(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202192398 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.23

(22) Дата подачи заявки
2020.03.03

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

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

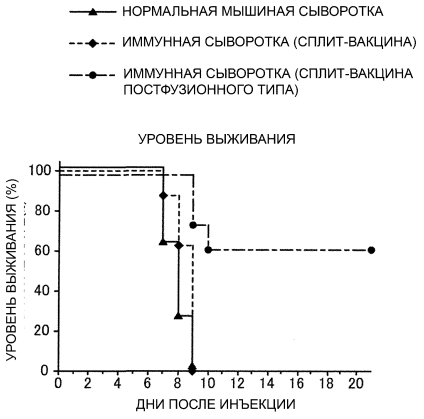
(31) **2019-038662**
(32) **2019.03.04**
(33) **JP**
(86) **PCT/JP2020/008974**
(87) **WO 2020/179797 2020.09.10**

(71) Заявитель:
ДЖЭПЭН ЭЗ РЕПРИЗЕНТИД БАИ ДИРЕКТОР ДЖЕНЕРАЛ ОФ НЭШНЛ ИНСТИТЬЮТ ОФ ИНФЕКШЕС ДИЗИЗИС; СУМИТОМО ДАЙНИППОН ФАРМА КО., ЛТД. (JP)

(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 LAH стволовой области НА. Эта НА сплит-вакцина против гриппа обладает отличной способностью противостоять заражению другими вирусами гриппа с отличающейся антигенностью.



202192398 A1

202192398 A1

СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ СПЛИТ-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГРИППА НА ОСНОВЕ ГЕМАГГЛЮТИНИНА

Область техники, к которой относится изобретение

[0001]

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

Предшествующий уровень техники

[0002]

Современные гемагглютининовые (далее также сокращенно «НА») вакцины против 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.

[0003]

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.

[0004]

Список цитирования

Патентный документ

[0005]

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

Изложение сущности изобретения

Техническая проблема

[0006]

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

Решение проблемы

[0007]

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

[0008]

В частности, настоящее изобретение относится к следующему.

[Пункт 1]

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

[Пункт 1a]

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

[Пункт 1b]

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

[Пункт 1c]

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

[Пункт 2]

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

[Пункт 3]

Способ получения НА сплит-вакцины против гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с LAH стволовой области НА, и которая эффективна против вируса гриппа, имеющего антигенную вариабельность, включающий кислотную обработку НА сплит-вакцины против 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 НА сплит-вакцина против гриппа относится к типу H3N2 или типу H1N1.

[Пункт 5c]

Способ по любому из пунктов 1-5 и 1a-1c, где НА сплит-вакцина против гриппа относится к типу H3N2 или типу H1N1, где обработку проводят путем добавления 0,15 М цитратного буфера (pH 3,5) к НА сплит-вакцине против 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 постфузионного типа; а затем к НА сплит-вакцине постфузионного типа 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 НА сплит-вакцина против гриппа относится к типу H3N2 или типу H1N1, где обработку проводят путем добавления 0,15 М цитратного буфера (pH 3,5) к НА сплит-вакцине против 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 НА сплит-вакцины постфузионного типа; а затем к НА сплит-вакцине постфузионного типа 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 НА сплит-вакцина против 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 НА сплит-вакцины против гриппа, каждый из которых получают путем кислотной обработки НА сплит-вакцины против гриппа одного подтипа.

[Пункт 6]

НА сплит-вакцина против гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с LAH стволовой области НА.

[Пункт 7]

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

[Пункт 8]

НА сплит-вакцина против гриппа по пункту 6 или 7, в которой стволовая область НА экспонирована наружу.

[Пункт 9]

НА сплит-вакцина против гриппа по любому из пунктов 6-8, где стволовая область НА антигена сплит-вакцины против гриппа, которая экспонирована наружу, усиливает антигенность LAH стволовой области НА, и НА сплит-вакцина против гриппа способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с LAH стволовой области НА.

[Пункт 10]

НА сплит-вакцина против гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с LAH стволовой области НА, причем вакцину получают путем кислотной обработки НА сплит-вакцины против гриппа.

[Пункт 10a]

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

[Пункт 10b]

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

[Пункт 10c]

НА сплит-вакцина против гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела,

связывающегося с LAH стволовой области HA, полученная с помощью производственного процесса, включающего кислотную обработку HA сплит-вакцины против гриппа, которая не подвергалась обработке формалином; и после этого обработку HA сплит-вакцины против гриппа формалином.

[Пункт 10d]

HA сплит-вакцина против гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с LAH стволовой области HA, полученная путем кислотной обработки HA сплит-вакцины против гриппа, включающей один подтип.

[Пункт 10e]

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

[Пункт 10f]

HA сплит-вакцина против гриппа по любому из пунктов 10–10e, которая также эффективна против вируса гриппа, имеющего антигенную вариабельность.

[Пункт 10g]

HA сплит-вакцина против гриппа по любому из пунктов 10–10f, которую получают способом, указанным в пунктах 5c или 5d.

[Пункт 11]

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

[0009]

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

Способ получения A включает следующие стадии: полиоксиэтиленсорбитан моноолеат (например, Tween 80) добавляют к штамму X31 типа H3N2 или штамму A/Puerto Rico/8/34 типа H1N1, 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 (pH 3,5) к НА сплит-вакцине, 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 pH к 7,3; проводят центрифугирование для получения НА сплит-вакцины постфузионного типа; а затем к НА сплит-вакцине постфузионного типа добавляют формалин до конечной концентрации 0,05 об.%.

[0010]

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

[0011]

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

[0012]

Один вариант осуществления настоящей заявки включает способ получения НА сплит-вакцины против 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 H3N2 или частицам вируса гриппа H1N1, 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 (pH 3,5) к НА сплит-вакцине, 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) для возврата pH к 7,3; проводят центрифугирование для получения НА сплит-вакцины постфузионного типа; а затем к НА сплит-вакцине постфузионного типа добавляют формалин до конечной концентрации 0,05 об.%.

[0013]

Один вариант осуществления настоящей заявки включает НА сплит-вакцину против гриппа, полученную способом получения НА сплит-вакцины против гриппа по

любому из пунктов 1-5, 1a-1c, 5a и 5b, где вакцину производят по способу получения B.

[0014]

Один вариант осуществления настоящей заявки включает HA сплит-вакцину против гриппа по любому из пунктов 6-11 и 10a-10f, где HA сплит-вакцину против гриппа производят способом получения B.

[0015]

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

Способ получения C, включающий следующие этапы: обработку проводят путем добавления 0,15 M цитратного буфера (pH 3,5) к HA сплит-вакцине против гриппа, полученной из штамма X31 типа H3N2 или штамма A/Puerto Rico/8/34 типа H1N1, суспендированного в фосфатно-солевом буферном растворе, для доведения pH до 5,0; через 30 минут при комнатной температуре добавляют 1 M Трис-буфер (pH 8,0) для возврата pH к 7,3; проводят центрифугирование для получения HA сплит-вакцины постфузионного типа; а затем к HA сплит-вакцине постфузионного типа добавляют формалин до конечной концентрации 0,05 об.%.

[0016]

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

[0017]

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

[0018]

Один вариант осуществления настоящей заявки включает способ получения HA сплит-вакцины против 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 M цитратного буфера (pH 3,5) к HA сплит-вакцине против 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 M Трис-буфер (pH 8,0) для возврата pH к 7,3; проводят центрифугирование для получения HA сплит-вакцины

постфузионного типа; а затем к НА сплит-вакцине постфузионного типа добавляют формалин до конечной концентрации 0,05 об.%.

[0019]

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

[0020]

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

Преимущества изобретения

[0021]

В соответствии с настоящим изобретением НА сплит-вакцину против 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 НА сплит-вакцину против гриппа, которая также эффективна против вируса гриппа, имеющего антигенную вариабельность.

Краткое описание фигур

[0022]

Фигура 1 является схематической диаграммой, иллюстрирующая вирус гриппа.

Фигура 2 представляет собой график, показывающий увеличение титра антитела против LAH в сыворотках мышей, иммунизированных НА сплит-вакциной H3N2 постфузионного типа.

Фигура 3 представляет собой график, показывающий улучшение перекрестной защитной способности мышей, иммунизированных НА сплит-вакциной H3N2 постфузионного типа против антигенного варианта.

Фигура 4 представляет собой график, показывающий увеличение титра антитела против LAH в сыворотке мышей, иммунизированных НА сплит-вакциной H1N1 постфузионного типа.

Фигура 5 представляет собой график, показывающий улучшение перекрестной защитной способности мышей, иммунизированных НА сплит-вакциной H1N1 постфузионного типа против антигенного варианта.

Фигура 6 демонстрирует графики, каждый из которых показывает, что

моноклональное антитело, связывающееся с LAH, более прочно связывается с HA сплит-вакциной постфузионного типа, чем с HA сплит-вакциной из предшествующего уровня техники.

Фигура 7 демонстрирует графики, каждый из которых показывает, что моноклональное антитело, связывающееся с LAH, прочно связывается с HA сплит-вакциной постфузионного типа, которая была подвергнута обработке формалином после кислотной обработки.

Фигура 8 представляет собой график, показывающий увеличение титра антитела против LAH в сыворотке мышей, иммунизированных HA сплит-вакцинами H3N2 постфузионного типа ((Pre-fix) и (Post-fix)).

Описание вариантов осуществления изобретения

[0023]

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.

[0024]

Способ получения HA сплит-вакцины против гриппа согласно этому варианту осуществления включает стадию кислотной обработки HA сплит-вакцины против гриппа.

[0025]

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

[0026]

Гликопротеин, называемый «спайк-белком», выступает с поверхности вируса гриппа (фигура 1). Вирус гриппа A 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. HA часто обеспечивает антигенную вариабельность. NA ослабляет связь инфицированной клетки с

НА и служит для высвобождения реплицированных вирусов из клетки.

[0027]

НА вируса гриппа А делится на две области, а именно, головную область и стволовую область (фигура 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.

[0028]

Кислотная обработка НА сплит-вакцины против гриппа изменяет структуру НА белка на структуру, называемую структурой постфузионного типа. В белке НА постфузионного типа 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 НА постфузионного типа используют в качестве вакцины, индуцируется антитело, которое связывается с LAH стволовой области, и что это антитело оказывает защитный эффект против штамма вируса, который обладает антигенной вариабельностью. Настоящее изобретение основано на этом факте.

[0029]

Кислотная обработка особо не ограничивается и может быть проведена при pH, 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 pH 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.

[0030]

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.

[0031]

Основываясь на различиях в антигенности, НА вируса гриппа А классифицируется на 18 подтипов (от H1 до H18), а NA - на 9 подтипов (от N1 до N9). НА сплит-вакцина против гриппа по настоящему изобретению применима ко всем этим подтипам. Кроме того, способ получения НА сплит-вакцины против гриппа согласно настоящему изобретению позволяет получить вакцину, которая эффективна не только против вируса гриппа А, но также против вируса гриппа В, имеющего НА.

[0032]

НА сплит-вакцина против гриппа, полученная способом согласно настоящему изобретению, вызывает выработку антитела, которое связывается с LAH, 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 НА. Кроме того, НА сплит-вакцина против гриппа, полученная способом согласно настоящему изобретению, может обладать перекрестной реактивностью между подтипами НА аналогичных аминокислотных последовательностей LAH (например, H3 и H7).

[0033]

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

[0034]

Для производства смешанной вакцины, содержащей два или более подтипа НА, сплит-вакцины против гриппа, каждая из которых относится к одному подтипу НА, 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 НА сплит-вакцины против 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 H1, H3 и B.

[0035]

В предпочтительном варианте осуществления НА сплит-вакцина против гриппа, полученная способом по настоящему изобретению, связывается с LAH-связывающим моноклональным антителом сильнее, чем НА сплит-вакцина из предшествующего уровня техники. Например, НА сплит-вакцина против гриппа связывается с LAH-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 «НА сплит-вакцина против 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 определенная 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 НА сплит-вакцины из предшествующего уровня техники. В предпочтительном варианте осуществления способность связывания НА сплит-вакцины против гриппа из настоящего изобретения с моноклональным антителом, связывающим LAH, выше, чем у НА сплит-вакцины против 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 НА сплит-вакцины против гриппа по настоящему изобретению с моноклональным антителом, связывающим LAH, по сравнению с таковой у НА сплит-вакцины 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 НА сплит-вакцины против гриппа с моноклональным антителом, связывающим LAH, 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.

[0036]

В настоящей заявке «LAH-связывающее моноклональное антитело» означает моноклональное антитело, которое связывается с LAH. 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 LAH-связывающим моноклональным антителом предполагается, что LAH-связывающее моноклональное антитело способно связываться с пептидом, соответствующим по меньшей мере части LAH вируса гриппа, из которой была получена НА сплит-вакцина против гриппа.

[0037]

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 НА сплит-вакцину против гриппа, полученную без обработки кислотой, в отличие от НА сплит-вакцины против гриппа по настоящему изобретению, полученной способом, включающим следующую кислотную обработку.

[0038]

Производство НА сплит-вакцины против гриппа по настоящему изобретению может включать обработку формалином. В предпочтительном варианте осуществления кислотную обработку НА сплит-вакцины против гриппа проводят перед обработкой формалином. При получении антигена НА сплит-вакцины против гриппа по настоящему изобретению (НА сплит-вакцины против гриппа, способной вызвать выработку антитела, которое связывается с LAH стволовой области НА) фракцию НА для использования в НА сплит-вакцине против 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.

[0039]

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

[0040]

Коммерческая НА вакцина против гриппа Influenza НА 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 НА Vaccine (торговое название), которая является одной из НА сплит-вакцин против гриппа, для производства НА сплит-вакцины против гриппа по настоящему изобретению, поскольку она уже была обработана формальдегидом или какими-либо другими соответствующими агентами.

[0041]

Концентрация формалина в растворе для обработки формалином для использования при формалиновой обработке НА сплит-вакцины против 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°С до 75°С, предпочтительно от 1°С до 37°С, более предпочтительно от 1°С до 30°С.

[0042]

Предпочтительно применяют формалин медицинского качества.

[0043]

Способ получения НА сплит-вакцины против гриппа по настоящему изобретению может включать стадию добавления адъюванта. Примеры адъюванта 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 адъюванта может повысить иммуногенность.

[0044]

НА сплит-вакцина против 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 НА сплит-вакцины против 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 иммунизаций можно использовать любой способ введения без особых ограничений, например, можно использовать назальное, подкожное, внутрикожное, трансдермальное, внутриглазное, слизистое или пероральное введение. Предпочтительным является внутримышечное введение.

[0045]

НА сплит-вакцина против гриппа, полученная способом по настоящему изобретению, обладает защитным действием против штамма вируса, проявляющего антигенную вариабельность. Например, если НА 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/Kitakyushyu/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 НА 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

[0046]

1. Приготовление НА сплит-вакцины

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.

[0047]

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 постфузионного типа. Формалин добавляли к полученной таким образом HA сплит-вакцине постфузионного типа до конечной концентрации 0,05 об.% и выдерживали в течение нескольких дней.

[0048]

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

[0049]

3. Измерение титра антител против LAH с помощью ИФА.

3-1. Иммунизация вакциной против гриппа H3N2

Мышей BALB/c (самки в возрасте от 6 до 12 недель) интраперитонеально иммунизировали HA сплит-вакциной H3N2 из предшествующего уровня техники или HA сплит-вакциной постфузионного типа (10 мкг вакцины + 10 об.% адъюванта AddaVax (InvivoGen), растворенного в фосфатно-солевом буфере до объема жидкости 200 мкл). Через двадцать восемь дней после первичной иммунизации мышей интраперитонеально иммунизировали HA вакциной постфузионного типа (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.

[0050]

3-2. Измерение с помощью ИФА

Концентрацию антитела против LAH в сыворотке мышей BALB/c, интраперитонеально иммунизированных HA сплит-вакциной H3N2 из предшествующего уровня техники или HA сплит-вакциной постфузионного типа, измеряли с помощью ИФА

(иммуноферментного анализа) следующим образом.

[0051]

В частности, синтетический пептид (H3; Ac-RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMNKLFEKTRRQLRENADYKDDDDKC) (SEQ ID NO: 1), соответствующий части (длинной альфа-спирали) 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 мышиной 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 масс.%; 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).

[0052]

Как показано на фигуре 2, титр антитела против LAH в сыворотке мышей BALB/c, интраперитонеально иммунизированных HA сплит-вакциной постфузионного типа, был значительно выше, чем титр антитела против LAH в сыворотке мышей BALB/c, интраперитонеально иммунизированных HA сплит-вакциной из предшествующего уровня техники.

[0053]

4. Перекрестная защита против антигенного варианта

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

[0054]

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.

[0055]

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 масса тела.

[0056]

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

[0057]

5. Измерение титра антител против LAH с помощью ИФА.

5-1. Частицы вируса гриппа H1N1

Мышам C57BL/6 (самки в возрасте от 6 до 12 недель) интраперитонеально вводили HA сплит-вакцину H1N1 из предшествующего уровня техники или HA сплит-вакцину постфузионного типа (10 мкг вакцины + 10 мкг CpG-ODN 1760, суспендированной в фосфатно-солевом буфере и смешанной с равным объемом неполного адъюванта Фрейнда (ROCKLAND) до объема жидкости 200 мкл). Через 28 дней после первоначальной иммунизации мышей интраперитонеально иммунизировали HA сплит-вакциной постфузионного типа (10 мкг вакцины + 10 мкг CpG-ODN, суспендированной в фосфатно-солевом буфере и смешанной с равным объемом неполного адъюванта 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.

[0058]

5-2. Измерение с помощью ИФА

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

[0059]

Измерение выполняли таким же образом, как описано выше, за исключением того, что использовали синтетический пептид (H1; Ac-RIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNADYK DDDDKC) (SEQ ID NO: 2), соответствующий части (длинной альфа-спирали) стволовой области, и стандартное антитело известной концентрации (H1; название клона F2).

[0060]

Как показано на фигуре 4, титр антитела против LAH в сыворотке мышей C57BL/6, интраперитонеально иммунизированных HA сплит-вакциной постфузионного типа, был значительно выше, чем титр антитела против LAH в сыворотке C57BL/6 мышей, интраперитонеально иммунизированных HA сплит-вакциной из предшествующего уровня техники.

[0061]

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 HA сплит-вакциной H1N1 из предшествующего уровня техники, или 200 мкл сыворотки, полученной от мышей, иммунизированных HA сплит-вакциной постфузионного типа, вводили интраперитонеально мышам C57BL/6 (самкам в возрасте от 6 до 12 недель).

[0062]

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 LD50 (в пять раз больше, чем количество вируса, летального для 50% мышей) под анестезией.

[0063]

Мышей наблюдали ежедневно в течение 20 дней после вирусной инфекции для изучения выживаемости. Как показано на фигуре 5, что касается мышей C57BL/6, иммунизированных HA сплит-вакциной постфузионного типа, снижение выживаемости

было значительно ограничено на девятый день и позже после инфицирования другим вирусом гриппа H1N1 с другой антигенностью.

[0064]

7. Связывающая способность антитела к эпитопу LAH.

Связывание моноклональных антител против LAH (от №1 до №5 на фигуре 6), полученных из периферической крови мыши или человека, инфицированной штаммом X31, с HA сплит-вакциной из предшествующего уровня техники или HA сплит-вакциной постфузионного типа измеряли с помощью ИФА (иммуноферментного анализа). HA сплит-вакцину из предшествующего уровня техники или HA сплит-вакцину постфузионного типа против вируса гриппа H3N2 (штамм X31) 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 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 LAH 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 меченного 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 (pH 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 HA сплит-вакцины из предшествующего уровня техники или HA сплит-вакцины постфузионного типа.

[0065]

Как показано на фигуре 6, связывающая способность LAH-связывающего

моноклонального антитела с НА сплит-вакциной постфузионного типа была в 1,05-21 раз выше, чем связывающая способность с НА сплит-вакциной из предшествующего уровня техники. Результаты показывают, что кислотная обработка pHA сплит-вакцины увеличивает связывающую способность антитела с эпитопом LAH.

[0066]

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.

[0067]

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

Предварительно обработанную формалином НА сплит-вакцину 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 минут добавляли 1 М Трис-буфер (pH 8,0) для возврата pH к 7,3. После этого проводили центрифугирование.

[0068]

9. Связывающая способность антитела к эпитопу LAH.

Связывающую способность антитела к эпитопу LAH 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 фигуре 6, использовали в качестве моноклональных антител, а моноклональное антитело № 6, которое связывается с головной областью НА, использовали в качестве контроля.

[0069]

10. Измерение титра антител против LAH с помощью ИФА.

10-1. Иммунизация вакциной против гриппа H3N2

Мышей BALB/c (самки в возрасте от 6 до 12 недель) интраперитонеально иммунизировали HA сплит-вакциной H3N2 из предшествующего уровня техники или HA сплит-вакциной постфузионного типа (10 мкг вакцины + 10 об.% адъюванта 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.

[0070]

10-2. Измерение с помощью ИФА

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

[0071]

Как показано на фигуре 7, LAH-связывающее моноклональное антитело связывалось с вакциной (Post-fix), которая подверглась обработке формалином после кислотной обработки в процессе получения HA сплит-вакцины постфузионного типа 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 LAH, полученным посредством кислотной обработки HA сплит-вакцины, и что обработку формалином необходимо проводить после кислотной обработки. На фигурах 7 и 8, вакцина, полученная путем кислотной обработки HA сплит-вакцины после обработки формалином таким же образом, как описано в приведенном выше примере 8, называется «сплит-вакциной постфузионного типа (Pre-fix)». Кроме того, в соответствии с процедурой примера 1 вакцина, полученная путем обработки HA сплит-вакцины формалином после кислотной обработки таким же способом, как описано в примере 1, называется «сплит-вакциной постфузионного типа (Post-fix)».

[0072]

Как показано на фигуре 8, титр антитела против LAH в сыворотке мышей BALB/c, интраперитонеально иммунизированных HA сплит-вакциной постфузионного типа, был выше, чем титр антитела против LAH в сыворотке мышей BALB/c, интраперитонеально иммунизированных HA сплит-вакциной из предшествующего уровня техники. Кроме того, HA сплит-вакцина постфузионного типа (Post-fix) показала более высокий титр антител против LAH, чем сплит-вакцина постфузионного типа (Pre-fix).

[0073]

11. Приготовление сплит-вакцины HA

HA сплит-вакцину получали способом, описанным в пункте 1 выше, с

использованием частиц вируса гриппа H3N2 (штамм X 31).

[0074]

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

В процессе кислотной обработки pH регулируют путем добавления 0,15 М цитратного буфера (pH 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 pH, и по изменению цвета по истечении времени реакции. Индикатор pH 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.

[0075]

13. Кислотная обработка

НА сплит-вакцину суспендируют в фосфатно-солевом буфере, а затем выполняют кислотную обработку путем добавления 0,15 М цитратного буфера (pH 3,5) или разбавленной соляной кислоты для достижения 5 условий pH (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 (pH 8,0) для возврата значения pH к 7,3. После этого проводят центрифугирование для получения НА сплит-вакцины постфузионного типа. Формалин добавляют к полученной таким образом НА сплит-вакцине постфузионного типа до конечной концентрации 0,05 об.% и выдерживают в течение нескольких дней.

[0076]

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.

[0077]

14. Связывающая способность антитела к эпитопу LAH.

Связывание моноклональных антител против LAH (от №1 до №5 на фигуре 6), полученных из периферической крови мыши или человека, инфицированных штаммом X31, с НА сплит-вакциной из предшествующего уровня техники или с НА сплит-вакциной постфузионного типа измеряли с помощью ИФА аналогично описанному выше пункту 7, используя штамм X31 вируса гриппа типа H3N2.

Промышленная применимость

[0078]

Настоящее изобретение полезно для производства вакцин против гриппа.

[Общедоступный Список последовательностей]

[0079]

SEQ ID NO: 1, 2: синтетический пептид.

[Список последовательностей]

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения HA сплит-вакцины против гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с LAH стволовой области HA, включающий кислотную обработку HA сплит-вакцины против гриппа HA, которая не подвергалась обработке формалином.

2. Способ получения HA сплит-вакцины против гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с LAH стволовой области HA, включающий:

кислотную обработку HA сплит-вакцины против гриппа, и

после этого обработку HA сплит-вакцины против гриппа формалином.

3. Способ получения HA сплит-вакцины против гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с LAH стволовой области HA, включающий:

кислотную обработку HA сплит-вакцины против гриппа, которая не подвергалась обработке формалином, и

после этого обработку HA сплит-вакцины против гриппа формалином.

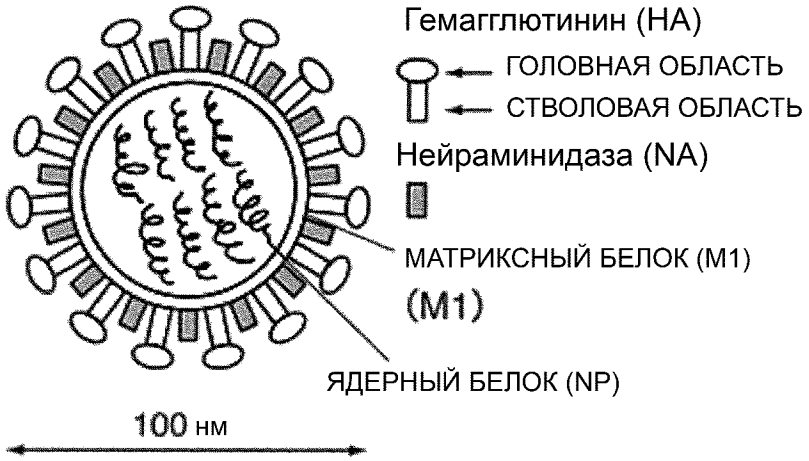
4. Способ получения HA сплит-вакцины против гриппа, которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с LAH стволовой области HA, и которая эффективна против вируса гриппа, обладающего антигенной вариабельностью, включающий кислотную обработку HA сплит-вакцины против гриппа.

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

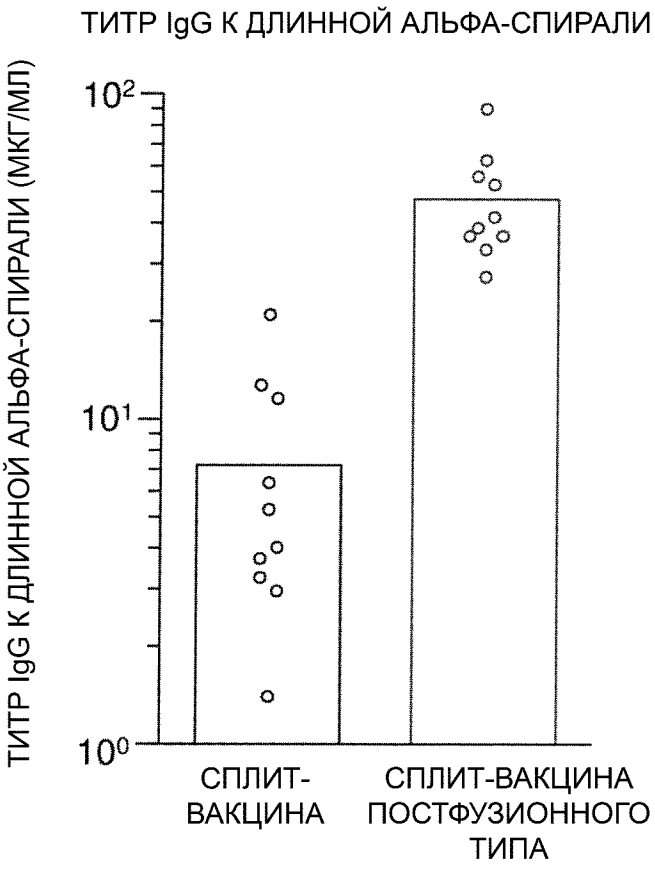
6. Способ по любому из пп.1-5, где HA сплит-вакцина против гриппа относится к типу H3N2 или типу H1N1.

7. HA сплит-вакцина против гриппа, которая эффективна против вируса гриппа, обладающего антигенной вариабельностью, и которая способна вызвать продукцию антитела, связывающегося с LAH стволовой области HA, причем вакцину производят путем кислотной обработки HA сплит-вакцины против гриппа.

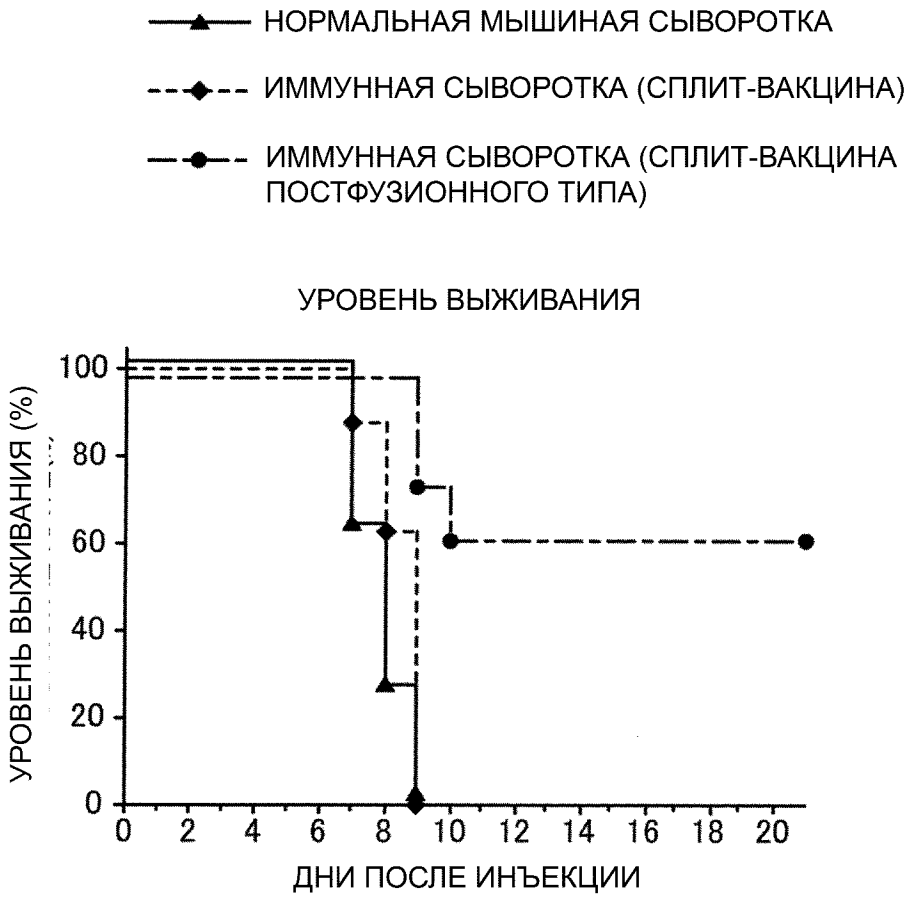
Фиг. 1


Гемагглютинин (HA)
ГОЛОВНАЯ ОБЛАСТЬ
СТВОЛОВАЯ ОБЛАСТЬ
Нейраминидаза (NA)
МАТРИКСНЫЙ БЕЛОК (M1)
(M1)
ЯДЕРНЫЙ БЕЛОК (NP)
100 нм

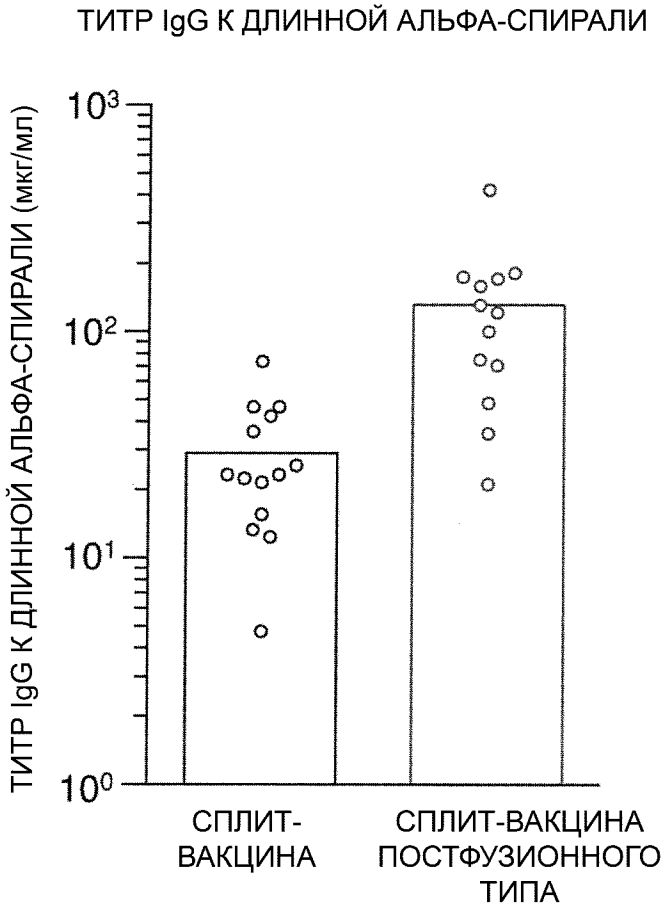
Фиг. 2


ТИТР IgG К ДЛИННОЙ АЛЬФА-СПИРАЛИ
ТИТР IgG К ДЛИННОЙ АЛЬФА-СПИРАЛИ (МКГ/МЛ)
10^2
10^1
10^0
СПЛИТ-ВАКЦИНА
СПЛИТ-ВАКЦИНА ПОСТФУЗИОННОГО ТИПА

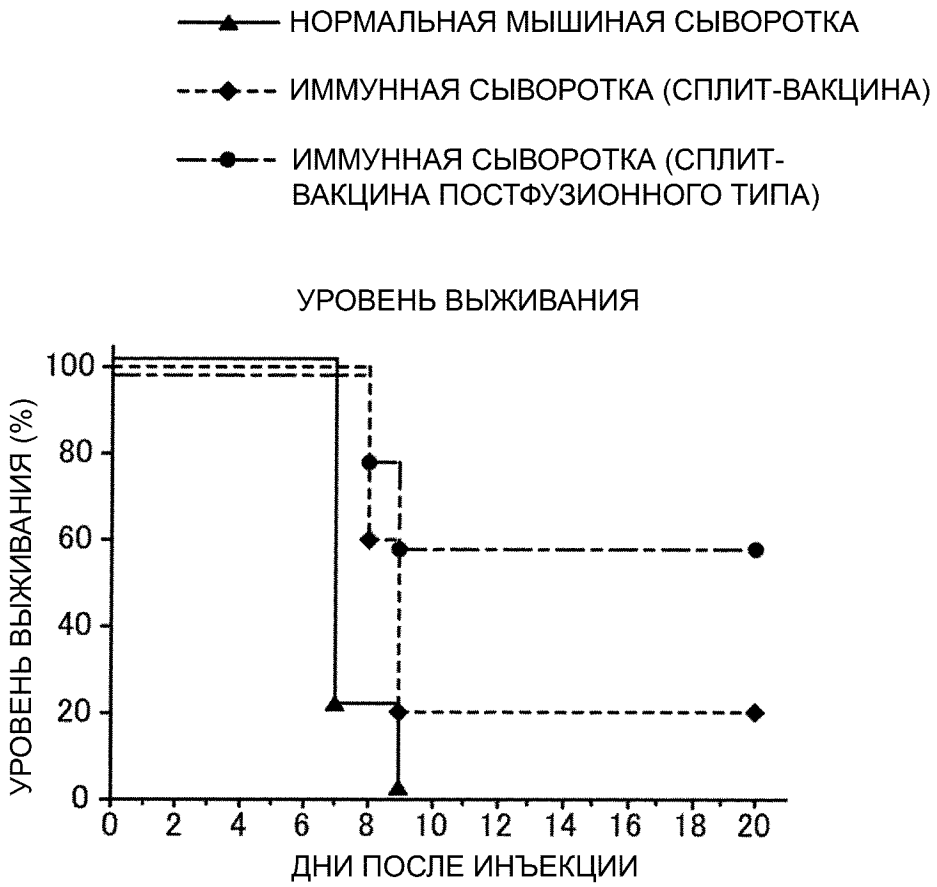
Фиг. 3


НОРМАЛЬНАЯ МЫШИНАЯ СЫВОРОТКА
ИММУННАЯ СЫВОРОТКА (СПЛИТ-ВАКЦИНА)
ИММУННАЯ СЫВОРОТКА (СПЛИТ-ВАКЦИНА ПОСТФУЗИОННОГО ТИПА)
УРОВЕНЬ ВЫЖИВАНИЯ
УРОВЕНЬ ВЫЖИВАНИЯ (%)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
ДНИ ПОСЛЕ ИНЪЕКЦИИ

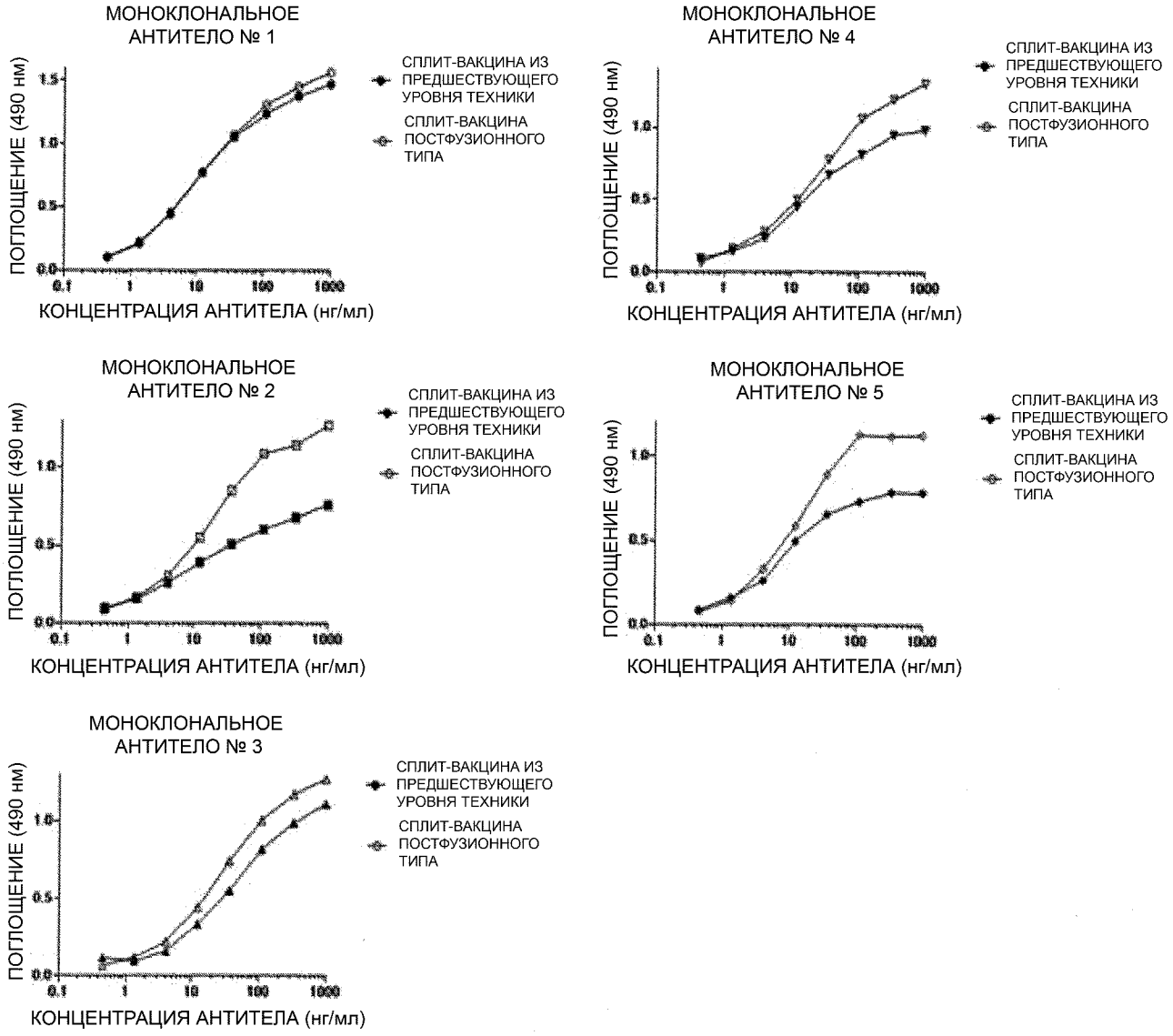
Фиг. 4

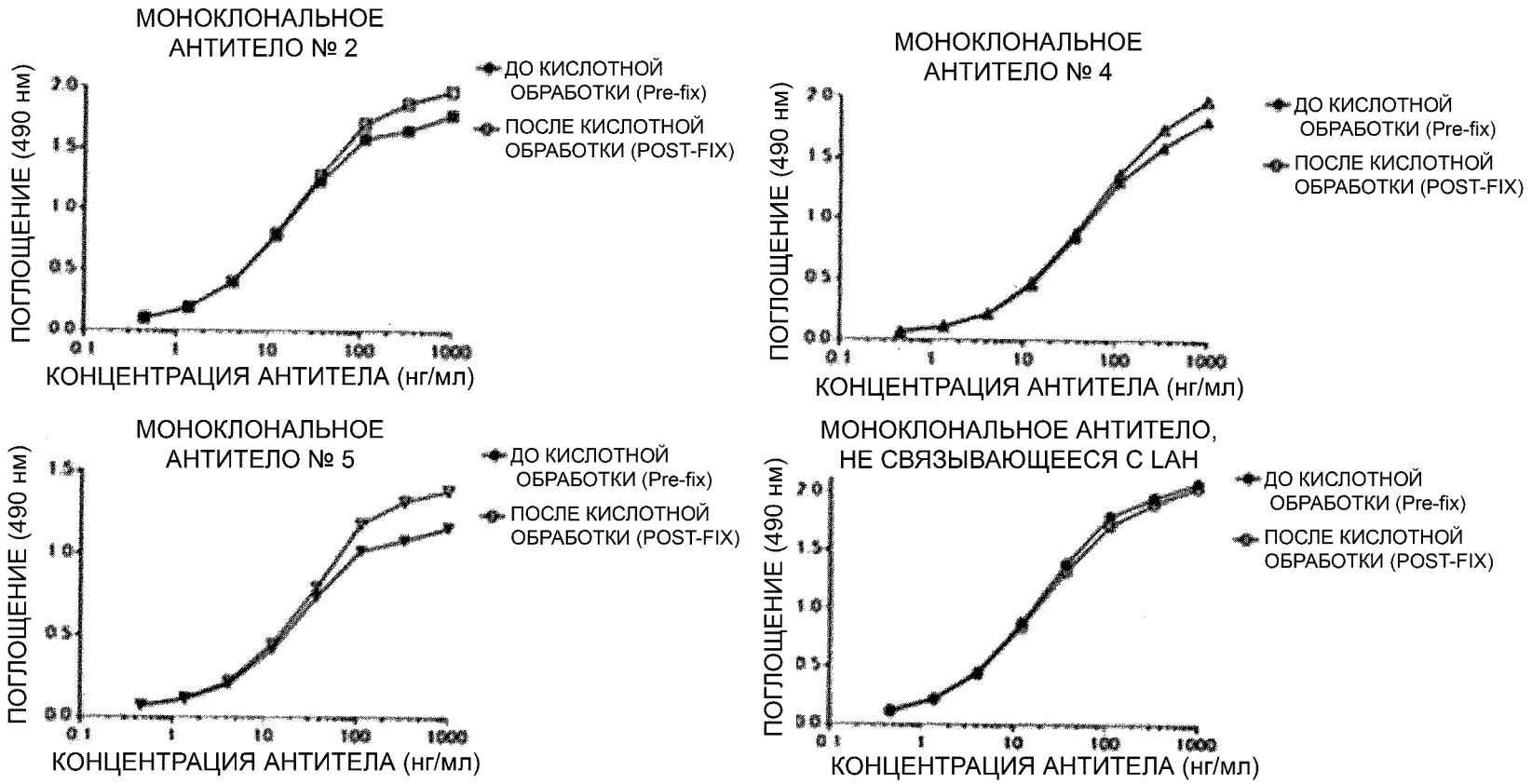

ТИТР IgG К ДЛИННОЙ АЛЬФА-СПИРАЛИ
ТИТР IgG К ДЛИННОЙ АЛЬФА-СПИРАЛИ (мкг/мл)
10^3
10^2
10^1
10^0
СПЛИТ-ВАКЦИНА
СПЛИТ-ВАКЦИНА ПОСТФУЗИОННОГО ТИПА

Фиг. 5


НОРМАЛЬНАЯ МЫШИНАЯ СЫВОРОТКА
ИММУННАЯ СЫВОРОТКА (СПЛИТ-ВАКЦИНА)
ИММУННАЯ СЫВОРОТКА (СПЛИТ-ВАКЦИНА ПОСТФУЗИОННОГО ТИПА)
УРОВЕНЬ ВЫЖИВАНИЯ
УРОВЕНЬ ВЫЖИВАНИЯ (%)
100
80
60
40
20
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
ДНИ ПОСЛЕ ИНЪЕКЦИИ

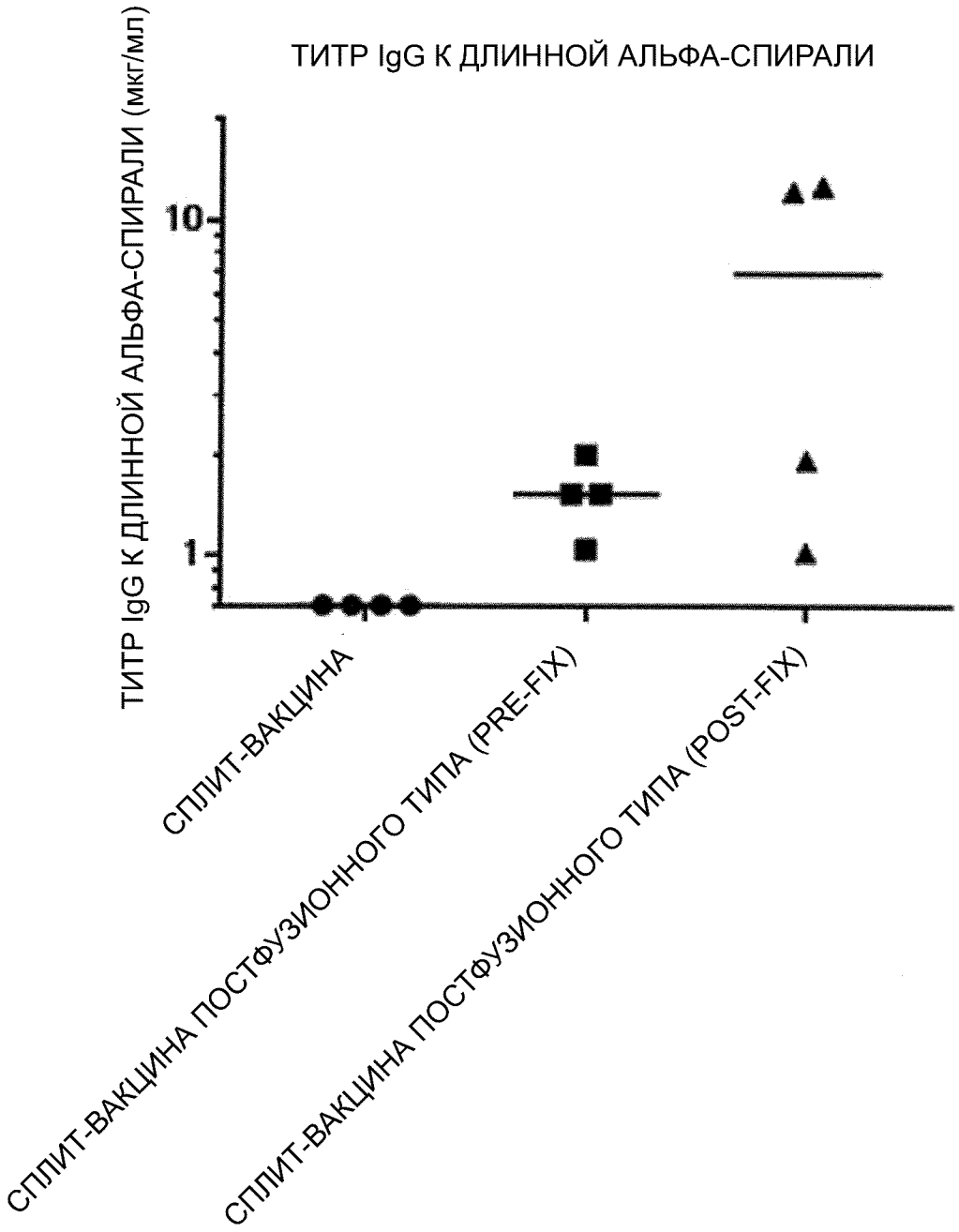
Фиг. 6


МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО № 1
ПОГЛОЩЕНИЕ (490 нм)
КОНЦЕНТРАЦИЯ АНТИТЕЛА (нг/мл)
СПЛИТ-ВАКЦИНА ИЗ ПРЕДШЕСТВУЮЩЕГО УРОВНЯ ТЕХНИКИ
СПЛИТ-ВАКЦИНА ПОСТФУЗИОННОГО ТИПА
МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО № 4
ПОГЛОЩЕНИЕ (490 нм)
КОНЦЕНТРАЦИЯ АНТИТЕЛА (нг/мл)
СПЛИТ-ВАКЦИНА ИЗ ПРЕДШЕСТВУЮЩЕГО УРОВНЯ ТЕХНИКИ
СПЛИТ-ВАКЦИНА ПОСТФУЗИОННОГО ТИПА
МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО № 2
ПОГЛОЩЕНИЕ (490 нм)
КОНЦЕНТРАЦИЯ АНТИТЕЛА (нг/мл)
СПЛИТ-ВАКЦИНА ИЗ ПРЕДШЕСТВУЮЩЕГО УРОВНЯ ТЕХНИКИ
СПЛИТ-ВАКЦИНА ПОСТФУЗИОННОГО ТИПА
МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО № 5
ПОГЛОЩЕНИЕ (490 нм)
КОНЦЕНТРАЦИЯ АНТИТЕЛА (нг/мл)
СПЛИТ-ВАКЦИНА ИЗ ПРЕДШЕСТВУЮЩЕГО УРОВНЯ ТЕХНИКИ
СПЛИТ-ВАКЦИНА ПОСТФУЗИОННОГО ТИПА
МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО № 3
ПОГЛОЩЕНИЕ (490 нм)
КОНЦЕНТРАЦИЯ АНТИТЕЛА (нг/мл)
СПЛИТ-ВАКЦИНА ИЗ ПРЕДШЕСТВУЮЩЕГО УРОВНЯ ТЕХНИКИ
СПЛИТ-ВАКЦИНА ПОСТФУЗИОННОГО ТИПА


МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО № 2
ПОГЛОЩЕНИЕ (490 нм)
КОНЦЕНТРАЦИЯ АНТИТЕЛА (нг/мл)
ДО КИСЛОТНОЙ ОБРАБОТКИ (Pre-fix)
ПОСЛЕ КИСЛОТНОЙ ОБРАБОТКИ (POST-FIX)
МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО № 4
ПОГЛОЩЕНИЕ (490 нм)
КОНЦЕНТРАЦИЯ АНТИТЕЛА (нг/мл)
ДО КИСЛОТНОЙ ОБРАБОТКИ (Pre-fix)
ПОСЛЕ КИСЛОТНОЙ ОБРАБОТКИ (POST-FIX)
МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО № 5
ПОГЛОЩЕНИЕ (490 нм)
КОНЦЕНТРАЦИЯ АНТИТЕЛА (нг/мл)
ДО КИСЛОТНОЙ ОБРАБОТКИ (Pre-fix)
ПОСЛЕ КИСЛОТНОЙ ОБРАБОТКИ (POST-FIX)
МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО, НЕ СВЯЗЫВАЮЩЕЕСЯ С LAH
ПОГЛОЩЕНИЕ (490 нм)
КОНЦЕНТРАЦИЯ АНТИТЕЛА (нг/мл)
ДО КИСЛОТНОЙ ОБРАБОТКИ (Pre-fix)
ПОСЛЕ КИСЛОТНОЙ ОБРАБОТКИ (POST-FIX)

Фиг. 7

Фиг. 8


ТИТР IgG К ДЛИННОЙ АЛЬФА-СПИРАЛИ
ТИТР IgG К ДЛИННОЙ АЛЬФА-СПИРАЛИ (мкг/мл)
10
1
СПЛИТ-ВАКЦИНА
СПЛИТ-ВАКЦИНА ПОСТфУЗИОННОГО ТИПА (PRE-FIX)
СПЛИТ-ВАКЦИНА ПОСТфУЗИОННОГО ТИПА (POST-FIX)