

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4480398号  
(P4480398)

(45) 発行日 平成22年6月16日(2010.6.16)

(24) 登録日 平成22年3月26日(2010.3.26)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K 39/145 (2006.01)	A 6 1 K 39/145
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00

請求項の数 19 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2003-549527 (P2003-549527)	(73) 特許権者	301055549
(86) (22) 出願日	平成14年12月9日 (2002.12.9)		クルセル ホランド ベー ヴェー
(65) 公表番号	特表2005-511051 (P2005-511051A)		オランダ国 2 3 3 3 セーエヌ レイデ
(43) 公表日	平成17年4月28日 (2005.4.28)		ン アルキメデスウェツハ 4
(86) 国際出願番号	PCT/NL2002/000804	(74) 代理人	100072051
(87) 国際公開番号	W02003/048348		弁理士 杉村 興作
(87) 国際公開日	平成15年6月12日 (2003.6.12)	(74) 代理人	100100125
審査請求日	平成17年11月25日 (2005.11.25)		弁理士 高見 和明
(31) 優先権主張番号	PCT/NL01/00892	(74) 代理人	100101096
(32) 優先日	平成13年12月7日 (2001.12.7)		弁理士 徳永 博
(33) 優先権主張国	オランダ(NL)	(74) 代理人	100107227
(31) 優先権主張番号	02075327.3		弁理士 藤谷 史朗
(32) 優先日	平成14年1月25日 (2002.1.25)	(74) 代理人	100114292
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 来間 清志
微生物の受託番号	ECACC 96022940		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルス、ウイルス分離株及びワクチンの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インフルエンザウイルス粒子を生産するための方法であって、

- アデノウイルスの E 1 で形質転換されたヒト細胞を、培地において、インフルエンザウイルス粒子による前記細胞の感染を促す条件下に、前記インフルエンザウイルス粒子と接触させる工程と、

- 前記細胞を、前記インフルエンザウイルス粒子の増殖を促す条件下に培養する工程と

を含み、

前記細胞は、遺伝子操作によって、2, 6 シアリルトランスフェラーゼをコード化する核酸を過剰発現する、方法。

【請求項 2】

前記 2, 6 シアリルトランスフェラーゼはヒト 2, 6 シアリルトランスフェラーゼである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

インフルエンザウイルス粒子を生産するための方法であって、

- アデノウイルスの E 1 で形質転換されたヒト細胞を、培地において、インフルエンザウイルス粒子による前記細胞の感染を促す条件下に、前記インフルエンザウイルス粒子と接触させる工程と、

- 前記細胞を、前記インフルエンザウイルス粒子の増殖を促す条件下に培養する工程

と

を含み、

前記細胞は、遺伝子操作によって、2, 3シアリルトランスフェラーゼをコード化する核酸を過剰発現する、方法。

【請求項4】

前記 2, 3シアリルトランスフェラーゼはヒト 2, 3シアリルトランスフェラーゼである、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記インフルエンザウイルス粒子はインフルエンザ分離株において存在する、請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項6】

前記インフルエンザ分離株は少なくとも1種のインフルエンザに感染した哺乳類対象体から得られる、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記インフルエンザに感染した哺乳類対象体はヒト又はブタである、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記インフルエンザ分離株は少なくとも1種のインフルエンザに感染したトリから得られる、請求項5に記載の方法。

【請求項9】

20

前記ヒト細胞は、E C A C Cの第96022940号の下で受託されたような細胞であり、2, 6シアリルトランスフェラーゼをコード化する核酸又は2, 3シアリルトランスフェラーゼをコード化する核酸が遺伝子操作によって導入されたものである、請求項1~8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

シアリルトランスフェラーゼをコード化する前記核酸は、前記細胞には異種である、請求項1~9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

シアリルトランスフェラーゼをコード化する前記核酸は、前記細胞のゲノムに組み込まれる、請求項10に記載の方法。

30

【請求項12】

ワクチンを製造するための方法であって、  
- 請求項1~11のいずれか1項に記載のインフルエンザウイルス粒子を生産する工程と、

- そのように生産されたインフルエンザウイルス粒子を不活性化する工程と  
を含む、方法。

【請求項13】

前記方法は、さらに、  
- そのように生産されたインフルエンザウイルス粒子を処理して抗原性部分を生成する工程と、

40

- 少なくとも1種の抗原性部分を得る工程と  
を含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記抗原性部分は、インフルエンザウイルス由来の、血球凝集素タンパク質及び/又はノイラミニダーゼタンパク質を包含する、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

アデノウイルスのE1で形質転換されたヒト細胞の使用であって、インフルエンザウイルス粒子を増殖させるために、2, 6シアリルトランスフェラーゼを遺伝子操作によって過剰発現させる、ヒト細胞の使用。

【請求項16】

50

アデノウイルスのE 1で形質転換されたヒト細胞の使用であって、インフルエンザウイルス粒子を増殖させるために、2, 3シアリルトランスフェラーゼを遺伝子操作によって過剰発現させる、ヒト細胞の使用。

【請求項17】

前記インフルエンザウイルス粒子は、少なくとも1種のインフルエンザに感染した哺乳類対象体から得られたインフルエンザ分離株において存在する、請求項15又は16に記載の使用。

【請求項18】

前記インフルエンザに感染した哺乳類対象体はヒト又はブタである、請求項17に記載の使用。

10

【請求項19】

前記インフルエンザウイルス粒子は、少なくとも1種のインフルエンザに感染したトリから得られたインフルエンザ分離株において存在する、請求項18に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医薬分野に関する。本発明は、さらに、インフルエンザ感染症に対して予防できるようにするワクチン並びにこれらを得る方法及び手段に関する。

【背景技術】

【0002】

インフルエンザウイルスは、インフルエンザの病因であり、該インフルエンザは、古代より、ヒトを苦しめている伝染性が高い呼吸器疾患である。前記ウイルスは、1933年に最初に同定されたが、ほぼ確実にインフルエンザに起因する多数の伝染病が何世紀にも渡って報告されている(Potter 1998)。前世紀に、インフルエンザの大発生の主要な事例が3つあった。1918年のいわゆる“スペイン風邪”は特に深刻であった。そのスペイン風邪によって、世界中でおおよそ2千万人から4千万人のヒトが死亡する結果となり、最も深刻な記録に残るヒト疾患の大発生として歴史上で知られている。1957年には、“アジア風邪”が、おおよそ100万人のヒトを死亡させ、1968年には“ホンコン風邪”が70万人以上のヒトに死をもたらした。科学者集団の努力にもかかわらず、インフルエンザウイルスを原因とする感染症は、病気及び死の場合のみならず、経済的帰結に関しても大きな損害を毎年出し続けている。最近の研究によって、過去に大きな流行病を引き起こしたいくつかのインフルエンザ株の異常な病原性が明らかにされている(Gibbsら 2001; Hattaら 2001)。しかしながら、根本的な病原機構に対する理解は不完全であり、従って病気の有効な予防及び治療が限られている。

20

【0003】

全ての年齢層を含む評価によれば、米国単独において、毎年4,800万人のヒトがインフルエンザにかかっている。これらの伝染病によって、病院で治療を必要とする約400万人のヒトに加えて1年当たり約20,000人が死亡している(CDC統計)。乳児、子供及び高齢者は、特にインフルエンザ感染症にかかりやすい。しかしながら、病原力及び感染力が高い新しいウイルス変異株の出現は、依然として全てのヒトに大きな脅威となっている。このことは、1997年の事例から明らかであり、このとき、ホンコンで同定されたウイルスは、臨床上診断された18の事例のうち3分の1に死をもたらした(Classら 1998; Subbaraoら 1998)。

30

40

【0004】

トリは、インフルエンザウイルスの主要な保有体となる。詳細には、インフルエンザAウイルスの既知のサブタイプはすべて(サブタイプBと共にヒトのインフルエンザの最も多く見られる原因)、野鳥のみならず、家禽からも単離されている。しかしながら、トリインフルエンザAウイルスは、通常、トリからヒトへ直接伝染しない。この点で、これまでに記録されている唯一の例外が、上記の1997年のホンコンウイルスである。いくつかのウイルスタンパク質が、宿主の特異性を与える役割を果たすことが考えられているが、最

50

も重要な因子は、血球凝集素 (hemagglutinin、HA) 膜タンパク質である。

【0005】

HA遺伝子は、同定され、配列決定された最初のインフルエンザウイルス遺伝子の1つである。前記遺伝子は、宿主細胞への付着及び侵入に直接関与する膜貫通型タンパク質をコードする。HAは、宿主細胞の表面上にある糖タンパク質及びガングリオシドに存在する末端のシアリル - オリゴ糖受容体決定基に結合することによって感染を起こす。天然のシアリル - 糖タンパク質及びガングリオシドの末端のシアル酸残基は、結合の最小決定基であることが知られている。しかしながら、結合は、最後から2番目のガラクトースへのシアル酸結合の種類及びシアリル複合糖質のより離れた部分の構造にも依存している。

【0006】

ヒトインフルエンザウイルスは、シアル酸 - 2, 6 - ガラクトース (SA<sub>2,6Gal</sub>) 結合を含む受容体に優先的に結合するが、トリウイルスは、SA<sub>2,3Gal</sub> 結合を使用する (総論として、Suzuki 1994参照)。この結合特異性は、宿主内部でのウイルスの細胞指向性も決定する。ヒトインフルエンザウイルスの感染 (及び複製) は、気道に限定されているが、トリインフルエンザウイルスは、腸管の内側を覆う細胞のみならず、トリの肺でも主に見られる。シアル酸 - ガラクトース結合特異的レクチンを用いることで、SA<sub>2,3Gal</sub>ではなく - 2, 6 結合によってガラクトースに結合したシアル酸残基が、ヒト気管上皮細胞の表面上に存在することが示された (BaumとPaulson 1990)。さらに、呼吸器のムチンにおける多量のSA<sub>2,3Gal</sub>部分も、HAのヒトインフルエンザのSA<sub>2,6Gal</sub>特異性の表現型を維持するのに寄与している (BaumとPaulson 1990; Coucerioら 1993)。

【0007】

多くの研究室では、初代分離株の増殖を、胚を有するニワトリの卵の漿尿膜の囊内で依然として行っている。これは、歴史的理由によるものだけではなく、適切な代わりとなる成長培地がないためでもある。これは、現在、ワクチン調整物に使用される大量のウイルスを生産するのに最適なシステムでもある。しかしながら、胚を有する卵は、ワクチン製造用の宿主システムとして、重大な制限を有する。例えば、高品質の卵の年間を通した確実な供給が十分ではないことだけでなく、胚を有する卵の入手が一般に限られていることによって、新しいインフルエンザのサブタイプが突然発生した場合にワクチン生産が妨げられる可能性がある。この生産システムの他の不利な点は、自由度の欠如、毒素の存在の危険及び偶発的なウイルス、特にレトロウイルスの危険及び無菌性に関する問題である。

【0008】

これらの制限に加えて、ウイルスを卵で培養することは、非常に重大な別の問題をもたらす。該問題は、ワクチンの目的のために特に重要であり、すなわち、卵の培養によって、ウイルスの基質特異的な順応をもたらされる十分な証拠がある。実際に、卵の尿囊内のほんの少数の継代でも、初代ヒト分離株をSA<sub>2,3Gal</sub>結合表現型に順応させるのに十分である (Rogersら 1985)。このことは、SA<sub>2,6Gal</sub>残基ではなく、SA<sub>2,3Gal</sub>残基が、ニワトリの胚の漿尿膜表面の内側を覆う細胞上に存在することによるものである。SA<sub>2,3Gal</sub>残基と特異的に相互作用することができる初代分離株内に存在するウイルス変異株は、SA<sub>2,6Gal</sub>残基とより特異的に相互作用するウイルス変異株と比較して複製の利益を有する。従って、SA<sub>2,3Gal</sub>特異的ウイルス変異株は、胚を有する卵で選択される (Gambaryanら 1999; Gambaryanら 1997)。卵への順応は、SA<sub>2,3Gal</sub>に対する親和性を上昇させるのみならず、SA<sub>2,6Gal</sub>に対する親和性の減少ももたらす。HAは、実際に、類似物質の両方の型をうまく均等に受け入れることができず、この改変された結合特異性を与える多様な変異株が同定されている (Danielsら 1987; Gambaryanら 1999; Itoら 1997; Suzukiら 1989)。特異的な免疫反応を誘導することにおいてHAが重要であれば、これらの変異株によって、その抗原の性質が大きく改変される結果となる (Illobiら 1994; Robertsonら 1994)。その結果、卵誘導変異株を有するHA分子を含むワクチンによる免疫化によって、得られた予防水準を犠牲にして、野生型インフルエンザ株に対する中和抗体の減少が引き起こされる (Newmanら 1993)。

【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0009】

本発明は、好ましくは感染した対象から得られるウイルス分離株に存在するインフルエンザウイルス粒子などのウイルス粒子を生産し、かつ／又は増殖させる方法を開示するものであり、前記方法は：細胞をウイルス粒子と接触させる工程と、前記細胞を、前記ウイルス粒子の増殖を助長する条件下で培養する工程を含み、前記細胞は、2, 6又は2, 3シアリルトランスフェラーゼをコードする核酸を過剰発現する。本発明は、また、インフルエンザ分離株内に存在するインフルエンザウイルス粒子などの一連のウイルス粒子を選択的に増殖させる方法を提供し、前記一連のウイルス粒子は、特異的な糖鎖残基を有する受容体に対する親和性を有し、前記方法は：細胞を、前記分離株とインキュベートする工程と；前記ウイルス粒子の増殖を助長する条件下で前記細胞を培養する工程と；前記細胞及び／又は前記培地からそのように生産されたウイルス粒子を回収する工程を含む。

10

## 【0010】

本発明は、さらに、新規ワクチン及びそのようなワクチンを製造する方法を提供し、好ましくは、前記方法は：生産したウイルス粒子を処理して、抗原部分を生成する工程と；インフルエンザウイルス由来の血球凝集素及び／又はノイラミニダーゼなどの少なくとも1種以上の抗原部分を回収する工程を含む。本発明は、さらに、ワクチン、例えばインフルエンザ感染症に対するワクチンを製造するために、糖鎖形成に關与する特定のタンパク質を過剰発現する細胞及び細胞系並びにそれらの使用方法を提供する。本発明の細胞は、好ましくはヒトのものであり、PER.C6細胞もしくはその誘導体などのアデノウイルスE1によって形質転換されている。

20

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0011】

本発明は、ウイルス粒子を生産し、かつ／又は増殖させる方法を提供し、前記方法は：ウイルス粒子による細胞の感染を助長する条件下で、培地内で前記細胞を前記ウイルス粒子と接触させる工程と；前記ウイルス粒子の増殖を助長する条件下で前記細胞を培養する工程を含み、前記細胞は、2, 6シアリルトランスフェラーゼ又は機能的にそれと等価なものをコードする核酸を過剰発現する。前記核酸は、ラット及びヒトなどの種々の供給源由来の2, 6シアリルトランスフェラーゼをコードしていてもよい。好ましくは、前記2, 6シアリルトランスフェラーゼは、ヒトの2, 6シアリルトランスフェラーゼである。本発明は、さらに、ウイルス粒子を生産し、かつ／又は増殖させる方法を提供し、前記方法は：ウイルス粒子による細胞の感染を助長する条件下で、培地内で前記細胞を前記ウイルス粒子と接触させる工程と；前記ウイルス粒子の増殖を助長する条件下で前記細胞を培養する工程を含み、前記細胞は、2, 3シアリルトランスフェラーゼ又は機能的にそれと等価なものをコードする核酸を過剰発現する。前記核酸は、ラット及びヒトなどの種々の供給源由来の2, 3シアリルトランスフェラーゼをコードしていてもよい。好ましくは、前記2, 3シアリルトランスフェラーゼは、ヒトの2, 3シアリルトランスフェラーゼである。本発明の1の実施態様において、前記ウイルス粒子は、インフルエンザウイルス粒子である。本発明の方法を用いて生産し、かつ／又は増殖させることができる他のウイルス粒子の例として、パラインフルエンザウイルス、アデノ関連ウイルス(Adeno-Associated Virus、AAV)又はポリオーマウイルスがあるが、これらに限定されない。2, 3及び2, 6シアリルトランスフェラーゼによって誘導される糖鎖形成構造を利用するどのウイルスも本発明の方法を用いて増殖させ、かつ／又は生産することができる。

30

40

## 【0012】

好ましい実施態様において、本発明は、インフルエンザウイルス粒子を増殖させる方法を提供し、前記インフルエンザウイルス粒子は、インフルエンザ分離株内に存在している。前記インフルエンザ分離株を、少なくとも1以上のインフルエンザに感染した対象哺乳類から得る方法がより好ましい。前記インフルエンザに感染した対象哺乳類はヒト又はブタである、インフルエンザウイルス粒子を増殖させる方法がさらに好ましい。別の実施態

50

様において、本発明は、インフルエンザウイルス粒子を生産し、かつ/又は増殖させる方法を提供し、前記インフルエンザ分離株を、少なくとも1以上のインフルエンザに感染したトリから得る。本明細書で用いる分離株とは、インフルエンザウイルスに感染した対象から得られたインフルエンザウイルスのバッチのことを言う。この対象は、ヒト、トリ、ブタ及びウマなどのインフルエンザウイルスに対して感受性があるすべての種であってもよい。ヒトを、種々の方法で、すなわち他のヒトから直接か、又はブタ及びトリなどの対象動物から直接、インフルエンザに感染させることができる。ワクチン製造に用いられる増殖したウイルスは、本来は、1又はそれ以上の対象(1又はそれ以上のヒト個体、或いは1又はそれ以上のトリ、ブタなど)に由来する。1997年のホンコンでの事例(上記参照)のように、インフルエンザウイルスがトリからヒトへ伝染することによって、ヒトに直接病気がもたらされる場合、トリ分離株に存在するインフルエンザウイルス粒子を生産し、かつ/又は増殖させることができることは、ワクチンを製造するのに直接有用である。本発明は、細胞表面タンパク質の糖鎖形成に参与し、オリゴ糖鎖のいわゆるSA<sub>2,3</sub>Gal結合及びSA<sub>2,6</sub>Gal結合を生成するシアリルトランスフェラーゼタンパク質を過剰発現させることによって、トリ、ブタ、ウマ及びヒトなどの種から得られる分離株に存在するインフルエンザウイルス粒子を生産し、かつ/又は増殖させる方法を提供する。本明細書で用いられる分離株は、好ましくは臨床分離株(すなわち、病気の患者から得られた分離株)を言う。そのような臨床分離株は、また初代分離株とも呼ばれている。初代分離株は、例えば、インフルエンザウイルスに感染しているヒト又は動物の鼻、粘液及び/又は糞便から直接得られるインフルエンザ分離株である。しかしながら、卵又は細胞又は他のシステムで増殖させた分離株でも、本発明の方法によってさらに生産し、かつ/又は増殖させることができる。従って、本発明を用いて生産し、かつ/又は増殖させるウイルス粒子は、継代培養したバッチ内に存在するものであってもよいが、好ましくは臨床分離株などの初代バッチに存在するものである。

10

20

**【0013】**

本発明の好ましい実施態様において、インフルエンザウイルス粒子の生産及び/又は増殖を、細胞を用いて培地内で行い、前記細胞は、アデノウイルス由来のE1で形質転換されている。前記細胞は、ヒト細胞であることがより好ましい。非常に好ましい態様において、本発明は、本発明によるインフルエンザウイルス粒子を増殖させる方法を提供し、前記ヒト細胞は、PER.C6又はその誘導体である。

30

**【0014】**

PER.C6細胞は、ロタウイルス及びインフルエンザウイルスなどの様々な種類のウイルスを増殖させるのに有用であると考えられている(国際公開第01/38362号参照)。PER.C6細胞は、胚網膜から得られた細胞を、アデノウイルス血清型5のE1領域で形質転換することによって最初に生成された。2,3及び2,6シアリルトランスフェラーゼタンパク質が両方ともPER.C6細胞に存在し、活性があることが発見されている(Pauら2001)。従って、2,3型のみならず2,6型のシアリ酸-ガラクトース結合(それぞれSA<sub>2,3</sub>Gal及びSA<sub>2,6</sub>Gal)と特異的に相互作用するウイルス粒子が、PER.C6細胞で増えることができた。これらのシアリルトランスフェラーゼタンパク質のうちいずれか1種を過剰発現させることによって、SA<sub>2,3</sub>Gal残基又はSA<sub>2,6</sub>Gal残基のいずれかを好む一連のインフルエンザウイルスが特異的に増殖するようになることは、本発明の重要な側面である。このことによって、最良の予防のために最も良い内容を有するワクチン製造用のウイルスバッチを生成することができるようになる。この内容は、異なってもよい。上記のように、ウイルスの蔓延のいくつかは主にヒト同士の接触を介して生じるが、その他の場合(1997年のホンコンの事例など)では、トリとヒトが直接接触することによって、ヒトにおいて劇的な効果が十分にもたらされた。このような役割を果たすインフルエンザウイルスの病原性及び種類により、分離株中のどの一連のウイルス粒子を増殖させ、それを用いて最終的なワクチンを製造すべきなのか選択することができる。

40

**【0015】**

本発明は、またインフルエンザウイルス粒子を生産し、かつ/又は増殖させる方法も提

50

供し、該方法において、シアリルトランスフェラーゼをコードする前記核酸は、前記細胞とは異種である。シアリルトランスフェラーゼをコードする前記核酸は、前記細胞のゲノムに組み込まれていることが好ましい。本明細書で用いる異種とは、核酸を操作していないものよりも、シアリルトランスフェラーゼをコードする遺伝子がタンパク質をより多く発現するように核酸を操作することを意味する。また、異種とは、核酸が、細胞が由来する種と異なる種に由来することも意味するが、前記核酸は、同じ種に由来するものでもよい。細胞が、その細胞に典型的なものよりも多いシアリルトランスフェラーゼを発現している場合、前記細胞は、シアリルトランスフェラーゼを過剰発現していると言われている。シアリルトランスフェラーゼを過剰発現する細胞は、前記細胞のゲノム操作によって、前記細胞のゲノムに存在する遺伝子が、操作される前に前記細胞が発現するものよりも多いタンパク質を発現するように、タンパク質を過剰発現してもよい。種々の、若しくはより活性のあるプロモーターの組み込みなどの外的な手段によって、タンパク質の発現を通常は制限しているサプレッサを除去するか、若しくは阻害することによって、又は化学的な手段によって過剰発現を誘導してもよい。また、過剰発現を選択してもよい。細胞を、少なくとも1以上のシアリルトランスフェラーゼを著しく過剰発現させるために選別した場合、それらを、本発明による方法に用いてもよい。従って、そのような細胞及びそのような細胞を使用することも、本発明の一部である。

10

**【0016】**

別の実施態様において、本発明は、ワクチンを製造する方法を提供し、前記方法は：本発明の方法に従って、ウイルス粒子を生産し、かつ/又は増殖させる工程と；そのように生産されたウイルス粒子を不活性化する工程を含む。さらに、ワクチンを製造する前記方法は：そのように生産された前記ウイルス粒子を処理して、抗原部分を生成する工程と；少なくとも1種以上の前記抗原部分を、好ましくは精製するか、かつ/又は濃縮する手段によって、前記抗原部分を少なくとも1種以上得る工程を含むことが好ましい。前記得られた抗原部分を少なくとも1種以上含む、精製し、かつ/又は濃縮した組成物は、前記処理したウイルス粒子の他の抗原部分を含まないことが好ましい。より好ましい実施態様において、本発明は、ワクチンを製造する方法を提供し、該方法において、前記抗原部分は、インフルエンザウイルス由来の、血球凝集素タンパク質若しくはその部分、及び/又はノイラミニダーゼタンパク質もしくはその部分を含む。ノイラミニダーゼ (neuraminidase, NA) 及び血球凝集素 (hemagglutinin, HA) タンパク質は、インフルエンザウイルス粒子の最も顕著な抗原部分であり、種々の増殖段階の最中に異なるものになる傾向がある。本発明は、本発明の方法に従って入手できるワクチンを提供する一方で、本発明に従って得られるワクチンを含む医薬組成物も提供する。

20

30

**【0017】**

上述したように、本発明の細胞は、糖タンパク質上に存在する特異的な糖鎖形成残基を認識する選別したインフルエンザウイルス粒子を得るために、インフルエンザウイルス粒子を含む初代臨床分離株を増殖させるのに非常に有用であり、一方で前記細胞は、また、既に胚を有する卵又は他のシステムで継代培養した分離株を増殖させるのに利用することもできる。従って、本発明は、また、2, 6シアリルトランスフェラーゼ又はその機能を有する部分を過剰発現する細胞系をウイルス粒子の増殖に使用する方法、及び2, 3シアリルトランスフェラーゼ又はその機能を有する部分を過剰発現する細胞系をウイルス粒子の増殖に使用する方法も提供する。前記ウイルス粒子は、インフルエンザウイルス粒子であるのが好ましい。前記インフルエンザウイルス粒子は、少なくとも1以上のインフルエンザに感染した対象哺乳類から得られたインフルエンザ分離株内に存在することがより好ましい。前記インフルエンザに感染した対象哺乳類がヒト又はブタである、本発明に従って前記細胞株を使用する方法がさらに好ましく、一方、前記インフルエンザウイルス粒子は、少なくとも1以上のインフルエンザに感染したトリから得られたインフルエンザ分離株内に存在することも好ましい。

40

**【0018】**

本発明は、さらに、分離株内に存在する一連の所定のウイルス粒子を選択的に生産し、

50

かつ/又は増殖させる方法を提供し、前記一連の所定のウイルス粒子は、受容体上に存在する特異的な糖鎖形成部分を好み、前記分離株は、前記一連の所定のウイルス粒子に加えて、前記好みを有さないウイルス粒子も含み、前記方法は：前記特異的な糖鎖形成部分を含む前記受容体を発現し、露出することが可能な細胞を、培地内で、前記一連の所定のウイルス粒子に存在する少なくとも1以上のウイルス粒子による前記細胞の感染を助長する条件下で、前記分離株とインキュベートする工程と；前記ウイルス粒子の増殖を助長する条件下で前記細胞を培養する工程と；前記細胞及び/又は前記培地から、そのように生産されたウイルス粒子を回収する工程を含む。本明細書で用いる糖鎖形成部分とは、感染するためにウイルス粒子によって認識される糖タンパク質上のオリゴ糖鎖に存在するいかなる種類の糖の種類、残基、結合及び/又は群のことを言う。前記糖鎖形成部分は、SA 2,6Gal 残基又はSA 2,3Gal 残基を含むことが好ましい。前記一連の所定のウイルス粒子が、一連の所定のインフルエンザウイルス粒子である方法がより好ましい。SA 2,6Gal 残基及びSA 2,3Gal 残基は、インフルエンザの場合、ウイルス粒子のHAタンパク質によって特異的に認識される。いずれか一つの残基との相互作用に何らかの特異性があるかどうかは、HAタンパク質次第である。概して、インフルエンザ分離株は、SA 2,6Gal 残基と特異的に相互作用するウイルスのみならず、SA 2,3Gal 残基と特異的に相互作用するウイルスも含む。本発明を用いて、臨床初代分離株由来及び/又は継代培養した分離株由来の一連のウイルスのいずれかを選択的に増殖させて、ヒトに有用なインフルエンザワクチンの製造に有用である増殖した一連のウイルスを得ることができる。ワクチンをヒトのために製造することができるという事実に加えて、本発明の方法及び手段を用いることで、獣医薬を製造するためにウイルスを選択的に増殖させて、例えばブタ又はウマの集団を介してインフルエンザウイルスが蔓延するのを防ぐことができる。前記インフルエンザ分離株を、少なくとも1以上のインフルエンザに感染したヒト、ブタ又はトリから得ることが好ましい。前記細胞は、ヒト細胞であって、アデノウイルス由来のE1で形質転換されていることも好ましい。PER.C6細胞又はその誘導体である細胞が、非常に好ましい。本明細書で用いる誘導体とは本来のPER.C6細胞の修飾された異形を言い、例えば、他の異種の核酸が導入されるか、ノックアウトされるか、又は他の方法で修飾されている。PER.C6誘導体の例として、アデノウイルスE2Aの温度感受性変異体を安定して発現するPER.C6細胞、又はE4などの他のアデノウイルスの核酸を発現するPER.C6細胞があるが、これらに限定されない。化学処理又はノックアウト技術などの他の手段によって、PER.C6細胞の特定の核酸のスイッチを入れたか、又は切った場合でも、これらの細胞は、依然としてPER.C6誘導体のままである。与えられた実施例には、エリスロポエチン(erythropoietin、EPO)タンパク質を過剰発現する細胞を使用することについて記載されているが、本発明の細胞においてEPOを過剰発現させることは本発明の一部ではないことに留意すべきである。

#### 【0019】

別の好ましい実施態様において、本発明は、分離株内に存在する一連のウイルス粒子を選択的に増殖させる方法を提供し、該方法において、前記細胞は、シアリルトランスフェラーゼをコードする、前記細胞と異種の核酸を含む。シアリルトランスフェラーゼをコードする前記核酸が前記細胞のゲノムに組み込まれている、本発明による方法がさらに好ましい。そのような組み込まれた核酸を、ハイグロマイシン耐性遺伝子及びネオマイシン耐性遺伝子などの選択マーカーを用いて安定して組み込むのが好ましい。

#### 【0020】

本発明は、また、2,6-シアリルトランスフェラーゼ又は2,3-シアリルトランスフェラーゼをコードする異種の核酸を含むヒト細胞も提供する。前記核酸は、前記ヒト細胞のゲノムに組み込まれていることが好ましい。本発明は、また、ウイルス粒子を選択的に増殖させるためにそのような細胞を使用する方法も提供し、該ウイルス粒子は、好ましくはインフルエンザウイルス粒子である。

#### 【0021】

本発明は、ヒトインフルエンザウイルスの初代分離株を増殖させる方法の最適化を可能にする。また、本発明は、細胞表面上の糖タンパク質に存在するSA 2,6Gal 又はSA 2,3Gal

10

20

30

40

50

al (又はその両方の)糖鎖形成部分を用いて、インフルエンザウイルスの初代分離株のみならず、実験用分離株を増殖させる方法の最適化を可能にする。一般に、ヒトインフルエンザウイルスは、SA 2,6Gal部分を認識するが、トリインフルエンザウイルスは、SA 2,3Gal部分を認識する。プタインフルエンザウイルスは、一般に両方の残基を利用する。本発明は、どのウイルスも増殖させる方法の最適化を可能にし、該ウイルスの複製は、2,3シアリルトランスフェラーゼ及び/又は2,6シアリルトランスフェラーゼ活性に、あるいはより一般的にはSA 2,3Gal残基又はSA 2,6Gal残基の存在に依存する。本発明の方法には、培地内で細胞を使用することが含まれる。そのような方法の例として、効率的なインフルエンザウイルスの複製及び生産を支援することが知られているヒト細胞を利用することがある。

10

#### 【0022】

本発明の細胞は、インフルエンザウイルスを増殖させるのに有用であるだけではない。アデノ関連ウイルス(Adeno-Associated Virus、AAV)、ヒトポリオマウイルス及びパラインフルエンザウイルスなどの他のウイルスが、感染のために、糖タンパク質中の2,3結合及び2,6結合を利用することは本技術分野において既知である(Liuら1998; Suzukiら2001; Waltersら2001)。従って、本発明は、また、標的細胞を認識し、かつ感染させるためにこれらの糖鎖形成構造を使用する他のウイルスを(選択的に)生産させ、かつ/又は増殖させる方法も提供する。さらに、本発明は、該当する場合、本発明の細胞を使用する方法、並びにインフルエンザ以外のウイルスを生産し、かつそのようなウイルスに対するワクチンを製造する方法及び手段を提供する。従って、本発明は、また、SA 2,3Gal残基及びSA 2,6Gal残基を、細胞の認識及び感染力に利用するウイルスに対するワクチンも提供する。

20

#### 【0023】

PER.C6(登録商標)細胞(ECACCに寄託、受託番号96022940)が、インフルエンザウイルスを増殖させるのに望ましい基質であり、PER.C6由来の生産レベルによって、ワクチンに適した力価が高い調整物がもたらされたことが既に示されている(国際公開第01/38362号)。本発明によって製造される新規細胞系を、“PER.C6-2,6ST”と名付け、該細胞系は、以下の工程によってPER.C6から得られ、該工程は：強いCMVプロモーターの制御下のヒト2,6シアリルトランスフェラーゼをコードする核酸を宿主プラスミドを、PER.C6細胞にトランスフェクションし、次に、プラスミドが安定して組み込まれた細胞を選択するというものである。PER.C6-2,6ST細胞は、本来のPER.C6細胞におけるSA 2,6Gal残基を持つ受容体の数と比較すると、SA 2,6Gal含有受容体が高発現していることを特徴とする。このことは、そのような部分を持つタンパク質が過剰発現していることを直接示すものではないが、SA 2,6Gal残基を持つタンパク質のパーセンテージが、PER.C6細胞の当該タンパク質のパーセンテージより高いことを示すものである。PER.C6細胞は、2,6シアリルトランスフェラーゼを過剰発現することなく、SA 2,3Gal残基とSA 2,6Gal残基の両方を細胞表面の糖タンパク質上に発現する能力が既にある。しかしながら、SA 2,3Gal残基を持つタンパク質のパーセンテージと比較して、SA 2,6Gal残基を持つタンパク質のパーセンテージを増加させることは、本発明の重要な側面である。細胞内の糖鎖形成機構において基質が直接競合するため、SA 2,3Galタイプの受容体は、2,6シアリルトランスフェラーゼタンパク質を過剰発現する細胞の表面上に不十分に表れることになる。これらを合わせた特徴によって、この新しい細胞系は、野生型の集団において淘汰圧を誘導することなく、初代インフルエンザウイルス分離株を増殖させるのに望ましい媒体となる。本発明の細胞でそのような分離株を増殖させると、ワクチンの製造に非常に有用である不変のHA特異性及び免疫原性を有する大量のウイルスのストックが効率良く製造される。PER.C6-2,6STで生産されたウイルスは、SA 2,3Gal受容体への順応から生じる変異(胚を有する卵の場合のように)を示さず、このウイルスの免疫原性の性質は、自然に循環するインフルエンザウイルスのものと最も類似する。結果として、PER.C6-2,6STで培養したインフルエンザウイルスから得られたワクチン調整物は、循環する野生型インフルエンザウイルスに対する防御反応を誘導するのに理想的に適している。ヒトインフルエンザウ

30

40

50

イルスが、SA 2,6Gal結合を認識する種類のものであることは、本技術分野において既知であり、従って、ヒトにおいてより防御する免疫反応を提供するために、これらのウイルス由来のタンパク質を含むワクチンを得ることが望ましいことは、本技術分野において認識されている (Newmanら 1993)。

#### 【0024】

ヒトインフルエンザウイルスを、胚を有するニワトリの卵によって増殖させる場合、SA 2,3Galに特異的に結合することができるウイルス変異株を選択し、SA 2,6Galを認識するウイルスを除く。PER.C6細胞は、その表面に、SA 2,6Gal含有受容体とSA 2,3Gal含有受容体の両方を有する。従って、SA 2,6Galを認識するウイルスを優先して増殖させるためには、上記のようにこの成分を宿主受容体を過剰発現させることが好ましい。反対の効果、すなわちヒト 2,3シアリルトランスフェラーゼの過剰発現を確定するために、本発明は、また、“PER.C6- 2,3ST”と名付けた別の新規な細胞系を生成する方法及び手段も提供する。上記のPER.C6- 2,6ST細胞と同様の方法で、強いCMVプロモーターの制御下のヒト 2,3シアリルトランスフェラーゼをコードする核酸を宿主プラスミドをトランスフェクションし、その後、安定して組み込まれているプラスミドを持つ細胞を選択することによって、PER.C6からこれらの細胞は得られる。PER.C6- 2,3ST細胞は、SA 2,3Gal含有受容体を高発現することを特徴とする。

#### 【0025】

2,6シアリルトランスフェラーゼ過剰発現細胞は、SA 2,6Gal残基を好んで認識するインフルエンザウイルスを増殖させるのに用いることができ、一方 2,3シアリルトランスフェラーゼ過剰発現細胞は、SA 2,3Gal残基を好んで認識するインフルエンザウイルスを増殖させるのに用いることができるので、2,6シアリルトランスフェラーゼ過剰発現細胞系と 2,3シアリルトランスフェラーゼ過剰発現細胞系の両方とも有用である。ウイルスの感染及び蔓延が、主に、ヒトとヒトとの間の接触によって生じ、SA 2,6Gal残基を経る感染経路にウイルスがより順応してきた場合、2,6シアリルトランスフェラーゼ過剰発現細胞系を利用することが好ましい。他方で、SA 2,3Gal残基を宿主糖タンパク質を有さないトリからヒトへ感染力が直接生じる場合 (1997年のホンコンでの小規模だが、深刻な流行の場合のように)、2,3シアリルトランスフェラーゼを過剰発現する細胞を利用することが好ましい。

#### 【0026】

本明細書で使用する、2,6シアリルトランスフェラーゼ又は 2,3シアリルトランスフェラーゼという用語は、それぞれのトランスフェラーゼを言い、また、前記トランスフェラーゼと等価なものも言い、前記トランスフェラーゼと等価なものは、等価なトランスフェラーゼと本質的に同じであるが、必ずしも量は同じではないトランスフェラーゼ活性を有する。当業者であれば、適切な等価物を生成することができる。前記トランスフェラーゼの一部は、本質的に同じであるが、必ずしも量は同じではないトランスフェラーゼ活性を有する場合、適切な等価物である。他の適切な等価物は、等価なトランスフェラーゼと本質的に同じであるが、必ずしも量は同じではないトランスフェラーゼ活性を有する、2,6シアリルトランスフェラーゼ又は 2,3シアリルトランスフェラーゼの誘導体及び/又は類似物質である。そのような誘導体を、保存されたアミノ酸の置換又は別の方法によって生成してもよい。誘導体は、また、それぞれのトランスフェラーゼの一部から作成することもできる。

#### 【0027】

本明細書で使用するインフルエンザウイルス粒子は、インフルエンザウイルス又はインフルエンザウイルス様粒子である。インフルエンザウイルス粒子と等価なものは、インフルエンザウイルス粒子と本質的に同じであるが、必ずしも量は同じではない感染力の性質を有するウイルス(様)粒子である。そのような等価物を、例えば、組み換え方法によって生成することができる。そのような等価物は、インフルエンザウイルス内に通常は存在しない分子を含んでもよい。

#### 【実施例1】

## 【 0 0 2 8 】

( p 2,6ST2000/Hygroの構築。 )

2, 6シリアルトランスフェラーゼをコードしている配列を含む断片を、プラスミド pGST-Gal ( アムステルダム自由大学のI. van Die博士からご恵与いただいた ; 前記プラスミドは、ラット 2, 6シリアルトランスフェラーゼをコードする全cDNA配列 ( GenBank アクセション番号M18769 ) を含むpBR322のバックボーンから構成される ) をEcoRIで消化することによって得た。前記断片を、標準手順に従って、T4 DNAポリメラーゼによって平滑末端にした。ゲルで精製した後、2, 6シリアルトランスフェラーゼをコードする断片を、pcDNA2000/Hygro ( 国際公開第00/63403号に記載されているプラスミドpcDNA2000/Hyg (-) とも呼ばれている ) にライゲーションし、標準実験法に従って、PmeIで直線化し、脱リン酸化し、ゲルで精製した。生じたプラスミドを、p 2,6ST2000/Hygroと名付けた ( 図 1 ) 。

10

## 【 実施例 2 】

## 【 0 0 2 9 】

( PER.C6-EPOにおけるp 2,6ST2000/Hygroのトランスフェクション及び過剰発現クローンの選択。 )

最初に、PER.C6-EPOを、他の目的のために、すなわちエリスロポエチン ( erythropoietin, EPO ) の糖鎖形成に重点を置いた実験のために精製した。EPOは、赤血球生産の促進に関与するタンパク質であり、その活性は、生体内での機能性についてそのシアル酸の含量に依存するところが大きい。PER.C6-EPO細胞系は、PER.C6の誘導體であり、ヒトEPOタンパク質を過剰発現させる ( 細胞について、国際公開第00/63403号に記載されている ) 。この細胞系がEPOを生産するという事実は、本発明において重要であるとは考えられない。PER.C6-EPO細胞を培養し、該細胞を、以下に記載したとおりにp 2,6ST2000/Hygroでトランスフェクションした。

20

## 【 0 0 3 0 】

組織培養シャーレ ( 直径10cm ) に、シャーレ 1 枚当たり約200万 - 300万個のPER.C6細胞を播き、37 °C、10%CO<sub>2</sub>で一晩保持した。次の日に、リポフェクトアミン ( Gibco ) を用いて、メーカーのプロトコールに従って、細胞にトランスフェクションした。当業者に既知である標準プロトコールに全て従って20枚のシャーレに、それぞれ2 µgのp 2,6ST2000/Hygroでトランスフェクションした。別の6枚のシャーレは、ハイグロマイシンによる死滅及びトランスフェクション効率のネガティブコントロールとなる。次の日に、ハイグロマイシンを、FBSを含むDMEM培地に溶解して50 µg/mlの濃度でシャーレに添加した。細胞を、3 - 4週間にわたってインキュベートし、該細胞を、ハイグロマイシンを追加した新鮮な培地で定期的に洗浄した。細胞を、死んでいるかどうか毎日観測し、ハイグロマイシン選択マーカーを宿すプラスミドを与えられていないネガティブコントロールと比較した。エリスロポエチン過剰発現細胞系及び抗体過剰発現細胞系について国際公開第00/63403号に概ね記載されているとおりに大きく成長したコロニーを採取し、継代培養した。続いて、約25個の選択された抗生物質耐性コロニーを、24ウェル、6ウェルのプレート及びT25フラスコ内で、ハイグロマイシンなしで培養し、細胞が、T75組織培養フラスコ内で成長した際に、各々のクローンを少なくとも1個以上のバイアル分凍結させ、予備用に保存した。続いて、前記クローンを、2, 6 ST活性があるかどうか、FACSort装置 ( Becton Dickinson ) によるFACS分析によって、Govorkovaら ( 1999 ) に記載されている方法を用いて試験した。このために、SA 2,6Gal特異的Sambucus nigra凝集素 ( DIG Glycan differentiation kit, Roche ) を、供給業者のプロトコールに従って使用した。これらのクローンを、2ヶ月のタイム・スパンで継代培養し、その間、FACS分析実験を定期的に行って、細胞表面上の2, 6シリアルトランスフェラーゼの発現を観測した。SA 2,6Galの発現の上昇は安定していた。最も良い2, 6シリアルトランスフェラーゼ発現クローンは、細胞表面上のSA 2,6Galの密度が最も高いと評価されたものであり、クローン25-3.10であった。このクローンを、“PER.C6 - 2,6 ST” と名付けた。選択過程の終了時のPER.C6 - 2,6 STにおけるFACS分析の結果を、図 4 A に示す。p 2,6ST2000/Hygroの安定したトランス

30

40

50

スフェクションによって、母系のPER.C6細胞系と比較して、細胞表面上のSA<sub>2,6Gal</sub>残基の濃度が顕著に上昇することは明らかである。興味深いことに、<sub>2,6</sub>シアリルトランスフェラーゼを過剰発現させると、<sub>2,3Gal</sub>特異的Maackia amurensis凝集素を用いてFACSによって検出されるSA<sub>2,3Gal</sub>残基の量が少なくなるようである(図4B)。この効果は、<sub>2,6</sub>シアリルトランスフェラーゼが、内生の<sub>2,3</sub>シアリルトランスフェラーゼと同じ糖タンパク質基質に対して競合することによるものである可能性が最も高い。

#### 【実施例3】

##### 【0031】

(<sub>2,6</sub>-及び<sub>2,3</sub>シアリルトランスフェラーゼのcDNA発現ベクターの生成。)  
 ヒト<sub>2,6</sub>シアリルトランスフェラーゼの完全長cDNA(GeneBankアクセッション番号:14735135)を含むPCR断片を、当業者に既知である方法を用いたヒトcDNAライブラリーによるポリメラーゼ連鎖反応(Polymerase Chain Reaction、PCR)によって得た。増幅に使用したプライマー(センス:5'-TTT TTT GGA TCC ATG ATT CAC ACC AAC CTG AAG AAA AAG-3'、アンチセンス:5'-TTT TTT CTT AAG TTA GCA GTG AAT GGT CCG GAA GC-3')は、センス・プライマーではBamHI、アンチセンス・プライマーではAflIIIによる消化をそれぞれ可能にする5'末端部をさらに含む。PCR産物を、アガロースゲル電気泳動によって精製し、BamHI及びAflIIIで消化し、続いてpcDNA2000/Hygro(国際公開第00/63403号には、pcDNA2000/Hyg(-)と記載されている)及びpcDNA2000/Neo(このベクターは、基本的にはpcDNA2000/Hyg(-)と同様に、pcDNA2000/DHFRから構築され、その詳細については、国際公開第00/63403号に記載されている)にクローニングした。このために、pcDNA2000/Hygro及びpcDNA2000/NeoもBamHI及びAflIII制限酵素で消化した。配列と正確にクローニングされていることを、分子生物学分野の当業者に既知である標準手順に従って、二重鎖配列を決定することによってチェックした。生じたプラスミドを、p<sub>2,6STcDNA2000/Hygro</sub>(図2A)及びp<sub>2,6STcDNA2000/Neo</sub>(図2B)と名付けた。それらは、拡張したCMVプロモーター(国際公開第00/63403号参照)の制御下のヒト<sub>2,6</sub>シアリルトランスフェラーゼをコードする核酸を含む。さらに、前記プラスミドはそれぞれ、プラスミドがそのゲノムに安定した状態で組み込まれているクローンを選択するのに用いるネオマイシン及びハイグロマイシンに対する耐性を与える。

##### 【0032】

ヒト<sub>2,3</sub>シアリルトランスフェラーゼのcDNA(GeneBankアクセッション番号L23767)を、上記のヒト<sub>2,6</sub>シアリルトランスフェラーゼ遺伝子について記載したようにして得、クローニングした。PCR反応に使用したプライマーは:センスは、5'-TTT TTT GGA TCC ATG TGT CCT GCA GGC TGG AAG CTC-3'、アンチセンスは、5'-TTT TTT CTT AAG TCA GAA GGA CGT GAG GTT CTT GAT AG-3'である。生じたプラスミドを、p<sub>2,3STcDNA2000/Hygro</sub>(図3A)及びp<sub>2,3STcDNA2000/Neo</sub>(図3B)と名付けた。

#### 【実施例4】

##### 【0033】

(ヒト<sub>2,6</sub>-又はヒト<sub>2,3</sub>シアリルトランスフェラーゼを過剰発現する安定したPER.C6細胞の生成。)

40枚の組織培養シャーレ(直径10cm)に、シャーレ1枚当たり約200万-300万個のPER.C6細胞系の細胞を播き、37℃、10%CO<sub>2</sub>で一晩中保持した。次の日、メーカーのプロトコールと当業者に既知の標準培養手順に従って、リポフェクトアミン(Gibco)で細胞にトランスフェクションした。20枚のシャーレを、それぞれ5µgのp<sub>2,6STcDNA2000/Neo</sub>でトランスフェクションした。トランスフェクションしていない細胞を有する別の20枚のシャーレは、ネオマイシンによる死滅及びトランスフェクション効率用のネガティブコントロールとなる。次の日、ネオマイシン(0.5mg/ml)を、FBSを含む培地に溶解して、適切なシャーレに添加した。細胞を、4-5週間にわたってインキュベートし、選択剤を追加した新鮮な培地で細胞を定期的に洗浄した。毎日、細胞が死んでいるかどうか観測し、ネオマイシン及びハイグロマイシン選択マーカを宿すプラスミドを与えられていないネガティブコントロールと比較した。エリスロポエチン過剰発現細胞系及び抗体過剰発現細胞系につ

いて国際公開第00/63403号に概ね記載されているとおりに大きく成長したクローンを採取し、継代培養した。

【0034】

続いて、各細胞系から、約50個の選択されたネオマイシン耐性コロニーを、96ウェル、24ウェル、6ウェルのプレート及びT25フラスコでネオマイシンを用いて培養した。細胞が、T25組織培養フラスコ内で成長した際に、各々のクローンを少なくとも1個以上のバイアル分凍結させ、予備用に保存した。続いて、各クローンを、組換えヒト 2, 6 シアリルトランスフェラーゼを生産しているかどうか、上記及びGovorkovaら(1999)に記載されているSA 2,6Gal特異的Sambucus nigra凝集素を用いて、FACS分析によって試験した。発現、培養行為及び生存度を基にして、優れた生産を行うクローンを下記のようにして選択する。長期生存度についてチェックできるようにするために、回転ボトル及びバイオリクター内で長期間懸濁培養し、最も良く機能するクローンのバイアルをより多く凍結させ、さらなる研究のために選択した。これらのクローンを、2ヶ月のタイム・スパンで継代培養した。この2ヶ月の間に、FACS分析実験を定期的に行って、細胞表面上の 2, 6 シアリルトランスフェラーゼの発現を観測した。最も良い安定した生産株を選択し、細胞バンキングに用いた。このクローンを増やして、PER.C6-H- 2,6 STと名付けた細胞系を生成した。

10

【0035】

ヒト 2, 3 シアリルトランスフェラーゼタンパク質を過剰発現する細胞系を上記のヒト 2, 6 シアリルトランスフェラーゼを過剰発現するPER.C6細胞について記載したのと概ね同様に生成した。この場合、プラスミドp 2,3STcDNA2000/Neoを用いた。生じた細胞株を、PER.C6-H- 2,3 STを名付けた。

20

【実施例5】

【0036】

(PER.C6細胞及び 2, 6 シアリルトランスフェラーゼ過剰発現PER.C6細胞における初代及び順応したインフルエンザウイルス分離株を用いた細胞培養及び感染。)

実験を行って、PER.C6細胞の感染に対する感受性をPER.C6- 2,6STのものと比較した。PER.C6及びPER.C6- 2,6STの懸濁培養物を、4mMのL-グルタミン(Gibco)を追加した血清のないExCell 525培地(JRH Biosciences)にて、37、10%CO<sub>2</sub>で、490cm<sup>2</sup>の組織培養回転ボトル内で、1rpmで連続回転させながら培養した。以下に記載されている手順を、報告した全てのインフルエンザ感染に適用した。感染の日に、細胞を、6ウェルのプレートに、1×10<sup>6</sup>個の細胞/mlの密度で、2mg/mlのPen/Strep(Gibco)、200ng/mlのファンギゾン(Gibco)及び3µg/mlのトリプシン-EDTA(Gibco)を含む最終容積が2mlの血清のない培地に播いた。初代分離株のウイルス接種材料及びPER.C6順応バッチ(初代分離株に由来し、PER.C6細胞上で1継代、継代培養した)で細胞を感染させた。使用した初代分離株は、A/Netherlands/002/01(H1N1、A/New Caledoniaと類似、ロッテルダム大学のA. Osterhaus博士・教授からご恵与いただいた)。バッチを両方とも、100倍(容積/容積)希釈して使用した。感染した細胞を、35、10%CO<sub>2</sub>で、静置培養で6日間保持した。ウイルス上清を実験を通じて回収し、続いて清浄にした。室温で、5000rpmで5分間微量遠心して細胞をペレットにすることによって、清浄を行った。細胞のペレットを、以下に記載されている直接免疫蛍光アッセイによって分析した。上清を、新しいエッペンドルフ・チューブに移し、液体窒素で急速に凍結させ、プラーク・アッセイ(下記参照)に使用するまで、-80 で保存した。

30

40

【実施例6】

【0037】

(免疫蛍光試験。)

インフルエンザウイルスの感染を検出するために、直接免疫蛍光(immunofluorescence、I.F.)アッセイを、IMAGEN(登録商標)インフルエンザウイルスA及びBキット(Dako)を用いて、供給業者が提供するプロトコルに従って、感染した細胞(上記参照)で行った。以下に簡潔に記載する。感染した細胞を5分間遠心した。上清を除去し、ペレット

50

をPBSに再懸濁した。これを二回繰り返して、細胞を完全に洗浄した。洗浄した細胞のペレットをPBSに再懸濁し、20  $\mu$ lの細胞懸濁液を、I.F.スライドの2個のウェルにそれぞれ添加した。これを、室温で乾燥させた。20  $\mu$ lのアセトン各ウェルに添加することで細胞を固定し、風乾した。各ウェルに、20  $\mu$ lの適切なIMAGENインフルエンザ試薬（すなわち、標識抗体特異的インフルエンザA又はB）を添加した。次に、スライドを、37  $^{\circ}$ Cで15分間、湿らせたティッシュペーパー上でインキュベートした。過剰な試薬を、PBSで洗い流し、次にPBSで5分間すすいだ。スライドを室温で風乾した。IMAGEN封入液を各ウェルに一滴添加し、カバーガラスをスライドの上に置いた（これを、少量のマニキュア液で所定の位置に固定した）。サンプルを、落射蛍光照射を用いて顕微鏡で観察した。感染した細胞は、明るい淡黄緑色の蛍光を特徴とする。ネガティブ（赤）細胞と比較して、ポジティブ（蛍光緑）を示す細胞のおよそのパーセンテージを記録した。結果を、図5に示す。PER.C6 - 2,6STが、臨床分離株（白色棒）の複製を有効に支援することは明らかである。

#### 【実施例7】

##### 【0038】

（ブランク・アッセイ。）

PER.C6及びPER.C6 - 2,6STにおけるウイルスの生産を、ウイルスの上清を接種したMDCK (Madin Darbin Canine Kidney) 細胞におけるブランクの形成を記録することによって調べた。MDCK細胞は、そのようなブランク・アッセイ実験に特に有用である。実施例5に記載した方法に従って、PER.C6とPER.C6 - 2,6STの両方で増殖させた初代及びPER.C6継代インフルエンザウイルスの10倍希釈したウイルスの上清合計1mlを、95%コンフルエンスとなるまで、6ウェルのプレートで、2mMのL - グルタミンを追加したDMEM内で培養したMDCK細胞に接種した。1時間後、37  $^{\circ}$ Cで、細胞をPBSで2回洗浄し、3mlのアガロース混合物（2.5%アガロース 1.2ml、2xMEM 1.5ml、200mM L - グルタミン 30  $\mu$ l、トリプシン - EDTA 24  $\mu$ l、PBS 250  $\mu$ l）を用いて過負荷をかけた。次に、湿度が高い状態で、10%CO<sub>2</sub>雰囲気下、37  $^{\circ}$ Cで、約3日間、細胞をインキュベートし、ウイルスのブランクを視覚によって記録し、計数した。結果を図6に示す。インフルエンザウイルスの臨床分離株（白色棒）及びPER.C6継代ウイルス（灰色棒）は、PER.C6 - 2,6ST細胞に非常に効果的に感染することができたが（右パネル）、PER.C6細胞（左パネル）は、初代臨床分離株による感染に対する感受性があまりなかった。このことは、2,6シリアルトランスフェラーゼを過剰発現する細胞は、初代ウイルス分離株を増殖させるのに特に有用であることを示し、これらの細胞が、迅速かつ安全な方法で、例えばインフルエンザ感染症に対するワクチンを製造するのに非常に有用であることを示している。

#### 【実施例8】

##### 【0039】

（FACSにおけるPER.C6細胞を用いたインフルエンザウイルス粒子の滴定。）

新規なFACSによる方法を使用して、上清中のインフルエンザウイルスの力価を測定した。前記方法は、ウイルス複製の最初のラウンド内に生産的に感染している細胞画分を検出することによって、複製能力のあるビリオンを定量することを伴う。0.01から1の間のPER.C6の懸濁培養物及び感染部分を用いて、数時間以内に非常に正確な値を得ることができる。MDCK細胞を用いたブランク・アッセイによる同様の滴定は、現在のところ、本技術分野で多く用いられているインフルエンザウイルス滴定用の標準的なアッセイであって、該滴定は、はるかに長期に渡り（一般的に大体2週間）、労力を要し、特に再現性が低い。以下に、使用した材料及び方法の専門的な説明をする。ここでは、FACSを用いる上清中のインフルエンザウイルス粒子の滴定のために懸濁細胞を用いることができることを示す。

##### 【0040】

血清のないAEM培地（Gibco）懸濁液内で培養したPER.C6細胞を、24ウェルのプレートに蒔いた（ウェル当たり $1 \times 10^6$ 個の細胞/mlの細胞を1ml）。トリプシン - EDTA（Gibco）を、最終濃度が3  $\mu$ g/mlとなるように添加した。インフルエンザウイルスA型の上清（X-127、A/Beijing/262/95のリアソータント及びX-31（国立生物学的製剤研究所から得た））を細胞に感染させた。200  $\mu$ lのウイルス上清を、未希釈のウイルス・ストックを初めとし

10

20

30

40

50

て3倍段階希釈で細胞に添加した。偽の感染細胞であるコントロールが用いられている。ウイルス添加後、細胞を、35℃で5時間保持した。

【0041】

感染細胞のサンプルを(各350μl)1.5mlのエッペンドルフ・チューブに取った。冷却したPBSを1mlまで添加し、チューブを、エッペンドルフ・ベンチ・遠心機(ependorf bench centrifuge)にて、5000rpmで5分間遠心した。上清を捨て、細胞を、100μlの冷却したCytoperm/Cytofix 透過処理溶液(permeabilizing solution)(Pharmingen)に穏やかに再懸濁した。4℃で20分経った後、冷却したPBS(900μl)を添加し、上記のように再び細胞をペレットにした。ペレット状の細胞を、5μlのFITC標識インフルエンザA核タンパク質特異的抗体(Imagen Kit、Dako)を含む350μlの冷却した染色培地(PBS、1%BSA、0.1%ナトリウムアジド)に再懸濁した。細胞を、4℃で、15分から30分間インキュベートし、続いて1mlの冷却したPBSで1回洗浄し、1mlの1×Cellfix固定溶液(Becton Dickinson)で1回洗浄した。次に、細胞をFACSで分析するか、又は後のFACS分析のために、4℃、暗黒下で1週間までの間保存した。

【0042】

染色した細胞を、FACSort装置(Becton Dickinson)で分析した。インフルエンザ/FITCポジティブ細胞は、FL1チャンネルで検出され、右上の象限に現れた(図7)。図の下部には、非感染細胞と感染後5時間における細胞でのFACS分析の結果がプロットされている。グラフの右上の象限は、FITCポジティブ/感染細胞を、左上の象限は、FITCネガティブ/非感染細胞を示している。

【0043】

次に、X軸の、感染細胞を感染させるのに用いた上清の希釈度に対して、該感染細胞を、パーセンテージとしてY軸にプロットした(図8)。50%の感染細胞に相当する値は、上清のTCID<sub>50</sub>を示す。1,000,000個の細胞をこの初期感染に用いたことを考えると、6倍希釈した上清200μlには、500,000個の感染性粒子が含まれ、これは $1.5 \times 10^7$ 個の感染性粒子/mlの力価に相当するものであることが導き出される。同じ上清を、当業者に既知である標準手順によって、MDCK細胞を用いる標準のブランク・アッセイで定量したとき、 $1.7 \times 10^7$ の値が得られ、偏差は±50%であった。

【0044】

種々の量のPER.C6と共に、種々の容積及び希釈度のウイルス上清を用いて、前記アッセイの感受性を変化させることができることは当業者に自明である。同様に、適切な抗体を染色に用いた場合でも、X-127以外のインフルエンザウイルスの力価を測定することができる。

【0045】

(参考文献)

Baum LG and Paulson JC (1990) Sialyloligosaccharides of the respiratory epithelium in the selection of human influenza virus receptor specificity. *Acta Histochem Suppl* 40: 35-8.

Claas EC, Osterhaus AD, van Beek R, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA, Krauss S, Shortridge KF and Webster RG (1998) Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 351: 472-427.

Couceiro JN, Paulson JC and Baum LG (1993) Influenza virus strains selectively recognize sialyl-oligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res* 29: 155-165.

Daniels PS, Jeffries S, Yates P, Schild GC, Rogers GN, Paulson JC, Wharton SA, Douglas AR, Skehel JJ and Wiley DC (1987) The receptor-binding and membrane-fus

10

20

30

40

50

ion properties of influenza virus variants selected using anti-haemagglutinin monoclonal antibodies. *Embo J* 6: 1459-1465.

Gambaryan AS, Robertson JS and Matrosovich MN (1999) Effects of egg-adaptation on the receptor-binding properties of human influenza A and B viruses. *Virology* 258: 232-239.

Gambaryan AS, Tuzikov AB, Piskarev VE, Yamnikova SS, Lvov DK, Robertson JS, Bovin NV and Matrosovich MN (1997) Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-sialyl(N-acetyl)lactosamine). *Virology* 232: 345-350. 10

Gibbs MJ, Armstrong JS and Gibbs AJ (2001) Recombination in the hemagglutinin gene of the 1918 "Spanish flu". *Science* 293: 1842-1845.

Govorkova EA, Matrosovich MN, Tuzikov AB et al. (1999) Selection of receptor-binding variants of human influenza A and B viruses in baby hamster kidney cells. *Virology* 262: 31- 38. 20

Hatta M, Gao P, Halfmann P and Kawaoka Y (2001) Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293:1840-1842.

Ilobi CP, Henfrey R, Robertson JS, Mumford JA, Erasmus BJ and Wood JM (1994) Antigenic and molecular characterization of host cell-mediated variants of equine H3N8 influenza viruses. *J Gen Virol* 75: 669-673.

Ito T, Suzuki Y, Takada A, Kawamoto A, Otsuki K, Masuda H, Yamada M, Suzuki T, Kida H and Kawaoka Y (1997) Differences in sialic acid-galactose linkages in the chicken egg amnion and allantois influence human influenza virus receptor specificity and variant selection. *J Virol* 71: 3357- 3362. 30

Liu CK, Wei G, Atwood WJ (1998) Infection of glial cells by the human polyomavirus JC is mediated by an N-linked glycoprotein containing terminal (2-6)-linked sialic acids. *J Virol* 72: 4643-4639.

Newman RW, Jennings R, Major DL, Robertson JS, Jenkins R, Potter CW, Burnett I, Jewes L, Anders M, Jackson D and et al. (1993) Immune response of human volunteers and animals to vaccination with egg-grown influenza A (H1N1) virus is influenced by three amino acid substitutions in the haemagglutinin molecule. *Vaccine* 11: 400-406. 40

Pau MG, Ophorst C, Koldijk MH, Schouten G, Mehtali M and Uytdehaag F (2001) The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. *Vaccine* 19: 2716-2721.

Potter WP (1998). Chronicle of influenza pandemics. In *Textbook of influenza*, NKG, RG Webster and AJ Hay, eds. (Oxford) pp. 3-18.

Robertson JS, Cook P, Nicolson C, Newman R and Wood JM (1994) Mixed population s in influenza virus vaccine strains. *Vaccine* 12: 1317-1322.

Rogers GN, Daniels RS, Skehel JJ, Wiley DC, Wang XF, Higa HH and Paulson JC (1985) Host-mediated selection of influenza virus receptor variants. Sialic acid-2,6 Gal-specific clones of A/duck/Ukraine/1/63 revert to sialic acid-2,3 Gal-specific wild type in ovo. *J Biol Chem* 260: 7362-7367.

Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, Perdue M, Swayne D, Bender C, Huang J, Hemphill M, Rowe T, Shaw M, Xu X, Fukuda K and Cox N (1998) Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 279: 393-396. 10

Suzuki Y (1994) Gangliosides as influenza virus receptors. Variation of influenza viruses and their recognition of the receptor sialo-sugar chains. *Prog Lipid Res* 33: 429-457.

Suzuki Y, Kato H, Naeve CW and Webster RG (1989) Single amino-acid substitution in an antigenic site of influenza virus hemagglutinin can alter the specificity of binding to cell membrane-associated gangliosides. *J Virol* 63: 4298-4302. 20

Suzuki T, Portner A, Scroggs RA, Uchikawa M, Koyama N, Matsuo K, Suzuki Y and Takimoto T (2001) Receptor specificities of human respiroviruses. *J Virol* 75: 4604-4613.

Walters RW, Yi SM, Keshavjee S, Brown KE, Welsh MJ, Chiorini JA and Zabner J (2001) Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer. *J Biol Chem* 276: 20610-20616.

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】図1は、p 2,6ST2000/Hygroの略図である。

【図2】図2は、(A) p 2,6STcDNA2000/Neo及び(B) p 2,6STcDNA2000/Hygroの略図である。

【図3】図3は、(A) p 2,3STcDNA2000/Neo及び(B) p 2,3STcDNA2000/Hygroの略図である。

【図4】図4は、PER.C6及びPER.C6/ 2,6STにおける(A) SA 2,6Gal及び(B) SA 2,3GalのFACS分析による検出結果を示す図である。

【図5】図5は、PER.C6及びPER.C6/ 2,6ST上の初代臨床インフルエンザ分離株及び卵-継代インフルエンザバッチ(同じ初代分離株由来)の増殖を蛍光で測定し、感染力を、HA免疫蛍光染色においてポジティブの細胞のパーセンテージで表した結果を示す図である。 40

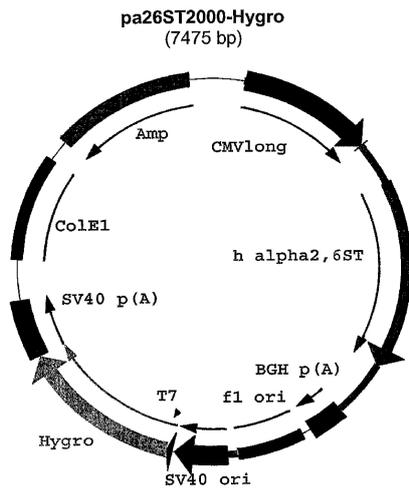
【図6】図6は、PER.C6及びPER.C6/ 2,6ST上の初代臨床インフルエンザ分離株及び卵-継代インフルエンザバッチ(同じ初代分離株由来)の増殖を、プラーク・アッセイで測定し、感染力を、1ml当たりのプラーク形成ユニット(plaque-forming units、pfu's)で表した結果を示す図である。

【図7】図7は、最初に細胞をウイルス粒子に感染させ、次に細胞を抗血清とインキュベートし、続いて、全ての細胞集団において感染細胞を分離し、かつ計数することができるFACS分析に使用するというインフルエンザ滴定アッセイの略図である。

【図8】図8は、希釈係数に対する感染細胞画分(%)のプロットを示す図である。

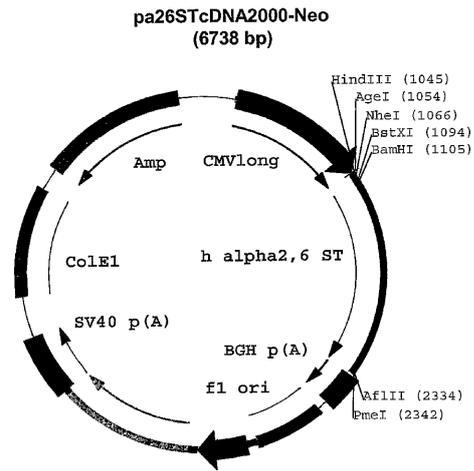
【 図 1 】

Figure 1



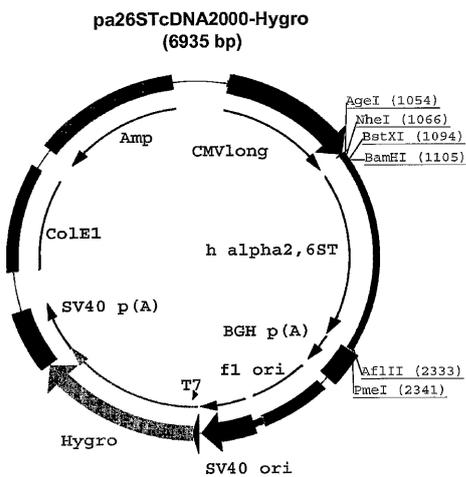
【 図 2 A 】

Figure 2A



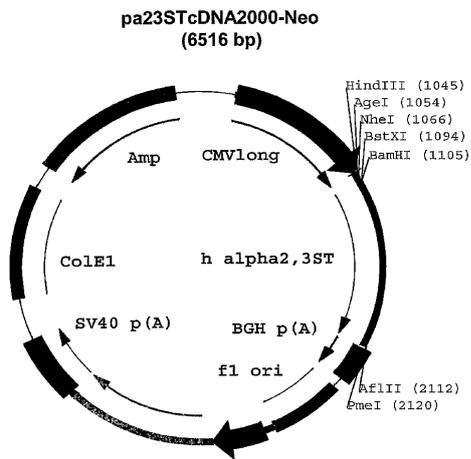
【 図 2 B 】

Figure 2B



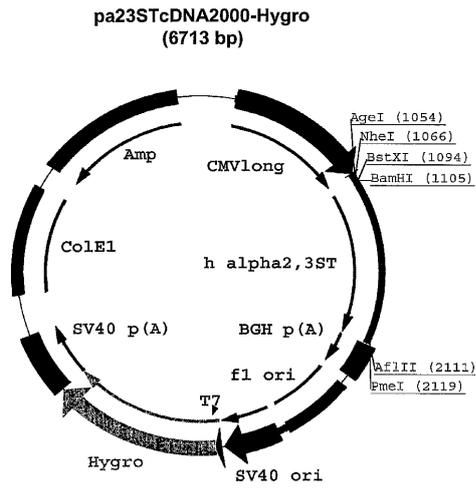
【 図 3 A 】

Figure 3A



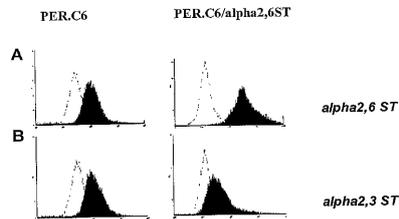
【 図 3 B 】

Figure 3B



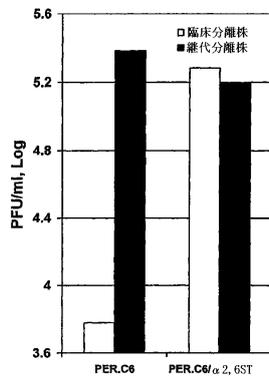
【 図 4 】

Figure 4



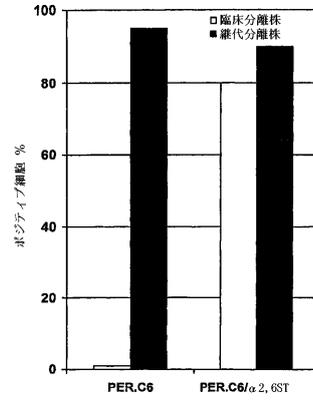
【 図 6 】

Figure 6.



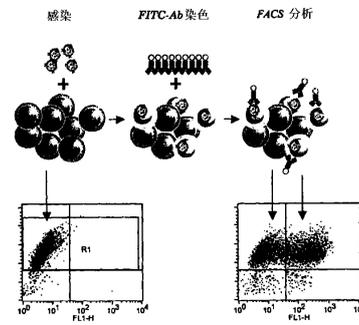
【 図 5 】

Figure 5

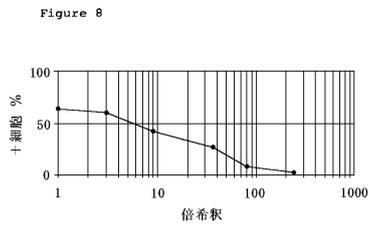


【 図 7 】

Figure 7



【 図 8 】



【 配列表 】

0004480398000001.app

## フロントページの続き

- (74)代理人 100119530  
弁理士 富田 和幸
- (72)発明者 ジュゼッペ マルツィオ  
オランダ国 1 0 1 9 エスエル アムステルダム クラトントゥイン 1 1
- (72)発明者 マリア グラツィア パウ  
オランダ国 2 3 3 3 セーウェー ライデン バルゲラーン 8 0
- (72)発明者 デイルク ヤン エルベルトゥス オプステルテン  
オランダ国 2 3 4 1 ペーカー オエグストゲースト ロベリウスラーン 9 4
- (72)発明者 アルフォンサス ヘラルドゥス コルネリス マリア ウィトデハーグ  
オランダ国 3 4 5 2 エーハー ヴリュテン ヘネラルベレンラーン 2 0

審査官 高堀 栄二

- (56)参考文献 国際公開第 0 0 / 6 3 4 0 3 ( W O , A 1 )  
Progress in Lipid Research, 1994, Vol.33, No.4, p.429-457  
Vaccine, 2001, Vol.19, No.17-19, p.2716-2721  
Virus Research, 1985, Vol.3, p.165-179

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
C12N 15/00-15/90  
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)