

計畫編號：DOH95-DC-1410

行政院衛生署疾病管制局九十五年度科技研究發展計畫

改良哺乳動物細胞以增加流行性感冒病毒
(疫苗株)之產量

計畫名稱

研究報告

執行機構：財團法人國家衛生研究院

計畫主持人：徐祖安

研究人員：

執行期間： 95年 01月 01日至 95年 12月 31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目 次

頁 碼

封面

目次

一、中文摘要	(2)
二、英文摘要	(3)
三、前言	(4)
四、材料與方法	(8)
五、結果	(12)
六、討論	(16)
七、結論與建議	(18)
八、計畫重要研究成果及具體建議	(19)
九、參考文獻	(20)
十、圖、表	(22)
十一、審查意見	(29)

共 (31) 頁

一、中文摘要:

關鍵詞：流行性感冒病毒、疫苗、受器、唾液酸、小分子化合物篩選

利用哺乳動物細胞來生產流行性感冒病毒疫苗時，最主要的問題就是病毒產量不夠高。為了解決這樣的問題，本研究計劃希望改變哺乳動物細胞，使得流感病毒於其中複製繁殖的產率能被提升。本研究計劃分成兩個部分，首先我們預計在哺乳動物細胞表面增加 α 2,3 連結型式之醣蛋白末端唾液酸的量以期能幫助禽流感病毒感染細胞。結果顯示 ManNAc 的添加的確會提高細胞內生成唾液酸前趨物的含量，進而提高了分佈於細胞表面的受器之含量。但是，NIBRG-14 並沒有辦法在其感染受器提升後進而明顯提高在哺乳類動物細胞生產的產量，因而在第二年的計畫中，我們將著眼於第二部份之發展。而由第二部份的工作項目中，我們已從 2000 個具有生物活性的小分子化合物庫中，篩選出能夠幫助病毒在哺乳動物細胞內繁殖的化合物。結果顯示我們的研究不但成功的建立了小分子化合物的篩選系統，更成功的找到了數個具有潛力可以幫助流感病毒複製的小分子化合物。藉由這個策略，我們相信在未来可以達到增加病毒於哺乳動物細胞內產量之目標。

二、英文摘要:

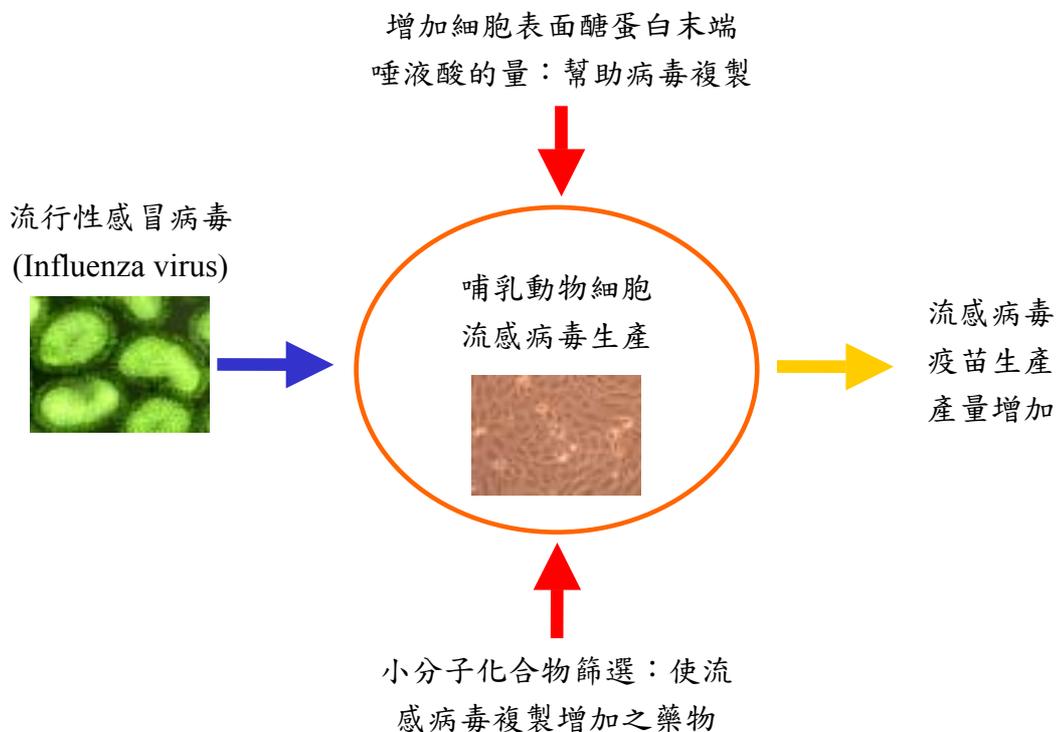
Keyword: influenza virus, vaccine, receptor, sialic acid, compound screening._____

The yield of Flu vaccine production in mammalian cells is unsatisfactorily low for economic manufacturing process. To improve this problem, our group attempted to develop methods to enhance the production yield for influenza virus in mammalian cells. In the first part, we hypothesized that the replication of avian influenza virus (NIBRG-14 vaccine strain) may be improved if the level of glycans with the α -2,3-linked sialic acid terminal. Results showed that the level of α -2,3- sialic acid on cell surface could indeed be increased when cells were cultured in medium supplemented with the metabolic precursor of sialic acid, i.e., ManNAc. We have observed that, when the viral titer yield was low in the control experiment, ManNAc supplementation could help to produce higher titer. However, the effect of ManNAc supplementation became invalid when the virus titer yield was high. The reason of these phenomena is currently under investigation. Alternative, a second approach was also undertaken to screen a chemical compounds for enhancers of influenza virus production in mammalian cells. From the 2,000 compounds that we screened, there are several potential compounds that can be used to increase the production yield of influenza virus in mammalian cells. We are currently investigating the optimal doses for these chemical enhancers to be used to facilitate influenza virus vaccine production

三、前言:

全程計劃總目標：利用改變哺乳動物細胞來提高流感病毒生產之產量 (圖一)。

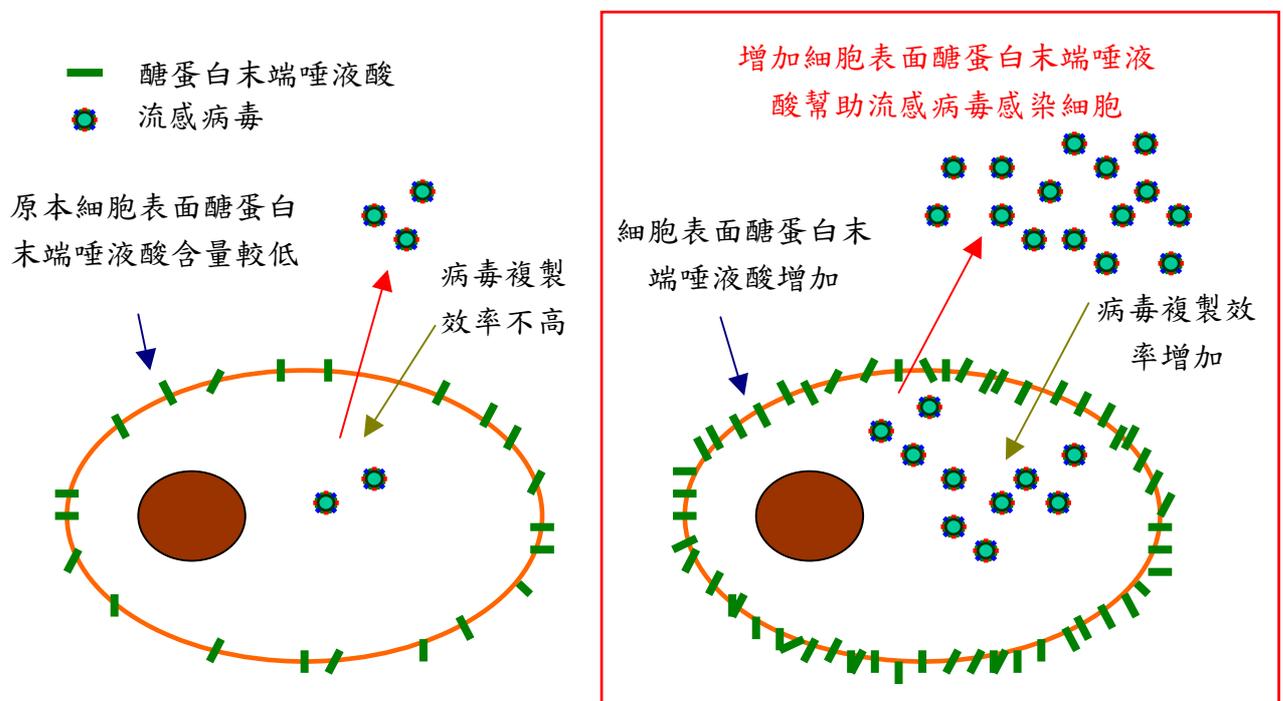
- (1) 在 MDCK 和 Vero 細胞表現人類 ST3Gal IV 轉移酶以及 UDP-GlcNAc2 異構酶，藉由增加醣蛋白末端以 $\alpha 2,3$ 連結型式之唾液酸的量，以期能幫助禽流感病毒的產量。
- (2) 建立對流感病毒影響之小分子化合物篩選系統，以 2000 個具有生物活性之化合物來篩選出對於流感病毒複製有幫助的小分子化合物。



圖一、幫助哺乳細胞生產流感病毒之策略。

細胞表面的醣蛋白 (glycoprotein) 末端唾液酸 (sialic acid) 是流感病毒(influenza virus)辨識的受器，當病毒表面的凝集素 (hemagglutinin ; HA) 辨識到細胞表面醣蛋白末端唾液酸時，會經由凝集素與細胞膜結合以進入細胞進行病毒的複製(Connor et al. 1994; Goto and Kawaoka 1998)，所以一般認為細胞表面的唾液酸會造成病毒感染效率的不同(Couceiro *et al.* 1993;

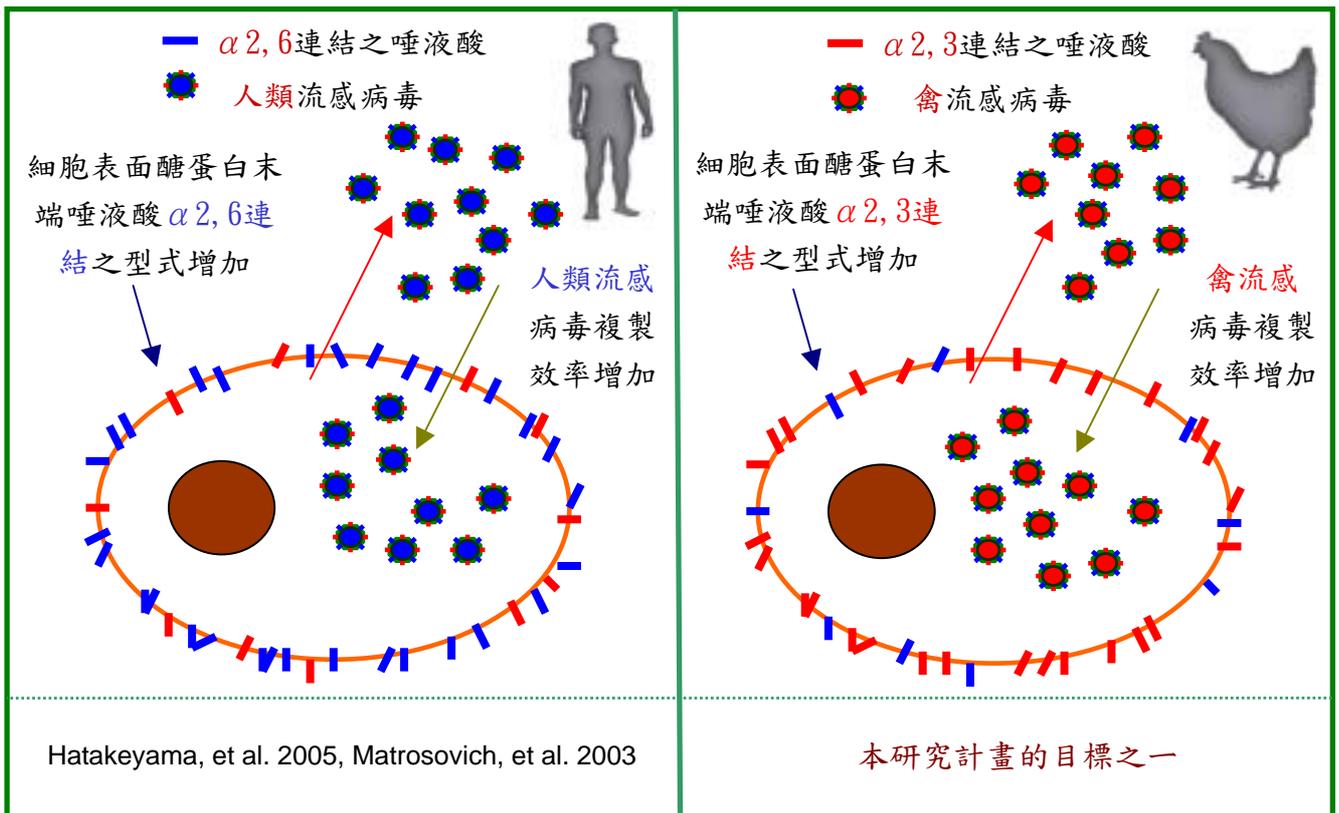
Matrosovich *et al.* 2004)。細胞表面的醣蛋白末端唾液酸的前驅物是 CMP-NeuAc (於文獻中，NeuAc、*N*-acetylneuraminic acid 與 sialic acid 經常交互使用於唾液酸的表示) 藉由唾液酸轉移酶 (sialyltransferase) 進行轉移作用而來的。Keppler 等人於 1999 年發表在 science 期刊的研究發現，許多哺乳動物細胞內的 UDP-GlcNAc2 異構酶 (UDP-GlcNAc2 epimerase) 是調控 CMP-NeuAc 生合成速率決定步驟的關鍵酵素(Keppler *et al.* 1999)。當 UDP-GlcNAc2 異構酶被大量表現在細胞時，會造成細胞內 CMP-NeuAc 的量上升，進而造成細胞表面醣蛋白末端唾液酸的量增加 (Keppler *et al.* 1999; Oetke *et al.* 2003) (圖二)。



圖二、細胞表面的醣蛋白末端唾液酸增加以幫助流感病毒感染。

除此之外，唾液酸鍵結於細胞表面醣蛋白末端的型式亦會對病毒的辨識有所影響，現在所了解的是 NeuAc α 2,3Gal (α 2,3 連結之型式) 對於禽流感病毒是比較好的受器，而人類的流感病毒則是較容易與 NeuAc α 2,6Gal (α 2,6 連結之型式) 結合(Connor *et al.* 1994; Rogers and Paulson 1983)。所以，若是增加整體細胞表面的醣蛋白末端唾液酸的量，即可讓病毒感染細胞效率更加好；而若是改變唾液酸鍵結的型式，更可能使得細胞對於病毒的適合性產生改變

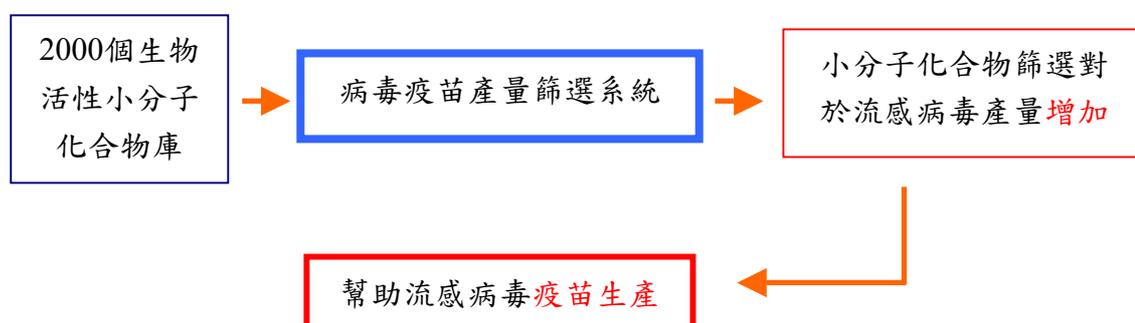
(圖三)。Hatakeyama 的研究團隊證明了在 MDCK 細胞內表現人類 ST6Gal I 轉移酶 (β -galactoside α 2,6-sialyltransferase I)，可以增加細胞表面的 NeuAca2,6Gal 大約 50 % (圖三左)，並使得人類流感病毒的量增加數倍到數十倍 (Hatakeyama et al. 2005)。在這樣的基礎之下，我們計劃利用類似的策略，在動物細胞內 (MDCK and Vero)表現 ST3Gal IV 轉移酶，即可得到對於禽流感病毒複製繁殖有幫助的穩定哺乳動物細胞株 (圖三右)。



圖三、唾液酸鍵結於細胞表面醣蛋白末端的型式對流感病毒感染細胞之影響。

許多抗病毒藥物都是經由大量的篩選而找到的，而篩選出的小分子化合物除了可能可以直接對疾病進行治療之外，還能夠進一步研究對於標的物 (target) 作用的機制進而分析出對抗疾病的方法 (De Clercq 2004; Joerger et al. 2004; Undevia et al. 2005)。但是在篩選抗病毒藥物的過程中，研究者卻反而常得到一些對於病毒複製、生長有幫助的化合物。例如 Chisari 的研究團隊就提出了 C 型肝炎病毒 (Hepatitis C virus; HCV) 的複製繁殖會因為一些脂肪酸 (Fatty acid) 的存在於細胞培養基中而增加 (Kapadia and Chisari 2005)。除此之外，許多的研

究也發現，某些化合物的確會在病毒複製的過程中扮演幫助的角色。可能作用在病毒本身，也可能是作用在細胞而間接幫助病毒複製 (Berthoux *et al.* 2003; Simon *et al.* 1994)。例如 Svitkin 的團隊發現細胞內 PI3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase) 抑制劑；Rapamycin 以及 Wortmannin，會藉由抑制細胞內 PI3 激酶來幫助 Encephalomyocarditis Virus 在細胞中的複製 (Svitkin *et al.* 1998)。此外 5-azacytidine (為一種 DNA 甲基化反應的抑制劑) 也被 Hotta 等人證明可以提高人類 spumavirus 在 RA 細胞內產量達 100 倍左右 (Hotta and Loh 1987)。基於這樣的觀念與經驗，我們將建立小分子化合物對流感病毒影響之篩選系統，預計利用 2000 個具有生物活性以及結構分歧的小分子化合物 (The Spectrum Collection™) 進行篩選，希望藉此篩選方式找到一些對於流行性感冒病毒的生長複製有幫助的化合物，而這些化合物就有機會可以運用在進行流感病毒疫苗的生產程序中來幫助病毒疫苗的產量增加(圖四)。此外，對於流感病毒生長複製有抑制效果的化合物也將會是我們的興趣，因為這樣的化合物也可能是有潛力的抗流感病毒藥物。



圖四、小分子化合物流感病毒篩選流程。

因此，我們將設計一系列的實驗來得到能夠穩定幫助流感病毒生產的哺乳動物細胞株，利用此改良細胞株來提高流感病毒的生產量，並篩選出對於流感病毒生長複製有幫助的小分子化合物。在結合這些策略之後，希望能提供一個可用於工業化生產流感病毒疫苗的哺乳動物細胞株。也預期在動物實驗中看到所生產的去活化病毒疫苗能夠引起實驗小鼠的免疫反應，進而成功抵抗流感病毒的感染。

四、材料與方法:

質體建構與轉染(transfection)

人類 ST3Gal IV 轉移酶以及 UDP-GlcNAc2 異構酶 DNA 片段分別以引子 (primer) 5'ATG GTC AGC AAG TCC CGC TGG 3'、5'TCA GAA GGA CGT GAG GTT CTT 3' 以及 5'ATG GAG AAG AAT GGA AAT AAC 3'、5'CTA GTA GAT CCT GCG TGT TGT 3'，藉 PCR 由人類 cDNA library 放大後轉殖到 pcDNA3.1(+)載體 (Invitrogen)。MDCK 以及 Vero cell 培養於 MEM 培養基 (Sigma) 或是無血清培養基 (Serum-free Medium; Sigma) 中，放置於 37 °C、5% CO₂ 培養箱中，每 3-4 天進行繼代培養。當細胞進行轉染時，先將細胞 (4×10^5) 培養於 6 孔培養盤 (6-well) 中，經約 24 小時生長至七分滿後，以 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 將質體轉染至細胞內，24 小時後加入 G-418 (Sigma) 進行細胞株篩選。

細胞與禽流感病毒的培養以及去活化

培養 MDCK 的培養基為添加了 10%胎牛血清的 DMEM 培養基，而培養 Vero 細胞的培養基為添加了 10%胎牛血清的 M199 培養基。MDCK 及 Vero 細胞培養於 37°C、5% CO₂ 的培養箱中，一般培養於 T-75 培養盤。在培養禽流感病毒(NIBRG-14)時，MDCK 及 Vero 細胞培養於 6 孔培養盤。每孔貼附了 5×10^5 的細胞，隔夜培養於 37°C、5% CO₂ 的培養箱中，爾後進行 NIBRG-14 的感染。感染時將含有血清的培養基吸去，爾後以 PBS (pH 7.4) 將每孔中殘餘的含有血清的培養基洗清，再加入 0.5 毫升含有 NIBRG-14 的無血清培養基，於 34°C、5% CO₂ 的培養箱中進行感染 1 個小時，期間每 15 分鐘平緩的搖晃培養盤一次。最後將含有 NIBRG-14 的無血清培養基吸去，加入 2.5 毫升的無血清培養基，然後於 34°C、5% CO₂ 的培養箱中進行病毒的培養。同時也進行一組實驗，並未以 PBS (pH 7.4) 將含有血清的培養基洗清，使得感染過程中含有少量血清，進行 NIBRG-14 的培養。去活化時，將含有病毒的細胞培養液收集後，以 0.02% formaldehyde 以等體積加入，於 37°C 中放置一個小時，完成去活化的步驟。

Vero-ST3 穩定細胞株的建立

將 5×10^5 Vero 細胞貼附於 6 孔盤上，利用 lipofectamin™ 2000 將帶有 ST3GalIV 的質體轉染進 Vero 細胞。爾後以 5 mg/ml G418 進行篩選，待沒有轉染質體 (pcDNA3.1-ST3GalIV) 的實驗組 Vero 細胞死亡後(約一星期)，利用序列稀釋的方法於 96 孔盤挑選出含有 ST3GalIV 基因的 Vero 細胞，命名為 Vero-ST3 細胞。並進行細胞的放大，進行病毒感染實驗。

以流式細胞儀分析分佈於細胞表面上的 α -2,3-linked 唾液酸

將細胞於培養瓶中收集下並以 PBS (pH 7.4) 洗清後，在室溫環境下，以 biotinylated MAAII (Maackia Amurensis II) lectin 來標定細胞表面上的 α -2,3-linked 唾液酸。一小時過後，以 PBS (pH 7.4) 將樣品洗清後，再以有鍵結 fluorescein isothiocyanate (FITC) 的 streptavidin 標定細胞表面上的 biotin。最後，再以流式細胞儀分析。

化合物與病毒之反應平台

進行化合物稀釋，並使小分子化合物中所含 DMSO 最終含量 0.5~1%。依之前病毒定量的結果，進行病毒液稀釋，加入 150ul 之病毒稀釋液至已培養完成之 MDCK 細胞。加入 50ul 含不同化合物濃度之 DMEM 培養基，於 35°C、5% CO₂ 培養箱中培養 64 小時備用。分別收集病毒培養液，以進行 TCID₅₀。加入福馬林使病毒去活化，收集病毒樣品，進行神經氨酸酶 (NA)、血球凝集試驗(Hemagglutination Assay)之分析偵測病毒產量。

神經氨酸酶 (Neuraminidase; NA) 活性檢測

螢光偵測方法：NA 的活性由 4-methylumbelliferyl-*N*-acetyl- α -D-neuraminic acid (MU-NANA) 為基質以螢光的方法的分析。將 20 μ l 的去活化過後的病毒液加入 20 μ l 的 MU-NANA，置於 37°C，一個小時。爾後加入停止反應溶劑(0.14N NaOH in 83% EtOH)停止反應。反應所釋放出的螢光物質(4-MU)即可以螢光(Ex 365nm, Em 450nm)檢測 NA 活性。

冷光偵測方法：參照 McKimm-Breschkin et al 之方法，取 40 ul 之稀釋病毒液與 10 ul 之冷光反應基質作用，於 37°C 反應 15 分鐘，隨即加入 50ul 之 Light Accelerator，直接以冷光儀

讀取其讀值。

凝血素 (Hemagglutinin; HA) titer 檢測

於 V 形 96 孔盤加入 50 μ l 去活化後的病毒液，並以 2 倍的稀釋倍率系列稀釋，然後加入 50 μ l 的 0.5% 火雞血，於室溫下放置 40 分鐘。HA titer 值即為能造成 hamegglutination 最大的稀釋倍率。

病毒定量 (Virus titer)

取 96 well plate 於每個 well 中，加入 DMEM 培養基。將預進行定量之病毒取 80ul 加到第一排(A1-H1)，取 80ul 病毒混合液至下一排，進行稀釋依此進行 0.5 log 的序列稀釋。取 150ul 稀釋完成的病毒依其相對位置加到 96 well plate MDCK 細胞，加入 50ul DMEM 培養基，於 35°C、5% CO₂ 培養箱中培養 64 小時備用。加入福馬林固定以結晶紫染色觀察細胞脫落的狀況，以細胞完全脫落之最高稀釋倍數，作為之後使用之病毒稀釋倍數。

Plaque forming unit (PFU)之測定

細胞 (1×10^6) 培養於 6 孔培養盤 (6-well) 中，經約 24 小時生長至九分滿後，將培養液吸掉以 PBS 清洗兩次，每個 well 加入含有 trypsin (20 ug/ml) 之培養基以 10 倍序列稀釋病毒液 500 μ l，置於 35 °C 及 5 % CO₂ 之培養箱中 2 小時 (每 15 分鐘均勻搖晃一次)，再以 PBS 清洗，加入含 2 % 胎牛血清、1 倍 DMEM、0.3 % agarose，待凝固後置於 35 °C 培養箱中培養四天後，直到有病毒斑形成後，加入 10 % 福馬林固定細胞 2 小時，吸掉福馬林以 0.5 % 結晶紫染色，計算 plaque formation unit (PFU) (Youil *et al.* 2004)。

TCID₅₀ (Tissue Culture Infecting Dose 50)之計算(Reed-Muench method)

要測定力價之病毒作 10 倍序列稀釋，每個稀釋接種 8 面 (或管) 的 MDCK 組織細胞，每面 (管) 接種量 0.1 ml，每天觀察有無 CPE (Cytopathic Effect) 或 Syneytium 發生 (二者為病毒發育之表徵)，連續觀察 7~10 天 (或是觀察到病毒發育至最大限量為止)。其計算法如下表一：

表一、CPE 之測定

病毒稀釋	觀察所得		累積值		感染率 CPE/總和	感染百分率 (%)
	有 CPE	無 CPE	有 CPE	無 CPE		
10 ⁻¹	8	0	25	0	25/25	100
10 ⁻²	8	0	17	0	17/17	100
10 ⁻³	7	1	9	1	9/10	90
10 ⁻⁴	2	6	2	7	2/9	22
10 ⁻⁵	0	8	0	15	0/15	0

90 (高於 50 % 之感染率) - 50 / 90 (僅高於 50 % 之感染率) - 22 (僅低於 50 % 之感染率) = 40 / 68 = 0.6

由以上公式求得 0.6 加到僅高於 50 % 感染率稀釋指數 (此例中為 10⁻³) 得 10^{-3.6} 即為病毒作 10^{-3.6} 稀釋後每 0.1 ml 含 1 TCIP50，亦即該病毒之力價為 10^{-3.6} / 0.1 ml。

五、結果:

Part I - 建立穩定幫助流感病毒生產之哺乳動物細胞株

在先前的報告我們已經證明了添加 ManNAc 於細胞培養液對生成唾液酸的前趨物，CMP-sialic acid，有顯著的幫助。為了找到最適的添加濃度，我們利用 MTS 來檢測添加 ManNAc 到細胞後是否會影響細胞的生長做一測試（圖一），結果顯示最高我們可添加 100 mM ManNAc，而不會影響細胞(MDCK 及 Vero)的生長。於是，我們進一步的觀察在添加了 ManNAc 後，細胞表面上流感病毒的受器(即唾液酸)的分佈，也利用了流式細胞儀來測定。結果顯示 MDCK 細胞在添加 ManNAc 後，細胞表面上的 α -2,3-linked 唾液酸分佈隨著 ManNAc 添加量的提高而有明顯所增加(圖二)。結果顯示，在 100mM ManNAc 的添加可達到最佳的 MDCK 細胞表面唾液酸的提高，可提高約 70%的細胞表面唾液酸。同樣的，ManNAc 的添加對 Vero 細胞也可觀察到細胞表面唾液酸有顯著的提升。

於是，我們在以 MDCK 及 Vero 細胞培養禽流感病毒(NIBRG-14)的過程中添加 ManNAc，了解 ManNAc 的添加是否會對 NIBRG-14 的產量有所提升。在我們初步的實驗中顯示，於培養病毒過程中，有少量的胎牛血清存在下(即培養 NIBRG-14 時，未將培養細胞時含有血清的培養基洗清，而直接以無血清的培養基培養)，NIBRG-14 的產量於添加了 100mM ManNAc 後，NA 活性、HA5 蛋白質表現量及 HA titer 的結果顯示 NIBRG-14 的產量有約十倍的提升(圖三及表一)。但是，由於血清會抑制 trypsin 切 HA 而分成兩個片段，HA1 及 HA5，使得流感病毒具有感染性。於是，在有少量的胎牛血清的培養條件下，NIBRG-14 的產量相當的低。然而，在培養病毒前將血清以 PBS 洗清後，所得到的 NIBRG-14 其 HA titer 值可到達 128，比沒有將血清洗淨時大了 16 倍，產量上有相當顯著的差異。可是，在沒有血清的影響下，MDCK 及 Vero 細胞培養液中添加了 ManNAc 後，由 NA 活性及 HA titer 來看，NIBRG-14 的產量並無明顯的差異(圖四及表二)。推究兩種培養條件下造成結果不同的原因，有可能是在有血清時，血清內可能含有抑制流感病毒複製的物質，且血清會抑制 trypsin 的活性。使得在培養病毒時，由於病毒的複製不易，整個病毒的感染過程中主要都是在感染的初期，亦即病

毒黏結受器(唾液酸)進入細胞的過程。所以我們會觀察到 NIBRG-14 的產量於有血清的培養情形下，且添加了 ManNAc 後，會有明顯的提升。

在建立穩定細胞株(stable cell lines)來生產流感病毒方面，我們已成功的挑選了七株含有 ST3GalIV 的 Vero 細胞(Vero-ST3)。ST3GalIV 為轉移酶，可將唾液酸的前趨物，CMP-sialic acid，轉移到 N-linked 糖基上，使得 N-linked 糖基上的末端含有唾液酸，而成為流感病毒進入細胞的受器。同樣地，為了解相較於 Vero 細胞，Vero-ST3 細胞表面上的唾液酸是否有所提升，我們也利用了流式細胞儀分析細胞表面上唾液酸的分佈。由圖五可明顯的看出，分佈於 Vero-ST3 的唾液酸相較於 Vero 細胞，的確有明顯的提高。但是，如同添加 ManNAc，相較於 Vero 細胞病毒的產量在 Vero-ST3 細胞中並沒有明顯的差異。由圖六可看出，NIBRG-14 於 Vero-ST3 細胞中的培養，也在有少量的血清存在下進行，病毒產量由 NA 活性及 HA titer 看來，是有十倍以上的提升。但是將血清洗清後，病毒的產量由 NA 活性及 HA titer 看來就沒有明顯的差異(圖七及表三)。其原因可能如同添加 ManNAc 的效應，即為提高流感病毒受器含量並無法使得流感病毒產量提高，無法有效達成我們目標。而於第二年計畫中，將努力完成第二部份的工作項目。

Part II - 篩選出對於流感病毒複製有幫助的小分子化合物

在這計畫執行期間，我們成功的建立小分子化合物對流感病毒影響之篩選系統 (圖八)，並利用 2000 個具有生物活性以及結構分歧的小分子化學藥物 (The Spectrum Collection™) 進行篩選，並藉此篩選方式找到一些對於流行性感冒病毒 NIBRG-14 的生長複製有幫助的化合物，而這些化合物就有機會可以運用在進行流感病毒疫苗的生產程序中來幫助病毒疫苗的產量增加。

以我們所建立小分子化合物對流感病毒影響之篩選系統，2000 個具有生物活性以及結構分歧的小分子化合物進行篩選結果如圖九所示 (冷光偵測系統)。在篩選的過程中，將細胞與小分子化合物共同培養於 96 well 系統，收取上清液分析。利用快速靈敏的冷光方法偵測神經氨酸酶(NA)以定量病毒之產量，發現於 2000 個化合物中確實存在不同程度增強病毒神經氨酸酶表現的能力。其中大於兩倍以上的化合物就有 64 個，所篩選之小分子對 NIBRG-14 產量有增加的效果就其中病毒神經氨酸酶表現較高者，進行血球凝集試驗 (Hemagglutination Assay) 之分析與 TCID50 之測定 (如表四)。而由血球凝集試驗結果，編號 DBPR NO.3、DBPR NO.5、DBPR NO.6 與 DBPR NO.9 之 HA 表現都較病毒對照組高。而半定量病毒產量-TCID50 分析測定結果，亦發現有這些化合物確實具有增強 NIBRG-14 複製之功能，結果顯示我們成功的篩選出對於流行性感冒病毒的生長複製有幫助的化合物。

除了以冷光偵測篩選系統之外，我們亦建立了螢光偵測系統 (Enzyme Based MU-NANA assay) 來確認平台篩選之結果。接著針對這些化合物進行增加病毒生產之 Dose dependent 分析，確認這些化合物最適當之作用濃度。結果如圖十，發現 DBPR NO.5、DBPR NO.6 與 DBPR NO.9 於 50 μ M 會有較佳的促進病毒生產之效果。因此爾後之分析與實驗所使用的化合物濃度將設定在 50 μ M，並將對這些小分子化合物進行後續的不同濃度組合及特性分析。

另外我們亦嘗試以添加這些病毒複製之增強劑於 T75 Flask 進行流感病毒的試產，初期我們依照篩選平台進行試產，所使用的感染 MOI 為 2.5，雖於產量上有相對提高，但此條件並不適用於病毒生產，因以較高濃度感染病毒會造成所生產的病毒基因表現與病毒蛋白質表現

缺失，即出現所謂的 Defective virus particle(缺陷病毒)。透過病毒班形成實驗我們亦發現所生產的病毒所形成的病毒班數量確實較低，雖然此類的病毒依舊具有引發免疫之抗原性，但其所引發的後續之影響恐怕會有疑慮。因而我們修正培養條件為 0.0001 MOI，添加病毒複製之小分子化合物-DBPR NO.6 於 T75 Flask 進行流感病毒的試產，經過感染時間 72 小時之後，我們進一步分析病毒培養液中的神經氨酸酶(NA)以定量病毒之產量，進行血球凝集試驗(Hemagglutination Assay)分析確認 HA 效價與病毒班形成數目定量病毒之產量。由表五發現，於此生產病毒條件下，其神經氨酸酶(NA)與 HA 效價均顯示，添加病毒複製之增強劑者會較未添加增強劑高。NA 表現前者較後者高出近兩倍，而 HA 效價前者較後者高兩倍，進一步以病毒班形成測定病毒產量結果前者較後者高出將近七倍，因而確認此一小分子化合物 DBPR NO.6 具有增強病毒複製之能力。且由不同感染時間分析病毒班數量測定病毒產量結果(如圖十一)，添加病毒複製之增強劑後，於 72 小時的生產之後可得到較高的病毒產量。

六、討論:

Part I - 建立穩定幫助流感病毒生產之哺乳動物細胞株

這部分的實驗結果顯示 ManNAc 的添加的確會提高細胞內生成唾液酸前趨物的含量，進而提高了分佈於細胞表面的受器之含量。但是，NIBRG-14 並沒有辦法在其感染受器提升後而提高在哺乳類動物細胞生產的產率。原因可能是我們所使用的生產疫苗病毒株，NIBRG-14，已是一株非常容易培養的病毒。而且，我們用來感染的 NIBRG-14 已在 MDCK 細胞中馴化數代，使得其更為容易在細胞內複製及生長。是故我們的策略，即利用 ManNAc 的添加提高流感病毒受器含量使得流感病毒產量提高，無法有效的達成目的。但是，我們相信此一策略對於臨床上一些較難複製或培養的流感病毒株的培養，會有相當的幫助；亦即，於 Pandemic Flu Vaccine Preparedness 的過程，若 Vaccine strains 於細胞株中的產量太低時，仍應考慮於細胞培養基中添加 ManNAc，提高流感病毒受器含量，以期流感病毒產量能夠提高。

在穩定細胞株方面，利用 Vero 細胞來建立能表現 ST3GalIV 的 Vero-ST3 細胞株無法成功有效的提高 NIBRG-14 的產量，故此表現 ST3GalIV 的 Vero-ST3 細胞株確定不適用於 NIBRG-14 的流感疫苗之生產。

Part II - 篩選出對於流感病毒複製有幫助的小分子化合物

在篩選對於流感病毒複製有幫助的小分子化合物的部分，我們非常成功的建立了小分子化合物對流感病毒影響之篩選系統，而此平台有效縮短操作與篩選的時間，確實促進我們找尋小分子化合物增強劑，因而除了 2000 個化合物外，亦可進行其他化合物之篩選，以期找到更佳的病毒繁殖促進劑。系統篩選所得之 NA 相對表現量與 HA 相對表現量均顯示化合物 DBPR NO.3、DBPR NO.5、DBPR NO.6 與 DBPR NO.9 具有可增強 NIBRG-14 複製潛力。複製之增強劑 DBPR NO.6 於 T75 flask 進行流感病毒的試產，經過感染時間 72 小時之後，NA 高出近兩倍，而 HA 效價高兩倍，病毒班形成分析測定病毒產量高出將近七倍。因而於未來的實驗裡，我們將繼續確認這些可以幫助 NIBRG-14 的複製的小分子化合物並進行試產分析。

這部分的實驗成果期許對於疫苗生產的過程有幫助，我們相信對於 Pandemic Flu Vaccine Preparedness 的過程一樣也有益處。也就是說對於臨床上一些較難複製或培養的流感病毒株，可以使用這些有潛力的小分子化合物來增加病毒的產量。

七、結論與建議:

Part I - 建立穩定幫助流感病毒生產之哺乳動物細胞株

1. 添加 ManNAc 的確會提高細胞內生成唾液酸前趨物的含量，進而提高了分佈於細胞表面的受器之含量。但 NIBRG-14 並沒有因為在其感染受器提升後而明顯提高在哺乳類動物細胞內的產量。
2. Vero 細胞能穩定表現 ST3GalIV 的 Vero-ST3 細胞株無法有效的提高 NIBRG-14 的產量故此表現 ST3GalIV 的 Vero-ST3 細胞株確定不適用於 NIBRG-14 的流感疫苗之生產。
3. 故第二年之計畫方向也將集中於第二部分之發展。

Part II - 篩選出對於流感病毒複製有幫助的小分子化合物

1. 在篩選對於流感病毒複製有幫助的小分子化合物的研究中，我們非常成功的建立了小分子化合物對流感病毒影響之篩選系統。
2. 在冷光系統篩選之後，發現化合物 DBPR NO.3、DBPR NO.5、DBPR NO.6 與 DBPR NO.9 具有增強 NIBRG-14 的複製潛力。
3. DBPR NO.6 於 T75 flask 進行流感病毒的試產，經過感染時間 72 小時，NA 高出近兩倍，而 HA 效價高兩倍，病毒班形成分析測定病毒產量結果提高將近七倍。
4. 就以上之結論，我們將儘速了解篩選出的小分子對病毒複製之影響，並進行其動物實驗免疫效應之測試，以判斷其應用價值。

八、計畫重要研究成果及具體建議:

由於小分子化合物篩選的結果發現了數個非常有潛力的化合物，所以未來我們將努力將測試各種感染與化合物處理條件以進行放大病毒生產最適化分析。期望在本年度的第四季實驗中達到開始進行試產去活化流感 H5 原型疫苗的目標，更進一步的在未來開始進行小鼠免疫力試驗。確認可增加流行性感冒病毒產量之化合物，並測量其最適使用濃度以探討所生產之病毒的抗原性。此外，亦將進一步探討化合物之間之加乘性，以期找出可提高流感病毒複製化合物之最佳組合。

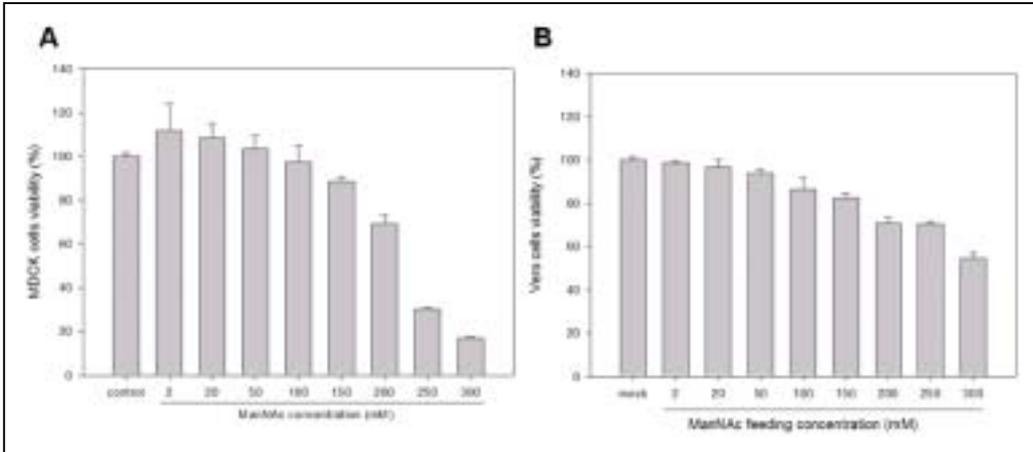
九、参考文献:

- Berthoux L, Towers GJ, Gurer C, Salomoni P, Pandolfi PP, Luban J. 2003. As(2)O(3) enhances retroviral reverse transcription and counteracts Ref1 antiviral activity. *J Virol* 77(5):3167-80.
- Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC. 1994. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 205(1):17-23.
- Couceiro JN, Paulson JC, Baum LG. 1993. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res* 29(2):155-65.
- De Clercq E. 2004. Antivirals and antiviral strategies. *Nat Rev Microbiol* 2(9):704-20.
- Goto H, Kawaoka Y. 1998. A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(17):10224-8.
- Hatakeyama S, Sakai-Tagawa Y, Kiso M, Goto H, Kawakami C, Mitamura K, Sugaya N, Suzuki Y, Kawaoka Y. 2005. Enhanced expression of an alpha2,6-linked sialic acid on MDCK cells improves isolation of human influenza viruses and evaluation of their sensitivity to a neuraminidase inhibitor. *J Clin Microbiol* 43(8):4139-46.
- Hotta J, Loh PC. 1987. Enhanced production of a human spumavirus (Retroviridae) in semi-permissive cell cultures after treatment with 5-azacytidine. *J Gen Virol* 68 (Pt 4):1183-6.
- Joerger M, Schellens JH, Beijnen JH. 2004. Therapeutic drug monitoring of non-anticancer drugs in cancer patients. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 26(7):531-45.
- Kapadia SB, Chisari FV. 2005. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(7):2561-6.
- Keppler OT, Hinderlich S, Langner J, Schwartz-Albiez R, Reutter W, Pawlita M. 1999. UDP-GlcNAc 2-epimerase: a regulator of cell surface sialylation. *Science* 284(5418):1372-6.
- Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. 2004. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(13):4620-4.
- Oetke C, Hinderlich S, Reutter W, Pawlita M. 2003. Epigenetically mediated loss of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase expression in hyposialylated cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 308(4):892-8.
- Rogers GN, Paulson JC. 1983. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* 127(2):361-73.
- Simon G, Moog C, Obert G. 1994. Effects of glutathione precursors on human immunodeficiency virus replication. *Chem Biol Interact* 91(2-3):217-24.

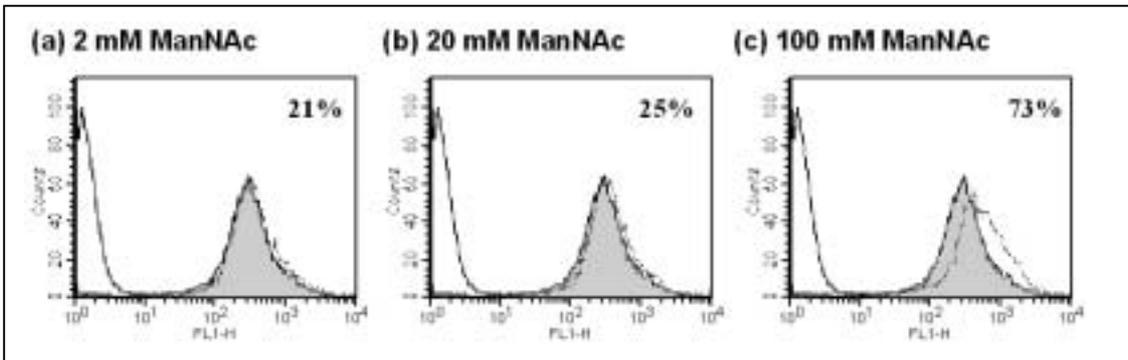
- Svitkin YV, Hahn H, Gingras AC, Palmenberg AC, Sonenberg N. 1998. Rapamycin and wortmannin enhance replication of a defective encephalomyocarditis virus. *J Virol* 72(7):5811-9.
- Undevia SD, Gomez-Abuin G, Ratain MJ. 2005. Pharmacokinetic variability of anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 5(6):447-58.
- Youil R, Su Q, Toner TJ, Szymkowiak C, Kwan WS, Rubin B, Petrukhin L, Kiseleva I, Shaw AR, DiStefano D. 2004. Comparative study of influenza virus replication in Vero and MDCK cell lines. *J Virol Methods* 120(1):23-31.

十、圖、表：

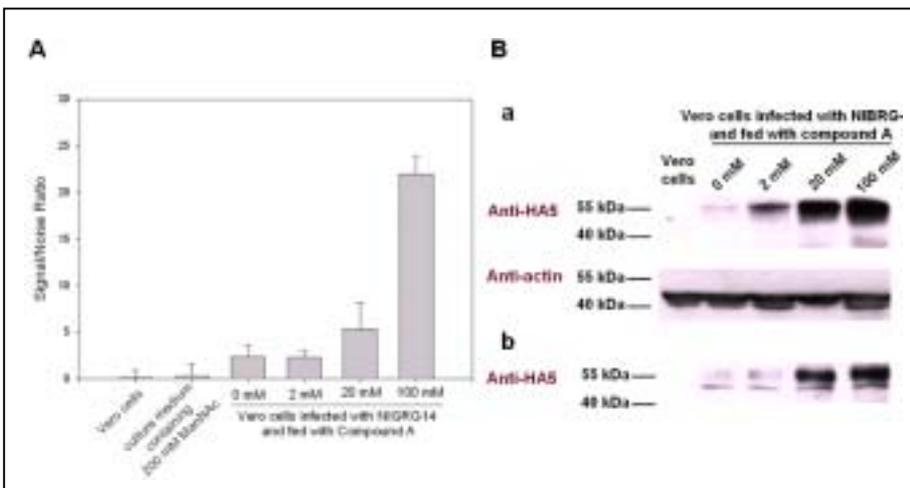
Part I - 建立穩定幫助流感病毒生產之哺乳動物細胞株



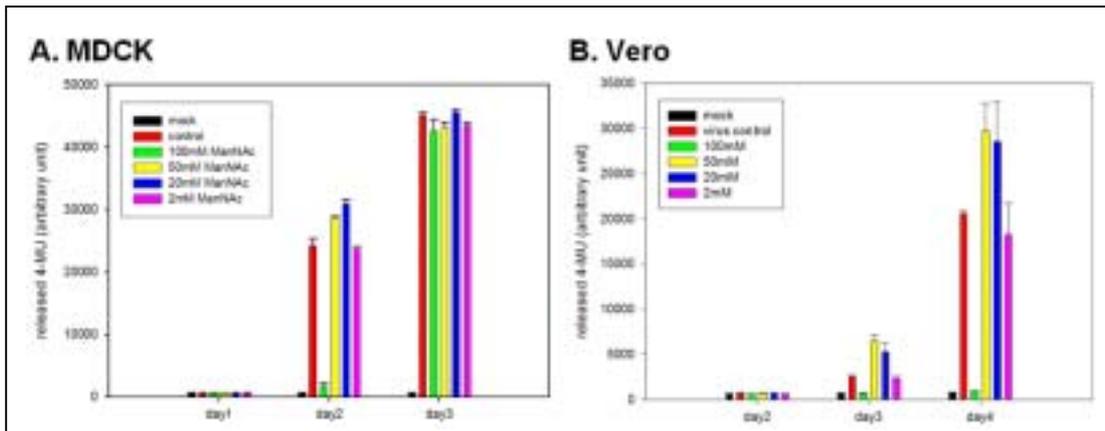
圖一 以 MTS 來測定 MDCK (A) 及 Vero (B) 細胞在添加 ManNAc 後，其細胞存活率。



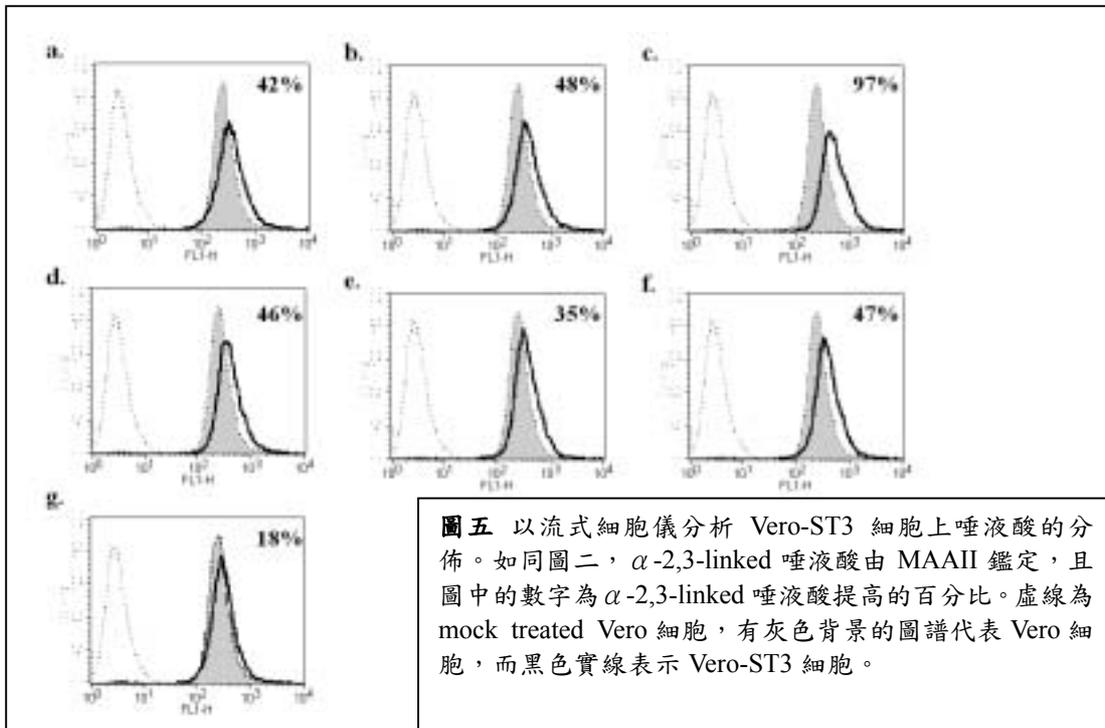
圖二 以流式細胞儀分析 MDCK 細胞表面上的唾液酸分佈。 α -2,3-linked 唾液酸是以 biotinylated MAAII lectin 來鑑定，隨後再以有 FITC 標定的 streptavidin 辨視 biotin，最後再以流式細胞儀利用螢光來分析。圖中所顯示的數字為 α -2,3-linked 唾液酸提高的百分比。黑線為 mock treated Vero 細胞，有灰色背景的圖譜代表 Vero 細胞，而虛線表示 Vero-ST3 細胞。



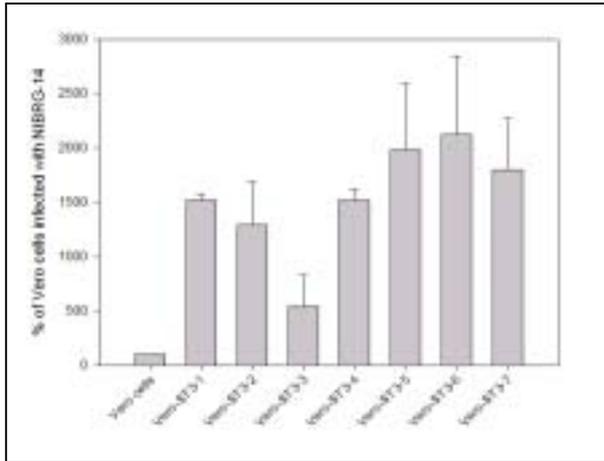
圖三 Vero 細胞在有少許血清情形下感染 NIBRG-14，所測得 NIBRG-14 的 NA(A)活性及 HA5(B)蛋白質表現量。



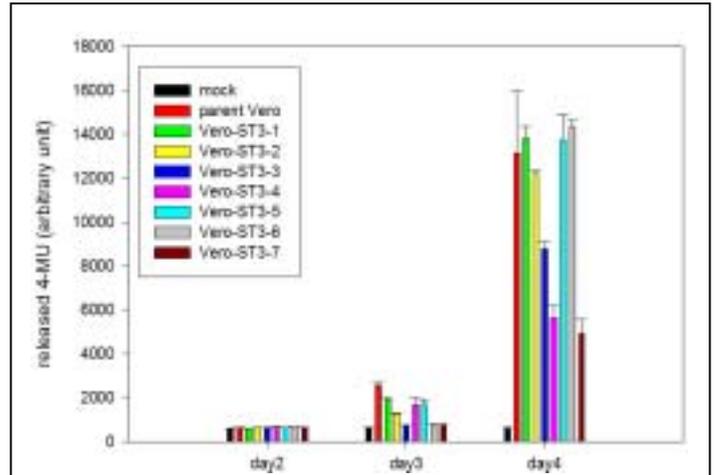
圖四 MDCK (A)及 Vero (B)細胞於無血清情形下，添加不同 ManNAc 濃度時感染 NIBRG-14，所測得的 NA 活性。



圖五 以流式細胞儀分析 Vero-ST3 細胞上唾液酸的分佈。如同圖二， α -2,3-linked 唾液酸由 MAAII 鑑定，且圖中的數字為 α -2,3-linked 唾液酸提高的百分比。虛線為 mock treated Vero 細胞，有灰色背景的圖譜代表 Vero 細胞，而黑色實線表示 Vero-ST3 細胞。



圖六 Vero 細胞於有血清情形下感染 NIBRG-14，所測得的 NA 活性。



圖七 Vero 及 Vero-ST3 細胞於無血清情形下，感染 NIBRG-14，所測得的 NA 活性。

表二 MDCK 及 Vero 細胞於無血清情形下所生產出的 NIBRG-14 之 HA titer。

		mock	virus control	100mM ManNAc	50mM ManNAc	20mM ManNAc	2mM ManNAc
MDCK	day2	<2	256	4	256	256	256
	day3	<2	1024	8	1024	1024	1024
Vero	day3	<2	64	<2	64	16	32
	day4	<2	128	<2	128	128	128

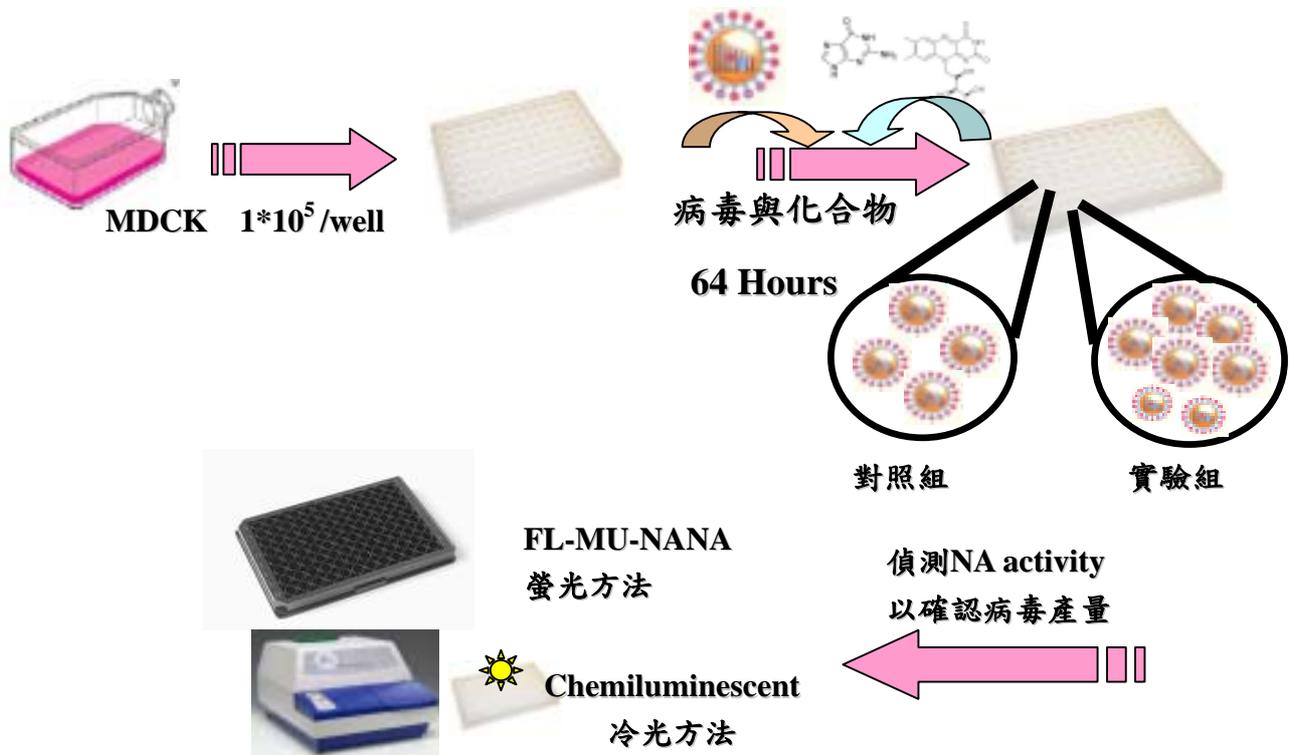
表一 Vero 細胞於有無血清情形下所生產出的 NIBRG-14 之 HA titer。

	mock	virus control	100mM ManNAc	50mM ManNAc	20mM ManNAc	2mM ManNAc
day4	<2	<2	8	4	<2	<2

表三 Vero 及 Vero-ST3 細胞在無血清情形下所生產出的 NIBRG-14 之 HA titer

mock	parent Vero	Vero-ST3-1	Vero-ST3-2	Vero-ST3-3	Vero-ST3-4	Vero-ST3-5	Vero-ST3-6	Vero-ST3-7
<2	128	128	128	64	32	128	128	32

Part II - 篩選出對於流感病毒複製有幫助的小分子化合物



圖八、流感病毒之小分子化合物篩選平台系統之圖示

Relative Signal	1	~1.5	~2	~3	~4
Number	1920	17	53	6	4

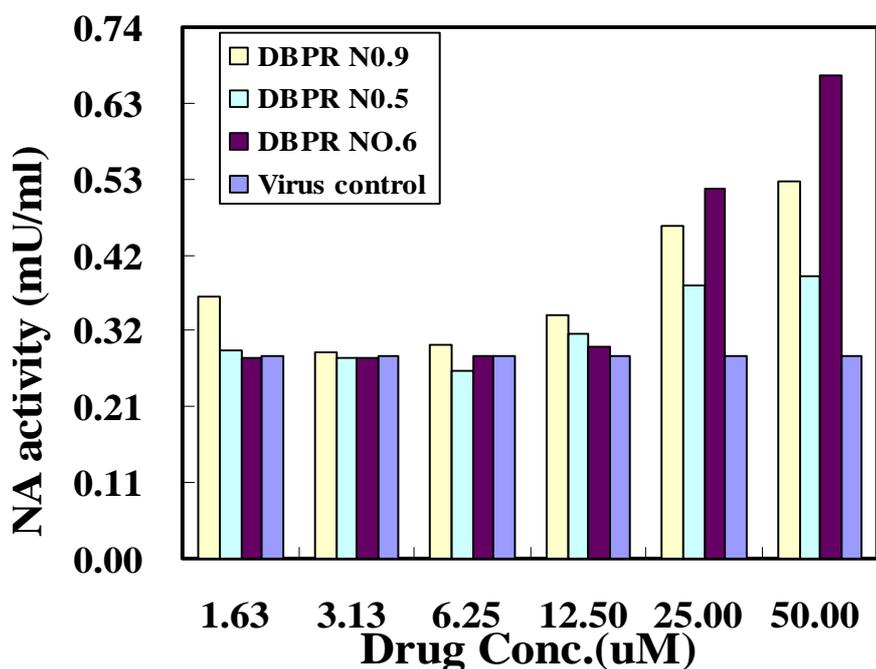
* The neuraminidase activity was detected by NA-STAR Luminicence method.

圖九、自 2000 個小分子化合物篩選增強流感病毒產量之結果

表四、具潛力之前十大化合物其相對增強流感病毒之表現

Drug	Drug Conc.	TCID50	HA relative Fold	NA relative Fold
-	-	2.15×10^4	1	1
DBPR N0.1	25 μ M	3.16×10^4	1	4.23 ± 1.80
DBPR N0.2	25 μ M	1×10^5	1	3.27 ± 0.53
DBPR N0.3	25 μ M	3.16×10^6	2	3.92 ± 1.06
DBPR N0.4	50 μ M	3.16×10^5	1	2.32 ± 0.37
DBPR N0.5	50 μ M	3.16×10^5	4	4.14 ± 0.33
DBPR N0.6	50 μ M	3.16×10^6	2	5.12 ± 0.95
DBPR N0.7	25 μ M	2.74×10^5	1	2.51 ± 0.30
DBPR N0.8	50 μ M	-	1	2.0 ± 0.16
DBPR N0.9	50 μ M	3.16×10^6	2	5.32 ± 0.76
DBPR N0.10	50 μ M	-	1	2.76 ± 0.33

* The neuraminidase activity was detected by NA-STAR Luminicence method.



* The neuraminidase activity was detected by FL-MU-NANA method.

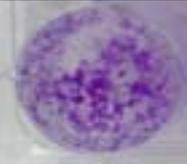
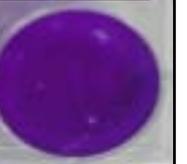
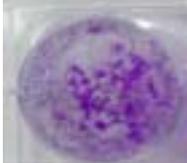
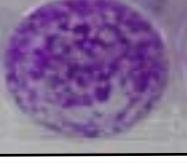
圖十、以 NA 活性偵測不同濃度之化合物促進病毒表現情形

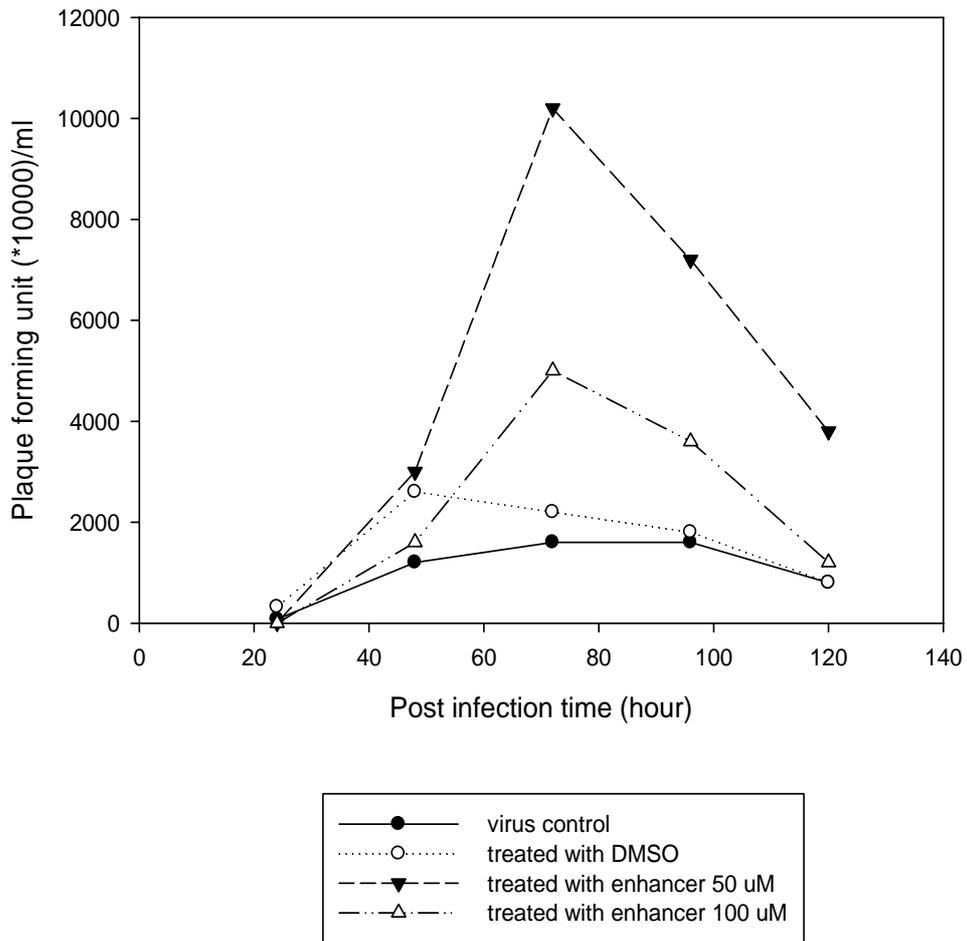
表 5. 添加小分子化合物-DBPR NO.6 於 T75 Flask 流感病毒生產系統分析

Culture	Cell Number	Infection Dose (MOI)	NA (FL signal)	HA/50ul	PFU/ml
DMEM ^a	1.75*10 ⁷	0.0001	715.8	512	1.6*10 ⁷
with DMSO	1.75*10 ⁷	0.0001	954.6	512	2.2*10 ⁷
with DBPR NO.6 (50 μ M)	1.75*10 ⁷	0.0001	1608	1024	9.6*10 ⁶
with DBPR NO.6 (100 μ M)	1.75*10 ⁷	0.0001	1002	512	5.0*10 ⁷

a virus production phase was completed using DMEM medium supplemented with 2ug/ml of Trypsin-TPCK

表 6. 病毒斑形成分析 DBPR NO.6 化合物添加於 T75 flask 增強流感病毒產量

Dilution fold	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Control			
with DMSO			
with DBPR NO.6 50uM			
with DBPR NO.6 100uM			



圖十一、增強劑-DBPR NO.6 添加於 T75 flask 流感病毒生產系統於不同時間分析病毒班形成數目。

審查意見與回覆

Q1. 添加 ManNAc 提高了分佈於細胞表面的受器之含量，但 NIBRG-14 並沒有因為在其感染受器提升後而明顯提高在哺乳類動物細胞內的產量。另外篩選更好的 Vero 細胞株來亦未能有突破性的進展，此部分是否該繼續值得商確?

回覆如下: 於我們的研究策略中，嘗試以添加 ManNAc 方法提高細胞表面的受器之含量，以利運用於流感疫苗之生產。我們研究結果顯示雖以此方法可成功的觀察到細胞表面的受器之含量增加，但進一步進行流感病毒之試產時發現其於最終之病毒產量無顯著性差異。故此研究策略不適用於流感疫苗之生產，但有可能適用於其他臨床病毒之培養或其他基礎研究。我們亦認同審查委員之意見，故我們將調整我們第二年的研究方向，以小分子篩選化合物為主軸。

Q2. UDP-GlcNAc2 epimerase 的方向雖然仍可嘗試，但細胞與病毒間的調控無法預測，成果也就無法掌握?

回覆如下: UDP-GlcNAc2 epimerase 的方向雖尚未完成，但其成果可能與添加 ManNAc 方法提高細胞表面的受器結果相近，成果確實無法掌握，因而此研究策略不適用於流感疫苗之生產，但有可能適用於其他臨床病毒之培養或其他基礎研究。我們亦認同審查委員之意見，故我們將調整我們第二年的研究方向，以小分子篩選化合物為主軸。

Q3. 以添加 ManNAc 的策略來增加 MCDK 或 Vero 細胞來生產禽流感病毒在先前的報告已經知道可以促進生成唾液酸的前趨物 CMP-sialic acid. 但在本年度中並未達到可以讓 NIBRG 禽流感病毒的產量增加的成果?

回覆如下:故此研究策略不適用於流感疫苗之生產，但有可能適用於其他臨床病毒之培養或其

他基礎研究。我們亦認同審查委員之意見，故我們將調整我們第二年的研究方向，以小分子篩選化合物為主軸。

Q4. 而在將 ST6Gal I 轉移酶進行轉基因後所得動物細胞株，雖然看到細胞表面的唾液酸有增加，但並未讓病毒產量增加，也未達成原先預期目標？

回覆如下：ST6Gal I 轉移酶進行轉基因後所得動物細胞株，但其成果可能與添加 ManNAc 方法提高細胞表面的受器結果相近，並未有助於病毒產量增加，亦未達成原先預期目標。因而此研究策略不適用於流感疫苗之生產，但有可能適用於其他臨床病毒之培養或其他基礎研究。我們亦認同審查委員之意見，故我們將調整我們第二年的研究方向，以小分子篩選化合物為主軸。

Q5. 依報告所述，在第一部份之研究並無明顯之成果，應將精力致力於第二部份篩選出對於流感病毒複製有幫助的小分子化合物之研究。將原先第一部份之經費刪除，其餘研究工作繼續進行？

回覆如下：於第一部份之研究流感病毒之生產並無明顯之助益，因而我們亦認同審查委員之意見，故我們將調整我們第二年的研究方向，以小分子篩選化合物為主軸。

Q6. 篩選出小分子能增加病毒的複製，就應儘速了解病毒是否發生變化，測試其免疫效應，由於無動物試驗結果實在難以判斷其價值？

回覆如下：於第二部份的策略中，於進一步進行流感病毒之試產時發現其於最終之病毒產量有顯著性差異，於添加 DBPR NO.6 的小分子於流感病毒之試產實驗中，其最終之 neuraminidase 及 HA 表現都有近兩倍的差異，於病毒班偵測產量亦發現其相對提高 7 倍之多，因此確認此 DBPR NO.6 的小分子確實可提高流感病毒產量，其餘之小分子特性與最適

反應濃度將一一釐清，以加速實驗進行。故於第二年的研究方向中，將儘快安排動物試驗，以期了解此小分子之應用價值。

Q7. 在篩選對流感病毒複製有幫助的小分子篩選方面，如果按照原規劃篩選二千種不知名的化學分子後，也未見到可以讓病毒複製增加的化合物出現，且有對細胞毒性化合物的可能，如果篩選完的結果仍然是如此，過去文獻 5-azacytidine 就可能只是特例，應該考慮換個方向進行？

回覆如下：於初部冷光試驗篩選結果，我們發現十個具有潛力的小分子，而選定五個增強效果較好的小分子，雖其中有幾個具細胞毒性，但於其中亦有幾個具有潛力，如 DBPR NO.6 其確實可提高流感病毒產量，最終之 neuraminidase 及 HA 表現都有近兩倍的差異，於病毒班偵測產量亦發現其相對提高 7 倍之多。我們第二年的研究方向，以小分子篩選化合物為主軸，將儘快安排病毒試產與動物試驗，以期了解這些小分子之應用價值。

Q8. 低分子化物的 random screening 看來成效不佳，是否考慮有更合理性的規劃再進行，如繼續原有規劃恐怕有結果的機率不大？

回覆如下：就成效的部份來說，效果不是很好，然就初部冷光試驗篩選結果，我們發現十個具有潛力的小分子，而選定五個增強效果較好的小分子，雖其中有幾個具細胞毒性，但於其中亦有幾個具有潛力而尚未釐清其作用方式的小分子，故就現階段而言傾向於完成分析已篩出的小分子特性，其他篩選方向則暫不考慮以免增加工作量，而延遲既定的研究方向。