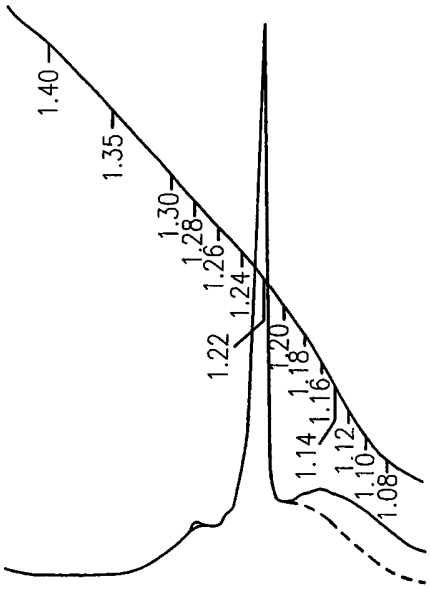


圖 .4C

RRV 32°C I-90

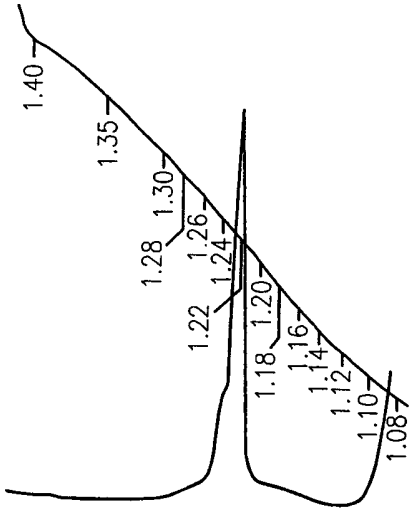


圖 .4D

RRV 35°C/32°C I-54

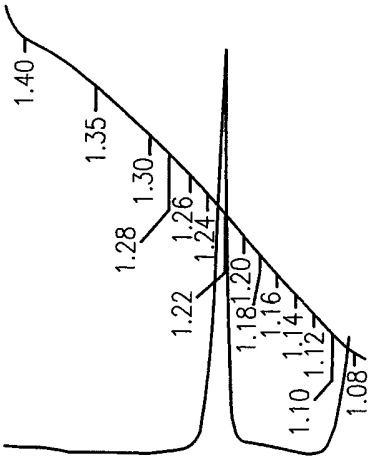


圖 .5A

RRV 35°C/32°C I-66

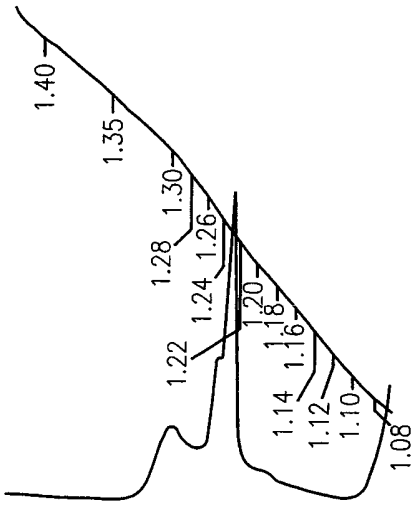


圖 .5B

RRV 35°C/32°C I-78

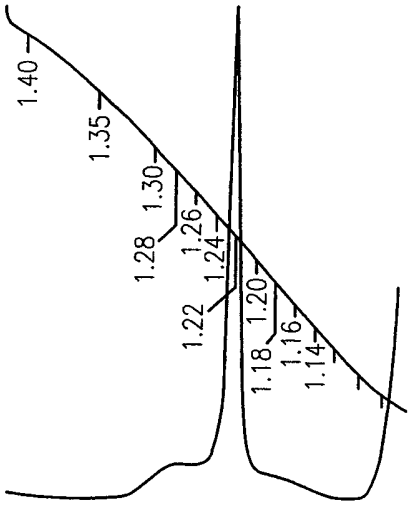


圖 .5C

RRV 35°C/32°C I-90

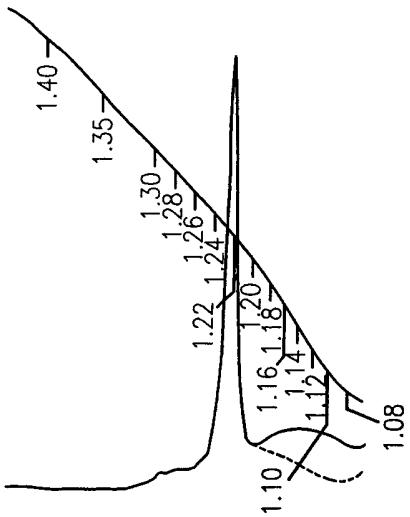


圖 .5D

七、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

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無