



(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 201109440 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：099124030

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 07 月 21 日

(51)Int. Cl.：

C12N7/04 (2006.01)

C12N15/86 (2006.01)

(30)優先權：2009/07/21

歐洲專利局

09305690.1

2009/11/25

美國

61/264,299

(71)申請人：轉殖基因公司 (法國) TRANSGENE S. A.

(FR)

法國

(72)發明人：馬瑞吉藍諾 馬汀尼 MARIGLIANO, MARTINE (FR)；雷蒙德 賈桂琳

REYMUND, JACQUELINE (FR)；聖瑪麗 馬汀尼 SAINTE-MARIE, MARTINE

(FR)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：0 共 57 頁

(54)名稱

用於雞胚胎之消化作用的酵素組合物

ENZYMATIC COMPOSITION FOR THE DIGESTION OF CHICKEN EMBRYOS

(57)摘要

本發明係關於用於雞胚胎之消化作用的酵素組合物，該等雞胚胎意欲用於製備用於製造病毒之細胞。本發明亦係關於製造野生型、減毒及/或重組病毒之方法，其包括使用本發明酵素組合物自雞胚胎製備細胞之步驟。本發明係關於所獲得純化野生型、減毒及/或重組病毒；且係關於包含該病毒之醫藥組合物，較佳為疫苗，其用於治療及/或預防癌症、傳染病及/或自體免疫病症；且係關於該病毒之用途。



(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 201109440 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：099124030

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 07 月 21 日

(51)Int. Cl. : *C12N7/04 (2006.01)* *C12N15/86 (2006.01)*

(30)優先權：2009/07/21 歐洲專利局 09305690.1
2009/11/25 美國 61/264,299

(71)申請人：轉殖基因公司 (法國) TRANSGENE S. A. (FR)
法國

(72)發明人：馬瑞吉藍諾 馬汀尼 MARIGLIANO, MARTINE (FR)；雷蒙德 賈桂琳
REYMUND, JACQUELINE (FR)；聖瑪麗 馬汀尼 SAINTE-MARIE, MARTINE
(FR)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：0 共 57 頁

(54)名稱

用於雞胚胎之消化作用的酵素組合物

ENZYMATIC COMPOSITION FOR THE DIGESTION OF CHICKEN EMBRYOS

(57)摘要

本發明係關於用於雞胚胎之消化作用的酵素組合物，該等雞胚胎意欲用於製備用於製造病毒之細胞。本發明亦係關於製造野生型、減毒及/或重組病毒之方法，其包括使用本發明酵素組合物自雞胚胎製備細胞之步驟。本發明係關於所獲得純化野生型、減毒及/或重組病毒；且係關於包含該病毒之醫藥組合物，較佳為疫苗，其用於治療及/或預防癌症、傳染病及/或自體免疫病症；且係關於該病毒之用途。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於病毒製造領域。具體而言，本發明係關於用於消化雞胚胎之酵素組合物，該等雞胚胎意欲用於製備用於製造病毒之細胞。

【先前技術】

諸如減毒或重組病毒等大多數病毒性疫苗係自原代或次代雞細胞產生，例如雞胚胎成纖維細胞(CEF)、雞胚胎腎細胞(CEKC)或雞胚胎肝細胞(CELC)。原代CEF尤其用於產生日本腦炎病毒疫苗(由(例如)Pasteur Merieux製造)、黃熱病病毒疫苗(由(例如)Arlvax製造)、流感病毒疫苗(由(例如)Medeva Pharmaceuticals製造)、麻疹及風疹病毒疫苗(由(例如)Merck製造)及經修飾牛痘病毒安卡拉(modified Vaccinia virus Ankara) (MVA)疫苗。

已研發出若干種自原代組織生成細胞製劑之方法。該等方法涉及使用機械解離、酶促解離或二者之組合。機械解離包括(例如)用解剖刀刮削胚胎、切碎胚胎或以物理方式切開胚胎。過度機械解離經常導致大量細胞死亡及細胞損傷。此外，由於個體之間解離效率不同，某些機械解離方案的手動性(例如手動實施的研磨)經常使得來自不同來源之量測值(例如細胞活力)難以比較。事實上，此程序的手動性可導致兩個原本相同之樣品的物理性質(例如細胞濃度、細胞活力、細胞尺寸分佈)產生差異。為避免機械解離之負面作用，使用來自牛胰腺之胰蛋白酶。不幸的是，

來自牛胰腺之胰蛋白酶可能含有諸如病毒等病原體。因此，該等病原體存在傳播至欲使用該疫苗治療或接種之動物或人類體內的潛在風險。與常用牛胰腺胰蛋白酶相關之多種可能的主要問題中之一者係可能會將引發牛海綿狀腦病(BSE)之病原體傳播至要與自細胞培養物製造之產物接觸之動物或人類中。因此，已研發出重組胰蛋白酶用於自原代或次代細胞製造疫苗。

國際專利申請案WO 2004/022729闡述在原代CEF上擴增痘病毒之方法，其中該等CEF得自在無血清培養基及室溫下經預熱(37°C)胰蛋白酶-EDTA溶液處理15分鐘之雞胚胎。

國際專利申請案WO 2006/116803闡述自哺乳動物胚胎製造幹細胞之方法，其中可端視胚胎大小將該等胚胎在預熱胰蛋白酶溶液中浸沒5至60分鐘。

自原代雞細胞製造疫苗之一主要問題係足量胚胎之供應。為減少所需胚胎數，需要可以自每個胚胎提取最大數量細胞來獲得細胞製劑之酵素組合物。本發明提供該等組合物。更具體而言，本發明提供用於雞胚胎之消化作用之酵素組合物，其可以自每個胚胎提取超過 500×10^6 個細胞來獲得細胞製劑。此外，本發明酵素組合物能消化未預先解剖之雞胚胎。

【發明內容】

除非上下文明確表示其他含義，否則通篇申請案中所用「一(a及an)」之含義意指「至少一」、「至少第一」、「一或

多」或「複數個」所提及組份或步驟。

通篇申請案中所用「及/或」在本文中之任一處皆包括以下含義：「及」、「或」及「與該術語相關之要素的所有或任一其他組合」。

通篇申請案中所用「包含(comprising及comprise)」欲意指產物、組合物及方法包括所提及組份或步驟，但不排除其他組份或步驟。「基本由.....組成」在用於界定產物、組合物及方法時應意指排除其他具有任何重要意義之組份或步驟。因此，基本上由所述組份組成之組合物可不排除痕量污染物及醫藥上可接受之載劑。「由.....組成」應意指排除大於痕量之其他組份或步驟要素。

通篇申請案中所用「約」或「大致」在本文中用於意指與給定值或範圍相差20%、較佳10%、且更佳5%。

本發明係關於用於消化雞胚胎之酵素組合物，該等雞胚胎欲用於製備細胞。根據一特定實施例，該等細胞可用於製造病毒。

本發明更具體而言係關於用於消化雞胚胎以獲得雞細胞製劑之酵素組合物之用途。

令人驚訝地，本發明酵素組合物可獲得包括自每個胚胎所提取的超過 500×10^6 個細胞之雞細胞製劑。就此而言，本發明更具體而言係關於用於雞胚胎之消化作用的酵素組合物，其可獲得包括自每個胚胎所提取的超過 500×10^6 個細胞之雞細胞製劑。

本發明酵素組合物包含至少2種酶。本發明組合物中所

含酶選自由以下組成之群：胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶原、胰凝乳蛋白酶原、分散酶、膠原酶、accutase、嗜熱菌蛋白酶、鏈黴蛋白酶、透明質酸酶、彈性蛋白酶、木瓜酶、神經胺酸酶及胰酶。本發明組合物中所含酶較佳選自由以下組成之群：胰蛋白酶、分散酶、膠原酶及Accutase。就此而言，本發明更具體而言係關於用於消化雞胚胎之酵素組合物，其中該酵素組合物包含至少2種選自由以下組成之群之酶：胰蛋白酶、分散酶、膠原酶及Accutase。

根據本發明一較佳實施例，本發明酵素組合物選自由以下組成之群：

- 胰蛋白酶、分散酶及膠原酶；
- 胰蛋白酶、分散酶及Accutase；
- 胰蛋白酶、分散酶、膠原酶及Accutase；
- 胰蛋白酶及分散酶；及
- 分散酶及Accutase。

根據本發明一特定實施例，本發明酵素組合物選自由以下組成之群：

- 以等效於30 mL/胚胎之TrypLE Select(Invitrogen，目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶、及10 mL/胚胎之20 mg/mL膠原酶；
- 以等效於10 mL/胚胎之TrypLE Select(Invitrogen，目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/

胚胎之10 mg/mL分散酶、及10 mL/胚胎之20 mg/mL
膠原酶；

- 以等效於15 mL/胚胎之TrypLE Select(Invitrogen，
目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/
胚胎之10 mg/mL分散酶、及以等效於10 mL/胚胎之
Accutase(Sigma，目錄號A-6964)之濃度添加之
Accutase；
- 以等效於15 mL/胚胎之TrypLE Select(Invitrogen，
目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/
胚胎之10 mg/mL分散酶、10 mL/胚胎之20 mg/mL膠
原酶、及以等效於10 mL/胚胎之Accutase(Sigma，
目錄號A-6964)之濃度添加之Accutase；
- 以等效於30 mL/胚胎之TrypLE Select(Invitrogen，
目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/
胚胎之10 mg/mL分散酶、及以等效於10 mL/胚胎之
Accutase(Sigma，目錄號A-6964)之濃度添加之
Accutase；
- 以等效於10 mL/胚胎之TrypLE Select(Invitrogen，
目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/
胚胎之10 mg/mL分散酶、及5 mL/胚胎之20 mg/mL
膠原酶；
- 以等效於30 mL/胚胎之TrypLE Select(Invitrogen，
目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/
胚胎之10 mg/mL分散酶、10 mL/胚胎之20 mg/mL膠

原酶、及以等效於10 mL/胚胎之Accutase(Sigma, 目錄號A-6964)之濃度添加之Accutase;

- 以等效於10 mL/胚胎之TrypLE Select(Invitrogen, 目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶、及以等效於10 mL/胚胎之Accutase(Sigma, 目錄號A-6964)之濃度添加之Accutase;
- 以等效於15 mL/胚胎之TrypLE Select(Invitrogen, 目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、及5 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶;
- 以等效於30 mL/胚胎之TrypLE Select(Invitrogen, 目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、及10 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶;
- 以等效於10 mL/胚胎之TrypLE Select(Invitrogen, 目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、及10 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶;
- 10 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶、及10 mL/胚胎之Accutase; 及
- 以等效於5 mL/胚胎之TrypLE Select(Invitrogen, 目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、及15 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶。

根據本發明另一特定實施例，本發明酵素組合物選自由以下組成之群：

- 以等效於30 mL/胚胎之TrypLETM Select (Invitrogen,

目錄號 12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶(Invitrogen，目錄號 17105-041)、及10 mL/胚胎之20 mg/mL膠原酶III(Gibco Invitrogen，目錄號 17102)；

- 以等效於 10 mL/胚胎之 TrypLE™ Select (Invitrogen，目錄號 12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶(Invitrogen，目錄號 17105-041)、及10 mL/胚胎之20 mg/mL膠原酶III(Gibco Invitrogen，目錄號 17102)；
- 以等效於 15 mL/胚胎之 TrypLE™ Select (Invitrogen，目錄號 12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶(Invitrogen，目錄號 17105-041)、及以等效於 10 mL/胚胎之 Accutase™(Sigma，目錄號 A-6964)之濃度添加之 Accutase；
- 以等效於 15 mL/胚胎之 TrypLE™ Select (Invitrogen，目錄號 12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶(Invitrogen，目錄號 17105-041)、10 mL/胚胎之20 mg/mL膠原酶III (Gibco Invitrogen，目錄號 17102)、及以等效於 10 mL/胚胎之 Accutase™(Sigma，目錄號 A-6964)之濃度添加之 Accutase；
- 以等效於 30 mL/胚胎之 TrypLE™ Select (Invitrogen，目錄號 12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶

酶、10 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶(Invitrogen，目錄號17105-041)、及以等效於10 mL/胚胎之AccutaseTM(Sigma，目錄號A-6964)之濃度添加之Accutase；

- 以等效於10 mL/胚胎之TrypLETM Select (Invitrogen，目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶(Invitrogen，目錄號17105-041)、及5 mL/胚胎之20 mg/mL膠原酶III (Gibco Invitrogen，目錄號17102)；
- 以等效於30 mL/胚胎之TrypLETM Select (Invitrogen，目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶(Invitrogen，目錄號17105-041)、10 mL/胚胎之20 mg/mL膠原酶III (Gibco Invitrogen，目錄號17102)、及以等效於10 mL/胚胎之AccutaseTM(Sigma，目錄號A-6964)之濃度添加之Accutase；
- 以等效於10 mL/胚胎之TrypLETM Select (Invitrogen，目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶(Invitrogen，目錄號17105-041)、及以等效於10 mL/胚胎之AccutaseTM(Sigma，目錄號A-6964)之濃度添加之Accutase；
- 以等效於15 mL/胚胎之TrypLETM Select (Invitrogen，目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白

酶、及 5 mL/胚胎之 10 mg/mL 分散酶(Invitrogen，目錄號 17105-041)；

- 以等效於 30 mL/胚胎之 TrypLE™ Select (Invitrogen，目錄號 12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、及 10 mL/胚胎之 10 mg/mL 分散酶(Invitrogen，目錄號 17105-041)；
- 以等效於 10 mL/胚胎之 TrypLE™ Select (Invitrogen，目錄號 12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、及 10 mL/胚胎之 10 mg/mL 分散酶(Invitrogen，目錄號 17105-041)；
- 10 mL/胚胎之 10 mg/mL 分散酶(Invitrogen，目錄號 17105-041)、及 10 mL/胚胎之 Accutase；及
- 以等效於 5 mL/胚胎之 TrypLE™ Select(Invitrogen，目錄號 12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、及 15 mL/胚胎之 10 mg/mL 分散酶(Invitrogen，目錄號 17105-041)。

根據本發明，酵素組合物不含動物產物。通篇申請案中
所用「動物產物」係指活有機體的動物細胞中或由該動物
細胞產生的任何化合物或化合物集合。就此而言，本發明
組合物中所含酶係重組酶。

胰蛋白酶係多種脊椎動物胰腺中產生之絲胺酸蛋白酶。
胰蛋白酶催化肽在鹼性胺基酸(精胺酸及離胺酸)之羧基處
水解裂解。文獻中已闡述多種重組胰蛋白酶，例如來自巴
斯德畢赤酵母(*Pichia pastoris*)之重組胰蛋白酶(Roche

Applied Science, 2003年9月), 且某些重組胰蛋白酶可自市場購得, 例如 TrypLE™ Select(Invitrogen, 例如目錄號 12563-011、12563-029)或 TrypZean(Sigma, 例如目錄號 T-3449)。本發明所用較佳重組胰蛋白酶係 TrypLE™ Select(Invitrogen, 目錄號 12563-029), 如實例中所述。

分散酶係自多黏芽孢桿菌(*Bacillus polymyxa*)細菌產生之中性蛋白酶(Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase, STENN K.S.、LINK R.、MOELLMANN G.、MADRI J.、KUKLINSKA E., *J. Invest Dermatol.* 1989年8月; 93(2):287-90)。文獻中已闡述多種重組分散酶, 例如重組分散酶I、重組分散酶II(Roche Applied Science, 2004年8月)或BD分散酶(BD Biosciences), 且某些重組分散酶可自市場購得, 例如分散酶(Invitrogen, 例如目錄號 17105-041)、分散酶I(Sigma, 例如目錄號 D4818)或分散酶(StemCell Technologies, 例如目錄號 07913、07923)。本發明所用較佳重組分散酶係分散酶(Invitrogen, 目錄號 17105-041), 如實例中所述。

膠原酶係自溶組織梭菌(*Clostridium histolyticum*)細菌產生之蛋白酶, 其斷裂膠原中之肽鍵(Isolation and characterization of proteinase and collagenase from *Cl. Histolyticum*, MANDL I.、MACLENNAN J.D.、HOWES E.L., *J Clin Invest.* 1953年12月; 32(12):1323-9)。文獻中已闡述多種膠原酶, 例如重組膠原酶III(Collagenase III: A superior

enzyme for complete disaggregation and improved viability of normal and malignant human breast tissue, SPEIRS V.、WHITE M.C.及 GREEN A.R., In vitro Cell. Dev. Biol. - Animal, 32:72-74, 1996年2月), 且某些重組膠原酶可自市場上購得, 例如膠原酶I型(Sigma, 例如目錄號C0130、C1639)、膠原酶II型(Sigma, 例如目錄號C0130、C1764、C6885)、膠原酶III型(例如Gibco Invitrogen, 例如目錄號17102; Sigma, 例如目錄號C0255)、膠原酶IV型(Sigma, 例如目錄號C1889)、膠原酶V型(Sigma, 例如目錄號C2014、C9263)、膠原酶VII型(Sigma, 例如目錄號C0773、C2399)或膠原酶XI型(Sigma, 例如目錄號C4785、C7657)。本發明所述用較佳重組膠原酶係膠原酶III(Gibco Invitrogen, 目錄號17102), 如實例中所述。

Accutase係源自甲殼類動物之蛋白酶。重組Accutase可自市場上購得, 例如Accutase(PAA, 例如目錄號L11-007)、Accutase(Thermo, 例如目錄號21-201-0100V)、Accutase(Interchim, 例如目錄號UPN68081)、Accutase(Sigma, 例如目錄號A6964)、Accutase(eBioscience, 例如目錄號00-4555)或Accutase(Millipore, 例如目錄號SCR005)。本發明所用較佳重組Accutase係Accutase(Sigma, 目錄號A6964), 如實例中所述。

藉由用本發明酵素組合物消化雞胚胎製備之「細胞」包括(但不限於)成纖維細胞、腎細胞、肝細胞、心臟細胞、肌細胞、上皮細胞、血液細胞及內皮細胞。

根據本發明一特定實施例，使用本發明酵素組合物來消化雞胚胎，從而獲得由分離雞細胞組成之雞細胞製劑。根據本發明，該等分離雞細胞係雞胚胎成纖維細胞(CEF)、雞胚胎腎細胞(CEKC)或雞胚胎肝細胞(CELC)，且較佳係雞胚胎成纖維細胞(CEF)。

根據本發明另一特定實施例，使用本發明酵素組合物來消化雞胚胎，從而獲得由雞細胞混合物組成之雞細胞製劑。根據本發明，該雞細胞混合物包含CEF、CEKC、CELC、心臟細胞、肌細胞、上皮細胞、血液細胞及/或內皮細胞。

該等細胞較佳係自無特殊病原體(SPF)之蛋提取。SPF蛋係自(例如)Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA)購得。該等蛋較佳超過9日齡，更佳介於10與14日齡之間，且甚至更佳為12日齡。在提取胚胎之前，較佳對蛋進行消毒。先前文獻中已闡述多種專用於蛋消毒之方法及產品。尤佳地，在甲醛溶液中培育(例如在2%甲醛中培育(例如)1分鐘)，之後用乙醇(例如70%乙醇)沖洗。隨後打開蛋，提取胚胎，並切除頭足。

然後用本發明酵素組合物直接消化未解剖胚胎。根據本發明，在以下條件下達成細胞解聚：

- 培育溫度介於35°C與39°C之間，較佳介於36°C與37°C之間，更佳為36°C、36.5°C或37°C，且甚至更佳為37°C；及
- 培育持續時間介於1與3小時之間，且較佳為2小

時。

令人驚訝地，本發明酵素組合物能消化事先未解剖之雞胚胎。

根據本發明一具體實施例，亦可在不同時間將酵素組合物中之各酶添加至胚胎中。例如，對於包含胰蛋白酶、分散酶及膠原酶之酵素組合物，可首先在分散酶及膠原酶存在下消化胚胎，且隨後在一定時間間隔後在胰蛋白酶存在下消化。在另一實例中，對於包含胰蛋白酶、分散酶及Accutase之酵素組合物，可首先在胰蛋白酶存在下消化胚胎，隨後在一定時間間隔後在分散酶存在下消化，且最終在一定時間間隔(可與前一時間間隔相同或不同)後在Accutase存在下消化。根據本發明，該時間間隔介於15分鐘與90分鐘之間，較佳介於20與80分鐘之間，更佳介於30與60分鐘之間，且最佳為30分鐘、35分鐘、40分鐘、45分鐘、50分鐘、55分鐘或60分鐘，且甚至更佳為60分鐘。

然後過濾所得混合物(例如使用不銹鋼(inox)篩，可自(例如)Fischer Bioblock購得，目錄號A37532)以移除未消化組織。然後藉由離心(例如2300 rpm，15分鐘)收集細胞(例如CEF、CEKC、CELC)。該離心亦使得可移除酶(即可存於上清液中之酶)。較佳使用實例1中所述之方法及條件。

根據本發明，亦可直接使用所獲得原代細胞或在再一次細胞傳代後使用次代細胞。

然後在適宜細胞培養基中培養細胞(即原代或次代細

胞)。本發明所用細胞培養基較佳不含動物產物。文獻中已闡述多種不含動物產物之培養基，且某些培養基可自市場購得，例如293 SFM II；293-F細胞，SFM適應性培養基；293-H細胞，SFM適應性培養基；293fectin™轉染試劑；CD 293 AGT™；CD 293培養基；FreeStyle™ 293表現系統；FreeStyle™ 293培養基；FreeStyle™ 293-F細胞，SFM適應性培養基；VP-SFM；VP-SFM AGT™；腺病毒表現培養基(AEM)；用於PER.C6®細胞之生長培養基；CD 293 AGT™；CD 293培養基；COS-7L細胞，SFM適應性培養基；EPISERF®培養基；OptiPro™ SFM(上述所有培養基皆可自Invitrogen購得)。在感染前，較佳將細胞培養1至5天，更佳1至2天，且甚至更佳2天。較佳在介於30與37℃之間之溫度下培養細胞。

本發明亦係關於製造野生型、減毒及/或重組病毒之方法，其包含使用先前所述酵素組合物自雞胚胎製備細胞之步驟。

該製造野生型、減毒及/或重組病毒之方法包括使用本發明酵素組合物自雞胚胎製備細胞之步驟，且亦可包括使用病毒感染該等細胞之步驟。使用病毒感染細胞之步驟為熟習此項技術者所熟知。通篇申請案中所用「感染」係指使病毒核酸轉移至細胞中，其中複製病毒核酸，合成病毒蛋白，或組裝新病毒顆粒。熟習此項技術者能選擇最適宜細胞來製造特定病毒。例如，在欲產生病毒為痘病毒之具體實施例中，所用細胞較佳為CEF。使用病毒感染細胞之

步驟係在適宜細胞培養基中進行，該細胞培養基可與用於製備該等細胞之細胞培養基相同或不同。本發明所用細胞培養基較佳不含動物產物。文獻中已闡述多種不含動物產物之培養基，且如上所述某些培養基可自商品購得。感染步驟中所用較佳細胞培養基係伊格爾基本培養基(Basal Medium Eagle)之細胞培養基(Invitrogen)。較佳採用介於0.5至1.5個胚胎/L細胞培養基之間，且更佳介於1.1至1.3個胚胎/L細胞培養基之間，且甚至更佳約1.2個胚胎/L細胞培養基來接種細胞培養基。在欲製造病毒為MVA之具體實施例中，依較佳介於0.001與0.1之間，更佳介於0.03與0.07之間，且甚至更佳為約0.05之MOI，將MVA接種於細胞培養容器中。

製造野生型、減毒及/或重組病毒之方法包括使用本發明酵素組合物自雞胚胎製備細胞之步驟，且亦可包含培養已感染之細胞之步驟。培養已感染之細胞直至產生子代病毒之步驟為熟習此項技術者所熟知。該步驟可包括黏附至表面生長、在存在或不存在(微)載體時在懸浮液中生長、或其組合。可在(例如)培養皿、轉瓶或生物反應器中使用分批式、加料分批式、連續式系統、中空纖維及諸如此類進行培養。為經由細胞培養達到大規模生產病毒，業內較佳使用能在存在或不存在(微)載體時在懸浮液中生長之細胞，且較佳使用能在不含動物產物之培養基中培養之細胞。本發明所用細胞培養基較佳不含動物產物。文獻中已闡述多種不含動物產物之培養基，且如上所述某些培養基

可自市場購得。培養經感染細胞之步驟係在適宜細胞培養基中實施，該細胞培養基可與用於製備該等細胞之細胞培養基以及用於用病毒感染該等細胞之細胞培養基相同或不同。用於培養經感染細胞之較佳細胞培養基係伊格爾基本培養基(Invitrogen)。較佳將經感染細胞培養1至6天，更佳2至4天，且甚至更佳3天。較佳在介於30°C與37°C之間之溫度下培養經感染細胞。

製造野生型、減毒及/或重組病毒之方法包含使用本發明酵素組合物自雞胚胎製備細胞之步驟，且亦可包含自上清液及/或自細胞回收所產生病毒之步驟。在自細胞回收病毒時(即僅自細胞回收，或自細胞及上清液回收)，可在回收所產生病毒之步驟之前實施使得可破壞細胞膜之步驟。此步驟使得自細胞釋放病毒。可藉由熟習此項技術者熟知之各種技術來誘導細胞膜之破壞。該等技術包含(但不限於)冷凍/解凍、低滲溶胞、超音波處理(藉由使用超音波清洗機)及微射流(藉由使用微射流均質機)。超音波清洗機可自(例如)Heraeus PSP、Biologics、Misonix或GlenMills購得。本發明所用較佳超音波清洗機係SONITUBE 20 kHz SM 20-120-3型及SONITUBE 35 kHz SM 35-400-3型(Heraeus PSP)。微射流均質機可自(例如)Microfluidics公司購得。亦可藉由使用SLM Aminco French壓機來破壞包裝細胞膜。亦可使用高速勻漿器來破壞包裝細胞膜。高速勻漿器可自(例如)Silverson Machines或Ika-Labortechnik購得。本發明所用較佳高速勻漿器係

SILVERSON L4R (Silverson Machines)。

製造野生型、減毒及/或重組病毒之方法包含使用本發明酵素組合物自雞胚胎製備細胞之步驟，且亦可包含一或多個純化所回收病毒之步驟。純化步驟可為(例如，但不限於)：

- 在適宜條件下澄清，從而使得可清除細胞碎片。該澄清可藉由(例如)深層過濾來實施。深層過濾包括(但不限於)使用一或多種市售產品，例如來自 Sartorius 之 Sartopure® 濾器(例如 Sartopure® PP2)、CUNO Incorporated AP 系列深層濾器(例如 AP01)、CUNO Incorporated CP 系列深層濾器(例如 CP10、CP30、CP50、CP60、CP70、CP90)、CUNO Incorporated HP 系列深層濾器(例如 HP10、HP30、HP50、HP60、HP70、HP90)、CUNO Incorporated Calif. 系列深層濾器(例如 CA10、CA30、CA50、CA60、CA70、CA90)、CUNO Incorporated SP 系列深層濾器(例如 SP10、SP30、SP50、SP60、SP70、SP90)、CUNO Delipid 及 Delipid Plus 濾器、Millipore 公司 CE 系列深層濾器(例如 CE15、CE20、CE25、CE30、CE35、CE40、CE45、CE50、CE70、CE75)、Millipore 公司 DE 系列深層濾器(例如 DE25、DE30、DE35、DE40、DE45、DE50、DE55、DE560、DE65、DE70、DE75)、Millipore 公司 HC 濾器(例如 A1HC、B1HC、COHC)、CUNO

PolyNet™ 濾器 (例如 PolyNet™ PB P050、P100、P200、P300、P400、P500、P700)、Millipore Clarigard 及 Polygard 濾器、CUNO Life Assure 濾器、ManCel Associates 深層濾器 (例如 PR 12 UP、PR12、PR 5 UP)；及 PALL 或 SeitzSchenk Incorporated 濾器。為提高可用深層過濾裝置之澄清能力，可有利地偶聯兩個或更多個孔徑遞減之裝置。在此實施例中，使欲澄清混合物通過第一深層過濾裝置，其中阻留最大污染物，且隨後使其通過第二深層過濾裝置。就此而言，根據本發明一較佳實施例，藉由深層過濾來實施澄清，較佳經相互偶聯之孔徑為 8 μm 之濾器與孔徑為 5 μm 之濾器來實施。本發明所用孔徑為 8 μm 及 5 μm 之較佳濾器係可自 Sartorius 購得之 Sartopure® 濾器 (Sartopure® PP2)。根據本發明，深層過濾較佳係以 1 L/分鐘之流速來實施。

- 濃縮，其可藉由 (例如) 微孔過濾或超濾來實施。微孔過濾係濃縮並純化大分子之壓力驅動膜方法。更具體而言，使溶液通過濾器，其孔徑經選擇以在滲餘物中排除病毒並使得小分子 (例如蛋白質) 可通過濾器進入滲透物。微孔過濾減小提取溶液之體積。就此而言，因此藉由使用孔徑小於 0.2 μm 、較佳孔徑介於 0.01 μm 與 0.15 μm 之間、更佳介於 0.09 μm 與 0.15 μm 之間、且孔徑甚至更佳為 0.1 μm 之濾器來實施微孔過濾。本發明所用濾器較佳係可高壓滅菌之

市售濾器，例如 Prostak 微孔過濾模件 (Millipore)，其中 Prostak 微孔過濾模件 PSVVAG021、PSVVAG041 及 SK2P12E1 較佳。

- 透析過濾，其係改良的微孔過濾(如上所述)，且涉及用溶液稀釋該包含病毒之部分以實現該部分中雜質濃度之降低。對包含病毒之部分的稀釋使得可自該部分洗出更多雜質。應理解，透析過濾可以分批模式、半連續模式、或連續模式來實施。有利地，可使用透析過濾來更換包含病毒之緩衝液。舉例而言，有利地可針對醫藥上可接受之緩衝液來交換純化過程中所用的緩衝液。根據本發明，微孔過濾係藉由使用孔徑小於 $0.2\ \mu\text{m}$ 、孔徑較佳介於 $0.01\ \mu\text{m}$ 與 $0.15\ \mu\text{m}$ 之間、更佳介於 $0.09\ \mu\text{m}$ 與 $0.15\ \mu\text{m}$ 之間、且孔徑甚至更佳為 $0.1\ \mu\text{m}$ 之濾器來實施。本發明所用濾器較佳係可高壓滅菌之市售濾器，例如 Prostak 微孔過濾模件 (Millipore)，其中 Prostak 微孔過濾模件 PSVVAG021、PSVVAG041 及 SK2P12E1 較佳。
- 層析，其使用陽離子或陰離子交換吸附劑，且較佳使用陰離子交換吸附劑。根據本發明，陰離子交換吸附劑之官能團可為一級、二級、三級或四級胺基，例如二甲基胺基乙基 (DMAE)、二乙基胺基乙基 (DEAE)、三甲基胺基乙基 (TMAE)、三乙基胺基乙基 (TEAE)、 $-\text{R}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{N}^+-(\text{CH}_3)_3$ 基團 (亦稱作 Q 基團；參見 Streamline® 樹脂，Pharmacia) 或在

7.0至9.0 pH範圍內已具有或將具有形式正電荷之其他基團，例如聚乙烯亞胺(PEI)。陰離子交換吸附劑之較佳官能團選自由以下組成之群：二甲基胺基乙基(DMAE)、二乙基胺基乙基(DEAE)、三甲基胺基乙基(TMAE)及三乙基胺基乙基(TEAE)，且更佳為三甲基胺基乙基(TMAE)。陰離子交換吸附劑可存在於(但不限於，例如)珠粒形成基質或膜中。

- 根據本發明一較佳實施例，陰離子交換吸附劑存在於珠粒形成基質中。基質可為(例如)瓊脂糖、親水聚合物、纖維素、葡聚糖或二氧化矽。將鏈(例如葡聚糖鏈)與基質偶合。使上述官能團經由化學穩定鍵(例如醚鍵)附接至該等鏈。珠粒形成基質之較佳官能團係三甲基胺基乙基(TMAE)。存在於本發明所用珠粒形成基質中之陰離子交換吸附劑較佳可高壓滅菌，例如 UNOsphere® Q (BioRad)、UNOsphere® S (BioRad)、STREAMLINE™ Q Sepharose® XL (Amersham Biosciences)、STREAMLINE™ SP Sepharose® XL (Amersham Biosciences) 或 BioSeptra® Q hyperZ(Pall公司)。存在於本發明珠粒形成基質中之較佳可高壓滅菌陰離子交換吸附劑係 UNOsphere® Q (BioRad)。UNOsphere® Q (BioRad)存於直徑為120 μm 且具有三甲基胺基乙基(TMAE)官能團之親水球形聚合珠粒中。

- 根據本發明另一較佳實施例，陰離子交換吸附劑存於膜中。膜之官能團可如上所述。膜之較佳官能團係三甲基胺基乙基(TMAE)。根據本發明一較佳實施例，所用膜之孔徑低於病毒尺寸。就此而言，在病毒係痘病毒(尺寸為200 nm)時，膜孔徑介於1 μm 與5 μm 之間，且孔徑較佳為3 μm 。存於本發明所用膜中之陰離子交換吸附劑較佳可高壓滅菌，例如 Sartobind® 75 Q (Sartorius)。
- 凝膠過濾：根據本發明，在包含珠粒之固體載體上處理含有病毒之樣品，該等珠粒之直徑介於3 μm 與160 μm 之間，有利地介於80 μm 與160 μm 之間，較佳介於40 μm 與105 μm 之間，更佳介於25 μm 與75 μm 之間，更佳介於20 μm 與80 μm 之間，且甚至更佳介於20 μm 與60 μm 之間。根據本發明，該載體之孔隙度接近病毒直徑(例如200-300 nm之痘病毒)，從而使得後者不能滲入珠粒中。另一方面，尺寸較小之分子可滲入珠粒中且其移動變慢。用於凝膠過濾之載體可基於(例如)瓊脂糖、葡聚糖、丙烯醯胺、二氧化矽、乙二醇/甲基丙烯酸酯共聚物、或其混合物，例如瓊脂糖與葡聚糖之混合物。根據本發明，所用載體較佳不含官能團。凝膠過濾層析載體可自市場上購得，例如：
 - 乙二醇/甲基丙烯酸酯凝膠過濾層析載體(例如

Toyopearl® HW 55、Toyopearl® HW 65 及 Toyopearl® HW 75，其珠粒直徑介於20 μm 與60 μm 之間，Tosohaas)；

- 烯丙基葡聚糖/亞甲基雙丙烯醯胺凝膠過濾層析載體(例如 Sephacryl™ S300 HR，珠粒直徑介於25 μm 與75 μm 之間；Sephacryl™ S400 HR，珠粒直徑介於25 μm 與75 μm 之間；Sephacryl™ S500 HR，珠粒直徑介於25 μm 與75 μm 之間；Sephacryl™ S1000 SF，珠粒直徑介於40 μm 與105 μm 之間，皆得自 Pharmacia)；
- N-丙烯基胺基羥丙二醇凝膠過濾層析載體(例如 Trisacryl，珠粒直徑介於80 μm 與160 μm 之間，Biosepra)；
- 瓊脂糖凝膠過濾層析載體(例如 Macro-Prep SE，珠粒直徑介於20 μm 與80 μm 之間，Bio-Rad)。

乙二醇/甲基丙烯酸酯凝膠過濾層析載體(例如 Toyopearl® HW 55、Toyopearl® HW 65及Toyopearl® HW 75，珠粒直徑介於20 μm 與60 μm 之間，Tosohaas)較佳。

製造野生型、減毒及/或重組病毒之方法包含使用本發明酵素組合物自雞胚胎製備細胞之步驟，且亦可包含在一或多種核酸酶存在下培育之步驟。實施在一或多種核酸酶(即內切核酸酶或外切核酸酶)存在下培育之步驟以降解溶液中存在之核酸(例如 DNA、RNA)。本發明所用較佳核酸酶係內切核酸酶。內切核酸酶可根據其受質分為如下類

別：降解DNA之脫氧核糖核酸酶(DNA酶)；降解RNA之核糖核酸酶(RNA酶)；及降解DNA及RNA之內切核酸酶。內切核酸酶DNA酶包括(但不限於)DNA酶I、DNA酶II及脫氧核糖核酸內切酶IV。內切核酸酶RNA酶包括(但不限於)RNA酶I、RNA酶III、RNA酶E、RNA酶F及RNA酶P。降解DNA及RNA之內切核酸酶包括(但不限於)Benzonase®。在本發明一較佳實施例中，培育所產生病毒之步驟係在Benzonase®存在下實施。Benzonase®藉由水解特定核苷酸之間之內部磷酸二酯鍵來降解核酸(例如DNA、RNA)。在完全消化後，使溶液中存在之所有游離核酸(例如DNA、RNA)還原為長3至8個鹼基之5'-單磷酸酯末端寡核苷酸。Benzonase®無蛋白分解活性。本發明所用Benzonase®較佳係醫藥上可接受的。醫藥上可接受之Benzonase®可自市場購得(例如Eurogentec之ME-0280-10型；Merck之(例如)1.01653.0001型)。根據本發明，所用核酸酶之濃度在5至100 U/ml範圍內，較佳在5至50 U/ml範圍內，且更佳為10 U/ml。

本發明製造野生型、減毒及/或重組病毒之方法適用於工業級無菌製程以確保完全符合疫苗無菌性之法規要求。

本申請案中通篇使用之「病毒」包括(但不限於)痘病毒、腺病毒、腺病毒相關病毒、逆轉錄病毒、皰疹病毒、甲病毒、泡沫病毒、流行性感感冒病毒(例如流感病毒)、黃病毒(例如黃熱病病毒、日本腦炎病毒、登革熱病毒(dengue virus)、蜱傳腦炎病毒或西尼羅河病毒(west nile

virus))、麻疹病毒、風疹病毒、甲病毒(例如羅斯河病毒(ross river virus)、切昆共亞病毒(chikungunya virus))、肝炎病毒、鼻病毒、呼腸孤病毒(例如科羅拉多蜱傳熱(colorado tick fever))或泡沫病毒。

在本發明一較佳實施例中，病毒係痘病毒。痘病毒係直徑介於200 nm與300 nm之間之複雜包膜病毒，主要依據其異常形態、其較大DNA基因組及其細胞質複製位點來區分。根據本發明，痘病毒可係不區分地不成熟病毒(IV)、細胞內成熟病毒(IMV)、細胞內包膜病毒(IEV)、細胞締合性包膜病毒(CEV)或細胞外包膜病毒(EEV)(SMITH等人(2002), J.Gen. Virol., 83, 2915-2931)。本發明所用痘病毒較佳係指脊索痘病毒(Chordopoxvirus)亞科之痘病毒(脊椎動物痘病毒)(Fields Virology/編輯：FIELDS, B. N.、KNIPE, D. M.、HOWLEY, P. M.; 第3版/ISBN 0-7817-0253-4; 第83章)。脊索痘病毒包括(但不限於)以下痘病毒屬：正痘病毒屬(Orthopoxvirus)、副痘病毒屬(Parapoxvirus)、禽痘病毒屬(Avipoxvirus)、山羊痘病毒屬(Capripoxvirus)、兔痘病毒屬(Lepripoxvirus)、豬痘病毒屬(Suipoxvirus)、軟疣痘病毒屬(Molluscipoxvirus)或亞塔痘病毒屬(Yatapoxvirus)。本發明較佳脊索痘病毒係正痘病毒。正痘病毒包括(但不限於)天花病毒、牛痘病毒(VV)(例如牛痘病毒株 Elstree、Western Reserve、Wyeth、NYVAC、NYCBOH、Paris、Copenhagen(GOEBLE等人，(1990); 基因庫(Genbank)登錄號 M35027.1))、或其衍生

物，例如經修飾牛痘病毒安卡拉(MVA)，具體而言MVA 575 (ECACC V00120707)及MVA-BN (ECACC V00083008)。已對痘病毒之若干成員的基因組實施標繪及測序，包括Copenhagen牛痘病毒(VV)株(GOEBEL等人，1990, Virol. 179, 247-266及517-563；JOHNSON等人，1993, Virol. 196, 381-401)及經修飾牛痘病毒安卡拉(MVA)株(ANTOINE等人，1998, Virol. 244, 365-396)。VV具有約192 kb之雙鏈DNA基因組，其編碼約200種蛋白質，其中約100種參與病毒組裝。MVA係藉由牛痘病毒Ankara株在雞胚胎成纖維細胞上連續傳代超過500次獲得之高度減毒牛痘病毒株(MAYR等人，1975, Infection 3, 6-16)。MVA病毒以存托號N⁶⁰² I-721存托於Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM)中。MVA基因組全部序列之測定及與Copenhagen VV基因組之比較使得可精確鑒定病毒基因組中出現之改變並確定七處缺失(I至VII)及多處導致片段化ORF(開放式閱讀框)之突變(ANTOINE等人，1998, Virology 244, 365-396)。

在本發明一較佳實施例中，病毒係痘病毒且較佳係正痘病毒。

在本發明一特定實施例中，正痘病毒係牛痘病毒(VV)。本發明較佳VV係(例如)專利申請案PCT/EP2008/009720或PCT/EP2008/009721中所述之VV，該兩個申請案分別闡述包含缺陷性I4L及/或F4L基因之VV及包含缺陷性F2L基因之VV。

在本發明另一特定實施例中，正痘病毒係經修飾牛痘病毒安卡拉(MVA)。本發明較佳MVA係以存托號N⁶⁰² I-721存托於Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM)中之MVA、MVA 575 (ECACC V00120707)及MVA-BN (ECACC V00083008)。

在一較佳實施例中，本發明係關於製造野生型、減毒及/或重組痘病毒之方法，其包含使用上述酵素組合物自胚胎製備細胞之步驟及以引用方式併入本文中之WO 07/147528專利申請案中所述之其他步驟。就此而言，本發明因此係關於製造野生型、減毒及/或重組痘病毒之方法，其包含以下步驟：

- a) 使用上述酵素組合物自胚胎製備細胞；
- b) 感染該細胞培養物(如以引用方式併入本文中之WO 07/147528專利申請案中所述)；
- c) 將該等感染細胞培養適宜時間長度(如以引用方式併入本文中之WO 07/147528專利申請案中所述)；
- d) 自培養物上清液及/或包裝細胞回收所產生之痘病毒顆粒(如以引用方式併入本文中之WO 07/147528專利申請案中所述)；
- e) 藉由深層過濾澄清所獲得混合物，較佳經相互偶聯之孔徑為8 μm 之濾器與孔徑為5 μm 之濾器來澄清(如以引用方式併入本文中之WO 07/147528專利申請案中所述)；
- f) 藉由微孔過濾濃縮所獲得混合物，較佳經孔徑介於

0.01 μm 與0.15 μm 之間之濾器、且較佳經孔徑為0.1 μm 之濾器來濃縮(如以引用方式併入本文中之WO 07/147528專利申請案中所述)；及

- g) 透析過濾所獲得混合物，較佳經孔徑介於0.01 μm 與0.15 μm 之間之濾器、且較佳經孔徑為0.1 μm 之濾器來透析過濾(如以引用方式併入本文中之WO 07/147528專利申請案中所述)。

在另一較佳實施例中，本發明係關於製造野生型、減毒及/或重組正痘病毒之方法，其包含使用上述酵素組合物自胚胎製備細胞之步驟及以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法A中所述之其他步驟。就此而言，本發明因此係關於製造野生型、減毒及/或重組正痘病毒之方法，其包含以下步驟：

- a) 使用上述酵素組合物自胚胎製備細胞；
- b) 用正痘病毒感染細胞(如以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法A中所述)；
- c) 培養經感染細胞直至產生子代正痘病毒(如以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法A中所述)；
- d) 在一或多種核酸酶存在下進行培育(如以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法A中所述)；
- e) 自培養物上清液及/或細胞回收正痘病毒(如以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法

A中所述)；

- f) 在適宜條件下將一價鹽(例如NaCl、KCl)添加至步驟e)所回收之正痘病毒中，從而抑制核酸酶活性並避免該等正痘病毒吸附至步驟g)中之陰離子交換吸附劑上(如以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法A中所述)；
- g) 在適宜條件下使步驟f)中獲得之混合物與陰離子交換吸附劑(例如珠粒形成基質或膜，所具有官能團為一級、二級、三級或四級胺基，例如二甲基胺基乙基(DMAE)、二乙基胺基乙基(DEAE)、三甲基胺基乙基(TMAE)、三乙基胺基乙基(TEAE)、-R-CH(OH)-CH₂-N⁺-(CH₃)₃基團(亦稱作Q基團；參見Streamline®樹脂，Pharmacia)或在7.0至9.0之pH範圍內已具有或將具有形式正電荷之其他基團，例如聚乙烯亞胺(PEI))接觸，從而使得可捕獲核酸(如以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法A中所述)；
- h) 在適宜條件下澄清步驟g)所獲得之混合物，從而使得可清除細胞碎片(如以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法A中所述)；
- i) 在適宜條件下用包含一價鹽(例如NaCl、KCl)之溶液洗滌陰離子交換吸附劑，從而回收流出液中剩餘之正痘病毒(如以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法A中所述)；

- j) 濃縮步驟h)中獲得之流出液及步驟i)中獲得之流出液(如以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法A中所述)；
- k) 透析過濾步驟j)中獲得之包含正痘病毒之部分(如以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法A中所述)；及視需要
- l) 凝膠過濾步驟及隨後之透析過濾步驟(如以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法A中所述)。

在另一較佳實施例中，本發明係關於製造野生型、減毒及/或重組正痘病毒之方法，其包含使用上述酵素組合物自胚胎製備細胞之步驟及以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法B中所述之其他步驟。就此而言，本發明因此係關於製造野生型、減毒及/或重組正痘病毒之方法，其包含以下步驟：

- a') 使用上述酵素組合物自胚胎製備細胞；
- b') 用正痘病毒感染細胞培養物(如以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法B中所述)；
- c') 培養經感染細胞直至產生子代正痘病毒(如以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法B中所述)；
- d') 在一或多種核酸酶存在下進行培育(如以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法B中所述)；

e') 自培養物上清液及/或包裝細胞回收正痘病毒(如以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法B中所述);

f') 在以下物質存在下培育步驟e')中回收之正痘病毒:

1. 一或多種能抑制核酸酶活性之試劑(例如螯合劑, 例如乙二胺四乙酸鹽(EDTA); 一價鹽, 例如NaCl或KCl), 及視需要
2. 一或多種穩定劑(例如糖, 例如蔗糖或海藻糖; 胺基酸; 洗滌劑, 例如Tween; 鹽, 例如NaCl或KCl)

(如以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法B中所述);

g') 在適宜條件下使步驟f')中獲得之混合物與陰離子交換吸附劑(例如珠粒形成基質或膜, 所具有官能團為一級、二級、三級或四級胺基, 例如二甲基胺基乙基(DMAE)、二乙基胺基乙基(DEAE)、三甲基胺基乙基(TMAE)、三乙基胺基乙基(TEAE)、-R-CH(OH)-CH₂-N⁺-(CH₃)₃基團(亦稱作Q基團; 參見Streamline®樹脂, Pharmacia)或在7.0至9.0之pH範圍內已具有或將具有形式正電荷之其他基團, 例如聚乙烯亞胺(PEI))接觸, 從而使得可捕獲該等正痘病毒及核酸(如以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法B中所述);

h') 在適宜條件下澄清步驟g')中獲得之混合物, 從而使

得可清除細胞碎片(如以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法B中所述);

- i') 用包含一價鹽之溶液洗脫正痘病毒;
- j') 濃縮步驟i')中獲得之混合物(如以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法B中所述);
- k') 透析過濾步驟j')中獲得之包含正痘病毒之部分;及視需要
- l') 凝膠過濾步驟及隨後之透析過濾步驟(如以引用方式併入本文中之EP09305422.9專利申請案之方法B中所述)。

在另一較佳實施例中，本發明係關於製造野生型、減毒及/或重組正痘病毒之方法，其包含使用上述酵素組合物自胚胎製備細胞之步驟及以引用方式併入本文中之PCT/EP2010/056491專利申請案之方法C中所述之其他步驟。就此而言，本發明因此係關於製造野生型、減毒及/或重組正痘病毒之方法，其包含以下步驟：

- a'') 使用上述酵素組合物自胚胎製備細胞;
- b'') 用正痘病毒感染包裝細胞培養物(如以引用方式併入本文中之PCT/EP2010/056491專利申請案之方法C中所述);
- c'') 培養經感染包裝細胞直至產生子代正痘病毒(如以引用方式併入本文中之PCT/EP2010/056491專利申請案之方法C中所述);
- d'') 在一或多種核酸酶存在下進行培育(如以引用方式併

入本文中之PCT/EP2010/056491專利申請案之方法C中所述)；

e'') 自培養物上清液及/或包裝細胞回收正痘病毒(如以引用方式併入本文中之PCT/EP2010/056491專利申請案之方法C中所述)；

f'') 在以下物質存在下培育步驟e'')中回收之正痘病毒：

1. 一或多種能抑制核酸酶活性之試劑，及視需要
2. 一或多種穩定劑；

(如以引用方式併入本文中之PCT/EP2010/056491專利申請案之方法C中所述)；

g'') 在適宜條件下使步驟f'')中獲得之混合物與陰離子交換吸附劑(例如珠粒形成基質或膜，所具有官能團為一級、二級、三級或四級胺基，例如二甲基胺基乙基(DMAE)、二乙基胺基乙基(DEAE)、三甲基胺基乙基(TMAE)、三乙基胺基乙基(TEAE)、-R-CH(OH)-CH₂-N⁺-(CH₃)₃基團(亦稱作Q基團；參見Streamline®樹脂，Pharmacia)或在7.0至9.0之pH範圍內已具有或將具有形式正電荷之其他基團，例如聚乙烯亞胺(PEI))接觸，從而使得可捕獲該等正痘病毒及核酸(如以引用方式併入本文中之PCT/EP2010/056491專利申請案之方法C中所述)；

h'') 在適宜條件下澄清步驟g'')中獲得之混合物，從而使得可清除細胞碎片(如以引用方式併入本文中之PCT/EP2010/056491專利申請案之方法C中所述)；

- i'') 用包含一價鹽之溶液洗脫正痘病毒(如以引用方式併入本文中之PCT/EP2010/056491專利申請案之方法C中所述);
- j'') 將一價鹽添加至步驟i'')中洗脫之正痘病毒中, 以避免該等正痘病毒吸附至步驟k'')中之陰離子交換吸附劑上(如以引用方式併入本文中之PCT/EP2010/056491專利申請案之方法C中所述);
- k'') 在適宜條件下使步驟j'')中獲得之混合物與陰離子交換吸附劑(例如珠粒形成基質或膜 所具有官能團為一級、二級、三級或四級胺基, 例如二甲基胺基乙基(DMAE)、二乙基胺基乙基(DEAE)、三甲基胺基乙基(TMAE)、三乙基胺基乙基(TEAE)、-R-CH(OH)-CH₂-N⁺-(CH₃)₃基團(亦稱作Q基團; 參見Streamline®樹脂, Pharmacia)或在7.0至9.0之pH範圍內已具有或將具有形式正電荷之其他基團, 例如聚乙烯亞胺(PEI))接觸, 從而使得可捕獲核酸(如以引用方式併入本文中之PCT/EP2010/056491專利申請案之方法C中所述);
- l'') 在適宜條件下用包含一價鹽之溶液洗滌陰離子交換吸附劑, 從而回收流出液中剩餘之正痘病毒(如以引用方式併入本文中之PCT/EP2010/056491專利申請案之方法C中所述);
- m'') 濃縮步驟l'')中獲得之流出液(如以引用方式併入本文中之PCT/EP2010/056491專利申請案之方法C中所

述)；

n'') 透析過濾步驟 m'') 中獲得之包含正痘病毒之部分(如以引用方式併入本文中之 PCT/EP2010/056491 專利申請案之方法 C 中所述)，及視需要

o'') 凝膠過濾步驟及隨後之透析過濾步驟(如以引用方式併入本文中之 PCT/EP2010/056491 專利申請案之方法 C 中所述)。

通篇申請案中所用「減毒病毒」係指已經修飾而使其在既定個體中之致病性顯著降低之任何病毒。病毒較佳減毒至在臨床上不致病之程度，即暴露於該病毒之個體不表現相對於對照個體在統計學上顯著提高程度之病狀。

通篇申請案中所用「重組病毒」係指基因組中插入有外源序列之病毒。本文所用外源序列係指並非天然存在於親代病毒中之核酸。

在一實施例中，外源序列編碼具有直接或間接細胞毒性功能之分子。「直接或間接」細胞毒性意指由外源序列編碼之分子可自身具有毒性(例如蓖麻蛋白、腫瘤壞死因子(TNF)、白介素-2 (IL2)、干擾素- γ (IFN γ)、核糖核酸酶、脫氧核糖核酸酶、假單胞菌(Pseudomonas)外毒素 A)，或其可在代謝後形成毒性產物，或其可與其他物質發生作用而形成毒性產物。蓖麻蛋白 cDNA 之序列揭示於 Lamb 等人(Eur. J. Biochem., 1985, 148, 265-270)中。

在本發明一較佳實施例中，外源序列係自殺基因。自殺基因編碼能將相對無毒性之前藥轉化為毒性藥物之蛋白

質。舉例而言，胞嘧啶脫胺酶將5-氟胞嘧啶(5-FC)轉化為5-氟尿嘧啶(5-FU)(Mullen等人(1922) PNAS 89, 33)；單純皰疹酶胸苷激酶使細胞對使用抗病毒劑更昔洛韋(ganciclovir) (GCV)或阿昔洛韋(aciclovir)(Moolten (1986) Cancer Res. 46, 5276；Ezzedine等人(1991) New Biol 3, 608)之處理敏感。可使用任何有機體之胞嘧啶脫胺酶，例如大腸桿菌 (*E. coli*) 或釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。因此，在本發明較佳實施例中，自殺基因編碼具有胞嘧啶脫胺酶活性之蛋白質，且更佳編碼以引用方式併入本文中之專利申請案 WO 99/54481、WO 05/07857、PCT/EP2008/009720 及 PCT/EP2008/009721 所涵蓋之 FCU1 蛋白或 FCU1-8 蛋白。

就此而言，根據本發明方法產生之較佳重組病毒係：

- MVA-FCU1(參見 WO 99/54481)，亦稱作 TG4023；
- MVA-FCU1-8(參見 WO 05/07857)；及
- VV-FCU1，其中該 VV 更具體而言包含缺陷性 I4L 及 / 或 F4L 基因，及缺陷性 J2R 基因(參見 PCT/EP2008/009720 及 PCT/EP2008/009721)。

前藥/酶組合之其他實例包括彼等由 Bagshawe 等人(WO 88/07378)所揭示者，即各種烷化劑及假單胞菌屬 CPG2 酶；及彼等由 Epenetos & Rowlinson-Busza (WO 91/11201) 所揭示者，即生氫前藥(例如苦杏仁苷)及植物源 β -葡糖苷酶。可用於本發明此實施例中之酶包括(但不限於)鹼性磷酸酶，其可用於將含磷酸根前藥轉化為游離藥物；芳基硫

酸酯酶，其可用於將含硫酸根前藥轉化為游離藥物；蛋白酶，例如沙雷菌屬(*serratia*)蛋白酶、嗜熱菌蛋白酶、枯草桿菌蛋白酶、羧肽酶及組織蛋白酶(例如組織蛋白酶B及L)，其可用於將含肽前藥轉化為游離藥物；D-內胺醯羧肽酶，其可用於轉化含有D-胺基酸取代基之前藥；碳水化合物裂解酶，例如 β -半乳糖苷酶及神經胺酸酶，其可用於將糖基化前藥轉化為游離藥物； β -內醯胺酶，其可用於將經 β -內醯胺衍生之藥物轉化為游離藥物；及青黴素(*penicillin*)醯胺酶，例如青黴素V醯胺酶或青黴素G醯胺酶，其可用於將胺氮原子分別經苯氧基乙醯基或苯乙醯基衍生之藥物轉化為游離藥物。或者，可使用具有酶活性之抗體(業內亦稱作抗體酶)來將本發明前藥轉化為游離活性藥物(Massey R.等人，*Nature*, 1987, 328, 457-458)。類似地，前藥包括(但不限於)上述前藥，例如含有磷酸根之前藥、含有硫代磷酸根之前藥、含有硫酸根之前藥、含肽前藥、經D-胺基酸修飾之前藥、糖基化前藥、含有 β -內醯胺之前藥、含有視需要經取代之苯氧基乙醯胺之前藥或含有視需要經取代之苯基乙醯胺之前藥、5-氟胞嘧啶前藥及可轉化之其他5-氟尿苷前藥。可衍生為本發明所用前藥形式之細胞毒性藥物之實例包括(但不限於)依託泊苷(*etoposide*)、替尼泊苷(*teniposide*)、亞德裏亞黴素(*adriamycin*)、道諾黴素(*daunomycin*)、洋紅黴素(*carminomycin*)、胺基蝶呤、更生黴素(*dactinomycin*)、絲裂黴素(*mitomycin*)、順鉑及順鉑類似物、博來黴素

(bleomycin)、埃斯波黴素(esperamicin)(例如，參見US 4,675,187)、5-氟尿嘧啶、美法倫(melphalan)及其他相關氮芥。

在另一實施例中，外源基因編碼能裂解靶定RNA或DNA之核酶。欲裂解之靶定RNA或DNA可為對細胞功能至關重要且裂解可導致細胞死亡之RNA或DNA；或欲裂解RNA或DNA可為編碼不期望蛋白、例如癌基因產物之RNA或DNA，且此RNA或DNA之裂解可防止細胞癌化。

在另一實施例中，外源基因編碼反義RNA。「反義RNA」意指與編碼蛋白質之mRNA分子雜交並干擾其表現之RNA分子，或與細胞內另一RNA分子(例如前mRNA或tRNA或rRNA)雜交之RNA分子，或與基因雜交並干擾其表現之RNA分子。

在本發明另一實施例中，外源序列替代靶細胞中缺陷性基因之功能。包括人類在內之哺乳動物有數千種遺傳病，其係由缺陷性基因引發的。該等遺傳病之實例包括囊性纖維化，其中已知在CFTR基因中存在突變；杜氏肌營養不良(Duchenne muscular dystrophy)，其中已知在肌營養不良蛋白基因中存在突變；鐮刀形細胞病，其中已知在HbA基因中存在突變。多種類型之癌症係由缺陷性基因(尤其原癌基因)及已發生突變之腫瘤抑制基因引發的。原癌基因之實例係ras、src、bcl等；腫瘤抑制基因之實例係p53及Rb。

在本發明另一實施例中，外源序列編碼腫瘤相關抗原

(TAA)。TAA係指經檢測在腫瘤細胞中之頻率或密度高於相同組織類型非腫瘤細胞之分子。TAA之實例包括(但不限於)CEA、MART1、MAGE1、MAGE3、GP-100、MUC1(參見WO 92/07000、WO 95/09241及Rochlitz等人，J Gene Med. 2003 Aug；5(8):690-9其係以引用方式併入本文中)、MUC2、點突變ras癌基因、正常或點突變p53、過表現p53、CA-125、PSA、C-erb/B2、BRCA I、BRCA II、PSMA、酪胺酸酶、TRP1、TRP2、NY-ESO-1、TAG72、KSA、HER-2/neu、bcr-abl、pax3-fkhr、ews-fli-1、存活蛋白(surviving)及LRP。根據一更佳實施例，TAA係MUC1。

在本發明另一實施例中，外源基因編碼抗原。本文所用「抗原」係指可結合抗體之配體；抗原自身不一定具有免疫原性。抗原較佳源自病毒，例如HIV-1(例如gp 120或gp 160)、以下病毒中之任一種：貓免疫缺陷病毒、人類或動物皰疹病毒(例如gD或其衍生物或立即早期蛋白(例如源自HSV1或HSV2之ICP27))、巨細胞病毒(例如gB或其衍生物)、水痘帶狀皰疹病毒(Varicella Zoster Virus)(例如gpI、II或III)；或源自肝炎病毒，例如肝炎B病毒(HBV)(例如肝炎B表面抗原或其衍生物)、肝炎A病毒(HAV)、肝炎C病毒(HCV；參見WO 04/111082；較佳源自基因型1b株ja之非結構性HCV蛋白)、及肝炎E病毒(HEV)；或源自其他病毒性病原體，例如呼吸道合胞病毒、人乳頭狀瘤病毒(HPV；參見WO 90/10459、WO 95/09241、WO 98/04705、WO 99/03885、WO 07/121894及WO 07/121894；源自HPV16株

之E6及E7蛋白較佳；亦參見Liu等人，Proc Natl Acad Sci U S A. 2004年10月5日；101增刊2:14567-71)或流感病毒；或源自細菌性病原體，例如沙門菌屬(*Salmonella*)、奈瑟球菌屬(*Neisseria*)、疏螺旋體屬(*Borrelia*)(例如OspA或OspB或其衍生物)、或衣原體屬(*Chlamydia*)、或博德特菌屬(*Bordetella*)(例如P.69、PT及FHA)；或源自寄生蟲，例如瘧原蟲屬(*plasmodium*)或弓形蟲屬(*Toxoplasma*)。根據一更佳實施例，抗原選自HCV或HPV。

就此而言，根據本發明方法產生之較佳重組病毒係MVA-HCV(參見WO 04/111082)，亦稱作TG4040。

重組病毒可包含不止一種外源序列且各外源序列可編碼不止一種分子。舉例而言，可在同一重組病毒中連接編碼(例如)TAA(如上所述)或抗原(如上所述)之外源序列與編碼細胞因子(例如白介素(IL，例如IL2)；腫瘤壞死因子(TNF)；干擾素-(IFN)；集落刺激因子(CSF))之外源序列。

就此而言，根據本發明方法產生之較佳重組病毒係：

- MVA-[MUC1-IL2](參見WO 92/07000及WO 95/09241)，亦稱作TG4010；及
- MVA-[HPV-IL2](參見WO 90/10459、WO 95/09241、WO 98/04705、WO 99/03885、WO 07/121894及WO 07/121894)，亦稱作TG4001。

有利地，重組病毒另外包含表現外源序列所需的元件。表現所需元件包括使得可將核苷酸序列轉錄為RNA及將mRNA轉譯為多肽之元件組，具體而言在欲經本發明重組

病毒感染之細胞中有效之啟動子序列及/或調節序列，及視需要使得該多肽可在細胞表面上分泌或表現所需之序列。該等元件可為誘導型或組成型。當然，啟動子適於所選重組病毒及宿主細胞。例如，可提及牛痘病毒啟動子p7.5K、pH5R、pK1L、p28、p11或該等啟動子之組合。文獻提供關於該等啟動子序列之大量資訊。所需元件可另外包括額外元件，該等額外元件可改良外源序列在宿主細胞中之表現或維持。具體而言，可提及內含子序列(WO 94/29471)、分泌信號序列、核定位序列、IRES型轉譯重起始之內部位點、終止轉錄之聚A序列。

本發明亦係關於藉由上述方法獲得之純化野生型、減毒及/或重組病毒，其用作醫藥組合物，較佳用作疫苗。

本文所用「醫藥組合物」係指包含醫藥上可接受之載劑之組合物。該醫藥上可接受之載劑較佳具有等滲性、低滲性或弱高滲性，且具有相對低之離子強度，例如蔗糖溶液。此外，此一載劑可含有任何溶劑、或水性或部分水性液體，例如非熱原性無菌水。另外，對醫藥組合物之pH加以調節及緩衝以滿足在體內使用之要求。醫藥組合物亦可包括醫藥上可接受之稀釋劑、佐劑或賦形劑、以及增溶劑、穩定劑及防腐劑。對於可注射投與，存於水性、非水性或等滲溶液中之調配物較佳。其可以液體或乾燥(粉劑、凍乾劑及諸如此類)形式以單一劑量或以多劑量來提供，且可在使用時用適宜稀釋劑來重構。

本發明亦係關於藉由上述方法獲得之純化野生型、減毒

及/或重組病毒，其用於治療及/或預防癌症、傳染病及/或自體免疫病症。

本文所用「癌症」係指(但不限於)肺癌(例如小細胞肺癌及非小細胞肺癌)、支氣管癌症、食道癌、咽癌、頭頸癌(例如喉癌、唇癌、鼻腔及鼻竇癌及咽喉癌)、口腔癌症(例如舌癌)、胃部癌症(例如胃癌)、腸癌、胃腸癌、結腸癌、直腸癌、結直腸癌、肛門癌、肝癌、胰腺癌、尿道癌、膀胱癌、甲狀腺癌、腎癌、癌症、腺癌、皮膚癌(例如黑色素瘤)、眼癌(例如視網膜母細胞瘤)、腦癌(例如神經膠質瘤、髓母細胞瘤及大腦星形細胞瘤)、中樞神經系統癌症、淋巴瘤(例如皮膚B細胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、何傑金氏症候群(Hodgkin's syndrome)及非何傑金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma))、骨癌、白血病、乳癌、生殖道癌、宮頸癌(例如宮頸上皮內瘤)、子宮癌(例如子宮內膜癌)、卵巢癌、陰道癌、外陰癌、前列腺癌、睪丸癌。「癌症」亦係指病毒誘導腫瘤，包括(但不限於)乳頭狀瘤病毒誘導癌症、皰疹病毒誘導腫瘤、EBV誘導B細胞淋巴瘤、肝炎B病毒誘導腫瘤、HTLV-1誘導淋巴瘤及HTLV-2誘導淋巴瘤。

本文所用「傳染病」係指任何由感染性有機體引發之疾病。感染性有機體包括(但不限於)病毒(例如單鏈RNA病毒、單鏈DNA病毒、人類免疫缺陷病毒(HIV)、肝炎A、B、及C病毒、單純皰疹病毒(HSV)、巨細胞病毒(CMV)、呼吸道合胞病毒(RSV)、愛潑斯坦-巴爾病毒(Epstein-Barr

virus)(EBV)或人乳頭狀瘤病毒(HPV))、寄生蟲(例如原生動物及後生動物病原體，例如瘧原蟲屬、利什曼原蟲屬(*Leishmania species*)、血吸蟲屬(*Schistosoma species*)或錐蟲屬(*Trypanosoma species*))、細菌(例如分枝桿菌(*Mycobacteria*)(具體而言結核桿菌(*M. tuberculosis*))、沙門菌屬、鏈球菌(*Streptococcus*)、大腸桿菌或葡萄球菌(*Staphylococcus*))、真菌(例如念珠菌屬(*Candida species*)或曲黴菌屬(*Aspergillus species*))、卡氏肺囊蟲(*Pneumocystis carinii*)、及朊病毒。

本文所用「自體免疫病症」係指兩種一般類型：「全身性自體免疫疾病」(即損害多種器官或組織之病症)及「局部自體免疫疾病」(即僅損害單一器官或組織之病症)。然而，「局部自體免疫疾病」可藉由間接影響其他身體器官及系統來影響全身。「全身性自體免疫疾病」包括(但不限於)類風濕性關節炎，其可影響關節，且可能影響肺及皮膚；狼瘡，包括全身性紅斑狼瘡(SLE)，其可影響皮膚、關節、腎臟、心臟、腦、紅血球細胞、以及其他組織及器官；硬皮症，其可影響皮膚、腸、及肺；斯耶格倫症候群(Sjogren's syndrome)，其可影響唾液腺、淚腺、及關節；肺出血腎炎症候群(Goodpasture's syndrome)，其可影響肺及腎臟；韋格納肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)，其可影響竇道、肺、及腎臟；風濕性多肌痛，其可影響大型肌群；及顱動脈炎/巨細胞動脈炎，其可影響頭頸動脈。

「局部自體免疫疾病」包括(但不限於)1型糖尿病，其影響

胰島；橋本甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)及格雷夫氏病(Graves' disease)，其影響甲狀腺；乳糜瀉、克羅恩氏病(Crohn's disease)、及潰瘍性結腸炎，其影響胃腸道；多發性硬化症(MS)及格林-巴利症候群(Guillain-Barre syndrome)，其影響中樞神經系統；愛迪生氏病(Addison's disease)，其影響腎上腺；原發性膽道硬化、硬化性膽管炎、及自體免疫性肝炎，其影響肝臟；及雷諾現象(Raynaud's phenomenon)，其可影響手指、腳趾、鼻子、耳朵。

本發明亦係關於包含藉由上述方法獲得之純化野生型、減毒及/或重組病毒之醫藥組合物，較佳為疫苗。根據本發明，該醫藥組合物意欲用於治療及/或預防癌症、傳染病及/或自體免疫病症。

本發明亦係關於藉由上述方法獲得之純化野生型、減毒及/或重組病毒之用途，其用於製備用於治療及/或預防癌症、傳染病及/或自體免疫病症之醫藥組合物，較佳為疫苗。

醫藥組合物(特定言之疫苗)可依習用方式製造，供藉由局部、非經腸或消化道途徑投藥。投藥途徑可為(例如)胃內、皮下、心內、肌內、靜脈內、腹膜內、腫瘤內、鼻內、肺內或氣管內途徑。對於後三種實施例，宜藉由氣溶膠或滴注法投藥。投藥法可採用單一劑量進行或依指定時間間隔重複進行一或若干次。適宜投藥途徑及劑量隨(例如)個體、欲治療疾病、或欲轉移之目標基因之各種參數

而變。根據第一種可能性，醫藥組合物(特定言之疫苗)可在體內直接投與(例如靜脈內注射至可到達之腫瘤或其周圍、皮下投與以供治療性或預防性接種)。亦可採用活體外方法，包括自患者收集細胞(骨髓幹細胞、外周血液淋巴細胞、肌細胞及諸如此類)，根據先前技術在體外轉染或感染該等細胞，及將該等細胞再投與患者。此外，若適宜且不背離本發明範圍，可藉由不同途徑同時或依序投與醫藥組合物(特定言之疫苗)中所含之各種組份。

提供以下實例來闡釋本發明。該等實例並不欲以任何方式限制本發明範圍。

【實施方式】

實例

製備 CEF.

在2%甲醛溶液中將66個SPF蛋培育1分鐘。在用70%乙醇沖洗後，打開蛋，提取胚胎並切除頭足。

然後藉由表1(見下文)中所述酵素組合物中之一種將胚胎(未解剖)在37°C下消化2小時。使用不銹鋼篩(Fischer Bioblock，目錄號A37532)過濾所得混合物以去除未消化組織且藉由離心(2300 rpm，15分鐘)收集CEF。

所得結果展示於下表1中：

酵素組合物	自每個胚胎提取之細胞
TrypLE™ Select, 30 mL/胚胎 分散酶, 10 mL/胚胎 膠原酶III型, 10 mL/胚胎	770×10^6
TrypLE™ Select, 10 mL/胚胎 分散酶, 10 mL/胚胎 膠原酶III型, 10 mL/胚胎	710×10^6
TrypLE™ Select, 15 mL/胚胎 分散酶, 10 mL/胚胎 Accutase, 10 mL/胚胎	709×10^6
TrypLE™ Select, 15 mL/胚胎 分散酶, 10 mL/胚胎 膠原酶III型, 10 mL/胚胎 Accutase, 10 mL/胚胎	696×10^6
TrypLE™ Select, 30 mL/胚胎 分散酶, 10 mL/胚胎 Accutase, 10 mL/胚胎	605×10^6
TrypLE™ Select, 10 mL/胚胎 分散酶, 10 mL/胚胎 膠原酶III型, 5 mL/胚胎	602×10^6
TrypLE™ Select, 30 mL/胚胎 分散酶, 10 mL/胚胎 膠原酶III型, 10 mL/胚胎 Accutase, 10 mL/胚胎	588×10^6
TrypLE™ Select, 10 mL/胚胎 分散酶, 10 mL/胚胎 Accutase, 10 mL/胚胎	583×10^6
TrypLE™ Select, 15 mL/胚胎 分散酶, 5 mL/胚胎	567×10^6

TrypLE™ Select, 30 mL/胚胎 分散酶, 10 mL/胚胎	560×10 ⁶
TrypLE™ Select, 10 mL/胚胎 分散酶, 10 mL/胚胎	546×10 ⁶
分散酶, 10 mL/胚胎 Accutase, 10 mL/胚胎	542×10 ⁶
TrypLE™ Select, 5 mL/胚胎 分散酶, 15 mL/胚胎	531×10 ⁶
TrypLE™ Select, 30 mL/胚胎 分散酶, 5 mL/胚胎 膠原酶III型, 5 mL/胚胎	291×10 ⁶
TrypLE™ Select, 30 mL/胚胎 Accutase, 15 mL/胚胎	375×10 ⁶
TrypLE™ Select, 30 mL/胚胎 膠原酶III型, 10 mL/胚胎	350×10 ⁶
TrypLE™ Select, 30 mL/胚胎	345×10 ⁶

TrypLE™ Select(Invitrogen, 目錄號 12563-029); 分散酶(Invitrogen, 目錄號 17105-041; 10 mg/mL, 存於PBS中); 膠原酶III(Gibco Invitrogen, 目錄號 17102; 20 mg/mL, 存於PBS中); Accutase(Sigma, 目錄號 A-6964)。

使用所製備 CEF製造病毒。

然後在潮濕氣氛及37℃下在無血清細胞培養基中將 CEF (如上所述用由15 mL/胚胎 TrypLE™ Select(Invitrogen, 目錄號 12563-029)及5 mL/胚胎分散酶(Invitrogen, 目錄號 17105-041; 10 mg/mL存於PBS中)組成之酵素組合物製備) 培養2天。然後棄去無血清細胞培養基並用表現MUC1-IL-2 之 MVA 病毒 (Collection Nationale de Cultures de

Microorganismes (CNCM), 存托號 N⁶⁰² I-721) 以 MOI 0.05 對 CEF 進行感染。然後將經感染 CEF 在 36.5°C 下培育 3 天。藉由在 BHK21 細胞上實施噬菌斑分析來測定感染效價。簡言之，將 MVA 樣品稀釋物接種於在 6 孔板中製備之 BHK21 細胞單層上。在 24 小時後，用針對牛痘病毒產生之兔抗體藉由免疫過氧化酶反應對病毒斑進行染色並計數。在三個獨立系列中一式三份實施滴定。所獲得病毒效價為： 6.3×10^7 噬菌斑形成單位 (PFU)/mL。

上文說明書中所引用之所有文件(例如專利、專利申請案、公開案)皆係以引用方式併入本文中。熟習此項技術者可瞭解對本發明所作之各種修改及改變，此並不背離本發明之範圍及精神。儘管已結合具體較佳實施例闡述本發明，但應理解所主張之本發明不應過度受限於該等具體實施例。實際上，隨附申請專利範圍之範圍內意欲涵蓋熟習此項技術者瞭解之用於實施本發明之所述方式的多種修改形式。

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： 99124030

※申請日： 99. 7. 21

※IPC 分類： ~~C12P~~

C12N^{7/04} (2006.01)

C12N^{15/86} (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

用於雞胚胎之消化作用的酵素組合物

ENZYMATIC COMPOSITION FOR THE DIGESTION OF CHICKEN
EMBRYOS

二、中文發明摘要：

本發明係關於用於雞胚胎之消化作用的酵素組合物，該等雞胚胎意欲用於製備用於製造病毒之細胞。本發明亦係關於製造野生型、減毒及/或重組病毒之方法，其包括使用本發明酵素組合物自雞胚胎製備細胞之步驟。本發明係關於所獲得純化野生型、減毒及/或重組病毒；且係關於包含該病毒之醫藥組合物，較佳為疫苗，其用於治療及/或預防癌症、傳染病及/或自體免疫病症；且係關於該病毒之用途。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to an enzymatic composition for the digestion of chicken embryos intended to the preparation of cells which are used for the production of viruses. The present invention also relates to a method for producing a wild type, an attenuated and/or a recombinant virus comprising a step of preparation of cells from chicken embryos using an enzymatic composition of the invention. The present invention relates to a purified wild type, attenuated and/or recombinant virus obtained and to a pharmaceutical composition, preferably a vaccine, comprising said virus for the treatment and/or the prevention a cancer, an infectious disease and/or an autoimmune disorder, and uses thereof.

七、申請專利範圍：

1. 一種酵素組合物之用途，其用於消化雞胚胎從而獲得雞細胞製劑。
2. 如請求項1之用途，其中該雞細胞製劑係由自每個胚胎提取的超過 500×10^6 個細胞所組成。
3. 如請求項1之用途，其中該等雞胚胎未經解剖。
4. 如請求項1之用途，其中該組合物包含至少2種酶。
5. 如請求項4之用途，其中該等酶選自由以下組成之群：
胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶原、胰凝乳蛋白酶原、分散酶、膠原酶、Accutase、嗜熱菌蛋白酶、鏈黴蛋白酶、透明質酸酶、彈性蛋白酶、木瓜酶、神經胺酸酶及胰酶，且較佳選自由胰蛋白酶、分散酶、膠原酶及Accutase組成之群。
6. 如請求項1至5中任一項之用途，其中該酵素組合物選自由以下組成之群：
胰蛋白酶、分散酶及膠原酶；
胰蛋白酶、分散酶及Accutase；
胰蛋白酶、分散酶、膠原酶及Accutase；
胰蛋白酶及分散酶；及
分散酶及Accutase。
7. 如請求項1至5中任一項之用途，其中該酵素組合物選自由以下組成之群：
以等效於30 mL/胚胎之TrypLE Select(Invitrogen，目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/胚胎之

10 mg/mL分散酶、及10 mL/胚胎之20 mg/mL膠原酶；

以等效於10 mL/胚胎之TrypLE Select(Invitrogen，目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶、及10 mL/胚胎之20 mg/mL膠原酶；

以等效於15 mL/胚胎之TrypLE Select(Invitrogen，目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶、及以等效於10 mL/胚胎之Accutase(Sigma，目錄號A-6964)之濃度添加之Accutase；

以等效於15 mL/胚胎之TrypLE Select(Invitrogen，目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶、10 mL/胚胎之20 mg/mL膠原酶、及以等效於10 mL/胚胎之Accutase(Sigma，目錄號A-6964)之濃度添加之Accutase；

以等效於30 mL/胚胎之TrypLE Select(Invitrogen，目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶、及以等效於10 mL/胚胎之Accutase(Sigma，目錄號A-6964)之濃度添加之Accutase；

以等效於10 mL/胚胎之TrypLE Select(Invitrogen，目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶、及5 mL/胚胎之20 mg/mL膠原酶；

以等效於30 mL/胚胎之TrypLE Select(Invitrogen，目錄號12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/胚胎之10 mg/mL分散酶、10 mL/胚胎之20 mg/mL膠原酶、及以等效於10 mL/胚胎之Accutase(Sigma，目錄號A-6964)之

濃度添加之 Accutase；

以等效於 10 mL/胚胎之 TrypLE Select(Invitrogen，目錄號 12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、10 mL/胚胎之 10 mg/mL 分散酶、及以等效於 10 mL/胚胎之 Accutase (Sigma，目錄號 A-6964)之濃度添加之 Accutase；

以等效於 15 mL/胚胎之 TrypLE Select(Invitrogen，目錄號 12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、及 5 mL/胚胎之 10 mg/mL 分散酶；

以等效於 30 mL/胚胎之 TrypLE Select(Invitrogen，目錄號 12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、及 10 mL/胚胎之 10 mg/mL 分散酶；

以等效於 10 mL/胚胎之 TrypLE Select(Invitrogen，目錄號 12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、及 10 mL/胚胎之 10 mg/mL 分散酶；

10 mL/胚胎之 10 mg/mL 分散酶、及 10 mL/胚胎之 Accutase；及

以等效於 5 mL/胚胎之 TrypLE Select(Invitrogen，目錄號 12563-029)之濃度添加之胰蛋白酶、及 15 mL/胚胎之 10 mg/mL 分散酶。

8. 如請求項 1 之用途，其中該雞細胞製劑係由分離之雞細胞組成。
9. 如請求項 8 之用途，其中該等分離之雞細胞係雞胚胎成纖維細胞 (CEF)、雞胚胎腎細胞 (CEKC) 或雞胚胎肝細胞 (CELC)，且較佳為 CEF。

10. 如請求項1之用途，其中該雞細胞製劑係由雞細胞混合物組成。
11. 如請求項10之用途，其中該雞細胞混合物包含CEF、CEKC、CELC、心臟細胞、肌細胞、上皮細胞、血液細胞及/或內皮細胞。
12. 如請求項1之用途，其中該等雞胚胎之消化作用係在以下條件下進行：
包括在35℃與39℃之間，較佳在36℃與37℃之間，更佳為36℃、36.5℃或37℃，且甚至更佳為37℃之培育溫度；及
包括在1與3小時之間，且較佳為2小時之培育持續時間。
13. 一種製造野生型、減毒及/或重組病毒之方法，其包括使用如請求項1至12中任一項之用途中所定義之酵素組合物自雞胚胎製備細胞之步驟。
14. 如請求項13之方法，其中該病毒選自由以下組成之群：
痘病毒、腺病毒、腺病毒相關病毒、逆轉錄病毒、皰疹病毒、甲病毒、泡沫病毒、流感病毒、黃病毒、麻疹病毒、風疹病毒、甲病毒、肝炎病毒、鼻病毒、呼腸孤病毒及泡沫病毒。
15. 如請求項14之方法，其中該痘病毒係選自由以下組成之群之脊索痘病毒(Chordopoxvirus)：正痘病毒(Orthopoxvirus)、副痘病毒屬(Parapoxvirus)、禽痘病毒屬(Avipoxvirus)、山羊痘病毒屬(Capripoxvirus)、兔痘病

毒屬 (Leprapoxvirus)、豬痘病毒屬 (Suipoxvirus)、軟疣痘病毒屬 (Molluscipoxvirus) 及亞塔痘病毒屬 (Yatapoxvirus)。

16. 如請求項15之方法，其中該正痘病毒選自由以下組成之群：天花病毒、牛痘病毒(VV)及經修飾牛痘病毒安卡拉(modified Vaccinia Virus Ankara) (MVA)。
17. 如請求項13至16中任一項之方法，其中該重組病毒包含外源序列，該外源序列係編碼具有胞嘧啶脫胺酶活性之蛋白質(較佳為FCU1蛋白或FCU1-8蛋白)之自殺基因。
18. 如請求項13至16中任一項之方法，其中該重組病毒包含編碼腫瘤相關抗原(TAA)(較佳為MUC1)之外源序列。
19. 如請求項13至16中任一項之方法，其中該重組病毒包含編碼抗原(較佳為HCV或HPV)之外源序列。
20. 如請求項18之方法，其中該重組病毒另外包含編碼細胞因子(較佳為IL2)之外源序列。
21. 如請求項19之方法，其中該重組病毒另外包含編碼細胞因子(較佳為IL2)之外源序列。
22. 如請求項13至16中任一項之方法，其中該重組病毒另外包含表現該(等)外源序列所需之元件。

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

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)