



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103874507 A

(43) 申请公布日 2014. 06. 18

(21) 申请号 201280043691. 2

(22) 申请日 2012. 07. 11

(30) 优先权数据

61/506, 447 2011. 07. 11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 03. 07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/046222 2012. 07. 11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/009849 EN 2013. 01. 17

(71) 申请人 武田疫苗股份有限公司

地址 美国蒙大拿州

(72) 发明人 C. 理查德森 R. F. 巴加特兹

P. M. 门德尔曼

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张红春

(51) Int. Cl.

A61K 39/125 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书39页

序列表2页 附图12页

(54) 发明名称

胃肠外诺如病毒疫苗配制剂

(57) 摘要

本发明涉及包含单价诺如病毒病毒样颗粒混合物的单剂胃肠外疫苗组合物。还公开了通过施用此类组合物在人受试者中赋予针对诺如病毒感染的保护性免疫的方法。

1. 一种在人中引发针对诺如病毒 (Norovirus) 的保护性免疫的方法,其包括对所述人胃肠外施用不超过单剂疫苗组合物,所述组合物包含原型基因小组 I 诺如病毒病毒样颗粒 (VLP),其中与施用所述组合物前所述人中的滴度相比,所述组合物至少诱导诺如病毒特异性血清抗体滴度的 3 倍升高,且其中所述原型基因小组 I 诺如病毒 VLP 包含自原型基因小组 I 病毒株衍生的衣壳蛋白。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述组合物包含不超过 150 μ g 所述原型基因小组 I 诺如病毒 VLP。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述组合物包含不超过 50 μ g 所述原型基因小组 I 诺如病毒 VLP。

4. 权利要求 1 的方法,其中所述组合物包含不超过 25 μ g 所述原型基因小组 I 诺如病毒 VLP。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述组合物包含不超过 15 μ g 所述原型基因小组 I 诺如病毒 VLP。

6. 权利要求 1 的方法,其中与施用所述组合物前所述人中的滴度相比,所述组合物至少诱导诺如病毒特异性血清抗体滴度的 6 倍升高。

7. 权利要求 1 的方法,其中所述诺如病毒 VLP 是单价 VLP 或多价 VLP。

8. 权利要求 1 的方法,其中所述组合物进一步包含原型基因小组 II 诺如病毒 VLP,所述原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 包含自原型基因小组 II 病毒株衍生的衣壳蛋白。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述组合物包含不超过 150 μ g 原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。

10. 权利要求 8 的方法,其中所述组合物包含不超过 50 μ g 原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。

11. 权利要求 8 的方法,其中所述组合物包含不超过 25 μ g 原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。

12. 权利要求 8 的方法,其中所述组合物包含不超过 15 μ g 原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。

13. 权利要求 8 的方法,其中所述原型基因小组 I 诺如病毒 VLP 是诺沃克 (Norwalk) 病毒 VLP,且所述原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 是自表达原型基因小组 II 诺如病毒的共有序列生成的 VLP。

14. 一种在人中引发针对诺如病毒的保护性免疫的方法,其包括对所述人胃肠外施用不超过单剂疫苗组合物,所述组合物包含原型基因小组 II 诺如病毒病毒样颗粒 (VLP),其中与施用所述组合物前所述人中的滴度相比,所述组合物至少诱导诺如病毒特异性血清抗体滴度的 3 倍升高,且其中所述原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 包含自原型基因小组 II 病毒株衍生的衣壳蛋白。

15. 权利要求 14 的方法,其中所述组合物包含不超过 150 μ g 所述原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。

16. 权利要求 14 的方法,其中所述组合物包含不超过 50 μ g 所述原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。

17. 权利要求 14 的方法,其中所述组合物包含不超过 25 μ g 所述原型基因小组 II 诺如

病毒 VLP。

18. 权利要求 14 的方法,其中所述组合物包含不超过 15 μ g 所述原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。

19. 权利要求 14 的方法,其中所述原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 包含自原型基因小组 II,基因型 4 病毒株衍生的衣壳蛋白。

20. 权利要求 14 的方法,其中与施用所述组合物前所述人中的滴度相比,所述组合物至少诱导诺如病毒特异性血清抗体滴度的 6 倍升高。

21. 权利要求 14 的方法,其中所述诺如病毒 VLP 是单价 VLP 或多价 VLP。

22. 权利要求 14 的方法,其中所述组合物进一步包含原型基因小组 I 诺如病毒 VLP,所述原型基因小组 I 诺如病毒 VLP 包含自原型基因小组 I 病毒株衍生的衣壳蛋白。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述组合物包含不超过 150 μ g 原型基因小组 I 诺如病毒 VLP。

24. 权利要求 22 的方法,其中所述组合物包含不超过 50 μ g 原型基因小组 I 诺如病毒 VLP。

25. 权利要求 22 的方法,其中所述组合物包含不超过 25 μ g 原型基因小组 I 诺如病毒 VLP。

26. 权利要求 22 的方法,其中所述组合物包含不超过 15 μ g 原型基因小组 I 诺如病毒 VLP。

27. 权利要求 14 的方法,其中所述原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 是自表达原型基因小组 II 诺如病毒的共有序列生成的 VLP。

28. 权利要求 1 至 27 中任一项的方法,其中所述组合物进一步包含至少一种佐剂。

29. 权利要求 28 的方法,其中所述至少一种佐剂是 Toll 样受体激动剂。

30. 权利要求 1 至 27 中任一项的方法,其中所述组合物进一步包含两种佐剂。

31. 权利要求 30 的方法,其中所述两种佐剂是单磷酸脂质 A 和氢氧化铝。

32. 权利要求 1 至 31 中任一项的方法,其中所述组合物进一步包含缓冲剂。

33. 权利要求 32 的方法,其中所述缓冲剂选自下组:L-组氨酸、咪唑、琥珀酸、Tris、和柠檬酸。

34. 权利要求 1 至 33 中任一项的方法,其中通过静脉内、皮下、皮内、或肌肉内施用路径对所述人施用所述疫苗组合物。

35. 权利要求 34 的方法,其中通过肌肉内施用路径对所述人施用所述疫苗组合物。

36. 权利要求 1 至 35 中任一项的方法,其中所述疫苗组合物配制为液体。

37. 权利要求 1 至 35 中任一项的方法,其中在施用所述单剂组合物的 7 天内诱导诺如病毒特异性抗体滴度的升高。

38. 权利要求 1 至 35 中任一项的方法,其中所述疫苗组合物赋予保护免于诺如病毒感染的一种或多种症状。

胃肠外诺如病毒疫苗配制剂

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2011 年 7 月 11 日提交的美国临时专利申请 61/506, 447 的优先权, 其全部内容通过提及并入本文。

发明领域

[0003] 本发明属于疫苗, 特别是诺如病毒疫苗领域。另外, 本发明涉及制备疫苗组合物的方法及诱导和评估人中针对诺如病毒的保护性免疫应答的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 诺如病毒是不可培养的人类杯状病毒, 已经成为非细菌性胃肠炎的流行性爆发的单一最重要起因 (Glass 等, 2000; Hardy 等, 1999)。在灵敏的分子诊断测定法的开发之前, 对诺如病毒的临床意义的重视不够。原型基因小组 I (genogroup I) 诺沃克病毒 (NV) 基因组的克隆和自重组杆状病毒表达系统生成病毒样颗粒 (VLP) 引起了测定法的开发, 其揭示了分布广泛的诺如病毒感染 (Jiang 等 1990; 1992)。

[0006] 诺如病毒是单链、正义 RNA 病毒, 含有不分段的 RNA 基因组。病毒基因组编码三个可读框, 其中后两个分别规定主要衣壳蛋白和次要结构蛋白的生成 (Glass 等 2000)。当在真核表达系统中以高水平表达时, NV 和某些其它诺如病毒的衣壳蛋白自组装成在结构上模拟天然诺如病毒病毒体 (virion) 的 VLP。当通过透射电子显微术观看时, VLP 在形态上与自人粪样品分离的感染性病毒体不可区分。

[0007] 针对诺如病毒的免疫应答是复杂的, 而且现在正在阐明保护的关联 (correlate)。用天然病毒实施的人志愿者研究证明了粘膜衍生的记忆免疫应答提供免于感染的短期保护并提示疫苗介导的保护是可行的 (Lindesmith 等 2003; Parrino 等 1997; Wyatt 等, 1974)。

[0008] 虽然由于 VLP 的可得性和它们被大量生成的能力, 诺如病毒不能在体外培养, 但是在定义诺如病毒衣壳的抗原拓扑学和结构拓扑学方面已经取得了可观的进步。VLP 保留病毒衣壳蛋白的真实构象 (authentic confirmation), 但是缺乏感染性遗传物质。结果, VLP 模拟病毒与细胞受体的功能相互作用, 由此引发适宜的宿主免疫应答, 但是缺乏繁殖或引起感染的能力。与 NIH 联合, 贝勒医学院 (Baylor College of Medicine) 在学术性的、调查人发起的 I 期临床试验中研究了人志愿者中针对 NV VLP 的体液、粘膜和细胞免疫应答。口服施用 VLP 在健康成人中是安全的且有免疫原性的 (Ball 等 1999; Tacket 等 2003)。但是, 需要相对大量的多剂 VLP 以观察免疫应答。在其它学术中心, 在动物模型中进行的临床前实验已经证明了当与细菌外毒素佐剂一起鼻内施用针对 VLP 的免疫应答的增强 (Guerrero 等 2001; Nicollier-Jamot 等 2004; Periwai 等 2003; Souza 等 (2007) Vaccine Vol. 25 (50):8448-59)。然而, 人中针对诺如病毒的保护性免疫仍然难以捉摸, 因为人中保护性免疫应答的指标仍然尚未清楚鉴定 (Herbst-Kralovetz 等 (2010) Expert Rev. Vaccines 9 (3), 299 - 307)。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明部分基于如下的发现,即单剂诺如病毒疫苗在胃肠外施用时在人中引发快速的、强力的针对诺如病毒的保护性免疫应答。因而,本发明提供了一种在人群中引发针对诺如病毒的保护性免疫的方法,其包括对所述人胃肠外施用不超过单剂疫苗组合物,所述组合物包含原型基因小组 I 和 / 或原型基因小组 II 诺如病毒 VLP,其中与施用所述组合物前所述人中的滴度相比,所述组合物至少诱导诺如病毒特异性血清抗体滴度的 3 倍升高。在某些实施方案中,在施用所述单剂组合物的 7 天内诱导诺如病毒特异性抗体滴度的升高。在一些实施方案中,经由静脉内、皮下、皮内、或肌肉内施用路径对所述人施用所述疫苗组合物。在一个实施方案中,通过肌肉内施用路径对所述人施用所述疫苗组合物。

[0011] 单剂疫苗组合物可以包含约 5 μ g 至约 150 μ g 剂量的原型基因小组 I 诺如病毒 VLP、原型基因小组 II 诺如病毒 VLP、或这两者。在单剂疫苗组合物包含原型基因小组 I 和原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 两者的实施方案中,每种 VLP 的剂量可以是相同的或不同的。在一个实施方案中,组合物包含不超过 50 μ g 原型基因小组 I 诺如病毒 VLP。在另一个实施方案中,组合物包含不超过 25 μ g 原型基因小组 I 诺如病毒 VLP。在又一个实施方案中,组合物包含不超过 150 μ g 原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。在又一个实施方案中,组合物包含不超过 50 μ g 原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。诺如病毒 VLP 可以是单价 VLP 或多价 VLP。

[0012] 在本发明的一些方面,疫苗组合物中的原型基因小组 I 诺如病毒 VLP 包含自原型基因小组 I 病毒株衍生的衣壳蛋白。在一个实施方案中,原型基因小组 I 诺如病毒 VLP 包含自原型基因小组 I,基因型 1 诺如病毒衍生的衣壳蛋白。在另一个实施方案中,原型基因小组 I 诺如病毒 VLP 包含来自诺沃克病毒的衣壳蛋白。在本发明的其它方面,疫苗组合物中的原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 包含自原型基因小组 II 病毒株衍生的衣壳蛋白。在一些实施方案中,原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 包含来自原型基因小组 II,基因型 4 诺如病毒的衣壳蛋白。在某些实施方案中,原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 是自表达原型基因小组 II 诺如病毒共有序列生成的 VLP。在一个具体的实施方案中,原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 包含具有序列 SEQ ID NO:1 的衣壳蛋白。

[0013] 在某些实施方案中,疫苗组合物进一步包含至少一种佐剂。优选地,佐剂不是细菌外毒素佐剂。在一个实施方案中,佐剂是 toll 样受体激动剂,诸如单磷酸脂质 A (MPL)、鞭毛蛋白、或 CpG。在另一个实施方案中,佐剂是氢氧化铝(例如明矾)。在某些实施方案中,疫苗组合物包含两种佐剂,诸如 MPL 和氢氧化铝。在一些实施方案中,疫苗组合物可以进一步包含缓冲剂,诸如 L- 组氨酸、咪唑、琥珀酸、Tris、和柠檬酸。疫苗组合物可以配制为干粉末或液体。在一个实施方案中,疫苗组合物配制为液体(例如水性配制剂)。

[0014] 附图简述

[0015] 图 1 :泛 ELISA 测定法的结果,所述泛 ELISA 测定法测量来自用安慰剂(盐水)或含有 5, 15, 50, 或 150 μ g 原型基因小组 I. 1 诺如病毒 VLP 和原型基因小组 II. 4 诺如病毒 VLP 之每种的疫苗配制剂肌肉内免疫的人志愿者的组合血清 IgG, IgA, 和 IgM 水平。在第一次免疫后 7 和 21 天时及第二次免疫后 7 和 28 天时对每个剂量水平显示抗 GI. 1 (A) 和抗 GII. 4 (B) 抗体的几何均值滴度。志愿者在研究第 0 天和第 28 天接受免疫。

[0016] 图 2 :泛 ELISA 测定法的结果,所述泛 ELISA 测定法测量来自用安慰剂(盐水)或含有 5, 15, 50, 或 150 μ g 原型基因小组 I. 1 诺如病毒 VLP 和原型基因小组 II. 4 诺如病毒 VLP 之每种的疫苗配制剂肌肉内免疫的人志愿者的组合的血清 IgG, IgA, 和 IgM 水平。在第一

次免疫后 7 和 21 天时及第二次免疫后 7 和 28 天时对每个剂量水平显示抗 GI. 1(A) 和抗 GII. 4(B) 抗体的几何均值倍数升高。志愿者在研究第 0 天和第 28 天接受免疫。

[0017] 图 3:泛 ELISA 测定法的结果,所述泛 ELISA 测定法测量来自用安慰剂(盐水)或含有 5, 15, 50, 或 150 μ g 原型基因小组 I. 1 诺如病毒 VLP 和原型基因小组 II. 4 诺如病毒 VLP 之每种的疫苗配制剂肌肉内免疫的人志愿者的组合的血清 IgG, IgA, 和 IgM 水平。在第一次免疫后 7 和 21 天时及第二次免疫后 7 和 28 天时对每个剂量水平显示抗 GI. 1(A) 和抗 GII. 4(B) 抗体的百分比血清响应率(即,与免疫前滴度相比抗体滴度的 4 倍升高)。志愿者在研究第 0 天和第 28 天接受免疫。

[0018] 图 4:ELISA 测定法的结果,所述 ELISA 测定法测量来自用安慰剂(盐水)或含有 5, 15, 或 50 μ g 原型基因小组 I. 1 诺如病毒 VLP 和原型基因小组 II. 4 诺如病毒 VLP 之每种的疫苗配制剂肌肉内免疫的人志愿者的血清 IgA。在第一次免疫后 7 和 21 天时及第二次免疫后 7 和 28 天时对每个剂量水平显示抗 GI. 1(A) 和抗 GII. 4(B) 抗体的几何均值滴度。志愿者在研究第 0 天和第 28 天接受免疫。

[0019] 图 5:ELISA 测定法的结果,所述 ELISA 测定法测量来自用安慰剂(盐水)或含有 5, 15, 或 50 μ g 原型基因小组 I. 1 诺如病毒 VLP 和原型基因小组 II. 4 诺如病毒 VLP 之每种的疫苗配制剂肌肉内免疫的人志愿者的血清 IgA。在第一次免疫后 7 和 21 天时及第二次免疫后 7 和 28 天时对每个剂量水平显示抗 GI. 1(A) 和抗 GII. 4(B) 抗体的几何均值倍数增加。志愿者在研究第 0 天和第 28 天接受免疫。

[0020] 图 6:ELISA 测定法的结果,所述 ELISA 测定法测量来自用安慰剂(盐水)或含有 5, 15, 或 50 μ g 原型基因小组 I. 1 诺如病毒 VLP 和原型基因小组 II. 4 诺如病毒 VLP 之每种的疫苗配制剂肌肉内免疫的人志愿者的血清 IgA。在第一次免疫后 7 和 21 天时及第二次免疫后 7 和 28 天时对每个剂量水平显示抗 GI. 1(A) 和抗 GII. 4(B) 抗体的百分比血清响应率(即,与免疫前滴度相比抗体滴度的 4 倍升高)。志愿者在研究第 0 天和第 28 天接受免疫。志愿者在研究第 0 天和第 28 天接受免疫。

[0021] 图 7:ELISA 测定法的结果,所述 ELISA 测定法测量来自用安慰剂(盐水)或含有 5, 15, 或 50 μ g 原型基因小组 I. 1 诺如病毒 VLP 和原型基因小组 II. 4 诺如病毒 VLP 之每种的疫苗配制剂肌肉内免疫的人志愿者的血清 IgG。在第一次免疫后 7 和 21 天时及第二次免疫后 7 和 28 天时对每个剂量水平显示抗 GI. 1(A) 和抗 GII. 4(B) 抗体的几何均值滴度。志愿者在研究第 0 天和第 28 天接受免疫。

[0022] 图 8:ELISA 测定法的结果,所述 ELISA 测定法测量来自用安慰剂(盐水)或含有 5, 15, 或 50 μ g 原型基因小组 I. 1 诺如病毒 VLP 和原型基因小组 II. 4 诺如病毒 VLP 之每种的疫苗配制剂肌肉内免疫的人志愿者的血清 IgG。在第一次免疫后 7 和 21 天时及第二次免疫后 7 和 28 天时对每个剂量水平显示抗 GI. 1(A) 和抗 GII. 4(B) 抗体的几何均值倍数增加。志愿者在研究第 0 天和第 28 天接受免疫。

[0023] 图 9:ELISA 测定法的结果,所述 ELISA 测定法测量来自用安慰剂(盐水)或含有 5, 15, 或 50 μ g 原型基因小组 I. 1 诺如病毒 VLP 和原型基因小组 II. 4 诺如病毒 VLP 之每种的疫苗配制剂肌肉内免疫的人志愿者的血清 IgG。在第一次免疫后 7 和 21 天时及第二次免疫后 7 和 28 天时对每个剂量水平显示抗 GI. 1(A) 和抗 GII. 4(B) 抗体的百分比血清响应率(即,与免疫前滴度相比抗体滴度的 4 倍升高)。志愿者在研究第 0 天和第 28 天接受免疫。

志愿者在研究第 0 天和第 28 天接受免疫。

[0024] 图 10:泛 ELISA 测定法的结果,所述泛 ELISA 测定法测量来自在指定的时间点时用如 El Kamary 等 (2010) *J Infect Dis*, Vol. 202(11):1649-1658 中描述的鼻内单价诺如病毒疫苗 (LV01-103 组) 或如实施例 1 中描述的肌肉内二价诺如病毒疫苗 (LV03-104 组) 免疫的人志愿者的组合的血清 IgG, IgA, 和 IgM 水平。人志愿者接受安慰剂或两剂肌肉内或鼻内疫苗配制剂。肌肉内二价诺如病毒疫苗含有 5 μ g 原型基因小组 I. 1 诺如病毒 VLP 和原型基因小组 II. 4 诺如病毒 VLP 之每种。鼻内单价疫苗含有 100 μ g 原型基因小组 I. 1 诺如病毒。在第二次免疫后用活的诺如病毒攻击接受鼻内疫苗或安慰剂的志愿者。

[0025] 图 11:对在用 5 μ g 剂量的肌肉内二价诺如病毒疫苗 (A) 或安慰剂 (B) 免疫前第 0 天和免疫后第 7 天自人志愿者获得的外周血单个核细胞的 FACS 分析。CD19+PBMC 是粘膜靶向的,如 α 4/ β 7 归巢受体和趋化因子 CCR10 受体表达证明的。

[0026] 发明详述

[0027] 本发明涉及在受试者中引发针对诺如病毒感染的保护性免疫的方法。具体而言,本发明提供了在人中引发针对诺如病毒的保护性免疫的方法,其通过对人胃肠外施用不超过单剂包含诺如病毒 VLP 和任选地至少一种佐剂的疫苗,其中疫苗赋予保护免于或改善诺如病毒感染的至少一种症状。令人惊讶地,发明人已经发现了对人肌肉内施用不超过单剂包含诺如病毒 VLP 的疫苗组合物诱导快速的(即在免疫的 7 天内)血清血清转化(即高于疫苗接种前水平的抗原特异性血清抗体滴度的至少三倍升高),其指示针对诺如病毒感染和疾病的保护性免疫应答。由此单剂疫苗组合物诱导的免疫应答在与攻击研究中通过施用活病毒在天然感染的情况中观察到的抗体滴度相似的高抗体滴度达到稳定水平。令人感兴趣地,加强剂量的疫苗是不需要的,因为免疫应答在进一步施用额外的疫苗剂量后没有升高。

[0028] 本发明提供了包含一种或多种诺如病毒抗原的疫苗组合物。“诺如病毒”、“诺如病毒 (NOR)”及本文中的语法等同物指杯状病毒科 (Caliciviridae) 的诺如病毒属的成员。在一些实施方案中,诺如病毒可包括一组相关的、正义单链 RNA、无包被病毒,其对于人类或非人哺乳类物种可以是感染性的。在一些实施方案中,诺如病毒能在人类中引起急性胃肠炎。诺如病毒也可称作小圆结构病毒 (SRSV),当通过电子显微术观看时,其具有限定的表面结构或粗糙的边缘。

[0029] 诺如病毒内包括至少 5 种原型基因小组 (GI, GII, GIII, GIV, 和 GV)。GI, GII, 和 GIV 诺如病毒在人中是感染性的,而 GIII 诺如病毒主要感染牛物种。最近已经从小鼠分离出 GV (Zheng 等 (2006) *Virology*, Vol. 346:312-323)。代表性 GIII 是耶拿 (Jena) 和纽布利 (Newbury) 株,而 Alpatron, 劳德代尔堡 (Fort Lauderdale), 和圣克劳德 (Saint Cloud) 株代表 GIV。GI 和 GII 组可以基于遗传分类进一步分成遗传簇或基因型 (Ando 等 (2000) *J. Infectious Diseases*, Vol. 181(Supp2):S336-S348; Lindell 等 (2005) *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 43(3):1086 - 1092)。如本文中使用的,术语遗传簇与术语基因型可互换使用。在原型基因小组 I 内,存在有至今已知的 8 种 GI 簇(及原型病毒株名称):GI. 1(诺沃克 (NV-USA93)); GI. 2(南安普顿 (Southampton) (SOV-GBR93)); GI. 3(沙原 (Desert Shield) (DSV-USA93)); GI. 4(旅游客船病毒 (Cruise Ship virus)/千叶 (Chiba) (千叶 -JPN00)); GI. 5(318/Musgrove (Musgrove-GBR00)); GI. 6(海塞

(Hesse) (海塞 -DEU98) ;GI. 7(Wnchest-GBR00) ; 和 GI. 8(拳师 (Boxer)-USA02)。在原型基因小组 II 内, 存在有至今已知的 19 种 GII 簇(及原型病毒株名称):GII. 1(夏威夷 (夏威夷 -USA94)) ;GII. 2(雪山病毒 /Melksham(Msham-GBR95)) ;GII. 3(多伦多 (多伦多 -CAN93)) ;GII. 4(布里斯托尔 (Bristol)/Lordsdale(Bristol-GBR93)) ;GII. 5(290/Hillingdon(Hilingd-GBR00)) ;GII. 6(269/Seacroft(Seacrof-GBR00)) ;GII. 7(273/利兹 (Leeds) (利兹 -GBR00)) ;GII. 8(539/阿姆斯特丹 (Amsterdam) (阿姆斯特丹 -NLD99)) ;GII. 9(378(VABeach-USA01)) , GII. 10(爱尔福特 (Erfurt)-DEU01) ;GII. 11(SW9180JPN01) ;GII. 12(Wortley-GBR00) ;GII. 13(Faytvil-USA02) ;GII. 14(M7-USA03) ;GII. 15(J23-USA02) ;GII. 16(Tiffin-USA03) ;GII. 17(CSE1-USA03) ;GII. 18(QW101/2003/US) 和 GII. 19(QW170/2003/US)。

[0030] “诺如病毒”在本文中还可指重组诺如病毒病毒样颗粒 (rNOR VLP)。在一些实施方案中, 在细胞中至少重组表达由 ORF2 编码的诺如病毒衣壳蛋白(例如在 Sf9 细胞中自杆状病毒载体)可以导致衣壳蛋白自发的自组装成 VLP。在一些实施方案中, 在细胞中至少重组表达由 ORF1 和 ORF2 编码的诺如病毒蛋白(例如在 Sf9 细胞中自杆状病毒载体)可以导致衣壳蛋白自发的自组装成 VLP。VLP 在结构上类似于诺如病毒, 但是缺乏病毒 RNA 基因组, 并且因此不是感染性的。因而, “诺如病毒”包括可以为感染性的病毒体或非感染性颗粒, 其包括有缺陷的颗粒。

[0031] 诺如病毒的非限制性例子包括诺如病毒原型基因小组 1 株 Hu/NoV/ 西切斯特 (West Chester)/2001/USA, GenBank 登录号 AY502016 ; 千叶病毒 (CHV, GenBank AB042808) ; 诺如病毒原型基因小组 2 株 Hu/NoV/ 布拉多克高地 (Braddock Heights)/1999/USA, GenBank 登录号 AY502015 ; 诺如病毒原型基因小组 2 株 Hu/NoV/ 费耶特 (Fayette)/1999/USA, GenBank 登录号 AY502014 ; 诺如病毒原型基因小组 2 株 Hu/NoV/ 费尔菲尔德 (Fairfield)/1999/USA, GenBank 登录号 AY502013 ; 诺如病毒原型基因小组 2 株 Hu/NoV/ 桑达斯基 (Sandusky)/1999/USA, GenBank 登录号 AY502012 ; 诺如病毒原型基因小组 2 株 Hu/NoV/ 坎顿 (Canton)/1999/USA, GenBank 登录号 AY502011 ; 诺如病毒原型基因小组 2 株 Hu/NoV/ 蒂芬 (Tiffin)/1999/USA, GenBank 登录号 AY502010 ; 诺如病毒原型基因小组 2 株 Hu/NoV/CS-E1/2002/USA, GenBank 登录号 AY50200 ; 诺如病毒原型基因小组 1 株 Hu/NoV/ 威斯康星 (Wisconsin)/2001/USA, GenBank 登录号 AY502008 ; 诺如病毒原型基因小组 1 株 Hu/NoV/CS-841/2001/USA, GenBank 登录号 AY502007 ; 诺如病毒原型基因小组 2 株 Hu/NoV/ 海勒姆 (Hiram)/2000/USA, GenBank 登录号 AY502006 ; 诺如病毒原型基因小组 2 株 Hu/NoV/ 通托加尼 (Tontogany)/1999/USA, GenBank 登录号 AY502005 ; 诺沃克病毒, 完整基因组, GenBank 登录号 NC. sub. —001959 ; 诺如病毒 Hu/GI/ 小樽 (Otofuke)/1979/JP 基因组 RNA, 完整基因组, GenBank 登录号 AB187514 ; 诺如病毒 Hu/ 北海道 (Hokkaido)/133/2003/JP, GenBank 登录号 AB212306 ; 诺如病毒悉尼 (Sydney) 2212, GenBank 登录号 AY588132 ; 诺沃克病毒株 SN2000JA, GenBank 登录号 AB190457 ; Lordsdale 病毒完整基因组, GenBank 登录号 X86557 ; 诺沃克样病毒基因组 RNA, Gifu' 96, GenBank 登录号 AB045603 ; 诺沃克病毒株越南 026, 完整基因组, GenBank 登录号 AF504671 ; 诺如病毒 Hu/GII. 4/2004/N/L, GenBank 登录号 AY883096 ; 诺如病毒 Hu/GII/ 北辰 (Hokushin)/03/JP, GenBank 登录号 AB195227 ; 诺如病毒 Hu/GII/ 贺茂 (Kamo)/03/JP, GenBank 登录号 AB195228 ; 诺如病毒 Hu/

GII/Sinsiro/97/JP, GenBank 登录号 AB195226 ; 诺如病毒 Hu/GII/Ina/02/JP, GenBank 登录号 AB195225 ; 诺如病毒 Hu/NLV/GII/Neustrelitz260/2000/DE, GenBank 登录号 AY772730 ; 诺如病毒 Hu/NLV/Dresden174/pUS-NorII/1997/GE, GenBank 登录号 AY741811 ; 诺如病毒 Hu/NLV/ 牛津 /B2S16/2002/UK, GenBank 登录号 AY587989 ; 诺如病毒 Hu/NLV/ 牛津 /B4S7/2002/UK, GenBank 登录号 AY587987 ; 诺如病毒 Hu/NLV/ 威特尼 (Witney)/B7S2/2003/UK, GenBank 登录号 AY588030 ; 诺如病毒 Hu/NLV/ 班伯里 (Banbury)/B9S23/2003/UK, GenBank 登录号 AY588029 ; 诺如病毒 Hu/NLV/ 奇平诺顿 (ChippingNorton)/2003/UK, GenBank 登录号 AY588028 ; 诺如病毒 Hu/NLV/ 迪考特 (Didcot)/B9S2/2003/UK, GenBank 登录号 AY588027 ; 诺如病毒 Hu/NLV/ 牛津 /B8S5/2002/UK, GenBank 登录号 AY588026 ; 诺如病毒 Hu/NLV/ 牛津 /B6S4/2003/UK, GenBank 登录号 AY588025 ; 诺如病毒 Hu/NLV/ 牛津 /B6S5/2003/UK, GenBank 登录号 AY588024 ; 诺如病毒 Hu/NLV/ 牛津 /B5S23/2003/UK, GenBank 登录号 AY588023 ; 诺如病毒 Hu/NLV/ 牛津 /B6S2/2003/UK, GenBank 登录号 AY588022 ; 诺如病毒 Hu/NLV/ 牛津 /B6S6/2003/UK, GenBank 登录号 AY588021 ; 诺沃克样病毒隔离群 Bo/Thirsk10/00/UK, GenBank 登录号 AY126468 ; 诺沃克样病毒隔离群 Bo/Penrith55/00/UK, GenBank 登录号 AY126476 ; 诺沃克样病毒隔离群 Bo/Aberystwyth24/00/UK, GenBank 登录号 AY126475 ; 诺沃克样病毒隔离群 Bo/Dumfries/94/UK, GenBank 登录号 AY126474 ; 诺如病毒 NLV/IF2036/2003/ 伊拉克, GenBank 登录号 AY675555 ; 诺如病毒 NLV/IF1998/2003/ 伊拉克, GenBank 登录号 AY675554 ; 诺如病毒 NLV/BUDS/2002/USA, GenBank 登录号 AY660568 ; 诺如病毒 NLV/ 巴黎岛 (Paris Island)/2003/USA, GenBank 登录号 AY652979 ; 雪山病毒, 完整基因组, GenBank 登录号 AY134748 ; 诺沃克样病毒 NLV/ 劳德代尔堡 (Fort Lauderdale)/560/1998/US, GenBank 登录号 AF414426 ; Hu/ 诺如病毒 / 广岛 /1999/JP (9912-02F), GenBank 登录号 AB044366 ; 诺沃克样病毒株 11MSU-MW, GenBank 登录号 AY274820 ; 诺沃克样病毒株 B-1SVD, GenBank 登录号 AY274819 ; 诺如病毒原型基因小组 2 株 Hu/NoV/ 法明顿山 (Farmington Hills)/2002/USA, GenBank 登录号 AY502023 ; 诺如病毒原型基因小组 2 株 Hu/NoV/CS-G4/2002/USA, GenBank 登录号 AY502022 ; 诺如病毒原型基因小组 2 株 Hu/NoV/CS-G2/2002/USA, GenBank 登录号 AY502021 ; 诺如病毒原型基因小组 2 株 Hu/NoV/CS-G12002/USA, GenBank 登录号 AY502020 ; 诺如病毒原型基因小组 2 株 Hu/NoV/ 安克雷奇 (Anchorage)/2002/USA, GenBank 登录号 AY502019 ; 诺如病毒原型基因小组 2 株 Hu/NoV/CS-D1/2002/CAN, GenBank 登录号 AY502018 ; 诺如病毒原型基因小组 2 株 Hu/NoV/Germanton/2002/USA, GenBank 登录号 AY502017 ; 人杯状病毒 (calicivirus) NLV/GII/Langen1061/2002/DE, 完整基因组, GenBank 登录号 AY485642 ; 鼠诺如病毒 1 多蛋白, GenBank 登录号 AY228235 ; 诺沃克病毒, GenBank 登录号 AB067536 ; 人杯状病毒 NLV/Mex7076/1999, GenBank 登录号 AF542090 ; 人杯状病毒 NLV/ 奥伯豪森 (Oberhausen) 455/01/DE, GenBank 登录号 AF539440 ; 人杯状病毒 NLV/ 赫茨伯格 (Herzberg) 385/01/DE, GenBank 登录号 AF539439 ; 人杯状病毒 NLV/Boxer/2001/US, GenBank 登录号 AF538679 ; 诺沃克样病毒基因组 RNA, 完整基因组, GenBank 登录号 AB081723 ; 诺沃克样病毒基因组 RNA, 完整基因组, 隔离群 :Saitama U201, GenBank 登录号 AB039782 ; 诺沃克样病毒基因组 RNA, 完整基因组, 隔离群 :Saitama U18, GenBank 登录号 AB039781 ; 诺沃克样病毒基因组 RNA, 完整基因组, 隔离群 :Saitama U25, GenBank 登录号 AB039780 ; 诺沃克病毒株 :U25GII, GenBank

登录号 AB067543 ;诺沃克病毒株 :U201GII, GenBank 登录号 AB067542 ;诺沃克样病毒株 416/97003156/1996/LA, GenBank 登录号 AF080559 ;诺沃克样病毒株 408/97003012/1996/FL, GenBank 登录号 AF080558 ;诺沃克样病毒 NLV/Burwash Landing/331/1995/US, GenBank 登录号 AF414425 ;诺沃克样病毒 NLV/ 迈阿密海滩 (Miami Beach)/326/1995/US, GenBank 登录号 AF414424 ;诺沃克样病毒 NLV/ 怀特河 (White River)/290/1994/US, GenBank 登录号 AF414423 ;诺沃克样病毒 NLV/ 新奥尔良 (New Orleans)/306/1994/US, GenBank 登录号 AF414422 ;诺沃克样病毒 LV/ 卡纳维拉尔港 (Port Canaveral)/301/1994/US, GenBank 登录号 AF414421 ;诺沃克样病毒 NLV/ 檀香山 (Honolulu)/314/1994/US, GenBank 登录号 AF414420 ;诺沃克样病毒 NLV/ 里士满 (Richmond)/283/1994/US, GenBank 登录号 AF414419 ;诺沃克样病毒 NLV/ 威斯多佛 (Westover)/302/1994/US, GenBank 登录号 AF414418 ;诺沃克样病毒 NLV/UK3-17/12700/1992/GB, GenBank 登录号 AF414417 ;诺沃克样病毒 NLV/ 迈阿密 /81/1986/US, GenBank 登录号 AF414416 ;雪山株, GenBank 登录号 U70059 ;沙原病毒 (Desert Shield virus)DSV395, GenBank 登录号 U04469 ;诺沃克病毒, 完整基因组, GenBank 登录号 AF093797 ;夏威夷杯状病毒, GenBank 登录号 U07611 ;南安普敦病毒 (Southampton virus), GenBank 登录号 L07418 ;诺沃克病毒 (SRSV-KY-89/89/J), GenBank 登录号 L23828 ;诺沃克病毒 (SRSV-SMA/76/US), GenBank 登录号 L23831 ;坎伯威尔病毒 (Camberwell virus), GenBank 登录号 U46500 ;人杯状病毒株 Melksham, GenBank 登录号 X81879 ;人杯状病毒 (calicivirus) 株 MX, GenBank 登录号 U22498 ;小呼肠孤病毒 (Minireovirus)TV24, GenBank 登录号 U02030 ;及诺沃克样病毒 NLV/ 格温内思 (Gwynedd)/273/1994/US, GenBank 登录号 AF414409 ;通过提及将所有病毒的序列(如到本申请的提交日进入的)收入本文。别的诺如病毒序列披露于下列专利公开文本中: W02005/030806, W02000/79280, JP2002020399, US2003129588, 美国专利 No. 6, 572, 862, W01994/05700, 和 W005/032457, 通过提及将它们全部完整收入本文。关于诺如病毒的序列比较和遗传多样性和种系发生分析的讨论, 还可见 Green 等 (2000) *J. Infect. Dis.*, Vol. 181(增刊 2):S322-330 ;Wang 等 (1994) *J. Virol.*, Vol. 68:5982-5990 ;Chen 等 (2004) *J. Virol.*, Vol. 78:6469-6479 ;Chakravarty 等 (2005) *J. Virol.*, Vol. 79:554-568 ;Hansman 等 (2006) *J. Gen. Virol.*, Vol. 87:909-919 ;Bull 等 (2006) *J. Clin. Micro.*, Vol. 44(2):327-333 ;Siebenga 等 (2007) *J. Virol.*, Vol. 81(18):9932-9941, 及 Fankhauser 等 (1998) *J. Infect. Dis.*, Vol. 178:1571-1578。将每种核酸和相应的氨基酸序列全部通过提及完整收录。在一些实施方案中, 可以将密文用于鉴定目的并且构造: 分离病毒的宿主物种 / 属缩写 / 种缩写 / 株名称 / 发生的年份 / 起源国家。(Green 等, *Human Caliciviruses*, in *Fields Virology* Vol. 1841-874 (Knipe 和 Howley 主编, 第 4 版, Lippincott Williams&Wilkins 2001))。原型基因小组 II, 基因型 4 (GII. 4) 病毒株 (例如休斯顿, 密涅瓦 (Minerva) (又称为 Den Haag), 和劳伦斯 (Laurens) (又称为 Yerseke) 株) 在一些实施方案中是优选的。由于鉴定了新的毒株并且其遗传序列是可用的, 本领域技术人员会能够使用普通技术在本发明的组合物和方法中采用使用这些当代毒株得到的 VLP。如此, 本发明涵盖自此类毒株制成的作为合适的抗原的 VLP, 用于本文中描述的组合物和方法。

[0032] 诺如病毒抗原可以是肽、蛋白质、或病毒样颗粒 (VLP) 的形式。在一个优选的实施

方案中, 诸如病毒抗原包含 VLP。如本文中所使用的, “病毒样颗粒或 VLP” 指自诸如病毒的衣壳蛋白编码序列生成的且包含与感染性诸如病毒颗粒相似的抗原特征的病毒样颗粒、其碎片、聚集物、或部分。诸如病毒抗原也可以是 VLP 的衣壳单体、衣壳多聚体、蛋白质或肽片段、或其聚集物或混合物的形式。诸如病毒抗原性蛋白质或肽也可以使用本领域已知方法生成的变性形式。

[0033] 本发明的 VLP 可以使用本领域标准技术自全长诸如病毒衣壳蛋白诸如 VP1 和 / 或 VP2 蛋白或者某些 VP1 或 VP2 衍生物形成。或者, 用于形成 VLP 的衣壳蛋白是截短的衣壳蛋白。在一些实施方案中, 例如, 至少一个 VLP 包含截短的 VP1 蛋白。在其它实施方案中, 所有 VLP 包含截短的 VP1 蛋白。截短可以是 N 端或 C 端截短。截短的衣壳蛋白是合适地功能性衣壳蛋白衍生物。功能性衣壳蛋白衍生物能够以与由全长衣壳蛋白组成的 VLP 引起免疫应答的方式相同的方式引起免疫应答(如果必要, 当有合适的佐剂时)。

[0034] VLP 可含有主要 VP1 蛋白和 / 或次要 VP2 蛋白。在一些实施方案中, 每个 VLP 含有只来自一个诸如病毒基因小组的 VP1 和 / 或 VP2 蛋白, 产生单价 VLP。如本文中所使用的, 术语“单价”指抗原性蛋白质衍生自单一诸如病毒基因小组。例如, VLP 含有来自基因小组 I 病毒株的 VP1 和 / 或 VP2 (例如来自诺沃克病毒的 VP1 和 VP2)。优选的是, VLP 主要由 VP1 蛋白构成。在本发明的一个实施方案中, 抗原是单价 VLP 的混合物, 其中所述组合物包括由来自单一诸如病毒基因小组的 VP1 和 VP2 构成的 VLP 并混有由来自取自多种病毒株的不同诸如病毒基因小组(例如诺沃克病毒和休斯顿病毒)的 VP1 和 VP2 构成的 VLP。纯粹举例来说, 所述组合物可含有来自诸如病毒基因小组 I 一种或多种株的单价 VLP 以及来自诸如病毒基因小组 II 一种或多种株的单价 VLP。毒株可以基于其在给定时间的流行优势而选择。在某些实施方案中, 诸如病毒 VLP 混合物由 GI. 1 和 GII. 4 病毒株构成。更优选地, 诸如病毒 VLP 混合物由诺沃克毒株和自原型基因小组 II 诸如病毒衍生的共有衣壳序列构成。自流行诸如病毒序列衍生的共有衣壳序列和用此类序列生成的 VLP 记载于 W02010/017542, 通过提及将其完整收入本文。例如, 在一个实施方案中, 自原型基因小组 II, 基因型 4 (GII. 4) 病毒株衍生的共有衣壳序列包含 SEQ ID NO:1 的序列。如此, 在一些实施方案中, 疫苗组合物包含单价 VLP 的混合物, 其中一种单价 VLP 包含来自原型基因小组 I 诸如病毒(例如诺沃克)的衣壳蛋白, 且另一种单价 VLP 包含包含序列 SEQ ID NO:1 的共有衣壳蛋白。

[0035] M K M A S S D A N P S D G S T A N L V P E V N N E V M A L E P V V G A
A I A A P V A G Q Q N V I D P W I R N N F V Q A P G G E F T V S P R N A P G E
I L W S A P L G P D L N P Y L S H L A R M Y N G Y A G G F E V Q V I L A G N A
F T A G K I I F A A V P P N F P T E G L S P S Q V T M F P H I I V D V R Q L E
P V L I P L P D V R N N F Y H Y N Q S N D P T I K L I A M L Y T P L R A N N A
G D D V F T V S C R V L T R P S P D F D F I F L V P P T V E S R T K P F T V P
I L T V E E M T N S R F P I P L E K L F T G P S G A F V V Q P Q N G R C T T D
G V L L G T T Q L S P V N I C T F R G D V T H I A G T Q E Y T M N L A S Q N W
N N Y D P T E E I P A P L G T P D F V G K I Q G V L T Q T T R G D G S T R G H
K A T V S T G S V H F T P K L G S V Q F S T D T S N D F E T G Q N T K F T P V
G V V Q D G S T T H Q N E P Q Q W V L P D Y S G R D S H N V H L A P A V A P T
F P G E Q L L F F R S T M P G C S G Y P N M N L D C L L P Q E W V Q H F Y Q E

A A P A Q S D V A L L R F V N P D T G R V L F E C K L H K S G Y V T V A H T G
Q H D L V I P P N G Y F R F D S W V N Q F Y T L A P M G N G T G R R R A L (SEQ
ID NO:1)

[0036] 然而,在本发明的另一个实施方案中,VLP 可以是多价 VLP,其包含例如来自一个诺如病毒基因小组的 VP1 和 / 或 VP2 蛋白,其中混有来自第二个诺如病毒基因小组的 VP1 和 / 或 VP2 蛋白,其中所述不同的 VP1 和 VP2 蛋白不是嵌合 VP1 和 VP2 蛋白,但是在同一衣壳结构内联合到一起以形成免疫原性 VLP。如本文中所使用的,术语“多价”指抗原性蛋白质衍生自两种或更多种诺如病毒基因小组或株。多价 VLP 可含有取自两种或更多种病毒株的 VLP 抗原。纯粹举例来说,所述组合物可含有由来自诺如病毒基因小组 I(例如诺沃克病毒)一种或多种株的衣壳单体或多聚体以及来自诺如病毒基因小组 II(例如休斯顿病毒)一种或多种株的衣壳单体或多聚体构成的多价 VLP。优选的是,多价 VLP 含有来自诺沃克和休斯顿诺如病毒的毒株,或给定时间的其它主要流行毒株的衣壳蛋白。

[0037] 组合物内单价或多价 VLP 的组合优选不会降低每种 VLP 类型的免疫原性。具体而言,优选的是,在本发明组合中的诺如病毒 VLP 间没有干扰,使得本发明的组合 VLP 组合物能够引发针对疫苗中所呈递的每种诺如病毒基因型的感染的免疫力。合适的是,针对组合中的给定 VLP 类型的免疫应答是当单独测量时针对同一 VLP 类型的免疫应答的至少 50%,优选 100% 或基本上 100%。如本文实施例中所例示的,免疫应答可以合适地测量,例如通过抗体应答。

[0038] 如本文中使用的,“原型基因小组 I 诺如病毒 VLP”指包含自一种或多种原型基因小组 I 诺如病毒株衍生的衣壳蛋白的单价或多价 VLP。在一些实施方案中,原型基因小组 I 诺如病毒 VLP 包含来自原型基因小组 I 诺如病毒(例如诺沃克病毒)的全长衣壳蛋白。在其它实施方案中,原型基因小组 I 诺如病毒 VLP 包含自各种原型基因小组 I 株衍生的共有衣壳蛋白。衍生共有衣壳序列的原型基因小组 I 株可以在相同基因型或遗传簇内或者来自不同基因型或遗传簇。类似地,如本文中使用的,“原型基因小组 II 诺如病毒 VLP”指包含自一种或多种原型基因小组 II 诺如病毒株衍生的衣壳蛋白的单价或多价 VLP。在一些实施方案中,原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 包含来自原型基因小组 II 诺如病毒(例如劳伦斯或密涅瓦病毒)的全长衣壳蛋白。在其它实施方案中,原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 包含自各种原型基因小组 II 株衍生的共有衣壳蛋白。衍生共有衣壳序列的原型基因小组 II 株可以在相同基因型或遗传簇内或者来自不同基因型或遗传簇。在一个实施方案中,原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 包含原型基因小组 II,基因型 4(GII. 4) 诺如病毒的衣壳共有序列。如此,在一些实施方案中,原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 包含 SEQ ID NO:1 的衣壳序列。

[0039] 可以如下生成多价 VLP,即分开表达各衣壳蛋白,接着组合以形成 VLP。或者,可以在同一细胞内自一种或多种 DNA 构建物表达多种衣壳蛋白。例如,可以将多种 DNA 构建物转化或转染入宿主细胞中,每种载体编码不同的衣壳蛋白。或者,可以使用具有在共享启动子或多个单独启动子控制下的多个衣壳基因的单一载体。在适宜的情况中,还可以将 IRES 元件掺入载体。使用此类表达策略,可以共纯化共表达的衣壳蛋白,用于后续 VLP 形成,或者可以自发形成随后可以纯化的多价 VLP。

[0040] 一种用于生成多价 VLP 的优选工艺包括制备来自不同诺如病毒基因型的 VLP 衣壳蛋白或衍生物,诸如 VP1 蛋白,混合所述蛋白质,并组装所述蛋白质以生成多价 VLP。在混合

之前,VP1 蛋白可以是粗制提取物的形式,部分纯化的或纯化的。可以将不同基因小组的组装好的单价 VLP 解组装,混合到一起,并再组装成多价 VLP。优选的是,在组合之前,所述蛋白质或 VLP 是至少部分纯化的。任选的是,可以在组装之后进一步纯化多价 VLP。

[0041] 合适的是,本发明的 VLP 是通过 VLP 的解组装和再组装而制备的,以提供同质的和纯的 VLP。在一个实施方案中,可以通过将两种或更多种 VLP 解组装,接着在再组装之前的任何合适点组合解组装的 VLP 成分来制备多价 VLP。当 VLP 自所表达的 VP1 蛋白自发形成时,如例如一些酵母菌株中发生的,这种办法是合适的。在 VP1 蛋白的表达不引起自发 VLP 形成的情况中,可以在组装成 VLP 之前组合 VP1 蛋白或衣壳粒的制备物。

[0042] 在使用多价 VLP 的情况中,优选的是,将 VLP 的各成分以它们在最终混合 VLP 中的期望比例混合。例如,相同量的自诺沃克和休斯顿病毒(或其它诺如病毒株)部分纯化的 VP1 蛋白的混合物提供含大致相等量的每种蛋白质的多价 VLP。

[0043] 包含多价 VLP 的组合物可以通过本领域已知的解决方案来稳定,诸如 W098/44944 ;W000/45841,通过述及收入本文。

[0044] 在诺如病毒 VP1 和 VP2 蛋白或衍生物之外,本发明的组合物可包含其它蛋白质或蛋白质片段。其它蛋白质或肽也可以与本发明的组合物共施用。任选的是,组合物也可以与非诺如病毒抗原一起配制或共施用。合适的是,这些抗原能提供针对其它疾病的保护。

[0045] VP1 蛋白或功能性蛋白质衍生物合适地能够形成 VLP,而且 VLP 形成可通过标准技术来评估,诸如例如大小排阻层析、电子显微术和动态激光散射。

[0046] 本发明的抗原性分子可以通过自它们天然存在于其中的生物体分离和纯化来制备,或者它们可以通过重组技术来制备。优选的是,自昆虫细胞诸如 Sf9 或 H5 细胞制备诺如病毒 VLP 抗原,尽管也可以使用任何合适的细胞,诸如大肠杆菌 (*E. coli*) 或酵母细胞,例如酿酒酵母/啤酒糖酵母 (*S. cerevisiae*)、粟酒裂殖糖酵母 (*S. pombe*)、巴斯德毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*) 或其它毕赤氏酵母表达系统,哺乳动物细胞表达诸如 CHO 或 HEK 系统。当通过重组方法或通过合成来制备时,可以对构成肽的氨基酸进行一处或多处插入、缺失、倒位或取代。优选以基本上纯的状态使用上述每一种抗原。

[0047] 在昆虫细胞培养物中生成诺如病毒 VLP 的规程先前已经披露于美国专利 No. 6,942,865,通过述及完整收入本文。简言之,克隆含有病毒衣壳基因 (ORF2) 和次要结构基因 (ORF3) 的来自基因组 3' 端的 cDNA。自所克隆的 cDNA 构建携带病毒衣壳基因的重组杆状病毒。在 Sf9 或 H5 昆虫细胞培养物中生成诺如病毒 VLP。

[0048] 在一些实施方案中,疫苗组合物包含与诺如病毒抗原组合的一种或多种佐剂。大多数佐剂含有设计用于保护抗原免于快速代谢的物质(诸如氢氧化铝或矿物油)和免疫应答的刺激物(诸如百日咳博德特氏菌 (*Bordetella pertussis*) 或结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 衍生的蛋白质)。合适的佐剂可通过商业途径获得,例如弗氏不完全佐剂和完全佐剂 (Pifco Laboratories, Detroit, Mich.) ;Merck 佐剂 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N. J.) ;铝盐,诸如氢氧化铝凝胶(明矾)或磷酸铝;钙、铁或锌的盐;酰化酪氨酸酰化糖的不溶性悬浮液;阳离子或阴离子衍生化多糖;聚磷腈;生物可降解微球体;和 Quil A。

[0049] 合适的佐剂还包括但不限于 toll 样受体 (TLR) 激动剂,特别是 toll 样受体 4 型 (TLR-4) 激动剂(例如单磷酸基脂质 A (MPL)、合成脂质 A、脂质 A 模拟物或类似物)、铝盐、细

胞因子、皂苷、胞壁酰二肽 (MDP) 衍生物、CpG 寡聚物、革兰氏阴性细菌的脂多糖 (LPS)、聚磷腈、乳剂、病毒体、Cochleates、聚(丙交酯-共-乙交酯) (PLG) 微粒、泊洛沙姆颗粒、微粒、脂质体、水包油乳剂、MF59、和鲨烯。在一些实施方案中,佐剂不是细菌衍生的外毒素。优选的佐剂包括刺激 Th1 型应答的佐剂,诸如 3DMPL 或 QS21。

[0050] 单磷酰基脂质 A (MPL),一种来自沙门氏菌 (*Salmonella*) 的脂质 A 无毒衍生物,是已经开发成疫苗佐剂的一种有力的 TLR-4 激动剂 (Evans 等 2003)。在临床前鼠研究中,鼻内 MPL 显示出增强分泌性以及系统性体液应答 (Baldrige 等 2000; Yang 等 2002)。还在超过 120,000 名患者的临床研究中证明了它作为疫苗佐剂是安全且有效的 (Baldrick 等, 2002; Baldrige 等 2004)。MPL 经由 TLR-4 受体刺激对先天免疫的诱导,并因此能够引发针对多种感染性病原体的非特异性免疫应答,包括革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌二者、病毒、和寄生物 (Baldrige 等 2004; Persing 等 2002)。疫苗配制剂中包括 MPL 应当提供对先天应答的快速诱导,自病毒攻击 (challenge) 引发非特异性免疫应答,同时增强由疫苗的抗原性成分产生的特异性应答。

[0051] 在一个实施方案中,本发明提供了包含单磷酰基脂质 A (MPL) 或 3De-O- 酰化单磷酰基脂质 A (3D-MPL) (作为适应性和先天性免疫的增强剂) 的组合物。在化学上,3D-MPL 是具有 4、5 或 6 条酰化链的 3De-O- 酰化单磷酰基脂质 A 的混合物。3De-O- 酰化单磷酰基脂质 A 的一种优选形式披露于欧洲专利 0689454B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA), 通过述及收入本文。在另一个实施方案中,本发明提供了包含合成脂质 A、脂质 A 模拟物或类似物诸如 BioMira 的 PET 脂质 A、或设计用于像 TLR-4 激动剂那样发挥功能的合成衍生物的组合物。

[0052] 在某些实施方案中,疫苗组合物包含两种佐剂。佐剂的组合可以选自上文描述的那些组合。在一个具体的实施方案中,两种佐剂是 MPL 和氢氧化铝 (例如明矾)。在另一个具体的实施方案中,两种佐剂是 MPL 和油。

[0053] 本领域技术人员会很好地理解术语“有效佐剂量”或“佐剂的有效量”,而且包括能够刺激针对所施用抗原的免疫应答的一种或多种佐剂量,即提高针对所施用抗原组合物的免疫应答的量,如就洗鼻液中的 IgA 水平、血清 IgG 或 IgM 水平、或 B 和 T 细胞增殖所测量的。如与没有任何佐剂的相同抗原组合物相比,免疫球蛋白水平的合适有效升高包括超过 5%、优选超过 25%、特别是超过 50%。

[0054] 在一个实施方案中,本发明提供了配制用于胃肠外施用的疫苗组合物,其中该组合物包含与氢氧化铝和缓冲剂组合的至少两类诸如病毒 VLP。缓冲剂可以选自下组:L- 组氨酸、咪唑、琥珀酸、Tris、柠檬酸、二-Tris、Pipes、Mes、Hepes、甘氨酸、和 Tricine。在一个实施方案中,缓冲剂是 L- 组氨酸或咪唑。优选地,缓冲剂以约 15mM 至约 50mM,更优选地约 18mM 至约 40mM,或最优选地约 20mM 至约 25mM 的浓度存在。在一些实施方案中,抗原性或疫苗组合物的 pH 是约 6.0 至约 7.0,或者约 6.2 至约 6.8,或约 6.5。疫苗组合物可以是水性配制剂。在一些实施方案中,疫苗组合物是冻干的粉末,并且重建成水性配制剂。

[0055] 在某些实施方案中,在诸如病毒 VLP、氢氧化铝、和缓冲剂中的两类或更多类外,疫苗组合物进一步包含至少一种佐剂。例如,佐剂可以是 toll 样受体激动剂,诸如 MPL、鞭毛蛋白、CpG 寡聚物、合成的脂质 A 或脂质 A 模拟物或类似物。在一个具体的实施方案中,佐剂是 MPL。

[0056] 本发明的疫苗组合物中包含的诺如病毒 VLP 可以是本文中描述的任何 VLP。在一个实施方案中,两类诺如病毒 VLP 各包含来自不同原型基因小组(例如原型基因小组 I 和原型基因小组 II)的衣壳蛋白。例如,一类诺如病毒 VLP 包含自原型基因小组 I 诺如病毒衍生的衣壳蛋白,而另一类诺如病毒 VLP 包含自原型基因小组 II 诺如病毒衍生的衣壳蛋白。在一个实施方案中,一类诺如病毒 VLP 包含来自诺沃克病毒的衣壳蛋白,而另一类诺如病毒 VLP 包含自原型基因小组 II,基因型 4 诺如病毒衍生的共有衣壳蛋白(例如包含序列 SEQ ID NO:1 的衣壳蛋白)。疫苗组合物可以包含约 5 μ g 至约 200 μ g 每种诺如病毒 VLP,更优选约 15 μ g 至约 50 μ g 每种诺如病毒 VLP。在一些实施方案中,一类诺如病毒 VLP 的剂量与另一类诺如病毒 VLP 的剂量不同。例如,在某些实施方案中,疫苗组合物包含约 5 μ g 至约 15 μ g 原型基因小组 I VLP 和约 15 μ g 至约 50 μ g 原型基因小组 II VLP。在其它实施方案中,疫苗组合物包含约 15 μ g 至约 50 μ g 原型基因小组 I VLP 和约 50 μ g 至约 150 μ g 原型基因小组 II VLP。

[0057] 在一些实施方案中,疫苗组合物进一步包含药学可接受盐,包括但不限于氯化钠、氯化钾、硫酸钠、硫酸铵、和柠檬酸钠。在一个实施方案中,药学可接受盐是氯化钠。药学可接受盐的浓度可以是约 10mM 至约 200mM,优选的浓度在约 100mM 至约 150mM 的范围中。优选地,本发明的疫苗组合物含有小于 2mM 游离的磷酸根。在一些实施方案中,疫苗组合物包含小于 1mM 游离的磷酸根。疫苗组合物还可以进一步包含其它药学可接受赋形剂,诸如糖(例如蔗糖、海藻糖、甘露醇)和表面活性剂。

[0058] 如本文中讨论的,本发明的组合物可配制成为供作为疫苗配制剂来施用。如本文中所使用的,术语“疫苗”指如下的配制剂,其含有如上所述的本发明的诺如病毒 VLP 或其它诺如病毒抗原,其处于能够对脊椎动物,特别是人施用并诱导保护性免疫应答的形式,该保护性免疫应答足以诱导免疫力来预防和 / 或改善诺如病毒感染或诺如病毒诱导的疾病和 / 或减轻诺如病毒感染或疾病的至少一种症状。

[0059] 如本文中所使用的,术语“免疫应答”指体液免疫应答和由细胞介导的免疫应答二者。体液免疫应答牵涉对 B 淋巴细胞生成抗体的刺激,该抗体例如中和传染剂、阻断传染剂进入细胞、阻断所述传染剂的复制、和 / 或保护宿主细胞免于感染和破坏。由细胞介导的免疫应答指由脊椎动物(例如人)展现的,针对传染剂的,由 T 淋巴细胞和 / 或其它细胞(诸如巨噬细胞)介导的免疫应答,其预防或改善感染或减轻其至少一种症状。具体而言,“保护性免疫”或“保护性免疫应答”指由脊椎动物(例如人)展现的,针对传染剂的免疫力或针对传染剂引发免疫应答,其预防或改善感染或减轻其至少一种症状。具体而言,自疫苗的施用诱导保护性免疫应答表现为消除或降低急性胃肠炎的一种或多种症状的存在或此类症状的持续时间或严重程度的降低。由诺如病毒引起的胃肠炎的临床症状包括恶心、腹泻、稀粪、呕吐、发烧、和全身不舒服。降低或消除疾病症状的保护性免疫应答会降低或终止诺如病毒爆发在人群中的传播。疫苗制备物一般性记载于 Vaccine Design (“The subunit and adjuvant approach” (Powell M. F. 和 Newman M. J. 编) (1995) Plenum Press New York)。本发明的组合物可配制用于例如投递至口、胃肠、和呼吸(例如鼻)粘膜中一项或多项。本发明的组合物可以例如配制用于通过注射(诸如胃肠外注射(例如静脉内、皮下、皮内或肌肉内注射))投递。

[0060] 在意图将组合物投递至呼吸(例如鼻)粘膜的情况中,通常将它配制成水溶液(用

于作为气雾剂或滴鼻剂施用)或干粉(例如用于在鼻道内快速沉积)。用于作为滴鼻剂施用的组合物可含有一种或多种通常包括在此类组合物中的赋形剂类型,例如防腐剂、粘度调节剂、张度调节剂、缓冲剂、等等。粘度剂可以是微晶纤维素、壳聚糖、淀粉、多糖、等等。用于作为干粉施用的组合物还可含有一种或多种通常包括在此类组合物中的赋形剂,例如粘膜粘着剂、填充剂、和提供适宜粉末流动和大小特征的药剂。填充剂和粉末流动和大小剂可包括甘露醇、蔗糖、海藻糖、和木糖醇。

[0061] 在组合物意图用于胃肠外注射,诸如静脉内(i. v.)、皮下(s. c.)、皮内、或肌肉内(i. m.)注射的情况中,它通常配制为由至少一类诺如病毒 VLP 和任选地至少一种佐剂构成的液体悬浮液(例如水性配制剂)。在一个实施方案中,佐剂可以是 MPL。在另一个实施方案中,配制用于胃肠外施用的液体疫苗可以具有超过一种佐剂。在一个优选的实施方案中,胃肠外配制的(例如 i. m., i. v., 或 s. c. 配制的)液体疫苗包含诺如病毒原型基因小组 I 和 / 或原型基因小组 II VLP 及氢氧化铝(例如明矾)和单磷酸脂质 A (MPL) 作为佐剂。在一个实施方案中,用于胃肠外施用的液体配制剂包含诺如病毒原型基因小组抗原,诸如如本文中描述的一类或多类诺如病毒 VLP, MPL, 氢氧化铝, 和缓冲剂。在另一个实施方案中,用于胃肠外施用的液体配制剂包含诺如病毒原型基因小组抗原, MPL, 油, 和缓冲剂。在某些实施方案中,胃肠外疫苗配制剂中的缓冲剂是 L- 组氨酸或咪唑。如本领域中公知的,液体疫苗的胃肠外施用可以通过针和注射器进行。

[0062] 在某些实施方案中,用于在人中引发针对诺如病毒的保护性免疫应答的本发明疫苗组合物包含不超过 150 μ g 剂量的原型基因小组 I 和 / 或原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。例如,在一些实施方案中,疫苗组合物包含不超过 150 μ g, 不超过 100 μ g, 不超过 50 μ g, 不超过 25 μ g, 不超过 15 μ g, 或不超过 10 μ g 原型基因小组 I 诺如病毒 VLP。在其它实施方案中,疫苗组合物包含不超过 150 μ g, 不超过 100 μ g, 不超过 50 μ g, 不超过 25 μ g, 不超过 15 μ g, 或不超过 10 μ g 原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。在某些实施方案中,疫苗组合物包含各不超过 150 μ g 原型基因小组 I 和原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。在此类实施方案中,原型基因小组 I 诺如病毒 VLP 和原型基因小组 II VLP 的剂量可以是相同或不同的。例如,在一个实施方案中,疫苗组合物可以包含不超过 50 μ g 原型基因小组 I 诺如病毒 VLP 和不超过 150 μ g 原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。在另一个实施方案中,疫苗组合物可以包含不超过 25 μ g 原型基因小组 I 诺如病毒 VLP 和不超过 50 μ g 原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。在其它实施方案中,疫苗组合物可以包含不超过 15 μ g 原型基因小组 I 诺如病毒 VLP 和不超过 50 μ g 原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。在又一些实施方案中,疫苗组合物可以包含不超过 25 μ g 原型基因小组 I 诺如病毒 VLP 和不超过 150 μ g 原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。

[0063] 原型基因小组 I 和原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 可以自本文中描述的任何诺如病毒株衍生。在一个实施方案中,原型基因小组 I 诺如病毒 VLP 是原型基因小组 I, 基因型 1 (GI. 1) VLP (即包含来自 GI. 1 诺如病毒的衣壳蛋白)。在另一个实施方案中,原型基因小组 I 诺如病毒 VLP 是诺沃克 VLP。在另一个实施方案中,原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 是原型基因小组 II, 基因型 4 (GII. 4) VLP。在又一个实施方案中,原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 是自表达原型基因小组 II 诺如病毒的共有序列生成的 VLP。在一个具体的实施方案中,原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 包含具有 SEQ ID NO:1 的序列的衣壳蛋白。

[0064] 上文所述疫苗组合物可以是冻干且无水贮存的,直至它们准备使用,在该点时用

稀释剂重建它们。或者,可以在试剂盒中分开贮存组合物的不同成分(任何或所有成分是冻干的)。所述成分可保持冻干形式,用于干配制剂或重建液体配制剂,而且或是在使用前混合或是分开对患者施用。在一些实施方案中,将疫苗组合物以液体配制剂在试剂盒中贮存,并且可以伴有投递装置,诸如装备有针的注射器。在其它实施方案中,液体疫苗组合物可以在试剂盒中在投递装置内贮存。例如,试剂盒可以包含载药注射器,自动注射器,或注射笔装置,其含有本文中描述的疫苗组合物的液体配制剂。

[0065] 疫苗的冻干是本领域公知的。典型的是,在存在在冻干过程中保护抗原及产生具有期望粉末特征的块状物 (cake) 的药剂的情况下冷冻干燥液体抗原。糖(诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖、或乳糖)(以 10-200mg/mL 的初始浓度存在)常常用于蛋白质抗原的冷冻保护及产生具有期望粉末特征的冻干块。冻干组合物理论上产生更稳定的组合物。

[0066] 将每种疫苗组合物中抗原的量选择成诱导强烈免疫应答而没有显著不良副作用的量。这样的量会随采用哪种具体抗原、施用路径、和所使用的佐剂而变化。一般而言,在本发明的语境中,对患者施用的剂量应当足以随时间在患者中实现保护性免疫应答,或诱导抗原特异性抗体的生成。如此,以足够的量对患者施用组合物以引发针对特定抗原的免疫应答和 / 或预防、减轻、降低、或治愈来自疾病或感染的症状和 / 或并发症,并如此减轻或终止诸如病毒爆发在人群中的传播。足以实现这一点的量定义为“治疗有效量”。

[0067] 可以经非粘膜或粘膜路径施用本发明的疫苗组合物。这些施用可以包括体内施用,其经由胃肠外注射(例如静脉内、皮下、皮内、和肌肉内)或其它传统直接途径,诸如含服 / 舌下、直肠、口、鼻、表面(诸如经皮和眼)、阴道、肺、动脉内、腹膜内、眼内、或鼻内路径或直接进入特定组织。其它合适的施用路径包括经皮、皮下、和经由栓剂。在一个实施方案中,通过胃肠外施用路径,诸如静脉内,皮下、皮内,或肌肉内施用疫苗。在某些实施方案中,通过肌肉内施用路径施用疫苗。可以在单一时间点或多个时间点时,仅使用针,导管或相关装置(例如载药注射器或自动注射器)通过直接施用完成施用。可以通过微注射或皮肤贴片投递方法皮下或皮内投递其它胃肠外配制剂。

[0068] 本发明提供了用于在受试者中引发针对诺如病毒的保护性免疫的方法,该方法包括对受试者胃肠外施用不超过单剂本发明的疫苗组合物,其中所述疫苗包含如本文中描述的原型基因小组 I 和 / 或原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 和任选地至少一种佐剂。在此类实施方案中,与施用所述组合物前所述人中的滴度相比,单剂疫苗组合物至少诱导诺如病毒特异性血清抗体滴度的 3 倍升高。在一些实施方案中,与施用所述组合物前所述人中的滴度相比,单剂疫苗组合物至少诱导诺如病毒特异性血清抗体滴度的 6 倍升高。在其它实施方案中,单剂疫苗组合物诱导与在天然感染中通过暴露于活的诺如病毒诱导的抗体滴度相当的诺如病毒特异性血清抗体滴度,即与施用所述组合物前所述人中的滴度相比诺如病毒 - 特异性血清抗体升高大于 10 倍。在某些实施方案中,单剂疫苗组合物在施用组合物的 7 天内诱导诺如病毒 - 特异性血清抗体滴度的升高。优选地,通过静脉内,皮下,或肌肉内施用路径施用单剂疫苗组合物。在某个实施方案中,对人肌肉内施用单剂疫苗组合物。

[0069] 如本文中描述的,在一些实施方案中,适合于用于所述方法的单剂疫苗组合物包含不超过 150 μ g 原型基因小组 I 和 / 或原型基因小组 II 诺如病毒之每种。例如,在一些实施方案中,疫苗组合物包含不超过 150 μ g, 不超过 100 μ g, 不超过 50 μ g, 不超过 25 μ g, 不超过 15 μ g, 或不超过 10 μ g 原型基因小组 I 诺如病毒 VLP。在其它实施方案中,疫苗组

合物包含不超过 150 μ g, 不超过 100 μ g, 不超过 50 μ g, 不超过 25 μ g, 不超过 15 μ g, 或不超过 10 μ g 原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。在某些实施方案中, 疫苗组合物包含不超过 50 μ g 原型基因小组 I 和原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 之每种。在单剂疫苗组合物包含原型基因小组 I 和原型基因小组 II 诺如病毒 VLP 两者的实施方案中, 原型基因小组 I 诺如病毒 VLP 和原型基因小组 II VLP 的剂量可以是相同或不同的。例如, 在一个实施方案中, 疫苗组合物可以包含不超过 50 μ g 原型基因小组 I 诺如病毒 VLP 和不超过 150 μ g 原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。在另一个实施方案中, 疫苗组合物可以包含不超过 25 μ g 原型基因小组 I 诺如病毒 VLP 和不超过 50 μ g 原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。在其它实施方案中, 疫苗组合物可以包含不超过 15 μ g 原型基因小组 I 诺如病毒 VLP 和不超过 50 μ g 原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。在又一些实施方案中, 疫苗组合物可以包含不超过 25 μ g 原型基因小组 I 诺如病毒 VLP 和不超过 150 μ g 原型基因小组 II 诺如病毒 VLP。

[0070] 在所述方法的一个实施方案中, 受试者是人, 而所述疫苗赋予保护免于诺如病毒感染的一种或多种症状。虽然其他人报告了用诺如病毒抗原诱导免疫应答的方法(参见美国专利申请公开文本 No. US2007/0207526), 但是仍然尚未清楚鉴定在人中针对诺如病毒的保护性免疫应答的指标 (Herbst-Kralovetz 等 (2010) *Expert Rev. Vaccines*9(3), 299 - 307)。与当前在美国得到许可的数种疫苗不同(其中疫苗的有效性与血清抗体有关), 研究显示了免疫应答的标志(诸如针对诺沃克病毒的血清 IgG 抗体滴度升高)与人中的保护性免疫无关 (Johnson 等 (1990) *J. Infectious Diseases*161:18-21)。此外, 另一项在人中检查诺沃克病毒攻击 (challenge) 的研究指明对诺沃克感染的易感性是多因子的, 而且包括诸如分泌者状态和记忆粘膜免疫应答等因素 (Lindesmith 等 (2003) *Nature Medicine*9:548-553)。

[0071] 因为诺如病毒不能在体外培养, 所以当前没有病毒中和测定法可用。一项充当中和测定法替代法的功能测定法是血细胞凝集抑制 (HAI) 测定法(见实施例 1)。HAI 测量由诺如病毒疫苗诱导的抗体抑制诺如病毒 VLP 凝集有抗原包被的红细胞(因为诺如病毒 VLP 结合红细胞抗原(例如组织血型抗原))的能力。此测定法又称为碳水化合物阻断测定法, 因为它指示抗体阻断病毒或 VLP 结合红细胞上血型抗原碳水化合物的功能能力。在此测定法中, 将固定量的诺如病毒 VLP 与固定量的红细胞和来自经免疫受试者的血清混合。如果血清样品含有功能性抗体, 那么所述抗体会结合 VLP, 由此抑制红细胞凝集。如本文中使用的, “功能性抗体”指能够抑制诺如病毒颗粒与红细胞抗原之间的相互作用的抗体。换言之, 功能性抗体滴度等于组织血型抗原 (HBGA) 或碳水化合物阻断抗体滴度。可以通过上文描述的 HAI 测定法测量诺如病毒特异性功能性抗体的血清滴度。也可以使用基于 ELISA 的测定法测量诺如病毒特异性功能性抗体的血清滴度, 其中碳水化合物 H 抗原与微量滴定孔结合, 并且在存在血清的情况下检测诺如病毒 VLP 对 H 抗原的结合(见实施例 1 及 Reeck 等 (2010) *J Infect Dis*, Vol. 202(8):1212-1218)。诺如病毒特异性功能性抗体的水平升高可以是保护性免疫应答的指标。如此, 在一个实施方案中, 施用疫苗引发保护性免疫, 其包括与没有接受疫苗的人中的血清滴度相比诺如病毒特异性功能性抗体的血清滴度升高。优选地, 指示保护性免疫应答的诺如病毒特异性功能性抗体的血清滴度是如通过 HAI 测定法测量的, 大于 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 的几何均值滴度, 或如通过 H 抗原结合测定法测量的大于 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 或 500 的阻断滴度 (BT)₅₀ (对诺如病毒

VLP 的 H 抗原结合的 50% 抑制)几何均值滴度。在一个实施方案中, 诺如病毒特异性功能性抗体的血清滴度是大于 40 的几何均值滴度, 如通过 HAI 测定法测量的。在另一个实施方案中, 诺如病毒特异性功能性抗体的血清滴度是大于 100 的几何均值滴度, 如通过 HAI 测定法测量的。在另一个实施方案中, 诺如病毒特异性功能性抗体的血清滴度是大于 100 的 BT_{50} 几何均值滴度, 如通过 H 抗原结合测定法测量的。在又一个实施方案中, 诺如病毒特异性功能性抗体的血清滴度是大于 200 的 BT_{50} 几何均值滴度, 如通过 H 抗原结合测定法测量的。

[0072] 在别的方面, 施用疫苗引发保护性免疫, 包括 IgA 粘膜免疫应答和 IgG 系统性免疫应答, 其通过对受试者胃肠外 (优选肌肉内) 施用不超过单剂包含一类或多类诺如病毒抗原和任选地至少一种有效佐剂的抗原性或疫苗组合物实现。令人惊讶地, 发明人已经发现了在较强的 IgG 应答外, 本文中描述的诺如病毒疫苗组合物的胃肠外施用诱导强力的 IgA 应答。通常, 仅在经由粘膜施用路径施用疫苗时观察到较强的 IgA 应答。

[0073] 在某些实施方案中, 施用疫苗引发保护性免疫, 包括与没有接受疫苗的人中的水平相比血液中诺如病毒特异性 IgA 抗体分泌性细胞的水平升高。在一些实施方案中, 施用疫苗引发保护性免疫, 包括与在接受疫苗前人中的水平相比血液中诺如病毒特异性 IgA 抗体分泌性细胞的水平升高。在一个实施方案中, 诺如病毒特异性 IgA 抗体分泌性细胞是 CCR10+, CD19+, CD27+, CD62L+, 且 $\alpha 4 \beta 7+$ 。具有此标志物概况的抗体分泌性细胞能够归巢至外周淋巴样组织, 诸如肠中的派伊尔 (Peyer) 氏斑, 和粘膜淋巴样组织, 诸如肠粘膜。在一个实施方案中, CCR10+, CD19+, CD27+, CD62L+, 且 $\alpha 4 \beta 7+$ IgA 抗体分泌性细胞的数目是每 1×10^6 个外周血单核细胞大于约 500, 约 700, 约 1,000, 约 1,500, 或大于约 2,000 个细胞。在另一个实施方案中, 诺如病毒特异性 IgA 抗体分泌性细胞是 CCR10+, CD19+, CD27+, CD62L-, 且 $\alpha 4 \beta 7+$ 。具有此标志物概况的抗体分泌性细胞一般展现出仅归巢至粘膜部位, 并且可以指示记忆 B 细胞应答。在肌肉内施用疫苗的一些实施方案中, CCR10+, CD19+, CD27+, CD62L-, 且 $\alpha 4 \beta 7+$ IgA 抗体分泌性细胞的数目是每 1×10^6 个外周血单核细胞大于约 5,000, 约 6,500, 约 7,000, 约 10,000, 约 13,000, 约 15,000, 或大于约 20,000 个细胞。

[0074] 针对其它病毒 (诸如轮状病毒) 的疫苗观察到相似的发现。对于轮状病毒, 关于血清抗体是直接牵涉保护还是仅仅反映最近的感染存在争论 (Jiang, 2002; Franco, 2006)。在腹泻疾病 (诸如轮状病毒或诺如病毒) 的背景中确定保护的此类关联是特别困难的, 其中临床前研究推断保护可以因来自粘膜免疫 (诸如肠 IgA)、细胞因子精调 (elaboration)、和由细胞介导的免疫的贡献而多样化的 (multifaceted)。在临床发生期间测量此类免疫应答的困难及与血清抗体测量的关联的缺失要求疫苗对这些类型的病毒的有效性只能经由人体临床攻击实验来证明。

[0075] 如上所述, 本发明的疫苗组合物的施用预防和 / 或减轻诺如病毒感染的至少一种症状。诺如病毒感染的症状是本领域公知的, 而且包括恶心、呕吐、腹泻、和胃部绞痛。另外, 有诺如病毒感染的患者可具有低烧、头痛、寒战、肌肉痛、和疲劳。本发明还涵盖在经历诺如病毒感染的受试者中诱导保护性免疫应答的方法, 其通过对受试者施用本发明的疫苗配制剂, 使得至少一种与诺如病毒感染有关的症状得到减轻和 / 或降低来进行。症状的降低可以主观地或客观地确定, 例如由受试者自己评估、由临床医师评估或进行适宜的测定法或测量 (例如体温), 包括例如生活质量评估、诺如病毒感染或别的症状的进展减缓、诺如病毒症状的严重程度降低或合适测定法 (例如抗体滴度、RT-PCR 抗原检测、和 / 或 B 细胞或 T 细

胞活化测定法)。也可以通过直接测量(例如 RT-PCR)大便样品中的病毒负载(这反映了自肠脱落的病毒的量)来确定有效应答。客观评估包括动物和人评估二者。

[0076] 本发明还提供了生成针对一种或多种诺如病毒抗原的抗体的方法,所述方法包括对受试者施用如上文描述的本发明的疫苗组合物。可以通过本领域中的常规方法分离并纯化这些抗体。分离的对诺如病毒抗原特异性的抗体可以在开发诊断用免疫学测定法中使用。可以采用这些测定法来检测临床样品中的诺如病毒,并且鉴定引起感染的特定病毒(例如诺沃克,休斯顿,雪山,等等)。或者,可以对易于诺如病毒感染的受试者施用分离的抗体以赋予被动或短期免疫。

[0077] 现在要通过参照下列实施例中描述的具体实施方案来更为详细地例示本发明。实施例意图纯粹为例示本发明,而非意图以任何方式限制其范围。

实施例

[0078] 实施例 1 :人(LV03-104 研究),分组 A 中肌肉内诺如病毒二价病毒样颗粒(VLP)疫苗的剂量增加、安全性和免疫原性研究

[0079] 本实施例描述了在成年受试者中与安慰剂相比四剂水平的以单磷酸脂质 A(MPL)和氢氧化铝(A1OH)为佐剂的肌肉内(IM)诺如病毒二价 VLP 疫苗的安全性和免疫原性的随机化、多位置、剂量增加研究的分组 A。在该分组中登记约 48 名年龄为 18 至 49 岁的受试者。使用 1.5 英寸(38mm)针相隔 28 天通过肌肉内(IM)注射,受试者接受两剂疫苗或安慰剂。

[0080] 诺如病毒二价 VLP 疫苗含有原型基因小组 I,基因型 1(GI. 1)和原型基因小组 II,基因型 IV(GII. 4)VLP 作为抗原,和单磷酸脂质 A(MPL)和氢氧化铝(A1OH)作为佐剂,氯化钠(NaCl)和 L-组氨酸(L-His)作为缓冲剂(pH6.3-6.7),

[0081] 乙醇和注射用水。表 1 中汇总了肌肉内诺如病毒二价 VLP 疫苗的组成。GII. 4VLP 包含 SEQ ID NO:1 的衣壳序列,其自三种 GII. 4 株衍生。

[0082] 表 1 :每 0.5mL 四种 IM 诺如病毒二价 VLP 疫苗配制剂的最终药物产品组成

| 配制剂 | GI.1-VLP (μg) | GII.4 VLP (μg) | MPL (μg) | Al* (mg) | NaCl (mg) | L-His (mg) | 乙醇 (mg) |
|----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------|--------------|---------------|------------|
| [0083] 10 μg 剂量 | 5 | 5 | 50 | 0.5 | 4.38 | 1.55 | 19.7 |
| 30 μg 剂量 | 15 | 15 | 50 | 0.5 | 4.38 | 1.55 | 19.7 |
| 100 μg 剂量 | 50 | 50 | 50 | 0.5 | 4.38 | 1.55 | 19.7 |
| 300 μg 剂量 | 150 | 150 | 50 | 0.5 | 4.38 | 1.55 | 19.7 |

[0084] * 为氢氧化铝

[0085] 安慰剂是无菌正常注射用盐水(0.9%NaCl 且无防腐剂)。如下进行疫苗的剂量增加:在适当筛查良好健康状态后,将分组 A 中的受试者序贯登记入四个各约 12 名受试者的剂量组之每个组(剂量组 A1, A2, A3, 和 A4)。剂量组 A1, A2, A3, 和 A4 分别代表 5/5 μg , 15/15 μg , 50/50 μg , 和 150/150 μg 的二价抗原性剂量的 GI. 1 和 GII. 4 诺如病毒。将每个剂量组中的受试者以 5:1 随机化以接受疫苗或安慰剂。剂量组 A1 中的受试者接受其相应

的随机化处理(10名受试者接受5/5 μ g疫苗,且2名受试者接受安慰剂)。追踪受试者以通过审阅记忆辅助上记录的症状(第0-7天)和来自第7天,第21天,第28天,第35天,和第56天调查的期中病史进行安全性评估。中心安全性监视器(CSM)审阅安全性数据。在剂量2后的7天后,安全性数据(研究第35天)可用于对剂量组A1中的受试者审阅并且认为可接受,剂量组A2中的受试者适合于接受其初始剂量。相同的规则适用于后续剂量组中的剂量给药;也就是说,在剂量2后的7天后,安全性数据(研究第35天)可用于对剂量组的审阅,接着的剂量组适合于接受其初始剂量。

[0086] 在分组A中的登记结束时,每个剂量组中的约10名受试者接受疫苗(总共40名受试者),并且每组中的2名受试者接受盐水(总共约8名盐水对照接受者)。

[0087] 受试者保留每剂IM诺如病毒二价VLP疫苗或对照后第0天到第7天的请求症状的每日记忆辅助,包括四种局部注射部位反应(诸如疼痛,压痛,发红,和肿胀),和10种系统性体征或症状,包括每日口腔温度,头痛,疲劳,肌肉痛,寒战,关节痛和恶心、呕吐、腹泻、腹部痛性痉挛/疼痛的胃肠症状。对于每次注射后7天,每日测量并记录注射部位处的发红和肿胀。

[0088] 在第7+3天,第21+3天,第28+3天,第35+3天,第56+7天,第180+14天,和第393+14天的每次随访访问时及在第265+14天的随访电话时获得期中病史;就期中疾病、医生的访问、任何严重不利事件(SAE)、和任何重大新医学状况的发作询问受试者。在筛选及第21天和第35天(每剂后约7天)对受试者评估具有WBC分类和血小板计数的CBC,和血清BUN,肌酸酐,葡萄糖,AST,和ALT,以分别评估连续适任和安全性。

[0089] 在第0天疫苗接种前和第7+3天,第21+3天,第28+3天,第35+3天,第56+7天,第180+14天,和第393+14天收集来自受试者的血液以通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)测量针对IM诺如病毒二价VLP疫苗的血清抗体(分别为IgG, IgA, 和IgM和组合的)。还测量血清碳水化合物阻断活性和血清HAI抗体。对于分组A中的受试者,测定抗体分泌性细胞(ASC),归巢标志物,记忆B细胞和细胞免疫应答。

[0090] 使用下列方法来分析自经免疫的个体或接受安慰剂的个体收集的血液样品。

[0091] 通过ELISA测量血清抗体

[0092] 对所有受试者实施通过ELISA测量针对诺如病毒的抗体,其使用纯化的重组诺如病毒VLP(分别为GI.1和GII.4)作为靶抗原来筛选有编码的标本。简言之,使用碳酸盐包被的pH9.6缓冲液中的诺如病毒VLP包被微量滴定板。将经包被的板清洗,封闭,并与连续两倍稀释的测试血清一起温育,接着清洗,并与酶偶联的对人总IgG,即IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA和IgM特异性的二抗试剂一起温育。添加适宜的底物溶液,显色,读板,并测定IgG, IgA和IgM终点滴度,与参照标准曲线比较每种抗体类别。测定每组的几何均值滴度(GMTs),几何均值倍数增加(GMFR)和血清响应率。血清响应定义为与免疫前滴度相比抗体滴度升高4倍。

[0093] 诺如病毒碳水化合物组织血型抗原(HBGA)阻断活性

[0094] 如先前描述的那样实施阻断测定法,该阻断测定法用于测量血清抗体抑制NV VLP结合H型1或H型3合成碳水化合物的能力(Reeck等(2010) *J Infect Dis*, Vol. 202(8):1212-1218)。简言之,将用于阻断测定法的NV VLP与等体积的血清一起温育,并从1:25的起始稀释起连续稀释两倍。将经Neutravidin包被的、96孔微量滴定板

清洗,并用 2.5 μ g/mL 合成的多价 H 型 1-PAA-生物素或多价 H 型 3-PAA-生物素包被。添加血清-VLP 溶液。将板清洗,并添加对 NVVLP 特异性的家兔多克隆血清,清洗,并接着与偶联辣根过氧化物酶的山羊抗家兔 IgG 一起温育。用四甲基联苯胺过氧化物酶液体底物显现颜色,并用 1M 磷酸停止。于 450 测量光密度。实施阳性和阴性对照。测定 50% 阻断滴度 (BT50),其定义为 OD 读数(在扣除空白后)是阳性对照的 50% 的滴度。数值 12.5 归入具有小于 25 的 BT50 的样品。测定每组的几何均值滴度 (GMT),几何均值倍数增加 (GMFR) 和血清响应率。血清响应定义为与免疫前滴度相比抗体滴度升高 4 倍。使用阻断对照血清样品作为内部对照。使用用于阻断测定法的相同方案实施确认阻断特异性的测定法,只是:在用碳水化合物包被后,在没有与 VLP 首先预温育的情况下在板上直接温育血清。在清洗后,如用于阻断测定法一样,在板上温育并检测 VLP,。

[0095] 诺如病毒血凝反应抗体抑制 (HAI) 测定法

[0096] 对疫苗诱导的抗体检查抑制诺如病毒 VLP 的 O 型人 RBC 血凝反应的能力,如先前描述的 (El Kamary 等 (2010) *J Infect Dis*, Vol. 202(11):1649-58)。HAI 滴度以抑制具有紧凑阴性 RBC 样式的血凝反应的最高稀释的倒数计算,并且以 GMT、GMFR 和 ≥ 4 倍的增加呈现。

[0097] 将诺如病毒 GI.1 和 GII.4VLP 分开连续稀释,并在 96 孔 V 底板中与等体积的 0.5% 人 RBC 悬浮液一起温育。通过返滴定测定并确认与 4 个 HA 单位对应的诺如病毒 VLP 抗原量。将测试血清于 56°C 热灭活 30 分钟,并用新鲜制备的 25% 高岭土悬浮液处理。为了消除血清抑制剂,将测试样品用 RBC 预吸附。如下实施 HAI 测定法:将预处理的血清(在 pH5.5 的 PBS 中稀释 2 倍)添加至 96 孔 V 板,并与等体积的含有 4 个 HA 单位的诺如病毒 GI.1 和 GII.4VLP 抗原分别温育。将 0.5%RBC 悬浮液添加至每孔,并将板于 4°C 再温育 90 分钟。仅含有 PBS 或抗原而无血清的孔分别充当阴性和阳性对照。测定每组的几何均值滴度 (GMT)、几何均值倍数增加 (GMFR) 和血清响应率。血清响应定义为与免疫前滴度相比抗体滴度升高 4 倍。

[0098] 抗体分泌性细胞测定法

[0099] 在施用 IM 诺如病毒二价 VLP 疫苗或安慰剂后第 0 天,第 7+3 天,第 28+3 天,和第 35+3 天从约 60mL 抗凝固血液分离 PBMC。获得约 25mL 用于新鲜 PBMC 测定法的血液和 35mL 用于冷冻保存 PBMC 的血液。ASC 测定法检测分泌针对诺如病毒 VLP 的抗体的细胞 (Tacket 等 (2000) *J. Infect. Dis.*, Vol. 182:302-305; Tacket 等 (2003) *Clin. Immunol.*, Vol. 108:241-247; El Kamary 等 (2010) *J Infect Dis*, Vol. 202(11):1649-58)。对新鲜的 PBMC 评估 ASC 频率并且以测定来自受试者子集的归巢标志物。对来自参与分组 A 的受试者的冷冻保存的 PBMC 评估 ASC 频率。描述了每组的每个时间点时每 10^6 个 PBMC 的 ASC 的响应率和均值数值。阳性应答定义为高于所有受试者和至少 8 个 ASC 点的均值疫苗接种前计数至少 3 个标准差 (SD) (以对数度量计)的每 10^6 个 PBMC 的疫苗接种后 ASC 计数,其对应于培养基刺激的阴性对照孔 (2 个点) 的均值加 3 个 SD,如在类似的测定法中测定的。

[0100] 诺如病毒病毒特异性记忆 B 细胞的测量

[0101] 仅在分组 A 受试者(在第 0 天,第 28 天,第 56 天和第 180 天约 25mL) 中收集抗凝固血液以使用先前进行体外抗原刺激的 ELISpot 测定法在疫苗接种后第

0 天, 第 28 天, 第 56 天和第 180 天测量记忆 B 细胞 (Crotty 等 (2004) *J. Immunol. Methods*, Vol. 286:111-122. ; Li 等 (2006) *J. Immunol. Methods*, Vol. 313:110-118)。将外周血单个核细胞 (5×10^6 个细胞 / mL, 24 孔板中的 1 mL / 孔) 与诺如病毒 GI. 1 和 GII. 4VLP 抗原分开一起温育 4 天, 以容许抗原特异性记忆 B 细胞的克隆扩充和分化成抗体分泌性细胞。对照包括在缺乏抗原时在相同条件中温育的细胞和 / 或与无关抗原一起温育的细胞。在刺激后, 将细胞清洗, 计数, 并转移至用诺沃克 VLP 包被的 ELISpot 板。为了对总 Ig 分泌性 B 淋巴细胞测定病毒特异性记忆 B 细胞的频率, 还将扩充的 B 细胞添加至用抗人 IgG 和抗人 IgA 抗体包被的孔。用经 HRP 标记的抗人 IgG 或抗人 IgA, 接着是合适的底物揭示结合的抗体。还使用与 IgA 和 IgG 亚类 (IgA1, IgA2 和 IgG1-4) 的偶联物来测定抗原特异性亚类应答, 其可以与独特的效应器机制和免疫引发的位置相关。用 ELISpot 阅读器计算点。通过流式细胞术检查每名受试者的扩充细胞群体以确认其记忆 B 细胞表型, 即 CD19+, CD27+, IgG+, IgM+, CD38+, IgD, 等等 (Crotty 等 (2004) *J. Immunol. Methods*, Vol. 286:111-122. ; Li 等 (2006) *J. Immunol. Methods*, Vol. 313:110-118)。

[0102] 细胞免疫应答

[0103] 将来自分组 A 中受试者的抗凝固血液 (在第 0 天, 第 28 天, 第 56 天和第 180 天约 25 mL) 以编码的标本收集, 并且将 PBMC 分离并在液氮中冷冻保存, 用于对诺如病毒 GI. 1 和 GII. 4VLP 抗原的 CMI 应答的可能的未来评估。实施的测定法包括对诺如病毒 GI. 1 和 GII. 4VLP 抗原的 PBMC 增殖和细胞因子应答, 其依照建立的技术 (Samandari 等 (2000) *J. Immunol.*, Vol. 164:2221-2232; Tacket 等 (2003) *Clin. Immunol.*, Vol. 108:241-247) 通过测量干扰素 (IFN)- γ 和白介素 (IL)-4 水平等进行。还评估了 T 细胞应答。

[0104] 结果

[0105] 安全性评估包括每剂后局部和系统性请求症状持续 7 天和非请求症状持续 28 天。对严重不利事件监测 12 个月。用每次疫苗接种之前和之后获得的血清在泛-ELISA 抗体 (组合的 IgG, IgA 和 IgM) 方面评估免疫原性以及经由 Elispot 在 IgG 和 IgA 抗体分泌性细胞 (ASC) 方面评估外周血单个核细胞 (PBMC)。

[0106] 分组 A 已经登记所有四个剂量组, 从所有四个剂量组 (总共 40 名受接种者) 可得到剂量 2 后安全性数据。在 40 名受接种者中, 疼痛或压痛是任一剂后报告的最常见局部症状, 而肿胀或发红是不常见的。没有报告严重的局部症状。小于半数的受接种者报告任一剂后头痛、肌痛或不适的系统性症状。没有受接种者报告发热。没有报告相关 SAE。

[0107] 如图 1-3 中显示的, 在第一剂最低剂量 ($5 \mu\text{g}$ GI. 1 + $5 \mu\text{g}$ GII. 4VLP) 后 7 天针对这两种 VLP 抗原观察到强力的泛-ELISA 抗体回忆应答 (组合的 IgG, IgA, 和 IgM)。第二剂没有加强剂量 1 后应答。对分开测量的抗原特异性血清 IgG 和血清 IgA 应答观察到类似的结果 (图 4-9)。对针对这两种抗原的抗体应答观察到剂量依赖性应答 (图 1-9)。然而, 对 GI. 1VLP 的最大应答表现为比对 GII. 4VLP 的最大应答以更低剂量实现 ($15 \mu\text{g}$ 对 $50 \mu\text{g}$)。令人感兴趣地, 单剂肌肉内施用的诺如病毒二价疫苗诱导比由两剂包含高 20 倍的 VLP 剂量的鼻内施用单价 VLP 疫苗诱导的滴度大得令人惊讶, 显著的抗原特异性抗体滴度 (图 10 ; 比较 LV03-1045 μg 组与 LV01-103100 μg 组)。此外, 低剂量 ($5 \mu\text{g}$) IM 二价诺如病毒疫苗产生与在暴露于天然诺如病毒的人中诱导的滴度相似的诺如病毒特异性抗体滴度 (图 10)。

[0108] 在第一剂最低剂量 ($5 \mu\text{g}$) 后 7 天对这两种 VLP 抗原也都观察到强力的 IgG 和 IgA

Elispot 应答(表 2)。值得注意地,抗体分泌性细胞 (ASC) 应答相对于 IgG,偏向于 IgA,并且 ASC 展现出粘膜归巢 ($\alpha 4/\beta 7$) 和趋化因子 (CCR10) 受体表型,如通过流式细胞术评估的(图 11 ;表 3)。如表 3 中显示的,与双重粘膜 / 外周归巢标志物 ($\beta 7+$, CD62L+) 相比,更大数目的 ASC 展现出粘膜归巢标志物 ($\beta 7+$, CD62L-)。表 4 显示了每 10^6 个外周血单核细胞的响应 VLP 抗原的记忆 B 细胞的百分比。与双重粘膜 / 外周或外周归巢标志物相比,更大百分比的抗原特异性记忆 B 细胞也表达粘膜归巢标志物。在接受 $15 \mu g$ 和 $50 \mu g$ 剂量的接受者中也观察到类似的应答(表 2-4)。

[0109] 表 2 :第 7 天, PBMC 应答的表征。抗体的近似值

[0110] 分泌性细胞(ASC) / 百万个 CD19+ 细胞

[0111]

| | ASC/百万个CD19+细胞-第7天 | | | | 疫苗应答百分比 | | 疫苗特异性 |
|-------------------------------|--------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|----------------|-----------------------|
| | IgA GI.1 | IgG GI.1 | IgA GII.4 | IgG GII.4 | 对GI.1 特异性 | 对 GII.4 特异性 | 占总循环 PBMC 的 百分比 |
| 诺如病毒特异性B细胞 | | | | | | | |
| 几何均值 A1 5 μg 剂量(n=5) | 30947 | 13807 | 10947 | 3945 | 4.48% | 1.49% | 5.96% |
| 标准差A1 5 μg 剂量 | 6674 | 9780 | 3651 | 2261 | | | |
| 几何均值 A2 15 μg 剂量(n=4) | 25296 | 17004 | 7108 | 4336 | 4.23% | 1.14% | 5.37% |

[0112]

| | ASC/百万个CD19+细胞-第7天 | | | | 疫苗应答百分比 | | 疫苗特异性 |
|-------------------------------|--------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|----------------|----------------------|
| 诺如病毒特异性B细胞 | IgA GI.1 | IgG GI.1 | IgA GII.4 | IgG GII.4 | 对GI.1 特异性 | 对 GII.4 特异性 | 占总循环 PBMC的 百分比 |
| 标准差A2 15 μ g剂量 | 10846 | 18770 | 6055 | 5697 | | | |
| 几何均值 A3 50 μ g剂量(n=4) | 36158 | 20572 | 14103 | 2549 | 5.67% | 1.67% | 7.34% |
| 标准差A3 50 μ g剂量 | 11470 | 418 | 7627 | 2230 | | | |
| 几何均值 A4 150 μ g剂量(n=4) | 34183 | 9566 | 26213 | 11310 | 4.37% | 3.75% | 8.13% |
| 标准差A4 150 μ g剂量 | 32938 | 4466 | 89769 | 15226 | | | |
| 安慰剂(n=2) | 0 | 152 | 0 | 108 | 0.02% | 0.01% | 0.03% |

[0113]

表3: 通过流式细胞术得到的疫苗和安慰剂接受者中的ASC标志物-第7天

| | 占为 CD27+ 和 CD38+ 的总 CD19+B细胞的% | 占 % 总 CD27+, CD38+, CCR10+ β 7+, CD62L-的% | 占 % 总 CD27+, CD38+, CCR10+ β 7+, CD62L+的% | 百分比, 总ASC CD27+, CD38+, CCR10+, β 7+ CD62L(+)和(-) | 每百万个细胞 *CD27+, CD38+, CCR10+ β 7+ CD62L(+)和(-)的总疫苗特异性 | 占总*循环PBMC 粘膜归巢的疫苗 特异性百分比 |
|-------------------|--------------------------------|---|---|---|---|--------------------------|
| 几何均值A1 | 25.10% | 6.86% | 1.06% | 2.78% | 1656 | 0.17% |
| 5 μ g剂量(n=5) | | | | | | |
| 标准差A1 | 10.45 | 3.13 | 1.01 | | | |
| 5 μ g剂量 | | | | | | |
| 几何均值A2 | 12.99% | 16.98% | 2.43% | 4.63% | 1355 | 0.14% |
| 15 μ g剂量(n=4) | | | | | | |
| 标准差A2 | 9.13 | 1.56 | 0.23 | | | |
| 15 μ g剂量 | | | | | | |
| 几何均值A3 | 31.71% | 26.43% | 3.63% | 12.01% | 23915 | 2.39% |
| 50 μ g剂量(n=4) | | | | | | |
| 标准差A3 | 6.32 | 1.82 | 1.38 | | | |
| 50 μ g剂量 | | | | | | |
| 几何均值A4 | 33.46% | 30.06% | 5.68% | 15.74% | 31350 | 3.14% |

[0114]

| | | | | | | |
|--------------|--------------------------------|---|---|--|--|--------------------------|
| | 占为 CD27+ 和 CD38+ 的总 CD19+B细胞的% | 占 % 总 CD27+, CD38+, CCR10+β7+, CD62L-的% | 占 % 总 CD27+, CD38+, CCR10+β7+, CD62L+的% | 百分比, 总ASC CD27+, CD38+, CCR10+, β7+ CD62L(+)和(-) | 每百万个细胞 *CD27+, CD38+, CCR10+,β7+ CD62L(+)和(-)的 总体疫苗特异性 | 占总*循环PBMC 粘膜归巢的疫苗 特异性百分比 |
| 150μg剂量(n=4) | | | | | | |
| 标准差A4 | 9.86 | 2.97 | 1.70 | | | |
| 150μg剂量 | | | | | | |
| 安慰剂(n=2) | 1.26% | 22.00% | 0.87% | 1.20% | 5 | 0.001% |

* 假设大多数ASC是诺如病毒特异性的。

表4: 疫苗和安慰剂接受者中的记忆B细胞应答-第7天

| | | | | | | |
|--------|--------------------------------------|---|---|--|--|--------------------------|
| | 占为 CD27+, CD38+, CD138+ 的总CD19+B细胞的% | 占 % 总 CD27+, CD38+, CD138+, CCR10+β7+, CD62L-的% | 占 % 总 CD27+, CD38+, CD138+, CCR10+β7+, CD62L+的% | 百分比, 总记忆 CD27+, CD38+, CD138+, CCR10+,β7+ CD62L(+)和(-) | 每百万个细胞 *CD27+, CD38+, CD138+, CCR10+,β7+ CD62L(+)和(-)的 总体疫苗特异性 | 占总*循环PBMC 粘膜归巢的疫苗 特异性百分比 |
| | | | | | | |
| 几何均值AI | N/D | N/D | N/D | N/D | N/D | N/D |

[0115]

| | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-------|--------|-------|-------|--|------|--|-------|--|--|--|--|
| 5µg剂量 | | | | | | | | | | | | |
| 几何均值 A2 15µg剂量(n=4) | 1.54% | 11.58% | 1.92% | 0.21% | | 61 | | 0.01% | | | | |
| 标准差A2 15µg剂量 | 1.54 | 3.94 | 0.94 | | | | | | | | | |
| 几何均值 A3 50µg剂量(n=4) | 3.31% | 16.10% | 4.60% | 0.68% | | 1364 | | 0.14% | | | | |
| 标准差A3 50µg剂量 | 1.11 | 2.16 | 0.97 | | | | | | | | | |
| 几何均值 A4 150µg剂量(n=4) | 1.56% | 16.90% | 8.10% | 0.39% | | 778 | | 0.08% | | | | |
| 标准差A4 150µg剂量 | 0.22 | 3.26 | 4.57 | | | | | | | | | |
| 安慰剂(n=1) | 0.10% | 12.50% | 0.00% | 0.01% | | 0 | | 0% | | | | |

* 假设大多数ASC是诺如病毒特异性的。

[0116] 在由于不能在体外培养诺如病毒而缺乏可用的直接病毒中和测定法的情况下,进行充当病毒中和测定法替代的功能性测定法以测量受接种者中的功能性抗体。

[0117] 使用上文描述的碳水化合物 H 抗原阻断活性测定法,测量由疫苗诱导的血清抗体介导的对 GI. 1VLP 结合 H 抗原的抑制。数据在表 5 中以几何均值倍数增加 (GMFR) 和血清响应(4 倍升高),且在表 6 中以几何均值滴度 (GMT) 呈现。令人惊讶地,在仅一次肌肉内注射疫苗配制剂后,在所有剂量组中观察到显著的碳水化合物阻断活性;实际上,与剂量 1 后水平相比,第二剂疫苗的施用没有显著提高阻断活性。在贯穿整个测试期间维持对结合活性的抑制,直至剂量 1 后 56 天。

[0118] 表 5 :碳水化合物阻断活性 (HBGA BT50)、抗诺如病毒 GI. 1 几何均值倍数增加 (GMFR) 和血清响应(4 倍升高)

[0119]

| | | 研究日 | | | | | | | | | | | |
|------------------|---|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|---------------------|------------------------|---------------------|------------------------|----------------------|----------------------|----------|----------|
| | | 剂量1后7天 | | 剂量1后21天 | | 剂量1后28天 (剂量2前) | | 剂量2后7天 (剂量1后35天) | | 剂量2后28天 (剂量1后56天) | | | |
| 处理组 | N | GMFR | 4倍升 | GMFR | 4倍升 | GMFR | 4倍升 | GMFR | 4倍升 | GMFR | 4倍升 | GMFR | 4倍升 |
| | | (95% CI) | (95% CI) | (95% CI) | (95% CI) | (95% CI) | (95% CI) | (95% CI) | (95% CI) | (95% CI) | (95% CI) | (95% CI) | (95% CI) |
| 5/5 mcg VLP 疫苗 | 9 | 26.6 (8.3, 85.1) | 88.9 (51.8, 99.7) | 25.1 (8.9, 70.3) | 88.9 (51.8, 99.7) | 19.7 (8.2, 47.1) | 100.0 (66.4, 100.0) | 20 (7.7, 51.7) | 88.9 (51.8, 99.7) | 16.6 (5.7, 48.1) | 77.8 (40.0, 97.2) | | |
| 15/15 mcg VLP 疫苗 | 8 | 33.2 (13.6, 80.8) | 100.0 (63.1, 100.0) | 25.5 (10.5, 61.8) | 100.0 (63.1, 100.0) | 18.5 (8.4, 40.6) | 100.0 (63.1, 100.0) | 22.2 (8.8, 56) | 100.0 (59.0, 100.0) | 8.4 (2.4, 29.6) | 57.1 (18.4, 90.1) | | |

[0120]

| | | 研究日 | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|----|-------------------------|---------------------------|----|-------------------------|---------------------------|----|-------------------------|---------------------------|----|-------------------------|---------------------------|---|------------------------|---------------------------|--|
| | | 剂量1后7天 | | | 剂量1后21天 | | | 剂量1后28天 (剂量2前) | | | 剂量2后7天 (剂量1后35天) | | | 剂量2后28天 (剂量1后56天) | | |
| 处理组 | N | GMFR | 4倍升 高 | N | GMFR | 4倍升 高 | N | GMFR | 4倍升 高 | N | GMFR | 4倍升 高 | N | GMFR | 4倍升 高 | |
| | | (95% CI) | (95% CI) | | (95% CI) | (95% CI) | | (95% CI) | (95% CI) | | (95% CI) | (95% CI) | | (95% CI) | (95% CI) | |
| 50/50 mcg VLP 疫 苗 | 10 | 38.6 (18.3, 81.6) | 100.0 (69.2, 100.0) | 10 | 27.9 (13.4, 58) | 100.0 (69.2, 100.0) | 10 | 20.9 (10, 43.5) | 100.0 (69.2, 100.0) | 10 | 19 (9.9, 36.4) | 100.0 (69.2, 100.0) | 9 | 10.2 (4.6, 22.8) | 77.8 (40.0, 97.2) | |
| 150/150 mcg VLP 疫 苗 | 7 | 30.6 (16.3, 57.6) | 100.0 (59.0, 100.0) | 8 | 19.4 (13.1, 28.5) | 100.0 (63.1, 100.0) | 8 | 16.3 (11.7, 22.6) | 100.0 (63.1, 100.0) | 8 | 18.8 (12.8, 27.5) | 100.0 (63.1, 100.0) | 8 | 23.8 (17, 33.3) | 100.0 (63.1, 100.0) | |
| 安慰剂 | 8 | 0.9 (0.8, 1) | 0.0 (0.0, 36.9) | 8 | 0.8 (0.7, 1.1) | 0.0 (0.0, 36.9) | 8 | 0.8 (0.6, 1.1) | 0.0 (0.0, 36.9) | 8 | 0.8 (0.7, 1.1) | 0.0 (0.0, 36.9) | 8 | 0.6 (0.3, 1.2) | 0.0 (0.0, 36.9) | |

基于接受两剂研究产品的所有受试者的结果。

由于可能的标本混乱而排出两名受试者的数据点；这些数据点之一是基线标本，导致没有倍数增加数据的受试者可用于任何时间点。

[0121] 表 6 :碳水化合物阻断活性 (HBGA BT50), 抗诺如病毒 GI.1 几何均值滴度 (GMT)

[0122]

| | | 研究日 | | | | | | |
|--|--|------|--------|---------|-------------------|-------------------------|--------------------------|--|
| | | 剂量1前 | 剂量1后7天 | 剂量1后21天 | 剂量1后28天 (剂量2前) | 剂量2后7天 (剂量1后35 天) | 剂量2后28天 (剂量1后56 天) | |

[0123]

| 处理组 | N | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) |
|--------------------------|----|-------------------------|----|---------------------------|----|----------------------------|----|----------------------------|----|----------------------------|---|----------------------------|
| 5/5 mcg VLP疫苗 | 9 | 28.9 (12.7, 65.9) | 9 | 768.5 (344.1, 1716) | 9 | 723.7 (398.1, 1316) | 9 | 568 (321.8, 1003) | 9 | 577.1 (351.2, 948.3) | 9 | 478.3 (293.3, 780.1) |
| 15/15 mcg VLP疫苗 | 8 | 24.9 (12.7, 48.7) | 8 | 826.1 (524.9, 1300) | 8 | 634.3 (285.9, 1407) | 8 | 459.8 (225.3, 938.6) | 7 | 610.3 (354.6, 1050) | 7 | 230.9 (105.2, 506.7) |
| 50/50 mcg VLP疫苗 | 10 | 17.3 (9.9, 30.3) | 10 | 669.2 (329.1, 1361) | 10 | 483.7 (258.7, 904.2) | 10 | 362.4 (192.9, 680.7) | 10 | 328.9 (191.9, 563.8) | 9 | 184 (97.2, 348.3) |
| 150/150 mcg VLP疫 苗 | 8 | 15.5 (11.1, 21.8) | 7 | 435 (262.5, 720.8) | 8 | 300.7 (173.9, 520) | 8 | 252.7 (146.7, 435.2) | 8 | 291.5 (171.5, 495.4) | 8 | 369.7 (233.8, 584.6) |
| 安慰剂 | 8 | 29 (9.1, 92.8) | 9 | 24.6 (9.8, 62.1) | 9 | 22.5 (8.8, 57.3) | 9 | 22.2 (8.9, 55.5) | 8 | 24.6 (8.4, 72.6) | 8 | 18.3 (10.1, 33.3) |

基于接受两剂研究产品的所有受试者的结果。

由于可能的标本混乱而排出两名受试者的数据点。

[0124] 类似地,测量针对 GII. 4VLP 的血清抗体的碳水化合物阻断活性。在所有剂量给药组中观察到显著的应答,如通过 GMFR 和血清响应(表 7)及 GMT (表 8)测量的。与上文描述的抗体介导的 GI. 1 结合阻断相似,在仅一剂后检测到对 GII. 4VLP 碳水化合物结合活性的强力阻断,并且第二剂没有表现为增强阻断活性。

[0125] 表 7:碳水化合物阻断活性 (HBGA BT50)、抗诺如病毒 GII. 4 几何均值倍数增加 (GMFR) 和血清响应(4 倍升高)

[0126]

| 处理组 | N | 研究日 | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|----|------------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|---|----------------------|-------------------------|
| | | 剂量1后7天 | | 剂量1后21天 | | 剂量1后28天 (剂量2前) | | 剂量2后7天 (剂量1后35天) | | 剂量2后28天 (剂量1后56天) | | | | | |
| | | GMFR (95% CI) | 4倍 升高 (95% CI) | GMFR (95% CI) | 4倍 升高 (95% CI) | GMFR (95% CI) | 4倍 升高 (95% CI) | GMFR (95% CI) | 4倍 升高 (95% CI) | GMFR (95% CI) | 4倍 升高 (95% CI) | | | | |
| 5/5 mcg VLP 疫 苗 | 9 | 5 (1.6, 16.1) | 33.3 (7.5, 70.1) | 9 | 5.9 (1.7, 20.3) | 55.6 (21.2, 86.3) | 9 | 4.7 (1.4, 15.7) | 44.4 (13.7, 78.8) | 9 | 4.7 (1.6, 13.8) | 44.4 (13.7, 78.8) | 9 | 5 (1.6, 15.9) | 55.6 (21.2, 86.3) |
| 15/15 mcg VLP 疫 苗 | 8 | 11 (2.7, 45.3) | 62.5 (24.5, 91.5) | 8 | 9.2 (3, 27.9) | 62.5 (24.5, 91.5) | 8 | 7.4 (2.5, 21.8) | 62.5 (24.5, 91.5) | 7 | 7 (2.1, 23) | 57.1 (18.4, 90.1) | 7 | 5.6 (2.3, 14) | 57.1 (18.4, 90.1) |
| 50/50 mcg VLP 疫 苗 | 10 | 18.6 (4.9, 70.8) | 70.0 (34.8, 93.3) | 10 | 12.2 (3.8, 39.4) | 70.0 (34.8, 93.3) | 10 | 8.4 (2.9, 24.1) | 70.0 (34.8, 93.3) | 10 | 8.7 (2.9, 26.1) | 70.0 (34.8, 93.3) | 9 | 5.2 (2.2, 12) | 66.7 (29.9, 92.5) |
| 150/150 mcg VLP 疫 苗 | 7 | 10.1 (2, 51.8) | 57.1 (18.4, 90.1) | 8 | 5.5 (1.9, 16.5) | 50.0 (15.7, 84.3) | 8 | 4.4 (1.6, 12.2) | 50.0 (15.7, 84.3) | 8 | 4.3 (1.7, 10.7) | 37.5 (8.5, 75.5) | 8 | 3.1 (1.3, 7.2) | 25.0 (3.2, 65.1) |
| 安慰剂 | 8 | 1 (0.9, 1.1) | 0.0 (0.0, 36.9) | 8 | 1.1 (1, 1.3) | 0.0 (0.0, 36.9) | 8 | 1.3 (0.9, 2.1) | 12.5 (0.3, 52.7) | 8 | 1.8 (0.5, 6.7) | 12.5 (0.3, 52.7) | 8 | 2 (0.7, 6.1) | 12.5 (0.3, 52.7) |

基于接受两剂研究产品的所有受试者的结果。

由于可能的标本混乱而排出两名受试者的数据点；这些数据点之一是基线标本，导致没有倍数增加数据的受试者可用于任何时间点。

[0127] 表 8 :碳水化合物阻断活性 (HBGA BT50), 抗诺如病毒 GII. 4 几何均值滴度 (GMT)

[0128]

| 处理组 | 研究日 | | | | | | | | | | | |
|----------------------|------|--------------------|--------|----------------------|---------|----------------------|-------------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | 剂量1前 | | 剂量1后7天 | | 剂量1后21天 | | 剂量1后28天 (剂量2前) | | 剂量2后7天 (剂量1后35天) | | 剂量2后28天 (剂量1后56天) | |
| | N | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) |
| 5/5 mcg VLP疫苗 | 9 | 40.3 (18, 90) | 9 | 202.1 (106.3, 384.3) | 9 | 236.9 (133.4, 420.6) | 9 | 189.7 (108.6, 331.3) | 9 | 188.7 (118.7, 300.1) | 9 | 201.6 (116.4, 349.5) |
| 15/15 mcg VLP疫苗 | 8 | 23.7 (12.8, 43.8) | 8 | 260.1 (95.1, 711.1) | 8 | 218.1 (104.2, 456.3) | 8 | 175.4 (82.7, 372) | 7 | 182.3 (89.1, 372.8) | 7 | 146.3 (92.4, 231.5) |
| 50/50 mcg VLP疫苗 | 10 | 28.4 (13.1, 61.5) | 10 | 527.2 (271.1, 1025) | 10 | 345.2 (195.5, 609.6) | 10 | 238.3 (139.4, 407.3) | 10 | 246.5 (138.7, 438.2) | 9 | 160.2 (107.4, 238.8) |
| 150/150 mcg VLP疫苗 | 8 | 63 (24.8, 160.4) | 7 | 721.8 (344.6, 1512) | 8 | 347.7 (186.1, 649.5) | 8 | 277 (145.6, 527) | 8 | 267.9 (158.7, 452.2) | 8 | 193.5 (121.6, 308.2) |
| 安慰剂 | 8 | 24.1 (12.9, 45) | 9 | 22.8 (12.6, 41.6) | 9 | 24.9 (12.7, 48.7) | 9 | 29.1 (15.1, 56.1) | 8 | 44 (12.6, 154.2) | 8 | 48.2 (16.7, 139.5) |

基于接受两剂研究产品的所有受试者的结果。

由于可能的标本混乱而排出两名受试者的数据点。

[0129] 还利用血凝反应抑制测定法 (HAI) 来测试针对靶诺如病毒 VLP 抗原的来自接种疫苗的受试者的血清抗体应答。与碳水化合物 H 抗原结合研究相似, 仅一剂 VLP 疫苗诱导在所有剂量给药组中抑制血凝反应的抗体, 如通过 GMFR (表 9)、4 倍升高 (表 9)、和 GMT (表 10) 测量的。虽然血凝反应抑制水平维持到测试的最后一天 (剂量 2 后 28 天, 剂量 1 后 56 天), 但是第二剂 VLP 疫苗没有表现为增强疫苗诱导的抗体介导的对血凝反应的抑制。

[0130] 表 9 :血凝反应抑制测定法抗诺如病毒 GI.1 几何均值倍数增加 (GMFR) 和血清响应 (4 倍升高)

[0131]

| 处理组 | N | 研究日 | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|----|-----------------------|---------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------------|---|------------------------|---------------------------|
| | | 剂量1后7天 | | 剂量1后21天 | | 剂量1后28天 (剂量2前) | | 剂量2后7天 (剂量1后35天) | | 剂量2后28天 (剂量1后56天) | | | | | |
| | | GMFR (95% CI) | 4倍升 高 (95% CI) | GMFR (95% CI) | 4倍升 高 (95% CI) | GMFR (95% CI) | 4倍升 高 (95% CI) | GMFR (95% CI) | 4倍升 高 (95% CI) | GMFR (95% CI) | 4倍升 高 (95% CI) | | | | |
| 5/5 mcg VLP 疫 苗 | 9 | 5.4 (3, 9.8) | 77.8 (40.0, 97.2) | 9 | 7 (4.6, 10.7) | 88.9 (51.8, 99.7) | 9 | 6.1 (4.1, 9.3) | 88.9 (51.8, 99.7) | 9 | 6 (3.7, 9.5) | 77.8 (40.0, 97.2) | 9 | 6.3 (3.9, 10.3) | 88.9 (51.8, 99.7) |
| 15/15 mcg VLP 疫 苗 | 8 | 8.9 (4.4, 18) | 100.0 (63.1, 100.0) | 8 | 9.5 (4, 22.5) | 87.5 (47.3, 99.7) | 8 | 7.1 (3.1, 16.1) | 75.0 (34.9, 96.8) | 7 | 8.5 (4.1, 17.7) | 85.7 (42.1, 99.6) | 7 | 8.1 (4.4, 15.2) | 100.0 (59.0, 100.0) |
| 50/50 mcg VLP 疫 苗 | 10 | 22.4 (11.6, 43) | 100.0 (69.2, 100.0) | 10 | 16.7 (9.3, 29.8) | 100.0 (69.2, 100.0) | 10 | 13.9 (8.1, 24) | 100.0 (69.2, 100.0) | 10 | 14.5 (9.3, 22.7) | 100.0 (69.2, 100.0) | 9 | 11.8 (6.3, 21.9) | 100.0 (66.4, 100.0) |
| 150/150 mcg VLP 疫 苗 | 7 | 12.6 (5.7, 28) | 85.7 (42.1, 99.6) | 8 | 11.1 (6.4, 19.3) | 100.0 (63.1, 100.0) | 8 | 8.4 (5, 14) | 100.0 (63.1, 100.0) | 8 | 8.4 (5, 14) | 100.0 (63.1, 100.0) | 8 | 7.3 (4.5, 11.9) | 100.0 (63.1, 100.0) |

[0132]

| | | 研究日 | | | | | | | | | | | | | |
|-----|---|---------------------------|-----------------|---------------------------|--------------|---------------------------|-----|---------------------------|-----------------|---------------------------|----------------|---------------------------|-----|--------------|-----------------|
| | | 剂量1后7天 | | | 剂量1后21天 | | | 剂量1后28天 (剂量2前) | | 剂量2后7天 (剂量1后35天) | | 剂量2后28天 (剂量1后56天) | | | |
| 处理组 | N | 4倍升 GMFR 高 (95% CI) | | 4倍升 GMFR 高 (95% CI) | | 4倍升 GMFR 高 (95% CI) | | 4倍升 GMFR 高 (95% CI) | | 4倍升 GMFR 高 (95% CI) | | 4倍升 GMFR 高 (95% CI) | | | |
| | | N | CI) | CI) | N | CI) | CI) | N | CI) | CI) | N | CI) | CI) | N | CI) |
| 安慰剂 | 8 | 1 (0.8, 1.2) | 0.0 (0.0, 36.9) | 8 | 1 (0.9, 1.2) | 0.0 (0.0, 36.9) | 8 | 1 (0.9, 1.1) | 0.0 (0.0, 36.9) | 8 | 0.9 (0.7, 1.1) | 0.0 (0.0, 36.9) | 8 | 1 (0.8, 1.2) | 0.0 (0.0, 36.9) |

基于接受两剂研究产品的所有受试者的结果。

由于可能的标本混乱而排出两名受试者的数据点；这些数据点之一是基线标本，导致没有倍数增加数据的受试者可用于任何时间点。

[0133] 表 10 :血凝反应抑制测定法抗诺如病毒 GI. 1 几何均值滴度 (GMT)

[0134]

| | | 研究日 | | | | | | | | | | | |
|--------------------|---|-------------------|-----|---------------------|-----|---------------------|-----|---------------------|-----|---------------------|-----|----------------------|-----|
| | | 剂量1前 | | 剂量1后7天 | | 剂量1后21天 | | 剂量1后28天 (剂量2前) | | 剂量2后7天 (剂量1后35天) | | 剂量2后28天 (剂量1后56天) | |
| 处理组 | N | GMT (95% CI) | | GMT (95% CI) | | GMT (95% CI) | | GMT (95% CI) | | GMT (95% CI) | | GMT (95% CI) | |
| | | N | CI) | N | CI) | N | CI) | N | CI) | N | CI) | N | CI) |
| 5/5 mcg VLP疫苗 | 9 | 26.4 (14.1, 49.4) | 9 | 143.5 (53.6, 383.8) | 9 | 185.3 (88.6, 387.6) | 9 | 162.1 (83.3, 315.6) | 9 | 157 (80.3, 307.1) | 9 | 167.4 (88.4, 316.8) | |
| 15/15 mcg VLP疫苗 | 8 | 11.9 (6.1, 23.4) | 8 | 105.3 (56.1, 197.6) | 8 | 113.1 (42.5, 301.3) | 8 | 84.2 (31.1, 227.6) | 7 | 103.3 (43.3, 246.6) | 7 | 99.2 (46.9, 209.7) | |

[0135]

| 处理组 | 研究日 | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|------|-------------------------|--------|---------------------------|---------|---------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------|---------------------------|----------------------|-----------------------|
| | 剂量1前 | | 剂量1后7天 | | 剂量1后21天 | | 剂量1后28天 (剂量2前) | | 剂量2后7天 (剂量1后35天) | | 剂量2后28天 (剂量1后56天) | |
| | N | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) |
| 50/50 mcg VLP疫苗 | 10 | 7.2 (5.3, 9.6) | 10 | 160 (79.4, 322.6) | 10 | 119.2 (60.4, 235.1) | 10 | 99.7 (51.8, 191.8) | 10 | 103.8 (58.4, 184.5) | 9 | 81.1 (38.8, 169.5) |
| 150/150 mcg VLP疫 苗 | 8 | 9.2 (7.5, 11.3) | 7 | 114.1 (50.9, 255.7) | 8 | 101.6 (62, 166.4) | 8 | 77.2 (51.8, 115) | 8 | 77.2 (51.8, 115) | 8 | 67.3 (44.7, 101.3) |
| 安慰剂 | 8 | 16.8 (10.1, 28.1) | 9 | 16.6 (11.7, 23.7) | 9 | 16.1 (10.7, 24.1) | 9 | 16.6 (11, 25) | 8 | 15.4 (10, 23.7) | 8 | 16.2 (10.8, 24.4) |

基于接受两剂研究产品的所有受试者的结果。

由于可能的标本混乱而排出两名受试者的数据点。

[0136] 对血凝反应的抑制也在靶 VLP 是错配病毒时实现。疫苗诱导的血清抗体抑制休斯顿病毒株 VLP 的血凝反应,如通过 GMFR 和血清响应(表 11)及 GMT (表 12)测量的。在此情况中,较高的 VLP 疫苗提供较强的应答,特别是如通过 4 倍升高或 GMT 测量的。GMFR 和 4 倍升高在靶 VLP 是 2003 年辛辛那提病毒株时也是显著升高的,如仅剂量 1 后 7 天测量的(表 13)。

[0137] 表 11 :血凝反应抑制测定法(休斯顿病毒株 VLP)、抗诺如病毒 GII.4 几何均值倍数增加 (GMFR) 和血清响应(4 倍升高)

[0138]

| | 研究日 | | | | |
|--|--------|---------|-------------------|---------------------|----------------------|
| | 剂量1后7天 | 剂量1后21天 | 剂量1后28天 (剂量2前) | 剂量2后7天 (剂量1后35天) | 剂量2后28天 (剂量1后56天) |
| | | | | | |

[0139]

| 处理组 | N | 4倍 | | N | 4倍 | | N | 4倍 | | N | 4倍 | | N | 4倍 | |
|------------------------------|----|-----------------------|-------------------------|----|----------------------|-------------------------|----|----------------------|------------------------|----|----------------------|------------------------|---|----------------------|------------------------|
| | | GMFR (95% CI) | 升高 (95% CI) | | GMFR (95% CI) | 升高 (95% CI) | | GMFR (95% CI) | 升高 (95% CI) | | GMFR (95% CI) | 升高 (95% CI) | | GMFR (95% CI) | 升高 (95% CI) |
| 5/5 mcg VLP 疫 苗 | 9 | 1.2 (1, 1.5) | 0.0 (0.0, 33.6) | 9 | 1.3 (0.9, 1.7) | 0.0 (0.0, 33.6) | 9 | 1.3 (0.9, 1.7) | 0.0 (0.0, 33.6) | 9 | 1.3 (1, 1.7) | 0.0 (0.0, 33.6) | 9 | 1.3 (1, 1.6) | 0.0 (0.0, 33.6) |
| 15/15 mcg VLP 疫 苗 | 8 | 1.7 (0.9, 3) | 12.5 (0.3, 52.7) | 8 | 1.6 (1.1, 2.4) | 12.5 (0.3, 52.7) | 8 | 1.5 (1.1, 2.2) | 0.0 (0.0, 36.9) | 7 | 1.5 (1, 2.2) | 0.0 (0.0, 41.0) | 7 | 1.6 (1.1, 2.4) | 0.0 (0.0, 41.0) |
| 50/50 mcg VLP 疫 苗 | 10 | 2 (0.9, 4.3) | 10.0 (0.3, 44.5) | 10 | 1.6 (0.8, 3.1) | 10.0 (0.3, 44.5) | 10 | 1.7 (0.9, 3.1) | 10.0 (0.3, 44.5) | 10 | 1.5 (0.9, 2.4) | 10.0 (0.3, 44.5) | 9 | 1.3 (0.8, 2) | 11.1 (0.3, 48.2) |
| 150/150 mcg VLP 疫 苗 | 7 | 4.3 (1.5, 12.4) | 57.1 (18.4, 90.1) | 8 | 2.6 (1.2, 5.8) | 50.0 (15.7, 84.3) | 8 | 1.9 (1.1, 3.3) | 12.5 (0.3, 52.7) | 8 | 1.9 (1.1, 3.5) | 12.5 (0.3, 52.7) | 8 | 1.7 (1.1, 2.6) | 12.5 (0.3, 52.7) |
| 安慰剂 | 8 | 1 (0.9, 1.1) | 0.0 (0.0, 36.9) | 8 | 1.1 (0.9, 1.3) | 0.0 (0.0, 36.9) | 8 | 1.1 (1, 1.2) | 0.0 (0.0, 36.9) | 8 | 1.2 (0.8, 1.9) | 12.5 (0.3, 52.7) | 8 | 1.1 (0.7, 1.8) | 12.5 (0.3, 52.7) |

基于接受两剂研究产品的所有受试者的结果。

由于可能的标本混乱而排出两名受试者的数据点；这些数据点之一是基线标本，导致没有倍数增加数据的受试者可用于任何时间点。

[0140] 表 12 : 血凝反应抑制测定法 (休斯顿病毒株 VLP), 抗诺如病毒 GII. 4 几何均值滴度 (GMT)

[0141]

| |
|-----|
| 研究日 |
|-----|

[0142]

| 处理组 | N | 剂量1前 | | 剂量1后7天 | | 剂量1后21天 | | 剂量1后28天 (剂量2前) | | 剂量2后28天 (剂量1后35天) | | 剂量2后7天 (剂量1后56天) | | |
|-------------------|----|-------------------------|----|-------------------------|----|-------------------------|----|-------------------------|----|-------------------------|---|-------------------------|---|-----------------|
| | | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) | N | GMT (95% CI) |
| 5/5 mcg VLP 疫苗 | 9 | 143.5 (97.9, 210.3) | 9 | 177.4 (122.7, 256.5) | 9 | 180.8 (114.4, 285.6) | 9 | 180.8 (114.4, 285.6) | 9 | 189.1 (119.2, 299.9) | 9 | 180.8 (122.7, 266.3) | | |
| 15/15 mcg VLP疫苗 | 8 | 129.8 (86.4, 194.9) | 8 | 218.3 (129.2, 368.8) | 8 | 207.5 (134.8, 319.3) | 8 | 200.2 (132.8, 301.7) | 7 | 169.5 (114.1, 252) | 7 | 187.2 (119.1, 294.2) | | |
| 50/50 mcg VLP疫苗 | 10 | 161.9 (119.7, 219) | 10 | 323.8 (156.5, 669.8) | 10 | 252.5 (130.4, 489.2) | 10 | 273.9 (150.9, 497.2) | 10 | 242.5 (150.2, 391.5) | 9 | 195.2 (125, 304.9) | | |
| 150/150 mcg VLP疫苗 | 8 | 210.6 (108.8, 407.5) | 7 | 853.5 (297.4, 2449) | 8 | 546.2 (237.6, 1255) | 8 | 406.3 (201.5, 819.1) | 8 | 406.3 (180.3, 915.4) | 8 | 354.1 (184.6, 679.5) | | |
| 安慰剂 | 8 | 148.9 (73.8, 300.3) | 9 | 150.1 (80.1, 281.1) | 9 | 157 (77.9, 316.5) | 9 | 167.4 (91.4, 306.4) | 8 | 183.6 (95, 354.5) | 8 | 162.4 (88.5, 297.9) | | |

基于接受两剂研究产品的所有受试者的结果。

由于可能的标本混乱而排出两名受试者的数据点。

[0143] 表 13 :安慰剂对 50/50 μg VLP 疫苗中对血凝反应的抑制

[0144]

| 剂量1后7天按处理组的血凝反应抑制测定法 (2003年辛辛那提病毒株VLP), 抗诺如病毒GII.4几何均值倍数增加(GMFR)和几何血清响应(4倍升高)结果 | | | |
|---|----|-----------------|-------------------|
| 处理组 | N | GMFR (95% CI) | 4倍升高 (95% CI) |
| 安慰剂 | 2 | 1.0 (0.6, 1.8) | 0.0 (0.0, 84.2) |
| 50/50 μg VLP疫苗 | 10 | 4.4 (1.6, 11.9) | 50.0 (18.7, 81.3) |

[0145] 来自此研究的结果证明了二价 IM 诺如病毒 VLP 疫苗一般是耐受良好的。免疫原性数据提示了单一疫苗剂量可以足以保护血清阳性成年人。来自碳水化合物阻断活性和血凝反应抑制测定法的结果提供进一步的证据,即单一疫苗剂量诱导具有有力抗诺如病毒活性的血清抗体。在人中的单一胃肠外剂量后观察到的免疫应答的量级和速度在与以高得多的 VLP 剂量通过多次鼻 VLP 疫苗施用报告的早期免疫应答 (El Kamary 等 (2010) *J Infect Dis*, Vol. 202(11):1649-1658) 相比时是显著的。这些应答也优于由口服施用的诺如病毒 VLP 诱导的那些应答 (Tacket 等 (2003) *Clin Immunol* 108:241-247; Ball 等 (1999, *Gastroenterology* 117:40-48) 及由转基因植物生成的诺如病毒 VLP 诱导的那些应答 (Tacket 等 (2000) *J Infect Dis* 182:302-305)。特别地,此肌肉内疫苗配制剂在免疫的 7 天内产生回忆应答,并且在单剂后观察到最大血清抗体应答,包括显著的 IgA 应答和功能性碳水化合物阻断活性和血凝反应抑制活性。如此,此诺如病毒二价疫苗在人中诱导强的、保护性免疫应答,其优于由任何目前可用的诺如病毒疫苗诱导的免疫应答。

[0146] 实施例 2:人中肌肉内诺如病毒二价病毒样颗粒 (VLP) 疫苗的剂量增加、安全性和免疫原性研究 (LV03-104 研究)

[0147] 以下实施例提供了实施例 1 中描述的临床研究的剩余计划部分,其中在年龄 ≥ 18 岁的成人中对与安慰剂相比四个剂量水平的以单磷酸脂质 A (MPL) 和氢氧化铝 (Al(OH)₃) 为佐剂的肌肉内 (IM) 诺如病毒二价 VLP 疫苗的安全性和免疫原性进行随机化的、多位置、剂量增加研究。相隔 28 天使用 1.5 英寸 (38mm) 针,通过肌肉内 (IM) 注射,受试者会接受两剂疫苗或安慰剂。本实施例意图进一步阐明本发明的原则。

[0148] 分组 A 已经在研究中完成登记,并且在上文实施例 1 中描述。分组 B 含有约 20 名年龄 50-64 岁的受试者。分组 C 含有年龄 65-85 岁的约 30 名受试者。在研究中总体上登记约 98 名受试者。

[0149] 在分组 B 中,将约 20 名年龄 50-64 岁的受试者登记并以 1:1 随机化以接受疫苗 (N=10) 或安慰剂 (N=10)。在剂量 2 后的 7 天后,对分组 B 中的受试者的审阅可得到安全性数据 (研究第 35 天),分组 C 中的受试者适合于接受其初始剂量。在分组 C 中,将约 30 名年龄 65 至 85 岁的受试者登记并以 1:1:1 随机化以接受以 MPL 和 Al(OH)₃ 为佐剂的疫苗 (N=10),或仅以 Al(OH)₃ 为佐剂 (即没有 MPL) 的疫苗 (N=10),或安慰剂 (N=10)。要在分组 C 中评估的两种疫苗配制剂中诺如病毒 VLP 和 Al(OH)₃ 的抗原浓度是相同的;仅 MPL 的存在或缺乏是不同的。

[0150] 诺如病毒二价 VLP 疫苗含有原型基因小组 I,基因型 1 (GI. 1) 和原型基因小组 II,基因型 IV (GII. 4) VLP 作为抗原,和单磷酸脂质 A (MPL) 和氢氧化铝 (Al(OH)₃) 作为佐剂,氯化钠 (NaCl) 和 L-组氨酸 (L-His) 作为缓冲剂 (pH 6.3-6.7),乙醇和注射用水。GII. 4 VLP 包含 SEQ ID NO:1 的衣壳序列,其自三种 GII. 4 株衍生。

[0151] 为了在分组 B 和 C 中进一步评估而选择的单剂疫苗是分组 A 中的最低剂量,其导致一般也耐受良好的最强力且可再现的免疫应答。来自分组 A 中的受试者的第 56 天安全性和免疫原性数据由 CSM/SMC 审阅,并且选择二价剂量以在分组 B 和 C 中评估。

[0152] 对于每剂 IM 诺如病毒二价 VLP 疫苗或对照后第 0 天到第 7 天,受试者保留请求症状的每日记忆辅助,包括 4 种局部注射部位反应,诸如疼痛、压痛、发红、和肿胀,和 10 种系统性体征或症状,包括每日口腔温度,头痛,疲劳,肌肉痛,寒战,关节痛和恶心、呕吐、腹泻、

腹部痛性痉挛 / 疼痛的胃肠症状。对于每次注射后 7 天,每日测量并记录注射部位处的发红和肿胀。

[0153] 在第 7+3 天,第 21+3 天,第 28+3 天,第 35+3 天,第 56+7 天,第 180+14 天,和第 393+14 天的每次随访访问时及在第 265+14 天的随访电话时获得期中病史;关于期中疾病、医生的访问、任何严重不利事件 (SAE)、和任何重大新医学状况的发作询问受试者。在筛选及第 21 天和第 35 天(每剂后约 7 天)对受试者评估具有 WBC 分类和血小板计数的 CBC,和血清 BUN,肌酸酐,葡萄糖,AST,和 ALT,以分别评估连续适任和安全性。

[0154] 在第 0 天疫苗接种前和第 7+3 天,第 21+3 天,第 28+3 天,第 35+3 天,第 56+7 天,第 180+14 天,和第 393+14 天收集来自受试者的血液以通过酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 测量针对 IM 诺如病毒二价 VLP 疫苗的血清抗体(分别为 IgG, IgA, 和 IgM 和组合的)。还测量血清碳水化合物阻断活性和血清 HAI 抗体。

[0155] 使用上文对分组 A 描述的方法来分析自免疫的个体或接受安慰剂的个体收集的血液样品。研究结果会在开发用于施用本发明的疫苗配制剂的临床方案中采用。

[0156] 本发明在范围上不受所描述的具体实施方案的限制,所描述的具体实施方案意图作为本发明各方面的单一例示,而且功能上等同的方法和成分在本发明的范围内。实际上,根据上述描述和附图,只不过使用例行实验,在本文所显示的和所描述的那些之外,对本发明的各种修饰对于本领域技术人员而言会变得显而易见。此类修饰和等同方案意图落在所附权利要求的范围内。

[0157] 通过述及将本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请收入本说明书,其程度就像具体且单独指明通过述及将每一篇单独的出版物、专利或专利申请收入本文一样。

[0158] 本文中对参考文献的引用或讨论不应解释为承认它是本发明的现有技术。

[0159] 参考文献

[0160] 1. Glass, RI, JS Noel, T Ando, RL Fankhauser, G Belloit, A Mounts, UD Parasher, JS Bresee and SS Monroe. The Epidemiology of Enteric Caliciviruses from Human: A Reassessment Using New Diagnostics. *J Infect Dis* 2000; 181 (Sup2): S254-S261.

[0161] 2. Hardy, ME. Norwalk and "Norwalk-like Viruses" in Epidemic Gastroenteritis. *Clin Lab Med* 1999; 19 (3): 675-90.

[0162] 3. Jiang, X, DY Graham, KN Wang, and MK Estes. Norwalk Virus Genome Cloning and Characterization. *Science* 1990; 250: 1580-1583.

[0163] 4. Jiang, X, M Want, DY Graham, and MK Estes. Expression, Self-Assembly, and Antigenicity of the Norwalk Virus Capsid Protein. *J Virol* 1992; 66: 6527-6532.

[0164] 5. Glass, P, LJ White, JM Ball, I Leparco-Goffart, ME Hardy, and MK Estes. Norwalk Virus Open Reading Frame 3 Encodes a Minor Structural Protein. *J Virol* 2000; 74: 6581-6591.

[0165] 6. Lindesmith, L, C Moe, S Marionneau, N Ruvoen, X Jiang, L Lindblad, P Stewart, J LePendou, and R Baric. Human Susceptibility and Resistance to Norwalk Virus Infection. *Nat Med* 2003; 9: 548-553.

[0166] 7. Parrino, TA, DS Schreiber, JS Trier, AZ Kapikian, and NR Blacklow.

Clinical Immunity in Acute Gastroenteritis Caused by Norwalk Agent. *N Engl J Med*1977;297:86-89.

[0167] 8. Wyatt, RG, R Dolin, NR Blacklow, HL DuPont, RF Buscho, TS Thornhill, AZ Kapikian, and RM Chanock. Comparison of Three Agents of Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis by Cross-challenge in Volunteers. *J Infect Dis*1974;129:709.

[0168] 9. Ball, JM, DY Graham, AR Opekum, MA Gilger, RA Guerrero, and MK Estes. Recombinant Norwalk Virus-like Particles Given Orally to Volunteers:Phase I Study. *Gastroenterology*1999;117:40-48.

[0169] 10. Tacket, CO, MB Sztein, GA Losonky, SS Wasserman, and MK Estes. Humoral, Mucosal, and Cellular Immune Responses to Oral Norwalk Virus-like Particles in Volunteers. *Clin Immunol*2003;108:241.

[0170] 11. Guerrero, RA, JM Ball, SS Krater, SE Pacheco, JD Clements, and MK Estes. Recombinant Norwalk Virus-like Particles Administered Intranasally to Mice Induce Systemic and Mucosal(Fecal and Vaginal)Immune Responses. *J Virol*2001;75:9713.

[0171] 12. Nicollier-Jamot, B, A Ogier, L Piroth, P Pothier, and E Kohli. Recombinant Virus-like Particles of a Norovirus(Genogroup II Strain) Administered Intranasally and Orally with Mucosal Adjuvants LT and LT(R192G) in BALB/c Mice Induce Specific Humoral and Cellular Th1/Th2-like Immune Responses. *Vaccine*2004;22:1079-1086.

[0172] 13. Periwal, SB, KR Kourie, N Ramachandaran, SJ Blakeney, S DeBruin, D Zhu, TJ Zamb, L Smith, S Udem, JH Eldridge, KE Shroff, and PA Reilly. A Modified Cholera Holotoxin CT-E29H Enhances Systemic and Mucosal Immune Responses to Recombinant Norwalk Virus-like Particle Vaccine. *Vaccine*2003;21:376-385.

[0173] 14. Isaka, M, Y Yasuda, S Kozuka, T Taniguchi, K Matano, J Maeyama, T Komiya, K Ohkuma, N Goto, and K Tochikubo. Induction of systemic and mucosal antibody responses in mice immunized intranasally with aluminum-non-adsorbed diphtheria toxoid together with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine*1999;18:743-751.

[0174] 15. Kozlowski, PA, S Cu-Uvin, MR Neutra, and TP Flanigan. Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women. *Infect Immun*1997;65:1387-1394.

[0175] 16. Mestecky, J, SM Michalek, Z Moldoveanu, and MW Russell. Routes of immunization and antigen delivery systems for optimal mucosal immune responses in humans. *Behring Inst Mitt*1997;33-43.

[0176] 17. Wu, HY, and MW Russell. Nasal lymphoid tissue, intranasal immunization, and compartmentalization of the common mucosal immune system. *Immunol Res*1997;16:187-201.

- [0177] 18. Evans, JT, CW Cluff, DA Johnson, MJ Lacy, DH Persing, and JR Baldrige. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4ligands MPL adjuvant and Ribi529. *Expert Rev Vaccines*2003;2:219-229.
- [0178] 19. Baldrige, JR, Y Yorgensen, JR Ward, and JT Ulrich. Monophosphoryl lipid A enhances mucosal and systemic immunity to vaccine antigens following intranasal administration[In Process Citation]. *Vaccine*2000;18:2416-2425.
- [0179] 20. Yang, QB, M Martin, SM Michalek, and J Katz. Mechanisms of monophosphoryl lipid A augmentation of host responses to recombinant HagB from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*2002;70:3557-3565.
- [0180] 21. Baldrick, P, D Richardson, G Elliott, and AW Wheeler. Safety evaluation of monophosphoryl lipid A(MPL):an immunostimulatory adjuvant. *Regul Toxicol Pharmacol*2002;35:398-413.
- [0181] 22. Baldrige, JR, P McGowan, JT Evans, C Cluff, S Mossman, D Johnson, and D Persing. Taking a toll on human disease:Toll-like receptor4agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther*2004;4:1129-1138.
- [0182] 23. Persing, DH, RN Coler, MJ Lacy, DA Johnson, JR Baldrige, RM Hershberg, and SG Reed. Taking toll:lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. *Trends Microbiol*2002;10:S32-37.

[0001]

序列表

<110> LigoCyte Pharmaceuticals, Inc.
Richardson, Charles
Bargatze, Robert F.
Mendelman, Paul M.

<120> 胃肠外诺如病毒疫苗配制剂

<130> LIG0-024/01W0

<150> US 61/506,447
<151> 2011-07-11

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 540
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的GII.4 诺如病毒 VP1 氨基酸序列

<400> 1

Met Lys Met Ala Ser Ser Asp Ala Asn Pro Ser Asp Gly Ser Thr Ala
1 5 10 15

Asn Leu Val Pro Glu Val Asn Asn Glu Val Met Ala Leu Glu Pro Val
20 25 30

Val Gly Ala Ala Ile Ala Ala Pro Val Ala Gly Gln Gln Asn Val Ile
35 40 45

Asp Pro Trp Ile Arg Asn Asn Phe Val Gln Ala Pro Gly Gly Glu Phe
50 55 60

Thr Val Ser Pro Arg Asn Ala Pro Gly Glu Ile Leu Trp Ser Ala Pro
65 70 75 80

Leu Gly Pro Asp Leu Asn Pro Tyr Leu Ser His Leu Ala Arg Met Tyr
85 90 95

Asn Gly Tyr Ala Gly Gly Phe Glu Val Gln Val Ile Leu Ala Gly Asn
100 105 110

Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Ile Phe Ala Ala Val Pro Pro Asn Phe
115 120 125

Pro Thr Glu Gly Leu Ser Pro Ser Gln Val Thr Met Phe Pro His Ile
130 135 140

Ile Val Asp Val Arg Gln Leu Glu Pro Val Leu Ile Pro Leu Pro Asp
145 150 155 160

Val Arg Asn Asn Phe Tyr His Tyr Asn Gln Ser Asn Asp Pro Thr Ile
165 170 175

Lys Leu Ile Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ala Asn Asn Ala Gly
180 185 190

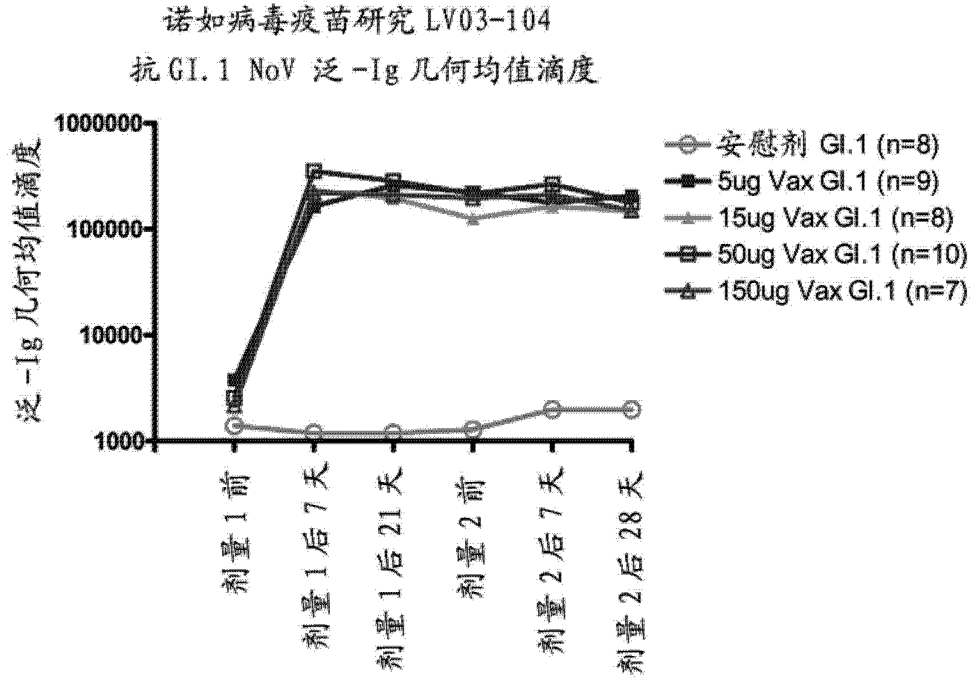
Asp Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Arg Pro Ser Pro
195 200 205

[0002]

Asp Phe Asp Phe Ile Phe Leu Val Pro Pro Thr Val Glu Ser Arg Thr
 210 215 220
 Lys Pro Phe Thr Val Pro Ile Leu Thr Val Glu Glu Met Thr Asn Ser
 225 230 235 240
 Arg Phe Pro Ile Pro Leu Glu Lys Leu Phe Thr Gly Pro Ser Gly Ala
 245 250 255
 Phe Val Val Gln Pro Gln Asn Gly Arg Cys Thr Thr Asp Gly Val Leu
 260 265 270
 Leu Gly Thr Thr Gln Leu Ser Pro Val Asn Ile Cys Thr Phe Arg Gly
 275 280 285
 Asp Val Thr His Ile Ala Gly Thr Gln Glu Tyr Thr Met Asn Leu Ala
 290 295 300
 Ser Gln Asn Trp Asn Asn Tyr Asp Pro Thr Glu Glu Ile Pro Ala Pro
 305 310 315 320
 Leu Gly Thr Pro Asp Phe Val Gly Lys Ile Gln Gly Val Leu Thr Gln
 325 330 335
 Thr Thr Arg Gly Asp Gly Ser Thr Arg Gly His Lys Ala Thr Val Ser
 340 345 350
 Thr Gly Ser Val His Phe Thr Pro Lys Leu Gly Ser Val Gln Phe Ser
 355 360 365
 Thr Asp Thr Ser Asn Asp Phe Glu Thr Gly Gln Asn Thr Lys Phe Thr
 370 375 380
 Pro Val Gly Val Val Gln Asp Gly Ser Thr Thr His Gln Asn Glu Pro
 385 390 395 400
 Gln Gln Trp Val Leu Pro Asp Tyr Ser Gly Arg Asp Ser His Asn Val
 405 410 415
 His Leu Ala Pro Ala Val Ala Pro Thr Phe Pro Gly Glu Gln Leu Leu
 420 425 430
 Phe Phe Arg Ser Thr Met Pro Gly Cys Ser Gly Tyr Pro Asn Met Asn
 435 440 445
 Leu Asp Cys Leu Leu Pro Gln Glu Trp Val Gln His Phe Tyr Gln Glu
 450 455 460
 Ala Ala Pro Ala Gln Ser Asp Val Ala Leu Leu Arg Phe Val Asn Pro
 465 470 475 480
 Asp Thr Gly Arg Val Leu Phe Glu Cys Lys Leu His Lys Ser Gly Tyr
 485 490 495
 Val Thr Val Ala His Thr Gly Gln His Asp Leu Val Ile Pro Pro Asn
 500 505 510
 Gly Tyr Phe Arg Phe Asp Ser Trp Val Asn Gln Phe Tyr Thr Leu Ala
 515 520 525
 Pro Met Gly Asn Gly Thr Gly Arg Arg Arg Ala Leu
 530 535 540

[0003]

A



B

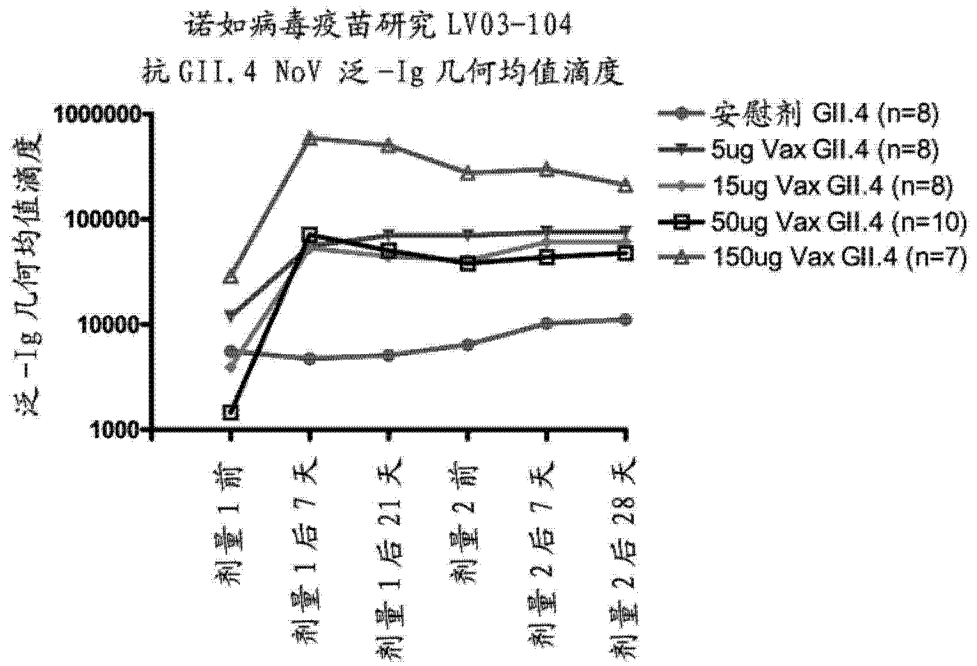
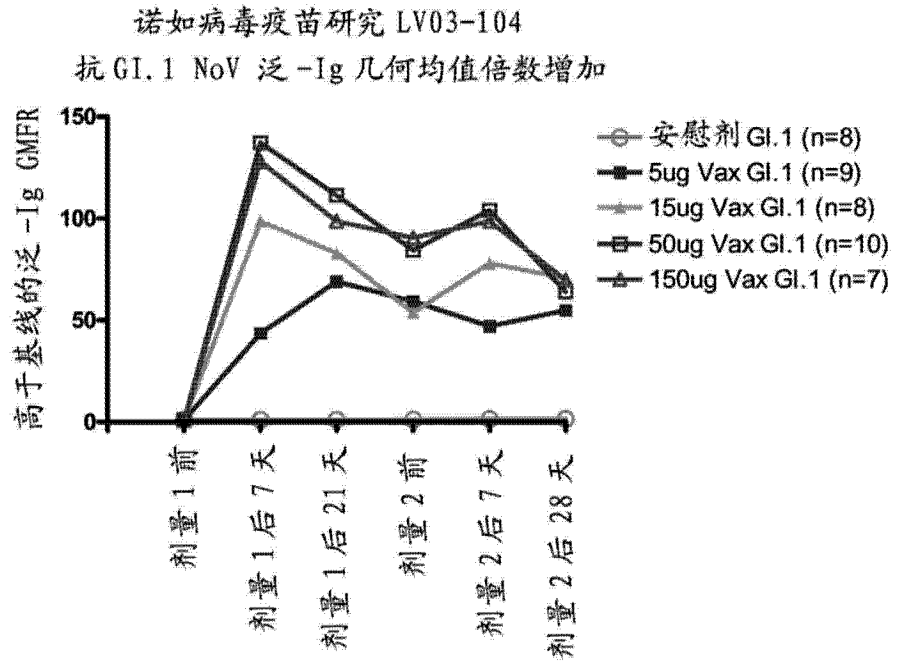


图 1

A



B

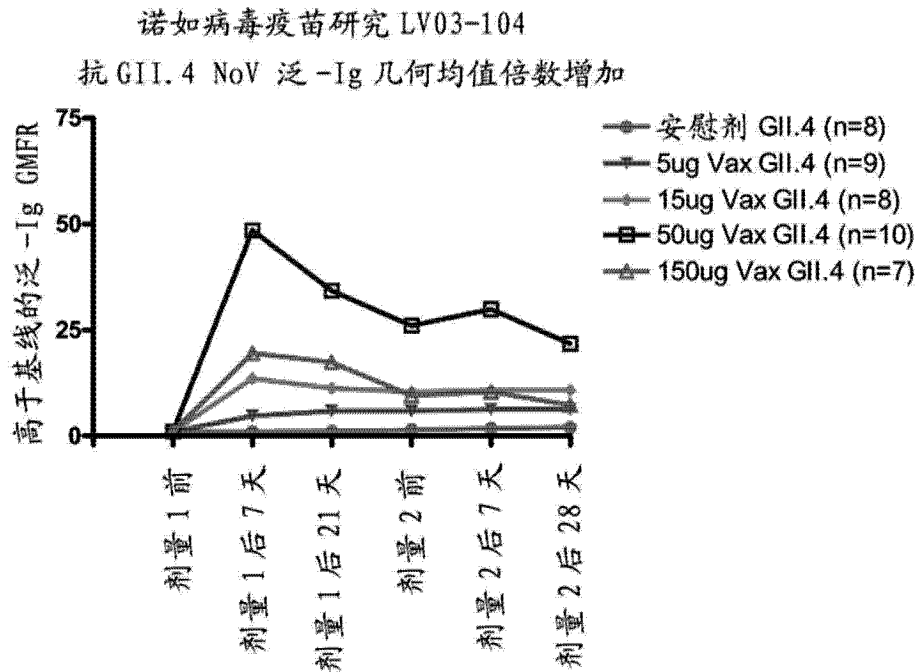
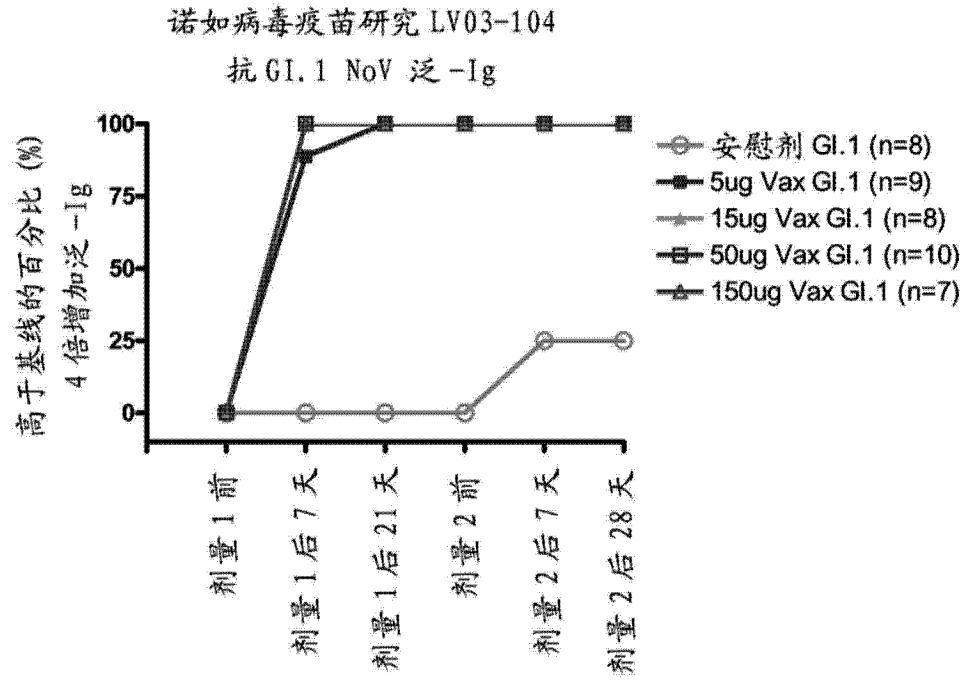


图 2

A



B

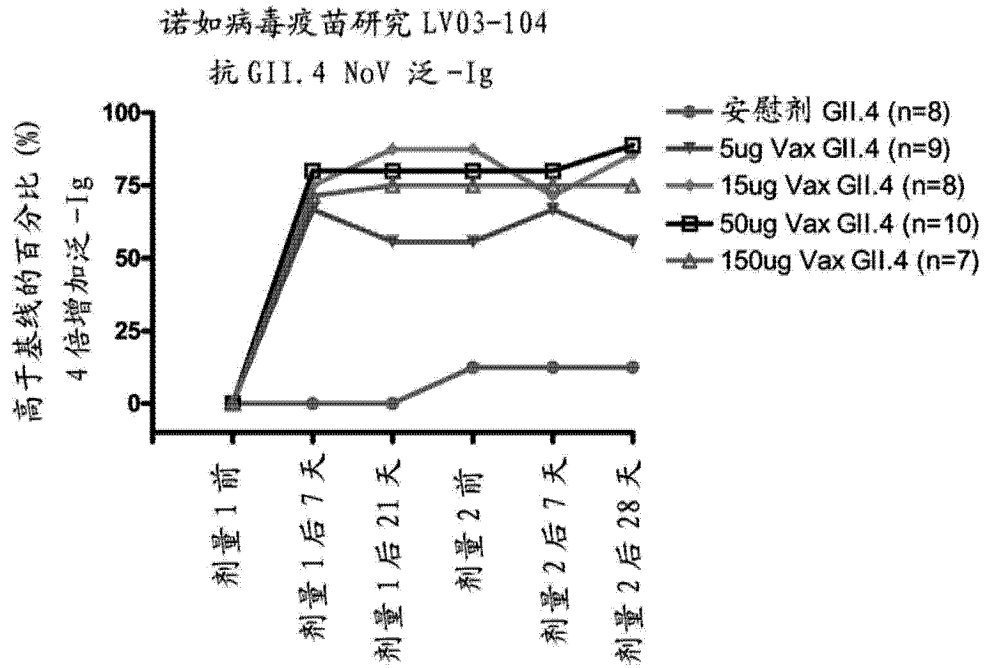
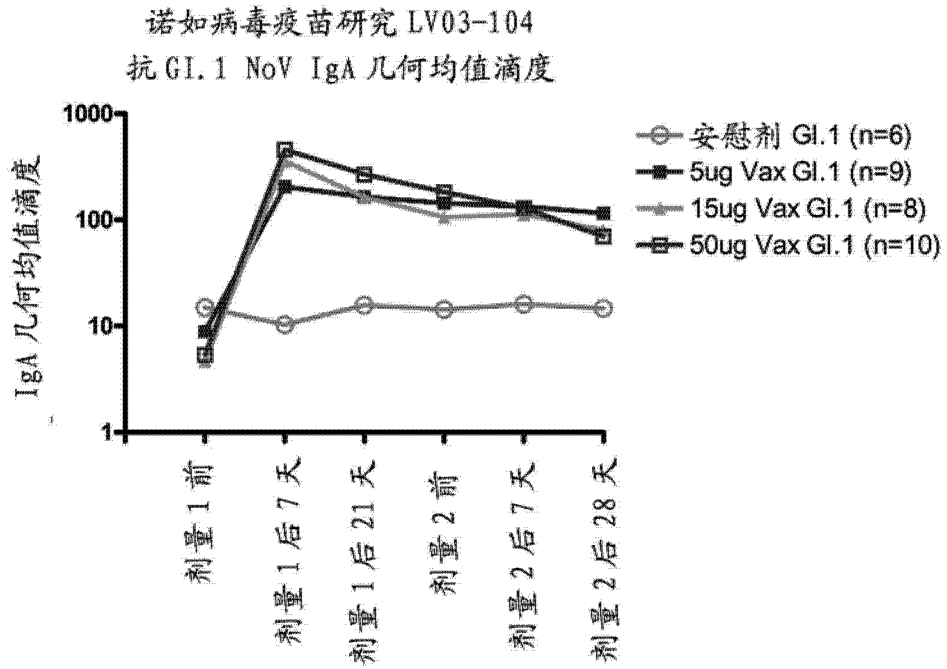


图 3

A



B

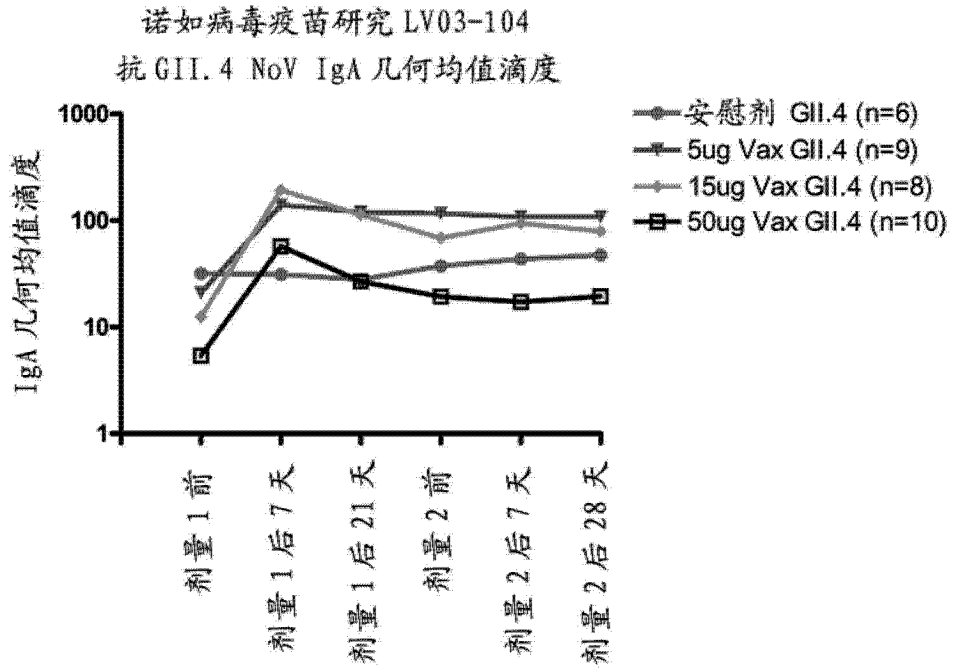
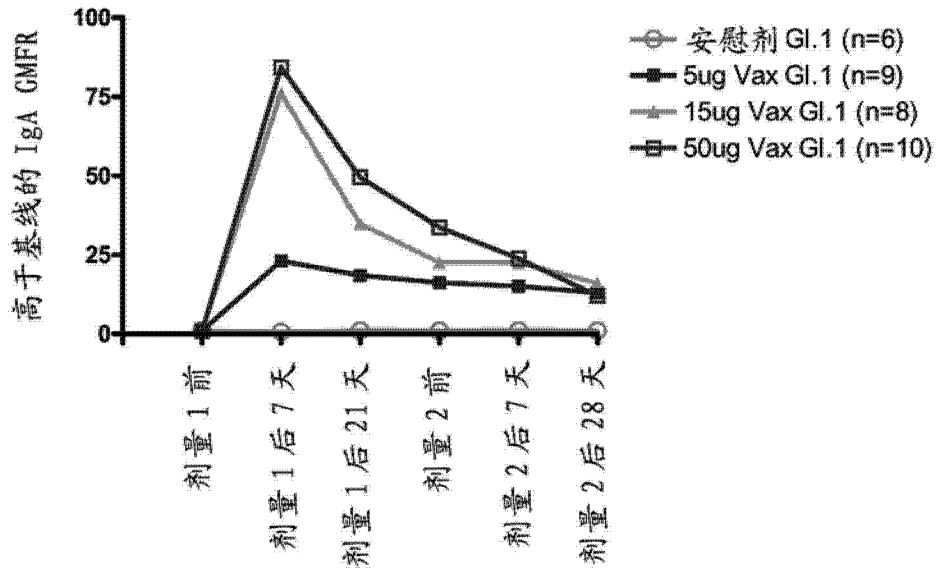


图 4

A

诺如病毒疫苗研究 LV03-104
抗 GI.1 NoV IgA 几何均值倍数增加



B

诺如病毒疫苗研究 LV03-104
抗 GII.4 NoV IgA 几何均值倍数增加

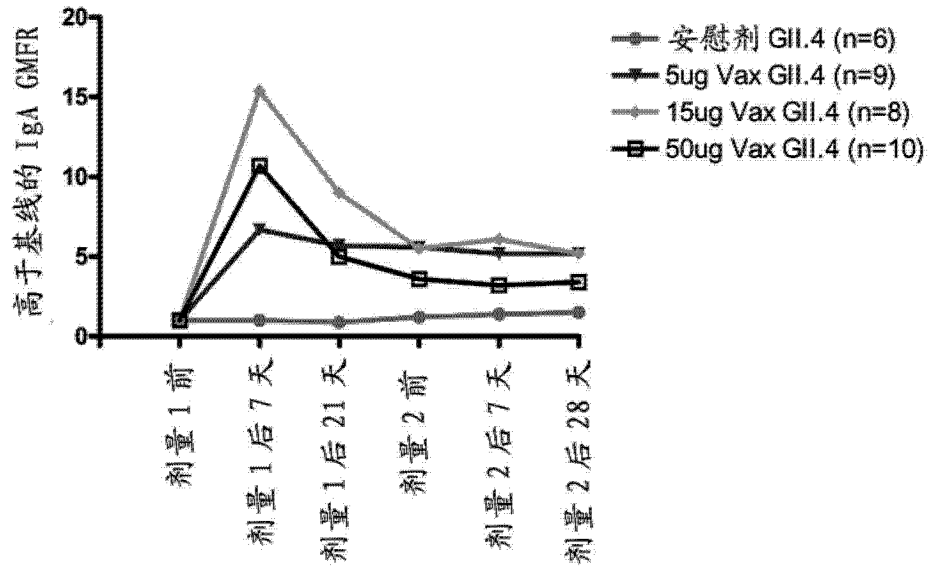
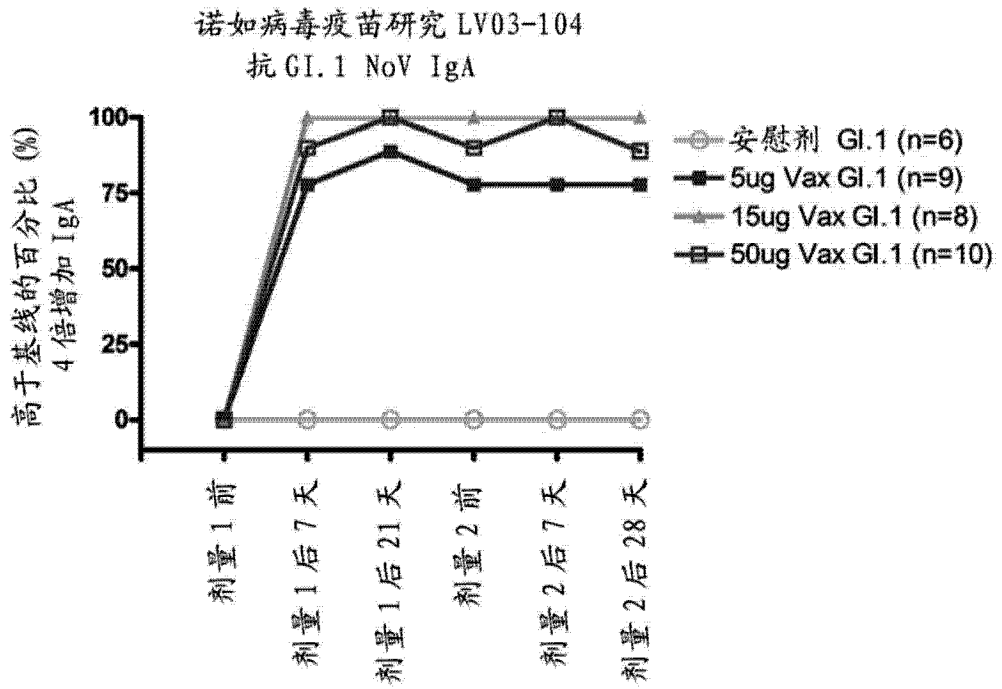


图 5

A



B

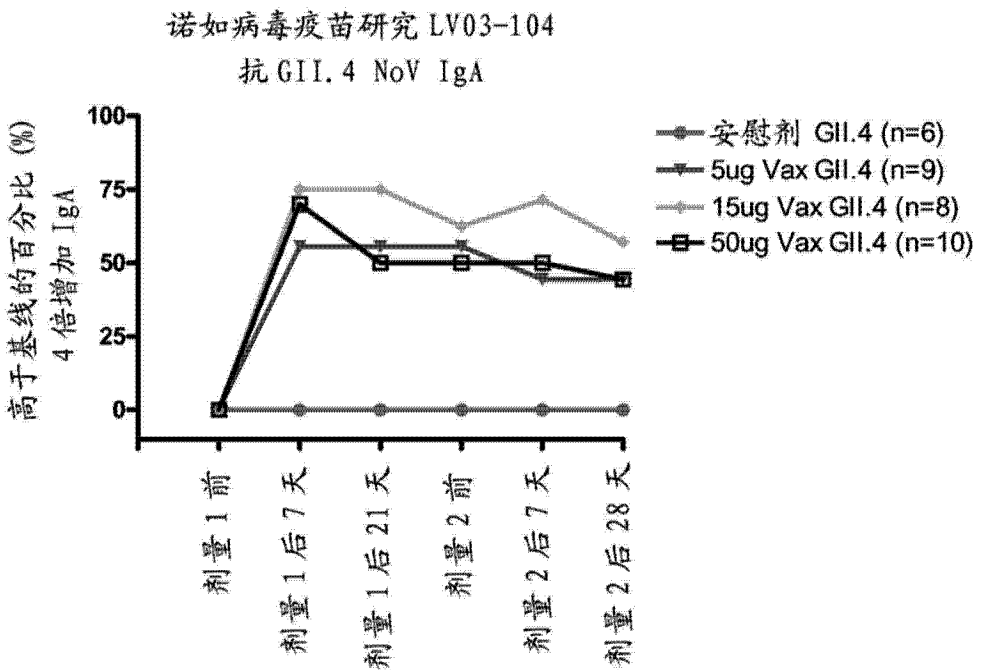
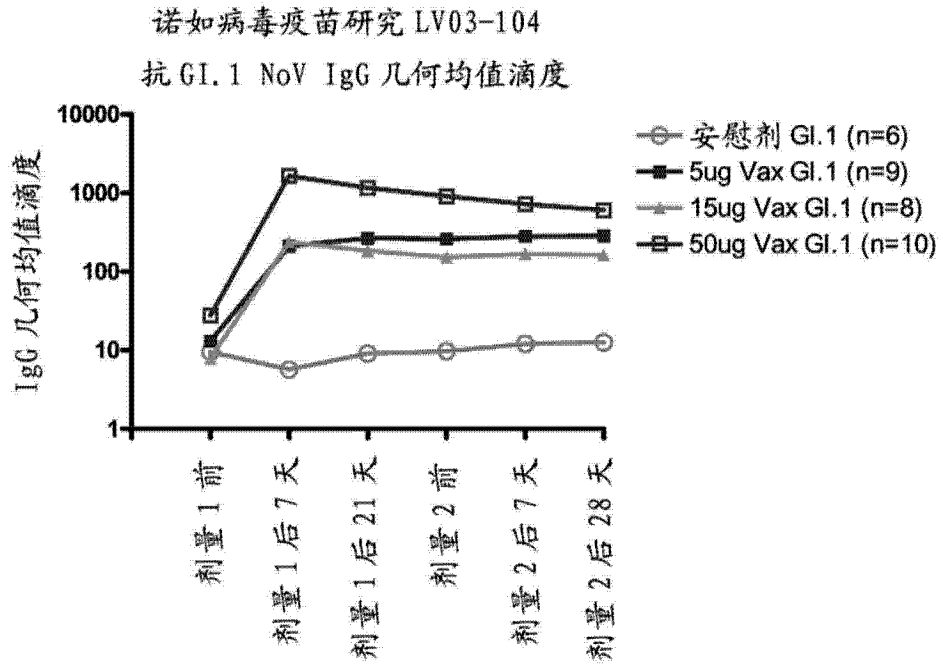


图 6

A



B

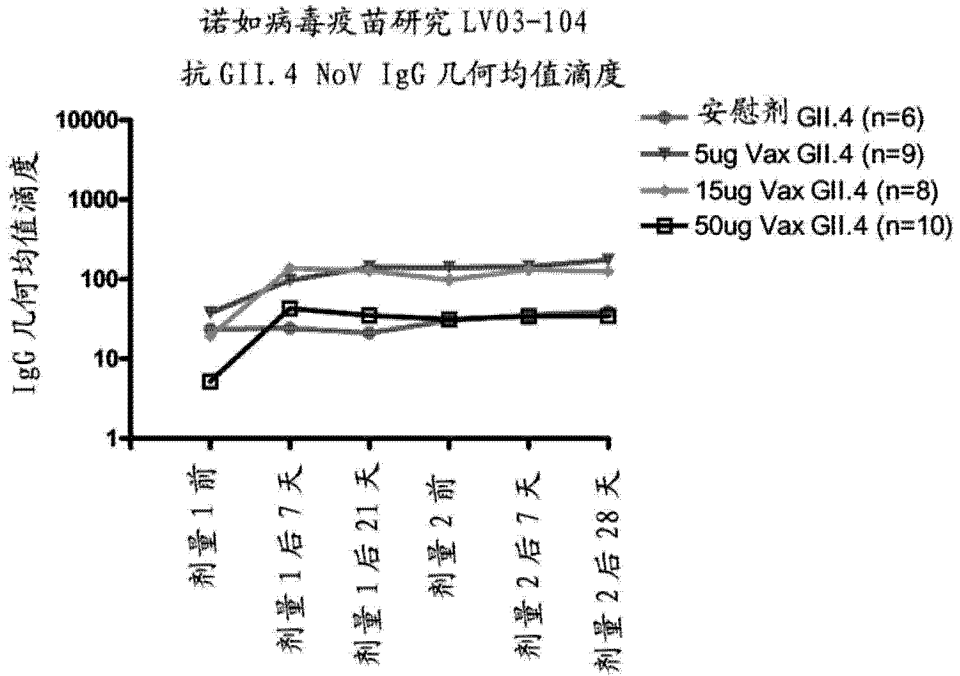
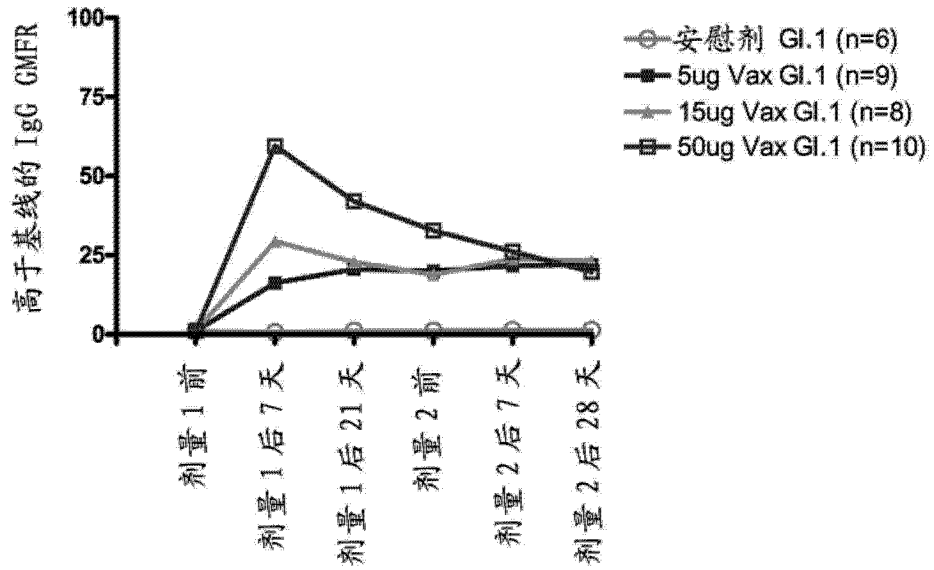


图 7

A

诺如病毒疫苗研究 LV03-104
抗 GI.1 NoV IgG 几何均值倍数增加



B

诺如病毒疫苗研究 LV03-104
抗 GII.4 NoV IgG 几何均值倍数增加

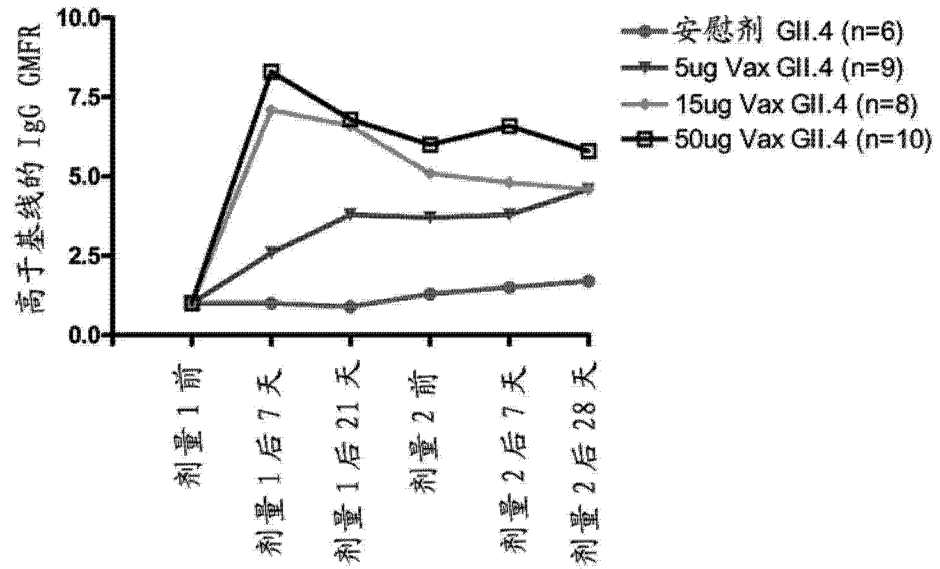
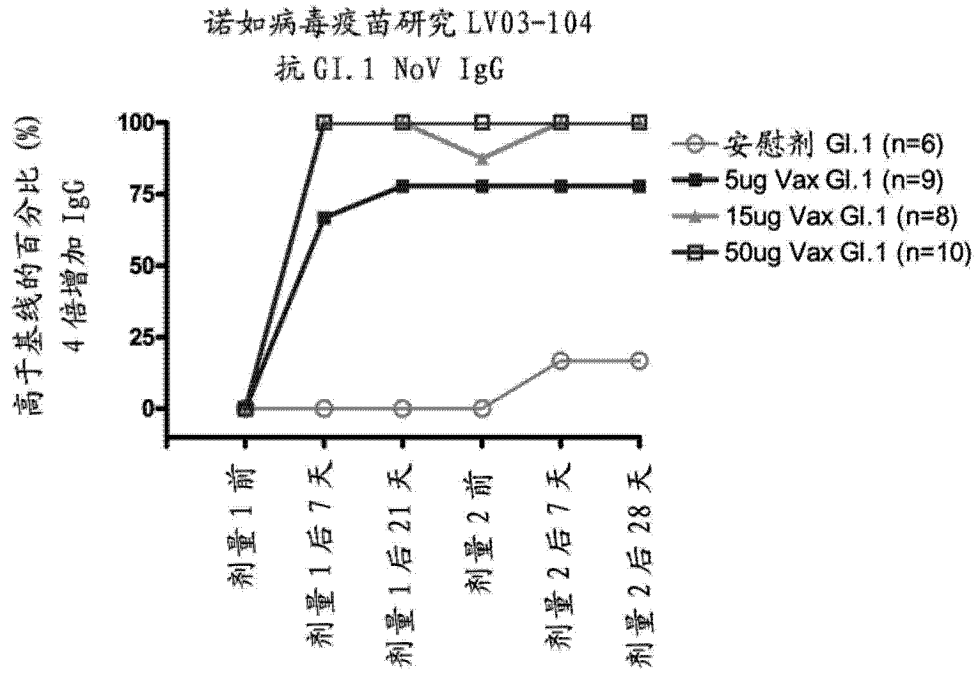


图 8

A



B

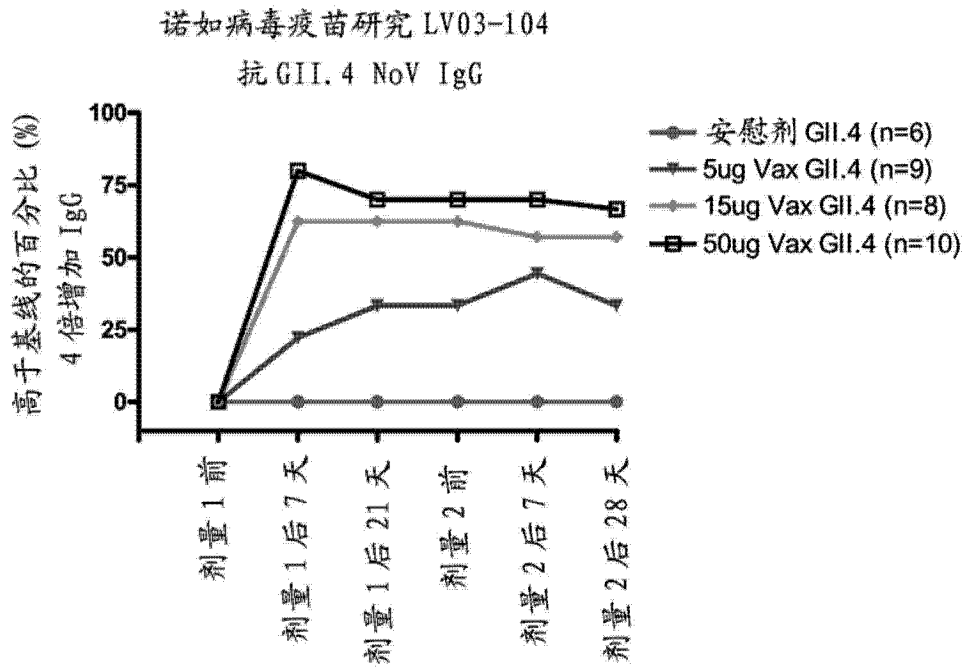


图 9

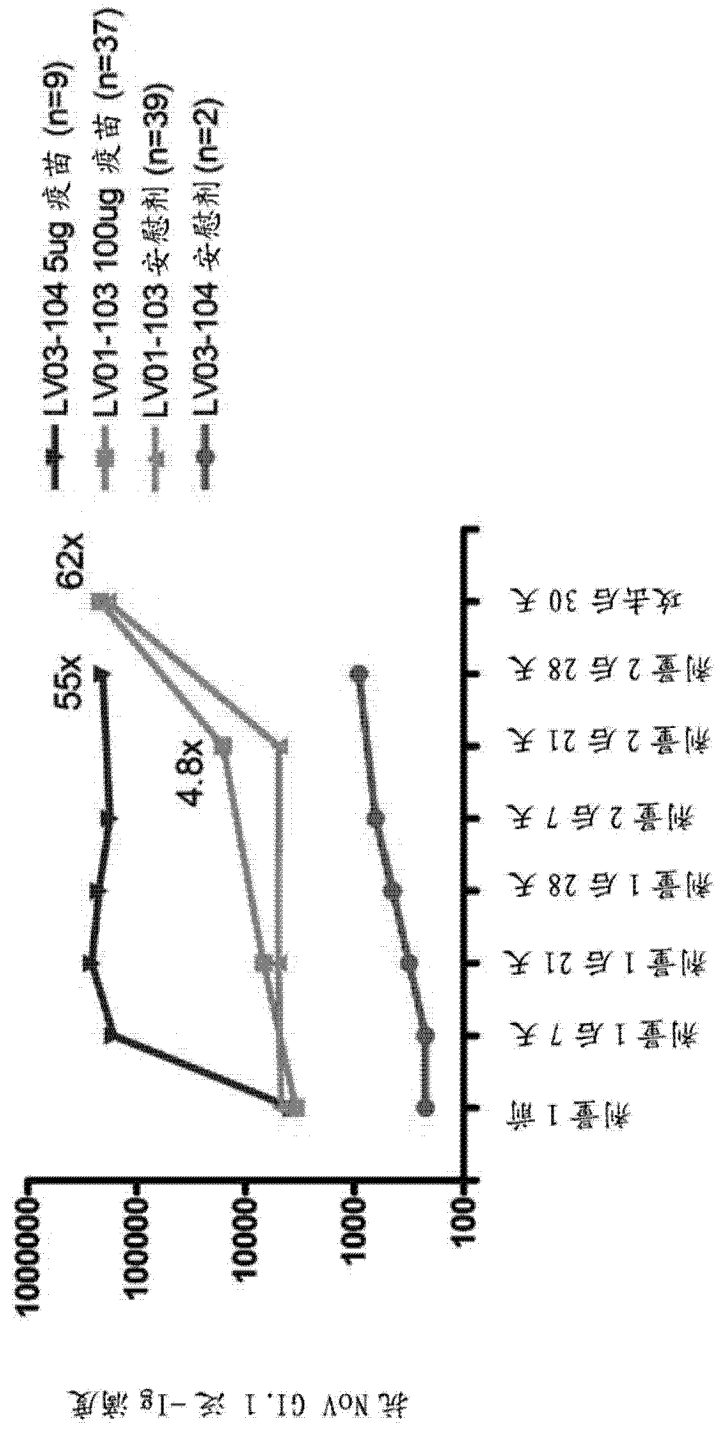


图 10

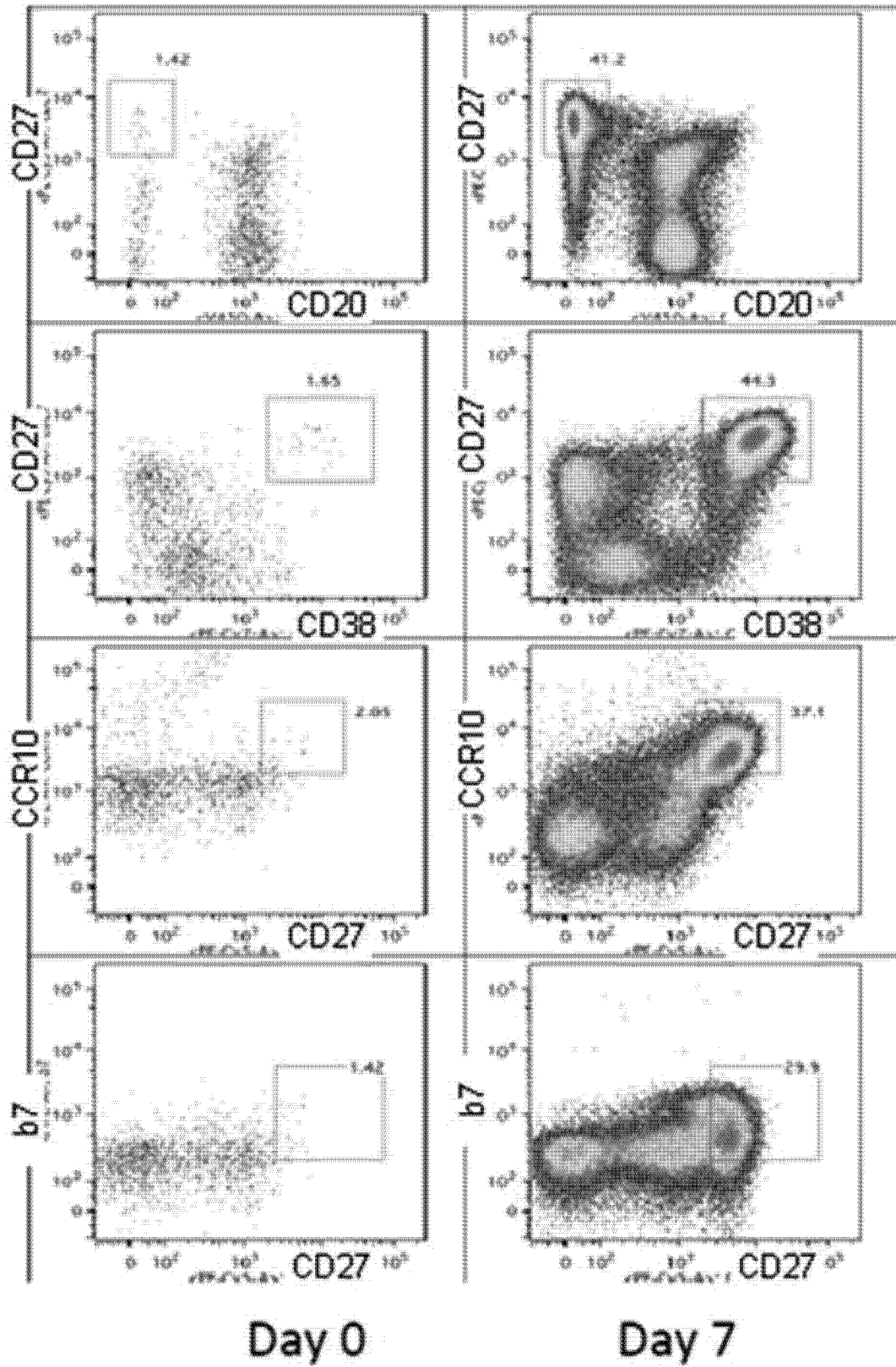


图 11A

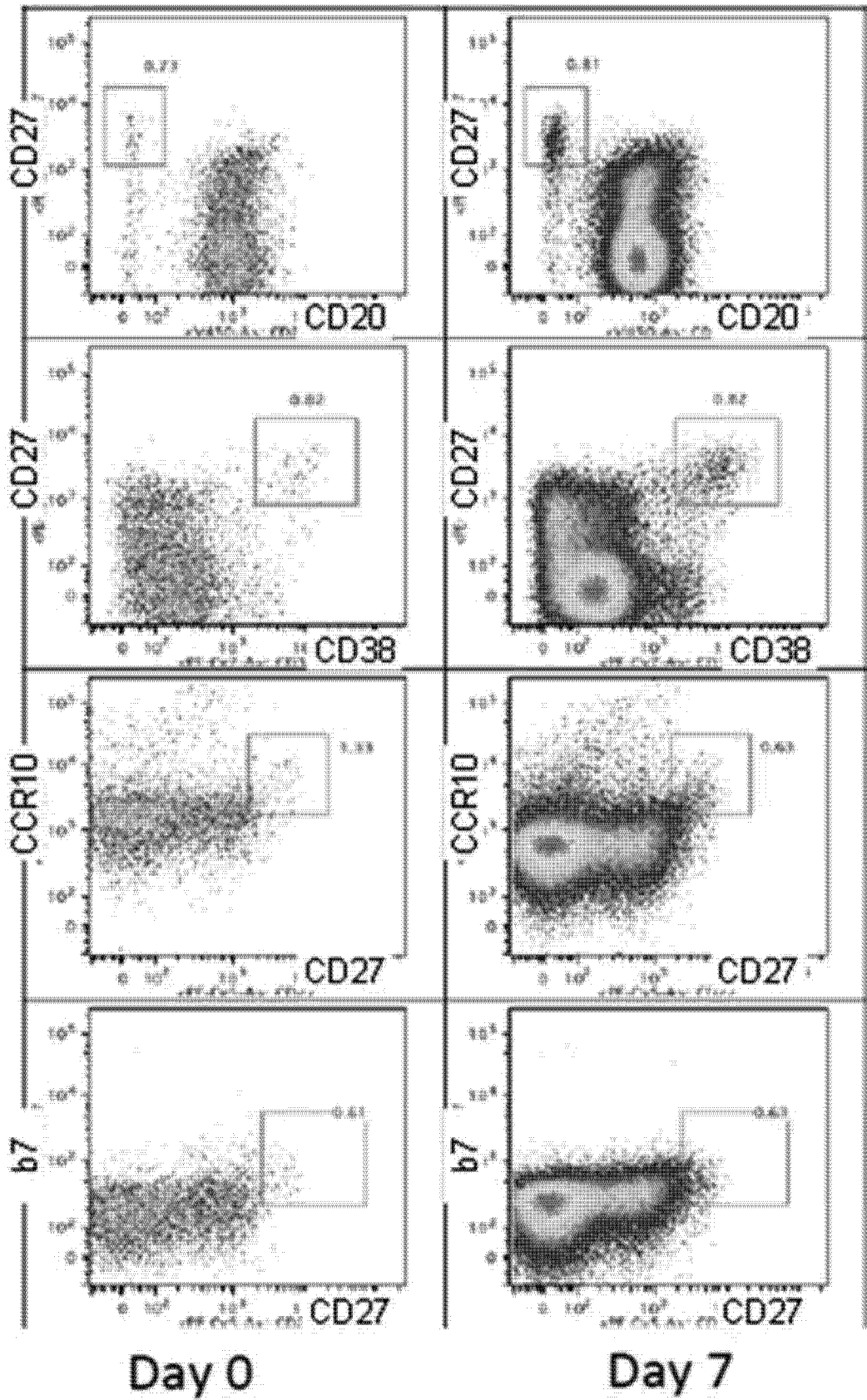


图 11B