



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108567975 A

(43)申请公布日 2018.09.25

(21)申请号 201810373895.1

(22)申请日 2012.07.11

(30)优先权数据

61/506,447 2011.07.11 US

(62)分案原申请数据

201280043691.2 2012.07.11

(71)申请人 武田疫苗股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(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 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 岑晓东

(51)Int.Cl.

A61K 39/125(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

权利要求书1页 说明书41页

序列表3页 附图12页

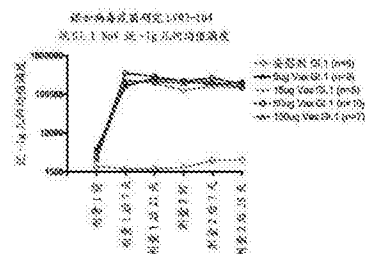
(54)发明名称

胃肠外诺如病毒疫苗配制剂

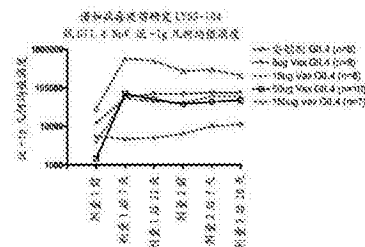
(57)摘要

本发明涉及胃肠外诺如病毒疫苗配制剂。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。

A



B



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. 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。

胃肠外诺如病毒疫苗配制剂

[0001] 本申请是申请日为2012年07月11日、中国申请号为201280043691.2、发明名称为“胃肠外诺如病毒疫苗配制剂”的发明申请的分案申请。

[0002] 对相关申请的交叉引用

[0003] 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

[0004] 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针对诺如病毒的保护性免疫应答的方法。

[0005] 发明背景

[0006] 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)。

[0007] 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。

[0008] 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)。

[0009] 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;Periwal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)。

[0010] 发明概述

[0011] 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。

[0012] 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。

[0013] 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。

[0014] 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)。

[0015] 本申请涉及下述各项实施方案。

[0016] 1.一种在人群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。

[0017] 2.实施方案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。

- [0018] 3.实施方案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。
- [0019] 4.实施方案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。
- [0020] 5.实施方案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。
- [0021] 6.实施方案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。
- [0022] 7.实施方案1的方法,其中所述诺如病毒VLP是单价VLP或多价VLP。
- [0023] 8.实施方案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。
- [0024] 9.实施方案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。
- [0025] 10.实施方案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。
- [0026] 11.实施方案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。
- [0027] 12.实施方案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。
- [0028] 13.实施方案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。
- [0029] 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。
- [0030] 15.实施方案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。
- [0031] 16.实施方案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。
- [0032] 17.实施方案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。
- [0033] 18.实施方案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。
- [0034] 19.实施方案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。
- [0035] 20.实施方案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。

- [0036] 21. 实施方案14的方法, 其中所述诺如病毒VLP是单价VLP或多价VLP。
- [0037] 22. 实施方案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。
- [0038] 23. 实施方案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。
- [0039] 24. 实施方案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。
- [0040] 25. 实施方案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。
- [0041] 26. 实施方案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。
- [0042] 27. 实施方案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。
- [0043] 28. 实施方案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。
- [0044] 29. 实施方案28的方法, 其中所述至少一种佐剂是Toll样受体激动剂。
- [0045] 30. 实施方案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。
- [0046] 31. 实施方案30的方法, 其中所述两种佐剂是单磷酸脂质A和氢氧化铝。
- [0047] 32. 实施方案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。
- [0048] 33. 实施方案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。
- [0049] 34. 实施方案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。
- [0050] 35. 实施方案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。
- [0051] 36. 实施方案1至35中任一项的方法, 其中所述疫苗组合物配制为液体。
- [0052] 37. 实施方案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。
- [0053] 38. 实施方案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。
- [0054] 附图简述
- [0055] 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。
- [0056] 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。

[0057] 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。

[0058] 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。

[0059] 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。

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] 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。

[0065] 图11A和11B: 对在用5 μ g剂量的肌肉内二价诺如病毒疫苗(图11A)或安慰剂(图11B)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。

[0066] 发明详述

[0067] 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人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。

[0068] 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。

[0069] 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Alphatron, 劳德代尔堡(FortLauderdale), 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) 。

[0070] “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。

[0071] 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(FortLauderdale)/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:WO 2005/030806,WO 2000/79280,JP2002020399,US2003129588,美国专利No.6,572,862,WO 1994/05700,和WO 05/032457,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. 1 841-874 (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。

[0072] 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,诺如病毒抗原包含VLP。如本文中所使用的,“病毒样颗粒或VLP”指自诺如病毒的衣壳蛋白编码序列生成的且包含与感染性诺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。诺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。诺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。

[0073] 本发明的VLP可以使用本领域标准技术自全长诺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)。

[0074] 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含有只来自一个诺如病毒基因小组的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诺如病毒基因小组。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诺如病毒基因小组的VP1和VP2构成的VLP并混有由来自取自多种病毒株的不同诺如病毒基因小组(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诺如病毒基因小组I一种或多种株的单价VLP以及来自诺如病毒基因小组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,诺如病毒VLP混合物由GI.1和GII.4病毒株构成。更优选地,诺如病毒VLP混合物由诺沃克毒株和自原型基因小组II诺如病毒衍生的共有衣壳序列构成。自流行诺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WO 2010/017542,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诺如病毒(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。

[0075] 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

[0076] 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

[0077] 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

[0078] 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

[0079] 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

[0080] 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

[0081] 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

[0082] 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

[0083] 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

[0084] 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

[0085] 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

[0086] 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

[0087] 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

[0088] 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

[0089] 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

[0090] 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

[0091] 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

[0092] 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

[0093] 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

[0094] G T G R R R A L (SEQ ID NO:1)

[0095] 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。

[0096] 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。

[0097] 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。

[0098] 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。

[0099] 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。

[0100] 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。

[0101] 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。

[0102] 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W0 98/44944;W0 00/45841,通过述及收入本文。

[0103] 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。

[0104] 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。

[0105] 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。

[0106] 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。

[0107] 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。

[0108] 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。

[0109] 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。

[0110] 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0 689 454 B1 (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。

[0111] 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。

[0112] 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%。

[0113] 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诺如病毒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。

[0114] 在某些实施方案中，在诺如病毒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。

[0115] 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。

[0116] 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。

[0117] 如本文中讨论的,本发明的组合物可配制成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。

[0118] 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。

[0119] 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。

[0120] 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。

[0121] 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。

[0122] 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。

[0123] 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。

[0124] 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) 的药剂的情况中冷冻干燥液体抗原。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。

[0125] 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反应的量。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,或诱导体特异性抗体的生成。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”。

[0126] 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。

[0127] 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。

[0128] 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150μg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150μg,不超过100μg,不超过50μg,不超过25μg,不超过15μg,或不超过10μg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150μg,不超过100μg,不超过50μg,不超过25μg,不超过15μg,或不超过10μg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50μg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。

[0129] 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.US 2007/0207526),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)。

[0130] 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

[0131] 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中检测诺如病毒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BT₅₀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BT₅₀几何均值滴度,如通过H抗原结合测定法测量的。

[0132] 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。

[0133] 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。

[0134] 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。

[0135] 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。

[0136] 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。

[0137] 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

[0138] 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

[0139] 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(AlOH)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。

[0140] 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(AlOH)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。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。

[0141] 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 (μ g)	GII.4 VLP (μ g)	MPL (μ g)	Al* (mg)	NaCl (mg)	L-His (mg)	乙醇 (mg)
10 μ g剂量	5	5	50	0.5	4.38	1.55	19.7
30 μ g剂量	15	15	50	0.5	4.38	1.55	19.7
100 μ g剂量	50	50	50	0.5	4.38	1.55	19.7
300 μ g剂量	150	150	50	0.5	4.38	1.55	19.7

[0142] *

为氢氧化铝

[0144] 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 μ g,15/15 μ g,50/50 μ g,和150/150 μ g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。

[0145] 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名受接种者),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)。

[0146] 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。

[0147] 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。

[0148] 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。

[0149] 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。

[0150] 通过ELISA测量血清抗体

[0151] 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pH 9.6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。

[0152] 诺如病毒碳水化合物组织血型抗原(HBGA)阻断活性

[0153] 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2.5µg/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,。

[0154] 诺如病毒血凝反应抗体抑制(HAI)测定法

[0155] 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(EI 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。

[0156] 将诺如病毒GI.1和GII.4 VLP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℃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pH 5.5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.4 VLP抗原分别温育。将0.5%RBC悬浮液添加至每孔,并将板于4℃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。

[0157] 抗体分泌性细胞测定法

[0158] 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; EI 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。

[0159] 诺如病毒病毒特异性记忆B细胞的测量

[0160] 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1mL/孔)与诺如病毒GI.1和GII.4 VLP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)。

[0161] 细胞免疫应答

[0162] 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25mL)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.4 VLP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.4 VLP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。

[0163] 结果

[0164] 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)。

[0165] 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。

[0166] 如图1-3中显示的,在第一剂最低剂量(5 μ gGI.1+5 μ g GII.4 VLP)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.1 VLP的最大应答表现为比对GII.4 VLP的最大应答以更低剂量实现(15 μ g对50 μ 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LV03-104 5 μ g组与LV01-103 100 μ g组)。此外,低剂量(5 μ 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)。

[0167] 在第一剂最低剂量(5 μ 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(α 4/ β 7)和趋化因子(CCR10)受体表型,如通过流式细胞术评估的(图11A和11B;表3)。如表3中显示的,与双重粘膜/外周归巢标志物(β 7+,CD62L+)相比,更大数目的ASC展现出粘膜归巢标志物(β 7+,CD62L-)。表4显示了每10⁶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 μ g和50 μ g剂量的接受者中也观察到类似的应答(表2-4)。

[0168] 表2:第7天,PBMC应答的表征。抗体的近似值

[0169] 分泌性细胞(ASC)/百万个CD19+细胞

[0170]

	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
几何均值 A1 5 μ g剂量(n=5)	30947	13807	10947	3945	4.48%	1.49%	5.96%
标准差A1 5 μ g剂量	6674	9780	3651	2261			
几何均值 A2 15 μ g剂量(n=4)	25296	17004	7108	4336	4.23%	1.14%	5.37%
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			

[0171]

	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
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%

[0172]

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A1 5 μ g剂量(n=5)	25.10%	6.86%	1.06%	2.78%	1656	0.17%
标准差A1 5 μ g剂量	10.45	3.13	1.01			
几何均值A2 15 μ g剂量(n=4)	12.99%	16.98%	2.43%	4.63%	1355	0.14%
标准差A2 15 μ g剂量	9.13	1.56	0.23			
几何均值A3 50 μ g剂量(n=4)	31.71%	26.43%	3.63%	12.01%	23915	2.39%
标准差A3 50 μ g剂量	6.32	1.82	1.38			
几何均值 A4	33.46%	30.06%	5.68%	15.74%	31350	3.14%

[0173]

	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 (-) 的总体疫苗特异性	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 (-) 的总体疫苗特异性	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 A1	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

[0176] 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.1 VLP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。

[0177] 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)

[0178]

	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	N	GMFR	4倍升	N	GMFR	4倍升	N	GMFR	4倍升	N	GMFR	4倍升
		(95% CI)	高 (95% CI)		(95% CI)	高 (95% CI)		(95% CI)	高 (95% CI)		(95% CI)	高 (95% CI)		(95% CI)	高 (95% CI)
5/5 mcg VLP 疫 苗	9	26.6 (8.3, 85.1)	88.9 (51.8, 99.7)	9	25.1 (8.9, 70.3)	88.9 (51.8, 99.7)	9	19.7 (8.2, 47.1)	100.0 (66.4, 100.0)	9	20 (7.7, 51.7)	88.9 (51.8, 99.7)	9	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)	8	25.5 (10.5, 61.8)	100.0 (63.1, 100.0)	8	18.5 (8.4, 40.6)	100.0 (63.1, 100.0)	7	22.2 (8.8, 56)	100.0 (59.0, 100.0)	7	8.4 (2.4, 29.6)	57.1 (18.4, 90.1)

[0179]

	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)		
			4倍升			4倍升			4倍升			4倍升			4倍升
		GMFR	高		GMFR	高		GMFR	高		GMFR	高		GMFR	高
		(95%	(95%		(95%	(95%		(95%	(95%		(95%	(95%		(95%	(95%
处理组	N	CI)	CI)	N	CI)	CI)	N	CI)	CI)	N	CI)	CI)	N	CI)	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)

[0180] 基于接受两剂研究产品的所有受试者的结果。

[0181] 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。

[0182] 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)

[0183]

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)

[0184]

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)

[0185] 基于接受两剂研究产品的所有受试者的结果。

[0186] 由于可能的标本混乱而排出两名受试者的数据点。

[0187] 类似地,测量针对GII.4 VLP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.4 VLP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。

[0188] 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)

[0189]

	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 (95% CI)	4倍 升高 (95% CI)	N	GMFR (95% CI)	4倍 升高 (95% CI)	N	GMFR (95% CI)	4倍 升高 (95% CI)	N	GMFR (95% CI)	4倍 升高 (95% CI)	N	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)

[0190] 基于接受两剂研究产品的所有受试者的结果。

[0191] 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。

[0192] 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)
[0193]

	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)	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)

[0194] 基于接受两剂研究产品的所有受试者的结果。

[0195] 由于可能的标本混乱而排出两名受试者的数据点。

[0196] 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。

[0197] 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)

[0198]

		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	N	GMFR	4倍升	N	GMFR	4倍升	N	GMFR	4倍升	N	GMFR	4倍升						
		(95% CI)	高 (95% CI)		(95% CI)	高 (95% CI)		(95% CI)	高 (95% CI)		(95% CI)	高 (95% CI)		(95% CI)	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)						

[0199]

	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%	(95%		(95%	(95%		(95%	(95%		(95%	(95%			
		CI)	CI)		CI)	CI)		CI)	CI)		CI)	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)

[0200] 基于接受两剂研究产品的所有受试者的结果。

[0201] 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。

[0202] 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)

[0203]

	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)	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	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)

[0204]

	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)	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)

[0205] 基于接受两剂研究产品的所有受试者的结果。

[0206] 由于可能的标本混乱而排出两名受试者的数据点。

[0207] 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)。

[0208] 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)

[0209]

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)

[0210]

处理组	N	GMFR (95% CI)	4倍 升高 (95% CI)	N	GMFR (95% CI)	4倍 升高 (95% CI)	N	GMFR (95% CI)	4倍 升高 (95% CI)	N	GMFR (95% CI)	4倍 升高 (95% CI)	N	GMFR (95% CI)	4倍 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)

[0211] 基于接受两剂研究产品的所有受试者的结果。

[0212] 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。

[0213] 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）

[0214]

	研究日
--	-----

[0215]

		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)
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)

[0216] 基于接受两剂研究产品的所有受试者的结果。

[0217] 由于可能的标本混乱而排出两名受试者的数据点。

[0218] 表13:安慰剂对50/50 μ g VLP疫苗中对血凝反应的抑制

[0219]

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)

[0220] 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。

[0221] 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)

[0222] 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(A10H)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。

[0223] 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。

[0224] 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A10H为佐剂的疫苗(N=10),或仅以A10H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A10H的抗原浓度是相同的;仅MPL的存在或缺乏是不同的。

[0225] 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(A10H)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。

[0226] 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。

[0227] 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。

[0228] 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,肌酐,葡萄糖,AST,和ALT,以分别评估连续适任和安全性。

[0229] 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。

[0230] 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。

[0231] 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。

[0232] 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。

[0233] 本文中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。

[0234] 参考文献

[0235] 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(Sup 2):S254-S261.

[0236] 2.Hardy,ME.Norwalk and“Norwalk-like Viruses”in Epidemic Gastroenteritis.Clin Lab Med 1999;19(3):675-90.

[0237] 3.Jiang,X,DY Graham,KN Wang,and MK Estes.Norwalk Virus Genome Cloning and Characterization.Science 1990;250:1580-1583.

[0238] 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.

- [0239] 5. Glass, P, LJ White, JM Ball, I Leparac-Goffart, ME Hardy, and MK Estes. Norwalk Virus Open Reading Frame 3 Encodes a Minor Structural Protein. *J Virol* 2000;74:6581-6591.
- [0240] 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.
- [0241] 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.
- [0242] 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.
- [0243] 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.
- [0244] 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.
- [0245] 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.
- [0246] 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.
- [0247] 13. Periwal, SB, KR Kourie, N Ramachandaran, SJ Blakeney, S DeBruin, DZhu, 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.
- [0248] 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.
- [0249] 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.

[0250] 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.

[0251] 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.

[0252] 18. Evans, JT, CW Cluff, DA Johnson, MJ Lacy, DH Persing, and JR Baldrige. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi 529. *Expert Rev Vaccines* 2003;2:219-229.

[0253] 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.

[0254] 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.

[0255] 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.

[0256] 22. Baldrige, JR, P McGowan, JT Evans, C Cluff, S Mossman, D Johnson, and D Persing. Taking a toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:1129-1138.

[0257] 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.

序列表

<110> 武田疫苗股份有限公司(Takeda Vaccines, Inc.)

C.理查德森(Richardson, Charles)

R.F.巴加特兹(Bargatze, Robert F.)

P.M.门德尔曼(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

```

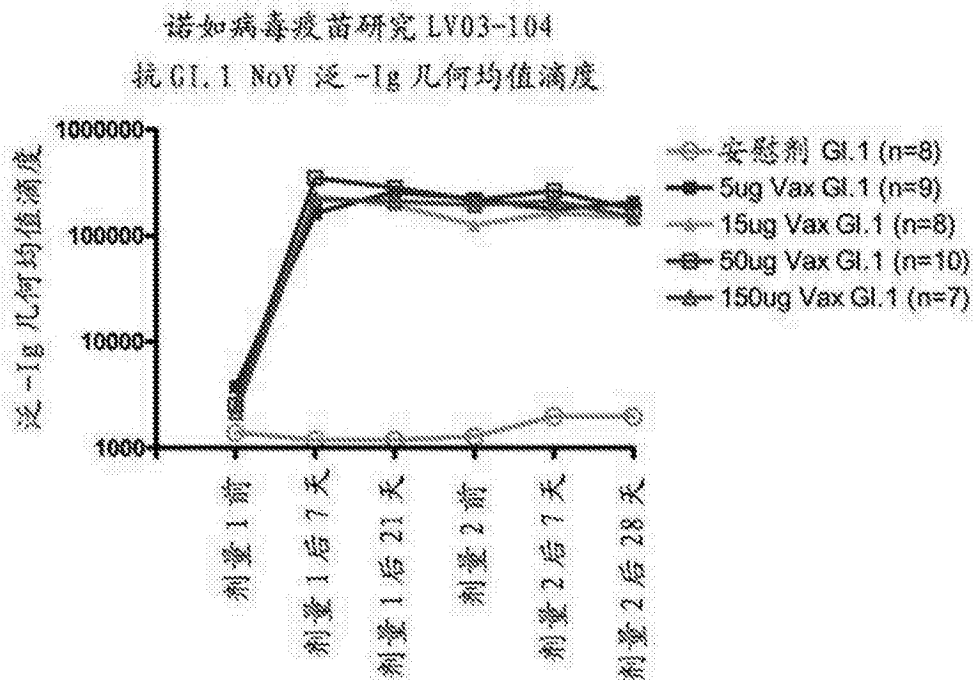
Met Lys Met Ala Ser Ser Asp Ala Asn Pro Ser Asp Gly Ser Thr Ala
1           5           10           15
Asn Leu Val Pro Glu Val Asn Asn Glu Val Met Ala Leu Glu Pro Val
           20           25           30
Val Gly Ala Ala Ile Ala Ala Pro Val Ala Gly Gln Gln Asn Val Ile
           35           40           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
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
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
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
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	

A



B

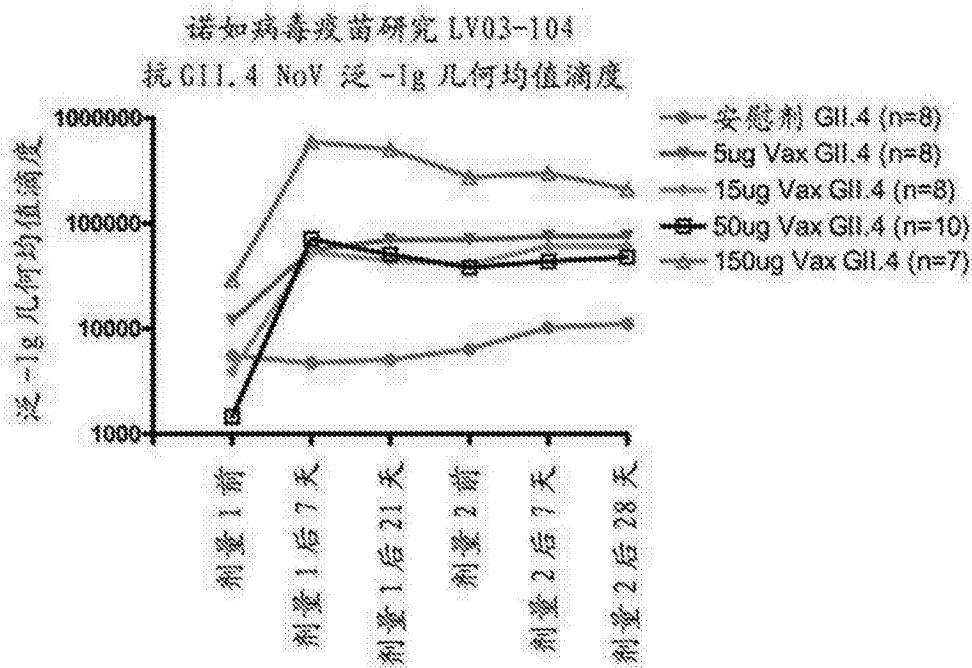
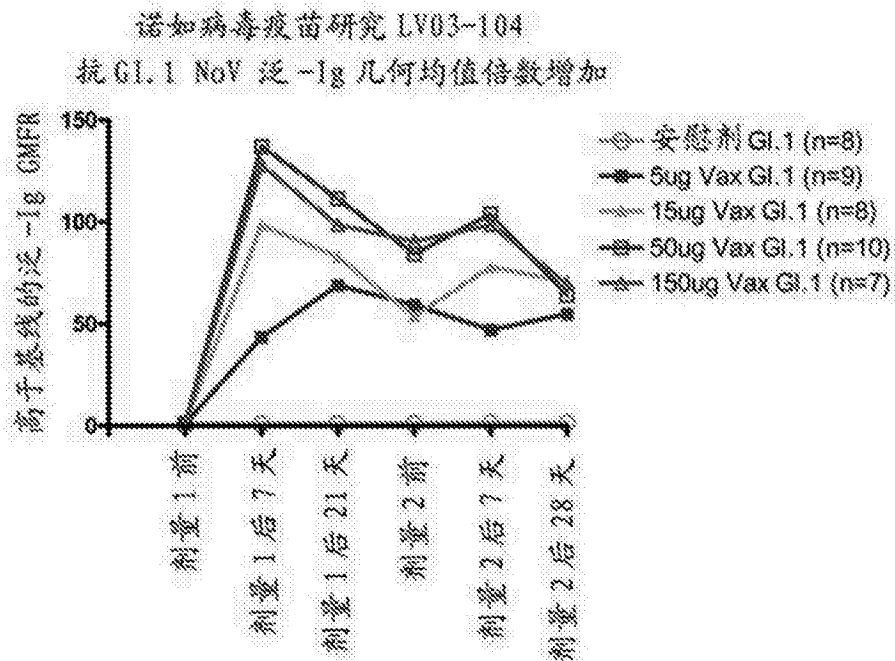


图1

A



B

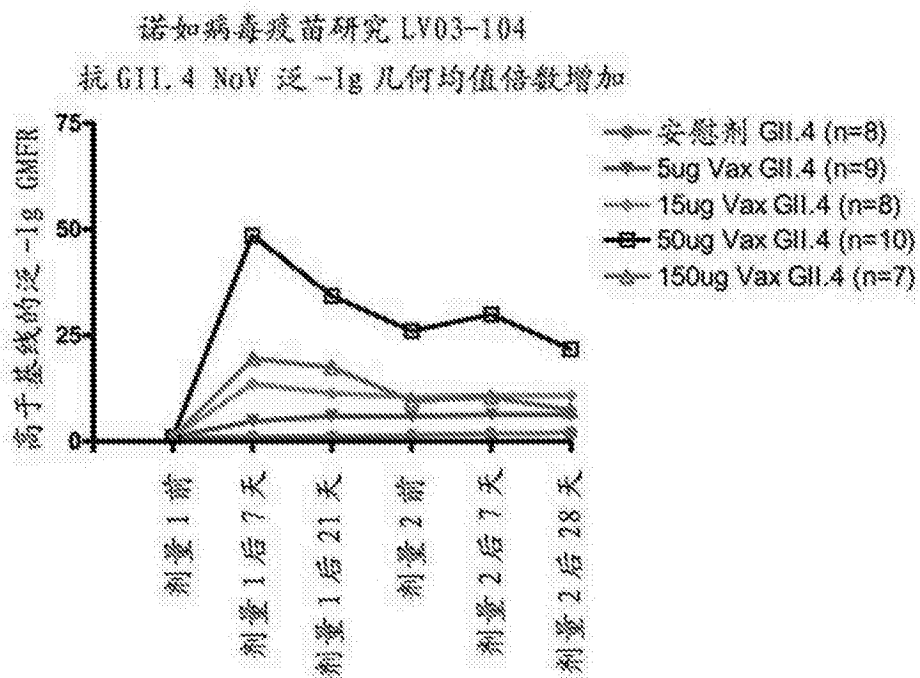
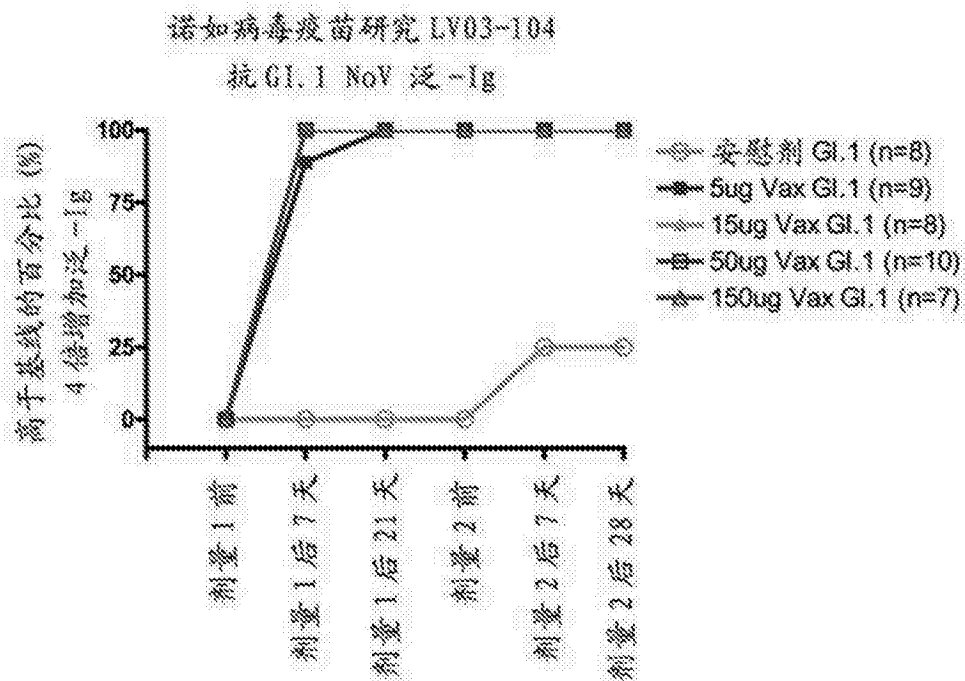


图2

A



B

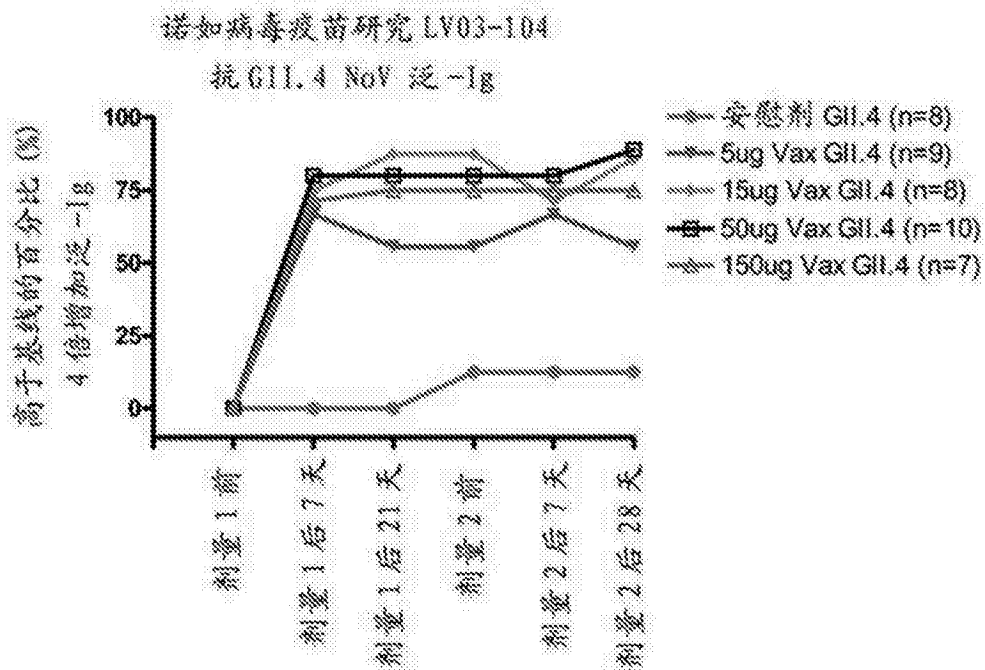
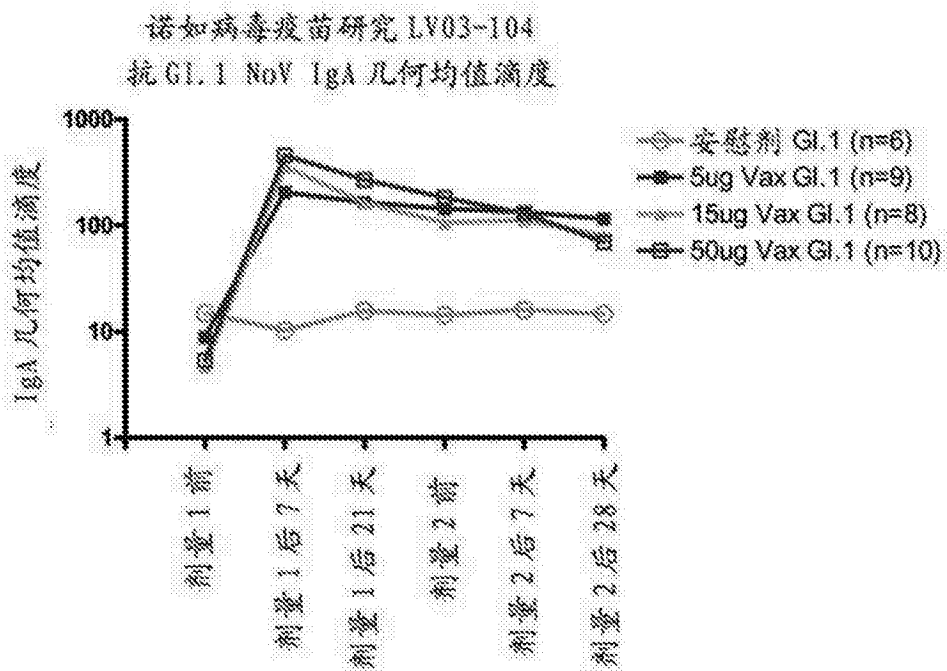


图3

A



B

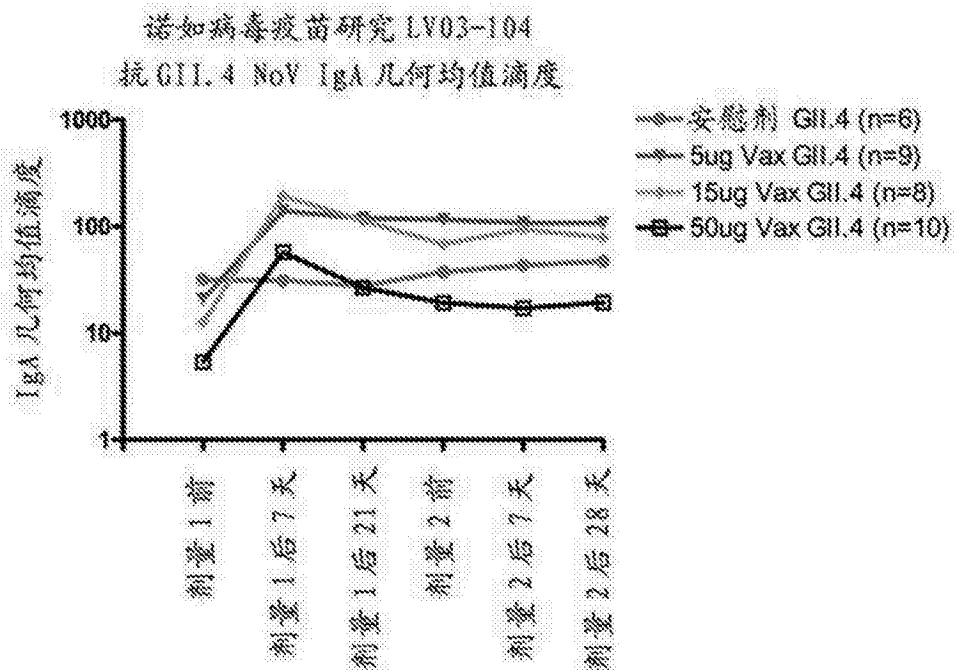
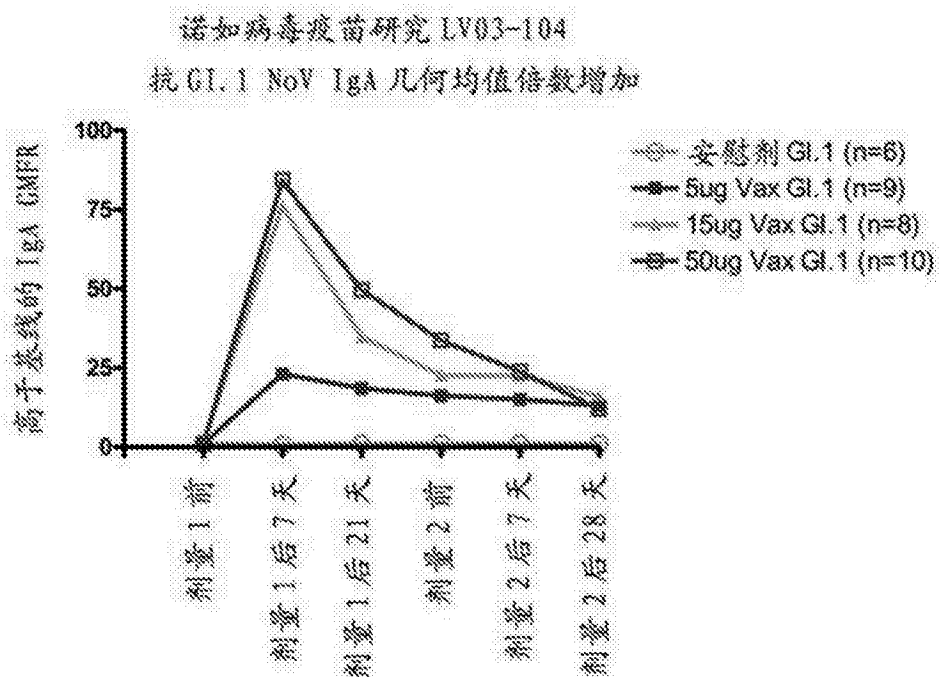


图4

A



B

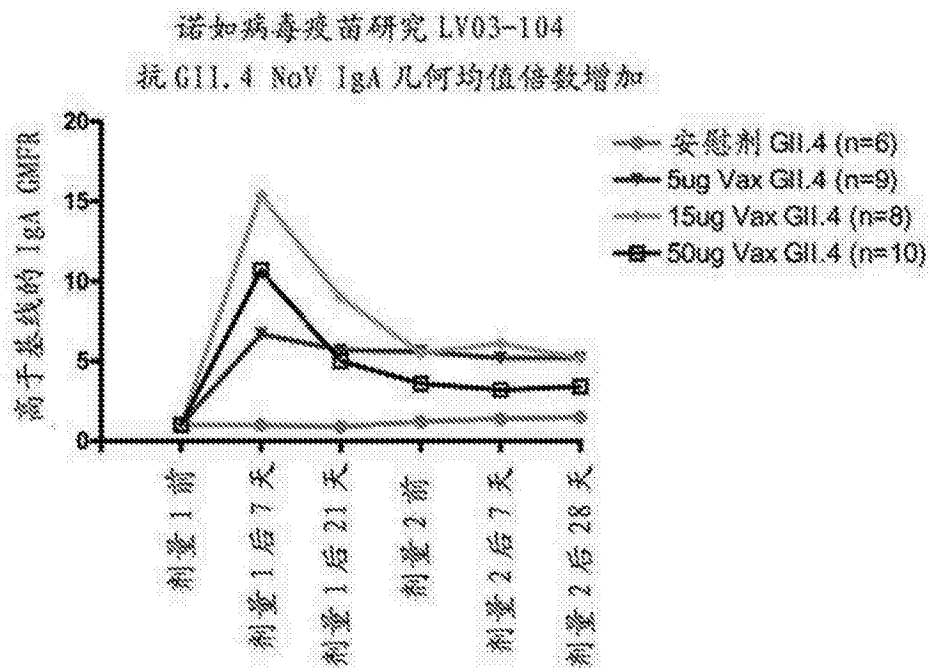
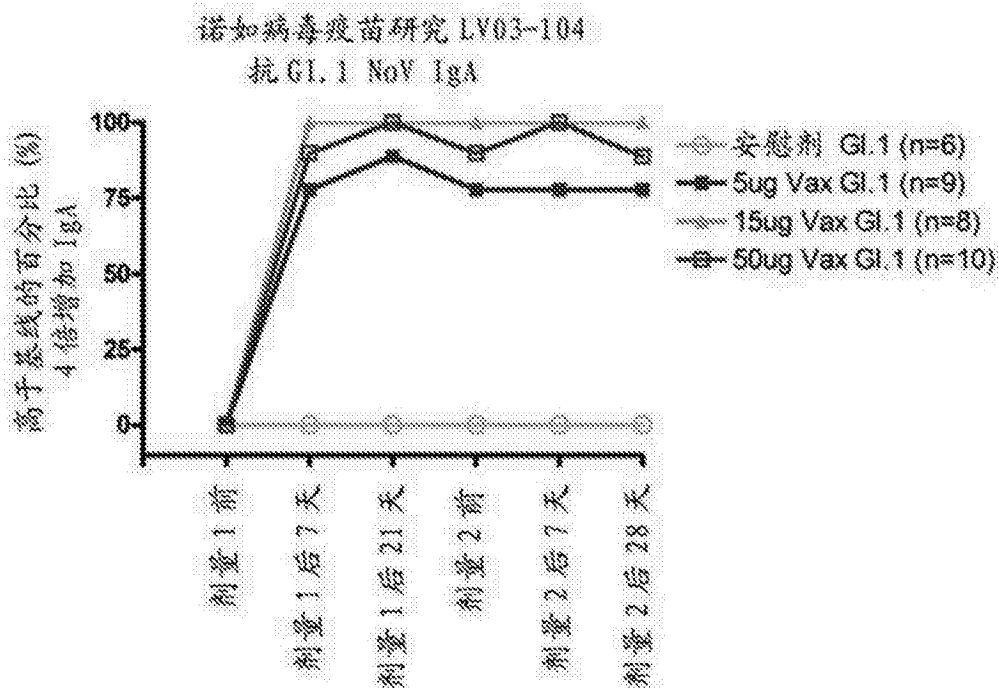


图5

A



B

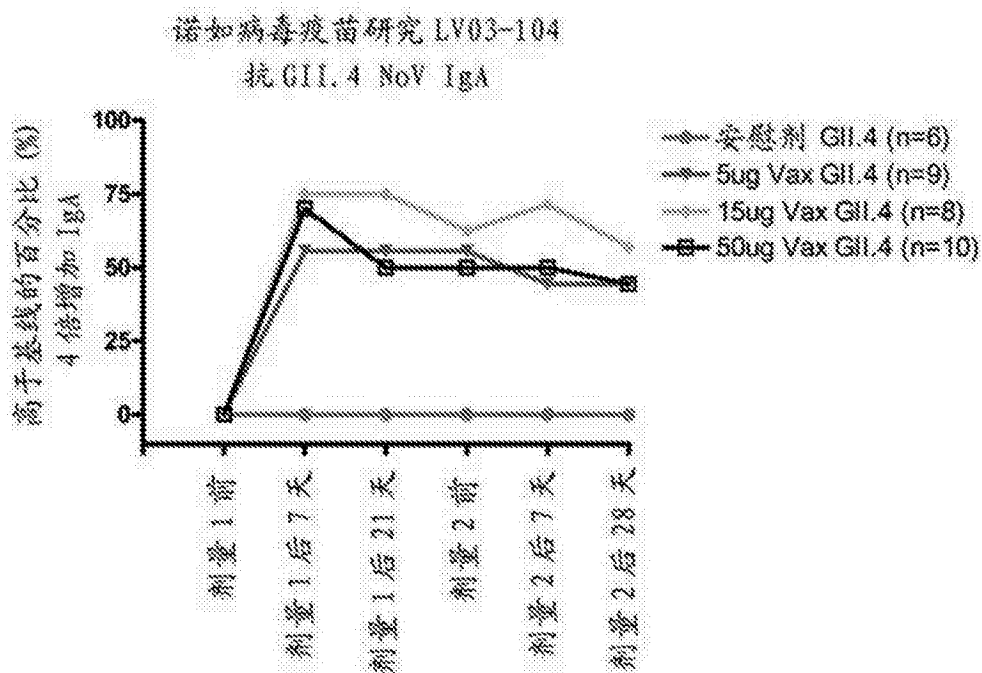
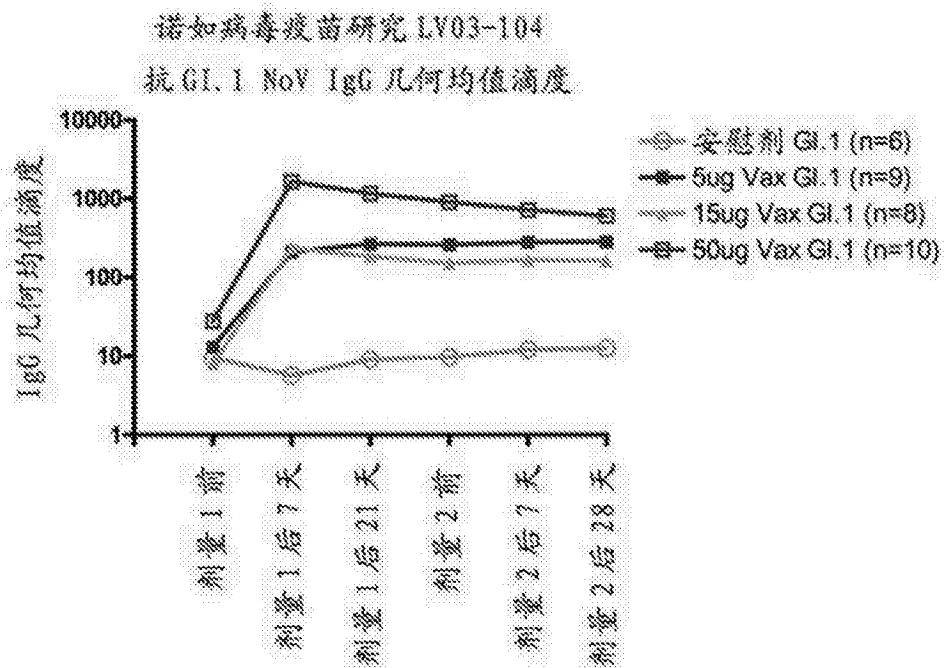


图6

A



B

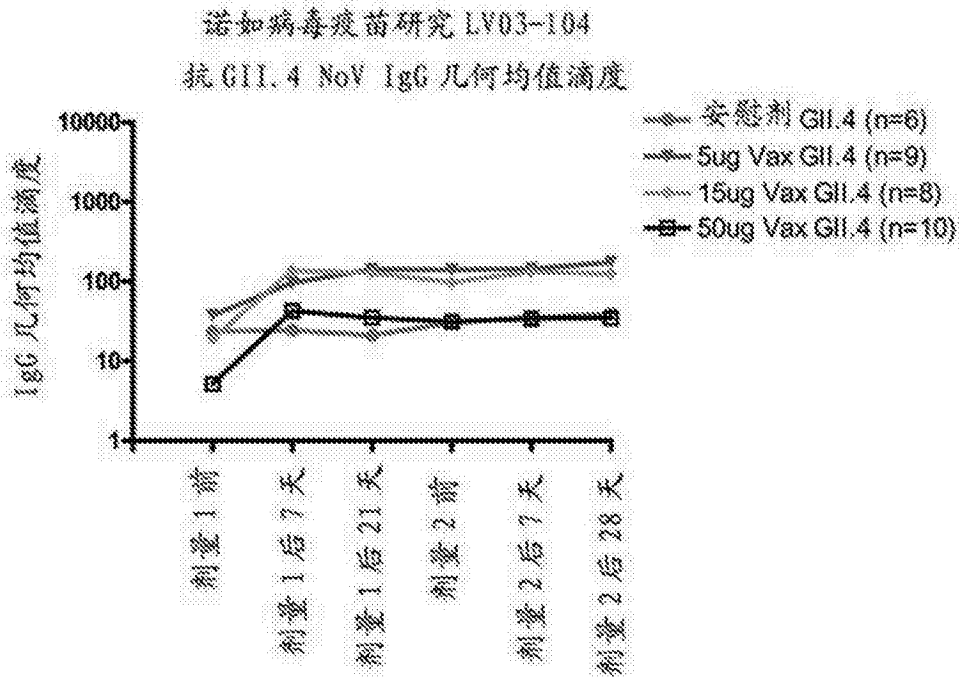
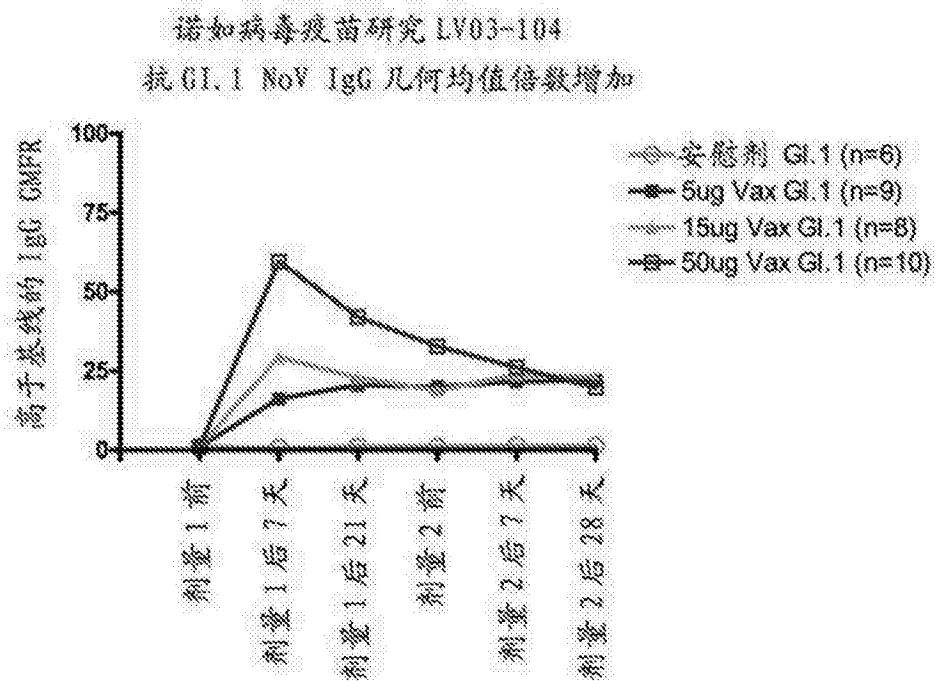


图7

A



B

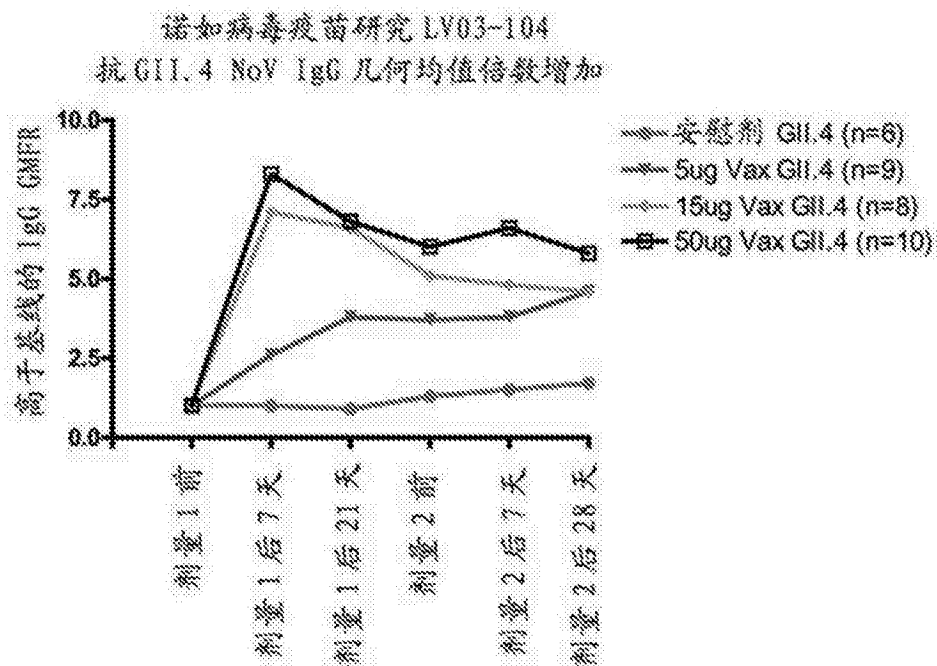
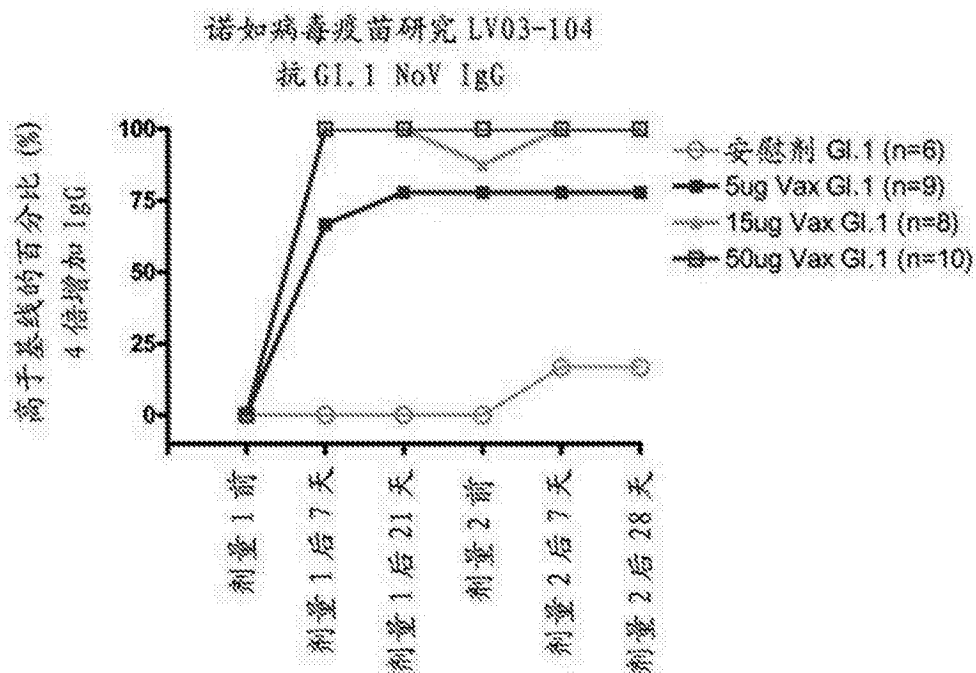


图8

A



B

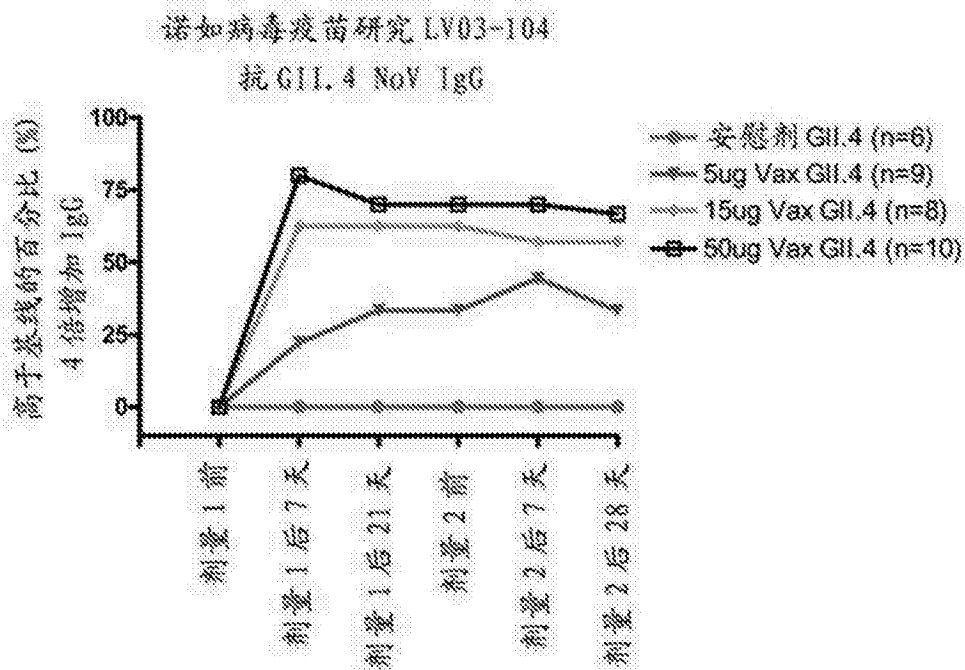


图9

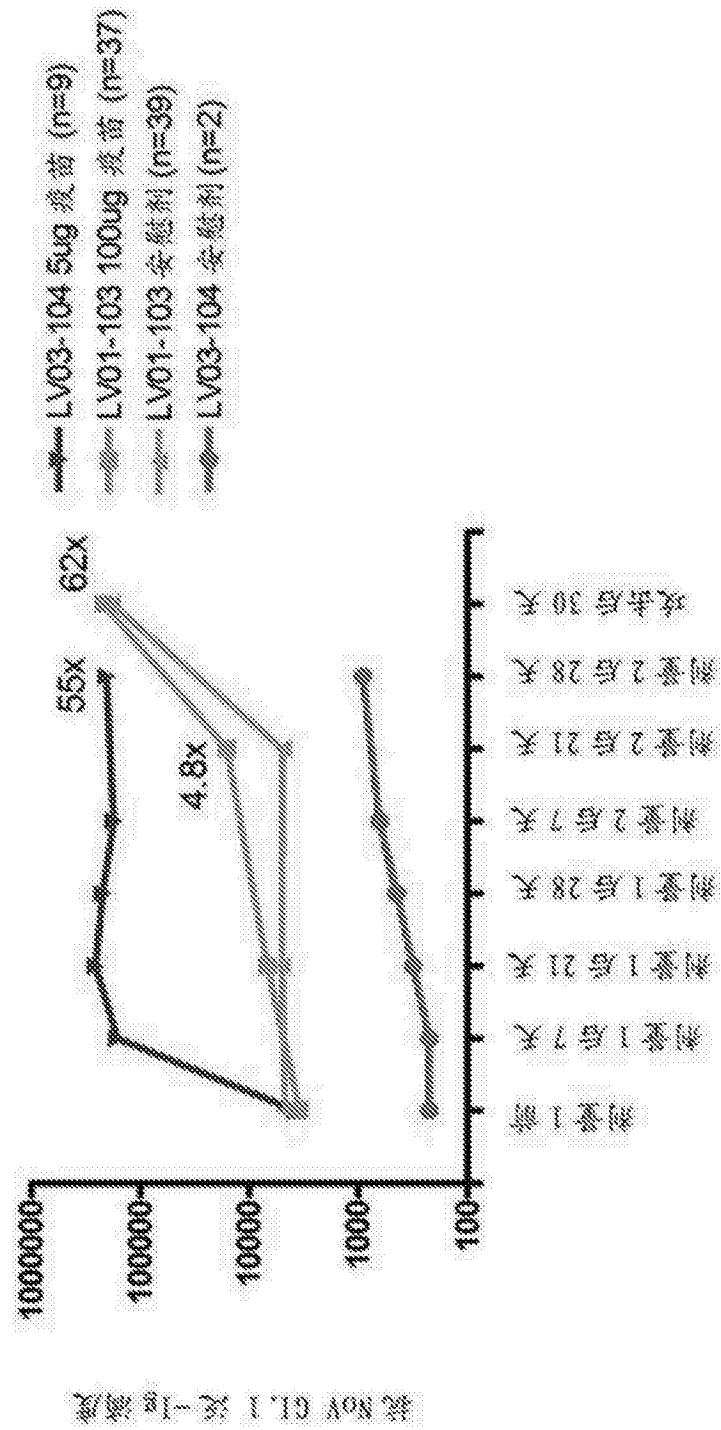


图10

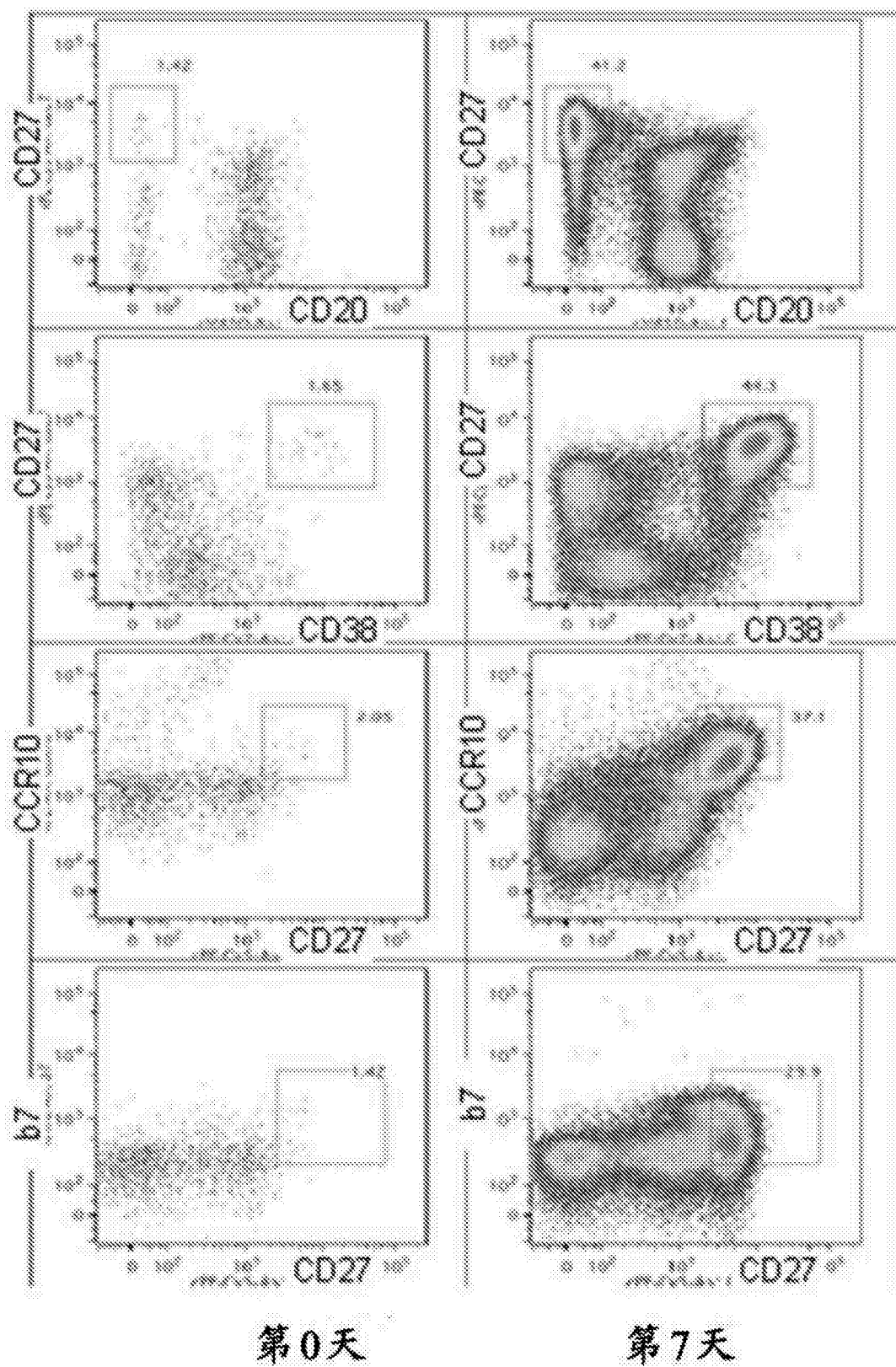


图11A

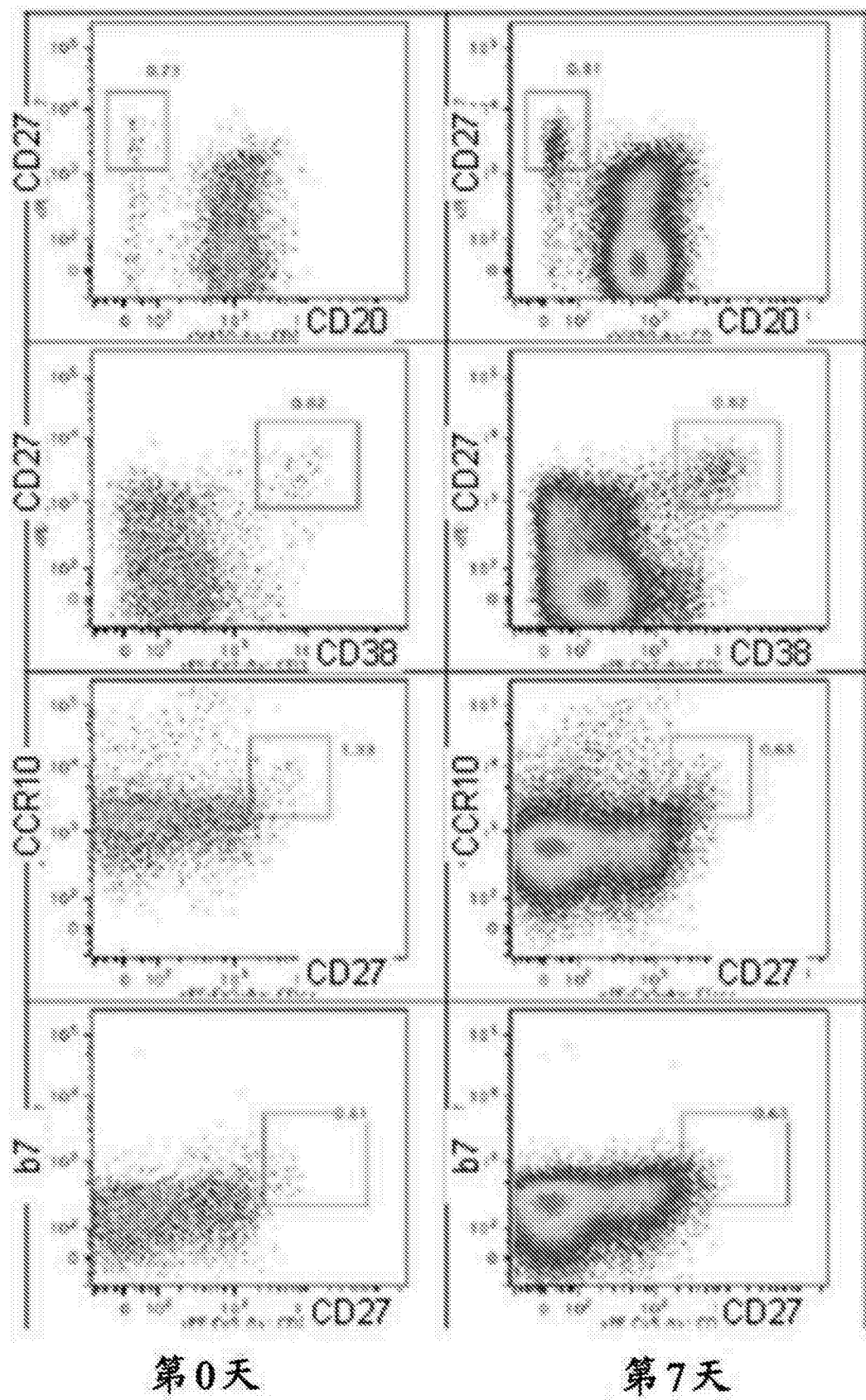


图11B