

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 833**

51 Int. Cl.:

A61K 39/42 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2007 E 13157572 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2601969**

54 Título: **Formulaciones de vacuna para norovirus**

30 Prioridad:

29.09.2006 US 847912 P

18.09.2007 US 973392 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.07.2016

73 Titular/es:

TAKEDA VACCINES, INC. (100.0%)

**One Takeda Parkway
Deerfield, IL 60015, US**

72 Inventor/es:

RICHARDSON, CHARLES;

VEDVICK, THOMAS S.;

FOUBERT, THOMAS R. y

TINO, WILLIAM T.

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 577 833 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de vacuna para norovirus

5 **Campo de la invención**

La invención pertenece al campo de las vacunas, especialmente al de las vacunas para norovirus. Además, la invención se refiere a procedimientos de preparación de composiciones para vacuna y a procedimientos de inducción de una respuesta inmunogénica.

10

Declaración de apoyo gubernamental

Esta invención se realizó con ayuda gubernamental del US Army Medical Research and Material Command, con los contratos número DAMD17-01-C-0400 y W81XWH-05-C-0135. Es posible que el gobierno tenga ciertos derechos sobre la invención.

15

Antecedentes de la invención

Los norovirus son calicivirus humanos no cultivables que aparecen como la principal causa de los brotes epidémicos de gastroenteritis no bacteriana (Glass y col., 2000; Hardy y col., 1999). La importancia clínica de los norovirus ha estado minusvalorada antes del desarrollo de ensayos moleculares de diagnóstico sensibles. La clonación del genoma del virus de Norwalk (NV) del genogrupo I prototipo y la producción de partículas similares a virus (VLP, por sus siglas en inglés) a partir de un sistema de expresión de baculovirus recombinante ha permitido el desarrollo de pruebas que han mostrado la extensión de infecciones por norovirus (Jiang y col. 1990; 1992).

20

Los norovirus son virus de ARN de cadena sencilla y sentido positivo que contienen un genoma de ARN no segmentado. El genoma vírico codifica tres marcos de lectura abiertos, de los cuales los dos últimos especifican la producción de la proteína principal de la cápside y una proteína estructural menor, respectivamente (Glass y col. 2000). Cuando se expresan a niveles elevados en sistemas de expresión eucariotas, la proteína de la cápside del NV, y de otros norovirus en particular, se ensambla en VLP que estructuralmente mimetizan a viriones de norovirus nativos. Cuando se observan mediante microscopía electrónica de transmisión, las VLP no pueden distinguirse morfológicamente de viriones infecciosos aislados a partir de muestras de heces humanas.

25

Las respuestas inmunes frente a norovirus son complejas y la correlación de protección está empezando a elucidarse. Los estudios en voluntarios humanos realizados con el virus nativo mostraron que las respuestas inmunes de memoria derivadas a partir de mucosas proporcionaban protección a corto plazo tras la infección y sugerían que es posible la protección mediante vacunas (Lindesmith y col. 2003; Parrino y col. 1997; Wyatt y col., 1974).

30

Aunque el norovirus no puede cultivarse *in vitro* gracias a la disponibilidad de VLP y su capacidad para producirse en grandes cantidades, se ha realizado un progreso considerable a la hora de definir la topografía antigénica y estructural de la cápside del norovirus. Las VLP conservan la conformación auténtica de la proteína de la cápside vírica careciendo del material genético infeccioso. Por consiguiente, las VLP mimetizan las interacciones funcionales del virus con los receptores celulares, mostrando de este modo una respuesta inmune del huésped apropiada al tiempo que carecen de la capacidad para reproducir o causar la infección. Junto al NIH, en el Baylor College of Medicine se estudiaron las respuestas inmunes humoral, mucosa y celular a las VLP de NV en voluntarios humanos en un ensayo clínico en fase I académico patrocinado por el investigador. Se demostró que la administración de VLP por vía oral era segura e inmunogénica en adultos sanos (Ball y col. 1999; Tacket y col. 2003). En otros centros académicos, los experimentos preclínicos en modelos animales han mostrado un aumento de las respuestas inmunes a VLP cuando se administran por vía intranasal con adyuvantes de exotoxinas bacterianas (Guerrero y col. 2001; Nicollier-Jamot y col. 2004; Perival y col. 2003). En conjunto, estos datos sugieren que una vacuna compuesta por VLP formulada de forma adecuada representa una estrategia viable de inmunización frente a una infección por norovirus.

35

40

45

El documento EP 1 186 890 describe el uso de VLP de norovirus y adyuvante de Freund para formular formulaciones de vacuna. Los documentos US 5 861 241, WO 92/16543, US 2005/155113, EP 2 360 175 y Singh y col. (Vaccine, 2006) dan a conocer el uso de sales de aluminio y TLR como adyuvantes.

50

55

Resumen

60

La presente invención se define, entre otras cosas, por los siguientes puntos:

1. Una composición que comprende al menos un antígeno de norovirus y al menos un adyuvante; en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en un adyuvante que es una sal de aluminio y un adyuvante que es un agonista del receptor de tipo toll (TLR); en la que la composición se formula como un líquido; y en la que el contenido del al menos un antígeno de norovirus en la composición es de desde aproximadamente 1 µg hasta

65

aproximadamente 200 µg por dosis.

2. La composición del punto 1, en la que el contenido del al menos un antígeno de norovirus en la composición es de desde aproximadamente 1 µg hasta 100 µg por dosis.
3. La composición del punto 1 ó 2, en la que el contenido del al menos un antígeno de norovirus en la composición es de desde aproximadamente 1 µg hasta 50 µg por dosis.
4. La composición de uno cualquiera de los puntos 1 – 3, en la que dicho antígeno de norovirus comprende péptidos, proteínas, partículas similares a virus (VLP) de norovirus, VLP desnaturalizadas, monómeros de cápside, multímeros de cápside, agregados o mezclas de los mismos.
5. La composición del punto 4, en la que dicho norovirus es una cepa vírica de norovirus del genogrupo I o del genogrupo II.
6. La composición del punto 4 o del punto 5, en la que dichas VLP de norovirus comprenden una proteína de la cápside VP1 y/o VP2.
7. La composición del punto 4, en la que las VLP son VLP monovalentes o VLP polivalentes.
8. La composición del punto 4, en la que las VLP de norovirus se producen en un sistema de expresión celular recombinante o un sistema de expresión celular infectado con baculovirus.
9. La composición del punto 1, que además comprende un segundo antígeno de norovirus.
10. La composición del punto 9, en la que dichos primer y segundo antígeno de norovirus son VLP monovalentes de genogrupos diferentes.
11. La composición del punto 10, en la que dicho primer antígeno de norovirus es una VLP monovalente que comprende al menos una proteína de la cápside de un norovirus del genogrupo I y dicho segundo antígeno de norovirus es una VLP monovalente que comprende al menos una proteína de la cápside de un norovirus del genogrupo II.
12. La composición del punto 11, en la que el norovirus del genogrupo II es un norovirus GII.4.
13. La composición del punto 1, en la que la composición se formula para su administración parenteral.
14. La composición del punto 1, que además comprende un aceite mineral.
15. La composición del punto 1 para su uso en un procedimiento para inducir una respuesta inmune frente a norovirus en un mamífero.

La presente divulgación proporciona formulaciones antigénicas y de vacuna que comprenden un antígeno de norovirus. En una realización, la formulación comprende además al menos un adyuvante. El antígeno de norovirus puede derivarse de secuencias víricas del genogrupo I o el genogrupo II o una secuencia vírica consenso. Las formulaciones de norovirus comprenden péptidos antigénicos, proteínas o partículas similares a virus (VLP). En una realización, las VLP pueden estar desnaturalizadas. En otra realización, los péptidos antigénicos y las proteínas se seleccionan del grupo que consiste en monómeros de cápside, multímeros de cápside, agregados de proteínas y mezclas de los mismos. En otra realización, el antígeno de norovirus está presente en una concentración de desde aproximadamente el 0,01% hasta aproximadamente el 80% en peso. La dosificación de antígeno de norovirus está presente en una cantidad de desde aproximadamente 1 µg hasta aproximadamente 100 mg por dosis.

En otra realización, las VLP de norovirus son VLP recombinantes producidas en un sistema de expresión usando una secuencia de ácido nucleico de norovirus, que codifica al menos una proteína de la cápside o un fragmento de la misma. La proteína de la cápside se selecciona entre el grupo compuesto por VP1 o VP2, o una combinación de las mismas. El sistema de expresión puede ser un sistema de expresión celular recombinante como un sistema de expresión de levaduras, bacterias, insectos o mamíferos, o un sistema de expresión celular infectado con baculovirus.

En todavía otra realización, la composición comprende además un agente de administración que funciona potenciando la captación del antígeno proporcionando un efecto de depósito, aumentando el tiempo de retención del antígeno en el lugar de la administración o potenciando la respuesta inmune a través de la relajación de las uniones estrechas celulares en el lugar de la administración. El agente de administración puede ser un bioadhesivo, preferiblemente un mucoadhesivo seleccionado entre el grupo compuesto por glucosaminoglucanos (p. ej., sulfato de condroitina, dermatano sulfato de condroitina, sulfato de queratano, heparina, sulfato de heparano, hialuronano), polímeros de hidratos de carbono (p. ej., pectina, alginato, glucógeno, amilasa, amilopectina, celulosa, quitina,

estaquiosa, inulina, dextrina, dextrano), derivados entrecruzados de poli(ácido acrílico), alcohol de polivinilo, polivinilpirrolidona, polisacáridos (incluyendo mucina y otros mucopolisacáridos), derivados de celulosa (p. ej., hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa), proteínas (p. ej., lectinas, proteínas frimbriales) y ácido desoxirribonucleico. Preferiblemente, el mucoadhesivo es un polisacárido. Más preferiblemente, el mucoadhesivo es quitosano, o una mezcla que contiene quitosano como una sal de quitosano o base de quitosano.

En aún otra realización, la presente divulgación proporciona una composición que comprende además un adyuvante. El adyuvante puede seleccionarse entre el grupo compuesto por agonistas de receptores de tipo toll (TLR), monofosforil lípido A (MPL[®]), lípido sintético A, miméticos o análogos del lípido A, sales de aluminio, citoquinas, saponinas, derivados del dipéptido de muramilo (MDP), oligos CpG, lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram negativas, polifosfacenos, emulsiones, virosomas, cocleatos, micropartículas de poli(láctido-co-glucolíidos) (PLG), partículas de poloxámero, micropartículas, endotoxinas, por ejemplo, endotoxinas bacterianas y liposomas. Preferiblemente, el adyuvante es un agonista del receptor de tipo toll (TLR). Más preferiblemente, el adyuvante es MPL[®].

Las composiciones de la presente divulgación pueden proporcionarse como una formulación líquida o una formulación en polvo seco. Las formulaciones en polvo seco tal como se describen en el presente documento pueden contener un tamaño medio de partícula de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 micras de diámetro. En una realización, la composición es una formulación antigénica. En otra realización, la composición está formulada para su administración como vacuna. Entre las vías de administración adecuadas se incluyen mucosa, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intradérmica, subdérmica o transdérmica. En particular, la vía de administración puede ser intramuscular o mucosa, prefiriéndose las vías mucosa de administración que incluyen las rutas de administración intranasal, oral o vaginal. En otra realización, la composición se formula como un spray nasal, gotas nasales o polvo seco, en la que la formulación se administra mediante depósito rápido dentro de la fosa nasal a partir de un dispositivo que contiene la formulación que se mantiene cerca o se inserta dentro de la fosa nasal. En otra realización, la formulación se administra en una o ambas fosas nasales.

La presente divulgación también proporciona procedimientos para generar una respuesta inmune frente a norovirus en un sujeto que comprende la administración al sujeto de una formulación antigénica o una vacuna que comprende la composición de norovirus. En una realización, las formulaciones antigénicas y las vacunas que comprenden la composición de norovirus encuentran su aplicación en la generación de anticuerpos frente a uno o más antígenos de norovirus. En otra realización, las formulaciones de vacunas para norovirus pueden usarse para tratar las infecciones por norovirus.

Breve descripción de los dibujos

En la Figura 1 se muestra un ensayo de proliferación *in vitro* específica de antígeno de células de ganglios linfáticos cervicales murinos tras la inmunización intranasal *in vivo* con 10 µg de VLP.

En la Figura 2 se muestra un ensayo de proliferación *in vitro* específica de antígeno de esplenocitos tras la inmunización intranasal *in vivo* con 10 µg de VLP.

En la Figura 3 se muestra un ensayo de proliferación *in vitro* específica de antígeno de esplenocitos tras la inmunización intraperitoneal *in vivo* con 25 µg de VLP.

En la Figura 4 se muestra la IgG o IgA específica de VLP producida por células secretoras de anticuerpo (CSA) medida mediante un ensayo ELISPOT.

En la Figura 5 se muestra la IgG específica de VLP medida por ELISA.

En la Figura 6 se muestra el resultado de un ensayo de potencia para la respuesta de IgG en suero frente a las VLP de Norwalk.

En la Figura 7 se muestran los resultados de un ensayo de potencia en el que se comparan las respuestas de IgG en suero frente a las VLP de Norwalk en ratones inmunizados con una formulación líquida del antígeno o con una formulación reconstituida a partir de polvo seco. En la gráfica se muestra la potencia frente a la concentración de VLP de Norwalk en las diferentes formulaciones.

En la Figura 8 se muestra la respuesta de IgG en suero en conejos el día 21 (panel izquierdo) y el día 42 (panel derecho) seguido de la administración de formulaciones para vacunas diferentes con VLP de norovirus.

En la Figura 9 se muestra la respuesta de IgG en suero en conejos inmunizados por vía intranasal con una formulación líquida o con una formulación en polvo seco con VLP de Norwalk.

En la Figura 10 se muestra la estabilidad de la formulación en polvo seco medida mediante análisis por PAGE en presencia de SDS y cromatografía de exclusión molecular (CEM). El análisis de regresión indica que no se observan

tendencias estadísticas en los µg totales o intactos de VLP por cada 10 mg de polvo seco durante 1 año. El porcentaje de agregado es un cálculo en el que se asume que la proteína VLP no detectada por CEM, en comparación con la proteína VLP total determinada por PAGE-SDS cuantitativo, está agregada.

5 En la Figura 11 se muestran los resultados de un ensayo ELISA de la respuesta de anticuerpos anti-norovirus en ratones inmunizados i.p. con antígenos múltiples de norovirus. Las flechas delgadas indican inyecciones de recuerdo con formulaciones que contienen solo VLP de Norwalk. Las flechas gruesas muestran inyecciones de recuerdo con formulaciones que contienen VLP de Norwalk y de Houston.

10 En la Figura 12 se muestra un ensayo ELISA de una respuesta humoral anti-norovirus en ratones inmunizados i.p. con VLP de Norwalk, VLP de Houston o una combinación de VLP de Norwalk y Houston.

En la Figura 13 se muestra la presencia de células plasmática de larga duración específicas de VLP en esplenocitos (A), ganglios linfáticos cervicales (B) y médula ósea (C) en ratones 114 días después de la inmunización intranasal con VLP de Norwalk en ratones.

En la Figura 14 se muestra la respuesta de células B de memoria específicas de Norwalk en esplenocitos de ratones inmunizados por vía intranasal con VLP de Norwalk. En el panel A se muestran células secretoras de anticuerpos IgA a día 0 (gráfico de la izquierda) y a día 4 en cultivos con VLP de Norwalk (gráfico de la derecha). En el panel B se muestran células secretoras de anticuerpos IgG a día 0 (gráfico de la izquierda) y a día 4 en cultivos con VLP de Norwalk (gráfico de la derecha). La diferencia en el número de células entre el día 0 y el día 4 indica el nivel de expansión y diferenciación de células B de memoria.

En la Figura 15 se muestran los resultados del ensayo ELISPOT de células mononucleares de sangre periférica aisladas de conejos inmunizados por vía intranasal con una formulación para vacuna de VLP de Norwalk. En el panel de la izquierda se muestra el número de células secretoras de anticuerpos (CSA) específicas de VLP de Norwalk a día 0 (día de obtención del tejido), mientras que en el panel de la derecha se muestra el número de CSA específicas de VLP de Norwalk después de 4 días en cultivo con VLP de Norwalk. La diferencia en el número de células entre el día 0 y el día 4 indica el nivel de respuesta de las células B de memoria.

En la Figura 16 se muestran los resultados del ensayo ELISPOT de esplenocitos obtenidos a partir de conejos inmunizados por vía intranasal con una formulación para vacuna de VLP de Norwalk. En el panel de la izquierda se muestra el número de células secretoras de anticuerpos (CSA) específicas de VLP de Norwalk a día 0 (día de obtención del tejido), mientras que en el panel de la derecha se muestra el número de CSA específicas de VLP de Norwalk después de 4 días en cultivo con VLP de Norwalk. La diferencia en el número de células entre el día 0 y el día 4 indica el nivel de respuesta de las células B de memoria.

En la Figura 17 se muestran los resultados del ensayo ELISPOT de células de médula ósea obtenidas a partir de las tibias de conejos inmunizados por vía intranasal con una formulación para vacuna de VLP de Norwalk. En el panel de la izquierda se muestra el número de células secretoras de anticuerpos (CSA) específicas de VLP de Norwalk a día 0 (día de obtención del tejido), mientras que en el panel de la derecha se muestra el número de CSA específicas de VLP de Norwalk después de 4 días en cultivo con VLP de Norwalk. La presencia de CSA a día 0 indica la presencia de células plasmáticas de larga duración. La diferencia en el número de células entre el día 0 y el día 4 indica el nivel de respuesta de las células B de memoria.

En la Figura 18 se muestran los resultados del ensayo ELISPOT de células de ganglios linfáticos mesentéricos obtenidos a partir de conejos inmunizados por vía intranasal con una formulación para vacuna de VLP de Norwalk. En el panel A se muestran las células secretoras de anticuerpos (CSA) positivas para IgG específicas de VLP de Norwalk. En el panel B se muestran las CSA positivas para IgA específicas de VLP de Norwalk. En los paneles de la izquierda se muestra el número de CSA específicas de VLP de Norwalk a día 0 (día de obtención del tejido), mientras que en los paneles de la derecha se muestra el número de CSA específicas de VLP de Norwalk después de 4 días en cultivo con VLP de Norwalk. La presencia de CSA a día 0 indica la presencia de células plasmáticas de larga duración. La diferencia en el número de células entre el día 0 y el día 4 indica el nivel de respuesta de células B de memoria.

En la Figura 19 se muestra el ensayo de proliferación específica de antígeno de esplenocitos tras la inmunización intranasal *in vivo* en conejos. En el panel de la izquierda se muestra la proliferación de células T tras la reestimulación con VLP de Norwalk en esplenocitos no fraccionados, mientras que en el panel de la derecha se muestra la proliferación de células T CD4+ tras la reestimulación con VLP de Norwalk.

Descripción detallada de la divulgación

La presente divulgación se refiere a composiciones antigénicas y para vacuna de norovirus y a procedimientos de preparación de las composiciones. En particular, la presente divulgación proporciona una composición que comprende un antígeno de norovirus y al menos un adyuvante. Adicional o alternativamente, la composición puede comprender además al menos un agente de administración. La divulgación también proporciona procedimientos de

administración de la composición a un animal para producir una respuesta inmune o generar anticuerpos frente a antígenos de norovirus.

Antígenos de norovirus

5 La divulgación proporciona una composición que comprende uno o más antígenos de *Norovirus*. Por “*Norovirus*”, “*Norovirus* (NOR)”, “norovirus” y expresión gramaticales equivalentes en este documento se entiende miembros del género *Norovirus* de la familia *Caliciviridae*. En algunas realizaciones, un norovirus puede incluir un grupo de virus sin envoltura, con ARN de cadena sencilla de sentido positivo relacionados que pueden ser infecciosos para humanos o especies de mamíferos no humanos. En algunas realizaciones, un norovirus puede causar una gastroenteritis aguda en humanos. Los norovirus también pueden hacer referencia a virus estructurados pequeños y redondos (SRSV, por sus siglas en inglés) que tienen una estructura superficial definida o un contorno irregular al microscopio electrónico. Dentro de los norovirus se incluyen al menos cuatro genogrupos (GI-IV) definidos por las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos que comprende 15 grupos genéticos. Los genogrupos principales son GI y GII. Se han propuestos los genogrupos GIII y GIV, aunque están aceptados a nivel general. El representante de GIII es la cepa bovina Jena. Hasta el momento, GIV contiene un virus, Alfatron. Consulte Vinje y col. *J. Clin. Micro.* 41:1423-1433 (2003) para obtener más información. Por “*Norovirus*” también se entiende en este documento las partículas similares a virus recombinantes de norovirus (VLP de NORr). En algunas realizaciones, las VLP de norovirus recombinantes se producen en un sistema de expresión usando una secuencia de ácido nucleico de norovirus, que codifica al menos una proteína de la cápside o un fragmento de la misma. En otras realizaciones, la expresión recombinante de al menos la proteína de la cápside de norovirus codificada por el ORF2 en células, por ejemplo, a partir de un vector de baculovirus en células Sf9, puede producir un autoensamblaje espontáneo de la proteína de la cápside en VLP. Aún en otras realizaciones, la expresión recombinante de al menos las proteínas de norovirus codificadas por ORF1 y ORF2 en células, p. ej., a partir de un vector de baculovirus en células Sf9, puede producir un autoensamblaje espontáneo de la proteína de la cápside en VLP. La secuencia de ácido nucleico de norovirus también puede ser una secuencia consenso que comprenda diversas cepas de norovirus o una construcción sintética modificada para potenciar los rendimientos o la estabilidad, o mejorar las propiedades antigénicas o inmunogénicas del antígeno codificado. Las VLP son estructuralmente similares a los norovirus aunque carecen del genoma ARN vírico y, por tanto, no son infecciosas. Por consiguiente, “*Norovirus*” incluye viriones que pueden ser partículas infecciosas o no infecciosas, en las que se incluyen partículas defectuosas.

Entre los ejemplos no limitantes de norovirus se incluyen el virus de Norwalk (NV, GenBank M87661, NP₀₅₆₈₂₁), virus de Southampton (SHV, GenBank L07418), virus Escudo del Desierto (DSV, U04469), virus de Hesse (HSV), virus de Chiba (CHV, GenBank AB042808), virus de Hawaii (HV, GenBank U07611), virus de la Montaña Nevada (SMV, GenBank U70059), virus de Toronto (TV, Leite y col., *Arch. Virol.* 141:865-875), virus de Bristol (BV), virus de Jena (JV, AJ01099), virus de Maryland (MV, AY032605), virus de Seto (SV, GenBank AB031013), virus de Camberwell (CV, AF145896), virus de Lordsdale (LV, GenBank X86557), virus de Grimsby (GrV, AJ004864), virus de México (MXV, GenBank U22498), Boxer (AF538679), C59 (AF435807), VA115 (AY038598), BUDS (AY660568), virus de Houston (HoV), cepa de Minerva (EF126963.1), cepa Laurens (EF126966.1), MOH (AF397156), virus de Parris Island (PIV; AY652979), VA387 (AY038600), VA207 (AY038599) y Operación de Liberación Iraquí (OIF, AY675554). La secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos correspondiente de cada uno se incorporan todas ellas como referencia en su totalidad. En algunas realizaciones puede usarse un criptograma para su identificación y se organiza como: especie huésped a partir de la cual se aisló el virus/abreviatura del género/abreviatura de la especie/nombre de la cepa/año de aparición/país de origen. (Green y col., *Human Caliciviruses*, en *Fields Virology* Vol. 1, 841-874 (Knipe y Howley, editores jefe, 4ª ed., Lippincott Williams & Wilkins 2001)). En algunas realizaciones se prefiere el uso de una combinación de genogrupos de norovirus como cepas de los genogrupos I.1 (virus de Norwalk) y II.4 (virus de Houston) u otras cepas normalmente en circulación, o construcciones sintéticas que representan combinaciones o porciones de las mismas. Habitualmente se identifican nuevas cepas de norovirus (Centers for Disease Control, *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 56(33):842-846 (2007)) y también pueden usarse secuencias consenso de dos o más cepas víricas para expresar antígenos de norovirus.

El antígeno de norovirus puede estar en forma de péptidos, proteínas o partículas similares a virus (VLP). En una realización preferida, el antígeno de norovirus comprende VLP. Según se usa en este documento, las “partículas similares a virus o VLP” se refieren a partículas similares a virus, fragmentos, agregados o porciones de las mismas producidos a partir de la secuencia que codifica la proteína de la cápside de norovirus y que comprende características antigénicas similares a las de partículas de norovirus infecciosas. Los antígenos de norovirus también pueden estar en forma de monómeros de cápside, multímeros de cápside, proteínas o fragmentos peptídicos de VLP, o agregados o mezclas de los mismos. Las proteínas o péptidos antigénicos de norovirus también pueden estar en forma desnaturalizada, producida usando procedimientos conocidos en la técnica.

Entre los antígenos de norovirus también pueden incluirse variantes de dichas proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas expresadas sobre o en las VLP de la invención. Las variantes pueden contener alteraciones en las secuencias de aminoácidos de las proteínas constituyentes. El término “variante” con respecto a un polipéptido se refiere a una secuencia de aminoácidos que está alterada en uno o más aminoácidos con respecto a una secuencia de referencia. La variante puede tener cambios “conservadores”, en los que el aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares, por ejemplo, sustitución de leucina por isoleucina. Alternativamente,

una variante puede tener cambios “no conservadores”, por ejemplo, sustitución de una glicina por triptófano. También pueden incluirse variaciones análogas menores como delección o inserción de aminoácidos, o ambas. Las directrices para determinar qué restos de aminoácidos pueden sustituirse, insertarse o deleccionarse sin eliminar la actividad biológica o inmunológica pueden encontrarse usando programas de ordenador bien conocidos en la técnica como, por ejemplo, el programa DNASTAR.

Entre los libros de texto en los que se describen las técnicas biológicas molecular aplicables a la presente divulgación, como clonación, mutación y similares, se incluyen Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volumen 152, Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger); Sambrook y col., Molecular Cloning-A Laboratory Manual (3ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 2000 (“Sambrook”) y Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel y col., eds., Current Protocols, sociedad entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (“Ausubel”). En estos libros se describe la mutagénesis, el uso de vectores, promotores y muchos otros temas destacados relacionados, por ejemplo, con la clonación y mutación de las proteínas de la cápside de norovirus. Por tanto, la divulgación también abarca usar procedimientos conocidos de ingeniería de proteínas y tecnología de ADN recombinante para mejorar o alterar las características de las proteínas expresadas sobre o en las VLP de la invención. Pueden utilizarse diversos tipos de mutagénesis para producir y/o aislar variantes de ácidos nucleicos, incluyendo secuencias consenso, que codifican moléculas proteicas y/o modificar/mutar adicionalmente las proteínas en o sobre las VLP de la invención. Entre estos se incluyen, pero sin limitaciones, mutagénesis dirigida a sitio, mutagénesis puntual al azar, recombinación homóloga (mezcla aleatoria de ADN), mutagénesis usando moldes que contiene uracilo, mutagénesis dirigida por oligonucleótido, mutagénesis de ADN modificado por fosforotioato, mutagénesis usando ADN doble incompleto o similares. Entre los procedimientos adecuados adicionales se incluyen reparación de errores de apareamiento puntuales, mutagénesis usando cepas huésped deficientes en mecanismos de reparación, restricción-selección y restricción-purificación, mutagénesis por delección, mutagénesis por síntesis total del gen, reparación de roturas de doble cadena y similares.

Las VLP de la presente divulgación pueden formarse a partir de la proteína de la cápside de norovirus de longitud completa, como las proteínas VP1 y/o VP2 o determinados derivados de VP1 o VP2 usando procedimientos convencionales en la técnica. Alternativamente, la proteína de la cápside usada para formar las VLP es una proteína de la cápside truncada. En algunas realizaciones, por ejemplo, al menos una de las VLP comprende una proteína VP1 truncada. En otras realizaciones, todas las VLP comprenden proteínas VP1 truncadas. El truncamiento puede ser un truncamiento en el extremo N o C terminal. Las proteínas de la cápside truncadas son derivados de la proteína de la cápside adecuadamente funcionales. Los derivados funcionales de proteínas de la cápside son capaces de inducir una respuesta inmune (si es necesario, cuando están convenientemente acompañadas de adyuvante) de una forma similar a la respuesta inmune inducida por una VLP compuesta por la proteína de la cápside de longitud completa.

Las VLP pueden contener proteínas VP1 principales y/o proteínas VP2 menores. Preferiblemente, cada VLP contiene proteínas VP1 y/o VP2 solo de un genogrupo de norovirus que da lugar a una VLP monovalente. Según se usa en este documento, el término “monovalente” significa que las proteínas antigénicas derivan de un único genogrupo de norovirus. Por ejemplo, las VLP contienen VP1 y/o VP2 de una cepa de virus del genogrupo I (p. ej., VP1 y VP2 del virus de Norwalk). Preferiblemente la VLP está compuesta predominantemente por proteínas VP1. En una realización de la divulgación, el antígeno es una mezcla de VLP monovalentes en las que la composición incluye VLP compuestas por VP1 y/o VP2 de un único genogrupo de norovirus mezcladas con VLP compuestas por VP1 y/o VP2 de un genogrupo de norovirus diferentes obtenidas de múltiples cepas víricas (p. ej., virus de Norwalk y virus de Houston). Simplemente a modo de ejemplo, la composición puede contener VLP monovalentes de una o más cepas del genogrupo I de norovirus junto con VLP monovalentes de una o más cepas del genogrupo II de norovirus. Preferiblemente, la mezcla de VLP de norovirus está compuesta por las cepas de norovirus de Norwalk y Houston.

Sin embargo, en una realización alternativa de la divulgación, las VLP pueden ser VLP polivalentes que comprenden, por ejemplo, proteínas VP1 y/o VP2 de un genogrupo de norovirus entremezcladas con proteínas VP1 y/o VP2 de un segundo genogrupo de norovirus, en las que las diferentes proteínas VP1 y VP2 son proteínas VP1 y VP2 no quiméricas, aunque se asocian entre sí con la misma estructura de la cápside para formar VLP inmunogénicas. Según se usa en este documento, el término “polivalente” significa que las proteínas antigénicas derivan de dos o más genogrupos de norovirus. Las VLP polivalentes pueden contener antígenos de VLP obtenidos de dos o más cepas víricas. Simplemente a modo de ejemplo, la composición puede contener VLP polivalentes que comprenden monómeros o polímeros de la cápside de una o más cepas del genogrupo I de norovirus junto con monómeros o polímeros de la cápside de una o más cepas del genogrupo II de norovirus. Preferiblemente, las VLP polivalentes contienen proteínas de la cápside de las cepas de norovirus de Norwalk y de Houston.

La combinación de VLP monovalentes o polivalentes dentro de la composición preferiblemente podría no bloquear la inmunogenicidad de cada tipo de VLP. En particular, se prefiere que no existan interferencias entre las VLP de norovirus en la combinación de la invención, de modo que la composición de VLP combinada de la invención sea capaz de inducir inmunidad frente a la infección por cada genotipo de norovirus representado en la vacuna. De forma adecuada, la respuesta inmune frente a un tipo de VLP determinado en la combinación es al menos el 50% de la respuesta inmune del mismo tipo de VLP cuando se mide de forma individual, preferiblemente el 100% o,

sustancialmente, el 100%. La respuesta inmune puede medirse de forma apropiada, por ejemplo, mediante la respuesta humoral, como se muestra en los ejemplos de este documento.

Pueden producirse VLP polivalentes mediante la expresión independiente de las proteínas individuales de la cápside seguido de su combinación para formar las VLP. Alternativamente, las proteínas múltiples de la cápside pueden expresarse dentro de la misma cápside, a partir de una o más construcciones de ADN. Por ejemplo, pueden transformarse o transfectarse múltiples construcciones de ADN dentro de células huésped, codificando cada vector una proteína diferente de la cápside. Alternativamente, puede usarse un único vector que tenga múltiples genes de la cápside, controlados por un promotor compartido o por múltiples promotores individuales. También pueden incorporarse elementos IRES dentro de vector, cuando sea apropiado. Usando estas estrategias de expresión, las proteínas de la cápside coexpresadas pueden purificarse conjuntamente para la posterior formación de VLP y pueden formarse de forma espontánea VLP polivalentes que pueden purificarse a continuación.

Un proceso preferido para la producción de VLP polivalentes comprende la preparación de proteínas de la cápside de VLP o derivados, como proteínas VP1 y/o VP2, de diferentes genotipos de norovirus, la mezcla de las proteínas y el ensamblaje de las proteínas para producir VLP polivalentes. Las proteínas de la cápside pueden estar en forma de un extracto sin purificar, estar parcialmente purificadas o purificadas antes del mezclado. Las VLP monovalentes ensambladas de genogrupos diferentes pueden desensamblarse, mezclarse entre sí y ensamblarse de nuevo en VLP polivalentes. Preferiblemente, las proteínas o las VLP están, al menos, parcialmente purificadas antes de su combinación. Opcionalmente, puede llevarse a cabo una purificación adicional de las VLP polivalentes después del ensamblaje.

De forma adecuada, las VLP de la divulgación se obtienen mediante el desensamblaje y reensamblaje de las VLP para obtener VLP puras y homogéneas. En una realización, las VLP polivalentes pueden obtenerse mediante desensamblaje de dos o más VLP, seguido de la combinación de los componentes de las VLP desensambladas en cualquier punto adecuado antes del reensamblaje. Esta técnica es adecuada cuando las VLP se forman espontáneamente a partir de la proteína VP1 expresada como ocurre, por ejemplo, en algunas cepas de levadura. Cuando la expresión de la proteína VP1 no induce la formación espontánea de VLP, las preparaciones de las proteínas o capsómeros de VP1 pueden combinarse antes del ensamblaje en VLP.

Cuando se utilizan VLP polivalentes, preferiblemente los componentes de las VLP se mezclan en las proporciones en las que se desee para la mezcla final de VLP. Por ejemplo, una mezcla de la misma cantidad de una proteína VP1 parcialmente purificada de los virus Norwalk y Houston (u otras cepas de norovirus) proporcionan una VLP polivalente con cantidades aproximadamente iguales de cada proteína.

Las composiciones que comprenden VLP polivalentes pueden estabilizarse mediante soluciones conocidas en la técnica, como las recogidas en los documentos WO 98/44944 y WO0045841.

Las composiciones de la divulgación pueden comprender otras proteínas o fragmentos de proteínas además de las proteínas VP1 y VP2 o sus derivados. También pueden administrarse otras proteínas o péptidos conjuntamente con la composición de la invención. Opcionalmente, la composición puede también formularse o administrarse conjuntamente con antígenos que no sean de norovirus. De forma adecuada, estos antígenos pueden proporcionar protección frente a otras enfermedades.

La proteína VP1 o su derivado proteico funcional es adecuadamente capaz de formar una VLP y la formación de VLP puede evaluarse mediante técnicas convencionales como, por ejemplo, microscopía electrónica y dispersión de luz láser dinámica.

Preparación del antígeno

Las moléculas antigénicas de la presente divulgación pueden prepararse mediante aislamiento y purificación a partir de los organismos en los que se producen de forma natural, y pueden prepararse mediante técnicas recombinantes. Preferiblemente, los antígenos de VLP de norovirus se preparan a partir de células de insecto, como las células Sf9 o H5, aunque también puede usarse cualquier célula adecuada como células de *E. coli* o células de levadura, por ejemplo, de *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Pichia pastori* y otros sistemas de expresión de *Pichia*, expresión en células de mamífero tales como sistemas CHO o HEK. Cuando se prepara mediante un procedimiento recombinante o mediante síntesis, pueden realizarse una o más inserciones, deleciones, inversiones o sustituciones de los aminoácidos que constituyen el péptido. Cada uno de los antígenos mencionados anteriormente se utiliza preferiblemente en su estado sustancialmente puro.

Los procedimientos de producción de VLP de norovirus en cultivos de células de insecto se han descrito previamente en la patente de EE. UU N.º 6.942.865. Brevemente, se clonó un ADNc del extremo 3' del genoma que contenía el gen de la cápside vírica (ORF2) y un gen estructural menor (ORF3). Los baculovirus recombinantes portadores de los genes de la cápside vírica se construyeron a partir del ADNc clonado. Las VLP de norovirus se produjeron en los cultivos de células de insecto Sf9 o H5.

Adyuvantes

La divulgación proporciona además una composición que comprende adyuvantes para su uso con el antígeno de norovirus. La mayoría de los adyuvantes contienen una sustancia diseñada para proteger al antígeno de un catabolismo rápido, como hidróxido de aluminio o aceite mineral, y un estimulador de las respuestas inmunes, como proteínas derivadas de *Bordetella pertussis* o de *Mycobacterium tuberculosis*. Los adyuvantes adecuados están disponibles en el mercado como, por ejemplo, adyuvante incompleto y adyuvante completo de Freund (Pifco Laboratories, Detroit, Mich.); adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.); sales de aluminio como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio; sales de calcio, hierro o cinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados, polisacáridos catiónica o aniónicamente derivatizados; polifosfacenos, microesferas biodegradable y Quil A.

Entre los adyuvantes adecuados también se incluyen, pero sin limitaciones, agonistas de los receptores de tipo toll (TLR), monofosforil lípido A (MPL), lípido sintético A, miméticos o análogos del lípido A, sales de aluminio, citoquinas, saponinas, derivados del dipéptido de muramilo (MDP), oligos CpG, lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram-negativas, polifosfacenos, emulsiones, virosomas, cocleatos, micropartículas de poli(láctido-co-glucólidos) (PLG), partículas de poloxámero, micropartículas y liposomas. Preferiblemente, los adyuvantes no son exotoxinas derivadas de bacterias. Los adyuvantes preferidos son aquellos que estimulan una respuesta de tipo Th1, como 3DMPL o QS21.

El monofosforil lípido A (MPL), un derivado no tóxico del lípido A de *Salmonella*, es un potente agonista de TLR-4 que se ha desarrollado como adyuvante para vacunas (Evans y col. 2003). En estudios murinos preclínicos, se ha demostrado que el MPL intranasal potencia las respuestas humorales secretoras, así como sistémicas (Baldrick y col. 2000; Yang y col. 2002). También se ha comprobado que es seguro y eficaz como adyuvante para vacunas en estudios clínicos con más de 120.000 pacientes (Baldrick y col., 2002; 2004). El MPL estimula la inducción de inmunidad innata a través del receptor TLR-4 y es, por tanto, capaz de inducir respuestas inmunes inespecíficas frente a una amplia variedad de patógenos infecciosos, incluyendo tanto bacterias gram-negativas como gram-positivas, virus y parásitos (Baldrick y col. 2004; Persing y col. 2002). La inclusión de MPL en formulaciones intranasales debería proporcionar una inducción rápida de respuestas innatas, inducir respuestas inmunes inespecíficas tras la estimulación vírica al tiempo que se potencian las respuestas específicas generadas por los componentes antigénicos de la vacuna.

Por consiguiente, en una realización, la presente divulgación proporciona una composición que comprende monofosforil lípido A (MPL[®]) o monofosforil lípido A 3 De-O-acilado (3D-MPL[®]) como potenciador de la inmunidad adquirida e innata. Desde un punto de vista químico, el 3D-MPL[®] es una mezcla de monofosforil lípido A De-O-acilado con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Una forma preferida de monofosforil lípido A 3 De-O-acilado se describe en la Patente Europea 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA). En otra realización, la presente divulgación proporciona una composición que comprende lípido A sintético, miméticos o análogos del lípido A, como lípido A PET de BioMira o derivados sintéticos diseñados para funcionar con agonistas de TLR-4.

Los términos “cantidad adyuvante eficaz” o “cantidad eficaz de adyuvante” serán bien entendidos por los expertos en la materia e incluyen una cantidad de uno o más adyuvantes que son capaces de estimular la respuesta inmune frente a un antígeno administrado, es decir, una cantidad que aumenta la respuesta inmune frente a una composición de antígeno administrada, medida en términos de niveles de IgA en los lavados nasales, niveles de IgG o IgM en suero o proliferación de células B o T. De forma adecuada, un aumento eficaz de los niveles de inmunoglobulina incluye más del 5%, preferiblemente más del 25% y, en particular, más del 50% en comparación con la misma composición de antígeno sin ningún adyuvante.

Agente de administración

La divulgación también proporciona una composición que comprende un agente de administración que funciona aumentando la captación del antígeno en función de, pero sin restricciones, un aumento de la viscosidad del líquido debido al efecto único o combinado de la deshidratación parcial de los mucopolisacáridos del huésped, las propiedades físicas del agente de administración o mediante interacciones iónicas entre el agente de administración y los tejidos del huésped en el sitio de exposición, lo que proporciona un efecto de depósito. Alternativamente, el agente de administración puede aumentar el tiempo de retención del antígeno en el sitio de administración (p. ej., retraso de la liberación del antígeno). Este agente de administración puede ser un agente bioadhesivo. En particular, el bioadhesivo puede ser un agente mucoadhesivo seleccionado entre el grupo compuesto por glucosaminoglucanos (p. ej., sulfato de condroitina, dermatano sulfato de condroitina, sulfato de queratano, heparina, sulfato de heparano, hialuronano), polímeros de hidratos de carbono (p. ej., pectina, alginato, glucógeno, amilasa, amilopectina, celulosa, quitina, estaquiosa, inulina, dextrina, dextrano), derivados entrecruzados de poli(ácido acrílico), alcohol de polivinilo, polivinilpirrolidona, polisacáridos (como mucina y otros mucopolisacáridos), derivados de celulosa (p. ej., hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa), proteínas (p. ej., lectinas, proteínas frimbriales) y ácido desoxirribonucleico. Preferiblemente, el agente mucoadhesivo es un polisacárido, como quitosano, una sal de quitosano o una base de quitosano (p. ej., glutamato de quitosano).

El quitosano, un polisacárido lineal con carga positiva derivado de la quitina de las conchas de los crustáceos, es un bioadhesivo para las células epiteliales y su capa mucosa superpuesta. La formulación de los antígenos con quitosano aumenta su tiempo de contacto con la membrana nasal, aumentando por tanto la captación en virtud de un efecto depósito (Illum y col. 2001; 2003; Davis y col. 1999; Bacon y col. 2000; van der Lubben y col. 2001; 2001; Lim y col. 2001). El quitosano se ha probado como sistema de administración nasal para varias vacunas, como para la gripe, pertussis y difteria, tanto en modelos animales como en humanos (Illum y col. 2001; 2003; Bacon y col. 2000; Jabbal-Gill y col. 1998; Mills y col. 2003; McNeela y col. 2004). En estos ensayos clínicos, se ha demostrado que el quitosano potencia las respuestas inmunes sistémicas a niveles equivalentes a la vacunación parenteral. Además, también se midieron niveles significativos de IgA específica de antígeno en las secreciones mucosas. Por tanto, el quitosano puede potenciar en gran medida la eficacia de una vacuna nasal. Además, debido a sus características físicas, el quitosano está especialmente indicado para vacunas intranasales formuladas como polvos (van der Lubben y col. 2001; Mikszta y col. 2005; Huang y col. 2004).

Por consiguiente, en una realización, la presente divulgación proporciona una composición antigénica o para vacuna adaptada para la administración intranasal, en la que la composición incluye antígeno y opcionalmente una cantidad eficaz de adyuvante. En realizaciones preferidas, la divulgación proporciona una composición antigénica o para vacuna que comprende antígeno de norovirus tal como VLP de norovirus, en combinación con al menos un agente de administración, tal como quitosano, y al menos un adyuvante, tal como MPL[®], CPG, imiquimod, gardiquimod o lípido A sintético o miméticos o análogos de lípido A.

El peso molecular del quitosano puede estar entre 10 kDa y 800 kDa, preferiblemente entre 100 kDa y 700 kDa y, más preferiblemente, entre 200 kDa y 600 kDa. La concentración de quitosano en la composición típicamente será de hasta aproximadamente el 80% (p/p), por ejemplo, el 5%, 10%, 30%, 50%, 70% u 80%. El quitosano es aquel que, preferiblemente, está desacetilado al 75%, por ejemplo, al 80-90%, más preferiblemente al 82-88% desacetilado, siendo ejemplos particulares con el 83%, 84%, 85%, 86% y 87% de desacetilación.

Formulaciones para vacunas y antigénicas

Las composiciones de la divulgación pueden formularse para su administración como formulaciones para vacunas y antigénicas. Según se usa en este documento, el término "vacuna" se refiera a una formulación que contiene VLP de norovirus u otros antígenos de norovirus de la presente divulgación según se ha descrito anteriormente, que está en forma tal que es posible administrarse a un vertebrado y que induce una respuesta inmune suficiente para inducir una inmunidad terapéutica para aliviar una infección y/o reducir al menos un síntoma de una infección y/o potenciar la eficacia de otra dosis de VLP o antígeno. Según se usa en este documento, los términos "formulación antigénica" o "composición antigénica" se refieren a una preparación que, cuando se administra a un vertebrado, por ejemplo un mamífero, inducirá una respuesta inmune. Según se usa en este documento, el término "respuesta inmune" se refiere tanto a la respuesta inmune humoral como a la respuesta inmune mediada por células. La respuesta inmune humoral conlleva la estimulación de la producción de anticuerpos por los linfocitos B que, por ejemplo, neutralizan agentes infecciosos, bloquean la entrada en las células de agentes infecciosos, bloquean la replicación de dichos agentes infecciosos y/o protegen a las células huésped de la infección y la destrucción. La respuesta inmune mediada por células se refiere a una respuesta inmune que está mediada por linfocitos T y/o por otras células, como macrófagos, frente a un agente infeccioso, mostrado por un vertebrado (p. ej., un humano), que previene o alivia la infección o reduce al menos un síntoma de la misma. La preparación de la vacuna se describe de forma general en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press Nueva York). Las composiciones de la presente divulgación pueden formularse, por ejemplo, para su administración en una o más de entre las mucosas oral, gastrointestinal y respiratoria (p. ej., nasal).

Cuando se pretende que la composición se administre en la mucosa respiratoria (p. ej., nasal), esta se formula como disolución acuosa para su administración como aerosol o gotas nasales, o alternativamente como polvo seco, por ejemplo, para un depósito rápido dentro de las fosas nasales.

Las composiciones para administración como gotas nasales pueden contener uno o más excipientes del tipo normalmente incluido en tales composiciones, por ejemplo conservantes, agentes de ajuste de la viscosidad, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes tamponadores y similares. Los agentes de viscosidad pueden ser celulosa microcristalina, quitosano, almidones, polisacáridos y similares. Las composiciones para administración como polvo seco también pueden contener uno o más excipientes normalmente incluidos en dichas composiciones, por ejemplo, agentes mucoadhesivos, agentes de carga y agentes para proporcionar características de flujo y tamaño del polvo apropiadas. Entre los agentes de carga y de flujo y tamaño del polvo pueden incluirse manitol, sacarosa, trehalosa y xilitol.

En una realización, las formulaciones para vacuna o antigénicas de norovirus de la presente divulgación pueden formularse como polvo seco que contiene uno o más antígenos de genogrupos de norovirus como inmunógeno, un adyuvante como MPL[®], un biopolímero como quitosano para estimular la adhesión a las superficies de la mucosa y agentes de carga como manitol y sacarosa. Por ejemplo, la vacuna de norovirus puede formularse como 10 mg de un polvo seco que contenga uno o más antígenos del genogrupo de norovirus (p. ej., virus de Norwalk, virus de Houston o virus de la Montaña Nevada), adyuvante MPL[®], mucoadhesivo quitosano y manitol y sacarosa como

agentes de carga y para proporcionar características de flujo adecuados. La formulación puede contener aproximadamente 7,0 mg (intervalo del 25 al 90% p/p) de quitosano, aproximadamente 1,5 mg de manitol (intervalo del 0 al 50% p/p), aproximadamente 1,5 mg de sacarosa (intervalo del 0 al 50% p/p), aproximadamente 25 µg de MPL® (intervalo del 0,1 al 5% p/p) y aproximadamente 100 µg de antígeno de norovirus (intervalo de 0,05 a 5% p/p).

El antígeno de norovirus puede estar presente a una concentración desde aproximadamente el 0,01% (p/p) hasta aproximadamente el 80% (p/p). En una realización, los antígenos de norovirus pueden estar formulados a dosis de aproximadamente 5 µg, aproximadamente 15 µg y aproximadamente 50 µg por 10 mg de formulación en polvo seco (0,025, 0,075 y 0,25% p/p) para su administración en ambas fosas nasales o aproximadamente 10 µg, aproximadamente 30 µg y aproximadamente 100 µg (0,1; 0,3 y 1,0% p/p) para su administración en una fosa nasal. La formulación puede administrarse en una o ambas fosas nasales durante cada administración. Puede realizarse una administración de refuerzo 1 a 12 semanas después de la primera administración para mejorar la respuesta inmune. El contenido de los antígenos de norovirus en las formulaciones para vacunas y antigénicas puede estar en el intervalo de 1 µg a 100 mg, preferiblemente en el intervalo de 1-500 µg, más preferiblemente de 5-200 µg, más típicamente en el intervalo de 10-100 µg. El antígeno de norovirus total administrado en cada dosis será de aproximadamente 10 µg, aproximadamente 30 µg o aproximadamente 100 µg en un total de 20 mg de polvo seco cuando se administra en ambas fosas nasales o de 100 mg de polvo seco cuando se administra en una fosa nasal. Las características del polvo seco son tales que menos del 10% de las partículas tiene un diámetro menor de 10 µm. El tamaño medio de partícula oscila entre 10 y 500 µm de diámetro.

En otra realización, las composiciones antigénicas y para vacuna pueden formularse como líquido para su posterior administración a un sujeto. La formulación líquida prevista para administración intranasal comprenderá antígeno(s) de genogrupos de norovirus, adyuvante y un agente de administración tal como quitosano. Las formulaciones líquidas para administración intramuscular (i.m.) u oral comprenderán antígeno(s) de genogrupos de norovirus, adyuvante y un tampón, sin un agente de administración (por ejemplo, quitosano).

Preferiblemente, las composiciones antigénicas y para vacunas descritas anteriormente en este documento se liofilizan y conservan sin agua hasta que estén listas para su uso, momento en el cual se reconstituyen con diluyente, si se usan en una formulación líquida. Alternativamente, los diferentes componentes de la composición pueden conservarse por separado en un kit o dispositivo (estando uno o todos los componentes liofilizados). Los componentes pueden permanecer en forma liofilizada para la formulación seca o reconstituirse para formulaciones líquidas, y o bien mezclarse antes de su uso o bien administrarse por separado al paciente. Para su administración como polvo seco, la formulación para vacuna o antigénica puede cargarse previamente en un dispositivo de administración intranasal o un parche de administración tópica (p. ej., dérmica) y conservarse hasta su uso. Preferiblemente, este dispositivo de administración y el envase asociado protegerán y asegurarán la estabilidad de su contenido.

La liofilización de formulaciones antigénicas y para vacunas es bien conocida en la técnica. Típicamente, el antígeno líquido se liofiliza en presencia de agentes que lo protegen durante el proceso de liofilización y para obtener polvos con las características deseadas. Normalmente se utilizan azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o lactosa (presentes a una concentración inicial de 10-200 mg/ml) para la crioprotección y lipoprotección de los antígenos proteicos y para obtener pastillas o polvos liofilizados con las características deseadas. Las composiciones liofilizadas son, en teoría, más estables. También pueden utilizarse otras tecnologías de secado, como secado por pulverización o liofilización por pulverización. Mientras que el objetivo de la mayoría de los procesos de formulación es minimizar la agregación y degradación de la proteína, los inventores han demostrado que la presencia de antígeno agregado potencia la respuesta inmune frente a las VLP de norovirus (véanse los ejemplos 3 y 4 en modelos animales). Por tanto, los inventores han desarrollado procedimientos por los cuales puede controlarse el porcentaje de agregación del antígeno durante el proceso de liofilización para producir una proporción óptima de antígeno agregado para que un antígeno intacto induzca una respuesta inmune máxima en modelos animales.

Por tanto, la divulgación también abarca un procedimiento para obtener formulaciones de antígeno de norovirus que comprende a) preparar una solución previa a la liofilización que contiene el antígeno de norovirus, sacarosa y quitosano donde las proporciones de sacarosa con respecto a quitosano, son de aproximadamente 0:1 a aproximadamente 10:1; b) congelar la solución y c) liofilizar la solución congelada durante 30-72 horas, donde el producto liofilizado final contiene un porcentaje de dicho antígeno de norovirus en forma de agregado. La liofilización puede realizarse a temperatura ambiente, temperatura reducida o proceder en ciclos a diversas temperaturas. Solo con fines ilustrativos, la liofilización puede tener lugar en varios pasos, por ejemplo, un ciclo inicial a -69°C, ajustado gradualmente a -24°C durante 3 horas, manteniendo a continuación esta temperatura durante 18 horas, y ajustándola después gradualmente a -16°C durante 1 hora, manteniendo esta temperatura durante 6 horas y ajustándola a +34°C de forma gradual durante 3 horas y, finalmente, manteniendo esta temperatura durante 9 horas. En una realización, la solución previa a la liofilización contiene además un agente de carga. En otra realización, dicho agente de carga es manitol.

Las proporciones adecuadas de sacarosa y quitosano para obtener los porcentajes deseados de agregación pueden determinarse mediante las siguientes directrices. Una mezcla previa a la liofilización que contenga proporciones de masa de sacarosa con respecto al quitosano en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 10:1

producirá un intervalo de aproximadamente el 50% al 100% de antígeno de norovirus intacto (es decir, del 0% al 50% de antígeno agregado) tras la liofilización dependiendo de las concentraciones de la solución previa a la liofilización (véase el ejemplo 13). Las proporciones de masa de 0:1 de sacarosa con respecto a quitosano producirán menos del 30% de antígeno de norovirus intacto (es decir, más del 70% de antígeno agregado). La omisión tanto de sacarosa como de quitosano y el uso solo de un agente de carga, como manitol, producirá menos del 10% de antígeno intacto (es decir, más del 90% de antígeno agregado dependiendo de las concentraciones de la solución previa a la liofilización). Usando estas directrices, el experto podría ajustar las proporciones de masa de sacarosa con respecto a quitosano y las concentraciones en la mezcla previa a la liofilización para obtener la cantidad de agregación deseada para producir una respuesta inmune óptima.

Además, la inclusión de sacarosa, quitosano y manitol en la solución previa a la liofilización no tiene efecto negativo sobre la estabilidad del antígeno de norovirus intacto con el tiempo, es decir, la proporción de antígeno agregado/antígeno intacto en la formulación no aumenta cuando se conserva como polvo seco durante un periodo de aproximadamente 12 meses o más (véase el ejemplo 10). Por tanto, este procedimiento de liofilización garantiza formulaciones estables con proporciones predecibles y controlables de antígeno de norovirus agregado con respecto al antígeno intacto.

Procedimientos para estimular una respuesta inmune

La cantidad de antígeno en cada dosis de formulación antigénica o para vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmune sólida sin efectos adversos significativos. Esta cantidad variará dependiendo de qué antígenos específicos se empleen, ruta de administración y adyuvantes utilizados. En general, la dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente divulgación, debería ser suficiente para producir una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente con el tiempo o inducir la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por tanto, la composición se administra a un paciente en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune frente a antígenos específicos y/o aliviar, reducir o curar los síntomas y/o complicaciones de la enfermedad o infección. La cantidad adecuada para conseguir esto se define como una “dosis terapéuticamente eficaz”.

Para una forma sustancialmente pura del antígeno de norovirus, se prevé que cada dosis comprenda de aproximadamente 1 µg a 10 mg, preferiblemente aproximadamente 2-50 µg para cada antígeno de norovirus en la formulación. En un régimen de inmunización típica que emplea las preparaciones antigénicas de la presente invención, las formulaciones puede administrarse en varias dosis (p. ej., 1-4), conteniendo cada dosis 1-100 µg de cada antígeno. La dosis será determinada por la actividad inmunológica de la composición producida y la afección del paciente, así como el peso corporal o las áreas superficiales del paciente que se va a tratar. El tamaño de la dosis también se determinará por la existencia, naturaleza y grado de cualquier efecto secundario adverso que pudiera acompañar a la administración de una composición en particular a un paciente en especial.

Las formulaciones para vacunas o antigénicas de la presente divulgación pueden administrarse mediante una vía mucosa o no mucosa. Estas administraciones pueden incluir la administración *in vivo* mediante inyección parenteral (p. ej., intravenosa, subcutánea e intramuscular) u otras vías directas tradicionales, como vías bucal/sublingual, rectal, oral, nasal, tópica (como transdérmica y oftálmica), vaginal, pulmonar, intraarterial, intraperitoneal, intraocular o intranasal o directamente dentro de un tejido específico. Alternativamente, las vacunas de la divulgación pueden administrarse mediante cualquiera de las diversas vías, como oral, tópica, subcutánea, mucosa, intravenosa, intramuscular, intranasal, sublingual, transcutánea, subdérmica, intradérmica y mediante supositorios. La administración puede conseguirse simplemente mediante administración directa usando un parche, aguja, catéter o dispositivo relacionado, en un único punto temporal o en múltiples puntos temporales.

En una realización preferida, las formulaciones para vacunas o antigénicas de la presente divulgación se administran en una superficie mucosa. La inmunización a través de las superficies mucosas ofrece numerosas posibles ventajas sobre otras rutas de inmunización. Los beneficios más obvios son 1) la inmunización mucosa no requiere de agujas o personal muy preparado para su administración y 2) las respuestas inmunes se generan en el/los sitio(s) de entrada de patógenos, así como a nivel sistémico (Isaka y col., 1999; Kozlowski y col., 1997; Mestecky y col., 1997; Wu y col., 1997).

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmune mucosa IgA y una respuesta inmune sistémica IgG mediante la administración (preferiblemente intranasal u oral) en una superficie mucosa del paciente una composición antigénica o para vacuna que comprende uno o más antígenos de norovirus, al menos un adyuvante eficaz y/o al menos un agente de administración.

La presente divulgación también contempla la provisión de medios para la dispensación de las formulaciones intranasales de antígenos de norovirus definidas anteriormente en este documento y al menos un adyuvante o al menos un agente de administración como se define anteriormente en este documento. Un dispositivo de dispensación puede, por ejemplo, estar en forma de un sistema de administración como aerosol y puede prepararse para dispensar solo una dosis o diversas dosis. Este dispositivo podría administrar una dosis regulada de la formulación para vacuna o antigénica en las fosas nasales. Entre otros ejemplos de dispositivos apropiados se

incluyen, pero sin limitaciones, cuentagotas, torunda, aerosoles, insufladores (p. ej., dispositivo de administración nasal Valois Monopowder, Bepak UniDose DP), nebulizadores e inhaladores. Los dispositivos pueden administrar la formulación para vacuna o antigénica mediante sistemas pasivos que requieren que el sujeto inhale la formulación en su cavidad nasal. Alternativamente, el dispositivo puede administrar de forma activa la formulación mediante el bombeo o pulverización de una dosis dentro de la cavidad nasal. La formulación antigénica o para vacuna puede administrarse dentro de una o ambas fosas nasales mediante uno o más de estos dispositivos. La administración podría incluir dos dispositivos por sujeto (un dispositivo por fosa nasal). La dosis real de principio activo (antígeno de norovirus) puede ser de aproximadamente 5-1.000 µg. En una realización preferida, la formulación antigénica o para vacuna se administra en la mucosa nasal mediante depósito rápido dentro de las fosas nasales a partir de un dispositivo que contenga la formulación que se mantiene próximo o se inserta en la fosa nasal.

La divulgación también proporciona un procedimiento de generación de anticuerpos frente a uno o más antígenos de norovirus, comprendiendo dicho procedimiento la administración de una formulación antigénica o para vacuna de la invención tal como se describió anteriormente a ese sujeto. Estos anticuerpos pueden aislarse y purificarse mediante procedimientos rutinarios en la técnica. Los anticuerpos aislados específicos para los antígenos de norovirus pueden usarse en el desarrollo de ensayos inmunológicos diagnósticos. Estos ensayos podrían emplearse para detectar un norovirus en muestras clínicas e identificar el virus en concreto causante de la infección (p. ej., Norwalk, Houston, Montaña Nevada, etc.). Alternativamente, los anticuerpos aislados pueden administrarse a sujetos susceptibles de infección por norovirus para conferir una inmunidad pasiva o a corto plazo.

Como se mencionó anteriormente, las formulaciones para vacunas de la divulgación pueden administrarse a un sujeto para tratar los síntomas de una infección por norovirus. En la técnica son bien conocidos los síntomas de la infección por norovirus e incluyen náuseas, vómitos, diarrea y cólicos estomacales. Adicionalmente, un paciente con una infección por norovirus puede presentar febrícula, cefalea, escalofríos, dolor muscular y fatiga. La divulgación abarca un procedimiento de inducción de una respuesta inmune en un sujeto que sufre una infección por norovirus administrando al sujeto una formulación para vacuna de la invención de modo que se mejora y/o reduce al menos un síntoma asociado con la infección por norovirus. La reducción de un síntoma puede determinarse subjetiva u objetivamente, por ejemplo, autovaloración por un sujeto, valoración por un médico o realización de un ensayo o medición apropiada (p. ej., temperatura corporal), incluyendo, por ejemplo, una evaluación de la calidad de vida, una progresión más lenta de la infección por norovirus o de los síntomas adicionales, una reducción de la intensidad de los síntomas de norovirus o de ensayos adecuados (p. ej., valor del anticuerpo y/o ensayos de activación de células T). La evaluación objetiva comprende tanto evaluaciones animales como humanas.

Ejemplos

Ahora, la invención se ilustrará con mayor detalle en referencia a las realizaciones específicas descritas en los ejemplos siguientes. Se pretende que los ejemplos sean puramente ilustrativos de la invención y no pretenden limitar su alcance de ninguna forma.

Ejemplo 1. Investigaciones sobre respuestas inmunes a diferentes formas de antígenos de norovirus

Para estudiar la eficacia de las formulaciones para vacunas, se inmunizaron ratones por vía intranasal (i.n.) con una formulación para vacuna en suspensión líquida mediante una micropipeta. Los ratones recibieron solo una única dosis de vacuna (sensibilización).

Para el experimento, se prepararon tres formulaciones para vacuna. La primera, denominada 100% agregada, se preparó mediante liofilización de VLP en condiciones que alteran la estructura nativa de la VLP e induce agregación. La segunda, 100% intacta, se preparó con placebo liofilizado rehidratado, inoculada con VLP monodispersas 100% nativas a partir de soluciones madre de VLP no liofilizadas. La tercera formulación, mezcla 50/50, se hace mezclando las dos formulaciones previas en una proporción 1:1 o liofilizando en condiciones que producen VLP aproximadamente 50% intactas y 50% agregadas. El estado estructural y la concentración de VLP nativa intacta se evaluaron mediante cromatografía líquida de alta resolución de exclusión molecular (EM-HPLC) y absorbancia con luz ultravioleta (UV). La concentración de proteína total (que incluye el agregado) de las formulaciones se determinó mediante tinción cuantitativa de las proteínas resueltas en electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (PAGE-SDS). El porcentaje de agregada/intacta se calculó como la proporción de VLP nativa intacta frente a la proteína total.

Tabla 1. Las mezclas mostradas a continuación se prepararon para el experimento 605.125, vacunación líquida i.n. en ratón

Número de grupo	Quitosano (mg/ml)	Manitol (mg/ml)	Sacarosa (mg/ml)	MPL (mg/ml)	VLP de Norwalk (mg/ml)
1	3,5	0,750	0,750	1,0	1,0
2	3,5	0,750	0,750	1,0	1,0
3	3,5	0,750	0,750	1,0	1,0

4	3,5	0,750	0,750	1,0	0
Tabla 1. Sensibilización para el exp. 605.125 (i.n. en ratón) Los valores indican las concentraciones finales de las formulaciones.					

Dosis: 20 µl por ratón; 10 µl por fosa nasal.

Grupo 1, 100% agregada: VLP 100% agregadas rehidratadas.

Grupo 2; 100% intacta: placebo liofilizado rehidratado, inoculado con VLP 100% intactas a partir de una solución madre de VLP no liofilizada.

Grupo 3, mezcla 50/50: mezclas 1:1 de soluciones de los grupos 1 y 2.

Grupo 4, naïve: placebo liofilizado rehidratado.

En este experimento se mide la respuesta inmune en ratones frente a diferentes formulaciones de VLP de norovirus. Se vacunaron por vía intranasal (i.n.) a grupos de ratones (5 por grupo) una vez con las formulaciones en polvo seco rehidratadas mostradas en la Tabla 1. Los animales vacunados con formulaciones que contenían VLP recibieron la misma cantidad de proteína total. 100% agregada (proteína VLP agregada al 100%), 100% intacta (VLP monodispersas 100% nativas), mezcla 50/50 (mezcla 1:1 de VLP monodispersas y agregadas), naïve (sin proteína VLP). El día 14 tras la inmunización i.n., se sacrificó a los ratones, se extrajeron los ganglios linfáticos cervicales y los bazo y se preparó una única suspensión celular para los ensayos de proliferación celular *in vitro* específica de antígeno. En estos ensayos se evaluó la respuesta de las células de los ganglios linfáticos cervicales o de los esplenocitos para determinar las respuestas inmunogénicas frente al antígeno tras la inmunización *in vivo*. Las células de ganglios linfáticos cervicales o los esplenocitos fueron reestimulados con VLP monodispersas nativas (VLP nativa, barras negras) o con proteína de VLP desnaturalizada por calor (Δ VLP, barras blancas), y se determinó el grado de proliferación celular de cada forma de antígeno (100% agregada, 100% intacta, mezcla 50/50 o naïve) mediante la incorporación de timidina tritiada como se indica en el eje de ordenadas (CPM) (Figura 1, células de ganglio linfático cervical, Figura 2, esplenocitos).

Ejemplo 2: Ensayo de proliferación *in vitro* específico de antígeno

Para estudiar más en profundidad la potencia de las formulaciones para vacuna, se inmunizó a ratones por vía intraperitoneal (i.p.) con la formulación para vacuna en suspensión líquida. Los ratones recibieron solo una única dosis de vacuna (sensibilización).

De forma similar al ejemplo 1, se vacunaron grupos de ratones (5 por grupo), aunque esta vez por vía intraperitoneal (i.p.), una vez con las formulaciones en polvo seco rehidratadas mostradas en la Tabla 2. De nuevo, los animales vacunados con formulaciones que contenían VLP recibieron la misma cantidad de proteína total. 100% agregada (proteína VLP agregada al 100%), 100% intacta (VLP intactas 100% nativas); mezcla 50/50 (mezcla 1:1 de VLP intactas y agregadas), naïve (sin proteína VLP).

Tabla 2. Las mezclas mostradas a continuación se prepararon para el experimento 605.127, inmunización líquida *i.p.* en ratón.

Número de grupo	Quitosano (mg/ml)	Manitol (mg/ml)	Sacarosa (mg/ml)	MPL (mg/ml)	VLP de Norwalk (mg/ml)
1	7	1,475	1,475	0,025	0,025
2	7	1,475	1,475	0,025	0,025
3	7	1,475	1,475	0,025	0,025
4	7	1,475	1,475	0,025	0
Sensibilización para el exp. 605.127 (<i>i.p.</i> en ratón) Los valores indican las concentraciones finales de las formulaciones y son equivalentes a un dispositivo de administración único de 10 mg.					

Dosis: 1 ml *i.p.* por ratón.

Grupo 1, 100% agregada: VLP 100% agregadas rehidratadas.

Grupo 2; 100% intacta: placebo liofilizado rehidratado, inoculado con VLP 100% intactas a partir de una solución madre de VLP no liofilizada.

Grupo 3, mezcla 50/50 : rehidratado a partir de VLP liofilizada intacta/agregada 50/50.

Grupo 4, naïve: placebo liofilizado rehidratado.

En este ensayo se midió la respuesta de diferentes células murinas a las VLP tras la inmunización *in vivo*. El día 14 después de la inmunización, los ratones fueron sacrificados, se extrajeron los bazo y se preparó una única suspensión celular. Los esplenocitos fueron estimulados de nuevo con VLP intactas nativas (VLP nativa, barras punteadas) o con proteína de VLP desnaturalizada por calor (Δ VLP, barras blancas), y se determinó el grado de proliferación celular de cada forma de antígeno (100% agregada, 100% intacta, mezcla 50/50 o naïve) mediante la incorporación de timidina tritiada como se indica en el eje de ordenadas (CPM) (Figura 3). Estos datos indican que diferentes formas biofísicas de las VLP preparadas en las formulaciones para vacuna desencadenan respuestas de células T comparables.

10 Ejemplo 3. Ensayo ELISPOT específico de VLP

Las respuestas de células secretoras de anticuerpos (CSA) específicas de VLP se midieron en ratones inmunizados por vía intraperitoneal con las diferentes formulaciones VLP de NV descritas en el ejemplo 2. Se vacunaron grupos de ratones (5 por grupo) i.p. una vez con las formulaciones en polvo seco rehidratadas mostradas en la Tabla 2 (ejemplo 2). Los animales vacunados con formulaciones que contenían VLP recibieron la misma cantidad de proteína total. 100% agregada (proteína VLP agregada al 100%), 100% intacta (VLP intactas 100% nativas); mezcla 50/50 (mezcla 1:1 de VLP intactas y agregadas), naïve (sin proteína VLP). A día 14, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los ganglios linfáticos cervicales. Las células de los ganglios linfáticos cervicales se cultivaron durante la noche en placas de ELISPOT recubiertas con VLP intactas nativas y se desarrollan los ELISPOT específicos de IgG o IgA usando los anticuerpos secundarios conjugados peroxidada de rábano picante (HRP) apropiados (Figura 4). Estos datos muestran que las tres formulaciones de antígeno de VLP inducían una respuesta de células B específica de antígeno. El grupo inmunizado con VLP 100% agregada mostraba la mayor respuesta inmune.

25 Ejemplo 4. ELISA específico de VLP

Los niveles de IgG sérica se midieron a partir de ratones inmunizados i.p. con diferentes formulaciones de VLP de NV. Se vacunaron grupos de ratones (5 por grupo) i.p. una vez con las formulaciones en polvo seco rehidratadas mostradas en la Tabla 2 (ejemplo 2). Los animales vacunados con formulaciones que contenían VLP recibieron la misma cantidad de proteína total. 100% agregada (proteína VLP agregada al 100%), 100% intacta (VLP intactas 100% nativas); mezcla 50/50 (mezcla 1:1 de VLP intactas y agregadas), naïve (sin proteína VLP). A día 14, se recogió el suero y se analizó mediante ELISA la IgG en suero específica anti-VLP (Figura 5). Estos datos se correlacionan con los resultados mostrados en el ejemplo 3, lo que indica que las tres formulaciones de antígeno VLP inducen una respuesta de células B específica de antígeno. Una vez más, el grupo inmunizado con VLP 100% agregada mostraba la mayor respuesta inmune.

35 Ejemplo 5. Formulaciones para vacuna en conejos

Las formulaciones se administraron a conejos por vía intranasal (i.n.) usando el dispositivo de administración nasal MonoPowder de Valois. Las formulaciones en polvo seco se muestran en las tablas 3 y 4.

40 Tabla 3. Las formulaciones descritas a continuación se prepararon para el experimento 605.129, vacunación con polvo seco (PS) i.n. en conejo

45 Formulaciones de sensibilización para el exp. 605.129 (i.n. en conejo) (cantidades finales para las vacunas de PS).

Número de grupo	Quitosano (mg/10 mg de PS)	Manitol (mg/10 mg)	Sacarosa (mg/10 mg)	MPL (mg/10 mg)	VLP de Norwalk (ml/10 mg)
1	7	1,475	1,475	0,025	0,025
2	7	1,475	1,475	0,025	0,025
3	7	1,475	1,475	0,025	0,025
4	7	1,475	1,475	0,025	0

Los valores indican las concentraciones finales de las formulaciones según un dispositivo único (10 mg de PS) que es 1/2 de la dosis total.

Dosis: 20 mg de PS por animal, 10 mg por fosa nasal.

50 Grupo 1, 100% agregada: VLP liofilizadas 100% agregadas.

Grupo 2; 100% intacta: VLP liofilizadas 100% intactas

Grupo 3, mezcla 50/50: VLP liofilizadas intactas/agregadas 50/50 (no una mezcla de 1 y 2).

55 Grupo 4, naïve: placebo.

Tabla 4. Las formulaciones mostradas a continuación se prepararon para el experimento 605.129, vacunación con polvo seco (PS) i.n. en conejo.

Formulaciones de recuerdo para el exp. 605.129 (i.n. en conejo) (cantidades finales para las vacunas de PS).

Número de grupo	Quitosano (mg/ 10mg de PS)	Manitol (mg/ 10mg)	Sacarosa (mg/ 10mg)	MPL (mg/ 10mg)	VLP de Norwalk (mg/ 10mg)
1	7	1,475	1,475	0,025	0,025
2	7	0	2,95	0,025	0,025
3	7	1,475	1,475	0,025	0,025
4	7	1,475	1,475	0,025	0

Los valores indican las concentraciones finales de las formulaciones según un dispositivo único (10 mg de PS) que es 1/2 de la dosis total.

Dosis: 20 mg de PS por animal, 10 mg por fosa nasal.

Grupo 1, 100% agregada: VLP 100% agregadas liofilizadas.

Grupo 2; 100% intacta: VLP* 100% intactas**

Grupo 3, mezcla 50/50: VLP liofilizadas intactas/agregadas 50/50 (no una mezcla de 1 y 2).

Grupo 4, naïve: placebo liofilizado.

*Formuladas sin manitol para aumentar la cantidad de VLP intactas tras la liofilización.

**La preparación produce solo ~80% de VLP intactas.

Ejemplo 6. Ensayo de potencia de la formulación para vacuna de norovirus en ratones

Se inmunizaron ratones C57B16 hembra por vía intraperitoneal (i.p.) el día 0 con diferentes diluciones de una vacuna en polvo seco de VLP de Norwalk reconstituida (que contenía VLP de Norwalk, MPL y quitosano). Se inyectaron a cada animal 100 µl de las formulaciones indicadas. Se recogió el suero cada semana y se midió la IgG en suero anti-VLP mediante ELISA. Los valores del suero recogido 3 semanas después de la inmunización se muestran en la Figura 6.

Se representa el valor de cada ratón individual, indicando las barras la media del grupo. Los valores de IgG anti VLP en suero se correlacionan con la dosis de vacuna indicada. Este diseño experimental ha sido refinado y desarrollado como ensayo de potencia necesario para el lanzamiento de vacunas fabricadas según al BPF para ensayos clínicos en humanos (Figura 6).

Ejemplo 7. Potencia de las formulaciones de norovirus líquidas frente a reconstituidas en ratones

Se inmunizó a ratones C57B16 hembra i.p. el día 0 con formulaciones que contenían quitosano, manitol, MPL y diversas concentraciones de VLP de Norwalk (Tabla 5) en un volumen de 100 µl. Se generó una curva patrón interna (grupos 1-5) solubilizando 10 mg/ml de matriz en polvo seco (manitol, MPL y quitosano) en agua purificada y se añadieron las cantidades especificadas de VLP de Norwalk líquida. Por el contrario, los lotes de VLP según la BPF se liofilizaron previamente y, a continuación, se solubilizaron en 1,0 ml de agua purificada (grupos 6-8). Se recogió suero de los ratones los días 14, 21 y 30 y la IgG anti-VLP de Norwalk en suero se midió mediante ELISA.

Tabla 5. Formulaciones de Norwalk líquidas y reconstituidas utilizadas en ratones inmunizados (i.p.).

Grupo	Tratamiento	IC del 95%	Potencia calculada		
			Potencia	Mín.	Máx.
1	5 µg de VLP en placebo	0,173	58,0	39,0	86,3
2	2,5 µg de VLP en placebo	0,192	23,3	15,0	36,3
3	1,25 µg de VLP en placebo	0,182	11,2	7,4	17,0
4	0,63 µg de VLP en placebo	0,287	5,4	2,8	10,4
5	0,31 µg de VLP en placebo	0,114	3,8	2,9	4,9
6	2,5 µg del lote BPF	0,276	11,3	6,0	21,3
7	7,5 µg del lote BPF	0,221	96,8	58,2	161,0
8	25 µg del lote BPF	0,147	113,6	80,9	159,5

La potencia relativa de cada formulación se calculó usando la siguiente fórmula: Antilog. (Media – intersecc.Y/pendiente). La potencia se representa frente a la concentración de VLP en las formulaciones y se notifica

en relación con la curva patrón generada usando cantidades conocidas de VLP inoculadas dentro del fondo de la matriz (Figura 7). Los resultados mostrados son representativos de 3 puntos temporales de recogida de suero independientes. Estos datos indican que la formulación de VLP de Norwalk reconstituida a partir de polvo seco tiene una potencia total más alta que las formulaciones líquidas.

5

Ejemplo 8. Potencia de la formulación en polvo seco en conejos

Se inmunizaron por vía intranasal (i.n.) 43 conejos hembra New Zealand White usando el dispositivo de administración nasal Monopowder de Valois con 5 µg (Bajo) o 25 µg (Alto) de VLP de Norwalk ± MPL y ± quitosano formulados como polvos secos. Un grupo recibió la dosis Alta de VLP y MLP formulados como líquido y administrados por vía intramuscular (i.m.). Los conejos se vacunaron los días 0 y 21. Cuando se utilizó MPL, se hizo a la misma dosis que las VLP (es decir, 5 µg de VLP de Norwalk y 5 µg de MPL). Cuando se utilizó quitosano, se hizo a 7 mg/dosis.

10

15

20

La IgG específica en suero para las VLP de Norwalk (según se determina por ELISA), se muestra en la Figura 8. Se muestra la media de los valores para cada grupo de tratamiento del día 21 (panel izquierdo, recogido justo antes de la administración de la inmunización de recuerdo) y del día 42 (panel izquierdo). Los valores se presentan en U/ml de IgG específica de VLP, con 1 U aproximadamente por 1 µg. Las desviaciones típicas se indican mediante barras. Todos los grupos de tratamiento tenían 6 animales, excepto el grupo control negativo (3 conejos) y el grupo inmunizado por vía intramuscular (4 animales). Estos datos muestran que, generalmente, la dosis de VLP más alta da lugar a niveles más altos de IgG anti-VLP en suero. El quitosano, en particular, potencia las respuestas a vacunas intranasales. El grupo inmunizado i.m. mostró las mayores respuestas. Sin embargo, los niveles de IgG específica de VLP en los grupos inmunizados por vía intranasal también fueron bastante sólidos.

25

Ejemplo 9. Potencia de las formulaciones de norovirus líquidas frente a secas administradas por vía intranasal en conejos

Los conejos New Zealand White hembra fueron inmunizados por vía intranasal usando el dispositivo de administración nasal Monopowder de Valois con 50 µg de VLP de Norwalk + 50 µg de MPL + 14 mg de quitosano formulados como un polvo seco o un líquido. El contenido de la vacuna era idéntico, excepto por el estado físico. Las inmunizaciones se realizaron los días 0 y 21 (semanas 0 y 3), con recogida de suero antes de la dosis de recuerdo a las 3 semanas y de nuevo a las 6 semanas después de la vacunación inicial. La IgG específica en suero para las VLP de Norwalk se midió mediante ELISA y los resultados se muestran en la Figura 9.

30

35

40

Se indican las medias de grupo, representando las barras las desviaciones típicas. El grupo de inmunización con polvo seco estaba compuesto por 6 conejos y el grupo de inmunización líquida por 10 conejos. Se representan 8 conejos control negativo. Se observaron pequeñas diferencias entre los grupos de inmunización líquida y con polvo seco a las 3 semanas; sin embargo, 6 semanas tras la inmunización inicial, los conejos inmunizados con la formulación en polvo seco presentaban respuestas IgG anti-VLP en suero superiores en comparación con el grupo de inmunización líquida.

Ejemplo 10. Estabilidad de las formulaciones en polvo seco de norovirus

Para estudiar la estabilidad de la formulación de VLP en polvo seco, el fármaco sin procesar se preparó mezclando (por cada 10 mg de fármaco) 25 µg de una VLP del genogrupo I en solución con 25 µg de MPL, 700 µg de glutamato de quitosano, 1.475 mg de manitol y 1.475 mg de sacarosa. La solución se liofilizó, se mezcló con 6,3 mg de glutamato de quitosano adicional (por cada 10 mg de fármaco), se cargó en dispositivos monodosis Bepak a un valor nominal de 10 mg de polvo seco y se conservó en bolsas de aluminio selladas con cápsulas de desecante. El contenido total de VLP se midió usando PAGE-SDS teñido con rojo Imperial y se hizo un escáner de densitometría, mientras que se usó la cromatografía de exclusión molecular (CEM) para cuantificar el contenido de VLP intactas. Estas medidas indicaban que, dentro del error experimental, los cambios en la VLP total o intacta no eran detectables durante el periodo de 12 meses (Figura 10). Asumiendo que la menor recuperación de la proteína VLP por CEM, en comparación con los resultados del PAGE en presencia de SDS, era debido a la agregación, el porcentaje agregado calculado no aumentaba con el tiempo sino que más bien permanecía constante o disminuía a lo largo de los 12 meses de conservación. Uno de los problemas de estabilidad más frecuente con las proteínas es un aumento de la agregación durante su conservación. En función de los resultados presentados en la Figura 10, puede concluirse que la formulación da lugar a un porcentaje estable de VLP intactas, lo que permite la fabricación y uso del producto durante al menos un periodo de un año.

45

50

55

60

Ejemplo 11. Antígenos múltiples de norovirus

Se inmunizaron 8 ratones C57Bl/6 (hembras de 9 semanas de edad) por vía intraperitoneal (i.p.) los días 0 y 14 con 2,5 µg de VLP de Norwalk formuladas con 0,7 mg de quitosano, 2,5 µg de MPL y 0,3 mg de manitol llevado a 0,1 ml con agua. Se inmunizaron dos ratones control con solución salina. Los días 28 y 49 se inmunizaron de nuevo i.p. con 2,5 µg de VLP de Norwalk + 2,5 µg de VLP de Houston formuladas con 0,7 mg de quitosano, 2,5 µg de MPL y 0,3 mg de manitol llevado a 0,1 ml con agua. Los ratones control recibieron solución salina de nuevo. Las muestras

65

de suero se recogieron cada semana a partir de la semana 5 (día 35) y se analizó por ELISA su reactividad con VLP de Norwalk o VLP de Houston. El momento de la inmunización de recuerdo con las mezclas solo de Norwalk se indican mediante las flechas delgadas y las mezclas de VLP de Norwalk + Houston se indican mediante flechas gruesas. Se muestran las respuestas de IgG en suero individuales específicas para las VLP de Norwalk (panel superior) o VLP de Houston (panel inferior) en U/ml (con aproximadamente 1 U por 1 µg de IgG). Las medias están indicadas por barras. Téngase en cuenta que las escalas del eje Y son diferentes, ya que las respuestas anti-Norwalk eran mucho más sólidas debido a dos inmunizaciones previas los días 0 y 14 (semanas 0 y 2). Sin embargo, las respuestas frente a las VLP de Houston son bastante sólidas, con la aparición de un gran aumento en la segunda semana tras la inmunización de recuerdo. Estos datos demuestran que pueden generarse respuestas inmunes específicas frente a diferentes cepas antigénicas de VLP de norovirus en la misma mezcla inmunizante (Figura 11).

Ejemplo 12. Respuesta inmune frente a diferentes antígenos de norovirus

Se inmunizaron ratones C57B16 hembra por vía intraperitoneal (i.p.) los días 0 y 14 con 25 µg de VLP de Norwalk, 25 µg de VLP de Houston o una combinación de 25 µg de VLP de Norwalk y 25 µg de VLP de Houston. Se recogió el suero cada semana y se midió la IgG en suero anti-VLP mediante ELISA. Los valores del suero recogido 4 semanas después de la inmunización se muestran en la Figura 12.

El contenido de VLP de las inmunizaciones se indica en el eje X. Se representa en valor de cada ratón individual, indicando las barras la media del grupo. Los niveles de anticuerpos se representan en U/ml, siendo 1 U aproximadamente 1 µg de IgG en suero. Los valores en el panel izquierdo se determinaron usando VLP de Norwalk como agente de captura, mientras que las VLP de Houston se usaron para recubrir las placas de ELISA para medir los valores del panel de la derecha. Estos datos muestran que la inmunización con VLP de Norwalk no induce la obtención de anticuerpos en suero que son capaces de reconocer las VLP de Houston o viceversa.

Ejemplo 13. Las mezclas de sacarosa y quitosano conservan la estructura de VLP de norovirus en las formulaciones en polvo seco

En los experimentos siguientes se examinaron los efectos de la sacarosa, el quitosano y el manitol solo o en combinación, en soluciones previas a la liofilización en la estructura cuaternaria de las VLP nativas de Norwalk durante la liofilización. La Tabla 6 es una mezcla de varios experimentos que muestra las concentraciones de las soluciones previas a la liofilización de los constituyentes de interés, el volumen total de la mezcla y las proporciones de masa correspondientes. Todas las soluciones se removieron manualmente y se agitaron con suavidad hasta homogeneidad, a continuación se congelaron en nitrógeno líquido y se liofilizaron de forma externa a la unidad usando recipientes con tubo lateral durante tiempos que oscilaban de aproximadamente 30 a 60 horas.

Tabla 6. Mezclas de solución prelioofilización utilizadas para comprobar los efectos de diferentes concentraciones y combinaciones de sacarosa, glutamato de quitosano (quitosano) y manitol sobre la estructura cuaternaria de las VLP de Norwalk.

Experimento y muestra	Concentraciones de las soluciones de constituyentes previas a la liofilización (mg/ml)				Volumen total (ml)	Equivalentes de masa S = sacarosa Q = quitosano M = manitol		
	Sacarosa	Quitosano	Manitol	VLP (proteína)		S	Q	M
LE1	0	0	100	0,83	0,30	0	0	1
LE2	0	0	75,0	0,62	0,40			
LE3	0	0	50,0	0,42	0,60			
LE4	0	0	25,0	0,21	1,20			
LE5	0	0	10,0	0,08	3,00			
LG1-LG3	0	7,83	0	0,20	1,28	0	1	0
LG4-LG6	0	5,06	0	0,13	1,98			
LG7-LG9	0	2,09	0	0,05	4,78			
LG10	19,32	1,93	0	0,05	5,18	10	1	0
LG11	10,05	2,01	0	0,05	4,98	5	1	
LG12	5,13	2,05	0	0,05	4,88	2,5	1	
LG13	9,52	0,00	0	0,09	2,63	1	0	
LJ1-LJ2	5,29	2,51	0	0,09	2,79	2	1	0
LJ3-LJ4	4,17	1,98	0	0,07	3,54			
LJ5-LJ6	3,65	1,73	0	0,06	4,04			
LJ7-LJ8	2,93	1,39	0	0,05	5,04			
LJ9-LJ10	5,25	2,49	0	0,09	2,81			
LJ11-LJ12	4,14	1,97	0	0,07	3,56			

LJ13-LJ14	3,63	1,72	0	0,06	4,06			
LIG1d-Sa	2,98	1,42	0,00	1,12	4,94	2	1	0
LIG1d-S1	12,89	6,12	0,00	1,12	2,29	2	1	0
LIG1d-S2	12,26	5,82	12,26	0,67	2,41	1	0,5	1
LIG1d-Sb	2,95	1,40	2,95	0,67	5,00	1	0,5	1
LIG1d-S3	29,32	0,00	29,32	0,83	1,01	0	0	1

En la Tabla 7 se muestran los resultados del análisis por cromatografía líquida de alta resolución de exclusión molecular (EM-HPLC) de las muestras liofilizadas mostradas en la Tabla 6. Las muestras liofilizadas se reconstituyeron con agua y se analizaron mediante EM-HPLC. Las VLP de NV sin procesar, analizadas simultáneamente, se usaron como patrón de referencia para cuantificar el contenido en VLP de NV de las muestras problema reconstituidas. Se usaron tanto detectores UV como de fluorescencia para la cuantificación (los datos mostrados son del detector de fluorescencia). El EM-HPLC se realizó usando una columna de Superose™ 6 10-300, con una fase móvil que consiste en fosfato sódico 10 mM, ácido cítrico 10 mM, pH 5 y NaCl 500 mM, a un flujo de 0,5 ml/min. Las concentraciones de proteína se cuantificaron usando áreas integradas de picos de elución. “VLP” es el pico que eluye de la columna aproximadamente a los 15 min y cualquier hombro precedente y/o cola del pico dentro del intervalo de tiempo de elución aproximado de las VLP del NV patrón de referencia analizado de forma simultánea. El fragmento de VLP que eluye de la columna aproximadamente a los 32 minutos es una especie única muy estable resultado de la desestabilización y el consiguiente desensamblaje de las VLP. No se observaron fragmentos intermedios y más pequeños.

Los resultados muestran que las combinaciones de sacarosa y quitosano producían una amplia gama de recuperaciones de VLP de NV monodispersas nativas incluyendo las más altas (aproximadamente el 100% de recuperación) posteriores a la liofilización (muestras LG10-LG12). Además, las formas de los picos de elución de las VLP de NV de estas muestras eran idénticas al patrón de referencia de VLP de NV sin procesar, lo que indica una alta conservación de la estructura nativa. Las muestras que contenían sacarosa solo mostraban formas de pico similares al patrón de referencia, aunque las recuperaciones de VLP de NV eran menores (recuperación de aproximadamente el 60% [muestra LG13]). Las muestras que contenían solo manitol producían VLP prácticamente agregadas por completo (muestras LE1-LE6 y LIG1d-S3). Los efectos perjudiciales del manitol sobre la estructura de las VLP de NV se contrarrestaban por la presencia de quitosano y sacarosa (muestras LIG1d-S2 y LIG1d-SB).

Tabla 7. Experimento e identificación de la muestra y resultados del análisis del efecto de la sacarosa, el quitosano y el manitol y combinaciones de los mismos sobre la estabilidad de la estructura de las VLP de NV durante la congelación y la liofilización.

Experimento y muestra	Conc. teórica de VLP (mg/ml)	N	Media de la concentración de proteína medida y tiempo de elución del pico por EM-HPLC		Valores porcentuales medios de proteína recuperada como porcentaje del valor teórico		Equivalentes de masa S = sacarosa Q = quitosano M = manitol		
			“VLP” ~15 min (mg/ml)	Fragmento de VLP ~32 min (mg/ml)	Proteína total (%)	“VLP” (%)	S	Q	M
LG1-LG9	0,25	9	0,06	0,00	24,0	24,0	0	1	0
LG10	0,25	1	0,25	0,00	101	101	10	1	0
LG11	0,25	1	0,25	0,00	101	101	5	1	0
LG12	0,25	1	0,25	0,00	100	100	2,5	1	0
LG13	0,25	1	0,16	0,00	65	65	1	0	0
LJ1-LJ14	0,25	14	0,22	0	85,4	85,4	2	1	0
LIG1d-S1	0,25	1	0,21	0	88	88	2	1	0
LIG1d-Sa	0,25	1	0,12	0	50	50	2	1	0
LIG1d-S2	0,25	1	92	0	92	92	1	0,5	1
LIG1d-Sb	0,25	1	60	0	60	60	1	0,5	1
LIG1d-S3	0,25	1	< 1	< 1	< 1	< 1	0	0	1

Ejemplo 14. Inducción de células plasmáticas de larga duración y de células B de memoria específicas de norovirus en ratones inmunización por vía intranasal

A. Células plasmáticas de larga duración específicas de VLP de Norwalk

Se inmunizaron ratones BALB/c por vía intranasal con VLP de norovirus y un adyuvante. A los controles naïve se les administró solo adyuvante. A los 114 días tras la inmunización, se extrajeron el bazo, los ganglios linfáticos cervicales y la médula ósea de ambos grupos de ratones. El día de la extracción de los tejidos (día 0), se analizó la

presencia de células secretoras de anticuerpos (CSA) específicas de antígeno usando un ensayo ELISPOT. En la Figura 13A-C se presentan los resultados de los diferentes tejidos. La detección de inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) en estos tejidos indica la presencia de células plasmáticas de larga duración específicas de norovirus.

5 B. Células B de memoria específicas de VLP de Norwalk

Se desarrolló un ensayo *in vitro* para detectar la presencia de células B de memoria específicas de VLP de Norwalk a partir de ratones inmunizados por vía intranasal con VLP de Norwalk. Los diversos tejidos linfoides o la sangre completa (células mononucleares de sangre periféricas, esplenocitos, células de ganglios linfáticos, etc.) pueden servir como fuente de células en las que puede analizarse la presencia de células B de memoria usando este ensayo.

En este experimento, se extrajo y procesó el bazo de los animales inmunizados y naïve (controles) y se cultivaron los esplenocitos durante cuatro días en presencia o ausencia (controles) de VLP de Norwalk (20 µg/ml). Se realizó un ensayo ELISPOT inicial específico de VLP el día de la extracción de tejido (día 0) para establecer los niveles basales de CSA (véase la sección A anterior). Después de cuatro días en cultivo, se recogieron las células y se analizaron de nuevo en un ensayo ELISPOT para cuantificar la cantidad de CSA específicas de VLP. La diferencia en la cantidad de CSA específicas de VLP entre los ensayos del día 0 y del día 4 representa la población de células B de memoria específicas de antígeno. Los resultados de este experimento se muestran en las Figuras 14A y B.

20 Ejemplo 15. Respuestas de las células B de memoria específicas de norovirus en conejos

Se inmunizaron dos conejos New Zealand White hembra por vía intranasal con una formulación en polvo seco compuesta por 25 µg de VLP de Norwalk, 25 µg de MPL, 1,5 mg de manitol, 1,5 mg de sacarosa y 7,0 mg de quitosano por 10 mg de polvo seco cargada en dispositivos de administración intranasal Mark 4 de Valois. Los dos conejos recibieron un total de tres inmunizaciones a intervalos de 14 días. Para estos experimentos, se usó un conejo hembra no inmunizado como control naïve.

30 A. Obtención y procesamiento de los tejidos de conejo

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC): Se obtuvo sangre completa (~50 ml) de conejos en tubos de extracción que contenían EDTA para evitar la coagulación. La sangre completa se diluyó 1:3 con D-PBS estéril y se pusieron ~35 ml de sangre completa diluida en una capa sobre 15 ml de medio de separación Lympholyte en un tubo de centrifuga de 50 ml. Los tubos se centrifugaron a 800xg durante 20 minutos a temperatura ambiente. La capa leucoplaquetaria que contenía los PBMC se retiró con cuidado usando una pipeta estéril de 5 ml y las células se lavaron dos veces con D-PBS. En caso necesario, los eritrocitos contaminantes se eliminaron mediante lisis con ACK. Las células se resuspendieron en medio RPMI-1640-STF al 10% (1640-C) y se contaron en un hemocitómetro usando un procedimiento de exclusión con Trypan.

Células de ganglios linfáticos mesentéricos: Tras ser sacrificados, se extrajeron de forma aséptica los ganglios linfáticos mesentéricos de cada conejo por separado. Los tejidos se mantuvieron en una placa de Petri estéril de plástico que contenía ~10 ml de RPMI-1640-sin suero (1640-SS). Los ganglios linfáticos se pasaron a través de una malla estéril usando un mortero estéril para dispersar el tejido y obtener una única suspensión de células de ganglio linfático. Las células se recogieron, lavaron dos veces con 1640-SS y, finalmente, se filtraron a través de un filtro estéril de 70 µm para eliminar aglomerados y restos celulares. Las células se resuspendieron en 1640-C y se contaron en un hemocitómetro usando un procedimiento de exclusión con azul de Trypan.

Esplenocitos: Se obtuvieron los bazos en condiciones asépticas de cada conejo tras ser sacrificados. Los bazos se colocaron en placas de Petri estériles que contenían aproximadamente 10 ml de 1640-NS. Usando una aguja de calibre 22 estéril y una jeringa, se inyectó repetidamente el medio en el tejido para romper la cápsula esplénica y obtener las células. A continuación se usaron pinzas estériles para disgregar los fragmentos de tejido restantes. El contenido de la placa de Petri se transfirió a un tubo de centrifuga estéril y la suspensión celular y el tejido esplénico roto se dejaron asentar durante 6-8 minutos para que sedimentaran los fragmentos grandes de tejido. La suspensión celular única se transfirió a un segundo tubo de centrifuga estéril y las células se lavaron una vez con 1640-NS. Los eritrocitos de la preparación de esplenocitos se eliminaron mediante lisis con ACK (8 ml de tampón ACK, 8 minutos, a temperatura ambiente) y las células se lavaron una vez más con 1640-NS y, finalmente, se filtraron a través de un filtro estéril de 70 µm para eliminar los agregados y los restos celulares. El sedimento celular final se resuspendió en medio 1640-completo y se contaron en un hemocitómetro usando un procedimiento de exclusión con azul de Trypan.

Células de la médula ósea: Se obtuvieron los huesos de la tibia de las patas inferiores de los conejos individuales tras su sacrificio. Para extraer las células de la médula ósea, se cortaron los extremos de los huesos usando una sierra para huesos y se extrajo el contenido de los huesos mediante lavado con inyecciones repetidas de medio 1640-NS. Las células de médula ósea se pipetearon arriba y abajo repetidamente para romper y dispersar los agregados de células. Las células se lavaron una vez con medio 1640-NS, los eritrocitos se lisaron con medio ACK y las células se lavaron una vez más con 1640-NS. Finalmente, las células se filtraron a través de un filtro de 70 µm

para eliminar los agregados y los restos celulares. El sedimento celular final se resuspendió en medio 1640-completo y se contaron en un hemocitómetro usando un procedimiento de exclusión con azul de Trypan.

B. Ensayo ELISPOT

5 Tras humedecer previamente y lavar las placas de filtración de PVDF de Millipore de 96 pocillos, se recubrieron con una solución estéril de VLP de Norwalk nativa a una concentración de 40 µg/ml en un volumen final de 50 µl/pocillo. Las placas se incubaron durante toda la noche a 4°C, se lavaron con D-PBS y se bloquearon con la adición de 1640-C. Las células de los ganglios linfáticos mesentéricos, los esplenocitos y las células de médula ósea de los conejos
10 inmunizados y de los conejos control naïve se añadieron a los pocillos a concentraciones variables (1×10^6 , 5×10^5 , 2×10^5 y 1×10^5 células/pocillo) y las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C. Las placas se lavaron abundantemente con PBS-Tween, se añadieron reactivos secundarios específicos de IgG e IgA de conejo a los pocillos y se incubaron durante 2 horas más a temperatura ambiente. Tras un lavado exhaustivo, las placas se
15 desarrollaron con cromógeno DAB/sustrato y se leyeron en un lector de placas de ELISPOT. Las manchas que aparecieron en los pocillos de los animales control sin inmunización se restaron de los grupos experimentales. Los datos se expresan como células secretoras de anticuerpos específicas de VLP de Norwalk y se normalizaron por 1×10^6 células.

C. Ensayo de células B de memoria específicas de VLP de Norwalk

20 Las células linfoides aisladas de los diversos tejidos descritas anteriormente se resuspendieron en medio 1640-C en presencia de VLP de Norwalk (10 µg/ml) a una densidad de 5×10^6 células por ml. Las células se incubaron en placas de 24 pocillos en volúmenes de 1 ml durante cuatro días a 37°C. Los ensayos de ELISPOT específicos de VLP se realizaron sobre estas células en el momento del cultivo. Después de cuatro días en cultivo, las células se
25 transfirieron, lavaron dos veces con medio 1640-NS, se resuspendieron en el 1640-Completo y se contaron en un hemocitómetro usando un procedimiento de exclusión con azul Trypan. Las células se probaron de nuevo en un ensayo de ELISPOT específico de VLP de Norwalk. Los datos obtenidos de los ensayos ELISPOT realizados el día de obtención de los tejidos se refieren como actividad CSA a día 0 (fondo). Cualquier mancha detectada en el punto temporal del día 0 se asume como células plasmáticas de secreción activa o células plasmáticas de larga duración (CPLD). Los datos obtenidos del ensayo ELISPOT realizado con las células en cultivo a día 4 se refieren como
30 actividad CSA a día 4 y la actividad de células B de memoria están representadas por la diferencia entre la actividad CSA a día 4 y la actividad CSA a día 0.

D. Las células B de memoria específicas de VLP de Norwalk están presentes en sangre periférica de conejos inmunizados por vía intranasal

35 La sangre completa se obtuvo de dos conejos inmunizados (RB735 y RB1411) 141 días después de la última de las tres inmunizaciones intranasales con una formulación para vacuna en polvo seco que contenían VLP de Norwalk, como se describe anteriormente. También se obtuvo sangre de un conejo naïve, no inmunizado. La sangre se
40 procesó para obtener células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y las PBMC se colocaron en un ensayo de células B de memoria específicas de VLP de Norwalk (sección C anterior). Los resultados se muestran en la Figura 15. En el panel izquierdo se muestran los resultados del ensayo ELISPOT inicial en el momento de la obtención del tejido (CSA a día 0). En el panel derecho se muestran los resultados del ensayo ELISPOT después de
45 4 días en cultivo con VLP de Norwalk (CSA a día 4).

Los resultados del ensayo ELISPOT a día 0 (Figura 15, panel izquierdo) muestran que no quedan células plasmáticas específicas de VLP en sangre periférica aproximadamente 140 días después de la última inyección de recuerdo con vacuna en polvo seco para VLP de Norwalk. En el panel izquierdo de la Figura 15 se muestran los
50 resultados del ensayo ELISPOT de las PBMC cultivadas durante cuatro días *in vitro* con VLP de Norwalk. En los dos conejos inmunizados, una cantidad significativa de PBMC, presumiblemente una subpoblación de células B de memoria, habían madurado a células plasmáticas específicas de VLP de Norwalk secretoras de IgG. Aunque se realizaron ensayos para células B de memoria secretoras de IgA, solo se detectaron células B de memoria secretoras de IgG en la población de PBMC. Como estaba previsto, el animal naïve no mostraba células B de memoria específicas de antígeno. Por tanto, las células B de memoria específicas de VLP se encontraron en la
55 circulación periférica de los conejos más de 140 días después de la última de las tres inmunizaciones intranasales.

E. Las células B de memoria específicas de VLP de Norwalk están presentes en el bazo de conejos inmunizados por vía intranasal

60 Los esplenocitos se obtuvieron de los bazos de los dos conejos inmunizados mediante vacuna y el conejo control no inmunizado. Los ensayos de células B de memoria específicas de VLP de Norwalk (descritos anteriormente) se realizaron con estas células y los resultados se muestran en la Figura 16. Como se observó en la población de PBMC, el ensayo ELISPOT del día 0 muestra que no hay células plasmáticas específicas de antígeno presentes en el bazo (Figura 16, panel izquierdo). Sin embargo, después de cuatro días de incubación *in vitro* con VLP de
65 Norwalk, las células de memoria B específicas de VLP de Norwalk eran aparentes en la población de esplenocitos. Por tanto, el bazo representa un sitio para la migración de células B de memoria tras la inmunización intranasal.

F. Una población de células plasmáticas de larga duración específicas de VLP de Norwalk se encuentra en la médula ósea pero no células B de memoria

5 Se obtuvieron las células de médula ósea de las tibias de conejos experimentales y se analizó la presencia de células plasmáticas de larga duración y células B de memoria. Los resultados se presentan en la Figura 17. En el panel izquierda de la Figura 17 se muestra que el conejo 1411 sigue teniendo una población significativa de células plasmáticas específicas de antígeno en la médula ósea. Las células plasmáticas que migran a la médula ósea y permanecen allí durante un periodo significativo de tiempo tras la inmunización se denominan células plasmáticas de larga duración (CPLD). El conejo 735 no mostró una cantidad alta de CPLD. No se encontraron CPLD en la médula ósea del conejo naïve. Las células de médula ósea se cultivaron en un ensayo de células B de memoria y se analizó de nuevo la presencia de células B de memoria. En el panel derecho de la Figura 17 se muestra la ausencia de esencialmente células B de memoria específicas de antígeno en la médula ósea. Por tanto, las células plasmáticas de larga duración migran a la médula ósea pero no se encontraron en ésta células B de memoria.

15 G. Las células B de memoria específicas de VLP de Norwalk secretoras tanto de IgG como de IgA se encuentran en los ganglios linfáticos mesentéricos de conejos inmunizados por vía intranasal

20 Los ganglios linfáticos mesentéricos se obtuvieron de todos los conejos experimentales y se analizó la presencia de CPLD y de células B de memoria en las células aisladas. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 18A. Como con la mayoría del tejido linfóide analizado, excepto la médula ósea, no se encontraron CPLD (paneles de la izquierda de la Figura 18A) en los ganglios mesentéricos. Tras la incubación *in vitro* con las VLP de Norwalk, se encontró una cantidad muy alta de células B de memoria específicas de VLP secretoras de IgG en la población de ganglios linfáticos mesentéricos (Figura 18A, panel derecho). Las cantidades de células B de memoria en los ganglios linfáticos mesentéricos eran significativamente más altas que las observadas en los demás tejidos linfoides analizados.

30 Varios investigadores han demostrado que la inmunización en un sitio inductor mucoso como las fosas nasales o el intestino, es capaz de inducir la llamada respuesta inmune de mucosa. Generalmente, esta respuesta se ha caracterizado por la presencia de células B IgA+ y células plasmáticas secretoras de IgA localizadas en el tejido linfóide mucoso. Por este motivo, también se analizó en las células de los ganglios linfáticos mesentéricos la presencia de CPLD o células B de memoria secretoras de IgA. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 18B. Una vez más, no se encontraron células CPLD IgA+ en la población de los ganglios linfáticos mesentéricos (figura 18B, panel izquierdo). Sin embargo, las células B de memoria secretoras de IgA se detectaron en este tejido (Figura 18B, panel derecho). Por tanto, la inmunización intranasal con una formulación para vacuna en polvo seco de VLP de Norwalk inducía una respuesta inmune mucosa que tenía como resultado tanto la migración de células B de memoria específicas de antígeno tanto IgG+ como IgA+ al tejido linfóide asociado a intestino. La producción de células B de memoria específicas de antígeno inducidas por la inmunización con la formulación para vacuna de Norwalk es un posible indicador de la eficacia de la vacuna. La presencia de células B de memoria es un marcador de inmunidad de larga duración.

H. Células T de memoria CD4+ específicas de VLP

45 Los esplenocitos obtenidos de los conejos inmunizados se reestimularon con VLP de Norwalk intactas y el grado de proliferación celular se determinó mediante incorporación de timidina tritiada como se indica en el eje de ordenada (CPM) (Figura 19). En el panel izquierdo se muestra la proliferación celular de una población no fraccionada de esplenocitos, mientras que en el panel de la derecha se muestra la proliferación celular de células T CD4+.

50 El alcance de la presente invención no debe limitarse por las realizaciones específicas descritas que se pretende que sean ilustraciones individuales de aspectos individuales de la invención, y componentes y procedimientos funcionalmente equivalentes se encuentran dentro del alcance de la invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en el presente documento, resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y de los dibujos adjuntos usando simplemente experimentación rutinaria. Se pretende que tales modificaciones y equivalentes se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Bibliografía

- 60 1. Glass, RI, JS Noel, T Ando, RL Fankhauser, G Belloit, A Mounts, UD Parasher, JS Bresee y 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" en Epidemic Gastroenteritis. *Clin Lab Med* 1999; 19(3): 675-90.
- 65 3. Jiang, X, DY Graham, KN Wang y MK Estes. Norwalk Virus Genome Cloning and Characterization. *Science* 1990; 250: 1580-1583.

4. Jiang, X, M Want, DY Graham, y M K 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 Leparco-Goffart, ME Hardy, y 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, y 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, y 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, y 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, y MK Estes. Recombinant Norwalk Virus-like Particles Given Orally to Volunteers: Phase I Study. *Gastroenterology* 1999; 117: 40-48.
10. Tacket, C O, MB Sztein, GA Losonky, SS Wasserman, y MK Estes. Humoral, Mucosal, and Cellular Immune Responses to Oral Nowalk Virus-like Particles in Volunteers. *Clin Immunol* 2003; 108: 241.
11. Guerrero, RA, JM Ball, SS Krater, SE Pacheco, JD Clements, y 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, y 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, y P A 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, y K Tochikubo. Induction of systemic and mucosal antibody responses in mice immunized intranasally with aluminium-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, y 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, y 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, y 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, y 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, y 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, y 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, y 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, y 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, y SG Reed. Taking toll: lipid A

- mimetics as adjuvants and immunomodulators. *Trends Microbiol* 2002; 10: S32-37.
24. Illum, L. Nasal drug delivery-possibilities, problems and solutions. *J Control Release* 2003; 87: 187-198.
- 5 25. Illum, L, I Jabbal-Gill, M Hinchcliffe, AN Fisher, y SS Davis. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 51: 81-96.
26. Davis, SS. Delivery of peptide and non-peptide drugs through the respiratory tract. *Pharm Sci Technol Today* 1999; 2: 450-456.
- 10 27. Bacon, A, J Makin, PJ Sizer, I Jabbal-Gill, M Hinchcliffe, L Illum, S Chatfield, y M Roberts. Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens. *Infect Immun* 2000; 68: 5764-5770.
- 15 28. van der Lubben, IM, J Verhoef, G Borchard, y HE Junginger. Chitosan for mucosal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 52: 139-144.
29. van der Lubben, IM, JC Verhoef, G Borchard, y HE Junginger. Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. *Eur J Pharm Sci* 2001; 14: 201-207.
- 20 30. Lim, ST, B Forbes, GP Martin, y MB Brown. *In vivo* and *in vitro* characterization of novel microparticulates based on hyaluronan and chitosan hydroglutamate. *AAPS Pharm Sci Tech* 2001; 2: 20.
31. Jabbal-Gill, I, N Fisher, R Rappuoli, SS Davis, y L Illum. Stimulation of mucosal and systemic antibody responses against *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin and recombinant pertussis toxin after nasal administration with chitosan in mice. *Vaccine* 1998; 16: 2039-2046.
- 25 32. Mills, KH, C Cosgrove, EA McNeela, A Sexton, R Giemza, I Jabbal-Gill, A Church, W Lin, L Illum, A Podda, R Rappuoli, M Pizza, GE Griffin, y DJ Lewis. Protective levels of diphtheria-neutralizing antibody induced in healthy volunteers by unilateral priming-boosting intranasal immunization associated with restricted ipsilateral mucosal secretory immunoglobulin. *A Infect Immun* 2003; 71: 726-732.
- 30 33. McNeela, EA., I Jabbal-Gill, L Illum, M Pizza, R Rappuoli, A Podda, DJ Lewis, y KH Mills. Intranasal immunization with genetically detoxified diphtheria toxin induces T cell responses in humans: enhancement of Th2 responses and toxin-neutralizing antibodies by formulation with chitosan. *Vaccine* 2004; 22: 909-914.
- 35 34. Mikszta, JA., VJ Sullivan, C Dean, AM Waterston, JB Alarcon, JP Dekker, 3rd, JM Brittingham, J Huang, CR Hwang, M Ferriter, G Jiang, K Mar, KU Saikh, BG Stiles, CJ Roy, RG Ulrich, y NG Harvey. Protective immunization against inhalational anthrax: a comparison of minimally invasive delivery platforms. *J Infect Dis* 2005; 191: 278-288.
- 40 35. Huang, J,R J Garmise, TM Crowder, K Mar, CR Hwang, AJ Hickey, JA Mikszta, y VJ Sullivan. A novel dry powder influenza vaccine and intranasal delivery technology: induction of systemic and mucosal immune responses in rats. *Vaccine* 2004; 23: 794-801.
- 45 36. GSK Press Room. www.gsk.com/media/archive.htm
37. Corixa Press Room. www.corixa.com/default.asp?pid=release_detail&id=248&year=2004
- 50 38. BioMira Web Site. <http://www.biomira.com/business/outLicensing/>
39. Centers for Disease Control, *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2007; 56(33):842-846.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende al menos un antígeno de norovirus y al menos un adyuvante; en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en un adyuvante que es una sal de aluminio y un adyuvante que es un agonista del receptor de tipo toll (TLR); en la que la composición se formula como un líquido; y en la que el contenido del al menos un antígeno de norovirus en la composición es de desde aproximadamente 1 µg hasta aproximadamente 200 µg por dosis.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en la que el contenido del al menos un antígeno de norovirus en la composición es de desde aproximadamente 1 µg hasta 100 µg por dosis.
3. La composición de la reivindicación 1 ó 2, en la que el contenido del al menos un antígeno de norovirus en la composición es de desde aproximadamente 1 µg hasta 50 µg por dosis.
- 15 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 3, en la que dicho antígeno de norovirus comprende péptidos, proteínas, partículas similares a virus (VLP) de norovirus, VLP desnaturalizadas, monómeros de cápside, multímeros de cápside, agregados o mezclas de los mismos.
- 20 5. La composición de la reivindicación 4, en la que dicho norovirus es una cepa vírica de norovirus del genogrupo I o del genogrupo II.
6. La composición de la reivindicación 4 o de la reivindicación 5, en la que dichas VLP de norovirus comprenden una proteína de la cápside VP1 y/o VP2.
- 25 7. La composición de la reivindicación 4, en la que las VLP son VLP monovalentes o VLP polivalentes.
8. La composición de la reivindicación 4, en la que las VLP de norovirus se producen en un sistema de expresión celular recombinante o un sistema de expresión celular infectado con baculovirus.
- 30 9. La composición de la reivindicación 1, que además comprende un segundo antígeno de norovirus.
10. La composición de la reivindicación 9, en la que dichos primer y segundo antígeno de norovirus son VLP monovalentes de genogrupos diferentes.
- 35 11. La composición de la reivindicación 10, en la que dicho primer antígeno de norovirus es una VLP monovalente que comprende al menos una proteína de la cápside de un norovirus del genogrupo I y dicho segundo antígeno de norovirus es una VLP monovalente que comprende al menos una proteína de la cápside de un norovirus del genogrupo II.
- 40 12. La composición de la reivindicación 11, en la que el norovirus del genogrupo II es un norovirus GII.4.
13. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición se formula para su administración parenteral.
- 45 14. La composición de la reivindicación 1, que además comprende un aceite mineral.
15. La composición de la reivindicación 1 para su uso en un procedimiento para inducir una respuesta inmune frente a norovirus en un mamífero.

Figura 1

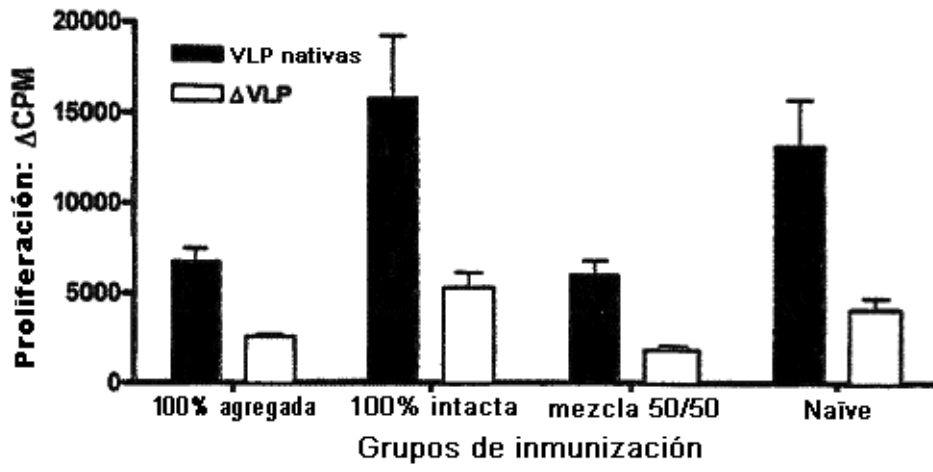


Figura 2

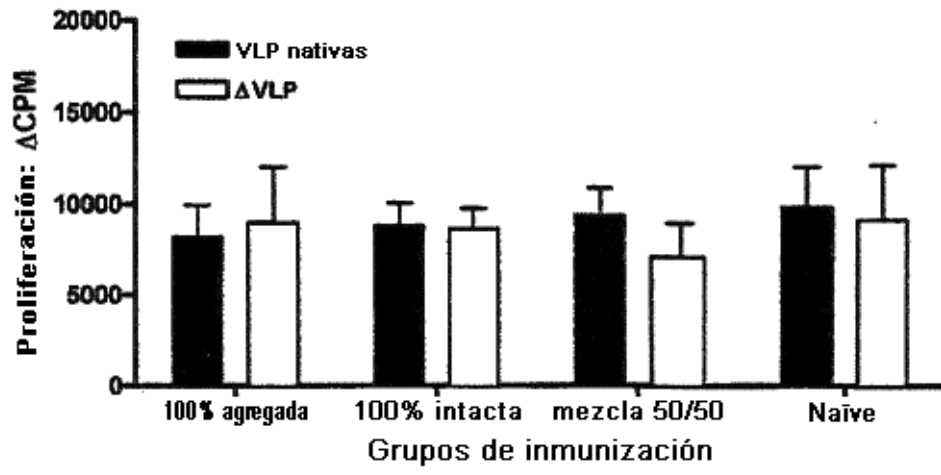


Figura 3

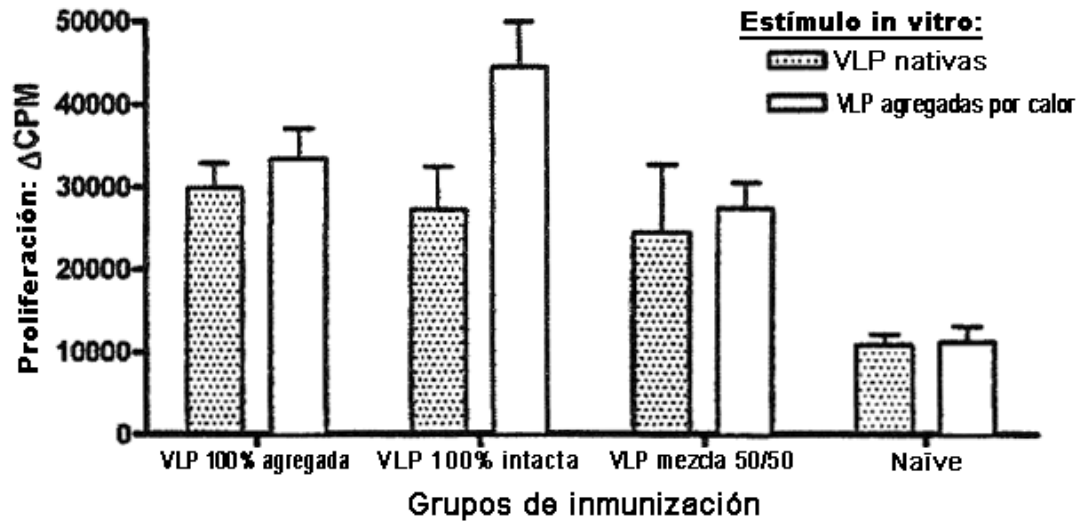


Figura 4

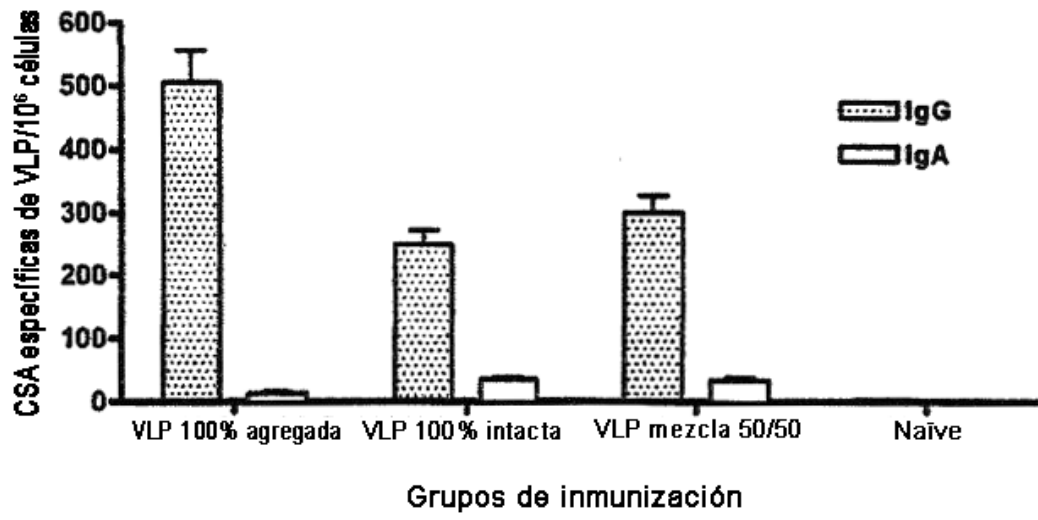


Figura 5

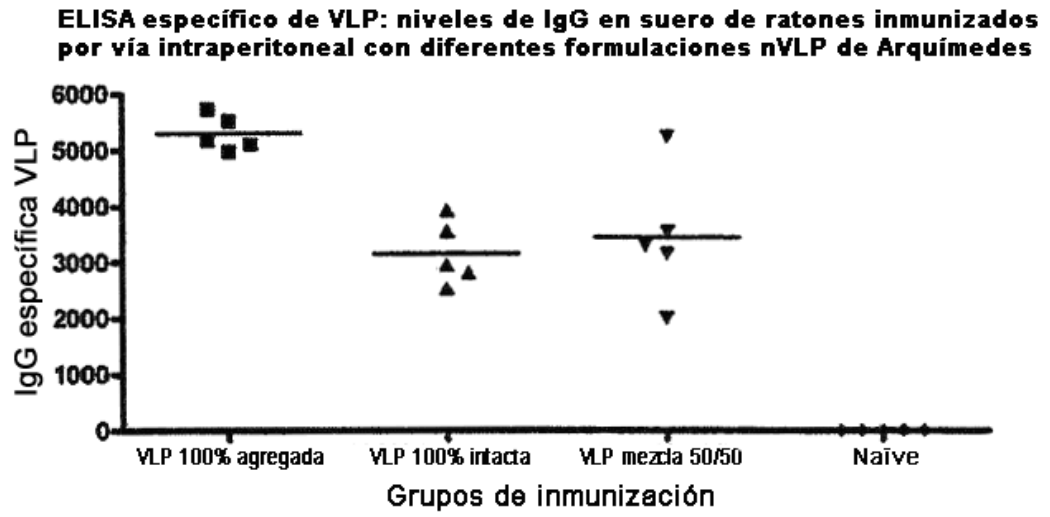


Figura 6

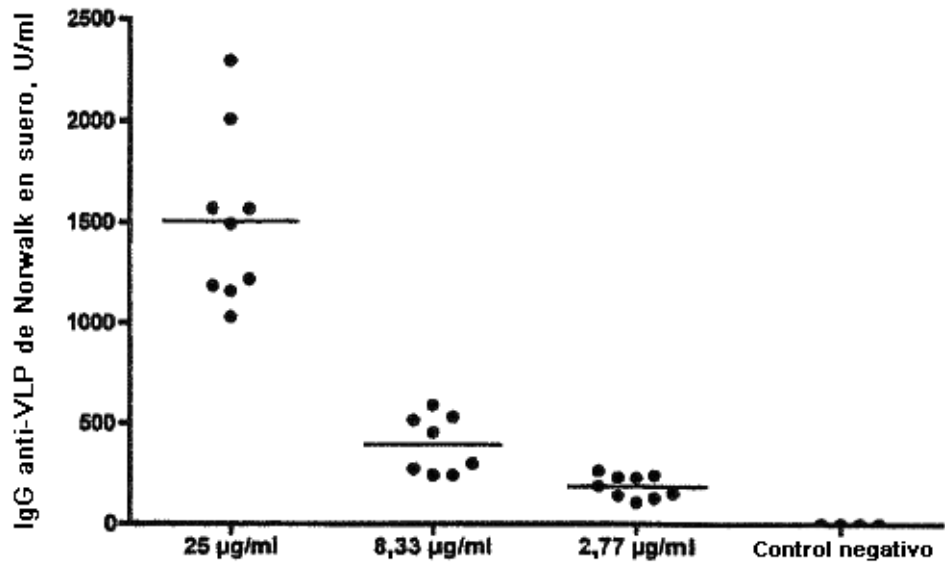


Figura 7

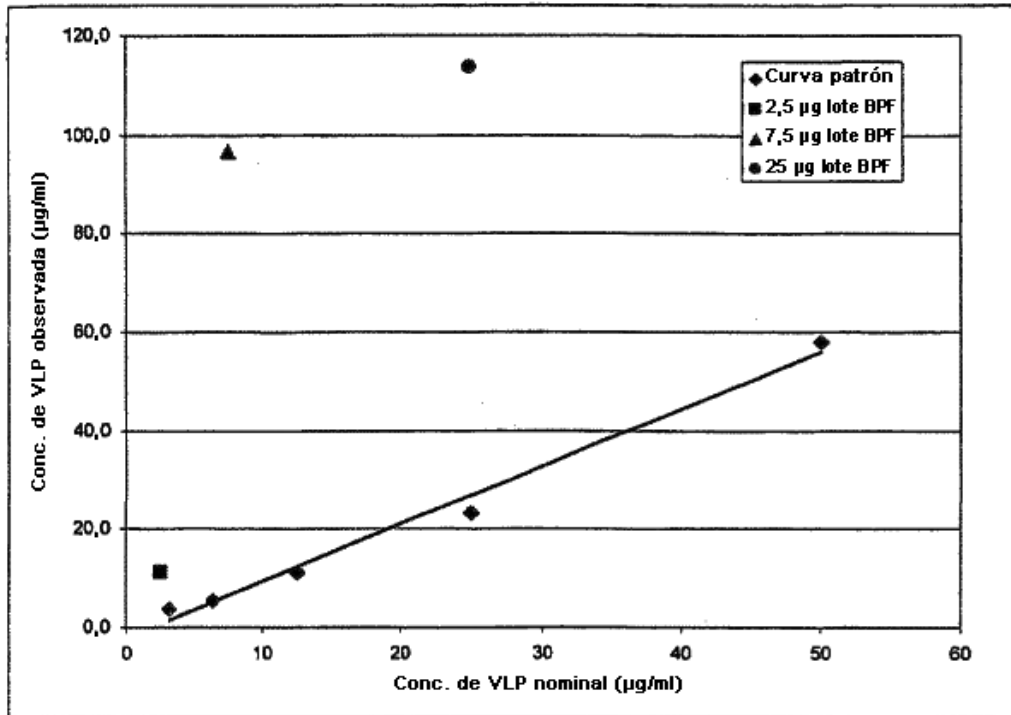


Figura 8

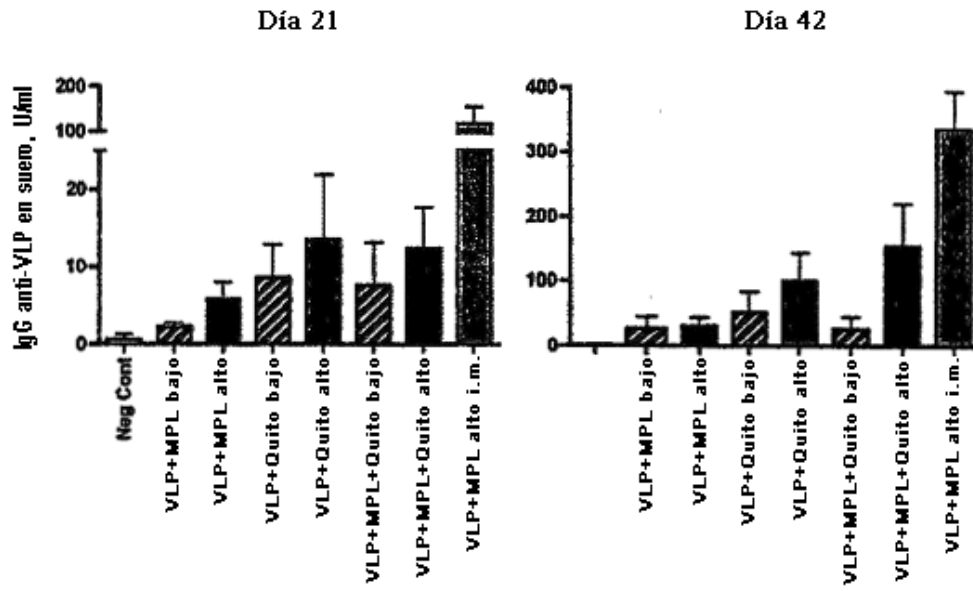


Figura 9

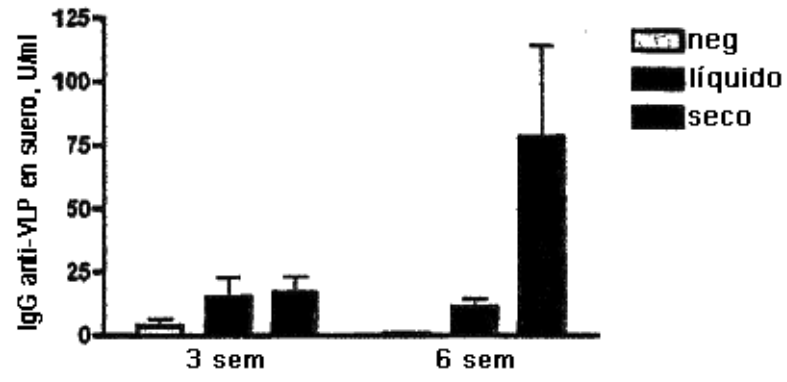


Figura 10

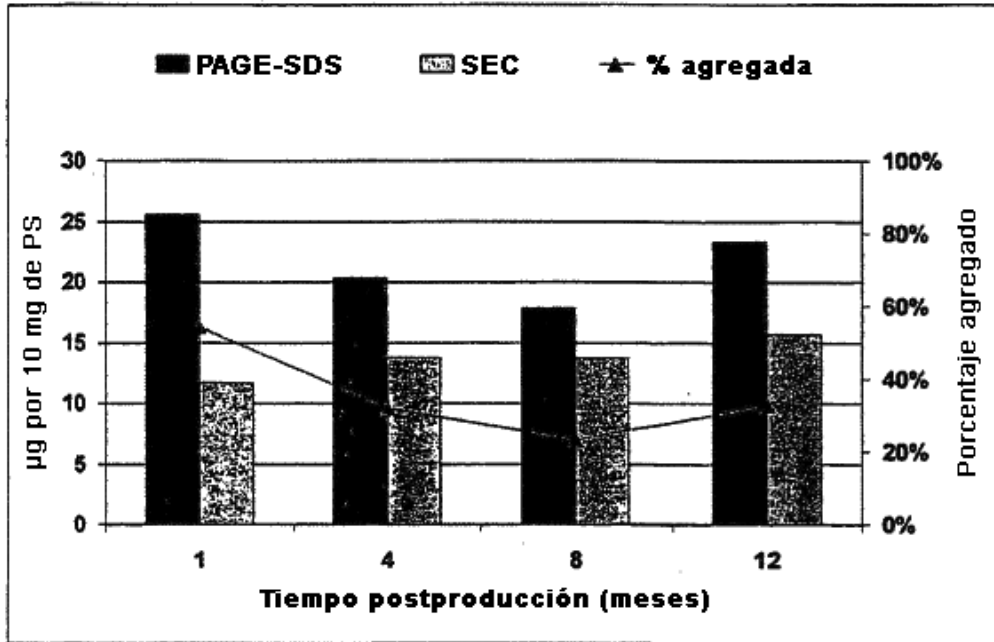


Figura 11

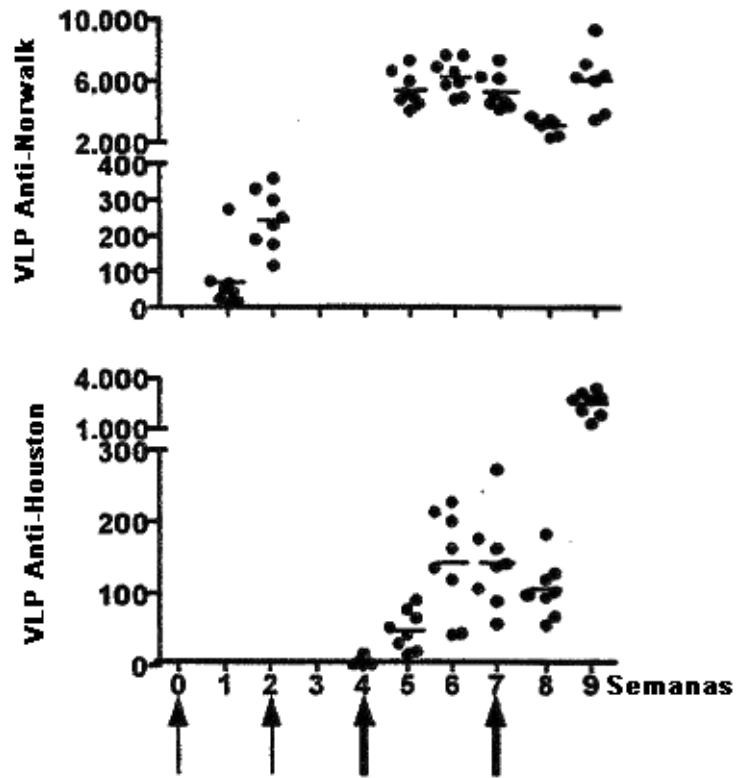


Figura 12

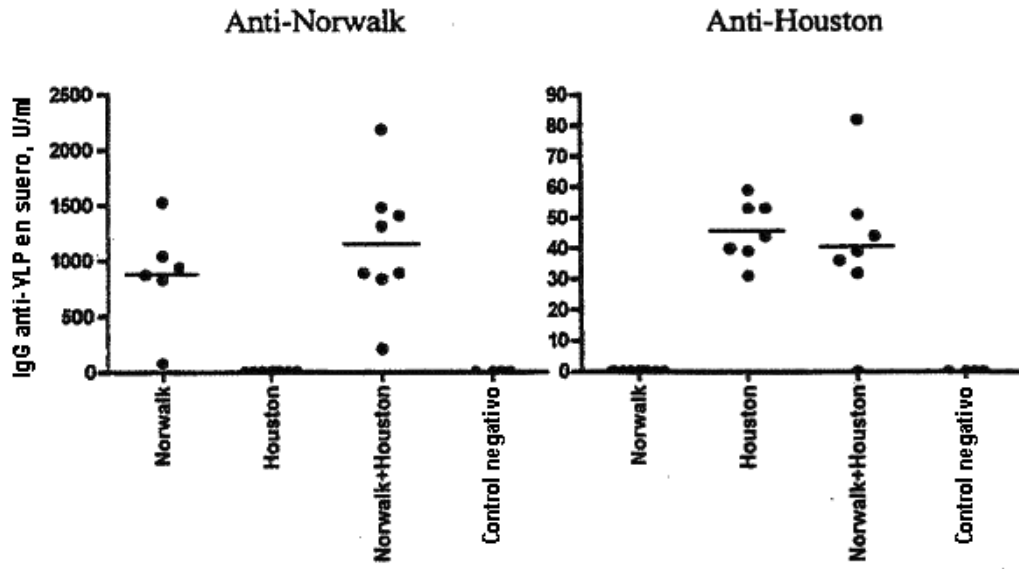


Figura 13

Células plasmáticas de larga duración específicas de VLP en ratones BALB/c 114 días postinmunización

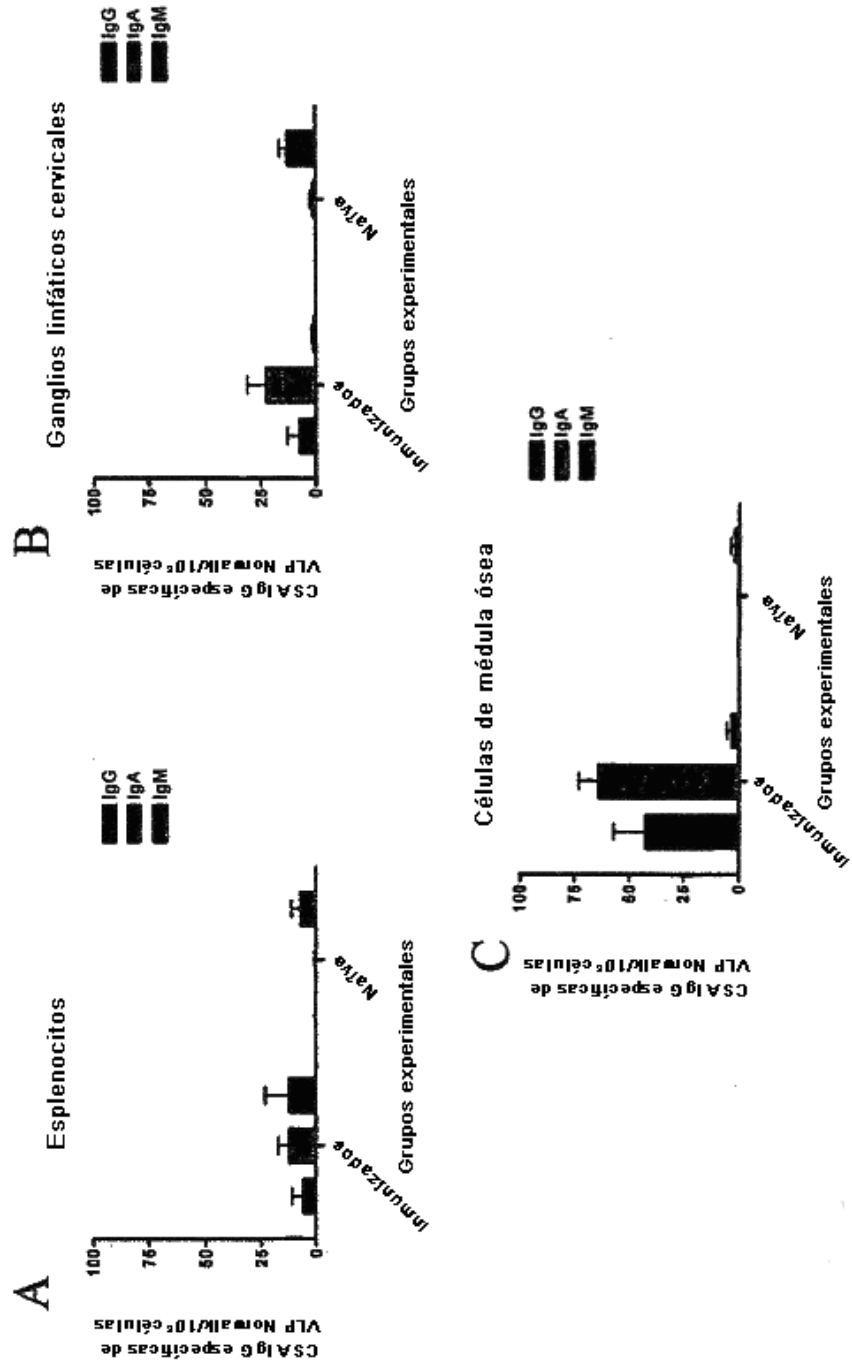


Figura 14

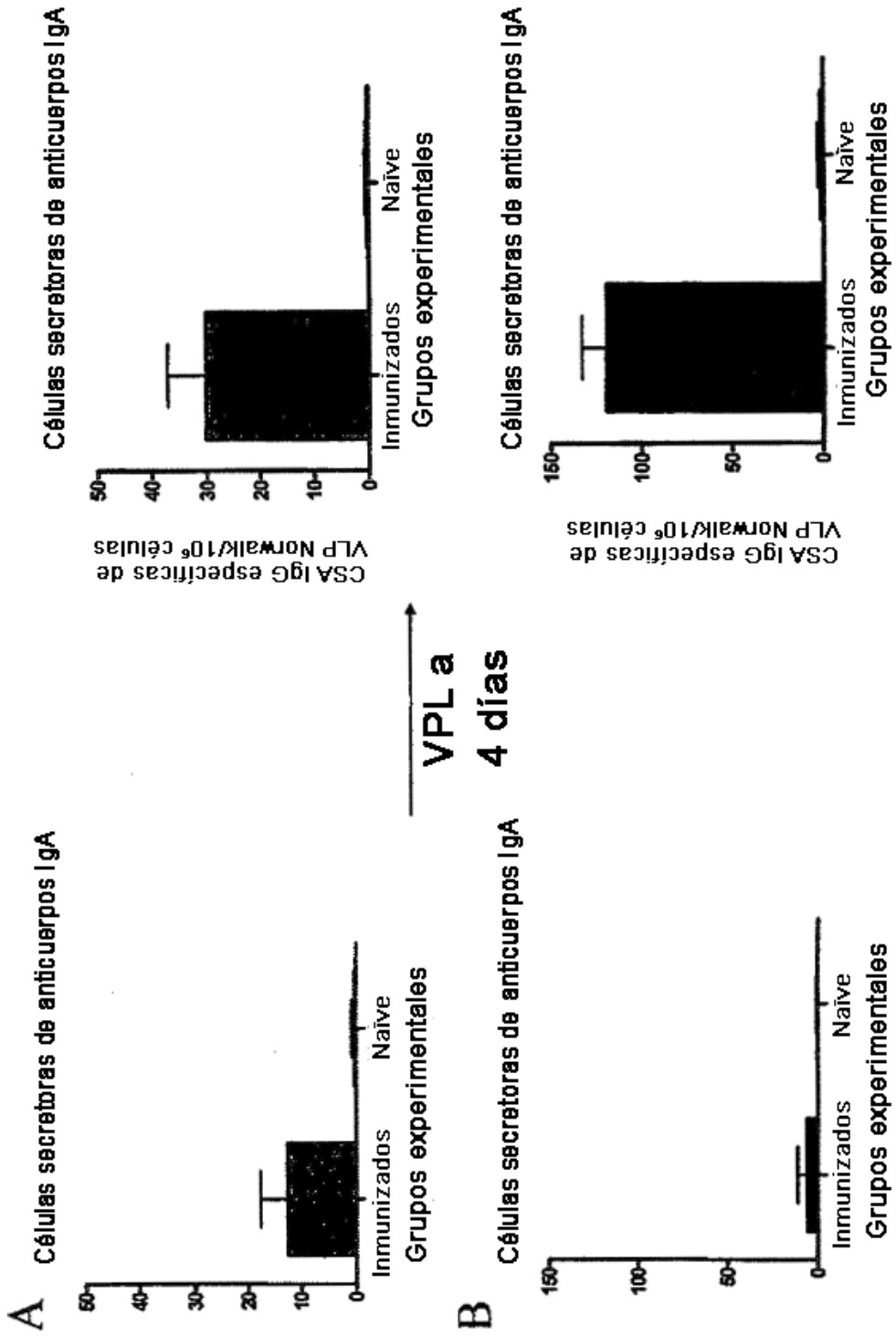


Figura 15

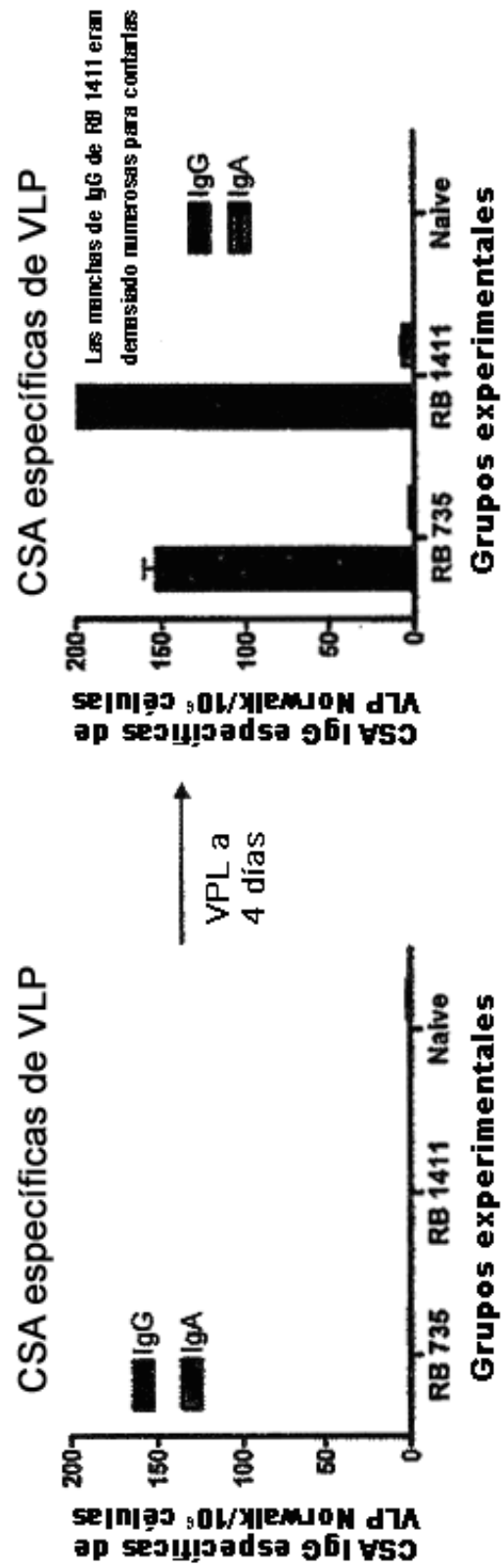


Figura 16

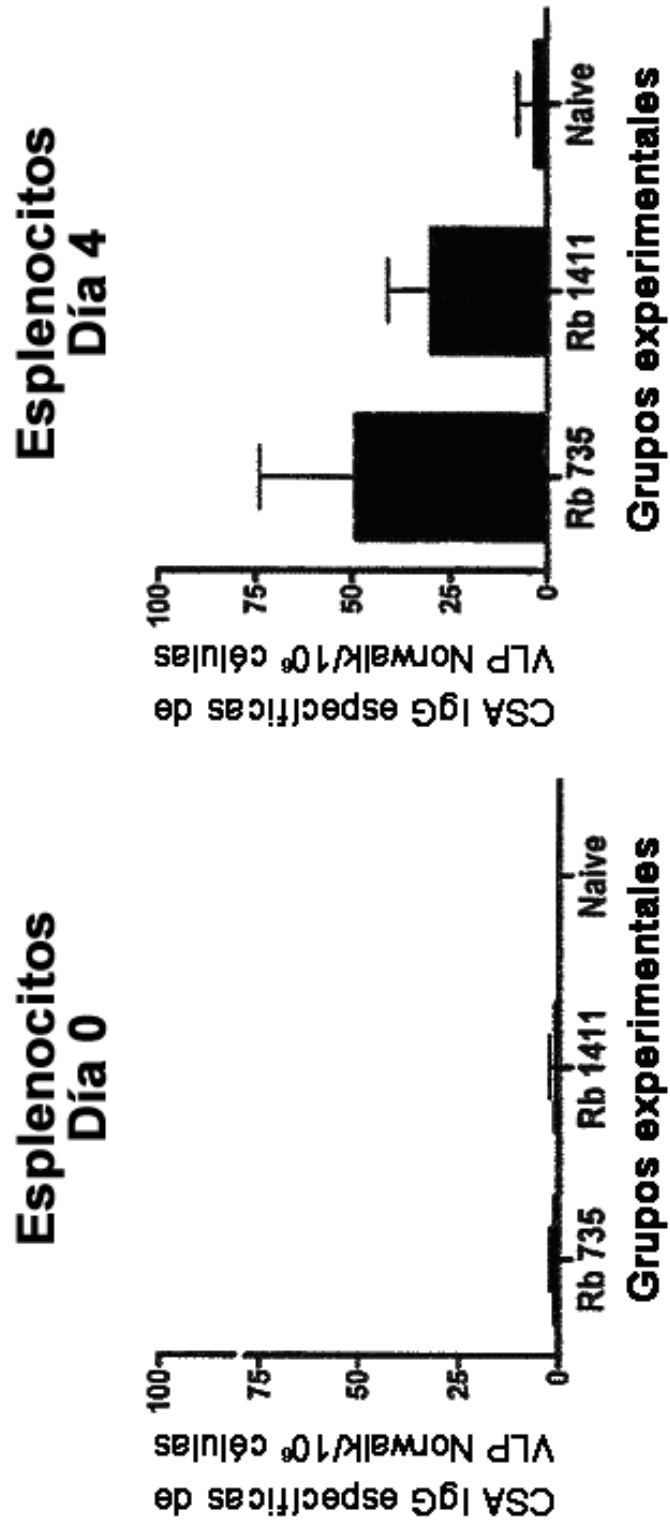


Figura 17

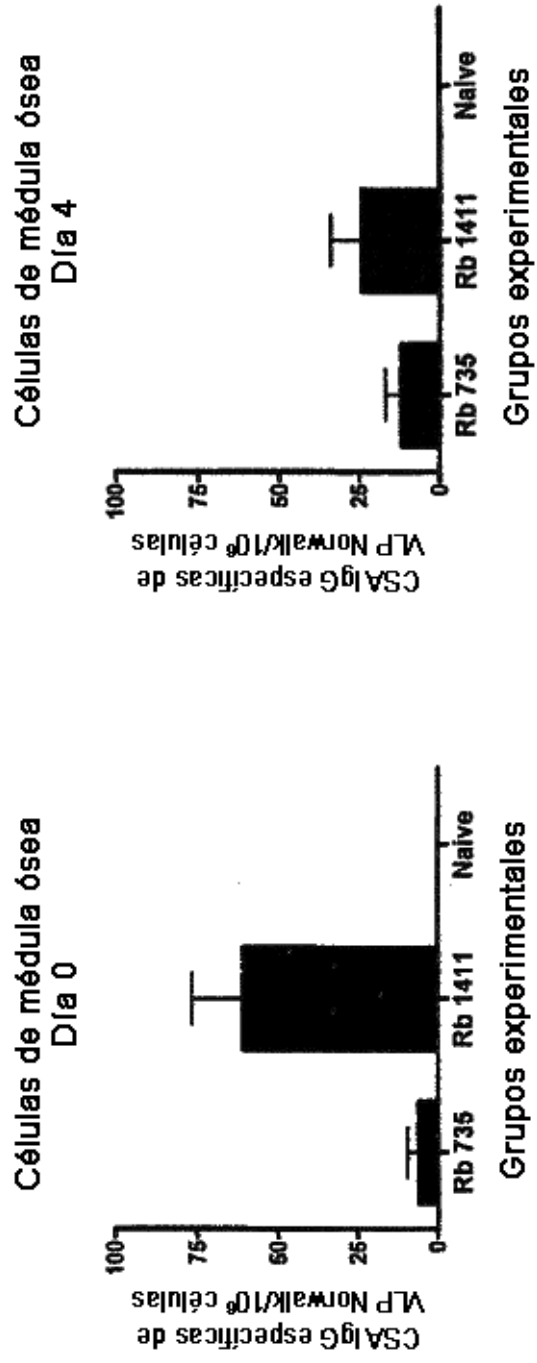
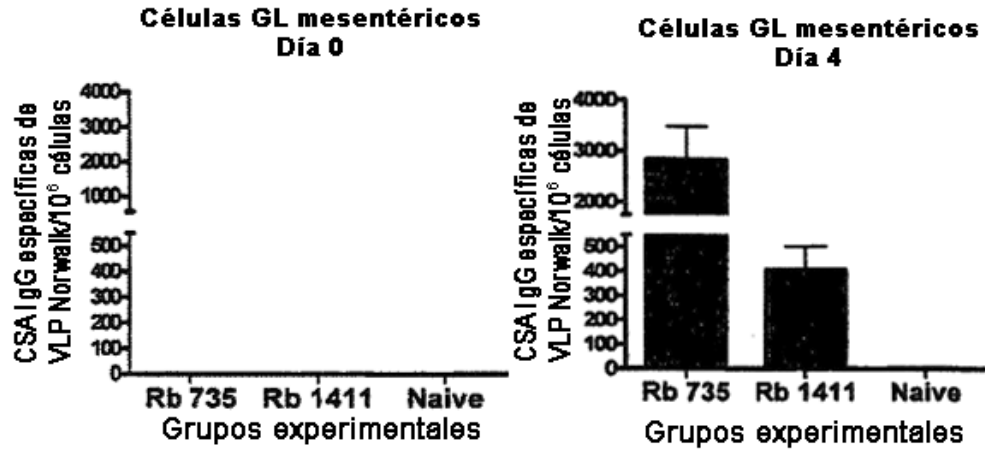


Figura 18

A



B

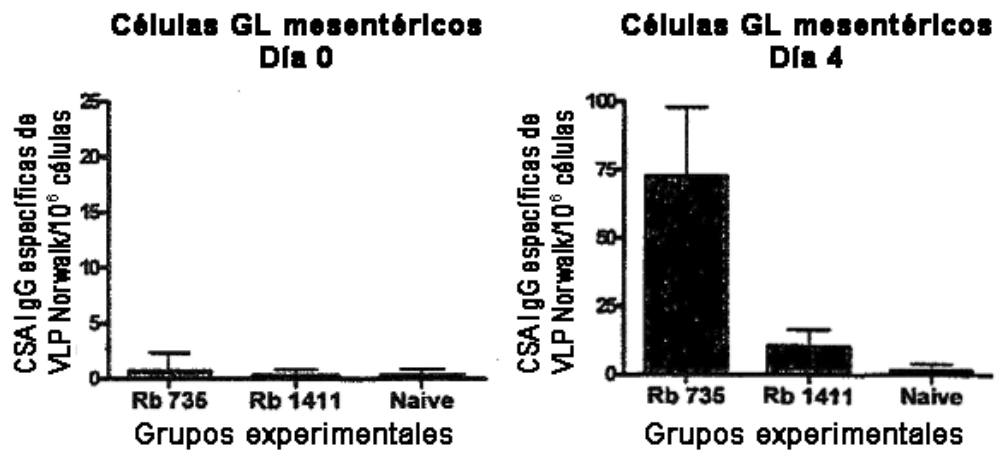


Figura 19

