

申請日期	87. 4. 1
案 號	87104913
類 別	A61K 39/145. C12P 21/00

公告本

A4
C4

570803

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書		
一、發明 名稱	中 文	流行性感冒疫苗
	英 文	"INFLUENZA VACCINE"
二、發明 創作人	姓 名	1.古史戴夫 傑 姆 文 史雀蘭伯格 2.路迪 白蘭氏
	國 籍	均荷蘭
	住、居所	均荷蘭維斯浦市希·傑·文荷登蘭36號
三、申請人	姓 名 (名稱)	荷蘭商杜化國際研究公司
	國 籍	荷蘭
	住、居所 (事務所)	荷蘭維斯浦市希·傑·文荷登蘭36號
	代 表 人 姓 名	E·J·梅比斯

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6
B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ，有 無主張優先權

歐盟 1997年4月9日 97201007.8 有 無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

本發明係關於由在培養之動物細胞中繁殖之流行性感冒病毒所製備的流行性感冒病毒表面抗原疫苗，與其表面抗原蛋白質的製備方法。

流行性感冒病毒的大小約125毫微米，以核糖核酸為核心，並與核蛋白(nucleoprotein)結合，外層由具有雙層脂質結構的病毒外鞘(envelope)所包覆。該外鞘的內層的主要組成為基質蛋白(matrix protein)，而外層則主要含有來的宿主的脂質成份。

所謂的"表面蛋白"是指出現在病毒表面棘(spike)的神經胺酸苷酶(neuraminidase; NA)與血球凝集素(hemagglutinine; HA)。

大部份市面上的去活化的流行性感冒疫苗為所謂的"分離疫苗(split vaccines)"或次單元疫苗。

"分離疫苗"的製備是以適當濃度的清潔劑將整個流行性感冒病毒溶解，接著除去清潔劑與大部份的脂質成份。

預防流行性感冒的"次單元疫苗"和"分離疫苗"不同，它不含所有的病毒蛋白，相反的，"次單元疫苗"含有較多在接種時可誘導特定病毒的中和性(保護性)抗體產生的表面蛋白。

目前市面上大部份的流行性感冒疫苗是由培養在雞胚的流行性感冒病毒所製備而得的。然而，為所公認；以雞胚培養產生的流行性感冒病疫苗，具有許多的缺點：

1. 由於每個蛋的(微)生物品質不同，此種製備方法是比較不可靠的。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(2)

2. 一旦需求增加，如：嚴重的流行病或大流行此種製備法完全沒有變通性(flexibility)，因為它的困難在於缺乏大量可適用的蛋。
3. 此種製備法產生的疫苗對於那些對雞或雞蛋的蛋白質會產生過敏的人，是禁忌使用的。

解決以上問題的方法也許可借助組織培養來繁衍流行性感
冒病毒，組織培養的方法具有許多優點：

1. 組織培養細胞株可由無(微)生物污染的公認細胞庫系統中取得，因此可大幅改善批次的一致性(batch-to-batch consistency)，並可獲得高品質的產物。
2. 如果發生嚴重流行病或大流行時，較有可能提供足夠的疫苗。
3. 最後得到的流行性感
冒病毒成份將更適用於其它的給藥方式(口服，鼻用，吸入)。
4. 從世界衛生組織(WHO)的觀點看來：此項技術將可延長每年的疫苗組成更改(從二月中至三月中)，增加疫苗與循環中的病毒株的對抗力。

然而，以組織培養的方式取得流行性感
冒病也有一項嚴重的問題，那就是疫苗中可能出現同一宿主細胞株的遺傳物質。

此問題如果沒有設法補救，則其潛藏的危機可能導致有關當局基於安全考量拒絕此種流行性感
冒疫苗申請上市的請求。例如，美國食品藥物管理局要求針對人類使用的生物科技產物每劑量不可含超過100微微克的宿主細胞

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(3)

DNA。

因此，本發明提供一種製備流行性感冒疫苗表面抗原的方法，其中該表面抗原是作為疫苗使用，此種方法所製備的疫苗是安全的，並不含無法接受量的有害遺傳物質，且符合有關當局的要求。然而，在過去想要製備含宿主細胞DNA低於100微微克/每劑量的流行性感冒疫苗一直被認為是奢望並令人驚訝的。

所以，本發明係關於一流行性病毒表面抗原疫苗，該疫苗是由經動物細胞繁殖而得的流行性感冒病毒製備而得的，而且其中所含的宿主細胞DNA量等於或低於每劑量25微微克。

在一特定具代表性實例中，本發明提供一種製備表面抗原蛋白的方法，其中該表面抗原蛋白是用於製備含低量DNA的流行性感冒疫苗，而這種流行性感冒病毒是由動物細胞繁殖而得的。本方法含有下列步驟：

- a. 以DNA分解酵素處理得自細胞培養物之含完整病毒之液體，並且
- b. 添加陽離子清潔劑。

隨後，分離表面抗原蛋白質。

本發明的方法可應用於不同的流行性感冒病毒疫苗的生產，典型的病毒包括人類流行性感冒，豬流行性感冒，馬流行性感冒與禽流感。

本發明的動物細胞培養包括初級細胞，如：雞胚纖維織母細胞(CEF)或永久細胞株，如馬汀黛比貓腎細胞

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

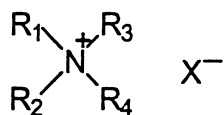
五、發明說明(4)

(MDCK)中國倉鼠卵細胞(CHO)與維羅(Vero)細胞。

DNA分解酵素分解具完整病毒體之培養液的過程可直接在發酵槽中進行，最好是在細胞培養與病毒增殖的過程中進行。

適合的DNA分解酵素為DNA分解酶(DNase)(酵素編號為EC 3.1.21與EC 3.1.22)與核酸酵素(nuclease)(酵素編號為：EC 3.1.30與EC 3.1.31)。

根據本發明，適合的陽離子性清潔劑最好為含有下列化學式的化合物



其中

R_1 ， R_2 與 R_3 為相同或不同，並且為烷基或芳基，

或 R_1 與 R_2 與其所附接之氮原子結合形成5或6員飽和雜環，

且 R_3 為烷基或芳基，

或 R_1 ， R_2 與 R_3 與其所附接之氮原子結合形成5或6員雜環，其中不飽和位置在氮原子上，

R_4 為烷基或芳基，且

X 為陰離子。

陽離子清潔劑的實例包括鯨蠟基三甲基銨鹽，如：鯨蠟基三甲基銨化溴(C.T.A.B.)，與肉荳蔻基三甲基銨鹽。合適的清潔劑還包括力玻菲汀(lipofectine)，力玻菲他命

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(5)

(lipofectamine), DOTMA。

這些陽離子清潔劑最好與非離子性清潔劑一起使用，如：吐溫(Tween)。

清潔劑處理後的表面抗原蛋白分離步驟可包括：

1. 利用離心，或超高速離心將RNP顆粒(體)從表面抗原蛋白中分離，且
2. 利用清潔劑與特定樹脂(如：安伯萊特(Amberlite) XAD-4)間的厭水性相互作用，且/或超(透)過濾(ultra(dia)filtration)將清潔劑從表面抗原蛋白中分離。

很令人驚訝地，本發明方法所得的產物，其中所含的動物細胞DNA量是非常低的。DNA濃度可低至25毫微克/劑量，並且很容量的可獲得低至10毫微克/劑量。

表面抗原蛋白可再經處理，以供製備流行性感感冒疫苗使用，這些處理包括：添加緩衝液(如：PBS)，且/或與其它血清型的流行性感感冒病毒一起混合。

表面抗原蛋白的濃度最好符合疫苗製備的要求。

實例1

A. 病毒的增殖

1. 在發酵槽中，將具有抗原型B/亞瑪加塔(Yamagata)之流行性感感冒病毒加入馬汀黛比貓腎(MDCK)細胞(ATCC CCL34)中，於35°C下培養2天，令病毒增殖。
2. 然後，加入稀釋的氫氧化鈉以調高pH值至8.0，並加入班容(Benzon)核分解酶至終濃度為每公升1000單位(1微克)。

五、發明說明(6)

3. 在35°C下，作用4小時。

B. 病毒的分離

1. 以濾孔大小為0.5微公分的厚濾紙將培養液過濾，去除細胞破片。
2. 接著，使用可阻斷分子量300,000以上通過的過濾膜，並藉由超高速離心將流行性感冒病毒濃縮及純化。
3. 加入甲醛至最終濃度為0.015% (重量百分比；w/v) 後，再將蔗糖加入至終濃度為30% (w/v)，然後將此混合物置於2-8°C下攪拌72小時。
4. 接下來以磷酸緩衝食鹽液將濃縮的病毒稀釋五倍，並置入含有阿美空(Amicon)塞絡芬(Cellufine)硫酸鹽的親和性管柱中。以磷酸緩衝食鹽液清洗，去除雜質後，以含有1.5莫耳氯化鈉濃度的磷酸緩衝食鹽液沖提病毒，以可阻斷分子量300,000以上的過濾膜，藉由超高速離心將沖提液濃縮並且脫鹽(desalted)。

C. 次單元的分離

1. 加入非離子性清潔劑吐溫-80至終濃度為300微克/毫升與溴化鯨基三甲基氦至終濃度為750微克/毫升，接著將此混合物置於4°C下攪拌3小時後，藉由離心方式，將RNP顆粒從表面抗原蛋白中分離出。
2. 上層液與安伯萊特XAD-4一起置於2-8°C下隔夜攪拌以去除清潔劑，以過濾方式將安伯萊特去除過濾液，緊接著，以0.22微米的濾膜進行無菌過濾。

經過以上的處理，可使用有效的測試法來分析樣本中的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(7)

宿主細胞DNA的含量，該方法是使用 ^{32}P -標定的貓DNA探針，進行空位轉漬雜交(slot blot hybridisation)。

經過不同步驟處理後的DNA含量分析結果列於下列表格中(在表格中，每個IVV劑量的DNA含量以每50微克HA中含微微克(picogram)作為代表。

表格

樣本	DNA含量	處理後
培養液48 hpi	19,000,000	A1
核分解酶處理後的培養液	370,000	A2
前過濾後的培養液	10,000	B1
超高速離心後的濃縮液	4350	B2
去活化並經親和性層析的濾液	4200	B4
經吐溫/C.T.A.B.處理與離心後的濾液	<25	C1
去除清潔劑後的濾液	<25	C2

實例2

在實例1中，病毒的增殖，純化，去活化與分解受到影響。

在病毒增殖的最後幾小時內(步驟A2與A3)，以班容核分解酶處理培養液，該核分解酶在增殖培養液的pH值範圍下作用(步驟A1)，可得到預期DNA去除的類似結果。

雖然核酸分解酶1需要較高的濃度，但是它在去除宿主細胞DNA(步驟A1-A3)是一樣有效的。其它的核酸內切酶(endonuclease)也可得到類似的結果。

五、發明說明(8)

實例3

除了以離心方式來去除細胞破片(步驟B1)外，其它的步驟依照實例1或2。

實例4

除了以持續流動區帶離心機(continuous flow zonal centrifuge)如：Electro-Nucleonics (RK型)，與蔗糖梯度如：以磷酸緩衝食鹽液配製，將培養液中的病毒濃縮與純化(步驟B2)外，其它的步驟依照實例1，2，或3。

實例5

除了以溴化鯨基吡啶，溴化肉荳蔻基氦，氯化二異丁基苯氧基乙氧基二甲基苯基氦(benzetonium chloride)，氯化甲基二異丁基苯氧基乙氧基二甲基苯基氦，氯化十甲鎊(decamethonium chloride)，或硬脂醯基二甲基苯基銨化溴溶液來取代鯨蠟基三甲基銨化溴溶液，其它的步驟依照實例1至4。可得到預期宿主細胞DNA去除的類似結果。

實例6

除了親和性層析後加入蔗糖，共且加入甲醛至0.05% (重量百分率濃度)，作用最長為120小時，其它步驟依照實例1。

實例7

根據實例1，2，3，4與6的方法已成功的應用於製備DNA含量低的B/哈賓(Harbin)，B/巴拿馬(Panama)，A/德州(Texas H1N1)，A/臺灣(H1N1)，A/約翰尼斯堡(H3N2)與A/武漢(H3N2)等型的流行性病毒感冒疫苗。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

四、中文發明摘要(發明之名稱：流行性感冒疫苗)

本發明係關於流行性感冒病毒表面抗原疫苗，該疫苗係由流行性感冒病毒在動物細胞培養物上繁殖的製得，其中宿主細胞DNA含量等於或低於每劑量25微微克。本發明亦有關在培養之動物細胞培養物上繁殖流行性感冒病毒來製備表面抗原蛋白質的方法，其包括以下步驟：

- a. 以DNA分解酶處理得自細胞培養物之含完整病毒之液體，及
 - b. 添加陽離子性清潔劑。
- 隨後，分離表面抗原蛋白質。

英文發明摘要(發明之名稱："INFLUENZA VACCINE")

The present invention is concerned with an Influenza surface antigen vaccine obtainable by production from Influenza Viruses propagated on animal cell culture and having a host cell DNA content equal to or less than 25 pg per dose. The present invention is also concerned with a method for the preparation of surface antigen proteins from Influenza Viruses propagated on an animal cell culture comprising the subsequent steps of:

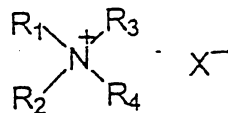
- a. treatment of the whole virus containing fluid obtained from the cell culture with a DNA digesting enzyme, and
 - b. adding a cationic detergent,
- followed by isolation of the surface antigen proteins.

六、申請專利範圍

公告本

1. 一種流行性感冒病毒表面抗原疫苗，此疫苗是由流行性感冒病毒於動物細胞培養物上繁殖製得，其包括下列步驟：

- a. 以DNA分解酵素處理得自細胞培養物的含完整病毒之液體，且該DNA分解酵素係選自由酵素編號為EC 3.1.21及EC 3.1.22之DNase與酵素編號為EC 3.1.30及EC 3.1.31之核酸酵素所組成之群；
- b. 添加陽離子性清潔劑，其主要係如下通式化合物所組成：



其中

R_1 ， R_2 與 R_3 為相同或不同，且各為烷基或芳基，

或 R_1 與 R_2 與其所附接之氮原子結合形成5或6員飽和雜環，且 R_3 為烷基或芳基，

或 R_1 ， R_2 與 R_3 與其所附接之氮原子結合形成5或6員雜環，且不飽和處在氮原子上，

R_4 為烷基或芳基，且

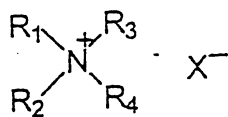
X為陰離子；

- c. 分離表面抗原蛋白質，其係利用離心或超過濾法將RNP顆粒(體)自表面抗原蛋白質中分出，接著利用清潔劑與適當樹脂間的厭水性相互作用，及/或利用超過濾法，將清潔劑自表面抗原蛋白質中分出；

六、申請專利範圍

且其宿主細胞DNA含量等於或低於每劑量25微微克。

2. 根據申請專利範圍第1項之流行性感冒病毒表面抗原疫苗，其中宿主細胞DNA含量低於每劑量10微微克。
3. 一種在動物細胞培養物上繁殖流行性感冒病毒來製備表面抗原蛋白質的方法，其包括下列步驟：
 - a. 以DNA分解酵素處理得自細胞培養物的含完整病毒之液體，且該DNA分解酵素係選自由酵素編號為EC 3.1.21及EC 3.1.22之DNase與酵素編號為EC 3.1.30及EC 3.1.31之核酸酵素所組成之群；
 - b. 添加陽離子性清潔劑，其主要係如下通式化合物所組成：



其中R₁，R₂與R₃為相同或不同，且各為烷基或芳基，或R₁與R₂與其所附接之氮原子結合形成5或6員飽和雜環，且R₃為烷基或芳基，

或R₁，R₂與R₃與其所附接之氮原子結合形成5或6員雜環，且不飽和處在氮原子上，

R₄為烷基或芳基，且

X為陰離子；

- c. 分離表面抗原蛋白質，其係利用離心或超過濾法將RNP顆粒(體)自表面抗原蛋白質中分出，接著利用清潔劑與適當樹脂間的厭水性相互作用，及/或利用

六、申請專利範圍

超過濾法，將清潔劑自表面抗原蛋白質中分出。

4. 根據申請專利範圍第3項之方法，其中DNA分解酵素的處理係於流行性感冒病毒在細胞培養物上繁殖時進行。
5. 根據申請專利範圍第3項的方法，其中陽離子性清潔劑主要包含鯨蠟基三甲基銨化溴。
6. 根據申請專利範圍第3項的方法，其中陽離子性清潔劑中補充了非離子性清潔劑。
7. 根據申請專利範圍第3項的方法，其中流行性感冒病毒在動物細胞株上繁殖。
8. 根據申請專利範圍第3項的方法，其中流行性感冒病毒在MDCK細胞上繁殖。