

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2019年3月7日(07.03.2019)



(10) 国際公開番号

**WO 2019/045090 A1**

(51) 国際特許分類:

*A61K 39/145* (2006.01) *C12N 15/44* (2006.01)  
*C07K 14/11* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/032537

(22) 国際出願日: 2018年9月3日(03.09.2018)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2017-169230 2017年9月4日(04.09.2017) JP  
特願 2018-137952 2018年7月23日(23.07.2018) JP

(71) 出願人: 公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 (JAPAN HEALTH SCIENCES

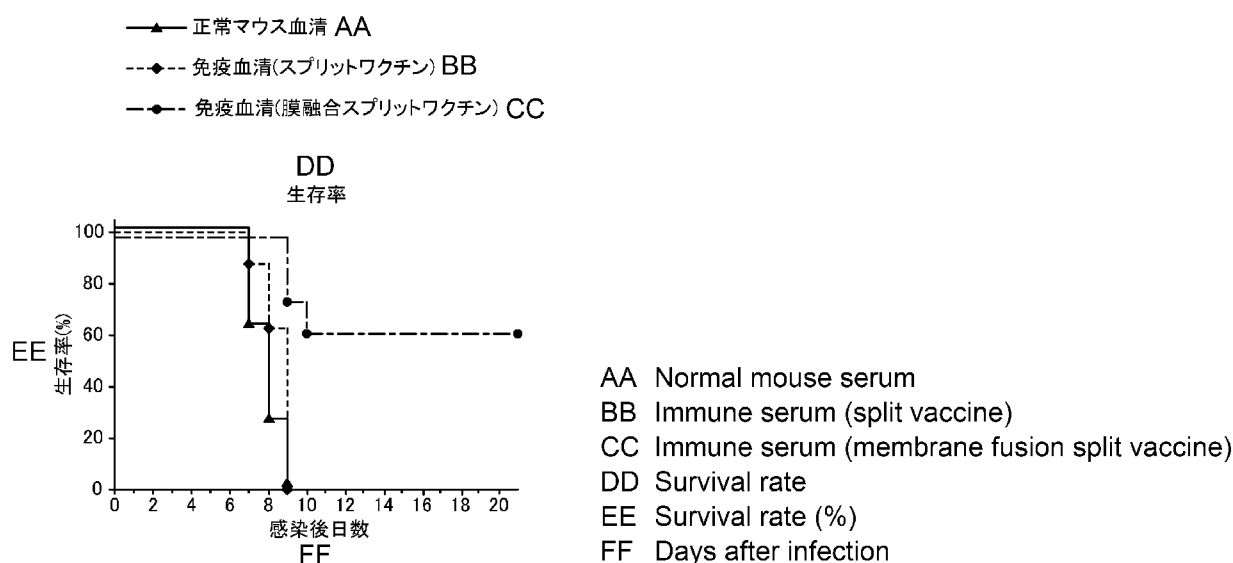
FOUNDATION) [JP/JP]; 〒1010032 東京都千代田区岩本町二丁目1番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 高橋 宜聖 (TAKAHASHI Yoshimasa); 〒1628640 東京都新宿区戸山1丁目2番1号 国立感染症研究所内 Tokyo (JP). 安達悠 (ADACHI Yu); 〒1628640 東京都新宿区戸山1丁目2番1号 国立感染症研究所内 Tokyo (JP). 阿戸 学 (ATO Manabu); 〒1628640 東京都新宿区戸山1丁目2番1号 国立感染症研究所内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人前田特許事務所 (MAEDA & PARTNERS); 〒5300004 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番1号 新ダイビル23階 Osaka (JP).

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING INFLUENZA HA SPLIT VACCINE

(54) 発明の名称: インフルエンザHAスプリットワクチンの製造方法



(57) Abstract: Provided is a method for producing an influenza HA split vaccine that produces antibodies that bind to the HA stem region of influenza, which is less likely to undergo antigenic mutation. Acid treatment of the influenza HA split vaccine is performed. An influenza HA split vaccine that produces antibodies that bind to LAH of the HA stem region is obtained by performing acid treatment. This influenza HA split vaccine has excellent protective ability against influenza virus infections of different antigenicity.

(57) 要約: 抗原変異を起こしにくいインフルエンザのHA幹領域に結合する抗体を産生する、インフルエンザHAスプリットワクチンの製造方法を提供する。インフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施す。酸性処理を施すことにより、HA幹領域のLAHに結合する抗体を産生するインフルエンザHAスプリットワクチンが得られる。このインフルエンザHAスプリットワクチンは抗原性の異なる別のインフルエンザウイルス感染に対して優れた防御能を有する。

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

## 明 細 書

### 発明の名称： インフルエンザHAスプリットワクチンの製造方法 技術分野

[0001] 本発明は、インフルエンザHAスプリットワクチンの製造方法に関する。

#### 背景技術

[0002] 現行のインフルエンザヘマグルチニン（以下、ヘマグルチニンを「HA」と記載することがある。）ワクチンは、HA抗体を誘導することで感染防御効果を発揮する。HA抗体は、球状部領域（head region）と呼ばれるウイルス膜から外側に露出した部分に結合するが、この部分はウイルス株間で最も構造変化に富む領域となる。その結果、ワクチン株と異なる抗原変異ウイルス感染に対して、HA抗体が結合できずワクチンが奏功しないケースがある。

[0003] 近年、抗原変異を起こしにくい幹領域（stem region）に結合する抗体の中に、感染防御抗体が含まれることが明らかにされた（特許文献1）。ステム抗体を効率的に誘導するため、人工的な変異やリンカーを結合させることで、不安定なステム部分の安定化に成功したHAステムタンパクが開発され、ヒト臨床試験が実施されている。

[0004] しかし、実用化に向けた製造面での課題も残されており、より簡便にステム抗体を誘導可能なHAワクチン抗原の開発が期待されている。

#### 先行技術文献

##### 特許文献

[0005] 特許文献1：特表2016-516090号公報

#### 発明の概要

##### 発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明はかかる問題点に鑑みてなされたものであって、抗原変異を起こしにくいインフルエンザのHA幹領域に結合する抗体を産生する、インフルエンザHAスプリットワクチンの製造方法を提供することを目的とする。

##### 課題を解決するための手段

[0007] 本発明にかかるHAスプリットワクチンの製造方法は、インフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施すことにより、HA幹領域のLAH(long alpha helix)に結合する抗体を産生する、抗原変異インフルエンザウイルスに対しても有効なインフルエンザHAスプリットワクチンの製造方法である。

[0008] すなわち、本発明は、以下のものに関する。

[項 1]

インフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施すことにより、HA幹領域のLAHに結合する抗体を産生する、インフルエンザHAスプリットワクチンの製造方法。

[項 2]

該インフルエンザHAスプリットワクチンが、抗原変異インフルエンザウイルスに対しても有効である、項 1 に記載の製造方法。

[項 3]

インフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施すことにより、HA幹領域のLAHに結合する抗体を産生する、抗原変異インフルエンザウイルスに対するインフルエンザHAスプリットワクチンの製造方法。

[項 4]

前記酸性処理はpH4.4～5.8にて処理を行うことを特徴とする請求項 1～3 のいずれかに記載のインフルエンザHAスプリットワクチンの製造方法。

[項 5]

前記インフルエンザHAスプリットワクチンはH3N2型又はH1N1型であることを特徴とする請求項 1～4 のいずれかに記載のインフルエンザHAスプリットワクチンの製造方法。

[項 6]

HA幹領域のLAHに結合する抗体を産生する、インフルエンザHAスプリットワクチン。

[項 7]

該インフルエンザHAスプリットワクチンが、抗原変異インフルエンザウイ

ルスに対しても有効である、項6に記載のインフルエンザHAスプリットワクチン。

[項8]

該インフルエンザHAスプリットワクチンが、HA幹領域が外部に露出した形状である、項6または7に記載のインフルエンザHAスプリットワクチン。

[項9]

インフルエンザHAスプリットワクチン抗原のHA幹領域が外部に露出した形状であることにより、HA幹領域のLAHの抗原性が高められており、かつ、HA幹領域のLAHに結合する抗体を産生することができる、項6～8のいずれかに記載のインフルエンザHAスプリットワクチン。

[項10]

インフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施すことにより製造される、HA幹領域のLAHに結合する抗体を産生する、インフルエンザHAスプリットワクチン。

[項11]

インフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施すことにより製造される、HA幹領域のLAHに結合する抗体を産生する、抗原変異インフルエンザウイルスに対しても有効なインフルエンザHAスプリットワクチン。

## 発明の効果

[0009] 本発明によれば、簡易な手法により、抗原変異を起こしにくいインフルエンザのHA幹領域に結合する抗体を産生する、インフルエンザHAスプリットワクチンが得られる。そのため抗原変異インフルエンザウイルスに対しても有効なインフルエンザHAスプリットワクチンが得られる。

## 図面の簡単な説明

[0010] [図1]インフルエンザウイルスを説明する模式図である。

[図2]H3N2型の膜融合型HAスプリットワクチンを接種したマウスの血清中のLAH抗体価の上昇を示す図である。

[図3]H3N2型の膜融合型HAスプリットワクチンを接種したマウスの抗原変異株

に対する交差防御能の向上を示す図である。

[図4]H1N1型の膜融合型HAスプリットワクチンを接種したマウスの血清中のLAH抗体価の上昇を示す図である。

[図5]H1N1型の膜融合型HAスプリットワクチンを接種したマウスの抗原変異株に対する交差防御能の向上を示す図である。

[図6]LAH結合性モノクローナル抗体が、現行HAスプリットワクチンよりも膜融合型HAスプリットワクチンに対して強く結合することを示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0011] 以下、添付の図面を参照して本発明の実施形態について具体的に説明するが、当該実施形態は本発明の原理の理解を容易にするためのものであり、本発明の範囲は、下記の実施形態に限られるものではなく、当業者が以下の実施形態の構成を適宜置換した他の実施形態も、本発明の範囲に含まれる。

[0012] 本実施形態にかかるインフルエンザHAスプリットワクチンの製造方法では、インフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施す工程を有する。

[0013] インフルエンザHAスプリットワクチンは、エーテルで全粒子ワクチン进行处理して発熱物質となる脂質成分を除いたものであり、また、免疫に必要なウイルス粒子表面のHA蛋白を密度勾配遠沈法により回収して製造するためHA蛋白が主成分となっている。

[0014] インフルエンザウイルスの表面には、スパイクタンパクという糖タンパク質が突き出ている(図1)。A型インフルエンザウイルスには、HAとNA(ノイラミニダーゼ)の二種類のスパイクタンパクがあり、ウイルスが感染を起こすための役割を果たす。HAは感染しようとする細胞に結合し、ウイルスを細胞の中に取り込む役割をする。HAは頻繁に抗原変異を起こす。NAは、感染した細胞とHAの結合を切って、複製されたウイルスを細胞から放出させる役割を持つ。

[0015] インフルエンザA型ウイルスのHAは、球状部領域と幹領域の2つに分けられる(図1)。球状部領域は、ウイルスが標的細胞に結合するためのレセプター結合部位を含んでいる。また幹領域は、ウイルス膜と標的細胞の細胞膜と

の膜融合に必要な融合ペプチド配列を含んでいる。

- [0016] インフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施すことにより、HAタンパクは膜融合型と呼ばれる構造に変化する。膜融合型HAタンパクでは、抗原ステム立体構造の大きな構造変化を伴いながら、球状部領域に代わり幹領域がウイルス膜から外部に露出した形状となる。本発明者は、膜融合型HAをワクチンとして使用したとき、幹領域のLAHに結合する抗体が誘導され、この抗体が抗原変異ウイルス株への防御効果を有することを *in vivo* で新知見として見出し、かかる事実に基づいて本発明を完成させた。
- [0017] 酸性処理は、特に限定されるものではないが、例えば pH 3.0～6.5、好ましくは4.0～6.0、更に好ましくは4.4～5.8である。酸性処理を施すために使用される酸は、特に限定されるものではないが、例えばリン酸、クエン酸、マレイン酸等を使用することが可能である。
- [0018] 抗原性の違いからA型インフルエンザウイルスのHAは18の亜型(H 1～H 18)に、NAは9の亜型(N 1～N 9)に分けられるが、本発明のインフルエンザHAスプリットワクチンはこれら全ての亜型を対象とすることが可能である。また本発明にかかるインフルエンザHAスプリットワクチンの製造方法ではA型のみならず、HAを有するB型のワクチンも製造可能である。
- [0019] 本発明にかかる製造方法で得られたインフルエンザHAスプリットワクチンは、変異の少ないLAHに結合する抗体を産生することから、同一のHAの亜型内であれば、抗原変異株として知られるインフルエンザウイルスに対しても交差防御が可能であり得る。さらに、LAHのアミノ酸配列が類似しているHA亜型間（例えば、H3型とH7型）では交差反応性を示しうる。
- [0020] 本発明にかかる製造方法で得られたインフルエンザHAスプリットワクチンは、LAH結合性モノクローナル抗体に対して、現行HAスプリットワクチンよりも強く結合することが好ましい。例えば、LAH結合性モノクローナル抗体に対して、現行HAスプリットワクチンよりも1.05倍以上、好ましくは1.1倍以上、より好ましくは1.5倍以上、更に好ましくは2倍以上強く結合することが好ましい。ここで、現行HAスプリットワクチンよりも1.05倍、1.1倍、1.5倍、ま

たは2倍以上強く結合するとは、例えば、回帰によって求めた吸光度が0.7を示した時の抗体濃度の逆数が、現行HAスプリットワクチンの抗体濃度の逆数の、それぞれ1.05倍、1.1倍、1.5倍、または2倍以上であることをいう。現行HAスプリットワクチンと比較した本発明のインフルエンザHAスプリットワクチンのLAH結合性モノクローナル抗体に対する結合性は高い方が好ましく、上限は特に限定されるものではないが、例えば1.05～200倍、1.1～150倍、1.5～100倍、2～50倍の範囲が例示される。あるいは現行HAスプリットワクチンと比較した本発明のインフルエンザHAスプリットワクチンのLAH結合性モノクローナル抗体に対する結合性の範囲は、1.05、1.1、1.5、2、3、4、および5から選択される下限値と200、150、100、50、30、および20から選択される上限値との組合せにより示されうる。LAH結合性モノクローナル抗体に対するインフルエンザHAスプリットワクチンの結合性の測定方法は特に限定されず、当業者に知られる一般的な方法で行うことができるが、例えば本願実施例の方法に従って測定することができる。

[0021] 本願において、LAH結合性モノクローナル抗体とは、LAHに結合するモノクローナル抗体を意味し、その製造方法は特に限定されず、当業者に知られる一般的な方法により製造することができる。LAH結合性モノクローナル抗体に対するインフルエンザHAスプリットワクチンの結合性の測定においては、LAH結合性モノクローナル抗体は当該インフルエンザHAスプリットワクチンが由来するインフルエンザウイルスのLAHの少なくとも一部に相当するペプチドに結合することができるものであることを意味する。

[0022] 本願において、現行HAスプリットワクチンとは、エーテルで全粒子ワクチンを処理して発熱物質となる脂質成分を除いたものを意味し、例えば本願実施例1の方法により製造することができる。また、現行HAスプリットワクチンは、以下の酸性処理を施す工程を有する方法により製造された本発明のインフルエンザHAスプリットワクチンに対して、酸性処理を施さずに製造されたインフルエンザHAスプリットワクチンであり得る。

[0023] 本発明にかかるインフルエンザHAスプリットワクチンの製造方法では、ア

ジュバントを包含させる工程を有することが可能である。アジュバントとしては、特に限定されるものではないが、例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム等のアルミニウム塩、キトサン、オリゴデオキシヌクレオチド、水中油型エマルジョン等を用いることが可能である。好ましくは水酸化アルミニウムであり、水酸化アルミニウムをアジュバントとして用いることにより、免疫原性を高めることができる。

[0024] 本発明にかかる製造方法で得られたインフルエンザHAスプリットワクチンは、例えば、初回接種の後、所定期間の経過後に追加接種するように使用されることが可能である。初回接種の後、追加接種されるまでの期間は、特に限定されるものではないが、例えば20日～3年であり、好ましくは3月～2年であり、より好ましくは6月～1年である。初回接種及び追加接種のインフルエンザHAスプリットワクチンの量は、特に限定されるものではないが、1用量あたり例えば $1\mu\text{g} \sim 200\mu\text{g}$ であり、好ましくは $10\mu\text{g} \sim 30\mu\text{g}$ であり、より好ましくは $15\mu\text{g}$ である。1用量は例えば0.5mLである。初回接種及び追加接種では、投与方法は特に限定されるものではないが、例えば経鼻、皮下、皮内、経皮、眼内、粘膜、又は、経口投与であり、好ましくは、筋肉内投与である。

[0025] 本発明にかかる製造方法で得られたインフルエンザHAスプリットワクチンは、抗原変異ウイルス株への防御効果を有する。例えば、H3N2型インフルエンザウイルス粒子(A/Fujian/411/02(H3N2))から現行HAスプリットワクチンを調整し、酸性処理を施した場合、A/Fujian/411/02(H3N2)のみならず、例えば、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/Shandong/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)又はA/Hiroshima/52/2005(H3N2)等に対しても感染防御効果を有する。また例

例えばH1N1型インフルエンザウイルス粒子(A/Puerto Rico/8/34(H1N1))から現行HAスプリットワクチンを調整し、酸性処理を施した場合、A/Puerto Rico/8/34(H1N1)のみならず、例えば、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) 又はA/Mexico/4108/2009 (H1N1) 等に対しても感染防御効果を有しうる。

## 実施例

### [0026] 1. HAスプリットワクチンの調整

リン酸緩衝生理食塩水に懸濁したH3N2型インフルエンザウイルス粒子 (X31株) もしくはH1N1型インフルエンザウイルス粒子 (A/Puerto Rico/8/34株) に、最終濃度が0.2%になるようTween80を添加し懸濁した。ジエチルエーテルを加えさらに懸濁し、水層とジエチルエーテル層が完全に分離するまで静置した後、ジエチルエーテル層を取り除いた。このエーテル抽出を繰り返した後、回収した水層に残存するジエチルエーテルを常圧で留去し、HAスプリットワクチンとした。

### [0027] 2. 酸性処理

HAスプリットワクチンをリン酸緩衝生理食塩水で懸濁後、酸性処理として0.15Mクエン酸緩衝液 (pH 3.5) を添加しpHを5.0にした。室温で30分静置した後、1M Tris緩衝液 (pH8.0)を加えて、pHを7.3に戻した。その後、遠心分離を行い、膜融合型HAスプリットワクチンとした。作製した膜融合型HAスプリットワクチンに、最終濃度0.05%になるようホルマリンを加えて数日静置した。

[0028] なお、現行HAスプリットワクチンの場合は、1.で調整したHAスプリットワクチンに対して酸性処理を施さない以外は上記と同様の処理を行った。

### [0029] 3. ELISA法によるLAH抗体価の測定

#### 3-1. H3N2型インフルエンザワクチンの接種

BALB/cマウス（♀、6～12週令）に、H3N2型の現行HAスプリットワクチン又は膜融合型HAスプリットワクチン（10  $\mu$ gワクチン + 20  $\mu$ g AddaVaxアジュバント（InvivoGen）をリン酸緩衝生理食塩水に溶解し、液量200  $\mu$ lにする）を腹腔内接種した。初回ワクチン接種28日後に、膜融合型HAワクチン（10  $\mu$ gワクチンのみをリン酸緩衝生理食塩水に溶解し、液量200  $\mu$ lにする）を腹腔内接種した。追加ワクチン接種から14日後以降に、ワクチンを接種したマウスより採血を行い、血清を回収した。

[0030] 3-2. ELISA法による測定

下記に示す手法により、ELISA法(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)にて、H3N2型の現行HAスプリットワクチン又は膜融合型HAスプリットワクチンを腹腔内接種したBALB/cマウスの血清中のLAH抗体濃度を測定した。

[0031] 即ち、ステム部分の一部（long alpha helix）に相当する合成ペプチド（H3; Ac-RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSMNKLFETRRLRENADYKDDDDKC）（配列番号1）を10  $\mu$ g/mlにてリン酸緩衝生理食塩水（pH 7.3）に溶解し、96ウェルプレートに100  $\mu$ lずつ添加した。4℃で一晩静置した後、リン酸緩衝生理食塩水にて各ウェルを3回洗浄し、1%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水を150  $\mu$ lずつ添加した。室温で2時間静置後、リン酸緩衝生理食塩水にて各ウェルを3回洗浄し、Tween20を0.05%と1%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝液にて段階希釈したマウス血清と、濃度既知の標準モノクローナル抗体（H3; クローン名V15-5）を各ウェルに100  $\mu$ lずつ添加した。室温で2時間静置後、リン酸緩衝生理食塩水（Tween20を0.05%含む）にて各ウェルを3回洗浄し、0.05%Tween20と1%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水にて希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体（Southern Biotech）を各ウェルに100  $\mu$ lずつ添加した。室温で2時間静置後、リン酸緩衝生理食塩水（Tween20を0.05%含む）にて各ウェルを3回洗浄し、基質としてクエン酸緩衝液（pH 5.0）60 mlにo-phenyldiamine tablet（シグマ）30 mgと24  $\mu$ lの30%過酸化水素水（30%w/w; シグマ）を加えたものを調整し、それを各ウェルに100  $\mu$ lずつ添加した。発色後50  $\mu$ lの2N硫酸（和光純

薬工業)で反応を止め、Microplate Reader 450型(Biorad)を用いて490 nmの吸光値を測定した。

[0032] 図2に示されるように、膜融合型HAスプリットワクチンを腹腔内接種したBALB/cマウスの血清中のLAH抗体価は、現行HAスプリットワクチンを腹腔内接種したBALB/cマウスの血清中のLAH抗体価よりも、有意に上昇していた。

[0033] 4. 抗原変異株に対する交差防御

H3N2型ウイルス感染防御実験では、ワクチン非接種マウス、又は、H3N2型の現行HAスプリットワクチン若しくは膜融合型HAスプリットワクチン接種後のマウスより回収した血清を、BALB/cマウス(♀、6~12週令)に200 µlずつ腹腔内投与した。

[0034] 血清投与から3時間後、ワクチン株とは抗原性の異なる別のH3N2型インフルエンザウイルス(A/Guizhou/54/89)を5マウス lethal dose<sub>50</sub> (50%のマウスに致死性感染をおこすウイルス量の5倍)にて麻酔下において経鼻投与することでウイルス感染を行った。

[0035] ウイルス感染から21日間、毎日マウスの体重測定及び観察を行い、体重の推移と生存率を調べた。25%の体重減少が認められたマウスが生じた場合は、安楽殺処分とした。

[0036] 図3に示されるように、膜融合型HAスプリットワクチンを接種したBALB/cマウスでは、抗原性の異なる別のH3N2型インフルエンザウイルス感染後9日目から有意に生存率低下を抑制できた。

[0037] 5. ELISA法によるLAH抗体価の測定

#### 5-1. H1N1型インフルエンザウイルス粒子

C57BL/6マウス(♀、6~12週令)に、H1N1型の現行HAスプリットワクチン又は膜融合型HAスプリットワクチン(10 µgワクチン + 10 µg CpG-ODN1760をリン酸緩衝生理食塩水に懸濁し、等量のFreund's incomplete adjuvant (ROCKLAND)と混合して液量200 µlにする)を腹腔内接種した。初回ワクチン接種28日後に、膜融合型HAスプリットワクチン(初回ワクチン接種と同様に、10 µgワクチン + 10 µg CpG-ODNをリン酸緩衝生理食塩水に懸濁し、等量

のFreund' s incomplete adjuvant (ROCKLAND) と混合して液量200  $\mu$ lにする) を腹腔内接種した。追加ワクチン接種から14日後以降に、ワクチンを接種したマウスより採血を行い、血清を回収した。

[0038] 5-2. ELISA法による測定

下記に示す手法により、ELISA法にて、H1N1型の現行HAスプリットワクチン又は膜融合型HAスプリットワクチンを腹腔内接種したC57BL/6マウスの血清中のLAH抗体濃度を測定した。

[0039] ステム部分の一部 (long alpha helix) に相当する合成ペプチド (H1; Ac-RIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLNERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNADYKDDDDKC) (配列番号2) を使用し、濃度既知の標準モノクローナル抗体 (H1; クローン名F2) を使用した以外は、上記と同様の手法を用いた。

[0040] 図4に示されるように、膜融合型HAスプリットワクチンを腹腔内接種したC57BL/6マウスの血清中のLAH抗体価は、現行HAスプリットワクチンを腹腔内接種したC57BL/6マウスの血清中のLAH抗体価よりも、有意に上昇していた。

[0041] 6. 抗原変異株に対する交差防御

H1N1型ウイルス感染防御実験では、ワクチン非接種マウス、又は、H1N1型の現行HAスプリットワクチン若しくは膜融合型HAスプリットワクチン接種後のマウスより回収した血清を、C57BL/6マウス (♀、6~12週令) に200  $\mu$ lずつ腹腔内投与した。

[0042] 血清投与から3時間後、ワクチン株とは抗原性の異なる別のH1N1型インフルエンザウイルス (A/Narita/1/09) を5マウス lethal dose50 (50%のマウスに致死性感染をおこすウイルス量の5倍) にて麻酔下において経鼻投与することでウイルス感染を行った。

[0043] ウイルス感染から20日間、毎日マウスの観察を行い、生存率を調べた。図5に示されるように、膜融合型HAスプリットワクチンを接種したC57BL/6マウスでは、抗原性の異なる別のH1N1型インフルエンザウイルス感染後9日目から有意に生存率低下を抑制できた。

[0044] 7. LAH epitopeに対する抗体結合性

ELISA法(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)により、X31株を感染させたマウスもしくはヒト末梢血より作製したLAH結合性モノクローナル抗体の、現行HAスプリットワクチンまたは膜融合型HAスプリットワクチンに対する結合を測定した。H3N2型インフルエンザウイルス(X31株)の現行HAスプリットワクチンまたは膜融合型HAスプリットワクチンをリン酸緩衝生理食塩水(pH 7.3)に溶解し、96ウェルプレートに50  $\mu$ lずつ添加した。4℃で一晩静置した後、リン酸緩衝生理食塩水にて各ウェルを3回洗浄し、1%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水を150  $\mu$ lずつ添加した。室温で2時間静置後、リン酸緩衝生理食塩水(Tween20を0.05%含む)にて各ウェルを3回洗浄し、1%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝液にて段階希釈したLAH結合性のモノクローナル抗体を50  $\mu$ lずつ添加した。4℃で一晩静置した後、リン酸緩衝生理食塩水(Tween20を0.05%含む)にて各ウェルを3回洗浄し、0.05%Tween20と1%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水にて希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(Southern Biotech)を各ウェルに100  $\mu$ lずつ添加した。室温で2時間静置後、リン酸緩衝生理食塩水(Tween20を0.05%含む)にて各ウェルを3回洗浄し、基質としてクエン酸緩衝液(pH 5.0) 60 mlにo-phenyldiamine tablet (シグマ) 30 mgと24  $\mu$ lの30%過酸化水素水(30%w/w; シグマ)を加えたものを調製し、それを各ウェルに50  $\mu$ lずつ添加した。発色後25  $\mu$ lの1 mol/L硫酸(和光純薬工業)で反応を止め、Microplate Reader 450型(Biorad)を用いて490 nmの吸光値を測定した。測定した現行HAスプリットワクチンまたは膜融合型HAスプリットワクチンに対するそれぞれの吸光値より、結合性の変化を算出した。

[0045] 図6に示されるように、LAH結合性モノクローナル抗体が膜融合型HAスプリットワクチンに対して現行HAスプリットワクチンよりも1.05~21倍強く結合した。これらの結果は、HAスプリットワクチンの酸性処理により、LAH epitopeに対する抗体結合性が亢進することを示すものである。

### 産業上の利用可能性

[0046] インフルエンザワクチンの製造に利用できる。

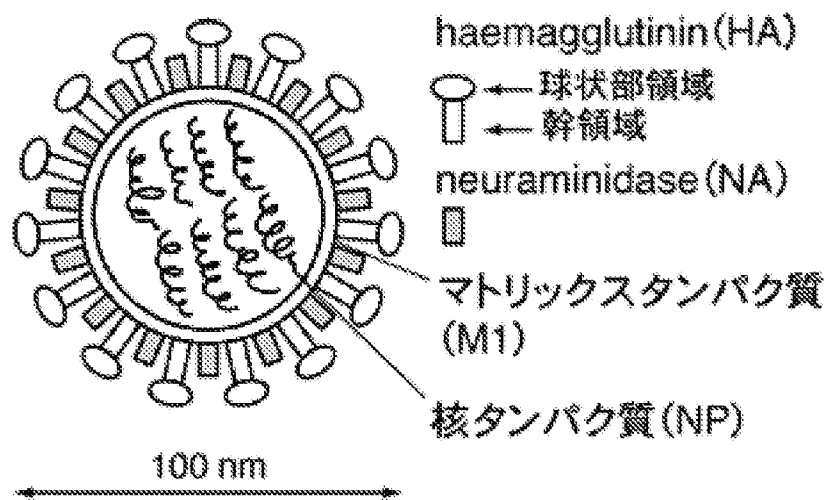
## 配列表フリーテキスト

[0047] 配列番号 1、2 : 合成ペプチド

### 請求の範囲

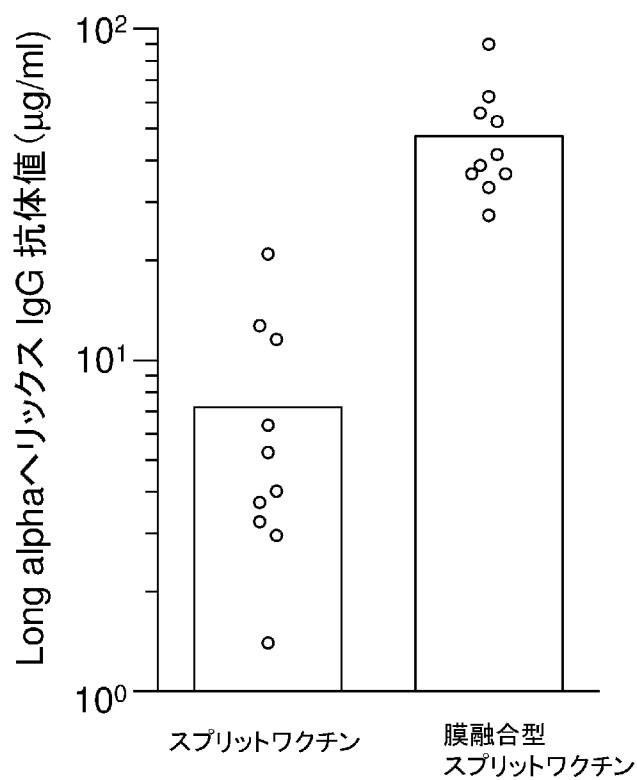
- [請求項1]           インフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施すことにより、HA幹領域のLAHに結合する抗体を産生する、抗原変異インフルエンザウイルスに対するインフルエンザHAスプリットワクチンの製造方法。
- [請求項2]           前記酸性処理はpH4.4～5.8にて処理を行うことを特徴とする請求項1記載のインフルエンザHAスプリットワクチンの製造方法。
- [請求項3]           前記インフルエンザHAスプリットワクチンはH3N2型又はH1N1型であることを特徴とする  
請求項1又は2に記載のインフルエンザHAスプリットワクチンの製造方法。
- [請求項4]           インフルエンザHAスプリットワクチンに酸性処理を施すことにより製造される、HA幹領域のLAHに結合する抗体を産生する、抗原変異インフルエンザウイルスに対するインフルエンザHAスプリットワクチン。

[図1]

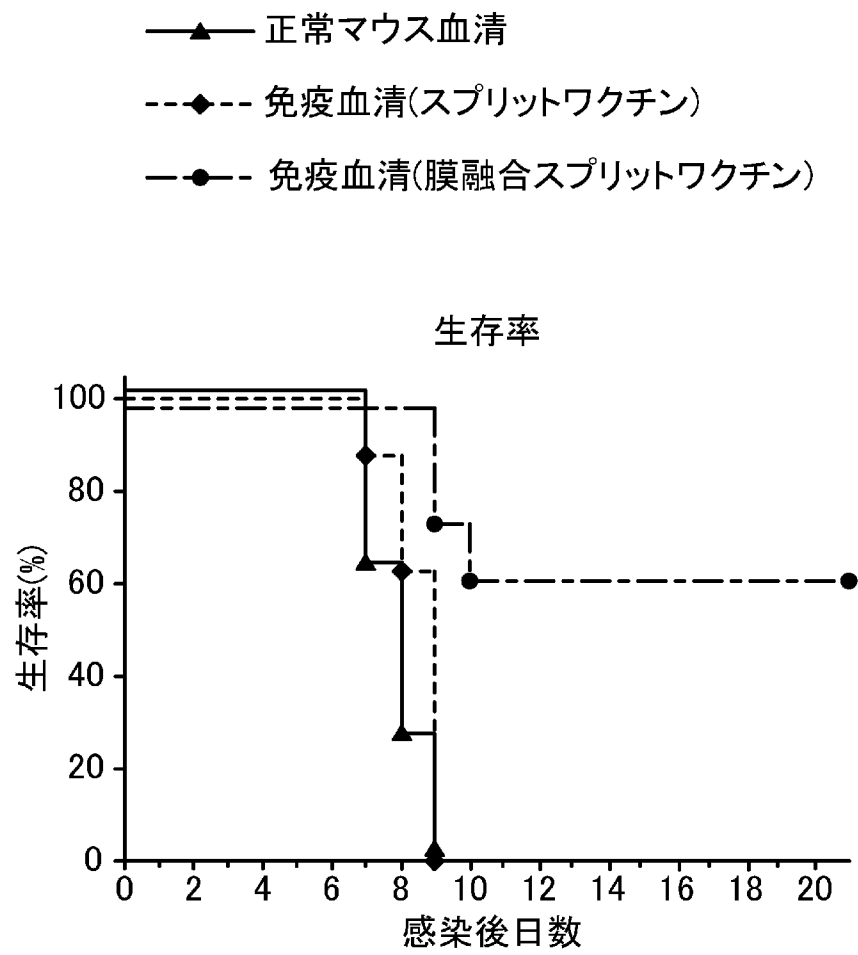


[図2]

## Long alphaヘリックスIgG抗体価

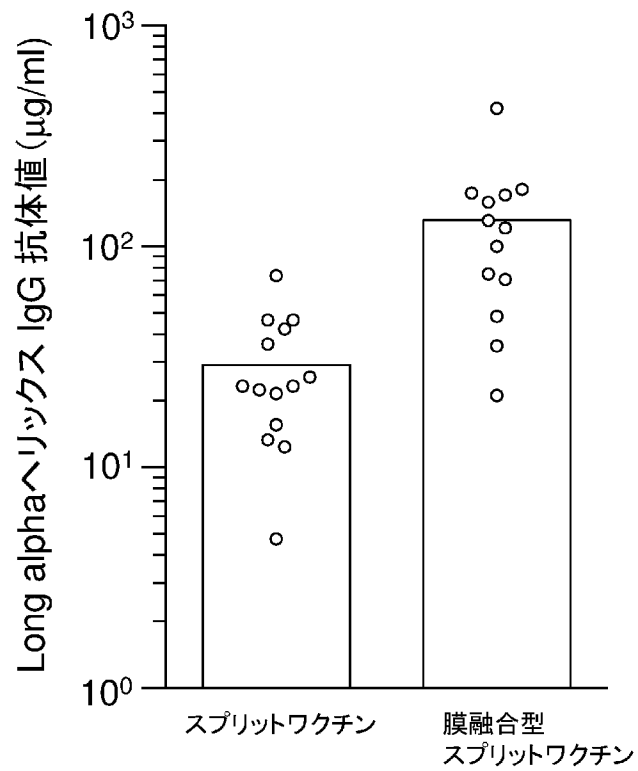


[図3]

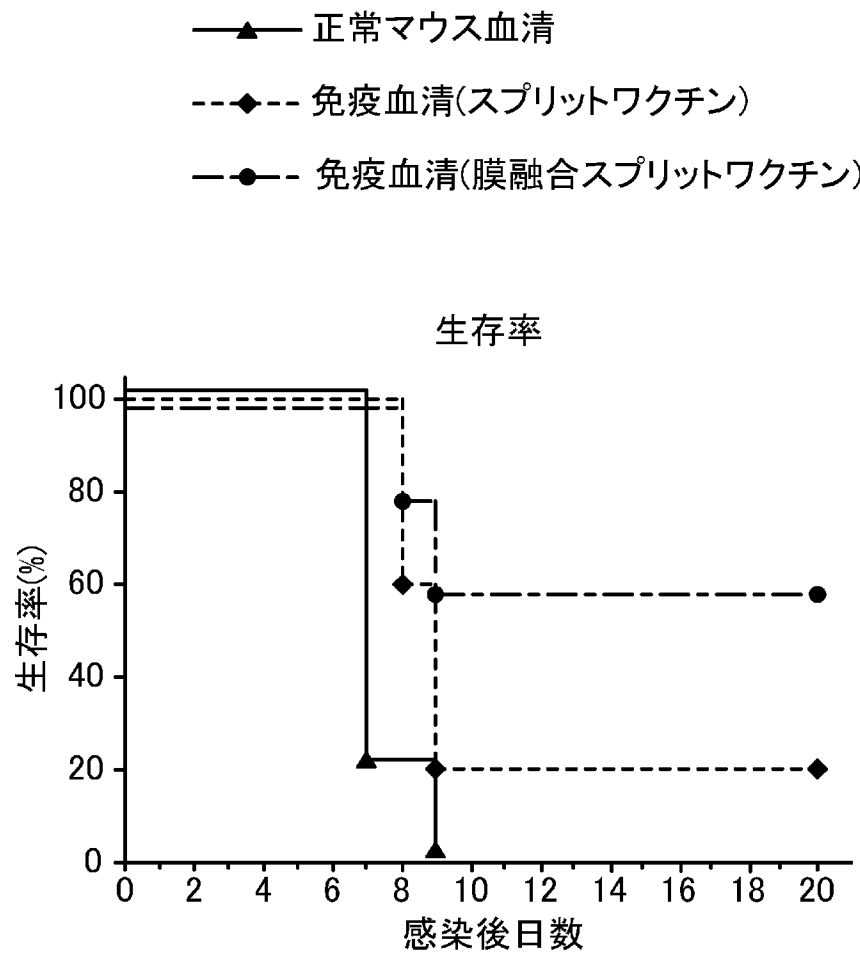


[図4]

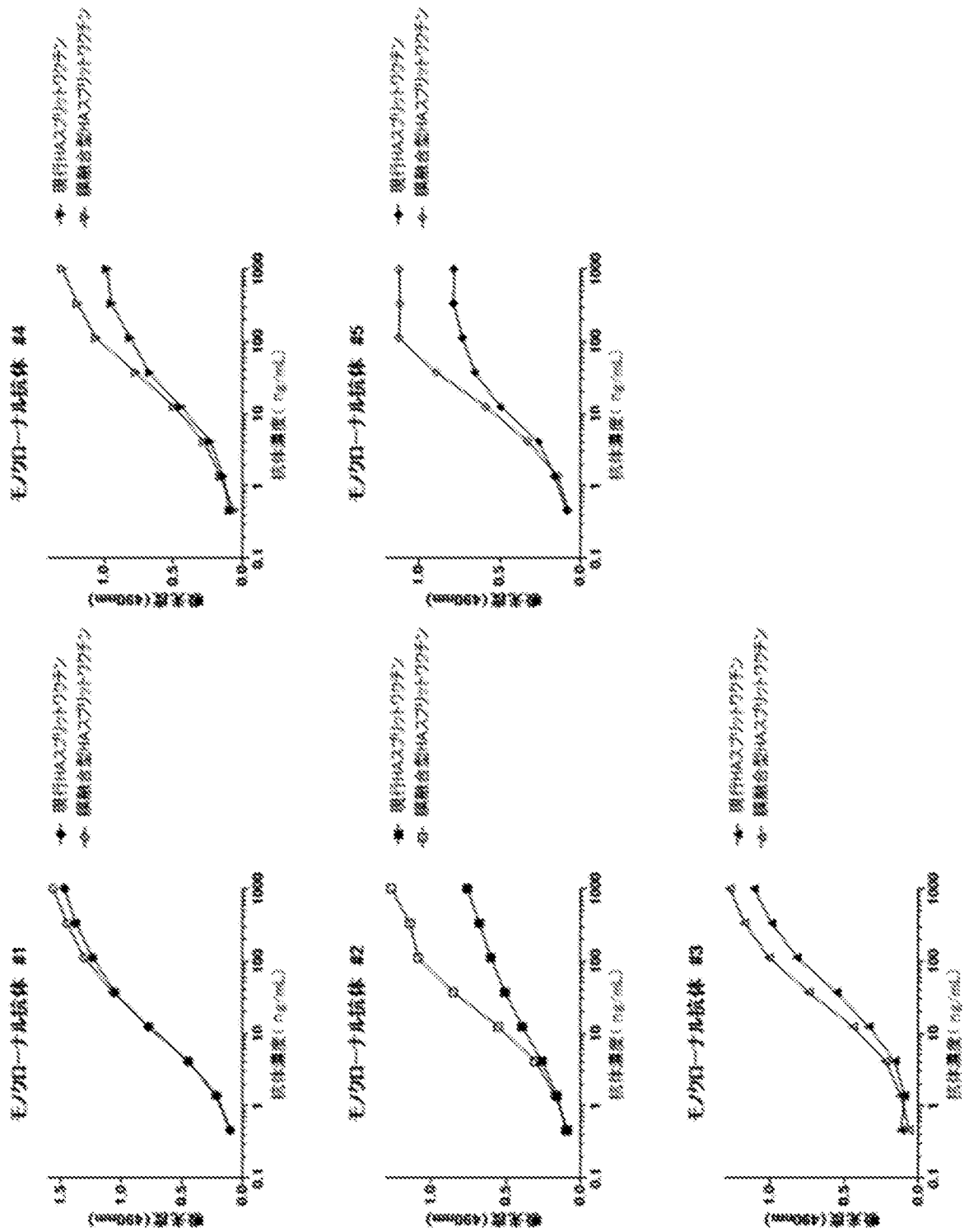
## Long alphaヘリックスIgG抗体価



[図5]



[図6]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/032537

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. A61K39/145 (2006.01) i, C07K14/11 (2006.01) i, C12N15/44 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. A61K39/145, C07K14/11, C12N15/44

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                                                          |           |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| Published examined utility model applications of Japan   | 1922-1996 |
| Published unexamined utility model applications of Japan | 1971-2018 |
| Registered utility model specifications of Japan         | 1996-2018 |
| Published registered utility model applications of Japan | 1994-2018 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)  
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                      | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | JP 2014-513680 A (BAXTER INTERNATIONAL INC.) 05<br>June 2014 & US 2012/0270255 A1 & WO 2012/145386 A1<br>& EP 2699586 A1 & AU 2012245557 A & CA 2831974 A &<br>CN 103502263 A & SG 194033 A & KR 10-2014-0011338<br>A & RU 2013150802 A | 1-4                   |
| A         | DOMS, R. W. et al., "Quaternary structure of<br>influenza virus hemagglutinin after acid<br>treatment", Journal of Virology, December 1986,<br>vol. 60, no. 3, pp. 833-839                                                              | 1-4                   |
| A         | BYRD, L. L. et al., "Influenza Hemagglutinin(HA)<br>Stem Region Mutations That Stabilize or<br>Destabilize the Structure of Multiple HA<br>Subtypes", Journal of Virology, April 2015, vol.<br>89, no. 8, pp. 4504-4516                 | 1-4                   |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
31 October 2018 (31.10.2018)

Date of mailing of the international search report  
20 November 2018 (20.11.2018)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2018/032537

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                   | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | WO 2016/028776 A1 (SANOFI PASTEUR BIOLOGICS LLC)<br>25 February 2016 & JP 2017-525766 A & US<br>2016/0045590 A1 & US 2016/0045590 A1 & EP 3182998<br>A1 & AU 2015305690 A & CA 2957570 A & KR 10-2017-<br>0042605 A & CN 106794241 A | 1-4                   |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K39/145(2006.01)i, C07K14/11(2006.01)i, C12N15/44(2006.01)i

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K39/145, C07K14/11, C12N15/44

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |            |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報   | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2018年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2018年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2018年 |

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)  
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                    | 関連する<br>請求項の番号 |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| A               | JP 2014-513680 A (バクスター・インターナショナル・インコーポレイテッド) 2014.06.05,<br>& US 2012/0270255 A1 & WO 2012/145386 A1 & EP 2699586 A1<br>& AU 2012245557 A & CA 2831974 A & CN 103502263 A<br>& SG 194033 A & KR 10-2014-0011338 A & RU 2013150802 A | 1-4            |
| A               | DOMS R.W. et al., Quaternary structure of influenza virus hemagglutinin after acid treatment, Journal of Virology, 1986.12, vol.60, no.3, p.833-839                                                                                  | 1-4            |

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- |                                                                |                                                                     |
|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの                                 | 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの     |
| 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの                         | 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの                     |
| 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) | 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの |
| 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                                      | 「&」 同一パテントファミリー文献                                                   |
| 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願                                   |                                                                     |

国際調査を完了した日

31.10.2018

国際調査報告の発送日

20.11.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

天野 貴子

4 U

9444

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                             |                |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                           | 関連する<br>請求項の番号 |
| A                     | BYRD L.L. et al., Influenza Hemagglutinin (HA) Stem Region Mutations That Stabilize or Destabilize the Structure of Multiple HA Subtypes, Journal of Virology, 2015.04, vol.89, no. 8, p. 4504-4516                         | 1-4            |
| A                     | WO 2016/028776 A1 (SANOFI PASTEUR BIOLOGICS LLC) 2016.02.25,<br>& JP 2017-525766 A & US 2016/0045590 A1 & US 2016/0045590 A1<br>& EP 3182998 A1 & AU 2015305690 A & CA 2957570 A<br>& KR 10-2017-0042605 A & CN 106794241 A | 1-4            |