



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **131061** (13) **C2**
(51) МПК
A61K 39/145 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

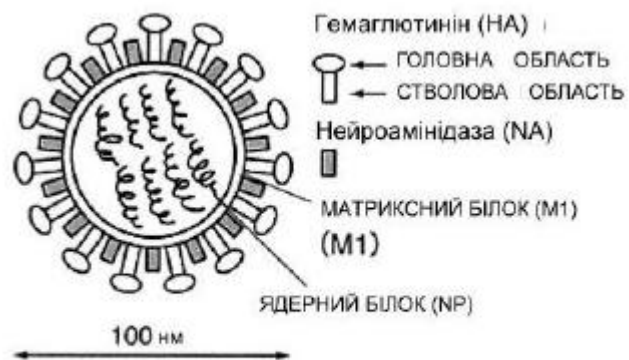
(21) Номер заявки: а 2021 05535 (22) Дата подання заявки: 03.03.2020 (24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 30.07.2026 (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 2019-038662 (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 04.03.2019 (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заяву: JP (41) Публікація відомостей про заявку: 26.01.2022, Бюл.№ 4 (46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 29.07.2026, Бюл.№ 30 (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/JP2020/008974, 03.03.2020	(72) Винахідник(и): Такахасі Йосімаса (JP), Адаті Ю (JP), Ато Манабу (JP) (73) Володілець (володільці): ДЖЕПЕН ЕЗ РЕПРІЗЕНТІД БАІ ДІРЕКТОР ДЖЕНЕРАЛ ОФ НЕШНЛ ІНСТІТЮТ ОФ ІНФЕКШЕС ДІЗІЗІС, 23-1, Toyama 1-chome, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan (JP), СУМІТОМО ФАРМА КО., ЛТД., 6-8, Doshomachi 2-chome, Chuo-ku, Osaka- shi, Osaka 541-0045, Japan (JP) (74) Представник: Слободянюк Алла Василівна, реєстр. №25 (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2013/173256 A2, 21.11.2013 QUAN FU-SHI et al. Immunogenicity of low-pH treated whole viral influenza vaccine. Virology. 2011. Vol. 417. P. 196–202, URL: https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.05.014 ADACHI YU et al. Exposure of an occluded hemagglutinin epitope drives selection of a class of cross-protective influenza antibodies. Nature Communications. 28.08.2019. Vol. 10. No. 1, Article 3885, URL: https://doi.org/10.1038/s41467-019-11821-6
---	--

(54) СПОСІБ ПРИГОТУВАННЯ СПЛІТ-ВАКЦИНИ ПРОТИ ГРИПУ НА ОСНОВІ ГЕМАГЛЮТИНІНУ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу одержання НА спліт-вакцини проти грипу, яка викликає продукцію антитіла, що зв'язується зі стовбурною областю НА вірусу грипу, яка менш піддана антигенній варіабельності. НА спліт-вакцину проти грипу піддають кислотній обробці. За допомогою кислотної обробки одержують НА спліт-вакцину проти грипу, яка викликає вироблення антитіла, що зв'язується з ЛАН стовбурної області НА. Ця НА спліт-вакцина проти грипу має відмінну здатність протистояти зараженню іншими вірусами грипу з відмінною антигенністю.

UA 131061 C2



Фиг. 1

Область техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід відноситься до способу одержання НА спліт-вакцини проти грипу.

Попередній рівень техніки

Сучасні гемаглютинінові (далі також скорочено «НА») вакцини проти грипу індукують антитіло проти НА, тим самим проявляючи захисний ефект проти інфекції. Антитіло проти НА зв'язується із частиною вірусу, названою «головною областю», що виступає назовні вірусної мембрани. Ця область найчастіше зазнає структурних змін у вірусного штаму. Отже, у деяких випадках анти-НА антитіло може не зв'язуватися з вірусом, який проявляє антигенні варіації й відрізняється від вакцинного штаму, і вакцина не може проявляти захисний ефект проти інфекції.

Недавно було виявлено, що антитіла, які зв'язуються зі стовбурною областю, яка з меншою ймовірністю проявляє антигенну варіацію, включають захисні антитіла проти інфекції (Патентний документ 1). Щоб ефективно індукувати антитіло, яке зв'язується зі стовбурною областю, був розроблений гемаглютиніновий стовбурний білок, який має стабілізовану стовбурну частину, і були проведені його клінічні випробування на людях: стовбурна область, яка первинно була нестабільною, була стабілізована за допомогою штучної зміни або зв'язування лінкерів.

Список цитування

Патентний документ

Патентний документ 1: публікація нерозглянутого японського патенту (переклад міжнародної заявки РСТ) № 2016-516090.

Виклад сутності винаходу

Технічна проблема

Через вищевикладене, метою даного винаходу є розробка способу одержання НА спліт-вакцини проти грипу, яка викликає вироблення антитіла, що зв'язується зі стовбурною областю НА, менш підданою антигенній варіабельності вірусу грипу.

Розв'язок проблеми

Спосіб одержання НА спліт-вакцини відповідно до даного винаходу включає кислотну обробку НА спліт-вакцини проти грипу, у результаті чого одержують НА спліт-вакцину проти грипу, яка викликає вироблення антитіла, яке зв'язується з довгою альфа-спіраллю (LAN) стовбурної області НА, і ефективна проти вірусу грипу, підданого антигенній варіабельності.

Зокрема, цей винахід відноситься до наступного.

[Пункт 1]

Спосіб одержання НА спліт-вакцини проти грипу, яка здатна викликати продукцію антитіла, що зв'язується з LAN стовбурної області НА, який включає кислотну обробку НА спліт-вакцини проти грипу.

[Пункт 1a]

Спосіб одержання НА спліт-вакцини проти грипу, яка здатна викликати продукцію антитіла, що зв'язується з LAN стовбурної області НА, який включає кислотну обробку НА спліт-вакцини проти грипу, яка не зазнала обробки формаліном.

[Пункт 1b]

Спосіб одержання НА спліт-вакцини проти грипу, яка здатна викликати продукцію антитіла, що зв'язується з LAN стовбурної області НА, який включає кислотну обробку НА спліт-вакцини проти грипу, і після цього обробку НА спліт-вакцини проти грипу формаліном.

[Пункт 1c]

Спосіб одержання НА спліт-вакцини проти грипу, яка здатна викликати продукцію антитіла, що зв'язується з LAN стовбурної області НА, який включає кислотну обробку НА спліт-вакцини проти грипу, яка не зазнала обробки формаліном, і після цього обробку НА спліт-вакцини проти грипу формаліном.

[Пункт 2]

Спосіб одержання відповідно до пунктів 1, 1a-1c, де НА спліт-вакцина проти грипу також ефективна проти вірусу грипу, який має антигенну варіабельність.

[Пункт 3]

Спосіб одержання НА спліт-вакцини проти грипу, яка здатна викликати продукцію антитіла, що зв'язується з LAN стовбурної області НА, і яка ефективна проти вірусу грипу, що має антигенну варіабельність, який включає кислотну обробку НА спліт-вакцини проти грипу.

[Пункт 4]

Спосіб за будь-яким з пунктів 1-3, 1a-1c, у якому кислотну обробку проводять при рН від 4,4 до 5,8.

[Пункт 5]

Спосіб за будь-яким з пунктів 1-4, 1а-1с, де НА спліт-вакцина проти грипу відноситься до типу H3N2 або типу H1N1.

[Пункт 5с]

Спосіб за будь-яким з пунктів 1-5 і 1а-1с, де НА спліт-вакцина проти грипу відноситься до типу H3N2 або типу H1N1, де обробку проводять шляхом додавання 0,15 М цитратного буфера (рН 3,5) до НА спліт-вакцини проти грипу типу H3N2 або типу H1N1, суспендованої у фосфатно-сольовому буфері для доведення рН до 5,0; через 30 хвилин за кімнатної температури додають 1 М Трис-буфер (рН 8,0), щоб повернути значення рН до 7,3; проводять центрифугування для одержання спліт-вакцини постфузійного типу; а потім до НА спліт-вакцини постфузійного типу додають формалін до кінцевої концентрації 0,05 об.%, і витримують протягом декількох діб.

[Пункт 5d]

Спосіб за будь-яким з пунктів 1-5 і 1а-1с, де НА спліт-вакцина проти грипу відноситься до типу H3N2 або типу H1N1, де обробку проводять шляхом додавання 0,15 М цитратного буфера (рН 3,5) до НА спліт-вакцини проти грипу, отриманої зі штаму Х31 типу H3N2 або штаму A/Puerto Rico/8/34 типу H1N1, суспендованої у фосфатно-сольовому буфері для доведення рН до 5,0; через 30 хвилин за кімнатної температури додають 1М Трис-буфер (рН 8,0) для повернення значення рН до 7,3; проводять центрифугування для одержання НА спліт-вакцини постфузійного типу; а потім до НА спліт-вакцини постфузійного типу додають формалін до кінцевої концентрації 0,05 об.%, і витримують протягом декількох діб.

[Пункт 5а]

Спосіб за будь-яким з пунктів 1-5, 1а-1с, 5с і 5d, де НА спліт-вакцина проти грипу є спліт-вакцина проти грипу НА одного підтипу НА.

[Пункт 5b]

Спосіб за будь-яким з пунктів 1-5, 1а-1с, 5с і 5d, що включає змішування двох або більше антигенів НА спліт-вакцини проти грипу, кожний з яких одержують шляхом кислотної обробки НА спліт-вакцини проти грипу одного підтипу.

[Пункт 6]

НА спліт-вакцина проти грипу, яка здатна викликати продукцію антитіла, що зв'язується з ЛАН стовбурної області НА.

[Пункт 7]

НА спліт-вакцина проти грипу за пунктом 6, яка також ефективна проти вірусу грипу, який має антигенну варіабельність.

[Пункт 8]

НА спліт-вакцина проти грипу за пунктом 6 або 7, у якій стовбурна область НА експонована назовні.

[Пункт 9]

НА спліт-вакцина проти грипу за будь-яким з пунктів 6-8, де стовбурна область НА антигену спліт-вакцини проти грипу, яка експонована назовні, підсилює антигенність ЛАН стовбурної області НА, і НА спліт-вакцина проти грипу здатна викликати продукцію антитіла, що зв'язується з ЛАН стовбурної області НА.

[Пункт 10]

НА спліт-вакцина проти грипу, яка здатна викликати продукцію антитіла, що зв'язується з ЛАН стовбурної області НА, причому вакцину одержують шляхом кислотної обробки НА спліт-вакцини проти грипу.

[Пункт 10а]

НА спліт-вакцина проти грипу, яка здатна викликати продукцію антитіла, що зв'язується з ЛАН стовбурної області НА, отримана шляхом кислотної обробки НА спліт-вакцини проти грипу, яка не зазнала обробки формаліном.

[Пункт 10b]

НА спліт-вакцина проти грипу, яка здатна викликати продукцію антитіла, що зв'язується з ЛАН стовбурної області НА, отримана за допомогою виробничого процесу, який включає кислотну обробку НА спліт-вакцини проти грипу; а після цього обробку НА спліт-вакцини проти грипу формаліном.

[Пункт 10с]

НА спліт-вакцина проти грипу, яка здатна викликати продукцію антитіла, що зв'язується з ЛАН стовбурної області НА, отримана за допомогою виробничого процесу, який включає кислотну обробку НА спліт-вакцини проти грипу, яка не зазнала обробки формаліном; і після цього обробку НА спліт-вакцини проти грипу формаліном.

[Пункт 10d]

НА спліт-вакцина проти грипу, яка здатна викликати продукцію антитіла, що зв'язується з

ЛАН стовбурної області НА, отримана шляхом кислотної обробки НА спліт-вакцини проти грипу, що включає один підтип.

[Пункт 10e]

НА спліт-вакцина проти грипу, здатна викликати продукцію антитіла, що зв'язується з ЛАН стовбурної області НА, що представляє собою вакцинний антиген, отриманий шляхом змішування двох або більше антигенів НА спліт-вакцини проти грипу, кожний з яких отриманий шляхом кислотної обробки НА спліт-вакцини проти грипу, що включає один підтип.

[Пункт 10f]

НА спліт-вакцина проти грипу за будь-яким з пунктів 10-10e, яка також ефективна проти вірусу грипу, який має антигенну варіабельність.

[Пункт 10g]

НА спліт-вакцина проти грипу за будь-яким з пунктів 10-10f, яку одержують способом, зазначеним у пунктах 5c або 5d.

[Пункт 11]

НА спліт-вакцина проти грипу, яка здатна викликати продукцію антитіла, що зв'язується з ЛАН стовбурної області НА, а також ефективна проти вірусу грипу, що має антигенну варіабельність, отримана шляхом кислотної обробки НА спліт-вакцини проти грипу.

Один варіант здійснення даної заявки включає спосіб одержання НА спліт-вакцини проти грипу відповідно до будь-якого з пунктів 1-5, 1a-1c, 5a і 5b, де спосіб одержання А є таким, як описано нижче.

Спосіб одержання А включає наступні стадії: поліоксиетиленсорбітан моноолеат (наприклад, Tween 80) додають до штаму Х31 типу Н3Н2 або штаму А/Puerto Rico/8/34 типу Н1Н1, суспендованому у фосфатно-сольовому буфері до кінцевої концентрації 0,1 об.%, і суспендують у ньому; додають і суспендують діетиловий ефір, і суспензію витримують доти, поки водний шар і шар діетилового ефіру повністю не розділяться, і потім видаляють шар діетилового ефіру; діетиловий ефір, що залишився у витягнутому водному шарі, відганяють за нормального тиску для одержання НА спліт-вакцини; потім проводять обробку шляхом додавання 0,15 М цитратного буфера (рН 3,5) до НА спліт-вакцини, суспендованої у фосфатно-сольовому буфері, для доведення рН до 5,0; через 30 хвилин за кімнатної температури додають 1М Трис-буфер (рН 8,0) для повернення рН до 7,3; проводять центрифугування для одержання НА спліт-вакцини постфузійного типу; а потім до НА спліт-вакцини постфузійного типу додають формалін до кінцевої концентрації 0,05 об. %.

Один варіант здійснення даної заявки включає НА спліт-вакцину проти грипу, яку одержують способом одержання НА спліт-вакцини проти грипу за будь-яким з пунктів 1-5, 1a-1c, 5a і 5b, вироблену за способом одержання А.

Один варіант здійснення даної заявки включає НА спліт-вакцину проти грипу за будь-яким з пунктів 6-11 і 10a-10f, вироблену за способом одержання А.

Один варіант здійснення даної заявки включає спосіб одержання НА спліт-вакцини проти грипу за будь-яким з пунктів 1-5, 1a-1c, 5a і 5b, що відрізняється тим, що вакцину одержують за способом одержання В, описаним нижче.

Спосіб одержання В, що включає наступні стадії: поліоксиетиленсорбітан моноолеат (наприклад, Tween 80) додають до часток вірусу грипу Н3Н2 або часток вірусу грипу Н1Н1, суспендованим у фосфатно-сольовому буфері до кінцевої концентрації 0,1 об.%, і суспендують у ньому; додають і суспендують діетиловий ефір, і суспензію витримують до повного поділу водного шару й шару діетилового ефіру, а потім видаляють шар діетилового ефіру; діетиловий ефір, що залишився у виділеному водному шарі, відганяють за нормального тиску для одержання НА спліт-вакцини; потім проводять обробку шляхом додавання 0,15 М цитратного буфера (рН 3,5) до НА спліт-вакцини, суспендованої у фосфатно-сольовому буфері, для доведення рН до 5,0; через 30 хвилин за кімнатної температури додають 1 М Трис-буфер (рН 8,0) для повернення рН до 7,3; проводять центрифугування для одержання НА спліт-вакцини постфузійного типу; а потім до НА спліт-вакцини постфузійного типу додають формалін до кінцевої концентрації 0,05 об. %.

Один варіант здійснення даної заявки включає НА спліт-вакцину проти грипу, отриману способом одержання НА спліт-вакцини проти грипу за будь-яким з пунктів 1-5, 1a-1c, 5a і 5b, де вакцину виробляють за способом одержання В.

Один варіант здійснення даної заявки включає НА спліт-вакцину проти грипу за будь-яким з пунктів 6-11 і 10a-10f, де НА спліт-вакцину проти грипу виробляють способом одержання В.

Один варіант здійснення даної заявки включає спосіб одержання НА спліт-вакцини проти грипу за будь-яким з пунктів 1-5, 1a-1c, 5a і 5b, де вакцину виробляють за способом одержання С, описаним нижче.

Спосіб одержання С, що включає наступні етапи: обробку проводять шляхом додавання 0,15 М цитратного буфера (рН 3,5) до НА спліт-вакцини проти грипу, отриманої зі штаму Х31 типу Н3Н2 або штаму А/Пуерто Ріко/8/34 типу Н1Н1, суспендованого у фосфатно-сольовому буферному розчині, для доведення рН до 5,0; через 30 хвилин за кімнатної температури додають 1 М Трис-буфер (рН 8,0) для повернення рН до 7,3; проводять центрифугування для одержання НА спліт-вакцини постфузійного типу; а потім до НА спліт-вакцини постфузійного типу додають формалін до кінцевої концентрації 0,05 об. %.

Один варіант здійснення даної заявки включає НА спліт-вакцину проти грипу НА, вироблену за способом одержання НА спліт-вакцини проти грипу відповідно до будь-якого з пунктів 1-5, 1а-1с, 5а і 5b, де вакцину виробляють за способом одержання С.

Один варіант здійснення даної заявки включає НА спліт-вакцину проти грипу за будь-яким з пунктів 6-11 і 10а-10f, з тією відмінністю, що НА спліт-вакцину проти грипу виробляють за способом одержання С.

Один варіант здійснення даної заявки включає спосіб одержання НА спліт-вакцини проти грипу за будь-яким з пунктів 1-5, 1а-1с, 5а і 5b, з тією відмінністю, що використовують спосіб одержання D, описаний нижче.

Спосіб одержання D, включає наступні стадії: обробку проводять шляхом додавання 0,15 М цитратного буфера (рН 3,5) до НА спліт-вакцини проти грипу типу Н3Н2 або типу Н1Н1, суспендованої у фосфатно-сольовому буфері, для доведення рН до 5,0; через 30 хвилин за кімнатної температури додають 1 М Трис-буфер (рН 8,0) для повернення рН до 7,3; проводять центрифугування для одержання НА спліт-вакцини постфузійного типу; а потім до НА спліт-вакцини постфузійного типу додають формалін до кінцевої концентрації 0,05 об. %.

Один варіант здійснення даної заявки включає НА спліт-вакцину проти грипу, яку одержують способом одержання НА спліт-вакцини проти грипу за будь-яким з пунктів 1-5, 1а-1с, 5а і 5b, з тією відмінністю, що використовують спосіб одержання D.

Один варіант здійснення даної заявки включає НА спліт-вакцину проти грипу за будь-яким з пунктів 6-11 і 10а-10f, з тією відмінністю, що НА спліт-вакцину проти грипу одержують за способом одержання D.

Переваги винаходу

Відповідно до даного винаходу НА спліт-вакцину проти грипу, яка викликає продукцію антитіла, що зв'язується зі стовбурною областю НА вірусу грипу, одержують за допомогою простого способу, причому стовбурна область НА з меншою ймовірністю піддається антигенній варіабельності. Таким чином, одержують НА спліт-вакцину проти грипу, яка також ефективна проти вірусу грипу, що має антигенну варіабельність.

Короткий опис фігур

Фігура 1 є схематичною діаграмою, що ілюструє вірус грипу.

Фігура 2 є графік, що показує збільшення титру антитіла проти ЛАН у сироватках мишей, імунізованих НА спліт-вакциною Н3Н2 постфузійного типу.

Фігура 3 є графік, що показує поліпшення перехресної захисної здатності мишей, імунізованих НА спліт-вакциною Н3Н2 постфузійного типу проти антигенного варіанта.

Фігура 4 є графік, що показує збільшення титру антитіла проти ЛАН у сироватці мишей, імунізованих НА спліт-вакциною Н1Н1 постфузійного типу.

Фігура 5 є графік, що показує поліпшення перехресної захисної здатності мишей, імунізованих НА спліт-вакциною Н1Н1 постфузійного типу проти антигенного варіанта.

Фігура 6 демонструє графіки, кожний з яких показує, що моноклональне антитіло, що зв'язується з ЛАН, більш міцно зв'язується з НА спліт-вакциною постфузійного типу, ніж з НА спліт-вакциною з попереднього рівня техніки.

Фігура 7 демонструє графіки, кожний з яких показує, що моноклональне антитіло, що зв'язується з ЛАН, міцно зв'язується з НА спліт-вакциною постфузійного типу, яка була піддана обробці формаліном після кислотної обробки.

Фігура 8 є графік, що показує збільшення титру антитіла проти ЛАН у сироватці мишей, імунізованих НА спліт-вакцинами Н3Н2 постфузійного типу ((Pre-fix) і (Post-fix)).

Опис варіантів здійснення винаходу

Варіанти здійснення даного винаходу будуть докладно описані нижче з посиланням на прикладені креслення. Однак варіанти здійснення призначені для полегшення розуміння принципу даного винаходу, і обсяг винаходу не обмежується наступними варіантами здійснення. Інші варіанти здійснення, у яких конфігурація наступних варіантів здійснення була відповідним чином змінена фахівцями в даній області техніки, також входять в обсяг даного винаходу.

Спосіб одержання НА спліт-вакцини проти грипу згідно із цим варіантом здійснення включає

стадію кислотної обробки НА спліт-вакцини проти грипу.

НА спліт-вакцину проти грипу готують шляхом обробки цільновірусної вакцини ефіром для видалення ліпідних компонентів, які стають пірогенами. НА спліт-вакцина проти грипу містить білок НА у якості основного інгредієнта, оскільки НА спліт-вакцину проти грипу виробляють шляхом збору білка НА, необхідного для імунізації, з поверхонь вірусних часток шляхом центрифугування в градієнті щільності.

Глікопротеїн, названий «спайк-білком», виступає з поверхні вірусу грипу (Фігура 1). Вірус грипу А має два типи спайк-білків, а саме НА і NA (нейрамінідаза), які допомагають вірусу викликати інфекцію. НА зв'язується з інфікованою клітиною й сприяє проникненню вірусу в клітину. НА часто забезпечує антигенну варіабельність. НА послабляє зв'язок інфікованої клітини з НА і служить для вивільнення реплікованих вірусів із клітини.

НА вірусу грипу А ділиться на дві області, а саме, головну область і стовбурну область (Фігура 1). Головна область містить сайт зв'язування рецептора, на якому вірус зв'язується із клітиною-мішенню. Стовбурна область містить послідовність пептиду злиття, необхідну для злиття вірусної мембрани й клітинної мембрани клітинки-мішені.

Кислотна обробка НА спліт-вакцини проти грипу змінює структуру НА білка на структуру, названу структурою постфузійного типу. У білку НА постфузійного типу стовбурна область експонована назовні від вірусної мембрани, на відміну від головної області, з більшою структурною зміною конформації стовбура антигену. Автори даного винаходу виявили *in vivo*, що, коли білок НА постфузійного типу використовують як вакцини, індукується антитіло, яке зв'язується з ЛАН стовбурної області, і що це антитіло виявляє захисний ефект проти штаму вірусу, який має антигенну варіабельність. Даний винахід заснований на цьому факті.

Кислотна обробка особливо не обмежується й може бути проведена при рН, наприклад, від 2,0 до 6,5, переважно від 3,0 до 6,5, більш переважно від 4,0 до 6,0 і більш переважно від 4,4 до 5,8. Конкретні приклади включають 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 і 6,0-6,5. Кислота для використання при кислотній обробці особливо не обмежується й може бути, наприклад, фосфорною кислотою, лимонною кислотою, maleїною кислотою, соляною кислотою або будь-якою іншою придатною кислотою.

Температура кислотної обробки становить, наприклад, від 0°C до 75°C, переважно від 10°C до 60°C, більш переважно від 20°C до 45°C і більш переважно від 25°C до 42°C. Конкретні приклади включають від 0°C до 20°C, від 5°C до 25°C, від 10°C до 30°C, від 15°C до 35°C, від 20°C до 37°C, від 25°C до 37°C, від 30°C до 50°C, від 38°C до 55°C, від 38°C до 60°C, від 38°C до 65°C, від 38°C до 70°C, від 38°C до 75°C, від 40°C до 55°C, від 40°C до 60°C, від 40°C до 65°C, від 40°C до 70°C, від 40°C до 75°C, від 42°C до 55°C, від 42°C до 60°C, від 42°C до 65°C, від 42°C до 70°C, від 42°C до 75°C, від 45°C до 55°C, від 45°C до 60°C, від 45°C до 65°C, від 45°C до 70°C і від 45°C до 75°C. Час обробки становить, наприклад, від 5 хвилин до 120 хвилин, переважно від 15 хвилин до 60 хвилин, більш переважно від 20 хвилин до 45 хвилин. Конкретні приклади включають від 5 хвилин до 60 хвилин, від 20 хвилин до 60 хвилин, від 15 хвилин до 120 хвилин, від 15 хвилин до 45 хвилин, від 20 хвилин до 60 хвилин, від 20 хвилин до 120 хвилин, від 45 хвилин до 120 хвилин і від 60 хвилин до 120 хвилин.

Ґрунтуючись на відмінностях в антигенності, НА вірусу грипу А класифікується на 18 підтипів (від H1 до H18), а NA - на 9 підтипів (від N1 до N9). НА спліт-вакцина проти грипу за даним винаходом застосовна до всіх цих підтипів. Крім того, спосіб одержання НА спліт-вакцини проти грипу відповідно до даного винаходу дозволяє одержати вакцину, яка ефективна не тільки проти вірусу грипу А, але також проти вірусу грипу В, що має НА.

НА спліт-вакцина проти грипу, отримана способом відповідно до даного винаходу, викликає вироблення антитіла, яке зв'язується з ЛАН, яка з меншою ймовірністю проявляє варіацію. Отже, вакцина може забезпечувати перехресний захист від вірусу грипу, який відомий як антигенний варіант, якщо вірус має той же підтип НА. Крім того, НА спліт-вакцина проти грипу, отримана способом відповідно до даного винаходу, може мати перехресну реактивність між підтипами НА аналогічних амінокислотних послідовностей ЛАН (наприклад, H3 і H7).

У даній заявці «НА спліт-вакцина проти грипу єдиного підтипу НА» відноситься до НА спліт-вакцини проти грипу одного підтипу НА, який обраний з 18 підтипів (від H1 до H18) вірусу грипу А або вірусу грипу В. Як і з одним підтипом НА, підтипи NA можуть бути ідентичними або різними. Кращі підтипи НА включають H1, H3 і В.

Для виробництва змішаної вакцини, що містить два або більше підтипів НА, спліт-вакцини проти грипу, кожна з яких відноситься до одного підтипу НА, піддають кислотній обробці, і множину (дві або більше) спліт-вакцин проти грипу, отриманих таким чином, можна змішувати разом. Альтернативно, змішана вакцина також може бути отримана шляхом проведення кислотної обробки НА спліт-вакцини проти грипу, попередньо приготовленої шляхом

змішування вакцин двох або більше підтипів НА. Для імунізації вакциною в якості вакцини, що включає два або більше підтипів, вакцина переважно включає від одного до трьох підтипів, обраних із групи, яка складається з Н1, Н3 і В.

У кращому варіанті здійснення НА спліт-вакцина проти грипу, отримана способом за даним винаходом, зв'язується з ЛАН-єднальним моноклональним антитілом сильніше, чим НА спліт-вакцина з попереднього рівня техніки. Наприклад, НА спліт-вакцина проти грипу зв'язується з ЛАН-єднальним моноклональним антитілом щонайменше в 1,05 разів сильніше, переважно щонайменше в 1,1 рази, більш переважно щонайменше в 1,5 разів й навіть більш переважно щонайменше у два рази сильніше, чим НА спліт-вакцина з попереднього рівня техніки. У цьому контексті «НА спліт-вакцина проти грипу зв'язується щонайменше в 1,05 разів сильніше, щонайменше в 1,1 рази, щонайменше в 1,5 разів або щонайменше у два рази сильніше, чим НА спліт-вакцина з попереднього рівня техніки» означає, наприклад, що зворотна величина від концентрації антитіла в той час, коли абсорбція визначена шляхом регресії, становить 0,7, щонайменше в 1,05 разів більше, щонайменше в 1,1 раз, щонайменше в 1,5 разів або щонайменше у два рази більше зворотної величини від концентрації антитілу від НА спліт-вакцини з попереднього рівня техніки. У кращому варіанті здійснення здатність зв'язування НА спліт-вакцини проти грипу із даного винаходу з моноклональним антитілом, що зв'язують ЛАН, вище, чим у НА спліт-вакцини проти грипу з попереднього рівня техніки. Хоча верхня межа особливо не обмежується, зв'язуюча здатність може перебувати в діапазоні, наприклад, від 1,05 до 200 разів, від 1,1 до 150 разів, від 1,5 до 100 разів або від 2 до 50 разів. У якості альтернативи діапазон єднальної здатності НА спліт-вакцини проти грипу за даним винаходом з моноклональним антитілом, що зв'язує ЛАН, у порівнянні з такою у НА спліт-вакцини з попереднього рівня техніки може бути зазначений комбінацією нижнього граничного значення, обраного з 1,05; 1,1; 1,5; 2; 3; 4 і 5, і верхнього граничного значення, обраного з 200, 150, 100, 50, 30 і 20. Для вимірювання єднальної здатності НА спліт-вакцини проти грипу з моноклональним антитілом, що зв'язує ЛАН, можна використовувати будь-який метод без конкретних обмежень, і можна використовувати загальний метод, відомий фахівцям у даній області техніки. Наприклад зв'язуюча здатність може бути обмірювана способом, описаним у прикладах даної заявки.

У даній заявці «ЛАН-єднальне моноклональне антитіло» означає моноклональне антитіло, яке зв'язується з ЛАН. Для одержання моноклонального антитіла можна використовувати будь-який метод без конкретних обмежень, і можна використовувати загальний метод, відомий фахівцям у даній області техніки. При вимірюванні єднальної здатності НА спліт-вакцини проти грипу з ЛАН-єднальним моноклональним антитілом передбачається, що ЛАН-єднальне моноклональне антитіло здатне зв'язуватися з пептидом, що відповідає щонайменше частині ЛАН вірусу грипу, з якої була отримана НА спліт-вакцина проти грипу.

У цій заявці «НА спліт-вакцина з попереднього рівня техніки» означає вакцину, з якої ліпідні компоненти, які стають пірогенами, видаляють за допомогою обробки цільновірусної вакцини ефіром, і може бути отримана, наприклад, способом, описаним у прикладі 1 даної заявки. НА спліт-вакцина з попереднього рівня техніки може також бути НА спліт-вакциною проти грипу, отриманою без обробки кислотою, на відміну від НА спліт-вакцини проти грипу за даним винаходом, отриманої способом, який включає наступну кислотну обробку.

Виробництво НА спліт-вакцини проти грипу за даним винаходом може включати обробку формаліном. У кращому варіанті здійснення кислотну обробку НА спліт-вакцини проти грипу проводять перед обробкою формаліном. При одержанні антигену НА спліт-вакцини проти грипу за даним винаходом (НА спліт-вакцини проти грипу, здатної викликати вироблення антитіла, яке зв'язується з ЛАН стовбурної області НА) фракцію НА для використання в НА спліт-вакцині проти грипу з попереднього рівня техніки піддають кислотній обробці, а потім обробці формаліном. Це дозволяє одержати антиген НА спліт-вакцини проти грипу, який більш ефективно продукує перехресно-реактивні антитіла й, таким чином, є більш кращим у якості універсального антигену вакцини проти грипу. Тобто в кращому варіанті здійснення даної заявки фракцію НА, з якої видаляють жирові розчинники від обробки вірусних часток ефіром або будь-якими іншими придатними агентами, піддають кислотній обробці, а потім обробці формаліном.

У кращому варіанті здійснення даної заявки НА спліт-вакцина проти грипу перед кислотною обробкою є спліт-вакцина, яка не зазнала обробки формаліном.

Комерційна НА вакцина проти грипу Influenza HA Vaccine (торговельна назва) уже зазнала обробки формальдегідом або речовиною, яка має еквівалентну дію, після того, як вірус розкладали ефіром або будь-якими іншими придатними агентами й видаляли жирові розчинники, як описано в Стандартах на біологічні продукти (30 березня 2004, Міністерське

повідомлення №155 Міністерства охорони здоров'я, праці й соціального забезпечення, остання редакція від 30 листопада 2018, Міністерське повідомлення №409). Переважно не використовують комерційну Influenza HA Vaccine (торговельна назва), яка є однією з HA спліт-вакцин проти грипу, для виробництва HA спліт-вакцини проти грипу за даним винаходом, оскільки вона вже була оброблена формальдегідом або якими-небудь іншими відповідними агентами.

Концентрація формаліну в розчині для обробки формаліном для використання при формаліновій обробці HA спліт-вакцини проти грипу після кислотної обробки становить, наприклад, від 0,0005 об.% до 10 об.%, переважно від 0,001 об.% до 1 об.%, більш переважно від 0,003 об.% до 0,5 об.% і ще більш переважно від 0,005 об.% до 0,1 об.%. Час обробки формаліном становить, наприклад, від 1 години до 10 днів, переважно від 2 годин до 5 днів, більш переважно від 12 годин до 3 днів. Температура обробки формаліном становить, наприклад, від 0°C до 75°C, переважно від 1°C до 37°C, більш переважно від 1°C до 30°C.

Переважають застосовують формалін медичної якості.

Спосіб одержання HA спліт-вакцини проти грипу за даним винаходом може включати стадію додавання ад'юванта. Приклади ад'юванта включають солі алюмінію, такі як гідроксид алюмінію й фосфат алюмінію, хітозан, олігодезоксинуклеотиди й емульсії масло-в-воді, але не обмежуються ними. Серед них гідроксид алюмінію є кращим, і використання гідроксиду алюмінію в якості ад'юванта може підвищити імуногенність.

HA спліт-вакцина проти грипу, отримана способом за даним винаходом, може бути використана, наприклад, для додаткової імунізації через заздалегідь визначений період після первинної імунізації. Період після первинної імунізації й перед додатковою імунізацією особливо не обмежується, але може становити, наприклад, від двадцяти днів до трьох років, переважно від трьох місяців до двох років, більш переважно від шести місяців до одного року. Кількість HA спліт-вакцини проти грипу для первинної й додаткової імунізації особливо не обмежується, але може становити, наприклад, від 1 мкг до 200 мкг, переважно від 10 мкг до 30 мкг, більш переважно 15 мкг на дозу. Разова доза становить, наприклад, 0,5 мл. Для первинних і додаткових імунізацій можна використовувати будь-який спосіб введення без особливих обмежень, наприклад, можна використовувати назальне, підшкірне, внутрішньошкірне, трансдермальне, внутрішньоочне, слизувате або пероральне введення. Кращим є внутрішньом'язове введення.

HA спліт-вакцина проти грипу, отримана способом за даним винаходом, має захисну дію проти штаму вірусу, що проявляє антигенну варіабельність. Наприклад, якщо HA спліт-вакцина з попереднього рівня техніки приготовлена із часток вірусу грипу H3N2 (A/Fujian/411/02 (H3N2)) і піддана кислотній обробці, вакцина може мати захисний ефект проти інфекції не тільки A/Fujian/411/02 (H3N2), але також, наприклад, 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), або A/Hiroshima/52/2005 (H3N2). Крім того, наприклад, якщо HA спліт-вакцина з попереднього рівня техніки приготовлена з часток вірусу грипу H1N1 (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) і піддана обробці кислотою, вакцина також може мати захисний ефект проти інфікування не тільки A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), але й, наприклад, 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), або A/Mexico/4108/2009 (H1N1).

Приклади

1. Приготування HA спліт-вакцини

Твін 80 додавали до часток вірусу грипу H3N2 (штам X31) або часток вірусу грипу H1N1 (штам A/Puerto Rico/8/34), суспендованих у фосфатно-сольовому буфері до кінцевої концентрації 0,1 об.%, і суспендували в ньому. Додавали й суспендували діетиловий ефір, і суспензію витримували до повного поділу водного шару й шару діетилового ефіру, а потім видаляли шар діетилового ефіру. Після повторення цієї ефірної екстракції діетиловий ефір, що залишився у виділеному водному шарі, відганяли за нормального тиску для одержання HA спліт-вакцини.

2. Кислотна обробка

HA спліт-вакцину суспендували у фосфатно-сольовому буферному розчині й потім проводили кислотну обробку шляхом додавання 0,15 М цитратного буфера (pH 3,5) для доведення pH до 5,0. Після витримування за кімнатної температури протягом 30 хвилин

додавали 1М Трис-буфер (pH 8,0) для повернення pH до 7,3. Після цього проводили центрифугування для одержання НА спліт-вакцини постфузійного типу. Формалін додавали до отриманої в такий спосіб НА спліт-вакцини постфузійного типу до кінцевої концентрації 0,05 об.% і витримували протягом декількох днів.

5 НА спліт-вакцину з попереднього рівня техніки готували таким самим чином, як описано в пункті 1 вище, за винятком того, що не застосовували кислотну обробку.

3. Вимірювання титру антитіл проти ЛАН за допомогою ІФА.

3-1. Імунізація вакциною проти грипу H3N2

10 Мишей BALB/c (самки у віці від 6 до 12 тижнів) інтраперитонеально імунізували НА спліт-вакциною H3N2 з попереднього рівня техніки або НА спліт-вакциною постфузійного типу (10 мкг вакцини + 10 об.% ад'юванта AddaVax (InvivoGen), розчиненого в фосфатно-сольовому буфері до обсягу рідини 200 мкл). Через двадцять вісім днів після первинної імунізації мишей інтраперитонеально імунізували НА вакциною постфузійного типу (10 мкг однієї вакцини розчиняли в фосфатно-сольовому буфері до обсягу рідини 200 мкл). Щонайменше через 14 днів після додаткової імунізації в мишей, привитих вакциною, збирали кров, з якої відокремлювали сироватку.

3-2. Вимірювання за допомогою ІФА

20 Концентрацію антитіла проти ЛАН у сироватці мишей BALB/c, інтраперитонеально імунізованих НА спліт-вакциною H3N2 з попереднього рівня техніки або НА спліт-вакциною постфузійного типу, вимірювали за допомогою ІФА (імуноферментного аналізу) у такий спосіб.

Зокрема, синтетичний пептид (H3; Ас-RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSMNKLFKTRRQLRENADYKDDDDKC) (SEQ ID NO: 1), який відповідає частині (довгій альфа-спіралі) стовбурної області, розчиняли в фосфатно-сольовому буферному розчині (pH 7,3) до 10 мкг/мл, і додавали в 96-ямкові планшети по 100 мкл у кожний. Після витримування протягом ночі при 4°C кожну лунку промивали три рази фосфатно-сольовим буферним розчином і додавали 150 мкл фосфатно-сольового буферного розчину, що містить 1 об.% бичачого сироваткового альбуміну. Після витримування за кімнатної температури протягом двох годин кожну лунку тричі промивали фосфатно-сольовим буферним розчином. Потім 100 мкл серійних розведень мишачої сироватки у фосфатно-сольовому буферному розчині, що містить 0,05 об.% Твін 20 і 1 об.% бичачого сироваткового альбуміну, і 100 мкл стандартного моноклонального антитіла відомої концентрації (H3; назва клону V15-5) додавали в кожну лунку. Після витримування за кімнатної температури протягом двох годин кожну лунку тричі промивали фосфатно-сольовим буферним розчином (який містить 0,05 об.% Твіну 20), і 100 мкл міченого пероксидазою антитіла проти IgG миші (Southern Biotech), розведеного фосфатно-сольовим буфером, який містить 0,05 об.% Твін 20 і 1 об.% бичачого сироваткового альбуміну, додавали в кожну лунку. Після витримування за кімнатної температури протягом двох годин кожну лунку тричі промивали фосфатно-сольовим буферним розчином (який містить 0,05 об.% Твін 20). Потім 30 мг таблетки о-фенілєндіаміну (Sigma) і 24 мкл 30% розчину перекису водню (30 мас.% ; Sigma) додавали до 60 мл цитратного буфера (pH 5,0) у якості субстрату, і 100 мкл отриманого розчину додавали в кожну лунку. Після прояву забарвлення додавали 50 мкл 1 моль/л сірчаної кислоти (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), щоб зупинити реакцію, і вимірювали значення поглинання при 490 нм, використовуючи Microplate Reader 450 (Biorad).

45 Як показано на Фігурі 2, титр антитіла проти ЛАН у сироватці мишей BALB/c, інтраперитонеально імунізованих НА спліт-вакциною постфузійного типу, був значно вище, ніж титр антитіла проти ЛАН у сироватці мишей BALB/c, інтраперитонеально імунізованих НА спліт-вакциною з попереднього рівня техніки.

4. Перехресний захист проти антигенного варіанта

50 В експерименті з захисту від інфекції вірусом H3N2 200 мкл сироватки, отриманої від неімунізованих мишей, 200 мкл сироватки, отриманої від мишей, імунізованих НА спліт-вакциною H3N2 з попереднього рівня техніки, або 200 мкл сироватки, отриманої від мишей, імунізованих НА спліт-вакциною постфузійного типу, вводили інтраперитонеально мишам BALB/c (самкам у віці від 6 до 12 тижнів).

55 Через три години після введення сироватки інший вірус грипу H3N2 (A/Guizhou/54/89), що має антигенність, відмінну від вакцинного штаму, вводили інтраназально в дозі 5 LD₅₀ (у п'ять раз більше, ніж кількість вірусу, летального для 50% мишей) під анестезією.

Мишей зважували й спостерігали щодня протягом 21 дня після вірусної інфекції для вивчення зміни маси тіла й виживаності. Гуманна кінцева точка була встановлена на рівні 25% втрати маса тіла.

60 Як показано на Фігурі 3, відносно мишей BALB/c, імунізованих НА спліт-вакциною

постфузійного типу, зниження виживаності було значно обмежене на дев'ятий день і пізніше після інфікування іншим вірусом грипу H3N2 з відмінною антигенністю.

5. Вимірювання титру антитіл проти ЛАН за допомогою ІФА.

5-1. Частки вірусу грипу H1N1

Мишам C57BL/6 (самки у віці від 6 до 12 тижнів) інтраперитонеально вводили НА спліт-вакцину H1N1 з попереднього рівня техніки або НА спліт-вакцину постфузійного типу (10 мкг вакцини + 10 мкг CpG-ODN 1760, суспендованої у фосфатно-сольовому буфері й змішаної з рівним обсягом неповного ад'юванта Фрейнда (ROCKLAND) до обсягу рідини 200 мкл). Через 28 днів після первинної імунізації мишей інтраперитонеально імунізували НА спліт-вакциною постфузійного типу (10 мкг вакцини + 10 мкг CpG-ODN, суспендованої у фосфатно-сольовому буфері й змішаної з рівним обсягом неповного ад'юванта Фрейнда (ROCKLAND) до обсягу рідини 200 мкл у такий самий спосіб, як і при первинній імунізації). Щонайменше через 14 днів після додаткової імунізації в мишей, привитих вакциною, збирали кров, з якої відокремлювали сироватку.

5-2. Вимірювання за допомогою ІФА

Концентрацію антитіла проти ЛАН у сироватці мишей C57BL/6, інтраперитонеально імунізованих НА спліт-вакциною H1N1 з попереднього рівня техніки або НА спліт-вакциною постфузійного типу, вимірювали за допомогою ІФА в такий спосіб.

Вимірювання виконували в такий самий спосіб, як описано вище, за винятком того, що використовували синтетичний пептид (H1; Aс-RIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNADYKDDDDKC) (SEQ ID NO: 2), який відповідає частині (довгої альфа-спіралі) стовбурної області, і стандартне антитіло відомої концентрації (H1; назва клону F2).

Як показано на Фігурі 4, титр антитіла проти ЛАН у сироватці мишей C57BL/6, інтраперитонеально імунізованих НА спліт-вакциною постфузійного типу, був значно вищим, ніж титр антитіла проти ЛАН у сироватці C57BL/6 мишей, інтраперитонеально імунізованих НА спліт-вакциною з попереднього рівня техніки.

6. Перехресний захист від антигенного варіанта

В експерименті з захисту від зараження вірусом H1N1 200 мкл сироватки, отриманої від неімунізованих мишей, 200 мкл сироватки, отриманої від мишей, імунізованих НА спліт-вакциною H1N1 з попереднього рівня техніки, або 200 мкл сироватки, отриманої від мишей, імунізованих НА спліт-вакциною постфузійного типу, вводили інтраперитонеально мишам C57BL/6 (самкам у віці від 6 до 12 тижнів).

Через три години після введення сироватки інший вірус грипу H1N1 (A/Narita/1/09), що має антигенність, відмінну від вакцинного штаму, інтраназально вводили в дозі 5 LD50 (у п'ять раз більше, ніж кількість вірусу, летального для 50% мишей) під анестезією.

Мишей спостерігали щодня протягом 20 днів після вірусної інфекції для вивчення виживаності. Як показано на Фігурі 5, що стосується мишей C57BL/6, імунізованих НА спліт-вакциною постфузійного типу, зниження виживаності було значно обмежене на дев'ятий день і пізніше після інфікування іншим вірусом грипу H1N1 з іншою антигенністю.

7. Зв'язуюча здатність антитіла до епітопу ЛАН.

Зв'язування моноклональних антитіл проти ЛАН (від №1 до №5 на Фігурі 6), отриманих з периферичної крові миші або людини, інфікованої штамом X31, з НА спліт-вакциною з попереднього рівня техніки або НА спліт-вакциною постфузійного типу вимірювали за допомогою ІФА (імуноферментного аналізу). НА спліт-вакцину з попереднього рівня техніки або НА спліт-вакцину постфузійного типу проти вірусу грипу H3N2 (штам X31) розчиняли у фосфатно-сольовому буферному розчині (рН 7,3) і додавали в 96-ячковий планшет по 50 мкл у кожну лунку. Після витримування протягом ночі за 4°C кожну лунку тричі промивали фосфатно-сольовим буфером і додавали 150 мкл фосфатно-сольового буфера, що містить 1 об.% бичачого сироваткового альбуміну. Після інкубації за кімнатної температури протягом двох годин кожну лунку тричі промивали фосфатно-сольовим буферним розчином (який містить 0,05 об.% Твін 20) і додавали 50 мкл серійних розведень Зв'язуючого ЛАН моноклонального антитіла у фосфатно-сольовому буферному розчині, що містить 1 об.% бичачого сироваткового альбуміну. Після інкубації протягом ночі за 4°C кожну лунку тричі промивали фосфатно-сольовим буферним розчином (який містить 0,05 об.% Твін 20), і додавали 100 мкл міченого пероксидазою антитіла проти IgG миші (Southern Biotech), розведеного фосфатно-сольовим буферним розчином, який містить 0,05 об.% Твін 20 і 1 об.% бичачого сироваткового альбуміну, у кожну лунку. Після інкубації за кімнатної температури протягом двох годин кожну лунку тричі промивали фосфатно-сольовим буферним розчином (який містить 0,05 об.% Твін 20). Потім 30 мг таблетки о-фенілєндіаміну (Sigma) і 24 мкл 30% розчину перекису водню (30% мас.; Sigma)

додавали до 60 мл цитратного буфера (pH 5,0) у якості субстрату, і 50 мкл отриманого продукту додавали в кожну лунку. Після прояву забарвлення додавали 25 мкл 1 моль/л сірчаної кислоти (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), щоб зупинити реакцію, і вимірювали значення поглинання при 490 нм за допомогою Microplate Reader 450 (Biorad). Зміна зв'язуючої здатності розраховували за значеннями оптичної щільності, обмірюваними для НА спліт-вакцини з попереднього рівня техніки або НА спліт-вакцини постфузійного типу.

Як показано на Фігурі 6 зв'язуюча здатність ЛАН-єднального моноклонального антитіла з НА спліт-вакциною постфузійного типу була в 1,05-21 разів вища, ніж єднальна здатність із НА спліт-вакциною з попереднього рівня техніки. Результати показують, що кислотна обробка рНА спліт-вакцини збільшує єднальну здатність антитіла з епітопом ЛАН.

8. Вплив порядку обробки формаліном на єднальну здатність антитіл і індукцію антитіл.

8-1. Приготування попередньо обробленої формаліном НА спліт-вакцини

До часток вірусу грипу H3N2 (штам Х31), суспендованих у фосфатно-сольовому буферному розчині, додавали Твін 80 і суспендували до кінцевої концентрації 0,1 об.%. Додавали й суспендували діетиловий ефір, і суспензію залишали до повного поділу водного шару й шару діетилового ефіру, а потім видаляли шар діетилового ефіру.

Після повторення цієї екстракції ефіром діетиловий ефір, що залишився у витягнутому водному шарі, відганяли за нормального тиску. Далі, додавали формалін до кінцевої концентрації 0,05 об.%, і суміш витримували кілька днів для одержання попередньо обробленої формаліном НА спліт-вакцини.

8-2. Кислотна обробка попередньо обробленої формаліном НА спліт-вакцини

Попередньо оброблену формаліном НА спліт-вакцину суспендували у фосфатно-сольовому буферному розчині, а потім проводили кислотну обробку шляхом додавання 0,15 М цитратного буфера (pH 3,5) для доведення pH до 5,0. Після витримання за кімнатної температури протягом 30 хвилин додавали 1 М Трис-буфер (pH 8,0) для повернення pH до 7,3. Після цього проводили центрифугування.

9. Зв'язуюча здатність антитіла до епітопу ЛАН.

Зв'язуючу здатність антитіла до епітопу ЛАН вимірювали в такий самий спосіб, як описано в пункті 7 вище, і розраховували зміну єднальної здатності. Тут ті самі антитіла, що й № 2, № 4 і № 5, показані на Фігурі 6, використовували в якості моноклональних антитіл, а моноклональне антитіло № 6, яке зв'язується з головною областю НА, використовували в якості контролю.

10. Вимірювання титру антитіл проти ЛАН за допомогою ІФА.

10-1. Імунізація вакциною проти грипу H3N2

Мишей BALB/c (самки у віці від 6 до 12 тижнів) інтраперитонеально імунізували НА спліт-вакциною H3N2 з попереднього рівня техніки або НА спліт-вакциною постфузійного типу (10 мкг вакцини + 10 об.% ад'юванта AddaVax (InvivoGen), розчиненого у фосфатно-сольовому буферному розчині до обсягу рідини 200 мкл). Щонайменше через 12 днів після імунізації в мишей, привитих вакцинами, збирали кров, з якої відокремлювали сироватку.

10-2. Вимірювання за допомогою ІФА

Титр антитіла проти ЛАН вимірювали в такий самий спосіб, як описано вище в пункті 3-2.

Як показано на Фігурі 7, ЛАН-єднальне моноклональне антитіло зв'язувалося з вакциною (Post-fix), яка піддалася обробці формаліном після кислотної обробки в процесі одержання НА спліт-вакцини постфузійного типу сильніше, ніж з вакциною (Pre-fix), яка пройшла обробку формаліном перед кислотною обробкою. Результати показують, що час проведення обробки формаліном впливає на посилення єднальної здатності антитіла з епітопом ЛАН, отриманим за допомогою кислотної обробки НА спліт-вакцини, і що обробку формаліном необхідно проводити після кислотної обробки. На Фігурах 7 і 8, вакцина, отримана шляхом кислотної обробки НА спліт-вакцини після обробки формаліном у такий самий спосіб, як описано в наведеному вище прикладі 8, називається «спліт-вакциною постфузійного типу (Pre-fix)». Крім того, відповідно до процедури прикладу 1 вакцина, отримана шляхом обробки НА спліт-вакцини формаліном після кислотної обробки таким самим способом, як описано в прикладі 1, називається «спліт-вакциною постфузійного типу (Post-fix)».

Як показано на Фігурі 8, титр антитіла проти ЛАН у сироватці мишей BALB/c, інтраперитонеально імунізованих НА спліт-вакциною постфузійного типу, був вищим, ніж титр антитіла проти ЛАН у сироватці мишей BALB/c, інтраперитонеально імунізованих НА спліт-вакциною з попереднього рівня техніки. Крім того, НА спліт-вакцина постфузійного типу (Post-fix) показала більш високий титр антитіл проти ЛАН, ніж спліт-вакцина постфузійного типу (Pre-fix).

11. Приготування спліт-вакцини НА

НА спліт-вакцину одержували способом, описаним у пункті 1 вище, з використанням часток вірусу грипу H3N2 (штам Х 31).

12. Попередня перевірка умов кислотної обробки з використанням змішувального резервуара.

У процесі кислотної обробки рН регулюють шляхом додавання 0,15 М цитратного буфера (рН 3,5) або розведеної соляної кислоти до фосфатно-солевого буферного розчину. Умови гомогенізації після додавання цитратного буфера досліджують за швидкістю перемішування після додавання цитратного буфера в змішувальний резервуар, у який доданий індикатор рН, і за зміною кольору після закінчення часу реакції. Індикатор рН метиловий червоний використовують у змішувальних резервуарах на 100 мл і 20 л, і зміну кольору спостерігають протягом 10 хвилин після додавання при швидкостях перемішування 100, 200, 300, 400 і 500 об./хв. і реєструється у відео.

13. Кислотна обробка

НА спліт-вакцину суспендують у фосфатно-солевому буфері, а потім виконують кислотну обробку шляхом додавання 0,15 М цитратного буфера (рН 3,5) або розведеної соляної кислоти для досягнення 5 умов рН (2,0, 3,0, 4,0, 5,0 або 6,0). Після витримування в 5 температурних умовах (10°C, 25°C, 35°C, 45°C або 55°C) і 3 умовах часу (протягом 10 хвилин, 30 хвилин або 1 години), додають 1 М Трис-буфер (рН 8,0) для повернення значення рН до 7,3. Після цього проводять центрифугування для одержання НА спліт-вакцини постфузійного типу. Формалін додають до отриманої в такий спосіб НА спліт-вакцини постфузійного типу до кінцевої концентрації 0,05 об.% і витримують протягом декількох днів.

НА спліт-вакцину з попереднього рівня техніки готували таким самим чином, як описано в пункті 11 вище, за винятком того, що не застосовували кислотну обробку.

14. Зв'язуюча здатність антитіла до епітопу LAN.

Зв'язування моноклональних антитіл проти LAN (від №1 до №5 на Фігурі 6), отриманих з периферичної крові миші або людини, інфікованих штамом Х31, з НА спліт-вакциною з попереднього рівня техніки або з НА спліт-вакциною постфузійного типу вимірювали за допомогою ІФА аналогічно описаному вище пункту 7, використовуючи штам Х31 вірусу грипу типу H3N2.

Промислова застосовність

Даний винахід корисний для виробництва вакцин проти грипу.

[Загальнодоступний Список послідовностей]

SEQ ID NO: 1, 2: синтетичний пептид.

[Список послідовностей]

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ДЖЕПЕН ЕЗ РЕПРІЗЕНТІД БАІ ДІРЕКТОР ДЖЕНЕРАЛ ОФ НЕШНЛ ІНСТІТЮТ ОФ ІНФЕКШЕС ДІЗІЗІС
СУМІТОМО ДАЙНІППОН ФАРМА КО., ЛТД.

<120> СПОСІБ ПРИГОТУВАННЯ СПЛІТ-ВАКЦИНИ ПРОТИ ГРИПУ НА ОСНОВІ ГЕМАГЛЮТИНІНУ

<130> H20-050WO-SA

<150> JP2019-038662

<151> 2019-03-04

<160> 2

<170> Патентна версія 3.5

<210> 1

<211> 64

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION

5

<400> 1
 Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu
 1 5 10 15

10 Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr
 20 25 30

Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg
 35 40 45

15

Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Cys
 50 55 60

20 <210> 2
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

25 <220>
 <223> Синтетичний пептид

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 30 <223> ACETYLATION

<400> 2
 Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile
 1 5 10 15

35

Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr
 20 25 30

40 Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Arg
 35 40 45

Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Cys
 50 55 60

45 ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб одержання гемаглютинінової (НА) спліт-вакцини проти грипу, яка індукує антитіла, що зв'язуються з довгою альфа-спіраллю (LAN) стовбурової області НА, який включає кислотну обробку НА спліт-вакцини проти грипу НА, яка не зазнала обробки формаліном,
 50 де кислотну обробку проводять при рН від 3,0 до 6,5 та при температурі від 38 до 55 °С.
2. Спосіб за п. 1, де кислотну обробку проводять при рН від 4,0 до 6,0.
3. Спосіб за п. 1, де кислотну обробку проводять при рН від 4,4 до 5,8.
4. Спосіб за п. 1, де НА спліт-вакцина проти грипу належить до типу H3N2 або типу H1N1.
5. Спосіб одержання НА спліт-вакцини проти грипу, яка індукує антитіла, що зв'язуються з LAN
 55 стовбурової області НА, який включає:
 кислотну обробку НА спліт-вакцини проти грипу, і
 після цього обробку НА спліт-вакцини проти грипу формаліном,
 де кислотну обробку проводять при рН від 3,0 до 6,5 та при температурі від 38 до 55 °С.
6. Спосіб за п. 5, де кислотну обробку проводять при рН від 4,0 до 6,0.
- 60 7. Спосіб за п. 5, де кислотну обробку проводять при рН від 4,4 до 5,8.

8. Спосіб за п. 5, де HA спліт-вакцина проти грипу належить до типу H3N2 або типу H1N1.
9. Спосіб одержання HA спліт-вакцини проти грипу, яка індукує антитіла, що зв'язуються з LАН стовбурової області HA, який включає:
кислотну обробку HA спліт-вакцини проти грипу, яка не зазнала обробки формаліном, і
5 після цього обробку HA спліт-вакцини проти грипу формаліном,
де кислотну обробку проводять при рН від 3,0 до 6,5 та при температурі від 38 до 55 °С.
10. Спосіб за п. 9, де кислотну обробку проводять при рН від 4,0 до 6,0.
11. Спосіб за п. 9, де кислотну обробку проводять при рН від 4,4 до 5,8.
12. Спосіб за п. 9, де HA спліт-вакцина проти грипу належить до типу H3N2 або типу H1N1.
- 10 13. Спосіб одержання HA спліт-вакцини проти грипу, яка індукує антитіла, що зв'язуються з LАН стовбурової області HA, і яка ефективна проти вірусу грипу з антигенною мінливістю, який
включає
кислотну обробку HA спліт-вакцини проти грипу,
15 де кислотну обробку проводять при рН від 3,0 до 6,5 та при температурі від 38 до 55 °С.
14. Спосіб за п. 13, де кислотну обробку проводять при рН від 4,0 до 6,0.
15. Спосіб за п.13, де кислотну обробку проводять при рН від 4,4 до 5,8.
16. Спосіб за п.13, де HA спліт-вакцина проти грипу належить до типу H3N2 або типу H1N1.
17. HA спліт-вакцина проти грипу з антигенною мінливістю, яка ефективна проти вірусу грипу, і
яка індукує антитіла, що зв'язуються з LАН стовбурової області HA, причому вакцину
20 виробляють шляхом кислотної обробки HA спліт-вакцини проти грипу,
де кислотну обробку проводять при рН від 3,0 до 6,5 та при температурі від 38 до 55 °С.
18. HA спліт-вакцина проти грипу за п. 17, де кислотну обробку проводять при рН від 4,0 до 6,0.
19. HA спліт-вакцина проти грипу за п. 17, де кислотну обробку проводять при рН від 4,4 до 5,8.
20. HA спліт-вакцина проти грипу за п. 17, де HA спліт-вакцина проти грипу належить до типу
25 H3N2 або типу H1N1.

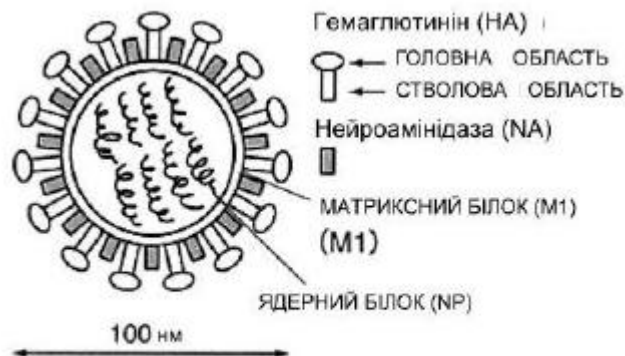
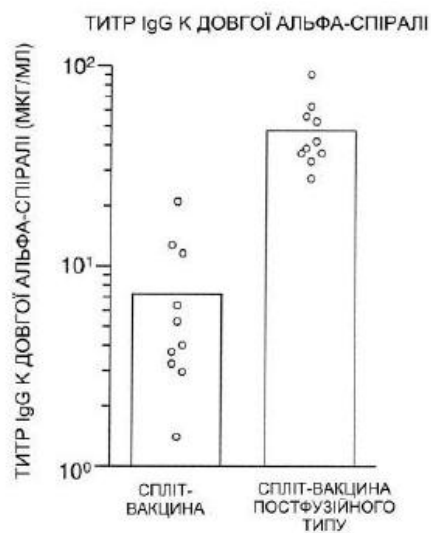
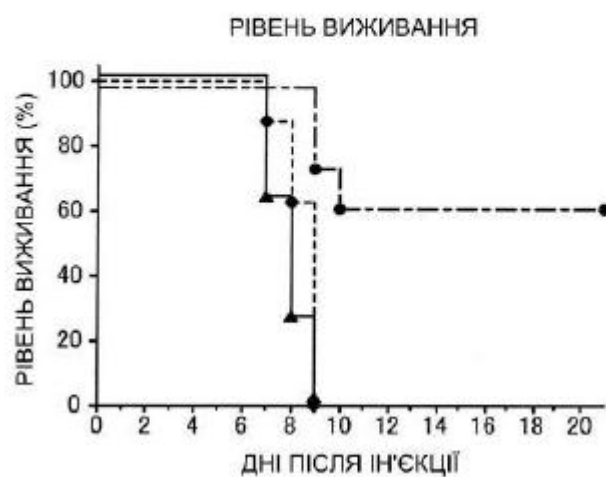


Fig. 1

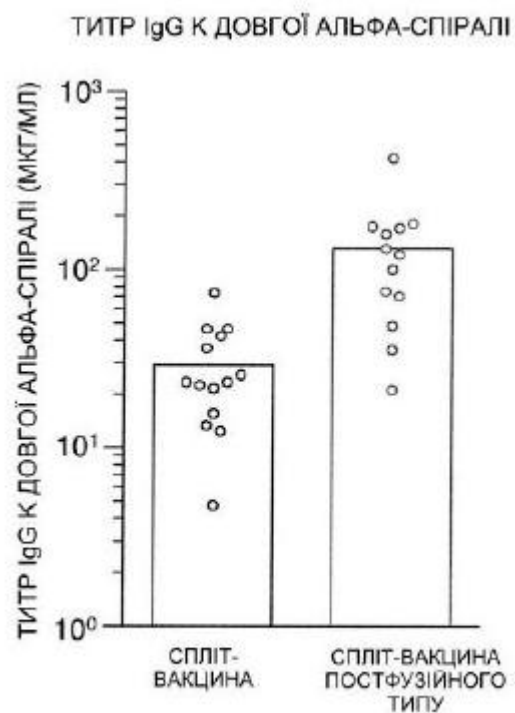


Фіг. 2

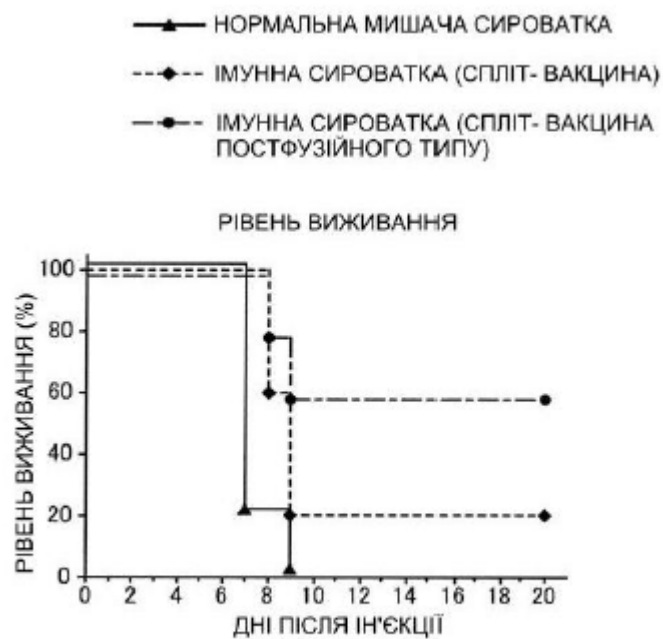
- ▲— НОРМАЛЬНА МИШАЧА СІРОВАТКА
- -◆- ІМУННА СІРОВАТКА (СПЛІТ- ВАКЦИНА)
- -●- ІМУННА СІРОВАТКА (СПЛІТ- ВАКЦИНА ПОСТФУЗІЙНОГО ТИПУ)



Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5

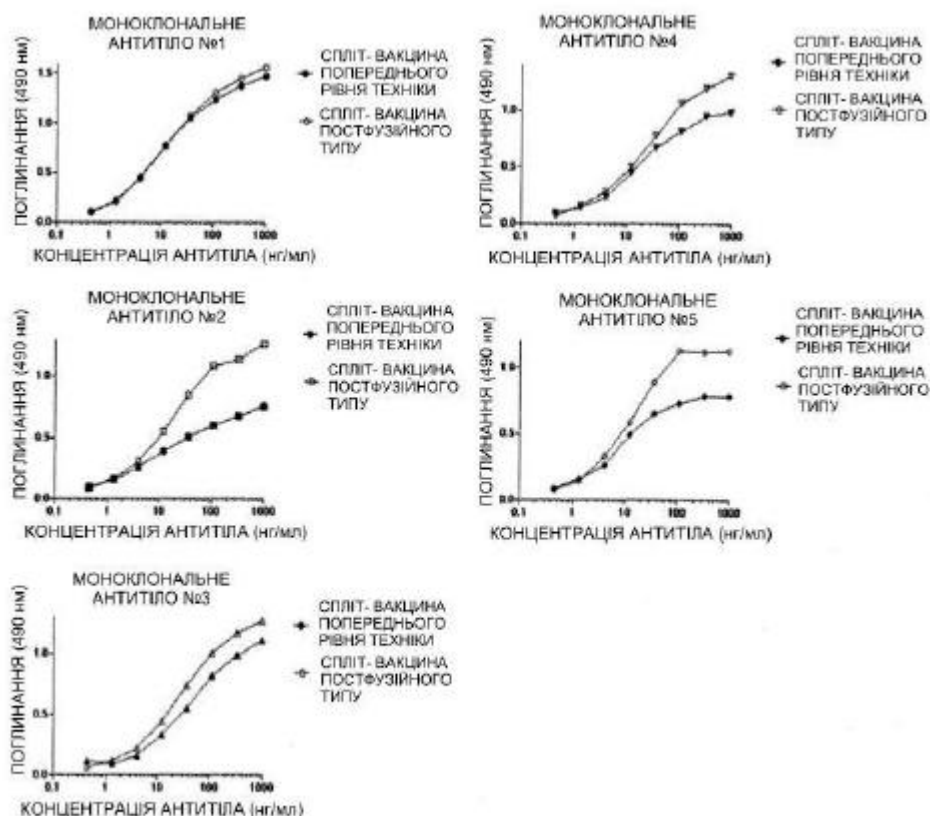


Fig. 6

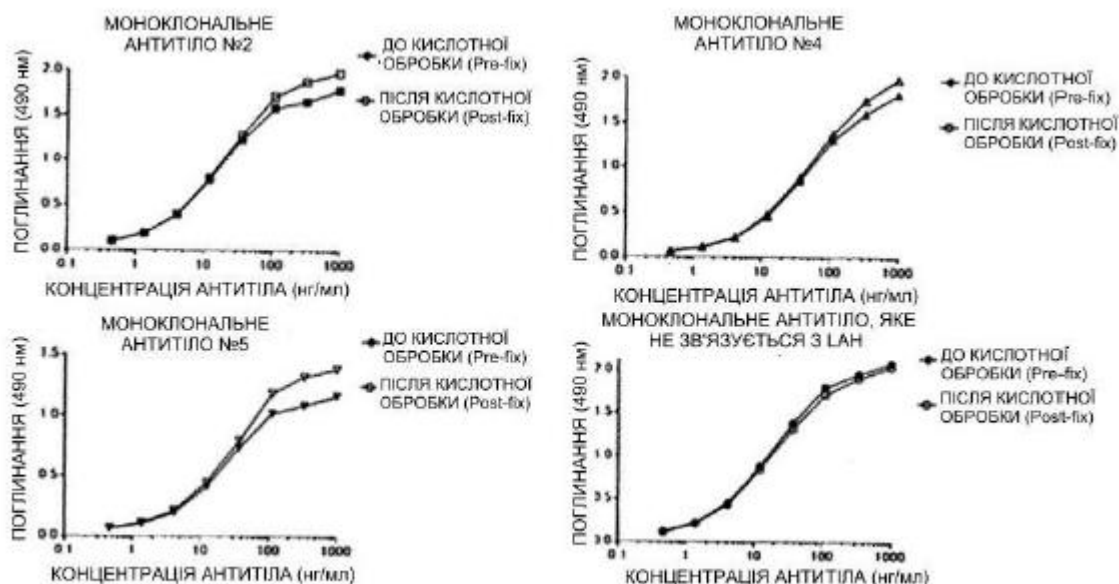
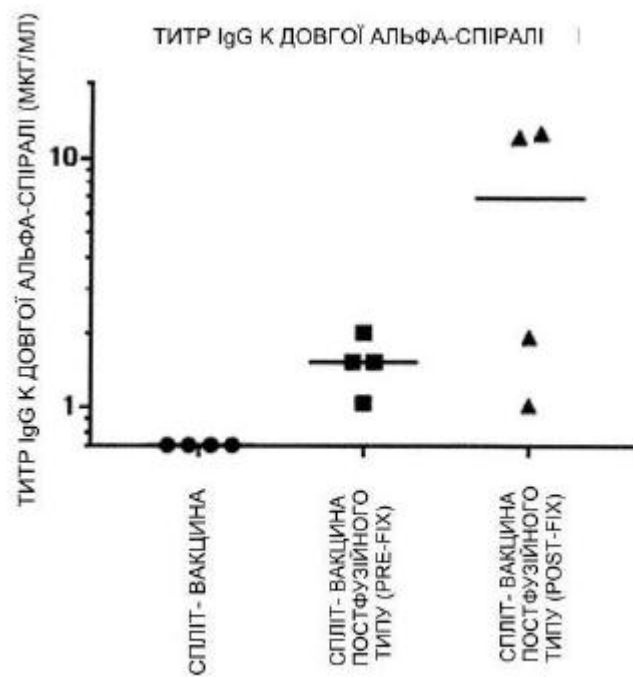


Fig. 7



Фиг. 8