

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4267693号  
(P4267693)

(45) 発行日 平成21年5月27日(2009.5.27)

(24) 登録日 平成21年2月27日(2009.2.27)

(51) Int.Cl.	F 1
A 6 1 K 39/12	(2006.01) A 6 1 K 39/12
A 6 1 K 39/145	(2006.01) A 6 1 K 39/145
A 6 1 K 39/205	(2006.01) A 6 1 K 39/205
C 12 N 5/06	(2006.01) C 12 N 5/00 E
C 12 Q 1/70	(2006.01) C 12 Q 1/70

請求項の数 13 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願平9-510508
(86) (22) 出願日	平成8年8月22日(1996.8.22)
(65) 公表番号	特表平11-514344
(43) 公表日	平成11年12月7日(1999.12.7)
(86) 国際出願番号	PCT/US1996/013745
(87) 国際公開番号	W01997/008292
(87) 国際公開日	平成9年3月6日(1997.3.6)
審査請求日	平成15年8月21日(2003.8.21)
(31) 優先権主張番号	60/002,621
(32) 優先日	平成7年8月22日(1995.8.22)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア アメリカ合衆国 94607-5200 カリフォルニア州 オークランド トウェルフス フロア フランクリン ストリート 1111
(74) 代理人	弁理士 中島 淳
(74) 代理人	弁理士 加藤 和詳
(74) 代理人	弁理士 西元 勝一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】インターフェロン抑制による細胞培養でのウィルスワクチン製造強化方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) 細胞に供与ウィルスを感染させる工程であって、該細胞において、二本鎖RNA依存キナーゼ(PKR)遺伝子、2'-5'オリゴアデニレート合成酵素(2'-5'A合成酵素)遺伝子、またはMxAタンパク質遺伝子が標的遺伝子削除によって欠失しているために、該細胞がPKR、2'-5'A合成酵素、またはMxAタンパク質の活性に欠陥を有することを特徴とする、該工程、

(b) 効率的なウィルス成長を提供するのに十分な条件下で感染細胞を培養する工程、及び

(c) 產生されたウィルスを採取する工程

を有する動物ウィルスのウィルスワクチンの製造方法。

## 【請求項 2】

前記細胞がPKR遺伝子及び2'-5'A合成酵素遺伝子の双方に標的遺伝子削除による欠失を有する請求項1記載の方法。

## 【請求項 3】

前記細胞がヒト由来の細胞である請求項1記載の方法。

## 【請求項 4】

前記細胞が、MRC-5、WI-38、Chang肝、U937、Vero、MRC-9、IMR-90、IMR-91、Lederle 130、MDCK、H9、CEM、およびCD4発現HUT78の群から選ばれる細胞系に由来する請求項1または2記載の方法

10

20

。

**【請求項 5】**

前記細胞がM R C - 5 または W I - 3 8 または V e r o 細胞に由来する請求項 4 記載の方法。

**【請求項 6】**

前記細胞が、 U 9 3 7 細胞に由来する請求項 1 または 2 記載の方法。

**【請求項 7】**

前記供与ウィルスが弱毒ウィルスである請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記供与ウィルスが組換えウィルスである請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

**【請求項 9】**

前記供与ウィルスがヒトのウィルスである請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記供与ウィルスがヒトのインフルエンザウィルスである請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記供与ウィルスが非ヒトウィルスである請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記細胞が M x タンパク質遺伝子に標的遺伝子削除による欠失を有し、かつ前記供与ウィルスがインフルエンザウィルスまたは水疱性口内炎ウィルスである請求項 1 記載の方法。

20

**【請求項 13】**

前記細胞が変異インターフェロンレセプターを有し、かつインターフェロンに対して応答性をもたない請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】**

関連出願

本願は米国仮出願USSN60/002,621号（1995年8月22日出願）の一部継続出願である。

序

技術分野

本発明は、ワクチン製造のために細胞培養でウィルスを産生させる方法に関する。

背景

30

汎発性流行病のインフルエンザを効率的に制御するには、新規に特定されたインフルエンザ株から製造した不活化ウィルスを用いる早期ワクチン接種にかかっている。しかしながら、より効率的に流行病を制御するにはワクチンの製造および検査の改良が必要である。インフルエンザウィルスは表面抗原が極めて頻繁に変異する。結果としてワクチン製造業者は、急激な使用増加に合わせて数百万回分を貯蔵することは不可能である。現在のインフルエンザ制御方法は、定常的な国際的調査および一切の新規出現株の特定とともに新規に特定された株に特異的なワクチンの製造を必要とする。ウィルスの接種および培養のために胚含有鶏卵の使用を必要とする現在のインフルエンザワクチンの製造は、煩雑で高価である。この方法はまた、適切な品質の鶏卵の供給に季節的な変動があることによって制限を受ける。したがって、短時間で大量のワクチンを製造するためには、鶏卵に頼らない別の製造技術を開発する方が有利であろう。この点に関して、安定な細胞系によるインフルエンザワクチンの製造は大量生産における問題の多くを解決するであろう。しかしながら、組織培養によるヒトインフルエンザウィルスの収量は胚含有鶏卵の場合より甚だしく低い（Tannockら、Vaccine 3:333-339 (1985)）。これらの限界を克服しワクチンの品質を改善するために、現在利用可能な細胞系より増加したウィルス収量をもたらす細胞培養系を開発することが有利であろう。完全ビリオン（virion）ワクチンを製造するためにホ乳類細胞系を用いる場合、ワクチン製造者における共通の問題は、ホ乳類細胞が固有の抗ウィルス特性を有する、具体的にはインターフェロン（IFN）系がウィルスの増殖に干渉することである。IFNはその一次配列により主に2つの群に分類される。インターフェロンI型、IFN-<sub>-</sub> および IFN-<sub>-</sub> 遺伝子類およびただ1種

40

50

の IFN - 遺伝子から成るイントロンの無い遺伝子上科によってコードされる。II型インターフェロン、即ち IFN -  $\alpha$  は、ただ 1 種のタイプのみから成り、リンパ球 (T - 細胞およびナチュラルキラー細胞) に限られる。I型インターフェロンは、抗ウィルス活性の誘発、細胞の増殖及び分化の調節、並びに免疫機能の調整を含む多様な生物学的過程を仲介する (G.C.Sen & P.Lengyel, J.Biol.Chem., 267:5017-5020 (1992); S.Pestka & J.A. Langer, Ann.Rev.Biochem., 56:727-777 (1987))。I型 IFN (IFN -  $\beta$  および IFN -  $\gamma$  遺伝子類を含む) の発現誘発は典型的にはウィルス感染に続いて検出される。多くの研究によって、I型 IFN の発現調節に必要なプロモータ成分および転写因子が特定された (W.Du, D.Thanos & T.Maniatis, Cell 74:887-898 (1993); T.Matsuyama, T.Kimura, M.Kitagawa, K.Pfeffer, T.Kawakami, N.Watanabe, T.M.Kundig, R.Amakawa, K.Kishihara, A.Wakeham, J.Potter, C.L.Furlonger, A.Narendran, H.Suzuki, P.S.Ohashi, C.J.Paige, T.Taniguchi & T.W.Mak, Cell 75:83-97 (1993); N.Tanaka & T.Taniguchi, Adv.Immunol., 52:263-281 (1992))。しかしながら、ウィルス感染を細胞に知らせる具体的な生化学上のきっかけおよび必要な報知メカニズムが何であるかは不明のままである (インターフェロン系に関する最近の概説については、Jaramilloら、Cancer Investigation 13:327-337 (1995) を参照されたい)。

IFN は、正常および癌化表現型を有する種々の細胞の増殖を抑制する能力を有する負の増殖因子類に属する。IFN 治療は、ヒトの悪性疾患、例えばカポジ肉腫、慢性骨髓性白血病、非ホジキン型リンパ腫および毛様細胞白血病の治療とともに感染性疾患、例えばパピローマウィルス (性器いぼ) 並びに B および C 型肝炎の治療に有益であることが示されている (概説 : Guterman, Proc.Natl.Acad.Sci., 91:1198-1205 (1994))。最近、遺伝子工学的に細菌で產生された IFN -  $\beta$  は、米国だけで少なくとも 250,000 人が罹患している比較的一般的な神経疾患である多発性硬化症の治療用に承認された。

IFN は、その同系のレセプターに結合し、続いてシグナルを伝達し、IFN 刺激遺伝子 (ISG) の誘発をもたらすことによってその生物学的活性を誘導する。多数の ISG が同定される一方、そのうちの幾つかしか性状が決定され、かつその生物学的活性が調べられていない。もっともよく解明された ISG の例として、二本鎖 RNA (dsRNA) 依存キナーゼ (PKR、以前には p68 キナーゼとして知られていた)、2' - 5' 連結オリゴアデニレート (2'-5'A) 合成酵素および Mx タンパク質が挙げられる (J.L.Taylor & S.E.Grossberg, Virus Research, 15:1-26 (1990); B.R.G.Williams, Eur.J.Biochem., 200: 1-11 (1991))。ヒト Mx A タンパク質は、インフルエンザウィルスおよび水疱性口内炎ウィルスの増殖を抑制する 76 kD のタンパク質である (Pavlovicら、J.Virol. 64:3370-3375 (1990))。

2' - 5' オリゴアデニレート合成酵素 (2'-5'A 合成酵素) は、ATP を利用して 2' - 5' ホスホジエステル結合によって連結された 12 個までのアデニレート残基の短いオリゴマーを合成する。得られたオリゴアデニレート分子は、ウィルス RNA および細胞 RNA を分解する潜伏リボヌクレアーゼ、RNA アーゼ L をアロステリック的に活性化する。この 2'-5'A 合成酵素経路は、IFN 処理細胞から単離した無細胞タンパク質合成系でのウィルスタンパク質の合成を低下させ、かつおそらくは少なくともいくつかの種類のウィルスのインビオでの耐ウィルス感染性に重要なようである。

PKR (タンパク質キナーゼ RNA 依存 “protein kinase RNA-dependent” の略) は、キナーゼ活性を有することが知られている唯一の同定された dsRNA 結合タンパク質である。PKR は、その酵素活性のために dsRNA との結合およびその結果の自己リン酸化を必要とするセリン / レオニンキナーゼである (J.Galabru & A.Hovanessian, J.Biol.Chem., 262:15538-15544 (1987); E.Meurs, K.Chong, J.Galabru, N.S.Thomas, I.M.Kerr, B.R.G.Williams & A.G.Hovanessian, Cell 62:379-390 (1990))。PKR は文献ではまた、dsRNA 活性化タンパクキナーゼ、P1/e1F2 キナーゼ、dsRNA 活性化抑制物質のための DAI または dsI、および p68 (ヒト) または p65 (ネズミ) キナーゼと呼ばれている。類似の酵素がウサギの網状赤血球、ネズミの種々の組織、およびヒト末梢血の单核球で報告されている (Farrelら、Cell, 11:187-200 (1977); Levinら、Proc.Natl.A

cad.Sci.USA,75:1121-1125 (1987) ;Hovanessian,Biochimie,62:775-778 (1980) ;Krustら、Virology 120:240-246 (1982) ;Buffet-Janvresseら、J.Interferon Res.,6:85-96 (1986) )。最もよく性状が調べられたPKRのインビポ基質は真核細胞の開始因子-2のアルファサブユニット(eukaryotic initiation factor-2 (eIF-2a))で、これは一旦リン酸化されると細胞およびウイルスタンパク質の合成を完全に抑制する (J.W.B.Hershey, Ann.Rev.Biochem.60:717-755 (1991) )。PKRは、二本鎖RNAによって活性化されたとき開始因子eIF-2をインビトロでリン酸化できる (Chongら、EMBO J.,11:1553-1562 (1992) )。PKRのこの特定の機能は、IFN-αおよびIFN-βの抗ウィルスおよび抗増殖活性を仲介するために必要なメカニズムの1つとして示唆された。PKRのまた別の生物学的機能はシグナル誘導物質(transducer)としての推定される役割である。クマ (A.Kumar) らは、PKRがIBをリン酸化でき、その結果、核因子B(NF-B)の遊離および活性化を生じることを示した (A.Kumar,J.Haque,J.Lacoste,J.Hiscott & B.R.G.Williams,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,91:6288-6292 (1994) )。IFN-プロモータに十分に性状が明らかにされたNF-B部位が与えられると、IFN-転写のdsRNA活性化をPKRが仲介するメカニズムを明らかにするかもしれない (K.V.Visvanathan & S.Goodbourne,EMBO J.,8:1129-1138 (1989) )。

PKR(すなわちp68(ヒト)キナーゼおよびp65(ネズミ)キナーゼ)の触媒キナーゼサブドメインは、イーストGCN2キナーゼと高い配列同一性(38%)を有する (Chongら、EMBO J.,11:1553-1562 (1992) ;Fengら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:5447-5451 (1992) )。サッカロミセス・セレビシアエ(Saccharomyces cerevisiae)で発現させた組換えp68キナーゼは増殖抑圧表現型を示す。これは、p68キナーゼの活性化およびそれに続くホ乳類eIF2のイースト等価物のリン酸化によると考えられる (Chongら; Ciganら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:2784-2788 (1982) )。

驚くべきことに、本発明者らはある種のISGの発現操作は有益な用途をもつことを見出した。彼らは、PKRタンパク質または2'-5'A合成酵素タンパク質の発現または抑圧もしくはその双方が、ウィルス感染細胞からのウィルス収量を実質的に高め、動物細胞培養でのワクチン製造を強化するのに有用であることを見出した。

#### 関連文献

PKRの生物学的役割を調べる一般的方法は、キナーゼ活性が不完全な変異体の作出を必要とする。PKRはdsRNA結合のための調節部位およびキナーゼ活性の触媒部位を有するので、研究者らは、調節部位または触媒部位についての変異体を作出するためにプロック欠失変異または位置特異的変異を利用した。触媒ドメインIIの296位の不变のリジンをアルギニンに置換した單一アミノ酸置換を含むPKR優性(-)変異体(PKR dominant negative mutant)、[Arg<sup>296</sup>]PKRが記載されている (K.V.Visvanathan & S.Goodbourne,EMBO J.8:1129-1138 (1989) ;M.D'Addario,A.Roulston,M.A.Wainberg & J.Hiscott,J.Virol.,64:6080-6089 (1990) )。この変異タンパク質[Arg<sup>296</sup>]PKRは、インビポで内因性野生型PKRの活性を特異的に抑圧することができる。さらに他の変異体が、dsRNA結合モチーフを改変することによって作出された。例えば、フェン(Feng)ら (Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:5447-5451 (1992) )は、アミノ酸残基39~50または58~69の間に欠失を有する変異体を得て、欠失分析を用いてPKRのdsRNA結合能力を完全に破壊した。同様に、他の研究者らは、N末端領域のアミノ酸残基を変異させてdsRNA結合能力を抑圧し、PKRの酵素活性の消失をもたらした (S.R.Green,M.B.Matthews,Genes & Development,6:2478-2490 (1992) ;S.J.McCormack,L.G.Ortega,J.P.Doohan,C.E.Samuels,Virology,198:92-99 (1994) )。最近の論文によって、dsRNA結合に絶対的に要求される2つのアミノ酸残基がさらに特定された。すなわちグリシン57およびリジン60である (N.A.J.McMillan,B.W.Carpick,B.Hollis,W.M.Toone,Zamanian-Daryoush & B.R.G.Williams,J.Biol.Chem.,270:2601-2606 (1995) )。これらの位置における変異体はインビトロでdsRNAに結合することができず、さらにネズミのマクロファージ細胞で発現させたときインビポで抗増殖活性を持たないことがわかった。

インビポでのPKR活性消失に関する生理学的な重要性を動物で調べた。触媒的に不活性

な P K R 変異体 ( [ A r g <sup>296</sup>] P K R を含む ) は、 N I H 3 T 3 ( マウス線維芽細胞 ) 細胞に核酸感染させたとき、核酸感染細胞で内因性 P K R 活性の抑圧をもたらした。又一  
ドマウスに投与したとき、これらの核酸感染細胞は腫瘍を形成し、 P K R の腫瘍抑圧活性  
を示唆した ( A.E.Koromilas,S.Roy,G.N.Barber,M.G.Katze & N.Sonenberg, Science, 257:1  
685-1689 ( 1992 ) ; E.F.Meurs,J.Galabru,G.N.Barber,M.G.Katze & A.G.Hovanessian, Proc  
. Natl.Acad.Sci.USA, 90:232-236 ( 1993 ) ) 。メウア ( Meurs ) ら ( J.Virology, 66:5805 ( 19  
92 ) ) は、 C M V プロモータの制御下で、野生型 ( w t ) P K R 遺伝子または優性 ( - )  
変異体のいずれかを有する安定な N I H 3 T 3 核酸感染体を作出し、 w t クローンを与  
えられた核酸感染体のみが脳脊髄炎ウィルス ( E M C V ) の部分的耐感染性を有すること  
を示した。リー ( Lee ) ら ( Virology, 193:1037 ( 1993 ) ) は、誘発可能プロモータの制御下  
で、 P K R 遺伝子を含む組換えワクシニアウィルスを構築し、この組換えウィルスを感染  
させ誘発した H e L a 細胞ではワクシニアウィルスタンパク質の抑制とウィルス収量の全  
体的な減少がもたらされることを示した。ヘンリー ( Henry ) ら ( J.Biol.Regulators & H  
omeostatic Agents, 8:15 ( 1994 ) ) は、 P K R 活性化因子の配列を含むレオウィルス m R  
N A が他のレオウィルス m R N A と比較して発現が少ないが、 2 - アミノプリン、 P K R  
抑制物質の添加または P K R 優性 ( - ) 変異体の核酸感染により、活性化因子の配列を含  
む m R N A の発現を特異的に増加させることを示した。メラン ( Maran ) ら ( Science, 265  
:789 ( 1994 ) ) は、 2 ' - 5 ' オリゴ A に連結させた P K R アンチセンスオリゴで処理する  
ことによって P K R m R N A を選択的に欠損させた H e L a 細胞が d s R N A ポリ ( I ) : ポリ ( C )  
による核因子 - B の活性化に応答しないことを示した。  
10

ワクチン製造用細胞培養から得られるウィルス収量を改善しようと幾つかの方法が用いられ  
た。個々のウィルスに最適な増殖を行う最良の細胞系を得るために種々の細胞型が調べ  
られた。ヒトの二倍体性胎児肺細胞系、 M R C - 5 および W I - 3 8 がワクチン製造のた  
めに特に開発された ( Pearson Devel,Biol.Standard, 76:13-17 ( 1992 ) ; C.MacDonald,Cri  
tical Reviews Biotech. 10:155-178 ( 1990 ) ; Wood ら、 Biologicals, 18:143-146 ( 1990 )  
を参照のこと ) 。細胞培養でのワクチン製造を改善するための他の試みには、低タンパク  
質血清置換因子の使用 ( Candal ら、 Biologicals, 19:213-218 ( 1991 ) ) およびタンパク分  
解酵素による細胞培養の処理 ( 米国特許第 RE33,164 号 ) が含まれる。  
20

#### 発明の要旨

本発明の目的は、細胞培養でのウィルスの產生を強化する方法を提供することである。と  
りわけ本発明の方法は、種々の動物ウィルス用ウィルスワクチンの製造に、抗ウィルス化  
合物の評価に、さらにウィルス性病原体の同定と培養に有用である。  
30

本発明の目的は一般に、インターフェロン遺伝子の発現が実質的に正常な発現レベルより  
低下した動物細胞培養を提供することによって達成される。これは、インターフェロンレ  
ベルを調節するためにインビポで機能する因子の発現レベルを操作することによって達成  
できるが、これら因子には、ある種のインターフェロン転写調節因子 ( 例えば I R F 1 )  
、ある種のインターフェロンレセプターおよびある種のインターフェロン刺激遺伝子産物  
( 例えば P K R および 2 - 5 A 合成酵素 ) が含まれる。

このような目的および以降で明らかになる他の目的は、具体的にはインターフェロンによ  
って仲介される抗ウィルスタンパク活性、特に二本鎖 R N A 依存キナーゼ ( P R K ) およ  
び 2 ' - 5 ' オリゴアデニレート合成酵素 ( 2 - 5 A 合成酵素 ) に対する活性が正常レベル  
より顕著に低下した動物細胞培養を提供することによって達成される。  
40

#### 【図面の簡単な説明】

図 1 は、 U 9 3 7 由来の安定な核酸感染細胞系の P K R 活性とタンパク質レベルである。  
( A ) 機能的な P K R 活性は、 P K R 自己リン酸化についてポリ ( I ) : ポリ ( C ) - セ  
ルロースアッセイを用いて求めた。細胞抽出物は、表示のように組換えヒト I F N - 2  
( 2 0 0 U / m l ) の存在下 ( + ) または非存在下 ( - ) でのインキュベーションに続い  
て種々の U 9 3 7 核酸感染細胞系から調製する一方、 L 9 2 9 細胞は同様にマウス I F N  
- / で処理した。レーン 1 は H e L a 、レーン 2 および 3 は U 9 3 7 - n e o 、レ  
ーン 4 は U 9 3 7 - A S 1 、レーン 5 は U 9 3 7 - A S 3 、レーン 6 は U 9 3 7 - M 1 3 、  
50

レーン7はU937-M22、レーン8はL929である。ヒト(68kDa)およびマウス(65kDa)PKRタンパク質、並びに分子サイズ標準物質(80および50kDa)の位置が表示されている。(B)細胞抽出物はIFN- $\alpha$ またはIFN- $\beta$ で誘発後、上記のように調製し、PKRタンパク質レベルはウェスタンプロット分析で決定した。

図2。EMCV複製の速度がPKR欠陥細胞で高められる。種々のU937細胞系を(A)0.1TCID<sub>50</sub>/細胞または(B)0.001TCID<sub>50</sub>/細胞のEMCVで攻撃した。表示した時間にサンプルを採取し、ウィルス収量をTCID<sub>50</sub>で測定した。

#### 具体的な態様の説明

本発明は、細胞におけるインターフェロン産生レベルが、インビボでインターフェロン発現およびインターフェロン活性を通常調節するある種の因子の発現または活性を操作することによって調節できることを発明者らが見出したことに依る。これらの因子には、ある種のインターフェロン特異的転写調節因子、特にIRF1、ある種のインターフェロンレセプター、並びにある種のインターフェロン刺激遺伝子の遺伝子産物(インターフェロン仲介抗ウィルス反応とも呼ばれる)、特にPKRおよび2'-5'A合成酵素が含まれる。これら因子のいずれかの発現または活性を抑圧するかまたは排除することにより、正常レベルより低いインターフェロン遺伝子発現がもたらされる。この正常より低いインターフェロン発現レベルの結果の1つは、ウィルス複製に対する細胞の受容性の増加である。ウィルス複製に対して受容性が増した細胞は、ワクチン製造、低レベルのウィルスの感度の高い検出を含む多くの応用、及び抗ウィルス化合物の評価に有用である。

驚くべきことに本発明者らは、インターフェロン仲介抗ウィルス応答に欠陥がある細胞、特にdsRNA依存キナーゼ、2'-5'オリゴアデニレート合成酵素または双方に欠陥を有する細胞が、動物ウィルスに感染させたとき、正常レベルでこれらタンパク質を有する細胞より高いウィルス収量を生じることを見出した。本発明の方法を用いて、10<sup>3</sup>から10<sup>4</sup>またはそれ以上のウィルス収量増加が得られる。PKRまたは2'-5'A合成酵素に欠陥がある細胞培養で高いウィルス収量を得ることが可能になることによって、短時間で大量のウィルスを产生することが可能になった。これは、ウィルスワクチンの製造に特に重要であり、インフルエンザウィルスを含むRNAウィルスにとってきわめて重要である。この欠陥細胞のウィルス複製に対する受容性の増加によって、そのような細胞は、細胞培養で抗ウィルス薬を評価する方法、及びウィルス性病原体を検出する方法において有用性を有する。

本発明の特徴の1つは、細胞培養でウィルスワクチンを製造する方法であって、(a)インターフェロン刺激遺伝子の遺伝子生成物の活性に欠陥を有する細胞培養を供与株の動物ウィルスで感染する工程、(b)効率的にウィルス生長を提供するのに十分な条件下で感染した細胞培養を培養する工程、及び(c)產生したウィルスを採取する工程を有する方法を提供する。採取したウィルスは、ワクチンとして使用するために例えば濾過滅菌、超遠心およびまたはカラムクロマトグラフィーによる濃縮または他の方法によって精製してさらに調製することができる。場合によって、採取ウィルスはウィルス死滅ワクチンを製造するために処理してウィルスを不活化することができる。

好ましい態様として、細胞培養はPKR活性に欠陥がある。PKRに欠陥を有するとは、PKR活性が正常レベルの5%未満であることを意味する。PKR活性の正常レベルとは、安定なPKR欠陥細胞が得られた親細胞培養で認められるPKR活性、またはPKRの欠陥性が一時的に誘発される場合、PKRの欠陥性を誘発する前の細胞で認められたPKR活性レベルをいう。好ましくは、PKR欠陥細胞は正常レベルの1%未満のPKR活性を有する。より好ましくはPKR欠陥細胞は正常レベルの0.1%未満のPKR活性を有する。PKR活性とは、IFN- $\alpha$ およびIFN- $\beta$ の抗ウィルスおよび抗増殖活性を仲介する能力、開始因子e1f-2をリン酸化する能力、または核因子Bを遊離させるためにIBをリン酸化する能力を意味する。PKRとはヒトp68キナーゼまたはヒトp68キナーゼの類似体もしくは相同体の全てを指す。ヒトp68キナーゼの類似体とは、インターフェロン転写のdsRNA活性化を仲介する全ての二本鎖RNA依存キナーゼを意味する。典型的には、そのようなdsRNA依存キナーゼは、例えばウサギまたはマ

10

20

30

40

50

ウスのような他の種および多様な種の種々の組織に存在する等価な p 6 8 キナーゼである。例えばネズミの p 6 5 キナーゼはヒト p 6 8 キナーゼの類似体である。p 6 8 キナーゼの類似体の別の例はヒトの末梢血単核球で報告された (Farrelら)。相同体とは、ヒト p 6 8 キナーゼの少なくとも 1 つのドメイン、例えば d s R N A 結合ドメインまたはキナーゼドメインと相同なタンパク質を指す。そのような機能的なキナーゼ相同体の 1 つはイースト G C N 2 キナーゼである。

P K R 欠陥細胞は、当該技術分野で周知の種々の方法のいずれかによって得ることができる。P K R 欠陥変異体は安定的に P K R に欠陥を有する場合もあり、また P K R 欠陥性を一時的に誘発することもできる。安定な P K R 欠陥変異体を製造する技術にはランダムまたは位置特異的変異誘発 (例えば W.P.Deng & J.A.Nickoloff, Analytical Biochemistry 200:81-88 (1992); S.Busy, M.Irani, B.J.Crombrugghe, J.Mol.Biol., 154:197-209 (1982) )、標的遺伝子削除 (“遺伝子ノックアウト”) (例えば S.A.Camperら, Biology of Reproduction 52:246-257 (1995); A.Aguazzi, S.Brandner, U.Sureら, Brain Pathology, 4:3-20 (1994) )、P K R アンチセンスポリヌクレオチドによる核酸感染 (例えば Leeら, Virology, 192:380-385 (1993) ) および P K R 優性 (-) 変異体遺伝子による核酸感染が含まれるが、これらに限定されるものではない。

P K R 優性変異体は、正常な P K R 活性を抑圧するためにただ 1 つの対立遺伝子のみが発現されねばならない P K R 優性変異体である。P K R 優性変異体遺伝子には、正常な P K R 活性を抑圧するヒト p 6 8 キナーゼ変異体、ネズミ p 6 5 キナーゼ変異体および、他の d s R N A 依存キナーゼのいずれかの変異体またはヒト p 6 8 キナーゼの類似体もしくは相同体の変異体、例えば [A r g<sup>296</sup>] P K R (Meursら, J.Virol. 66:5805-5814 (1992) ) が含まれる。他の P K R 優性変異体の例には、ウサギ網状赤血球、種々のマウス組織およびヒト末梢血単核球から得られた P K R 変異体が含まれる (Farrelら, Levinら, Hovanessian, Krustら, Buffet-Janvresseら)。P K R 優性変異体には、開始因子リン酸化、特に e 1 f - 2 のリン酸化で干渉することによってタンパク質合成を抑圧する機能的相同体の変異体が含まれる。そのような機能的キナーゼ相同体の変異体の 1 つは、イースト G C N 2 キナーゼの変異体である。

P K R の欠陥が一時的な細胞を作出する技術には、2' - 5' オリゴアデニレート連結 P K R アンチセンスオリゴヌクレオチドの利用 (A.Maran, R.K.Maitra, A.Kumar, B.Dong, W.Xiao, G.Williams, B.R.G.Torrence & R.H.Silverman, Science, 265:789-792) または 2-アミノブリジンのような P K R タンパク質の特異的抑制物質の利用 (P.I.Marcus & M.J.Sekellick, J.Gen.Virol., 69:1637-45 (1988); K.Zinn, A.Keller, L.A.Whitemore & T.Maniatis, Science, 240:210-3 (1988) )、並びに P K R 基質のリン酸化を妨害することができる他の競合的抑制物質の利用、または二本鎖 R N A 結合を妨害することができる抑制物質の利用が含まれるが、これらに限られるものではない。一時的 P K R 欠陥細胞培養は、そのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは抑制物質の存在下で細胞系を培養することによって得ることができる。

本発明の方法で使用するためには、細胞培養は、安定的に P K R 欠陥であるのが好ましい。典型的には、P K R 欠陥細胞培養は、親細胞系、好ましくはワクチン製造に現在用いられている細胞系、好ましくは M R C - 5、W I - 3 8 または V e r o (アフリカミドリザル細胞) を機能的な P K R アンチセンス遺伝子構築物または P K R 優性 (-) 変異体構築物を含むベクターで核酸感染させ、続いてこのベクターを受容した細胞を選別することによって作製される。機能的 P K R アンチセンス遺伝子構築物は、従来の方法、例えば Meursら (Cell, 62:379-390 (1990) ) に報告されたような P K R c D N A を適切なプロモータ、例えば C M V プロモータの制御下で、アンチセンス方向にクローニングすることによって調製できる。P K R 優性 (-) 変異体構築物は、P K R 優性 (-) 変異体の c D N A、例えば [A r g<sup>296</sup>] P K R の c D N A を適切なプロモータの制御下でクローニングすることによって調製できる。

P K R 欠陥細胞は、本発明の方法でワクチンを製造するために用いるためのものであるので、これら P K R 欠陥細胞による腫瘍形成の危険性を減少させるために、P K R 変異体遺

10

20

30

40

50

伝子構築物は誘発可能プロモータの制御下でクローニングするのが好ましい。この方法はこれらの細胞によって產生されるワクチンの安全性を担保するであろう。PKR活性の消失は腫瘍形成に付随している(Koromilasら;Meursら)。採集ウィルスは細胞培養成分から精製することができるが、それにもかかわらずいくつかのPKR欠陥細胞が最終的なワクチン調製物に持ち込まれる危険性が残る。PKR活性が構造的に抑圧された状態を維持している場合、これらの細胞は腫瘍を誘発する潜在性を秘めているであろう。これはワクチン受容者に健康上の潜在的な危険性を与えるであろう。しかしながら、誘発可能プロモータが遺伝子構築物の発現制御に用いられる場合、内在性PKR活性は誘発物質の除去に際して回復するであろう。適切な誘発可能プロモータには、lacプロモータ、熱ショックプロモータ、メタロチオネインプロモータ、グルココルチコイドプロモータまたは当該技術分野で既知の他の誘発可能な全てのプロモータが含まれる。

例えば化学的もしくは酵素的に合成したDNA、PKR cDNAまたはPKR遺伝子のフラグメントを用いる同様なベクターを構築するその他の方法は、当業者にとって容易に知られよう。親細胞培養の核酸感染は標準的な方法、例えばDEAEデキストラン法(McCutchen & Pagano, J.Natl.Cancer Inst., 41:351-357 (1968))、リン酸カルシウム法(Grahamら、J.Virology, 33:739-748 (1973))または微量注入、リポフェクション、電気的穿孔を含むがこれらに限定されない当業界で既知の他のいずれかの方法によって行われる。そのような方法は一般的にサンブルックら(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)(Sambrookら編、第2版、(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press刊)に記載されている。不完全なPKR活性を有する核酸感染体が選別される。選別を容易にするために、例えばネオマイシンホスホトランスフェラーゼII、アンピシリン耐性またはG418耐性のようなマーカー遺伝子をアンチセンスまたは変異体遺伝子を含むベクターに包含させることができる。マーカー遺伝子が含まれている場合、核酸感染体はマーカー遺伝子の発現(例えば抗生物質耐性)について選別し、培養し続けてPKR活性についてアッセイすることができる。

PKR欠陥細胞の残留PKR活性は、当業界で周知の多くの技術のいずれかによって決定できる。PKR活性は、例えばマラン(Maran)ら(Science, 265:789-792 (1994))またはシルバーマンら(R.H.Silverman & D.Krause, 「インターフェロン:実際的アプローチ(Interferons:A practical approach)」、A.G.Morris & M.J.Clemens編、pp71-74, IRL Press刊、Oxford-Washington, DC)が記載した自己リン酸化アッセイによって直接決定できる。典型的にはPKR活性のための自己リン酸化アッセイは以下のように実施される。タンパク質約100μgを含む、PKR活性を調べようとする細胞から得た抽出物をポリ(I) : ポリ(C)-セルロースビーズ20μlと共に氷上で60分間インキュベートする。キナーゼはビーズ上で固定され活性化される。ポリヌクレオチドセルロース結合キナーゼ分画を洗浄した後、自己リン酸化反応をアッセイ溶液中で30℃で30分間実施する。アッセイ溶液は、[<sup>32</sup>P]ATPを1μCi、1.5mM酢酸マグネシウム、10μMのATP(pH7.5)、0.5%NP40および100μg/mlロイペプチドを含む。硫酸ドデシルナトリウム(SDS)を含むゲルサンプル緩衝液でサンプルを90℃で3分間加熱し、さらにタンパク質を10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析する。ゲルを乾燥させ、XAR-5X線フィルム(コダック)を用いてオートラジオグラフを調製する。

残留PKR活性はまた、例えばPKR特異的抗体を用いてウェスタンプロットによりPKRタンパク質の存在を、または例えばPKRに特異的なオリゴヌクレオチドもしくはcDNAプローブを用いてノザンプロットによりPKR RNAの存在をアッセイすることによって間接的に決定できる。明らかにわかるように、残留PKR活性の測定に適切なアッセイのタイプは、大抵の場合PKR欠陥表現型を得るために用いた方法に左右されるであろう。例えば、PKR欠陥細胞を作出するために用いた方法がPKR遺伝子発現の抑圧または排除をもたらす場合、(例えば、遺伝子ノックアウト)、mRNAもしくはcDNAの存在を検出する分析技術(例えばノザンプロットまたはサザンプロット)、またはタンパク質の存在を検出する分析技術(例えばウェスタンプロット)、または該タンパク質活性を検出する分析技術が、PKR欠陥細胞の残留PKR活性を測定するのに有用であ

10

20

30

40

50

ろう。他方、PKR欠陥細胞を作出するためには用いた方法が遺伝子発現の排除よりむしろ該タンパク質の抑制をもたらす場合（例えば優性（-）PKR変異体を担持するベクターでの核酸感染）、残留PKR活性の測定に自己リン酸化アッセイがウェスタンプロットより適切である。

他の態様として、本発明は、2'-5'オリゴアデニレート合成酵素活性に欠陥を有する細胞培養でウィルスワクチンを製造する方法を提供する。2-5A合成酵素に欠陥を有する細胞培養は、PKRに欠陥を有する細胞培養と同様な方法で単離できる。それらは、例えばランダムもしくは位置特異的変異誘発、2-5A合成酵素遺伝子の標的遺伝子削除またはアンチセンス2-5A合成酵素構築物の核酸感染である。2-5A合成酵素に欠陥を有するとは、2-5A合成酵素活性が正常な2-5A合成酵素活性の5%未満であることを意味する。正常レベルの2-5A合成酵素とは、安定な2-5A合成酵素欠陥細胞が得られた親細胞で認められる2-5A合成酵素活性レベル、または2-5A合成酵素欠陥性が一時的に誘発される場合、2-5A合成酵素欠陥性が誘発される前に認められる2-5A合成酵素活性レベルを意味する。好ましくは2-5A合成酵素活性欠陥細胞は、正常レベルの2-5A合成酵素活性の1%未満を有し、より好ましくは2-5A合成酵素欠陥細胞は、正常レベルの2-5A合成酵素活性の0.1%未満を有する。2-5A合成酵素欠陥細胞の残留2-5A合成酵素活性は、残留PKR活性を測定するために用いた方法と同様な方法で測定できる。すなわち、2-5A合成酵素特異的抗体を用いるウェスタンプロット、2-5A合成酵素に特異的なオリゴヌクレオチドもしくはcDNAを用いるノザンプロット、または酵素活性アッセイである（Readら、J. Infect. Dis., 152:466-472 (1985); Hassel & Ts'o, J. Virol. Methods, 50:323-334 (1994) を参照のこと）。典型的には、2-5A合成酵素活性は以下のように求められる。アッセイするべき細胞をIFN- $\alpha_2$  (RPMI + 10%ウシ胎児血清に100U / 1ml) で処理する。簡単に記せば、細胞培養を37

で18時間インキュベートし、洗浄して細胞ペレットを細胞溶解緩衝液で10分間4℃で処理する。細胞抽出物の一部をポリ(I) : ポリ(C) - アガロースビーズと共に30℃で30分間インキュベートして2-5A合成酵素を結合させるとともに活性化させる。このビーズを洗浄し、続いて3mMのATP、アッセイサンプル当たり4μCiの<sup>3</sup>H-ATP、および20mMのHepes緩衝液(pH7.5)を含むアッセイ溶液中で30℃で20時間インキュベートする。インキュベーション後、サンプルを90℃に加熱して酵素を不活化し、続いて細菌のアルカリホスファターゼ(BAP)で処理する。合成した2-5オリゴAはBAPに対して耐性を有する。サンプルを濾紙に滴下して洗浄し、シンチレーションカウンターを用いて<sup>3</sup>Hの放射能活性を計測することによって2-5オリゴAの量を求める。このオリゴA生成物の量は通常の方法による酵素活性と相関性を有する。また、2-5A合成酵素は、ラジオイムノ法および放射能結合法によってアッセイできる（M.Knightら、Radioimmune, radiobinding and HPLC analysis of 2-5A and related oligonucleotides from intact cells (完全細胞の2-5Aおよび関連オリゴヌクレオチドの放射能免疫分析、放射能結合分析およびHPLC分析)、nature, 288:189-192 (1980)）。

PKR活性および2-5A合成酵素活性の両方に欠陥を有する細胞培養は上記の方法を組み合わせて作出できることは明白であろう。二重に欠陥を有する細胞培養は、連続的に（すなわち先ず1つの活性に欠陥を有する培養を選別し、続いて第二の欠陥細胞の調製にこの細胞培養を出発材料として用いる）または同時に（両欠陥を一度に選別する）調製できる。

また他の態様として、本発明は、ヒトのMxAタンパク質活性に欠陥を有する細胞培養でウィルスワクチンを製造する方法を提供する。ヒトMxAタンパク質活性に欠陥を有する細胞培養は、PKR欠陥細胞培養と同様な方法、例えばランダムもしくは位置特異的変異誘発、MxA遺伝子の標的遺伝子削除、またはアンチセンスMxA構築物の核酸感染で単離できる。MxAタンパク質に欠陥を有するとは、MxA活性が正常なMxA活性レベルの5%未満であることを意味する。正常レベルのMxA活性とは、安定なMxA欠陥細胞が得られた親細胞で認められるMxA活性、またはMxA欠陥性が一時的に誘発される場合、MxA欠陥性が誘発される前に認められるMxA活性レベルを意味する。好ましくは

10

20

30

40

50

M × A 欠陥細胞は、正常レベルの M × A 活性の 1 % 未満を有し、より好ましくは M × A 欠陥細胞は、正常レベルの M × A 活性の 0.1 % 未満を有する。M × A 欠陥細胞の残留 M × A 活性は、残留 P K R 活性を測定するのに用いた方法と同様な方法で測定できる。すなわち、M × A 特異的抗体を用いるウェスタンプロット、M × A に特異的なオリゴヌクレオチドもしくは c D N A プローブを用いるノザンプロットまたは酵素活性アッセイである

(Garberら、Virology, 180:754-762(1991); Zürcherら、J. Virol., 66:5059-5066(1992))。

典型的には M × A 活性はゼルヒャーら  
(Zürcherら)

の記載にしたがって測定される。

さらに他の態様として、本発明は、インターフェロン応答性に欠陥を有する細胞培養でウイルスワクチンを製造する方法を提供する。インターフェロン応答性とは、インターフェロンによる刺激に応答する細胞の能力を指す。インターフェロン反応性に欠陥を有する細胞培養は、インターフェロンレセプターの抑制物質の存在下で細胞を培養することによって得られる。また、正常なインターフェロンレセプターの非存在下でインターフェロンに応答性をもたない変異インターフェロンレセプターを発現するように細胞を操作してもよい。

また他の態様として、本発明は、インターフェロン特異的転写調節因子に欠陥を有する細胞培養でウイルスワクチンを製造する方法を提供する。そのようなインターフェロン特異的転写調節因子の 1 つは I R F 1 である。インターフェロン特異的調節因子に安定的に欠陥を有する細胞は、当該技術分野で周知の多数の技術、例えばランダムもしくは位置特異的変異誘発、標的遺伝子削除またはアンチセンスベクターの核酸感染のいずれかによって得ることができる。一時的に欠陥を有する細胞は、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはインターフェロン転写の特異的抑制物質の存在下で細胞を培養することによって得られる。

本発明の方法は、初代細胞培養、二倍体細胞培養および継代細胞培養を含む種々の動物細胞を用いて実施できる。特に有用なものは、現在ワクチン製造に用いられている細胞培養、特に U S F D A および / または W H O によりワクチン製造について承認されている細胞培養、例えば M R C - 5 (胎児肺組織由来ヒト二倍体細胞系 (Nature Lond., 227:168-170 (1970) )、および W I - 3 8 (胎児肺組織由来ヒト二倍体細胞系 (Am. J. Hyg., 75:240 (1962) ; ヒトのウイルス病およびリケッチャ病に対するワクチンに関する第 1 回国際会議 (First Conference on Vaccines Against Viral and Rickettsial Diseases of Man) 、Pan American Health Organization, Pub. No. 147:581, 1981年5月) である。また有用なものは、C h a n g 肝細胞 (R.S.Chang, Proc. Exp. Biol. Med., 87:440 (1954) )、U 9 3 7 ヒト前单球 (Sundstromら、Int. J. Cancer 17:565-577 (1976) )、V e r o 細胞、M R C - 9 細胞、1 M R - 9 0 細胞、1 M R - 9 1 細胞および L e d e r l e 1 3 0 細胞 (Biologicals, 18:143-146 (1991) ) である。U 9 3 7 細胞は、C D 4 を発現する免疫細胞に感染するウイルス、例えば H I V について特に有用である。ワクチン製造で使用される細胞培養に関する概論として、グラシェフの論文 (V.P.Grachev, 「ウイルスワクチン (Viral Vaccines) 」、A.Mizrahi編、pp.37-67 (1990) 、Wiley-Liss刊) を参照されたい。選択される個々の細胞培養は産生されるウイルスに左右され、一般には細胞培養は該ウイルスの天然の宿主である種に由来するであろう。ただしこのことは本発明を実施するうえで必ずしも必須ではない (例えばヒトのウイルスはネコの腎細胞系 (M D C K 細胞) またはミドリザル腎細胞系 (V e r o 細胞 (Swansonら、J. Biol. Stand., 16:311 (1988) ) で増殖できる)。典型的には、選択される細胞は、産生されるウイルスに対して適切な宿主であることが分かっている細胞または細胞系の P K R 欠陥誘導体または 2 - 5 A 合成酵素欠陥誘導体である。例えば、インフルエンザウイルスおよび A 型肝炎ウイルスワクチンでは好ましい宿主細胞は M R C - 5 の誘導体である。H I V ワクチン製造に好ましい宿主細胞は、U 9 3 7 、H 9 、C E M または C D 4 発現 H U T 7 8 細胞の誘導体である。ワクチン製

10

20

30

40

50

造に用いられる細胞系は周知であり、かつ商業ルートの供給者、例えばアメリカン・タイプ・カルチャ・コレクション (American Type Culture Collection) から容易に入手できる。

本発明によるインターフェロン仲介抗ウィルス反応欠陥細胞の供与ウィルス感染は通常の技術によって実施される（例えば、J.Peetermans, J.Vaccine, 1992/10増補1:S99-101; Shevitzら、「ウィルスワクチン」、A.Mizrahi編、pp.1-35 (1990)、Wiley-Liss刊を参照のこと）。典型的には、ウィルスは $0.001\sim0.5\text{TCID}_{50}/\text{細胞}$ 、好ましくは $0.01\sim0.10\text{TCID}_{50}/\text{細胞}$ で細胞培養に添加されるが、個々のウィルスおよび用いられる宿主細胞にとって適切なように変動するであろう。当業者には容易に理解されるところであるが、効率的なウィルス産生のために細胞培養の全ての細胞が最初から感染していなければならぬということではない。感染をモニターした後、この細胞およびウィルス産生に適した条件下でこれら感染細胞を培養する。ウィルスの産生は、ブラーク形成単位アッセイ、 $\text{TCID}_{50}$ アッセイまたは血球凝集抑制アッセイを含む多数の標準的な技術のうち何れかによつてモニターすることができる（Robertsonら、J.Gen.Viro., 72:2671-2677 (1991)）。感染細胞は効率のよいウィルス成長を提供するのに十分な条件下で培養される。細胞は、ウィルス収量がプラトーに達することによって表示されるように最大のウィルス産生が達成されるまで培養できる。ウィルスは標準的な方法によって採集され、続いて他の細胞性成分から精製される（Peetermans (1992) を参照のこと）。採集ウィルスは生ウィルスワクチン（完全な強毒または弱毒のいずれか）として用いてもよいし、または当該技術分野で周知の方法、例えばホルムアルデヒド処理によって使用前に不活化してもよい（J.Peetermans, J.Vaccine, 1992/10増補1:S99-101; 米国特許第RE33164号）。

ワクチンは乾燥形（希釈液と混合される）で用いてもよく、または濃縮もしくは直ぐに使用できる液体形（好ましくは水溶液）でもよい。ワクチンは単独で投与してもよく、または医薬上許容可能な担体、アジュバント、保存料、希釈液および、免疫誘発性を強化するか、もしくは投与を助け、もしくは保存を助けるのに有用であると当業界で周知の他の添加物と組み合わせて投与してもよい。適切なアジュバントには水酸化アルミニウム、ミヨウバン、リン酸アルミニウム、フロイントまたは米国特許第3,790,665号および3,919,411号に記載されているものが含まれる。他の適切な添加物には、ショ糖、デキストロース、乳糖、および他の無毒な物質が含まれる。ワクチンは、筋肉内、静脈内、皮下、経気管的、経鼻的ルートを含む種々なルートで、またはエアゾルスプレーによって動物に投与され、さらにワクチンはヒト、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ウシを含む種々の動物で有益に用いられる。

本発明の方法は、種々の供与動物ウィルスを用いて実施できる。供与ウィルスとは、ワクチンを製造するためにインビロで複製される個々のウィルス株を意味する。用いられる個々の供与動物ウィルスは所望するウィルスワクチンに左右される。ワクチン製造に現時点で用いられる供与ウィルスは当業界で周知であり、本発明の方法は新規に特定された何れの供与ウィルスにも容易に応用できる。好ましい供与ウィルスには、ヒトインフルエンザウィルス、特にインフルエンザA (H3N2) およびインフルエンザA (H1N1) (米国特許第4,552,758号：ATCC第VR-2072号、第VR-2073号、第VR-897号)、米国特許第3,953,592号に開示されたインフルエンザA、インフルエンザB (米国特許第3,962,423号：ATC第VR-786号、第VR-791号) およびパラインフルエンザ1 (センダイウィルス) (Cantellら、Meth.Enzymol., 78A:299-301 (1980); ATCC第VR-907号) が含まれる。供与ウィルスはウィルス性病原体でもよく、または天然に得られる弱毒形、細胞培養の連続継代によって產生された弱毒形または組換え体もしくは再組合せ体でもよい。供与ウィルスが必須の抗原性を保持し、該ウィルス性病原体に対して防御することができるということを条件として、いずれのウィルス株も供与ウィルスとして用いることができる。本発明の方法は、弱毒供与ウィルスまたは複製の弱い供与ウィルスについて特に有用である。

本発明の方法によって提供することができるワクチンの幾つかには、ポリオウィルス、麻疹、流行性耳下腺炎、風疹、A型肝炎、インフルエンザ、パラインフルエンザ、日本脳炎、サイトメガロウィルス、HIV、デング熱ウィルス、狂犬病および水痘 - 帯状疱疹ウィ

10

20

30

40

50

ルスに対するヒトワクチンとともに多くの非ヒト動物ワクチンが含まれるが、これらに限定されるものではない。非ヒト動物ワクチンには、例えばネコ白血病ウィルス、ウシ鼻氣管炎ウィルス（赤鼻ウィルス）、牛痘ウィルス、イヌ肝炎ウィルス、イヌジステンパーーウィルス、ウマライノウィルス、ウマインフルエンザウィルス、ウマ肺炎ウィルス、ウマ伝染性貧血ウィルス、ウマ脳炎ウィルス、ヒツジ脳炎ウィルス、ヒツジブルータングウィルス、狂犬病ウィルス、ブタインフルエンザウィルス、およびサル免疫不全ウィルスに対するワクチンが含まれる。前述の記載から明らかなように、本発明の方法はヒトのウィルスに対するワクチン製造に限定されず、非ヒト動物ウィルスワクチンの製造にも等しく適切である。

本発明の他の特徴により、抗ウィルス化合物の活性を評価する方法が提供される。P K R 欠陥細胞ではウィルス複製に対する受容性が高まるために、そのような細胞は抗ウィルス化合物の効能を評価する感度の高いアッセイで役立つ。この特徴では、本発明は、(a) ウィルス、ウィルス感染宿主細胞またはウィルス感染前の宿主細胞を抗ウィルス化合物で処理する工程、及び(b) P K R 欠陥または2 - 5 A 合成酵素欠陥インジケーター細胞培養を感染条件下に曝すことによって、残存する感染性ウィルスの存在をアッセイする工程を有する。

この特徴では、抗ウィルス化合物の検査対象であるウィルスはこの化合物で直接処理できる。この場合、その後感染条件下でP K R 欠陥または2 - 5 A 合成酵素欠陥インジケーター細胞培養を処理ウィルスの一部に曝し、全ての残留感染性ウィルスの複製を可能にするために十分な時間培養し、さらに複製ウィルスの存在についてインジケーター培養を分析することによって残留感染性ウィルスの存在についてこの処理ウィルスを直接分析できる。または、抗ウィルス化合物の検査対象であるウィルスを用いて、宿主細胞培養を感染させることができる。その後感染宿主細胞培養を抗ウィルス化合物で処理する。処理した感染宿主細胞培養の細胞抽出物を通常の技術で調製し、抽出物の一部をP K R 欠陥または2 - 5 A 合成酵素欠陥インジケーター細胞培養に上記のように曝して、残留する感染性ウィルスについて調べる。さらに別の選択肢では、宿主細胞培養は感染後よりむしろウィルス感染前に抗ウィルス化合物で処理してもよい。続いて処理細胞を抗ウィルス化合物の検査対象であるウィルスに感染させて培養し、さらに複製ウィルスの存在について調べる。選択される個々の処理方法は、抗ウィルス化合物の既に分かっている、または想定される作用様に左右され、当業者は容易に決定できるであろう。感染条件下に曝すとは、何らかのウィルスが処理サンプルに存在する場合、欠陥細胞培養の感染を生じる条件下で欠陥を有するインジケーター細胞と処理サンプルの一部（ウィルスまたは感染細胞抽出物のいずれか）とを一緒にすることを意味する。処理サンプルに曝した後、欠陥を有するインジケーター細胞培養をさらに培養し、ウィルス複製について標準的な方法（例えばブラークアッセイまたはT C I D<sub>50</sub>アッセイ、もしくはウィルスR N A またはタンパク質についてノザンまたはウェスタン分析）によってアッセイする。

宿主細胞培養は、抗ウィルス化合物の検査対象であるウィルスによる感染に感受性を有する何れの細胞培養でもよい。インジケーター細胞培養は、抗ウィルス化合物による処理後に残存する感染性ウィルスについてのアッセイに用いられるP K R 欠陥または2 - 5 A 合成酵素欠陥細胞培養である。P K R 欠陥または2 - 5 A 合成酵素欠陥インジケーター細胞培養はワクチン製造について上記で述べたように調製される。欠陥を有するインジケーターを作出する親として適切な細胞は、ワクチン製造のためにP K R 欠陥または2 - 5 A 合成酵素欠陥細胞培養を作出するために有用なものと同じである。また、以下の細胞系もまた適切である。一般にヘパトーマ細胞系、特にH e p G 2 ヒト肝細胞性癌腫（Nature, 282:615-616 (1979) :米国特許第4,393,133号）およびH e p 3 B（米国特許第4,393,133号）である。インジケーター細胞培養もまた、抗ウィルス化合物の検査対象であるウィルスの感染に感受性を有することは明白であろう。宿主細胞培養およびインジケーター細胞培養は同じでも異なっていてもよい。抗ウィルス化合物は、何らかの抗ウィルス活性を有すると思われる何れの化学的または生物学的調製物でもよい。ウィルス自体が抗ウィルス化合物で処理される場合、この化合物は、処理ウィルスに曝してインジケーター細胞培

10

20

30

40

50

養を感染させる前に除去するのがよい。感染宿主細胞培養（または感染前宿主細胞）が抗ウィルス化合物で処理される場合、この化合物は細胞抽出物を調製する前に除去するのがよい。

また別の関連する特徴として、本発明は、ウィルス性病原体を同定する方法および培養する方法を提供する。PKR欠陥細胞のウィルス複製に対する受容性は、培養が困難な極めて低レベルのウィルス、例えば新生児の単球またはリンパ球でのHIVを検出する方法においてそれら細胞を特に有用なものにする。この特徴において、本発明は、(1) ウィルスを含むと思われるサンプルにPKR欠陥または2-5A合成酵素欠陥細胞培養を感染条件下で曝す工程、及び(2)曝露細胞における複製ウィルスの存在についてアッセイする工程を有する。本発明のこの特徴の実施は、抗ウィルス化合物との処理が省略されるという点を除いて前述の特徴の実施と同様である。この特徴では、ウィルスの存在についてアッセイされるべきサンプルは一般に、ウィルスに感染したと疑われる患者の臨床サンプルである。サンプルは、血液、唾液、尿、並びにリンパ節、肺臓、腸、肝臓、腎臓および脳組織の生検サンプルを含む適切な何れの臨床サンプルでもよい。サンプルはウィルス粒子を遊離するために適切に処理されるか（例えば細胞抽出物を調製してもよい）、または患者から得た状態のまま用いてもよい。サンプルまたはサンプルの一部を欠陥を有するインジケーター細胞培養に感染条件下で曝し、全ての複製ウィルスの存在を上記のように測定する。10

上述の工程の特定の例を以下の実施例で説明する。しかしながら、多くの変更が可能であり、さらにこれら実施例は説明のみを目的とし、特に限定されないかぎり本発明を制限するものではないことは当業者には明白であろう。20

#### 実施例

##### 実施例1：プラスミドの調製

それぞれpBS-8.6Rおよびyex6Mから得られる（E.Meurs,K.Chong,J.Galabruら、Cell,62:379-90（1990）；Chongら、EMBO J.,11:1553-1562（1992））野生型ヒトPKR遺伝子および優性で（-）の[Arg<sup>296</sup>]PKR変異体遺伝子に対応するcDNA挿入物を、HindIII消化によって遊離し、G418耐性マーカーを含む構造的真核細胞発現プラスミドであるpRC-CMV（Invitrogen）でサブクローニングした。選別したクローンにおける挿入物の方向性は制限消化分析によって決定し、配列分析（sequencing）（シーケンサーZ.0、USB）によって確認した。この方法によって使用する発現プラスミド、pPKR-AS（ベクター中のCMVプロモーターの制御下でのアンチセンス方向のPKR cDNAを含む）およびp[Arg<sup>296</sup>]PKR（ベクター中のCMVプロモーターの制御下でのArg<sup>296</sup>PKR cDNAを含む）が得られた。30

##### 実施例2：PKR欠陥安定核酸感染体の単離

安定な核酸感染体は、D E A E デキストラン（50mg/ml）含有無血清RPMI-1640中で各プラスミド10mg、ジーンパルサー（Gene Pulser）装置（BioRad）（500μF、250Vに設定）を用いて対数増殖期の $5 \times 10^6$ 個のU937細胞に電気的穿孔を施して得られた。安定な核酸感染体の大集団を、ジェネチシン（geneticin）400μg/ml（GIBCO-BRL）による3週間の選別で得た。限定希釀クローニングにより続いてクローン系を得た。細胞系を10%ウシ胎児血清含有RPMI-1640（完全培養液）およびジェネチシン中で培養した。40

5つの代表的な細胞株系を最初の性状分析のために選別した。“U937-neo”（U9K-Cとも呼ぶ）は親ベクター（pRC-CMV）を核酸感染させたコントロール細胞系であった。“U937-AS1”（U9K-A1とも呼ぶ）および“U937-AS3”（U9K-A3とも呼ぶ）はpPKR-ASを核酸感染させたそれぞれ別個のクローンであった。“U937-M13”（U9K-M13とも呼ぶ）および“U937-M22”（U9K-M22とも呼ぶ）はp[Arg<sup>296</sup>]PKRを核酸感染させたそれぞれ別個のクローンであった。

##### 実施例3：PKR欠陥核酸感染体の性状分析

PKR酵素の結合と活性化のためにポリ(I)：ポリ(C)-セルロースを用いる自己リ50

ン酸化アッセイでPKRキナーゼ活性を測定した。PKR自己リン酸化アッセイは、以下の変更を加えて本質的にはマラン(Maran)らの記載にしたがって実施した。細胞抽出物(1アッセイにつきタンパク質100μg)をポリ(I)：ポリ(C)-セルロースとともに氷上で1時間インキュベートし、3回洗浄し、さらに[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATPを1μCi含む反応緩衝液50μl(20mMのHEPES(pH7.5)、50mMのKC1、50mMの2-メルカプトエタノール、1.5mM酢酸マグネシウム、1.5mMのMnCl<sub>2</sub>)に30℃で30分間インキュベートした。タンパク質を10%SDSポリアクリルアミドゲルで分離し、オートラジオグラフィーで分析した。

IFN処理HeLaおよびマウスL929細胞の細胞抽出物をポジティブ・コントロールとして用いたが、これらの細胞のPKR活性は以前に性状分析してあったからである(Meursら)(図1A、レーン1および8)。U937-neo細胞は低い基底レベルのPKR活性を含み、これはIFN-αによる処理後、増加した(図1A、レーン2および3)。親の非核酸感染U937細胞のPKR活性はU937-neo細胞と同様であった。しかしながら、pPKR-ASまたはp[Arg<sup>296</sup>]PKRプラスミドを核酸感染させた4つの細胞系のいずれにおいてもPKR活性は検出されなかった。さらにまた、IFN-αでこれらの細胞を処理してもPKR活性は回復せず(図1A、レーン4-7)、IFN-αで処理してもまた回復しなかった。

#### 実施例4：PKR欠陥核酸感染体のウェスタン分析

pPKR-AS核酸感染細胞系のPKR発現抑制をさらに確認するために、ウェスタンプロット分析をヒトPKRに対して特異的なモノクローナル抗体を用いて行った。細胞抽出物(100μg)を10%SDS-Polycrylamide gel上で分離し、ニトロセルロース膜に電気的に移した。BLOTTTO(トリス緩衝食塩水に5%無脂肪ドライミルク、0.05%トウイーン20)で1:1000にした抗PKRモノクローナル抗体(Meursら、Cell(1990))とこの膜をインキュベートした。ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス二次抗体(Santa Cruz Biotech)をプローブとして用いかつ化学ルミネセンス法(Amersham ECL)を用いて、PKRを最終的に検出した。

基底レベルのPKRタンパク質はU937-neo細胞(図1B、レーン1)で検出され、IFN-αおよびIFN-βによるその後の処理で増加した(図1B、レーン2および3)。対照的にPKR発現はU937-AS1およびU937-AS3細胞の両方で顕著に減少し(図1B、レーン4および6)、IFN-αによるその後の処理では増加しなかつた(図1B、レーン5および7)。一方、PKRタンパク質はU937-M13およびU937-M22細胞で検出され、変異体[Arg<sup>296</sup>]PKRのタンパク質はウェスタンプロット分析を用いた場合、野生型PKRとは区別できなかった。

#### 実施例5：PKR欠陥細胞でのEMCV複製の強化

IFN系は抗ウイルス反応で主要な役割を果たすので、我々は、PKR機能の消失が脳脊髄炎ウイルス(EMCV)の複製速度に影響を与えるのか否かを調べた。EMCV(ATCC No.VR-1314)のストックはL929細胞で継代して調製された。EMCV複製の判定のために、U937由来核酸感染細胞をIFN群(組換えヒトIFN-α2(Schering)；組換えヒトIFN-β(Amgen))とともに、またはIFN群を添加せずに完全培養液で18時間培養した。PBSで2回洗浄してから細胞をEMCVと共に無血清培養液で2時間インキュベートした。細胞を再度2回洗浄し、1%FCSを含む培養液を補充した。サンプルを必要とする時点で採取し、凍結融解を3回繰り返して細胞を溶解させた。サンプルの4倍段階希釈をL929単層培養に加え、48時間培養し、続いて0.05%クリスタルバイオレットで染色して細胞障害効果および組織培養感染中央値(TCID<sub>50</sub>)を求めた。0.1TCID<sub>50</sub>/細胞のEMCVで攻撃した後コントロールのU937neo細胞系では、ウイルス力価は48時間後に約10<sup>4</sup>TCID<sub>50</sub>/mlのピークに達し、72時間後にそれ以上増加しなかつた(図2A)。しかしながら、U937-AS1およびU937-M22細胞では、EMCV複製は、わずか24時間後に10<sup>4</sup>から10<sup>5</sup>TCID<sub>50</sub>/mlの実質的により高い力価に達し、かつ48時間までに10<sup>8</sup>TCID<sub>50</sub>/mlに達してコントロール細胞で得られたウイルス収量の10<sup>3</sup>から10<sup>4</sup>の増加を示した。より低い0.001TCID<sub>50</sub>/mlの

10

20

30

40

50

接種量を用いた別の実験では、コントロールとPKR欠陥細胞との間でEMCV感受性についてより劇的な相違が観察された(図2B)。このような条件下では、U937-neo細胞でのEMCVの複製は最小で、72時間後でさえ $10^2 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ を越えなかつた。一方、より高い $10^8 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ の力値がU937-AS1およびU937-M22細胞の両方で48時間後に得られた。これらの結果は、インビボでPKR活性を抑圧することによって細胞はウィルス複製に強い受容性を有するようになることを示し、コントロール細胞より1000倍もの増加を示唆する。

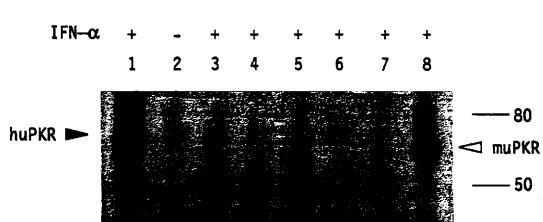
本明細書で述べた全ての刊行物および特許出願は、個々の刊行物および特許出願が具体的にかつ個々に参考により本明細書に含まれるように、参考により本明細書に含まれる。

本発明をこれまでのところで十分に説明してきたが、多くの変更および改変が本発明の範囲を逸脱することなく為しえることは当業者には明白であろう。

10

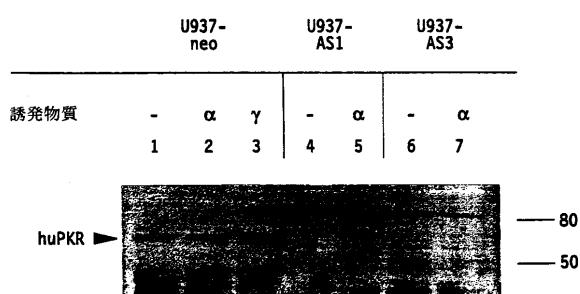
【図1A】

FIG. 1A



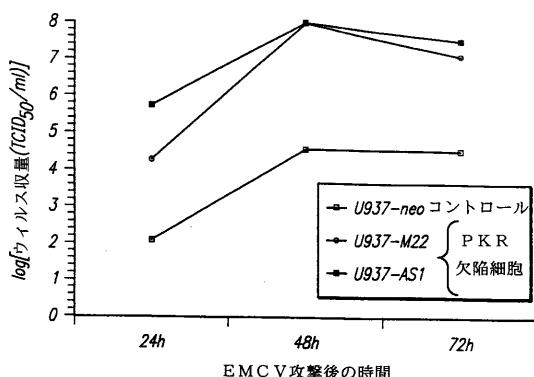
【図1B】

FIG. 1B



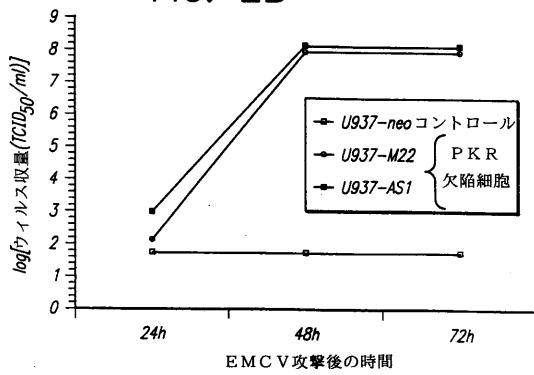
【図2A】

FIG. 2A



【図2B】

FIG. 2B



---

フロントページの続き

(72)発明者 ロウ、アラン、エス.

アメリカ合衆国 94110 カリフォルニア州 サンフランシスコ ポトレロ アベニュー 1  
001 ユニバーシティ オブ カリフォルニア デパートメント オブ ペティアトリックス  
ルーム 6イー6 エスエフジーエイチ

審査官 濱下 浩一

(56)参考文献 国際公開第93/020188 (WO, A1)

Science, 1988, Vol.69, pp.789-792

JOURNAL OF VIROLOGY, 1992, Vol.66, No.10, pp.5805-5814

Vaccine, 1985, Vol.3, pp.333-339

JOURNAL OF VIROLOGY, 1992, Vol.66, No.8, pp.5059-5066

JOURNAL OF INTERFERON RESEARCH, 1994, Vol.14, pp.5529-5534

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/12

A61K 39/145

A61K 39/205

C12N 5/06

C12Q 1/70

BIOSIS(STN)

CAplus(STN)

EMBASE(STN)

MEDLINE(STN)