



등록특허 10-2733152



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월21일

(11) 등록번호 10-2733152

(24) 등록일자 2024년11월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/145 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)

C07K 14/11 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/145 (2013.01)

A61P 31/16 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2020-7009033

(22) 출원일자(국제) 2018년09월03일

심사청구일자 2021년09월01일

(85) 번역문제출일자 2020년03월27일

(65) 공개번호 10-2020-0047629

(43) 공개일자 2020년05월07일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2018/032537

(87) 국제공개번호 WO 2019/045090

국제공개일자 2019년03월07일

(30) 우선권주장

JP-P-2017-169230 2017년09월04일 일본(JP)

JP-P-2018-137952 2018년07월23일 일본(JP)

(56) 선행기술조사문헌

US20150098966 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

국립감염증연구소장이 대표하는 일본국

일본국 도쿄도 신주쿠구 도야마 1-23-1

(72) 발명자

다카하시 요시마사

일본국 도쿄 신주쿠구 토야마 1쵸메 23-1 고쿠리
츠칸센쇼켄쿠죠 나이

아다치 유

일본국 도쿄 신주쿠구 토야마 1쵸메 23-1 고쿠리
츠칸센쇼켄쿠죠 나이

아토 마나부

일본국 도쿄 신주쿠구 토야마 1쵸메 23-1 고쿠리
츠칸센쇼켄쿠죠 나이

(74) 대리인

특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 이형준

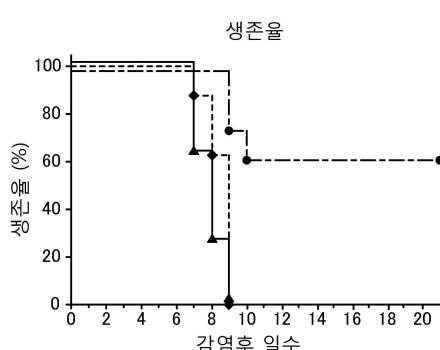
(54) 발명의 명칭 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 제조 방법

(57) 요 약

항원 변이를 일으키기 어려운 인플루엔자의 HA 스템 영역에 결합하는 항체를 생산하는 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 제조 방법을 제공한다. 인플루엔자 HA 스플릿 백신에 산성 처리를 실시한다. 산성 처리를 실시하여 HA 스템 영역의 LAH에 결합하는 항체를 생산하는 인플루엔자 HA 스플릿 백신이 얻어진다. 이 인플루엔자 HA 스플릿 백신은 항원성이 상이한 다른 인플루엔자 바이러스의 감염에 뛰어난 방어능이 있다.

대 표 도 - 도3

- ▲— 정상 마우스 혈청
- ◆--- 면역 혈청 (스플릿 백신)
- 면역 혈청
(막 융합형 스플릿 백신)



(52) CPC특허분류

C07K 14/11 (2013.01)

C12N 2760/16134 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

포르말린 처리를 하지 않은 인플루엔자 HA 스플릿 백신에 산성 처리를 실시하는 것을 포함하는, HA 스템 영역의 LAH에 결합하는 항체를 생산하는 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 제조 방법으로서, 산성 처리는 pH 3.0 내지 6.5에서 실시하는 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 제조 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 인플루엔자 HA 스플릿 백신이 항원 변이를 일으키는 인플루엔자 바이러스에 대해서도 효과적인 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 제조 방법.

청구항 3

포르말린 처리를 하지 않은 인플루엔자 HA 스플릿 백신에 산성 처리를 실시하는 것을 포함하는, HA 스템 영역의 LAH에 결합하는 항체를 생산하는, 항원 변이를 일으키는 인플루엔자 바이러스에 대해 효과적인 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 제조 방법으로서, 산성 처리는 pH 3.0 내지 6.5에서 실시하는 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 제조 방법.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 산성 처리는 pH 4.0 내지 6.0에서 실시하는 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 제조 방법.

청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 산성 처리는 pH 4.4 내지 5.8에서 실시하는 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 제조 방법.

청구항 6

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 인플루엔자 HA 스플릿 백신은 H3N2 형 또는 H1N1 형인 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 제조 방법.

청구항 7

포르말린 처리를 하지 않은 인플루엔자 HA 스플릿 백신에 산성 처리를 실시하는 것을 포함하는 방법으로 제조되는, HA 스템 영역의 LAH에 결합하는 항체를 생산하는 인플루엔자 HA 스플릿 백신으로서, 산성 처리는 pH 3.0 내지 6.5에서 실시하는 인플루엔자 HA 스플릿 백신.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 항원 변이를 일으키는 인플루엔자 바이러스에 대해서도 효과적인 인플루엔자 HA 스플릿 백신.

청구항 9

제 7 항에 있어서, HA 스템 영역이 외부로 노출된 형상인 인플루엔자 HA 스플릿 백신.

청구항 10

제 7 항에 있어서, 외부로 노출된 인플루엔자 HA 스플릿 백신 항원의 HA 스템 영역이 HA 스템 영역의 LAH의 항원성을 높이고, 인플루엔자 HA 스플릿 백신이 HA 스템 영역의 LAH에 결합하는 항체를 생산할 수 있는 인플루엔자 HA 스플릿 백신.

청구항 11

제 7 항에 있어서, 산성 처리는 pH 4.0 내지 6.0에서 실시하는 인플루엔자 HA 스플릿 백신.

청구항 12

제 7 항에 있어서, 산성 처리는 pH 4.4 내지 5.8에서 실시하는 인플루엔자 HA 스플릿 백신.

청구항 13

제 7 항에 있어서, 인플루엔자 HA 스플릿 백신은 H3N2 형 또는 H1N1 형인 인플루엔자 HA 스플릿 백신.

청구항 14

제 7 항에 있어서, 인플루엔자로의 감염으로부터 방어를 위한 백신 제조에 사용되는 인플루엔자 HA 스플릿 백신.

청구항 15

제 7 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 인플루엔자 HA 스플릿 백신을 포함하는, 인플루엔자 감염 예방제.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

본 발명은 인플루엔자 HA 스플릿 (split) 백신의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

현재 인플루엔자 헤마글루티닌 (이하, "HA"로도 약칭됨) 백신은 항-HA 항체를 유도함으로써 감염 방어 효과를 발휘한다. 항-HA 항체는 바이러스의 "헤드 영역 (head region)"으로 호칭되는 바이러스 막에서 외부로 노출된 부분에 결합한다. 이 영역은 바이러스주 (strain) 간에 구조 변화를 가장 빈번히 겪는다. 그 결과, 백신주와 상이한 항원 변이를 일으키는 바이러스에 대해 항-HA 항체가 결합하지 못하고 백신이 감염 방어 효과를 발휘하지 못하는 경우가 있다.

[0003]

최근에, 항원 변이를 일으키기 어려운 스템 영역 (stem region)에 결합하는 항체에 감염 방어 항체가 포함된 것으로 밝혀졌다 (특히 문헌 1). 스템 영역에 결합하는 항체를 효율적으로 유도하기 위해, 스템 부분이 안정화된 HA 스템 단백질이 개발되어 인간 임상 시험이 실시되고 있다: 원래 불안정한 스템 부분은 인공적인 변이나 링커의 결합을 통해 안정화되었다.

[0004]

그러나, 실용화를 위한 제조면에서의 과제도 남아 있어, 보다 간편하게 항-스템 항체를 유도할 수 있는 HA 백신 항원의 개발이 기대되고 있다.

선행기술문헌**특허문헌**

[0005]

(특허문헌 0001) 특허 문헌 1 : 일본 미심사 특허 공보 (PCT 국제 출원의 번역문) 제 2016-516090 호

발명의 내용**해결하려는 과제**

[0006]

본 발명은 이러한 문제점을 감안하여, 항원 변이를 일으키기 어려운 인플루엔자의 HA 스템 영역에 결합하는 항체를 생산하는 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007]

본 발명에 따른 HA 스플릿 백신의 제조 방법은, 인플루엔자 HA 스플릿 백신에 산성 처리를 실시하는 것을 포함

하며, HA 스템 영역의 긴 알파 나선 (long alpha helix) (LAH) 에 결합하는 항체를 생산하고, 항원 변이를 일으키는 인플루엔자 바이러스에 대해 효과적이다.

[0008] 구체적으로, 본 발명은 다음과 같은 것이다.

[항 1]

인플루엔자 HA 스플릿 백신에 산성 처리를 실시하는 것을 포함하는, HA 스템 영역의 LAH 에 결합하는 항체를 생산하는 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 제조 방법.

[항 2]

상기 인플루엔자 HA 스플릿 백신이 항원 변이를 일으키는 인플루엔자 바이러스에 대해서도 효과적인, 항 1 의 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 제조 방법.

[항 3]

인플루엔자 HA 스플릿 백신에 산성 처리를 실시하는 것을 포함하는, HA 스템 영역의 LAH 에 결합하는 항체를 생산하는, 항원 변이를 일으키는 인플루엔자 바이러스에 대해 효과적인 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 제조 방법.

[항 4]

상기 산성 처리는 pH 4.4 내지 5.8 에서 처리하는 것을 특징으로 하는 항 1 내지 3 중 어느 한 항의 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 제조 방법.

[항 5]

상기 인플루엔자 HA 스플릿 백신은 H3N2 형 또는 H1N1 형인 것을 특징으로 하는 항 1 내지 4 중 어느 한 항의 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 제조 방법.

[항 6]

HA 스템 영역의 LAH 에 결합하는 항체를 생산하는 인플루엔자 HA 스플릿 백신.

[항 7]

항원 변이를 일으키는 인플루엔자 바이러스에 대해서도 효과적인, 항 6 의 인플루엔자 HA 스플릿 백신.

[항 8]

HA 스템 영역이 외부로 노출된 형상인, 항 6 또는 7 의 인플루엔자 HA 스플릿 백신.

[항 9]

외부로 노출된 인플루엔자 HA 스플릿 백신 항원의 HA 스템 영역이 HA 스템 영역의 LAH 의 항원성을 높이고, 인플루엔자 HA 스플릿 백신이 HA 스템 영역의 LAH 에 결합하는 항체를 생산할 수 있는, 항 6 내지 8 중 어느 한 항의 인플루엔자 HA 스플릿 백신.

[항 10]

인플루엔자 HA 스플릿 백신에 산성 처리를 실시함으로써 제조되는, HA 스템 영역의 LAH 에 결합하는 항체를 생산하는, 항원 변이를 일으키는 인플루엔자 바이러스에 대해 효과적인 인플루엔자 HA 스플릿 백신.

[항 11]

인플루엔자 HA 스플릿 백신에 산성 처리를 실시함으로써 제조되는, HA 스템 영역의 LAH 에 결합하는 항체를 생산하는, 항원 변이를 일으키는 인플루엔자 바이러스에 대해서도 효과적인 인플루엔자 HA 스플릿 백신.

발명의 효과

[0031] 본 발명에 의하면, 간단한 기술에 의해 항원 변이를 일으키기 어려운 인플루엔자의 HA 스템 영역에 결합하는 항체를 생산하는 인플루엔자 HA 스플릿 백신이 얻어진다. 따라서, 항원 변이를 일으키는 인플루엔자 바이러스에 대해서도 효과적인 인플루엔자 HA 스플릿 백신이 얻어진다.

도면의 간단한 설명

[0032]

[도 1] 도 1 은 인플루엔자 바이러스를 설명하는 모식도이다.

[도 2] 도 2 는 막 융합형 H3N2 HA 스플릿 백신을 접종한 마우스의 혈청 중의 항-LAH 항체 역가의 상승을 보여주는 그래프이다.

[도 3] 도 3 은 막 융합형 H3N2 HA 스플릿 백신을 접종한 마우스의 항원 변이주에 대한 교차 방어능의 향상을 보여주는 그래프이다.

[도 4] 도 4 는 막 융합형 H1N1 HA 스플릿 백신을 접종한 마우스의 혈청 중의 항-LAH 항체 역가의 상승을 보여주는 그래프이다.

[도 5] 도 5 는 막 융합형 H1N1 HA 스플릿 백신을 접종한 마우스의 항원 변이주에 대한 교차 방어능의 향상을 보여주는 그래프이다.

[도 6] 도 6 은 LAH 결합성 모노클로날 항체가 현행 HA 스플릿 백신보다 막 융합형 HA 스플릿 백신에 강하게 결합하는 것을 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033]

발명을 실시하기 위한 형태

[0034]

이하에서 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시형태에 대해 구체적으로 설명한다. 그러나, 당해 실시형태는 본 발명의 원리의 이해를 용이하게 하기 위한 것이며, 본 발명의 범위는 하기의 실시형태에 한정되는 것이 아니다. 당업자가 이하의 실시형태의 구성을 적절하게 치환한 다른 실시형태도 본 발명의 범위에 포함된다.

[0035]

본 실시형태에 따른 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 제조 방법에는 인플루엔자 HA 스플릿 백신에 산성 처리를 실시하는 공정이 있다.

[0036]

인플루엔자 HA 스플릿 백신은 에테르로 전바이러스 백신을 처리하여 발열 물질이 되는 지질 성분을 제거하여 제조된다. 인플루엔자 HA 스플릿 백신은 면역에 필요한 바이러스 입자 표면의 HA 단백질을 밀도 구배 원침법에 의해 회수하여 제조되므로 HA 단백질이 주성분이다.

[0037]

인플루엔자 바이러스의 표면에는 "스파이크 단백질"이라는 당단백질이 돌출되어 있다 (도 1). A 형 인플루엔자 바이러스에는 두 종류의 스파이크 단백질, 즉, HA 와 NA (뉴라미니다아제) 가 있으며, 바이러스가 감염을 일으키는 것을 돋는다. HA 는 감염하려고 하는 세포에 결합하여 바이러스가 세포 내에 진입하는 것을 돋는다. HA 는 빈번히 항원 변이를 일으킨다. NA 는 감염된 세포와 HA의 결합을 끊어서, 복제된 바이러스를 세포에서 방출시키는 역할을 한다.

[0038]

인플루엔자 A 형 바이러스의 HA 는 두 가지 영역, 즉, 헤드 영역과 스템 영역으로 나뉜다 (도 1). 헤드 영역은 바이러스가 표적 세포에 결합하는 수용체 결합 부위를 포함한다. 스템 영역은 바이러스 막과 표적 세포의 세포막의 막 융합에 필요한 융합 펩티드 서열을 포함한다.

[0039]

인플루엔자 HA 스플릿 백신에 대한 산성 처리는 HA 단백질의 구조를 막 융합형으로 불리는 구조로 변화시킨다. 막 융합형 HA 단백질에서는, 항원 스템 입체 구조의 큰 구조 변화를 수반하면서, 헤드 영역 대신 스템 영역이 바이러스 막에서 외부로 노출되어 있다. 본 발명자들은 막 융합형 HA 단백질을 백신으로 사용했을 때 스템 영역의 LAH 에 결합하는 항체가 유도되고, 이 항체가 항원 변이를 일으키는 바이러스주에 대한 방어 효과를 갖는 것을 생체내에서 발견했다. 이 사실에 기초하여 본 발명을 완성시켰다.

[0040]

산성 처리는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, pH 3.0 내지 6.5, 바람직하게는 4.0 내지 6.0, 더욱 바람직하게는 4.4 내지 5.8 이다. 산성 처리를 실시하는데 사용되는 산은 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 인산, 구연산, 말레산, 또는 임의의 다른 적합한 산을 사용하는 것이 가능하다.

[0041]

항원성의 차이에 기초하여, A 형 인플루엔자 바이러스의 HA 는 18 개의 아형 (H1 내지 H18) 으로, NA 는 9 개의 아형 (N1 내지 N9) 으로 분류된다. 본 발명의 인플루엔자 HA 스플릿 백신은 이러한 모든 아형에 적용가능하다. 또한, 본 발명에 따른 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 제조 방법으로는 A 형 인플루엔자 바이러스 뿐만 아니라 HA 를 갖는 B 형 인플루엔자 바이러스에 대해 효과적인 백신도 제조가능하다.

[0042]

본 발명에 따른 제조 방법으로 얻어진 인플루엔자 HA 스플릿 백신은 변이를 일으키기 어려운 LAH 에 결합하는 항체를 생산한다. 그러므로, 바이러스가 동일한 HA 아형을 갖는 한, 백신은 항원 변이주로 알려진 인플루엔자 바이러스에 대해서도 교차 방어가 가능하다. 또한, 본 발명에 따른 제조 방법으로 얻어진 인플루엔자 HA

스플릿 백신은 LAH 의 아미노산 서열이 유사한 HA 아형 간 (예를 들어, H3 형과 H7 형) 에는 교차 반응성을 보일 수 있다.

[0043]

바람직한 실시형태에서, 본 발명에 따른 제조 방법으로 얻어진 인플루엔자 HA 스플릿 백신은 LAH 결합성 모노클로날 항체에 대해 현행 HA 스플릿 백신보다 강하게 결합한다. 예를 들어, 인플루엔자 HA 스플릿 백신은 LAH 결합성 모노클로날 항체에 대해 현행 HA 스플릿 백신보다 1.05 배 이상, 바람직하게는 1.1 배 이상, 보다 바람직하게는 1.5 배 이상, 더욱 바람직하게는 2 배 이상 강하게 결합한다. 이러한 맥락에서, "인플루엔자 HA 스플릿 백신은 현행 HA 스플릿 백신보다 1.05 배 이상, 1.1 배 이상, 1.5 배 이상 또는 2 배 이상 강하게 결합한다" 는, 예를 들어, 회귀에 의해 구한 흡광도가 0.7 일 때 항체 농도의 역수가 현행 HA 스플릿 백신의 항체 농도의 역수의 1.05 배 이상, 1.1 배 이상, 1.5 배 이상 또는 2 배 이상인 것을 말한다. 바람직한 실시형태에서, 현행 HA 스플릿 백신과 비교하여 본 발명의 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 LAH 결합성 모노클로날 항체에 대한 결합성은 높다. 상한은 특별히 한정되는 것은 아니지만, 결합성은, 예를 들어, 1.05 내지 200 배, 1.1 내지 150 배, 1.5 내지 100 배 또는 2 내지 50 배의 범위일 수 있다. 대안적으로, 현행 HA 스플릿 백신과 비교하여 본 발명의 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 LAH 결합성 모노클로날 항체에 대한 결합성의 범위는 1.05, 1.1, 1.5, 2, 3, 4 및 5 에서 선택되는 하한값과 200, 150, 100, 50, 30 및 20 에서 선택되는 상한치의 조합으로 표시될 수 있다. LAH 결합성 모노클로날 항체에 대한 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 결합성의 측정을 위해, 특별한 제한 없이 임의의 방법이 이용될 수 있고, 당업자에 알려진 일반적인 방법이 이용될 수 있다. 예를 들어, 결합성은 본 출원의 실시예에 기재된 방법에 따라 측정할 수 있다.

[0044]

본 출원에서 "LAH 결합성 모노클로날 항체" 는 LAH 에 결합하는 모노클로날 항체를 의미한다. 모노클로날 항체의 제조를 위해, 특별한 제한 없이 임의의 방법이 이용될 수 있고, 당업자에 알려진 일반적인 방법이 이용될 수 있다. LAH 결합성 모노클로날 항체에 대한 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 결합성의 측정에서는, LAH 결합성 모노클로날 항체가 당해 인플루엔자 HA 스플릿 백신이 유래하는 인플루엔자 바이러스의 LAH 의 적어도 일부에 상당하는 웹티드에 결합할 수 있다는 것을 추정한다.

[0045]

본 출원에서, "현행 HA 스플릿 백신" 은 에테르로 전바이러스 백신을 처리하여 발열 물질이 되는 지질 성분을 제거한 백신을 의미하며, 예를 들어, 본 출원의 실시예 1에 기재된 방법으로 제조할 수 있다. 현행 HA 스플릿 백신은 또한, 이하의 산성 처리를 실시하는 공정을 갖는 방법에 의해 제조된 본 발명의 인플루엔자 HA 스플릿 백신과 대조적으로, 산성 처리를 실시하지 않고 제조된 인플루엔자 HA 스플릿 백신일 수 있다.

[0046]

본 발명에 따른 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 제조 방법은 애주번트를 첨가하는 단계를 포함하는 것이 가능하다. 애주번트의 예로는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 수산화 알루미늄 및 인산 알루미늄과 같은 알루미늄 염, 키토산, 올리고데옥시뉴클레오티드, 및 수중유형 에멀젼을 들 수 있다. 이들 중에서, 수산화 알루미늄이 바람직하며, 수산화 알루미늄을 애주번트로 사용하여 면역원성을 높일 수 있다.

[0047]

본 발명에 따른 제조 방법으로 얻어진 인플루엔자 HA 스플릿 백신은, 예를 들어, 초회 접종 후 소정 기간의 경과 후에 추가 접종하도록 사용되는 것이 가능하다. 초회 접종 후 추가 접종될 때까지의 기간은 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 20 일 내지 3 년이며, 바람직하게는 3 월 내지 2 년이며, 보다 바람직하게는 6 월 내지 1 년이다. 초회 접종 및 추가 접종의 인플루엔자 HA 스플릿 백신의 양은 특별히 한정되는 것은 아니지만, 1 용량 당 예를 들어, 1 μ g 내지 200 μ g이며, 바람직하게는 10 μ g 내지 30 μ g이며, 보다 바람직하게는 15 μ g이다. 1 용량은 예를 들어, 0.5 ml이다. 초회 접종 및 추가 접종의 투여 방법은 특별히 한정되지 않고 임의의 투여 방법이 사용될 수 있지만, 예를 들어, 경비, 피하, 피내, 경피, 안내, 점막 또는 경구 투여이다. 바람직하게는 근육내 투여이다.

[0048]

본 발명에 따른 제조 방법으로 얻어진 인플루엔자 HA 스플릿 백신은 항원 변이를 일으키는 바이러스주에 대한 방어 효과를 갖는다. 예를 들어, H3N2 인플루엔자 바이러스 입자 (A/Fujian/411/02 (H3N2))로부터 현행 HA 스플릿 백신을 제조하고, 산성 처리를 한 경우, 백신은 A/Fujian/411/02 (H3N2) 뿐만 아니라, 예를 들어, 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), 또는 A/Hiroshima/52/2005 (H3N2)에 대해서도 감염 방어 효과를 가질 수 있다. 또한, 예를 들어, H1N1 인플루엔자 바이러스 입자 (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1))로부터 현행 HA 스플릿 백신을 제조하고, 산성 처리를 한 경우, A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) 뿐만 아니라 예를 들어,

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), 또는 A/Mexico/4108/2009 (H1N1)에 대해서도 감염 방어 효과를 가질 수 있다.

[0049] [실시예]

[0050] 1. HA 스플릿 백신의 제조

[0051] 인산 완충 생리 식염수에 혼탁한 H3N2 인플루엔자 바이러스 입자 (X31 주) 또는 H1N1 인플루엔자 바이러스 입자 (A/Puerto Rico/8/34 주)에 최종 농도가 0.2 %가 되도록 Tween80을 첨가하여 혼탁했다. 디에틸 에테르를 첨가하여 혼탁하고, 혼탁액을 수증과 디에틸 에테르 층이 완전히 분리될 때까지 정치한 후, 디에틸 에테르 층을 제거했다. 이 에테르 추출을 반복한 후, 회수한 수증에 잔존하는 디에틸 에테르를 상압에서 증류하여 HA 스플릿 백신을 얻었다.

[0052] 2. 산성 처리

[0053] HA 스플릿 백신을 인산 완충 생리 식염수에 혼탁한 후, 산성 처리로서 0.15 M 구연산 완충액 (pH 3.5)을 첨가하여 pH를 5.0으로 했다. 실온에서 30분 정치한 후, 1 M Tris 완충액 (pH 8.0)을 첨가하여 pH를 7.3으로 되돌렸다. 그 후, 원심분리를 하여, 막 융합형 HA 스플릿 백신을 얻었다. 그에 따라 제작된 막 융합형 HA 스플릿 백신에 최종 농도 0.05 %가 되도록 포르말린을 첨가하여 수일 정치했다.

[0054] 현행 HA 스플릿 백신은, 산성 처리를 실시하지 않은 것 이외에는 상기 1. 과 동일한 방식으로 제조했다.

[0055] 3. ELISA에 의한 항-LAH 항체 역가의 측정

[0056] 3-1. H3N2 인플루엔자 백신의 접종

[0057] BALB/c 마우스 (암컷, 6 내지 12주령)에 현행 H3N2 HA 스플릿 백신 또는 막 융합형 HA 스플릿 백신 (10 μ g 백신 + 20 μ g AddaVax 애주번트 (InvivoGen)를 인산 완충 생리 식염수에 용해하여 액량 200 μ l로 한다)을 복강내 접종했다. 초회 접종 28일 후에, 마우스에 막 융합형 HA 백신 (10 μ g 백신만을 인산 완충 생리 식염수에 용해하여 액량 200 μ l로 한다)을 복강내 접종했다. 추가 백신 접종 14일 이후에, 백신을 접종한 마우스에서 채혈을 실시하여 혈청을 회수했다.

[0058] 3-2. ELISA에 의한 측정

[0059] 하기에 제시한 방법에 따라 ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)로 현행 H3N2 HA 스플릿 백신 또는 막 융합형 HA 스플릿 백신을 복강내 접종한 BALB/c 마우스의 혈청 중의 항-LAH 항체 농도를 측정했다.

[0060] 구체적으로, 스템 부분의 일부 (긴 알파 나선)에 상당하는 합성 펩티드 (H3; Ac-RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMNLKLFKTRRQLRENADYKDDDDKC) (SEQ ID NO: 1)를 10 μ g/ml로 인산 완충 생리 식염수 (pH 7.3)에 용해하고, 96 웰 플레이트에 100 μ l씩 첨가했다. 4 °C에서 하룻밤 정치한 후, 인산 완충 생리 식염수로 각 웰을 3회 세척하고, 1 % 소 혈청 알부민을 포함한 인산 완충 생리 식염수를 150 μ l씩 첨가했다. 실온에서 2시간 정치한 후, 인산 완충 생리 식염수로 각 웰을 3회 세척했다. 그 후, 0.05 %의 Tween20과 1 % 소 혈청 알부민을 포함한 인산 완충액으로 단계 희석한 마우스 혈청 100 μ l와, 농도가 알려진 표준 모노클로날 항체 (H3; 클론 이름 V15-5) 100 μ l를 각 웰에 첨가했다. 실온에서 2시간 정치한 후, 인산 완충 생리 식염수 (Tween20을 0.05 % 포함)로 각 웰을 3회 세척하고, 0.05 % Tween20과 1 % 소 혈청 알부민을 포함한 인산 완충 생리 식염수로 희석한 퍼옥시다아제 표지 항-마우스 IgG 항체 (Southern Biotech)를 각 웰에 100 μ l씩 첨가했다. 실온에서 2시간 정치한 후, 인산 완충 생리 식염수 (Tween20을 0.05 % 포함)로 각 웰을 3회 세척했다. 그 후, 기질로서 구연산 완충액 (pH 5.0) 60 ml에 o-페닐렌디아민 정제 (Sigma) 30 mg과 30 % 과산화수소수 (30 % w/w; Sigma) 24 μ l를 첨가하고, 그것을 각 웰에 100 μ l씩 첨가했다. 발색 후, 50 μ l의 2N 황산 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)을 첨가하여 반응을 중지하고, Microplate Reader 450 (Biorad)을 이용하여 490 nm에서의 흡광도 값을 측정했다.

[0061] 도 2에 나타낸 바와 같이, 막 융합형 HA 스플릿 백신을 복강내 접종한 BALB/c 마우스의 혈청 중의 항-LAH 항체의 역가는 현행 HA 스플릿 백신을 복강내 접종한 BALB/c 마우스의 혈청 중의 항-LAH 항체의 역가보다 유의하게 높았다.

[0062] 4. 항원 변이주에 대한 교차 방어

- [0063] H3N2 바이러스 감염 방어에 대한 실험에서는, 백신 비접종 마우스로부터 회수한 혈청 200 μl , 현행 H3N2 HA 스플릿 백신을 접종한 마우스로부터 회수한 혈청 200 μl , 또는 막 융합형 HA 스플릿 백신을 접종한 마우스로부터 회수한 혈청 200 μl 를 BALB/c 마우스 (암컷, 6 내지 12 주령) 에 복강내 투여했다.
- [0064] 혈청 투여로부터 3 시간 후, 백신주와 항원성이 상이한 다른 H3N2 인플루엔자 바이러스 (A/Guizhou/54/89) 를 5 마우스 치사량 50 (50 % 의 마우스에 치명적인 바이러스량의 5 배) 으로 마취 하에서 경비 투여했다.
- [0065] 바이러스 감염으로부터 21 일 동안 매일 마우스의 체중 측정 및 관찰을 행하여 체중 변화와 생존율을 조사했다. 25 % 의 체중이 감소된 마우스를 안락사 처분했다.
- [0066] 도 3 에 나타낸 바와 같이, 막 융합형 HA 스플릿 백신을 접종한 BALB/c 마우스는 항원성이 상이한 다른 H3N2 인플루엔자 바이러스로 감염 후 9 일째부터 유의하게 생존율 저하가 억제되었다.
- [0067] 5. ELISA 에 의한 항-LAH 항체 역가의 측정
- [0068] 5-1. H1N1 인플루엔자 바이러스의 입자
- [0069] C57BL/6 마우스 (암컷, 6 내지 12 주령) 에 현행 H1N1 HA 스플릿 백신 또는 막 융합형 HA 스플릿 백신 (10 μg 백신 + 10 μg CpG-ODN1760 을 인산 완충 생리 식염수에 혼탁하여 등량의 프로인트 불완전 아주번트 (ROCKLAND) 와 혼합하여 액량 200 μl 로 한다) 을 복강내 접종했다. 초회 백신 접종 28 일 후에, 막 융합형 HA 스플릿 백신 (초회 백신 접종과 마찬가지로, 10 μg 백신 + 10 μg CpG-ODN 을 인산 완충 생리 식염수에 혼탁하여 등량의 프로인트 불완전 아주번트 (ROCKLAND) 와 혼합하여 액량 200 μl 로 한다) 을 복강내 접종했다. 추가 백신 접종 14 일 이후에, 백신을 접종한 마우스로부터 채혈을 실시하여 혈청을 회수했다.
- [0070] 5-2. ELISA 에 의한 측정
- [0071] 하기에 제시한 방법에 따라 ELISA 로 현행 H1N1 HA 스플릿 백신 또는 막 융합형 HA 스플릿 백신을 복강내 접종한 C57BL/6 마우스의 혈청 중의 항-LAH 항체 농도를 측정했다.
- [0072] 스템 부분의 일부 (긴 알파 나선) 에 상당하는 합성 펩티드 (H1; Ac-RIENLNKKVDDGFLDIWTYNAAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNADYKDDDDDKC) (SEQ ID NO: 2) 를 사용하고 알려진 농도의 표준 모노클로날 항체 (H1; 클론 이름 F2) 를 사용한 것을 제외하고는 위에 기재된 바와 같은 방식으로 측정을 수행했다.
- [0073] 도 4 에 나타난 바와 같이, 막 융합형 HA 스플릿 백신을 복강내 접종한 C57BL/6 마우스의 혈청 중의 항-LAH 항체의 역가는 현행 HA 스플릿 백신을 복강내 접종한 C57BL/6 마우스의 혈청 중의 항-LAH 항체의 역가보다 유의하게 높았다.
- [0074] 6. 항원 변이주에 대한 교차 방어
- [0075] H1N1 바이러스 감염 방어에 대한 실험에서는, 백신 비접종 마우스로부터 회수한 혈청 200 μl , 현행 H1N1 HA 스플릿 백신을 접종한 마우스로부터 회수한 혈청 200 μl , 또는 막 융합형 HA 스플릿 백신을 접종한 마우스로부터 회수한 혈청 200 μl 를 C57BL/6 마우스 (암컷, 6 내지 12 주령) 에 복강내 투여했다.
- [0076] 혈청 투여로부터 3 시간 후, 백신주와 항원성이 상이한 다른 H1N1 인플루엔자 바이러스 (A/Narita/1/09) 를 5 마우스 치사량 50 (50 % 의 마우스에 치명적인 바이러스량의 5 배) 으로 마취 하에서 경비 투여했다.
- [0077] 바이러스 감염으로부터 20 일 동안 매일 마우스를 관찰하여 생존율을 조사했다. 도 5 에 나타낸 바와 같이, 막 융합형 HA 스플릿 백신을 접종한 C57BL/6 마우스는 항원성이 상이한 다른 H1N1 인플루엔자 바이러스로 감염 후 9 일째부터 유의하게 생존율 저하가 억제되었다.
- [0078] 7. LAH 에피토프에 대한 항체 결합성
- [0079] ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) 에 의해, X31 주를 감염시킨 마우스 또는 인간 말초 혈액으로 제조한 항-LAH 모노클로날 항체의 현행 HA 스플릿 백신 또는 막 융합형 HA 스플릿 백신에 대한 결합을 측정했다. H3N2 인플루엔자 바이러스 (X31 주) 의 현행 HA 스플릿 백신 또는 막 융합형 HA 스플릿 백신을 인산 완충 생리 식염수 (pH 7.3) 에 용해하여, 96 웰 플레이트에 50 μl 씩 첨가했다. 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 정치한 후, 인산 완충 생리 식염수로 각 웰을 3 회 세척하고, 1 % 소 혈청 알부민을 포함한 인산 완충 생리 식염수를 150 μl 씩 첨가했다. 실온에서 2 시간 정치한 후, 인산 완충 생리 식염수 (Tween20 을 0.05 % 포함) 로 각 웰을 3 회 세척하고, 1 % 소 혈청 알부민을 포함한 인산 완충액으로 단계 희석한 LAH 결합성 모노클로날 항체를 50 μl 씩

첨가했다. 4 °C에서 하룻밤 정지한 후, 인산 완충 생리 식염수 (Tween20 을 0.05 % 포함)로 각 웰을 3 회 세척하고, 0.05 % Tween20 과 1 % 소 혈청 알부민을 포함한 인산 완충 생리 식염수로 희석한 퍼옥시다아제 표지 항-마우스 IgG 항체 (Southern Biotech)를 각 웰에 100 μ l 씩 첨가했다. 실온에서 2 시간 정지한 후, 인산 완충 생리 식염수 (Tween20 을 0.05 % 포함)로 각 웰을 3 회 세척했다. 그 후, 기질로서 구연산 완충액 (pH 5.0) 60 ml에 o-페닐렌디아민 정제 (Sigma) 30 mg 과 30 % 과산화수소수 (30 % w/w; Sigma) 24 μ l를 첨가하고, 그것을 각 웰에 50 μ l 씩 첨가했다. 발색 후, 25 μ l의 1 mol/L 황산 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)을 첨가하여 반응을 중지하고, Microplate Reader 450 (Biorad)을 이용하여 490 nm에서의 흡광도 값을 측정했다. 측정한 현행 HA 스플릿 백신 또는 막 융합형 HA 스플릿 백신에 대한 흡광도 값으로부터 결합성의 변화를 산출했다.

[0080] 도 6에 나타낸 바와 같이, LAH 결합성 모노클로날 항체는 막 융합형 HA 스플릿 백신에 대한 결합성이 현행 HA 스플릿 백신에 대한 결합성보다 1.05 내지 21 배 강했다. 이 결과는 HA 스플릿 백신의 산성 처리에 의해, LAH 에피토프에 대한 항체 결합성이 항진하는 것을 보여준다.

[0081] 산업상 이용가능성

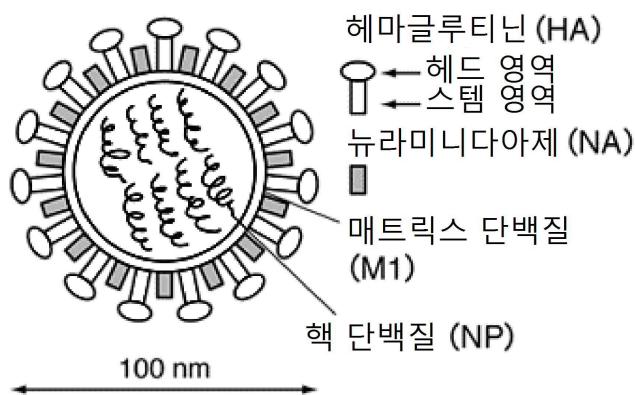
[0082] 본 발명은 인플루엔자 백신의 제조에 유용하다.

[0083] [서열목록 프리 텍스트]

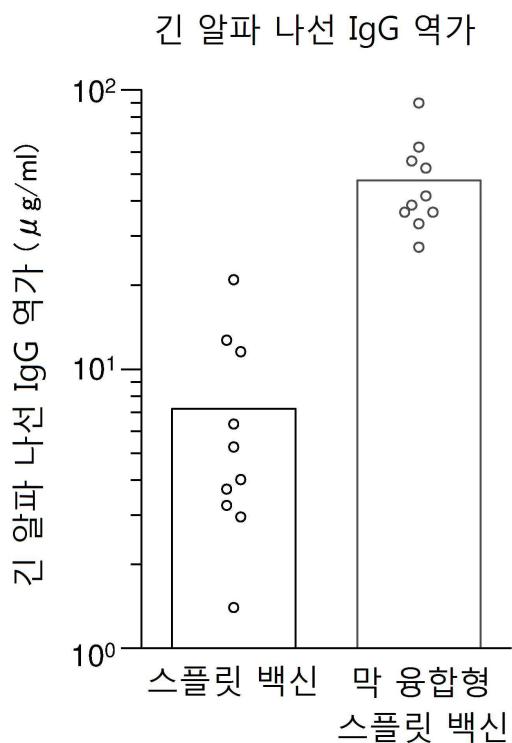
[0084] SEQ ID NO: 1, 2: 합성 펩티드

도면

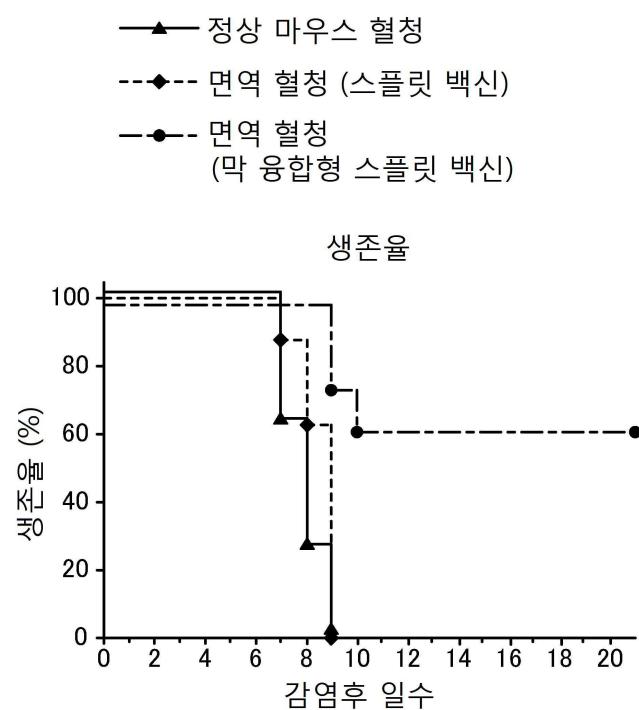
도면1



도면2

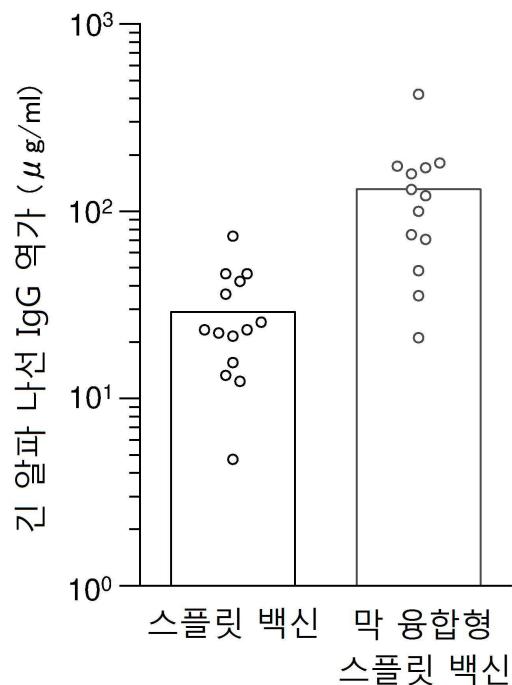


도면3

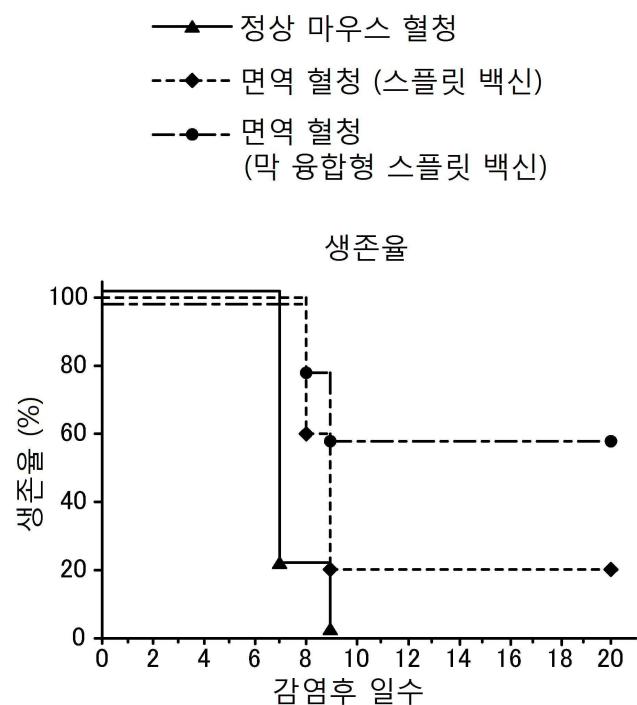


도면4

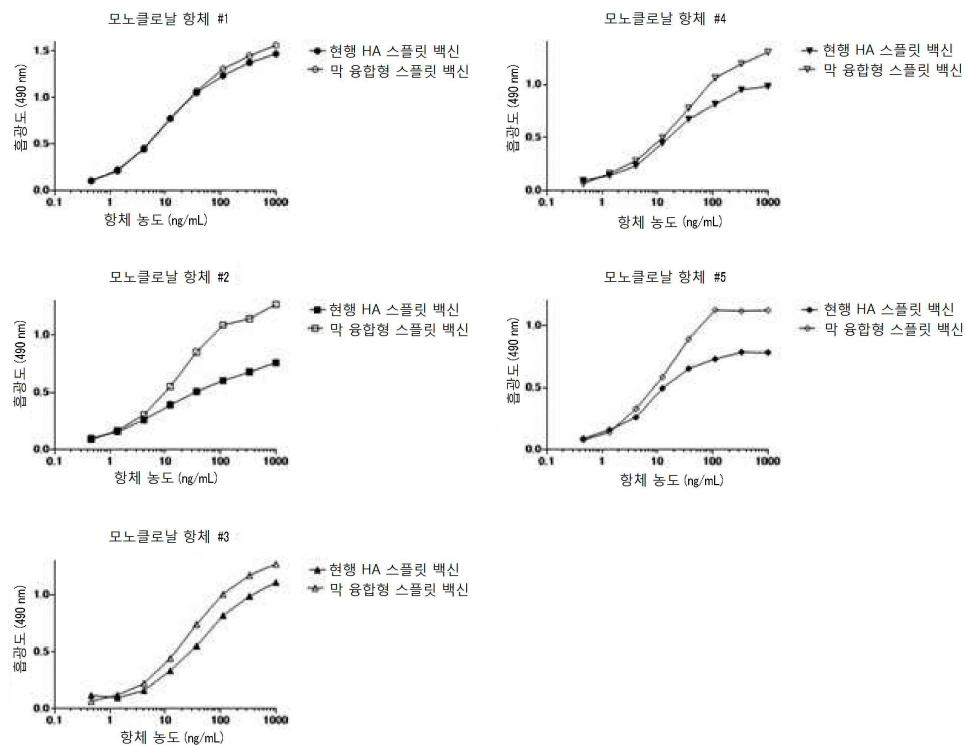
긴 알파 나선 IgG 역가



도면5



도면6



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Health Sciences Foundation
 <120> Method of manufacturing influenza HA split vaccine
 <130> H18-279WO
 <150> JP2017-169230
 <151> 2017-09-04
 <150> JP2018-137952
 <151> 2018-07-23
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETYLATION
 <400> 1

Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu

1 5 10 15

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

Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Cys

50 55 60

<210> 2

<211> 64

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> ACETYLATION

<400> 2

Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile

1 5 10 15

Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr

20 25 30

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