

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4759201号  
(P4759201)

(45) 発行日 平成23年8月31日(2011.8.31)

(24) 登録日 平成23年6月10日(2011.6.10)

(51) Int. Cl.		F I
C 1 2 N 7/00	(2006.01)	C 1 2 N 7/00
A 6 1 K 39/275	(2006.01)	A 6 1 K 39/275
A 6 1 K 39/39	(2006.01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
C 1 2 N 7/02	(2006.01)	C 1 2 N 7/02

請求項の数 29 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-567304 (P2001-567304)  
 (86) (22) 出願日 平成13年3月10日(2001.3.10)  
 (65) 公表番号 特表2003-526362 (P2003-526362A)  
 (43) 公表日 平成15年9月9日(2003.9.9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2001/002703  
 (87) 国際公開番号 W02001/068820  
 (87) 国際公開日 平成13年9月20日(2001.9.20)  
 審査請求日 平成19年11月12日(2007.11.12)  
 (31) 優先権主張番号 PA 2000 00410  
 (32) 優先日 平成12年3月14日(2000.3.14)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク(DK)  
 微生物の受託番号 ECACC 01021411  
 微生物の受託番号 ECACC 99101431  
 微生物の受託番号 ECACC 94012707

(73) 特許権者 502240076  
 バヴァリアン・ノルディック・アクティー  
 ゼルスカブ  
 デンマーク国, 3490クヴィストゴード  
 , ベーゲスコフヴェイ, 9  
 (74) 代理人 230104019  
 弁護士 大野 聖二  
 (74) 代理人 100106840  
 弁理士 森田 耕司  
 (74) 代理人 100105991  
 弁理士 田中 玲子  
 (74) 代理人 100119183  
 弁理士 松任谷 優子  
 (74) 代理人 100114465  
 弁理士 北野 健

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変異ワクシニアウイルスアンカラ (MVA) の改変株

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

連続細胞系の細胞で増殖するように適応した変異ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)であって、前記細胞系がベロ細胞系である変異ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)。

【請求項2】

ベロ細胞系の細胞で増殖するように適応した変異ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)であって、以下の段階：

- a) ベロ細胞系の細胞を野生型MVAに感染させること、
- b) 前記細胞系の感染細胞によって産生されたウイルス粒子を収集すること、
- c) 前記Vero細胞系の新しい細胞を新たに産生されたウイルスに感染させ、前記細胞から産生されたウイルスを収集すること、

を含み、段階c)がウイルス力価の産生量/投入量比が1より大きくなるまで繰り返される方法によって得ることができる、変異ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)。

【請求項3】

前記細胞系がベロ細胞系ATCC番号CCL-81である請求項1または2に記載のMVA。

【請求項4】

European Collection of Cell Cultures (ECC) (英国ソールズベリー) に受託番号99101431として寄託されたMVA、および/またはベロ細胞において、寄託された株の増殖速度と本質的に同じ速度で増殖する

ように適応されているが、寄託された株と比較してそのゲノムに少なくとも1つの相違を持っている変異MVAである、請求項1～3のいずれか一項に記載のMVA。

【請求項5】

European Collection of Cell Cultures (ECCC) (英国ソールズベリー) に受託番号01021411として寄託されたMVA、および/またはベロ細胞において、寄託された株の増殖速度と本質的に同じ速度で増殖するように適応されているが、寄託された株と比較してそのゲノムに少なくとも1つの相違を持っている変異MVAである、請求項1～3のいずれか一項に記載のMVA。

【請求項6】

少なくとも1つの異種核酸配列を含む上記請求項1～5のいずれか一項に記載のMVA。 10

【請求項7】

異種核酸配列が治療用タンパク質および/または抗原決定基をコードする、請求項6に記載のMVA。

【請求項8】

上記請求項1～7のいずれか一項に記載のMVAウイルスに感染した宿主細胞。

【請求項9】

上記請求項1～7のいずれか一項に記載のMVAおよび/または前記MVAのDNAを含む組成物。

【請求項10】

ワクチンである請求項9に記載の組成物。 20

【請求項11】

ヒトを含む動物の生体を免疫処置するための請求項10に記載の組成物。

【請求項12】

オルトボックス感染に対する免疫処置用の請求項10または11に記載の組成物。

【請求項13】

ネコをネコ痘感染に対して、マウスをエクトロメリア感染に対して、および/またはラクダをラクダ痘感染に対して免疫処置するための請求項10～12のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項14】

MVAが非特異的免疫系の活性化剤、抑制剤および/または安定剤である請求項9に記載の組成物。 30

【請求項15】

上記請求項1～7のいずれか一項に記載のMVAおよび/または前記MVAのDNAをアジュバントとして含む組成物。

【請求項16】

遺伝子治療において使用するための、請求項6または7に記載の組換えMVAおよび/または前記組換えMVAのDNAを含む組成物。

【請求項17】

標的細胞に同種および/または異種核酸配列を導入するための、請求項6または7に記載の組換えMVAおよび/または前記組換えMVAのDNAを含む組成物。 40

【請求項18】

標的細胞に同種および/または異種核酸配列を導入する方法であって、標的細胞を請求項6または7に記載のMVAおよび/または前記MVAのDNAにインビトロまたはエクスピボで感染させることを含む方法。

【請求項19】

上記請求項1～7のいずれか一項に記載のMVA株を取得する方法であって、

a) ベロ細胞系の細胞を野生型MVAに感染させること、

b) ウイルスを収集すること、

c) 前記ベロ細胞系の新しい細胞を新たに産生されたウイルスに感染させ、前記細胞から産生されたウイルスを収集すること、 50

を含み、段階 c ) がウイルス力価の産生量 / 投入量比が 1 より大きくなるまで繰り返される方法。

【請求項 20】

野生型 M V A が E C A C C に受託番号 V 9 4 0 1 2 7 0 7 として寄託された M V A である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

上記請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の M V A のウイルス粒子を製造する方法であって、

- a ) M V A が複製する細胞系の細胞を適切な条件で培養すること、
  - b ) 前記細胞系を前記 M V A に感染させること、および
  - c ) 前記細胞によって産生されたウイルス粒子を収集すること、
- を含む方法。

10

【請求項 22】

核酸分子、ペプチドおよび / またはポリペプチドを製造する方法であって、

- a ) 宿主細胞を請求項 6 または 7 に記載の組換え M V A に感染させること、および
  - b ) 感染した宿主細胞を適切な条件で培養すること
- を含む方法。

【請求項 23】

上記請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の M V A に反応する疾患または障害を処置または予防するための医薬組成物の製造のための、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の M V A または前記 M V A の D N A の使用。

20

【請求項 24】

ヒトを含む動物の生体を免疫処置するためのワクチンの製造のための、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の M V A または前記 M V A の D N A の使用。

【請求項 25】

非特異的免疫系の活性化剤、抑制剤および / または安定剤の製造のための、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の M V A または前記 M V A の D N A の使用。

【請求項 26】

アジュバントの製造のための、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の M V A または前記 M V A の D N A の使用。

30

【請求項 27】

非ヒト動物のための、ワクチンとしての請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の M V A または前記 M V A の D N A の使用。

【請求項 28】

非ヒト動物のための、アジュバントとしての請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の M V A または前記 M V A の D N A の使用。

【請求項 29】

非ヒト動物のための、免疫系の活性化剤、抑制剤および / または安定剤としての請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の M V A または前記 M V A の D N A の使用。

【発明の詳細な説明】

40

【0001】

本発明は、ほとんどの哺乳動物（特にヒト）で著しく低下した毒力を示すが、それでもなおワクチンなどの治療薬の製造用として承認された連続細胞系の細胞で増殖する、変異ワクシニアウイルスアンカラ (Modified Vaccinia virus Ankara : M V A ) の新しい株に関する。また本発明は前記適応 M V A 株を製造する方法に関する。本 M V A は、例えば非経口免疫処置にベクター系として、または活性型もしくは不活性型でアジュバントとして、または免疫系の非特異的成分の調節剤として使用することができる。

【0002】

(発明の背景)

50

生物は細菌、ウイルス、真菌または寄生虫などの感染因子による攻撃を常に受けている。免疫系は、これらの感染因子およびそれらが産生する毒性分子を破壊し排除することによって、その生物がこれらの因子によって持続感染するのを阻止している。免疫系は特異的部分と非特異的部分とに分割することができるが、両者は密接にクロスリンクしている。非特異的免疫応答は多種多様な異物および感染因子に対する即時的防御を可能にする。これに対して、特異免疫応答は、生物がある物質による攻撃を初めて受けた場合は、誘導期間を経てから生成する。しかし特異的免疫応答の効率は極めてよい。特異的免疫応答は、特定の感染から回復した個体はその特定の感染からは保護されるが、他の感染性疾患には依然として罹りやすいという事実の原因となっている。一般に、同じ感染因子または極めて似た感染因子による2回目の感染では症状ははるかに軽いか、または症状が全く現れない。免疫は長期間持続し、一生持続する場合もある。この免疫記憶は、無害な型または不活性型の感染因子で生物を攻撃して特異的免疫を誘導するという予防接種に利用されている。特異的免疫応答を強化するためにワクチンにはアジュバントが組み込まれることもある。

10

#### 【0003】

感染性疾患と免疫に関する知見の多くは痘瘡の研究によってもたらされた。この疾患はオルトボックスウイルス属の一種である痘瘡ウイルスによって引き起される。2世紀近く前に牛痘の予防的接種が開始され、痘瘡に対する免疫処置が行われるようになった。後に免疫処置はワクシニアウイルスで行われた。1950年代初頭には、工業国の多くが、ワクシニアウイルスによる予防接種を使って痘瘡を局地的に根絶した。しかし、このワクシニアウイルスによる痘瘡予防接種は、時として、種痘後脳炎、全身性痘疱または接触感染などの重篤な合併症を引き起した。

20

#### 【0004】

これらの合併症を示さない新しいワクチンがAnton Mayrによって開発された。このボックスワクチンはボックスウイルスの一種、変異ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)からなり、痘瘡に対する非経口予防接種に約150,000例で使用されたが、この予防接種に関係する合併症は何も起こらなかった。免疫不全を持つ小児でさえ重篤な副作用は示さなかった。MVAは、元のワクシニアウイルスアンカラの突然変異および選択により、ニワトリ胚線維芽細胞培養物における575代の継代培養後に得られた。このMVAの安全性はその生物学的、化学的および物理的特徴に表われている。MVAは分子量が小さく、ゲノム中に6つの欠失を持ち、哺乳類細胞に対して著しく弱毒化されている。すなわちDNAおよびタンパク質は合成されるが、ウイルス粒子は事実上産生されない。Anton Mayrが開発した変異ワクシニアウイルスアンカラはEuropean Collection of Cell Cultures (ECCACC) (英国ソールズベリー)に受託番号V94012707として寄託された。

30

#### 【0005】

痘瘡に対する予防接種は大成功を収めた。1979年に国際保健機関は痘瘡の根絶を宣言した。したがって小児の集団予防接種は中止され、予防接種は一部の国の軍人および研究所で働く人々だけに行われている。

#### 【0006】

痘瘡の根絶により、ヒトにおけるボックス感染の主要因はなくなった。しかし一部の非ヒトボックスウイルスは宿主特異性を低下させている。すなわち、一部の非ヒトボックスウイルスは定型宿主(例えば牛痘の場合はウシ)だけでなく、他の動物(例えばラットおよびネコ)でも感染を引き起す。ヒトも同様にこの経路で感染する可能性がある。人口の一部はもはや痘瘡に対する免疫を持たないので、そのような人々にとって動物種のオルトボックス感染は危険でありうる。家畜はヒトにとって主要な感染源である。したがってオルトボックスウイルスに対する家畜の予防接種は重要性を増しつつある。またMVAは遺伝子治療用のベクターとしても、すなわち核酸配列を標的細胞に導入してそこで発現させるためにも重要だろう。

40

#### 【0007】

50

MVAの対数的再生産には、初代または二次ニワトリ胚線維芽細胞の細胞培養物が必要である。これらの細胞は10～12日間インキュベートした鶏卵から得られる。卵には生物学的多様性があるので、細胞培養系のために得た細胞は細胞レベルでも多様である。また、ニワトリ胚「線維芽細胞培養物」には上皮細胞などの他の細胞タイプが認められる場合も多い。この細胞の多様性はニワトリ胚線維芽細胞で産生されるウイルスの多様性にもつながる。したがって、細胞培養系を規格化し、検証することにより、製造されたMVAが常に高品質であることを保証することは困難である。さらに、インキュベートする卵中に既に存在している微生物またはウイルスによる細胞培養系の汚染を完全に排除することはできない。MVAをウイルス汚染細胞で増殖させると、MVAは汚染ウイルスと組換えを起こすかもしれない。そのために新しい予測不可能な特徴を持つMVAが生成するかもしれない。初代または二次ニワトリ胚線維芽細胞は、懸濁培養でのウイルスの大量製造にもあまり適していない。また、MVAを密度勾配超遠心法によって精製および濃縮すれば有利であろう。しかし、MVAを初代または二次ニワトリ胚線維芽細胞で培養した場合、そのような精製は困難である。最後に、鶏卵アルブミンに対してアレルギーを起こしたことがある患者の数は増えつつある。インビトロ培養条件はアレルゲン性を著しく低下させるが、アレルギー反応の危険を完全に排除することはできない。

10

## 【0008】

要するにMVAは、初代または二次ニワトリ胚線維芽細胞でしか効率よく増殖させることができず、そのことにより多くの不都合が生じるが、その一方で、MVAをヒトに安全に応用できることは、ワクチンとしてのMVAの大規模な応用によって証明されているのである。

20

## 【0009】

(発明の目的)

本発明の目的は均質なMVAウイルス粒子の製造条件を提供することである。また前記条件はMVAの簡単かつ大規模な製造が可能なものでなければならない。

## 【0010】

(発明の詳細な説明)

上記の目的および他の目的を達成するために、本発明は、治療薬の製造用として承認された連続細胞系の細胞で増殖するように適応させたMVA株を提供する。

## 【0011】

本発明によれば、MVAの効率のよい大規模製造が初めて可能になる。連続細胞系の細胞は均質であり、その特徴は安定しているので、これらの細胞系から収集されるMVAも均質であり、その特徴は大いに予測可能である。さらに、微生物による汚染の危険を管理することができ、MVAをニワトリ胚線維芽細胞で培養した場合に見られるような鶏卵タンパク質によるMVA製剤の汚染も排除することができる。永久細胞系の取り扱いが便利なので、工業用途には極めて適している。

30

## 【0012】

本発明の好ましい実施形態では、MVAを、ワクチン製造用として承認された哺乳類細胞系の細胞で増殖するように適応させる。驚いたことに、ベロ細胞系などの哺乳類細胞系に適応したMVAは、ヒトでも、広範囲にわたる他の哺乳動物でも、依然として低下した毒力を示す。したがって本MVAは著しく弱毒化されている。すなわち、DNAおよびタンパク質は合成されるが、ウイルス粒子は事実上産生されないため、病原性は事実上排除されている。したがって本発明のMVAはヒト用および広範囲にわたる哺乳動物用のワクチンとして極めて好適である。したがって本MVAは獣医学分野にとりわけ適している。

40

## 【0013】

さらに、本発明のMVA株を取得する方法も提供する。本発明のこの実施形態では、治療物質の製造用として承認された細胞系の細胞を野生型MVAに感染させる。この感染には高い感染多重度(MOI)、すなわち1細胞につき多数のウイルスを使用する。次にウイルスを収集し、同じ細胞系の新しい細胞を新たに産生されたウイルスに感染させる。この工程をMVAが前記細胞系に適応するまで繰り返す(連続継代培養する)。感染後72時

50

間で適応は達成され、ウイルス力価は投入したウイルス力価と比較して少なくとも1~9倍、好ましくは10~99倍、より好ましくは100~10<sup>6</sup>倍、最も好ましくは10<sup>7</sup>~10<sup>10</sup>倍上昇する。適応は限られた継代数で達成される。

【0014】

「増殖するように適応」とは、感染によって産生されるウイルスの量（産生量）が、細胞を感染させるために最初に使用したウイルスの量（投入量）よりも増加することを意味する。この場合、産生量/投入量比は1より大きい。

【0015】

E C A C C（英国ソールズベリー）に受託番号99101431および/または仮受託番号01021411として寄託されたMVAの「誘導株」とは、ペロ細胞において、寄託された株の増殖速度と本質的に同じ速度で増殖するように適応しているが、寄託された株と比較してそのゲノムに少なくとも1つの相違を持っているMVAを意味する。

10

【0016】

「免疫系」という用語は基本的に、異物および微生物に対する生物の防御に関与する複合体を表す。免疫系は、いくつかの細胞タイプ（例えばリンパ球および白血球由来の他の細胞）からなる細胞性部分と、ペプチドおよびタンパク質（例えば抗体、補体因子およびサイトカイン類）からなる体液性部分とに分割される。

【0017】

「免疫応答」という用語は、異物または微生物が生物に侵入したときの免疫系の反応を表す。一般に免疫応答は特異的反応と非特異的反応とに分割されるが、両者は密接にクロスリンクしている。非特異的免疫応答は多種多様な異物および感染因子に対する即時的防御であると考えられる。特異免疫応答は、ある異物に対する生物の極めて効率のよい防御機構であって、前記異物に対して誘導期間後に生じ、前記異物に著しく特異的な防御機構であるとみなすことができる。特異的免疫応答は、特定の感染から回復した個体がある後はその特定の感染から保護されるという現象の原因になっている。

20

【0018】

「免疫系の活性化剤」とは、免疫応答を誘発または強化することができる任意の物質を意味する。

【0019】

「免疫系の抑制剤」とは、免疫応答を軽減または阻害することができる任意の物質を意味する。

30

【0020】

「免疫系の安定剤」とは、免疫応答を一定のレベルに保つことができる任意の物質を意味する。

【0021】

本発明者らは、ペロ細胞系と呼ばれるアフリカミドリザル細胞系（ATCC番号CCL-81）に適応した2つの好ましいMVA株を提供する。ペロ細胞で100代継代培養したMVA株を「Vero-MVA」と名付け、European Collection of Cell Cultures（英国ソールズベリー）に受託番号99101431として寄託した。ペロ細胞で200代継代培養した後のMVA株を「Vero-MVA-200」と名付け、E C A C Cに仮受託番号01021411として寄託した。

40

【0022】

上述のようにして得たMVAは、承認された細胞系の細胞を適切な条件で培養し、細胞を当該MVAに感染させ、その細胞によって産生されたウイルス粒子を収集することによって、さらに増幅される。したがって本MVAは効率よく、しかも容易に、大量増幅することができる。驚いたことに、本発明のMVAはペロ細胞以外の細胞、例えばHL、HEP-2またはヒーラを含むヒト細胞系では、毒力の増加を示さない。

【0023】

本発明のもう一つの実施形態では、MVAが、少なくとも1つの異種核酸配列、すなわちMVAゲノム中に本来見いだされない核酸配列を含有する（組換えMVA）。この異種核

50

酸配列は好ましくは遺伝子であり、より好ましくは免疫タンパク質をコードする遺伝子、最も好ましくはマラリア、狂犬病および/または肝炎に対する免疫を与えるタンパク質をコードする遺伝子である。前記異種核酸配列の発現は、好ましくはワクシニアウイルスプロモーターの転写制御下であり、より好ましくはMVA自身のプロモーターの転写制御下にある。本発明のさらに好ましい実施形態では、異種核酸配列を、MVAゲノムの天然の欠失部位( P C T / E P 9 6 / 0 2 9 2 6 に開示されている)に挿入する。

【0024】

組換えMVAは、標的細胞にとって同種または異種である核酸配列を標的細胞に導入するために使用される。標的細胞への異種核酸配列の導入は、当該核酸配列によってコードされる異種の核酸、ペプチドおよび/またはポリペプチドおよび/またはタンパク質をインビトロで製造するために使用することができる。この方法には、宿主細胞を組換えMVAに感染させること、感染した宿主細胞を適当な条件で培養すること、そして所望により、前記宿主細胞によって産生されたペプチドおよび/またはタンパク質を単離および/または濃縮することが含まれる。

10

【0025】

さらに、同種配列または異種配列の導入はインビトロ遺伝子治療に応用することができ、また好ましくはインビボ遺伝子治療にも応用することができる。インビトロおよびエキスピボ遺伝子治療の場合は、それぞれ、処置しようとする個体から細胞を単離し、その細胞を組換えMVAで形質転換し、その細胞を採取した個体に再導入する。インビボ遺伝子治療の場合は、人体を含む動物の生体に組換えMVAを直接投与する。本発明の好ましい一実施形態では、組換えMVAが抗原または抗原エピトープを発現させる。前記ベクターは、最も好ましくは、熱帯熱マラリア原虫( *Plasmodium falciparum* )、ミコプラズマ、ヘルペスウイルス、インフルエンザウイルス、肝炎またはヒト免疫不全ウイルスの抗原決定基を発現させる。

20

【0026】

本発明のMVAは、驚くべきことに、依然として著しく弱毒化されているので、本MVAはヒトを含む広範囲にわたる哺乳動物を免疫処置するのに理想的である。したがって本発明は、ボックス感染(好ましくはオルトボックス感染)に対してヒトを含む動物の生体を免疫処置するためのMVAを含むワクチンも提供する。このワクチンはMVAの他に1または複数の添加物(抗生物質、保存剤または安定剤など)を含んでもよい。本ワクチンは特に獣医学分野で、例えばオルトボックス感染に対して動物を免疫処置するために(例えばネコをネコ痘に対して、マウスをエクトロメリアに対して、またはラクダをラクダ痘に対して免疫処置するために)利用することができる。免疫処置は好ましくは非経口的に行われる。

30

【0027】

ワクチン中の抗原決定基の免疫効果は、いわゆるアジュバントの添加によって強化されることが多い。アジュバントは免疫系を非特異的に同時刺激することにより、ワクチンの抗原決定基に対して、より強い特異的免疫反応を引き起す。本発明のもう一つの実施形態では、ワクチンの抗原決定基に対する免疫応答を同時刺激するために、MVAをアジュバントとして使用する。この場合は、MVAを不活化することが好ましい。MVAの不活化は、例えば熱または化学物質によって行うことができる。好ましくは、MVAを $\beta$ -プロピオラクトンによって不活化する。本発明のこの実施形態によれば、不活化したMVAを、数多くの感染性疾患に対するワクチンに、その疾患に対する免疫を増大させる目的で添加することができる。

40

【0028】

感染症の場合、個体の免疫系、神経系、ホルモン系および脈管系は密接に連携して働く。これらの相互作用は非特異的免疫系の要素、例えばインターフェロンおよびインターロイキンなどのサイトカインによって調節することができる。ボックスウイルスは免疫系の調節に影響を及ぼすことができる( *Swiss Vet* 11/99, 13-17)。したがって本発明のさらなる実施形態では、非特異的(先天性)免疫系の細胞性および体液性

50

要素を調節するために、MVA（好ましくは不活化MVA）を、ヒトを含む哺乳動物に使用する。好ましくは、MVAを生体調節剤として使用して、免疫系の機能不全を排除し、身体自身の防御機構を活性化、安定化および/または抑制する。最も好ましくは、ウイルス感染（例えばヘルペスウイルス、B型またはC型肝炎ウイルスによる感染）に備えて、または慢性炎症性疾患に備えて、そして/または腫瘍治療を補助するために、MVAを生体調節剤として使用する。またMVAは、例えばストレス時または新生児に見られるように感染に対する感受性が高くなっている状況で、免疫系を安定化するためにも使用することができる。活性型MVAおよび/または好ましくは不活化MVAは、全身適用（例えば筋肉内適用）および/または局所適用（例えば経粘膜および/または経皮適用）することができる。

10

## 【0029】

要するに、本発明は、一般に野生型MVAと同じ用途に使用できるが、ニワトリ胚線維芽細胞で野生型MVAを増幅した場合に起こる問題を生じないMVAを提供する。

## 【0030】

（発明の概要）

本発明は、とりわけ以下のものを、単独で、または組合わせて含む。

## 【0031】

治療物質の製造用として承認された連続細胞系の細胞で増殖するように適応した変異ワクシニアウイルスアンカラ（MVA）。

## 【0032】

哺乳類細胞系の細胞で増殖するように適応した上記MVA。

20

## 【0033】

細胞系がワクチン製造用として承認された細胞系である上記MVA。

## 【0034】

前記承認された細胞系がベロ細胞系である上記MVA。

## 【0035】

前記承認された細胞系がベロ細胞系ATCC番号CCL-81である上記MVA。

## 【0036】

European Collection of Cell Cultures（英国ソールズベリー）に受託番号99101431として寄託された上記MVAおよび/またはその誘導株。

30

## 【0037】

ECACC（英国ソールズベリー）に仮受託番号01021411として寄託された上記MVAおよび/またはその誘導株。

## 【0038】

少なくとも1つの異種核酸配列を含む上記MVA。

## 【0039】

例えば治療用タンパク質および/または抗原決定基（マラリア、肝炎および/または狂犬病感染に対する免疫を与えるペプチドなど）をコードする異種核酸配列を含む上記MVA。

40

## 【0040】

上記MVAに感染した宿主細胞。

## 【0041】

上記MVAおよび/または上記MVAのDNAを含む組成物、好ましくは医薬組成物。

## 【0042】

ワクチンである上記医薬組成物。

## 【0043】

ヒトを含む動物の生体を免疫処置するための上記ワクチン。

## 【0044】

オルトポックス感染に対する免疫処置用の上記ワクチン。

50



## 【 0 0 4 5 】

ネコをネコ痘感染に対して、マウスをエクトロメリア感染に対して、および/またはラクダをラクダ痘感染に対して免疫処置するための上記ワクチン。

## 【 0 0 4 6 】

M V A が非特異的免疫系の活性化剤、抑制剤および/または安定剤である上記医薬組成物。

## 【 0 0 4 7 】

上記 M V A および/または上記 M V A の D N A をアジュバントとして含む医薬組成物。

## 【 0 0 4 8 】

上記組換え M V A および/または上記組換え M V A の D N A を含む医薬組成物。

10

## 【 0 0 4 9 】

遺伝子治療用の上記医薬組成物。

## 【 0 0 5 0 】

標的細胞に同種および/または異種核酸配列を導入する方法であって、標的細胞を上記 M V A に感染させることを含む方法。

## 【 0 0 5 1 】

上記 M V A 株を取得する方法であって、 a ) 承認された細胞系の細胞を野生型 M V A ( 好ましくは E C A C C に受託番号 V 9 4 0 1 2 7 0 7 として寄託された M V A ) に感染させること、 b ) ウイルスを収集すること、 c ) 同じ細胞系の新しい細胞を新たに産生されたウイルスに感染させること、および所望により、 d ) ウイルスが前記細胞系の細胞での増殖に適應するまで b ) および c ) を繰り返すことを含む方法。

20

## 【 0 0 5 2 】

上記 M V A のウイルス粒子を製造する方法であって、承認された細胞系の細胞を適切な条件で培養すること、前記細胞系を前記 M V A に感染させること、および前記細胞によって産生されたウイルス粒子を収集することを含む方法。

## 【 0 0 5 3 】

E C A C C に受託番号 9 9 1 0 1 4 3 1 として寄託された M V A および/または E C A C C に仮受託番号 0 1 0 2 1 4 1 1 として寄託された M V A またはそれらウイルス株の誘導株に前記細胞系を感染させる上記方法。

## 【 0 0 5 4 】

核酸配列、ペプチド、ポリペプチドおよび/またはタンパク質を製造する方法であって、宿主細胞を上記組換え M V A に感染させること、感染した宿主細胞を適切な条件で培養すること、および所望により、前記宿主細胞によって産生された核酸配列、ペプチドおよび/またはタンパク質を単離および/または濃縮することを含む方法。

30

## 【 0 0 5 5 】

前記 M V A に反応する疾患または障害を処置または予防するための医薬組成物の製造を目的とする上記 M V A の使用。

## 【 0 0 5 6 】

ヒトを含む動物の生体を免疫処置するためのワクチンの製造を目的とする上記 M V A の使用。

40

## 【 0 0 5 7 】

非特異的免疫系の活性化剤、抑制剤および/または安定剤の製造を目的とする上記 M V A の使用。

## 【 0 0 5 8 】

アジュバントの製造を目的とする上記の使用。

## 【 0 0 5 9 】

ワクチンとしての上記 M V A の使用。

## 【 0 0 6 0 】

アジュバントとしての上記 M V A の使用。

## 【 0 0 6 1 】

50

非特異的免疫系の活性化剤、抑制剤および/または安定剤としての上記MVAの使用。

【0062】

ヒトを含む動物の生体を免疫処置する方法であって、当該免疫処置を必要とする個体に、治療有効量の上記医薬組成物を投与することを含む方法。

【0063】

標的細胞に同種および/または異種核酸配列を導入する方法であって、標的細胞を上記MVAおよび/または上記MVAのDNAに感染させることを含む方法。

【0064】

ヒトを含む動物の生体の免疫系を活性化、抑制および/または安定化する方法であって、ヒトを含む動物の生体に上記医薬組成物を投与することを含む方法。

10

【0065】

ワクチン中の抗原決定基に対する特異的免疫応答を強化する方法であって、ヒトを含む動物の生体に上記MVAをアジュバントとして投与することを含む方法。

【0066】

連続細胞系の細胞で増殖するように適応した変異ワクシニアウイルスアンカラであって、以下の段階：治療物質の製造用として承認された細胞系の細胞を感染させること、前記細胞系によって産生されたウイルス粒子を収集すること、および所望により、前記MVAが前記細胞内で所望の増殖特性を持つようになるまで上記の工程を繰り返すことを含む方法によって得ることができるもの。

【0067】

20

(実施例)

以下の実施例により本発明をさらに詳しく説明する。本発明によって提供される技術の利用可能性を以下の実施例に限定するような解釈を決してしてはならないことは、当業者には十分理解されるだろう。

【0068】

実施例：ペロ細胞へのMVAの適応および前記MVA株の特徴づけ

1. ペロ細胞へのMVAの適応

Anton Mayrによって開発された野生型MVA、すなわち変異ワクシニアウイルスアンカラは、EACCに受託番号V94012707として寄託されている。このウイルスをペロ細胞で連続継代培養することにより、野生型MVAをペロ細胞で増殖するように適応させた(表1)。樹立ペロ細胞系の細胞クローンATCC番号CCL-81(WHOシードストックEACC番号88020401)を継代数148~165で使用した(WHOシードロット、マスターおよび分譲バンク)。EarleのMEM(ICN)(pH7.4~7.6)および5%代替血清BMS(Biochrom)からなる培地で細胞を増殖させた。当業者に知られている技術に従って、細胞を1:2~1:4に分割することにより、常に同じ分譲バンクの細胞を播種した。培地は1mlあたり約250,000個の細胞を含んだ。細胞を培養管(2ml)、Roux培養皿(100ml)およびプラスチック製培養皿(それぞれ6および40ml)でそれぞれ増殖させた。一般に細胞は16~24時間後にコンフルエントな単層を形成した。その後、添加剤を含まない純粋なEarleのMEMに、培地を置き換えた。

30

40

【0069】

野生型MVAの適応には培養管培養系を使用した。継代培養の結果を表1および表2に要約する。ペロ細胞を10MOI(感染多重度)の野生型MVA(すなわちペロ細胞1個につき平均して10個のウイルス粒子)に感染させた。最初に使用した野生型MVAは、ニワトリ胚線維芽細胞で575代にわたって継代培養した後の遺伝子的に均質なブランク精製MVAである(ウイルス力価:  $10^{7.75}$  KID<sub>50</sub>/ml)。24時間後に、コンフルエントな単層のペロ細胞の90%が毒性過程によって破壊された(毒性により50%、溶解により40%)。産生されたウイルスを含む培地と細胞片とを細胞の凍結融解後に収集し、この混合物のうち0.2mlを培養管中のペロ細胞の単層に播種した(第2継代)。この処置を200回繰り返した。第3継代後には、もはや毒性効果は認められなかったが、

50

感染後 ( p . i n f . ) 4 ~ 6 日の期間に細胞の円形化および溶解を特徴とする弱い細胞変性効果 ( C P E ) が見られた。ウイルス力価は  $10^{1.0} \text{KID}_{50} / \text{ml}$  だった。極めて効率は低いもののペロ細胞における M V A の増殖が始まったと結論した。第 5 継代後に、典型的 C P E が観察され、それは感染後 4 ~ 5 日で完了した。ウイルス力価は第 3 継代後の  $10^{1.0} \text{KID}_{50} / \text{ml}$  から第 5 継代後の  $10^{4.0} \text{KID}_{50} / \text{ml}$  まで増加した。したがってウイルスはペロ細胞でより効率よく増幅した。継代数 5 ~ 11 では、完全な C P E が認められる時期が早くなり、ウイルス力価は継代培養毎に増加した。継代数 11 で、 $10^{7.5} \text{KID}_{50} / \text{ml}$  のプラトーに達した。したがって 11 代の継代培養後に、ペロ細胞への M V A の適応は達成された。さらに 30 代の継代培養を行ったところ、結果はどの継代培養でも同じであり、再現性が高かった。すなわち感染後 24 時間には C P E が始まり、感染後 3 日で全ての細胞が影響を受けた。その時点でペロ細胞の 20% は円形化し、80% は溶解された。感染後 3 日でのウイルス力価は常に約  $10^{7.75} \text{KID}_{50} / \text{ml}$  だった。第 15 継代後は、ウイルスを常に感染後 2 ~ 3 日で収集し、10 MOI ではなく 1 MOI だけを細胞の感染に使用した (表 2)。その後のさらなる継代培養では M V A の増殖特性はわずかしか変化しなかった。注目すべきことに、至適ウイルス力価はさらに増加し、第 200 継代で  $10^{10} \text{KID}_{50} / \text{ml}$  に達した。

10

## 【0070】

要するに、ウイルスはペロ細胞で再現性よく指数的に増殖した。この増殖特性は野生型 M V A の特徴とは驚くほど異なっている。したがって、連続継代培養により、M V A の新しい株が得られた。この新しい株を「V e r o - M V A」と名付け、ペロ細胞における 200 代の継代培養後は「V e r o - M V A - 200」と名付けた。

20

## 【0071】

V e r o - M V A および V e r o - M V A - 200 を大量に培養した。保存のために V e r o - M V A を遠心分離によって濃縮し、2.5% ポリゲリン ( p o l y g e l i n e ) に再懸濁し、2 ml のバイアル中で凍結乾燥した。凍結乾燥後のウイルス力価は依然として少なくとも  $10^{8.5} \text{KID}_{50} / \text{ml}$  だった。凍結乾燥した V e r o - M V A および V e r o - M V A - 200 を汚染および毒性についてチェックし、+4 で保存した。

## 【0072】

## 2. V e r o - M V A の生物学的性質の特徴づけ

V e r o - M V A (継代数 100) および V e r o - M V A - 200 (継代数 200) の生物学的特徴を野生型 M V A の特徴と比較した (表 3 および表 5)。これには当業者に知られている技術を応用した。本発明者らは、ウイルスの宿主域はペロ細胞を除いて変化していないし、ヒトまたは動物に対する毒力も増加していないことを明らかにした。V e r o - M V A は依然として非許容宿主細胞での増殖不全 ( a b o r t i v e p r o p a g a t i o n ) を特徴とする。

30

## 【0073】

ワクシニアウイルスのエルストリー ( E l s t r e e ) 株のウイルス粒子と比較した V e r o - M V A のウイルス粒子の主な特徴は、エルストリー株に対して産生させた抗体の交差反応性によって明らかになった。エルストリー株は WHO が痘瘡予防接種用として推奨しているワクシニア株である。エルストリー株に対して産生させたラビットのポリクローナル高度免疫血清を V e r o - M V A に加えた。100  $\text{KID}_{50} / \text{ml}$  の V e r o - M V A は 1 : 512 の血清希釈率で完全に中和された。同じ量のワクシニアエルストリー株を中和するには 2 倍の血清希釈率 ( 1 : 256 ) が必要だった。したがって V e r o - M V A はワクシニア免疫血清により、依然として効率よく中和することができる。

40

## 【0074】

V e r o - M V A、V e r o - M V A - 200 および野生型 M V A を表 3、4 および 5 に示す多くの追加試験によって比較した。本発明者らは、ヒトを含む哺乳動物に対する V e r o - M V A および V e r o - M V A - 200 の毒力が野生型 M V A と比較して増加していないことを明らかにした。また、V e r o - M V A および V e r o - M V A - 200 はヒトを含む哺乳動物に対して接触感染性または毒性を示さないこともわかった。驚くべき

50

ことにVero-MVAの細胞特異性はペロ細胞を除けば野生型MVAの特異性とほぼ同じだった。すなわち、ヒト細胞系の細胞におけるVero-MVAの増幅(表4参照:HL細胞、HEP-2細胞およびヒーラ細胞)は野生型MVAの増幅とほぼ同じぐらい効率が悪い。したがってヒト細胞とアフリカミドリザルの細胞とは系統学的には密接な近縁関係にあるが、Vero-MVAはヒト細胞で増幅する能力を獲得しなかった。他の試験でも有意な相違は見られなかった。

【0075】

さらに、野生型MVAおよびVero-MVA-200の物理的、化学的および生物学的特徴を比較した(表5)。ニワトリ胚線維芽細胞培養で増殖した野生型MVAが、アンカラで最初に分離されたポックスウイルスのゲノムと比較して、左逆位末端領域に3つの欠失を持つものに対して、Vero-MVA-200は左末端領域中に4つの欠損を持つ。したがって、ペロ細胞における野生型MVAの継代培養により、新たにもう一つの欠失が起こった。

10

【0076】

Vero-MVAを使って家畜をオルトポックス感染に対して免疫処置した。動物の血清を集めて、中和試験を行った。本発明者らは、これらの動物が抗体価の高い抗体を産生することを明らかにした。抗体価は少なくとも111日間にわたって安定だった。これらの抗体はブランク減少試験においてMVAのウイルス粒子をインビトロで中和しうることも明らかになった。要するに、Vero-MVAは家畜およびヒトにおけるオルトポックス感染に対するワクチンとして使用することができる。

20

【0077】

【表1】

【表1】 ペロ細胞へのMVAの適応

継代数	細胞培養	最高ウイルス力価[log <sub>10</sub> /ml]	結果	結論
1	24時間後に毒性効果	2.0	接種したウイルスの残り	盲目継代 地帯現象およびサイトカイン産生
3	毒性なし 4~6日後に弱いCPE	1.0	接種したウイルスの残り? ウイルス再生産の開始	
5	典型的CPE 4~5日に完了	4.0	ウイルス再生産が増加	
11	CPE 3日後に完了	7.5	対数的ウイルス再生産	適応の成功
12~42*	CPEは24時間後に開始して3日後に完了	7.75	再現性のあるウイルス再生産	Vero-MVA
43~100*	CPEは24時間後に開始して3日後に完了	8.0	再現性のあるウイルス再生産	Vero-MVA
100~200*	CPEは24時間後に開始して3日後に完了	10.0	再現性のあるウイルス再生産	Vero-MVA-200の生成

30

40

\*第11継代後は10MOIではなく1MOIだけ接種する。

【0078】

【表2】

**【表2】** ペロ細胞へのMVAの適応中のウイルス力価の変化

継代数	収集日 [感染後の日数]	1ml あたりのウイルス力価 [ $\log_{10}/\text{ml}$ ]
1	1	<2.0
2	3	2.0
3	5	1.0
5	5	4.0
8	4	6.5
11	3	7.5
18	2	8.0
19	2	7.75
20	3	8.0
25	2	7.75
29	2	7.75
30	3	7.75
31	3	8.0
45	2	7.75
51	3	7.75
60	2	8.0
66	2	7.75
68	2	8.0
75	3	8.0
100	2	8.0
200	2	10.0

10

20

【0079】

【表3】

【表3】 野生型MV AおよびVero-MVAの生物学的特徴の比較

マーカー	野生型 MVA	Vero-MVA (継代数 100)	Vero-MVA-200
単層細胞培養物における CPE(接種量 1MOI)	5 日後に細胞の円形化および溶解 (90% CPE)	5 日後に細胞の円形化および溶解 (100% CPE)	3~5 日後に細胞の円形化および溶解 (100% CPE)
至適収集物のウイルス力価	$10^{8.0}$ KID <sub>50</sub> /ml	$10^{7.75}$ KID <sub>50</sub> /ml	$10^{10.0}$ KID <sub>50</sub> /ml
非許容細胞系におけるウイルス再生産不全	あり	あり	あり
ヒトおよび動物に対する毒力の低下	あり	あり	あり (全く無毒)
接触感染性	なし	なし	なし
漿尿膜上の一次プラークの特徴	増殖結節なし 壊死なし	増殖結節なし 壊死なし	増殖結節なし 壊死なし
赤血球凝集反応 (ニワトリ赤血球)	陰性	陰性	陰性
$\beta$ -プロピオラクトンによる不活化	0.05%で1次速度	0.05%で1次速度	0.04~0.05%で1次速度
VSV-仔マウスチャレンジ試験における保護効果	あり	あり	あり
ヒトおよび動物に対する毒性	なし	なし	なし
サイトカイン刺激	インターフェロン $\alpha$ 、IL-2 および 12、CSA	インターフェロン $\alpha$ 、IL-2 および 12、CSA	インターフェロン $\alpha$ および $\gamma$ 、IL-1、2 および 12、CSA
食作用、ナチュラルキラー細胞および Tリンパ球の活性化	あり	あり	あり (増加)

【 0 0 8 0 】

【 表 4 】

10

20

30

40

50

【表4】 様々な細胞培養系におけるVero-MVAおよび野生型MVAのKID<sub>50</sub>/mlの再生産率 [log<sub>10</sub>/ml]

細胞培養系	Vero-MVA (ペロ継代数 31)	野生型 MVA (初代ニワトリ 胚線維芽細胞での継代数 575)
1) ペロ (アフリカミドリザル腎細胞)	8.0	4.5
初代ニワトリ胚線維芽細胞	4.5	8.5
1, 2) HL (ヒト肺)	3.0	2.5
1, 2) HEP-2 (ヒト類表皮癌)	3.0	2.5
1, 2) ヒーラ (ヒト子宮頸癌)	2.75	2.75
1, 2) BHK (ハムスター腎細胞)	5.75	5.25
1, 2) MDBK (ウシ腎細胞)	3.5	3.5
1, 2) PK-15 (ブタ腎細胞)	3.25	3.5

1) 括弧内に示す組織および種由来の連続細胞系。

2) ドイツ・ミュンヘンの医学微生物学研究所の収集物から入手した細胞系。

10

20

【0081】

【表5】

(表5) 野生型MVA (ニワトリ胚線維芽細胞 (CEF) での継代数572) とVero-MVA-200 (ベロ細胞での継代数200) との比較

マーカー	野生型 MVA	Vero-MVA-200
遺伝子マーカー (アンカラで分離された ボックスウイルス株との 比較)	左末端領域 (逆位末端 反復配列) に 3 つの欠 失  ゲノムサイズは 208kb から 178kb に減少  元のゲノムの分子量の 15%を喪失  インターフェロン受容 体の喪失	左末端領域中に 4 つの欠 失  ゲノムサイズがさらに 172kb に減少  元のゲノムの分子量の 20%を喪失  受容体 (例えば IL-1 $\beta$ 受容体) をさらに喪失
細胞マーカー	T ヘルパー細胞の活性 化 (CD4, CD8, CD25)  NK 細胞の活性化  哺乳類細胞 (BHK 細胞を 除く) における再生産 不全	細胞傷害性 T リンパ球の 活性化の増大  NK 細胞の活性化の増大  細胞培養系における宿主 スペクトルのさらなる狭 小化
サイトカイン	インターフェロン $\alpha$ 、 IL-2、IL-12	インターフェロン $\alpha$ およ び $\gamma$ 、IL-1、2、12
ウイルス力価	CEF: $10^{9.5}$ KID <sub>50</sub> /ml ベロ細胞: $10^{4.0}$ KID <sub>50</sub> /ml	CEF: $10^{4.5}$ KID <sub>50</sub> /ml ベロ細胞: $10^{9.5}$ KID <sub>50</sub> /ml
免疫系	特異的免疫系の活性の 低下	非特異的免疫系の活性の 強化
ヒトおよび動物に対する 毒力	低	なし

10

20



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A  
C 1 2 P 21/02 (2006.01) C 1 2 P 21/02 C

(74)代理人 100156915

弁理士 伊藤 奈月

(72)発明者 マイル・アントン

ドイツ連邦共和国、8 2 3 1 9シュタルンベルク、ヴァイルハイマー・ストラッセ、1

審査官 光本 美奈子

(56)参考文献 国際公開第9 9 / 0 1 8 9 9 4 (WO , A 1 )

国際公開第9 5 / 0 2 2 9 7 8 (WO , A 1 )

Virology, vol.238, p.198-211 (1997)

J Gen Virol, vol.79, p.347-352 (1998)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 7/00

C12N 15/09

PubMed