

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201792407** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2018.03.30**

(51) Int. Cl. *A61K 39/125* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2012.07.11**

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БУФЕР, СОСТАВЫ ВАКЦИН, КОТОРЫЕ  
СОДЕРЖАТ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БУФЕР, И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) **61/506,447**

(32) **2011.07.11**

(33) **US**

(62) **201490258; 2012.07.11**

(71) Заявитель:  
**ТАКЕДА ВЭКСИНС, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Ричардсон Чарльз, Баргаце Роберт Ф.,  
Мендельман Пол М. (US)**

(74) Представитель:  
**Носырева Е.Л. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к парентеральным композициям вакцины однократной дозы, содержащим смеси моновалентных вирусоподобных частиц норовируса. Также раскрыты способы обеспечения защитного иммунитета к норовирусным инфекциям у субъектов, являющихся людьми, посредством введения таких композиций.

**A2**

**201792407**

**201792407**

**A2**

**КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БУФЕР, СОСТАВЫ ВАКЦИН,  
КОТОРЫЕ СОДЕРЖАТ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БУФЕР, И  
ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

**ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[0001] Настоящая заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США 61/506447, поданной 11 июля 2011 г., полное содержание которой включено данный документ посредством ссылки.

**ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0002] Настоящее изобретение относится к области, связанной с вакцинами, в частности, вакцинами от норовирусов. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам получения композиций вакцины и способам индуцирования и оценивания защитных иммунных ответов против норовируса у людей.

**ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0003] Норовирусы являются некультивируемыми калицивирусами человека, которые, как выяснилось, являются единственной наиболее важной причиной эпидемических вспышек разновидностей небактериального гастроэнтерита (Glass *et al.*, 2000; Hardy *et al.*, 1999). Клиническое значение норовирусов недооценивали до того, как были разработаны чувствительные анализы молекулярной диагностики. Клонирование генома прототипного вируса Norwalk (NV) геногруппы I и получение вирусоподобных частиц (VLP) с помощью системы экспрессии рекомбинантного бакуловируса привело к разработке анализов, которые выявляют распространенную норовирусную инфекцию (Jiang *et al.* 1990; 1992).

[0004] Норовирусы являются вирусами, содержащими одноцепочечную молекулу РНК положительной полярности, которые содержат несегментированный РНК-геном. Вирусный геном кодирует три открытые рамки считывания, из которых последние две определяют продуцирование главного капсидного белка и малого структурного белка, соответственно (Glass *et al.* 2000). При экспрессии капсидного белка NV и некоторых других норовирусов на высоком уровне в эукариотических системах экспрессии, он самоорганизуется в VLP, которые структурно имитируют нативные вирионы норовирусов. При исследовании с помощью трансмиссионной электронной микроскопии VLP морфологически неотличимы от инфекционных вирионов, выделенных из образцов фекалий человека.

[0005] Иммунные ответы на норовирусы являются комплексными, и корреляты защиты в настоящее время только выясняют. Исследования на людях-добровольцах, осуществлявшиеся с нативным вирусом, показали, что иммунологическая память слизистых оболочек обеспечивала краткосрочную защиту от инфекции, и позволили предположить, что защита, опосредованная вакциной, является возможной (Lindesmith *et al.* 2003; Parrino *et al.* 1977; Wyatt *et al.*, 1974).

[0006] Хотя норовирус невозможно культивировать *in vitro*, благодаря доступности VLP и их способности вырабатываться в больших количествах был достигнут значительный прогресс в определении антигенной и структурной топографии норовирусного капсида. VLP сохраняют исходную конформацию вирусного капсидного белка, при этом у них отсутствует инфекционный генетический материал. Следовательно, VLP имитируют функциональные взаимодействия вируса с клеточными рецепторами, вызывая, таким образом, соответствующий иммунный ответ хозяина, но при этом у них отсутствует способность к репродукции или способность вызывать инфекцию. Медицинский колледж Бэйлора (Baylor College of Medicine) совместно с NIH изучали гуморальный, мукозный и клеточный иммунные ответы на VLP NV на людях-добровольцах в I фазе академических клинических испытаний, спонсируемых

исследователем. Перорально применяемые VLP характеризовались безопасностью и иммуногенностью у здоровых взрослых (Ball *et al.* 1999; Tacket *et al.* 2003). Но для появления иммунного ответа требовались многократные дозы с относительно высоким количеством VLP. В других научных центрах доклинические эксперименты на животных моделях продемонстрировали усиление иммунных ответов на VLP при их применении интраназально с адьювантами-бактериальными экзотоксинами (Guetero *et al.* 2001; Nicollier-Jamot *et al.* 2004; Periwal *et al.* 2003; Souza *et al.* (2007) *Vaccine*, Vol. 25(50):8448-59). Однако защитный иммунитет против норовируса у людей остается неясным в связи с тем, что показатели защитного иммунного ответа у людей все еще четко не определены (Herbst-Kralovetz *et al.* (2010) *Expert Rev. Vaccines* 9(3), 299–307).

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Настоящее изобретение частично основано на открытии, что однократная доза норовирусной вакцины вызывает быстрый, сильный защитный иммунный ответ против норовируса у людей при парентеральном введении. Соответственно, в настоящем изобретении представлен способ стимулирования формирования защитного иммунитета против норовируса у человека, включающий парентеральное введение человеку не более однократной дозы композиции вакцины, при этом указанная композиция содержит VLP норовируса геногруппы I и/или геногруппы II, при этом указанная композиция индуцирует по меньшей мере трехкратное увеличение титра норовирус-специфичных сывороточных антител по сравнению с титром у человека до введения композиции. В определенных вариантах осуществления индукция увеличения титра норовирус-специфичных антител происходит в течение семи дней после введения однократной дозы композиции. В некоторых вариантах осуществления композицию вакцины вводят человеку посредством внутривенного, подкожного, внутрикожного или внутримышечного пути введения. В одном варианте осуществления композицию вакцины вводят человеку посредством внутримышечного пути введения.

**[0008]** Композиции вакцины однократной дозы могут содержать VLP норовируса геногруппы I, VLP норовируса геногруппы II или и те, и те в дозе, составляющей от приблизительно 5 мкг до приблизительно 150 мкг. В вариантах осуществления, в которых композиции вакцины однократной дозы содержат VLP норовируса и геногруппы I, и геногруппы II, доза VLP каждой геногруппы может быть одинаковой или различной. В одном варианте осуществления композиция содержит не более 50 мкг VLP норовируса геногруппы I. В другом варианте осуществления композиция содержит не более 25 мкг VLP норовируса геногруппы I. В еще одном варианте осуществления композиция содержит не более 150 мкг VLP норовируса геногруппы II. В еще другом варианте осуществления композиция содержит не более 50 мкг VLP норовируса геногруппы II. VLP норовируса могут быть моновалентными VLP или мультивалентными VLP.

**[0009]** В некоторых аспектах настоящего изобретения VLP норовируса геногруппы I в композициях вакцины содержат капсидный белок, полученный из вирусного штамма геногруппы I. В одном варианте осуществления VLP норовируса геногруппы I содержат капсидный белок из норовируса 1 генотипа геногруппы I. В другом варианте осуществления VLP норовируса геногруппы I содержат капсидный белок из вируса Norwalk. В других аспектах настоящего изобретения VLP норовируса геногруппы II в композициях вакцины содержат капсидный белок, полученный из вирусного штамма геногруппы II. В некоторых вариантах осуществления VLP норовируса геногруппы II содержат капсидный белок из норовируса 4 генотипа геногруппы II. В определенных вариантах осуществления VLP норовируса геногруппы II представляют собой VLP, образованные в результате экспрессии консенсусной последовательности норовируса геногруппы II. В одном конкретном варианте осуществления VLP норовируса геногруппы II содержат капсидный белок с последовательностью SEQ ID NO: 1.

**[0010]** В определенных вариантах осуществления композиция вакцины дополнительно содержит по меньшей мере один адъювант. Адъювант

предпочтительно не является адьювантом-бактериальным экзотоксином. В одном варианте осуществления адьювант представляет собой агонист toll-подобных рецепторов, такой как монофосфорил-липид А (MPL), флагеллин или CpG. В другом варианте осуществления адьювант представляет собой гидроксид алюминия (например, квасцы). В определенных вариантах осуществления композиция вакцины содержит два адьюванта, таких как MPL и гидроксид алюминия. В некоторых вариантах осуществления композиция вакцины может дополнительно содержать буфер, такой как L-гистидин, имидазол, янтарная кислота, трис и лимонная кислота. Композиция вакцины может быть составлена в виде сухого порошка или жидкости. В одном варианте осуществления композицию вакцины составляют в виде жидкости (например, водный состав).

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

**[0011] Фигура 1.** Результаты анализов по методу ELISA для общего Ig по измерению объединенных сывороточных уровней IgG, IgA и IgM у людей-добровольцев, иммунизированных внутримышечно плацебо (солевым раствором) или составом вакцины, содержащим 5, 15, 50 или 150 мкг каждого из VLP норовируса геногруппы I.1 и VLP норовируса геногруппы II.4. Средний геометрический титр антител к GI.1 (A) и к GII.4 (B) показан для каждого из уровней дозировки на 7 и 21 день после первой иммунизации и на 7 и 28 день после второй иммунизации. Добровольцев иммунизировали в 0 и на 28 день исследования.

**[0012] Фигура 2.** Результаты анализов по методу ELISA для общего Ig по измерению объединенных сывороточных уровней IgG, IgA и IgM у людей-добровольцев, иммунизированных внутримышечно плацебо (солевым раствором) или составом вакцины, содержащим 5, 15, 50 или 150 мкг каждого из VLP норовируса геногруппы I.1 и VLP норовируса геногруппы II.4. Фактор сероконверсии для антител к GI.1 (A) и к GII.4 (B) показан для каждого из уровней дозировки на 7 и 21 день после первой иммунизации и на 7 и 28 день

после второй иммунизации. Добровольцев иммунизировали в 0 и на 28 день исследования.

**[0013] Фигура 3.** Результаты анализов по методу ELISA для общего Ig по измерению объединенных сывороточных уровней IgG, IgA и IgM у людей-добровольцев, иммунизированных внутримышечно плацебо (солевым раствором) или составом вакцины, содержащим 5, 15, 50 или 150 мкг каждого из VLP норовируса геногруппы I.1 и VLP норовирус геногруппы II.4. Процентные показатели серологической реакции (т. е. четырехкратное увеличение титра антител по сравнению с титрами до иммунизации) для антител к GI.1 (А) и к GII.4 (В) показаны для каждого из уровней дозировки на 7 и 21 день после первой иммунизации и на 7 и 28 день после второй иммунизации. Добровольцев иммунизировали в 0 и на 28 день исследования.

**[0014] Фигура 4.** Результаты анализов по методу ELISA по измерению сывороточного IgA у людей-добровольцев, иммунизированных внутримышечно плацебо (солевым раствором) или составом вакцины, содержащим 5, 15 или 50 мкг каждого из VLP норовируса геногруппы I.1 и VLP норовируса геногруппы II.4. Средний геометрический титр антител к GI.1 (А) и к GII.4 (В) показан для каждого из уровней дозировки на 7 и 21 день после первой иммунизации и на 7 и 28 день после второй иммунизации. Добровольцев иммунизировали в 0 и на 28 день исследования.

**[0015] Фигура 5.** Результаты анализов по методу ELISA по измерению сывороточного IgA у людей-добровольцев, иммунизированных внутримышечно плацебо (солевым раствором) или составом вакцины, содержащим 5, 15 или 50 мкг каждого из VLP норовируса геногруппы I.1 и VLP норовирус геногруппы II.4. Фактор сероконверсии для антител к GI.1 (А) и к GII.4 (В) показан для каждого из уровней дозировки на 7 и 21 день после первой иммунизации и на 7 и 28 день после второй иммунизации. Добровольцев иммунизировали в 0 и на 28 день исследования.

**[0016] Фигура 6.** Результаты анализов по методу ELISA по измерению сывороточного IgA у людей-добровольцев, иммунизированных внутримышечно плацебо (солевым раствором) или составом вакцины, содержащим 5, 15 или 50 мкг каждого из VLP норовируса геногруппы I.1 и VLP норовируса геногруппы II.4. Процентные показатели серологической реакции (т. е. четырехкратное увеличение титра антител по сравнению с титрами до иммунизации) для антител к GI.1 (А) и к GII.4 (В) показаны для каждого из уровней дозировки на 7 и 21 день после первой иммунизации и на 7 и 28 день после второй иммунизации. Добровольцев иммунизировали в 0 и на 28 день исследования.

**[0017] Фигура 7.** Результаты анализов по методу ELISA по измерению сывороточного IgG у людей-добровольцев, иммунизированных внутримышечно плацебо (солевым раствором) или составом вакцины, содержащим 5, 15 или 50 мкг каждого из VLP норовируса геногруппы I.1 и VLP норовируса геногруппы II.4. Средний геометрический титр антител к GI.1 (А) и к GII.4 (В) показан для каждого из уровней дозировки на 7 и 21 день после первой иммунизации и на 7 и 28 день после второй иммунизации. Добровольцев иммунизировали в 0 и на 28 день исследования.

**[0018] Фигура 8.** Результаты анализов по методу ELISA по измерению сывороточного IgG у людей-добровольцев, иммунизированных внутримышечно плацебо (солевым раствором) или составом вакцины, содержащим 5, 15 или 50 мкг каждого из VLP норовируса геногруппы I.1 и VLP норовируса геногруппы II.4. Фактор сероконверсии для антител к GI.1 (А) и к GII.4 (В) показан для каждого из уровней дозировки на 7 и 21 день после первой иммунизации и на 7 и 28 день после второй иммунизации. Добровольцев иммунизировали в 0 и на 28 день исследования.

**[0019] Фигура 9.** Результаты анализов по методу ELISA по измерению сывороточного IgG у людей-добровольцев, иммунизированных внутримышечно плацебо (солевым раствором) или составом вакцины, содержащим 5, 15 или



50 мкг каждого из VLP норовируса геногруппы I.1 и VLP норовируса геногруппы II.4. Процентные показатели серологической реакции (т. е. четырехкратное увеличение титра антител по сравнению с титрами до иммунизации) для антител к GI.1 (А) и к GII.4 (В) показаны для каждого из уровней дозировки на 7 и 21 день после первой иммунизации и на 7 и 28 день после второй иммунизации. Добровольцев иммунизировали в 0 и на 28 день исследования.

**[0020] Фигура 10.** Результаты анализов по методу ELISA для общего Ig по измерению объединенных сывороточных уровней IgG, IgA и IgM у людей-добровольцев, иммунизированных либо норовирусной моновалентной вакциной для интраназального введения, как описано в El Kamary *et al.* (2010) *J Infect Dis*, Vol. 202(11): 1649-1658, (группы LV01-103), либо норовирусной бивалентной вакциной для внутримышечного введения, как описано в примере 1 (группы LV03-104), в указанные моменты времени. Люди-добровольцы получали либо плацебо, либо две дозы состава вакцины либо для внутримышечного введения, либо для интраназального введения. Бивалентная норовирусная вакцина для внутримышечного введения содержала 5 мкг каждого из VLP норовируса геногруппы I.1 и VLP норовируса геногруппы II.4. Моновалентная вакцина для интраназального введения содержала 100 мкг норовируса геногруппы I.1. Добровольцам, получавшим вакцину для интраназального введения или плацебо, вводили провокационную пробу с живым норовирусом после второй иммунизации.

**[0021] Фигура 11.** FACS-анализ мононуклеарных клеток периферической крови, полученной от людей-добровольцев в 0 день перед иммунизацией либо 5 мкг дозой бивалентной норовирусной вакцины для внутримышечного введения (А), либо плацебо (В) и на 7 день после иммунизации. CD19<sup>+</sup> PBMC являются нацеленными на слизистые, о чем свидетельствует экспрессия хоминг-рецептора альфа 4/бета7 и хемокинового рецептора CCR10.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0022]** Настоящее изобретение относится к способам стимулирования формирования защитного иммунитета к норовирусным инфекциям у субъекта. В частности, в настоящем изобретении представлены способы стимулирования формирования защитного иммунитета против норовируса у человека посредством парентерального введения человеку не более однократной дозы вакцины, содержащей VLP норовируса и необязательно по меньшей мере один адъювант, где вакцина обеспечивает защиту от или облегчение по меньшей мере одного симптома норовирусной инфекции. Изобретатели обнаружили, что внутримышечное введение людям не более однократной дозы композиции вакцины, содержащей VLP норовируса, индуцирует быструю (т. е. в течение 7 дней после иммунизации) сероконверсию в сыворотке крови (т. е. по меньшей мере трехкратное увеличение титров антиген-специфичных сывороточных антител по сравнению с уровнями до вакцинации), что указывает на защитный иммунный ответ против норовирусной инфекции и заболевания. Иммунные ответы, индуцируемые данной композицией вакцины однократной дозы, достигают такого же высокого уровня титров антител, что и уровень, наблюдаемый при природной инфекции в результате введения живого вируса в исследованиях с введением провокационной пробы людям. Примечательно, что ревакцинирующая доза вакцины не требуется, поскольку иммунный ответ не повышается при дополнительном введении еще одной дозы вакцины.

**[0023]** В настоящем изобретении представлена композиция вакцины, содержащая один или несколько норовирусных антигенов. Под «норовирусом», «норовирусом (NOR)» и грамматическими эквивалентами в данном документе понимают члены рода *Norovirus* семейства *Caliciviridae*. В некоторых вариантах осуществления норовирус может включать группу родственных вирусов, содержащих одноцепочечную молекулу РНК положительной полярности, не имеющих оболочки, которые могут быть инфекционными для человека или видов млекопитающих, не являющихся человеком. В некоторых вариантах осуществления норовирус может вызывать острый гастроэнтерит у людей.

Норовирусы также могут упоминаться как небольшие сферические структурированные вирусы (SRSV), имеющие определенную поверхностную структуру или неровный контур, как видно при рассмотрении с помощью электронной микроскопии.

**[0024]** Норовирусы включают по меньшей мере пять геногрупп (GI, GII, GIII, GIV и GV). Норовирусы GI, GII и GIV являются инфекционными для людей, тогда как норовирусы GIII в основном инфицируют крупный рогатый скот. GV в недавнем времени был выделен из мышей (Zheng *et al.* (2006) *Virology*, Vol 346: 312-323). Типичными представителями GIII являются штаммы Jena и Newbury, тогда как типичными представителями GIV являются штаммы Alphatron, Fort Lauderdale и Saint Cloud. Группы GI и GII можно дополнительно разделить на генетические кластеры или генотипы на основе генетической классификации (Ando *et al.* (2000) *J. Infectious Diseases*, Vol. 181(Supp2):S336-S348; Lindell *et al.* (2005) *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 43(3): 1086–1092). Используемое в данном документе выражение «генетические кластеры» применяется взаимозаменяемо с выражением «генотипы». В геногруппу I входит 8 кластеров GI, известных на сегодняшний день (с названием прототипного вирусного штамма): GI.1 (Norwalk (NV-USA93)); GI.2 (Southampton (SOV-GBR93)); GI.3 (Desert Shield (DSV-USA93)); GI.4 (Cruise Ship virus/Chiba (Chiba-JPN00)); GI.5 (318/Musgrove (Musgrove-GBR00)); GI.6 (Hesse (Hesse-DEU98)); GI.7 (Wnchest-GBR00) и GI.8 (Boxer-USA02). В геногруппу II входит 19 кластеров GII, известных на сегодняшний день (с названием прототипного вирусного штамма): GII.1 (Hawaii (Hawaii-USA94)); GII.2 (Snow Mountain/Melksham (Msham-GBR95)); GII.3 (Toronto (Toronto-CAN93)); GII.4 (Bristol/Lordsdale (Bristol-GBR93)); GII.5 (290/Hillingdon (Hilingd-GBR00)); GII.6 (269/Seacroft (Seacrof-GBR00)); GII.7 (273/Leeds (Leeds-GBR00)); GII.8 (539/Amsterdam (Amstdam-NLD99)); GII.9 (378 (VABeach-USA01)), GII.10 (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) и GII.19 (QW170/2003/US).

**[0025]** Под «норовирусом» также в данном документе понимают вирусоподобные частицы рекомбинантного норовируса (VLP rNOR). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная экспрессия по меньшей мере норовирусного капсидного белка, кодируемого ORF2, в клетках, например, из бакуловирусного вектора в клетках Sf9, может привести к самопроизвольной самоорганизации капсидного белка в VLP. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная экспрессия по меньшей мере норовирусных белков, кодируемых ORF1 и ORF2, в клетках, например, из бакуловирусного вектора в клетках Sf9, может привести к самопроизвольной самоорганизации капсидного белка в VLP. VLP структурно схожи с норовирусами, но у них отсутствует вирусный РНК-геном и, следовательно, они не являются инфекционными. Соответственно, «норовирус» включает вирионы, которые могут представлять собой инфекционные или неинфекционные частицы, которые включают неполные частицы.

**[0026]** Неограничивающие примеры норовирусов включают норовирус геногруппы 1 штамм Hu/NoV/West Chester/2001/USA, номер доступа в GenBank AY502016; Chiba virus (CHV, GenBank AB042808); норовирус геногруппы 2 штамм Hu/NoV/Braddock Heights/1999/USA, номер доступа в GenBank AY502015; норовирус геногруппы 2 штамм Hu/NoV/Fayette/1999/USA, номер доступа в GenBank AY502014; норовирус геногруппы 2 штамм Hu/NoV/Fairfield/1999/USA, номер доступа в GenBank AY502013; норовирус геногруппы 2 штамм Hu/NoV/Sandusky/1999/USA, номер доступа в GenBank AY502012; норовирус геногруппы 2 штамм Hu/NoV/Canton/1999/USA, номер доступа в GenBank AY502011; норовирус геногруппы 2 штамм Hu/NoV/Tiffin/1999/USA, номер доступа в GenBank AY502010; норовирус геногруппы 2 штамм Hu/NoV/CS-E1/2002/USA, номер доступа в GenBank AY50200; норовирус геногруппы 1 штамм Hu/NoV/Wisconsin/2001/USA, номер доступа в GenBank AY502008; норовирус геногруппы 1 штамм Hu/NoV/CS-841/2001/USA, номер доступа в GenBank AY502007; норовирус геногруппы 2 штамм Hu/NoV/Hiram/2000/USA, номер доступа в GenBank AY502006; норовирус геногруппы 2 штамм Hu/NoV/Tontogany/1999/USA, номер доступа в

GenBank AY502005; вирус Norwalk, полный геном, номер доступа в GenBank NC.sub.--001959; норовирус Hu/GI/Otofuke/1979/JP, геномная РНК, полный геном, номер доступа в GenBank AB187514; норовирус Hu/Hokkaido/133/2003/JP, номер доступа в GenBank AB212306; норовирус Sydney 2212, номер доступа в GenBank AY588132; вирус Norwalk штамм SN2000JA, номер доступа в GenBank AB190457; вирус Lordsdale, полный геном, номер доступа в GenBank X86557; Norwalk-подобный вирус, геномная РНК, Gifu'96, номер доступа в GenBank AB045603; вирус Norwalk штамм Vietnam 026, полный геном, номер доступа в GenBank AF504671; норовирус Hu/GII.4/2004/N/L, номер доступа в GenBank AY883096; норовирус Hu/GII/Hokushin/03/JP, номер доступа в GenBank AB195227; норовирус Hu/GII/Kamo/03/JP, номер доступа в GenBank AB195228; норовирус Hu/GII/Sinsiro/97/JP, номер доступа в GenBank AB195226; норовирус Hu/GII/Ina/02/JP, номер доступа в GenBank AB195225; норовирус Hu/NLV/GII/Neustrelitz260/2000/DE, номер доступа в GenBank AY772730; норовирус Hu/NLV/Dresden174/pUS-NorII/1997/GE, номер доступа в GenBank AY741811; норовирус Hu/NLV/Oxford/B2S16/2002/UK, номер доступа в GenBank AY587989; норовирус Hu/NLV/Oxford/B4S7/2002/UK, номер доступа в GenBank AY587987; норовирус Hu/NLV/Witney/B7S2/2003/UK, номер доступа в GenBank AY588030; норовирус Hu/NLV/Banbury/B9S23/2003/UK, номер доступа в GenBank AY588029; норовирус Hu/NLV/ChippingNorton/2003/UK, номер доступа в GenBank AY588028; норовирус Hu/NLV/Didcot/B9S2/2003/UK, номер доступа в GenBank AY588027; норовирус Hu/NLV/Oxford/B8S5/2002/UK, номер доступа в GenBank AY588026; норовирус Hu/NLV/Oxford/B6S4/2003/UK, номер доступа в GenBank AY588025; норовирус Hu/NLV/Oxford/B6S5/2003/UK, номер доступа в GenBank AY588024; норовирус Hu/NLV/Oxford/B5S23/2003/UK, номер доступа в GenBank AY588023; норовирус Hu/NLV/Oxford/B6S2/2003/UK, номер доступа в GenBank AY588022; норовирус Hu/NLV/Oxford/B6S6/2003/UK, номер доступа в GenBank AY588021; изолят Norwalk-подобного вируса Vo/Thirsk10/00/UK, номер доступа в GenBank AY126468; изолят Norwalk-подобного вируса Vo/Penrith55/00/UK, номер доступа в GenBank AY126476; изолят Norwalk-подобного вируса Vo/Aberystwyth24/00/UK, номер доступа в

GenBank AY126475; изолят Norwalk-подобного вируса Vo/Dumfries/94/UK, номер доступа в GenBank AY126474; норовирус NLV/IF2036/2003/Iraq, номер доступа в GenBank AY675555; норовирус NLV/IF1998/2003/Iraq, номер доступа в GenBank AY675554; норовирус NLV/BUDS/2002/USA, номер доступа в GenBank AY660568; норовирус NLV/Paris Island/2003/USA, номер доступа в GenBank AY652979; вирус Snow Mountain, полный геном, номер доступа в GenBank AY134748; Norwalk-подобный вирус NLV/Fort Lauderdale/560/1998/US, номер доступа в GenBank AF414426; Hu/Norovirus/hiroshima/1999/JP(9912-02F), номер доступа в GenBank AB044366; Norwalk-подобный вирус штамм 11MSU-MW, номер доступа в GenBank AY274820; Norwalk-подобный вирус штамм B-1SVD, номер доступа в GenBank AY274819; норовирус геногруппы 2 штамм Hu/NoV/Farmington Hills/2002/USA, номер доступа в GenBank AY502023; норовирус геногруппы 2 штамм Hu/NoV/CS-G4/2002/USA, номер доступа в GenBank AY502022; норовирус геногруппы 2 штамм Hu/NoV/CS-G2/2002/USA, номер доступа в GenBank AY502021; норовирус геногруппы 2 штамм Hu/NoV/CS-G1/2002/USA, номер доступа в GenBank AY502020; норовирус геногруппы 2 штамм Hu/NoV/Anchorage/2002/USA, номер доступа в GenBank AY502019; норовирус геногруппы 2 штамм Hu/NoV/CS-D1/2002/CAN, номер доступа в GenBank AY502018; норовирус геногруппы 2 штамм Hu/NoV/Germanton/2002/USA, номер доступа в GenBank AY502017; калицивирус человека NLV/GII/Langen1061/2002/DE, полный геном, номер доступа в GenBank AY485642; норовирус мышей 1, полипротеин, номер доступа в GenBank AY228235; вирус Norwalk, номер доступа в GenBank AB067536; калицивирус человека NLV/Mex7076/1999, номер доступа в GenBank AF542090; калицивирус человека NLV/Oberhausen 455/01/DE, номер доступа в GenBank AF539440; калицивирус человека NLV/Herzberg 385/01/DE, номер доступа в GenBank AF539439; калицивирус человека NLV/Boxer/2001/US, номер доступа в GenBank AF538679; Norwalk-подобный вирус, геномная РНК, полный геном, номер доступа в GenBank AB081723; Norwalk-подобный вирус, геномная РНК, полный геном, изолят:Saitama U201, номер доступа в GenBank AB039782; Norwalk-подобный вирус, геномная РНК, полный геном, изолят: Saitama U18,

номер доступа в GenBank AB039781; Norwalk-подобный вирус, геномная РНК, полный геном, изолят: Saitama U25, номер доступа в GenBank AB039780; вирус Norwalk штамм:U25GII, номер доступа в GenBank AB067543; вирус Norwalk штамм:U201 GII, номер доступа в GenBank AB067542; Norwalk-подобные вирусы штамм 416/97003156/1996/LA, номер доступа в GenBank AF080559; Norwalk-подобные вирусы штамм 408/97003012/1996/FL, номер доступа в GenBank AF080558; Norwalk-подобный вирус NLV/Burwash Landing/331/1995/US, номер доступа в GenBank AF414425; Norwalk-подобный вирус NLV/Miami Beach/326/1995/US, номер доступа в GenBank AF414424; Norwalk-подобный вирус NLV/White River/290/1994/US, номер доступа в GenBank AF414423; Norwalk-подобный вирус NLV/New Orleans/306/1994/US, номер доступа в GenBank AF414422; Norwalk-подобный вирус NLV/Port Canaveral/301/1994/US, номер доступа в GenBank AF414421; Norwalk-подобный вирус NLV/Honolulu/314/1994/US, номер доступа в GenBank AF414420; Norwalk-подобный вирус NLV/Richmond/283/1994/US, номер доступа в GenBank AF414419; Norwalk-подобный вирус NLV/Westover/302/1994/US, номер доступа в GenBank AF414418; Norwalk-подобный вирус NLV/UK3-17/12700/1992/GB, номер доступа в GenBank AF414417; Norwalk-подобный вирус NLV/Miami/81/1986/US, номер доступа в GenBank AF414416; штамм Snow Mountain, номер доступа в GenBank U70059; вирус Desert Shield DSV395, номер доступа в GenBank U04469; вирус Norwalk, полный геном, номер доступа в GenBank AF093797; калицивирус Hawaii, номер доступа в GenBank U07611; вирус Southampton, номер доступа в GenBank L07418; вирус Norwalk (SRSV-KY-89/89/J), номер доступа в GenBank L23828; вирус Norwalk (SRSV-SMA/76/US), номер доступа в GenBank L23831; вирус Camberwell, номер доступа в GenBank U46500; калицивирус человека штамм Melksham, номер доступа в GenBank X81879; калицивирус человека штамм MX, номер доступа в GenBank U22498; миниреовирус TV24, номер доступа в GenBank U02030; и Norwalk-подобный вирус NLV/Gwynedd/273/1994/US, номер доступа в GenBank AF414409; последовательности всех из которых (как внесено на дату подачи настоящей заявки) включены в данный документ посредством ссылки. Дополнительные

последовательности норовируса раскрыты в следующих патентных публикациях: WO 2005/030806, WO 2000/79280, JP2002020399, US2003129588, патент США № 6572862, WO 1994/05700 и WO 05/032457, все из которых включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Для сравнения последовательностей и для рассмотрения генетического разнообразия и филогенетического анализа норовирусов см. также Green *et al.* (2000) *J. Infect. Dis.*, Vol. 181(Suppl. 2):S322-330; Wang *et al.* (1994) *J. Virol.*, Vol. 68:5982-5990; Chen *et al.* (2004) *J. Virol.*, Vol. 78: 6469-6479; Chakravarty *et al.* (2005) *J. Virol.*, Vol. 79: 554-568; Hansman *et al.* (2006) *J. Gen. Virol.*, Vol. 87:909-919; Bull *et al.* (2006) *J. Clin. Micro.*, Vol. 44(2):327-333; Siebenga, *et al.* (2007) *J. Virol.*, Vol. 81(18):9932-9941 и Fankhauser *et al.* (1998) *J. Infect. Dis.*, Vol. 178:1571-1578. Все нуклеиновые кислоты и соответствующие аминокислотные последовательности каждого из них включены в полном объеме посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления для целей идентификации может использоваться шифр, и он имеет следующий порядок: вид хозяина, из которого вирус был выделен/сокращенное обозначение рода/сокращенное обозначение вида/название штамма/год обнаружения/страна происхождения (Green *et al.*, Human Caliciviruses, in Fields Virology Vol. 1 841-874 (Knipe and Howley, editors-in-chief, 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins 2001)). Вирусные штаммы 4 генотипа геногруппы II (GII.4) (например, штаммы Houston, Minerva (также известный как Den Haag) и Laurens (также известный как Yerseke)) являются предпочтительными в некоторых вариантах осуществления. По мере того, как идентифицируют новые штаммы и их генетические последовательности становятся доступными, специалист в данной области сможет применять VLP с использованием этих современных штаммов в композициях и способах по настоящему изобретению с помощью обычных методик. Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрены VLP, полученные из таких штаммов, в качестве подходящих антигенов для применения в композициях и способах, описанных в данном документе.

**[0027]** Норовирусные антигены могут быть в форме пептидов, белков или вирусоподобных частиц (VLP). В предпочтительном варианте осуществления



норовирусные антигены включают VLP. Используемое в данном документе выражение «вирусоподобная частица (вирусоподобные частицы) или VLP» относится к вирусоподобной частице (вирусоподобным частицам), ее фрагменту (фрагментам), комплексам или части (частям), полученным из последовательности, кодирующей капсидный белок норовируса, и включающим антигенную характеристику (характеристики), аналогичные таковым инфекционных частиц норовируса. Норовирусные антигены могут также быть в форме капсидных мономеров, капсидных мультимеров, белковых или пептидных фрагментов VLP или их комплексов или смесей. Норовирусные антигенные белки или пептиды могут также находиться в денатурированной форме, их можно получить посредством способов, известных в уровне техники.

**[0028]** VLP по настоящему изобретению могут быть образованы либо из норовирусного капсидного белка полной длины, такого как белки VP1 и/или VP2, либо определенных производных VP1 или VP2 посредством стандартных способов из уровня техники. Альтернативно, капсидный белок, применяемый для образования VLP, является усеченным капсидным белком. В некоторых вариантах осуществления, например, по меньшей мере один из VLP содержит усеченный белок VP1. В других вариантах осуществления все VLP содержат усеченные белки VP1. Усечение может быть N- или C-концевым усечением. Усеченные капсидные белки являются подходящими функциональными производными капсидного белка. Функциональные производные капсидного белка способны вызывать иммунный ответ (при необходимости, при наличии подходящего адьюванта) таким же образом, как вызывают иммунный ответ VLP, состоящие из капсидного белка полной длины.

**[0029]** VLP могут содержать главные белки VP1 и/или малые белки VP2. В некоторых вариантах осуществления каждая VLP содержит белок VP1 и/или VP2 из норовируса только одной геногруппы, образуя моновалентную VLP. Используемое в данном документе выражение «моновалентный» означает, что антигенные белки получены из норовируса одной геногруппы. Например, VLP содержат VP1 и/или VP2 из штамма вируса геногруппы I (например, VP1 и VP2

из вируса Norwalk). Предпочтительно VLP преимущественно состоят из белков VP1. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антиген представляет собой смесь моновалентных VLP, где композиция включает VLP состоящие из VP1 и VP2 из норовируса одной геногруппы, смешанные с VLP, состоящими из VP1 и VP2 норовируса другой геногруппы (например, вируса Norwalk и вируса Houston), полученными из нескольких вирусных штаммов. Исключительно в качестве примера композиция может содержать моновалентные VLP из одного или нескольких штаммов норовируса геногруппы I совместно с моновалентными VLP из одного или нескольких штаммов норовируса геногруппы II. Штаммы могут быть выбраны на основе их преобладания в кровотоке в данное время. В определенных вариантах осуществления смесь VLP норовируса включает вирусные штаммы GI.1 и GII.4. Более предпочтительно смесь VLP норовируса содержит последовательность штаммов Norwalk и консенсусную последовательность капсидного белка, полученную из норовирусов геногруппы II. Консенсусные последовательности капсидного белка, полученные из последовательностей циркулирующих норовирусов, и VLP, созданные из таких последовательностей, описаны в WO 2010/017542, который включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Например, в одном варианте осуществления консенсусная последовательность капсидного белка, полученная из вирусных штаммов 4 генотипа геногруппы II (GII.4), содержит последовательность SEQ ID NO: 1. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления композиция вакцины содержит смесь моновалентных VLP, где одни моновалентные VLP содержат капсидный белок из норовируса геногруппы I (например, Norwalk), а другие моновалентные VLP содержат капсидный белок с консенсусной последовательностью, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1.

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

DVFTVSCRVLTRPSPDFDFIFLVPPTVESRTKPFTVPILT  
 VEEMTNSRFPIPLEKLFTGPSGAFVVQPQNGRCTTDGVL  
 LGTTQLSPVNICFRGDVTHIAGTQEYTMNLSQNWNN  
 YDPTEEIPAPLGTPDFVGKIQGVLTQTTRGDGSTRGHKA  
 TVSTGSVHFTPKLGSVQFSTDTSNDFETGQNTKFTPVG  
 VQDGSTTHQNEPQQWVLPDYSGRDSHNVHLAPAVPTF  
 PGEQLLFFRSTMPGCSGYPNMNLDCLLPQEWVQHFYQE  
 AAPAQSDVALLRFVNPDTGRVLFECKLHKSGYVTVANT  
 GQHDLVIPPNGYFRFDSWVNQFYTLAPMGNGTGRRRAL  
 (SEQ ID NO: 1).

**[0030]** Однако в альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения VLP могут быть мультивалентными VLP, которые содержат, например, белки VP1 и/или VP2 из норовируса одной геногруппы, смешанные с белками VP1 и/или VP2 из норовируса второй геногруппы, где различные белки VP1 и VP2 не являются химерными белками VP1 и VP2, но связаны вместе в одной капсидной структуре с образованием иммуногенных VLP. Используемое в данном документе выражение «мультивалентный» означает, что антигенные белки получены из двух или более геногрупп или штаммов норовируса. Мультивалентные VLP могут содержать антигены VLP, взятые из двух или более вирусных штаммов. Исключительно в качестве примера композиция может содержать мультивалентные VLP, состоящие из капсидных мономеров или мультимеров из одного или нескольких штаммов норовируса геногруппы I (например, вируса Norwalk) совместно с капсидными мономерами или мультимерами из одного или нескольких штаммов норовируса геногруппы II (например, вируса Houston). Предпочтительно мультивалентные VLP содержат капсидные белки из штаммов норовируса Norwalk и Houston или других преобладающих в данное время циркулирующих штаммов.

**[0031]** Комбинирование моновалентных или мультивалентных VLP в композиции предпочтительно не будет снижать иммуногенность VLP каждого типа. В частности, предпочтительно, чтобы между VLP норовируса в

комбинации по настоящему изобретению не было взаимного воздействия так, чтобы комбинированная композиция VLP по настоящему изобретению была способна стимулировать формирование иммунитета к инфекции с помощью норовируса каждого генотипа, представленного в вакцине. Соответственно, иммунный ответ против данного типа VLP в комбинации составляет по меньшей мере 50% иммунного ответа против того же типа VLP при измерении отдельно, предпочтительно 100% или практически 100%. Иммунный ответ можно подходящим образом определять, например, посредством гуморальных иммунных ответов, как иллюстрируется в примерах данного документа.

**[0032]** Используемое в данном документе выражение «VLP норовируса геногруппы I» относится либо к моновалентным, либо к мультивалентным VLP, которые содержат капсидный белок, полученный из одного или нескольких штаммов норовируса геногруппы I. В некоторых вариантах осуществления VLP норовируса геногруппы I содержат капсидный белок полной длины из норовируса геногруппы I (например, вируса Norwalk). В других вариантах осуществления VLP норовируса геногруппы I содержат капсидный белок с консенсусной последовательностью, полученный из различных штаммов геногруппы I. Штаммы геногруппы I, из которых получена консенсусная последовательность капсидного белка, могут входить в один и тот же генотип или генетический кластер или в разные генотипы или генетические кластеры. Аналогично, используемое в данном документе выражение «VLP норовируса геногруппы II» относится либо к моновалентным, либо к мультивалентным VLP, которые содержат капсидный белок, полученный из одного или нескольких штаммов норовируса геногруппы II. В некоторых вариантах осуществления VLP норовируса геногруппы II содержат капсидный белок полной длины из норовируса геногруппы II (например, вируса Laagens или Minerva). В других вариантах осуществления VLP норовируса геногруппы II содержат капсидный белок с консенсусной последовательностью, полученный из различных штаммов геногруппы II. Штаммы геногруппы II, из которых получена консенсусная последовательность капсидного белка, могут входить в один и тот же генотип или генетический кластер или в разные генотипы или генетические кластеры. В

одном варианте осуществления VLP норовируса геногруппы II содержат консенсусную последовательность капсидного белка из норовируса 4 генотипа геногруппы II (GII.4). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления VLP норовируса геногруппы II содержат последовательность капсидного белка SEQ ID NO: 1.

**[0033]** Мультивалентные VLP можно получать посредством отдельной экспрессии отдельных капсидных белков с последующим комбинированием для получения VLP. Альтернативно, множество капсидных белков может экспрессироваться в одной и той же клетке из одного или нескольких ДНК-конструктов. Например, клетки-хозяева можно трансформировать или трансфицировать с помощью множества ДНК-конструктов, причем каждый вектор кодирует отличный капсидный белок. Альтернативно, можно применять один вектор со множеством генов капсидных белков, регулируемых общим промотором или несколькими отдельными промоторами. IRES-элементы также можно при необходимости внедрять в вектор. С помощью таких стратегий экспрессии совместно экспрессируемые капсидные белки можно совместно очищать для дальнейшего образования VLP, или они могут самопроизвольно образовывать мультивалентные VLP, которые можно затем очищать.

**[0034]** Предпочтительный способ получения мультивалентных VLP включает получение капсидных белков или производных VLP, таких как белки VP1, из норовирусов различных генотипов, смешивание белков и сборку белков с получением мультивалентных VLP. Белки VP1 могут быть в форме неочищенного экстракта, могут быть частично очищенными или очищенными перед смешиванием. Собранные моновалентные VLP различных геногрупп можно разбирать, смешивать вместе и собирать заново в мультивалентные VLP. Предпочтительно белки или VLP по меньшей мере частично очищены перед комбинированием. Необязательно дополнительное очищение мультивалентных VLP можно проводить после сборки.

**[0035]** В подходящем случае VLP по настоящему изобретению получают, разбирая и заново собирая VLP для обеспечения гомогенных и чистых VLP. В одном варианте осуществления мультивалентные VLP можно получать, разбирая две или более VLP, с последующим комбинированием разобранных компонентов VLP в любой подходящий момент до новой сборки. Этот подход можно применять, когда VLP образуются самопроизвольно из экспрессированного белка VP1, что происходит, например, у некоторых штаммов дрожжей. В случае, когда экспрессия белка VP1 не приводит к самопроизвольному образованию VLP, получения белков VP1 или капсомеров можно комбинировать до сборки в VLP.

**[0036]** В случае, когда используют мультивалентные VLP, компоненты VLP предпочтительно смешивают в процентном соотношении, в котором они должны быть в конечных смешанных VLP. Например, смесь одинакового количества частично очищенного белка VP1 из вирусов Norwalk и Houston (или других штаммов норовируса) обеспечивает мультивалентные VLP с приблизительно равными количествами каждого белка.

**[0037]** Композиции, содержащие мультивалентные VLP, можно стабилизировать с помощью растворов, известных в уровне техники, таких как растворы из WO 98/44944, WO 00/45841, включенных в данный документ посредством ссылки.

**[0038]** Композиции по настоящему изобретению могут содержать другие белки или фрагменты белков в дополнение к белкам или производным VP1 и VP2 норовируса. Другие белки или пептиды можно также вводить вместе с композицией по настоящему изобретению. Необязательно композицию можно также составлять или вводить вместе с антигенами, не являющимися норовирусными антигенами. Соответственно, эти антигены могут обеспечивать защиту от других заболеваний.

**[0039]** Белок VP1 или функциональное производное белка в подходящем случае способны образовывать VLP, и образование VLP можно оценивать с помощью

стандартных техник, таких как, например, эксклюзионная хроматография, электронная микроскопия и динамическое рассеяние лазерного излучения.

[0040] Молекулы антигена по настоящему изобретению можно получать с помощью выделения и очищения из организмов, в которых они встречаются в природе, или их можно получать с помощью техник рекомбинации. Предпочтительно антигены VLP норовируса получают из клеток насекомых, таких как клетки Sf9 или H5, хотя можно применять любые подходящие клетки, такие как клетки *E. coli* или дрожжей, например, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Pichia pastoris* или другие системы экспрессии на основе *Pichia*, системы экспрессии на основе клеток млекопитающих, такие как системы экспрессии на основе CHO или HEK. При получении с помощью рекомбинантного способа или с помощью синтеза можно производить одну или несколько вставок, делеций, инверсий или замещений аминокислот, составляющих пептид. Каждый из вышеуказанных антигенов предпочтительно применяют в по сути чистом состоянии.

[0041] Процедуры получения VLP норовируса в культуре клеток насекомых были ранее раскрыты в патенте США № 6942865, который включен в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки. Вкратце, клонируют кДНК от 3'-конца генома, содержащего ген вирусного капсида (ORF2) и малый структурный ген (ORF3). Рекомбинантные бакуловирусы, несущие гены вирусного капсида, конструируют на основе клонированных кДНК. VLP норовируса получают в культурах клеток насекомых Sf9 или H5.

[0042] В некоторых вариантах осуществления композиция вакцины содержит один или несколько адъювантов в комбинации с норовирусным антигеном. Большинство адъювантов содержат вещество, предназначенное защищать антиген от быстрого катаболизма, такое как гидроксид алюминия или минеральное масло, и стимулятор иммунных ответов, такой как белки, полученные из *Bordetella pertussis* или *Mycobacterium tuberculosis*. Подходящие адъюванты коммерчески доступны, как, например, неполный адъювант Фрейнда и полный адъювант (Pifco Laboratories, Детройт, Мичиган); адъювант Merck

Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Рахвей, Нью-Джерси); соли алюминия, такие как гель гидроксида алюминия (квасцы) или фосфат алюминия; соли кальция, железа или цинка; нерастворимая суспензия ацилированного тирозина, ацилированных сахаров; катионно или анионно полученные полисахариды; полифосфазены; биоразлагаемые микросферы и Quil A.

**[0043]** Подходящие адьюванты также включают без ограничений агонисты toll-подобных рецепторов (TLR), в частности, агонисты toll-подобных рецепторов 4 типа (TLR-4) (например, монофосфорил-липид А (MPL), синтетический липид А, миметики или аналоги липида А), соли алюминия, цитокины, сапонины, производные мурамилдипептида (MDP), CpG-олигонуклеотиды, липополисахарид (LPS) грамотрицательных бактерий, полифосфазены, эмульсии, виросомы, кохлеаты, микрочастицы сополимеров (лактида и гликолида) (PLG), поллоксамерные частицы, микрочастицы, липосомы, эмульсии «масло в воде», MF59 и сквален. В некоторых вариантах осуществления адьюванты не являются экзотоксинами бактериального происхождения. Предпочтительные адьюванты включают адьюванты, которые стимулируют ответ по Th1-типу, такие как 3DMPL или QS21.

**[0044]** Монофосфорил-липид А (MPL), нетоксичное производное липида А, полученного из *Salmonella*, является сильным агонистом TLR-4, который был разработан в качестве адьюванта вакцины (Evans *et al.* 2003). В доклинических исследованиях на мышах было показано, что интраназальное введение MPL усиливает секреторные, а также системные гуморальные ответы (Baldrige *et al.* 2000; Yang *et al.* 2002). Также была доказана его безопасность и эффективность в качестве адьюванта вакцины в клинических исследованиях на более 120000 пациентов (Baldrick *et al.*, 2002; Baldrige *et al.* 2004). MPL стимулирует индукцию врожденного иммунитета посредством рецептора TLR-4 и, таким образом, способен стимулировать формирование неспецифических иммунных ответов против широкого спектра инфекционных патогенов, в том числе грамотрицательных и грамположительных бактерий, вирусов и паразитов (Baldrige *et al.* 2004; Persing *et al.* 2002). Включение MPL в составы вакцин



должно обеспечивать быструю индукцию врожденных ответов, стимулируя формирование неспецифических иммунных ответов, после введения вирусной провокационной пробы и при этом усиливать специфические ответы, вызываемые антигенными компонентами вакцины.

**[0045]** В одном варианте осуществления настоящее изобретение представляет композицию, содержащую монофосфорил-липид А (MPL) или 3-де-О-ацилированный монофосфорил-липид А (3D-MPL) в качестве стимулятора адаптивного и врожденного иммунитета. В химическом отношении 3D-MPL представляет собой смесь 3-де-О-ацилированного монофосфорил-липида А с 4, 5 или 6 ацилированными цепями. Предпочтительная форма 3-де-О-ацилированного монофосфорил-липида А раскрыта в Европейском патенте 0 689 454 В1 (SmithKline Beecham Biologicals SA), который включен в данный документ посредством ссылки. В другом варианте осуществления настоящее изобретение представляет композицию, содержащую синтетический липид А, миметики или аналоги липида А, такие как РЕТ липид А от BioMira, или синтетические производные, разработанные таким образом, что функционируют как агонисты TLR-4.

**[0046]** В определенных вариантах осуществления композиция вакцины содержит два адъюванта. Комбинацию адъювантов можно выбрать из комбинаций, описанных выше. В одном конкретном варианте осуществления два адъюванта представляют собой MPL и гидроксид алюминия (например, квасцы). В другом конкретном варианте осуществления два адъюванта представляют собой MPL и масло.

**[0047]** Выражение «эффективное количество адъюванта» будет хорошо понятно специалисту в данной области и включает количество одного или нескольких адъювантов, которое способно стимулировать иммунный ответ на введенный антиген, т. е. количество, которое увеличивает иммунный ответ на введенную композицию антигена, который измеряют на основе уровней IgA в смывах из носовой полости, уровней сывороточного IgG или IgM или В- и Т-клеточной

пролиферации. Подходящее эффективное увеличение уровней иммуноглобулинов включает более чем на 5%, предпочтительно более чем на 25% и, в частности, более чем на 50% по сравнению с такой же композицией антигена без какого-либо адъюванта.

**[0048]** В одном варианте осуществления настоящее изобретение представляет композицию вакцины, составленную для парентерального введения, где композиция включает по меньшей мере два типа VLP норовируса в комбинации с гидроксидом алюминия и буфером. Буфер может быть выбран из группы, включающей L-гистидин, имидазол, янтарную кислоту, трис, лимонную кислоту, бис-трис, PIPES, MES, HEPES, глицинамид и трицин. В одном варианте осуществления буфер представляет собой L-гистидин или имидазол. Предпочтительно буфер присутствует в концентрации от приблизительно 15 мМ до приблизительно 50 мМ, более предпочтительно от приблизительно 18 мМ до приблизительно 40 мМ или наиболее предпочтительно от приблизительно 20 мМ до приблизительно 25 мМ. В некоторых вариантах осуществления pH композиции антигена или вакцины составляет от приблизительно 6,0 до приблизительно 7,0, или от приблизительно 6,2 до приблизительно 6,8, или приблизительно 6,5. Композиция вакцины может представлять собой водный состав. В некоторых вариантах осуществления композиция вакцины представляет собой лиофилизированный порошок и ее ресуспендируют с получением водного состава.

**[0049]** В определенных вариантах осуществления композиция вакцины дополнительно содержит по меньшей мере один адъювант в дополнение к VLP норовируса двух или более типов, гидроксиду алюминия и буферу. Например, адъювант может представлять собой агонист toll-подобных рецепторов, такой как MPL, флагеллин, CpG-олигонуклеотиды, синтетический липид А или миметики или аналоги липида А. В одном конкретном варианте осуществления адъювант представляет собой MPL.

[0050] VLP норовируса, которые включают в композиции вакцины по настоящему изобретению, могут представлять собой любые VLP, описанные в данном документе. В одном варианте осуществления каждый из двух типов VLP норовируса содержит капсидный белок различных геногрупп (например, геногруппы I и геногруппы II). Например, VLP норовируса одного типа содержат капсидный белок, полученный из норовируса геногруппы I, а VLP норовируса другого типа содержат капсидный белок, полученный из норовируса геногруппы II. В одном варианте осуществления VLP норовируса одного типа содержат капсидный белок из вируса Norwalk, а VLP норовируса другого типа содержат капсидный белок с консенсусной последовательностью, полученный из норовирусов 4 генотипа геногруппы II (например, капсидный белок, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1). Композиция вакцины может содержать от приблизительно 5 мкг до приблизительно 200 мкг VLP норовируса каждого типа, более предпочтительно от приблизительно 15 мкг до приблизительно 50 мкг VLP норовируса каждого типа. В некоторых вариантах осуществления доза VLP норовируса одного типа отличается от дозы VLP норовируса другого типа. Например, в определенных вариантах осуществления композиция вакцины содержит от приблизительно 5 мкг до приблизительно 15 мкг VLP геногруппы I и от приблизительно 15 мкг до приблизительно 50 мкг VLP геногруппы II. В других вариантах осуществления композиция вакцины содержит от приблизительно 15 мкг до приблизительно 50 мкг VLP геногруппы I и от приблизительно 50 мкг до приблизительно 150 мкг VLP геногруппы II.

[0051] В некоторых вариантах осуществления композиции вакцины дополнительно содержат фармацевтически приемлемую соль, включая без ограничений хлорид натрия, хлорид калия, сульфат натрия, сульфат аммония и цитрат натрия. В одном варианте осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой хлорид натрия. Концентрация фармацевтически приемлемой соли может составлять от приблизительно 10 мМ до приблизительно 200 мМ с предпочтительными концентрациями в диапазоне от приблизительно 100 мМ до приблизительно 150 мМ. Предпочтительно композиции вакцины по настоящему изобретению содержат менее 2 мМ

свободного фосфата. В некоторых вариантах осуществления композиции вакцины содержат менее 1 мМ свободного фосфата. Композиции вакцины могут также дополнительно содержать другие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как сахара (например, сахароза, трегалоза, маннит) и поверхностно-активные вещества.

**[0052]** Как рассматривалось в данном документе, композиции по настоящему изобретению можно составлять для введения в виде составов вакцины. Используемое в данном документе выражение «вакцина» относится к составу, который содержит VLP норовируса или другие норовирусные антигены по настоящему изобретению, описанные выше, который представлен в форме, которую можно вводить позвоночным, в частности, человеку, и который индуцирует защитный иммунный ответ, достаточный для индукции иммунитета для предупреждения и/или облегчения течения норовирусной инфекции или индуцируемой норовирусом болезни и/или для уменьшения по меньшей мере одного симптома норовирусной инфекции или болезни.

**[0053]** Используемое в данном документе выражение «иммунный ответ» относится как к гуморальному иммунному ответу, так и к клеточно-опосредованному иммунному ответу. Гуморальный иммунный ответ включает стимуляцию продукции антител В-лимфоцитами, которые, например, нейтрализуют возбудителей инфекции, препятствуют проникновению возбудителей инфекции в клетки, препятствуют репликации указанных возбудителей инфекции и/или защищают клетки-хозяева от инфекции и разрушения. Клеточно-опосредованный иммунный ответ относится к иммунному ответу, опосредованному Т-лимфоцитами и/или другими клетками, такими как макрофаги, направленному против возбудителя инфекции, проявляющемуся у позвоночных (например, человека), который предупреждает или облегчает течение инфекции или уменьшает по меньшей мере один ее симптом. В частности, «защитный иммунитет» или «защитный иммунный ответ» относится к иммунитету или стимулированию формирования иммунного ответа против возбудителя инфекции, проявляющемуся у позвоночных

(например, человека), который предупреждает или облегчает течение инфекции или уменьшает по меньшей мере один ее симптом. В частности, об индукции защитного иммунного ответа при введении вакцины свидетельствует устранение или уменьшение проявления одного или нескольких симптомов острого гастроэнтерита или уменьшение длительности или тяжести таких симптомов. Клинические симптомы гастроэнтерита, вызванного норовирусом, включают тошноту, диарею, жидкий стул, рвоту, лихорадку и общее недомогание. Защитный иммунный ответ, который уменьшает или устраняет симптомы заболевания будет уменьшать или останавливать распространение эпидемии норовируса в популяции. Получение вакцины в целом описано в Vaccine Design («The subunit and adjuvant approach» (eds Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press New York). Композиции по настоящему изобретению можно составлять, например, для доставки в одну или несколько из слизистых ротовой полости, желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей (например, носовой полости). Композиции по настоящему изобретению можно составлять, например, для доставки посредством инъекции, такой как парентеральная инъекция (например, внутривенная, подкожная, внутрикожная или внутримышечная инъекция).

**[0054]** В случае, когда композиция предназначена для доставки в слизистую дыхательных путей (например, носовой полости), ее обычно составляют в виде водного раствора для введения в форме аэрозоля, или назальных капель, или, альтернативно, в форме сухого порошка, например, для быстрого накопления в носовом ходе. Композиции для введения в форме назальных капель могут содержать одно или несколько вспомогательных веществ таких, какие обычно включают в подобные композиции, например, консерванты, средства, регулирующие вязкость, средства, регулирующие тоничность, буферные средства и т.п. Средствами для изменения вязкости могут быть микрористаллическая целлюлоза, хитозан, крахмалы, полисахариды и т.п. Композиции для введения в форме сухого порошка могут также содержать одно или несколько вспомогательных веществ, какие обычно включают в подобные композиции, например, средства, регулирующие мукоадгезивные свойства,

наполнители и средства для придания порошку соответствующих характеристик текучести и объема. Наполнители и средства, регулирующие текучесть и объем порошка, могут включать маннит, сахарозу, трегалозу и ксилит.

**[0055]** В случае, когда композиция предназначена для парентеральной инъекции, такой как внутривенная (i.v.), подкожная (s.c.), внутрикожная или внутримышечная (i.m.) инъекция, ее обычно составляют в форме жидкой суспензии (т. е. водного состава), содержащей по меньшей мере один тип VLP норовируса и необязательно по меньшей мере один адъювант. В одном варианте осуществления адъювант может представлять собой MPL. В другом варианте осуществления в жидкой вакцине, составленной для парентерального введения, может содержаться более одного адъюванта. В предпочтительном варианте осуществления жидкая вакцина, составленная для парентерального введения (например, составленная для i.m., i.v. или s.c. введения), содержит VLP норовируса геногруппы I и/или геногруппы II с гидроксидом алюминия (например, квасцами) и монофосфорил-липидом A (MPL) в качестве адъювантов. В одном варианте осуществления, жидкий состав для парентерального введения содержит антиген (антигены) геногрупп норовируса, такой как один или несколько типов VLP норовируса, описанных в данном документе, MPL, гидроксид алюминия и буфер. В другом варианте осуществления жидкий состав для парентерального введения содержит антиген (антигены) геногрупп норовируса, MPL, масло и буфер. В определенных вариантах осуществления буфер в составах вакцины для парентерального введения представляет собой L-гистидин или имидазол. Парентеральное введение жидких вакцин можно осуществлять посредством иглы и шприца, как хорошо известно в уровне техники.

**[0056]** В определенных вариантах осуществления композиция вакцины по настоящему изобретению для стимулирования формирования защитного иммунного ответа против норовируса у людей содержит VLP норовируса геногруппы I и/или геногруппы II в дозе не более 150 мкг. Например, в некоторых вариантах осуществления композиция вакцины содержит не более

150 мкг, не более 100 мкг, не более 50 мкг, не более 25 мкг, не более 15 мкг или не более 10 мкг VLP норовируса геногруппы I. В других вариантах осуществления композиция вакцины содержит не более 150 мкг, не более 100 мкг, не более 50 мкг, не более 25 мкг, не более 15 мкг или не более 10 мкг VLP норовируса геногруппы II. В определенных вариантах осуществления композиция вакцины содержит не более 150 мкг каждого из VLP норовируса геногруппы I и геногруппы II. В таких вариантах осуществления доза VLP норовируса геногруппы I и VLP геногруппы II может быть одинаковой или различной. Например, в одном варианте осуществления композиция вакцины может содержать не более 50 мкг VLP норовируса геногруппы I и не более 150 мкг VLP норовируса геногруппы II. В другом варианте осуществления композиция вакцины может содержать не более 25 мкг VLP норовируса геногруппы I и не более 50 мкг VLP норовируса геногруппы II. В других вариантах осуществления композиция вакцины может содержать не более 15 мкг VLP норовируса геногруппы I и не более 50 мкг VLP норовируса геногруппы II. В еще других вариантах осуществления композиция вакцины может содержать не более 25 мкг VLP норовируса геногруппы I и не более 150 мкг VLP норовируса геногруппы II.

**[0057]** VLP норовируса геногруппы I и геногруппы II могут быть получены из любого штамма норовируса, описанного в данном документе. В одном варианте осуществления VLP норовируса геногруппы I представляют собой VLP 1 генотипа геногруппы I (GI.1) (т. е. содержат капсидный белок из норовируса GI.1). В другом варианте осуществления VLP норовируса геногруппы I представляют собой VLP вируса Norwalk. В другом варианте осуществления VLP норовируса геногруппы II представляют собой VLP 4 генотипа геногруппы II (GII.4). В другом варианте осуществления VLP норовируса геногруппы II представляют собой VLP, полученные в результате экспрессии консенсусной последовательности норовируса геногруппы II. В конкретном варианте осуществления VLP норовируса геногруппы II содержат капсидный белок с последовательностью SEQ ID NO: 1.

**[0058]** Композиции вакцины, описанные ранее в данном документе, можно лиофилизировать и хранить в безводном состоянии до того, как они будут готовы к использованию, и тогда их ресуспендируют с помощью разбавителя. Альтернативно, различные компоненты композиции можно хранить отдельно в наборе (любой или все компоненты можно лиофилизировать). Компоненты можно оставлять в лиофилизованной форме для сухого состава или можно ресуспендировать для жидких составов и либо смешивать перед применением, либо вводить пациенту отдельно. В некоторых вариантах осуществления композиции вакцины хранятся в наборах в форме жидких составов, и к ним могут прилагаться устройства доставки, такие как шприцы с иглами. В других вариантах осуществления жидкие композиции вакцины можно хранить в устройствах доставки в наборе. Например, набор может содержать предварительно заполненные шприцы, автоинжекторы или устройства шприц-ручки, содержащие жидкий состав композиции вакцины, описанный в данном документе.

**[0059]** Лиофилизация вакцин хорошо известна в уровне техники. Обычно жидкий антиген лиофилизируют в присутствии средств для защиты антигена во время процесса лиофилизации и для получения осадка с необходимыми характеристиками порошка. Сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или лактоза (присутствующие в начальной концентрации 10-200 мг/мл) обычно применяют для криозащиты белковых антигенов и для получения лиофилизованного осадка с необходимыми характеристиками порошка. Лиофилизация композиций теоретически дает в результате более устойчивую композицию.

**[0060]** Количество антигена в каждой композиции вакцины выбирают как количество, которое индуцирует сильный иммунный ответ без значительных неблагоприятных побочных эффектов. Такое количество будет варьировать в зависимости от того, какой специфический антиген (антигены) используют, от пути введения и используемых адъювантов. В общем, доза, которую вводят пациенту, согласно настоящему изобретению должна быть достаточной для



того, чтобы вызвать защитный иммунный ответ у пациента через какое-то время или чтобы индуцировать выработку антиген-специфичных антител. Таким образом, композицию вводят пациенту в количестве, достаточном для стимулирования формирования иммунного ответа на специфические антигены и/или для предупреждения, облегчения, уменьшения или излечения симптомов и/или осложнений заболевания или инфекции и, таким образом, уменьшения или остановки распространения эпидемии норовируса в популяции. Количество, достаточное для выполнения вышеуказанного, определяют как «терапевтически эффективную дозу».

[0061] Композиции вакцины по настоящему изобретению можно вводить посредством пути введения через слизистые или не через слизистые. Эти пути введения могут включать *in vivo* введение посредством парентеральной инъекции (например, внутривенной, подкожной, внутрикожной и внутримышечной), или другие традиционные прямые пути, такие как буккальный/сублингвальный, ректальный, пероральный, назальный, местный (такой как трансдермальный и глазной), вагинальный, легочный, интраартериальный, внутрибрюшинный, интраокулярный или интраназальный пути, или введение непосредственно в конкретную ткань. Другие подходящие пути введения включают чрескожный, субдермальный и посредством суппозитория. В одном варианте осуществления вакцину вводят посредством парентерального пути введения, такого как внутривенный, подкожный, внутрикожный или внутримышечный. В определенных вариантах осуществления вакцину вводят посредством внутримышечного пути введения. Введение можно осуществлять просто путем непосредственного введения с помощью иглы, катетера или сходного устройства (например, предварительно заполненных шприцев или автоинжекторов) одномоментно или в разные моменты времени. Другие составы для парентерального введения могут быть доставлены подкожно или внутрикожно посредством микроинъекции или способов доставки с использованием трансдермального пластыря.

**[0062]** В настоящем изобретении представлены способы стимулирования формирования защитного иммунитета против норовируса у субъекта, включающие парентеральное введение субъекту не более однократной дозы композиции вакцины по настоящему изобретению, где указанная вакцина содержит VLP норовируса геногруппы I и/или геногруппы II, описанные в данном документе, и необязательно по меньшей мере один адъювант. В таких вариантах осуществления композиция вакцины однократной дозы индуцирует по меньшей мере трехкратное увеличение титра норовирус-специфичных сывороточных антител по сравнению с титром у человека до введения композиции. В некоторых вариантах осуществления композиция вакцины однократной дозы индуцирует по меньшей мере шестикратное увеличение титра норовирус-специфичных сывороточных антител по сравнению с титром у человека до введения композиции. В других вариантах осуществления композиция вакцины однократной дозы индуцирует титр норовирус-специфичных сывороточных антител, сопоставимый с титром антител, индуцируемым контактом с живым норовирусом при природной инфекции, т. е. более чем десятикратное увеличение титра норовирус-специфичных сывороточных антител по сравнению с титром у человека до введения композиции. В определенных вариантах осуществления композиция вакцины однократной дозы индуцирует увеличение титра норовирус-специфичных сывороточных антител в течение семи дней после введения композиции. Предпочтительно композицию вакцины однократной дозы вводят посредством внутривенного, подкожного или внутримышечного пути введения. В определенном варианте осуществления композицию вакцины однократной дозы вводят человеку внутримышечно.

**[0063]** Как описано в данном документе, в некоторых вариантах осуществления композиции вакцины однократной дозы, подходящие для применения в способе, содержат не более 150 мкг каждого из VLP норовируса геногруппы I и/или геногруппы II. Например, в некоторых вариантах осуществления композиция вакцины содержит не более 150 мкг, не более 100 мкг, не более 50 мкг, не более 25 мкг, не более 15 мкг или не более 10 мкг VLP норовируса геногруппы I. В

других вариантах осуществления композиция вакцины содержит не более 150 мкг, не более 100 мкг, не более 50 мкг, не более 25 мкг, не более 15 мкг или не более 10 мкг VLP норовируса геногруппы II. В определенных вариантах осуществления композиция вакцины содержит не более 50 мкг каждого из VLP норовируса геногруппы I и геногруппы II. В вариантах осуществления, в которых композиция вакцины однократной дозы содержит VLP норовируса и геногруппы I, и геногруппы II, доза VLP норовируса геногруппы I и VLP геногруппы II может быть одинаковой или различной. Например, в одном варианте осуществления композиция вакцины может содержать не более 50 мкг VLP норовируса геногруппы I и не более 150 мкг VLP норовируса геногруппы II. В другом варианте осуществления композиция вакцины может содержать не более 25 мкг VLP норовируса геногруппы I и не более 50 мкг VLP норовируса геногруппы II. В других вариантах осуществления композиция вакцины может содержать не более 15 мкг VLP норовируса геногруппы I и не более 50 мкг VLP норовируса геногруппы II. В еще других вариантах осуществления композиция вакцины может содержать не более 25 мкг VLP норовируса геногруппы I и не более 150 мкг VLP норовируса геногруппы II.

[0064] В одном варианте осуществления способа субъект является человеком, и вакцина обеспечивает защиту от одного или нескольких симптомов норовирусной инфекции. Хотя в других источниках и сообщалось о способах индукции иммунного ответа с помощью норовирусных антигенов (см. публикацию заявки на патент США № US 2007/0207526), показатели защитного иммунного ответа против норовируса у людей все еще четко не определены (Herbst-Kralovetz *et al.* (2010) *Expert Rev. Vaccines* 9(3), 299–307). В отличие от некоторых вакцин, лицензированных в настоящее время в США, где эффективность вакцины коррелирует с сывороточными антителами, исследования показали, что маркеры иммунного ответа, такие как увеличение титров сывороточных антител IgG к вирусу Norwalk, не связаны с защитным иммунитетом у людей (Johnson *et al.* (1990) *J. Infectious Diseases* 161: 18-21). Более того, другое исследование, в котором изучали реакцию людей на введение провокационной пробы с вирусом Norwalk, показало, что восприимчивость к

инфекции Norwalk является мультифакториальной и включает такие факторы, как секреторный статус и иммунологическая память слизистых (Lindesmith *et al.* (2003) *Nature Medicine* 9: 548-553).

[0065] Поскольку норовирус невозможно культивировать *in vitro*, то анализы нейтрализации вирусов в настоящее время не доступны. Функциональным анализом, который служит заменой анализу нейтрализации, является анализ ингибирования гемагглютинации (HAI) (см. пример 1). HAI позволяет измерять способность антител, индуцированных норовирусной вакциной, ингибировать агглютинацию эритроцитов, покрытых антигенами, VLP норовируса, так как VLP норовируса связываются с антигенами эритроцитов (например, антигенами группы крови). Данный анализ также известен как анализ блокирования углеводов, поскольку он показывает функциональную способность антитела блокировать связывание вируса или VLP с углеводами антигенов группы крови на поверхности эритроцитов. В данном анализе определенное количество VLP норовируса смешивают с определенным количеством эритроцитов и сыворотки от иммунизированных субъектов. Если образец сыворотки содержит функциональные антитела, антитела будут связываться с VLP и, таким образом, ингибировать агглютинацию эритроцитов. Используемое в данном документе выражение «функциональные антитела» относится к антителам, способным ингибировать взаимодействие между частицами норовируса и антигенами эритроцитов. Другими словами, титр функциональных антител равен титру антител, блокирующих антигены группы крови (HBGA) или углеводы. Сывороточный титр норовирус-специфичных функциональных антител можно измерять с помощью анализа HAI, описанного выше. Сывороточный титр норовирус-специфичных функциональных антител можно также измерять с помощью анализа на основе ELISA, в котором углеводный H-антиген связан с лунками микротитровального планшета и связывание VLP норовируса с H-антигеном выявляют в присутствии сыворотки (см. пример 1 и Reeck *et al.* (2010) *J Infect Dis*, Vol. 202(8):1212-1218). Увеличение уровня норовирус-специфичных функциональных антител может служить показателем защитного иммунного ответа. Таким образом, в одном варианте осуществления введение вакцины

стимулирует формирование защитного иммунитета, что включает увеличение сывороточного титра норовирус-специфичных функциональных антител по сравнению с сывороточным титром у человека, не получавшего вакцину. Сывороточный титр норовирус-специфичных функциональных антител, служащий показателем защитного иммунного ответа, предпочтительно представляет собой средний геометрический титр, составляющий более 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 по результатам измерения с помощью анализа HAI, или средний геометрический титр блокирующих антител (BT)<sub>50</sub> (50% ингибирование связывания Н-антигена с VLP норовирусом) составляет более 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 по результатам измерения с помощью анализа связывания Н-антигена. В одном варианте осуществления сывороточный титр норовирус-специфичных функциональных антител представляет собой средний геометрический титр, составляющий более 40 по результатам измерения с помощью анализа HAI. В другом варианте осуществления сывороточный титр норовирус-специфичных функциональных антител представляет собой средний геометрический титр, составляющий более 100 по результатам измерения с помощью анализа HAI. В другом варианте осуществления сывороточный титр норовирус-специфичных функциональных антител представляет собой средний геометрический титр BT<sub>50</sub>, составляющий более 100 по результатам измерения с помощью анализа связывания Н-антигена. В еще другом варианте осуществления сывороточный титр норовирус-специфичных функциональных антител представляет собой средний геометрический титр BT<sub>50</sub>, составляющий более 200 по результатам измерения с помощью анализа связывания Н-антигена.

[0066] В дополнительном аспекте введением вакцины стимулируют формирование защитного иммунитета, включая IgA-опосредованный мукозный иммунный ответ и IgG-опосредованный системный иммунный ответ, посредством парентерального введения (предпочтительно внутримышечного) субъекту не более однократной дозы антигенной композиции или композиции вакцины, содержащей один или несколько типов норовирусных антигенов и необязательно по меньшей мере один эффективный адъювант. Изобретатели

обнаружили, что парентеральное введение композиций норовирусной вакцины, описанных в данном документе, индуцирует сильный IgA-опосредованный ответ в дополнение к сильному IgG-опосредованному ответу. Как правило, сильные IgA-опосредованные ответы наблюдаются только когда вакцины вводят посредством пути введения через слизистые.

[0067] В определенных вариантах осуществления введение вакцины стимулирует формирование защитного иммунитета, что включает увеличение уровня клеток, секретирующих норовирус-специфичные антитела класса IgA, в крови по сравнению с уровнем у человека, не получавшего вакцину. В некоторых вариантах осуществления введение вакцины стимулирует формирование защитного иммунитета, что включает увеличение уровня клеток, секретирующих норовирус-специфичные антитела класса IgA, в крови по сравнению с уровнем у человека до получения вакцины. В одном варианте осуществления клетками, секретирующими норовирус-специфичные антитела класса IgA, являются CCR10+, CD19+, CD27+, CD62L+ и  $\alpha 4\beta 7+$ . Клетки, секретирующие антитела, с данным маркерным профилем способны к хоумингу как в периферическую лимфоидную ткань, такую как пейеровы бляшки в кишечнике, так и в лимфоидную ткань слизистой, такой как слизистая кишечника. В одном варианте осуществления количество CCR10+, CD19+, CD27+, CD62L+ и  $\alpha 4\beta 7+$  клеток, секретирующих антитела класса IgA, составляет более приблизительно 500, приблизительно 700, приблизительно 1000, приблизительно 1500 или более приблизительно 2000 клеток на  $1 \times 10^6$  моноцитов периферической крови. В другом варианте осуществления клетками, секретирующими норовирус-специфичные антитела класса IgA, являются CCR10+, CD19+, CD27+, CD62L- и  $\alpha 4\beta 7+$ .  $\Sigma$  секретирующих антитела клеток с данным маркерным профилем обычно наблюдается хоуминг только в участки слизистой, и они могут служить показателями вторичного В-клеточного ответа. В некоторых вариантах осуществления, в которых вакцину вводят внутримышечно, количество CCR10+, CD19+, CD27+, CD62L- и  $\alpha 4\beta 7+$  клеток, секретирующих антитела класса IgA, составляет более приблизительно 5000, приблизительно 6500, приблизительно 7000, приблизительно 10000,

приблизительно 13000, приблизительно 15000 или более приблизительно 20000 клеток на  $1 \times 10^6$  моноцитов периферической крови.

[0068] Аналогичные результаты получали с вакцинами против других вирусов, таких как ротавирус. В отношении ротавирусной вакцины существуют разногласия по поводу того, вовлечены ли сывороточные антитела непосредственно в защиту или только отражают недавнюю инфекцию (Jiang, 2002; Franco, 2006). Определение таких взаимосвязей с защитой особенно затруднительно в отношении острых кишечных инфекций, таких как ротавирусные или норовирусные, поскольку доклинические исследования, по результатам которых можно сделать вывод о защитном эффекте, могут быть многофакторными и учитывать защитные свойства слизистых (такие как опосредованные IgA кишечника), выработку цитокинов и клеточный иммунитет. Сложность измерения таких иммунных ответов во время клинических исследований и слабая взаимосвязь с данными измерений сывороточных антител подразумевают, что эффективность вакцины против этих типов вирусов можно обнаружить только с помощью клинических экспериментов по введению провокационной пробы людям.

[0069] Как указано выше, введение композиции вакцины по настоящему изобретению предупреждает и/или уменьшает по меньшей мере один симптом норовирусной инфекции. Симптомы норовирусной инфекции хорошо известны в уровне техники и включают тошноту, рвоту, диарею и спастические боли в желудке. Кроме того, у пациента с норовирусной инфекцией может наблюдаться субфебрильная лихорадка, головная боль, озноб, мышечные боли и слабость. Настоящее изобретение также охватывает способ индукции защитного иммунного ответа у субъекта с наличием норовирусной инфекции посредством введения субъекту состава вакцины по настоящему изобретению таким образом, что облегчают и/или уменьшают по меньшей мере один симптом, связанный с норовирусной инфекцией. Уменьшение симптома может быть определено субъективно или объективно, например, посредством самостоятельной оценки своего состояния субъектом, оценки клиницистом или посредством проведения

соответствующего анализа или измерения (например, температуры тела), включая, например, оценку качества жизни, замедление прогрессирования норовирусной инфекции или дополнительных симптомов, уменьшение тяжести симптомов норовирусной инфекции, или подходящих анализов (например, титр антител, выявление антигенов методом ОТ-ПЦР и/или анализ активации В-клеток или Т-клеток). Эффективный ответ также можно определять посредством прямого измерения (например, ОТ-ПЦР) вирусной нагрузки в образцах испражнений, которая отражает количество вирусов, выделяемых из кишечника). Объективное оценивание включает методы оценки, применяемые как для животных, так и для человека.

**[0070]** В настоящем изобретении также представлен способ стимулирования образования антител к одному или нескольким норовирусным антигенам, причем указанный способ включает введение композиции вакцины по настоящему изобретению, описанной выше, субъекту. Эти антитела можно выделять и очищать с помощью обычных способов из уровня техники. Выделенные антитела, специфичные в отношении норовирусных антигенов, можно использовать при разработке диагностических иммунологических анализов. Эти анализы можно использовать для выявления норовируса в клинических образцах и идентификации конкретного вируса, вызывающего инфекцию (например, Norwalk, Houston, Snow Mountain и т. д.). Альтернативно, выделенные антитела можно вводить субъектам, восприимчивым к норовирусной инфекции, для обеспечения пассивного или краткосрочного иммунитета.

**[0071]** Настоящее изобретение будет далее более подробно иллюстрировано основываясь на конкретных вариантах осуществления, описанных в следующих примерах. Примеры, как предполагается, служат исключительно иллюстративным целям настоящего изобретения и, как предполагается, не ограничивают каким-либо образом его объем.



## ПРИМЕРЫ

**Пример 1. Исследование с эскалацией дозы по изучению безопасности и иммуногенности норовирусной бивалентной вакцины для внутримышечного введения на основе вирусоподобных частиц (VLP) у людей (исследование LV03-104), когорта А**

[0072] В данном примере описана когорта А рандомизированного многоцентрового исследования с эскалацией дозы по изучению безопасности и иммуногенности четырех уровней дозировки норовирусной бивалентной вакцины для внутримышечного введения (IM) на основе VLP с адьювантом монофосфорил-липидом А (MPL) и гидроксидом алюминия (AlOH) по сравнению с плацебо у взрослых субъектов. Приблизительно 48 субъектов в возрасте от 18 до 49 лет включили в когорту. Субъекты получали две дозы вакцины или плацебо посредством внутримышечной (IM) инъекции с использованием 1,5-дюймовой (38 мм) иглы с разницей в 28 дней.

[0073] Норовирусная бивалентная вакцина на основе VLP содержала VLP 1 генотипа геногруппы I (GI.1) и IV генотипа геногруппы II (GII.4) в качестве антигенов и монофосфорил-липид А (MPL) и гидроксид алюминия (AlOH) в качестве адьювантов, хлорид натрия (NaCl) и L-гистидин (L-His) в качестве буфера (pH 6,3-6,7), этанол и воду для инъекций. Композиция норовирусной бивалентной вакцины для внутримышечного введения на основе VLP изложена в таблице 1. VLP GII.4 содержали последовательность капсидного белка SEQ ID NO: 1, полученную из трех штаммов GII.4.

Таблица 1. Конечная композиция готовой лекарственной формы для четырех составов норовирусных бивалентных IM вакцин на основе VLP в расчете на 0,5 мл

Состав	VLP GI.1 (мкг)	VLP GI.4 (мкг)	MPL (мкг)	Al* (мг)	NaCl (мг)	L-His (мг)	Этанол (мг)
Дозировка 10 мкг	5	5	50	0,5	4,38	1,55	19,7
Дозировка 30 мкг	15	15	50	0,5	4,38	1,55	19,7
Дозировка 100 мкг	50	50	50	0,5	4,38	1,55	19,7
Дозировка 300 мкг	150	150	50	0,5	4,38	1,55	19,7

\* в виде гидроксида алюминия

[0074] Плацебо представляло собой стерильный нормальный солевой раствор для инъекций (0,9% NaCl, без консервантов). Эскалацию дозы вакцины проводили следующим образом: после соответствующего скрининга на предмет удовлетворительного состояния здоровья субъектов когорты А последовательно включали в каждую из четырех групп по дозировке, по ~12 субъектов каждая (группы по дозировке A1, A2, A3 и A4). Группы по дозировке A1, A2, A3 и A4 представляли дозировки бивалентных антигенов, составляющие 5/5 мкг, 15/15 мкг, 50/50 мкг и 150/150 мкг VLP норовируса G I.1 и GI.4, соответственно. Субъекты в каждой группе по дозировке были рандомизированы в соотношении 5:1 для получения вакцины или плацебо. Субъекты в группе по дозировке A1 получали свое соответствующее рандомизированное лечение (10 субъектов получали 5/5 мкг вакцины и 2 субъекта получали плацебо). Субъектов наблюдали с целью оценки безопасности посредством рассмотрения симптомов, зарегистрированных во дневнике самонаблюдения (дни 0-7) и индивидуальных картах, начиная с дня посещения 7, 21, 28, 35 и 56. Данные по безопасности рассматривались главным наблюдателем, ответственным за безопасность (CSM). После того, как от субъектов группы по дозировке A1 были получены для рассмотрения данные по безопасности по истечении 7 дней после приема дозы 2 (день исследования 35) и их сочли приемлемыми, субъекты группы по дозировке A2 допускались к приему своей начальной дозы. То же правило применяли для

дозирования в последующих группах по дозировке; то есть после того, как от группы по дозировке были получены для рассмотрения данные по безопасности по истечении 7 дней после приема дозы 2 (день исследования 35), следующая группа по дозировке допускалась к приему своей начальной дозы.

[0075] По окончании включения в когорту А приблизительно 10 субъектов в каждой группе по дозировке получали вакцину (в сумме 40 вакцинированных) и 2 субъекта в каждой группе получали солевой раствор (в сумме приблизительно 8 реципиентов, получавших солевой раствор-контроль).

[0076] Субъекты ежедневно вели записи в дневнике самонаблюдения об ожидаемых симптомах, включая четыре местные реакции в местах инъекций, такие как боль, болезненная чувствительность, покраснение и припухлость, и 10 системных проявлений или симптомов, включая ежедневную температуру тела, измеряемую в ротовой полости, головную боль, слабость, мышечные боли, озноб, боли в суставах и гастроинтестинальные симптомы, а именно тошноту, рвоту, диарею, абдоминальные спастические боли/абдоминальную боль, от дня 0 до 7 после каждой дозы норовирусной бивалентной IM вакцины на основе VLP или контроля. Покраснение и припухлость в месте инъекции измеряли и регистрировали ежедневно в течение 7 дней после каждой инъекции.

[0077] Индивидуальные карты заполняли при каждом последующем посещении в дни 7+3, 21+3, 28+3, 35+3, 56+7, 180+14 и 393+14 и во время последующего телефонного звонка в день 265+14; субъектов расспрашивали о перенесенных за данный период заболеваниях, посещениях врача, любых серьезных неблагоприятных явлениях (SAE) и возникновении любых новых значимых медицинских состояний. У субъектов определяли количество форменных элементов крови с определением лейкоцитарной формулы и определением количества тромбоцитов и осуществляли оценку сывороточной мочевины, креатинина, глюкозы, АСТ и АЛТ при скрининге и в дни 21 и 35 (~7 дней после каждой дозы) для оценки того, продолжают ли они соответствовать требованиям, и для оценки безопасности, соответственно.

[0078] У субъектов забирали образцы крови перед вакцинацией в день 0 и в дни 7+3, 21+3, 28+3, 35+3, 56+7, 180+14 и 393 +14 для измерения сывороточных антител (IgG, IgA и IgM по отдельности и в совокупности), выработанных в ответ на норовирусную бивалентную IM вакцину на основе VLP, посредством иммуноферментных анализов (ELISA). Также измеряли уровни антител, обуславливающих активность блокирования углеводов в сыворотке крови и HAI в сыворотке крови. У субъектов когорты А анализировали клетки, секретирующие антитела (ASC), маркеры хоуминга, В-клетки памяти и клеточные иммунные ответы.

[0079] Следующие способы применяли для анализа образцов крови, собранных от иммунизированных лиц или лиц, получавших плацебо.

#### Измерения уровней сывороточных антител посредством ELISA

[0080] Измерение уровней антител к норовирусам посредством ELISA осуществляли у всех субъектов с использованием очищенных рекомбинантных VLP норовируса (GI.1 и GII.4 по отдельности) в качестве целевых антигенов для того, чтобы осуществлять скрининг проб с присвоенным шифром. Вкратце, VLP норовируса в карбонатном покрывающем буфере с pH 9,6 использовали для нанесения на титрационные микропланшеты. Планшеты промывали, блокировали и инкубировали с двукратными серийными разведениями исследуемой сыворотки с последующим промыванием и инкубированием со связанными с ферментом вторичными антителами-реагентами, специфичными в отношении всех IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgM человека. Добавляли соответствующие субстратные растворы, осуществляли проявление окрашивания, считывание планшетов и определяли конечные титры IgG, IgA и IgM в сравнении с контрольной стандартной кривой для каждого класса антител. Определяли средние геометрические титры (GMT), фактор сероконверсии (GMFR) и показатели серологической реакции для каждой группы. Серологическую реакцию характеризовали как 4-кратное увеличение титра антител по сравнению с титрами до иммунизации.

Активность норовирусов по блокированию углеводных антигенов группы крови (HBGA)

[0081] Анализы блокирования для определения способности сывороточных антител ингибировать связывание VLP NV с синтетическими углеводными Н-антигенами 1 типа или Н-антигенами 3 типа осуществляли, как описано ранее (Reeck *et al.* (2010) *J Infect Dis*, Vol. 202(8):1212-1218). Вкратце, VLP NV для анализов блокирования инкубировали с равным объемом сыворотки и осуществляли двукратное серийное разведение, начиная от исходного разведения 1:25. Покрытые нейтравидином 96-луночные титрационные микропланшеты промывали и на них наносили 2,5 мкг/мл либо синтетического поливалентного комплекса Н-антиген 1 типа-РАА-биотин, либо поливалентного комплекса Н-антиген 3 типа-РАА-биотин. Добавляли растворы VLP в сыворотке. Планшеты промывали и добавляли поликлональную сыворотку кролика, специфичную в отношении VLP NV, промывали и затем инкубировали с антителами козы к IgG кролика, связанными с пероксидазой хрена. Окрашивание проявляли с помощью жидкого субстрата для пероксидазы тетраметилбензидина и останавливали с помощью 1М фосфорной кислоты. Оптическую плотность измеряли при 450. Выполняли положительный и отрицательный контроли. Определяли пятидесятипроцентные титры блокирующих антител (BT50), их характеризовали как титры, при которых результаты считывания OD (после удаления данных контроля) составляли 50% положительного контроля. Значение 12,5 было присвоено образцам с BT50 менее 25. Определяли средние геометрические титры (GMT), фактор сероконверсии (GMFR) и показатели серологической реакции для каждой группы. Серологическую реакцию характеризовали как 4-кратное увеличение титра антител по сравнению с титрами до иммунизации. Контрольные образцы блокирующей сыворотки использовали в качестве внутреннего контроля. Анализ для подтверждения специфичности блокирования осуществляли с использованием того же самого протокола для анализа блокирования со следующими особенностями: после нанесения углеводов сыворотки инкубировали непосредственно на планшете без первого предварительного

инкубирования с VLP. После промывки VLP инкубировали на планшете и выявляли так же, как в анализе блокирования.

Анализ антитело-опосредованного ингибирования гемагглютинации (НАИ) норовирусом

[0082] Индуцированные вакциной антитела исследовали на способность ингибировать гемагглютинацию эритроцитов человека О-типа VLP норовируса, как описано ранее (El Kamary *et al.* (2010) *J Infect Dis*, Vol. 202(11): 1649-58). Титры НАИ вычисляли как величину, обратную наибольшему разведению, при котором происходило ингибирование гемагглютинации с образованием компактного «отрицательного» паттерна эритроцитов, и представляли в виде GMT, GMFR и  $\geq 4$ -кратного увеличения.

[0083] Проводили серийное разведение VLP норовируса GI.1 и GII.4 по отдельности и инкубировали их с равным объемом 0,5% суспензии эритроцитов человека в 96-луночной планшете с V-образным дном. Определяли количество антигенов, VLP норовируса, соответствующее 4 ГА единицам, и подтверждали посредством обратного титрования. Исследуемые сыворотки инактивировали теплом при 56°C в течение 30 минут и обрабатывали свежеполученной 25% суспензией каолина. Для того, чтобы исключить сывороточные ингибиторы, исследуемые образцы были предварительно адсорбированы на эритроцитах. Анализ НАИ осуществляли следующим образом: предварительно обработанные сыворотки (в двукратном разведении в PBS, pH 5,5) добавляли в 96-луночные планшеты с V-образным дном и инкубировали с равным объемом антигена, VLP норовируса GI.1 и GII.4, соответственно, содержащим 4 ГА единицы. Добавляли 0,5% суспензию эритроцитов в каждую лунку и планшеты инкубировали в течение дополнительных 90 минут при 4°C. Лунки, содержавшие только PBS или антиген без сыворотки, служили в качестве отрицательных и положительных контролей, соответственно. Определяли средние геометрические титры (GMT), фактор сероконверсии (GMFR) и показатели серологической реакции для каждой группы. Серологическую реакцию

характеризовали как 4-кратное увеличение титра антител по сравнению с титрами до иммунизации.

#### Анализы клеток, секретирующих антитела

[0084] PBMC выделяли из приблизительно 60 мл крови с добавленным антикоагулянтом в дни 0, 7+3, 28+3 и 35+3 после введения норовирусной бивалентной IM вакцины на основе VLP или плацебо. Получали приблизительно 25 мл крови для анализов PBMC непосредственно после получения и 35 мл крови для криоконсервации PBMC. Анализы ASC позволяют выявить клетки, секретирующие антитела к VLP норовируса (Tacket *et al.* (2000) *J. Infect. Dis.*, Vol. 182:302-305; Tacket *et al.* (2003) *Clin. Immunol.*, Vol. 108:241-247; El Kamary *et al.* (2010) *J Infect Dis*, Vol. 202(11): 1649-58). Свежезабранные PBMC от группы субъектов оценивали на частоту встречаемости ASC и определяли маркеры хоуминга. Замороженные PBMC от субъектов, входивших в когорту А, оценивали на частоту встречаемости ASC. Показатели ответа и среднее количество ASC на  $10^6$  PBMC описаны в каждый момент времени для каждой группы. Положительный ответ определяли как число ASC после вакцинации на  $10^6$  PBMC, которое по меньшей мере на 3 стандартных отклонения (SD) превышает среднее число до вакцинации для всех субъектов (в логарифмическом виде), и наличие по меньшей мере 8 пятен ASC, что соответствовало среднему значению стимулированных средой лунок отрицательного контроля (2 пятна) плюс 3 SD, как определено в аналогичных анализах.

#### Измерение количества вирус-специфичных В-клеток памяти, специфичных в отношении норовируса

[0085] Образцы крови с добавленным антикоагулянтом собирали только от субъектов когорты А (приблизительно 25 мл в дни 0, 28, 56 и 180) для измерения количества В-клеток памяти в дни 0, 28, 56 и 180 после вакцинации с помощью анализа ELISpot с предшествующей антигенной стимуляцией *in vitro* (Crotty *et al.* (2004) *J. Immunol. Methods*, Vol. 286:111-122.; Li *et al.* (2006) *J. Immunol.*

Methods, Vol. 313:110-118). Мононуклеарные клетки периферической крови ( $5 \times 10^6$  клеток/мл, 1 мл/лунка в 24-луночных планшетах) инкубировали в течение 4 дней с антигенами, VLP норовируса GI.1 и GII.4, по отдельности для того, чтобы обеспечить возможность клональной экспансии антиген-специфичных В-клеток памяти и дифференциации в клетки, секретирующие антитела. Контроли включали клетки, инкубированные в тех же условиях в отсутствие антигена, и/или клетки, инкубированные с неродственным антигеном. После стимуляции клетки промывали, подсчитывали и переносили в планшеты для ELISpot с нанесенными VLP Norwalk. Для того, чтобы определить частоту встречаемости вирус-специфичных В-клеток памяти по отношению к общему количеству Ig-секретирующих В-лимфоцитов, размноженные В-клетки также добавляли в лунки с нанесенными антителами к IgG человека и к IgA человека. Связавшиеся антитела выявляли с помощью HRP-меченных антител к IgG человека или к IgA человека, после которых применяли соответствующий субстрат. Конъюгаты к подклассам IgA и IgG (IgA1, IgA2 и IgG1-4) также применяют для определения антиген-специфичных ответов, опосредованных антителами этих подклассов, которые могут быть связаны с определенными эффекторными механизмами и локализацией иммунного примирования. Пятна подсчитывали с помощью ELISpot-ридера. Популяции размноженных клеток для каждого субъекта изучали с помощью проточной цитометрии для того, чтобы, среди прочего, подтвердить фенотип В-клеток памяти, т. е. CD19+, CD27+, IgG+, IgM+, CD38+, IgD (Crotty *et al.* (2004) J. Immunol. Methods, Vol. 286:111-122.; Li *et al.* (2006) J. Immunol. Methods, Vol. 313:110-118).

#### Клеточные иммунные ответы

[0086] Образцы крови с добавленным антикоагулянтом (приблизительно 25 мл в дни 0, 28, 56 и 180) от субъектов когорты А собирали в виде проб с присвоенным шифром и РВМС выделяли и замораживали в жидком азоте для возможного оценивания в будущем СМІ-ответов на антигены, VLP норовируса GI.1 и GII.4. Анализы, которые проводят, включают, среди прочего, анализы пролиферации РВМС и цитокиновых ответов на антигены, VLP норовируса GI.1 и GII.4,



посредством измерения уровней интерферона (IFN)- $\gamma$  и интерлейкина (IL)-4 согласно принятым техникам (Samandari *et al.* (2000) *J. Immunol.*, Vol. 164:2221-2232; Tacket *et al.* (2003) *Clin. Immunol.*, Vol. 108:241-247). Также оценивают Т-клеточные ответы.

### Результаты

[0087] Оценка безопасности включала местные и системные ожидаемые симптомы в течение 7 дней и неожиданные симптомы в течение 28 дней после каждой дозы. Осуществляли наблюдение на предмет серьезных нежелательных явлений в течение 12 месяцев. Иммуногенность оценивали на основе сыворотки, полученной до и после каждой вакцинации, по антителам из ELISA для общего Ig (IgG, IgA и IgM в совокупности) и мононуклеарным клеткам периферической крови (PBMC) в отношении клеток, секретирующих антитела класса IgG и IgA (ASC), посредством Elispot.

[0088] Все четыре группы по дозировке были включены в когорту А с наличием данных по безопасности после дозы два для всех четырех групп по дозировке (40 вакцинированных в сумме). Среди 40 вакцинированных боль или болезненная чувствительность были самыми распространенными местными симптомами, зарегистрированными после каждой дозы, тогда как припухлость или покраснение были редкими. Не было зарегистрировано тяжелых местных симптомов. Системные симптомы, а именно головная боль, миалгия или недомогание, после каждой дозы были зарегистрированы у менее чем половины вакцинированных. Ни у одного вакцинированного не была зарегистрирована лихорадка. Никаких родственных SAE зарегистрировано не было.

[0089] Как показано на фигурах 1-3, по результатам ELISA для общего Ig сильные анамнестические антитело-опосредованные ответы (IgG, IgA и IgM в совокупности) наблюдали в отношении обоих типов антигенов VLP спустя 7 дней после первой дозы с наименьшей дозировкой (5 мкг VLP GI.1 + 5 мкг VLP GI.4). Вторая доза не усилила ответы после дозы один. Аналогичные результаты наблюдали для ответов, опосредованных антиген-специфичными

сывороточными IgG и сывороточными IgA, измеряемых по отдельности (фигуры 4-9). Доза-зависимые ответы наблюдали для антитело-опосредованных ответов на оба антигена (фигуры 1-9). Однако максимальный ответ на VLP GI.1, как оказалось, получали с меньшей дозой, чем для получения максимального ответа на VLP GI.4 (15 мкг по сравнению с 50 мкг). Что примечательно, однократная доза вводимой внутримышечно норовирусной бивалентной вакцины индуцировала неожиданно значительно больший титр антиген-специфичных антител, чем титр, индуцированный двумя дозами вводимых интраназально моновалентных вакцин на основе VLP, содержащих в 20 раз большую дозу VLP (фигура 10; сравнивается группа 5 мкг LV03-104 с группой 100 мкг LV01-103). Более того, низкая доза (5 мкг) бивалентной норовирусной IM вакцины обеспечивала такой же титр норовирус-специфичных антител, что и титр, индуцированный у людей, контактировавших с нативным норовирусом (фигура 10).

**[0090]** Сильные IgG- и IgA-опосредованные ответы по результатам Elispot также наблюдали спустя 7 дней после первой дозы с наименьшей дозировкой (5 мкг) в отношении обоих типов антигенов VLP (таблица 2). Примечательно, ответы, опосредованные клетками, секретирующими антитела (ASC), были смещены в сторону IgA по сравнению с IgG, и у ASC наблюдался фенотип рецепторов хоуминга в слизистые (альфа 4/бета7) и фенотип хемокиновых (CCR10) рецепторов, как оценивалось с помощью проточной цитометрии (фигура 11; таблица 3). Как показано в таблице 3, у большего количества ASC наблюдались маркеры хоуминга в слизистые (бета 7+, CD62L-) по сравнению с двойственными маркерами хоуминга в слизистые/периферические ткани (бета 7+, CD62L+). В таблице 4 показано процентное соотношение В-клеток памяти на  $10^6$  моноцитов периферической крови, осуществляющих ответ на антигены, VLP. Большой процент антиген-специфичных В-клеток памяти также экспрессируют маркеры хоуминга в слизистые по сравнению с двойственными маркерами в слизистые/периферические ткани или хоуминга в периферические ткани. Аналогичные ответы также наблюдали у реципиентов, получавших дозы 15 мкг и 50 мкг (таблицы 2-4).

Таблица 2. День 7, характеристика ответа, опосредованного РВМС. Приблизительное количество клеток, секретирующих антитела (ASC)/миллион CD19+ клеток

Норовирус-специфичные В-клетки	ASC/миллион CD19+ клеток - день 7				Процент ответа на вакцину		Вакцина-специфичные
	IgA GI.1	IgG GI.1	IgA GII.4	IgG GII.4	Специфичные в отношении GI.1	Специфичные в отношении GII.4	Процент общей совокупности циркулирующих РВМС
Среднее геометрическое A1 доза 5 мкг (n=5)	30947	13807	10947	3945	4,48%	1,49%	5,96%
Стандартное отклонение A1 доза 5 мкг	6674	9780	3651	2261			
Среднее геометрическое A2 доза 15 мкг (n=4)	25296	17004	7108	4336	4,23%	1,14%	5,37%
Стандартное отклонение A2 доза 15 мкг	10846	18770	6055	5697			
Среднее геометрическое A3 доза 50 мкг (n=4)	36158	20572	14103	2549	5,67%	1,67%	7,34%
Стандартное отклонение A3 доза 50 мкг	11470	418	7627	2230			
Среднее геометрическое A4 доза 150 мкг (n=4)	34183	9566	26213	11310	4,37%	3,75%	8,13%
Стандартное отклонение A4 доза 150 мкг	32938	4466	89769	15226			
Плацебо (n=2)	0	152	0	108	0,02%	0,01%	0,03%

Таблица 3. Маркеры ASC у реципиентов, получавших вакцину и плацебо, определенные с помощью проточной цитометрии - день 7

	% общего количес тва CD19+ В- клеток, которые являютс я CD27+ и CD38+	% от % общего количес тва CD27+, CD38+, CCR10+ _бета 7+, CD62L-	% от % общего количес тва CD27+, CD38+, CCR10+ бета 7+, CD62L+	Процент общего количества ASC CD27+, CD38+, CCR10+, бета 7+ CD62L(+) и (-)	Общее количество вакцина- специфичных на миллион клеток* CD27+, CD38+, CCR10+, бета 7+_CD62L(+) и (-)	Процент вакцина- специфичны х от общего количества* циркулирую щих РВМС с хоумингом в слизистые
Среднее геометрическо е А1 доза 5 мкг (n=5)	25,10%	6,86%	1,06%	2,78%	1656	0,17%
Стандартное отклонение А1 доза 5 мкг	10,45	3,13	1,01			
Среднее геометрическо е А2 доза 15 мкг (n=4)	12,99%	16,98%	2,43%	4,63%	1355	0,14%
Стандартное отклонение А2 15 мкг доза	9,13	1,56	0,23			
Среднее геометрическо е А3 50 мкг доза (n=4)	31,71%	26,43%	3,63%	12,01%	23915	2,39%
Стандартное отклонение А3 доза 50 мкг	6,32	1,82	1,38			
Среднее геометрическо е А4 доза 150 мкг (n=4)	33,46%	30,06%	5,68%	15,74%	31350	3,14%
Стандартное отклонение А4 доза 150 мкг	9,86	2,97	1,70			
Плацебо (n=2)	1,26%	22,00%	0,87%	1,20%	5	0,001%

\* в случае, когда большинство ASC являются норовирус-специфичными

Таблица 4. Ответы В-клеток памяти у реципиентов, получавших вакцину и плацебо - день 7

	% общего количества CD19+ В-клеток, которые являются CD27+, CD38+, CD138+	% от % общего количества CD27+, CD38+, CD138+, CCR10+ Бета 7+, CD62L-	% от % общего количества CD27+, CD38+, CD138+, CCR10+_Бета 7+, CD62L+	Процент общего количества CD27+, CD38+, CD138+, CCR10+, Бета 7+ CD62L(+) и (-) клеток памяти	Общее количество вакцина-специфических на миллион клеток* CD27+, CD38+, CD138+, CCR10+, бета 7+_CD62L(+) и (-)	Процент вакцина-специфических от общего количества* циркулирующих РВМС с хоумингом в слизистые
Среднее геометрическое А1 доза 5 мкг	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Среднее геометрическое А2 доза 15 мкг (n=4)	1,54%	11,58%	1,92%	0,21%	61	0,01%
Стандартное отклонение А2 доза 15 мкг	1,54	3,94	0,94			
Среднее геометрическое А3 доза 50 мкг (n=4)	3,31%	16,10%	4,60%	0,68%	1364	0,14%
Стандартное отклонение А3 доза 50 мкг	1,11	2,16	0,97			
Среднее геометрическое А4 150 мкг доза (n=4)	1,56%	16,90%	8,10%	0,39%	778	0,08%
Стандартное отклонение А4 доза 150 мкг	0,22	3,26	4,57			
Плацебо (n=1)	0,10%	12,50%	0,00%	0,01%	0	0%

\* в случае, когда большинство ASC являются норовирус-специфическими

В отсутствие доступного прямого анализа нейтрализации вируса в связи с отсутствием возможности культивировать норовирус *in vitro* проводили функциональные анализы, которые служат заменой анализам нейтрализации вируса, для измерения количества функциональных антител у вакцинированных.

[0091] С помощью анализа активности блокирования углеводного Н-антигена, описанного выше, измеряли ингибирование связывания VLP GI.1 с Н-антигеном, опосредованное сывороточными антителами, индуцированными вакциной. Данные представлены в виде фактора сероконверсии (GMFR) и серологической реакции (4-кратное увеличение) в таблице 5 и в виде среднего геометрического титра (GMT) в таблице 6. К удивлению, после всего одной внутримышечной инъекции состава вакцины наблюдали значительную активность блокирования углеводов для всех групп доз; фактически, введение второй дозы вакцины не повышало значительно активность блокирования по сравнению с уровнями после дозы 1. Активность ингибирования связывания сохранялась в течение всего периода испытаний вплоть до 56-го дня после дозы 1.

Таблица 5. Активность блокирования углеводов (HBGA BT50). Фактор сероконверсии (GMFR) и серологическая реакция (4-кратное увеличение) для антител к норовирусам GI.1

	День исследования														
	7 дней после дозы 1			21 день после дозы 1			28 дней после дозы 1 (перед дозой 2)			7 дней после дозы 2 (35 дней после дозы 1)			28 дней после дозы 2 (56 дней после дозы 1)		
Группа обработки	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)
Вакцина на основе VLP 5/5 мкг	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)

	День исследования														
	7 дней после дозы 1			21 день после дозы 1			28 дней после дозы 1 (перед дозой 2)			7 дней после дозы 2 (35 дней после дозы 1)			28 дней после дозы 2 (56 дней после дозы 1)		
Группа обработки	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)
Вакцина на основе VLP 15/15 мкг	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)
Вакцина на основе VLP 50/50 мкг	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)	9	19 (9,9, 36,4)	100,0 (69,2, 100,0)	9	10,2 (4,6, 22,8)	77,8 (40,0, 97,2)
Вакцина на основе VLP 150/150 мкг	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)
Плацебо	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)

Результаты на основе данных по всем субъектам, получавшим обе дозы исследуемого продукта.

Исключены два частных значения от двух субъектов в связи с тем, что пробы возможно были перепутаны; одно из этих частных значений представляло собой данные базовой пробы, что привело в результате к тому, что для субъекта не были получены данные по кратности увеличения для какого-либо момента времени.

Таблица 6. Активность блокирования углеводов (HBGA BT50). Средний геометрический титр (GMT) антител к норовирусам GI.1

	День исследования											
	Перед дозой 1		7 дней после дозы 1		21 день после дозы 1		28 дней после дозы 1 (перед дозой 2)		7 дней после дозы 2 (35 дней после дозы 1)		28 дней после дозы 2 (56 дней после дозы 1)	
Группа обработки	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)
Вакцина на основе VLP 5/5 мкг	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)
Вакцина на основе VLP 15/15 мкг	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)
Вакцина на основе VLP 50/50 мкг	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)
Вакцина на основе VLP 150/150 мкг	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)
Плацебо	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)

Результаты на основе данных по всем субъектам, получавшим обе дозы исследуемого продукта.

Исключены два частных значения от двух субъектов в связи с тем, что пробы возможно были перепутаны.

[0092] Аналогично, измеряли активность блокирования углеводов сывороточных антител против VLP GI.4. Значительный ответ наблюдали во всех группах дозирования, как было измерено с помощью GMFR и серологической реакции (таблица 7), а также GMT (таблица 8). Аналогично антитело-опосредованному блокированию связывания GI.1, описанному выше, выявляли сильную активность блокирования связывания углеводов VLP GI.4 после всего одной дозы, причем вторая доза, как оказалось, не усиливала активность блокирования.



Таблица 7. Активность блокирования углеводов (НВГА ВТ50). Фактор сероконверсии (GMFR) и серологическая реакция (4-кратное увеличение) для антител к норовирусам GII.4

	День исследования														
	7 дней после дозы 1			21 день после дозы 1			28 дней после дозы 1 (перед дозой 2)			7 дней после дозы 2 (35 дней после дозы 1)			28 дней после дозы 2 (56 дней после дозы 1)		
Группа обработки	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)
Вакцина на основе VLP 5/5 мкг	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)
Вакцина на основе VLP 15/15 мкг	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)
Вакцина на основе VLP 50/50 мкг	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)
Вакцина на основе VLP 150/150 мкг	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)
Плацебо	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)

Результаты на основе данных по всем субъектам, получавшим обе дозы исследуемого продукта.

Исключены два частных значения от двух субъектов в связи с тем, что пробы возможно были перепутаны; одно из этих частных значений представляло собой данные базовой

пробы, что привело в результате к тому, что для субъекта не были получены данные по кратности увеличения для какого-либо момента времени.

Таблица 8. Активность блокирования углеводов (HBGA BT50). Средний геометрический титр (GMT) антител к норовирусам GII.4

	День исследования											
	Перед дозой 1		7 дней после дозы 1		21 день после дозы 1		28 дней после дозы 1 (перед дозой 2)		7 дней после дозы 2 (35 дней после дозы 1)		28 дней после дозы 2 (56 дней после дозы 1)	
Группа обработки	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)
Вакцина на основе VLP 5/5 мкг	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)
Вакцина на основе VLP 15/15 мкг	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)
Вакцина на основе VLP 50/50 мкг	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)
Вакцина на основе VLP 150/150 мкг	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)
Плацебо	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)

Результаты на основе данных по всем субъектам, получавшим обе дозы исследуемого продукта.

Исключены два частных значения от двух субъектов в связи с тем, что пробы возможно были перепутаны.

**[0093]** Анализы ингибирования гемагглютинации (HAI) также использовали для исследования ответа сывороточных антител от вакцинированных субъектов против целевых антигенов, VLP норовируса. Аналогично исследованиям связывания углеводных Н-антигенов всего одна доза вакцины на основе VLP индуцировала антитела, которые ингибировали гемагглютинацию во всех группах дозирования, что измеряли с помощью GMFR (таблица 9), 4-кратного увеличения (таблица 9) и GMT (таблица 10). Хотя уровень ингибирования

гемагглютинации сохранялся до последнего дня испытаний (28 дней после дозы 2, 56 дней после дозы 1), вторая доза вакцины на основе VLP, как оказалось, не усиливала ингибирование гемагглютинации, опосредованное антителами, индуцированными вакциной.

Таблица 9. Анализ ингибирования гемагглютинации. Фактор сероконверсии (GMFR) и серологическая реакция (4-кратное увеличение) для антител к норовирусам GI.1

	День исследования														
	7 дней после дозы 1			21 день после дозы 1			28 дней после дозы 1 (перед дозой 2)			7 дней после дозы 2 (35 дней после дозы 1)			28 дней после дозы 2 (56 дней после дозы 1)		
Группа обработки	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)
Вакцина на основе VLP 5/5 мкг	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)
Вакцина на основе VLP 15/15 мкг	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)
Вакцина на основе VLP 50/50 мкг	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)
Вакцина на основе VLP 150/150 мкг	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)
Плацебо	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)

Результаты на основе данных по всем субъектам, получавшим обе дозы исследуемого продукта.

Исключены два частных значения от двух субъектов в связи с тем, что пробы возможно были перепутаны; одно из этих частных значений представляло собой данные базовой пробы, что привело в результате к тому, что для субъекта не были получены данные по кратности увеличения для какого-либо момента времени.

Таблица 10. Анализ ингибирования гемагглютинации. Средний геометрический титр (GMT) антител к норовирусам GI.1

Группа обработки	День исследования											
	Перед дозой 1		7 дней после дозы 1		21 день после дозы 1		28 дней после дозы 1 (перед дозой 2)		7 дней после дозы 2 (35 дней после дозы 1)		28 дней после дозы 2 (56 дней после дозы 1)	
	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)
Вакцина на основе VLP 5/5 мкг	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)
Вакцина на основе VLP 15/15 мкг	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)
Вакцина на основе VLP 50/50 мкг	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)
Вакцина на основе VLP 150/150 мкг	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)
Плацебо	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)

Результаты на основе данных по всем субъектам, получавшим обе дозы исследуемого продукта.

Исключены два частных значения от двух субъектов в связи с тем, что пробы возможно были перепутаны.

**[0094]** Ингибирование гемагглютинации также достигали, когда целевые VLP относились к несоответствующему вирусу. Сывороточные антитела, индуцированные вакциной, ингибировали гемагглютинацию VLP штамма вируса Houston, что измеряли с помощью GMFR и серологической реакции

(таблица 11), а также GMT (таблица 12). В данном случае, более высокие дозы вакцины на основе VLP обеспечивали более сильные ответы, что, в частности, измеряли с помощью 4-кратного увеличения или GMT. Также наблюдалось значительное повышение GMFR и 4-кратного увеличения, когда целевые VLP относились к штамму вируса 2003 Cincinnati, что измеряли всего 7 дней после дозы 1 (таблица 13).

Таблица 11. Анализ ингибирования гемагглютинации (VLP штамма вируса Houston). Фактор сероконверсии (GMFR) и серологическая реакция (4-кратное увеличение) для антител к норовирусам GI.4

Группа обработки	День исследования														
	7 дней после дозы 1			21 день после дозы 1			28 дней после дозы 1 (перед дозой 2)			7 дней после дозы 2 (35 дней после дозы 1)			28 дней после дозы 2 (56 дней после дозы 1)		
	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)
Вакцина на основе VLP 5/5 мкг	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)
Вакцина на основе VLP 15/15 мкг	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)
Вакцина на основе VLP 50/50 мкг	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)

	День исследования														
	7 дней после дозы 1			21 день после дозы 1			28 дней после дозы 1 (перед дозой 2)			7 дней после дозы 2 (35 дней после дозы 1)			28 дней после дозы 2 (56 дней после дозы 1)		
Группа обработки	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)
Вакцина на основе VLP 150/150 мкг	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)
Плацебо	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)

Результаты на основе данных по всем субъектам, получавшим обе дозы исследуемого продукта.

Исключены два частных значения от двух субъектов в связи с тем, что пробы возможно были перепутаны; одно из этих частных значений представляло собой данные базовой пробы, что привело в результате к тому, что для субъекта не были получены данные по кратности увеличения для какого-либо момента времени.

Таблица 12. Анализ ингибирования гемагглютинации (VLP штамма вируса Houston). Средний геометрический титр (GMT) антител к норовирусам GII.4

	День исследования											
	Перед дозой 1		7 дней после дозы 1		21 день после дозы 1		28 дней после дозы 1 (перед дозой 2)		7 дней после дозы 2 (35 дней после дозы 1)		28 дней после дозы 2 (56 дней после дозы 1)	
Группа обработки	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)
Вакцина на основе VLP 5/5 мкг	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)

	День исследования											
	Перед дозой 1		7 дней после дозы 1		21 день после дозы 1		28 дней после дозы 1 (перед дозой 2)		7 дней после дозы 2 (35 дней после дозы 1)		28 дней после дозы 2 (56 дней после дозы 1)	
Группа обработки	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)	N	GMT (95% ДИ)
Вакцина на основе VLP 15/15 мкг	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)
Вакцина на основе VLP 50/50 мкг	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)
Вакцина на основе VLP 150/150 мкг	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)
Плацебо	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)

Результаты на основе данных по всем субъектам, получавшим обе дозы исследуемого продукта.

Исключены два частных значения от двух субъектов в связи с тем, что пробы возможно были перепутаны.

Таблица 13. Ингибирование геагглютинации у группы плацебо по сравнению с группой 50/50 мкг вакцин на основе VLP

Анализ ингибирования геагглютинации (VLP штамма вируса 2003 Cincinnati). Фактор сероконверсии (GMFR) и геометрическая серологическая реакция (4-кратное увеличение) для антител к норовирусам GI.4.			
Результаты по группе обработки, 7 дней после дозы 1			
Группа обработки	N	GMFR (95% ДИ)	4-кратное увеличение (95% ДИ)
Плацебо	2	1,0 (0,6, 1,8)	0,0 (0,0, 84,2)
Вакцина на основе VLP 50/50 мкг	10	4,4 (1,6, 11,9)	50,0 (18,7, 81,3)

[0095] Результаты данного исследования продемонстрировали, что бивалентная норовирусная IM вакцина на основе VLP в целом хорошо переносилась. Данные по иммуногенности позволяют считать, что однократной дозы вакцины может быть достаточно для защиты серопозитивных взрослых людей. Результаты анализов активности блокирования углеводов и ингибирования гемагглютинации представили дополнительные доказательства того, что однократная доза вакцины индуцировала сильную противоноровирусную активность сывороточных антител. Сила и быстрота наблюдаемых иммунных ответов после введения однократной парентеральной дозы у людей были значительно большими по сравнению с иммунными ответами после введений множества вакцин на основе VLP для назального введения с более высокими дозировками VLP, о которых сообщалось ранее (El Kamary *et al.* (2010) *J Infect Dis*, Vol. 202(11): 1649-1658). Эти ответы также превосходили ответы, индуцированные перорально вводимыми VLP норовируса (Tacket *et al.* (2003) *Clin Immunol* 108:241-247; Ball *et al.* (1999, *Gastroenterology* 117:40-48), а также ответы, индуцированные VLP норовируса, продуцируемыми трансгенными растениями (Tacket *et al.* (2000) *J Infect Dis* 182:302-305). В частности, данный состав вакцины для внутримышечного введения вызывал анамнестические ответы в течение семи дней после иммунизации, и наблюдались максимальные ответы, опосредованные сывороточными антителами, после однократной дозы, включая значительный IgA-опосредованный ответ, и функциональную активность блокирования углеводов, и активность ингибирования гемагглютинации. Таким образом, данная норовирусная бивалентная вакцина индуцировала сильный защитный иммунный ответ у людей, который превосходил иммунные ответы, индуцированные любой в настоящее время доступной норовирусной вакциной.



**Пример 2. Эскалация дозы. Исследование безопасности и иммуногенности норовирусной бивалентной вакцины для внутримышечного введения на основе вирусоподобных частиц (VLP) у людей (исследование LV03-104)**

[0096] В следующем примере представлена оставшаяся запланированная часть клинического исследования, описанного в примере 1, где проводили рандомизированное многоцентровое исследование с эскалацией дозы среди взрослых в возрасте  $\geq 18$  лет по изучению безопасности и иммуногенности четырех уровней дозировки норовирусной бивалентной вакцины для внутримышечного введения (IM) на основе VLP с адъювантом монофосфориллипидом А (MPL) и гидроксидом алюминия (AlOH) по сравнению с плацебо. Субъекты получали две дозы вакцины или плацебо посредством внутримышечной (IM) инъекции с использованием 1,5-дюймовой (38 мм) иглы с разницей в 28 дней. Данный пример предназначен для дополнительного иллюстрирования основных идей настоящего изобретения.

[0097] Отбор в когорту А исследования завершен и был описан выше в примере 1. Когорта В включает ~20 субъектов в возрасте 50-64 года. Когорта С включает ~30 субъектов в возрасте 65-85 лет. Всего в исследование включено приблизительно 98 субъектов.

[0098] В когорте В ~20 субъектов в возрасте 50-64 года отобраны и рандомизированы в соотношении 1:1 для получения вакцины (N=10) или плацебо (N=10). После того, как получены для рассмотрения данные по безопасности по истечении 7 дней после дозы 2 (день исследования 35) от субъектов когорты В, субъекты когорты С допускаются к получению своей начальной дозы. В когорте С ~30 субъектов в возрасте от 65 до 85 лет отобраны и рандомизированы в соотношении 1:1:1 для получения вакцины с адъювантом MPL и AlOH (N=10), или вакцины только с адъювантом AlOH, т. е. без MPL (N=10), или плацебо (N=10). Концентрации антигена, VLP норовируса, и AlOH в двух составах вакцины, которые оценивают, в когорте С одинаковы; отличие только в наличии или отсутствии MPL.

**[0099]** Норовирусная бивалентная вакцина на основе VLP содержит VLP 1 генотипа геногруппы I (GI.1) и IV генотипа геногруппы II (GII.4) в качестве антигенов и монофосфорил-липид А (MPL) и гидроксид алюминия (AlOH) в качестве адъювантов, хлорид натрия (NaCl) и L-гистидин (L-His) в качестве буфера (pH 6,3-6,7), этанол и воду для инъекций. VLP GII.4 содержат последовательность капсидного белка SEQ ID NO: 1, которая была получена из трех штаммов GII.4.

**[00100]** Однократная дозировка вакцины, выбранная для дальнейшего оценивания в когортах В и С, представляет собой наименьшую дозировку из когорты А, которая дает в результате наиболее сильный и воспроизводимый иммунный ответ, которая также в целом хорошо переносится. Данные по безопасности и иммуногенности на день 56 от субъектов когорты А рассматривают с помощью CSM/SMC, и выбирают дозировку бивалентной вакцины для оценивания в когортах В и С.

**[00101]** Субъекты ведут записи в дневнике самонаблюдения об ожидаемых симптомах, включая четыре местные реакции в месте инъекции, такие как боль, болезненная чувствительность, покраснение и припухлость, и 10 системных проявлений или симптомов, включая ежедневную температуру тела, измеряемую в ротовой полости, головную боль, слабость, мышечные боли, озноб, боли в суставах и гастроинтестинальные симптомы, а именно тошноту, рвоту, диарею, абдоминальные спастические боли/абдоминальную боль, от дня 0 до 7 после каждой дозы норовирусной бивалентной IM вакцины на основе VLP или контроля. Покраснение и припухлость в месте инъекции измеряют и фиксируют ежедневно в течение 7 дней после каждой инъекции.

**[00102]** Индивидуальные карты заполняют при каждом последующем посещении в дни 7+3, 21+3, 28+3, 35+3, 56+7, 180+14 и 393+14 и во время последующего телефонного звонка в день 265+14; субъектов расспрашивают о перенесенных за данный период заболеваниях, посещениях врача, любых серьезных неблагоприятных явлениях (SAE) и возникновении любых новых

значимых медицинских состояний. У субъектов определяют количество форменных элементов крови с определением лейкоцитарной формулы и определением количества тромбоцитов и осуществляют оценку сывороточной мочевины, креатинина, глюкозы, АСТ и АЛТ при скрининге и в дни 21 и 35 (~7 дней после каждой дозы) для оценки того, продолжают ли они соответствовать требованиям, и для оценки безопасности, соответственно.

**[00103]** Образцы крови от субъектов собирают до вакцинации в день 0 и в дни 7+3, 21+3, 28+3, 35+3, 56+7, 180+14 и 393 +14 для измерения количества сывороточных антител (IgG, IgA и IgM вместе и по отдельности), выработанных в ответ на норовирусную бивалентную IM вакцину на основе VLP, посредством иммуноферментных анализов (ELISA). Также измеряют уровни антител, обуславливающих активность блокирования углеводов в сыворотке крови и HAI в сыворотке крови.

**[00104]** Способы, описанные выше для когорты А, применяют для анализа образцов крови, собранных от иммунизированных лиц или лиц, получающих плацебо. Результаты исследования будут использоваться в разработке клинического протокола введения составов вакцины по настоящему изобретению.

**[00105]** Настоящее изобретение не следует ограничивать в объеме конкретными описанными вариантами осуществления, которые, как предполагается, являются только иллюстрациями отдельных аспектов настоящего изобретения, и функциональные эквиваленты способов и компонентов охвачены объемом настоящего изобретения. Безусловно, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к таковым, приведенным и описанным в данном документе, станут очевидными специалистам в данной области из вышеизложенного описания и сопутствующих графических материалов при использовании не более чем обычного экспериментирования. Такие модификации и эквиваленты, как предполагается, охвачены объемом прилагаемой формулы изобретения.

**[00106]** Все публикации, патенты и заявки на патент, упоминаемые в настоящем описании, в данном документе включены в настоящее описание посредством ссылки в том же объеме, как если бы было указано, что каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент конкретно и индивидуально включены в данный документ посредством ссылки.

**[00107]** Цитирование или рассмотрение литературных источников в данном документе не следует истолковывать как признание, что таковые являются уровнем техники для настоящего изобретения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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.
2. Hardy, ME. Norwalk and «Norwalk-like Viruses» in Epidemic Gastroenteritis. *Clin Lab Med* 1999;19(3): 675-90.
3. Jiang, X, DY Graham, KN Wang, and MK Estes. Norwalk Virus Genome Cloning and Characterization. *Science* 1990; 250: 1580-1583.
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.
5. Glass, P, LJ White, JM Ball, I Leparc-Goffart, ME Hardy, and MK Estes. Norwalk Virus Open Reading Frame 3 Encodes a Minor Structural Protein. *J Virol* 2000; 74: 6581-6591.
6. Lindesmith, L, C Moe, S Marionneau, N Ruvoen, X Jiang, L Lindblad, P Stewart, J LePendu, and R Baric. Human Susceptibility and Resistance to Norwalk Virus Infection. *Nat Med* 2003; 9: 548-553.
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.
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.
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.

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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.

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.
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.
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.
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.
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.
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.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> ЛигоЦит Фармацевтикалз, Инк.  
Ричардсон, Чарльз  
Баргаце, Роберт Ф.  
Мендельман, Пол М.
- <120> КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БУФЕР, СОСТАВЫ ВАКЦИН, КОТОРЫЕ СОДЕРЖАТ  
КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БУФЕР, И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ
- <130> LIGO-024/01WO
- <150> US 61/506,447
- <151> 2011-07-11
- <160> 1
- <170> PatentIn версия 3.5
- <210> 1
- <211> 540
- <212> Белок
- <213> Искусственная последовательность
- <220>
- <223> Составная аминокислотная последовательность VP1 норовируса GII.4
- <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  
 225 230 235 240

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

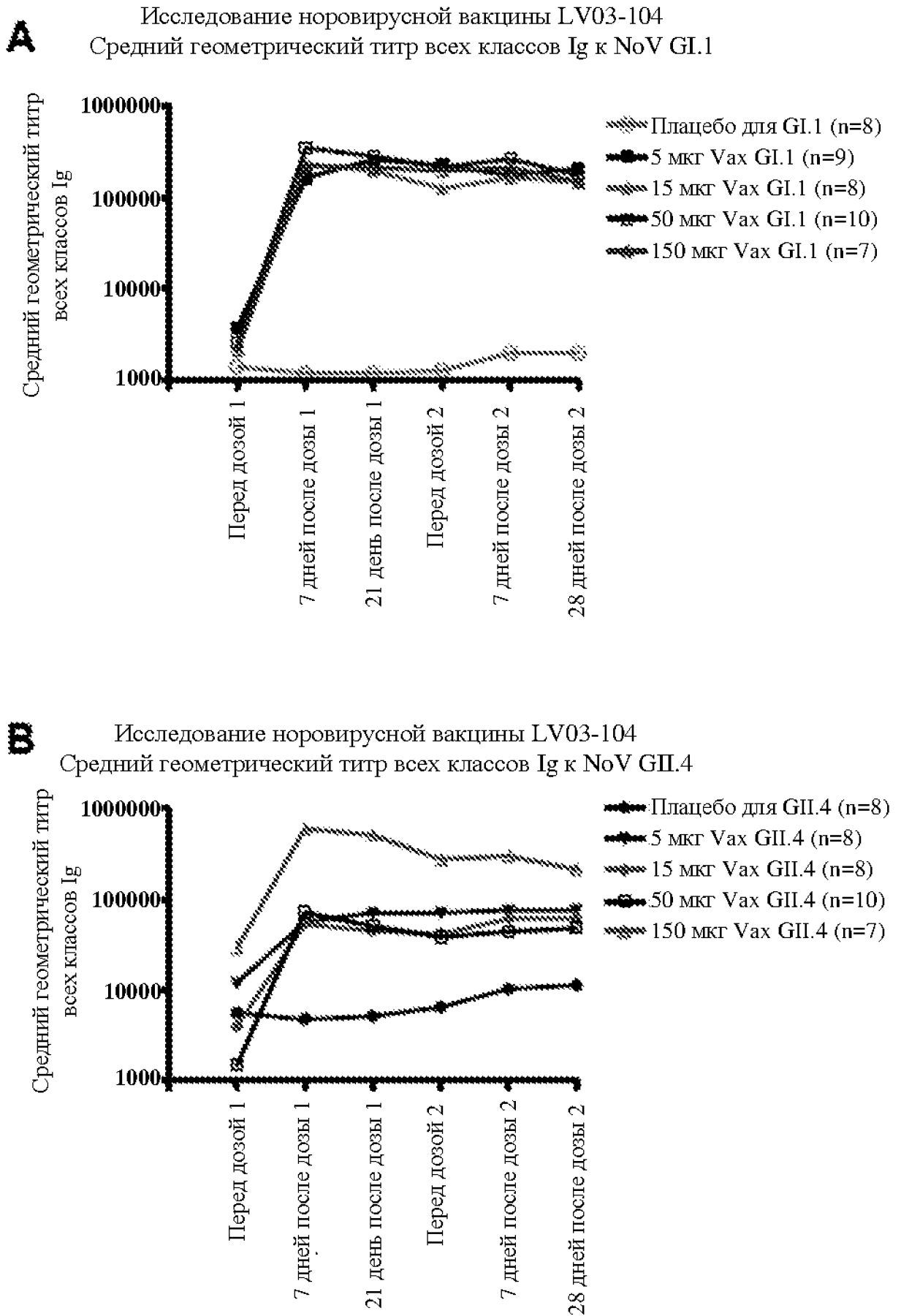
Pro Met Gly Asn Gly Thr Gly Arg Arg Arg Ala Leu  
 530 535 540

## Формула изобретения

1. Композиция, содержащая буфер, которая содержит первую моновалентную VLP, полученную из норовируса первой геногруппы, и вторую моновалентную VLP, полученную из норовируса второй геногруппы, где указанный буфер представляет собой L-гистидин или имидазол, где композиция составлена в виде жидкости, и где первая геногруппа норовирусов представляет собой геногруппу I, и вторая геногруппа норовирусов представляет собой геногруппу II.
2. Композиция, содержащая буфер, по п. 1, где указанный L-гистидин или имидазол присутствуют в концентрации от приблизительно 15 мМ до приблизительно 50 мМ.
3. Композиция, содержащая буфер, по п. 2, где указанный L-гистидин или имидазол присутствуют в концентрации от приблизительно 20 мМ до приблизительно 25 мМ.
4. Композиция, содержащая буфер, по п. 1, где значение pH композиции составляет от приблизительно 6,0 до приблизительно 7,0.
5. Композиция, содержащая буфер, по п. 4, где значение pH композиции составляет от приблизительно 6,2 до приблизительно 6,8.
6. Композиция, содержащая буфер, по п. 1, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемую соль.
7. Композиция, содержащая буфер, по п. 6, где соль выбрана из группы, состоящей из хлорида натрия, хлорида калия, сульфата натрия, сульфата аммония и цитрата натрия.
8. Композиция, содержащая буфер, по п. 7, где соль представляет собой хлорид натрия.
9. Композиция, содержащая буфер, по п. 8, где концентрация хлорида натрия составляет от приблизительно 10 мМ до приблизительно 200 мМ.

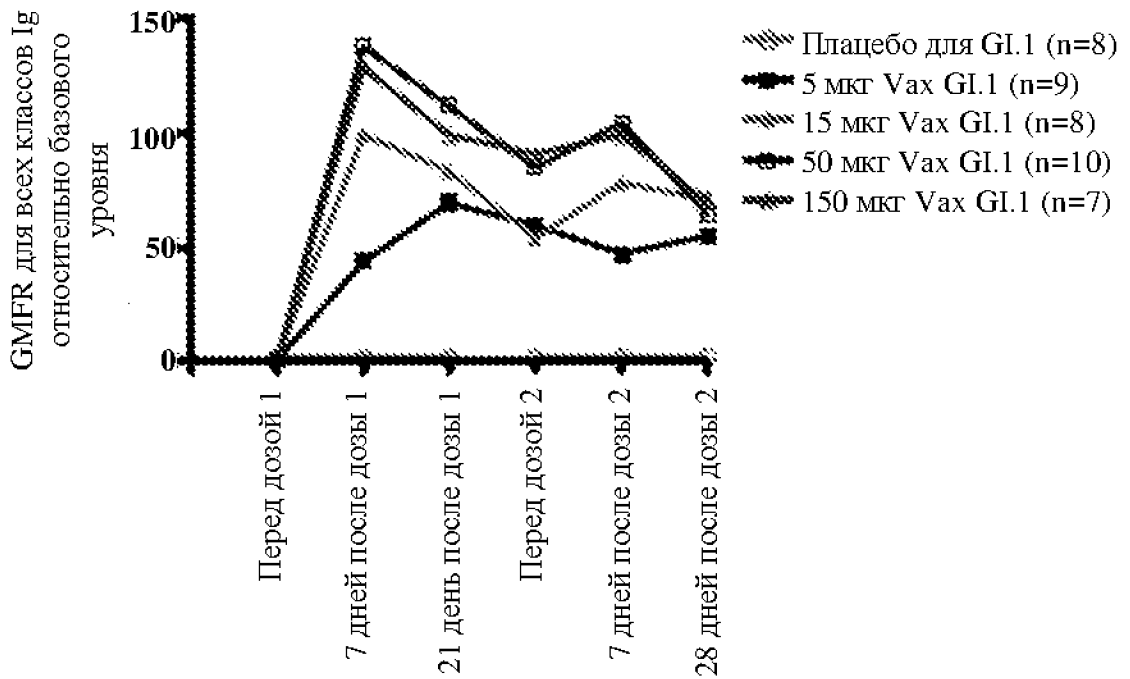
10. Композиция, содержащая буфер, по п. 9, где концентрация хлорида натрия составляет от приблизительно 100 мМ до приблизительно 150 мМ.
11. Композиция, содержащая буфер, по п. 1, где первая моновалентная VLP получена из норовируса генотипа GI.1, и вторая моновалентная VLP получена из норовируса генотипа GII.4.
12. Композиция, содержащая буфер, по п. 1, где вторая моновалентная VLP содержит капсидные белки, полученные из консенсусной последовательности норовирусов геногруппы II.
13. Композиция, содержащая буфер, по п. 1, дополнительно содержащая по меньшей мере один адъювант.
14. Композиция, содержащая буфер, по п. 13, где адъювант выбран из группы, состоящей из монофосфорил-липида А (MPL) и квасцов.
15. Композиция, содержащая буфер, по п. 1, где вторая моновалентная VLP содержит капсидные белки, полученные из консенсусной последовательности норовирусов генотипа GII.4.
16. Композиция, содержащая буфер, по п. 1, дополнительно содержащая MPL и квасцы.
17. Применение композиции, содержащей буфер, по п. 1 для индуцирования иммунного ответа у субъекта, при этом применение предусматривает введение субъекту композиции, содержащей буфер.
18. Состав вакцины, содержащий композицию по п. 1.
19. Применение состава вакцины по п. 18 для индуцирования иммунного ответа у субъекта.

Фигура 1

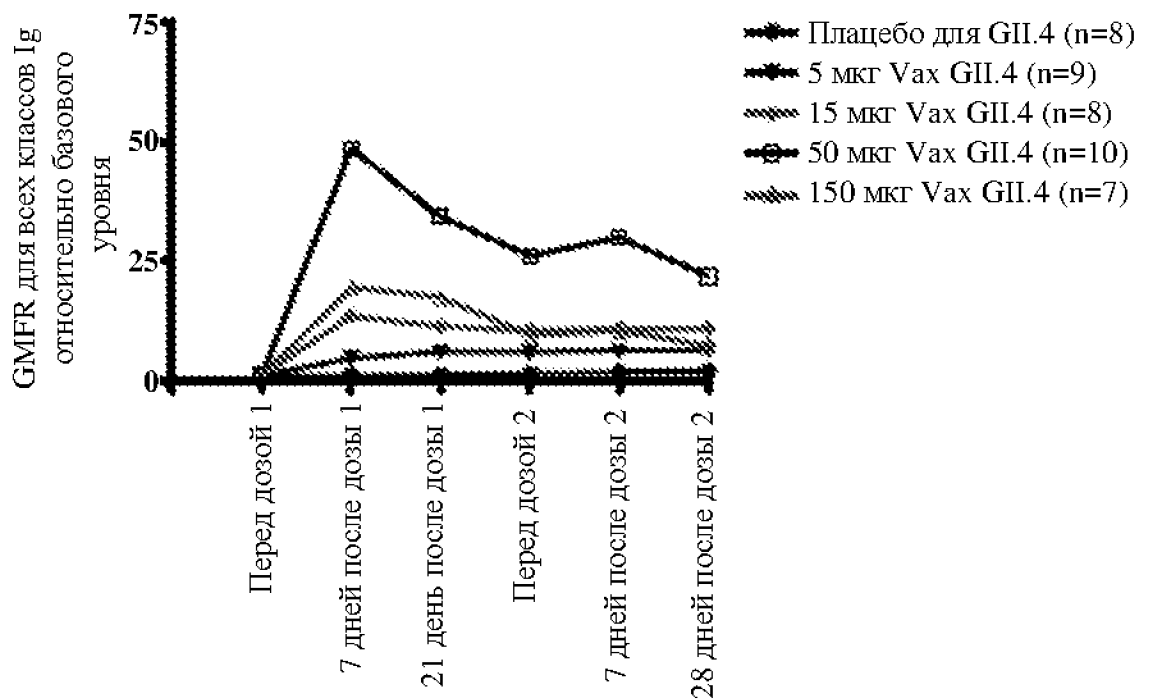


Фигура 2

**A** Исследование норовирусной вакцины LV03-104  
Фактор сероконверсии для всех классов Ig к NoV GI.1



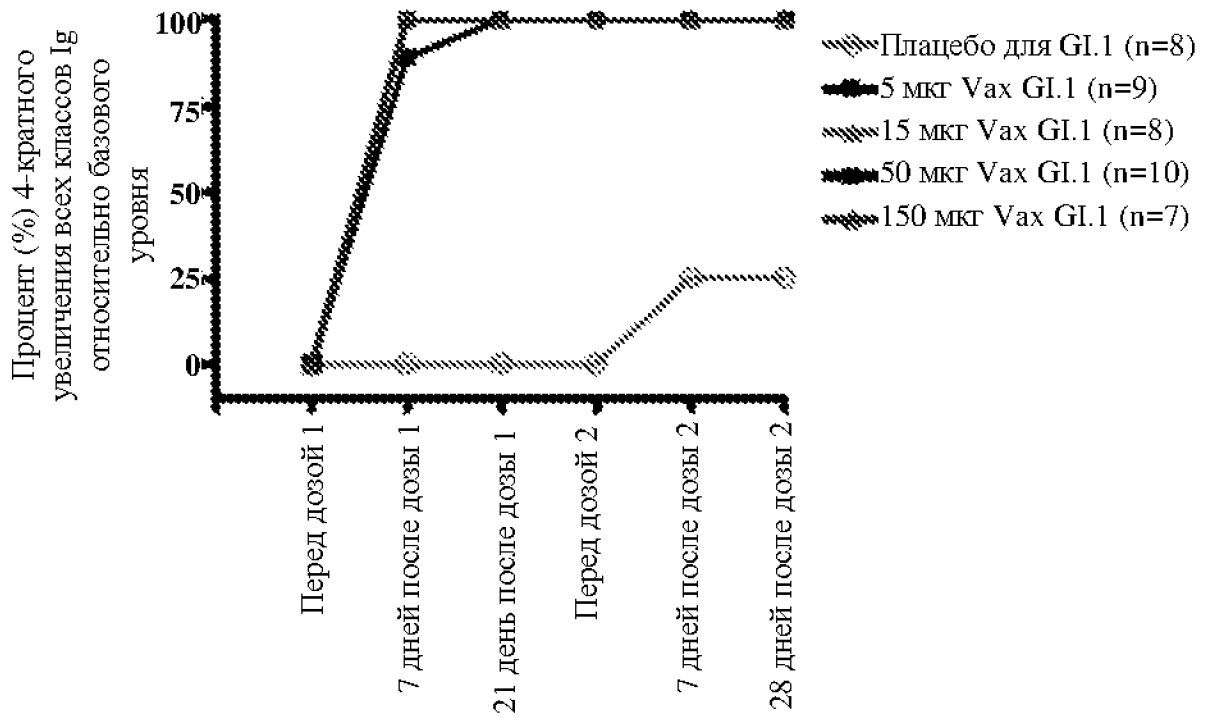
**B** Исследование норовирусной вакцины LV03-104  
Фактор сероконверсии для всех классов Ig к NoV GII.4



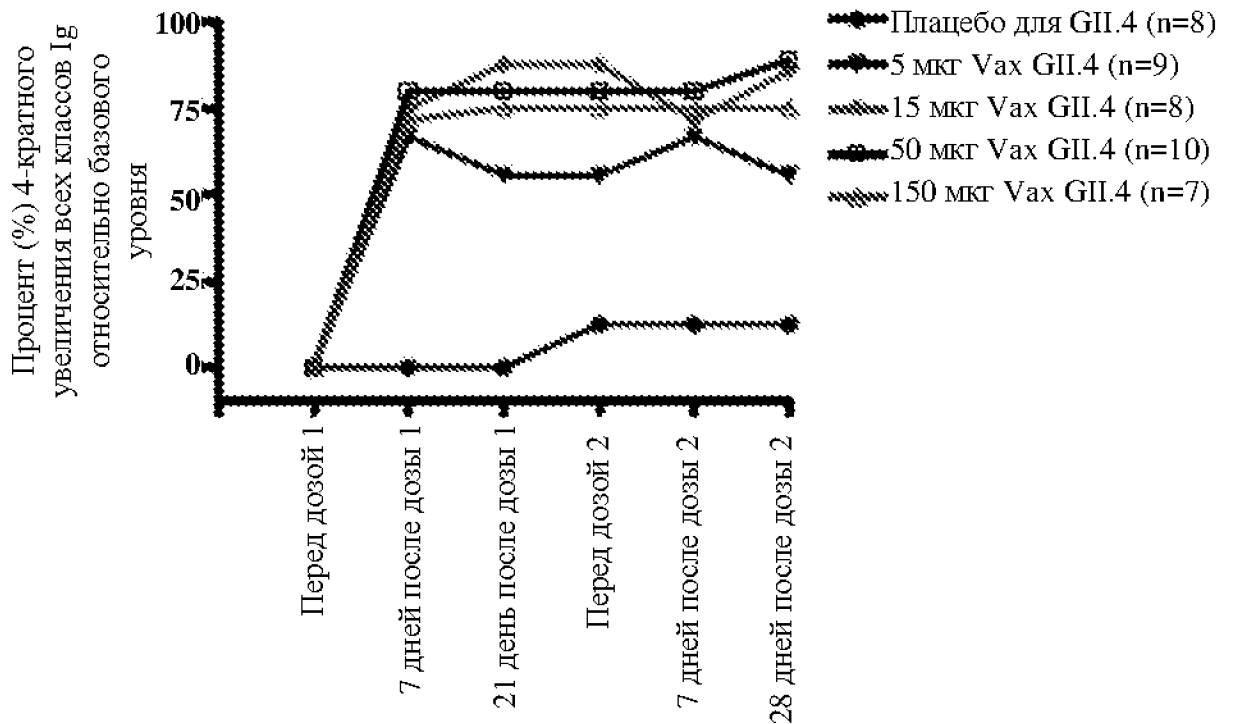
Фигура 3

**A**

Исследование норовирусной вакцины LV03-104  
Все классы Ig к NoV GI.1

**B**

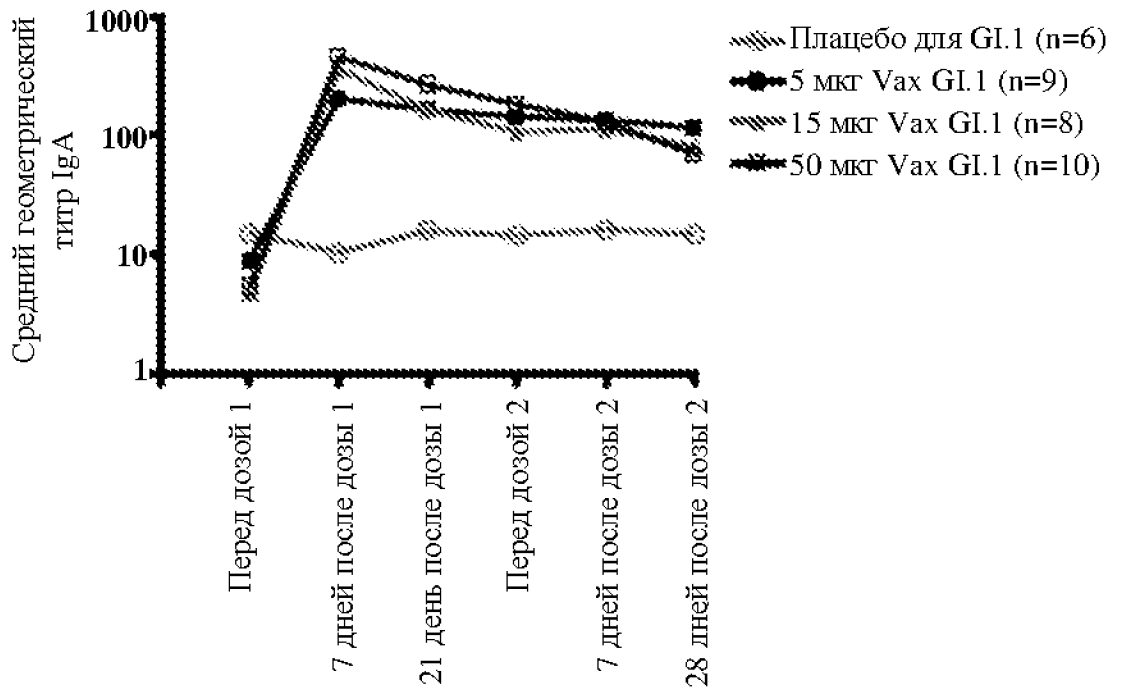
Исследование норовирусной вакцины LV03-104  
Все классы Ig к NoV GII.4



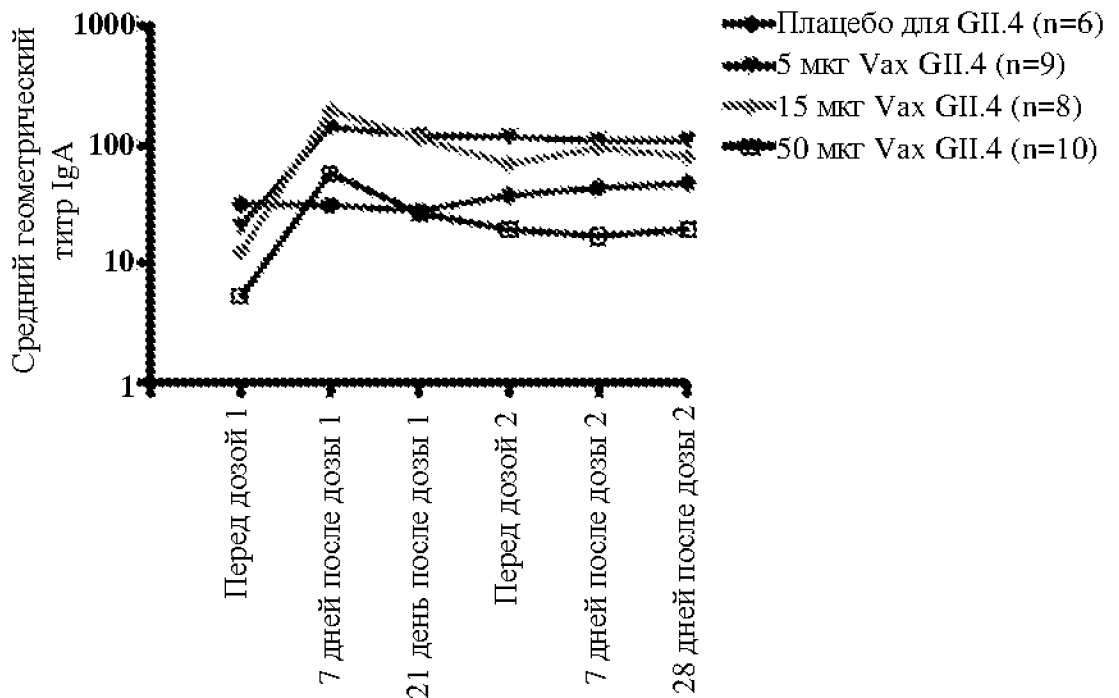
Фигура 4

**A**

Исследование норовирусной вакцины LV03-104  
Средний геометрический титр IgA к NoV GI.1

**B**

Исследование норовирусной вакцины LV03-104  
Средний геометрический титр IgA к NoV GII.4

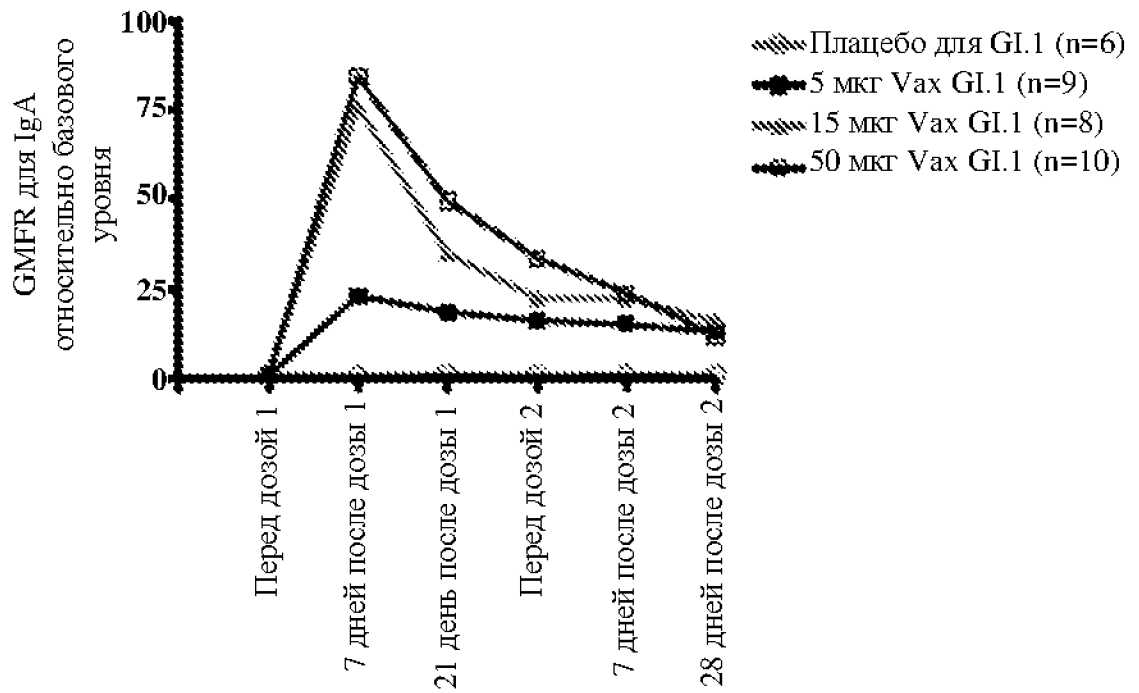




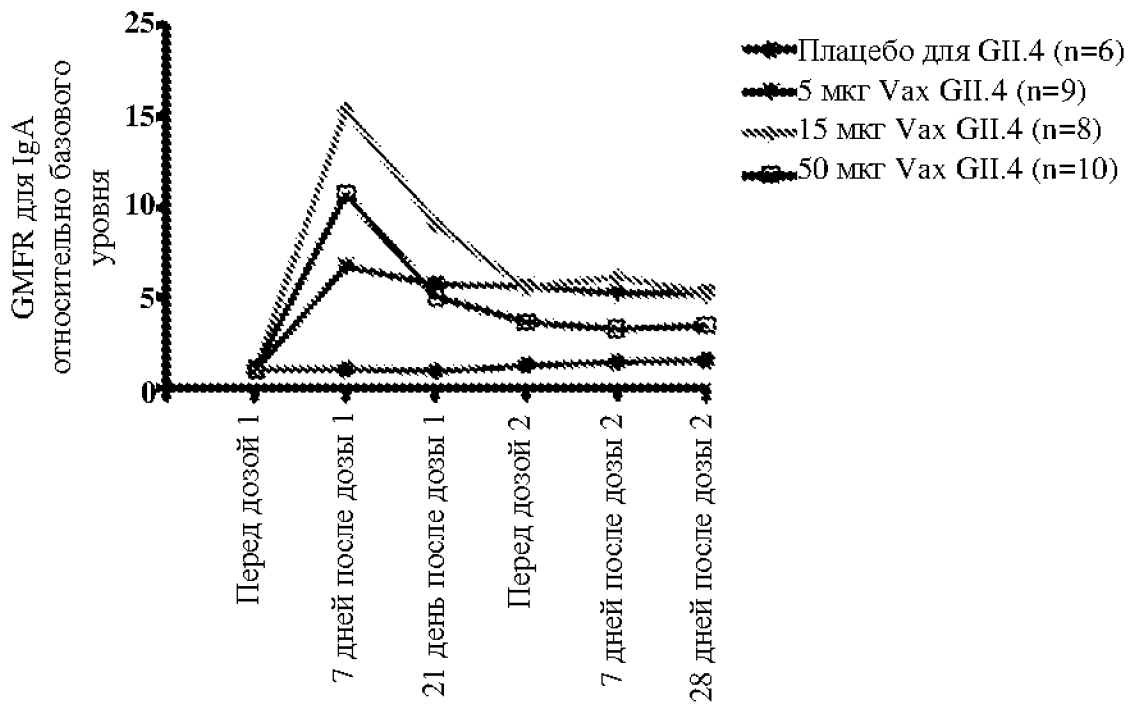
Фигура 5

**A**

Исследование норовирусной вакцины LV03-104  
Фактор сероконверсии для IgA к NoV GI.1

**B**

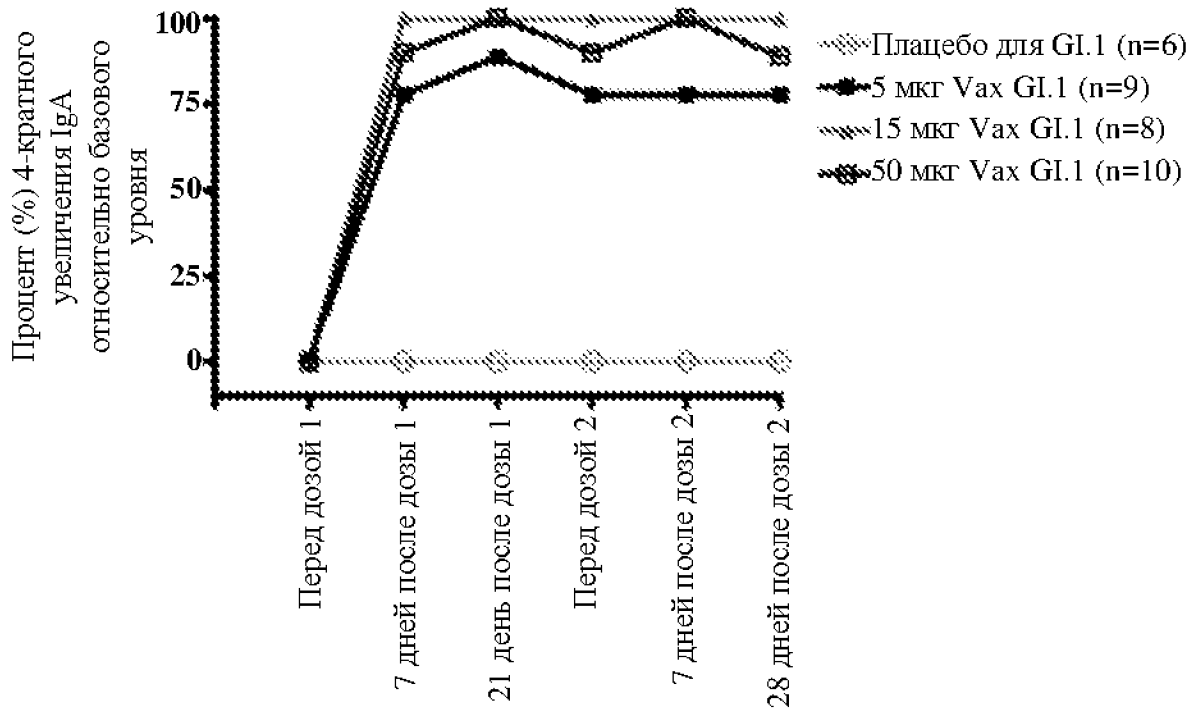
Исследование норовирусной вакцины LV03-104  
Фактор сероконверсии для IgA к NoV GII.4



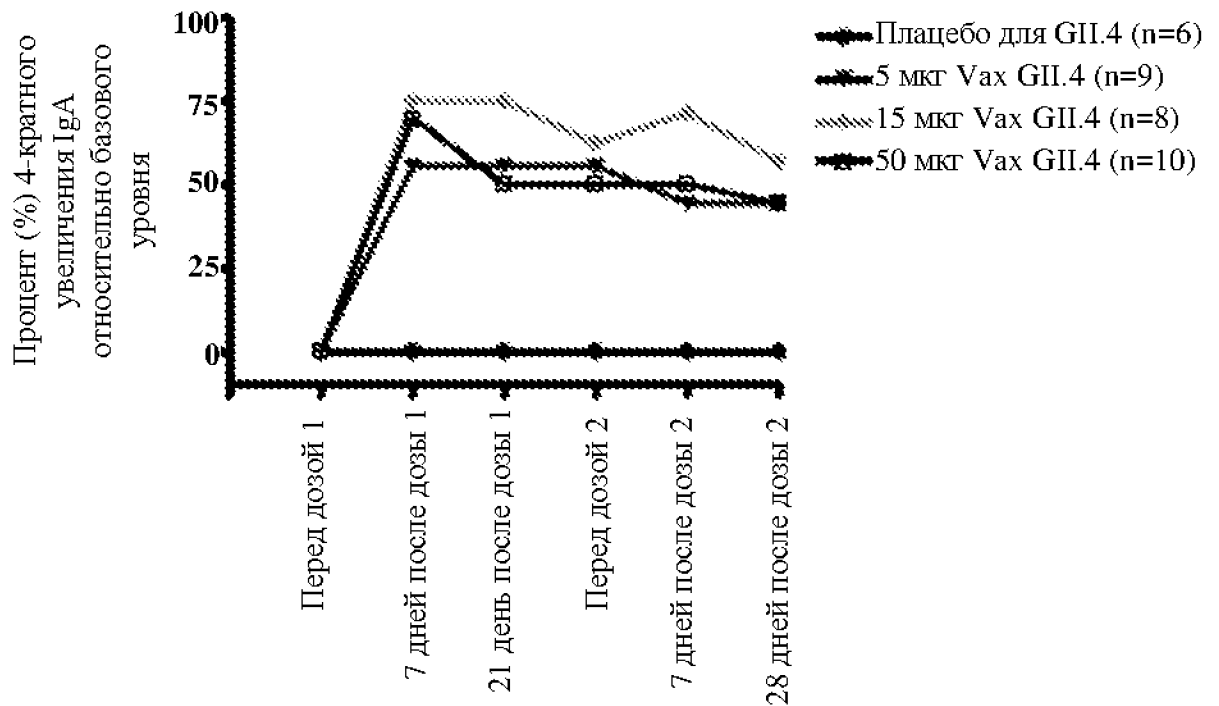
Фигура 6

**A**

Исследование норовирусной вакцины LV03-104  
IgA к NoV GI.1

**B**

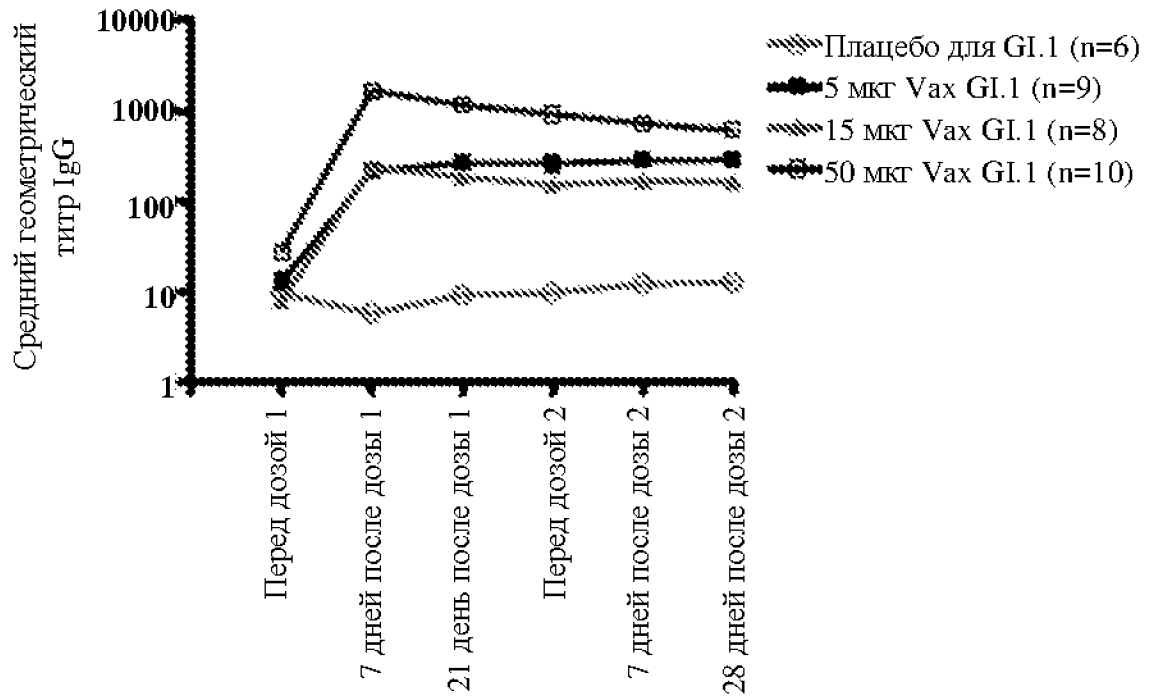
Исследование норовирусной вакцины LV03-104  
IgA к NoV GII.4



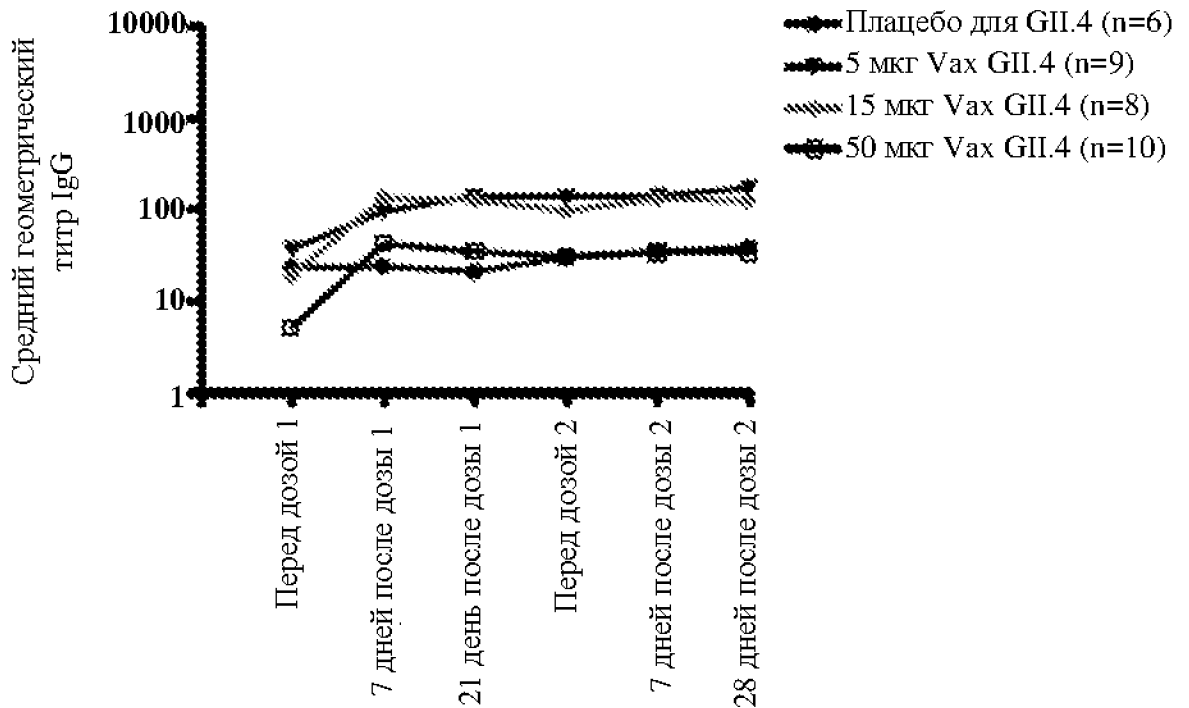
Фигура 7

**A**

Исследование норовирусной вакцины LV03-104  
Средний геометрический титр IgG к NoV GI.1

**B**

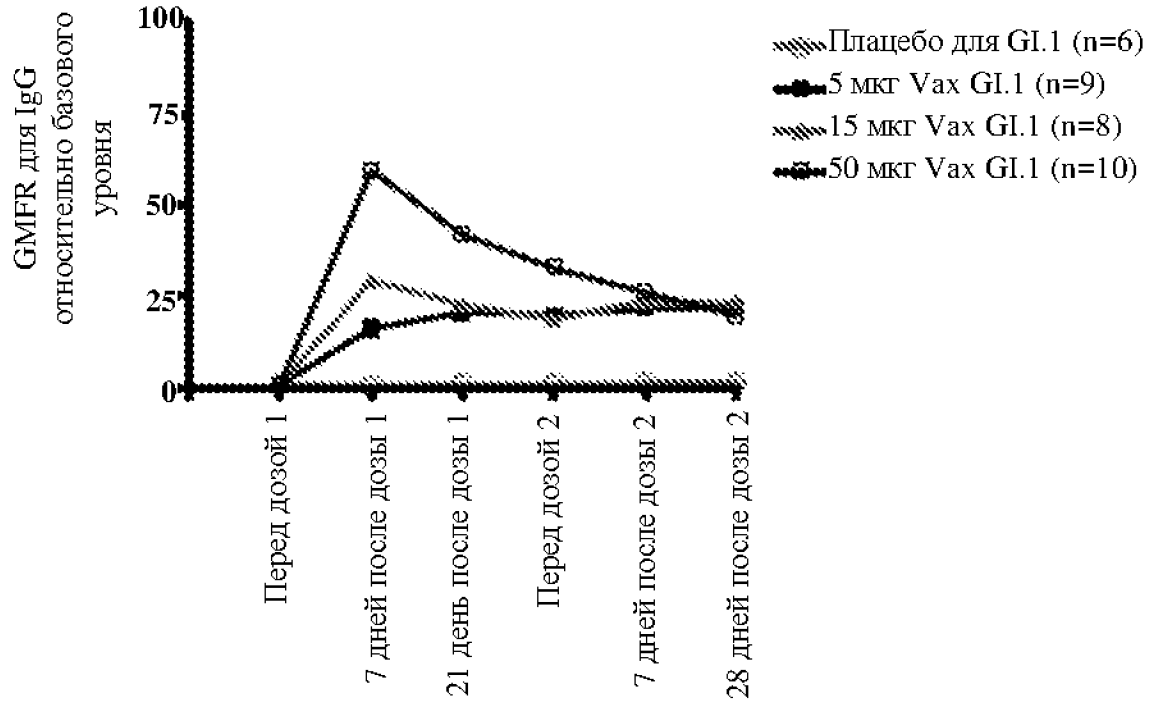
Исследование норовирусной вакцины LV03-104  
Средний геометрический титр IgG к NoV GII.4



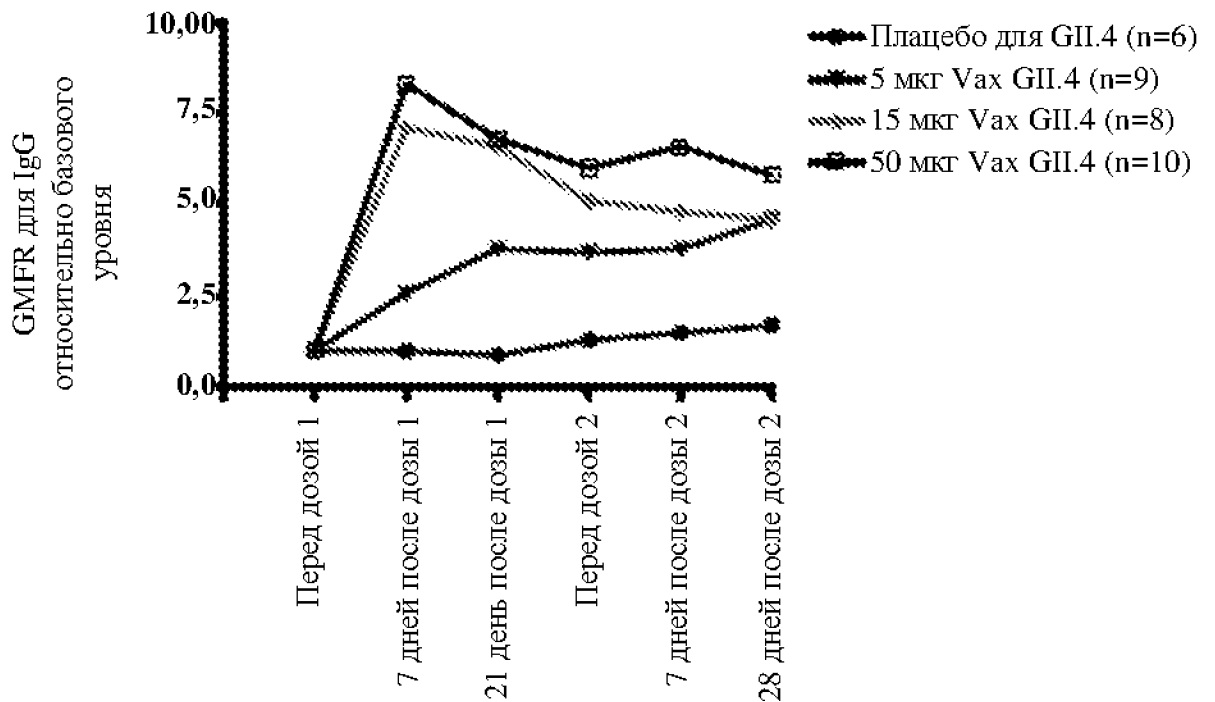
Фигура 8

**A**

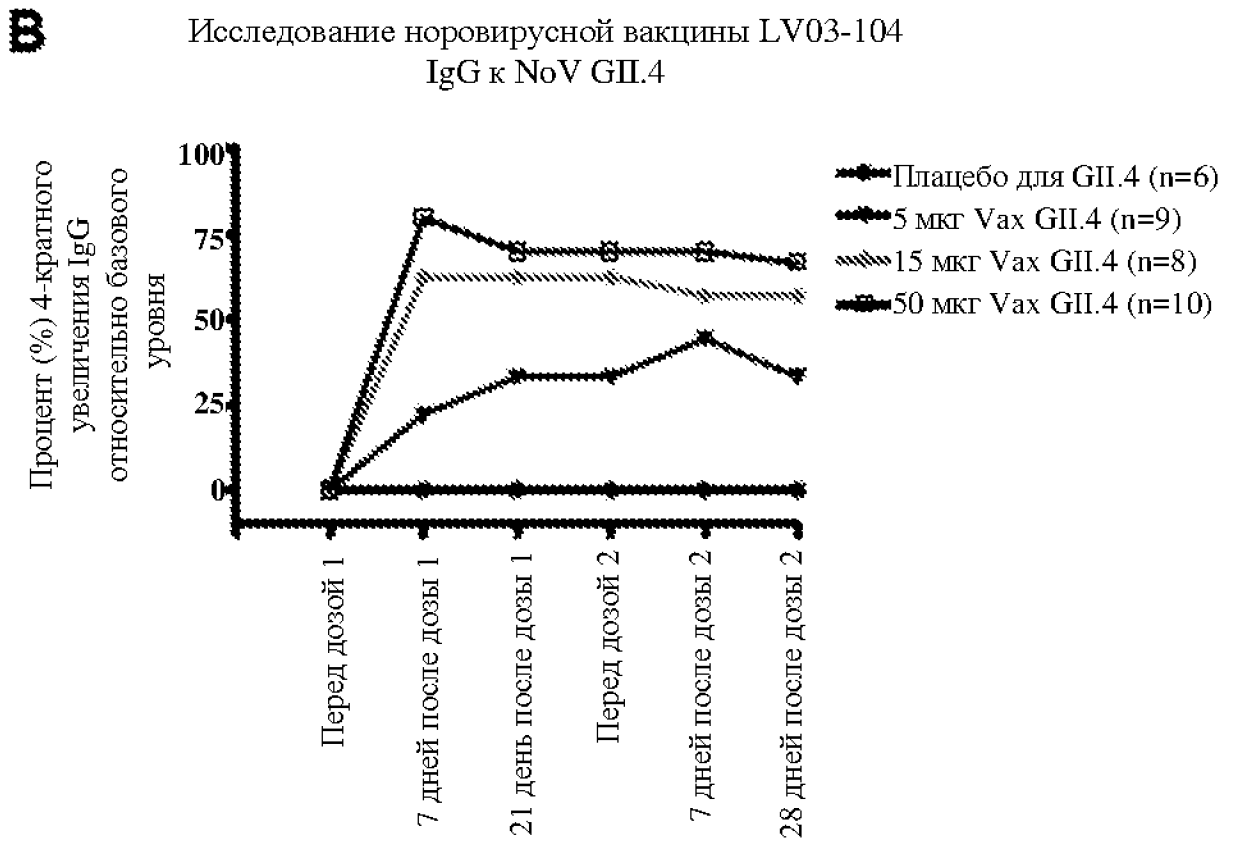
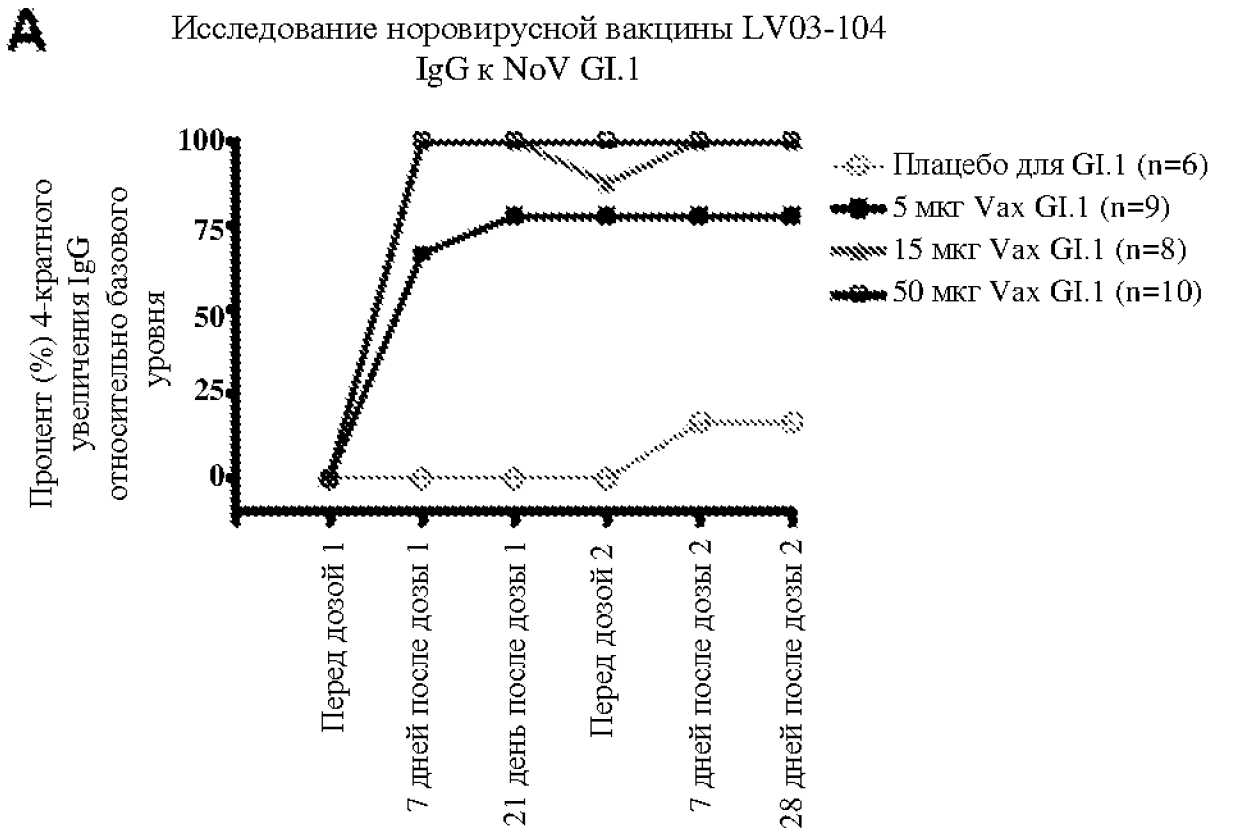
Исследование норвирусной вакцины LV03-104  
Фактор сероконверсии для IgG к NoV GI.1

**B**

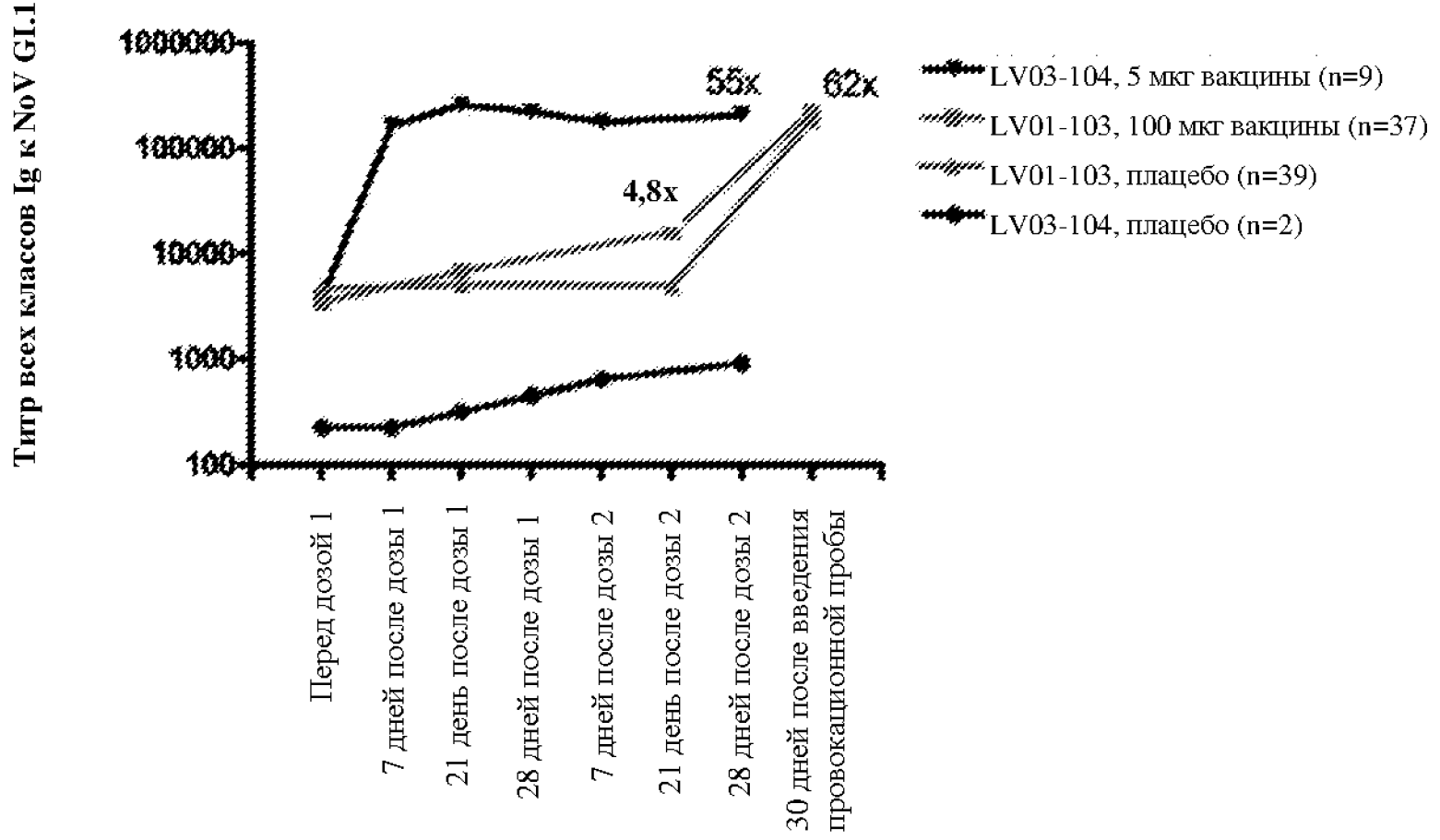
Исследование норвирусной вакцины LV03-104  
Фактор сероконверсии для IgG к NoV GII.4



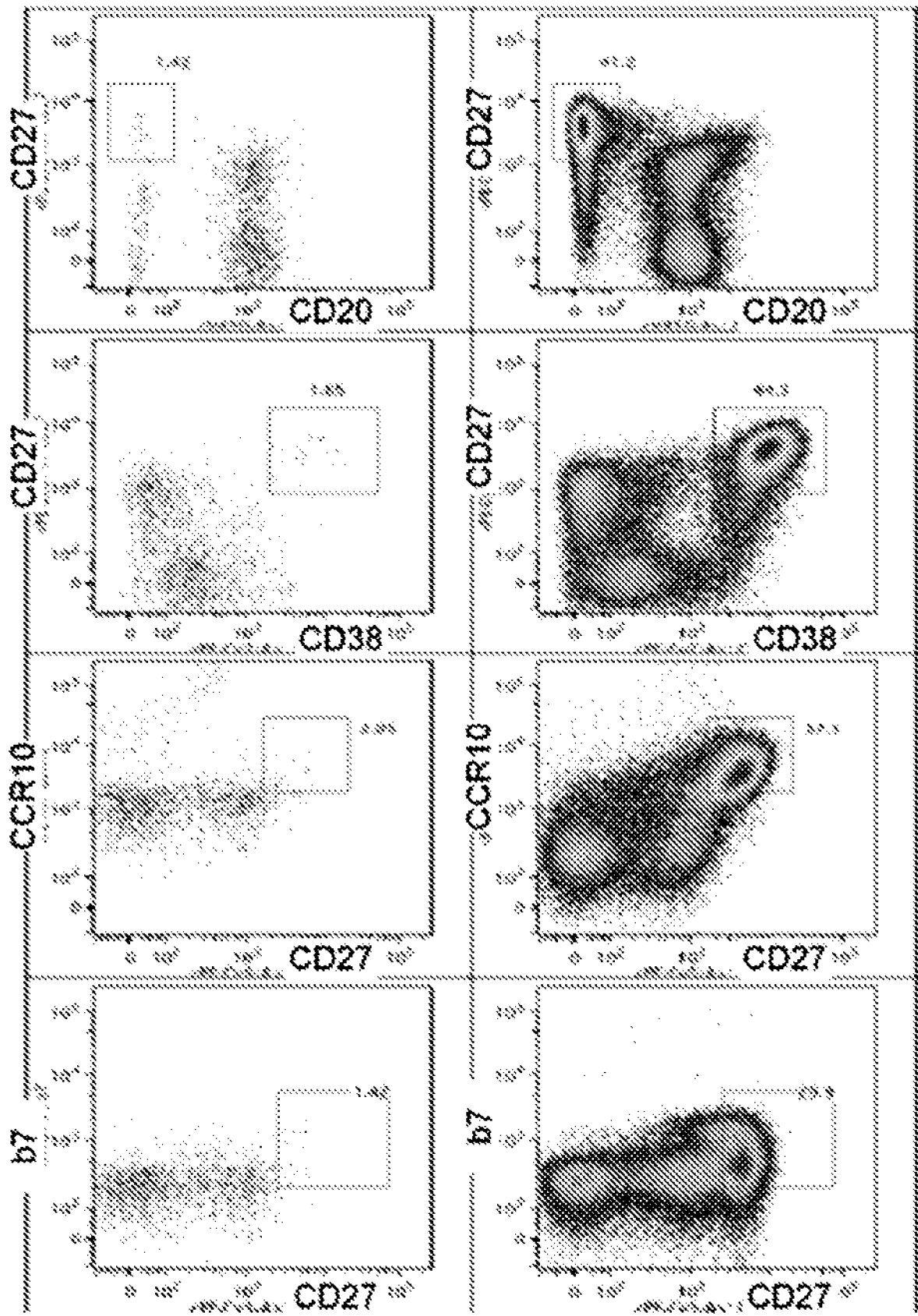
Фигура 9



Фигура 10



Фигура 11А



День 0

День 7

Фигура 11В

