

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045912**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.01.17**

(51) Int. Cl. *A61K 39/145* (2006.01)  
*A61P 31/16* (2006.01)

(21) Номер заявки  
**202192398**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.03.03**

---

(54) **СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ СПЛИТ-ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ГРИППА**

---

(31) **2019-038662**

(32) **2019.03.04**

(33) **JP**

(43) **2021.11.23**

(86) **PCT/JP2020/008974**

(87) **WO 2020/179797 2020.09.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ДЖЭПЭН ЭЗ РЕПРИЗЕНТИД  
БАИ ДИРЕКТОР ДЖЕНЕРАЛ  
ОФ НЭШНЛ ИНСТИТЬЮТ  
ОФ ИНФЕКШЕС ДИЗИС;  
СУМИТОМО ФАРМА КО., ЛТД. (JP)**

(56) **WO-A2-2013173256**

**JP-A-2019043937**

**WO-A1-2020022272**

**QUAN, Fu-Shi et al., "Immunogenicity of low-pH treated whole viral influenza vaccine", Virology, 2011, vol. 417, pp. 196-202 abstract**

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

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

---

(57) Предложен способ получения НА сплит-вакцины против гриппа, которая вызывает продукцию антитела, связывающегося со стволовой областью НА вируса гриппа, которая менее подвержена антигенной вариабельности. НА сплит-вакцину против гриппа подвергают кислотной обработке. Посредством кислотной обработки получают НА сплит-вакцину против гриппа, которая вызывает выработку антитела, связывающегося с ЛАН стволовой области НА. Эта НА сплит-вакцина против гриппа обладает отличной способностью противостоять заражению другими вирусами гриппа с отличающейся антигенностью.

**B1**

**045912**

**045912**

**B1**

### **Область техники, к которой относится изобретение**

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

#### **Предшествующий уровень техники**

Современные вакцины на основе гемагглютинаина (далее также сокращенно "НА") гриппа индуцируют антитело против НА, тем самым проявляя защитный эффект против инфекции. Антитело против НА связывается с частью вируса, называемой "головной областью", выступающую наружу вирусной мембраны. Эта область наиболее часто претерпевает структурные изменения у вирусного штамма. Следовательно, в некоторых случаях анти-НА антитело может не связываться с вирусом, проявляющим антигенные вариации и отличающимся от вакцинного штамма, и вакцина не может проявлять защитный эффект против инфекции.

Недавно было обнаружено, что антитела, связывающиеся со стволовой областью, которая с меньшей вероятностью проявляет антигенную вариацию, включают защитные антитела против инфекции (Патентный документ 1). Чтобы эффективно индуцировать антитело, которое связывается со стволовой областью, был разработан гемагглютининовый стволовой белок, имеющий стабилизированную стволовую часть, и были проведены его клинические испытания на людях: стволовая область, которая изначально была нестабильной, была стабилизирована посредством искусственного изменения или связывания линкеров.

Список цитирования.

Патентный документ.

Патентный документ 1: публикация нерассмотренного японского патента (перевод международной заявки РСТ) № 2016-516090.

#### **Изложение сущности изобретения**

Техническая проблема.

Ввиду вышеизложенного, целью настоящего изобретения является разработка способа получения сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая вызывает выработку антитела, связывающегося со стволовой областью НА, менее подверженной антигенной вариативности вируса гриппа.

Решение проблемы.

Способ получения сплит-вакцины на основе НА согласно настоящему изобретению включает кислотную обработку сплит-вакцины на основе НА гриппа, в результате чего получают сплит-вакцину на основе НА гриппа, вызывающую выработку антитела, которое связывается с длинной альфа-спиралью (ЛАН) стволовой области НА, и эффективную против вируса гриппа, подверженного антигенной вариативности.

В частности, настоящее изобретение относится к следующему.

[Пункт 1].

Способ получения сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с ЛАН стволовой области НА, включающий кислотную обработку сплит-вакцины на основе НА гриппа.

[Пункт 1a].

Способ получения сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с ЛАН стволовой области НА, включающий кислотную обработку сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая не подвергалась обработке формалином.

[Пункт 1b].

Способ получения сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с ЛАН стволовой области НА, включающий кислотную обработку сплит-вакцины на основе НА гриппа, и после этого обработку сплит-вакцины на основе НА гриппа формалином.

[Пункт 1c].

Способ получения сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с ЛАН стволовой области НА, включающий кислотную обработку сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая не подвергалась обработке формалином, и после этого обработку сплит-вакцины на основе НА гриппа формалином.

[Пункт 2].

Способ получения в соответствии с пунктами 1, 1a-1c, где сплит-вакцина на основе НА гриппа также эффективна против вируса гриппа, который имеет антигенную вариативность.

[Пункт 3].

Способ получения сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с ЛАН стволовой области НА, и которая эффективна против вируса гриппа, имеющего антигенную вариативность, включающий кислотную обработку сплит-вакцины на основе НА гриппа.

[Пункт 4].

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

[Пункт 5].

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

[Пункт 5c].

Способ по любому из пунктов 1-5 и 1a-1c, где сплит-вакцина на основе НА гриппа относится к типу H3N2 или типу H1N1, где обработку проводят путем добавления 0,15 М цитратного буфера (pH 3,5) к сплит-вакцине на основе НА сплит-вакцине на основе НА гриппа типа H3N2 или типа H1N1, суспендированной в фосфатно-солевом буфере для доведения pH до 5,0; через 30 минут при комнатной температуре добавляют 1 М Трис-буфер (pH 8,0), чтобы вернуть значение pH к 7,3; проводят центрифугирование для получения сплит-вакцины типа слитого с мембраной; а затем к сплит-вакцине на основе НА типа слитого с мембраной добавляют формалин до конечной концентрации 0,05 об.%, и выдерживают в течение нескольких суток.

[Пункт 5d].

Способ по любому из пунктов 1-5 и 1a-1c, где сплит-вакцина на основе НА гриппа относится к типу H3N2 или типу H1N1, где обработку проводят путем добавления 0,15 М цитратного буфера (pH 3,5) к сплит-вакцине на основе НА гриппа, полученной из штамма X31 типа H3N2 или штамма A/Puerto Rico/8/34 типа H1N1, суспендированной в фосфатно-солевом буфере для доведения pH до 5,0; через 30 минут при комнатной температуре добавляют 1М Трис-буфер (pH 8,0) для возврата значения pH к 7,3; проводят центрифугирование для получения сплит-вакцины на основе НА типа слитого с мембраной; а затем к сплит-вакцине на основе НА типа слитого с мембраной добавляют формалин до конечной концентрации 0,05 об. % и выдерживают в течение нескольких суток.

[Пункт 5a].

Способ по любому из пунктов 1-5, 1a-1c, 5c и 5d, где сплит-вакцина на основе НА гриппа представляет собой сплит-вакцину против гриппа НА одного подтипа НА.

[Пункт 5b].

Способ по любому из пунктов 1-5, 1a-1c, 5c и 5d, включающий смешивание двух или более антигенов сплит-вакцины на основе НА гриппа, каждый из которых получают путем кислотной обработки сплит-вакцины на основе НА гриппа одного подтипа.

[Пункт 6].

Сплит-вакцина на основе НА гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с ЛАН стволовой области НА.

[Пункт 7].

Сплит-вакцина на основе НА гриппа по пункту 6, которая также эффективна против вируса гриппа, имеющего антигенную вариабельность.

[Пункт 8].

Сплит-вакцина на основе НА гриппа по пункту 6 или 7, в которой стволовая область НА экспонирована наружу.

[Пункт 9].

Сплит-вакцина на основе НА гриппа по любому из пунктов 6-8, где стволовая область НА антигесплит-вакцины на основе НА гриппа, которая экспонирована наружу, усиливает антигенность ЛАН стволовой области НА, и сплит-вакцина на основе НА гриппа способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с ЛАН стволовой области НА.

[Пункт 10].

Сплит-вакцина на основе НА гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с ЛАН стволовой области НА, причем вакцину получают путем кислотной обработки сплит-вакцины на основе НА гриппа.

[Пункт 10a].

Сплит-вакцина на основе НА гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с ЛАН стволовой области НА, полученная путем кислотной обработки сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая не подвергалась обработке формалином.

[Пункт 10b].

Сплит-вакцина на основе НА гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с ЛАН стволовой области НА, полученная с помощью производственного процесса, включающего кислотную обработку сплит-вакцины на основе НА гриппа; а после этого обработку сплит-вакцины на основе НА гриппа формалином.

[Пункт 10c].

Сплит-вакцина на основе НА гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с ЛАН стволовой области НА, полученная с помощью производственного процесса, включающего кислотную обработку сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая не подвергалась обработке формалином; и после этого обработку сплит-вакцины на основе НА гриппа формалином.

[Пункт 10d].

Сплит-вакцина на основе НА гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающе-

гося с ЛАН стволовой области НА, полученная путем кислотной обработки сплит-вакцины на основе НА гриппа, включающей один подтип.

[Пункт 10e].

Сплит-вакцина на основе НА гриппа, способная вызвать продукцию антитела, связывающегося с ЛАН стволовой области НА, представляющая собой вакцинный антиген, полученный путем смешивания двух или более антигенов сплит-вакцины на основе НА гриппа, каждый из которых получен путем кислотной обработки сплит-вакцины на основе НА гриппа, включающей один подтип.

[Пункт 10f].

Сплит-вакцина на основе НА гриппа по любому из пунктов 10-10e, которая также эффективна против вируса гриппа, имеющего антигенную вариабельность.

[Пункт 10g].

Сплит-вакцина на основе НА гриппа по любому из пунктов 10-10f, которую получают способом, указанным в пунктах 5c или 5d.

[Пункт 11].

Сплит-вакцина на основе НА гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с ЛАН стволовой области НА, а также эффективна против вируса гриппа, имеющего антигенную вариабельность, полученная путем кислотной обработки сплит-вакцины на основе НА гриппа.

Один вариант осуществления настоящей заявки включает способ получения сплит-вакцины на основе НА гриппа согласно любому из пунктов 1-5, 1a-1c, 5a и 5b, где способ получения А является таким, как описано ниже.

Способ получения А включает следующие стадии: полиоксиэтиленсорбитан моноолеат (например, Tween 80) добавляют к штамму Х31 типа Н3Н2 или штамму А/Puerto Rico/8/34 типа Н1Н1, суспендированному в фосфатно-солевом буфере до конечной концентрации 0,1 об.%, и суспендируют в нем; добавляют и суспендируют диэтиловый эфир, и суспензию выдерживают до тех пор, пока водный слой и слой диэтилового эфира полностью не разделятся, и затем удаляют слой диэтилового эфира; диэтиловый эфир, оставшийся в извлеченном водном слое, отгоняют при нормальном давлении для получения НА сплит-вакцины; затем проводят обработку путем добавления 0,15 М цитратного буфера (рН 3,5) к сплит-вакцине на основе НА, суспендированной в фосфатно-солевом буфере, для доведения рН до 5,0; через 30 минут при комнатной температуре добавляют 1М Трис-буфер (рН 8,0) для возврата рН к 7,3; проводят центрифугирование для получения сплит-вакцины на основе НА типа слитого с мембраной; а затем к сплит-вакцине на основе НА типа слитого с мембраной добавляют формалин до конечной концентрации 0,05 об. %.

Один вариант осуществления настоящей заявки включает сплит-вакцину на основе НА гриппа, которую получают способом получения сплит-вакцины на основе НА гриппа по любому из пунктов 1-5, 1a-1c, 5a и 5b, произведенную по способу получения А.

Один вариант осуществления настоящей заявки включает сплит-вакцину на основе НА гриппа по любому из пунктов 6-11 и 10a-10f, произведенную способом получения А.

Один вариант осуществления настоящей заявки включает способ получения сплит-вакцины на основе НА гриппа по любому из пунктов 1-5, 1a-1c, 5a и 5b, отличающийся тем, что вакцину получают по способу получения В, описанному ниже.

Способ получения В, включающий следующие стадии: полиоксиэтиленсорбитан моноолеат (например, Tween 80) добавляют к частицам вируса гриппа Н3Н2 или частицам вируса гриппа Н1Н1, суспендированным в фосфатно-солевом буфере до конечной концентрации 0,1 об.%, и суспендируют в нем; добавляют и суспендируют диэтиловый эфир, и суспензию выдерживают до полного разделения водного слоя и слоя диэтилового эфира, а затем удаляют слой диэтилового эфира; диэтиловый эфир, оставшийся в выделенном водном слое, отгоняют при нормальном давлении для получения НА сплит-вакцины; затем проводят обработку путем добавления 0,15 М цитратного буфера (рН 3,5) к сплит-вакцине на основе НА, суспендированной в фосфатно-солевом буфере, для доведения рН до 5,0; через 30 минут при комнатной температуре добавляют 1 М Трис-буфер (рН 8,0) для возврата рН к 7,3; проводят центрифугирование для получения сплит-вакцины на основе НА типа слитого с мембраной; а затем к сплит-вакцине на основе НА типа слитого с мембраной добавляют формалин до конечной концентрации 0,05 об. %.

Один вариант осуществления настоящей заявки включает сплит-вакцину на основе НА гриппа, полученную способом получения сплит-вакцины на основе НА гриппа по любому из пунктов 1-5, 1a-1c, 5a и 5b, где вакцину производят по способу получения В.

Один вариант осуществления настоящей заявки включает сплит-вакцину на основе НА гриппа по любому из пунктов 6-11 и 10a-10f, где сплит-вакцину на основе НА гриппа производят способом получения В.

Один вариант осуществления настоящей заявки включает способ получения сплит-вакцины на основе НА гриппа по любому из пунктов 1-5, 1a-1c, 5a и 5b, где вакцину производят по способу получения С, описанному ниже.

Способ получения С, включающий следующие этапы: обработку проводят путем добавления 0,15 М

цитратного буфера (рН 3,5) к сплит-вакцине на основе НА гриппа, полученной из штамма Х31 типа Н3N2 или штамма А/Puerto Rico/8/34 типа Н1N1, суспендированного в фосфатно-солевом буферном растворе, для доведения рН до 5,0; через 30 минут при комнатной температуре добавляют 1 М Трис-буфер (рН 8,0) для возврата рН к 7,3; проводят центрифугирование для получения сплит-вакцины на основе НА типа слитого с мембраной; а затем к сплит-вакцине на основе НА типа слитого с мембраной добавляют формалин до конечной концентрации 0,05 об.%.

Один вариант осуществления настоящей заявки включает сплит-вакцину на основе НА гриппа НА, произведенную способом получения сплит-вакцины на основе НА гриппа в соответствии с любым из пунктов 1-5, 1a-1c, 5a и 5b, где вакцину производят способом получения С.

Один вариант осуществления настоящей заявки включает сплит-вакцину на основе НА гриппа по любому из пунктов 6-11 и 10a-10f, с тем отличием, что сплит-вакцину на основе НА гриппа производят способом получения С.

Один вариант осуществления настоящей заявки включает способ получения сплит-вакцины на основе НА гриппа по любому из пунктов 1-5, 1a-1c, 5a и 5b, с тем отличием, что используют способ получения D, описанный ниже.

Способ получения D, включает следующие стадии: обработку проводят путем добавления 0,15 М цитратного буфера (рН 3,5) к сплит-вакцине на основе НА гриппа типа Н3N2 или типа Н1N1, суспендированной в фосфатно-солевом буфере, для доведения рН до 5,0; через 30 минут при комнатной температуре добавляют 1 М Трис-буфер (рН 8,0) для возврата рН к 7,3; проводят центрифугирование для получения сплит-вакцины на основе НА типа слитого с мембраной; а затем к сплит-вакцине на основе НА типа слитого с мембраной добавляют формалин до конечной концентрации 0,05 об.%.

Один вариант осуществления настоящей заявки включает сплит-вакцину на основе НА гриппа, которую получают способом получения сплит-вакцины на основе НА гриппа по любому из пунктов 1-5, 1a-1c, 5a и 5b, с тем отличием, что используют способ получения D.

Один вариант осуществления настоящей заявки включает сплит-вакцину на основе НА гриппа по любому из пунктов 6-11 и 10a-10f, с тем отличием, что сплит-вакцину на основе НА гриппа получают способом получения D.

#### **Преимущества изобретения**

В соответствии с настоящим изобретением сплит-вакцину на основе НА гриппа, которая вызывает продукцию антитела, связывающегося со стволовой областью НА вируса гриппа, получают с помощью простого способа, причем стволовая область НА с меньшей вероятностью подвержена антигенной вариабельности. Таким образом, получают сплит-вакцину на основе НА гриппа, которая также эффективна против вируса гриппа, имеющего антигенную вариабельность.

#### **Краткое описание фигур**

Фиг. 1 является схематической диаграммой, иллюстрирующая вирус гриппа.

Фиг. 2 представляет собой график, показывающий увеличение титра антитела против ЛАН в сыворотках мышей, иммунизированных НА сплит-вакциной Н3N2 типа слитого с мембраной.

Фиг. 3 представляет собой график, показывающий улучшение перекрестной защитной способности мышей, иммунизированных НА сплит-вакциной Н3N2 типа слитого с мембраной против антигенного варианта.

Фиг. 4 представляет собой график, показывающий увеличение титра антитела против ЛАН в сыворотке мышей, иммунизированных НА сплит-вакциной Н1N1 типа слитого с мембраной.

Фиг. 5 представляет собой график, показывающий улучшение перекрестной защитной способности мышей, иммунизированных НА сплит-вакциной Н1N1 типа слитого с мембраной против антигенного варианта.

Фиг. 6 демонстрирует графики, каждый из которых показывает, что моноклональное антитело, связывающееся с ЛАН, более прочно связывается с НА сплит-вакциной типа слитого с мембраной, чем с НА сплит-вакциной из предшествующего уровня техники.

Фиг. 7 демонстрирует графики, каждый из которых показывает, что моноклональное антитело, связывающееся с ЛАН, прочно связывается с НА сплит-вакциной типа слитого с мембраной, которая была подвергнута обработке формалином после кислотной обработки.

Фиг. 8 представляет собой график, показывающий увеличение титра антитела против ЛАН в сыворотке мышей, иммунизированных НА сплит-вакцинами Н3N2 типа слитого с мембраной ((Pre-fix) и (Post-fix)).

#### **Описание вариантов осуществления изобретения**

Варианты осуществления настоящего изобретения будут подробно описаны ниже со ссылкой на прилагаемые чертежи. Однако варианты осуществления предназначены для облегчения понимания принципа настоящего изобретения, и объем изобретения не ограничивается следующими вариантами осуществления. Другие варианты осуществления, в которых конфигурация следующих вариантов осуществления была соответствующим образом изменена специалистами в данной области техники, также входят в объем настоящего изобретения.

Способ получения сплит-вакцины на основе НА гриппа согласно этому варианту осуществления

включает стадию кислотной обработки сплит-вакцины на основе HA гриппа.

Сплит-вакцину на основе HA гриппа готовят путем обработки цельновирусной вакцины эфиром для удаления липидных компонентов, которые становятся пирогенами. Сплит-вакцина на основе HA гриппа содержит белок HA в качестве основного ингредиента, поскольку сплит-вакцину на основе HA гриппа производят путем сбора белка HA, необходимого для иммунизации, с поверхностей вирусных частиц путем центрифугирования в градиенте плотности.

Гликопротеин, называемый "спайк-белком", выступает с поверхности вируса гриппа (фиг. 1). Вирус гриппа А имеет два типа спайк-белков, а именно HA и NA (нейраминидаза), которые помогают вирусу вызывать инфекцию. HA связывается с инфицированной клеткой и способствует проникновению вируса в клетку. NA часто обеспечивает антигенную вариабельность. NA ослабляет связь инфицированной клетки с 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, на котором вирус связывается с клеткой-мишенью. Стволовая область содержит последовательность пептида слияния, необходимую для слияния вирусной мембраны и клеточной мембраны клетки-мишени.

Кислотная обработка сплит-вакцины на основе HA гриппа изменяет структуру HA белка на структуру, называемую структурой типа слитого с мембраной. В белке HA типа слитого с мембраной стволовая область экспонирована наружу от вирусной мембраны, в отличие от головной области, с большим структурным изменением конформации ствола антигена. Авторы настоящего изобретения обнаружили *in vivo*, что, когда белок HA типа слитого с мембраной используют в качестве вакцины, индуцируется антитело, которое связывается с LАH стволовой области, и что это антитело оказывает защитный эффект против штамма вируса, который обладает антигенной вариабельностью. Настоящее изобретение основано на этом факте.

Кислотная обработка особо не ограничивается и может быть проведена при рН, например, от 2,0 до 6,5, предпочтительно от 3,0 до 6,5, более предпочтительно от 4,0 до 6,0 и более предпочтительно от 4,4 до 5,8. Конкретные примеры включают рН 2,0-2,9; 2,0-4,0; 2,0-5,0; 2,0-6,0; 3,0-4,0; 3,0-5,0; 3,0-6,0; 4,0-5,8; 4,0-6,5; 5,0-6,5 и 6,0-6,5. Кислота для использования при кислотной обработке особо не ограничивается и может быть, например, фосфорной кислотой, лимонной кислотой, малеиновой кислотой, соляной кислотой или любой другой подходящей кислотой.

Температура кислотной обработки составляет, например, от 0°C до 75°C, предпочтительно от 10°C до 60°C, более предпочтительно от 20°C до 45°C и более предпочтительно от 25°C до 42°C. Конкретные примеры включают от 0°C до 20°C, от 5°C до 25°C, от 10°C до 30°C, от 15°C до 35°C, от 20°C до 37°C, от 25°C до 37°C, от 30°C до 50°C, от 38°C до 55°C, от 38°C до 60°C, от 38°C до 65°C, от 38°C до 70°C, от 38°C до 75°C, от 40°C до 55°C, от 40°C до 60°C, от 40°C до 65°C, от 40°C до 70°C, от 40°C до 75°C, от 42°C до 55°C, от 42°C до 60°C, от 42°C до 65°C, от 42°C до 70°C, от 42°C до 75°C, от 45°C до 55°C, от 45°C до 60°C, от 45°C до 65°C, от 45°C до 70°C и от 45°C до 75°C. Время обработки составляет, например, от 5 минут до 120 минут, предпочтительно от 15 минут до 60 минут, более предпочтительно от 20 минут до 45 минут. Конкретные примеры включают от 5 минут до 60 минут, от 20 минут до 60 минут, от 15 минут до 120 минут, от 15 минут до 45 минут, от 20 минут до 60 минут, от 20 минут до 120 минут, от 45 минут до 120 минут и от 60 минут до 120 минут.

Основываясь на различиях в антигенности, HA вируса гриппа А классифицируется на 18 подтипов (от H1 до H18), а 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 на основе HA гриппа согласно настоящему изобретению позволяет получить вакцину, которая эффективна не только против вируса гриппа А, но также против вируса гриппа В, имеющего HA.

Сплит-вакцина на основе HA гриппа, полученная способом согласно настоящему изобретению, вызывает выработку антитела, которое связывается с LАH, которая с меньшей вероятностью проявляет вариацию. Следовательно, вакцина может обеспечивать перекрестную защиту от вируса гриппа, который известен как антигенный вариант, если вирус имеет тот же подтип HA. Кроме того, сплит-вакцина на основе HA гриппа, полученная способом согласно настоящему изобретению, может обладать перекрестной реактивностью между подтипами HA аналогичных аминокислотных последовательностей LАH (например, H3 и H7).

В настоящей заявке "сплит-вакцина на основе HA гриппа единственного подтипа HA" относится к сплит-вакцине на основе HA гриппа одного подтипа HA, который выбран из 18 подтипов (от H1 до H18) вируса гриппа А или вируса гриппа В. Как и с одним подтипом HA, подтипы NA могут быть идентичными или разными. Предпочтительные подтипы HA включают H1, H3 и В.

Для производства смешанной вакцины, содержащей два или более подтипа HA, сплит-вакцины против гриппа, каждая из которых относится к одному подтипу HA, подвергают кислотной обработке, и множество (две или более) сплит-вакцин против гриппа, полученных таким образом, можно смешивать вместе. Альтернативно, смешанная вакцина также может быть получена путем проведения кислотной обработки сплит-вакцины на основе HA гриппа, предварительно приготовленной путем смешивания

вакцин двух или более подтипов НА. Для иммунизации вакциной в качестве вакцины, включающей два или более подтипа, вакцина предпочтительно включает от одного до трех подтипов, выбранных из группы, состоящей из Н1, Н3 и В.

В предпочтительном варианте осуществления сплит-вакцина на основе НА гриппа, полученная способом по настоящему изобретению, связывается с ЛАН-связывающим моноклональным антителом сильнее, чем НА сплит-вакцина из предшествующего уровня техники. Например, сплит-вакцина на основе НА гриппа связывается с ЛАН-связывающим моноклональным антителом по меньшей мере в 1,05 раз сильнее, предпочтительно по меньшей мере в 1,1 раза, более предпочтительно по меньшей мере в 1,5 раза и даже более предпочтительно по меньшей мере в два раза сильнее, чем НА сплит-вакцина из предшествующего уровня техники. В этом контексте "сплит-вакцина на основе НА гриппа связывается по меньшей мере в 1,05 раза сильнее, по меньшей мере в 1,1 раза, по меньшей мере в 1,5 раза или по меньшей мере в два раза сильнее, чем НА сплит-вакцина из предшествующего уровня техники" означает, например, что обратная величина от концентрации антитела в то время, когда абсорбция определенной путем регрессии, составляет 0,7, по меньшей мере в 1,05 раза больше, по меньшей мере в 1,1 раз, по меньшей мере в 1,5 раза или по меньшей мере в два раза больше обратной величины от концентрации антител от сплит-вакцины на основе НА из предшествующего уровня техники. В предпочтительном варианте осуществления способность связывания сплит-вакцины на основе НА гриппа из настоящего изобретения с моноклональным антителом, связывающим ЛАН, выше, чем у сплит-вакцины на основе НА гриппа из предшествующего уровня техники. Хотя верхний предел особо не ограничивается, 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. В качестве альтернативы диапазон связывающей способности сплит-вакцины на основе НА гриппа по настоящему изобретению с моноклональным антителом, связывающим ЛАН, по сравнению с таковой у сплит-вакцины на основе НА из предшествующего уровня техники может быть указан 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 связывающей способности сплит-вакцины на основе НА гриппа с моноклональным антителом, связывающим ЛАН, можно использовать любой метод без конкретных ограничений, и можно использовать общий метод, известный специалистам в данной области техники. Например, связывающая способность может быть измерена способом, описанным в примерах настоящей заявки.

В настоящей заявке "ЛАН-связывающее моноклональное антитело" означает моноклональное антитело, которое связывается с ЛАН. Для получения моноклонального антитела можно использовать любой метод без конкретных ограничений, и можно использовать общий метод, известный специалистам в данной области техники. При измерении связывающей способности НА сплит-вакцины против гриппа с ЛАН-связывающим моноклональным антителом предполагается, что ЛАН-связывающее моноклональное антитело способно связываться с пептидом, соответствующим по меньшей мере части ЛАН вируса гриппа, из которой была получена сплит-вакцина на основе НА гриппа.

В этой заявке "НА сплит-вакцина из предшествующего уровня техники" означает вакцину, из которой липидные компоненты, которые становятся пирогенами, удаляют посредством обработки цельновирусной вакцины эфиром, и может быть получена, например, способом, описанным в примере 1 настоящей заявки. НА сплит-вакцина из предшествующего уровня техники может также представлять собой сплит-вакцину на основе НА гриппа, полученную без обработки кислотой, в отличие от сплит-вакцины на основе НА гриппа по настоящему изобретению, полученной способом, включающим следующую кислотную обработку.

Производство сплит-вакцины на основе НА гриппа по настоящему изобретению может включать обработку формалином. В предпочтительном варианте осуществления кислотную обработку сплит-вакцины на основе НА гриппа проводят перед обработкой формалином. При получении антигена сплит-вакцины на основе НА гриппа по настоящему изобретению (сплит-вакцины на основе НА гриппа, способной вызвать выработку антитела, которое связывается с ЛАН стволовой области НА) фракцию НА для использования в сплит-вакцине на основе НА гриппа из предшествующего уровня техники подвергают кислотной обработке, а затем обработке формалином. Это позволяет получить антиген НА сплит-вакцины против гриппа, который более эффективно продуцирует перекрестно-реактивные антитела и, таким образом, является более предпочтительным в качестве универсального антигена вакцины против гриппа. То есть в предпочтительном варианте осуществления настоящей заявки фракцию НА, из которой удаляют жировые растворители от обработки вирусных частиц эфиром или любыми другими подходящими агентами, подвергают кислотной обработке, а затем обработке формалином.

В предпочтительном варианте осуществления настоящей заявки сплит-вакцина на основе НА гриппа перед кислотной обработкой представляет собой сплит-вакцину, которая не подвергалась обработке формалином.

Коммерческая НА вакцина против гриппа Influenza NA Vaccine (торговое название) уже подвергалась обработке формальдегидом или веществом, имеющим эквивалентное действие, после того, как вирус разлагали эфиром или любыми другими подходящими агентами и удаляли жировые растворители, как описано в Стандартах на биологические продукты (30 марта 2004, Министерское уведомление №155

Министерства здравоохранения, труда и социального обеспечения, последняя редакция от 30 ноября 2018, Министерское уведомление №409). Предпочтительно не используют коммерческую Influenza HA Vaccine (торговое название), которая является одной из HA сплит-вакцин против гриппа, для производства сплит-вакцины на основе HA гриппа по настоящему изобретению, поскольку она уже была обработана формальдегидом или какими-либо другими соответствующими агентами.

Концентрация формалина в растворе для обработки формалином для использования при формалиновой обработке сплит-вакцины на основе HA гриппа после кислотной обработки составляет, например, от 0,0005 об.% до 10 об.%, предпочтительно от 0,001 об.% до 1 об.%, более предпочтительно от 0,003 об.% до 0,5 об.% и еще более предпочтительно от 0,005 об.% до 0,1 об.%. Время обработки формалином составляет, например, от 1 часа до 10 дней, предпочтительно от 2 часов до 5 дней, более предпочтительно от 12 часов до 3 дней. Температура обработки формалином составляет, например, от 0°C до 75°C, предпочтительно от 1°C до 37°C, более предпочтительно от 1°C до 30°C.

Предпочтительно применяют формалин медицинского качества.

Способ получения сплит-вакцины на основе HA гриппа по настоящему изобретению может включать стадию добавления адьюванта. Примеры адьюванта включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и фосфат алюминия, хитозан, олигодезоксинуклеотиды и эмульсии масло-в-воде, но не ограничиваются ими. Среди них гидроксид алюминия является предпочтительным, и использование гидроксида алюминия в качестве адьюванта может повысить иммуногенность.

Сплит-вакцина на основе HA гриппа, полученная способом по настоящему изобретению, может быть использована, например, для дополнительной иммунизации через заранее определенный период после первоначальной иммунизации. Период после первичной иммунизации и перед дополнительной иммунизацией особо не ограничивается, 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 на основе HA гриппа для первичной и дополнительной иммунизации особо не ограничивается, но может составлять, например, от 1 мкг до 200 мкг, предпочтительно от 10 мкг до 30 мкг, более предпочтительно 15 мкг на дозу. Разовая доза составляет, например, 0,5 мл. Для первичных и дополнительных иммунизации можно использовать любой способ введения без особых ограничений, например, можно использовать назальное, подкожное, внутривенное, трансдермальное, интравитальное, слизистое или пероральное введение. Предпочтительным является внутримышечное введение.

Сплит-вакцина на основе HA гриппа, полученная способом по настоящему изобретению, обладает защитным действием против штамма вируса, проявляющего антигенную вариабельность. Например, если HA сплит-вакцина из предшествующего уровня техники приготовлена из частиц вируса гриппа H3N2 (A/Fujian/411/02 (H3N2)) и подвергнута кислотной обработке, вакцина может иметь защитный эффект против инфекции не только A/Fujian/411/02 (H3N2), но также, например, A/Guizhou/54/89 (H3N2), A/OMS/5389/88 (H3N2), A/Beijing/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/Kitakyushu/159/93 (H3N2), A/Akita/1/94 (H3N2), A/Panama/2007/99 (H3N2), A/Wyoming/03/03 (H3N2), A/New York/55/2004 (H3N2), или A/Hiroshima/52/2005 (H3N2). Кроме того, например, если HA сплит-вакцина из предшествующего уровня техники приготовлена из частиц вируса гриппа H1N1 (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) и подвергнута обработке кислотой, вакцина также может иметь защитный эффект против инфицирования 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 на основе 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 буфере до конечной концентрации 0,1 об.%, и суспендировали в нем. Добавляли и суспендировали диэтиловый эфир, и суспензию выдерживали до полного разделения водного слоя и слоя диэтилового эфира, а затем удаляли слой диэтилового эфира. После повторения этой эфирной экстракции диэтиловый эфир, оставшийся в выделенном водном слое, отгоняли при нормальном давлении для получения HA сплит-вакцины.

#### 2. Кислотная обработка.

HA сплит-вакцину суспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе и 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 минут добавляли 1М Трис-буфер (pH 8,0) для возврата pH к 7,3. После этого проводили центрифугирование для получения HA сплит-вакцины типа слитого с мембраной. Формалин добавляли к полученной таким образом сплит-вакцине на основе HA типа слитого с мембраной до конечной концентрации 0,05 об.% и выдерживали в течение нескольких дней.

НА сплит-вакцину из предшествующего уровня техники готовили таким же образом, как описано в пункте 1 выше, за исключением того, что не применяли кислотную обработку.

3. Измерение титра антител против ЛАН с помощью ИФА. 3-1. Иммунизация вакциной против гриппа H3N2.

Мышей BALB/c (самки в возрасте от 6 до 12 недель) интраперитонеально иммунизировали НА сплит-вакциной H3N2 из предшествующего уровня техники или НА сплит-вакциной типа слитого с мембраной (10 мкг вакцины +10 об.% адьюванта AddaVax (InvivoGen), растворенного в фосфатно-солевом буфере до объема жидкости 200 мкл). Через двадцать восемь дней после первичной иммунизации мышей интраперитонеально иммунизировали НА вакциной типа слитого с мембраной (10 мкг одной вакцины растворяли в фосфатно-солевом буфере до объема жидкости 200 мкл). По меньшей мере через 14 дней после дополнительной иммунизации у мышей, привитых вакциной, собирали кровь, из которой отделяли сыворотку.

3-2. Измерение с помощью ИФА.

Концентрацию антитела против ЛАН в сыворотке мышей BALB/c, интраперитонеально иммунизированных НА сплит-вакциной H3N2 из предшествующего уровня техники или НА сплит-вакциной типа слитого с мембраной, измеряли с помощью ИФА (иммуноферментного анализа) следующим образом.

В частности, синтетический пептид

(H3; Ac-RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSSEMNKLFETRRLRENADYK DDDDKC) (SEQ ID NO: 1), соответствующий части (длинной альфа-спиралью) стволовой области, растворяли в фосфатно-солевом буферном растворе (pH 7,3) до 10 мкг/мл, и добавляли в 96-луночные планшеты по 100 мкл в каждый. После выдерживания в течение ночи при 4°C каждую лунку промывали три раза фосфатно-солевым буферным раствором и добавляли 150 мкл фосфатно-солевого буферного раствора, содержащего 1 об.% бычьего сывороточного альбумина. После выдерживания при комнатной температуре в течение двух часов каждую лунку трижды промывали фосфатно-солевым буферным раствором. Затем 100 мкл серийных разведений мышинной сыворотки в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 0,05 об.% Твин 20 и 1 об.% бычьего сывороточного альбумина, и 100 мкл стандартного моноклонального антитела известной концентрации (H3; название клона V15-5) добавляли в каждую лунку. После выдерживания при комнатной температуре в течение двух часов каждую лунку трижды промывали фосфатно-солевым буферным раствором (содержащим 0,05 об.% Твина 20), и 100 мкл меченного пероксидазой антитела против IgG мыши (Southern Biotech), разбавленного фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,05 об.% Твин 20 и 1 об.% бычьего сывороточного альбумина, добавляли в каждую лунку. После выдерживания при комнатной температуре в течение двух часов каждую лунку трижды промывали фосфатно-солевым буферным раствором (содержащим 0,05 об.% Твин 20). Затем 30 мг таблетки о-фенилендиамина (Sigma) и 24 мкл 30% раствора перекиси водорода (30 мас.%; Sigma) добавляли к 60 мл цитратного буфера (pH 5,0) в качестве субстрата, и 100 мкл полученного раствора добавляли в каждую лунку. После проявления окраски добавляли 50 мкл 1 моль/л серной кислоты (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), чтобы остановить реакцию, и измеряли значение поглощения при 490 нм, используя Microplate Reader 450 (Biorad).

Как показано на фиг. 2, титр антитела против ЛАН в сыворотке мышей BALB/c, интраперитонеально иммунизированных НА сплит-вакциной типа слитого с мембраной, был значительно выше, чем титр антитела против ЛАН в сыворотке мышей BALB/c, интраперитонеально иммунизированных НА сплит-вакциной из предшествующего уровня техники.

4. Перекрестная защита против антигенного варианта.

В эксперименте по защите от инфекции вирусом H3N2 200 мкл сыворотки, полученной от иммунизированных мышей, 200 мкл сыворотки, полученной от мышей, иммунизированных НА сплит-вакциной H3N2 из предшествующего уровня техники, или 200 мкл сыворотки, полученной от мышей, иммунизированных НА сплит-вакциной типа слитого с мембраной, вводили интраперитонеально мышам BALB/c (самкам в возрасте от 6 до 12 недель).

Через три часа после введения сыворотки другой вирус гриппа H3N2 (A/Guizhou/54/89), имеющий антигенность, отличную от вакцинного штамма, вводили интраназально в дозе 5 LD50 (в пять раз больше, чем количество вируса, летального для 50% мышей) под анестезией.

Мышей взвешивали и наблюдали ежедневно в течение 21 дня после вирусной инфекции для изучения изменения массы тела и выживаемости. Гуманная конечная точка была установлена на уровне 25% потери массы тела.

Как показано на фиг. 3, в отношении мышей BALB/c, иммунизированных НА сплит-вакциной типа слитого с мембраной, снижение выживаемости было значительно ограничено на девятый день и позже после инфицирования другим вирусом гриппа H3N2 с отличающейся антигенностью.

5. Измерение титра антител против ЛАН с помощью ИФА. 5-1. Частицы вируса гриппа H1N1.

Мышам C57BL/6 (самки в возрасте от 6 до 12 недель) интраперитонеально вводили НА сплит-вакцину H1N1 из предшествующего уровня техники или НА сплит-вакцину типа слитого с мембраной (10 мкг вакцины +10 мкг CpG-ODN 1760, суспензированной в фосфатно-солевом буфере и смешанной с равным объемом неполного адьюванта Фрейнда (ROCKLAND) до объема жидкости 200 мкл). Через 28

дней после первоначальной иммунизации мышей интраперитонеально иммунизировали НА сплит-вакциной типа слитого с мембраной (10 мкг вакцины +10 мкг CpG-ODN, суспендированной в фосфатно-солевом буфере и смешанной с равным объемом неполного адьюванта Фрейнда (ROCKLAND) до объема жидкости 200 мкл таким же образом, как и при первичной иммунизации). По меньшей мере через 14 дней после дополнительной иммунизации у мышей, привитых вакциной, собирали кровь, из которой отделяли сыворотку.

5-2. Измерение с помощью ИФА.

Концентрацию антитела против ЛАН в сыворотке мышей C57BL/6, интраперитонеально иммунизированных НА сплит-вакциной H1N1 из предшествующего уровня техники или НА сплит-вакциной типа слитого с мембраной, измеряли с помощью ИФА следующим образом.

Измерение выполняли таким же образом, как описано выше, за исключением того, что использовали синтетический пептид

(H1; Ac-RIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNADYK DDDDKC) (SEQ ID NO: 2), соответствующий части (длинной альфа-спирали) стволовой области, и стандартное антитело известной концентрации (H1; название клона F2).

Как показано на фиг. 4, титр антитела против ЛАН в сыворотке мышей C57BL/6, интраперитонеально иммунизированных НА сплит-вакциной типа слитого с мембраной, был значительно выше, чем титр антитела против ЛАН в сыворотке C57BL/6 мышей, интраперитонеально иммунизированных НА сплит-вакциной из предшествующего уровня техники.

6. Перекрестная защита от антигенного варианта.

В эксперименте по защите от заражения вирусом H1N1 200 мкл сыворотки, полученной от неиммунизированных мышей, 200 мкл сыворотки, полученной от мышей, иммунизированных НА сплит-вакциной H1N1 из предшествующего уровня техники, или 200 мкл сыворотки, полученной от мышей, иммунизированных НА сплит-вакциной типа слитого с мембраной, вводили интраперитонеально мышам C57BL/6 (самкам в возрасте от 6 до 12 недель).

Через три часа после введения сыворотки другой вирус гриппа H1N1 (A/Narita/1/09), имеющий антигенность, отличную от вакцинного штамма, интраназально вводили в дозе 5 LD<sub>50</sub> (в пять раз больше, чем количество вируса, летального для 50% мышей) под анестезией.

Мышей наблюдали ежедневно в течение 20 дней после вирусной инфекции для изучения выживаемости. Как показано на фиг. 5, что касается мышей C57BL/6, иммунизированных НА сплит-вакциной типа слитого с мембраной, снижение выживаемости было значительно ограничено на девятый день и позже после инфицирования другим вирусом гриппа H1N1 с другой антигенностью.

7. Связывающая способность антитела к эпитопу ЛАН.

Связывание моноклональных антител против ЛАН (от №1 до №5 на фиг. 6), полученных из периферической крови мыши или человека, инфицированной штаммом X31, с НА сплит-вакциной из предшествующего уровня техники или НА сплит-вакциной типа слитого с мембраной измеряли с помощью ИФА (иммуноферментного анализа). НА сплит-вакцину из предшествующего уровня техники или НА сплит-вакцину типа слитого с мембраной против вируса гриппа H3N2 (штамм X31) растворяли в фосфатно-солевом буферном растворе (рН 7,3) и добавляли в 96-луночный планшет по 50 мкл в каждую лунку. После выдерживания в течение ночи при 4°C каждую лунку трижды промывали фосфатно-солевым буфером и добавляли 150 мкл фосфатно-солевого буфера, содержащего 1 об.% бычьего сывороточного альбумина. После инкубации при комнатной температуре в течение двух часов каждую лунку трижды промывали фосфатно-солевым буферным раствором (содержащим 0,05 об.% Твин 20) и добавляли 50 мкл серийных разведений связывающего ЛАН моноклонального антитела в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 1 об.% бычьего сывороточного альбумина. После инкубации в течение ночи при 4°C каждую лунку трижды промывали фосфатно-солевым буферным раствором (содержащим 0,05 об.% Твин 20), и добавляли 100 мкл меченого пероксидазой антитела против IgG мыши (Southern Biotech), разбавленного фосфатно-солевым буферным раствором, содержащим 0,05 об.% Твин 20 и 1 об.% бычьего сывороточного альбумина, в каждую лунку. После инкубации при комнатной температуре в течение двух часов каждую лунку трижды промывали фосфатно-солевым буферным раствором (содержащим 0,05 об.% Твин 20). Затем 30 мг таблетки о-фенилендиамина (Sigma) и 24 мкл 30% раствора перекиси водорода (30% масс; Sigma) добавляли к 60 мл цитратного буфера (рН 5,0) в качестве субстрата, и 50 мкл полученного продукта добавляли в каждую лунку. После проявления окраски добавляли 25 мкл 1 моль/л серной кислоты (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), чтобы остановить реакцию, и измеряли значение поглощения при 490 нм с помощью Microplate Reader 450 (Biorad). Изменение связывающей способности рассчитывали по значениям оптической плотности, измеренным для сплит-вакцины на основе НА из предшествующего уровня техники или сплит-вакцины на основе НА типа слитого с мембраной.

Как показано на фиг. 6, связывающая способность ЛАН-связывающего моноклонального антитела с НА сплит-вакциной типа слитого с мембраной была в 1,05-21 раз выше, чем связывающая способность с НА сплит-вакциной из предшествующего уровня техники. Результаты показывают, что кислотная обра-

ботка сплит-вакцины на основе НА увеличивает связывающую способность антитела с эпитопом ЛАН.

8. Влияние порядка обработки формалином на связывающую способность антител и индукцию антител.

8-1. Приготовление предварительно обработанной формалином НА сплит-вакцины.

К частицам вируса гриппа H3N2 (штамм X31), суспендированным в фосфатно-солевом буферном растворе, добавляли Твин 80 и суспендировали до конечной концентрации 0,1 об.%. Добавляли и суспендировали диэтиловый эфир, и суспензию оставляли до полного разделения водного слоя и слоя диэтилового эфира, а затем удаляли слой диэтилового эфира.

После повторения этой экстракции эфиром диэтиловый эфир, оставшийся в извлеченном водном слое, отгоняли при нормальном давлении. Далее, добавляли формалин до конечной концентрации 0,05 об.%, и смесь выдерживали несколько дней для получения предварительно обработанной формалином НА сплит-вакцины.

8-2. Кислотная обработка предварительно обработанной формалином сплит-вакцины на основе НА.

Предварительно обработанную формалином НА сплит-вакцину суспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе, а затем проводили кислотную обработку путем добавления 0,15 М цитратного буфера (рН 3,5) для доведения рН до 5,0. После выдерживания при комнатной температуре в течение 30 минут добавляли 1 М Трис-буфер (рН 8,0) для возврата рН к 7,3. После этого проводили центрифугирование.

9. Связывающая способность антитела к эпитопу ЛАН.

Связывающую способность антитела к эпитопу ЛАН измеряли таким же образом, как описано в пункте 7 выше, и рассчитывали изменение связывающей способности. Здесь те же антитела, что и № 2, № 4 и № 5, показанные на фиг. 6, использовали в качестве моноклональных антител, а моноклональное антитело № 6, которое связывается с головной областью НА, использовали в качестве контроля.

10. Измерение титра антител против ЛАН с помощью ИФА. 10-1. Иммунизация вакциной против гриппа H3N2.

Мышей BALB/c (самки в возрасте от 6 до 12 недель) интраперитонеально иммунизировали НА сплит-вакциной H3N2 из предшествующего уровня техники или НА сплит-вакциной типа слитого с мембраной (10 мкг вакцины +10 об.% адьюванта AddaVax (InvivoGen), растворенного в фосфатно-солевом буферном растворе до объема жидкости 200 мкл). По меньшей мере через 12 дней после иммунизации у мышей, привитых вакцинами, собирали кровь, из которой отделяли сыворотку.

10-2. Измерение с помощью ИФА.

Титр антитела против ЛАН измеряли таким же образом, как описано выше в пункте 3-2.

Как показано на фиг. 7, ЛАН-связывающее моноклональное антитело связывалось с вакциной (Post-fix), которая подверглась обработке формалином после кислотной обработки в процессе получения сплит-вакцины на основе НА типа слитого с мембраной сильнее, чем с вакциной (Pre-fix), которая прошла обработку формалином перед кислотной обработкой. Результаты показывают, что время проведения обработки формалином влияет на усиление связывающей способности антитела с эпитопом ЛАН, полученным посредством кислотной обработки НА сплит-вакцины, и что обработку формалином необходимо проводить после кислотной обработки. На фигурах 7 и 8, вакцина, полученная путем кислотной обработки сплит-вакцины на основе НА после обработки формалином таким же образом, как описано в приведенном выше примере 8, называется "сплит-вакциной типа слитого с мембраной (Pre-fix)". Кроме того, в соответствии с процедурой примера 1 вакцина, полученная путем обработки сплит-вакцины на основе НА формалином после кислотной обработки таким же способом, как описано в примере 1, называется "сплит-вакциной типа слитого с мембраной (Post-fix)".

Как показано на фиг. 8, титр антитела против ЛАН в сыворотке мышей BALB/c, интраперитонеально иммунизированных НА сплит-вакциной типа слитого с мембраной, был выше, чем титр антитела против ЛАН в сыворотке мышей BALB/c, интраперитонеально иммунизированных НА сплит-вакциной из предшествующего уровня техники. Кроме того, НА сплит-вакцина типа слитого с мембраной (Postfix) показала более высокий титр антител против ЛАН, чем сплит-вакцина типа слитого с мембраной (Prefix).

11. Приготовление сплит-вакцины НА.

НА сплит-вакцину получали способом, описанным в пункте 1 выше, с использованием частиц вируса гриппа H3N2 (штамм X 31).

12. Предварительная проверка условий кислотной обработки с использованием смесительного резервуара.

В процессе кислотной обработки рН регулируют путем добавления 0,15 М цитратного буфера (рН 3,5) или разбавленной соляной кислоты к фосфатно-солевому буферному раствору. Условия гомогенизации после добавления цитратного буфера исследуют по скорости перемешивания после добавления цитратного буфера в смесительный резервуар, в который добавлен индикатор рН, и по изменению цвета по истечении времени реакции. Индикатор рН метиловый красный используют в смесительных резервуарах на 100 мл и 20 л, и изменение цвета наблюдают в течение 10 минут после добавления при скоростях перемешивания 100, 200, 300, 400 и 500 об/мин и регистрируется в видео.

## 13. Кислотная обработка.

НА сплит-вакцину суспендируют в фосфатно-солевом буфере, а затем выполняют кислотную обработку путем добавления 0,15 М цитратного буфера (рН 3,5) или разбавленной соляной кислоты для достижения 5 условий рН (2,0, 3,0, 4,0, 5,0 или 6,0). После выдерживания в 5 температурных условиях (10°C, 25°C, 35°C, 45°C или 55°C) и 3 условиях времени (в течение 10 минут, 30 минут или 1 часа), добавляют 1 М Трис-буфер (рН 8,0) для возврата значения рН к 7,3. После этого проводят центрифугирование для получения сплит-вакцины на основе НА типа слитого с мембраной. Формалин добавляют к полученной таким образом сплит-вакцине на основе НА типа слитого с мембраной до конечной концентрации 0,05 об.% и выдерживают в течение нескольких дней.

НА сплит-вакцину из предшествующего уровня техники готовили таким же образом, как описано в пункте 11 выше, за исключением того, что не применяли кислотную обработку.

## 14. Связывающая способность антитела к эпитопу LAN.

Связывание моноклональных антител против LAN (от №1 до №5 на фиг. 6), полученных из периферической крови мыши или человека, инфицированных штаммом Х31, с НА сплит-вакциной из предшествующего уровня техники или с НА сплит-вакциной типа слитого с мембраной измеряли с помощью ИФА аналогично описанному выше пункту 7, используя штамм Х31 вируса гриппа типа Н3N2.

**Промышленная применимость**

Настоящее изобретение полезно для производства вакцин против гриппа.

[Общедоступный Список последовательностей].

SEQ ID NO: 1,2: синтетический пептид.

[Список последовательностей].

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ получения сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с LAN стволовой области НА, включающий кислотную обработку сплит-вакцины НА против гриппа, которая не подвергалась обработке формалином, причем кислотную обработку проводят при 38-55°C.

2. Способ получения сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с LAN стволовой области НА, включающий:

кислотную обработку сплит-вакцины на основе НА гриппа, и

после этого обработку сплит-вакцины на основе НА гриппа формалином, причем кислотную обработку проводят при 38-55°C.

3. Способ получения сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с LAN стволовой области НА, включающий:

кислотную обработку сплит-вакцины на основе НА гриппа, которая не подвергалась обработке формалином, и

после этого обработку сплит-вакцины на основе НА гриппа формалином, причем кислотную обработку проводят при 38-55°C.

4. Способ по любому из пп.1-3, где сплит-вакцина НА также эффективна против вируса гриппа, обладающего антигенной вариабельностью.

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

6. Способ по любому из пп.1-5, где сплит-вакцина на основе НА гриппа относится к типу Н3N2 или типу Н1N1.

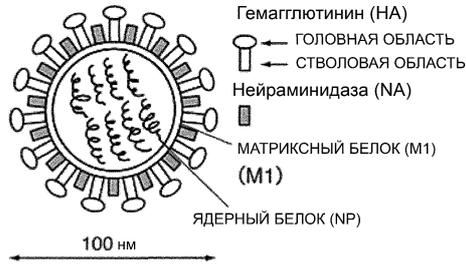
7. Способ по любому из пп.1-6, в котором сплит-вакцина на основе НА гриппа относится к типу Н3N2 или типу Н1N1, причем в этом случае способ включает этапы: проведения обработки путем добавления 0,15 М цитратного буфера (рН 3,5) к сплит-вакцине на основе НА гриппа типа Н3N2 или типа Н1N1, суспендированной в фосфатно-солевом буфере, для доведения рН до 5,0; добавления через 30 минут при комнатной температуре 1 М Трис-буфера (рН 8,0) так, чтобы рН вернулся к 7,3; проведения центрифугирования для получения сплит-вакцины на основе НА типа слитого с мембраной; а затем добавления к сплит-вакцине на основе НА типа слитого с мембраной формалина до конечной концентрации 0,05% об./об. и выдерживания в течение нескольких суток.

8. Способ по любому из пп.1-6, в котором сплит-вакцина на основе НА гриппа относится к типу Н3N2 или типу Н1N1, причем в этом случае способ включает этапы: проведения обработки путем добавления 0,15 М цитратного буфера (рН 3,5) к сплит-вакцине на основе НА гриппа, приготовленной из штамма Х31 типа Н3N2 или штамма A/Puerto Rico/8/34 типа Н1N1, суспендированной в фосфатно-солевом буфере, для доведения рН до 5,0; добавления через 30 минут при комнатной температуре 1 М Трис-буфера (рН 8,0) так, чтобы рН вернулся к 7,3; проведения центрифугирования для получения сплит-вакцины на основе НА типа слитого с мембраной; а затем добавления к сплит-вакцине на основе НА типа слитого с мембраной формалина до конечной концентрации 0,05% об./об. и выдерживания в течение нескольких суток.

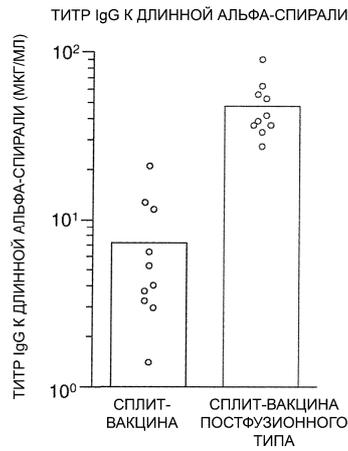
9. Способ по любому из пп.1-8, в котором сплит-вакцина на основе НА гриппа представляет собой

сплит-вакцину на основе НА гриппа одного подтипа НА.

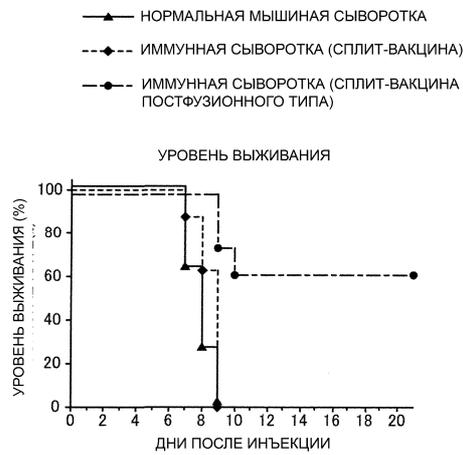
10. Способ по любому из пп.1-8, включающий смешивание двух или более антигенов сплит-вакцины на основе НА гриппа, каждый из которых получен путем кислотной обработки сплит-вакцины на основе НА гриппа одного подтипа.



Фиг. 1

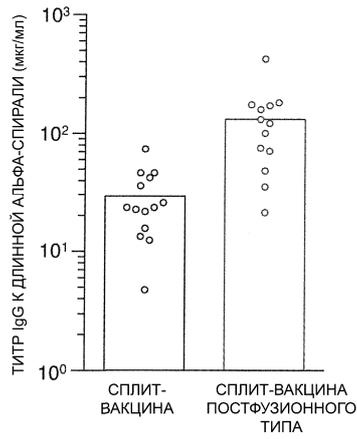


Фиг. 2



Фиг. 3

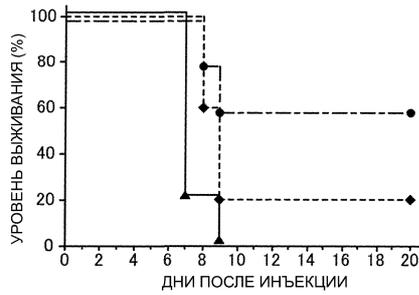
ТИТР IgG К ДЛИННОЙ АЛЬФА-СПИРАЛИ



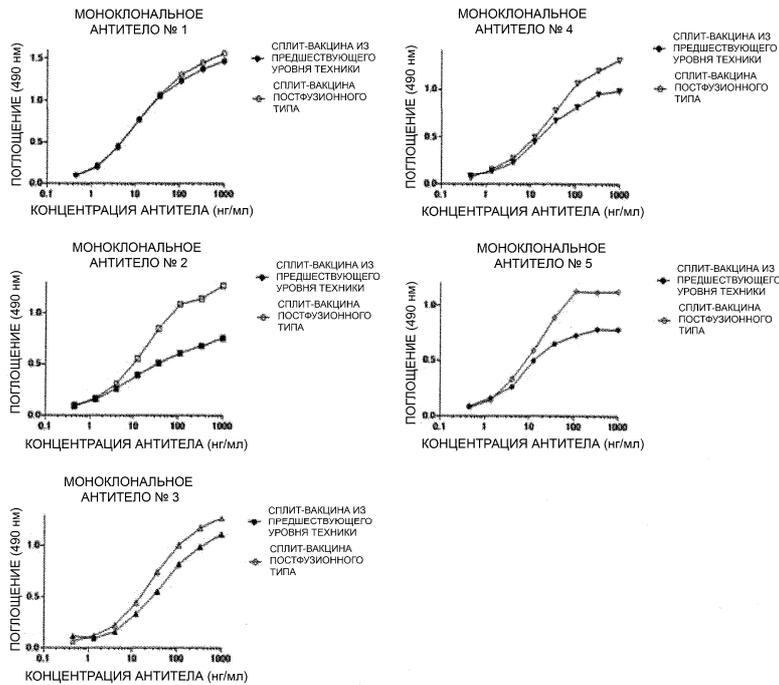
Фиг. 4

- ▲— НОРМАЛЬНАЯ МЫШИНАЯ СЫВОРОТКА
- -◆- ИММУННАЯ СЫВОРОТКА (СПЛИТ-ВАКЦИНА)
- ИММУННАЯ СЫВОРОТКА (СПЛИТ-ВАКЦИНА ПОСТФУЗИОННОГО ТИПА)

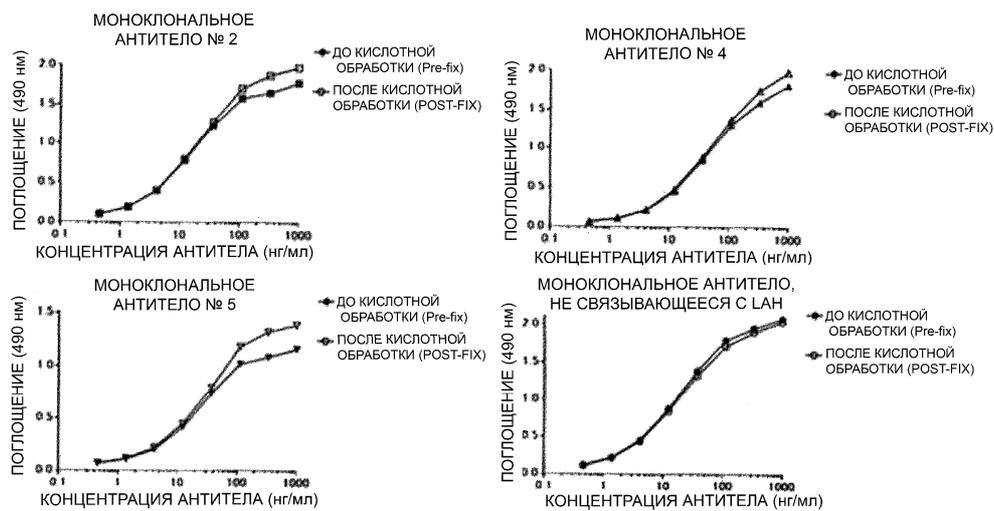
УРОВЕНЬ ВЫЖИВАНИЯ



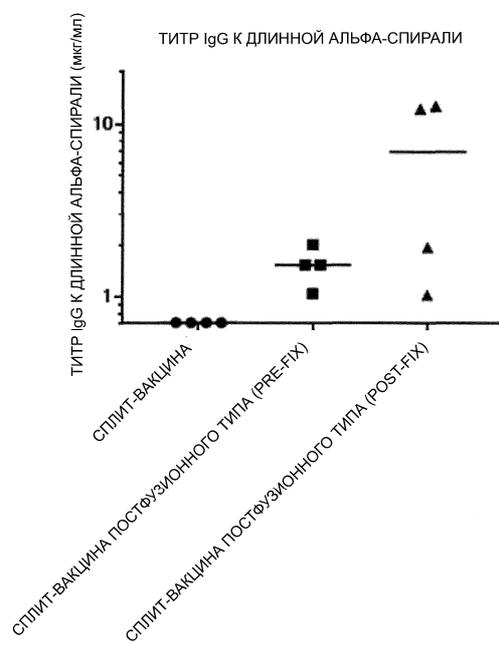
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

