



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0026819

(51)⁷ A61K 39/125

(13) B

(21) 1-2014-00378

(22) 11/07/2012

(86) PCT/US2012/046222 11/07/2012

(87) WO2013/009849 17/01/2013

(30) 61/506,447 11/07/2011 US

(45) 25/12/2020 393

(43) 25/07/2014 316A

(73) TAKEDA VACCINES, INC. (US)

2155 Analysis Drive, Bozeman, Montana 59718, United States of America

(72) RICHARDSON Charles (US); BARGATZE Robert F. (US); MENDELMAN Paul M. (US).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHẾ PHẨM CHỨA HẠT GIẢ VIRUT ĐỂ PHÒNG NGỪA NOROVIRUT

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa hạt giả virus dùng ngoài đường tiêu hóa để phòng ngừa Norovirus với một liều duy nhất bao gồm hỗn hợp của các hạt giả Norovirus đơn giá. Sáng chế còn mô tả phương pháp gây miễn dịch để bảo vệ khỏi sự lây nhiễm Norovirus ở đối tượng là người bằng cách dùng chế phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực vaccin, cụ thể là vaccin ngừa Norovirut. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến chế phẩm vaccin, phương pháp bào chế chế phẩm vaccin và các phương pháp tạo ra và đánh giá đáp ứng miễn dịch bảo vệ kháng lại Norovirut ở người.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Norovirut là Calicivirut ở người, không thể nuôi cấy được và xuất hiện như là nguyên nhân chính duy nhất gây ra bệnh dịch ở dạ dày-ruột không do vi khuẩn (Glass et al., 2000; Hardy et al., 1999). Ý nghĩa lâm sàng của Norovirut đã không được đánh giá đúng mức trước khi phát triển được phương pháp thử nghiệm chẩn đoán phân tử độ nhạy cao. Việc nhân dòng vô tính được hệ gen virut Norwalk (Norwalk virus - NV) nhóm gen I nguyên mẫu và sản xuất được các hạt giả virut (virus-like particles - VLP) từ hệ biểu hiện Baculovirut tái tổ hợp đã cho phép phát triển các thử nghiệm phát hiện nhiễm Norovirut trên diện rộng (Jiang et al. 1990; 1992).

Norovirut là virut mang ARN sợi đơn dương, chứa hệ gen ARN không phân đoạn. Hệ gen virut mã hóa ba khung đọc mở, trong đó hai khung đọc sau đặc trưng cho việc sản xuất lần lượt protein capsit chính và protein cấu trúc phụ (Glass et al. 2000). Khi được biểu hiện ở các mức cao trong hệ biểu hiện nhân chuẩn, protein capsit của NV, và một số Norovirut khác, tự lắp ráp thành VLP có cấu trúc tương tự virion Norovirut tự nhiên. Nhìn dưới kính hiển vi điện tử truyền, VLP không khác về hình thái học với virion gây nhiễm được phân lập từ các mẫu phân người.

Đáp ứng miễn dịch với Norovirut rất phức tạp, và tương quan bảo vệ vẫn đang được làm sáng tỏ. Các nghiên cứu trên tình nguyện viên được tiến hành với virut tự nhiên chứng tỏ rằng đáp ứng miễn dịch ghi nhớ có nguồn gốc từ niêm mạc đã tạo ra tác dụng bảo vệ chống lại sự lây nhiễm trong thời gian ngắn và cho thấy rằng có thể tạo ra tác dụng bảo vệ bằng vaccin (Lindesmith et al. 2003; Parrino et al. 1977; Wyatt et al., 1974).

Mặc dù không thể nuôi cấy được Norovirut *in vitro*, nhưng do tính sẵn có của VLP và khả năng tạo ra chúng với lượng lớn, nên đã có thành công đáng kể trong việc

xác định hình thái học kháng nguyên và cấu trúc của Norovirut capsit. VLP bảo toàn tính xác thực của protein capsit virut trong khi thiếu vật liệu di truyền gây nhiễm. Do đó, VLP bắt chước sự tương tác chức năng của virut với các thụ thể tế bào, bởi vậy tạo ra đáp ứng miễn dịch vật chủ thích đáng trong khi không có khả năng tái sinh hoặc gây nhiễm. Cùng với NIH, Baylor College of Medicine đã nghiên cứu đáp ứng miễn dịch thể dịch, niêm mạc và tế bào đối với NV VLP ở người tình nguyện trong thử nghiệm lâm sàng Pha 1 với sự tài trợ từ các nguồn nghiên cứu học thuật. VLP được dùng qua đường miệng là an toàn và tạo được miễn dịch ở người trưởng thành khỏe mạnh (Ball et al. 1999; Tacket et al. 2003). Nhưng cần có liều phức với lượng VLP tương đối cao để quan sát đáp ứng miễn dịch. Ở các trung tâm học thuật khác, các thử nghiệm tiền lâm sàng trên mô hình động vật đã chứng tỏ là đáp ứng miễn dịch với VLP được cải thiện khi được dùng trong mũi với các tá dược ngoại độc tố vi khuẩn (Guerrero et al. 2001; Nicollier-Jamot et al. 2004; Periwai et al. 2003; Souza et al. (2007) *Vaccin*, Vol. 25(50):8448-59). Tuy nhiên, miễn dịch bảo vệ kháng lại Norovirut ở người vẫn còn là mơ hồ bởi vì các chỉ báo đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở người vẫn chưa được xác định một cách rõ ràng (Herbst-Kralovetz et al. (2010) *Expert Rev. Vaccines* 9(3), 299–307).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế một phần dựa trên khám phá ra rằng, một liều duy nhất vaccin Norovirut tạo ra đáp ứng miễn dịch mạnh, nhanh bảo vệ kháng lại Norovirut ở người khi được dùng ngoài đường tiêu hóa. Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp tạo tính miễn dịch bảo vệ kháng lại Norovirut ở người, phương pháp này bao gồm việc cho người dùng ngoài đường tiêu hóa không nhiều hơn một liều duy nhất chế phẩm vaccin, chế phẩm này bao gồm VLP Norovirut nhóm gen I và/hoặc nhóm gen II, trong đó chế phẩm này làm tăng ít nhất 3 lần hiệu giá kháng thể huyết thanh đặc hiệu với Norovirut so với hiệu giá ở người đó trước khi dùng chế phẩm. Theo một số phương án, việc tăng hiệu giá kháng thể đặc hiệu với Norovirut được tạo ra trong phạm vi 7 ngày dùng một liều duy nhất chế phẩm. Theo một số phương án, chế phẩm vaccin được dùng cho người với đường dùng trong tĩnh mạch, dưới da, trong da, hoặc trong cơ. Theo một phương án, chế phẩm vaccin được dùng cho người bằng đường dùng trong cơ.

Chế phẩm vaccin một liều duy nhất có thể bao gồm liều VLP Norovirut nhóm gen I nằm trong khoảng từ 5µg đến 150µg, VLP Norovirut nhóm gen II, hoặc cả hai.

Trong các phương án trong đó chế phẩm vaccin một liều duy nhất bao gồm cả VLP Norovirut nhóm gen I và nhóm gen II, liều của mỗi VLP có thể là giống hoặc khác nhau. Theo một phương án, chế phẩm bao gồm VLP Norovirut nhóm gen I với lượng không lớn hơn 50µg. Theo một phương án khác, chế phẩm bao gồm VLP Norovirut nhóm gen I với lượng không lớn hơn 25µg. Theo một phương án khác nữa, chế phẩm bao gồm VLP Norovirut nhóm gen II với lượng không lớn hơn 150µg. Theo một phương án còn khác nữa, chế phẩm bao gồm VLP Norovirut nhóm gen II với lượng không lớn hơn 50µg. VLP Norovirut có thể là VLP đơn giá hoặc VLP đa giá.

Theo một số khía cạnh của sáng chế, VLP Norovirut nhóm gen I trong chế phẩm vaccin bao gồm protein capsit có nguồn gốc từ chủng virus nhóm gen I. Theo một phương án, VLP Norovirut nhóm gen I bao gồm protein capsit từ nhóm gen I, kiểu gen 1 Norovirut. Theo một phương án khác, VLP Norovirut nhóm gen I bao gồm protein capsit từ virus Norwalk. Theo một khía cạnh khác của sáng chế, VLP Norovirut nhóm gen II trong chế phẩm vaccin bao gồm protein capsit có nguồn gốc từ chủng virus nhóm gen II. Theo một số phương án, VLP Norovirut nhóm gen II bao gồm protein capsit từ Norovirut nhóm gen II, kiểu gen 4. Theo một số phương án, VLP Norovirut nhóm gen II là VLP được sinh ra từ biểu hiện của trình tự liên ứng ở Norovirut nhóm gen II. Theo một phương án cụ thể, VLP Norovirut nhóm gen II bao gồm protein trình tự capsit SEQ ID NO: 1.

Theo một số phương án, chế phẩm vaccin còn bao gồm ít nhất một tá dược. Tốt hơn, nếu tá dược không phải là tá dược ngoại độc tố vi khuẩn. Theo một phương án, tá dược là chất đối kháng thụ thể giống toll, như là monophosphoryl lipid A (MPL), flagelin, hoặc CpG. Theo một phương án khác, tá dược là nhôm hydroxit (ví dụ, phèn). Theo một số phương án, chế phẩm vaccin bao gồm hai tá dược, như là MPL và nhôm hydroxit. Theo một số phương án, chế phẩm vaccin có thể còn bao gồm chất đệm, như là L-histidin, imidazol, axit succinic, tris, và axit citric. Chế phẩm vaccin có thể được bào chế ở dạng bột khô hoặc ở dạng lỏng. Theo một phương án, chế phẩm vaccin được bào chế ở dạng lỏng (ví dụ, chế phẩm chứa nước).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1. Các kết quả của các thử nghiệm pan-ELISA được tiến hành bằng cách đo các mức huyết thanh IgG, IgA, và IgM kết hợp từ người tình nguyện được gây miễn

dịch trong cơ với giả dược (nước muối) hoặc chế phẩm vacxin chứa 5, 15, 50, hoặc 150µg mỗi nhóm gen trong số các Norovirut nhóm gen I.1 VLP và nhóm gen II.4 VLP Norovirut. Hiệu giá trung bình nhân đôi với các kháng thể kháng GI.1 (A) và kháng GII.4 (B) được thể hiện đối với mỗi mức phân liều trong số các mức ở ngày 7 và ngày 21 sau khi tạo miễn dịch thứ nhất và ngày 7 và 28 ngày sau khi tạo miễn dịch thứ hai. Người tình nguyện tiếp nhận việc gây miễn dịch vào các ngày nghiên cứu 0 và 28.

FIG.2. Các kết quả của các thử nghiệm pan-ELISA được tiến hành bằng cách đo các mức huyết thanh IgG, IgA, và IgM kết hợp từ người tình nguyện được gây miễn dịch trong cơ với giả dược (nước muối) hoặc chế phẩm vacxin chứa 5, 15, 50, hoặc 150µg mỗi nhóm gen trong số các Norovirut nhóm gen I.1 VLP và nhóm gen II.4 VLP Norovirut. Số lần tăng hiệu giá trung bình nhân kháng đối với các kháng thể kháng GI.1 (A) và kháng GII.4 (B) được thể hiện đối với mỗi mức phân liều trong số các mức ở ngày 7 và ngày 21 sau khi tạo miễn dịch thứ nhất và ngày 7 và 28 ngày sau khi tạo miễn dịch thứ hai. Người tình nguyện tiếp nhận việc gây miễn dịch vào các ngày nghiên cứu 0 và 28.

FIG.3. Các kết quả của các thử nghiệm pan-ELISA được tiến hành bằng cách đo các mức huyết thanh IgG, IgA, và IgM kết hợp từ người tình nguyện được gây miễn dịch trong cơ với giả dược (nước muối) hoặc chế phẩm vacxin chứa 5, 15, 50, hoặc 150µg mỗi nhóm gen trong số các Norovirut nhóm gen I.1 VLP và nhóm gen II.4 VLP Norovirut. Tỷ lệ phần trăm đáp ứng huyết thanh (nghĩa là tăng 4 lần hiệu giá kháng thể so với hiệu giá trước khi được tạo miễn dịch) đối với các kháng thể kháng GI.1 (A) và kháng GII.4 (B) được thể hiện đối với mỗi mức phân liều trong số các mức ở ngày 7 và ngày 21 sau khi tạo miễn dịch thứ nhất và ngày 7 và 28 ngày sau khi tạo miễn dịch thứ hai. Người tình nguyện tiếp nhận việc gây miễn dịch vào các ngày nghiên cứu 0 và 28.

FIG.4. Các kết quả của các thử nghiệm ELISA được tiến hành bằng cách đo huyết thanh IgA từ người tình nguyện được gây miễn dịch trong cơ với giả dược (nước muối) hoặc chế phẩm vacxin chứa mỗi loại trong số VLP Norovirut nhóm gen I.1 và VLP Norovirut nhóm gen II.4 với lượng 5, 15, hoặc 50µg. Hiệu giá trung bình nhân đôi với các kháng thể kháng GI.1 (A) và kháng GII.4 (B) được thể hiện đối với mỗi mức phân liều trong số các mức ở ngày 7 và ngày 21 sau khi tạo miễn dịch thứ nhất và ngày 7 và

28 ngày sau khi tạo miễn dịch thứ hai. Người tình nguyện tiếp nhận việc gây miễn dịch vào các ngày nghiên cứu 0 và 28.

FIG.5. Các kết quả của các thử nghiệm ELISA được tiến hành bằng cách đo huyết thanh IgA từ người tình nguyện được gây miễn dịch trong cơ với giả dược (nước muối) hoặc chế phẩm vacxin chứa mỗi loại trong số VLP Norovirut nhóm gen I.1 và VLP Norovirut nhóm gen II.4 với lượng 5, 15, hoặc 50 μ g. Số lần tăng hiệu giá trung bình nhân kháng đối với các kháng thể kháng GI.1 (A) và kháng GII.4 (B) được thể hiện đối với mỗi mức phân liều trong số các mức ở ngày 7 và ngày 21 sau khi tạo miễn dịch thứ nhất và ngày 7 và 28 ngày sau khi tạo miễn dịch thứ hai. Người tình nguyện tiếp nhận việc gây miễn dịch vào các ngày nghiên cứu 0 và 28.

FIG.6. Các kết quả của các thử nghiệm ELISA được tiến hành bằng cách đo huyết thanh IgA từ người tình nguyện được gây miễn dịch trong cơ với giả dược (nước muối) hoặc chế phẩm vacxin chứa mỗi loại trong số VLP Norovirut nhóm gen I.1 và VLP Norovirut nhóm gen II.4 với lượng 5, 15, hoặc 50 μ g. Tỷ lệ phần trăm đáp ứng huyết thanh (nghĩa là tăng 4 lần hiệu giá kháng thể so với hiệu giá trước khi được tạo miễn dịch) đối với các kháng thể kháng GI.1 (A) và kháng GII.4 (B) được thể hiện đối với mỗi mức phân liều trong số các mức ở ngày 7 và ngày 21 sau khi tạo miễn dịch thứ nhất và ngày 7 và 28 ngày sau khi tạo miễn dịch thứ hai. Người tình nguyện tiếp nhận việc gây miễn dịch vào các ngày nghiên cứu 0 và 28.

FIG.7. Các kết quả của các thử nghiệm ELISA được tiến hành bằng cách đo huyết thanh IgG từ người tình nguyện được gây miễn dịch trong cơ với giả dược (nước muối) hoặc chế phẩm vacxin chứa mỗi loại trong số VLP Norovirut nhóm gen I.1 và VLP Norovirut nhóm gen II.4 với lượng 5, 15, hoặc 50 μ g. Hiệu giá trung bình nhân đối với các kháng thể kháng GI.1 (A) và kháng GII.4 (B) được thể hiện đối với mỗi mức phân liều trong số các mức ở ngày 7 và ngày 21 sau khi tạo miễn dịch thứ nhất và ngày 7 và 28 ngày sau khi tạo miễn dịch thứ hai. Người tình nguyện tiếp nhận việc gây miễn dịch vào các ngày nghiên cứu 0 và 28.

FIG.8. Các kết quả của các thử nghiệm ELISA được tiến hành bằng cách đo huyết thanh IgG từ người tình nguyện được gây miễn dịch trong cơ với giả dược (nước muối) hoặc chế phẩm vacxin chứa mỗi loại trong số VLP Norovirut nhóm gen I.1 và VLP Norovirut nhóm gen II.4 với lượng 5, 15, hoặc 50 μ g. Số lần tăng hiệu giá trung

bình nhân kháng đối với các kháng thể kháng GI.1 (A) và kháng GII.4 (B) được thể hiện đối với mỗi mức phân liều trong số các mức ở ngày 7 và ngày 21 sau khi tạo miễn dịch thứ nhất và ngày 7 và 28 ngày sau khi tạo miễn dịch thứ hai. Người tình nguyện tiếp nhận việc gây miễn dịch vào các ngày nghiên cứu 0 và 28.

FIG.9. Các kết quả của các thử nghiệm ELISA được tiến hành bằng cách đo huyết thanh IgG từ người tình nguyện được gây miễn dịch trong cơ với giả dược (nước muối) hoặc chế phẩm vaccin chứa mỗi loại trong số VLP Norovirut nhóm gen I.1 và VLP Norovirut nhóm gen II.4 với lượng 5, 15, hoặc 50 μ g. Tỷ lệ phần trăm đáp ứng huyết thanh (nghĩa là tăng 4 lần hiệu giá kháng thể so với hiệu giá trước khi được tạo miễn dịch) đối với các kháng thể kháng GI.1 (A) và kháng GII.4 (B) được thể hiện đối với mỗi mức phân liều trong số các mức ở ngày 7 và ngày 21 sau khi tạo miễn dịch thứ nhất và ngày 7 và 28 ngày sau khi tạo miễn dịch thứ hai. Người tình nguyện tiếp nhận việc gây miễn dịch vào các ngày nghiên cứu 0 và 28.

FIG.10. Các kết quả của các thử nghiệm pan-ELISA được tiến hành bằng cách đo các mức huyết thanh IgG, IgA, và IgM kết hợp từ người tình nguyện được gây miễn dịch với hoặc là vaccin Norovirut đơn giá dùng trong mũi như được mô tả trong El Kamary et al. (2010) J Gây nhiễm Dis, Vol. 202(11): 1649-1658 (LV01-103 các nhóm) hoặc Norovirut dùng trong cơ, nhị giá vaccin như được mô tả trong Ví dụ 1 (LV03-104 các nhóm) ở các thời điểm chỉ ra. Người tình nguyện nhận hoặc là giả dược hoặc hai liều dùng chế phẩm vaccin dùng trong cơ hoặc trong mũi. Vaccin Norovirut nhị giá, dùng trong cơ chứa 5 μ g mỗi nhóm gen trong số các Norovirut nhóm gen I.1 VLP và nhóm gen II.4 VLP Norovirut. Vaccin đơn giá dùng trong mũi chứa Norovirut nhóm gen I.1 với lượng 100 μ g. Người tình nguyện nhận vaccin hoặc giả dược dùng trong mũi được thử nghiệm với Norovirut sống sau khi tạo miễn dịch thứ hai.

FIG.11. Phân tích FACS của tế bào đơn nhân máu ngoại vi thu được từ người tình nguyện vào các ngày 0 trước khi tạo miễn dịch với hoặc là liều 5 μ g của Norovirut dùng trong cơ, vaccin (A) nhị giá hoặc giả dược (B) và ngày thứ 7 sau khi tạo miễn dịch. CD19+ PBMC được tạo đích màng nhầy làm bằng chứng của biểu hiện của alpha 4/beta7 định cư thụ thể và thụ thể CCR10 hóa động.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp tạo tính miễn dịch bảo vệ đến sự nhiễm Norovirut ở đối tượng. Cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp tạo tính miễn dịch bảo vệ kháng lại Norovirut ở người bằng cách dùng ngoài đường tiêu hóa cho người không nhiều hơn một liều duy nhất vaccin bao gồm VLP Norovirut và tùy ý ít nhất một tá dược, trong đó vaccin cho sự bảo vệ khỏi hoặc cải thiện ít nhất một triệu chứng trong số các triệu chứng do nhiễm Norovirut. Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên khám phá ra rằng, việc dùng trong cơ không nhiều hơn một liều duy nhất chế phẩm vaccin bao gồm VLP Norovirut cho người tạo ra chuyển hóa huyết thanh (nghĩa là trong phạm vi 7 ngày tạo miễn dịch) (nghĩa là tăng ít nhất 3 lần hiệu giá kháng thể huyết thanh kháng nguyên đặc hiệu cao hơn các mức trước khi dùng vaccin) đó là dấu hiệu đáp ứng miễn dịch bảo vệ kháng lại nhiễm Norovirut và bệnh tật. Đáp ứng miễn dịch được tạo ra nhờ dùng chế phẩm vaccin một liều duy nhất này ở các hiệu giá kháng thể cao tương tự với khi quan sát được với nhiễm tự nhiên bằng cách dùng các virut sống trong các nghiên cứu thử nghiệm trên người. Ngạc nhiên là, không đòi hỏi liều vaccin lớn do đáp ứng miễn dịch không tăng theo việc dùng thêm liều vaccin bổ sung.

Sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên Norovirut. Các thuật ngữ “Norovirut,” “Norovirut (NOR),” “norovirut,” và các dạng tương đương về ngữ pháp ở đây, chỉ các thành viên của Norovirut hệ gen của họ Caliciviridae. Theo một số phương án, Norovirut có thể bao gồm nhóm của ARN sợi đơn dương tính liên quan, các virut không có vỏ bao ngoài mà có thể gây nhiễm cho người hoặc các loài động vật có vú không phải là người. Theo một số phương án, Norovirut có thể gây ra bệnh dạ dày ruột ác tính ở người. Norovirut còn có thể để chỉ các virut có cấu trúc tròn nhỏ (SRSV) có cấu trúc bề mặt được xác định hoặc mép bị rách khi được nhìn qua kính hiển vi điện tử.

Norovirut bao gồm ít nhất 5 nhóm gen (GI, GII, GIII, GIV, và GV). GI, GII, và GIV Norovirut gây nhiễm ở người, trong khi GIII Norovirut trước tiên gây nhiễm các giống bò. GV hiện được phân lập từ chuột (Zheng et al. (2006) *Virology*, Vol 346: 312-323). Đại diện của GIII là các chủng Jena và Newbury, trong khi các chủng Alpatron, Fort Lauderdale, và Saint Cloud là đại diện của GIV. Các nhóm GI và GII có thể được phân tách hơn nữa thành các cụm gen hoặc các kiểu gen dựa trên phân loại phát sinh (Ando et al. (2000) *J. Gây nhiễm Các bệnh*, Vol. 181(Supp2):S336-S348;

Lindell et al. (2005) J. Clin. Microbiol., Vol. 43(3): 1086–1092). Theo sáng chế, thuật ngữ các cụm gen được sử dụng thay thế với thuật ngữ các kiểu gen. Trong phạm vi nhóm gen I, có 8 cụm GI được biết đến cho đến nay (với tên chủng virus nguyên mẫu): 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 (Winchester (Winchest-GBR00)); và GI.8 (Boxer-USA02). Trong phạm vi nhóm gen II, có 19 cụm GII được biết đến cho đến nay (với tên chủng virus nguyên mẫu): 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 (Hillingd-GBR00)); GII.6 (269/Seacroft (Seacroft-GBR00)); GII.7 (273/Leeds (Leeds-GBR00)); GII.8 (539/Amsterdam (Amsterdam-NLD99)); GII.9 (378 (VABeach-USA01)), GII.10 (Erfurt-DEU01); GII.11 (SW9180JPN01); GII.12 (Wortley-GBR00); GII.13 (Fayetteville-USA02); GII.14 (M7-USA03); GII.15 (J23-USA02); GII.16 (Tiffin-USA03); GII.17 (CSE1-USA03); GII.18 (QW101/2003/US) và GII.19 (QW170/2003/US).

"Norovirus" chỉ các hạt giống như Norovirus tái tổ hợp (các VLP rNOR). Theo một số phương án, biểu hiện tái tổ hợp của ít nhất Norovirus protein capsid được mã hóa bởi ORF2 trong tế bào, ví dụ, từ vật truyền baculovirus trong Sf9 tế bào, có thể tạo ra tự lắp ráp tự phát của protein capsid vào trong Các VLP. Theo một số phương án, biểu hiện tái tổ hợp của ít nhất Norovirus các protein được mã hóa bởi ORF1 và ORF2 trong tế bào, ví dụ, từ vật truyền baculovirus trong Sf9 tế bào, có thể tạo ra tự lắp ráp tự phát của protein capsid vào trong Các VLP. VLP tương tự về mặt cấu trúc với Norovirus nhưng thiếu hệ gen virus ARN và do đó không phải là gây nhiễm. Do đó, "Norovirus" bao gồm các virion mà có thể là các hạt gây nhiễm hoặc không gây nhiễm, bao gồm cả các hạt thiếu sót.

Các ví dụ không giới hạn về Norovirus bao gồm nhóm gen Norovirus 1 chủng Hu/NoV/West Chester/2001/USA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY502016; Chiba virus (CHV, GenBank AB042808); chủng Norovirus nhóm gen 2 Hu/NoV/Braddock Heights/1999/USA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY502015; chủng Norovirus nhóm gen 2 Hu/NoV/Fayette/1999/USA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY502014; chủng Norovirus nhóm gen 2

Hu/NoV/Fairfield/1999/USA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY502013; chủng Norovirut nhóm gen 2 Hu/NoV/Sandusky/1999/USA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY502012; chủng Norovirut nhóm gen 2 Hu/NoV/Canton/1999/USA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY502011; chủng Norovirut nhóm gen 2 Hu/NoV/Tiffin/1999/USA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY502010; chủng Norovirut nhóm gen 2 Hu/NoV/CS-E1/2002/USA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY50200; nhóm gen Norovirut 1 chủng Hu/NoV/Wisconsin/2001/USA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY502008; nhóm gen Norovirut 1 chủng Hu/NoV/CS-841/2001/USA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY502007; chủng Norovirut nhóm gen 2 Hu/NoV/Hiram/2000/USA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY502006; chủng Norovirut nhóm gen 2 Hu/NoV/Tontogany/1999/USA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY502005; virut Norwalk, hệ gen hoàn chỉnh, có số truy cập trong Ngân hàng gen là NC.sub.--001959; Norovirut Hu/GI/Otofuke/1979/JP genomic RNA, hệ gen hoàn chỉnh, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AB187514; Norovirut Hu/Hokkaido/133/2003/JP, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AB212306; Norovirut Sydney 2212, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY588132; chủng virut Norwalk SN2000JA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AB190457; Lordsdale virut hệ gen hoàn chỉnh, có số truy cập trong Ngân hàng gen là X86557; ARN hệ gen virut giống Norwalk, Gifu'96, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AB045603; chủng virut Norwalk Vietnam 026, hệ gen hoàn chỉnh, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AF504671; Norovirut Hu/GII.4/2004/N/L, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY883096; Norovirut Hu/GII/Hokushin/03/JP, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AB195227; Norovirut Hu/GII/Kamo/03/JP, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AB195228; Norovirut Hu/GII/Sinsiro/97/JP, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AB195226; Norovirut Hu/GII/Ina/02/JP, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AB195225; Norovirut Hu/NLV/GII/Neustrelitz260/2000/DE, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY772730; Norovirut Hu/NLV/Dresden174/pUS-NorII/1997/GE, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY741811; Norovirut Hu/NLV/Oxford/B2S16/2002/UK, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY587989; Norovirut Hu/NLV/Oxford/B4S7/2002/UK, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY587987; Norovirut Hu/NLV/Witney/B7S2/2003/UK, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY588030; Norovirut Hu/NLV/Banbury/B9S23/2003/UK, có số truy cập

trong Ngân hàng gen là AY588029; Norovirut Hu/NLV/ChippingNorton/2003/UK, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY588028; Norovirut Hu/NLV/Didcot/B9S2/2003/UK, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY588027; Norovirut Hu/NLV/Oxford/B8S5/2002/UK, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY588026; Norovirut Hu/NLV/Oxford/B6S4/2003/UK, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY588025; Norovirut Hu/NLV/Oxford/B6S5/2003/UK, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY588024; Norovirut Hu/NLV/Oxford/B5S23/2003/UK, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY588023; Norovirut Hu/NLV/Oxford/B6S2/2003/UK, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY588022; Norovirut Hu/NLV/Oxford/B6S6/2003/UK, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY588021; virut giống Norwalk phân lập Bo/Thirsk10/00/UK, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY126468; virut giống Norwalk phân lập Bo/Penrith55/00/UK, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY126476; virut giống Norwalk phân lập Bo/Aberystwyth24/00/UK, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY126475; virut giống Norwalk phân lập Bo/Dumfries/94/UK, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY126474; Norovirut NLV/IF2036/2003/Iraq, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY675555; Norovirut NLV/IF1998/2003/Iraq, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY675554; Norovirut NLV/BUDS/2002/USA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY660568; Norovirut NLV/Paris Island/2003/USA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY652979; Snow Mountain virut, hệ gen hoàn chỉnh, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY134748; virut giống Norwalk NLV/Fort Lauderdale/560/1998/US, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AF414426; Hu/Norovirut/hiroshima/1999/JP(9912-02F), có số truy cập trong Ngân hàng gen là AB044366; chủng virut giống Norwalk 11MSU-MW, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY274820; chủng virut giống Norwalk B-1SVD, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY274819; chủng Norovirut nhóm gen 2 Hu/NoV/Farmington Hills/2002/USA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY502023; chủng Norovirut nhóm gen 2 Hu/NoV/CS-G4/2002/USA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY502022; chủng Norovirut nhóm gen 2 Hu/NoV/CS-G2/2002/USA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY502021; chủng Norovirut nhóm gen 2 Hu/NoV/CS-G12002/USA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY502020; chủng Norovirut nhóm gen 2 Hu/NoV/Anchorage/2002/USA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là

AY502019; chủng Norovirut nhóm gen 2 Hu/NoV/CS-D1/2002/CAN, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY502018; chủng Norovirut nhóm gen 2 Hu/NoV/Germanton/2002/USA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY502017; Người calicivirut NLV/GII/Langen1061/2002/DE, hệ gen hoàn chỉnh, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY485642; polyprotein norovirut 1 ở chuột, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AY228235; virut Norwalk, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AB067536; Người calicivirut NLV/Mex7076/1999, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AF542090; Người calicivirut NLV/Oberhasz dụn 455/01/DE, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AF539440; Người calicivirut NLV/Herzberg 385/01/DE, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AF539439; Người calicivirut NLV/Boxer/2001/US, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AF538679; ARN hệ gen virut giống Norwalk, hệ gen hoàn chỉnh, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AB081723; ARN hệ gen virut giống Norwalk, hệ gen hoàn chỉnh, phân lập:Saitama U201, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AB039782; ARN hệ gen virut giống Norwalk, hệ gen hoàn chỉnh, phân lập:Saitama U18, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AB039781; ARN hệ gen virut giống Norwalk, hệ gen hoàn chỉnh, phân lập:Saitama U25, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AB039780; chủng virut Norwalk:U25GII, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AB067543; chủng virut Norwalk:U201 GII, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AB067542; chủng virut giống Norwalk 416/97003156/1996/LA, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AF080559; chủng virut giống Norwalk 408/97003012/1996/FL, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AF080558; virut giống Norwalk NLV/Burwash Landing/331/1995/US, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AF414425; virut giống Norwalk NLV/Miami Beach/326/1995/US, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AF414424; virut giống Norwalk NLV/White River/290/1994/US, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AF414423; virut giống Norwalk NLV/New Orleans/306/1994/US, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AF414422; virut giống Norwalk NLV/Port Canaveral/301/1994/US, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AF414421; virut giống Norwalk NLV/Honolulu/314/1994/US, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AF414420; virut giống Norwalk NLV/Richmond/283/1994/US, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AF414419; virut giống Norwalk NLV/Westover/302/1994/US, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AF414418; virut giống Norwalk NLV/UK3-

17/12700/1992/GB, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AF414417; virus giống Norwalk NLV/Miami/81/1986/US, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AF414416; chủng Snow Mountain, có số truy cập trong Ngân hàng gen là U70059; virus Desert Shield DSV395, có số truy cập trong Ngân hàng gen là U04469; virus Norwalk, hệ gen hoàn chỉnh, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AF093797; Hawaii calicivirus, có số truy cập trong Ngân hàng gen là U07611; Southampton virus, có số truy cập trong Ngân hàng gen là L07418; virus Norwalk (SRSV-KY-89/89/J), có số truy cập trong Ngân hàng gen là L23828; virus Norwalk (SRSV-SMA/76/US), có số truy cập trong Ngân hàng gen là L23831; virus Camberwell, có số truy cập trong Ngân hàng gen là U46500; chủng Melksham calicivirus ở người, có số truy cập trong Ngân hàng gen là X81879; chủng MX calicivirus ở người, có số truy cập trong Ngân hàng gen là U22498; Minireovirus TV24, có số truy cập trong Ngân hàng gen là U02030; và virus giống Norwalk NLV/Gwynedd/273/1994/US, có số truy cập trong Ngân hàng gen là AF414409; các trình tự của tất cả các loại này (được đưa vào theo ngày nộp đơn này) được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các trình tự Norovirus bổ sung được bộc lộ trong các công bố patent dưới đây: công bố đơn quốc tế số WO2005/030806, công bố đơn quốc tế số WO2000/79280, JP2002020399, US2003129588, US 6,572,862, WO1994/05700, và WO05/032457. Tham khảo cả tài liệu 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, và Fankhauser et al. (1998) J. Infect. Dis., Vol. 178:1571-1578; để so sánh trình tự và trình bày về đa dạng di truyền và phân tích phát sinh chủng loại của Norovirus. Các axit nucleic và các trình tự axit amin tương ứng, mỗi loại được kết hợp toàn bộ để tham khảo. Theo một số phương án, phương thức xác nhận có thể được sử dụng đối với các mục đích nhận diện và được sắp xếp: các loài vật chủ từ đó virus được phân lập/dạng viết tắt hệ gen/dạng viết tắt các loài/tên chủng/năm xuất hiện/vùng gốc. (Green et al., Human Caliciviruses, in Fields Virology Vol. 1 841-874 (Knipe and Howley, editors-in-chief, 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins 2001)). Các chủng virus nhóm gen II, kiểu gen 4 (GII.4) (ví dụ, Houston, Minerva (còn được biết đến là Den Haag), và các chủng Laurens (còn được biết đến là Yerseke)) được ưu tiên theo

một số phương án. Do các chủng mới được nhận diện và các trình tự gen của chúng được tạo sẵn có, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ có khả năng dùng VLP bằng cách sử dụng các chủng hiện hành này trong các chế phẩm và các phương pháp của sáng chế nhờ sử dụng kỹ năng thông thường. Do đó, sáng chế dự tính đến VLP được tạo từ các chủng làm các kháng nguyên phù hợp để sử dụng trong các chế phẩm và các phương pháp được mô tả theo sáng chế.

Kháng nguyên Norovirut có thể ở dạng các peptit, các protein, hoặc các hạt giả virus (Virus-Like-Particle - VLP). Theo một phương án được ưu tiên, kháng nguyên Norovirut bao gồm Các VLP. Theo sáng chế, “(các) hạt giả virus hoặc VLP” chỉ (các) hạt, (các) đoạn, (các) kết cụm, hoặc (các) phần giống virus của nó được sản xuất ra từ protein capsit mã hóa trình tự Norovirut và bao gồm (các) đặc tính kháng nguyên tương tự với các đặc tính của các hạt Norovirut gây nhiễm. Các kháng nguyên Norovirut còn có thể ở dạng capsit monome, capsit multime, protein hoặc các đoạn peptit của VLP, hoặc các kết cụm hoặc hỗn hợp của chúng. Các protein kháng nguyên Norovirut hoặc các peptit còn có thể ở dạng biến tính, được sản xuất ra nhờ sử dụng các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này.

VLP theo sáng chế có thể được hình thành từ hoặc là protein capsit Norovirut có chiều dài đầy đủ như là các protein VP1 và/hoặc VP2 hoặc một số dẫn xuất VP1 hoặc VP2 sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn trong ngành. Theo cách khác, protein capsit được sử dụng để tạo ra VLP là protein capsit được cắt cụt. Theo một số phương án, ví dụ, ít nhất một VLP trong số các VLP bao gồm protein VP1 được cắt cụt. Trong các phương án khác, tất cả các VLP bao gồm các protein VP1 được cắt cụt. Việc cắt cụt có thể là cắt cụt đầu tận cùng N hoặc C. Các protein capsit được cắt cụt là các dẫn xuất protein capsit chức phù hợp. Các dẫn xuất protein capsit chức phù hợp có khả năng làm tăng đáp ứng miễn dịch (nếu cần thiết, khi được bổ sung phù hợp) theo cùng cách do đáp ứng miễn dịch được tăng nhờ VLP được tạo thành từ protein capsit có chiều dài đầy đủ.

Các VLP có thể chứa các protein VP1 chính và/hoặc các protein VP2 phụ. Theo một số phương án, mỗi VLP chứa protein VP1 và/hoặc VP2 chỉ từ một nhóm gen Norovirut tạo ra VLP đơn giá. Theo sáng chế, thuật ngữ “đơn giá” chỉ các protein kháng nguyên có nguồn gốc từ nhóm gen Norovirut đơn. Ví dụ, VLP chứa VP1 và/hoặc VP2 từ chủng virus của nhóm gen I (ví dụ, VP1 và VP2 từ virus Norwalk). Tốt

hơn là, VLP được tạo thành từ các protein VP1 ưu thế. Theo một phương án của sáng chế, kháng nguyên là hỗn hợp của các VLP đơn giá trong đó chế phẩm bao gồm VLP được tạo thành từ VP1 và VP2 từ nhóm gen Norovirut đơn được trộn với VLP được tạo thành từ VP1 và VP2 từ một nhóm gen Norovirut khác (ví dụ, virut Norwalk và virut Houston) được lấy từ các chủng virut phức. Chỉ là ví dụ, chế phẩm có thể gồm có VLP đơn giá từ một hoặc nhiều chủng của Norovirut nhóm gen I cùng với VLP đơn giá từ một hoặc nhiều chủng của Norovirut nhóm gen II. Các chủng có thể được chọn dựa trên ưu thế tuần hoàn của chúng ở thời điểm đưa ra. Theo một số phương án, hỗn hợp VLP Norovirut gồm có các chủng virut GI.1 và GII.4. Tốt hơn nữa là, hỗn hợp VLP Norovirut được tạo thành từ các chủng Norwalk và trình tự capsit liên ứng có nguồn gốc từ Norovirut nhóm gen II. Các trình tự capsit liên ứng có nguồn gốc từ các trình tự Norovirut tuần hoàn và VLP được tạo với các trình tự này được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO2010/017542. Ví dụ, theo một phương án, trình tự capsit liên ứng có nguồn gốc từ các chủng virut nhóm gen II, kiểu gen 4 (GII.4) bao gồm trình tự SEQ ID NO: 1. Do đó, theo một số phương án, chế phẩm vacxin bao gồm hỗn hợp của các VLP đơn giá, trong đó một VLP đơn giá bao gồm protein capsit từ Norovirut nhóm gen I (ví dụ, Norwalk) và VLP đơn giá khác bao gồm protein capsit liên ứng bao gồm trình tự SEQ ID NO: 1.

MKMASSDANPSDGSTANLVPEVNNEVMALEPVVGA
 AIAAPVAGQQNVIDPWIRNNFVQAPGGGEFTVSPRNAPG
 EILWSAPLGPDLNPYLSHLARMYNGYAGGFVQVILAG
 NAFTAGKIIFAAVPPNFPTEGLSPSQVTMFPHIIVDVRQL
 EPVLIPLPDVRNNFYHYNQSNPTIKLIAMLYTPLRANN
 AGDDVFTVSCRVLTRPSPDFDFIFLVPPTVESRTKPFTVP
 ILTVEEMTNSRFPIPLEKLFTGPSGAFVVQPQNGRCTTD
 GVLLGTTQLSPVNICTFRGDVTHIAGTQEYTMNLASQN
 WNNYDPTEEIPAPLGTPDFVGKIQQGVLTQTTRGDGSTRG
 HKATVSTGSHFHTPKLGSVQFSTDTSNDFETGQNTKFTP
 VGVVQDGSTTHQNEPQQWVLPDYSGRDSHNVHLAPAV
 APTFPGEQLLFFRSTMPGCSGYPNMNLDCLLPQEWVQH
 FYQEAAPAQSDVALLRFVNPDTGRVLFECKLHKSGYVT
 VAHTGQHDLVIPPNGYFRFDSWVNQFYTLAPMGNGTGR
 RRAL (SEQ ID NO: 1)

Tuy nhiên, theo một phương án khác của sáng chế, VLP có thể là VLP đa giá mà bao gồm, ví dụ, các protein VP1 và/hoặc VP2 từ một nhóm gen Norovirut được trộn tương tác với các protein VP1 và/hoặc VP2 từ nhóm gen Norovirut thứ hai, trong đó các protein VP1 và VP2 khác nhau không phải là các protein VP1 và VP2 thể khảm, nhưng kết hợp với nhau trong phạm vi cùng cấu trúc capsit để tạo ra VLP tạo miễn dịch. Theo sáng chế, thuật ngữ “đa giá” có nghĩa là các protein kháng nguyên có nguồn gốc từ hai hoặc nhiều nhóm gen hoặc các chủng Norovirut. VLP đa giá có thể chứa các kháng nguyên VLP được lấy từ hai hoặc nhiều chủng virut. Chỉ là ví dụ, chế phẩm có thể gồm có VLP đa giá được tạo thành từ monome hoặc multime capsit từ một hoặc nhiều chủng của Norovirut nhóm gen I (ví dụ, virut Norwalk) cùng với monome hoặc multime capsit từ một hoặc nhiều chủng của Norovirut nhóm gen II (ví dụ, virut Houston). Tốt hơn là, VLP đa giá chứa protein capsit từ các chủng Norovirut Norwalk và Houston, hoặc các chủng tuần hoàn ưu thế ở thời điểm đưa ra.

Việc kết hợp của các VLP đơn giá hoặc đa giá trong phạm vi chế phẩm tốt hơn là sẽ không làm giảm khả năng tạo miễn dịch của mỗi dạng VLP. Cụ thể được ưu tiên là không có sự can thiệp giữa các VLP Norovirut trong việc kết hợp của sáng chế, sao cho chế phẩm kết hợp VLP theo sáng chế có khả năng tạo tính miễn dịch kháng lại nhiễm bằng mỗi kiểu gen Norovirut được thể hiện trong vacxin. Phù hợp là, đáp ứng miễn dịch kháng lại dạng VLP đưa ra trong việc kết hợp đáp ứng miễn dịch ít nhất 50% đáp ứng miễn dịch cùng dạng khi được đo riêng, tốt hơn là 100% hoặc cơ bản là 100%. Thích hợp, nếu đáp ứng miễn dịch có thể được đo, ví dụ, bằng các đáp ứng kháng thể, như được minh họa trong các ví dụ theo sáng chế.

Theo sáng chế, thuật ngữ “Norovirut VLP nhóm gen I” chỉ VLP đơn giá hoặc đa giá mà bao gồm protein capsit có nguồn gốc từ một hoặc nhiều chủng Norovirut nhóm gen I. Theo một số phương án, VLP Norovirut nhóm gen I bao gồm protein capsit có chiều dài đầy đủ từ Norovirut nhóm gen I (ví dụ, virut Norwalk). Trong các phương án khác, VLP Norovirut nhóm gen I bao gồm protein capsit liên ứng có nguồn gốc từ các chủng nhóm gen I khác nhau. Các chủng nhóm gen I mà từ đó trình tự capsit liên ứng được tạo ra có thể ở trong phạm vi cùng kiểu gen hoặc cụm gen hoặc từ các kiểu gen hoặc các cụm gen khác nhau. Tương tự, theo sáng chế, “Norovirut VLP nhóm gen II” chỉ VLP đơn giá hoặc đa giá mà bao gồm protein capsit có nguồn gốc từ một hoặc nhiều chủng Norovirut nhóm gen II. Theo một số phương án, VLP Norovirut nhóm

gen II bao gồm protein capsit có chiều dài đầy đủ từ Norovirut nhóm gen II (ví dụ, virut Laurens hoặc Minerva). Trong các phương án khác, VLP Norovirut nhóm gen II bao gồm protein capsit liên ứng có nguồn gốc từ các chủng nhóm gen II khác nhau. Các chủng nhóm gen II mà trình tự capsit liên ứng có nguồn gốc từ đó có thể ở trong phạm vi cùng kiểu gen hoặc cụm gen hoặc từ các kiểu gen hoặc các cụm gen khác nhau. Theo một phương án, VLP Norovirut nhóm gen II bao gồm trình tự capsit liên ứng của Norovirut nhóm gen II, kiểu gen 4 (GII.4). Do đó, theo một số phương án, VLP Norovirut nhóm gen II bao gồm trình tự capsit SEQ ID NO: 1.

VLP đa giá có thể được sản xuất ra bằng biểu hiện riêng của protein capsit cá thể tiếp theo là kết hợp để tạo ra Các VLP. Theo cách khác, protein capsit phức có thể được biểu hiện trong phạm vi cùng tế bào, từ một hoặc nhiều cấu trúc ADN. Ví dụ, cấu trúc ADN phức có thể được chuyển dạng hoặc được chuyển nhiễm vào trong tế bào vật chủ, mỗi vật truyền mã hóa một protein capsit khác. Theo cách khác vật truyền đơn có các gen phức capsit, được kiểm soát bởi gen khởi đầu dùng chung hoặc gen khởi đầu cá thể phức, có thể được sử dụng. Các yếu tố IRES còn có thể được kết hợp vào vật truyền, khi thích hợp. Sử dụng các chiến thuật biểu hiện này, protein capsit đồng biểu hiện có thể được đồng tinh chế cho việc hình thành VLP tiếp theo, hoặc có thể tự phát hình thành VLP đa giá mà khi đó có thể được tinh chế.

Quy trình được ưu tiên để sản xuất VLP đa giá bao gồm việc tạo ra protein capsit VLP hoặc các dẫn xuất, như là các protein VP1, từ các kiểu gen Norovirut khác, trộn các protein, và lắp ráp các protein để sản xuất ra VLP đa giá. Các protein VP1 có thể là ở dạng phân chiết thô, được tinh chế một phần hoặc được tinh chế trước khi trộn. VLP đơn giá được lắp ráp từ các nhóm gen khác nhau có thể được tháo rời, được trộn với nhau và được lắp ráp lại thành các VLP đa giá. Tốt hơn là, các protein hoặc các VLP ít nhất được tinh chế một phần trước khi được kết hợp. Tùy ý, có thể tiến hành tinh chế thêm nữa cho các VLP đa giá sau khi lắp ráp.

Phù hợp là, VLP theo sáng chế được tạo bằng cách tháo rời và lắp ráp lại các VLP, để cho ra các VLP đồng nhất và tinh khiết. Theo một phương án, VLP đa giá có thể được tạo bằng cách tháo rời hai hoặc nhiều VLP, tiếp theo là kết hợp các thành phần VLP được tháo rời ở điểm phù hợp bất kỳ trước khi lắp ráp lại. Cách tiếp cận này là phù hợp khi VLP tự phát hình thành từ protein VP1 được biểu hiện, như xuất hiện, ví dụ, trong một số chủng men. Trong trường hợp biểu hiện của protein VP1 không tạo

ra hình thành VLP tự phát, việc tạo ra các protein VP1 hoặc capsome có thể được kết hợp trước khi lắp ráp thành các VLP.

Trong trường hợp VLP đa giá được sử dụng, tốt hơn là các thành phần của VLP được trộn theo tỷ phần trong đó chúng được mong muốn trong hỗn hợp thành phẩm VLP. Ví dụ, hỗn hợp cùng lượng của protein VP1 từ Norwalk được tinh chế một phần và virus Houston (hoặc các chủng Norovirus khác) để xuất VLP đa giá với các lượng của mỗi protein gần như bằng nhau.

Các chế phẩm bao gồm VLP đa giá có thể được ổn định bằng các dung dịch đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, như là các dung dịch được nêu trong các công bố đơn quốc tế số WO98/44944, WO00/45841.

Ngoài các protein VP1 và VP2 của Norovirus hoặc các dẫn xuất, các chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm các protein hoặc các đoạn protein. Các protein hoặc các peptit khác còn có thể được dùng đồng thời với chế phẩm theo sáng chế. Tùy ý, chế phẩm còn có thể được bào chế hoặc được dùng đồng thời với các kháng nguyên không Norovirus. Phù hợp là, các kháng nguyên này có thể cho sự bảo vệ kháng lại các bệnh khác.

Protein VP1 hoặc dẫn xuất protein chức năng có khả năng một cách phù hợp để tạo ra VLP, và sự hình thành VLP có thể được đánh giá bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn như là, ví dụ, phép sắc ký loại trừ kích thước, phương pháp hiển vi điện tử và phân tán ánh sáng laser động.

Các phân tử kháng nguyên theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách phân tách và tinh chế từ vi sinh vật trong đó chúng xuất hiện một cách tự nhiên, hoặc chúng có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật tái tổ hợp. Tốt hơn là, các kháng nguyên VLP Norovirus được tạo ra từ tế bào côn trùng như là tế bào Sf9 hoặc H5, mặc dù tế bào phù hợp bất kỳ như là *E. coli* hoặc tế bào men, ví dụ, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Pichia pastori* hoặc các hệ biểu hiện *Pichia* khác, biểu hiện tế bào động vật có vú như là các hệ CHO hoặc HEK cũng có thể được sử dụng. Khi được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp hoặc bằng cách tổng hợp, một hoặc nhiều thao tác xen vào, xóa bỏ, đảo ngược hoặc thay thế của axit amin cấu tạo nên peptit có thể được tạo. Mỗi kháng nguyên trong số các kháng nguyên được nêu trên đây tốt hơn là được sử dụng trong trạng thái cơ bản là tinh khiết.

Quy trình sản xuất VLP Norovirut trong nuôi cấy tế bào côn trùng đã được bộc lộ trước đây trong US 6,942,865. Cụ thể là, ADN bổ trợ từ đầu 3' của hệ gen chứa gen capsit virut (ORF2) và gen cấu trúc phụ (ORF3) được nhân dòng vô tính. Gen capsit virut mang baculovirut tái tổ hợp được tạo cấu trúc từ ADN bổ trợ được nhân dòng vô tính. VLP Norovirut được sản xuất ra trong môi trường nuôi cấy tế bào côn trùng Sf9 hoặc H5.

Theo một số phương án, chế phẩm vaccin bao gồm một hoặc nhiều tá dược kết hợp với kháng nguyên Norovirut. Hầu hết các tá dược chứa cơ chất được thiết kế để bảo vệ kháng nguyên khỏi dị hóa nhanh, như là nhôm hydroxit hoặc dầu khoáng, và tác nhân kích thích đáp ứng miễn dịch, như là *Bordetella pertussis* hoặc *Mycobacterium tuberculosis* có nguồn gốc từ các protein. Các tá dược phù hợp có trên thị trường là, ví dụ, tá dược không hoàn chỉnh và tá dược hoàn chỉnh Freund (Pifco Laboratories, Detroit, Mich.); Tá dược Merck 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.); muối nhôm như là nhôm hydroxit gel (phèn) hoặc nhôm phosphat; muối của canxi, sắt hoặc kẽm; huyền phù không hòa tan của đường được axyl hóa tyrosin axyl hóa; polysacarit dẫn xuất cation hoặc anion; polyphosphazen; các vi cầu phân hủy sinh học; và Quil A.

Các tá dược phù hợp còn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất đối kháng thụ thể giống toll (TLR), cụ thể là chất đối kháng thụ thể giống toll dạng 4 (TLR-4) (ví dụ, monophosphoryl lipit A (MPL), lipit A tổng hợp, các chất giả hoặc tương tự lipit A), muối nhôm, xytokin, saponin, các dẫn xuất muramyl dipeptit (MDP), CpG oligo, lipopolysacarit (LPS) của vi khuẩn gram âm, polyphosphazen, nhũ tương, virosome, cochleat, poly(lactit-co-glycolit) (PLG) các vi hạt, các hạt poloxame, các vi hạt, các liposome, nhũ tương dầu trong nước, MF59, và squalen. Theo một số phương án, các tá dược không phải là ngoại độc tố có nguồn gốc từ vi khuẩn. Được ưu tiên các tá dược bao gồm các tá dược kích thích đáp ứng kiểu Th1 như là 3DMPL hoặc QS21.

Monophosphoryl Lipit A (MPL), dẫn xuất không độc của lipit A từ *Salmonella*, là chất đối kháng TLR-4 tiềm năng mà được phát triển làm tá dược vaccin (Evans et al. 2003). Trong các nghiên cứu tiền lâm sàng ở chuột, MPL được cho dùng trong mũi có tác dụng làm tăng tiết, cũng như đáp ứng dịch thể toàn thân (Baldrige et al. 2000; Yang et al. 2002). Nó còn được chứng tỏ là an toàn và hiệu quả làm tá dược vaccin trong các nghiên cứu lâm sàng ở hơn khoảng 120.000 người bệnh (Baldrick et al.,

2002; Baldrige et al. 2004). MPL kích thích tạo tính miễn dịch bẩm sinh qua TLR-4 thụ thể và do đó có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu kháng lại trên diện rộng các mầm bệnh gây nhiễm, bao gồm cả vi khuẩn gram âm và gram dương, virus, và các vật ký sinh (Baldrige et al. 2004; Persing et al. 2002). Việc bao gồm MPL trong chế phẩm vaccin sẽ cho tạo ra nhanh đáp ứng bẩm sinh, tạo ra đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu từ thử nghiệm virus trong khi cải thiện đáp ứng đặc hiệu được tạo ra bởi các thành phần kháng nguyên của vaccin.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm monophosphoryl lipid A (MPL) hoặc monophosphoryl lipid A được axyl hóa 3 De-O (3D-MPL) làm tác nhân cải thiện miễn dịch thích ứng và miễn dịch bẩm sinh. Về mặt hóa học, 3D-MPL là hỗn hợp của monophosphoryl lipid A được axyl hóa 3 De-O với 4, 5 hoặc 6 chuỗi được axyl hóa. Dạng được ưu tiên của monophosphoryl lipid A được axyl hóa 3 De-O được bộc lộ trong Patent châu Âu số 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA). Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm lipid A tổng hợp, các chất giả hoặc tương tự lipid A, như là PET Lipid A của BioMira, hoặc các dẫn xuất tổng hợp được thiết kế để hoạt động như là các chất đối kháng TLR-4.

Theo một số phương án, chế phẩm vaccin bao gồm hai tá dược. Việc kết hợp các tá dược có thể được chọn từ các loại được mô tả trên đây. Theo một phương án cụ thể, hai tá dược là MPL và nhôm hydroxit (ví dụ, phèn). Trong phương án cụ thể khác, hai tá dược là MPL và dầu.

Thuật ngữ "lượng tá dược hiệu quả" hoặc "lượng hiệu quả của tá dược" sẽ được hiểu như cách hiểu của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và bao gồm lượng của một hoặc nhiều tá dược mà có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch đến kháng nguyên được dùng, nghĩa là, lượng mà làm tăng đáp ứng miễn dịch của chế phẩm kháng nguyên được dùng, như được đo về các mức IgA trong dùng để rửa mũi, các mức huyết thanh IgG hoặc IgM, hoặc tăng sinh tế bào B hoặc T. Phù hợp là, việc tăng hiệu quả về các mức globulin miễn dịch bao gồm lớn hơn 5%, tốt hơn là lớn hơn 25%, và tốt hơn nữa là lớn hơn 50%, so với cùng chế phẩm kháng nguyên không có tá dược bất kỳ.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin được bào chế để dùng ngoài đường tiêu hóa, trong đó chế phẩm bao gồm ít nhất 2 dạng của VLP Norovirus

kết hợp với nhôm hydroxit và chất đệm. Chất đệm có thể được chọn từ nhóm bao gồm L-histidin, imidazol, axit succinic, tris, axit citric, bis-tris, pipes, mes, hepes, glyxin amit, và trixin. Theo một phương án, chất đệm là L-histidin hoặc imidazol. Tốt hơn là, chất đệm có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ 15mM đến 50mM, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 18mM đến 40mM, hoặc tốt nhất là nằm trong khoảng từ 20mM đến 25mM. Theo một số phương án, độ pH của kháng nguyên hoặc chế phẩm vaccin nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0, hoặc nằm trong khoảng từ 6,2 đến 6,8, hoặc khoảng 6,5. Chế phẩm vaccin có thể là chế phẩm chứa nước. Theo một số phương án, chế phẩm vaccin ở dạng bột được làm đông khô nhanh và được hoàn nguyên thành chế phẩm chứa nước.

Theo một số phương án, chế phẩm vaccin còn bao gồm ít nhất một tá dược ngoài hai hoặc nhiều dạng của VLP Norovirut, nhôm hydroxit, và chất đệm. Ví dụ, tá dược có thể là chất đối kháng thụ thể giống toll, như là MPL, flagelin, CpG oligo, lipit A tổng hợp hoặc chất giả lipit A hoặc chất tương tự lipit A. Theo một phương án cụ thể, tá dược là MPL.

VLP Norovirut bao gồm trong chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể là VLP bất kỳ được mô tả theo sáng chế. Theo một phương án, 2 dạng của VLP Norovirut mà mỗi dạng bao gồm protein capsit từ các nhóm gen khác nhau (ví dụ, nhóm gen I và nhóm gen II). Ví dụ, một dạng của VLP Norovirut bao gồm protein capsit có nguồn gốc từ Norovirut nhóm gen I và dạng khác của VLP Norovirut bao gồm protein capsit có nguồn gốc từ Norovirut nhóm gen II. Theo một phương án, một dạng của VLP Norovirut bao gồm protein capsit từ virus Norwalk và dạng khác của VLP Norovirut bao gồm protein capsit liên ứng có nguồn gốc từ Norovirut nhóm gen II, kiểu gen 4 (ví dụ, protein capsit bao gồm trình tự SEQ ID NO: 1). Chế phẩm vaccin có thể bao gồm mỗi VLP Norovirut với lượng nằm trong khoảng từ 5µg đến 200µg của, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 15µg đến 50µg. Theo một số phương án, liều dùng của một dạng VLP Norovirut là khác với liều dùng của dạng VLP Norovirut kia. Ví dụ, theo một số phương án, chế phẩm vaccin bao gồm lượng nằm trong khoảng từ 5µg đến 15µg VLP nhóm gen I và khoảng 15µg đến 50µg VLP nhóm gen II. Trong các phương án khác, chế phẩm vaccin bao gồm khoảng 15µg đến 50µg VLP nhóm gen I và khoảng 50µg đến 150µg VLP nhóm gen II.

Theo một số phương án, chế phẩm vacxin còn bao gồm muối được dụng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, natri clorua, kali clorua, natri sulfat, amoni sulfat, và natri xitrat. Theo một phương án, muối được dụng là natri clorua. Nồng độ của muối được dụng có thể là nằm trong khoảng từ 10mM đến 200mM, với nồng độ được ưu tiên là nằm trong khoảng từ 100mM đến 150mM. Tốt hơn là, chế phẩm vacxin theo sáng chế chứa ít hơn 2mM phosphat tự do. Theo một số phương án, chế phẩm vacxin bao gồm ít hơn 1mM phosphat tự do. Chế phẩm vacxin còn có thể còn bao gồm tá được dụng khác, như đường (ví dụ, sucroza, trehaloza, manitol) và các chất hoạt động bề mặt.

Như được mô tả theo sáng chế, các chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế để dùng làm các chế phẩm vacxin. Theo sáng chế, thuật ngữ “vacxin” chỉ chế phẩm mà chứa VLP Norovirut hoặc kháng nguyên Norovirut khác theo sáng chế như được mô tả trên đây, ở dạng mà có khả năng dùng được cho động vật có xương sống, cụ thể là người, và tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ đủ để gây ra miễn dịch để ngăn ngừa và/hoặc cải thiện việc nhiễm Norovirut hoặc bệnh tật do Norovirut gây ra và/hoặc tạo ra ít nhất một triệu chứng hoặc bệnh tật do nhiễm Norovirut.

Theo sáng chế, thuật ngữ “đáp ứng miễn dịch” chỉ cả đáp ứng miễn dịch thể dịch và đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào. Đáp ứng miễn dịch thể dịch đòi hỏi kích thích việc sản xuất các kháng thể bằng các tế bào limphô B mà, ví dụ, trung hòa các tác nhân gây nhiễm, phong bế các tác nhân gây nhiễm khỏi đi vào tế bào, phong bế việc sao chép của các tác nhân gây nhiễm này, và/hoặc bảo vệ tế bào vật chủ khỏi nhiễm và hủy hoại. Đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào chỉ đáp ứng miễn dịch cụ thể qua trung gian tế bào limphô T và/hoặc tế bào khác, như là đại thực bào, kháng lại tác nhân gây nhiễm, được thể hiện ở động vật có xương sống (ví dụ, người), mà ngăn ngừa hoặc cải thiện nhiễm hoặc giảm ít nhất một triệu chứng của nó. Cụ thể, “miễn dịch bảo vệ” hoặc “đáp ứng miễn dịch bảo vệ” chỉ miễn dịch hoặc tạo ra đáp ứng miễn dịch kháng lại tác nhân gây nhiễm, mà được thể hiện ở động vật có xương sống (ví dụ, người), mà ngăn ngừa hoặc cải thiện nhiễm hoặc giảm ít nhất một triệu chứng của nó. Đặc biệt là, việc tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ từ việc dùng vacxin là hiển nhiên bằng cách loại đi hoặc làm giảm sự có mặt của một hoặc nhiều triệu chứng bệnh dạ dày ruột ác tính hoặc giảm bớt sự kéo dài hoặc tính trầm trọng của triệu chứng này. Triệu chứng lâm sàng ở dạ dày-ruột từ việc nhiễm Norovirut bao gồm nôn, tiêu chảy,

phân lỏng, nôn, sốt, và khó chịu tổng thể. Đáp ứng miễn dịch bảo vệ mà làm giảm hoặc loại đi triệu chứng bệnh sẽ làm giảm hoặc dừng sự lan rộng bùng nổ Norovirut trong dân số. Việc điều chế vaccin thường được mô tả trong bài báo: Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press New York).

Chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế, ví dụ, để phân phối theo một hoặc nhiều đường dùng bao gồm đường miệng, đường dạ dày ruột, và niêm mạc đường hô hấp (ví dụ, mũi). Các chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế, ví dụ, để phân phối bằng cách tiêm, như là dùng ngoài đường tiêu hóa bằng cách tiêm (ví dụ, tiêm ven, tiêm dưới da, trong da, hoặc bắp).

Trong trường hợp chế phẩm với mục đích để phân phối đến niêm mạc đường hô hấp (ví dụ, mũi), nó thường được bào chế ở dạng dung dịch trong nước để dùng ở dạng bình phun hoặc nhỏ vào mũi, hoặc theo cách khác, ở dạng bột khô, ví dụ để lắng bám nhanh trong phạm vi đường hô hấp. Các chế phẩm để dùng ở dạng nhỏ mũi có thể chứa một hoặc nhiều tá dược ở dạng thường có mặt trong chế phẩm này, ví dụ các chất bảo quản, các tác nhân điều chỉnh độ nhớt, các tác nhân điều chỉnh trương lực, các tác nhân đệm, và các tác nhân tương tự. Các tác nhân tạo nhớt có thể là xenluloza vi tinh thể, chitosan, tinh bột, polysacarit, và tương tự. Các chế phẩm để dùng ở dạng bột khô còn có thể chứa một hoặc nhiều tá dược thường có mặt trong chế phẩm này, ví dụ, các tác nhân bám dính màng nhầy, tác nhân tạo khối, và các tác nhân để phân phối dòng chất dạng bột thích hợp và các đặc tính về kích cỡ. Tác nhân tạo khối và dòng chất dạng bột và các tác nhân tạo kích cỡ có thể bao gồm manitol, sucroza, trehaloza, và xylitol.

Trong trường hợp chế phẩm với mục đích để dùng ngoài đường tiêu hóa bằng cách tiêm, như là tiêm tĩnh mạch (i.v.), tiêm dưới da (s.c.), trong da, hoặc trong cơ (i.m.), nó thường được bào chế ở dạng hỗn dịch lỏng (nghĩa là chế phẩm chứa nước) được tạo thành từ ít nhất một dạng của VLP Norovirut và tùy ý ít nhất một tá dược. Theo một phương án, tá dược có thể là MPL. Theo một phương án khác, vaccin dạng lỏng được bào chế để dùng ngoài đường tiêu hóa có thể có lớn hơn một tá dược. Theo một phương án được ưu tiên, vaccin dạng lỏng được bào chế để dùng ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, được bào chế để dùng trong cơ, trong tĩnh mạch, hoặc dưới da) bao gồm VLP Norovirut nhóm gen I và/hoặc nhóm gen II với nhôm hydroxit (ví dụ, phèn) và

monophosphoryl lipit A (MPL) làm các tá dược. Theo một phương án, dạng chế phẩm lỏng để dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm (các) kháng nguyên Norovirut nhóm gen, như là một hoặc nhiều dạng của VLP Norovirut như được mô tả theo sáng chế, MPL, nhôm hydroxit, và chất đệm. Theo một phương án khác, dạng chế phẩm lỏng để dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm (các) kháng nguyên Norovirut nhóm gen, MPL, dầu, và chất đệm. Theo một số phương án, chất đệm trong chế phẩm vaccin dùng ngoài đường tiêu hóa là L-histidin hoặc imidazol. Việc dùng ngoài đường tiêu hóa cho vaccin dạng lỏng có thể bằng cách sử dụng kim tiêm và ống tiêm, như đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một số phương án, chế phẩm vaccin theo sáng chế để tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ kháng lại Norovirut ở người bao gồm VLP Norovirut nhóm gen I và/hoặc nhóm gen II với liều dùng không lớn hơn 150 μ g. Ví dụ, theo một số phương án, chế phẩm vaccin bao gồm VLP Norovirut nhóm gen I với lượng không lớn hơn 150 μ g, không lớn hơn 100 μ g, không lớn hơn 50 μ g, không lớn hơn 25 μ g, không lớn hơn 15 μ g, hoặc không lớn hơn 10 μ g. Trong các phương án khác, chế phẩm vaccin bao gồm VLP Norovirut nhóm gen II với lượng không lớn hơn 150 μ g, không lớn hơn 100 μ g, không lớn hơn 50 μ g, không lớn hơn 25 μ g, không lớn hơn 15 μ g, hoặc không lớn hơn 10 μ g. Theo một số phương án, chế phẩm vaccin bao gồm mỗi loại trong số VLP Norovirut nhóm gen I và nhóm gen II với lượng không lớn hơn 150 μ g. Trong các phương án này, liều dùng VLP Norovirut nhóm gen I và nhóm gen II có thể là giống hoặc khác nhau. Ví dụ, theo một phương án, chế phẩm vaccin có thể bao gồm VLP Norovirut nhóm gen I với lượng không lớn hơn 50 μ g và VLP Norovirut nhóm gen II với lượng không lớn hơn 150 μ g. Theo một phương án khác, chế phẩm vaccin có thể bao gồm VLP Norovirut nhóm gen I với lượng không lớn hơn 25 μ g và VLP Norovirut nhóm gen II với lượng không lớn hơn 50 μ g. Trong các phương án khác, chế phẩm vaccin có thể bao gồm VLP Norovirut nhóm gen I với lượng không lớn hơn 15 μ g và VLP Norovirut nhóm gen II với lượng không lớn hơn 50 μ g. Trong các phương án khác nữa, chế phẩm vaccin có thể bao gồm VLP Norovirut nhóm gen I với lượng không lớn hơn 25 μ g và VLP Norovirut nhóm gen II với lượng không lớn hơn 150 μ g.

VLP Norovirut nhóm gen I và nhóm gen II có thể có nguồn gốc từ các chủng Norovirut bất kỳ được mô tả theo sáng chế. Theo một phương án, VLP Norovirut

nhóm gen I là VLP nhóm gen I, kiểu gen 1 (GI.1) (nghĩa là bao gồm protein capsit từ Norovirut GI.1). Theo một phương án khác, VLP Norovirut nhóm gen I là VLP Norwalk. Theo một phương án khác, VLP Norovirut nhóm gen II là VLP nhóm gen II, kiểu gen 4 (GII.4). Theo một phương án còn khác nữa, VLP Norovirut nhóm gen II là VLP được sinh ra từ biểu hiện của trình tự liên ứng ở Norovirut nhóm gen II. Trong phương án cụ thể, VLP Norovirut nhóm gen II bao gồm capsit protein có trình tự SEQ ID NO: 1.

Chế phẩm vaccin được mô tả trên đây có thể được làm đông khô nhanh và được bảo quản khô cho đến khi chúng sẵn sàng cho sử dụng, ở thời điểm đó chúng được hoàn nguyên bằng chất pha loãng. Theo cách khác, các thành phần khác nhau của chế phẩm có thể được bảo quản riêng trong kit (thành phần bất kỳ hoặc tất cả các thành phần được làm đông khô nhanh). Các thành phần có thể duy trì ở dạng được làm đông khô nhanh đối với chế phẩm khô hoặc được hoàn nguyên thành chế phẩm dạng lỏng, và được trộn trước khi sử dụng hoặc được dùng riêng cho người bệnh. Theo một số phương án, chế phẩm vaccin được bảo quản trong các kit ở dạng chế phẩm lỏng và có thể được kèm theo thiết bị phân phối, như là ống tiêm có kim tiêm. Trong các phương án khác, chế phẩm vaccin lỏng có thể được bảo quản trong thiết bị phân phối trong kit. Ví dụ, kit có thể bao gồm ống tiêm được nạp trước, bơm tự động, hoặc thiết bị bút tiêm chứa chế phẩm vaccin lỏng được mô tả theo sáng chế.

Việc làm đông khô nhanh vaccin là đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thông thường kháng nguyên dạng lỏng được làm khô ở nhiệt độ thấp với sự có mặt của các tác nhân để bảo vệ kháng nguyên trong quá trình làm đông khô nhanh và để tạo ra bánh với các đặc tính bột mong muốn. Đường như là sucroza, manitol, trehaloza, hoặc lactoza (có mặt ở nồng độ ban đầu nằm trong khoảng từ 10 đến 200mg/mL) thường được sử dụng cho việc bảo vệ lạnh các protein kháng nguyên và để tạo ra bánh được làm đông khô nhanh với các đặc tính bột mong muốn. Theo lý thuyết, việc làm khô chế phẩm ở nhiệt độ thấp sẽ làm cho chế phẩm ổn định hơn.

Lượng kháng nguyên trong mỗi chế phẩm vaccin được chọn là lượng mà tạo ra đáp ứng miễn dịch mạnh và không có tác dụng phụ đáng kể. Lượng này sẽ thay đổi tùy thuộc vào (các) kháng nguyên đặc hiệu được dùng, đường dùng, và các tá được được sử dụng. Nhìn chung, liều được dùng cho người bệnh, trong trong bối cảnh của sáng chế nên là đủ để có tác dụng đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở người bệnh theo thời gian,

hoặc tạo ra việc sản xuất các kháng thể đặc hiệu kháng nguyên. Do đó, chế phẩm được dùng cho người bệnh với lượng đủ để tạo ra đáp ứng miễn dịch đối với các kháng nguyên đặc hiệu và/hoặc để ngăn ngừa, làm nhẹ bớt, làm giảm, hoặc chữa khỏi các triệu chứng và/hoặc các biến chứng từ bệnh hoặc nhiễm, và do đó làm giảm hoặc dừng sự lan rộng bùng nổ Norovirut trong dân số. Lượng thích đáng để đạt được mục đích này được xác định là "liều có hiệu quả chữa bệnh."

Chế phẩm vaccin theo sáng chế có thể được cung cấp qua đường niêm mạc hoặc không qua niêm mạc. Việc cung cấp này có thể bao gồm việc cung cấp *in vivo* ngoài đường tiêu hóa bằng cách tiêm (ví dụ, trong tĩnh mạch, dưới da, trong da, và trong cơ) hoặc các đường dùng trực tiếp truyền thống khác, như dùng qua đường miệng/dưới lưỡi, trực tràng, qua đường miệng, dùng cho mũi, dùng khu trú (như là dùng qua da và dùng vào mắt), âm đạo, phổi, trong động mạch, trong màng bụng, trong mắt, hoặc trong mũi hoặc trực tiếp vào mô cụ thể. Các đường dùng phù hợp khác bao gồm dùng qua da, dưới da, và ở dạng thuốc đạn. Theo một phương án, vaccin được dùng bằng đường dùng ngoài đường tiêu hóa, như là trong tĩnh mạch, dưới da, trong da, hoặc trong cơ. Theo một số phương án, vaccin được dùng bằng đường dùng trong cơ. Việc dùng có thể được thực hiện đơn giản bằng cách dùng trực tiếp nhờ sử dụng kim, ống thông hoặc thiết bị liên quan (ví dụ, ống tiêm được nạp trước hoặc bơm tự động), ở một thời điểm hoặc ở nhiều thời điểm. Chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa khác có thể được phân phối dưới da hoặc trong da bằng các phương pháp vi tiêm hoặc phân phối bằng miếng dán trên da.

Sáng chế đề xuất phương pháp tạo tính miễn dịch bảo vệ kháng lại Norovirut ở đối tượng, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng dùng ngoài đường tiêu hóa không nhiều hơn một liều duy nhất chế phẩm vaccin theo sáng chế, trong đó vaccin này bao gồm VLP Norovirut nhóm gen I và/hoặc nhóm gen II như được mô tả theo sáng chế và tùy ý ít nhất một tá được. Trong các phương án này, chế phẩm vaccin một liều duy nhất làm tăng ít nhất 3 lần hiệu giá kháng thể huyết thanh đặc hiệu với Norovirut so với hiệu giá ở người này trước khi dùng chế phẩm. Theo một số phương án, chế phẩm vaccin một liều duy nhất làm tăng ít nhất 6 lần hiệu giá kháng thể huyết thanh đặc hiệu với Norovirut so với hiệu giá ở người này trước khi dùng chế phẩm. Trong các phương án khác, chế phẩm vaccin một liều duy nhất tạo ra hiệu giá kháng thể huyết thanh đặc hiệu với Norovirut có thể so sánh được với hiệu giá kháng thể

được tạo ra bởi việc phơi nhiễm Norovirut sống trong quá trình nhiễm tự nhiên-nghĩa là, tăng hơn khoảng 10 lần về kháng thể huyết thanh đặc hiệu với Norovirut so với hiệu giá ở người này trước khi dùng chế phẩm. Theo một số phương án, chế phẩm vaccin một liều duy nhất tạo ra việc tăng hiệu giá kháng thể huyết thanh đặc hiệu với Norovirut trong phạm vi 7 ngày dùng chế phẩm. Tốt hơn là, chế phẩm vaccin một liều duy nhất được dùng bằng đường dùng trong tĩnh mạch, dưới da, hoặc trong cơ. Theo một số phương án, chế phẩm vaccin một liều duy nhất được dùng trong cơ cho người.

Như được mô tả theo sáng chế, theo một số phương án, chế phẩm vaccin một liều duy nhất phù hợp để sử dụng trong phương pháp này bao gồm mỗi loại trong số Norovirut nhóm gen I và/hoặc nhóm gen II với lượng không lớn hơn 150 μ g. Ví dụ, theo một số phương án, chế phẩm vaccin bao gồm VLP Norovirut nhóm gen I với lượng không lớn hơn 150 μ g, không lớn hơn 100 μ g, không lớn hơn 50 μ g, không lớn hơn 25 μ g, không lớn hơn 15 μ g, hoặc không lớn hơn 10 μ g. Trong các phương án khác, chế phẩm vaccin bao gồm VLP Norovirut nhóm gen II với lượng không lớn hơn 150 μ g, không lớn hơn 100 μ g, không lớn hơn 50 μ g, không lớn hơn 25 μ g, không lớn hơn 15 μ g, hoặc không lớn hơn 10 μ g. Theo một số phương án, chế phẩm vaccin bao gồm mỗi loại trong số VLP Norovirut nhóm gen I và nhóm gen II với lượng không lớn hơn 50 μ g. Trong các phương án, trong đó chế phẩm vaccin một liều duy nhất bao gồm cả VLP Norovirut nhóm gen I và nhóm gen II, liều dùng VLP Norovirut nhóm gen I và nhóm gen II có thể là giống hoặc khác nhau. Ví dụ, theo một phương án, chế phẩm vaccin có thể bao gồm VLP Norovirut nhóm gen I với lượng không lớn hơn 50 μ g và VLP Norovirut nhóm gen II với lượng không lớn hơn 150 μ g. Theo một phương án khác, chế phẩm vaccin có thể bao gồm VLP Norovirut nhóm gen I với lượng không lớn hơn 25 μ g và VLP Norovirut nhóm gen II với lượng không lớn hơn 50 μ g. Trong các phương án khác, chế phẩm vaccin có thể bao gồm VLP Norovirut nhóm gen I với lượng không lớn hơn 15 μ g và VLP Norovirut nhóm gen II với lượng không lớn hơn 50 μ g. Trong các phương án khác nữa, chế phẩm vaccin có thể bao gồm VLP Norovirut nhóm gen I với lượng không lớn hơn 25 μ g và VLP Norovirut nhóm gen II với lượng không lớn hơn 150 μ g.

Theo một phương án của phương pháp này, đối tượng là người và vaccin cho sự bảo vệ khỏi một hoặc nhiều triệu chứng do nhiễm Norovirut. Mặc dù còn có các báo

cáo khác về các phương pháp tạo ra đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên Norovirut (tham khảo US 2007/0207526), các chỉ số đáp ứng miễn dịch bảo vệ kháng lại Norovirut ở người vẫn chưa được nhận diện rõ rệt (Herbst-Kralovetz et al. (2010) Expert Rev. Vaccines 9(3), 299–307). Không giống như một số vacxin hiện được cấp phép ở Mỹ mà hiệu quả của vacxin này là tương liên với kháng thể huyết thanh, các nghiên cứu thể hiện là các gen đánh dấu đáp ứng miễn dịch, như là việc tăng hiệu giá của các kháng thể huyết thanh IgG kháng lại virus Norwalk, không phải là kết hợp với miễn dịch bảo vệ ở người (Johnson et al. (1990) J. Infectious Diseases 161: 18-21). Hơn nữa, nghiên cứu khác để thử nghiệm virus Norwalk ở người đã chỉ ra rằng, tính nhạy cảm với nhiễm Norwalk là do nhiều yếu tố và bao gồm các yếu tố như là tình trạng tiết và đáp ứng miễn dịch niêm mạc ghi nhớ (Lindesmith et al. (2003) Nature Medicine 9: 548-553).

Bởi vì Norovirut không có khả năng được nuôi cấy *in vitro*, nên hiện không có các thử nghiệm trung hòa virus. Thử nghiệm chức năng dùng để thay thế đối với thử nghiệm trung hòa là thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu (hemagglutination inhibition - HAI) (tham khảo Ví dụ 1). Thử nghiệm HAI đo khả năng của các kháng thể được tạo ra bởi vacxin Norovirut, ức chế ngưng kết tế bào hồng cầu được phủ kháng nguyên bằng VLP Norovirut bởi vì VLP Norovirut gắn kết với các kháng nguyên tế bào hồng cầu (ví dụ, các kháng nguyên nhóm máu histo). Thử nghiệm này còn được biết đến là thử nghiệm phong bế hydrat cacbon, do nó là dấu hiệu cho biết khả năng chức năng của các kháng thể trong việc phong bế sự gắn kết của virus hoặc VLP với hydrat cacbon kháng nguyên của nhóm máu trên tế bào hồng cầu. Trong thử nghiệm này, lượng được cố định của VLP Norovirut được trộn với lượng được cố định của tế bào hồng cầu và huyết thanh từ các đối tượng được tạo miễn dịch. Nếu mẫu huyết thanh chứa các kháng thể chức năng, các kháng thể sẽ gắn kết với các VLP, nhờ đó ức chế sự ngưng kết của tế bào hồng cầu. Theo sáng chế, “các kháng thể chức năng” chỉ các kháng thể mà có khả năng ức chế sự tương tác giữa các hạt Norovirut và các kháng nguyên tế bào hồng cầu. Nói cách khác, hiệu giá kháng thể chức năng là tương đương với kháng nguyên nhóm máu histo (HBGA) hoặc hiệu giá kháng thể phong bế hydrat cacbon. Hiệu giá huyết thanh của các kháng thể chức năng đặc hiệu với Norovirut có thể được đo bằng thử nghiệm HAI được mô tả trên đây. Hiệu giá huyết thanh của các kháng thể chức năng đặc hiệu với Norovirut còn có thể được đo

nhờ sử dụng thử nghiệm dựa trên ELISA, trong đó kháng nguyên hydrat cacbon H được gắn kết với các giếng vi chuẩn độ và VLP Norovirut gắn kết với kháng nguyên H được phát hiện khi có mặt huyết thanh (tham khảo Ví dụ 1 và Reeck et al. (2010) J Infect Dis, Vol. 202(8):1212-1218). Việc tăng mức của các kháng thể chức năng đặc hiệu với Norovirut có thể là chỉ số của đáp ứng miễn dịch bảo vệ. Do đó, theo một phương án, việc dùng vaccin tạo tính miễn dịch bảo vệ bao gồm việc tăng hiệu giá huyết thanh của các kháng thể chức năng đặc hiệu với Norovirut so với hiệu giá huyết thanh ở người không nhận vaccin. Hiệu giá huyết thanh của các kháng thể chức năng đặc hiệu với Norovirut cho dấu hiệu về đáp ứng miễn dịch bảo vệ tốt hơn là hiệu giá trung bình nhân lớn hơn khoảng 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 như được đo bằng thử nghiệm HAI hoặc hiệu giá phong bế (BT)₅₀ (ức chế 50% liên kết kháng nguyên H bằng VLP Norovirut) hiệu giá trung bình nhân là lớn hơn khoảng 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, hoặc 500 như được đo bằng thử nghiệm gắn kết kháng nguyên H. Theo một phương án, hiệu giá huyết thanh của các kháng thể chức năng đặc hiệu với Norovirut là hiệu giá trung bình nhân lớn hơn khoảng 40 như được đo bằng thử nghiệm HAI. Theo một phương án khác, hiệu giá huyết thanh của các kháng thể chức năng đặc hiệu với Norovirut là hiệu giá trung bình nhân lớn hơn khoảng 100 như được đo bằng thử nghiệm HAI. Theo một phương án khác, hiệu giá huyết thanh của các kháng thể chức năng đặc hiệu với Norovirut là BT₅₀, hiệu giá trung bình nhân lớn hơn khoảng 100 như được đo bằng thử nghiệm gắn kết kháng nguyên H. Theo một phương án khác, hiệu giá huyết thanh của các kháng thể chức năng đặc hiệu với Norovirut là BT₅₀, hiệu giá trung bình nhân lớn hơn khoảng 200 như được đo bằng thử nghiệm gắn kết kháng nguyên H.

Theo một khía cạnh khác, việc cho đối tượng dùng vaccin tạo tính miễn dịch bảo vệ bao gồm đáp ứng miễn dịch niêm mạc IgA và đáp ứng miễn dịch toàn thân IgG bằng cách dùng ngoài đường tiêu hóa (tốt hơn là trong cơ) không nhiều hơn một liều duy nhất kháng nguyên hoặc chế phẩm vaccin bao gồm một hoặc nhiều loại kháng nguyên Norovirut và tùy ý ít nhất một tá dược hiệu quả. Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên khám phá ra rằng, việc dùng ngoài đường tiêu hóa chế phẩm vaccin Norovirut được mô tả theo sáng chế tạo ra đáp ứng IgA mạnh, ngoài đáp ứng IgG mạnh. Thông thường, các đáp ứng IgA mạnh chỉ quan sát được khi vaccin được dùng qua đường niêm mạc.

Theo một số phương án, việc dùng vaccin tạo tính miễn dịch bảo vệ bao gồm việc tăng mức tế bào tiết kháng thể đặc hiệu với Norovirut IgA trong máu so với mức ở người không dùng vaccin. Theo một số phương án, việc dùng vaccin tạo tính miễn dịch bảo vệ bao gồm việc tăng mức tế bào tiết kháng thể đặc hiệu với Norovirut IgA trong máu so với mức ở người trước khi nhận vaccin. Theo một phương án, tế bào tiết kháng thể đặc hiệu với Norovirut IgA là CCR10+, CD19+, CD27+, CD62L+, và $\alpha 4\beta 7$ +. Tế bào tiết kháng thể với đặc tính đánh dấu này có khả năng định cư ở cả mô limphô ngoại vi, như là vết Peyer trong gut, và mô limphô niêm mạc, như là niêm mạc ruột. Theo một phương án, số lượng tế bào tiết kháng thể CCR10+, CD19+, CD27+, CD62L+, và $\alpha 4\beta 7$ + IgA là lớn hơn khoảng 500, khoảng 700, khoảng 1.000, khoảng 1.500, hoặc là lớn hơn khoảng 2.000 tế bào trên 1×10^6 bạch cầu đơn nhân to máu ngoại vi. Theo một phương án khác, tế bào tiết kháng thể đặc hiệu với Norovirut IgA là CCR10+, CD19+, CD27+, CD62L-, và $\alpha 4\beta 7$ +. Tế bào tiết kháng thể với đặc tính đánh dấu này thường thể hiện định cư chỉ cho các vị trí niêm mạc và có thể là dấu hiệu của đáp ứng tế bào nhớ. Theo một số phương án, trong đó vaccin được dùng trong cơ, số lượng tế bào tiết kháng thể CCR10+, CD19+, CD27+, CD62L-, và $\alpha 4\beta 7$ + IgA là lớn hơn khoảng 5.000, khoảng 6.500, khoảng 7.000, khoảng 10.000, khoảng 13.000, khoảng 15.000, hoặc là lớn hơn khoảng 20.000 tế bào trên 1×10^6 bạch cầu đơn nhân to máu ngoại vi.

Các phát hiện tương tự quan sát được với vaccin đối với các virus khác, như là rotavirut. Đối với vaccin rotavirut, có tranh luận là có hay không kháng thể huyết thanh liên quan trực tiếp trong sự bảo vệ hoặc chỉ phản ánh nhiễm hiện tại (Jiang, 2002; Franco, 2006). Việc xác định những tương liên này của sự bảo vệ là đặc biệt khó trong bối cảnh của các bệnh tiêu chảy như là do rotavirut hoặc norovirut gây ra, trong trường hợp các nghiên cứu tiền lâm sàng luận ra sự bảo vệ có thể là nhiều khía cạnh với các thể hiện từ miễn dịch niêm mạc (như là IgA ở ruột), tạo ra xytokin, và miễn dịch qua trung gian tế bào. Khó khăn trong việc đo đáp ứng miễn dịch này trong quá trình phát triển lâm sàng, và thiếu tương quan đến việc đo kháng thể huyết thanh, đòi hỏi rằng tính hiệu quả của vaccin đối với các dạng virus này có thể chỉ được chứng tỏ thông qua các thử nghiệm lâm sàng ở người.

Như được nêu trên đây, việc dùng chế phẩm vaccin theo sáng chế có tác dụng ngăn ngừa và/hoặc giảm ít nhất một triệu chứng trong số các triệu chứng do nhiễm

Norovirut. Triệu chứng do nhiễm Norovirut đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm nôn mửa, nôn, tiêu chảy, và co thắt dạ dày. Ngoài ra, người bệnh bị nhiễm Norovirut có thể có sốt nhẹ, đau đầu, ớn lạnh, đau cơ, và mệt. Sáng chế còn bao gồm phương pháp tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở đối tượng mắc nhiễm Norovirut bằng cách cho đối tượng dùng chế phẩm vacxin theo sáng chế sao cho ít nhất một triệu chứng kết hợp với nhiễm Norovirut được làm nhẹ bớt và/hoặc giảm. Việc giảm triệu chứng có thể được xác định một cách chủ quan hoặc khách quan, ví dụ, nhờ đối tượng tự đánh giá, thầy thuốc lâm sàng đánh giá hoặc bằng cách tiến hành thử nghiệm hoặc đo thích đáng (ví dụ, nhiệt độ cơ thể), bao gồm, ví dụ, đánh giá chất lượng cuộc sống, tiến triển chậm của việc nhiễm Norovirut hoặc triệu chứng bổ sung, tính trầm trọng của triệu chứng Norovirut giảm hoặc các thử nghiệm phù hợp (ví dụ, hiệu giá kháng thể, xác định kháng nguyên bằng RT-PCR, và/hoặc thử nghiệm hoạt hóa tế bào B hoặc tế bào T). Đáp ứng hiệu quả còn có thể được xác định bằng cách đo trực tiếp (ví dụ, RT-PCR) tải lượng virus trong các mẫu phân, để phản ánh lượng virus đi ra từ ruột). Việc đánh giá đối tượng bao gồm cả đánh giá trên động vật và người.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra các kháng thể đối với một hoặc nhiều kháng nguyên Norovirut, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng dùng chế phẩm vacxin theo sáng chế như được mô tả trên đây. Các kháng thể này có thể được phân lập và được tinh chế bằng các phương pháp thông thường trong ngành. Các kháng thể được phân lập đặc hiệu đối với các kháng nguyên Norovirut có thể được sử dụng trong phát triển các phương pháp thử nghiệm chẩn đoán miễn dịch. Các thử nghiệm này có thể được dùng để xác định Norovirut trong các mẫu lâm sàng và nhận diện virus cụ thể gây nhiễm (ví dụ, Norwalk, Houston, Snow Mountain, v.v.). Theo cách khác, các kháng thể được phân lập có thể được cho các đối tượng dễ bị nhiễm Norovirut dùng để tạo ra sự miễn dịch thụ động hoặc miễn dịch trong thời gian ngắn.

Sáng chế sẽ được minh họa một cách chi tiết hơn bằng cách viện dẫn đến các phương án cụ thể được mô tả trong các ví dụ dưới đây. Các ví dụ này được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế mà không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế dưới hình thức bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Nghiên cứu liều bậc thang, tính an toàn và khả năng tạo miễn dịch của vaccin Norovirut dạng hạt giả virus nhĩ giá dùng trong cơ ở người (Nghiên cứu LV03-104), Nhóm nghiên cứu A

Ví dụ này mô tả Nhóm nghiên cứu A của nghiên cứu liều bậc thang, đa vị trí, được lấy ngẫu nhiên về tính an toàn và khả năng tạo miễn dịch ở 4 mức phân liều của Vaccin VLP Norovirut nhĩ giá dùng trong cơ (IM) được bổ trợ tá được là monophosphoryl lipit A (MPL) và nhôm hydroxit (AlOH) so với giả được ở các các đối tượng trưởng thành. Khoảng 48 đối tượng ở độ tuổi từ 18 đến 49 được xếp trong Nhóm nghiên cứu. Các đối tượng nhận 2 liều vaccin hoặc giả được, bằng cách tiêm bắp (IM), 28 ngày riêng sử dụng kim 1,5insơ (38mm).

Vaccin VLP Norovirut nhĩ giá chứa VLP nhóm gen I, kiểu gen 1 (GI.1) và nhóm gen II, kiểu gen IV (GII.4) làm các kháng nguyên và Monophosphoryl Lipit A (MPL) và nhôm hydroxit (AlOH) làm các tá được, natri clorua (NaCl) và L-histidin (L-His) làm chất đệm (độ pH bằng 6,3-6,7), etanol và nước để tiêm. Chế phẩm vaccin VLP Norovirut nhĩ giá dùng trong cơ được tóm tắt trong Bảng 1. VLP GII.4 bao gồm trình tự capsit SEQ ID NO: 1, mà có nguồn gốc từ ba chủng GII.4.

Bảng 1. Thành phẩm thuốc đối với 4 chế phẩm vaccin VLP Norovirut nhĩ giá dùng trong cơ trên 0,5 mL

Chế phẩm	VLP GI.1 (µg)	VLP GII.4(µg)	MPL (µg)	Al* (mg)	NaCl (mg)	L-His (mg)	Etanol (mg)
phân liều 10µg	5	5	50	0,5	4,38	1,55	19,7
phân liều 30µg	15	15	50	0,5	4,38	1,55	19,7
phân liều 100µg	50	50	50	0,5	4,38	1,55	19,7
phân liều 300µg	150	150	50	0,5	4,38	1,55	19,7

* là nhôm hydroxit

Giả được là nước muối vô trùng thông thường để tiêm (0,9% NaCl và không có chất bảo quản). Liều bậc thang của vaccin được tiến hành như sau: sau khi sàng lọc thích đáng để bao gồm các đối tượng có sức khỏe tốt, các đối tượng trong Nhóm nghiên cứu A được xếp lần lượt vào mỗi nhóm trong số 4 nhóm dùng liều, mỗi nhóm khoảng 12 đối tượng (các nhóm dùng liều A1, A2, A3, và A4). Các nhóm dùng liều

A1, A2, A3, và A4 thể hiện các phân liều kháng nguyên nhị giá 5/5 μ g, 15/15 μ g, 50/50 μ g, và 150/150 μ g của norovirut GI.1 và GII.4 tương ứng. Các đối tượng trong mỗi nhóm dùng liều được lấy ngẫu nhiên 5:1 để nhận vaccin hoặc giả dược. Các đối tượng trong nhóm dùng liều A1 nhận điều trị được lấy ngẫu nhiên tương ứng của chúng (10 đối tượng nhận vaccin 5/5 μ g và 2 đối tượng nhận giả dược). Tiếp theo là đánh giá tính an toàn cho các đối tượng bằng cách xem lại các triệu chứng được ghi lại trên phần hỗ trợ nhớ (các ngày từ 0 đến 7) và tiền sử bệnh tạm thời từ các lần thăm bệnh vào các ngày 7, 21, 28, 35, và 56. Xem xét lại dữ liệu an toàn qua bộ kiểm tra tính an toàn trung tâm (CSM). 7 ngày sau khi dùng liều 2 (ngày nghiên cứu 35) dữ liệu an toàn là có để xem lại từ các đối tượng trong nhóm dùng liều A1 và được xem là chấp nhận được, các đối tượng trong nhóm dùng liều A2 là thích hợp để nhận liều khởi đầu của họ. Cùng quy tắc áp dụng đối với liều dùng trong các nhóm dùng liều tiếp theo; cụ thể, 7 ngày sau khi dùng liều 2 (ngày nghiên cứu 35) dữ liệu an toàn là có để xem lại từ nhóm dùng liều, nhóm dùng liều tiếp theo là thích hợp để nhận liều khởi đầu của họ.

Ở cuối giai đoạn thử nghiệm trong Nhóm nghiên cứu A, khoảng 10 đối tượng trong mỗi nhóm dùng liều nhận vaccin (tổng là 40 vaccin) và 2 đối tượng trong mỗi nhóm nhận nước muối (tổng là khoảng 8 đối tượng đối chứng nhận nước muối).

Các đối tượng duy trì trợ giúp nhớ hàng ngày có các triệu chứng kéo dài bao gồm 4 phản ứng phụ tiêm khu trú, như là đau, yếu, đỏ, và sưng, và 10 dấu hiệu hoặc triệu chứng toàn thân bao gồm nhiệt độ miệng hàng ngày, đau đầu, mệt, đau cơ, ớn lạnh, đau khớp và triệu chứng ở dạ dày ruột là nôn mửa, nôn, tiêu chảy, cứng cơ/đau ở bụng đối với các ngày 0 đến 7 sau mỗi liều vaccin VLP Norovirut nhị giá dùng trong cơ hoặc kiểm soát. Hiện tượng đỏ và sưng ở vị trí tiêm được đo và được ghi lại hàng ngày trong 7 ngày sau mỗi lần tiêm.

Tiền sử bệnh tạm thời thu được ở mỗi lần thăm khám sau đó vào các ngày 7+3, 21+3, 28+3, 35+3, 56+7, 180+14, và 393+14 và ở cuộc gọi điện thoại tiếp sau vào các ngày 265+14; các đối tượng được hỏi về chứng bệnh tạm thời, thăm bệnh của bác sĩ, tác dụng phụ trầm trọng bất kỳ (SAE), và sự khởi phát các tình trạng bệnh mới rõ rệt. Các đối tượng có CBC với WBC khác nhau và số lượng tiểu cầu, và BUN huyết thanh, creatinin, glucoza, AST, và ALT được đánh giá khi sàng lọc và vào các ngày 21 và 35

(khoảng 7 ngày sau mỗi liều) để đánh giá tính thích hợp tiếp tục và tính an toàn, tương ứng.

Máu từ các đối tượng được gom trước khi dùng vacxin vào ngày 0 và vào các ngày 7+3, 21+3, 28+3, 35+3, 56+7, 180+14, và 393 +14 để đo kháng thể huyết thanh (IgG, IgA, và IgM riêng rẽ và kết hợp) cho Vacxin VLP Norovirut nhị giá dùng trong cơ bằng các thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA). Hoạt tính phong bế hydrat cacbon huyết thanh và các kháng thể HAI huyết thanh cũng được đo. Đối với các đối tượng trong Nhóm nghiên cứu A, tế bào tiết kháng thể (ASC), các gen đánh dấu định cư, tế bào B ghi nhớ và đáp ứng miễn dịch tế bào được thử nghiệm.

Các phương pháp dưới đây được sử dụng để phân tích các mẫu máu được gom từ các cá thể được gây miễn dịch hoặc các cá thể nhận giả được.

Đo kháng thể huyết thanh bằng thử nghiệm ELISA

Việc đo các kháng thể đến norovirut bằng thử nghiệm ELISA được tiến hành đối với tất cả các đối tượng, sử dụng VLP Norovirut tái tổ hợp được tinh chế (GI.1 và GII.4 riêng rẽ) làm các kháng nguyên đích để sàng lọc các mẫu được mã hóa. Cụ thể là, VLP Norovirut trong chất đệm phủ cacbonat có độ pH bằng 9,6 được sử dụng để phủ các đĩa vi chuẩn độ. Rửa, phong bế, và ủ các đĩa được phủ bằng các dung dịch đã được pha loãng 2 lần theo dãy của huyết thanh thử nghiệm tiếp theo là rửa và ủ với chất phản ứng kháng thể thứ cấp kết hợp enzym đặc hiệu đối với tổng IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA và IgM ở người. Các dung dịch cơ chất thích đáng được bổ sung, màu được hiện, các đĩa được đọc và các hiệu giá IgG, IgA và IgM điểm cuối được xác định khi so sánh với đường cong chuẩn so sánh đối với mỗi nhóm kháng thể. Hiệu giá trung bình nhân (GMT), số lần tăng hiệu giá trung bình nhân (GMFR) và tốc độ đáp ứng huyết thanh đối với mỗi nhóm được xác định. Đáp ứng huyết thanh được xác định là tăng 4 lần hiệu giá kháng thể so với hiệu giá trước khi được tạo miễn dịch.

Hoạt tính phong bế của các kháng nguyên nhóm máu Histo hydrat cacbon (HBGA) Norovirut

Các thử nghiệm phong bế để đo khả năng của kháng thể huyết thanh ức chế NV VLP gắn kết với hydrat cacbon tổng hợp H tip 1 hoặc H tip 3 được tiến hành như được mô tả trên đây (Reeck et al. (2010) J Infect Dis, Vol. 202(8):1212-1218). Cụ thể là, NV VLP đối với các thử nghiệm phong bế được ủ với thể tích tương đương của huyết

thanh, và được pha loãng hai lần theo dãy từ dung dịch pha loãng ban đầu là 1:25. Rửa các đĩa vi chuẩn độ 96 giếng được phủ Neutravidin và phủ bằng 2,5 µg/mL polyvalent H tổng hợp tip 1-PAA-biotin hoặc polyvalent H tip 3-PAA-biotin. Bổ sung các dung dịch VLP huyết thanh. Rửa các đĩa và huyết thanh thô đa dòng đặc hiệu với NV VLP được bổ sung, rửa, và tiếp theo là ủ với IgG dê kháng thô liên hợp peroxidaza cải ngựa. Màu được phát triển với cơ chất tetramethylbenzidin peroxidaza dạng lỏng và được dừng bằng 1M axit phosphoric. Mật độ quang học được đo ở 450. Đối chứng dương tính và đối chứng âm tính được tiến hành. 50% hiệu giá phong bế (BT50) được xác định, và chỉ định làm hiệu giá ở đó OD được đọc (sau khi bỏ đi phần trống) là 50% đối chứng dương tính. Hiệu giá bằng 12,5 được chỉ định cho các mẫu với BT50 ít hơn 25. Xác định hiệu giá trung bình nhân (GMT), số lần tăng hiệu giá trung bình nhân (GMFR) và tốc độ đáp ứng huyết thanh đối với mỗi nhóm. Đáp ứng huyết thanh được xác định là tăng 4 lần hiệu giá kháng thể so với hiệu giá trước khi được tạo miễn dịch. Mẫu huyết thanh kiểm soát phong bế được sử dụng làm đối chứng nội. Thử nghiệm để khẳng định đặc hiệu phong bế được tiến hành nhờ sử dụng cùng quy trình đối với thử nghiệm phong bế với các ngoại lệ dưới đây: sau khi phủ bằng hydrat cacbon, huyết thanh được ủ trực tiếp trên đĩa không có ủ sơ bộ đầu tiên với VLP. Sau khi rửa, VLP được ủ trên đĩa và được xác định như đối với thử nghiệm phong bế.

Thử nghiệm ức chế của kháng thể trong việc ngưng kết hồng cầu (HAI) bởi Norovirus

Các kháng thể được tạo ra nhờ vacxin được thử nghiệm về khả năng ức chế ngưng kết hồng cầu RBC dạng O ở người bằng VLP Norovirus như được mô tả trên đây (El Kamary et al. (2010) J Infect Dis, Vol. 202(11): 1649-58). Các hiệu giá HAI được tính như sự đảo ngược của pha loãng cao nhất mà ức chế ngưng kết hồng cầu với mẫu RBC âm tính được nén và được thể hiện làm GMT, GMFR và tăng ≥ 4 lần.

Norovirus GI.1 và VLP GII.4 được pha loãng theo dãy riêng rẽ và được ủ với thể tích tương đương của 0,5% huyền phù RBC ở người trong đĩa đáy chữ V 96 giếng. Lượng các kháng nguyên VLP Norovirus tương ứng với 4 đơn vị HA được xác định và khẳng định bằng chuẩn độ ngược. Huyết thanh thử nghiệm được làm bất hoạt bằng nhiệt ở 56°C trong 30 phút và được xử lý với huyền phù Kaolin 25% mới được tạo. Để loại bỏ các tác nhân ức chế huyết thanh, các mẫu thử nghiệm được hấp phụ sơ bộ với RBC. Thử nghiệm HAI được tiến hành như sau: huyết thanh được xử lý sơ bộ (được pha loãng 2 lần trong PBS có độ pH bằng 5,5) được bổ sung vào các đĩa V 96 giếng và

được ủ với thể tích tương đương của kháng nguyên Norovirut GI.1 và VLP GII.4, tương ứng, chứa 4 đơn vị HA. Huyền phù chứa 0,5% RBC được bổ sung vào mỗi giếng và các đĩa được ủ trong 90 phút nữa ở 4°C. Các giếng chỉ chứa PBS hoặc kháng nguyên không có huyết thanh được dùng làm đối chứng âm tính và đối chứng dương tính, tương ứng. Hiệu giá trung bình nhân (GMT), số lần tăng hiệu giá trung bình nhân (GMFR) và tốc độ đáp ứng huyết thanh đối với mỗi nhóm được xác định. Đáp ứng huyết thanh được xác định là tăng 4 lần hiệu giá kháng thể so với hiệu giá trước khi được tạo miễn dịch.

Thử nghiệm tế bào tiết kháng thể

PBMC được phân lập từ khoảng 60 mL máu đã được chống đông vào các ngày 0, 7+3, 28+3, và 35+3 sau khi dùng Vacxin VLP Norovirut nhị giá dùng trong cơ hoặc giả được. Thu được khoảng 25mL máu đối với các thử nghiệm PBMC mới và 35mL máu đối với bảo quản lạnh của PBMC. Các thử nghiệm ASC xác định các tế bào tiết kháng thể đến VLP Norovirut (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). PBMC mới được đánh giá đối với tần số ASC và xác định các gen đánh dấu định cư từ tập hợp phụ của các đối tượng. Được bảo quản lạnh PBMC từ các đối tượng tham gia trong Nhóm nghiên cứu A được đánh giá đối với tần số ASC. Tốc độ và phương tiện đáp ứng số lượng ASC trên 10^6 PBMC ở mỗi thời điểm đối với mỗi nhóm được mô tả. Đáp ứng dương tính được xác định làm kết quả đếm ASC sau vacxin trên 10^6 PBMC cụ thể ít nhất 3 độ lệch chuẩn (SD) cao hơn hiệu giá trung bình trước khi dùng vacxin được đếm đối với tất cả các đối tượng (trong log hệ mét) và ít nhất 8 vết ASC, mà tương ứng với hiệu giá trung bình của các giếng đối chứng âm tính được kích thích bởi môi trường (2 vết) cộng 3 SD như được xác định trong các thử nghiệm tương tự.

Đo các tế bào B ghi nhớ đặc hiệu với Norovirut

Máu đã được chống đông được gom đối với các đối tượng chỉ trong Nhóm nghiên cứu A (khoảng 25 mL vào các ngày 0, 28, 56 và 180) để đo tế bào B ghi nhớ vào các ngày 0, 28, 56 và 180 sau khi vacxin sử dụng thử nghiệm ELISpot mà trước đó đã tiến hành kích thích kháng nguyên *in vitro* (Crotty et al. (2004) J. Immunol. Methods, Vol. 286:111-122.; Li et al. (2006) J. Immunol. Methods, Vol. 313:110-118). Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (5×10^6 tế bào/mL, 1mL/giếng trong các đĩa 24 giếng) được ủ trong 4 ngày với các kháng nguyên VLP Norovirut GI.1 và GII.4 riêng rẽ để

cho phép mở rộng nhân dòng tế bào B ghi nhớ đặc hiệu kháng nguyên và phân hóa thành tế bào tiết kháng thể. Các mẫu đối chứng bao gồm tế bào được ủ trong cùng các điều kiện không có mặt kháng nguyên và/hoặc các tế bào được ủ với kháng nguyên không liên quan. Theo sau kích thích, rửa, đếm, và chuyển các tế bào vào các đĩa ELISpot được phủ bằng Norwalk VLP. Để xác định tần số của các tế bào B ghi nhớ đặc hiệu virus trên tổng tế bào lympho B tiết Ig, tế bào B lan rộng cũng được bổ sung vào các giếng được phủ bằng các kháng thể IgG kháng người và IgA kháng người. Các kháng thể liên kết được khám phá ra với IgG kháng người hoặc IgA kháng người được đánh dấu HRP tiếp theo là cơ chất thích đáng. Liên hợp vào các nhóm phụ IgA và IgG (IgA1, IgA2 và IgG1-4) còn được sử dụng để xác định các đáp ứng nhóm phụ đặc hiệu kháng nguyên mà có thể liên quan với cơ chế hiệu quả riêng biệt và các vị trí miễn dịch. Đếm các vết bằng thiết bị đọc ELISpot. Quần thể tế bào lan rộng đối với mỗi đối tượng được thử nghiệm bằng cách đếm dòng tế bào để khẳng định phenotyp tế bào B ghi nhớ của chúng, nghĩa là CD19+, CD27+, IgG+, IgM+, CD38+, IgD, trong số các dạng khác (Crotty et al. (2004) J. Immunol. Methods, Vol. 286:111-122.; Li et al. (2006) J. Immunol. Methods, Vol. 313:110-118).

Đáp ứng miễn dịch tế bào

Máu đã được chống đông (khoảng 25 mL vào các ngày 0, 28, 56, và 180) từ các đối tượng trong Nhóm nghiên cứu A được gom làm các mẫu được mã hóa và PBMC được phân lập và được bảo quản lạnh trong nitơ lỏng để đánh giá sau đó có thể về các đáp ứng CMI đến các kháng nguyên VLP Norovirus GI.1 và GII.4. Các thử nghiệm mà được tiến hành bao gồm các đáp ứng tăng sinh PBMC và các đáp ứng cytokin đến các kháng nguyên VLP Norovirus GI.1 và GII.4 bằng cách đo các mức interferon (IFN)- γ và interleukin (IL)-4 trong số các dạng khác theo các kỹ thuật được thiết lập (Samandari et al. (2000) J. Immunol., Vol. 164:2221-2232; Tacket et al. (2003) Clin. Immunol., Vol. 108:241-247). Các đáp ứng tế bào T cũng được đánh giá.

Kết quả

Đánh giá tính an toàn bao gồm các triệu chứng kéo dài khu trú và toàn thân trong 7 ngày và các triệu chứng không kéo dài trong 28 ngày sau mỗi liều. Tác dụng phụ trầm trọng quan sát được trong 12 tháng. Khả năng tạo miễn dịch được đánh giá với huyết thanh thu được trước và sau mỗi vacxin đối với các kháng thể Pan-ELISA (IgG, IgA và IgM kết hợp) và tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) đối với tế bào tiết kháng thể (ASC) IgG và IgA nhờ ELISpot.

Tất cả 4 nhóm dùng liều được xếp đối với Nhóm nghiên cứu A với 2 dữ liệu an toàn sau liều sẵn có từ tất cả 4 nhóm dùng liều (tổng 40 vaccin). Trong số 40 vaccin, đau hoặc yếu là triệu chứng khu trú phổ biến nhất được báo cáo sau khi dùng hoặc là khi dùng liều, trong khi triệu chứng sung hoặc đỏ là không thường xuyên. Không có triệu chứng khu trú trầm trọng được báo cáo. Triệu chứng toàn thân như đau đầu, đau cơ, hoặc khó chịu sau khi dùng hoặc là khi dùng liều được báo cáo bởi ít hơn một nửa vaccin. Không có vaccin được báo cáo là gây sốt. Không có SAE liên quan được báo cáo.

Như được thể hiện trên các hình vẽ từ FIG.1 đến FIG.3, các đáp ứng kháng thể Pan-ELISA trí nhớ mạnh (kết hợp IgG, IgA, và IgM) quan sát được ở cả các kháng nguyên VLP 7 ngày sau khi dùng liều thứ nhất của phân liều thấp nhất (các VLP 5 μ g GI.1 + 5 μ g GII.4). Liều thứ hai không cho đáp ứng sau liều mạnh. Các kết quả tương tự quan sát được đối với kháng nguyên đặc hiệu huyết thanh IgG và đáp ứng huyết thanh IgA được đo riêng rẽ (các hình vẽ từ FIG.4 đến FIG.9). Các đáp ứng phụ thuộc liều quan sát được đối với các đáp ứng kháng thể đến cả hai kháng nguyên (các hình vẽ từ FIG.1 đến FIG.9). Tuy nhiên, đáp ứng tối đa đến GI.1 VLP xuất hiện để đạt được liều thấp hơn so với đáp ứng tối đa đến VLP GII.4 (15 μ g đối lại 50 μ g). Ngạc nhiên là, một liều duy nhất vaccin Norovirut nhị giá dùng trong cơ tạo ra hiệu giá kháng thể đặc hiệu kháng nguyên ngạc nhiên là lớn hơn rõ rệt so với hiệu giá được tạo ra bởi hai liều dùng vaccin VLP đơn giá được dùng trong mũi bao gồm liều VLP cao hơn 20 lần (FIG.10; so sánh nhóm LV03-104 5 μ g với nhóm LV01-103 100 μ g). Hơn nữa, liều thấp (5 μ g), vaccin Norovirut nhị giá dùng trong cơ tạo ra hiệu giá kháng thể đặc hiệu với Norovirut tương tự với khi được tạo ra ở người được phơi nhiễm với Norovirut tự nhiên (FIG.10).

Các đáp ứng IgG và IgA ELISpot mạnh còn quan sát được ở ngày 7 sau liều thứ nhất của phân liều thấp nhất (5 μ g) đối với cả hai kháng nguyên VLP (Bảng 2). Đặc biệt, đáp ứng tế bào tiết kháng thể (ASC) thiên về IgA đối lại IgG và ASC thể hiện định cư niêm mạc (alpha 4/beta7) và phenotyp thụ thể hóa động (CCR10) như được đánh giá bằng cách đếm dòng tế bào (FIG.11; Bảng 3). Như được thể hiện trong Bảng 3, số lượng ASC lớn hơn thể hiện các gen đánh dấu định cư niêm mạc (beta 7+, CD62L-) so với các gen đánh dấu định cư đối ngẫu niêm mạc/ngoại vi (beta 7+, CD62L+). Bảng 4 thể hiện tỷ lệ phần trăm của các tế bào B ghi nhớ trên 10^6 bạch cầu đơn nhân to máu ngoại vi mà đáp ứng với các kháng nguyên VLP. Tỷ lệ phần trăm lớn của tế bào B ghi nhớ đặc hiệu kháng nguyên còn biểu hiện các gen đánh dấu định cư

niêm mạc so với đối ngẫu niêm mạc/ngoại vi hoặc các gen đánh dấu định cư ngoại vi. Đáp ứng tương tự còn quan sát được ở người nhận liều 15 μ g và 50 μ g (các Bảng từ 2 đến 4).

Bảng 2. Ngày 7, đặc tính đáp ứng PBMC. Số tế bào tiết kháng thể xấp xỉ (ASC)/triệu CD19+ tế bào.

	ASC/triệu CD19+ tế bào - Ngày 7				Phần trăm đáp ứng vaccin		Vaccin đặc hiệu
Tế bào B đặc hiệu với Norovirut	IgA GI.1	IgG GI.1	IgA GII.4	IgG GII.4	Đặc hiệu với GI.1	Đặc hiệu với GII.4	Phần trăm của tổng PBMC tuần hoàn
Hiệu giá trung bình nhân liều A1 5 μ g (n=5)	30947	13807	10947	3945	4,48%	1,49%	5,96%
Độ lệch chuẩn liều A1 5 μ g	6674	9780	3651	2261			
Hiệu giá trung bình nhân liều A2 15 μ g (n=4)	25296	17004	7108	4336	4,23%	1,14%	5,37%
Độ lệch chuẩn liều A2 15 μ g	10846	18770	6055	5697			
Hiệu giá trung bình nhân liều A3 50 μ g (n=4)	36158	20572	14103	2549	5,67%	1,67%	7,34%
Độ lệch chuẩn liều A3 50 μ g	11470	418	7627	2230			
Hiệu giá trung bình nhân liều A4 150 μ g (n=4)	34183	9566	26213	11310	4,37%	3,75%	8,13%
Độ lệch chuẩn liều A4 150 μ g	32938	4466	89769	15226			
Giả dược (n=2)	0	152	0	108	0,02%	0,01%	0,03%

Bảng 3. Các gen đánh dấu ASC ở người nhận vắc xin và người nhận giả được bằng cách đếm dòng tế bào-Ngày 7

	% của tổng CD19+ tế bào B mà là CD27+ & CD38+	% của tổng CD27+, CD38+, CCR10+ Beta 7+, CD62L-	% của tổng CD27+, CD38+, CCR10+ Beta 7+, CD62L+	Phần trăm của tổng ASC CD27+, CD38+, CCR10+, Beta 7+ CD62L (+)&(-)	Vắc xin đặc hiệu của tổng trên một triệu tế bào* CD27+, CD38+, CCR10+, Beta 7+ CD62L (+)&(-)	Vắc xin đặc hiệu Phần trăm tổng* PBMC tuần hoàn định cư niêm mạc
Hiệu giá trung bình nhân liệu A1 5µg (n=5)	25,10%	6,86%	1,06%	2,78%	1656	0,17%
Độ lệch chuẩn liệu A1 5µg	10,45	3,13	1,01			
Hiệu giá trung bình nhân liệu A2 15µg (n=4)	12,99%	16,98%	2,43%	4,63%	1355	0,14%
Độ lệch chuẩn liệu A2 15µg	9,13	1,56	0,23			
Hiệu giá trung bình nhân liệu A3 50µg (n=4)	31,71%	26,43%	3,63%	12,01%	23915	2,39%
Độ lệch chuẩn liệu 50µg	6,32	1,82	1,38			
Hiệu giá trung bình nhân liệu A4 150µg (n=4)	33,46%	30,06%	5,68%	15,74%	31350	3,14%
Độ lệch chuẩn liệu A4 150µg	9,86	2,97	1,70			
Giá được (n=2)	1,26%	22,00%	0,87%	1,20%	5	0,001%

* Giả sử rằng phần lớn ASC là Norovirut đặc hiệu.

Bảng 4. Đáp ứng tế bào B ghi nhớ ở người nhận vắc xin và người nhận giả được vào ngày 7

	% của tổng CD19+ tế bào B mà là CD27+, CD38+, CCR10+ Beta 7+, CD62L+	% của tổng CD27+, CD38+, CD138+, CCR10+ Beta 7+, CD62L+	% của tổng CD27+, CD38+, CD138+, CCR10+ Beta 7+, CD62L+	Phân trăm của tổng Ghi nhớ CD27+, CD38+, CD138+, CCR10+, Beta 7+ CD62L (+)&(-)	Vắc xin đặc hiệu Tổng trên triệu tế bào* CD27+, CD38+, CD138+, CCR10+, Beta 7+ CD62L (+)&(-)	Vắc xin đặc hiệu Phần trăm tổng* PBMC tuần hoàn định cư niêm mạc
Hiệu giá trung bình nhân liều A1 5µg	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Hiệu giá trung bình nhân liều A2 15µg (n=4)	1,54%	11,58%	1,92%	0,21%	61	0,01%
Độ lệch chuẩn liều A2 15µg	1,54	3,94	0,94			
Hiệu giá trung bình nhân liều A3 50µg (n=4)	3,31%	16,10%	4,60%	0,68%	1364	0,14%
Độ lệch chuẩn liều A3 50µg	1,11	2,16	0,97			
Hiệu giá trung bình nhân liều A4 150µg (n=4)	1,56%	16,90%	8,10%	0,39%	778	0,08%
Độ lệch chuẩn liều A4 150µg	0,22	3,26	4,57			
Giá được (n=1)	0,10%	12,50%	0,00%	0,01%	0	0%

* Giá sử rằng phần lớn ASC là Norovirut đặc hiệu.

* N/D: không phát hiện được

Khi không có thử nghiệm trung hòa virus trực tiếp sẵn có do không có khả năng nuôi cấy Norovirus *in vitro*, các thử nghiệm chức năng được dùng để thay thế đối với các thử nghiệm trung hòa virus được tiến hành để đo các kháng thể chức năng trong vaccin.

Sử dụng thử nghiệm hoạt tính phong bế kháng nguyên hydrat cacbon H được mô tả trên đây, để đo ức chế liên kết VLP GI.1 vào kháng nguyên H qua trung gian là kháng thể huyết thanh được tạo ra nhờ vaccin. Dữ liệu được thể hiện làm số lần tăng hiệu giá trung bình nhân (geometric mean fold rise- GMFR) và đáp ứng huyết thanh (tăng 4 lần) trong Bảng 5, và là hiệu giá trung bình nhân (geometric mean titer - GMT) trong Bảng 6. Ngạc nhiên là, sau chỉ một lần tiêm chế phẩm vaccin trong cơ, hoạt tính phong bế hydrat cacbon rõ rệt quan sát được trong tất cả các nhóm dùng liều; thực tế, việc dùng liều thứ hai của vaccin không làm tăng rõ rệt hoạt tính phong bế so với các mức sau liều 1. Việc ức chế hoạt tính liên kết được duy trì qua toàn bộ giai đoạn thử nghiệm, lên đến 56 ngày sau khi dùng liều 1.

Bảng 5. Hoạt tính phong bế hydrat cacbon (HBGA BT50), số lần tăng hiệu giá trung bình nhân GI.1 kháng Norovirut (GMFR) và đáp ứng huyết thanh (tăng 4 lần)

Ngày nghiên cứu															
	7 ngày sau khi dùng liều 1			21 ngày sau khi dùng liều 1			28 ngày sau khi dùng liều 1 (Trước khi dùng liều 2)			7 ngày sau khi dùng liều 2 (35 ngày sau khi dùng liều 1)			28 ngày sau khi dùng liều 2 (56 ngày sau khi dùng liều 1)		
Nhóm điều trị	N	GMFR (95% CI)	tăng 4 lần (95% CI)	N	GMFR (95% CI)	tăng 4 lần (95% CI)	N	GMFR (95% CI)	tăng 4 lần (95% CI)	N	GMFR (95% CI)	tăng 4 lần (95% CI)	N	GMFR (95% CI)	tăng 4 lần (95% CI)
vacxin VLP 5/5 mcg	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)
vacxin VLP 15/15 mcg	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)
vacxin VLP 50/50 mcg	10	38,6 (18,3, 81,6)	100,0 (69,2, 100,0)	10	27,9 (13,4, 58)	100,0 (69,2, 100,0)	10	20,9 (10, 43,5)	100,0 (69,2, 100,0)	10	19 (9,9, 36,4)	100,0 (69,2, 100,0)	9	10,2 (4,6, 22,8)	77,8 (40,0, 97,2)
vacxin VLP 150/150 mcg	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)
Già được	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)

Các kết quả dựa trên tất cả các đối tượng nhận cả hai liều của sản phẩm nghiên cứu.

Hai điểm dữ liệu của đối tượng bị loại trừ do khả năng bị lẫn giữa các mẫu; một trong các điểm dữ liệu này là mẫu đường cơ sở tạo ra đối tượng không có dữ liệu về số lần tăng đối với thời điểm bất kỳ.

Bảng 6. Hoạt tính phong bế hydrat cacbon (HBGA BT50), hiệu giá trung bình nhân GI.1 kháng Norovirut (GMT)

	Ngày nghiên cứu											
	Trước khi dùng liều 1		7 ngày sau khi dùng liều 1		21 ngày sau khi dùng liều 1		28 ngày sau khi dùng liều 1 (Trước khi dùng liều 2)		7 ngày sau khi dùng liều 2 (35 ngày sau khi dùng liều 1)		28 ngày sau khi dùng liều 2 (56 ngày sau khi dùng liều 1)	
Nhóm điều trị	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)
vacxin VLP 5/5 mcg	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)
vacxin VLP 15/15 mcg	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)
vacxin VLP 50/50 mcg	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)
vacxin VLP 150/150 mcg	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)
Giả dược	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)

Các kết quả dựa trên tất cả các đối tượng nhận cả hai liều của sản phẩm nghiên cứu.

Hai điểm dữ liệu của đối tượng bị loại trừ do khả năng bị lẫn giữa các mẫu.

Tương tự, hoạt tính phong bế hydrat cacbon của kháng thể huyết thanh kháng lại VLP GII.4 được đo. Đáp ứng rõ rệt quan sát được trong tất cả các nhóm dùng liều như được đo bởi GMFR và đáp ứng huyết thanh (Bảng 7) cũng như GMT (Bảng 8). Tương tự với phong bế liên kết GI.1 qua trung gian là kháng thể được mô tả trên đây, phong bế mạnh hoạt tính liên kết hydrat cacbon VLP GII.4 được xác định chỉ sau một liều, và liều thứ hai không xuất hiện sự cải thiện hoạt tính phong bế.

Bảng 7. Hoạt tính phong bế hydrat cacbon (HBGA BT50), số lần tăng hiệu giá trung bình nhân GII.4 kháng Norovirut (GMFR) và đáp ứng huyết thanh (tăng 4 lần)

	Ngày nghiên cứu														
	7 ngày sau khi dùng liều 1			21 ngày sau khi dùng liều 1			28 ngày sau khi dùng liều 1 (Trước khi dùng liều 2)			7 ngày sau khi dùng liều 2 (35 ngày sau khi dùng liều 1)			28 ngày sau khi dùng liều 2 (56 ngày sau khi dùng liều 1)		
Nhóm điều trị	N	GMF R (95% CI)	tăng 4 lần (95% CI)	N	GMF R (95% CI)	tăng 4 lần (95% CI)	N	GMF R (95% CI)	tăng 4 lần (95% CI)	N	GMFR (95% CI)	tăng 4 lần (95% CI)	N	GMF R (95% CI)	tăng 4 lần (95% CI)
Vacxin VLP 5/5 mcg	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)
Vacxin VLP 15/15 mcg	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)
Vacxin VLP 50/50 mcg	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)
Vacxin VLP 150/150 mcg	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)
Giả dược	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)

Các kết quả dựa trên tất cả các đối tượng nhận cả hai liều của sản phẩm nghiên cứu.

Hai điểm dữ liệu của đối tượng bị loại trừ do khả năng bị lẫn giữa các mẫu; một trong các điểm dữ liệu này là mẫu đường cơ sở tạo ra đối tượng không có dữ liệu về số lần tăng đối với thời điểm bất kỳ.

Bảng 8. Hoạt tính phong bế hydrat cacbon (HBGA BT50), hiệu giá trung bình nhân GII.4 kháng Norovirut (GMT)

	Ngày nghiên cứu											
	Trước khi dùng liều 1		7 ngày sau khi dùng liều 1		21 ngày sau khi dùng liều 1		28 ngày sau khi dùng liều 1 (Trước khi dùng liều 2)		7 ngày sau khi dùng liều 2 (35 ngày sau khi dùng liều 1)		28 ngày sau khi dùng liều 2 (56 ngày sau khi dùng liều 1)	
Nhóm điều trị	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)
vacxin VLP 5/5 mcg	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)

	Ngày nghiên cứu											
	Trước khi dùng liều 1		7 ngày sau khi dùng liều 1		21 ngày sau khi dùng liều 1		28 ngày sau khi dùng liều 1 (Trước khi dùng liều 2)		7 ngày sau khi dùng liều 2 (35 ngày sau khi dùng liều 1)		28 ngày sau khi dùng liều 2 (56 ngày sau khi dùng liều 1)	
Nhóm điều trị	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)
vacxin VLP 15/15 mcg	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)
vacxin VLP 50/50 mcg	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)
vacxin VLP 150/150 mcg	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)
Giả dược	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)

Các kết quả dựa trên tất cả các đối tượng nhận cả hai liều của sản phẩm nghiên cứu.

Hai điểm dữ liệu của đối tượng bị loại trừ do khả năng bị lẫn giữa các mẫu.

Thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu (HAI) còn được sử dụng cho thử nghiệm đáp ứng của kháng thể huyết thanh từ các đối tượng được dùng vacxin kháng lại các kháng nguyên đích VLP Norovirut. Tương tự với các nghiên cứu liên kết kháng nguyên hydrat cacbon H, chỉ một liều vacxin VLP tạo ra các kháng thể có tác dụng ức chế ngưng kết hồng cầu trong tất cả các nhóm dùng liều, như được đo bởi GMFR (Bảng 9), tăng 4 lần (Bảng 9), và GMT (Bảng 10). Mặc dù mức ức chế ngưng kết hồng cầu được duy trì đến ngày cuối cùng được thử nghiệm (28 ngày sau khi dùng liều 2, 56 ngày sau khi dùng liều 1), liều vacxin VLP thứ hai không xuất hiện sự cải thiện mức độ ức chế ngưng kết hồng cầu do kháng thể được tạo ra bởi vacxin.

Bảng 9. Thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu, với số lần tăng hiệu giá trung bình nhân GI.1 kháng Norovirut (GMFR) và đáp ứng huyết thanh (tăng 4 lần)

Nhóm điều trị	Ngày nghiên cứu											
	7 ngày sau khi dùng liều 1			21 ngày sau khi dùng liều 1			28 ngày sau khi dùng liều 1 (Trước khi dùng liều 2)			7 ngày sau khi dùng liều 2 (35 ngày sau khi dùng liều 1)		
	N	GMFR (95% CI)	tăng 4 lần (95% CI)	N	GMFR (95% CI)	tăng 4 lần (95% CI)	N	GMFR (95% CI)	tăng 4 lần (95% CI)	N	GMFR (95% CI)	tăng 4 lần (95% CI)
vaccin VLP 5/5 mcg	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)
vaccin VLP 15/15 mcg	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)
vaccin VLP 50/50 mcg	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)	1	14,5 (9,3, 22,7)	100,0 (69,2, 100,0)
vaccin VLP 150/150 mcg	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)
Giả dược	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)

Các kết quả dựa trên tất cả các đối tượng nhận cả hai liều của sản phẩm nghiên cứu.

Hai điểm dữ liệu của đối tượng bị loại trừ do khả năng bị lẫn giữa các mẫu; một trong các điểm dữ liệu này là mẫu đường cơ sở tạo ra đối tượng không có dữ liệu về số lần tăng đối với thời điểm bất kỳ.

Bảng 10. Thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu, cho hiệu giá trung bình nhân GI.1 kháng Norovirut (GMT)

	Ngày nghiên cứu											
	Trước khi dùng liều 1		7 ngày sau khi dùng liều 1		21 ngày sau khi dùng liều 1		28 ngày sau khi dùng liều 1 (Trước khi dùng liều 2)		7 ngày sau khi dùng liều 2 (35 ngày sau khi dùng liều 1)		28 ngày sau khi dùng liều 2 (56 ngày sau khi dùng liều 1)	
Nhóm điều trị	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)
vacxin VLP 5/5 mcg	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)
vacxin VLP 15/15 mcg	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)
vacxin VLP 50/50 mcg	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)
vacxin VLP 150/150 mcg	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)
Giả dược	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)

Các kết quả dựa trên tất cả các đối tượng nhận cả hai liều của sản phẩm nghiên cứu.

Hai điểm dữ liệu của đối tượng bị loại trừ do khả năng bị lẫn giữa các mẫu.

Còn có thể đạt được ức chế ngưng kết hồng cầu khi VLP đích là virus không ghép đôi được. Kháng thể huyết thanh được tạo ra nhờ vacxin mà ức chế ngưng kết hồng cầu bằng chủng virus VLP Houston, như được đo bởi GMFR và đáp ứng huyết thanh (Bảng 11) cũng như GMT (Bảng 12). Trong trường hợp này, các liều vacxin VLP cao hơn tạo cho các đáp ứng mạnh hơn, cụ thể là như được đo bởi việc tăng 4 lần hoặc GMT. GMFR và tăng 4 lần còn được tăng rõ rệt khi VLP đích là chủng virus 2003 Cincinnati, như được đo chỉ 7 ngày sau khi dùng liều 1 (Bảng 13).

Bảng 12. Thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu (chủng virus VLP Houston), với hiệu giá trung bình nhân GII.4 kháng Norovirus (GMT)

	Ngày nghiên cứu											
	Trước khi dùng liều 1		7 ngày sau khi dùng liều 1		21 ngày sau khi dùng liều 1		28 ngày sau khi dùng liều 1 (Trước khi dùng liều 2)		7 ngày sau khi dùng liều 2 (35 ngày sau khi dùng liều 1)		28 ngày sau khi dùng liều 2 (56 ngày sau khi dùng liều 1)	
Nhóm điều trị	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)	N	GMT (95% CI)
vacxin VLP 5/5 mcg	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)
vacxin VLP 15/15 mcg	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)
vacxin VLP 50/50 mcg	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)
vacxin VLP 150/150 mcg	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)
Giả dược	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)

Các kết quả dựa trên tất cả các đối tượng nhận cả hai liều của sản phẩm nghiên cứu.

Hai điểm dữ liệu của đối tượng bị loại trừ do khả năng bị lẫn giữa các mẫu.

Bảng 13. Mức độ ức chế ngưng kết hồng cầu ở giả dược so với ở vacxin VLP 50/50µg

Thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu (chủng virus VLP 2003 Cincinnati), số lần tăng hiệu giá trung bình nhân GII.4 kháng Norovirus (GMFR) và đáp ứng huyết thanh trung bình nhân hiệu quả (tăng 4 lần)			
Các kết quả đối với nhóm điều trị 7 ngày sau khi dùng liều 1			
Nhóm điều trị	N	GMFR (95% CI)	tăng 4 lần (95% CI)
Giả dược	2	1,0 (0,6, 1,8)	0,0 (0,0, 84,2)
Vacxin VLP 50/50µg	10	4,4 (1,6, 11,9)	50,0 (18,7, 81,3)

Các kết quả từ nghiên cứu này chứng tỏ rằng vacxin VLP Norovirus nhĩ giá dùng trong cơ thường dung nạp tốt. Dữ liệu về khả năng tạo miễn dịch đề xuất rằng liều

vacxin đơn có thể là đủ để bảo vệ người trưởng thành có huyết thanh dương tính. Các kết quả từ hoạt tính phong bế hydrat cacbon và thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu đề xuất bằng chứng khác nữa rằng liều vacxin đơn tạo ra kháng thể huyết thanh với hoạt tính kháng Norovirut tiềm năng. Độ mạnh và độ nhanh của các đáp ứng miễn dịch quan sát được sau một liều duy nhất dùng ngoài đường tiêu hóa ở người là rất ấn tượng so với các đáp ứng miễn dịch sớm hơn được báo cáo bởi việc dùng vacxin VLP phức cho mũi ở phân liều VLP cao hơn nhiều (El Kamary et al. (2010) *J Infect Dis*, Vol. 202(11): 1649-1658). Các đáp ứng này còn cao hơn các đáp ứng được tạo ra bởi VLP Norovirut dùng qua đường miệng (Tacket et al. (2003) *Clin Immunol* 108:241-247; Ball et al. (1999, *Gastroenterology* 117:40-48) cũng như các đáp ứng được tạo ra bởi VLP Norovirut được sản xuất ra bởi thực vật chuyển gen (Tacket et al. (2000) *J Infect Dis* 182:302-305). Cụ thể, chế phẩm vacxin dùng trong cơ này sản xuất ra các đáp ứng trí nhớ trong phạm vi 7 ngày tạo miễn dịch và các đáp ứng kháng thể huyết thanh tối đa quan sát được sau liều dùng đơn, bao gồm đáp ứng IgA rõ rệt và hoạt tính phong bế hydrat cacbon chức năng và hoạt tính ức chế ngưng kết hồng cầu. Do đó, vacxin Norovirut nhị giá này được tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ mạnh ở người mà là cao hơn đáp ứng miễn dịch được tạo ra bởi vacxin Norovirut hiện có bất kỳ.

Ví dụ 2. Nghiên cứu liều bậc thang, tính an toàn và khả năng tạo miễn dịch của vacxin Norovirut dạng hạt giả virus nhị giá dùng trong cơ ở người (Nghiên cứu LV03-104)

Ví dụ dưới đây đề xuất phân dự tính còn lại của nghiên cứu lâm sàng được mô tả trong Ví dụ 1, trong đó nghiên cứu liều bậc thang, đa vị trí, được lấy ngẫu nhiên được tiến hành ở người trưởng thành ≥ 18 tuổi về tính an toàn và khả năng tạo miễn dịch của 4 mức phân liều của Vacxin VLP Norovirut nhị giá dùng trong cơ (IM) được bổ trợ tá được là monophosphoryl lipid A (MPL) và nhôm hydroxit (AlOH), so với giả được. Các đối tượng sẽ nhận 2 liều của vacxin hoặc giả được, bằng cách tiêm bắp (IM), 28 ngày riêng sử dụng kim 38mm (1,5in). Ví dụ này chỉ với hàm ý để minh họa hơn nữa các nguyên lý của sáng chế.

Nhóm nghiên cứu A đã hoàn chỉnh giai đoạn thử nghiệm trong nghiên cứu và được mô tả trên đây trong Ví dụ 1. Nhóm nghiên cứu B chứa khoảng 20 đối tượng ở độ tuổi từ 50 đến 64. Nhóm nghiên cứu C chứa khoảng 30 đối tượng ở độ tuổi 65 đến 85. Toàn bộ khoảng 98 đối tượng được đưa vào trong nghiên cứu.

Trong Nhóm nghiên cứu B, khoảng 20 đối tượng ở độ tuổi từ 50 đến 64 được xếp và được lấy ngẫu nhiên 1:1 để nhận vaccin (N=10) hoặc giả dược (N=10). 7 ngày sau khi dùng liều 2 (ngày nghiên cứu 35) dữ liệu an toàn là có để xem lại từ các đối tượng trong Nhóm nghiên cứu B, các đối tượng trong Nhóm nghiên cứu C là thích hợp để nhận liều khởi đầu của họ. Trong Nhóm nghiên cứu C, khoảng 30 đối tượng ở độ tuổi 65 đến 85 được xếp và được lấy ngẫu nhiên 1:1:1 để nhận vaccin được bổ sung tá dược MPL và AlOH (N=10), hoặc vaccin được bổ sung tá dược AlOH riêng, nghĩa là không có MPL (N=10), hoặc giả dược (N=10). Nồng độ kháng nguyên của VLP Norovirut và của AlOH trong 2 chế phẩm Vaccin để được đánh giá trong Nhóm nghiên cứu C là đồng dạng; chỉ sự có mặt hoặc không có mặt của MPL là khác nhau.

Vaccin VLP Norovirut nhị giá chứa VLP nhóm gen I, kiểu gen 1 (GI.1) và nhóm gen II, kiểu gen IV (GII.4) làm các kháng nguyên chứa, và Monophosphoryl Lipit A (MPL) và nhôm hydroxit (AlOH) làm các tá dược, natri clorua (NaCl) và L-histidin (L-His) làm chất đệm (độ pH bằng 6,3-6,7), etanol và nước để tiêm. VLP GI.1 bao gồm trình tự capsit SEQ ID NO: 1, mà có nguồn gốc từ ba chủng GI.1.

Một liều duy nhất vaccin được chọn để đánh giá hơn nữa trong các Nhóm nghiên cứu B và C là phân liều thấp nhất trong Nhóm nghiên cứu A, mà tạo ra đáp ứng miễn dịch mạnh nhất và tái sinh cụ thể cũng được dung nạp nhìn chung là tốt. Dữ liệu ngày 56 về tính an toàn và khả năng tạo miễn dịch từ các đối tượng trong Nhóm nghiên cứu A được xem lại bởi CSM/SMC và phân liều nhị giá được chọn để đánh giá trong các Nhóm nghiên cứu B và C.

Các đối tượng giữ trợ giúp nhớ hàng ngày có các triệu chứng kéo dài bao gồm 4 phản ứng phụ tiêm khu trú, như là đau, yếu, đỏ, và sưng, và 10 dấu hiệu hoặc triệu chứng toàn thân bao gồm nhiệt độ miệng hàng ngày, đau đầu, mệt, đau cơ, ớn lạnh, đau khớp và triệu chứng ở dạ dày ruột nôn mửa, nôn, tiêu chảy, cứng cơ/đau ở bụng đối với ngày 0 qua 7 sau mỗi liều vaccin VLP Norovirut nhị giá dùng trong cơ hoặc kiểm soát. Vùng đỏ và sưng ở vị trí tiêm được đo và được ghi lại hàng ngày trong 7 ngày sau mỗi lần tiêm.

Tiền sử bệnh tạm thời thu được ở mỗi lần thăm bệnh tiếp sau vào các ngày 7+3, 21+3, 28+3, 35+3, 56+7, 180+14, và 393+14 và ở cuộc gọi điện thoại tiếp sau vào các ngày 265 +14; các đối tượng được hỏi về chứng bệnh tạm thời, thăm bệnh của bác sĩ,

tác dụng phụ trầm trọng bất kỳ (SAE), và việc khởi phát các tình trạng bệnh mới rõ rệt. Các đối tượng có CBC với WBC khác nhau và số lượng tiểu cầu, và BUN huyết thanh, creatinin, glucoza, AST, và ALT đánh giá ở sàng lọc và vào các ngày 21 và 35 (khoảng 7 ngày sau mỗi liều) để đánh giá tính thích hợp tiếp tục và tính an toàn, tương ứng.

Máu từ các đối tượng được gom trước khi dùng vacxin vào ngày 0 và vào các ngày 7+3, 21+3, 28+3, 35+3, 56+7, 180+14, và 393 +14 để đo kháng thể huyết thanh (IgG, IgA, và IgM riêng rẽ và kết hợp) cho Vacxin VLP Norovirut nhị giá dùng trong cơ bằng các thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA). Hoạt tính phong bế hydrat cacbon huyết thanh và các kháng thể HAI huyết thanh cũng được đo.

Các phương pháp được mô tả trên đây đối với Nhóm nghiên cứu A được sử dụng để phân tích các mẫu máu được gom từ các cá thể được gây miễn dịch hoặc các cá thể nhận giả được. Các kết quả của nghiên cứu sẽ được dùng trong quy trình phát triển lâm sàng để dùng chế phẩm vacxin theo sáng chế.

Phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các phương án cụ thể được mô tả chỉ với hàm ý là những minh họa khía cạnh riêng của sáng chế, và các phương pháp tương đương chức năng và các thành phần là nằm trong phạm vi của sáng chế. Thực tế, các dạng biến đổi khác nhau của sáng chế, ngoài các dạng được thể hiện và được mô tả theo sáng chế, sẽ là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này căn cứ vào phần mô tả trên đây và các hình vẽ kèm theo nhờ sử dụng các thử nghiệm thông thường. Các dạng biến đổi và tương đương cũng được hàm ý nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây.

Tất cả các công bố, các patent và các đơn patent được nêu trong phần mô tả này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn cho phần mô tả này cho cùng bối cảnh là nếu mỗi công bố, patent hoặc đơn patent riêng được chỉ ra đặc hiệu và riêng để được kết hợp vào sáng chế để tham khảo.

Phân liệt kê và trình bày các tài liệu tham khảo theo sáng chế không nên hiểu rằng các tài liệu này là tình trạng kỹ thuật của sáng chế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm bao gồm hạt giả virus (virus-like particle: VLP) Norovirus nhóm gen I và VLP Norovirus nhóm gen II, trong đó VLP Norovirus nhóm gen I và nhóm gen II này có mặt trong chế phẩm với các lượng khác nhau, và trong đó VLP Norovirus nhóm gen I có mặt trong chế phẩm với lượng khoảng 15 µg và VLP Norovirus nhóm gen II có mặt trong chế phẩm với lượng khoảng 50µg.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó VLP Norovirus nhóm gen I là GI.1.
3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó VLP Norovirus nhóm gen II là GII.4.
4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn bao gồm chất tá dược.
5. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó tá dược này không phải là ngoại độc tố vi khuẩn.
6. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó tá dược được chọn từ nhóm bao gồm monophosphoryl lipid A (MPL), lipid A tổng hợp, chất giả lipid A hoặc chất tương tự lipid A, flagelin, muối nhôm, xytokin, saponin, các dẫn xuất muramyl dipeptit (MDP), CpG oligo, lipopolysaccharit (LPS) của vi khuẩn gram âm, polyphosphazene, nhũ tương, virosome, cochleate, poly(lactide-co-glycolide) (PLG) các vi hạt, các hạt poloxamer, các vi hạt, các liposome, nhũ tương dầu trong nước, MF59, và squalene, 3DMPL và QS21.
7. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này bao gồm chất đệm được chọn từ nhóm bao gồm L-histidine, imidazole, axit succinic, tris, axit citric, bis-tris, piperazine, MES, HEPES, glycine và triethanolamine.
8. Chế phẩm theo điểm 7, trong đó chất đệm là L-histidine hoặc imidazole.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

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

 <120> CHẾ PHẨM CHỨA HẠT GIẢ VIRUT ĐỂ PHÒNG NGỪA NOROVIRUT

 <130> LIGO-024/01WO

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

 <160> 1

 <170> PatentIn version 3.5

 <210> 1
 <211> 540
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự axit amin VP1 Norovirut GII.4 phức hợp

 <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		

FIG.1

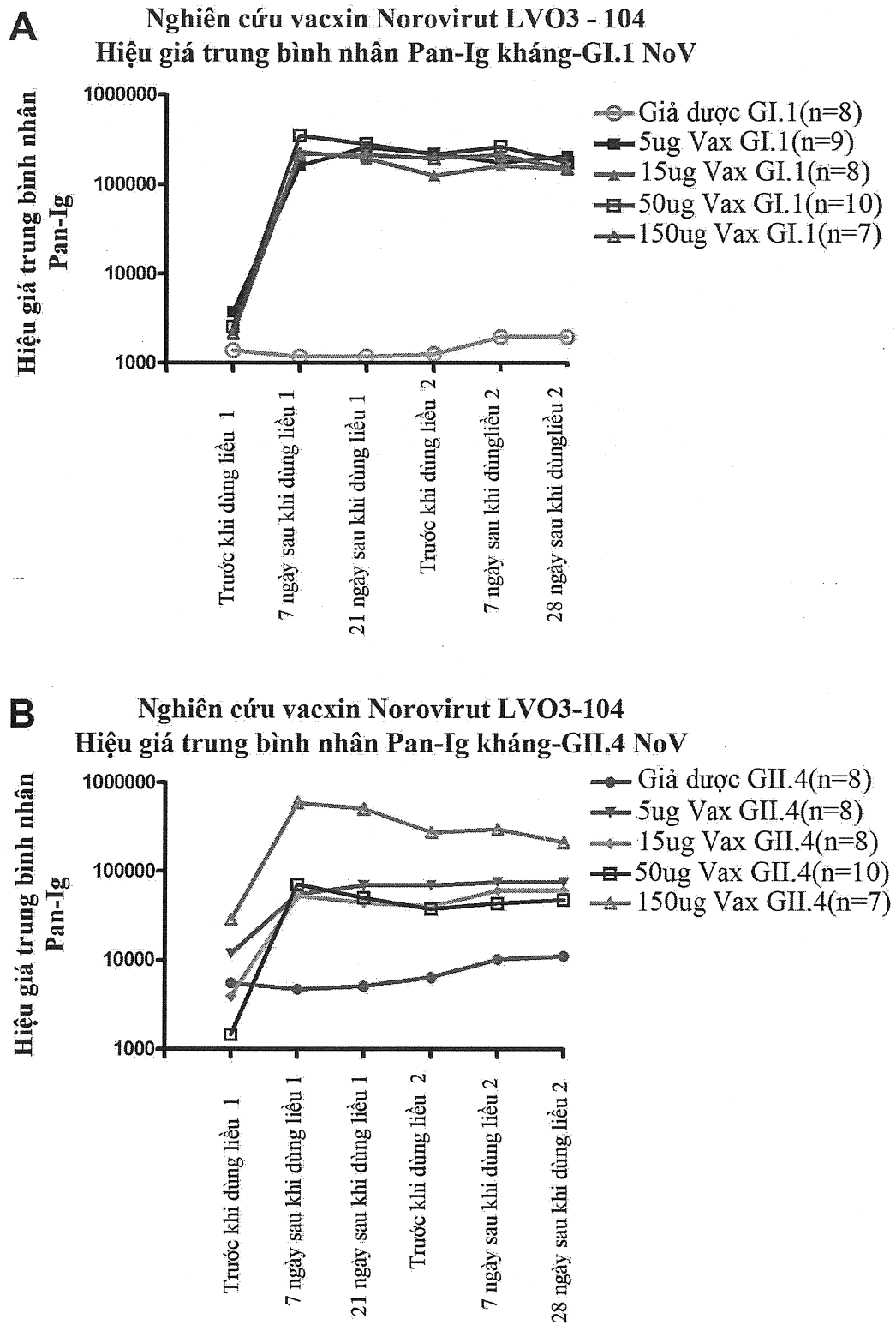


FIG.2

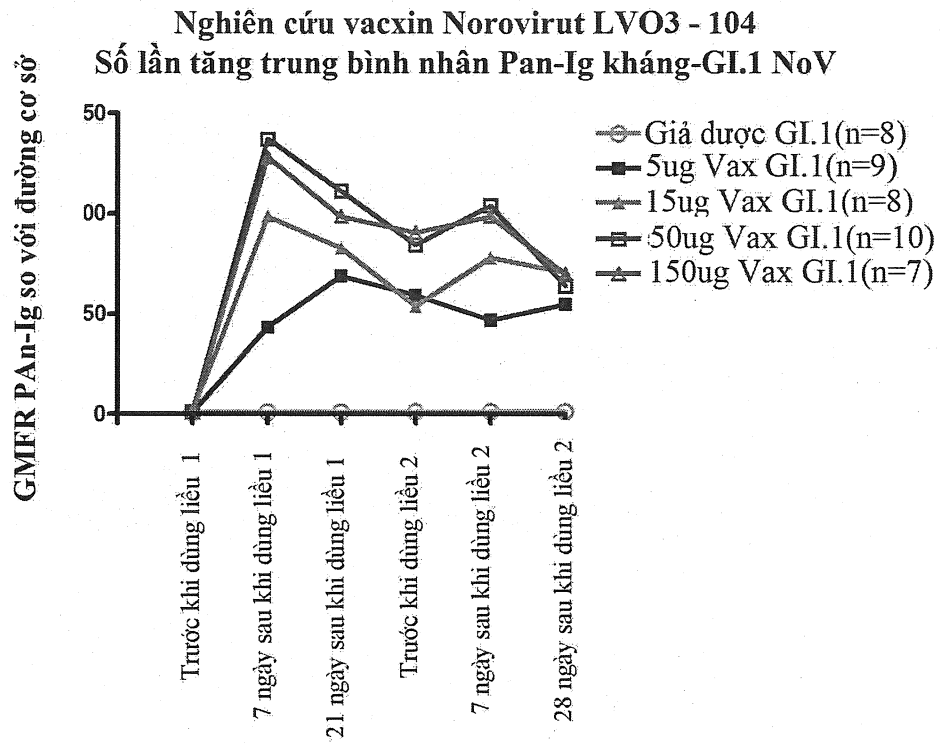
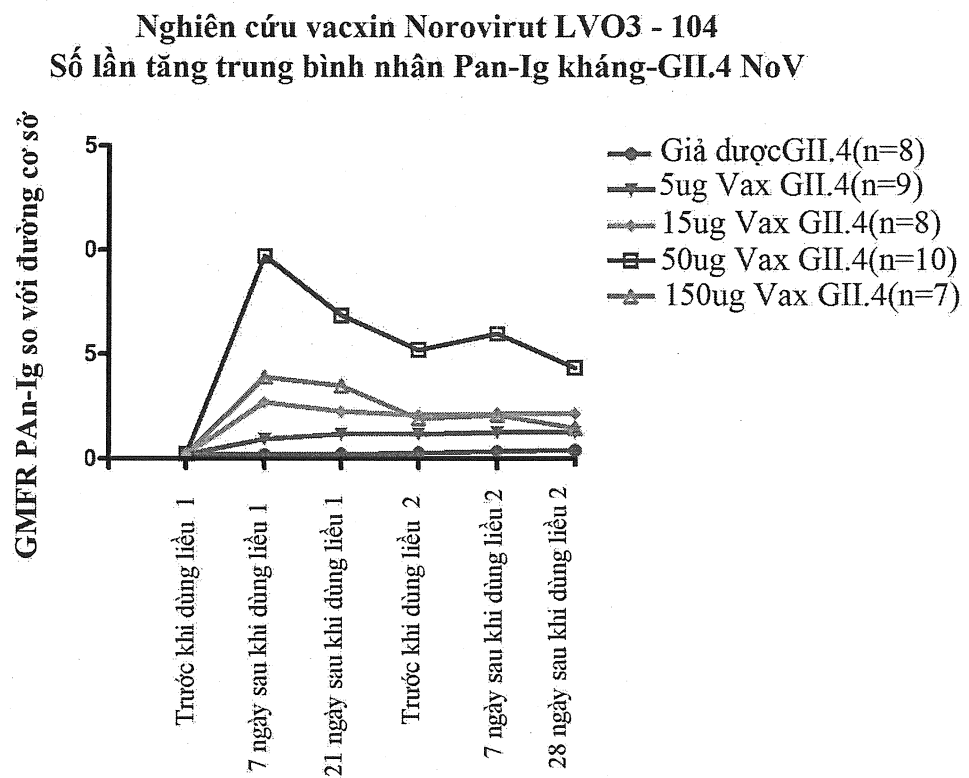
A**B**

FIG.3

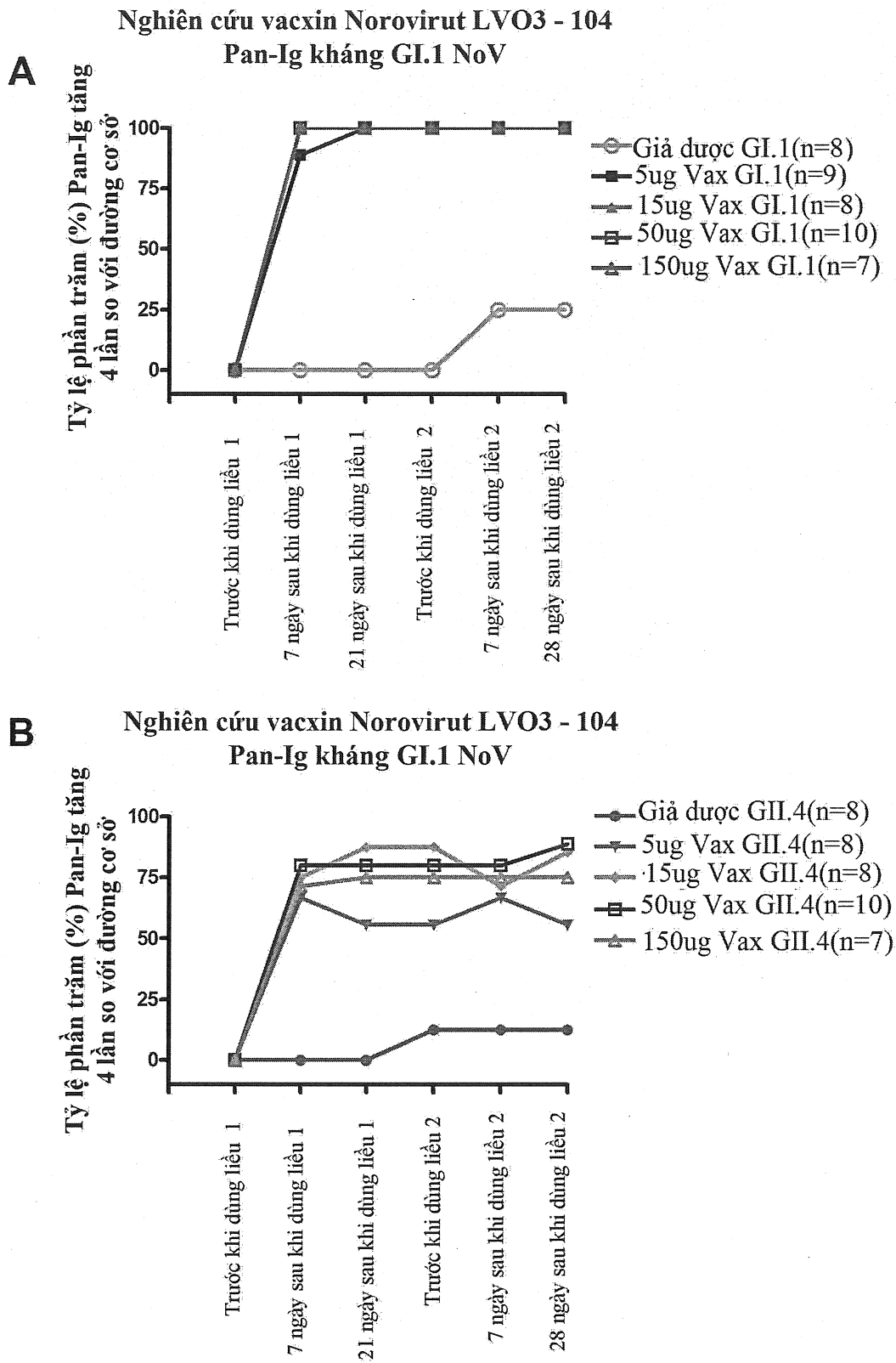


FIG.4

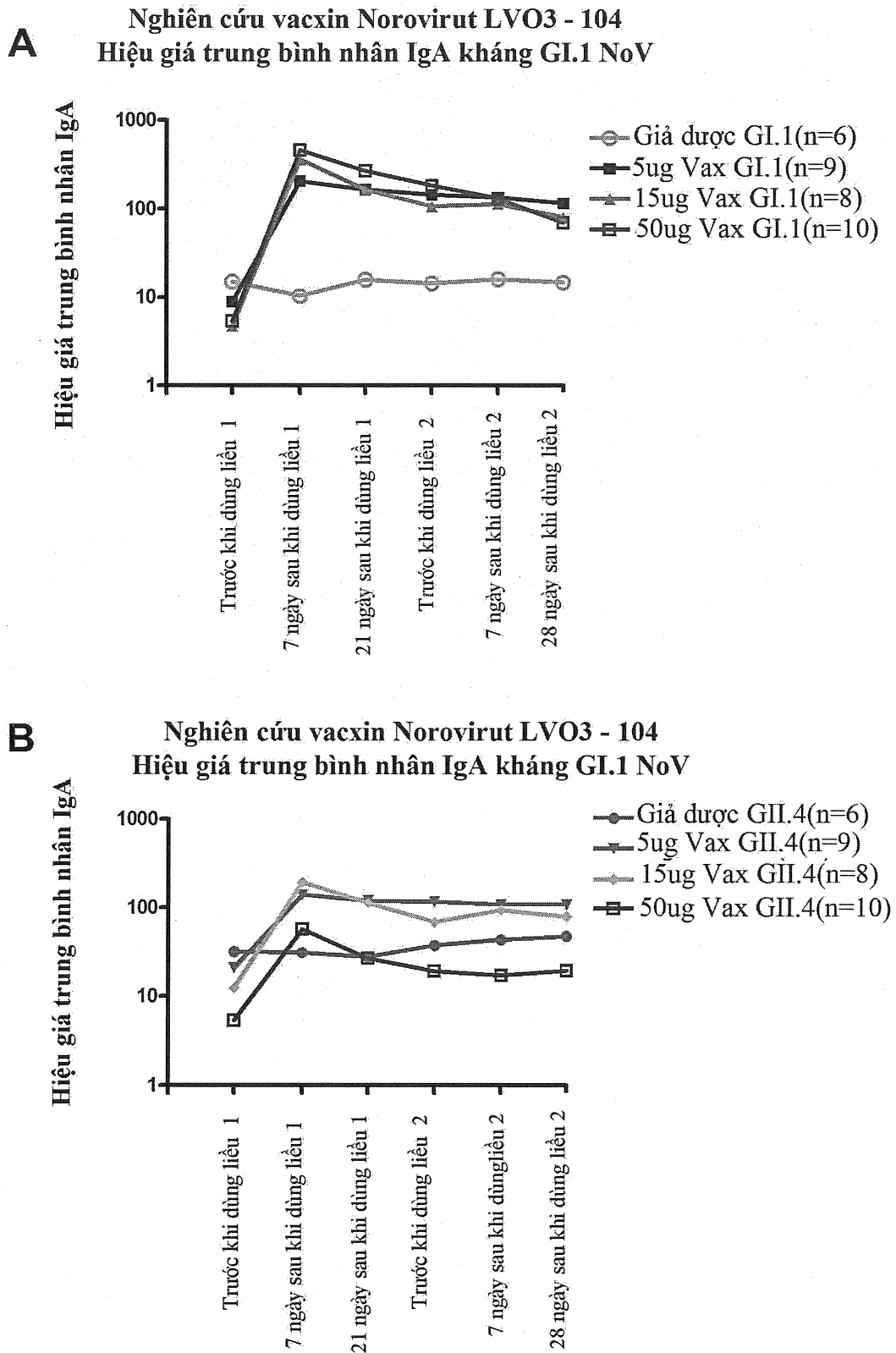
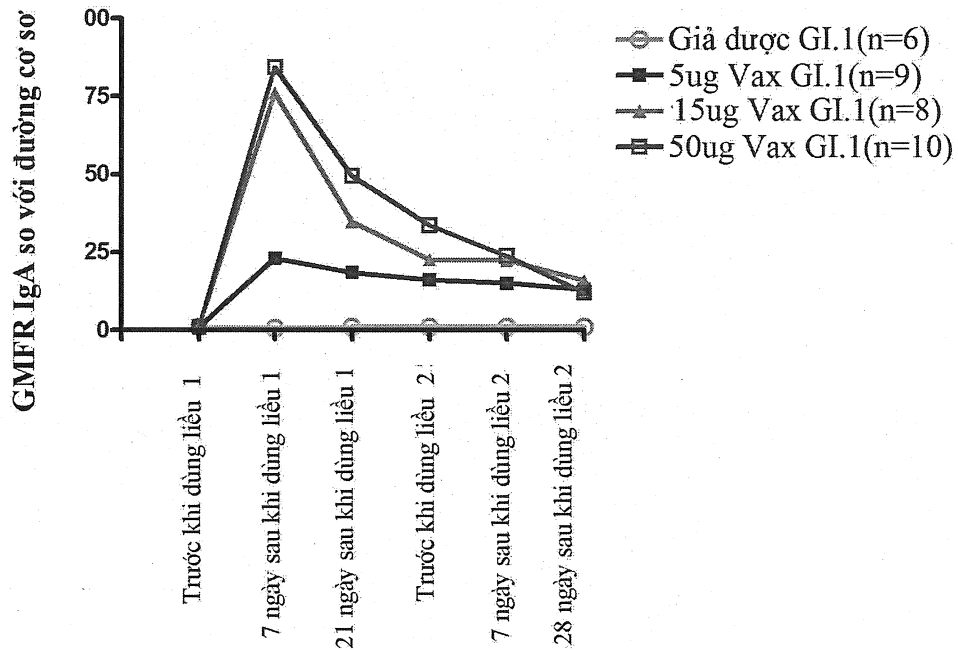


FIG.5

A Nghiên cứu vaccin Norovirut LVO3 - 104
Số lần tăng hiệu giá trung bình nhân IgA kháng GI.1 NoV



B Nghiên cứu vaccin Norovirut LVO3 - 104
Số lần tăng hiệu giá trung bình nhân IgA kháng GI.1 NoV

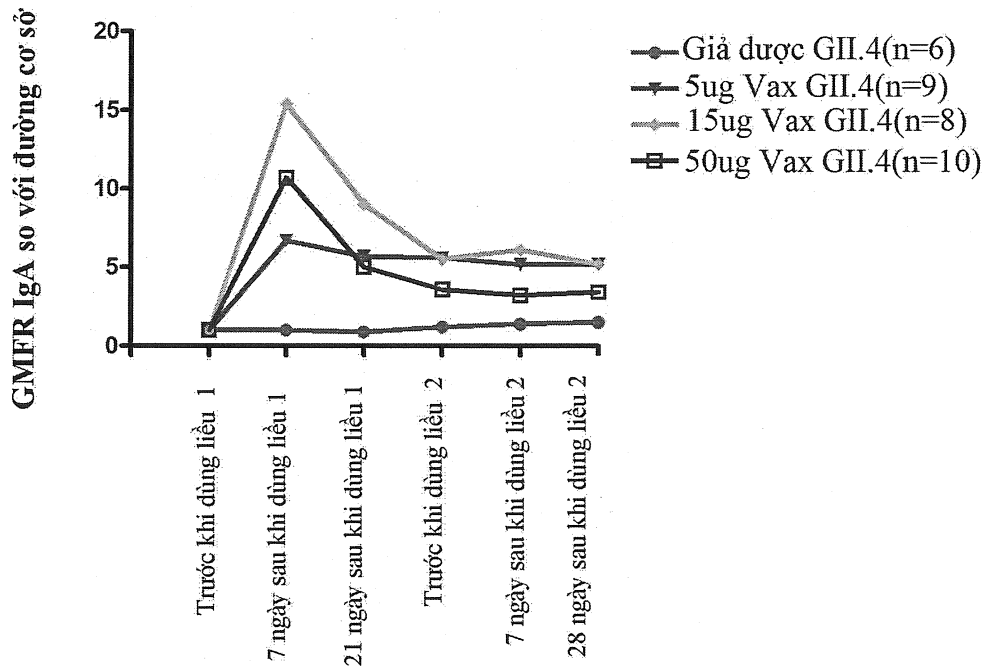


FIG.6

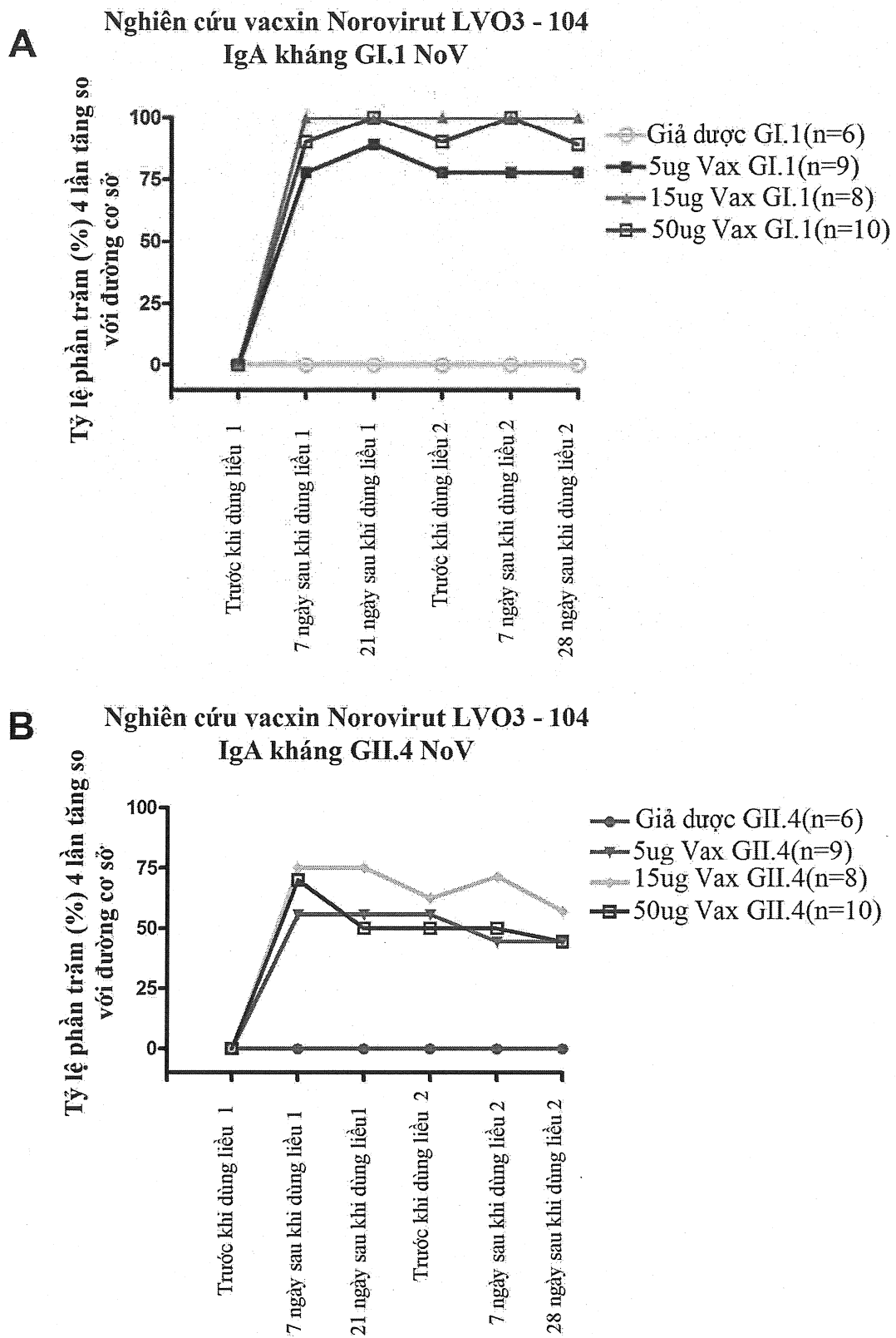
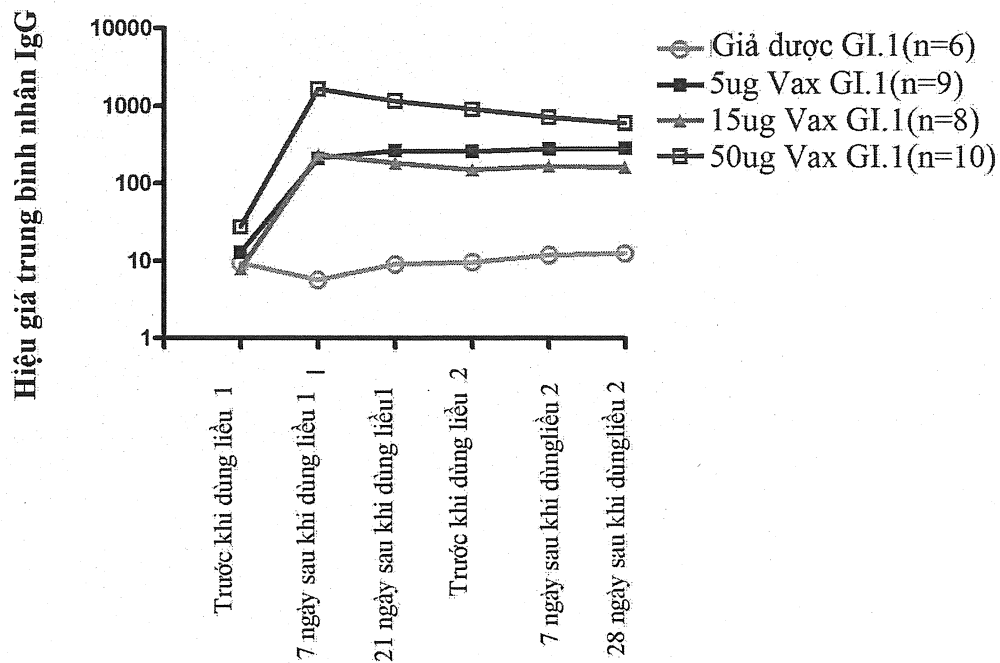


FIG.7

A

Nghiên cứu vaccin Norovirut LVO3 - 104
Hiệu giá trung bình nhân IgG kháng GI.1 NoV

**B**

Nghiên cứu vaccin Norovirut LVO3 - 104
Hiệu giá trung bình nhân IgG kháng GII.4 NoV

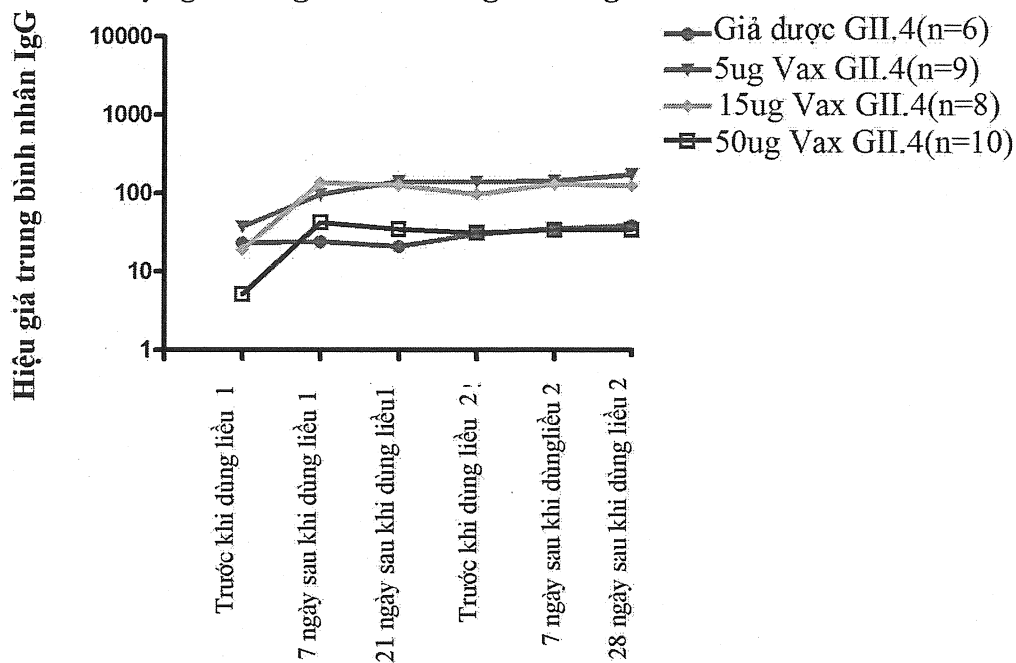
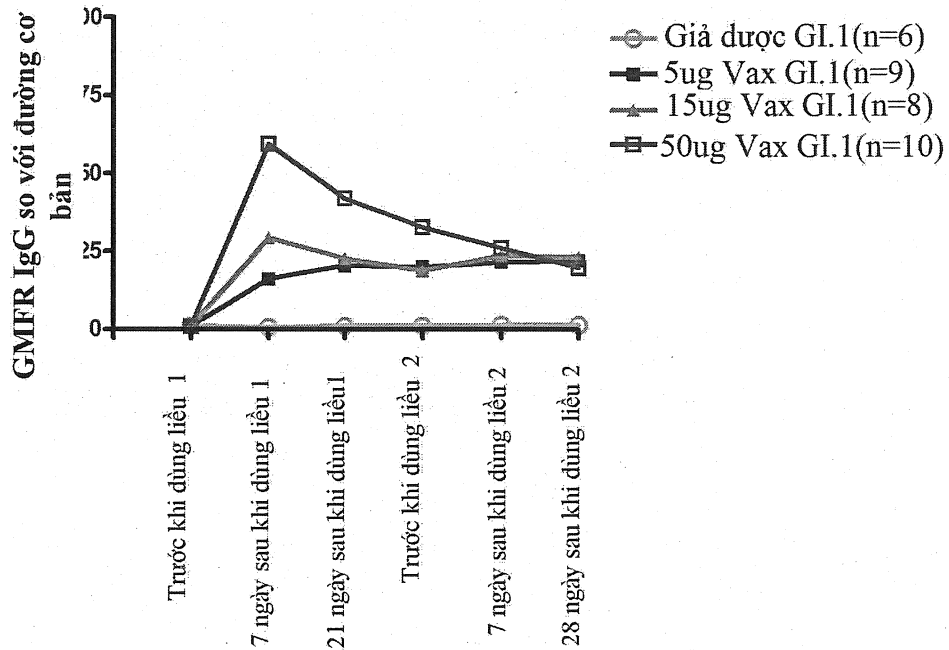


FIG.8

A

Nghiên cứu vaccin Norovirut LVO3 - 104
Số lần tăng trung bình nhân IgG kháng GI.1 NoV

**B**

Nghiên cứu vaccin Norovirut LVO3 - 104
Số lần tăng trung bình nhân IgG kháng GII.4 NoV

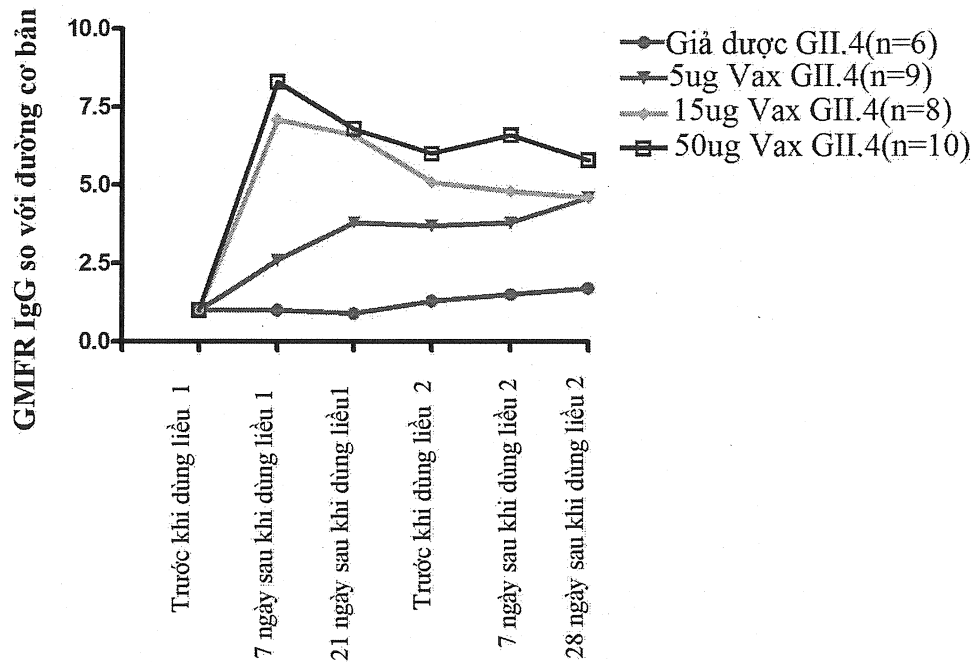


FIG.9

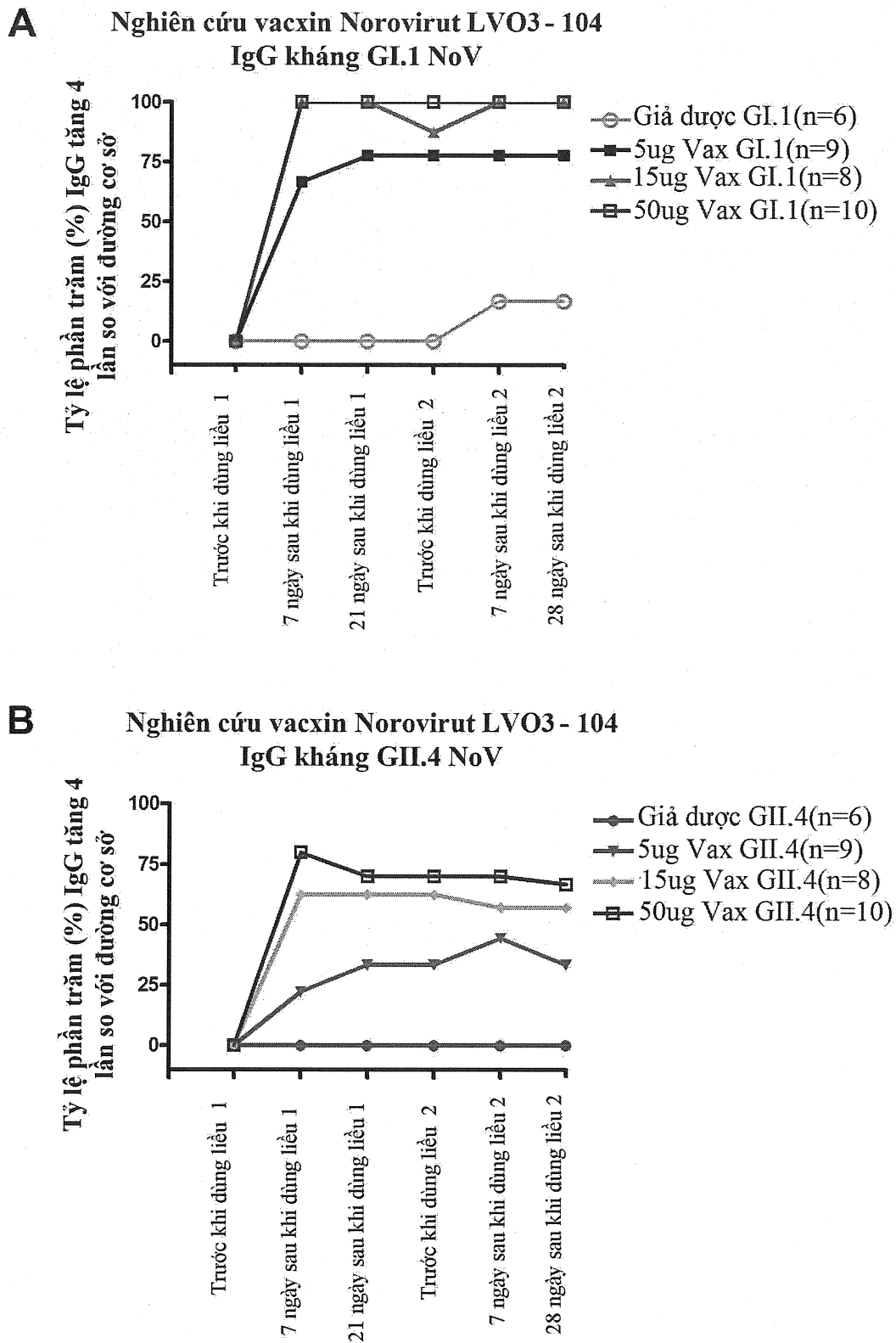


FIG.10

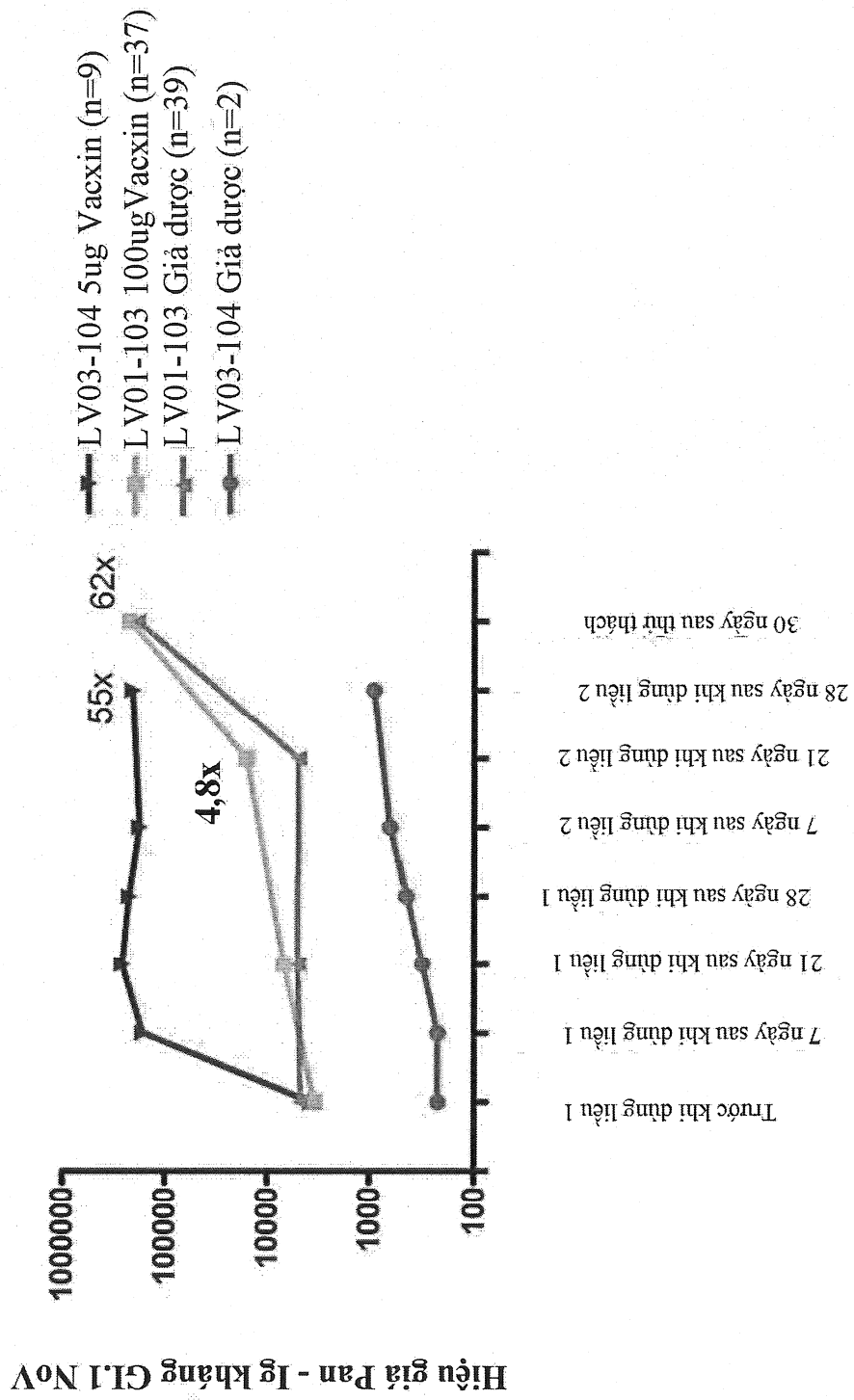
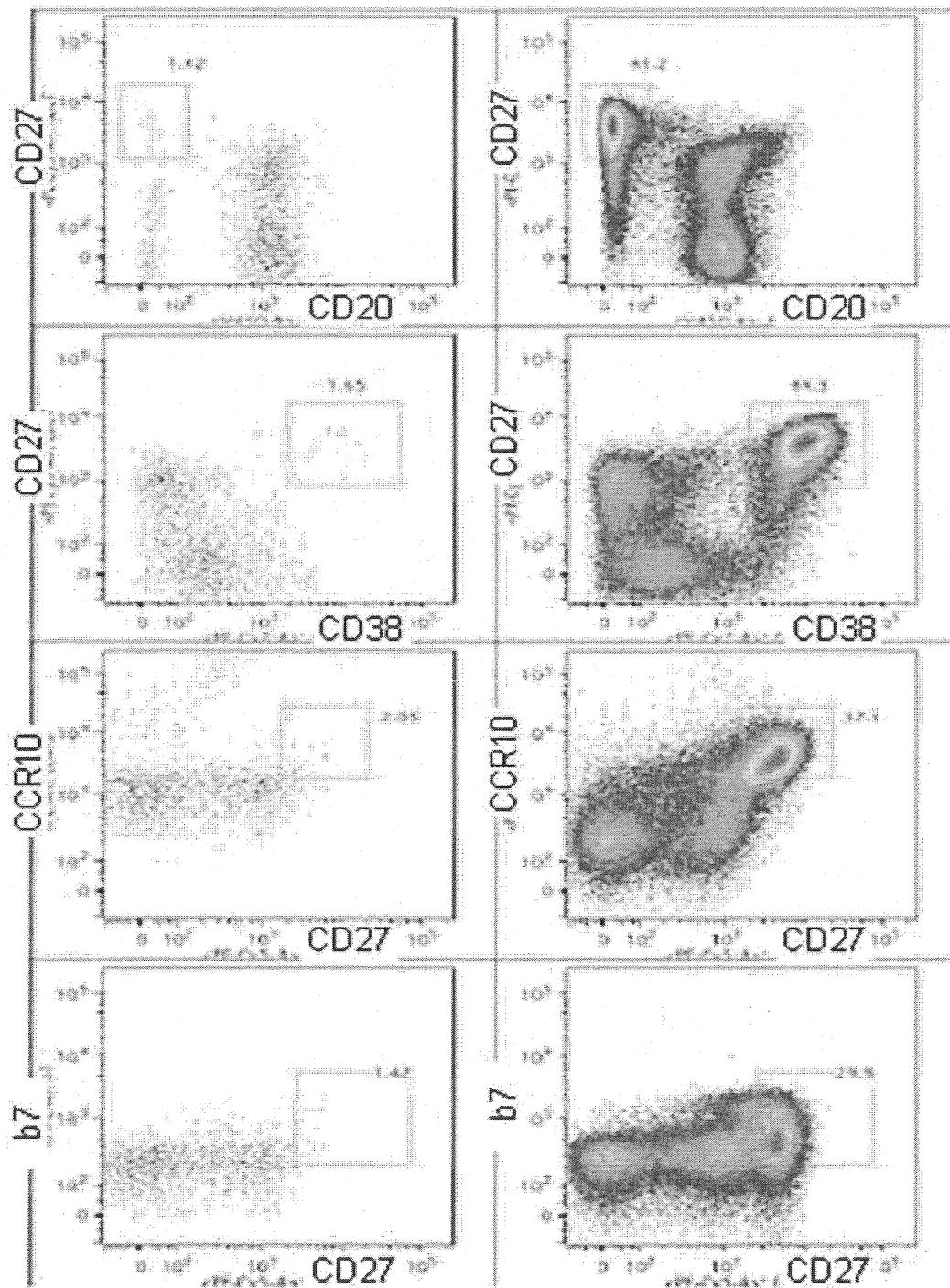


FIG.11A



Ngày 0

Ngày 7

FIG.11B

