



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I850223 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：108109652

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 03 月 20 日

(51)Int. Cl. : G01N33/50 (2006.01)

G01N21/00 (2006.01)

(30)優先權：2018/03/20 美國

62/645,652

(71)申請人：美商路瑪賽特有限責任公司(美國) LUMACYTE LLC (US)

美國

(72)發明人：哈特 西恩 HART, SEAN (US)；亥柏特 柯林 HEBERT, COLIN (US)；麥克可伊
瑪格麗特 MCCOY, MARGARET (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

TW 494239B

CN 204287185U

US 2002/0005354A1

US 2008/0124726A1

US 2016/0069921A1

審查人員：施孝欣

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：21 共 54 頁

(54)名稱

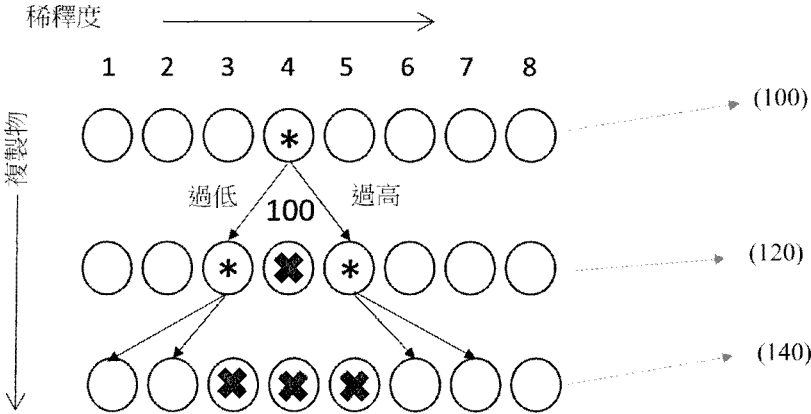
使用雷射力細胞學之先進生理及生化細胞監測與定量

(57)摘要

本發明係關於用於生理及生化細胞監測與定量之智慧型演算法、方法及電腦實施方法，其使用基於流體及光學力之量測而使能夠增強包括中和檢定及外來因子測試之先進感染力檢定之效能及客觀分析。

The present invention is directed to intelligent algorithms, methodologies and computer-implemented methodologies for biophysical and biochemical cellular monitoring and quantification enabling enhanced performance and objective analysis of advanced infectivity assays including neutralization assays and adventitious agent testing using fluidic and optical force-based measurements.

指定代表圖：



【圖1】



公告本

I850223

【發明摘要】

【中文發明名稱】

使用雷射力細胞學之先進生理及生化細胞監測與定量

【英文發明名稱】

ADVANCED BIOPHYSICAL AND BIOCHEMICAL CELLULAR
MONITORING AND QUANTIFICATION USING LASER FORCE
CYTOLOGY

【中文】

本發明係關於用於生理及生化細胞監測與定量之智慧型演算法、方法及電腦實施方法，其使用基於流體及光學力之量測而使能夠增強包括中和檢定及外來因子測試之先進感染力檢定之效能及客觀分析。

【英文】

The present invention is directed to intelligent algorithms, methodologies and computer-implemented methodologies for biophysical and biochemical cellular monitoring and quantification enabling enhanced performance and objective analysis of advanced infectivity assays including neutralization assays and adventitious agent testing using fluidic and optical force-based measurements.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

使用雷射力細胞學之先進生理及生化細胞監測與定量

【英文發明名稱】

ADVANCED BIOPHYSICAL AND BIOCHEMICAL CELLULAR
MONITORING AND QUANTIFICATION USING LASER FORCE
CYTOLOGY

【技術領域】

【0001】 本發明之實施例大體上係關於利用光學及/或流體力量測對差動刺激之細胞回應，以及係關於產生用於生理及生化細胞監測與定量之方法的智慧型演算法(IA)；在某些實施例中，本文中之方法被電腦實施。本文中所描述之實施例包括使能夠增強包括中和檢定及外來因子測試(AAT)之先進感染力檢定之效能及客觀分析。如所描述之方法使用基於光學力之量測，諸如雷射力細胞學(LFC)。具體而言，本發明描述用於對多孔板進行自動化掃描及分析以用於中和及其他功能檢定之自動化演算法及感染度量計算。另外，使能夠使用懸浮液或基質嵌入式細胞，以便擴展可用於此類檢定之感染模型以及監測、評估及定量外來因子(AA)樣本及培養物之能力。

【先前技術】

【0002】 當前，血清病毒中和檢定為用於分析活體內衍生免疫性抑制病毒感染及/或複製之能力的最高準則。中和檢定用以確定血清衍生抗體減少或阻斷培養物中之細胞中之病毒感染及/或後續複製的功效。基本上，人類或動物細胞係用感染性病毒劑及活體內衍生血清抗體之組合進行

活體外處理，以便檢驗血清衍生抗體是否對活體外細胞內之病毒劑的感染及/或複製具有特異性且有效。此等類型之分析實驗需要額外分析。溶斑檢定及溶斑減少中和測試(PRNT)兩者皆量測每單位體積之樣本的感染性病毒粒子之數目，後者亦量測由於中和血清或其他因子而引起的感染性單位之減少。檢定涉及將含病毒溶液置放於板中之生長黏附細胞上，施用覆蓋物(通常為瓊脂糖)以防止病毒自由地分散，且接著等待3至15天之間以使死亡細胞或已清除細胞(溶斑)之區域由於單一感染性病毒粒子而顯現。相似地，組織培養物感染劑量50 (TCID50)為藉由執行端點稀釋檢定而進行的特定體積中之感染性病毒濃度之量度。TCID50被定義為感染培養物中細胞之給定批次之接種孔之50%所需要的病毒稀釋度。儘管此等方法已被使用了數十年，但在以實驗與操作者之間的結果之可靠性及再現性執行該等方法方面存在固有挑戰。在懸浮液中之細胞分析、對大量樣本之需求(用於稀釋計算)、用於分析之耗時及主觀技術以及由於細胞操縱而產生的諸如細胞死亡及/或感染參數更改之不良後果方面，亦存在檢定之限制。所需稀釋度之數目大的一個原因為當前方法之動態範圍有限且當前方法之可變性高。

【0003】 先前技術描述了一種用於使用光學密度及各種約束以測定中和效價--諸如分析及標繪各樣本之最大光學密度--之方法及設備(美國專利公開案第2013/0084560號，其以引用之方式併入本文中)。然而，美國專利公開案第2013/0084560號僅使用光學密度而不利用微流體及/或光學力，且其亦未併有以下操作：藉由利用自動即時格點搜尋演算法以計算哪些樣本需要被讀取/分析以便確定實驗之結果而使用額外智慧。美國專利第4,329,424號中描述了另一半自動化系統，然而，此方法利用光源而非

光學力，且未完全自動化。

【0004】 另外，儘管美國專利第8,778,347號描述了使用由流動式細胞測量術監測之不活化螢光標記病毒以便減少實驗操縱所需要之安全防範，且歐洲專利第1140974號描述了使用假病毒粒子報導基因，但兩個參考文獻皆受到限制，此在於，歸因於用於檢定中之樣本細胞或感染物之繁瑣標記或修飾，必須分析大量樣本。因為細胞及感染物之修飾已被顯示為活化、分化或更改感染力及/或功能，所以需要無標記分析作為需要此類修飾以供分析之傳統方法之理想替代方案。

【0005】 此外，儘管WO1989006705描述了使用溶斑轉移檢定以用於偵測反轉錄病毒並量測中和抗體，但其中之教示將實驗者限於僅使用單層細胞類型。實際上，如熟習此項技術者所熟知，並非所有病毒皆感染形成單層之細胞。需要使能夠使用懸浮液或基質嵌入式細胞以用於感染研究及分析之方法及裝置，藉此允許在用於病毒感染之實驗中使用較多種細胞類型。

【0006】 諸如美國專利第6,778,263號之先前技術描述了使用校準對象(例如，珠粒或細胞)，然而，此類教示受到限制，此在於，其描述了僅在時間延遲積分(time-delay-integration；TDI)偵測器之內容背景中使用校準對象。TDI偵測器之功能性依賴於在固態偵測器(諸如電荷耦合裝置陣列)中使光子誘發性電荷線與試樣之流動同步地移位，且校準對象用以增強此系統之效能。此外，先前技術之校準珠粒不僅限於校準流量並對準TDI偵測器，其並未用以校準分析資訊以用於諸如折射率(例如，珠粒/人工細胞之折射率之比率)之物理或化學資訊之資料校正、正規化、定量或計算。缺少描述諸如光學力、光學扭力、光學動力學、有效折射率、大

小、形狀或相關量測之量測之校準對象的教示或使用，其中該等對象係基於聚合物、玻璃、生物、脂質、囊泡或細胞(活的或固定的)。此外，亦缺少具有與所關注粒子相關之性質但不干擾所關注樣本上之資料收集之校準對象的教示。

【0007】 需要用於在諸如生理及生化概況之多個鑑別態樣方面高效地特性化生物組分及系統的改良式方法及裝置。在某些實施例中，此類方法及裝置應包含適用於諸如得自基於病毒之疫苗接種或藥物發現試驗之樣本的樣本的智慧型演算法及方法，其使能夠在完整或耗盡細胞分離株中檢驗細胞類型之間、個體群組之間或甚至為試驗之間的感染力參數偏差。其他樣本處理可包括評估血清抗體、抗病毒化合物、抗菌化合物、毒素、有毒工業物質或化學物(TIM/TIC)、寄生物，及基因或細胞療法產物，諸如CAR T細胞及溶瘤疫苗。亦需要對利用經設計為對細菌敏感之細胞(低回應臨限值)之細菌的中和檢定，該等細胞包括用以使用基於多層面光學力之量測而量測感染物之感染力的細胞株或初級細胞。此類方法及裝置應理想地使能夠經由諸如經調節培養基之生物製造液體或諸如獲自生物反應器或其他此類容器之樣本之另一所關注樣本的分析而測定適用於外來因子測試之感染力量測。

【發明內容】

【0008】 當前可用的用於特性化諸如感染力檢定(例如，中和檢定、TCID50及臨床樣本操縱)之生物細胞及系統之程序及分析方法需要大量稀釋度、潛在有害的標記程序且得到高度可變的結果，從而使實驗間及實驗內及試驗比較具有挑戰性且使下游細胞應用受到限制。本發明藉由提供與生理及生化細胞監測與定量相關之新穎方法而克服了此類限制，該等方法

包括使用基於光學力之技術(諸如雷射力細胞學(LFC))以用於增強未標記細胞樣本之自動化掃描的智慧型分析演算法，該等技術引起對樣本稀釋度及最終樣本試樣之需求以及分析所需要之時間及關聯成本減少，同時使能夠在分析期間對細胞進行正規化及一致評定。另外，本發明使能夠使用懸浮液或基質嵌入式細胞以用於分析，從而擴展用於中和或其他功能檢定之感染模型之動態範圍以及監測、評估及定量來自樣本及培養物之外來因子之能力。

【0009】 背景技術--雷射力細胞學(LFC)--之基本前提為，其利用微流體學及光誘發性壓力之組合以在每細胞基礎上採取包括光學力或壓力、大小、速度及其他參數之光學量測。儘管LFC為較佳實施例，但根據本發明可使用其他基於光學力之技術。將LFC應用於中和、TCID50及其他檢定之掃描及分析以用於測定病毒效價及感染力(兩者彼此同義)以及濃度測定係藉由量測細胞之特性改變而執行，該等改變指示與含有抗體及/或所關注病毒之血清共培養之細胞相較於僅用未免疫血清(對照或安慰劑)處理之細胞的細胞病變效應。另外，在不存在血清之情況下與病毒共培養之細胞可用以測定得自初級或細胞培養源之細胞之感染速率。在下文中，對中和檢定之任何參考亦將被視為包括對作為習知應用之TCID50或溶斑檢定之參考。

【0010】 本發明減少了與實驗主觀性、時間及成本需求相關聯之挑戰，同時增強了關於讀取及分析樣本之客觀易用性。此係藉由使用智慧型演算法(IA)以掃描及自動地且以演算法計算稀釋及/或效價測定及需求而實現，與人類計算無關。一種智慧型演算法為涉及包括模糊邏輯方法之複雜指令集的演算法，該等方法涵蓋可變結果，諸如感染力及感染度量(例

如，低、中等或高感染力範圍)。IA亦可包括人工智慧(AI)概念，包括神經網路(NN) (反向傳播或機率性NN)或機器學習以將校準資料應用於當前樣本以較好地預測用於取樣之最佳格點搜尋型樣。本文中所揭示之此新穎方法最終減少了每實驗所需要之稀釋度數目且因此節省了實驗者資源、時間及高度受訓練人員對結果之分析需要，以及消除了如當前對定量中和檢定效價所需要的報導基因、抗體或其他染色/標記機制之使用。

【0011】 本發明使用光學及/或流體力而最佳化對差動刺激之細胞回應之量測，且使能夠遞送生物系統之一致及可靠特性化。

【圖式簡單說明】

【0012】 圖1為用於選擇依序稀釋(100; 演算法將基於輸入至軟體中之觀測資料、資料趨勢及實驗佈局自動地選擇用於分析之較高或較低稀釋度。在一替代方案中，演算法可經設定以自動地搜尋某些條件，包括在一或多個取樣時間點之各種時間點、稀釋度或試劑變化)並在細胞培養孔板上計算TCID50/mL或中和百分比且將結果定義為感染度量/mL 「IM」 (120; 將細胞計數(穿過LFC儀器的每單位體積之細胞總數)與感染力資料(%CPE)耦合以獲得IM/mL及稀釋度因子)之智慧型演算法(IA)(稀釋度格點搜尋)過程之實例。另外，IA (100)使能夠使用細胞之細胞病變效應百分比(%CPE)之定量量測而進行稀釋度與複製物之間的內插及結果之分析(140; 使用%CPE之定量量測來進行稀釋度與複製物之間的內插)。

【0013】 圖2描繪詳述基於光學力之技術Radiance™之實施例如何利用如本發明中在圖1中所描述之(100; 演算法將基於輸入至軟體中之觀測資料、資料趨勢及實驗佈局自動地選擇用於分析之較高或較低稀釋度。在一替代方案中，演算法可經設定以自動地搜尋某些條件，包括在一或多個取樣時間點

之各種時間點、稀釋度或試劑變化)操縱含樣本培養板以供應用於中和(200; 傳統中和)及TCID₅₀檢定(220; TCID₅₀檢定可潛在地保存稀釋液之操縱、培育期且提供客觀即時實驗分析)的圖解(運用雷射力細胞學(LFC)之中和及功能檢定; 用於中和檢定之Radiance™及自動取樣器方塊圖)。

【0014】圖3為表明使用添加至可用作內部校準標準之細胞樣本之校準珠粒的示意圖(用於資料完整性之原位校準珠粒)。

【0015】圖4描繪使用Radiance™以用於生物反應器取樣及分析以進行外來因子測試(AAT)(雷射力細胞學-AAT方法實例)。

【0016】圖5繪示使用Radiance™之策略AAT評估及監測。

【0017】圖6為CHO細胞¹中之病毒CPE及複製的概述表(¹Berting, A, Farcet, M, Kriel, T Biotechnology and Bioengineering, 106, 4, 2010)。

【0018】圖7定義同時使用多種細胞類型以進行AAT之LFC多工檢定的潛能。

【0019】圖8表示藉由直接自大製程生物反應器取樣而進行之AAT的LFC分析。

【0020】圖9描繪使用運行摻入CM之懸浮細胞之微型生物反應器之AAT的LFC分析。

【0021】圖10為繪示AAT之LFC巨噬細胞檢定的示意圖。

【0022】圖11提供表明如本文中所使用之智慧型演算法的流程圖(IM為感染度量，OLDR為最佳線性動態範圍)。

【0023】圖12提供表明被應用智慧型演算法之潛在情況的圖形：圖12(A)為中間效價，圖12(B)為高效價，圖12(C)為低效價，圖12(D)為低效價(過多稀釋)，且圖12(E)為高效價(未充分稀釋)。

【0024】 圖13提供顯示感染度量對感染水泡性口炎病毒之非洲綠猴腎細胞之MOI的圖形：圖13(A)為MOI 0.125，圖13(B)為MOI 0.5，且圖13(C)為MOI 4。

【0025】 圖14提供表明黏附HEK 293細胞中腺病毒感染(Ad5)之各種量測之四個圖形中的實例資料：圖14(A)為大小對速度之散佈圖，圖14(B)為顯示速度頻率之直方圖，圖14(C)為顯示一系列MOI值之多變數感染度量的條形圖，且圖14(D)為使多變數感染度量與以PFU/mL為單位之病毒效價相關的散佈圖。

【0026】 圖15提供Radiance™資料之K均值叢集分析(K均值叢集載玻片; K-選擇感染度量之K均值叢集)。

【0027】 圖16提供用於計算絕對效價/感染力之示意圖。

【0028】 圖17提供如下圖形：圖17(A)為效價(對數尺度)，圖17(B)為效價(線性尺度)，且圖17(C)為感染度量。

【0029】 圖18提供表明感染力及絕對效價結果之圖形。

【0030】 圖19提供使用ANN之病毒之LFC鑑別。

【0031】 圖20提供概述用於評估細胞回應作為用於安慰劑患者之疾病偵測或疫苗功效之生物標記之步驟的示意圖。

【0032】 圖21提供概述用於評估細胞回應作為用於患者個體之疾病偵測或疫苗功效之生物標記之步驟的示意圖。

【實施方式】

【0033】 參考具有各種特徵之特定實施例描述本發明。對於熟習此項技術者而言將顯而易見，在不脫離本發明之範疇或精神的情況下，可對本發明之實踐進行各種修改及變化。熟習此項技術者將認識到，此等特徵

可基於給定應用或設計之需求及規格而被單一地或以任何組合方式使用。熟習此項技術者將認識到，本發明之實施例之系統及裝置可與本發明之方法中之任一者一起使用，且本發明之任何方法可使用本發明之系統及裝置中之任一者來執行。包含各種特徵之實施例亦可由彼等各種特徵組成或基本上由該等特徵組成。自本說明書之考慮及本發明之實踐，本發明之其他實施例對於熟習此項技術者而言將顯而易見。所提供之本發明之描述本質上僅為例示性的，且因此，不脫離本發明之要素的變化意欲在本發明之範疇內。

【0034】 在詳細地闡釋本發明之至少一個實施例之前，應理解，本發明在其應用方面不限於以下描述中所闡述或圖式中所繪示之組件之構造及配置的細節。本發明能夠具有其他實施例或能夠以各種方式來實踐或進行。又，應理解，本文中所使用之措詞及術語係出於描述之目的且不應被視為限制性的。

【0035】 除非另有定義，否則本文中所使用之所有技術及科學術語皆具有與由此技術及方法涵蓋的一般熟習此項技術者將通常理解或使用之含義相同的含義。

【0036】 在一實施例中，提供用於使用光學及/或流體力量測對差動刺激之細胞回應之方法，其中此類方法包含：接收一系列包含用不同已知位準之刺激或分析物處理之生物細胞的初始樣本；對樣本執行基於光學力之量測；基於一或多個光學或流體力之參數產生回應度量(RM)以描述對刺激之細胞回應。在某些實施例中，如本文中所揭示之方法可被電腦實施。

【0037】 如圖1中所繪示，智慧型演算法(100)經設計為用於讀取(偵

測)、分析及預測細胞改變,諸如但不限於多孔板(96孔為較佳實施例,但「孔板」可在下文中被理解為意謂任何孔板,包括但不限於含有任何數目個孔或圖案或容器之孔板(參見例如圖4))中所含有之樣本的細胞病變效應(CPE)(例如,病毒、細菌或毒素效應之% CPE。替代地,包括但不限於有效折射率或大小正規化速度之任何LFC量測參數可用以代替% CPE而描述細胞改變)。在一個實施例中,演算法軟體在開始孔位置中起始細胞改變--亦即% CPE--之儀器分析及偵測。在態樣中,此開始位置可由使用者基於經驗或其他預程式化歸向座標而選擇。在實施例中,演算法隨後將基於先前載入至軟體中之觀測資料、資料趨勢及/或實驗佈局自動地選擇具有較高或較低稀釋度之孔。具體而言,取樣基於使用者輸入或先前知識以中間稀釋度或未經處理對照而開始。待分析之下一樣本係基於初始樣本之定量結果而選擇。更具體而言,對於感染力量測,此可指% CPE。因此,若% CPE高於目標感染力值(例如,50%),則所分析之下一樣本將為含有較大稀釋因子之樣本(例如,較低濃度之分析物,諸如病毒或中和劑)。移動之間隔大小取決於量測之量值。舉例而言,接近最大值(100%)之CPE值可保證降低兩個至三個稀釋度,而較接近所要值(50%)之CPE值將需要僅降低一(1)個稀釋度。相反地,若初始量測低於目標值,則所量測之下一樣本將為較小稀釋因子(較高濃度之分析物),且間隔之量值將再次基於量測之量值。以相似方式選擇所取樣之後續稀釋度,直至鑑別出目標稀釋度或已(部分地或全部地)分析板。此後,取樣同一稀釋度下之複製物,直至可測定感染力之準確量測。若存在對所預期之感染力或分析物之位準的有限先前知識或理解,則取樣可基於量測在中間開始且以自動化方式繼續進行,直至已鑑別出目標感染力。此可最終引起準確地量測樣本之感染力所

需要之稀釋度及/或複製物之數目減少。因此，相較於傳統中和檢定所需要之數目，本文中所提供之新穎方法減少了所需樣本稀釋度之數目，且亦藉由應用智慧型演算法及藉由使用諸如雷射力細胞學(LFC)之基於光學力之技術提供的較大動態範圍而減少了孔板分析所需要之時間。在一實施例中，所利用之基於光學力之技術包含雷射力細胞學(LFC)，然而，任何其他基於光學力之技術可與如本文中所描述之本發明一起使用，包括但不限於光學層析、交叉型光學層析、雷射分離、正交雷射分離、光學鑷子、光學捕獲、全像光學捕獲、光學操縱及雷射輻射壓力。

【0038】 在一替代實施例中，可設定IA (100)以自動地搜尋某些條件，包括在一或多個取樣時間點之各種時間點、稀釋度或試劑變化。因此，IA (100)可監測最低稀釋度，外推及預測濃度及取樣需求，且使用光學力量測(亦即，LFC)計算對下一分析之估計並使能夠計算感染度量/mL(「IM」)(120)。如本文中所使用，術語感染度量(「IM」)或回應度量(「RM」)係指考量以下各者之特定參數或值：細胞計數、速度(包括在飛行時間期間之速度及位置改變)、光學力、大小、形狀、縱橫比、偏心率、變形性、定向、旋轉(頻率及位置)、折射率、體積、粗糙度、細胞複雜度、基於對比度之影像量測(例如，空間頻率、時間或空間之強度變化)、3-D細胞影像或截塊、雷射散射、螢光、拉曼或其他光譜量測，及關於反映樣本中之細胞改變或病毒/細菌感染力之位準之細胞或群體而進行之其他量測的任何組合或該其他量測。在一實施例中，諸如Radiance™(可購自LumaCyte™ (Charlottesville, Virginia, USA)之雷射力細胞學儀器)之裝置用於進行基於光學力之量測，然而，對於熟習此項技術者而言將顯而易見，能夠進行包括LFC之光學力量測的其他裝置及方法將適合用

於結合本發明而使用。(出於清晰起見，感染度量(IM)及回應度量(RM)可取決於正進行之量測之類型而互換地使用。)

【0039】 在圖1中被標記為(120)之一個IA實施例係藉由量測各種感染力位準下之多個樣本來顯現，以便測定在感染時所量測之Radiance™特定參數如何改變。如圖1中所指示，當在每單元基礎上量測此等參數時，LFC儀器(「Radiance™」)關聯軟體自動地計算(120)各樣本。(120)可相當於傳統TCID50/mL、pfu/mL、感染倍率(MOI)或其他已知感染值，但亦含有關於細胞群體之額外定量資訊。每細胞多參數分析得到可在細胞群體與病毒株感染力速率中偵測多得多的敏感性移位或在細胞群體與病毒株感染力速率之間偵測多得多的差異的資料。在替代方案中，將(120)應用於各種細胞株及病毒株亦可經正規化以使感染模型與來自疫苗接種或未疫苗接種樣本之血清之間的變動及或相似性相關，在該等樣本中可檢驗血液中之藥物或疫苗誘發性抗體之位準對細胞之影響。此外，細胞之細菌或病毒感染的結果可在各種研究之間及跨越各種研究對細胞群體之趨勢進行進一步比較。

【0040】 可藉由調節(100)以外推來自所分析之孔的資料，使用%CPE (140)之定量量測來進行稀釋度與複製物之間的內插，以確定用於高度準確且敏感之分析の間質對數或指數資料點，該分析與觀測現象直接相關。此預測性演算法測定可告知使用者未來實驗及樣本操縱所需要之稀釋度或複製物策略。

【0041】 圖12及圖13提供關於用於量測感染性之實例IA之細節的額外細節。儘管此實施例描述基於Radiance量測之感染性病毒效價(感染力)的計算，但演算法可以相似方式應用於其他系統。本文揭示用於此特定實

施例之假定及目標。具體而言，假定包括已鑑別出基於**Radiance**量測之感染度量，已知病毒/細胞組合之感染度量之對照(未感染)及最大值，且已知用於校準曲線之擬合類型(亦即，線性對對數)。**IA**之目標係為了獲得最大化感染性病毒效價或感染力之準確度、精確度以及信雜比之**RIM**的一或多個值。應存在確保此之用於**RIM**之值的範圍，該等值係基於用以產生校準曲線之先前資料計算。該範圍係校準曲線之最佳線性動態範圍(**OLDR**)的術語且可在每病毒/細胞株基礎上調整。另外，有可能在**OLDR**內量測多個值且接著全部用於計算所得感染性病毒效價或感染力。在一些實施例中，**IA**之目標包括：在校準曲線之線性動態範圍內獲得最佳感染度量(最佳準確度、精確度及信雜比位準-**S/N**)；一個量測及在彼稀釋度處於校準曲線之最佳線性動態範圍(**ODLR**)(例如，最大感染度量之40%至60%)內或搜尋**ODLR**內之一個額外感染度量值且接著選擇最佳稀釋度的情況下進行；使用**S/N**以確定資料點之適合性(計算資料之平坦區中之**N**及峰度量信號處之**S**)；可組合及平均化若干不同稀釋度(病毒樣本之體積)以在其處於**ODLR**內的情況下計算目標值；及可在每病毒/細胞株基礎上調節**ODLR**。

【0042】 圖11顯示描述實例演算法之流程圖。第一步驟為量測樣本，其中之第一者通常在稀釋度值之範圍的中間。若**RIM**之值在**OLDR**外部，則取樣不同孔，若**IM**過低，則移動至病毒(分析物)之較高濃度，且若**IM**過高，則移動至病毒(分析物)之較低濃度。一旦**IM**之值在**OLDR**內，進行檢驗以確認樣本是否真正地在**OLDR**內。關於此之原因繪示於圖12中，圖12顯示**IM**隨病毒(分析物)之濃度變化而變化的數個實例圖形。在一些情況下(顯示於A.中間效價中)，高濃度分析物之**IM**平穩期的值，在此情況下，關於單一量測值是否實際上在**OLDR**內，將存在較小的混淆之可能

性。在其他情況下(顯示於B.高效價中)，在OLDR外部之極高濃度下的IM之值可相同或甚至小於實際上在OLDR內的值。因此，必須使檢查成為圖11中之實例演算法之部分以確保值在OLDR內。檢查之第一部分係為了查看未必為IM之部分的樣本之其他特性及量測是否可用以判定樣本是否真正地在OLDR內。此可基於與系統之生物學相關之先前知識以及LFC系統中可能進行之其他量測。若其他度量可用以確認OLDR，則演算法根據彼測試之結果繼續進行。若其他度量證實OLDR，則量測完成且可計算效價(感染力)。若其他量測無法確認OLDR，則針對病毒(分析物)之下一最高濃度量測IM。若不存在可用以確認OLDR之其他度量，則執行同一步驟。基於較高病毒濃度之IM，演算法相應地繼續進行。若IM基於校準曲線之先前知識改變預期量，則該值經確認為真正地在OLDR中，且量測完成。若否，則該值在OLDR外部且很可能過高，因此量測之下一樣本在病毒濃度方面降低3個階躍。

【0043】 額外情況顯示於圖12中，圖12描述IM隨病毒(分析物)濃度變化之潛在趨勢或情況。除了已描述之兩種情況之外，12C.亦顯示病毒之低初始濃度，使得取樣之體積下之較少值在OLDR內，而12D.顯示初始濃度如此低以致量測之所有稀釋度皆在OLDR外部。最後，12E.繪示如此高以致所有值皆亦在OLDR外部之初始濃度。

【0044】 圖2中之示意圖繪示用於先前及較佳實施例應用之以引用之方式併入本文中的先前受專利保護之雷射分析及分類技術(「Radiance™」)，其中樣本源自含有多個患者血清-病毒稀釋液及所選細胞之中和檢定且藉由LFC (200)分析。對於中和檢定，血清及病毒在孔板中培育一段時間，隨後與細胞及隨後培育組合。在培育期之後，藉由

Radiance™分析樣本以便確定包括(120)之計算的感染力值。傳統中和檢定本質上需要使用黏附細胞來以用於檢定效能。當病毒感染在懸浮液中時需要生長及感染之許多哺乳動物及昆蟲細胞株時(生理需求)，此可限制用於中和檢定研究之模型。**Radiance™**藉由不需要用於處理及量測樣本之技術的平孔板或黏附細胞來使能夠分析用於中和及其他感染力檢定之懸浮細胞。使用懸浮細胞(160)隨時間進一步允許潛在較均勻之感染及對同一孔進行取樣(例如，週期性取樣)。在另一實施例中，細胞可在取樣之前懸浮於海藻酸鹽、明膠或其他相似半固體懸浮液中以便在經延長之培育時間期間降低對組織培養板表面之附著及/或提供更加代表活體內條件之物理環境(180；海藻酸鹽或明膠類型之基質用於使用細胞以保持較分離以用於感染/稀釋精確度)。懸浮液基質之潛在使用進一步使能夠相對地隔絕來自其他細胞之潛在干擾接觸信號而感染稀釋細胞且使得感染模型之生理相關性能夠比先前技術當前所體現之生理相關性更準確。此外，**Radiance™**及IA (100)允許對於病毒或其他病原體計算百分比中和。在一實施例中，**Radiance™**及IA (100)可用於在TCID₅₀或溶斑檢定(220)中自動分析且評分CPE或溶斑形成以及用於AAT，藉此定期取樣受感染細胞以偵測細菌、病毒或另一病原體之存在。在此情況下，病毒或其他分析物將不與中和血清一起培育，但替代地直接與細胞組合。

【0045】 使用LFC量測細胞改變以用於任何類型之細胞或粒子由病毒、細菌、原蟲或真菌感染、細胞分化、壞死、細胞凋亡、老化、成熟、惡性疾病(無論是否為癌組織、細胞、物質循環)、胞外體、抗體、蛋白質或小分子所致之改變。動物或植物系統內之細胞可表現為哨細胞，原因在於其回應且以可使用LFC偵測之方式改變。細胞或其他生物粒子之生理、

生化或其他性質之改變可由各種外部或內部改變或損害(諸如上文所描述之彼等)而改變。LFC偵測及量測此類微妙改變(回應度量(RM))之能力使得其為用於生物標記發現及鑑別動物、植物、原蟲或真菌系統中之微粒的工具。此等生物標記對於偵測與疾病或生物過程相關之新型或更改細胞狀態為重要的。圖20及21提供此等概念之實例，其中人類患者患有疾病或被給與治療(例如但不限於化學、疫苗、細胞或基因療法)且其血球(紅血球、白血球、血小板分離或不分離)、胞外體或其他細胞或生物組分回應於疾病或治療而改變(對於經治療之患者)。LFC可偵測此等改變，其可接著形成生物標記基礎以用於未來監測。

【0046】可如在圖3中使用一或多個類型及/或大小之內部校準對象(珠粒或粒子)(300; 包括固定細胞、活細胞及/或感染病毒之細胞等的校準細胞/珠粒; 量測樣本流中之校準珠粒作為內標; 用以在整個量測中監測系統效能-不僅每天、每板、每列; 可用以出於驗證目的而拒絕或接受資料; 用以正規化資料以確保一致性-若校準資料超出設定限制，則資料被拒絕且不能正規化)之使用，以提高實驗樣本以一致方式表現之可信度。並行校準可藉由監測貫穿板分析之系統效能而產生經增強之滴定效能、降低樣本之間的誤差及標準差、使得資料能夠根據實驗參數被排斥或接受及/或經正規化以確保相互及/或內部實驗一致性(無論是否固定、冷凍乾燥抑或人工)。在某些實施例中，取決於樣本之性質及所需校準之所需位準，校準對象可在每一列開始時或在板上使用一次。本發明描述量測，諸如光學力、光學扭力、光學動力學、有效折射率、大小、形狀或單獨或與細胞混合之校準對象之相關量測，其中該等對象基於聚合物、玻璃、金屬、合金、生物製劑、脂質、囊泡或細胞(活的或固定的)。校準對象應具有與所關注粒子相關之性質，但不干擾

所關注樣本上之資料收集。校準對象可單獨使用、與所關注樣本混合、與不同類型之校準對象混合、或三者之任何組合。如上文所描述之光學力及其他量測可用於校準、驗證或增強系統之效能以及正規化或比較跨越不同系統之資料。

【0047】 在一實施例中，提供基於對不同濃度之處理的細胞回應生成校準曲線且接著使用此類曲線以用於預測未知位準之樣本之特性的方法。此類方法包含以下步驟：添加處理及培育樣本細胞；藉由基於光學力之量測分析具有細胞的複數個樣本及處理之已知範圍以確定回應度量；基於稀釋趨勢確定最佳回應度量及時間；及使用所產生資料以預測未來樣本。

【0048】 產生代表性校準曲線所需要之步驟之兩個實施例顯示於實例14及實例15中。實例14描述用於自具有未知效價之樣本之已知或充分理解的病毒樣本計算效價並產生校準曲線的方法(已知：病毒、細胞、培養基、培育時間、感染度量；未知：效價；結果：1)經測試病毒樣本之效價及2)校準曲線；1.製得病毒儲備液之稀釋液；2.添加至細胞中；3.培育指定時間段；4.收集細胞且在Radiance儀器上分析具有複製物之稀釋液；5.基於絕對效價演算法計算效價；6.用以計算稀釋感染力之效價(效價)；7.用於未來樣本之校準曲線)。充分理解意謂已基於先前實驗建立用於計算效價之IM及培育時間兩者。在此情況下，製得已知病毒儲備液之稀釋液且將其添加至細胞中，隨後培育指定時段。接著，收集細胞且使用能夠進行基於光學力之量測之Radiance™或相似儀器分析。接著基於圖16中所描述之絕對效價/感染力演算法計算效價(感染力)。一旦計算效價，則亦可藉由使用所確定之效價值以計算各稀釋液的病毒濃度來產生校準曲線。此校準曲線可接著用

於未來未知樣本之量測。

【0049】實例15描述用於自具有未知效價之樣本之未知或未充分理解的病毒系統計算效價並產生校準曲線的方法(已知：病毒、細胞、培養基；未知：效價、培育時間、感染度量；結果：1)經測試病毒樣本之效價及2)校準曲線；1. 製得病毒儲備液之稀釋液；2. 添加至細胞中；3. 培育指定時間段；4. 在Radiance儀器上分析具有複製物之稀釋液；5. 基於稀釋趨勢確定最佳感染席量及時間(1. 有時可使用單變數度量；2. 整個群體直方圖或子集可用作輸入向量之部分；3. K均值叢集可用以鑑別額外度量；4. 亦可與PLS組合以產生多變數度量)；6. 基於絕對效價演算法計算效價；7. 用以計算稀釋感染力之效價(效價)；8. 用於未來樣本之校準曲線)。在此情況下，已知病毒及細胞株，但IM及培育時間為未知的。因此，必須實施實驗以確定感染後之培育時間以及使用何種LFC參數以計算感染度量。如實例15及圖13至圖15中所描述，存在產生此等度量之數個方式，但與使用何種參數以計算IM無關之總目標係為了顯現在儘可能廣泛範圍之病毒濃度內與感染性病毒效價充分相關的參數(或參數集合)。此情形之一實例繪示於圖13中，顯示LFC參數中之一者之直方圖、大小正規化速度及其相對於所添加之病毒(MOI)之量如何改變。在此情況下，非洲綠猴腎細胞(Vero cell)已感染水泡性口炎病毒(VSV)。如所示，大小正規化速度隨MOI增加而增加，在第一直方圖中之MOI 0.125至最後一個直方圖中之MOI 4.0範圍內。與速度之標準差偶合之大小正規化速度用以顯現與MOI且因此與病毒濃度強烈相關的IM。圖14顯示來自感染人類胚腎(HEK 293)細胞之人類腺病毒5(Ad5)之另一病毒系統的資料。其亦繪示用於顯現IM、部分最小平方(PLS)分析之另一技術。在此情況下，可將需要之儘可能多的參數添加至

PLS計算中以便顯現多變數IM。PLS模型之輸入可為群體寬統計，諸如由LFC儀器量測之任何參數的平均值、標準差或中值，且亦可為較複雜的輸入，諸如具體參數，諸如速度之群體直方圖。此直方圖之區間可簡單地基於區間之間的標準距離而界定，或可基於圖15中隨顯示之叢集演算法，諸如K均值叢集而調整。在K均值叢集之情況下，可界定區間之數目以及所使用之參數。又，一般而言，整個群體或僅其一部分可用於界定群體直方圖。

【0050】 圖16描述一種用於在已知感染度量及培育時間時計算未知樣本之效價(感染力)的具體方法。如實例15中所描述，將細胞用不同病毒稀釋液感染且接著計算各樣本之感染度量，因為在指定感染後培育期之後對其進行分析。在高於病毒之某一濃度下，基本上所有細胞在第一輪感染期間應感染。已開發多個分佈來描述病毒感染，但通常使用之一個特定實例為泊松分佈(Poisson distribution)。一般而言，感染度量將具有高於給定病毒濃度之最大值或平穩期。因此，分析未知樣本時之第一步驟為鑑別最大感染度量以及感染度量何時開始降低至彼最大值以下，其應基於假定之病毒感染分佈以已知方式出現。藉由理解此分佈以及細胞數目及所添加之病毒之體積，可添加病毒之感染性單位的數目。一旦在確定最大感染度量點，在所示特定實例中，此發生在MOI 4下，下一步驟為減去未感染對照細胞之基線感染度量。假定細胞之100%感染為最大感染點，其允許藉由以線性方式縮放感染度量來計算感染於較低病毒濃度下之細胞的百分比。下一步驟為基於感染時細胞之數目、在各稀釋度下未感染細胞之百分比、泊松分佈(儘管可使用其他分佈)及在彼稀釋度下添加之病毒的體積，計算在各稀釋度下添加於感染性單位/毫升中之病毒之量。關於此關係之

方程式為：

$$\text{效價} \left(\frac{\text{感染性單位}}{\text{mL}} \right) = -\ln P(0) \times n/v$$

其中P(0)為未感染細胞之部分，n為感染時細胞之數目，且v為所添加之原始病毒儲備液之體積(mL)。基於泊松分佈，假定：

$$MOI \left(\frac{\text{感染性單位}}{\text{細胞}} \right) = -\ln P(0)$$

作為下一步驟之部分，測定落入計算之最佳範圍內之稀釋度。一般而言，此感染於0.5%與40%之間。一旦測定此等稀釋度，可基於來自OLDR內之2至3份稀釋液之平均效價計算總效價(感染性單位/mL)。

● 顯示稀釋度與效價之間的關係之具體資料顯示於圖17及圖18中。圖17顯示線性與對數尺度上之稀釋度與效價之間的相關性以及此具體資料集之MOI與感染度量之間的關係。圖18顯示基於此計算自5個獨立實驗預測之絕對效價/感染力。已知效價與預測之效價之間的平均差為0.096log₁₀。

【0051】基於光學力量測之感染力的分析亦可能在諸如Radiance™之裝置上以多個格式進行。樣本殼體之形式包括但不限於具有各種孔板數目或大小組態(平底或U型底)之孔板，諸如6、12、24、48或96孔板；具有孔、空間、凹槽或用於細胞培養、流動或懸浮液之其他凸起或凹陷特徵之圖案化表面；在孔板或微流體結構上、在其中或獨立於其之一個或多個細胞之液滴；可容納較大樣本體積的其他容器，諸如培養皿、燒瓶、燒杯、生物反應器或導管。更改樣本製備之格式之能力使得使用者能夠利用任何數目之多個實驗設計，包括分析於一個製劑中之樣本的不同樣本大小、劑量/稀釋液及/或量值。

【0052】如熟習此項技術者所已知，與製造諸如疫苗及細胞及基因

療法產物之生物產物相關聯的一個嚴重問題為無意引入外來因子(內源性或外源性)。使用基於光學力之量測，諸如使用LFC以偵測生物反應器調節培養基或用於生物製造之其他流體中之外來因子(AA)獲得的彼等量測係本文中所描述之新穎方法的重要能力。本發明之方法使能夠進行對品質之關鍵評估及對細菌、病毒或其他複製/活性污染物損害藥物物質之產生的預防。使用LFC之先進AAT之最終目標係為了阻止可能包括於可導致患者之潛在感染的藥品中。使用LFC以用於量測生物製造中之病毒感染力之總體製程顯示於圖4中，其中來自生物反應器或其他製造製程之調節培養基(CM; 調節培養基可被移除或保持在細胞上持續延長時段; LFC可潛在地鑑別病毒感染，即使存在由培養基中之組分所致之細胞改變亦如此)與在懸浮液或黏附培養液中生長之細胞混合且培育比當前在FDA準則下耗時14天或更多天數之當前方法短的時間段。使用空白樣本作為對照來監測同一細胞。可調節細胞曝露於經調節培養基之時間量作為檢定最佳化的部分。

【0053】 在一實施例中，當使用LFC以監測AA時第一防線係使用CHO或用於生物生產之另一細胞株直接作為可使用LFC量測之回應性細胞。儘管並非所有病毒皆在CHO細胞(及其他生產細胞株)中引起細胞病變效應，但多數引起，且此在生產期間形成CHO細胞改變之即時監測之基礎。可將使用LFC來量測之變數之偏差用作AA潛在污染之指標。此顯示於圖5中，其中給出使用Radiance™/LFC之AAT之總體策略。用於生產之CHO細胞係藉由取樣系統不斷監測，該取樣系統移出細胞且將其引入至Radiance™以用於LFC分析以將其固有性質之改變計量為AA之監測方式。若AA存在，則CPE可為可見的，且此不同於用以監測蛋白質產生之

LFC量測之變數的任何改變。與線上分析相反，樣本亦可自生物反應器移除且分別在Radiance™中使用LFC運行。調節培養基(CM)可移除且與具有或不具有濃度之細胞一起培育(例如，離心以濃縮潛在AA)。在培育期之後或貫穿培育期，可監測細胞之AA徵象。Radiance™/LFC可分類出潛在感染之細胞且收集其以用於使用其他方法之分析，該等方法包括光譜(螢光、拉曼或其他)、聚合酶鏈反應(PCR)、次世代定序(NGS)、質譜分析(MS)、細胞測量術(流動、螢光、質量或影像)或其他方法。

【0054】對於不在CHO細胞中引起細胞病變效應之彼等病毒，其他細胞株可用於偵測。圖6顯示病毒之部分清單且根據細胞病變效應及複製對其進行分類。此指示四種細胞株可提供對潛在病毒之適當覆蓋：非洲綠猴腎細胞、幼倉鼠腎細胞(BHK)、MRC-5細胞及人類腎臟纖維母細胞(324K)細胞。小組不限於此等四種細胞株且可使用其他現有細胞株，以及經修飾以用於特定易感性之新近研發之細胞株。

【0055】在另一實施例中，本文所描述之方法可用以基於資料之特定型樣對病毒或其他AA進行分類。可對此使用若干方法，包括人工神經網路(ANN)、型樣辨識或預測性分析之其他方法。使用LFC資料之此之特定資料實例顯示於圖19中。此處，使用ANN以使用約17個LFC參數作為輸入來將測試樣本分類為三種潛在病毒中之一者。

【0056】在某些實施例中，為了加快分析，可與具有調節培養基(CM)或另一分析物之活體外細胞株同時運行多個細胞株。在某些實施例中，細胞為易受所監測或偵測之條件(病毒、細菌、黴漿菌、感染或其他AA)影響的細胞且可使用LFC量測其回應。圖7顯示在各孔或生物取樣系統中使用多個活體外細胞株之多重檢定。藉由參數空間或使用其他

標記、螢光、可見亮視野微觀鑑別或其他手段在Radiance™/LFC中區分細胞之能力將藉由允許細胞共同培育且同時運行而大大增加輸送量。經工程改造以在Radiance™/LFC中具有不同參數，如此其將不彼此混淆之細胞可用以進行多工檢定。藉由修飾細胞以具有不同性質來進行多工之方法包括但不限於：基於螢光之-綠色螢光蛋白(GFP)、紅色螢光蛋白(RFP)、黃色螢光蛋白(YFP)及併入至巨噬細胞株或其他細胞株中之其他基因修飾，因此吾人可確定哪一基因正報導由AA所致之細胞病變或其他效應之存在。使用LFC分析之細胞亦可用(僅藉助於實例)色料、染料、抗體共軛之珠粒標記物、親和力結合之珠粒或分子、奈米粒子(Au、Ag、Pt、玻璃、金剛石、聚合物或其他物質)標記。奈米粒子可具有不同形狀(球形、四面體、二十面體、棒狀或立方體形，及其他)及大小以實現兩個目標：1)變化進入細胞，及2)更改可使用LFC量測之光學力。

【0057】 在某些實施例中，奈米粒子可與細胞一起培育且吸收將與細胞類型之正常一樣發生，或替代地奈米粒子吸收可經化學或物理強化(諸如藉由電穿孔或藉由脂質體促進)以增強奈米粒子吸收百分比。細胞將與待測試之奈米粒子及病毒一起培育且經增加之病毒吸收至細胞中的差動將導致使用LFC來量測之光學力的較大差動，由此改良病毒偵測敏感性。在替代實施例中，奈米粒子可在曝露於細胞之前與病毒一起培育。

【0058】 在額外替代實施例中，吞噬指定數目之珠粒的巨噬細胞將在LFC中具有不同性質，但將仍報導AA之存在。另外，僅可分析細胞之特定部分，諸如細胞核、粒線體或其他細胞器。此可用以不僅增強AA以及包括感染力之其他基於細胞之檢定的效能。

【0059】 在態樣中，細胞可經基因工程改造以具有不同病毒、細

菌、真菌或其他AA易感性以用作活體外哨細胞，在一實施例中，在用於與Radiance™/LFC一起使用之小組中，將允許AA偵測之定製方法。將某些基因併入至細胞株中或自細胞株消除某些基因可使得細胞株較容許感染具體類別之病毒、細菌或其他AA，由此提供具有病原體類型之選擇性的快速偵測。此與使用LFC之可能廣泛病毒鑑別組合、將允許對病毒、細菌或其他類型之AA的較好鑑別。

【0060】如圖8中所示，本文中所描述之新穎方法證實，AAT可直接出現在自生產生物感測器(800)經由立即使用LFC/Radiance™ (810)之分析移除之細胞上。對於不在生產細胞株(CHO或其他)中產生CPE或其他效應之AA，其他懸浮細胞株可用於微型分析生物反應器(910)中以激勵生物反應器中存在之任何AA之生長及感染。

【0061】如圖9中所示，生長於微型生物反應器(910)中以用於用例如Radiance™ (920)之後續取樣的細胞株可用以測試AA之CM。將CM樣本自大製程生物反應器(900)泵送至微型生物反應器中，該等微型生物反應器可接著使用LFC技術(920) (例如，Radiance™)定期取樣以確定是否存在外來因子。若需要，則多個生物反應器可用以在製造過程中之不同時間點取樣。在各態樣中，微型生物反應器將具有用於針對細胞株之感染徵象之光譜分析的光學窗，該等感染徵象可用以提供對病毒感染或黴漿菌或朊病毒或細菌、真菌或原蟲感染之鑑別。

【0062】圖10顯示巨噬細胞(吞噬包括病毒、細菌、營養孢子及幾乎任何其他物質之外來物質的白血球)在此實例中作為活體外哨細胞用於偵測存在於CM中之AA的用途。巨噬細胞以可經由LFC偵測之獨特方式回應於外來物質之存在，且亦可吞噬外來物質(病毒、病毒包涵體、細菌孢

子或營養細胞、胞外體或任何其他生物物質)，因此藉由隨著其吞噬其而在其膜內濃縮AA來增加其折射率。此用以增加對AA之LFC回應且亦使得巨噬細胞成為方便且可偵測的用於LFC之容器或媒劑，以將經預先濃縮之AA分類且遞送至其他技術以用於進一步分析。在本申請案中排除生物生產細胞(CHO或其他)將為重要的，如此其不被巨噬細胞吞噬，從而影響檢定結果。儘管CHO細胞²可能將一般不被吞噬，因為其為相同大小或大於巨噬細胞³。替代巨噬細胞活化(尤其諸如板結合之已知活化劑、板組合物、培養基添加劑、包括脂多醣(LPS)、細菌或病毒蛋白之生物分子之添加)可用以選擇性地控制吞噬活性或包括基因或蛋白質表現之改變的表型狀態。

【0063】 經由使用LFC/Radiance™量測之許多參數使得病毒、細菌或其他生物偵測中之特異性成為可能，該等參數包括大小、速度(與光學力相關)、大小正規化速度、細胞體積、有效折射率、偏心率、變形性、細胞粒度、旋轉、定向、光學複雜度、膜灰階或使用LFC/Radiance™量測之其他參數。此表示使用包括影像之多變數參數空間以定義用於AAT篩檢目的之病毒或其他有機體之類別。與光譜學之偶合將提供額外特異性，包括拉曼、螢光、化學發光、圓二色性或其他方法。

【0064】 熟習此項技術者將認識到，所揭示特徵可基於給定應用或設計之要求及規格而被單一地、以任何組合方式使用，或省略。當一實施例係指「包含」某些特徵時，應理解，實施例可替代地「由該等特徵中之任何一或多者組成」或「基本上由該等特徵中之任何一或多者組成」。自本說明書之考慮及本發明之實踐，本發明之其他實施例對於熟習此項技術者而言將顯而易見。

【0065】詳言之，應注意，在本說明書中提供值之範圍的情況下，亦特定地揭示彼範圍之上限與下限之間之各值。此等較小範圍之上限及下限亦可獨立地包括或不包括於該範圍內。除非上下文另有明確規定，否則單數形式「一(a/an)」及「該」包括複數個指示物。希望本說明書及實例在本質上被視為例示性的且不脫離本發明之要素的變化屬於本發明之範疇。另外，在本發明中引用的所有參考文獻各自個別地以引用之方式全文併入本文中且因而意欲提供補充本發明之啟用揭示內容的高效方式以及提供詳述一般熟習此項技術者之層級的背景。

參考文獻

1. Andreas Berting, M.R.F., Thomas R. Kriel, *Virus Susceptibility L90155 of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells and Detection of Viral Contaminations by Adventitious Agent testing*. Biotechnology and Bioengineering, 2010. **106**(4): p. 598-607.

2. Thomas R. Kiehl, D.S., Sarwat F. Khattak, Zheng Jian Li, Susan T. Sharfstein, *Observations of cell size dynamics under osmotic stress*. Cytometry Part A, 2011. **79A**(7).

3. Krombach, F., et al., *Cell size of alveolar macrophages: an interspecies comparison*. Environ Health Perspect, 1997. **105**(Suppl 5): p. 1261-3.

【符號說明】

100	智慧型演算法
120	感染度量
140	結果之分析

160	懸浮細胞
180	代表活體內條件之物理環境
200	傳統中和檢定
220	TCID50
300	校準珠粒
310	樣本流之方向
320	樣本粒子
330	雷射方向
400	生物反應器
410	調節培養基培育
420	培育步驟
430	Radiance機台
440	樣品容器
800	大製程生物反應器
810	使用LFC之分析
900	大製程生物反應器
910	微型生物反應器
920	使用LFC之分析
1000	步驟1：於樣品容器(即，培養皿)中放置巨噬細胞
1100	步驟2：以調節培養基培育巨噬細胞
1200	步驟3：以在培養基中之細菌及/或病毒監測巨噬細胞之回應

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種用於使用光學力及/或流體力量測對差動刺激之細胞回應之方法，其中該方法包含：

接收包含用不同已知位準之刺激或分析物處理之生物細胞的一系列初始樣本，

對該等樣本執行基於光學力之量測，以量測選自該等生物細胞之大小、速度、大小正規化速度、細胞體積、有效折射率、偏心率、變形性、細胞粒度、旋轉、定向、光學複雜度或膜灰階之基於光學力之參數，

基於該基於光學力之參數產生回應度量(RM)以描述對該等刺激之該細胞回應。

【第2項】

如請求項1之方法，其中該回應度量係用以量測額外未知樣本之回應。

【第3項】

如請求項1之方法，其進一步包含分析該樣本之稀釋液，直至基於具有屬於可接受目標值範圍內之RM來測定感染力之準確量測。

【第4項】

如請求項1之方法，其中該等光學及流體力係基於雷射力細胞學。

【第5項】

如請求項1之方法，其進一步包含：

比較自該一系列初始樣本之初始樣本之該回應度量與目標值；

基於該初始樣本及控管該預期或已知回應之演算法的結果選擇第二

樣本；

比較該第二樣本之該回應度量與目標值；及

以相似方式選擇後續樣本，直至鑑別出匹配該目標回應度量或其他界定端點之樣本。

【第6項】

如請求項4之方法，其中該等基於光學力之量測利用微流體學及光誘發性壓力之組合。

【第7項】

如請求項1之方法，其中該生物細胞包含植物細胞(藻類細胞或其他細胞)、原核細胞(細菌)、真核細胞、酵母、真菌、黴菌細胞、紅血球、神經元、卵細胞(卵子)、精細胞、白血球、嗜鹼性球、嗜中性白血球、嗜伊紅血球、單核球、淋巴細胞、巨噬細胞、血小板、囊泡、胞外體、基質細胞、諸如橢球體之多細胞構築體、間葉細胞、誘發性多能幹細胞(iPSC)，或細胞核、粒線體或其他亞細胞組分或部分。

【第8項】

如請求項1之方法，其中該分析物包含病毒、中和血清、疫苗、溶瘤病毒、蛋白質、核酸、病毒載體、其他基於病毒之產物、細菌、感染細菌的病毒、細胞，或細胞產物。

【第9項】

如請求項1之方法，其中該分析物為病毒及含有抗體之中和血清(病毒中和檢定)、細菌及中和血清(細菌中和檢定)、毒素及血清中之抗體(毒素中和檢定)、病毒與抗病毒化合物(抗病毒檢定)，或其他分析物之組合。

【第10項】

如請求項1之方法，其中該等細胞係以單層、懸浮液形式存在或嵌入於基質中，其中該基質包含海藻酸鹽、明膠或其他相似半固體懸浮液。

【第11項】

如請求項1之方法，其中該等細胞係自進行中的製程取樣且在無進一步培育之情況下直接分析。

【第12項】

如請求項1之方法，其進一步包含校準對象。

【第13項】

如請求項12之方法，其中該等校準對象包含珠粒、粒子、生物製劑、脂質、囊泡、活細胞或固定細胞。

【第14項】

如請求項13之方法，其中該粒子係呈大小為奈米至毫米之球形或非球形，並包含有機物質、聚合物、金屬、合金、玻璃、藍寶石或金剛石。

【第15項】

如請求項12之方法，其中將該等校準對象與一或多個樣本混合且同時分析，且其中該等校準對象可基於對該等細胞之亮視野影像分析、螢光量測或一或多個基於光學力之量測而與細胞樣本區分。

【第16項】

一種用於基於對不同處理濃度之細胞回應產生校準曲線且接著使用其以預測未知位準之樣本的方法，該方法：

添加處理及培育樣本細胞，

對該樣本執行基於光學力之量測，以量測選自該等細胞之大小、速

度、大小正規化速度、細胞體積、有效折射率、偏心率、變形性、細胞粒度、旋轉、定向、光學複雜度或膜灰階之基於光學力之參數，

藉由基於流體及/或光學力之量測分析具有細胞及已知處理範圍之複數個樣本以確定回應度量，

基於稀釋趨勢確定最佳回應度量及時間，

使用所產生之資料以預測未來樣本。

【第17項】

如請求項16之方法，其中該刺激為病毒感染且該濃度為病毒效價。

【第18項】

如請求項16之方法，其視情況包含額外分析，該額外分析包括單變數度量、總群體直方圖資料、子集群體直方圖資料、K均值叢集、或用以產生多變數度量之PLS、PCA、神經網路或其他多變數或機器學習演算法。

【第19項】

一種用於在生產生物分子或其他進行中的生物製程期間基於細胞改變產生校準曲線且接著使用該校準以預測未來製程之結果的方法，該校準曲線使細胞回應與所關注之產物或細胞性質相關：

添加處理及培育樣本細胞，

藉由基於光學力之量測分析具有細胞及已知產物濃度範圍之複數個樣本以確定回應度量，其中該等基於光學力之量測量測選自該等細胞之大小、速度、大小正規化速度、細胞體積、有效折射率、偏心率、變形性、細胞粒度、旋轉、定向、光學複雜度或膜灰階之基於光學力之參數；

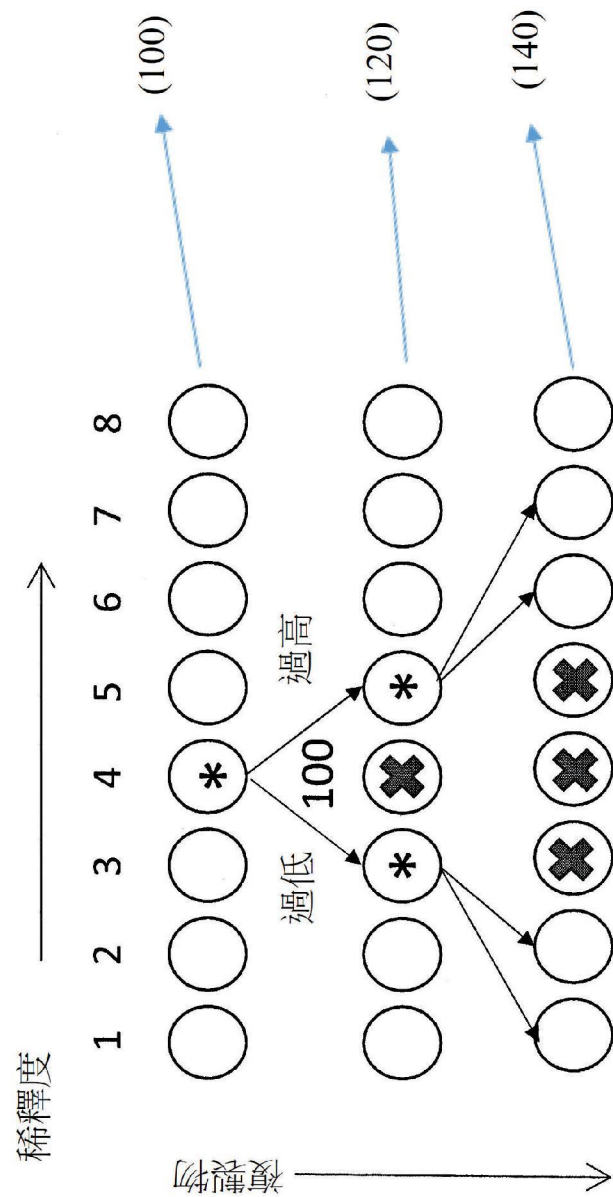
基於趨勢確定最佳回應度量，

使用所產生之資料以預測未來樣本。

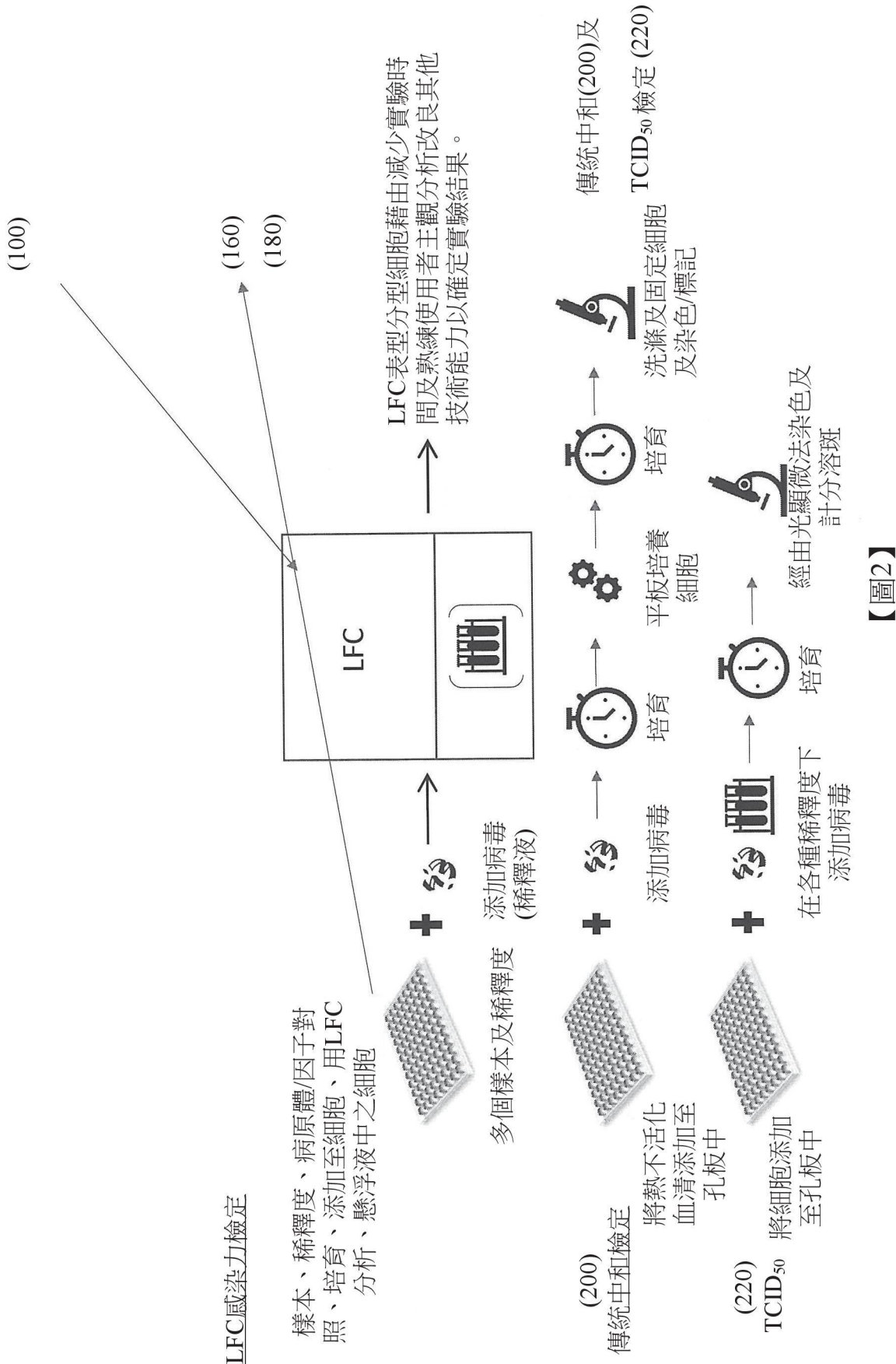
【第20項】

如請求項19之方法，其中該細胞性質為產生目標分子之生產力、生存力或能力、分化狀態、殺滅諸如腫瘤之特定細胞類型之能力、活化另一細胞類型之能力、或改變另一細胞類型之生化狀態之能力。

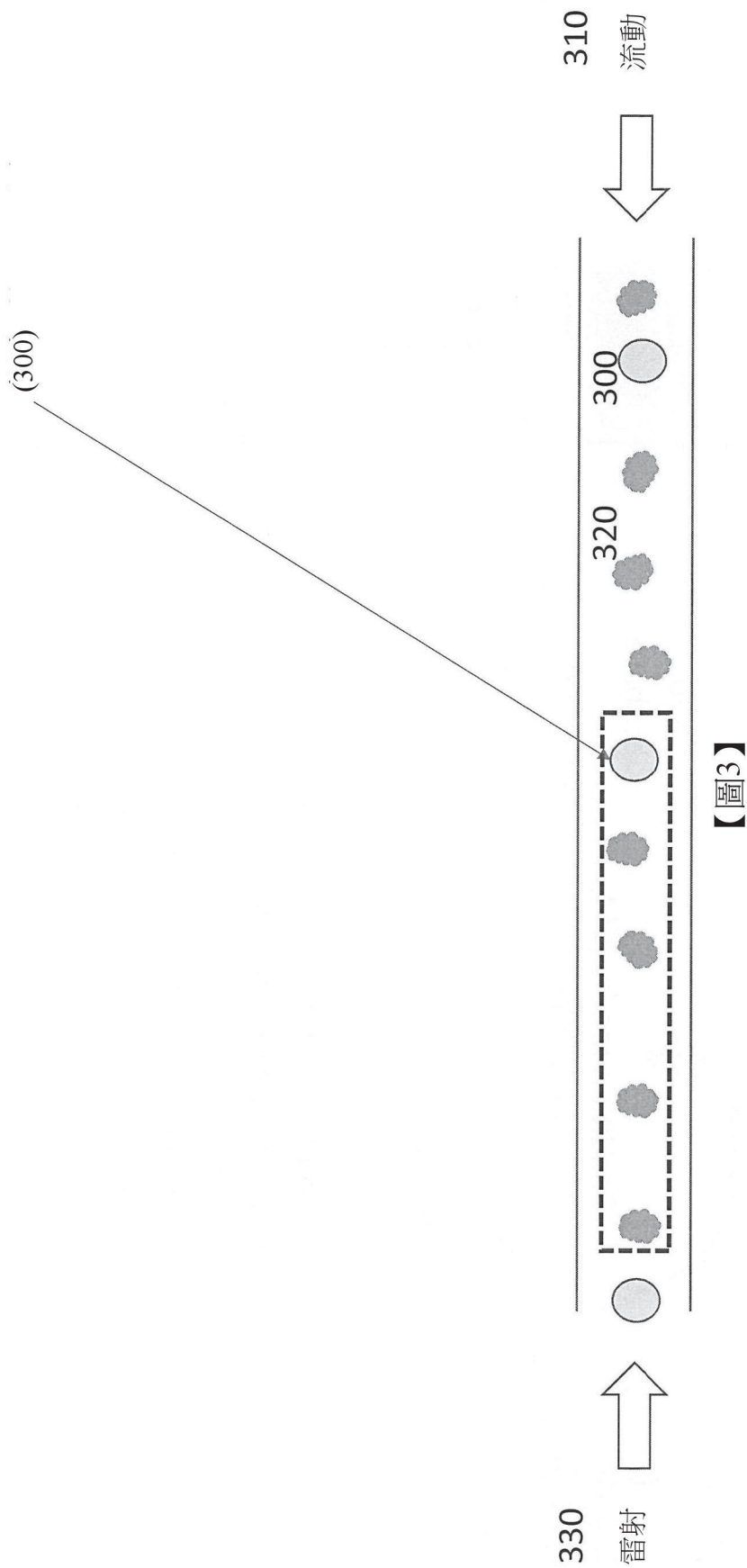
【發明圖式】

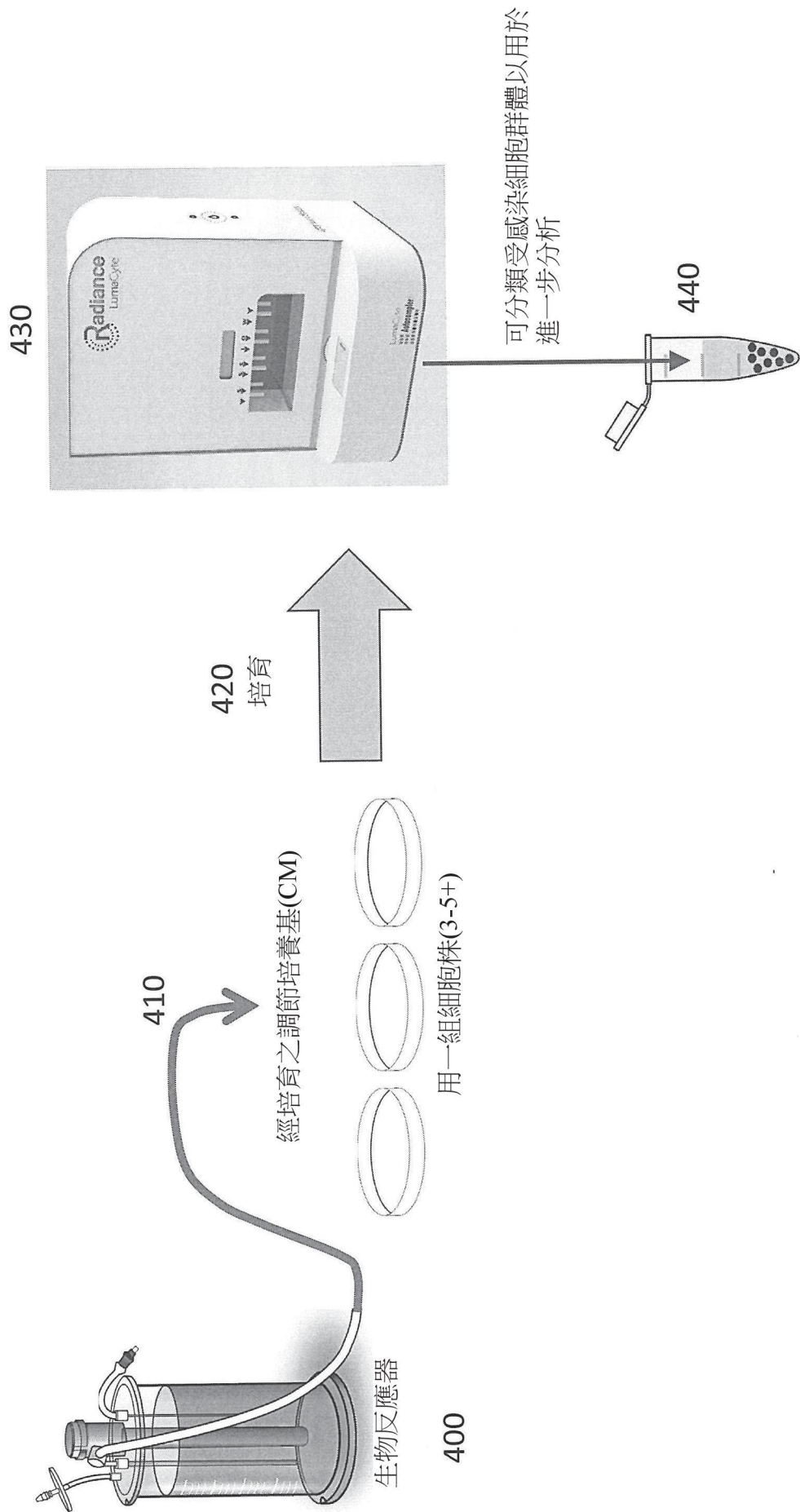


【圖1】



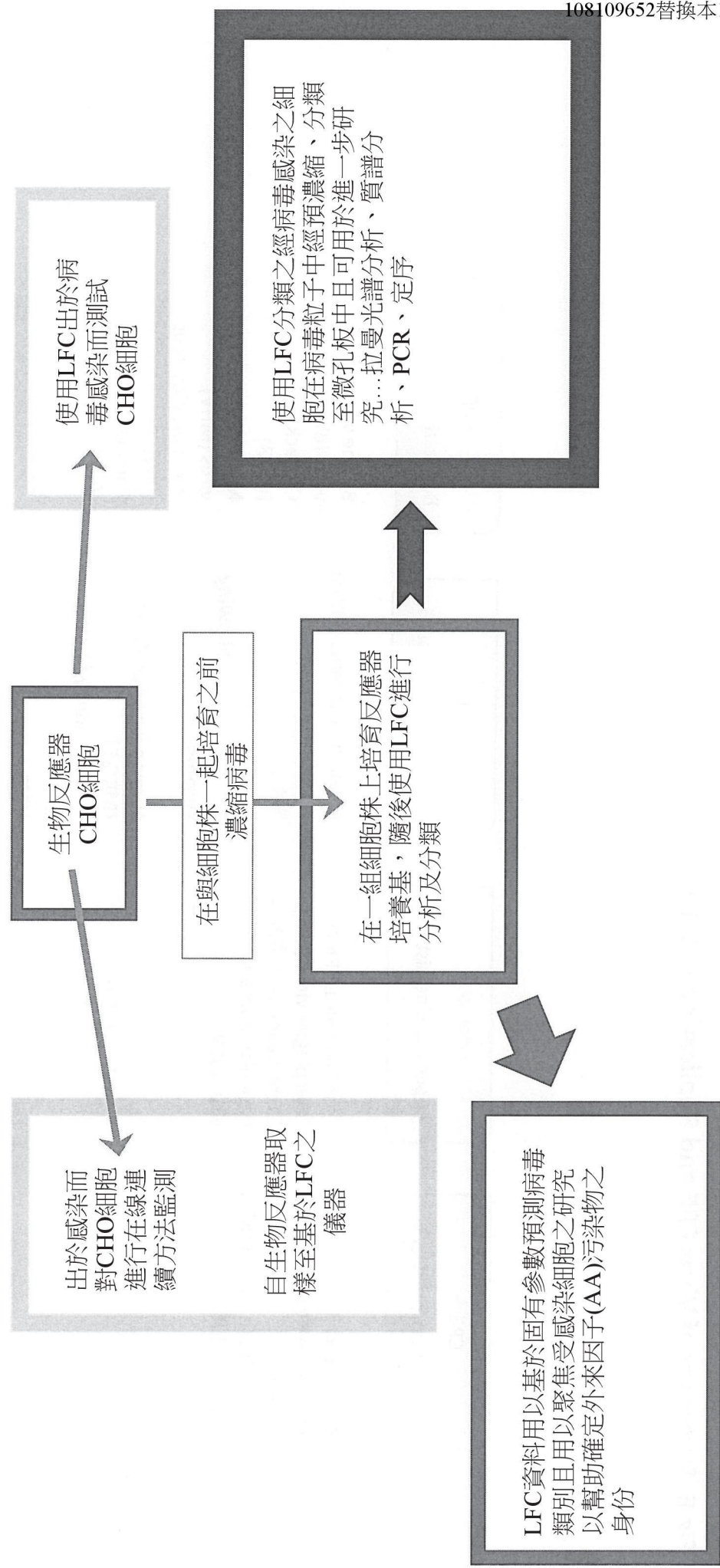
【圖2】





【圖4】

雷射力細胞學- AAT策略



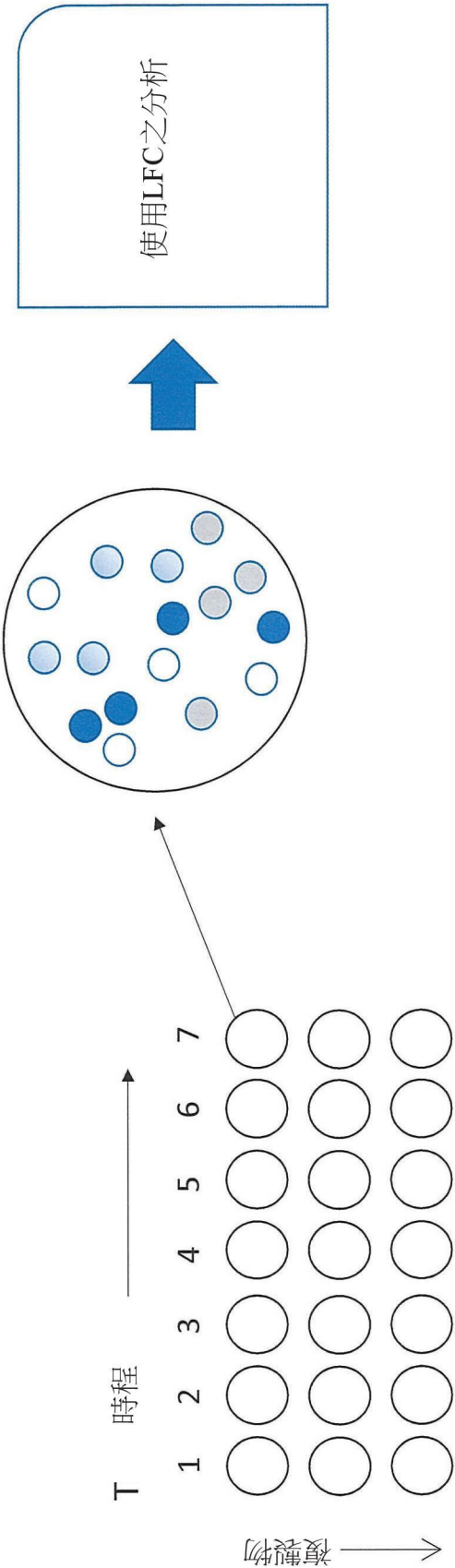
【圖5】

CPE + 複製/持續+	CPE + 複製/持續-	CPE - 複製/持續+	CPE - 複製/持續-
腺病毒(hAdV) 腦心肌炎 (EMCV) 小鼠細小病毒(MMV) 里奧病毒-3 (Reo-3)	羅氏河病毒(RRV) 雞瘟病毒(FPV) 卡希谷病毒 (Cache Valley virus , CVV) 水泡性口炎病毒(VSV)	副流感病毒(PIV-3) 但... CPE見於以下細胞株中： 人類肺纖維母細胞 (MRC-5) 人類腎臟纖維母細胞 (324K) 非洲綠猴腎	牛病毒性腹瀉病毒 (BVDV) 柯薩奇病毒B3 (Coxsackievirus B3 , CVB3) 鼠類肝炎病毒 (MHV) 假性狂犬病病毒 (PRV) 豬小病毒 (PPV) 但... 可在嬰兒倉鼠腎細胞株 (BHK)中為感染性的

² Qiu, Y, Jones, N, et. Al., Biotechnology and Bioengineering, 110, 5, 2013.

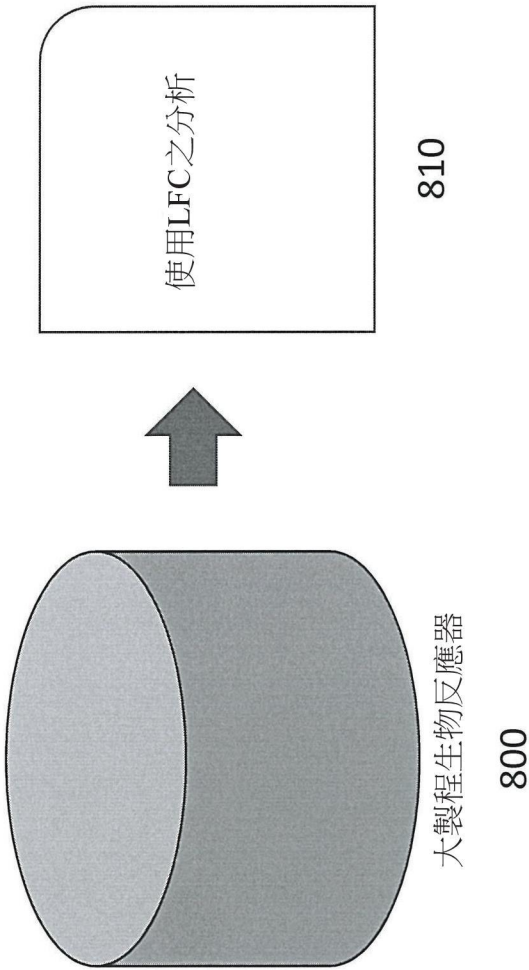
【圖6】

同時使用多個報導細胞之用於AAT的LFC多工檢定



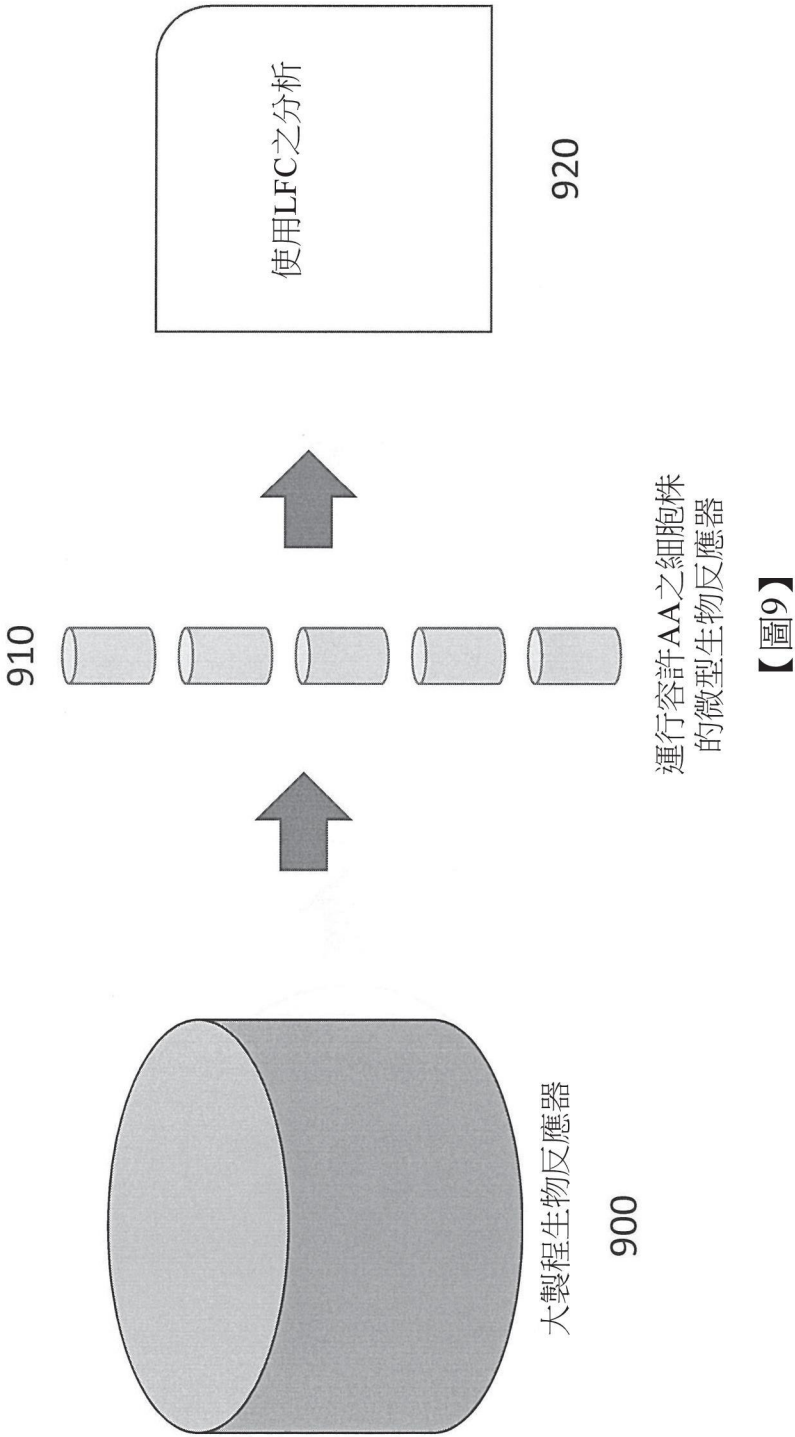
【圖7】

使用運行摻入CM之懸浮細胞之微型生物反應器的用於AAT之LFC分析



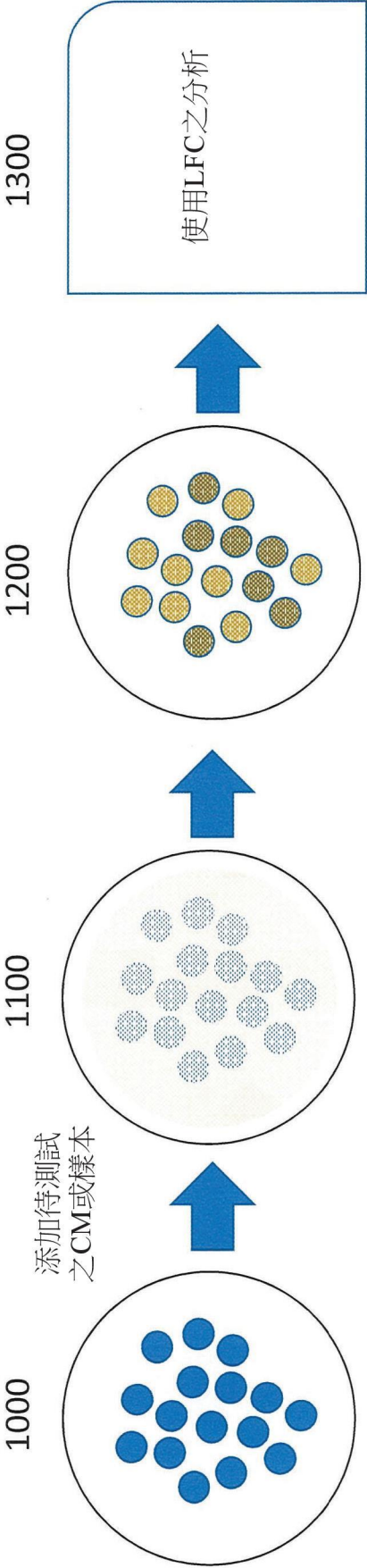
【圖8】

使用運行摻入CM之懸浮細胞之微型生物反應器的用於AAT之LFC分析



【圖9】

用於AAT之LFC巨噬細胞報導體檢定



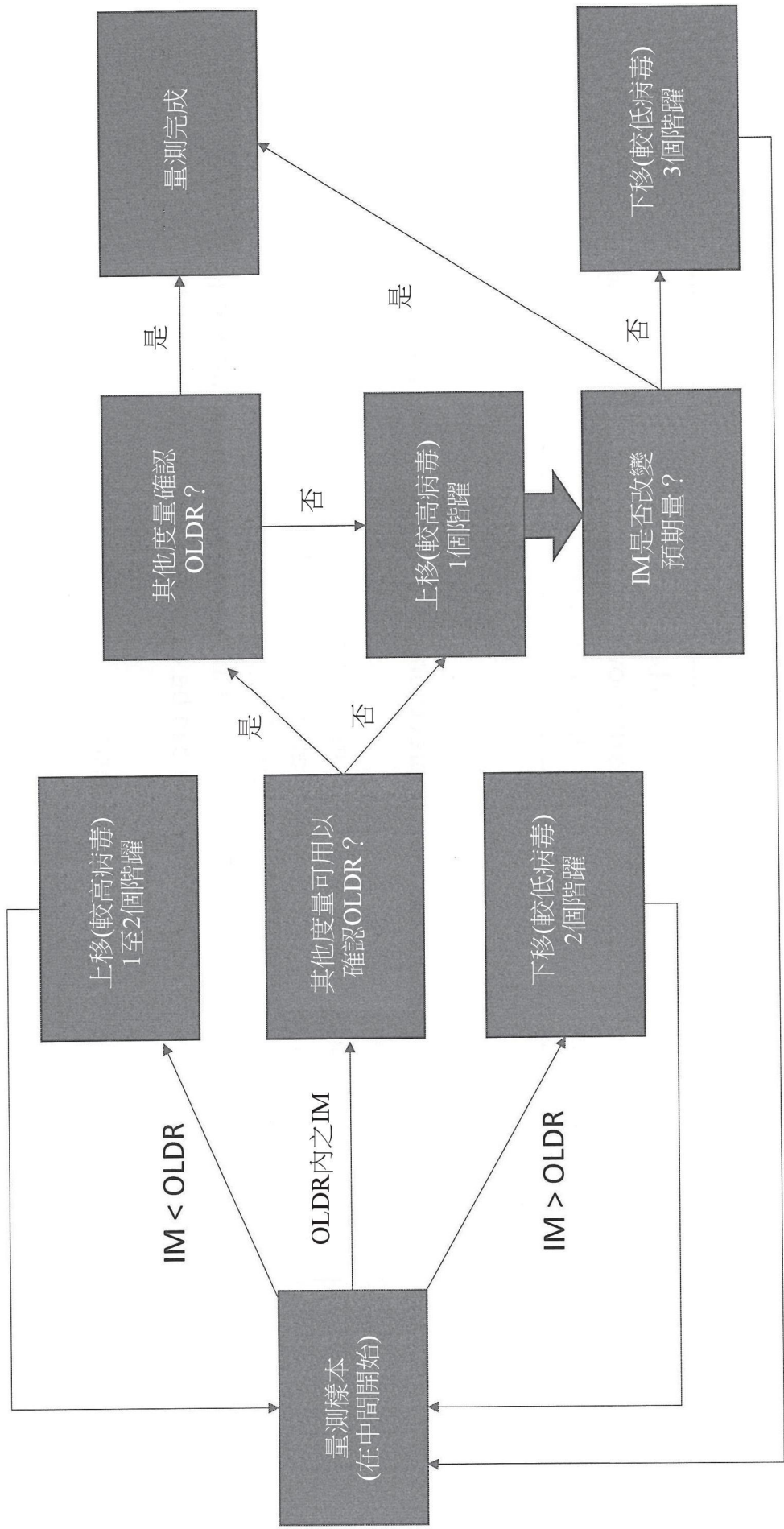
巨噬細胞：
呈懸浮或黏附

若懸浮，則如現狀使用
若黏附，則使用機械或生化手段
移除

CM =調節培養基

【圖10】

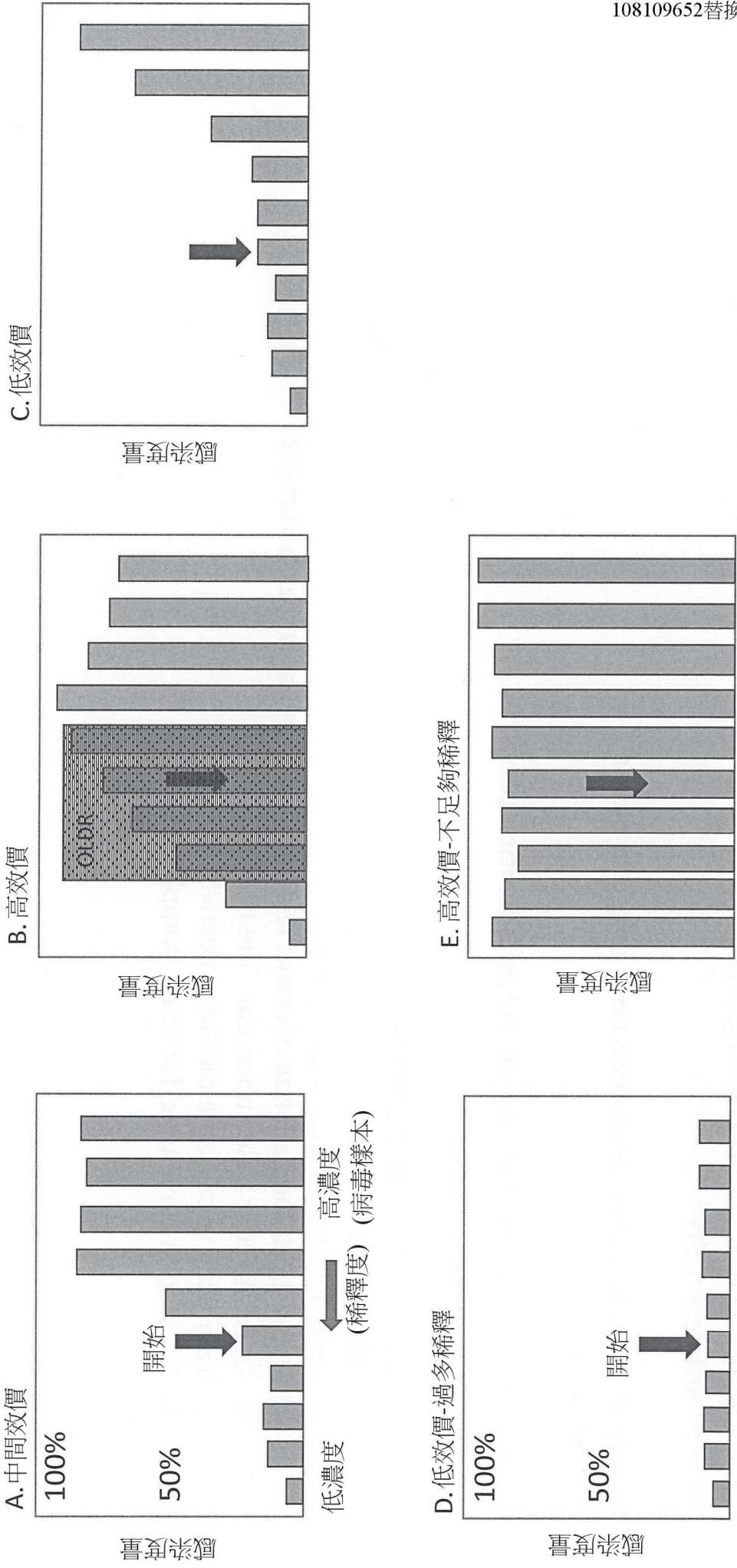
實例智慧型演算法(IA)



IM = 感染度量
OLD = 最佳線性動態範圍

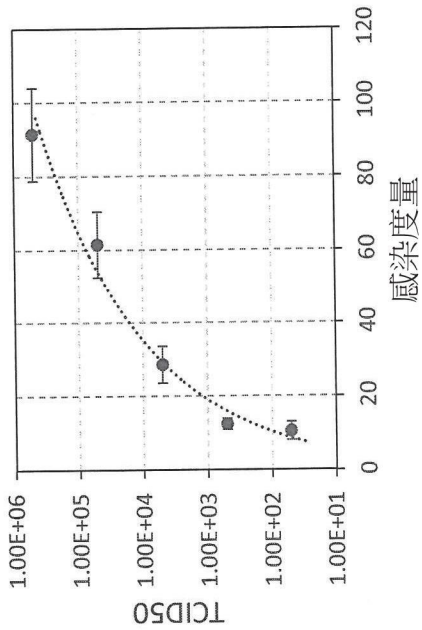
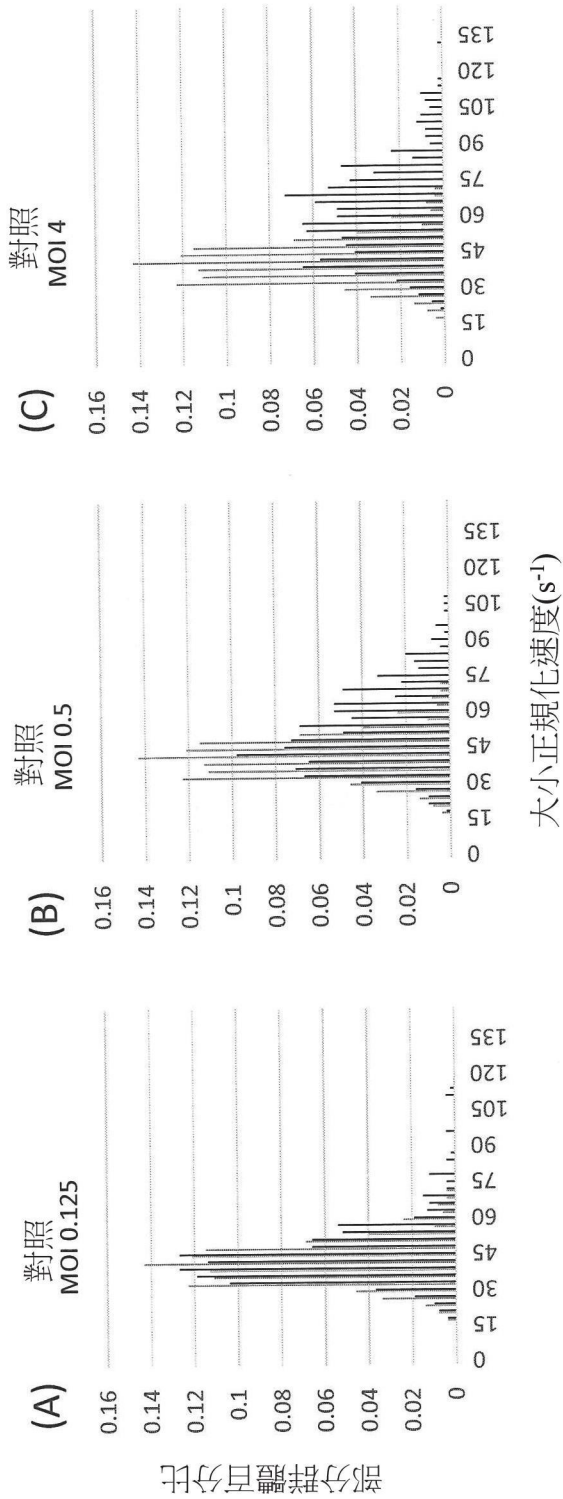
【圖11】

被應用智慧型演算法之潛在情況



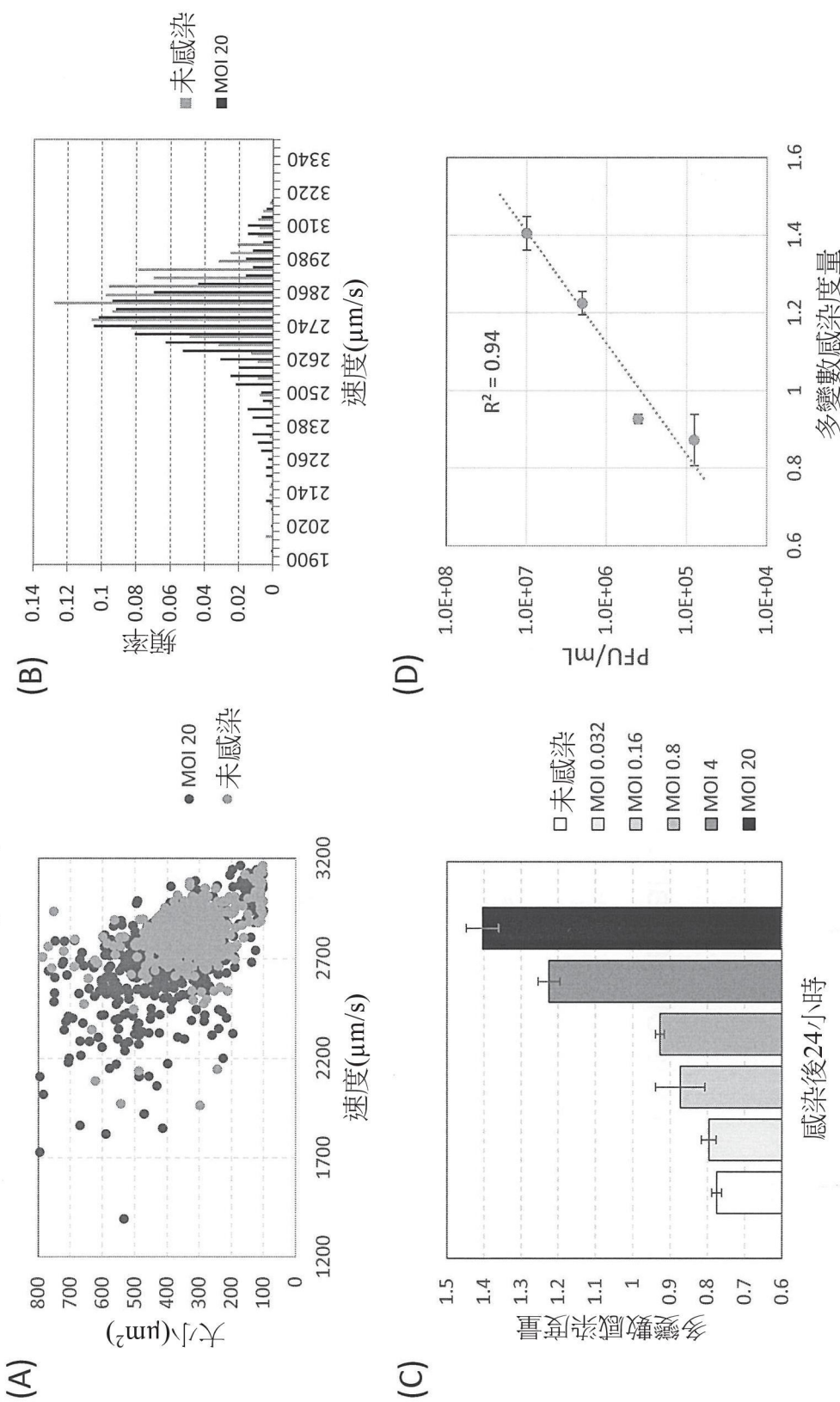
【圖12】

感染水泡性口炎病毒之非洲綠猴腎細胞



【圖13】

實例資料-黏附HEK 293細胞中之腺病毒感染(Ad5)



【圖14】

對Radiance資料之K均值叢集分析

以CSV格式上傳資料檔案

瀏覽 ...

F2Compile2018-08-22.csv

上傳完成

☒ 標頭

叢集之數目：

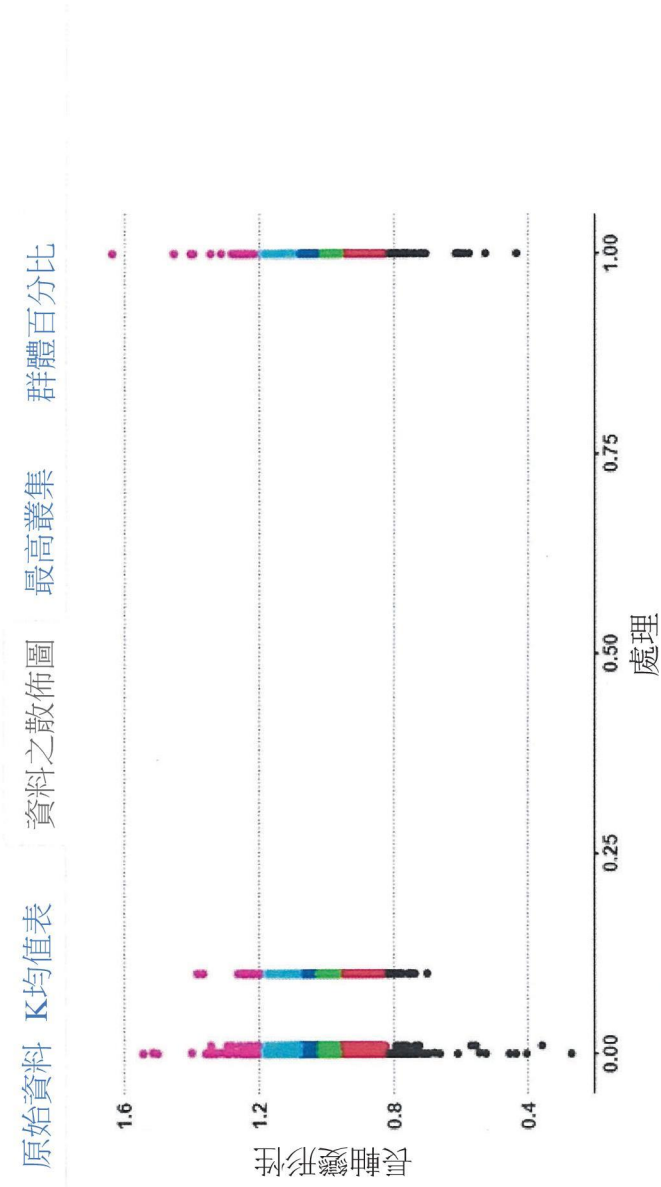
1

6

12

選擇待分析之參數

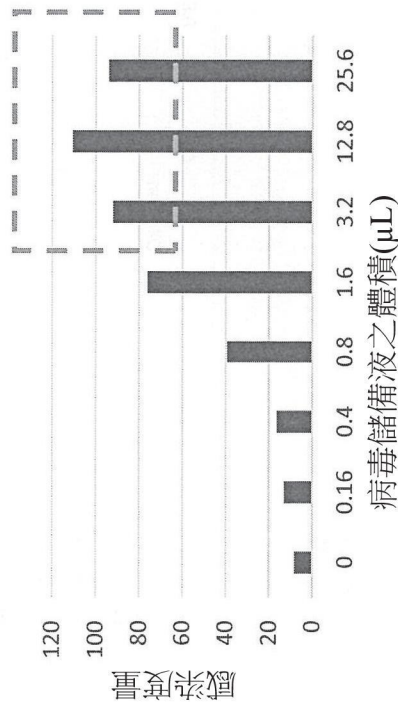
長軸變形性



使用LFC之絕對感染力計算之示意圖

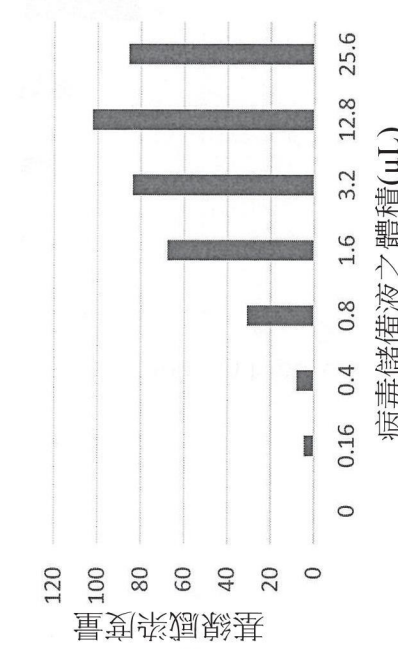
此假定已確定感染度量及收集時間

1.分析樣本且鑑別跨越最大感染度量之稀釋液



2. Subtract infection metric of

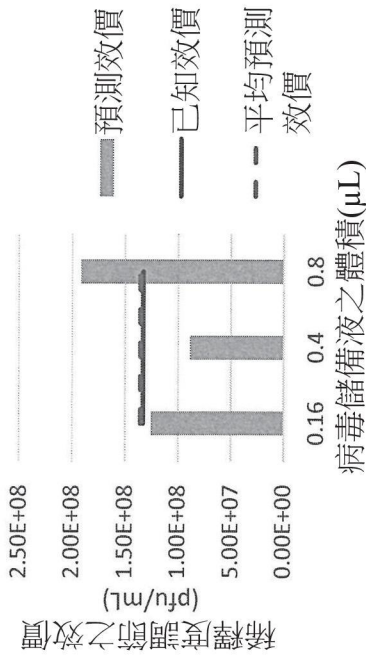
2.減去作為基線之未感染細胞之感染度量



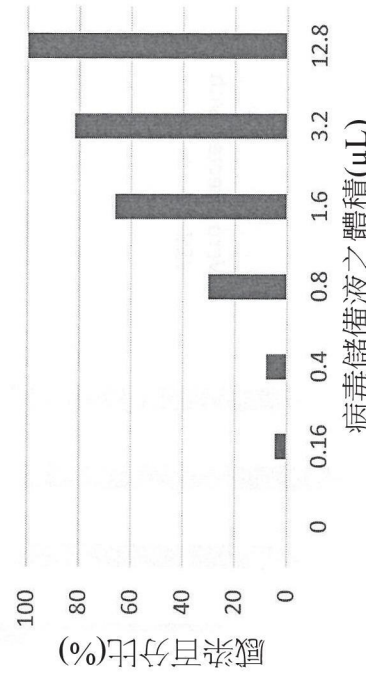
4.基於感染時細胞之數目、未感染細胞之百分比、泊松分佈及在彼稀釋度下添加之病毒之體積計算添加至各稀釋液中的病毒(感染性單位/mL)之量。

5.僅使用屬於線性範圍內之稀釋度(一般感染0.5-40%)，基於屬於分析線性範圍內之稀釋液之效價的平均值計算總體效價。

6.

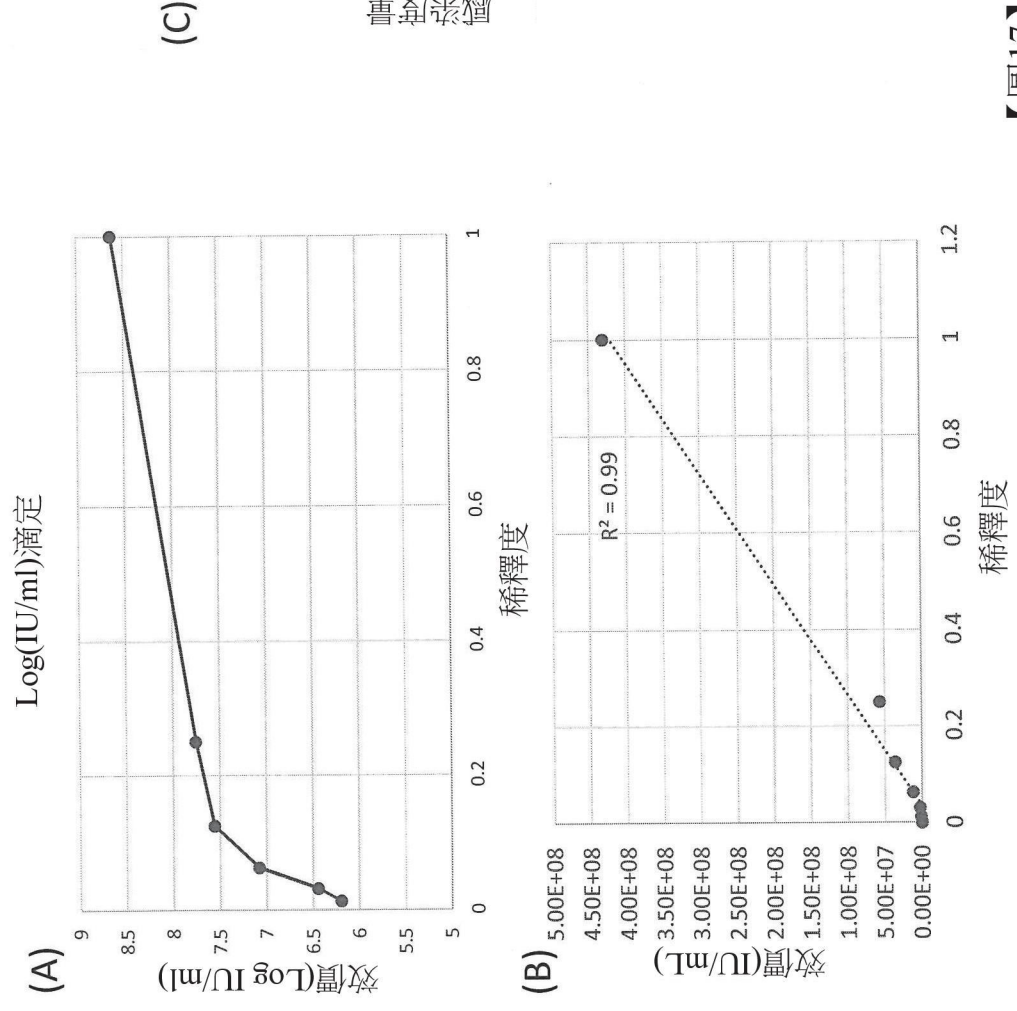


3.假定最高感染度量為100%感染，丟棄高於100%之稀釋液，基於按比例調整計算各稀釋液感染之百分比



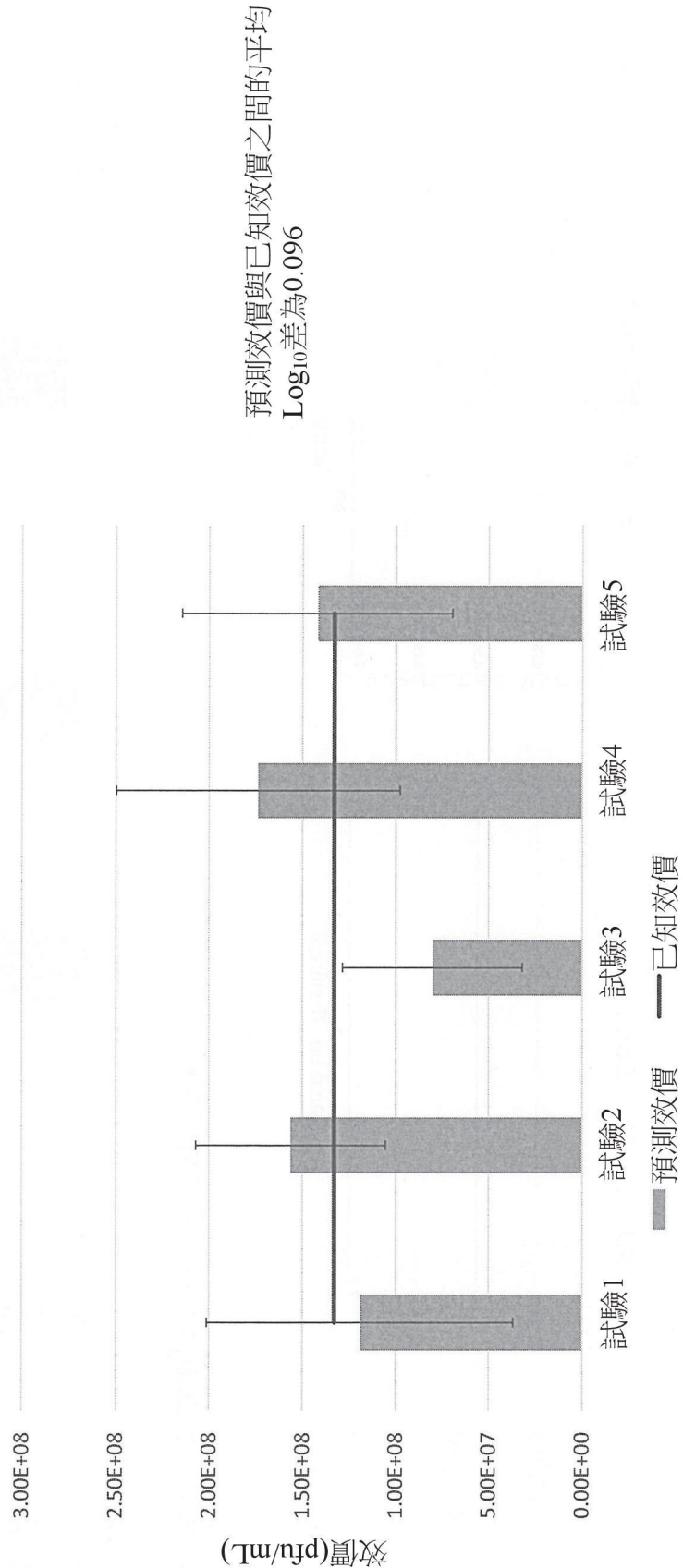
【圖16】

感染力及絕對效價曲線



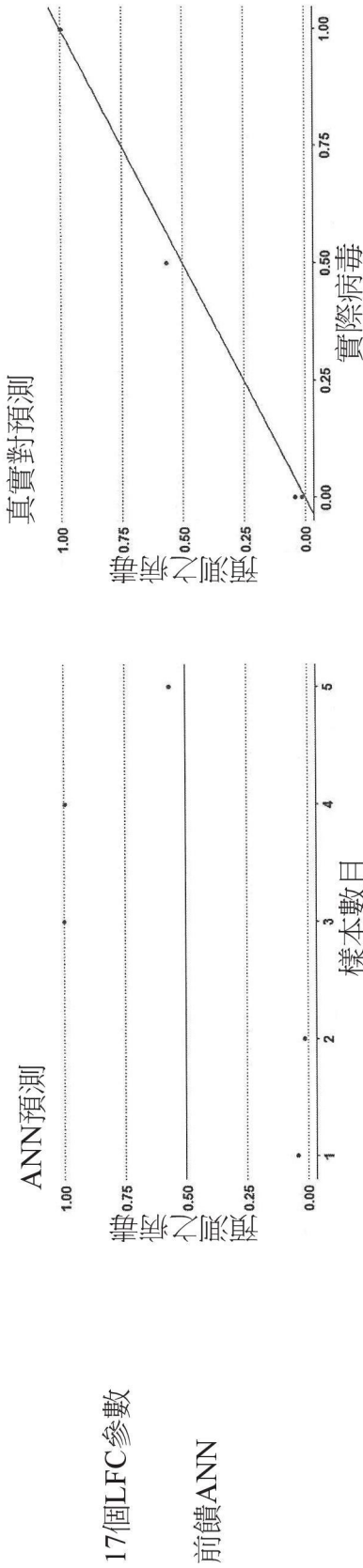
【圖17】

感染力及絕對效價結果

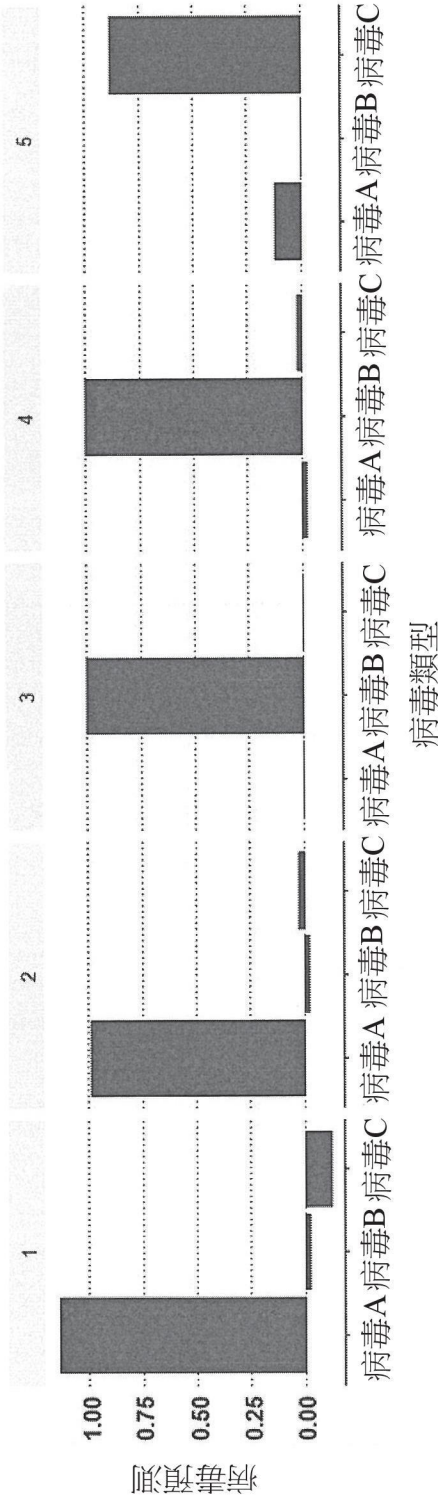


【圖18】

病毒之LFC鑑別



測試樣本數目



測試樣本
數目

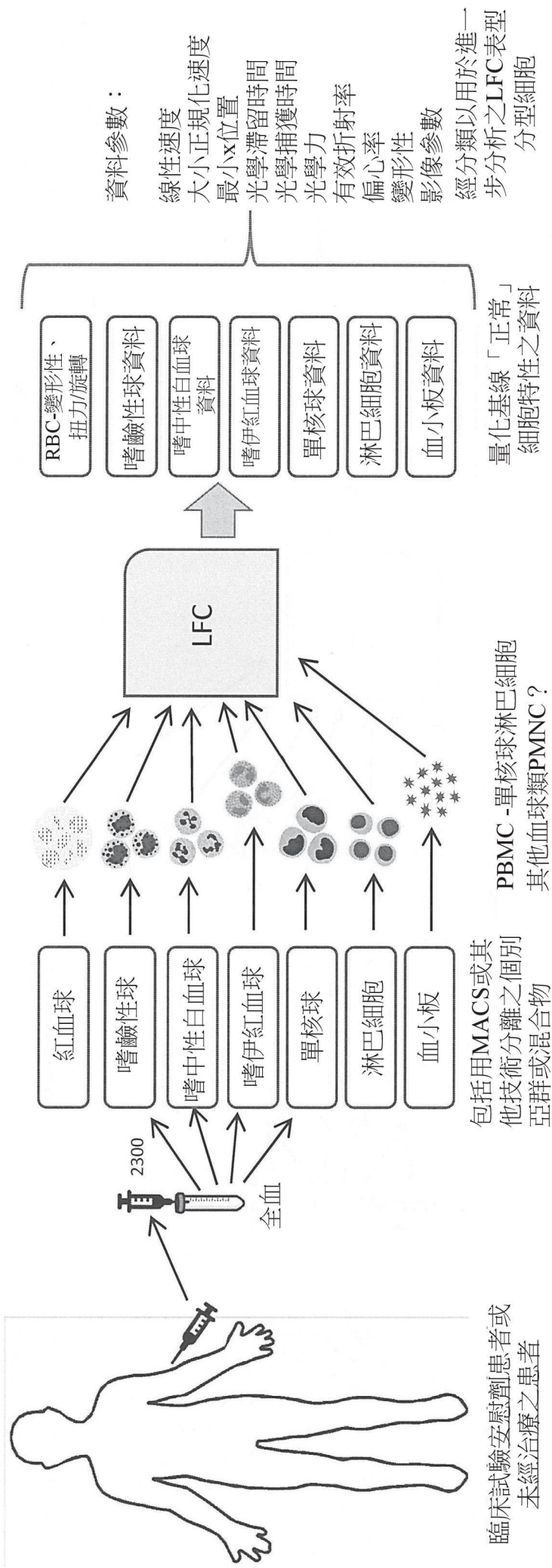
1 2 3 4 5

測試樣本
身份

A A B B C

【圖19】

作為用於疾病偵測或疫苗功效之生物標記的安慰劑患者-細胞回應



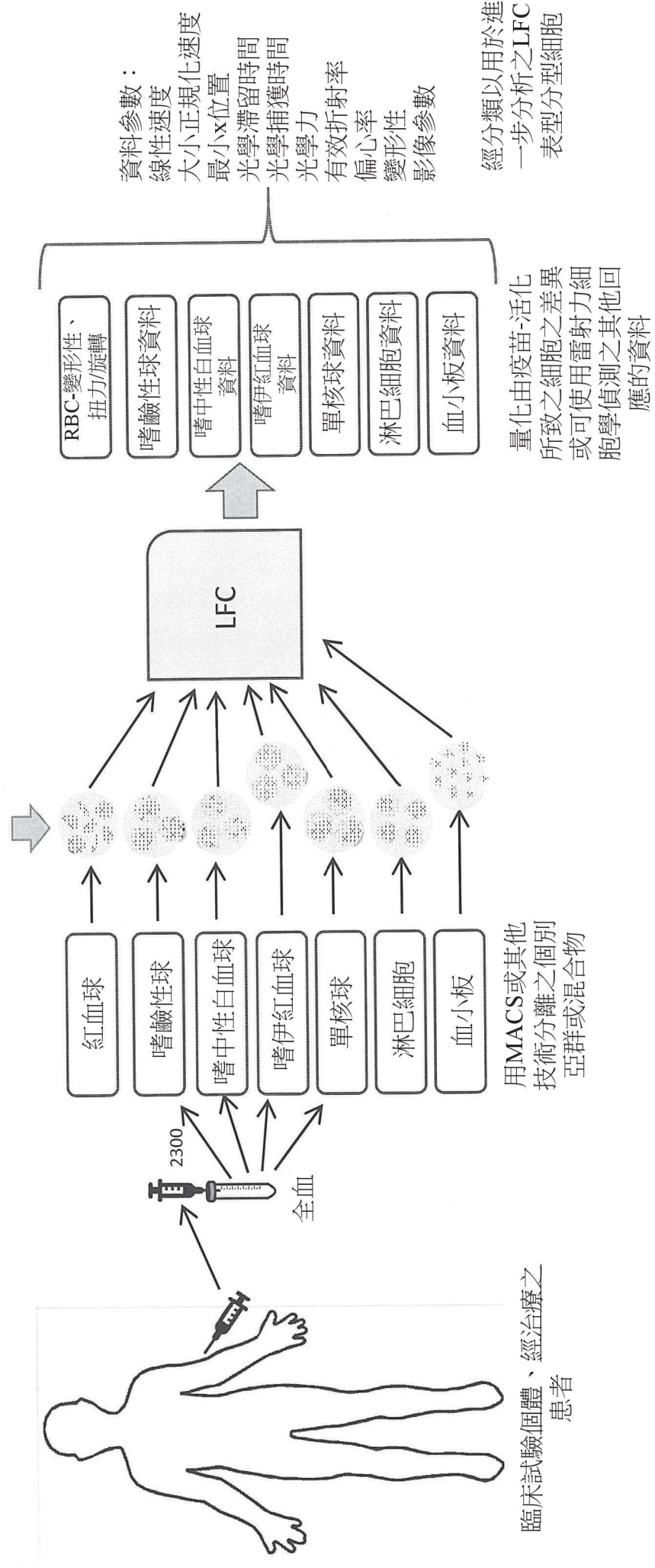
【圖20】

2300 -使用離心或RBC裂解、組合或其他方法之製程

資料參數中之 Δ 指示
疫苗功效或不良效應

作為用於疾病偵測或疫苗功效之生物標記的患者個體-細胞回應

改變對疾病、疫苗、細胞
或基因療法作出回應之細胞
且使用LFC偵測差異



2300 -使用離心或RBC裂解、組合或其他方法之製程

【圖21】