



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111372605 B

(45) 授权公告日 2024.12.17

(21) 申请号 201880070955.0

(73) 专利权人 日本国立感染症研究所所长代表

(22) 申请日 2018.09.03

之日本国

(65) 同一申请的已公布的文献号

地址 日本东京都

申请公布号 CN 111372605 A

(72) 发明人 高桥宜圣 安达悠 阿户学

(43) 申请公布日 2020.07.03

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(30) 优先权数据

专利代理人 罗文锋 黄登高

2017-169230 2017.09.04 JP

(51) Int.CI.

2018-137952 2018.07.23 JP

A61K 39/145 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 14/11 (2006.01)

2020.04.29

C12N 15/44 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/JP2018/032537 2018.09.03

CN 104302317 A, 2015.01.21

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 陈永强

W02019/045090 JA 2019.03.07

权利要求书1页 说明书7页

序列表2页 附图5页

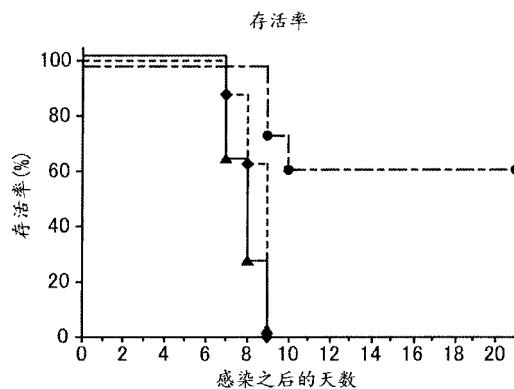
## (54) 发明名称

用于产生流感HA裂解疫苗的方法

## (57) 摘要

提供一种用于产生流感HA裂解疫苗的方法，所述疫苗产生与流感的HA茎区结合的抗体，所述HA茎区不太可能引起抗原变异。对流感HA裂解疫苗进行酸性处理。通过酸性处理，获得流感HA裂解疫苗，所述疫苗产生与HA茎区的LAH结合的抗体。这种流感HA裂解疫苗具有出色的抵抗具有不同抗原性的其他流感病毒感染的能力。

- ▲— 正常小鼠血清
- ◆- 免疫血清(裂解疫苗)
- 免疫血清(膜融合型裂解疫苗)



1. 一种用于产生流感膜融合型HA裂解疫苗的方法，所述疫苗诱导体内产生与HA茎区的LAH结合的抗体，所述方法包括：

用醚处理全病毒疫苗以去除脂质成分，从而制备流感HA裂解疫苗；和

对所述流感HA裂解疫苗进行酸性处理以便产生所述流感膜融合型HA裂解疫苗，其中所述酸性处理在4.0-6.0的pH下进行，并将HA蛋白的结构改变为称为膜融合型的结构，

其中所述流感HA裂解疫苗具有H3N2型或H1N1型。

2. 根据权利要求1所述的方法，其中所述酸性处理在4.4-5.8的pH下进行。

3. 一种流感膜融合型HA裂解疫苗，其诱导体内产生与HA茎区的LAH结合的抗体，其中所述流感膜融合型HA裂解疫苗通过根据权利要求1-2中任何一项所述的方法产生。

4. 根据权利要求3所述的流感膜融合型HA裂解疫苗在制备用于保护免受H3N2型或H1N1型流感感染的疫苗中的用途。

5. 根据权利要求3所述的流感膜融合型HA裂解疫苗在制备用于保护免受H3N2型流感感染的疫苗中的用途，其中所述流感膜融合型HA裂解疫苗具有H3N2型。

6. 根据权利要求3所述的流感膜融合型HA裂解疫苗在制备用于保护免受H1N1型流感感染的疫苗中的用途，其中所述流感膜融合型HA裂解疫苗具有H1N1型。

## 用于产生流感HA裂解疫苗的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于产生流感HA裂解疫苗的方法。

### 背景技术

[0002] 现有的流感应血凝素(下文也缩写为“HA”)疫苗诱导抗HA抗体,从而发挥针对感染的保护作用。抗HA抗体与从病毒膜外部暴露的称为“头部区域”的病毒部分结合。该区域最经常经历病毒株的结构变化。因此,在一些情况下,抗HA抗体可能无法与引起抗原变异和与疫苗株不同的病毒结合,疫苗不能发挥针对感染的保护作用。

[0003] 近来,已经揭示出与不太可能引起抗原变异的茎区结合的抗体包括针对感染的保护性抗体(专利文献1)。为了有效地诱导与茎区结合的抗体,已经开发出具有稳定化茎部分的HA茎蛋白,并且已经在人体进行了其临床试验:最初不稳定的茎部分已通过人为变异或接头结合得以稳定。

[0004] 然而,关于用于实际用途的生产的问题仍然有待解决,并且已经期望开发可更易于诱导抗茎抗体的HA疫苗抗原。

[0005] 引文列表

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:日本未经审查的专利公开第2016-516090号(PCT国际申请的翻译)

[0008] 发明概述

[0009] 技术问题

[0010] 鉴于前述,本发明的一个目的为提供一种用于产生流感HA裂解疫苗的方法,所述疫苗产生与流感的不太可能引起抗原变异的HA茎区结合的抗体。

[0011] 问题的解决方案

[0012] 本发明的用于产生HA裂解疫苗的方法包括对流感HA裂解疫苗进行酸性处理,从而产生流感HA裂解疫苗,所述疫苗产生与HA茎区的长 $\alpha$ 螺旋(LAH)结合的抗体,并且对引起抗原变异的流感病毒有效。

[0013] 具体地讲,本发明涉及以下内容。

[0014] [项目1]

[0015] 一种用于产生流感HA裂解疫苗的方法,所述疫苗产生与HA茎区的LAH结合的抗体,所述方法包括:对流感HA裂解疫苗进行酸性处理。

[0016] [项目2]

[0017] 项目1的产生方法,其中流感HA裂解疫苗对引起抗原变异的流感病毒也有效。

[0018] [项目3]

[0019] 一种用于产生流感HA裂解疫苗的方法,所述疫苗产生与HA茎区的LAH结合的抗体并且对引起抗原变异的流感病毒有效,所述方法包括:对流感HA裂解疫苗进行酸性处理。

[0020] [项目4]

[0021] 项目1-3中任何一项的方法,其中酸性处理在4.4-5.8的pH下进行。

- [0022] [项目5]
- [0023] 项目1-4中任何一项的方法,其中流感HA裂解疫苗具有H3N2型或H1N1型。
- [0024] [项目6]
- [0025] 一种流感HA裂解疫苗,其产生与HA茎区的LAH结合的抗体。
- [0026] [项目7]
- [0027] 项目6的流感HA裂解疫苗,其对引起抗原变异的流感病毒也有效。
- [0028] [项目8]
- [0029] 项目6或7的流感HA裂解疫苗,其具有暴露于外部的HA茎区。
- [0030] [项目9]
- [0031] 项目6-8中任何一项的流感HA裂解疫苗,其中暴露于外部的流感HA裂解疫苗抗原的HA茎区增强HA茎区的LAH的抗原性,并且流感HA裂解疫苗能够产生与HA茎区的LAH结合的抗体。
- [0032] [项目10]
- [0033] 一种流感HA裂解疫苗,其对引起抗原变异的流感病毒有效,并且产生与HA茎区的LAH结合的抗体,该疫苗通过对流感HA裂解疫苗进行酸性处理而产生。
- [0034] [项目11]
- [0035] 一种流感HA裂解疫苗,其通过对流感HA裂解疫苗进行酸性处理而产生,产生与HA茎区的LAH结合的抗体,并且还对引起抗原变异的流感病毒有效。
- [0036] 发明的优点
- [0037] 根据本发明,通过简单技术获得产生与流感的HA茎区结合的抗体的流感HA裂解疫苗,该HA茎区不太可能引起抗原变异。因此,获得了对引起抗原变异的流感病毒也有效的流感HA裂解疫苗。
- [0038] 附图简述
- [0039] [图1] 图1为说明流感病毒的示意图。
- [0040] [图2] 图2为显示在接种膜融合型H3N2 HA裂解疫苗的小鼠血清中抗LAH抗体的滴度增加的图表。
- [0041] [图3] 图3为显示接种膜融合型H3N2 HA裂解疫苗的小鼠对抗原变体的交叉保护能力的改善的图表。
- [0042] [图4] 图4为显示在接种膜融合型H1N1 HA裂解疫苗的小鼠血清中抗LAH抗体的滴度增加的图表。
- [0043] [图5] 图5为显示接种膜融合型H1N1 HA裂解疫苗的小鼠对抗原变体的交叉保护能力的改善的图表。
- [0044] [图6] 图6显示各自表明LAH结合单克隆抗体与膜融合型HA裂解疫苗比与现有HA裂解疫苗更强烈地结合的图表。
- [0045] 实施方案的描述
- [0046] 本发明的实施方案以下将参考附图进行详细描述。然而,实施方案旨在促进对本发明原理的理解,并且本发明的范围不限于以下实施方案。其中以下实施方案的配置已被本领域技术人员适当替换的其他实施方案也包括在本发明的范围内。
- [0047] 该实施方案的用于产生流感HA裂解疫苗的方法包括对流感HA裂解疫苗进行酸性

处理的步骤。

[0048] 通过用醚处理全病毒疫苗以去除成为热原的脂质成分,来制备流感HA裂解疫苗。流感HA裂解疫苗以HA蛋白作为主要成分,因为流感HA裂解疫苗通过经由密度梯度离心从病毒颗粒表面收集免疫所需的HA蛋白而产生。

[0049] 称为“刺突蛋白”糖蛋白从流感病毒的表面突出(图1)。甲型流感病毒具有两种类型的刺突蛋白,即HA和NA(神经氨酸酶),其帮助病毒引起感染。HA与要感染的细胞结合,并帮助病毒进入细胞。HA经常引起抗原变异。NA将受感染的细胞与HA解结合,并用于从细胞释放复制的病毒。

[0050] 甲型流感病毒的HA分为两个区域,即头部区域和茎区(图1)。头部区域含有病毒与靶细胞结合的受体结合位点。茎区含有用于在病毒膜和靶细胞的细胞膜之间进行膜融合所需的融合肽序列。

[0051] 对流感HA裂解疫苗进行的酸性处理将HA蛋白的结构改变为称为膜融合型的结构。在膜融合型HA蛋白中,茎区暴露于病毒膜的外部而不是头部区域,抗原茎的构象具有大的结构变化。本发明人在体内发现,当将膜融合型HA蛋白用作疫苗时,诱导与茎区的LAH结合的抗体,并且该抗体对引起抗原变异的病毒株具有保护作用。基于这一事实完成了本发明。

[0052] 酸性处理没有特别限制,并且可在例如3.0-6.5,优选地在4.0-6.0,并且更优选地在4.4-5.8的pH下进行。用于酸性处理的酸没有特别限制,并且可为例如磷酸、柠檬酸、马来酸或任何其他合适的酸。

[0053] 基于抗原性的差异,将甲型流感病毒的HA分类为18个亚型(H1-H18),和将NA分类为9个亚型(N1-N9)。本发明的流感HA裂解疫苗适用于所有这些亚型。另外,本发明的用于产生流感HA裂解疫苗的方法可产生不仅对甲型流感病毒而且还对具有HA的乙型流感病毒有效的疫苗。

[0054] 通过本发明产生方法获得的流感HA裂解疫苗产生了与不太可能引起变异的LAH结合的抗体。因此,疫苗可对称为抗原变体的流感病毒具有交叉保护作用,只要病毒具有相同的HA亚型即可。此外,通过本发明产生方法获得的流感HA裂解疫苗可在LAH的相似氨基酸序列的HA亚型(例如H3和H7)之间具有交叉反应性。

[0055] 在一个优选的实施方案中,通过本发明产生方法获得的流感HA裂解疫苗比现有HA裂解疫苗更强烈地与LAH结合单克隆抗体结合。例如,流感HA裂解疫苗与LAH结合单克隆抗体的结合强度为现有HA裂解疫苗的至少1.05倍,优选地至少1.1倍,更优选地至少1.5倍,和甚至更优选地至少2倍。在该上下文中,“流感HA裂解疫苗的结合强度为现有HA裂解疫苗的至少1.05倍、至少1.1倍、至少1.5倍或至少2倍”意指例如当通过回归确定的吸光度为0.7时抗体浓度的倒数为现有HA裂解疫苗的抗体浓度的倒数的至少1.05倍、至少1.1倍、至少1.5倍或至少2倍。在一个优选的实施方案中,本发明的流感HA裂解疫苗与LAH结合单克隆抗体的结合能力高于现有HA裂解疫苗的结合能力。尽管上限没有特别限制,但是结合能力可在例如1.05-200倍、1.1-150倍、1.5-100倍或2-50倍的范围内。或者,本发明的流感HA裂解疫苗与LAH结合单克隆抗体的结合能力的范围与现有HA裂解疫苗的范围相比较可通过选自1.05、1.1、1.5、2、3、4和5的下限值和选自200、150、100、50、30和20的上限值的组合来表示。为了测量流感HA裂解疫苗与LAH结合单克隆抗体的结合能力,可使用任何方法而没有特别限制,并且可采用本领域技术人员已知的常用方法。例如,结合能力可通过本申请的实施例

所述的方法测量。

[0056] 在本申请中，“LAH结合单克隆抗体”意指与LAH结合的单克隆抗体。为了产生单克隆抗体，可使用任何方法而没有特别限制，并且可采用本领域技术人员已知的常用方法。在测量流感HA裂解疫苗与LAH结合单克隆抗体的结合能力时，假定LAH结合单克隆抗体能够与对应于衍生流感HA裂解疫苗的流感病毒LAH的至少一部分的肽结合。

[0057] 在本申请中，“现有HA裂解疫苗”意指通过用醚处理全病毒疫苗而自其去除成为热原的脂质成分的疫苗，并且可例如通过本申请的实施例1所述的方法来产生。与通过包括以下酸性处理的方法制备的本发明流感HA裂解疫苗相比较，现有HA裂解疫苗也可为没有进行酸性处理而产生的流感HA裂解疫苗。

[0058] 用于产生本发明流感HA裂解疫苗的方法可包括添加佐剂的步骤。佐剂的实例包括(但不限于)铝盐(比如氢氧化铝和磷酸铝)、壳聚糖、寡脱氧核苷酸和水包油乳剂。其中，优选氢氧化铝，并且使用氢氧化铝作为佐剂可增强免疫原性。

[0059] 通过本发明产生方法获得的流感HA裂解疫苗可例如用于在初次接种之后的预定时间之后的额外接种。初次接种之后和额外接种之前的时间没有特别限制，但是可为例如20天-3年，优选地为3个月-2年，更优选地为6个月-1年。用于初次和额外接种的流感HA裂解疫苗的量没有特别限制，但是可为例如每剂1 μg-200 μg，优选地为10 μg-30 μg，更优选地为15 μg。单剂量为例如0.5 mL。可将任何给予方法用于初次和额外接种而没有特别限制，并且例如可采用鼻、皮下、皮内、经皮、眼内、粘膜或口服给予。肌内给予为优选的。

[0060] 通过本发明产生方法获得的流感HA裂解疫苗具有针对引起抗原变异的病毒株的保护作用。例如，如果现有HA裂解疫苗由H3N2流感病毒(A/Fujian/411/02 (H3N2))的颗粒制备并进行酸性处理，则该疫苗可不仅对A/Fujian/411/02 (H3N2)的感染，而且对例如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)或A/Hiroshima/52/2005 (H3N2)的感染具有保护作用。同样，例如，如果现有HA裂解疫苗由H1N1流感病毒(A/Puerto Rico/8/34 (H1N1))的颗粒制备并进行酸处理，则该疫苗也可不仅对A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)的感染，而且对例如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)或A/Mexico/4108/2009 (H1N1)的感染具有保护作用。

[0061] [实施例]

[0062] 1. HA裂解疫苗的制备

[0063] 将Tween 80添加到悬浮于磷酸盐缓冲盐水中的H3N2流感病毒(毒株X31)的颗粒或H1N1流感病毒(A/Puerto Rico/8/34毒株)的颗粒至最终浓度为0.2%，并悬浮于其中。加入乙醚并使其悬浮，且将悬浮液静置直至水层和乙醚层完全分离，并然后去除乙醚层。重复该

醚萃取之后,常压下蒸出残留在所回收水层中的乙醚以获得HA裂解疫苗。

[0064] 2. 酸性处理

[0065] 将HA裂解疫苗悬浮于磷酸盐缓冲盐水中,并然后通过添加0.15 M柠檬酸盐缓冲液(pH 3.5)以使pH达到5.0来进行酸性处理。在室温下静置30分钟之后,加入1 M Tris缓冲液(pH 8.0),使得pH恢复至7.3。之后,进行离心以获得膜融合型HA裂解疫苗。将福尔马林添加到由此制备的膜融合型HA裂解疫苗中至最终浓度为0.05%,并静置几天。

[0066] 除了不进行酸性处理以外,以与上述1中所述相同的方式制备现有HA裂解疫苗。

[0067] 3. 通过ELISA测量抗LAH抗体的滴度

[0068] 3-1. H3N2流感疫苗的接种

[0069] 将BALB/c小鼠(雌性,6-12周龄)腹膜内接种现有H3N2 HA裂解疫苗或膜融合型HA裂解疫苗(10  $\mu$ g疫苗+ 20  $\mu$ g AddaVax佐剂(InvivoGen),其溶解于磷酸盐缓冲盐水中至液体体积为200  $\mu$ l)。初次接种之后28天,将小鼠腹膜内接种膜融合型HA疫苗(仅将10  $\mu$ g疫苗溶解于磷酸盐缓冲盐水中至液体体积为200  $\mu$ l)。在额外接种之后至少14天,从接种疫苗的小鼠收集血液,从中收集血清。

[0070] 3-2. 通过ELISA测量

[0071] 通过ELISA(酶联免疫吸附测定)以以下方式测量了腹膜内接种现有H3N2 HA裂解疫苗或膜融合型HA裂解疫苗的BALB/c小鼠血清中抗LAH抗体的浓度。

[0072] 具体地将,将对应于茎部分的一部分(长 $\alpha$ 螺旋)的合成肽(H3; Ac-RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMNLFEKTRRQLRENADYKDDDKC)(SEQ ID NO: 1)以10  $\mu$ g/ml溶解于磷酸盐缓冲盐水(pH 7.3)中,并以各自100  $\mu$ l添加到96孔板中。在4°C下静置过夜之后,每孔用磷酸盐缓冲盐水洗涤3次,并加入150  $\mu$ l含有1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲盐水。在室温下静置2小时之后,每孔用磷酸盐缓冲盐水洗涤3次。然后,向每孔添加100  $\mu$ l用含有0.05% Tween 20和1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液连续稀释的小鼠血清和100  $\mu$ l已知浓度的标准单克隆抗体(H3;克隆名称V15-5)。在室温下静置2小时之后,每孔用磷酸盐缓冲盐水(含有0.05% Tween 20)洗涤3次,并向每孔加入100  $\mu$ l用含有0.05% Tween 20和1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲盐水稀释的过氧化物酶标记的抗小鼠IgG抗体(Southern Biotech)。在室温下静置2小时之后,每孔用磷酸盐缓冲盐水(含有0.05% Tween 20)洗涤3次。然后,将30 mg邻苯二胺片(Sigma)和24  $\mu$ l 30%过氧化氢溶液(30% w/w; Sigma)添加到60 ml柠檬酸盐缓冲液(pH 5.0)中作为底物,并将100  $\mu$ l所得物添加到每孔中。显色之后,加入50  $\mu$ l 2N硫酸(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)以终止反应,并使用Microplate Reader 450(Biorad)测量490 nm处的吸光度值。

[0073] 如图2所示,腹膜内接种膜融合型HA裂解疫苗的BALB/c小鼠血清中抗LAH抗体的滴度明显高于腹膜内接种现有HA裂解疫苗的BALB/c小鼠血清中抗LAH抗体的滴度。

[0074] 4. 对抗原变体的交叉保护

[0075] 在关于针对H3N2病毒感染的保护的实验中,将自未接种的小鼠收集的200  $\mu$ l血清、自接种现有H3N2 HA裂解疫苗的小鼠收集的200  $\mu$ l血清或自接种膜融合型HA裂解疫苗的小鼠收集的200  $\mu$ l血清腹膜内给予BALB/c小鼠(雌性,6-12周龄)。

[0076] 血清给予之后3小时,在麻醉下,以5倍小鼠半数致死剂量(使50%小鼠致死的病毒量的5倍)鼻内给予与疫苗株具有不同抗原性的另一H3N2流感病毒(A/Guizhou/54/89)。

[0077] 从病毒感染开始,每天称重小鼠并观察持续21天,以研究体重和存活率的变化。处死体重减轻25%的小鼠。

[0078] 如图3所示,对于接种膜融合型HA裂解疫苗的BALB/c小鼠,在感染其他具有不同抗原性的H3N2流感病毒之后第9天及之后,存活率的下降被显著抑制。

[0079] 5. 通过ELISA测量抗LAH抗体的滴度

[0080] 5-1. H1N1流感病毒颗粒

[0081] 将C57BL/6小鼠(雌性,6-12周龄)腹膜内接种现有H1N1 HA裂解疫苗或膜融合型HA裂解疫苗( $10 \mu\text{g}$ 疫苗+ $10 \mu\text{g}$  CpG-ODN 1760,其悬浮于磷酸盐缓冲盐水中,并与等体积的弗氏不完全佐剂(ROCKLAND)混合至液体体积为 $200 \mu\text{l}$ )。初次接种之后28天,将小鼠腹膜内接种膜融合型HA裂解疫苗( $10 \mu\text{g}$ 疫苗+ $10 \mu\text{g}$  CpG-ODN,其以与初次接种相同的方式悬浮于磷酸盐缓冲盐水中,并与等体积的弗氏不完全佐剂(ROCKLAND)混合至液体体积为 $200 \mu\text{l}$ )。在额外接种之后至少14天,从接种疫苗的小鼠收集血液,从中收集血清。

[0082] 5-2. 通过ELISA测量

[0083] 通过ELISA以以下方式测量腹膜内接种现有H1N1 HA裂解疫苗或膜融合型HA裂解疫苗的C57BL/6小鼠血清中抗LAH抗体的浓度。

[0084] 除了使用对应于茎部分的一部分(长α螺旋)的合成肽(H1; Ac-RIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQQLKNNADYKDDDKC)(SEQ ID NO: 2)和使用已知浓度的标准单克隆抗体(H1;克隆名称F2)以外,以与上述相同的方式进行测量。

[0085] 如图4所示,腹膜内接种膜融合型HA裂解疫苗的C57BL/6小鼠血清中抗LAH抗体的滴度明显高于腹膜内接种现有HA裂解疫苗的C57BL/6小鼠血清中抗LAH抗体的滴度。

[0086] 6. 对抗原变体的交叉保护

[0087] 在关于针对H1N1病毒感染的保护的实验中,将自未接种的小鼠收集的 $200 \mu\text{l}$ 血清、自接种现有H1N1 HA裂解疫苗的小鼠收集的 $200 \mu\text{l}$ 血清或自接种膜融合型HA裂解疫苗的小鼠收集的 $200 \mu\text{l}$ 血清腹膜内给予C57BL/6小鼠(雌性,6-12周龄)。

[0088] 血清给予之后3小时,在麻醉下,以5倍小鼠半数致死剂量(使50%小鼠致死的病毒量的5倍)鼻内给予与疫苗株具有不同抗原性的另一H1N1流感病毒(A/Narita/1/09)。

[0089] 从病毒感染开始每天观察小鼠持续20天,以研究存活率。如图5所示,对于接种膜融合型HA裂解疫苗的C57BL/6小鼠,在感染其他具有不同抗原性的H1N1流感病毒之后第9天及之后,存活率的下降被显著抑制。

[0090] 7. 抗体与LAH表位的结合能力

[0091] 通过ELISA(酶联免疫吸附测定)测量从感染毒株X31的鼠或人类外周血制备的抗LAH单克隆抗体与现有HA裂解疫苗或膜融合型HA裂解疫苗的结合。将H3N2流感病毒(毒株X31)的现有HA裂解疫苗或膜融合型HA裂解疫苗溶解于磷酸盐缓冲盐水(pH 7.3)中,并以各自 $50 \mu\text{l}$ 添加到96孔板中。在 $4^\circ\text{C}$ 下静置过夜之后,每孔用磷酸盐缓冲盐水洗涤3次,并加入 $150 \mu\text{l}$ 含有1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲盐水。在室温下静置2小时之后,每孔用磷酸盐缓冲盐水(含有0.05% Tween 20)洗涤3次,并加入 $50 \mu\text{l}$ 用含有1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液连续稀释的LAH结合单克隆抗体。在 $4^\circ\text{C}$ 下静置过夜之后,每孔用磷酸盐缓冲盐水(含有0.05% Tween 20)洗涤3次,并向每孔加入用含有0.05% Tween 20和1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲盐水稀释的 $100 \mu\text{l}$ 过氧化物酶标记的抗小鼠IgG抗体(Southern Biotech)。在室温

下静置2小时之后,每孔用磷酸盐缓冲盐水(含有0.05% Tween 20)洗涤3次。然后,将30 mg 邻苯二胺片(Sigma)和24  $\mu$ l 30%过氧化氢溶液(30% w/w; Sigma)添加到60 ml柠檬酸盐缓冲液(pH 5.0)中作为底物,并将50  $\mu$ l所得物添加到每孔中。显色之后,加入25  $\mu$ l 1 mol/L 硫酸(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)以终止反应,并使用Microplate Reader 450 (Biorad) 测量490 nm处的吸光度值。从对于现有HA裂解疫苗或膜融合型HA裂解疫苗测量的吸光度值计算结合能力的变化。

[0092] 如图6所示,LAH结合单克隆抗体与膜融合型HA裂解疫苗的结合能力为与现有HA裂解疫苗的结合能力的1.05-21倍。结果表明,HA裂解疫苗的酸性处理增强抗体与LAH表位的结合能力。

[0093] 工业实用性

[0094] 本发明可用于产生流感疫苗。

[0095] [序列表自由文本]

[0096] SEQ ID NO: 1, 2: 合成肽

[0097] [序列表]

<110> Japan Health Sciences Foundation

<120> 制造流感 HA 裂解疫苗的方法

<130> H18-279W0

<150> JP2017-169230

<151> 2017-09-04

<150> JP2018-137952

<151> 2018-07-23

<160> 2

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 64

<212> PRT

<213> 人工序列

[0001] <220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 乙酰化

<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 Lys Cys

50

55

60

<210> 2  
<211> 64  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 乙酰化

[0002]

<400> 2  
Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys 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 Lys Cys  
50 55 60

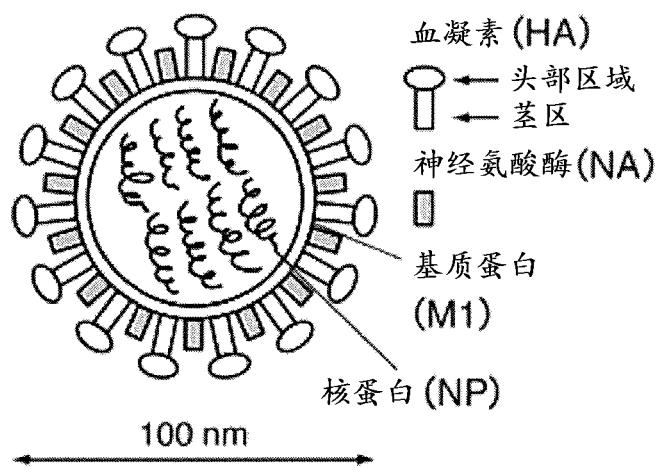


图 1

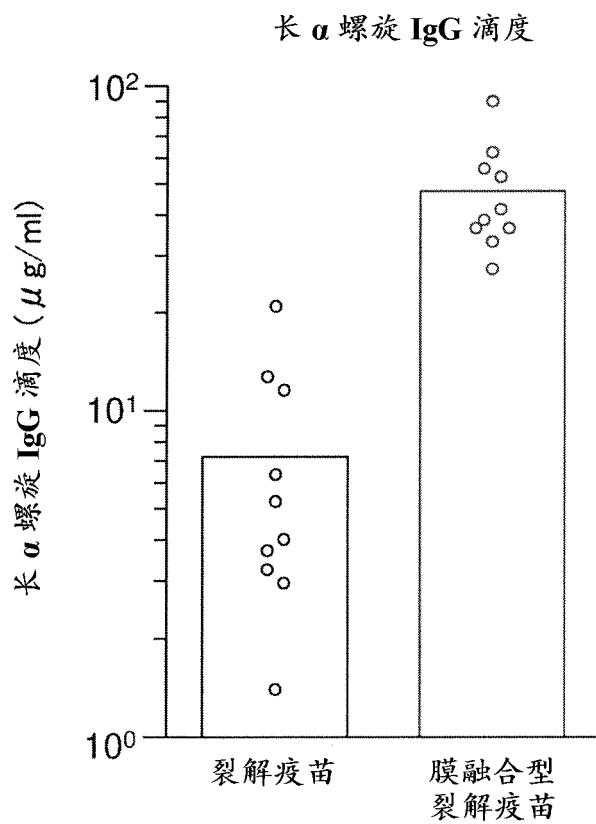


图 2

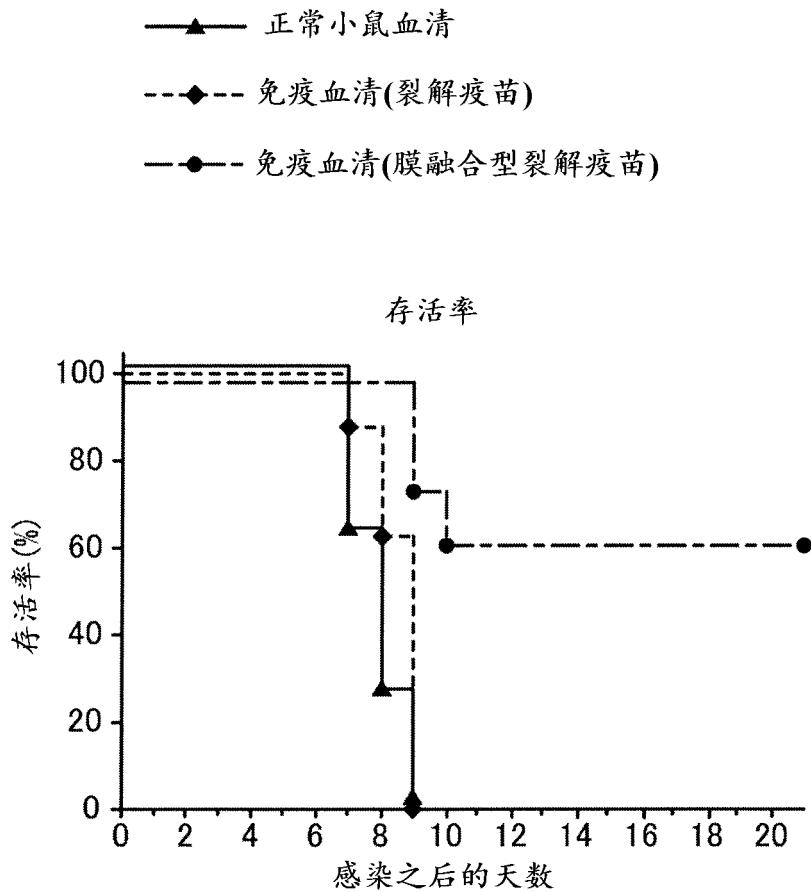


图 3

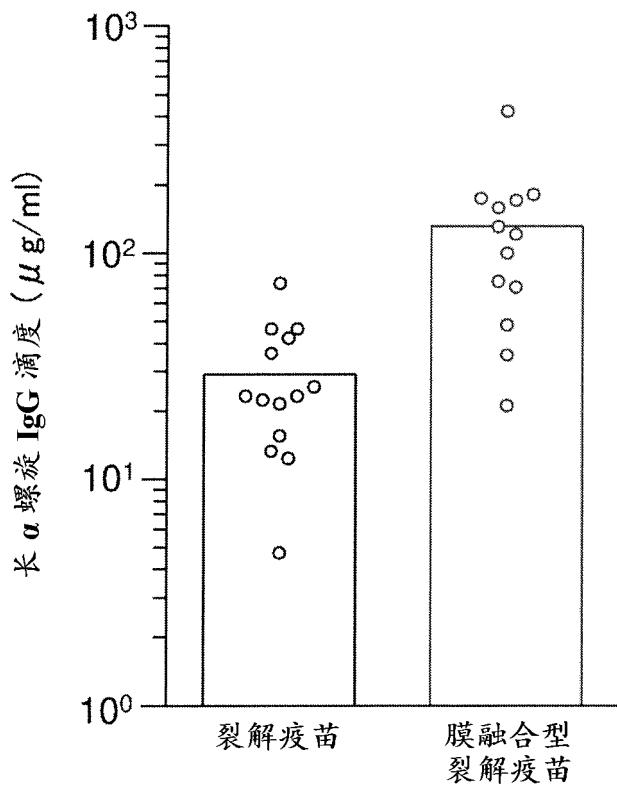
长  $\alpha$  螺旋 IgG 滴度

图 4

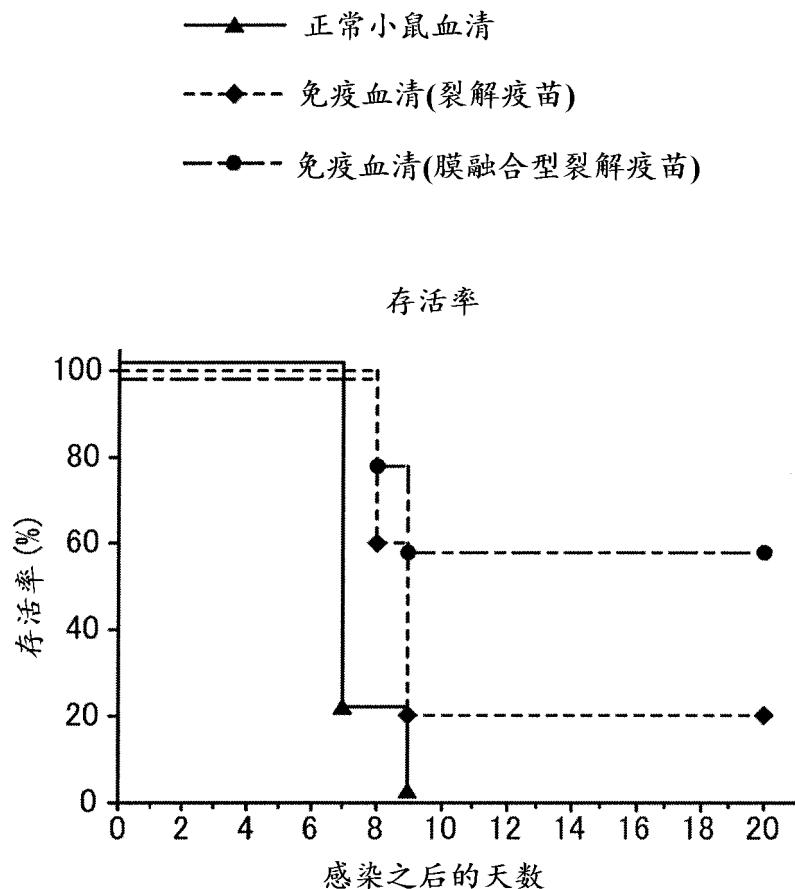


图 5

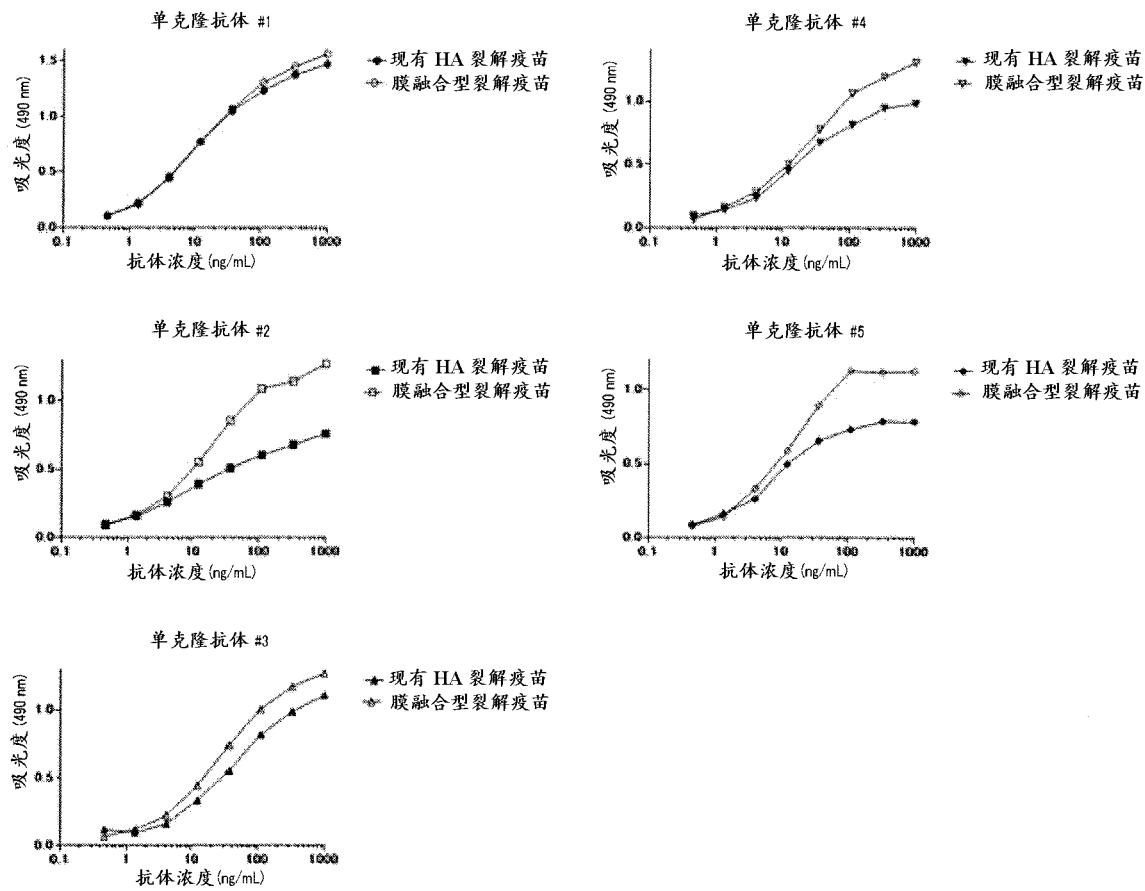


图 6