

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045852**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.01.11

(21) Номер заявки
202090587

(22) Дата подачи заявки
2018.09.03

(51) Int. Cl. *A61K 39/145* (2006.01)
C07K 14/11 (2006.01)
C12N 15/44 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СПЛИТ-ВАКЦИНЫ С НА ГРИППА**

(31) **2017-169230; 2018-137952**

(32) **2017.09.04; 2018.07.23**

(33) **JP**

(43) **2020.08.24**

(86) **PCT/JP2018/032537**

(87) **WO 2019/045090 2019.03.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДЖЭПЭН ЭЗ РЕПРИЗЕНТИД
БАИ ДИРЕКТОР ДЖЕНЕРАЛ
ОФ НЭШНЛ ИНСТИТЮТ ОФ
ИНФЕКШЕС ДИЗИСИС (JP)**

(72) Изобретатель:
**Такахаси Ёсимаса, Адати Ю, Ато
Манабу (JP)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) **JP-A-2014513680**

DOMS, R.W. et al., "Quaternary structure of influenza virus hemagglutinin after acid treatment", Journal of Virology, December 1986, vol. 60, no. 3, p. 833-839

BYRD, L.L. et al., "Influenza Hemagglutinin (HA) Stem Region Mutations That Stabilize or Destabilize the Structure of Multiple HA Subtypes", Journal of Virology, April 2015, vol. 89, no. 8, p. 4504-4516

WO-A1-2016028776

(57) Предложен способ получения сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая продуцирует антитело, которое связывается со стволовой областью НА гриппа, причем стволовая область НА менее вероятно подвергается антигенной изменчивости, Сплит-вакцину на основе НА гриппа подвергают кислотной обработке. Посредством кислотной обработки получают сплит-вакцину с НА, которая продуцирует антитело, которое связывается с ЛАН стволовой области НА. Эта сплит-вакцина против гриппа обладает превосходной способностью против заражения другими вирусами гриппа различной антигенности.

B1

045852

045852

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способу получения сплит-вакцины с НА гриппа.

Предшествующий уровень техники

Современные противогриппозные вакцины против гемагглютинина (далее также сокращенно обозначаемого как "НА") индуцируют антитело на основе НА, тем самым оказывая защитный эффект против инфекции. Антитело на основе НА связывается с частью вируса, называемой "головной областью", которая внешне экспонирована на вирусной мембране. Эта область чаще всего подвергается структурным изменениям в вирусном штамме. Следовательно, в некоторых случаях анти-НА антитело может не связываться с вирусом, который подвергся антигенной изменчивости и отличается от вакцинного штамма, и вакцина не может оказывать защитное действие против инфекции.

Недавно было обнаружено, что антитела, которые связываются со стволовой областью, в которой с меньшей вероятностью происходят антигенные изменения, включают защитные антитела против инфекции (патентный документ 1). Чтобы эффективно индуцировать антитело, которое связывается со стволовой областью, был разработан стволовой белок НА, имеющий стабилизированную стволовую часть, и было проведено его клиническое испытание на людях: стволовая часть, которая изначально нестабильна, была стабилизирована посредством искусственного изменения или связывания через линкеры.

Однако проблемы, связанные с производством для практического применения, все еще остаются нерешенными, и планировалась разработка вакцинного антигена НА, который может легче индуцировать антитело против стволовых антител.

Список литературы

Патентный документ.

Патентный документ 1: японская нерассмотренная патентная публикация (перевод международной заявки PCT) № 2016-516090.

Сущность изобретения

Техническая проблема

В свете вышеизложенного целью настоящего изобретения является создание способа получения сплит-вакцины на основе НА, которая продуцирует антитело, которое связывается со стволовой областью НА гриппа, которая с меньшей вероятностью подвергается антигенной изменчивости.

Решение проблемы

Способ получения сплит-вакцины НА согласно настоящему изобретению включает кислотную обработку сплит-вакцины НА против гриппа, в результате чего получают сплит-вакцину с НА гриппа, которая продуцирует антитело, которое связывается с длинной альфа-спиралью (ЛАН) стволовой области НА, и эффективна против вируса гриппа, который подвергается антигенной изменчивости.

В частности, настоящее изобретение относится к следующему.

Пункт 1.

Способ получения сплит-вакцины НА гриппа, которая продуцирует антитело, связывающееся с ЛАН стволовой области НА, причем способ включает кислотную обработку сплит-вакцины НА гриппа.

Пункт 2.

Способ получения по пункту 1, где сплит-вакцина с НА гриппа также эффективна против вируса гриппа, который подвергся антигенной изменчивости.

Пункт 3.

Способ получения сплит-вакцины НА гриппа, которая продуцирует антитело, которое связывается с ЛАН стволовой области НА и которое эффективно против вируса гриппа, подвергшегося антигенной изменчивости, причем способ включает: кислотную обработку сплит-вакцины НА.

Пункт 4.

Способ по любому из пунктов 1-3, в котором кислотную обработку проводят при pH от 4,4 до 5,8.

Пункт 5.

Способ по любому из пунктов 1-4, где сплит-вакцина с НА гриппа имеет тип H3N2 или тип H1N1.

Пункт 6.

Сплит-вакцина с НА, которая продуцирует антитело, которое связывается с ЛАН стволовой области НА.

Пункт 7.

Сплит-вакцина с НА-гриппа по пункту 6, которая также эффективна против вируса гриппа, подвергшегося антигенным изменениям.

Пункт 8.

Сплит-вакцина с НА-гриппа по пункту 6 или 7, у которой стволовая область НА экспонирована наружу.

Пункт 9.

Сплит-вакцина с НА гриппа по любому из пунктов 6-8, где стволовая область антигена сплит-вакцины НА гриппа, которая экспонирована наружу, усиливает антигенность ЛАН стволовой области НА и сплит-вакцина на основе НА гриппа способна продуцировать антитело, которое связывается с ЛАН стволовой области НА.

Пункт 10.

Сплит-вакцина на основе HA гриппа, которая эффективна против вируса гриппа, подвергшегося антигенной изменчивости, и которая продуцирует антитело, связывающееся с LАN стволовой области HA, причем вакцину производят путем кислотной обработки вакцины на основе HA гриппа.

Пункт 11.

Сплит-вакцина на основе HA гриппа, которую производят путем кислотной обработки сплит-вакцины HA гриппа, продуцирует антитело, которое связывается с LАN стволовой области HA, а также эффективно против вируса гриппа, который подвергся антигенной изменчивости.

Преимущества изобретения

В соответствии с настоящим изобретением сплит-вакцину на основе HA гриппа, продуцирующую антитело, которое связывается со стволовой областью HA гриппа, получают простым способом, причем стволовая область HA менее вероятно подвергается антигенной изменчивости. Следовательно, получена сплит-вакцина на основе HA гриппа, которая также эффективна против вируса гриппа, который подвергся антигенной изменчивости.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой схематическую диаграмму, иллюстрирующую вирус гриппа.

Фиг. 2 представляет собой график, показывающий увеличение титра антитела против LАN в сыворотке мышей, инокулированных сплит-вакциной на основе HA H3N2 типа слитого с мембраной.

Фиг. 3 представляет собой график, показывающий улучшение способности к перекрестной защите у мышей, инокулированных сплит-вакциной на основе HA H3N2 типа слитого с мембраной, против антигенного варианта.

Фиг. 4 представляет собой график, показывающий увеличение титра антитела против LАN в сыворотке мышей, инокулированных сплит-вакциной на основе HA H1N1 типа слитого с мембраной.

Фиг. 5 представляет собой график, показывающий улучшение способности к перекрестной защите мышей, инокулированных сплит-вакциной на основе HA H1N1 типа слитого с мембраной, против антигенного варианта.

На фиг. 6 показаны графики, каждый из которых указывает на то, что связывающее LАN моноклональное антитело более сильно связывается со сплит-вакциной на основе HA типа слитого с мембраной, чем с текущей сплит-вакциной с HA.

Описание воплощений

Воплощения настоящего изобретения будут подробно описаны ниже со ссылкой на прилагаемые чертежи. Однако воплощения предназначены для облегчения понимания принципа настоящего изобретения, и объем изобретения не ограничен следующими воплощениями. Другие воплощения, в которых конфигурация следующих воплощений надлежащим образом заменена специалистами в данной области техники, также включены в объем настоящего изобретения.

Способ получения сплит-вакцины HA гриппа согласно этому воплощению включает стадию кислотной обработки сплит-вакцины на основе HA гриппа.

Сплит-вакцину на основе HA гриппа готовят путем обработки цельной вирусной вакцины эфиром для удаления липидных компонентов, которые становятся пирогенами. Сплит-вакцина на основе HA гриппа содержит белок HA в качестве основного ингредиента, потому что сплит-вакцина на основе HA гриппа производится путем сбора белка HA, который необходим для иммунизации, с поверхностей вирусных частиц центрифугированием в градиенте плотности.

Гликопротеин, называемый "белком шипа", выступает на поверхности вируса гриппа (фиг. 1). Вирус гриппа А имеет два типа белков шипа, а именно HA и NA (нейраминидаза), которые помогают вирусу вызывать инфицирование. HA связывается с заражаемой клеткой и способствует проникновению вируса в клетку. NA часто является причиной антигенной вариации. NA освобождает инфицированную клетку от HA и служит для высвобождения реплицированных вирусов из клетки.

HA вируса гриппа А делится на две области, а именно головную область и стволовую область (фиг. 1). Головная область содержит сайт связывания рецептора, через который вирус связывается с клеткой-мишенью. Стволовая область содержит последовательность пептида слияния, необходимую для мембранного слияния между вирусной мембраной и клеточной мембраной клетки-мишени.

Кислотная обработка сплит-вакцины на основе HA изменяет структуру белка HA до структуры, называемой тип, слитый с мембраной. В белке HA типа слитого с мембраной, вместо области головы снаружи от вирусной мембраны экспонируется стволовая область с большим структурным изменением конформации ствола антигена. Авторы настоящего изобретения обнаружили *in vivo*, что, когда в качестве вакцины используется белок HA типа слитого с мембраной, индуцируется антитело, которое связывается с LАN стволовой области, и что это антитело обладает защитным действием против штамма вируса, который подвергся антигенной изменчивости. Настоящее изобретение было сделано на основании этого факта.

Кислотная обработка ничем конкретно не ограничена и может проводиться при рН, например, от 3,0 до 6,5, предпочтительно от 4,0 до 6,0 и более предпочтительно от 4,4 до 5,8. Кислота для применения в кислотной обработке ничем конкретно не ограничена и может представлять собой, например, фосфор-

ную кислоту, лимонную кислоту, малеиновую кислоту или любую другую подходящую кислоту.

На основании различий в антигенности HA вирус гриппа А подразделяют на 18 подтипов (от H1 до H18), а на основании NA - на 9 подтипов (от N1 до N9). Сплит-вакцина на основе HA гриппа по настоящему изобретению применима ко всем этим подтипам. Кроме того, способ получения сплит-вакцины HA гриппа согласно настоящему изобретению позволяет получить вакцину, которая эффективна не только против вируса гриппа А, но и вируса гриппа В, имеющего HA.

Сплит-вакцина на основе HA гриппа, полученная способом получения в соответствии с настоящим изобретением, продуцирует антитело, которое связывается с LAN, которое с меньшей вероятностью вызывает изменчивость. Следовательно, вакцина может быть перекрестно защищающей от вируса гриппа, который известен как антигенный вариант, при условии, что вирус имеет тот же подтип HA. Кроме того, сплит-вакцина на основе HA гриппа, полученная способом получения в соответствии с настоящим изобретением, может быть перекрестно реактивной между подтипами HA со сходными аминокислотными последовательностями LAN (например, H3 и H7).

В предпочтительном воплощении сплит-вакцина на основе HA, полученная способом получения по настоящему изобретению, связывается с моноклональным антителом, связывающимся с LAN, сильнее, чем используемая в настоящее время сплит-вакцина на основе HA. Например, сплит-вакцина на основе HA связывается с моноклональным антителом, связывающим LAN по меньшей мере в 1,05 раза, предпочтительно по меньшей мере в 1,1 раза, более предпочтительно по меньшей мере в 1,5 раза и еще более предпочтительно по меньшей мере в 2 раза более сильно, чем используемая в настоящее время сплит-вакцина на основе HA. В этом контексте "сплит-вакцина на основе HA гриппа связывается по меньшей мере в 1,05 раза по меньшей мере в 1,1 раза по меньшей мере в 1,5 раза или по меньшей мере в два раза сильнее, чем текущая сплит-вакцина", означает, например, что обратная величина концентрации антител когда поглощение, определяемое путем регрессии, составляет 0,7, по меньшей мере 1,05, по меньшей мере 1,1, по меньшей мере 1,5 раза или по меньшей мере 2 раза обратной величины концентрации антител текущей сплит-вакцины с HA. В предпочтительном воплощении связывающая способность сплит-вакцины HA гриппа по настоящему изобретению с LAN-связывающим моноклональным антителом выше, чем у текущей сплит-вакцины HA. Хотя верхний предел ничем конкретно не ограничен, связывающая способность может находиться в диапазоне, например, от 1,05 до 200 раз, от 1,1 до 150 раз, от 1,5 до 100 раз или от 2 до 50 раз. Альтернативно, диапазон связывающей способности сплит-вакцины HA гриппа по настоящему изобретению с моноклональным антителом, связывающимся с LAN, по сравнению с диапазоном текущей сплит-вакцины HA может указываться комбинацией нижнего предельного значения, выбранного из 1,05, 1,1, 1,5, 2, 3, 4 и 5, и верхнего предельного значения, выбранного из 200, 150, 100, 50, 30 и 20. Для измерения способности связывания сплит-вакцины с HA гриппа с моноклональным антителом, связывающимся с LAN, можно использовать любой способ без особых ограничений и можно использовать обычный способ, известный специалистам в данной области. Например, связывающая способность может быть измерена способом, описанным в примерах настоящего документа.

В настоящем документе "LAN-связывающее моноклональное антитело" означает моноклональное антитело, которое связывается с LAN. Для получения моноклонального антитела может быть использован любой способ без особых ограничений и может быть использован общий способ, известный специалистам в данной области. При измерении связывающей способности сплит-вакцины HA гриппа с моноклональным антителом, связывающим LAN, предполагается, что моноклональное антитело, связывающее LAN, способно связываться с пептидом, соответствующим по меньшей мере части LAN вируса гриппа, из которого получена сплит-вакцина на основе HA гриппа.

В этом документе "используемая в настоящее время сплит-вакцина на основе HA" означает вакцину, из которой липидные компоненты, которые становятся пирогенами, удаляются путем обработки цельной вирусной вакцины эфиром, и ее можно получить способом, описанным, например, в примере 1 настоящего описания. Используемая в настоящее время сплит-вакцина на основе HA также может представлять собой сплит-вакцину на основе HA гриппа, полученную без кислотной обработки, в отличие от сплит-вакцины HA гриппа по настоящему изобретению, полученной способом, включающим последующую кислотную обработку.

Способ получения сплит-вакцины HA гриппа по настоящему изобретению может включать стадию добавления адъюванта. Примеры адъюванта включают, без ограничения указанным, соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и фосфат алюминия, хитозан, олигодезоксинуклеотиды и эмульсии масло-в-воде. Среди них предпочтительным является гидроксид алюминия, и применение гидроксида алюминия в качестве адъюванта может повысить иммуногенность.

Сплит-вакцина на основе HA гриппа, полученная способом получения по настоящему изобретению, может быть использована, например, для дополнительной инокуляции через заданный период после начальной инокуляции. Период после первоначальной инокуляции и до дополнительной инокуляции конкретно не ограничен, но может составлять, например, от двадцати дней до трех лет, предпочтительно от трех месяцев до двух лет, более предпочтительно от шести месяцев до одного года. Количество сплит-вакцины HA гриппа для начальных и дополнительных прививок ничем конкретно не ограничено, но может составлять, например, от 1 до 200 мкг, предпочтительно от 10 до 30 мкг, более предпочтительно

15 мкг на дозу. Разовая доза составляет, например, 0,5 мл. Для начальных и дополнительных прививок может использоваться любой способ введения без особых ограничений и, например, может применяться назальное, подкожное, внутривенное, трансдермальное, интратрахеальное, слизистое или пероральное введение. Внутримышечное введение является предпочтительным.

Сплит-вакцина на основе HA гриппа, полученная способом получения по настоящему изобретению, обладает защитным действием против штамма вируса, который вызывает антигенную вариацию. Например, если используемая в настоящее время сплит-вакцина против HA приготовлена из частиц вируса гриппа H3N2 (A/Fujian/411/02 (H3N2)) и подвергнута кислотной обработке, вакцина может оказывать защитное действие против инфекции не только A/Fujian/411/02 (H3N2), но также, например, A/Guizhou/54/89 (H3N2), A/OMS/5389/88 (H3N2), A/B eij ing/32/92 (H3N2), A/England/427/88 (H3N2), A/Johannesburg/33/94 (H3N2), A/Leningrad/360/86 (H3N2), A/Mississippi/1/85 (H3N2), A/Philippines/2/82 (H3N2), A/Shangdong/9/93 (H3N2), A/Shanghai/16/89 (H3N2), A/Shanghai/24/90 (H3N2), A/Sichuan/2/87 (H3N2), A/Kitakyushyu/159/93 (H3N2), A/Akita/1/94 (H3N2), A/Panama/2007/99 (H3N2), A/Wyoming/03/03 (H3N2), A/New York/551/2004 (H3N2) или A/Hiroshima/52/2005 (H3N2). Также, например, если используемая в настоящее время сплит-вакцина на основе HA приготовлена из частиц вируса гриппа H1N1 (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) и подвергнута кислотной обработке, вакцина также может оказывать защитное действие против инфекции не только A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), но и, например, A/Narita/1/09 (H1N1), A/Beijing/262/95 (H1N1), A/Brazil/11/78 (H1N1), A/Chile/1/83 (H1N1), A/New Jersey/8/76 (H1N1), A/Taiwan/1/86 (H1N1), A/Yamagata/32/89 (H1N1), A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1) или A/Mexico/4108/2009 (H1N1).

Примеры

1. Приготовление сплит-вакцины HA.

Твин 80 добавляли к частицам вируса гриппа H3N2 (штамм X31) или частицам вируса гриппа H1N1 (штамм A/Puerto Rico/8/34), суспендированным в фосфатно-солевом буферном растворе до конечной концентрации 0,2%, и суспендировали в нем. Добавляли диэтиловый эфир и суспендировали и суспензию оставляли стоять до тех пор, пока водный слой и слой диэтилового эфира не были полностью разделены, а затем слой диэтилового эфира удаляли. После повторения этой экстракции эфиром оставшийся в извлеченном водном слое диэтиловый эфир отгоняли при нормальном давлении, чтобы получить сплит-вакцину с HA.

2. Кислотная обработка.

Сплит-вакцину с HA суспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе, а затем проводили кислотную обработку путем добавления 0,15 М цитратного буфера (pH 3,5) для доведения pH до 5,0.

После выдерживания при комнатной температуре в течение 30 мин добавляли 1 М трис-буфер (pH 8,0), чтобы довести pH до 7,3. После этого проводили центрифугирование для получения сплит-вакцины HA типа слитого с мембраной. Формалин добавляли к сплит-вакцине с HA типа слитого с мембраной, приготовленной таким образом до конечной концентрации 0,05%, и оставляли на несколько дней.

Текущую сплит-вакцину с HA готовили таким же образом, как описано в пункте 1 выше, за исключением того, что кислотная обработка не проводилась.

3. Измерение титра анти-LAN антитела с помощью ELISA.

3-1. Инокуляция вакцины против гриппа H3N2.

Мышей BALB/c (самки в возрасте от 6 до 12 недель) внутрибрюшинно инокулировали используемой в настоящее время сплит-вакциной на основе HA H3N2 или сплит-вакциной на основе HA типа слитого с мембраной (10 мкг вакцины + 20 мкг адьюванта AddaVax (InvivoGen), растворенного в фосфатно-солевом буферном растворе до объема жидкости 200 мкл). Через 28 дней после первоначальной инокуляции мышей внутрибрюшинно инокулировали сплит-вакциной на основе HA типа слитого с мембраной (10 мкг одной вакцины растворяли в фосфатно-солевом буферном растворе до объема жидкости 200 мкл). По меньшей мере через 14 дней после дополнительной инокуляции у мышей, инокулированных вакциной, собирали кровь, из которой собирали сыворотку.

3-2. Измерение с помощью ELISA.

Концентрацию анти-LAN антитела в сыворотке мышей BALB/c, внутрибрюшинно инокулированных текущей сплит-вакциной с H3N2 HA или сплит-вакциной на основе HA типа слитого с мембраной, измеряли с помощью ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) следующим образом.

В частности, синтетический пептид (H3 Ac-RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQ-NTIDLTDSEMKNLFEKTRRQLRENADYKDDDDKC) (SEQ ID NO: 1), соответствующий части (длинная альфа-спираль) из стволовой части, растворяли в фосфатно-солевом буферном растворе (pH 7,3) при 10 мкг/мл и добавляли в 96-луночные планшеты по 100 мкл в каждую. После выдерживания в течение ночи при 4°C каждую лунку промывали три раза с фосфатно-солевым буферным раствором и добавляли 150 мкл физиологического раствора, содержащего 1% бычьего сывороточного альбумина. После отстаивания при комнатной температуре в течение 2 ч каждую лунку трижды промывали фосфатно-буферным солевым раствором. Затем 100 мкл мышьиной сыворотки, серийно разбавленной фосфатным буфером, содержащим 0,05% Твин 20 и 1% бычьего сывороточного альбумина, и 100 мкл стандартного монокло-

нального антитела известной концентрации (H3; название клона V15-5) добавляли в каждую лунку. После выдерживания при комнатной температуре в течение 2 ч каждую лунку промывали три раза физиологическим раствором с фосфатно-солевым буферным раствором (содержащим 0,05% Твин 20) и 100 мкл меченого пероксидазой антитела против мышинных IgG (Southern Biotech), разбавленного фосфатно-солевым буферным раствором, содержащим 0,05% Твин 20, и 1% бычий сывороточный альбумин добавляли в каждую лунку. После выдерживания при комнатной температуре в течение 2 ч каждую лунку трижды промывали фосфатно-солевым буферным раствором (содержащим 0,05% Твин 20). Затем 30 мг таблетки о-фенилендиамина (Sigma) и 24 мкл 30% раствора пероксида водорода (30% мас./мас.; Sigma) добавляли к 60 мл цитратного буфера (pH 5,0) в качестве субстрата и 100 мкл полученного результата добавляли в каждую лунку. После проявления цвета добавляли 50 мкл 2н. серной кислоты (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), чтобы остановить реакцию, и измеряли величину поглощения при 490 нм с использованием устройства для считывания микропланшетов Microplate Reader 450 (Biorad).

Как показано на фиг. 2, титр анти-LAN антитела в сыворотке мышей BALB/c, внутрибрюшинно инокулированных сплит-вакциной на основе HA типа слитого с мембраной, был значительно выше, чем титр анти-LAN антитела в сыворотке мышей BALB/c, внутрибрюшинно инокулированных текущей сплит-вакциной с HA.

4. Перекрестная защита от антигенного варианта.

В эксперименте по защите от заражения вирусом H3N2 200 мкл сыворотки, собранной у непривитых мышей, 200 мкл сыворотки, собранной у мышей, инокулированных текущей сплит-вакциной с H3N2 HA, или 200 мкл сыворотки, собранной у мышей, инокулированных сплит-вакциной на основе HA типа слитого с мембраной вводили внутрибрюшинно мышам BALB/c (самки, от 6 до 12 недель).

Через 3 ч после введения сыворотки другой вирус гриппа H3N2 (A/Guizhou/54/89), имеющий антигенность, отличную от вакцинного штамма, интраназально вводили в 5-кратной 50% летальной дозе для мышей (пятикратное количество вируса, летальное для 50% мышей) под наркозом.

Мышей взвешивали и наблюдали ежедневно в течение 21 дня от вирусной инфекции для изучения изменения массы тела и выживаемости. Мышей, потерявших 25% своей массы, умерщвляли.

Как показано на фиг. 3, в отношении мышей BALB/c, инокулированных сплит-вакциной на основе HA типа слитого с мембраной, снижение выживаемости было значительно ограничено на и после девятого дня после заражения другим вирусом гриппа H3N2 с другой антигенностью.

5. Измерение титра анти-LAN антитела с помощью ELISA.

5-1. Частицы вируса гриппа H1N1.

Мышей C57BL/6 (самки в возрасте от 6 до 12 недель) внутрибрюшинно инокулировали используемой в настоящее время сплит-вакциной против H1N1 HA или сплит-вакциной на основе HA типа слитого с мембраной (10 мкг вакцины +10 мкг CpG-ODN 1760, суспендированных в фосфатно-солевом буферном растворе и смешивали с равным объемом неполного адьюванта Фрейнда (ROCKLAKD) до объема жидкости 200 мкл). Через 28 дней после первоначальной инокуляции мышей внутрибрюшинно инокулировали сплит-вакциной на основе HA типа слитого с мембраной (10 мкг вакцины +10 мкг CpG-ODN, суспендированных в фосфатно-солевом буферном растворе и смешанных с равным объемом неполного адьюванта Фрейнда (ROCKLAND) до объема жидкости 200 мкл, так же, как при первоначальной инокуляции). По меньшей мере через 14 дней после дополнительной инокуляции у мышей, инокулированных вакциной, собирали кровь, из которой выделяли сыворотку.

5-2. Измерение с помощью ELISA.

Концентрацию анти-LAN антитела в сыворотке мышей C57BL/6, внутрибрюшинно инокулированных текущей сплит-вакциной с H1N1 HA или сплит-вакциной на основе HA типа слитого с мембраной, измеряли методом ELISA следующим образом.

Измерение выполняли таким же образом, как описано выше, за исключением того, что использовали синтетический пептид (H1; Ac-RIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNL-YEKVRSQKNNADYKDDDDKC) (SEQ ID NO: 2), соответствующий участку (длинная альфа-спираль) стволовой части, и стандартное моноклональное антитело известной концентрации (H1; клон F2).

Как показано на фиг. 4, титр анти-LAN антитела в сыворотках мышей C57BL/6, внутрибрюшинно инокулированных сплит-вакциной на основе HA типа слитого с мембраной, был значительно выше, чем титр анти-LAN антитела в сыворотках мышей C57BL/6, внутрибрюшинно инокулированных текущей сплит-вакциной на основе HA.

6. Перекрестная защита от антигенного варианта.

В эксперименте по защите от инфекции вирусом H1N1, 200 мкл сыворотки, собранной у непривитых мышей, 200 мкл сыворотки, собранной от мышей, инокулированных текущей сплит-вакциной с H1N1 HA, или 200 мкл сыворотки, собранной от мышей, инокулированных сплит-вакциной на основе HA типа слитого с мембраной вводили внутрибрюшинно мышам C57BL/6 (самки в возрасте от 6 до 12 недель).

Через 3 ч после введения сыворотки другой вирус гриппа H1N1 (A/Narita/1/09), имеющий антигенность, отличную от вакцинного штамма, интраназально вводили в 5-кратной 50% летальной дозе для мышей (пятикратное количество вируса, летальное для 50% мышей) под наркозом.

Мышей наблюдали ежедневно в течение 20 дней от вирусной инфекции для изучения выживаемости. Как показано на фиг. 5, в отношении мышей C57BL/6, инокулированных сплит-вакциной на основе НА типа слитого с мембраной, снижение выживаемости было значительно ограничено на девятый день и после девятого дня после заражения другим вирусом гриппа H1N1 другой антигенности.

7. Способность антитела связываться с эпитопом LAN.

Связывание моноклональных антител против LAN, полученных из периферической крови мыши или человека, инфицированных штаммом X31, с используемой в настоящее время сплит-вакциной на основе НА или сплит-вакциной на основе НА типа слитого с мембраной измеряли с помощью ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ). Используемую в настоящее время сплит-вакцину на основе НА или сплит-вакцину на основе НА вируса гриппа H3N2 (штамм X31) типа слитого с мембраной растворяли в фосфатно-солевом буферном растворе (pH 7,3) и добавляли в 96-луночный планшет по 50 мкл в каждую лунку. После выдерживания в течение ночи при 4°C каждую лунку промывали три раза с фосфатно-солевым буферным раствором и добавляли 150 мкл физиологического раствора, содержащего 1% бычьего сывороточного альбумина. После выдерживания при комнатной температуре в течение 2 ч каждую лунку промывали фосфатно-солевым буферным раствором (содержащим 0,05% Твин 20) и добавляли 50 мкл LAN-связывающего моноклонального антитела, серийно разбавленного фосфатным буфером, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина. После выдерживания в течение ночи при 4°C каждую лунку промывали три раза фосфатно-солевым буферным раствором (содержащим 0,05% Твин 20) и 100 мкл меченого пероксидазой антитела против мышинных IgG (Southern Biotech), разбавляли фосфатно-солевым буферным раствором, содержащим 0,05% Твин 20, и 1% бычьего сывороточного альбумина добавляли в каждую лунку. После выдерживания при комнатной температуре в течение 2 ч каждую лунку трижды промывали фосфатно-солевым буферным раствором (содержащим 0,05% Твин 20). Затем 30 мг таблетки о-фенилендиамина (Sigma) и 24 мкл 30% раствора перекиси водорода (30% мас./мас.; Sigma) добавляли к 60 мл цитратного буфера (pH 5,0) в качестве субстрата и 50 мкл полученный результат добавляли в каждую лунку. После проявления цвета добавляли 25 мкл серной кислоты с концентрацией 1 моль/л (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), чтобы остановить реакцию, и измеряли величину поглощения при 490 нм с использованием устройства для считывания микропланшетов Microplate Reader 450 (Biorad). Изменение связывающей способности рассчитывали по значениям оптической плотности, измеренным относительно текущей сплит-вакцины НА или сплит-вакцины НА типа слитого с мембраной.

Как показано на фиг. 6, способность связывания моноклонального антитела, связывающего LAN, со сплит-вакциной на основе НА типа слитого с мембраной, была в 1,05-21 раза больше, чем способность связывания с текущей сплит-вакциной с НА. Результаты показывают, что кислотная обработка сплит-вакцины с НА повышает способность антитела связываться с эпитопом LAN.

Промышленная применимость

Настоящее изобретение полезно для производства вакцин против гриппа.

Свободный текст списка последовательностей.

Список последовательностей

SEQ ID NO: 1, 2: Синтетический пептид.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения сплит-вакцины на основе гемагглютинина (НА) гриппа, которая продуцирует антитело, которое связывается с длинной альфа-спиралью (LAN) стволовой области НА, причем способ включает кислотную обработку сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая не была предварительно обработана формалином, где указанную кислотную обработку проводят при pH 3,0-6,5.

2. Способ по п.1, в котором сплит-вакцина на основе НА гриппа также эффективна против вируса гриппа, который подвергается антигенной изменчивости.

3. Способ получения сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая продуцирует антитело, которое связывается с LAN стволовой области НА, и которая эффективна против вируса гриппа, подвергаемого антигенной изменчивости, причем способ включает:

обработку вирусных частиц эфиром, чтобы получить сплит-вакцину на основе НА гриппа; и кислотную обработку указанной сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая не была предварительно обработана формалином, где указанную кислотную обработку проводят при pH 3,0-6,5.

4. Способ по любому из пп.1-3, где кислотную обработку проводят при pH от 4,4 до 5,8.

5. Способ по любому из пп.1-4, где сплит-вакцина на основе НА гриппа относится к типу H3N2 или типу H1N1.

6. Сплит-вакцина на основе НА гриппа, которая продуцирует антитело, которое связывается с LAN стволовой области НА, и также эффективна против вируса гриппа, который подвергается антигенной изменчивости, причем эта сплит-вакцина на основе НА гриппа имеет стволовую область НА, экспонированную наружу, и получена способом по п.1.

7. Сплит-вакцина на основе НА гриппа по п.6, отличающаяся тем, что стволовая область НА анти-

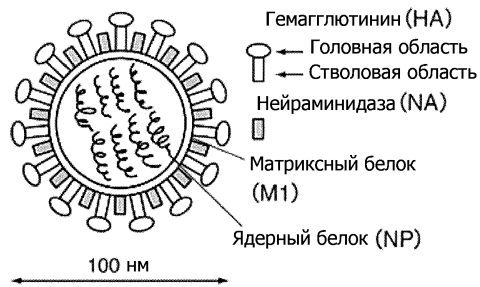
гена сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая экспонируется наружу, усиливает антигенность ЛАН стволовой области НА, и эта сплит-вакцина на основе НА гриппа способна продуцировать антитело, которое связывается с ЛАН стволовой области НА.

8. Сплит-вакцина на основе НА гриппа, которая эффективна против вируса гриппа, который подвергается антигенной изменчивости, и которая продуцирует антитело, связывающееся с ЛАН стволовой области НА, причем вакцину производят путем кислотной обработки сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая не была предварительно обработана формалином, где указанную кислотную обработку проводят при рН 3,0-6,5.

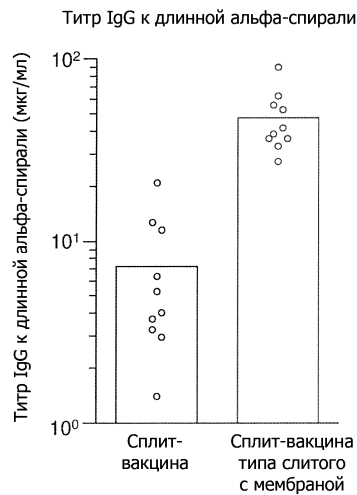
9. Сплит-вакцина на основе НА гриппа, произведенная из сплит-вакцины на основе НА гриппа, полученной из частиц вируса гриппа, который подвергается антигенной изменчивости, путем кислотной обработки сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая не была предварительно обработана формалином, продуцирующая антитело, которое связывается с ЛАН стволовой области НА, и также эффективная против вируса гриппа, который подвергается антигенной изменчивости, где кислотную обработку проводят при рН 3,0-6,5.

10. Применение сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая продуцирует антитело, связывающееся с ЛАН стволовой области НА, по п.6 или 7 для изготовления вакцины для защиты от заражения гриппом.

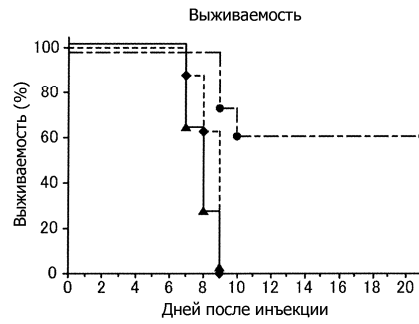
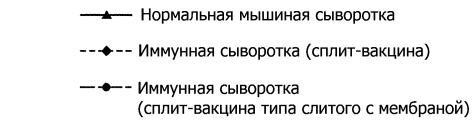
11. Применение сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая продуцирует антитело, связывающееся с ЛАН стволовой области НА, которая получена способом по п.1, для изготовления вакцины для защиты от заражения гриппом.



Фиг. 1

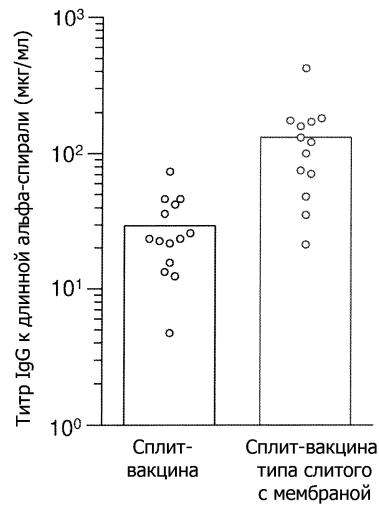


Фиг. 2

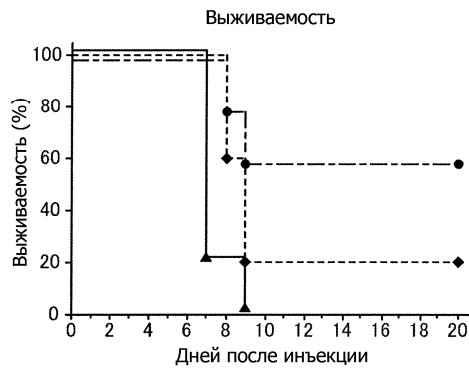
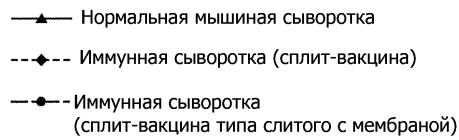


Фиг. 3

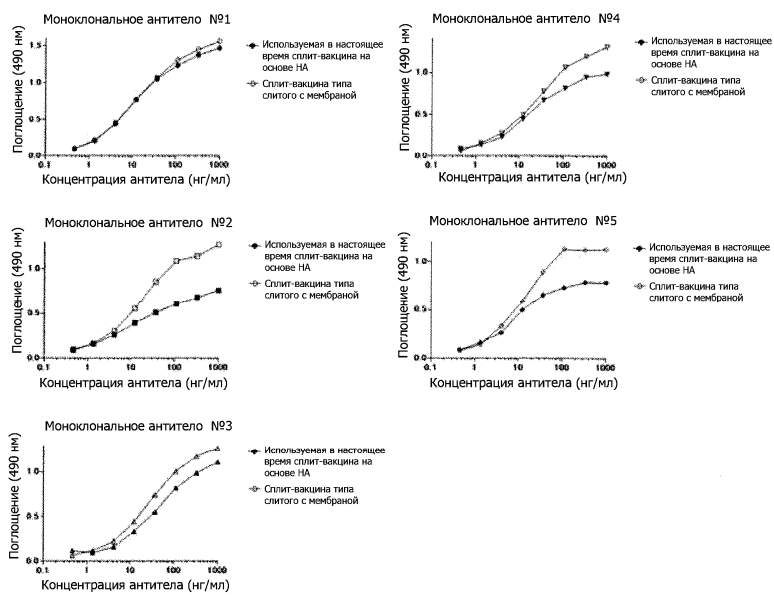
Титр IgG к длинной альфа-спирали



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

