



(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 201118173 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：099123327

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 07 月 15 日

(51)Int. Cl. : C12N7/04 (2006.01)

A61K39/13 (2006.01)

A61P31/14 (2006.01)

(30)優先權：2009/07/16

歐洲專利局

09165620.7

(71)申請人：庫賽爾荷蘭公司 (荷蘭) CRUCCELL HOLLAND B. V. (NL)

荷蘭

(72)發明人：路易斯 約翰 奧弗雷 LEWIS, JOHN ALFRED (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：5 共 41 頁

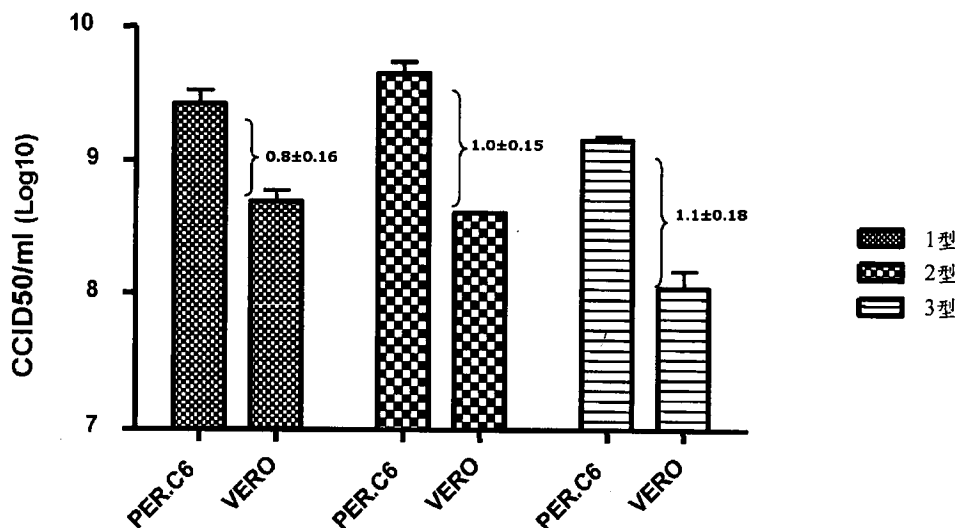
(54)名稱

用於疫苗生產之高效價小兒麻痺病毒之製造

PRODUCTION OF POLIO VIRUS AT HIGH TITERS FOR VACCINE PRODUCTION

(57)摘要

本發明提供一種製造小兒麻痺病毒之方法，其包含如下步驟：a)提供一種無血清懸浮細胞培養物，其為 PER.C6 細胞，b)以小兒麻痺病毒感染該等細胞，細胞密度在 2×10^6 個細胞/ml 至 150×10^6 個細胞/ml 之間，及 c)於感染後 12 至 48 小時之間收集小兒麻痺病毒。





(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 201118173 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：099123327

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 07 月 15 日

(51)Int. Cl. : C12N7/04 (2006.01)

A61K39/13 (2006.01)

A61P31/14 (2006.01)

(30)優先權：2009/07/16

歐洲專利局

09165620.7

(71)申請人：庫賽爾荷蘭公司 (荷蘭) CRUCCELL HOLLAND B. V. (NL)

荷蘭

(72)發明人：路易斯 約翰 奧弗雷 LEWIS, JOHN ALFRED (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：5 共 41 頁

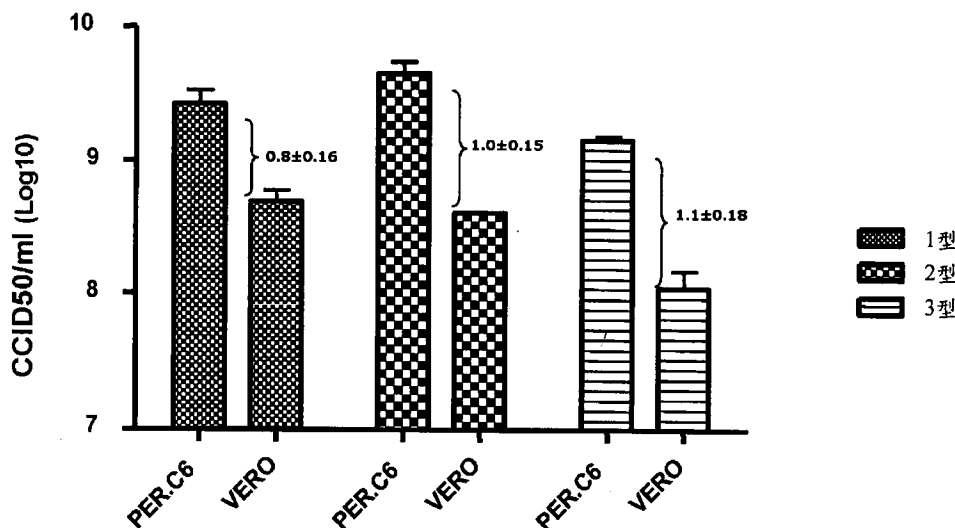
(54)名稱

用於疫苗生產之高效價小兒麻痺病毒之製造

PRODUCTION OF POLIO VIRUS AT HIGH TITERS FOR VACCINE PRODUCTION

(57)摘要

本發明提供一種製造小兒麻痺病毒之方法，其包含如下步驟：a)提供一種無血清懸浮細胞培養物，其為 PER.C6 細胞，b)以小兒麻痺病毒感染該等細胞，細胞密度在 2×10^6 個細胞/ml 至 150×10^6 個細胞/ml 之間，及 c)於感染後 12 至 48 小時之間收集小兒麻痺病毒。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於細胞培養及小兒麻痺病毒製造之領域。更特定言之，本發明係關於一種經改良之培養細胞的方法及自該細胞製造用於生產小兒麻痺症疫苗之小兒麻痺病毒的方法。

【先前技術】

小兒麻痺病毒為小RNA病毒科(Picornaviridae)，腸病毒(Enterovirus)屬之成員。小兒麻痺病毒為小型、無外被膜之病毒，其衣殼封閉單鏈正義RNA基因組。存在三種類型之小兒麻痺病毒：1型、2型及3型。小兒麻痺病毒感染易受感染之個體可導致小兒麻痺症(paralytic poliomyelitis)。小兒麻痺症(Poliomyelitis)具高度傳染性。已發展出兩種不同小兒麻痺症疫苗：沙克(Salk)之不活化小兒麻痺病毒疫苗(IPV)、及沙賓(Sabin)之減毒口服小兒麻痺病毒疫苗(OPV)。兩種疫苗皆安全且有效。各自具有其特定之優點及缺點，且二者在控制小兒麻痺症上皆扮演重要角色。關於小兒麻痺病毒及小兒麻痺症疫苗，可參見例如Kew等人，2005。

口服小兒麻痺症疫苗(OPV)廉價且方便，且已大量使用。然而，偶有接受者由於疫苗中之回復突變種而罹患與疫苗相關之小兒麻痺症(VAPP)。此外，已在免疫不全之人群中觀察到，減毒沙賓小兒麻痺病毒株發生突變變化，導致發生麻痺症(paralytic disease)，其在臨床上及流行病學

上無法與天然存在之野生型小兒麻痺症區分；該等突變種稱為流通性衍生自疫苗之小兒麻痺病毒或cVDPV(參見例如Kew等人，2005；Wright及Modlin, 2008；Yakovenko等人，2009)。

漸漸達成如下共識：當與現有之OPV方法組合使用時，不活化小兒麻痺病毒疫苗(IPV)可有助於更快速根除野生型小兒麻痺症及控制出現cVDPV(Wright及Modlin, 2008；John, 2009)。

然而，生產IPV之成本較高(參見例如John, 2009)，且對於較低度及最低度開發國家而言，可能甚至係天價，但該等國家仍然強烈需要小兒麻痺症疫苗。用於批量製造可用於疫苗之小兒麻痺病毒材料(特定言之未經減毒之小兒麻痺病毒)的培養系統為成本相當高昂的主要原因。

因此，於技術中需要一種用於製造於疫苗中使用之小兒麻痺病毒的有效培養系統。

已闡述於HEK293細胞中繁殖小兒麻痺病毒作為用於研究神經元特異性複製表現型小兒麻痺病毒之系統，且已闡述，減毒形式之小兒麻痺病毒(諸如：存在於如沙賓病毒株中之IRES元件中含有點突變之小兒麻痺病毒)已證實在HEK293細胞中之繁殖減少(Campbell等人，2005)。

已闡述E1-不死人類胚胎視網膜(HER)細胞(特定言之PER.C6細胞)適用於繁殖多種病毒，尤其係流感病毒(Pau等人，2001；WO 01/38362)。雖然WO 01/38362闡述於PER.C6細胞中繁殖多種流感病毒株、及1型及2型單純疱疹

病毒 (Herpes Simplex Virus)(HSV)、麻疹病毒 (measles virus)及輪狀病毒 (rotavirus)病毒株之工作實例，但是小兒麻痺病毒之繁殖未列舉於WO 01/38362中。此外，仍未闡述使小兒麻痺病毒於該等細胞中複製之條件，且無法基於不相關之病毒於該等細胞中之複製而輕易作出推斷。因此，至今仍未知是否能夠以工業規模經濟地於該等細胞中製造用於疫苗生產之小兒麻痺病毒。

爲了大規模生產不活化小兒麻痺症疫苗，通常於源自猴之非洲綠猴腎細胞 (Vero cell)中繁殖小兒麻痺病毒。非洲綠猴腎細胞廣泛用於疫苗生產，包括不活化、及活的減毒小兒麻痺症疫苗，且迄今仍為管理當局最廣泛接受之用於生產病毒疫苗之連續細胞株，且相關技術中之專家希望使用該等細胞用於生產疫苗 (Barrett等人，2009)。

已由 Montagnon 等人，1982及1984闡述大規模微載體培養非洲綠猴腎細胞，以用於生產不活化小兒麻痺病毒疫苗。亦於美國專利案4,525,349中闡述利用非洲綠猴腎細胞大規模生產小兒麻痺症疫苗之方法，及最終所得之疫苗。

已有 Merten 等人，1997闡述，於如下條件下可製造高效價 (約 2×10^9 TCID₅₀/ml)小兒麻痺病毒 (沙賓1型)：首先於含有血清之培養基中培養於微載體上之細胞，隨後於病毒製造時期，於不含血清之培養基中培養，但鑒於使用血清之缺點，該等作者已經指出，需要一種完全不含血清之方法，且於該種優化之完全不含血清之方法中，該等作者等夠獲得 6.3×10^8 TCID₅₀/ml之效價。

涉及於工業規模上製造用於生產疫苗之小兒麻痺病毒的 Kreeftenberg 等人，2006 亦提及於生長於微載體上之非洲綠猴腎細胞中產生多種野生型及沙賓小兒麻痺病毒株，其中不同菌株之產率近似，(log 效價) 為 8.1 至 8.6。該等作者亦闡述，生產最終之 IPV 疫苗所需之病毒數量顯著高於生產最終之 OPV 疫苗所需之病毒數量，其導致每一劑量之 IPV 的生產成本顯著高於 OPV。

亦有 Card 等人，2005 闡述，利用培養於微載體上之非洲綠猴腎細胞，以無血清方式製造小兒麻痺病毒，且雖然生產量低於靜態培養時，但已闡述微載體培養更易於擴大規模。

雖然該等基於微載體之非洲綠猴腎細胞培養物有效且具工業可應用性，但若製造大量小兒麻痺病毒仍成本高昂，因此仍然需要一種替代性之小兒麻痺病毒製造系統，以減弱該缺點。

已闡述利用懸浮非洲綠猴腎細胞製造小兒麻痺病毒，其所產生之病毒效價 ($^{10}\log$ CCID₅₀/ml 為 6.5 至 7.9) 比彼等於通常之微載體非洲綠猴腎細胞中所觀察到之病毒效價低 (van Eikenhorst 等人，2009)。

本發明之一標的為提供一種適宜方法，其可用於大規模且經濟地製造作為疫苗使用之小兒麻痺病毒。其可能有助於開發中國家獲得其可負擔之小兒麻痺症疫苗。

【發明內容】

本發明係基於如下已證實之結論：即可於 PER.C6 細胞中

極高效地繁殖小兒麻痺病毒，其中根據文中所述之方法，可獲得前所未有之高效價之病毒。由於針對具有極不同性質之多種不同類型之病毒之條件及可獲得之優點會有極大變化，因此無法基於其他病毒於該等細胞中之複製情形來預測所獲得如此高之效價是否會比於非洲綠猴腎細胞中製造之小兒麻痺病毒更提供顯著之經濟優勢，亦不能預見其工業上可行方法之條件。

因此，本發明提供一種製造小兒麻痺病毒之方法，包括如下步驟：a)提供無血清懸浮細胞培養物，其為以ECACC第96022940號名義寄存之PER.C6細胞，b)依細胞密度 2×10^6 個細胞/ml至 150×10^6 個細胞/ml，以小兒麻痺病毒感染該等細胞，及c)於感染後之12至48小時收集小兒麻痺病毒。

於某些實施例中，於細胞密度為約 5×10^6 個細胞/ml至 20×10^6 個細胞/ml，例如約 8×10^6 個細胞/ml至 15×10^6 個細胞/ml，例如於約 10×10^6 個細胞/ml下進行該感染。

於某些實施例中，於感染之後之約18至30小時，例如於感染之後約24小時，收集小兒麻痺病毒。

該等條件可在相當短之製程中獲得極高之小兒麻痺病毒效價(約 10^{10} /ml，其為利用基於微載體之非洲綠猴腎細胞通常可獲得之野生型小兒麻痺病毒株之效價之10倍以上)，因此較之當前所採用之製造用於疫苗生產之小兒麻痺病毒的方法，其具有顯著之經濟優勢。該結論已在所有三種類型之小兒麻痺病毒(1型(Brunenders病毒株)、2型

(MEF病毒株)及3型(Saukett病毒株))中得到證實。

因此在某些實施例中，該等小兒麻痺病毒為野生型毒性小兒麻痺病毒，例如1型小兒麻痺病毒、2型小兒麻痺病毒或3型小兒麻痺病毒。於某些實施例中，該小兒麻痺病毒為1型小兒麻痺病毒株Mahoney或Brunenders、2型小兒麻痺病毒株MEF(或MEF-1)、或3型小兒麻痺病毒株Saukett。於其他實施例中，該小兒麻痺病毒為減毒小兒麻痺病毒(神經毒性較弱)，例如沙賓病毒株(其亦可為分為1、2或3型)。

本發明另外提供一種生產小兒麻痺症疫苗之方法，包括根據本發明製造小兒麻痺病毒之方法，且包括純化，且視需要不活化、及調配所收集之小兒麻痺病毒，以獲得小兒麻痺症疫苗。對於IPV，藉由福馬林或其他方法進行不活化。對於OPV，不需要不活化步驟。

文中亦揭示提供一種適用於製備小兒麻痺症疫苗之小兒麻痺病毒原液，該小兒麻痺病毒原液可藉由根據本發明之製造小兒麻痺病毒之方法獲得，且包括培養基，且小兒麻痺病毒之效價為至少 $10^{9.4}$ CCID₅₀/ml，例如約 $10^{9.5}$ 至 10^{11} CCID₅₀/ml，例如約 $10^{9.8}$ 至 $10^{10.8}$ CCID₅₀/ml。於某些實施例中，該原液之體積為1至1000升。於其他實施例中，該原液含有根據本發明方法所使用之細胞及/或該細胞的細胞碎片。於某些實施例中，該原液係置於生物反應器中。於其他實施例中，已自生物反應器移出原液，並置於適宜容器中。

本發明亦揭示一種根據本發明之方法可獲得之小兒麻痺病毒及小兒麻痺症疫苗。該等小兒麻痺病毒及/或該疫苗不含猴蛋白質，較佳不含非人類蛋白質。其亦不含其它非人類宿主細胞殘留物。相反，根據通常方法製得之小兒麻痺病毒會含有殘留之來源於所使用之宿主細胞及/或來源於在細胞培養期間所使用之血清的非人類蛋白質及/或其他非人類殘留物。因此，根據本發明製得之小兒麻痺病毒受到由製造方法所導致之非人類雜質之污染程度低於採用通常方法製得之小兒麻痺病毒。

本發明亦提供一種於細胞培養物中獲得小兒麻痺病毒製劑之方法，且其效價為至少約 $10^{9.4}$ ，較佳至少 $10^{9.8}$ ，更佳至少 10^{10} ，例如 $10^{10.5}$ 至 10^{11} CCID₅₀/ml，該方法包括如下步驟：a)提供無血清懸浮細胞培養物，其為PER.C6細胞，b)依細胞密度為 2×10^6 個細胞/ml至 150×10^6 個細胞/ml，以小兒麻痺病毒感染該等細胞，及c)於感染之後12至48小時收集小兒麻痺病毒，獲得具有該濃度之小兒麻痺病毒製劑。較佳實施例係與上述用於根據本發明製造小兒麻痺病毒之方法相同。

【實施方式】

用於本發明方法之細胞為PER.C6細胞，其為不死細胞，於相關技術中亦稱為連續細胞株，且因此其有可能永生(參見例如Barrett等人，2009)。於本申請案中之PER.C6細胞意指於1996年2月29日以第96022940號寄存於ECACC之細胞。熟習此項技術者咸清楚，該定義將包括獲自該等寄

存細胞之上游或下游繼代、或上游或下游繼代之子代之細胞。於美國專利案5,994,128及Fallaux等人，1998中已闡述PER.C6細胞。如例如於Pau等人，2001及WO 01/38362中所述，由於該等細胞可高效率感染並繁殖病毒，因此其非常適用於製造流感病毒，以生產基於細胞之流感疫苗。如例如於Yallop等人，2005中所述，PER.C6細胞能夠於不存在血清下懸浮生長。文中已證實，該等細胞亦非常適用於於無血清懸浮培養物中製造高濃度小兒麻痺病毒。

此外，所採用之條件具經濟性且具管理優勢。

本發明不需要使用微載體，此係與廣泛使用之利用非洲綠猴腎細胞之方法相反。微載體導致採用常用之基於非洲綠猴腎細胞之方法製造小兒麻痺病毒成本高。

根據本發明，無血清意指用於細胞生長及感染之培養基缺少全血清成份。其可能並非完全不含衍生自血清之產物，諸如例如牛血清白蛋白(BSA)，然而，於較佳實施例中，該等組分亦不存在，或已於不存在任何動物來源之組分下重組製得。於較佳實施例中，於不存在直接獲自動物之任何組分(諸如血清或血清組分等)下，進行全部製程。於較佳實施例中，於無動物組分之條件下，進行生產疫苗製程。其意指，用於細胞生長及感染之培養基不含任何源自動物之組分。此外，在疫苗製造製程期間向培養基補充之任何添加物亦不含源自動物之組分。於製造該小兒麻痺症疫苗之方法中不存在動物組分，使得該方法更可控及安全。因此，特徵已完全鑑定出，且遵從GLP/GMP下發展出

之人類細胞-PER.C6細胞非常適用於生產疫苗。可使用不同培養基，且選擇細胞之較佳培養基及所採用之環境為熟習此領域之工作者之日常工作之一部份。用於本發明之適宜培養基因此已為熟習此項技術者所熟知，且通常可大量購得，或可根據標準方法定製。可於例如培養皿、轉瓶或生物反應器中，採用分批、批次進料、連續系統等進行培養。為了透過細胞培養大量(連續)製造病毒，於技術中較佳需要一種能夠於懸浮液中生長之細胞，且較佳需要一種能夠在不存在源自動物或人類之血清、或源自動物或人類之血清組分下培養之細胞。已知適用於培養細胞之條件(參見例如 Tissue Culture, Academic 出版社，Kruse 及 Paterson 編輯(1973)；及 R.I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique，第四版(Wiley-Liss 公司，2000, ISBN 0-471-34889-9)。可根據本發明方法使用之無血清培養基包括但不限於可自 media vendors 目錄訂購之標準培養基，包括 CDM4PERMAb™(Thermo Scientific HyClone，目錄號第 SH30871、SH30872 號)。此外，諸如 Permexcis (Lonza) 之訂製培養基亦適宜。可能適用於本發明方法之其他不含血清之培養基實例為 AEM(Invitrogen，目錄編號第 12582-011 號)、EX-CELL™ VPRO 培養基(JRH Biosciences，目錄編號 14561 號)及 CDM4Retino™(HyClone，目錄編號第 SH30520、SH30519 號)。

於某些視需要選擇及非限制性實施例中，可能向本發明方法中之無血清培養基補充脂質及/或水解物及/或其他補

充物，以進一步改善產率。

於本揭示案中，用於修飾數量數值之術語「約」(about 或 around)意指數值 $\pm 10\%$ 。

於根據本發明方法中，可例如適宜於溫度約 33°C 至 38°C 下，以小兒麻痺病毒感染細胞及/或繁殖病毒。於較佳實施例中，該感染及/或繁殖病毒係於溫度約 34°C 至 36°C 下進行，於某些實施例中，為約 34.5°C 至 35.5°C ，例如於約 35°C 下。

於根據本發明之方法中，可例如適宜於感染倍率(MOI)為0.001至10下，以小兒麻痺病毒感染細胞。於某些實施例中，該感染係於MOI為約1至3下進行，例如於MOI為約2下。於相當高之MOI(>0.1 ，較佳約1或更高)下感染時，可進一步改善該高效率、高產率方法。

根據本發明，較佳於高細胞密度下，以小兒麻痺病毒感染細胞。於某些態樣中，當細胞密度為 1×10^6 個細胞/ml至 150×10^6 個細胞/ml，較佳 2×10^6 個細胞/ml至 150×10^6 個細胞/ml下，感染小兒麻痺病毒。於某些較佳實施例中，於細胞密度為約 5×10^6 個細胞/ml至 20×10^6 個細胞/ml，例如約 8×10^6 個細胞/ml至 15×10^6 個細胞/ml，例如約 10×10^6 個細胞/ml下進行該感染。據吾人瞭解，在生產非腺病毒型病毒之疫苗時，本發明方法提供最高之細胞濃度。該等根據本發明之方法之優點為可獲得極高之小兒麻痺病毒效價，亦即至少比利用先前技術中之常用非洲綠猴腎細胞方法高約數倍。

於根據本發明之方法中，於感染之後12至48小時收集小兒麻痺病毒。於某些實施例中，於感染之後約18至30小時，例如於感染之後約20至28小時、約22至26小時，例如於感染之後約24小時，收集小兒麻痺病毒。因此，根據本發明之方法可用於非常快速地獲得高效價小兒麻痺病毒，相較於相關技術中通常耗時更長之方法，其亦有助於使得本發明方法極具經濟吸引力。

大多數大規模懸浮培養物係採用分批或批次進料製程操作，因為其可最直接操作及擴大規模，且該等製程原則上適用於本發明方法。然而，基於灌注原則之連續製程越來越普遍。於本發明之某些實施例中，於灌注系統中培養生產者細胞。

分批、批次進料、灌注、及灌注製造製程曾採用PER.C6細胞，例如用於生產重組抗體。於分批培養時，通常獲得活細胞濃度高於 12×10^6 個細胞/ml。已多次證實可利用分批進料使活細胞濃度高達 40×10^6 個細胞/ml。於灌注製程中，通常獲得之細胞濃度峰值高於 150×10^6 個細胞/ml(Kral等人，2009)。

灌注培養細胞具有技術上之意義，亦即其意指在培養期間，可利用分離裝置截留細胞，其中流出之液體中細胞密度比分離前減少，並且有細胞培養基流入。灌注培養之用法係因應高密度之細胞(例如 $10-50 \times 10^6$ 個活細胞/ml)生長之挑戰。爲了增加密度，以新鮮培養基恒定、或間期性置換培養基，以補充缺失之營養素，並去除毒性產物。灌注

法亦更能控制培養環境(pH、dO₂、營養素含量等)。可利用多種分離裝置(例如細篩網旋轉過濾器(fine mesh spin filter)、中空纖維或平板式薄膜濾器、沉降管)截留細胞，以使新鮮培養基灌注進入培養物。於某些實施例中，分離裝置為含有中空纖維之過濾模組，亦即管狀薄膜。管之內徑通常為0.3至6.0 mm，例如0.5至2.0 mm。於某些實施例中，所選擇之膜篩目(孔徑)使得篩網中之孔徑接近細胞直徑，以確保高度截留細胞，且同時使細胞碎片可通過濾網。於其他實施例中，篩目顯著小於細胞直徑。篩目較佳為0.1至30 μm，例如0.1至3 μm，例如約0.2 μm。含有中空纖維之過濾模組可購自例如 General Electric(先前稱 Amersham)。

採用灌注法以使某些代謝產物維持在所需濃度，並去除，藉此減少培養基中之雜質。於通常之情形中，並非於培養之整個過程中進行灌注，而通常係按需要於培養期間不定時進行。例如，通常直至某些培養基組分(諸如葡萄糖)開始耗盡且需要置換時才開始灌注。

此技術中已知有幾種灌注系統，原則上適用於本發明之方法。術語「灌注系統」意指生物反應器與分離裝置相連之組合。分離裝置可併入生物反應器中(例如細篩網旋轉過濾器)，或可保留在生物反應器外部(例如中空纖維)。於兩種情形中，如上述，分離裝置阻止細胞團洗出反應器，且可更新培養基。於某些實施例中，生物反應器係與(連結於)交替切向流(alternating tangential flow; ATF)灌注系

統(例如 ATF System, Refine Technology, Co., East Hanover, NJ)一起工作。切向流可根據熟習此項技術者所知之方法及例如 US 6,544,424 中所述獲得。ATF 灌注系統之操作已闡述，且可調整(Furey, 2002)。ATF 系統使得細胞可培養更長時間，且達到高細胞密度而不會阻塞濾器。事實上，採用 ATF 灌注系統，例如使用 PER.C6 細胞，可獲得極高細胞密度，超過 100×10^6 個活細胞/ml(參見例如 Yallop 等人，2005 及 WO 2005/095578)。然而，於先前之報導中，灌注系統中之 PER.C6 細胞係用於重組產生抗體，亦即目的完全不同，且不感染小兒麻痺病毒。

於某些實施例中，於預培養時期(亦即感染小兒麻痺病毒之前)宜利用例如 ATF 系統灌注，因為其可獲得極高細胞密度，且該等細胞係於良好狀態下用於隨後感染小兒麻痺病毒。為了達到該等高細胞密度，於某些實施例中，在細胞生長一部份時間，至少部份灌注培養基。於某些實施例中，一旦細胞密度達約 2×10^6 個活細胞/ml 至 8×10^6 個活細胞/ml 之間，即開始灌注。

於本發明方法中，以小兒麻痺病毒感染細胞。通常在允許攝入病毒之最佳條件下，使病毒暴露於適宜生產細胞。熟習此項技術者知曉如何找出最佳之其他條件，亦即攪拌條件、pH、溶解氧(dO_2 或 DO)。通常，最佳攪拌為在約 50 至 300 rpm 之間，通常約 100-200，例如約 150，通常 DO 為 5-60%，最佳 pH 為在 6.7 至 7.7 之間。通常小兒麻痺病毒自發感染本發明細胞，且細胞與小兒麻痺病毒顆粒接觸足以

使細胞感染。通常向培養物添加小兒麻痺病毒接種物以起始感染，且隨後於該等細胞中繁殖小兒麻痺病毒。

宜於高細胞密度下(亦即約 10×10^6 個細胞/ml)，以小兒麻痺病毒感染根據本發明之細胞培養物，且可獲得極高小兒麻痺病毒效價(高於 10^{10} CCID₅₀/ml)。

於某些實施例中，於感染之前，細胞培養物之存活率保持75%以上，其意指在感染時，培養物中細胞總數之至少75%存活。於某些實施例中，感染時之細胞培養物之存活率為至少80%，於其他實施例中，為至少85%。可利用熟習此項技術者可使用之常用方法測定存活率，例如錐蟲藍排除法(trypsin blue exclusion)、Casy細胞計數等。

於某些實施例中，感染時之細胞密度為約 10×10^6 至 50×10^6 個活細胞/ml，例如約 10×10^6 至 20×10^6 個活細胞/ml，例如約 10×10^6 至 15×10^6 個活細胞/ml。該等細胞密度可獲得高的病毒產量，且限制細胞碎片與宿主細胞DNA之累積量，有利於該等實施例中，於下游處理所收集之小兒麻痺病毒。因此，本發明提供一種製造小兒麻痺病毒之優化方法，其產生高效價的小兒麻痺病毒，且同時使得所收集之材料仍然可於下游製程中接受處理。

於其他實施例中，感染時之細胞密度為約 15×10^6 至 150×10^6 個細胞/ml，例如約 15×10^6 至 80×10^6 個細胞/ml，例如約 20×10^6 至 50×10^6 個細胞/ml。於該等細胞密度下進行感染可產生更高濃度之病毒。

於本發明之某些實施例中，提供一種大量產生效價為至

少 10^{10} CCID₅₀/ml 之小兒麻痺病毒之方法。

效價係以 CCID₅₀ 表示，其係 50% 細胞培養物之感染劑量。有時亦稱其為 TCID₅₀ (50% 組織培養物之感染劑量)，但是由於文中係利用細胞培養物測定，故於文中使用術語 CCID₅₀。

使病毒與細胞接觸，以使得病毒感染該等細胞，並進行繁殖。例如，向細胞培養物添加病毒接種物，並於溫和攪拌下(例如約 30 rpm)使其被細胞吸收，例如約 30 分鐘，隨後再添加一些培養基，且若需要調節 pH，可調節攪拌速度，並維持培養。於感染步驟之後，發生病毒顆粒數量之擴增。當然，較佳亦於沒有血清下，於懸浮培養之 PER.C6 細胞中進行該步驟，且更佳為在完全不含直接源自動物之組分的條件下。可於例如規模為 1 至 20,000 升(例如 10 至 2000 升，例如 50 至 1000 升)之生物反應器中進行該步驟，其規模很容易地調整，以滿足疫苗之要求。於某些實施例中，生物反應器為單次使用生物反應器(SUB)。

在細胞中繁殖小兒麻痺病毒之後，自細胞培養物收集病毒或其組分。其可藉由諸如熟習此項技術者已知之常用方法進行。可藉由諸如離心術或超濾術之常用方法，自細胞生物質中分離出所製造及釋放到細胞培養基中之病毒，並自上清液中收集。於該種情形中，離心或過濾即為收集步驟。可使用常用方法收集病毒，例如彼等於 US 4,525,349 中所述之方法。簡言之，通常藉由例如超濾術抽吸含有病毒之液態培養懸浮液，過濾，並濃縮。例如，於培養結束

時進行收集，其方法為收集含有病毒懸浮液之培養基。可例如利用0.22 μm濾網過濾收集物，並視需要貯存於4℃下。

經過濾之收集物可視需要進行超濾，以濃縮病毒懸浮液，且隨後例如根據於US 4,525,349或Van Wezel等人，1978中所述之製程，例如藉由凝膠過濾術及/或離子交換層析術純化小兒麻痺病毒。可視需要稀釋最終所得濃縮之病毒懸浮液，且為了製備IPV，可使用常用方法使其中之小兒麻痺病毒不活化。

收集及純化小兒麻痺病毒或病毒組分、及自其製造疫苗之方法已於相關技術中使用數十年，且因此已熟知，且已詳細闡述於例如Van Wezel等人，1978；Montagnon等人，1984；WO 2007/007344；US 4,525,349中，所有文獻均係以引用的方式併入文中。

小兒麻痺症疫苗係基於活的病毒或不活化病毒。其含有小兒麻痺病毒D-抗原，其為重要之保護性抗原。可藉由標準病毒滴定技術測定病毒產量，且亦藉由熟習此項技術者已熟知之常用技術(例如D-抗原ELISA分析術)測定D-抗原濃度。可例如藉由動物之活體內測試法決定免疫原性。可利用D-抗原ELISA，及藉由對獲自過去曾接受免疫接種之大鼠的血清進行小兒麻痺病毒中和細胞培養分析，測定效力。

通常係於分開製程中培養各小兒麻痺病毒株，且若例如製備含有三種類型之小兒麻痺病毒的三價疫苗時，則混合

(不活化，用於IPV)病毒，並調配用於製備個別劑量。於某些實施例中，例如每一劑量(例如0.5 ml)之最終所得疫苗可例如包含40 D-抗原單位(DU)之1型小兒麻痺病毒、8 DU之2型小兒麻痺病毒及32 DU之3型小兒麻痺病毒，其係以參考製劑為對照所測定。

可根據相關技術中已知之方法，例如利用福馬林或利用 β -丙內酯(BPL)(參見例如Jiang等人，1986)使小兒麻痺病毒不活化。於某些實施例中，例如藉由以下方法，利用福馬林進行不活化：使純化之病毒懸浮液經過0.22 μm 薄膜過濾，於穩定磁力下攪拌24小時，並加熱至37 $^{\circ}\text{C}$ ，隨後添加甲醛溶液，使濃度為4,000分之一。於頭四天，保持病毒懸浮液處於37 $^{\circ}\text{C}$ 下，且同時繼續進行磁力攪拌。於第六天，使病毒懸浮液經過0.22微米薄膜過濾，懸浮液處於37 $^{\circ}\text{C}$ 之下，繼續進行不活化，直至第十二天。均質化經不活化之病毒懸浮液，並可貯存於例如4 $^{\circ}\text{C}$ 下。於該步驟之後，可例如藉由混合所需之製備物，製得用於投與之經濃縮及/或最終所得之批次。

於某些實施例中，將純化後之小兒麻痺病毒或病毒組分調配成醫藥組合物。可根據熟習此項技術者所熟知之常用方法，利用多種緩衝液，並採用多種方法進行調配。通常，其要求使小兒麻痺病毒顆粒形成醫藥上可接受之組合物，該組合物包括小兒麻痺病毒、及至少一種醫藥上可接受之賦形劑。可於熟習此項技術者已知之條件下製備該組合物，且於某些實施例中，其適於向人類投與。於某些實

施例中，組合物可包括經緩衝之培養基，其可視需要為Medium M-199培養基，其係用作某些已註冊之常用不活化小兒麻痺病毒疫苗之調配緩衝液。此外，可使用磷酸鹽緩衝生理鹽水，且最終所得之藥劑調配物可包含例如每劑0.5% 2-苯氧乙醇及最多0.02%甲醛作為抗微生物防腐劑。

醫藥上可接受之載劑或賦形劑及稀釋劑已於相關技術中熟知，且廣泛應用於多種治療用產品中。較佳採用可於疫苗中良好發揮作用之載劑。於某些實施例中，疫苗另外包括佐劑，例如明礬。於相關技術中已知佐劑可進一步增加針對所使用之抗原決定子的免疫反應。

為了向人類投與，本發明可使用含有小兒麻痺病毒及醫藥上可接受之載劑或賦形劑之醫藥組合物。於本發明全文中，術語「醫藥上可接受」意指於所採用之劑量及濃度下之載劑或賦形劑不會在接受投與之受檢者中導致不需要或有害之反應。該等醫藥上可接受之載劑及賦形劑係相關技術中已熟知(參見Remington's Pharmaceutical Sciences，第18版，A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer及L. Hovgaard編輯，Taylor & Francis [2000]; 及醫藥上可接受之賦形劑手冊(Handbook of Pharmaceutical Excipients)，第3版，A. Kibbe編輯，Pharmaceutical出版社[2000])。經純化之不活化小兒麻痺病毒或其具免疫原性之部份較佳係調配成無菌溶液投與。藉由無菌過濾術或藉由相關技術中已知之其他方法製備無

菌溶液。隨後凍乾溶液或填裝入醫藥藥劑容器中。溶液之pH通常為pH 3.0至9.5，例如pH 5.0至7.5。小兒麻痺病毒或其具免疫原性之部份通常處於含有適宜之醫藥上可接受之緩衝液的溶液中，且小兒麻痺病毒溶液亦可含有鹽。視需要存在諸如白蛋白之穩定劑。於某些實施例中，添加清潔劑。於某些實施例中，可將疫苗調配成注射用製劑。該等調配物含有有效數量之小兒麻痺病毒或其具免疫原性之部份，且為無菌液態溶液、液態懸浮液或為凍乾形式，且視需要含有穩定劑或賦形劑。

小兒麻痺症疫苗可為單價(含有一種類型之小兒麻痺病毒(1、2或3型)、或雙價(含有兩種類型之小兒麻痺病毒，例如1及2型、1及3型或2及3型)、或三價(含有三種類型之小兒麻痺病毒，亦即1、2及3型)。

可自野生型小兒麻痺病毒生產IPV。或者，可自無毒性之活小兒麻痺病毒，例如自沙賓病毒株製得IPV，該等病毒可進一步降低自IPV製造再次引入野生型小兒麻痺病毒之風險(參見例如WO 2007/007344及Doi等人，2001)。本發明適於製造野生型小兒麻痺病毒(1、2及3型，例如1型病毒株Mahoney、2型病毒株MEF、或3型病毒株Saukett)、及無毒性類型之小兒麻痺病毒(例如沙賓病毒株)。本發明因此可用於製造用於IPV、及用於OPV之小兒麻痺病毒。用於生產IPV之根據本發明之方法可使得成本降低至較低度開發及最低度開發之國家可負擔IPV之程度。雖然，根據通常之方法所製得之OPV通常比IPV廉價，但本發明之

極高效方法仍可進一步降低用於OPV之原料成本，且因此亦降低OPV之成本。

可根據相關技術中已知之方法，例如經肌內、經皮內、或經口投與小兒麻痺症疫苗。

根據本發明可獲得之小兒麻痺病毒疫苗可用作獨立疫苗(stand-alone vaccine)，但於其他實施例中可與其他疫苗以常用方式組合，例如呈抗白喉病、百日咳、破傷風與小兒麻痺症之組合疫苗之形式，且可視需要包含其他疫苗組分，例如抗B型肝炎及/或流行性感冒嗜血桿菌(*heamophilus influenzae*)等之組分。因此，小兒麻痺病毒適用於擴大免疫計畫(expanded program on immunization; EPI)，且可與該計畫中之疫苗組合。類似於常用之小兒麻痺病毒疫苗，根據本發明之疫苗可呈單劑提供，或較佳於初免-加強療程中提供，其中間隔適宜時間投與多劑量之疫苗，例如間隔1-2個月注射兩次，隨後於6-12個月之後加強；或例如首先經口投藥，隨後於約8週之後進行第二次投藥，且於第二次投藥之後8-12個月第三次投藥；或者例如對於嬰兒，於6-12週齡時第一次經口投藥，隨後於第一次投與之後約8週第二次投藥，且於約6-18月齡時第三次投藥；或者例如對於先前曾接受免疫接種且正處於增加之風險中之個體僅單次投藥等。可根據標準醫學操作確定較佳投藥方式，且其通常係與現有之小兒麻痺病毒疫苗之投藥方式相同。

下列實例將進一步闡釋本發明。該等實例不以任何方式

限制本發明。其僅供闡述本發明。

實例

實例1：小兒麻痺病毒之於固著PER.C6細胞中之有效生產法

為測試小兒麻痺病毒於固著PER.C6細胞中之繁殖，並產生病毒儲備物，自SBL(瑞典)獲得1型小兒麻痺病毒(Brunenders)、2型(MEF-1)及3型(Sauckett)。於非洲綠猴腎細胞中製得之各該等儲備物之效價均為約 10^6 CCID₅₀/ml。PER.C6細胞(Fallaux等人，1998)係生長於培養基(含有10% FBS及10 mM MgCl₂之DMEM)中。於三個T175燒瓶中，依每個燒瓶 30×10^6 個PER.C6細胞，接種細胞至25 ml培養基中，次日，依感染倍率(MOI)為0.1(0.1 CCID₅₀/個細胞)，於潮濕培養箱中，於37°C及10% CO₂下分別接種各類型之小兒麻痺病毒。三天之後，收集細胞及培養基，且藉由兩次凍/融循環製得粗製溶胞產物。藉由離心去除細胞碎片之後，取上清液分成等份，並貯存於-80°C下。作為平行處理，於含於T175燒瓶之25 ml非洲綠猴腎細胞培養基(補充4 mM L-麩胺酸之Optipro SFM培養基)中接種 6.25×10^6 個非洲綠猴腎細胞，並依相同MOI感染各小兒麻痺病毒株。亦於三天之後收集非洲綠猴腎細胞培養物，凍/融兩次，並等份貯存。

隨後利用非洲綠猴腎細胞，藉由CCID₅₀分析法定量小兒麻痺病毒產量。因此，於96孔分析板各孔之100 µl培養基中接種 1.25×10^4 個非洲綠猴腎細胞，並於37°C及5% CO₂下培養。次日，於非洲綠猴腎細胞培養基中製備小兒麻痺病

毒樣本的15個五倍稀釋系列，並各取100 μ l第5至15號稀釋液添加至96孔分析板中之第1至11行，八個重複。第12行用作未受感染之對照行。七天之後，分析各孔中出現之細胞病變效應(CPE)，並利用如下Spearman-Kärber方法計算效價：

$$\text{終點效價}(\log_{10})=X_0-d/2+d/n*\Sigma X_i$$

其中 X_0 為當所有接種物仍然呈陽性時之最高稀釋倍數的 \log_{10} 值， d 為所採用之稀釋倍數之 \log_{10} 值， n 為各稀釋倍數下之重複次數，且 ΣX_i 為呈陽性之孔(包括稀釋度 X_0)之總數。

效價實驗之結果出示於圖1中，且其顯示，於固著PER.C6細胞上，1型小兒麻痺病毒之效價比非洲綠猴腎細胞時之效價高5倍以上，且2型及3之效價比非洲綠猴腎細胞時之效價高10倍以上。由於接種較多PER.C6細胞，因此認為每個細胞之病毒顆粒的產量差異較小。PER.C6及非洲綠猴腎細胞之細胞單層之匯合度皆估計為~80%。

自該等實驗，吾人得出如下結論：於固著單層PER.C6細胞上之小兒麻痺病毒產量至少與非洲綠猴腎細胞一樣好。

實例2：小兒麻痺病毒於懸浮PER.C6細胞中之有效生產法

為研究小兒麻痺病毒於懸浮PER.C6細胞中之繁殖，進行小規模實驗以測試不同培養基、感染倍率(MOI)及收集時間(TOH)。因此，於如下三種不同培養基中培養PER.C6細胞：AEM(Invitrogen)、BMIVg(以商品名PermexcisTM購自Lonza)、及CDM4PERMAb(Hyclone)。於感染當天，於震

盪臺(shaking platform)上之含濕氣培育箱中，於37°C下，計算一種類型培養基中所培養之細胞數，且依不同細胞密度(1.5、2.5、3.5或5百萬個細胞/ml)再接再種於相同類型之培養基中，並依不同MOI(0.01、0.05或0.1 CCID₅₀/個細胞)感染病毒。震盪臺(IKA KS 260)之軌道直徑為10 mm，且對於填裝15-20 ml培養基之125或250 ml震盪燒瓶，於100 rpm下使用。對於AEM培養基，依1.5或2.5百萬個細胞/ml接種細胞，此係因為AEM不能承受更高之細胞密度。依此方式，製得多種培養物，並於感染之後之2、3或4天收集。所有樣本均凍/融兩次，並貯存於-20°C或更低之溫度下，直至進一步分析。

圖2說明於第二天及第四天時，該等樣本之效價測定結果(第三天之數據未顯示)。於三種培養基中生長並受感染之PER.C6細胞均能夠製造高效價1型小兒麻痺病毒，雖然BMIVg培養基之效價比PERMAb及AEM培養基相對較低。此外，培養更長時間並不導致效價更高。相反，於大多數情形中，第二天之收集物之效價比第三天及第四天之收集物高。於該實驗中不能觀察到MOI變化之一致效應。重要的是，感染時採用較高細胞密度確實提高單位體積效價，其說明採用高細胞密度之懸浮培養製程有利於產生具感染性之小兒麻痺病毒。

於下一個實驗中，在所有三種小兒麻痺病毒株中，比較收集時間及感染期間之溫度。因此，於震盪燒瓶中，依 2.5×10^6 個細胞/ml接種PER.C6細胞至15 ml體積之AEM培養

其中，並依MOI為0.1，於37°C及於35°C下感染各小兒麻痺病毒株。於感染之後2、3及4天收集細胞及培養基，並如上所述進行處理。如上所述藉由測定CCID₅₀值來分析不同條件下之病毒產量，且顯示，對於所有三種類型之小兒麻痺病毒，於35°C下之產量高於37°C(圖3)。此外，已證實，於大多數情形下，當於第二天採集收集物時，可測得最高之效價，2型及3型小兒麻痺病毒亦如此。

實驗3：於較高細胞密度下，於懸浮PER.C6細胞中之小兒麻痺病毒之產量增加

為研究進一步增加細胞密度是否會增加病毒效價，故比較 2.5×10^6 個細胞/ml與 10×10^6 個細胞/ml下之產量。因此，於震盪燒瓶中，依指定細胞密度，接種PER.C6細胞至15 ml體積之PERMAb培養基中，並感染2 CCID₅₀/個細胞之1型小兒麻痺病毒，並進行三重複。於24及48小時之後，收集細胞及培養基，並藉由如上所述之凍/融及離心術術製得澄清之溶胞產物。除了先前測試之溫度35及37°C之外，亦於33°C下進行實驗。

藉由CCID₅₀分析法(圖4)分析效價，且證實，當細胞於密度為 10×10^6 個細胞/ml下受感染時，產量高於當於 2.5×10^6 個細胞/ml下受感染時。於不同細胞密度或收集日期下，均於35°C下獲得最佳效價。此外，對於於PER.C6細胞上之小兒麻痺病毒的有效繁殖量而言，該實驗顯示，亦可於24小時之後採集收集物，因為24小時與48小時之樣本中之產量非常相當。

於下一個實驗中，針對其他類型之小兒麻痺病毒測試該等條件。依 10×10^6 個細胞/ml接種PER.C6細胞至PERMAb培養基中，並於震盪燒瓶中，於 35°C 下，依2 CCID₅₀/個細胞感染不同小兒麻痺病毒儲備物，並進行三重複。於24及48小時之後進行收集，並如上所述處理細胞及培養基，獲得澄清之溶胞產物。藉由CCID₅₀分析法測定效價，結果顯示採用高細胞密度亦導致2型及3病毒之高產量(圖5)。

該實驗清楚顯示，懸浮PER.C6細胞之高密度培養物提供製造野生型小兒麻痺病毒極佳平臺。由於可利用生物反應器系統、波動袋(wave bags)或其他類型之可擴大規模之培養系統增加PER.C6細胞之細胞密度及培養物之尺寸/體積，因此相較於當前利用非洲綠猴腎細胞培養物之微載體系統，可顯著改善小兒麻痺病毒之生產。

所製得之小兒麻痺病毒係根據此技術中已知且用於非洲綠猴腎細胞上繁殖之小兒麻痺病毒之方法收集及純化，根據已知方法由福馬林不活化，且隨後根據此技術中周知之方法利用標準大鼠免疫原性分析法測試免疫原性(例如Bevilacqua等人，1996)。預期由此製得之小兒麻痺病毒的免疫原性與利用非洲綠猴腎細胞之常用方法所製得之小兒麻痺病毒相當。

實例4：於生物反應器中於PER.C6細胞中製造小兒麻痺病毒

細胞自PER.C6工作細胞庫解凍，並於含濕氣培養箱中於 37°C 及10% CO_2 下於無血清培養基中繁殖。每隔3至4天進行繼代培養，直至達到充分細胞密度，以細胞密度0.2-

0.4×10⁶個細胞/ml接種2 L生物反應器。細胞於2 L生物反應器中，於37°C，DO 40%，及pH 7.3下繁殖。當細胞密度達到約2×10⁶個細胞/ml時(接種後第四天)，開始ATF系統，以使細胞可培養更長時間並達到高細胞密度。於約11至12天之後，2 L生物反應器中之細胞密度達到50×10⁶個細胞/ml以上。此時，將細胞懸浮液轉移至10 L生物反應器。2 L生物反應器之細胞懸浮液以無血清培養基1:5稀釋。10 L生物反應器中之細胞密度為在10至15×10⁶個細胞/ml之間。隨後，以小兒麻痺病毒種儲備物感染10 L生物反應器，MOI為2 CCID₅₀/個細胞。於35°C，pH 7.3及DO 40%下，製造小兒麻痺病毒。於某些時間點對10 L生物反應器採樣，用於細胞計數及小兒麻痺病毒產量，並適宜於感染後12至48小時之間收集小兒麻痺病毒。

參考文獻

Barrett PN, Mundt W, Kistner O, Howard MK. 2009. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 8: 607-618。

Bevilacqua JM, Young L, Chiu SW, Sparkes JD, Kreeftenberg JG. 1996. Rat immunogenicity assay of inactivated poliovirus. *Dev. Biol. Stand.* 86: 121-127。

Campbell SA, Lin J, Dobrikova EY, Gromeier M. 2005. Genetic determinants of cell type-specific poliovirus propagation in HEK 293 cells. *J. Virol.* 79: 6281-6290。

Card CJ, Smith T, Hunsaker B, Barnett B. 2005. Serum-free production of poliovirus: A comparative study using microcarriers, roller bottles and stationary cell culture. In: F. Gòdia及M. Fussenegger編輯，Animal Cell Technology meets Genomics, 761-765。

Doi Y, Abe S, Yamamoto H, Horie H 等人，2001. Progress with inactivated poliovirus vaccines derived from the Sabin strains. In: Brown F編輯：Progress in Polio Eradication: Vaccine Strategies for the End Game. Dev. Biol. 105: 163-169。

Van Eikenhorst G, Bakker WAM, Thomassen YE, van der Pol LA. 2009. Platform technology for viral vaccine production: comparison between attached and suspension Vero cells. Poster and Abstract P70. In: 21st Meeting of the European Society for Animal Cell Technology, Programme and Book of Abstracts。

Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J 等人，New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. Hum Gene Ther 1998 Sep 1; 9(13): 1909-17。

Furey J. Scale-up of a cell culture perfusion process-A low-shear filtration system that inhibits filter-membrane fouling. Genetic Engineering News，第22卷，第7號，2002

年4月。

Jiang S, Pye D, Cox JC. 1986. Inactivation of poliovirus with β -propiolactone. *J. Biol. Stand.* 14: 103-109。

John J. 2009. Role of injectable and oral polio vaccines in polio eradication. *Expert Rev. Vaccines* 8: 5-8。

Kew OM, Sutter RW, de Gourville EM, Dowdle WR, Pallansch MA. 2005. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 587-635。

Kral KM, Golden K, Zijlstra G, Swaving J, Nieboer M, Chon JH. 2009. Advances in high yielding platform production processes using the PER.C6® human cell line. Abstract P142. In: 21st Meeting of the European Society for Animal Cell Technology, Programme and Book of Abstracts。

Merten O.-W., Wu R, Couvé E, Crainic R. 1997. Evaluation of the serum-free medium MDSS2 for the production of poliovirus on Vero cells in bioreactors. *Cytotechnology* 25: 35-44。

Montagnon B, Vincent-Falquet JC, Fanget B. 1982. Thousand litre scale microcarrier culture of Vero cells for killed poliovirus vaccine. Promising results. *Develop. Biol. Standard.* 55: 37-42。

Montagnon BJ, Fanget B, Vincent-Falquet JC. 1984. Industrial-scale production of inactivated poliovirus

vaccine prepared by culture of Vero cells on microcarrier. Rev. Infect. Dis. 6(增刊2): S341-S344。

Pau MG, Ophorst C, Koldijk MH, Schouten G, Mehtali M, Uytdehaag F. The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. Vaccine 2001 Mar 21; 19(17-19): 2716-21。

Van Wezel AL, van Steenis G, Hannik CA, Cohen H. 1978. New approach to the production of concentrated and purified inactivated polio and rabies tissue culture vaccines. Develop. Biol. Standard. 41: 159-168。

Wright PF, Modlin JF. 2008. The demise and rebirth of Polio-A modern Phoenix? J. Infect. Dis. 197: 335-336。

Yakovenko ML, Korotkova EA, Ivanova OE, Eremeeva TP 等人，2009. Evolution of the Sabin vaccine into pathogenic derivatives without appreciable changes in antigenic properties: need for improvement of current poliovirus surveillance. J. Virol. 83: 3402-3406。

Yallop C, Crowley J, Cote J, Hegmans-Brouwer K, Lagerwerf F, Gagne R, Martin JC, Oosterhuis N, Opstelten DJ, Bout A. Per.C6 cells for the manufacture of biopharmaceutical proteins. Modern Biopharmaceuticals-Design, Development and Optimization, 第3卷, 2005。

【圖式簡單說明】

圖1：於固著PER.C6及非洲綠猴腎細胞中之小兒麻痺病

毒產量；

圖2：於不同無血清培養基中，於不同MOI下，及於感染時之不同細胞密度下，於懸浮PER.C6細胞中之1型小兒麻痺病毒產量；

圖3：溫度及收集時間對於懸浮於無血清培養基中之PER.C6細胞製造1、2及3型小兒麻痺病毒之影響；

圖4：感染時之細胞密度、溫度、及收集時間對於懸浮於無血清培養基之PER.C6細胞中製造1型小兒麻痺病毒之影響；及

圖5：於高細胞密度之無血清懸浮PER.C6細胞中，1、2及3型小兒麻痺病毒之有效產量。

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： 99123327

C12N7/04 (2006.01)

※申請日： 94-07-15

※IPC 分類：A61K³⁹/13 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P³¹/14 (2006.01)

用於疫苗生產之高效價小兒麻痺病毒之製造

PRODUCTION OF POLIO VIRUS AT HIGH TITERS FOR VACCINE
PRODUCTION

二、中文發明摘要：

本發明提供一種製造小兒麻痺病毒之方法，其包含如下步驟：a)提供一種無血清懸浮細胞培養物，其為PER.C6細胞，b)以小兒麻痺病毒感染該等細胞，細胞密度在 2×10^6 個細胞/ml至 150×10^6 個細胞/ml之間，及c)於感染後12至48小時之間收集小兒麻痺病毒。

三、英文發明摘要：

The invention provides a process for the production of poliovirus, comprising the steps of: a) providing a serum-free suspension culture of cells, which are PER.C6 cells, b) infecting said cells with poliovirus, at a cell density of between 2×10^6 cells/ml and 150×10^6 cells/ml, and c) harvesting poliovirus at a time of between 12 and 48 hours after infection.

七、申請專利範圍：

1. 一種製造小兒麻痺病毒之方法，其包含如下步驟：
 - a) 提供一種無血清懸浮PER.C6細胞培養物，
 - b) 以小兒麻痺病毒感染該等細胞，細胞密度在 2×10^6 個細胞/ml至 150×10^6 個細胞/ml之間，及
 - c) 於感染後12至48小時之間收集小兒麻痺病毒。
2. 如請求項1之方法，其中於 34°C 至 36°C 間之溫度進行該感染及/或病毒繁殖。
3. 如請求項1或2之方法，其中於細胞密度在 5×10^6 個細胞/ml至 20×10^6 個細胞/ml之間進行該感染。
4. 如請求項1或2之方法，其中於細胞密度約 10×10^6 個細胞/ml進行該感染。
5. 如請求項1或2之方法，其中於感染倍率(MOI)在1至3之間，例如約2，進行該感染。
6. 如請求項1或2之方法，其中於感染後18至30小時之間，例如於感染後約24小時，收集小兒麻痺病毒。
7. 如請求項1或2之方法，其中該小兒麻痺病毒為1型小兒麻痺病毒、2型小兒麻痺病毒或3型小兒麻痺病毒。
8. 如請求項7之方法，其中該小兒麻痺病毒為1型小兒麻痺病毒株Mahoney、2型小兒麻痺病毒株MEF、或3型小兒麻痺病毒株Saukett。
9. 如請求項7之方法，其中該小兒麻痺病毒為減毒小兒麻痺病毒，諸如沙賓(Sabin)病毒株。
10. 一種生產小兒麻痺疫苗之方法，包含如請求項1或2之方

法，其進一步包含純化，視需要不活化，及調配所收集之小兒麻痺病毒，以獲得小兒麻痺疫苗。

11. 如請求項3之方法，其中於感染後18至30小時之間，例如於感染後約24小時，收集小兒麻痺病毒。
12. 如請求項3之方法，其中該小兒麻痺病毒為1型小兒麻痺病毒、2型小兒麻痺病毒或3型小兒麻痺病毒。
13. 一種生產小兒麻痺疫苗之方法，包含如請求項3之方法，其進一步包含純化，視需要不活化，及調配所收集之小兒麻痺病毒，以獲得小兒麻痺疫苗。
14. 一種生產小兒麻痺疫苗之方法，包含如請求項6之方法，其進一步包含純化，視需要不活化，及調配所收集之小兒麻痺病毒，以獲得小兒麻痺疫苗。
15. 一種生產小兒麻痺疫苗之方法，包含如請求項7之方法，其進一步包含純化，視需要不活化，及調配所收集之小兒麻痺病毒，以獲得小兒麻痺疫苗。

八、圖式：

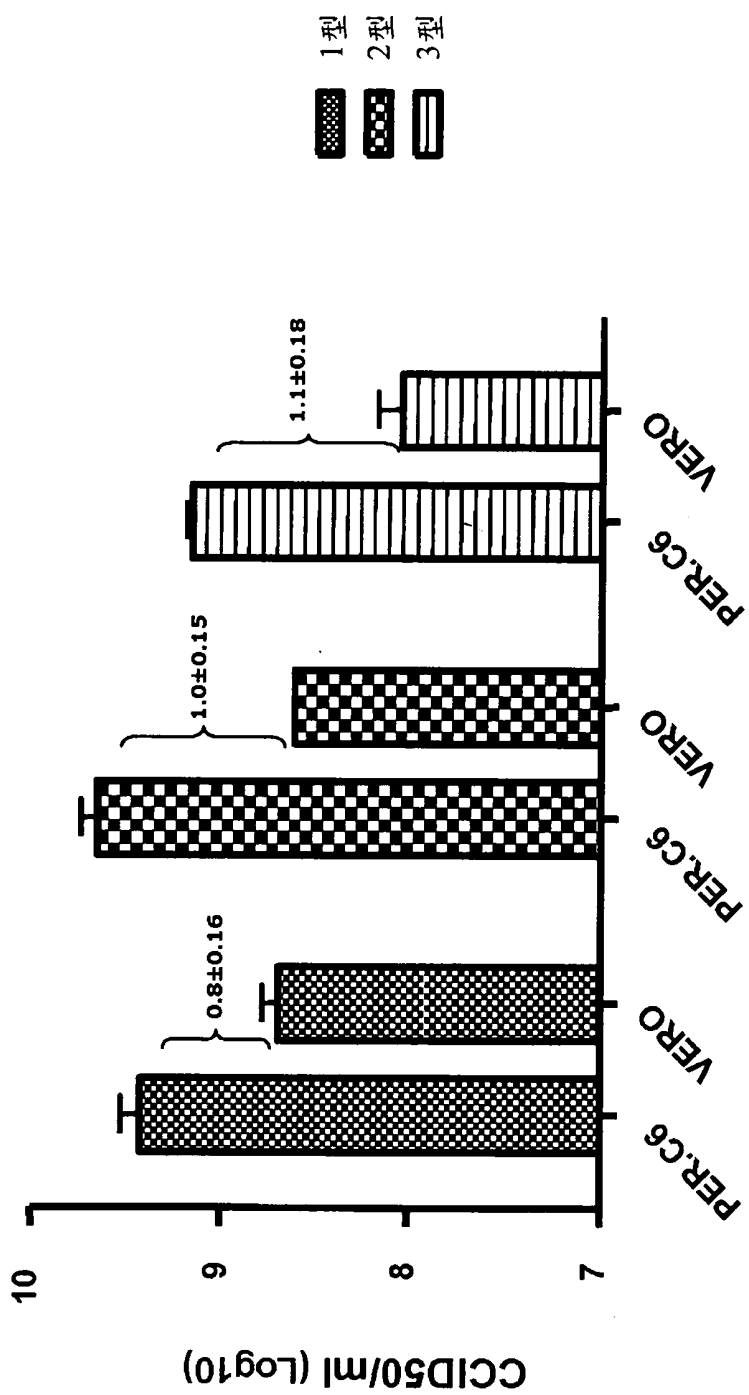


圖 1

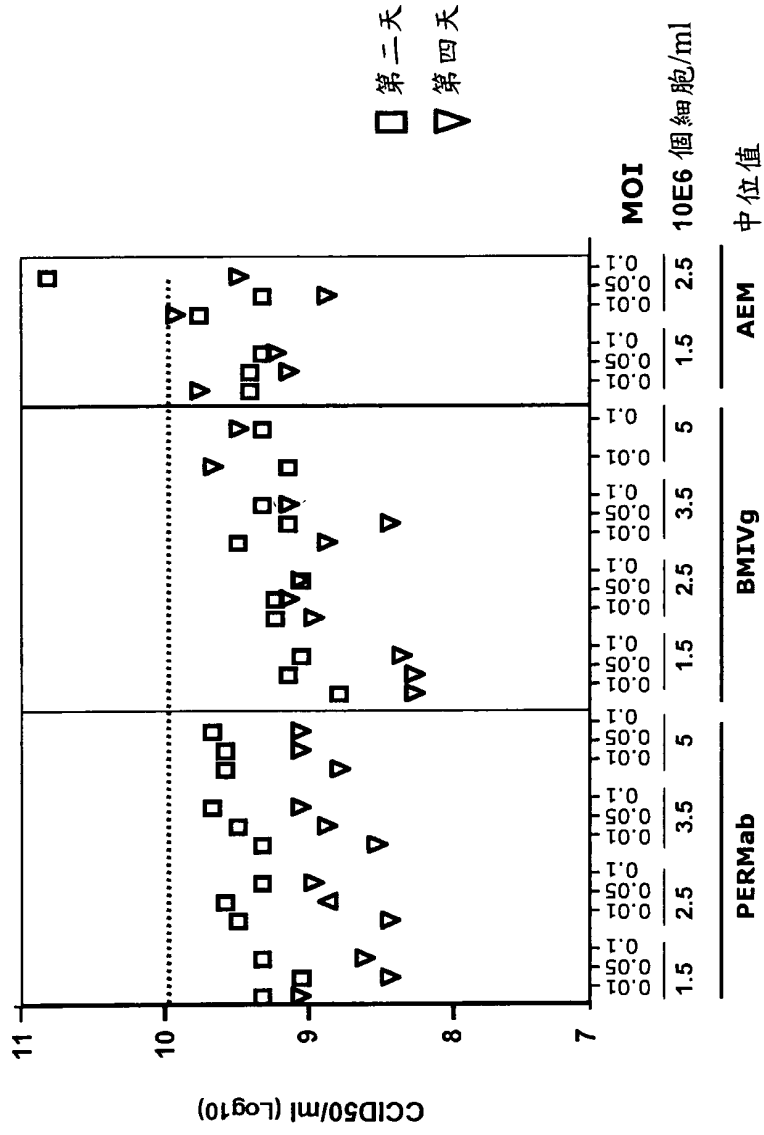


圖 2

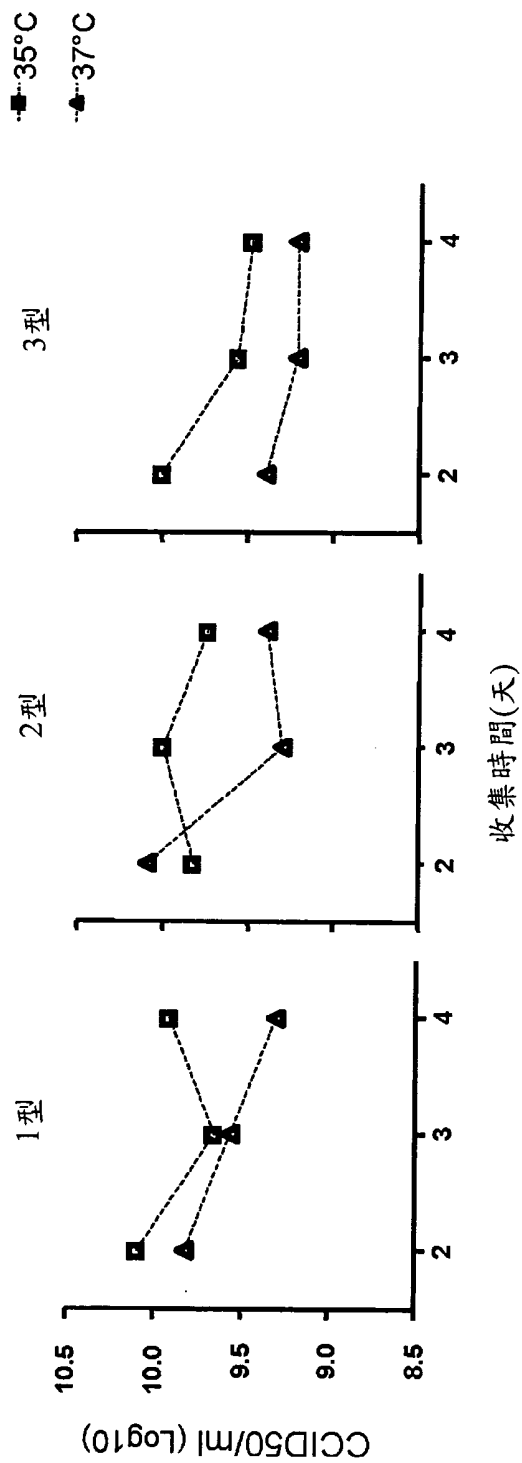


圖 3

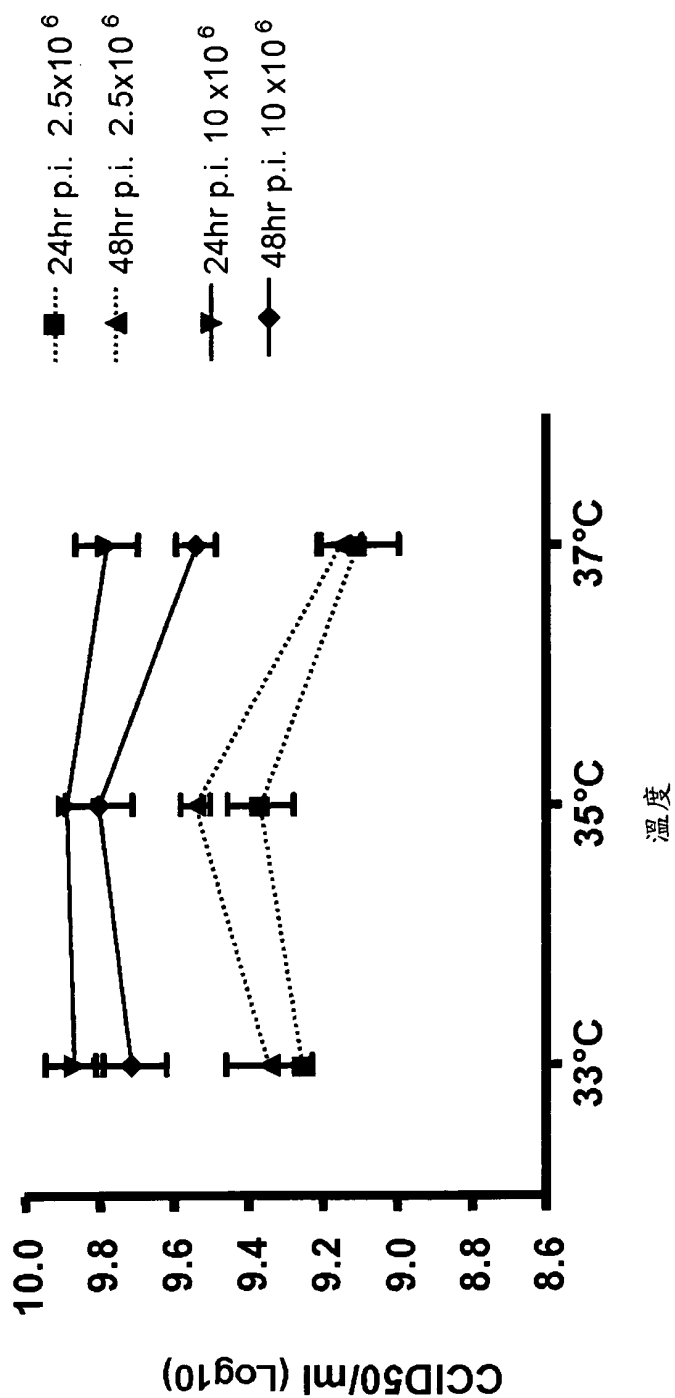


圖 4

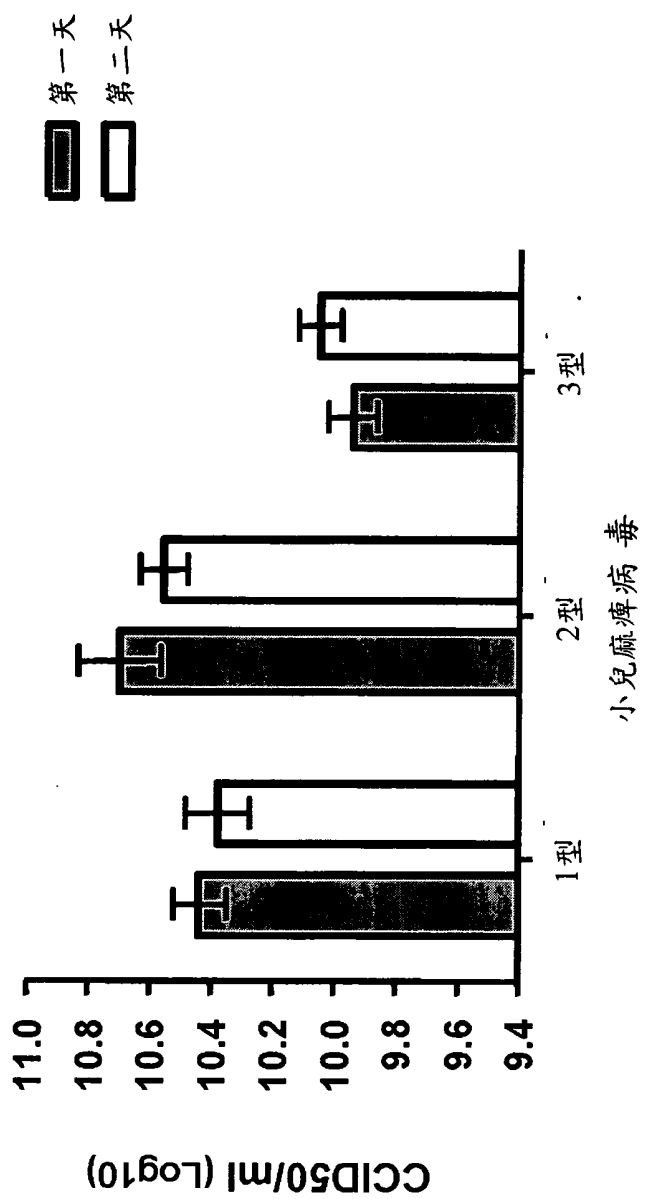


圖 5

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)