

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 527**

51 Int. Cl.:

A61K 39/125 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2012 PCT/US2012/046222**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13009849**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2012 E 12811916 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2731621**

54 Título: **Formulaciones parenterales de vacunas de norovirus**

30 Prioridad:

11.07.2011 US 201161506447 P

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

27.02.2018

73 Titular/es:

**TAKEDA VACCINES, INC. (100.0%)
75 Sidney Street
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**RICHARDSON, CHARLES;
BARGATZE, ROBERT, F. y
MENDELMAN, PAUL, M.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 656 527 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 parenterales de vacunas de norovirus

Campo de la invención

5 La invención pertenece al campo de las vacunas, particularmente las vacunas para norovirus. Además, la descripción se refiere a métodos para preparar composiciones de vacuna y a métodos para inducir y evaluar respuestas inmunes protectoras contra norovirus en seres humanos.

Antecedentes de la invención

10 Los norovirus son calicivirus humanos no cultivables que se han convertido en la causa más importante de brotes epidémicos de gastroenteritis no bacteriana (Glass et al, 2000; Hardy et al, 1999). La importancia clínica de los norovirus fue subestimada antes del desarrollo de ensayos de diagnóstico molecular sensitivo. La clonación del prototipo del genoma del virus de Norwalk (NV) del genotipo I y la producción de partículas similares a virus (VLP) de un sistema de expresión de baculovirus recombinante condujo al desarrollo de ensayos que revelaron infecciones de norovirus generalizadas (Jiang et al. 1990; 1992).

15 Los norovirus son virus de ARN de sentido positivo monocatenarios 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 et al. 2000). Cuando se expresa a niveles elevados en sistemas de expresión de eucariotas, la proteína de la cápside de NV, y algunos otros norovirus, se autoensambla en VLP que imitan estructuralmente los viriones de norovirus naturales. Cuando se observan mediante microscopía electrónica de transmisión, los VLP son morfológicamente indistinguibles de los viriones infecciosos aislados de muestras de heces humanas.

20 Las respuestas inmunes frente a los norovirus son complejas, y los correlatos de protección recién se están elucidando. Los estudios de voluntarios humanos realizados con virus nativos demostraron que las respuestas inmunes de memoria derivadas de la mucosa proporcionaron protección a corto plazo contra la infección y sugirieron que la protección mediada por vacuna es factible (Lindesmith et al., 2003; Parrino et al., 1977; Wyatt et al. 1974).

25 Aunque el norovirus no se puede cultivar in vitro, debido a la disponibilidad de VLP y su capacidad para producirse en grandes cantidades, se ha logrado un progreso considerable en la definición de la topografía antigénica y estructural de la cápside del norovirus. Las VLP conservan la confirmación auténtica de la proteína de la cápside viral a la vez que carecen del material genético infeccioso.

30 Consecuentemente, las VLP imitan las interacciones funcionales del virus con los receptores celulares, provocando así una respuesta inmune del huésped apropiada mientras carecen de la capacidad de reproducirse o causar infección. Conjuntamente con el NIH, el Baylor College of Medicine estudió las respuestas inmunitarias humorales, mucosales y celulares frente a VLP de NV en voluntarios humanos en un ensayo clínico Fase I académico patrocinado por un investigador. Las VLP administradas por vía oral eran seguras e inmunogénicas en adultos sanos (Ball et al., 1999; Tacket et al., 2003). Sin embargo, se requirieron dosis múltiples de una cantidad relativamente alta de VLP para observar una respuesta inmune. En otros centros académicos, los experimentos preclínicos en modelos animales han demostrado una mejora de las respuestas inmunes frente a las VLP cuando se administran por vía intranasal con adyuvantes de exotoxinas bacterianas (Guerrero et al., 2001; Nicollier-Jamot et al 2004; Periwal et al., 2003; Souza et al. (2007) Vaccine, vol. 25(50):8448-59). Sin embargo, la inmunidad protectora contra los norovirus en seres humanos sigue siendo esquiva debido a que todavía no se han identificado claramente los indicadores de una respuesta inmune protectora en seres humanos (Herbst-Kralovetz et al. (2010) Expert Rev. Vaccines 9 (3), 299-307).

El documento WO2009/039229A2 describe una vacuna de norovirus que se administra intranasalmente en dos dosis, pero menciona también la posibilidad de una administración en dosis 1-4, y la administración intramuscular.

Sumario de la invención

45 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que una sola dosis de una vacuna de norovirus provoca una respuesta inmune protectora rápida y robusta contra norovirus en seres humanos cuando se administra parenteralmente. Por consiguiente, se describe en este documento un método para provocar inmunidad protectora contra norovirus en un ser humano que comprende administrar parenteralmente al ser humano no más de una dosis única de una composición de vacuna, comprendiendo dicha composición VLP de norovirus del genogrupo I y/o genogrupo II, en donde dicha composición induce al menos un aumento de tres veces en el título del anticuerpo sérico específico de norovirus en comparación con el título en el ser humano antes de la administración de la composición. En ciertas realizaciones, el aumento en el título de anticuerpos específicos de norovirus se induce en los siguientes siete días de la administración de la dosis única de la composición.

55 En una realización, la composición de vacuna se administra al ser humano mediante una vía de administración intramuscular.

Las composiciones de vacuna de dosis única pueden comprender dosis de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 150 µg de VLP de norovirus del genogrupo I, y VLP de norovirus del genogrupo II. En realizaciones en las que las composiciones de vacuna de dosis única comprenden VLP de norovirus del genogrupo I y genogrupo II, la dosis de cada VLP puede ser igual o diferente. En una realización, la composición comprende no más de 50 µg de VLP de norovirus del genogrupo I. En otra realización, la composición comprende no más de 25 µg de VLP de norovirus del genogrupo I. Todavía en otra realización, la composición comprende no más de 150 µg de VLP de norovirus del genogrupo II. Las VLP de norovirus pueden ser VLP monovalentes o VLP multivalentes.

En algunos aspectos de la invención, las VLP de norovirus del genogrupo I en las composiciones de vacuna comprenden una proteína de cápside derivada de una cepa viral del genogrupo I. En una realización, las VLP de norovirus del genogrupo I comprenden una proteína de la cápside de un genogrupo I, norovirus de genotipo 1. En otra realización, las VLP de norovirus del genogrupo I comprenden una proteína de la cápside del virus de Norwalk. En otros aspectos de la invención, las VLP de norovirus del genogrupo II en las composiciones de vacuna comprenden una proteína de cápside derivada de una cepa viral del genogrupo II. En algunas realizaciones, las VLP de norovirus del genogrupo II comprenden una proteína de la cápside de un genogrupo II, norovirus del genotipo 4. En ciertas realizaciones, las VLP de norovirus del genogrupo II son VLP generadas a partir de la expresión de una secuencia consenso del norovirus del genogrupo II. En una realización particular, las VLP de norovirus del genogrupo II comprenden una proteína de cápside que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1.

La composición de vacuna comprende dos adyuvantes, MPL e hidróxido de aluminio. En algunas realizaciones, la composición de vacuna comprende además un tampón, tal como L-histidina, imidazol, ácido succínico, tris y ácido cítrico. La composición de vacuna puede formularse como un polvo seco o un líquido. En una realización, la composición de vacuna se formula como un líquido (por ejemplo, una formulación acuosa).

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Los resultados de los ensayos pan-ELISA que miden los niveles séricos combinados de IgG, IgA e IgM de voluntarios humanos inmunizados por vía intramuscular con placebo (solución salina) o una formulación de vacuna que contiene 5, 15, 50 ó 150 µg cada uno de una VLP de norovirus del genogrupo I.1 y un VLP del Norovirus del genogrupo II.4. El título medio geométrico para anticuerpos anti-GI.1 (A) y anti-GII.4 (B) se muestra para cada uno de los niveles de dosificación a los 7 y 21 días después de la primera inmunización y 7 y 28 días después de la segunda inmunización. Los voluntarios recibieron vacunas en los días de estudio 0 y 28.

Figura 2. Los resultados de los ensayos pan-ELISA que miden niveles séricos combinados de IgG, IgA e IgM de voluntarios humanos inmunizados por vía intramuscular con placebo (solución salina) o una formulación de vacuna que contiene 5, 15, 50 ó 150 µg cada una de una VLP de norovirus del genogrupo I.1 y una VLP del norovirus del genogrupo II.4. El aumento de veces de la media geométrica para anticuerpos anti-GI.1 (A) y anti-GII.4 (B) se muestra para cada uno de los niveles de dosificación a los 7 y 21 días después de la primera inmunización y 7 y 28 días después de la segunda inmunización. Los voluntarios recibieron vacunas en los días de estudio 0 y 28.

Figura 3. Resultados de los ensayos pan-ELISA que miden los niveles séricos combinados de IgG, IgA e IgM de voluntarios humanos inmunizados por vía intramuscular con placebo (solución salina) o una formulación de vacuna que contiene 5, 15, 50 ó 150 µg cada una de la VLP del norovirus del genogrupo I.1 y VLP del norovirus del genogrupo II.4. Las tasas de porcentaje de sero-respuestas (es decir, un aumento de cuatro veces en el título de anticuerpos en comparación con los títulos de preinmunización) para anticuerpos anti-GI.1 (A) y anti-GII.4 (B) se muestran para cada uno de los niveles de dosificación en los días 7 y 21 después de la primera inmunización y 7 y 28 días después de la segunda inmunización. Los voluntarios recibieron vacunas en los días de estudio 0 y 28.

Figura 4. Resultados de ensayos ELISA que miden IgA sérica de voluntarios humanos inmunizados por vía intramuscular con placebo (solución salina) o una formulación de vacuna que contiene 5, 15 ó 50 µg de una VLP de norovirus del genogrupo I.1 y una VLP del norovirus del de genogrupo II.4. El título de la media geométrica para los anticuerpos anti-GI.1 (A) y anti-GII.4 (B) se muestra para cada uno de los niveles de dosificación a los 7 y 21 días después de la primera inmunización y 7 y 28 días después de la segunda inmunización. Los voluntarios recibieron vacunas en los días de estudio 0 y 28.

Figura 5. Los resultados de los ensayos ELISA que miden IgA sérica de voluntarios humanos inmunizados por vía intramuscular con placebo (solución salina) o una formulación de vacuna que contiene 5, 15 ó 50 µg cada una de una VLP de norovirus del genogrupo I.1 y una VLP de norovirus del genogrupo II.4. El aumento en veces de la media geométrica para anticuerpos anti-GI.1 (A) y anti-GII.4 (B) se muestra para cada uno de los niveles de dosificación a los 7 y 21 días después de la primera inmunización y 7 y 28 días después de la segunda inmunización. Los voluntarios recibieron vacunas en los días de estudio 0 y 28.

Figura 6. Los resultados de los ensayos ELISA que miden la IgA sérica de voluntarios humanos inmunizados por vía intramuscular con placebo (solución salina) o una formulación de vacuna que contiene 5, 15 ó 50 µg cada una de una VLP de norovirus del genogrupo I.1 y una VLP de norovirus del genogrupo II.4. Se muestran los porcentajes de sero-respuestas (es decir, un aumento de cuatro veces en el título de anticuerpos en comparación con los títulos de preinmunización) para los anticuerpos anti-GI.1 (A) y anti-GII.4 (B) para cada uno de los niveles de dosificación a los

7 y 21 días después de la primera inmunización y 7 y 28 días después de la segunda inmunización. Los voluntarios recibieron vacunas en los días de estudio 0 y 28.

5 Figura 7. Resultados de ensayos ELISA que miden IgG sérica de voluntarios humanos inmunizados por vía intramuscular con placebo (solución salina) o una formulación de vacuna que contiene 5, 15 ó 50 µg cada una de una VLP de norovirus del genogrupo I.1 y una VLP de norovirus del genogrupo II.4. El título de la media geométrica para los anticuerpos anti-GI.1 (A) y anti-GII.4 (B) se muestra para cada uno de los niveles de dosificación a los 7 y 21 días después de la primera inmunización y 7 y 28 días después de la segunda inmunización. Los voluntarios recibieron vacunas en los días de estudio 0 y 28.

10 Figura 8. Los resultados de los ensayos ELISA que miden IgG sérica de voluntarios humanos se inmunizaron por vía intramuscular con placebo (solución salina) o una formulación de vacuna que contenía 5, 15 ó 50 µg cada una de una VLP de norovirus de genogrupo I.1 y una VLP de norovirus del genogrupo II.4. El aumento en veces de la media geométrica para los anticuerpos anti-GI.1 (A) y anti-GII.4 (B) se muestra para cada uno de los niveles de dosificación a los 7 y 21 días después de la primera inmunización y 7 y 28 días después de la segunda inmunización. Los voluntarios recibieron vacunas en los días de estudio 0 y 28.

15 Figura 9. Los resultados de los ensayos ELISA que miden la IgG sérica de voluntarios humanos inmunizados por vía intramuscular con placebo (solución salina) o una formulación de vacuna que contiene 5, 15 ó 50 µg cada una de una VLP del norovirus del genogrupo I.1 y una VLP del norovirus del genogrupo II.4. Se muestran los porcentajes de sero-respuestas (es decir, un aumento de cuatro veces en el título de anticuerpos en comparación con los títulos de preinmunización) para los anticuerpos anti-GI.1 (A) y anti-GII.4 (B) para cada uno de los niveles de dosificación a los 7 y 21 días después de la primera inmunización y 7 y 28 días después de la segunda inmunización. Los voluntarios recibieron vacunas en los días de estudio 0 y 28.

25 Figura 10. Los resultados de los ensayos pan-ELISA que miden los niveles séricos combinados de IgG, IgA e IgM de voluntarios humanos inmunizados con una vacuna monovalente intranasal de norovirus como se describe en El Kamary et al. (2010) J Infect Dis, Vol. 202(11): 1649-1658 (grupos LV01-103) o una vacuna bivalente intramuscular del norovirus como se describe en el Ejemplo 1 (grupos LV03-104) en los momentos indicados. Los voluntarios humanos recibieron placebo o dos dosis de la formulación de vacuna intramuscular o intranasal. La vacuna de norovirus intramuscular y bivalente contenía 5 µg de cada una de una VLP del norovirus del genotipo I.1 y una VLP del norovirus del genotipo II.4. La vacuna monovalente intranasal contenía 100 µg de un norovirus del genogrupo I.1. Los voluntarios que recibieron la vacuna intranasal o el placebo fueron desafiados con norovirus vivos después de la segunda inmunización.

30 Figura 11. Análisis FACS de células mononucleares de sangre periférica obtenidas de voluntarios humanos en el día 0 antes de la inmunización con una dosis 5 µg de vacuna intramuscular bivalente de norovirus (A) o placebo (B) y 7 días después de la inmunización. Las CD 19+ PBMC se dirigen por las mucosas como se evidencia de la expresión del receptor migrante alfa 4/beta7 y del receptor CCR10 de quimioquinas.

35 Descripción detallada de la invención

La presente descripción se refiere a métodos para provocar una inmunidad protectora contra infecciones por norovirus en un sujeto. En particular, la presente descripción proporciona métodos para provocar una inmunidad protectora contra norovirus en un humano administrando por vía parenteral al ser humano no más que una dosis única de una vacuna que comprende VLP de norovirus y un adyuvante, en el que la vacuna confiere protección o mejora de, al menos, un síntoma de la infección por norovirus. Los inventores han descubierto sorprendentemente que la administración intramuscular de no más de una dosis única de una composición de vacuna que comprende VLP de Norovirus a humanos induce una seroconversión sérica rápida (es decir, dentro de los 7 días de la inmunización) (es decir, al menos un aumento de tres veces en los títulos de anticuerpos séricos específicos del antígeno por encima de los niveles previos a la vacunación) que es indicativo de una respuesta inmune protectora contra la infección del norovirus y enfermedad. Las respuestas inmunes inducidas por esta meseta de composición de vacuna de dosis única a títulos de anticuerpos elevados son similares a las observadas con la infección natural mediante la administración de virus vivos en estudios de exposición en seres humanos. Curiosamente, no se requiere una dosis de refuerzo de la vacuna ya que la respuesta inmune no aumenta con la administración adicional de una dosis de vacuna adicional.

50 La invención proporciona una composición de vacuna que comprende uno o más antígenos de norovirus. Por "Norovirus", "norovirus (NOR)", "norovirus" y los equivalentes gramaticales en el presente documento se entiende los miembros del género Norovirus de la familia Caliciviridae. En algunas realizaciones, un norovirus puede incluir un grupo de virus no encapsulados de ARN monocatenario relacionados, de sentido positivo, que pueden ser infecciosos para especies de mamíferos humanos o no humanos. En algunas realizaciones, un norovirus puede causar gastroenteritis aguda en humanos. Los norovirus también pueden denominarse virus estructurados redondos pequeños (SRSV) que tienen una estructura superficial definida o un borde irregular cuando se observan mediante microscopía electrónica.

Incluidos dentro de los norovirus hay al menos cinco genogrupos (GI, GII, GIII, GIV y GV). Los norovirus GI, GII y GIV son infecciosos en humanos, mientras que los norovirus GIII infectan principalmente a las especies bovinas. GV se ha aislado recientemente de ratones (Zheng et al. (2006) *Virology*, Vol 346: 312-323). Representativo de GIII son las cepas de Jena y Newbury, mientras que las cepas Alpatron, Fort Lauderdale y Saint Cloud son representativas de GIV. Los grupos GI y GII pueden segregarse adicionalmente en grupos genéticos o genotipos basados en la clasificación genética (Ando et al. (2000) *J. Infectious Diseases*, Vol. 181 (Supl. 2): S336-S348; Lindell et al. (2005) *J. Clin. Microbiol.*, vol. 43(3): 1086-1092). Como se usa en el presente documento, la expresión agrupaciones genéticas se usa de manera intercambiable con el término genotipos. Dentro del genogrupo I, hay 8 grupos GI conocidos hasta la fecha (con el nombre de la cepa del virus prototipo): GI.1 (Norwalk (NV-USA93)); GI.2 (Southampton (SOV-GBR93)); GI.3 (Desert Shield (DSV-USA93)); GI.4 (virus Cruise Ship/Chiba (Chiba-JPN00)); GI.5 (318/Musgrove (Musgrove-GBR00)); GI.6 (Hesse (Hesse-DEU98)); GI.7 (Wnchest-GBR00); y GI.8 (Boxer-USA02). Dentro del genogrupo II, hay 19 grupos de GII conocidos hasta la fecha (con el nombre de cepa de virus prototipo): GII.1 (Hawaii (Hawaii-USA94)); GII.2 (Snow Mountain-Melksham (Msham-GBR95)); GII.3 (Toronto (Toronto-CAN93)); GII.4 (Bristol/Lordsdale (Bristol-GBR93)); GII.5 (290/Hillingdon (Hillingd-GBR00)); GII.6 (269/Seacroft (Seacroft-GBR00)); GII.7 (273/Leeds (Leeds-GBR00)); GII.8 (539/Amsterdam (Amsterdam-NLD99)); GII.9 (378 (VABeach-USA01)), GII.10 (Erfurt-DEU01); GII.11 (SW9180JPN01); GII.12 (Wortley-GBR00); GII.13 (Faytviil-USA02); GII.14 (M7-USA03); GII.15 (J23-USA02); GII.16 (Tiffin-USA03); GII.17 (CSE1-USA03); GII.18 (QW101/2003/US) y GII.19 (QW170/2003/US).

Por "Norovirus" también se entiende en este documento partículas de virus de norovirus recombinantes (rNOR VLP). En algunas realizaciones, la expresión recombinante de al menos la proteína de la cápside del norovirus codificada por ORF2 en células, por ejemplo, de un vector de baculovirus en células Sf9, puede dar como resultado el autoensamblaje espontáneo de la proteína de la cápside en las VLP. En algunas realizaciones, la expresión recombinante de al menos las proteínas de norovirus codificadas por ORF1 y ORF2 en células, por ejemplo, de un vector de baculovirus en células Sf9, puede dar como resultado el autoensamblaje espontáneo de la proteína de la cápside en las VLP. Las VLP son estructuralmente similares a los norovirus pero carecen del genoma de ARN viral y, por lo tanto, no son infecciosas. En consecuencia, los "norovirus" incluyen viriones que pueden ser partículas infecciosas o no infecciosas, que incluyen partículas defectuosas.

Los ejemplos no limitantes de norovirus incluyen la cepa del genogrupo 1 de norovirus Hu/NoV/West Chester/2001/USA, No. de acceso GenBank AY502016; Virus Chiba (CHV, GenBank AB042808); cepa del genogrupo 2 del norovirus Hu/NoV/Braddock Heights/1999/USA, número de acceso GenBank AY502015; cepa del genogrupo 2 del norovirus Hu/NoV/Fayette/1999/USA, número de acceso GenBank AY502014; cepa del genogrupo 2 del norovirus Hu/NoV/Fairfield/1999/USA, número de acceso de GenBank AY502013; cepa del genogrupo 2 del norovirus Hu/NoV/Sandusky/1999/USA, Número de Acceso de GenBank AY502012; cepa del genogrupo 2 del norovirus Hu/NoV/Canton/1999/USA, número de acceso de GenBank AY502011; cepa del genogrupo 2 del norovirus Hu/NoV/Tiffin/1999/USA, número de acceso de GenBank AY502010; cepa del genogrupo 2 del norovirus Hu/NoV/CS-E1/2002/USA, número de acceso de GenBank AY50200; cepa del genogrupo 1 del norovirus Hu/NoV/Wisconsin/2001/USA, número de acceso de GenBank AY502008; cepa del genogrupo 1 del norovirus Hu/NoV/CS-841/2001/USA, número de acceso de GenBank AY502007; cepa del genogrupo 2 del norovirus Hu/NoV/Hiram/2000/USA, número de acceso GenBank AY502006; cepa del genogrupo 2 del norovirus Hu/NoV/Tontogony/1999/USA, número de acceso GenBank AY502005; virus de Norwalk, genoma completo, número de acceso de GenBank NC. sub.-001959; Norovirus Hu/GI/Otofuke/1979/JP RNA genómico, genoma completo, número de acceso de GenBank AB187514; Norovirus Hu/Hokkaido/133/2003/JP, número de acceso de GenBank AB212306; Norovirus Sydney 2212, número de acceso de GenBank AY588132; Cepa SN2000JA del virus Norwalk, número de acceso de GenBank AB190457; Genoma completo del virus Lordsdale, número de acceso de GenBank X86557; ARN genómico del virus tipo Norwalk, Gifu'96, número de acceso del GenBank AB045603; Cepa del virus de Norwalk Vietnam 026, genoma completo, número de acceso de GenBank, AF504671; norovirus Hu/GII.4/2004/NL, número de acceso de GenBank AY883096; Norovirus Hu/GII/Hokushin/03/JP, número de acceso de GenBank AB195227; Norovirus Hu/GII/Kamo/03/JP, número de acceso de GenBank AB195228; Norovirus Hu/GII/Sinsiro/97/JP, número de acceso de GenBank AB195226; Norovirus Hu/GII/Ina/02/JP, número de acceso de GenBank AB195225; Norovirus Hu/NLV/GII/Neustrelitz260/2000/DE, número de acceso de GenBank AY772730; Norovirus Hu/NLV/Dresden174/pUS-NorII/1997/GE, número de acceso de GenBank AY741811; Norovirus Hu/NLV/Oxford/B2S16/2002/UK, número de acceso de GenBank AY587989; Norovirus Hu/NLV/Oxford/B4S7/2002/UK, número de acceso de GenBank AY587987; Norovirus Hu/NLV/Witney/B7S2/2003/UK, número de acceso de GenBank AY588030; Norovirus Hu/NLV/Banbury/B9S23/2003/UK, número de acceso GenBank AY588029; Norovirus Hu/NLV/ChippingNorton/2003/UK, número de acceso de GenBank AY588028; Norovirus Hu/NLV/Didcot/B9S2/2003/UK, número de acceso de GenBank AY588027; Norovirus Hu/NLV/Oxford B8S5/2002/UK, número de acceso de GenBank AY588026; Norovirus Hu/NLV/Oxford/B6S4/2003/UK, número de acceso de GenBank AY588025; Norovirus Hu/NLV/Oxford B6S5/2003/UK, número de acceso GenBank AY588024; Norovirus Hu/NLV/Oxford/B5S23/2003/UK, número de acceso GenBank AY588023; Norovirus Hu/NLV/Oxford/B6S2/2003/UK, número de acceso GenBank AY588022; Norovirus Hu/NLV/Oxford/B6S6/2003/UK, número de acceso GenBank AY588021; aislado de virus tipo Norwalk Bo/Thirsk10/00/UK, número de acceso de GenBank AY126468; aislado de virus de tipo Norwalk Bo/Penrith55/00/UK, número de acceso de GenBank AY126476; aislado de virus tipo Norwalk Bo/Aberystwyth24/00/UK, número de acceso de GenBank AY126475;

aislado de virus tipo Norwalk Bo/Dumfries/94/UK, número de acceso GenBank AY126474; Norovirus NLV/IF2036/2003/Iraq, número de acceso de GenBank AY675555; Norovirus NLV/IF1998/2003/Iraq, número de acceso del GenBank AY675554; Norovirus NLV/BUDS/2002/USA, número de acceso de GenBank AY660568; Norovirus NLV/Paris Island/2003/USA, número de acceso de GenBank AY652979; Virus Snow Mountain, genoma completo, número de acceso de GenBank AY134748; Virus tipo Norwalk NLV/Fort Lauderdale/560/1998/US, número de acceso GenBank AF414426; Hu/Norovirus/hiroshima/1999/JP (9912-02F), número de acceso de GenBank AB044366; Cepa de virus tipo Norwalk 11MSU-MW, número de acceso de GenBank AY274820; Cepa B-1SVD del virus de tipo Norwalk, número de acceso del GenBank AY274819; cepa del genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/Farmington Hills/2002/USA, número de acceso del GenBank AY502023; cepa del genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/CS-G4/2002/USA, número de acceso del GenBank AY502022; cepa del genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/CS-G2/2002/USA, número de acceso del GenBank AY502021; cepa del genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/CS-G1/2002/USA, número de acceso del GenBank AY502020; cepa del genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/Anchorage/2002/USA, número de acceso del GenBank AY502019; cepa del genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/CS-D1/2002/CAN, número de acceso GenBank AY502018; cepa del genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/Germanton/2002/USA, número de acceso del GenBank AY502017; Calicivirus humano NLV/GII/Langen1061/2002/DE, genoma completo, número de acceso de GenBank AY485642; Poliproteína de norovirus 1 murino, número de acceso de GenBank AY228235; Virus Norwalk, número de acceso de GenBank AB067536; calicivirus humano NLV/Mex7076/1999, número de acceso de GenBank AF542090; calicivirus humano NLV/Oberhausen 455/01/DE, número de acceso de GenBank AF539440; calicivirus humano NLV/Herzberg 385/01/DE, número de acceso de GenBank AF539439; calicivirus humano NLV/Boxer/2001/US, número de acceso de GenBank AF538679; ARN genómico del virus tipo Norwalk, genoma completo, número de acceso del GenBank AB081723; ARN genómico del virus tipo Norwalk, genoma completo, aislado: Saitama U201, número de acceso del GenBank AB039782; ARN genómico del virus tipo Norwalk, genoma completo, aislado: Saitama U18, número de acceso del GenBank AB039781; ARN genómico del virus tipo Norwalk, genoma completo, aislado: Saitama U25, número de acceso del GenBank AB039780; cepa del virus de Norwalk: U25GII, número de acceso de GenBank AB067543; cepa del virus de Norwalk: U201 GII, número de acceso de GenBank AB067542; Virus tipo Norwalk, cepa 416/97003156/1996/LA, número de acceso de GenBank AF080559; Virus tipo Norwalk, cepa 408/97003012/1996/FL, número de acceso de GenBank AF080558; Virus tipo Norwalk NLV/Burwash Landing/331/1995/US, número de acceso de GenBank AF414425; Virus tipo Norwalk NLV/Miami Beach/326/1995/US, número de acceso de GenBank AF414424; Virus tipo Norwalk NLV/White River/290/1994/US, número de acceso del GenBank AF414423; Virus tipo Norwalk NLV/New Orleans/306/1994/US, número de acceso de GenBank AF414422; Virus tipo Norwalk NLV/Port Canaveral/301/1994/US, número de acceso de GenBank AF414421; Virus tipo Norwalk NLV/Honolulu/314/1994/US, número de registro GenBank, AF414420; virus tipo Norwalk NLV/Richmond/283/1994/US, número de acceso de GenBank AF414419; Virus tipo Norwalk NLV/Westover/302/1994/US, número de acceso de GenBank AF414418; Virus tipo Norwalk NLV/UK3-17/12700/1992/GB, número de acceso de GenBank AF414417; Virus tipo Norwalk NLV/Miami/81/1986/US, número de acceso de GenBank AF414416; cepa Snow Mountain, número de acceso del GenBank U70059; virus Desert Shield DSV395, número de acceso de GenBank U04469; Virus de Norwalk, genoma completo, número de acceso de GenBank AF093797; Calicivirus de Hawaii, número de acceso de GenBank U07611; Virus de Southampton, número de acceso de GenBank L07418; Virus de Norwalk (SRSV-KY-89/89/J), número de acceso de GenBank L23828; virus de Norwalk (SRSV-SMA/76/US), número de acceso de GenBank L23831; Virus de Camberwell, número de acceso de GenBank U46500; cepa de calicivirus humano Melksham, número de acceso de GenBank X81879; cepa de calicivirus humano MX, número de acceso de GenBank U22498; Minireovirus TV24, número de acceso de GenBank U02030; y virus de tipo Norwalk NLV/Gwynedd/273/1994/US, número de acceso de GenBank AF414409; las secuencias de todas las cuales (según se ingresaron antes de la fecha de presentación de esta solicitud) se incorporan en este documento como referencia. Secuencias de norovirus adicionales se describen en las siguientes publicaciones de patentes: WO 2005/030806, WO 2000/79280, JP2002020399, US2003129588, U.S. Pat. N° 6.572.862, WO 1994/05700 y WO 05/032457. Ver también Green et al (2000) J. Infect. Dis., Vol. 181 (Supl. 2): S322-330; Wang et al. (1994) J. Virol., vol. 68: 5982-5990; Chen et al. (2004) J. Virol., vol. 78:6469-6479; Chakravarty et al. (2005) J. ViroL, vol. 79:554-568; Hansman et al. (2006) J. Gen. Virol., Vol. 87: 909-919; Bull et al. (2006) J. Clin. Micro., Vol. 44(2): 327 - 333; Siebenga, et al. (2007) J. Virol, vol. 81 (18): 9932-9941, y Fankhauser et al. (1998) J. Infect. Dis., Vol. 178: 1571 - 1578; para las comparaciones de secuencias y una discusión de la diversidad genética y el análisis filogenético de norovirus. El ácido nucleico y las correspondientes secuencias de aminoácidos de cada uno se incorporan por referencia en su totalidad. En algunas realizaciones, puede usarse un criptograma con fines de identificación y está organizado: especie anfitriona de la que se aisló el virus/abreviatura de género/abreviatura de especie/nombre de cepa/año de aparición/país de origen, (Green et al., Human Calicivirus, en Fields Virology vol. 1 841-874 (Knipe y Howley, editores en jefe, 4ª ed., Lippincott Williams y Wilkins 2001)). Las cepas virales del Genogrupo II, genotipo 4 (GII.4) (por ejemplo, cepas Houston, Minerva (también conocida como Den Haag) y Laurens (también conocidas como cepas Yerseke) son preferidas en algunas realizaciones. A medida que se identifican nuevas cepas y se ponen a disposición sus secuencias genéticas, los expertos en la técnica pueden emplear las VLP usando estas cepas contemporáneas en las composiciones y métodos de la presente invención utilizando la técnica ordinaria. Por lo tanto, la presente invención contempla VLP preparadas a partir de tales cepas como antígenos adecuados para usar en las composiciones y métodos descritos en este documento.

El antígeno de norovirus puede estar en forma de péptidos, proteínas o partículas del tipo virus (VLP). En una realización preferida, el antígeno del norovirus comprende VLP. Como se usa en este documento, "partícula(s) tipo(s) virus o VLP" se refiere a una(s) partícula(s) tipo(s) virus, fragmento(s), agregados o porción(s) de la misma producida a partir de la secuencia codificante de proteína de la cápside del norovirus y que comprende características antigénicas similares a las de las partículas infecciosas del norovirus. Los antígenos de norovirus también pueden estar en forma de monómeros de cápside, multímeros de cápside, fragmentos de proteínas o péptidos de VLP, o agregados o mezclas de los mismos. Las proteínas o péptidos antigénicos de norovirus también pueden estar en una forma desnaturalizada, producida usando métodos conocidos en la técnica.

Las VLP de la presente invención se pueden formar a partir de la proteína de la cápside de norovirus de longitud completa tales como las proteínas VP1 y/o VP2 o ciertos derivados de VP1 o VP2 usando métodos estándar en la técnica. Alternativamente, la proteína de la cápside utilizada para formar la 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 N o C-terminal. Las proteínas de la cápside truncada son derivados de la proteína de la cápside funcionalmente adecuados. Los derivados funcionales de la proteína de la cápside son capaces de generar una respuesta inmune (si es necesario, cuando están adecuadamente adyuvados) de la misma manera que la respuesta inmune es provocada por una VLP que consiste en la proteína de la cápside de longitud completa.

Las VLP pueden contener proteínas mayores VP1 y/o proteínas menores VP2. En algunas realizaciones, cada VLP contiene la proteína VP1 y/o VP2 de solo un genogrupo de norovirus que da lugar a una VLP monovalente. Como se usa en el presente documento, el término "monovalente" significa que las proteínas antigénicas se derivan de un genogrupo de norovirus único. Por ejemplo, las VLP contienen VP1 y/o VP2 de una cepa de virus del genogrupo I (por ejemplo, VP1 y VP2 del virus Norwalk). Preferiblemente, la VLP se compone principalmente de proteínas VP1. En una realización de la invención, el antígeno es una mezcla de VLP monovalentes en donde la composición incluye VLPs que comprenden VP1 y VP2 de un solo genogrupo del norovirus mezclado con VLPs compuestas por VP1 y VP2 de un genogrupo diferente de norovirus (p. ej, el virus de Norwalk y el virus de Houston) tomado de múltiples cepas virales. Puramente 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. Las cepas se pueden seleccionar en función de su predominio de la circulación en un momento dado. En ciertas realizaciones, la mezcla de VLP de norovirus se compone de cepas virales GI.1 y GII.4. Más preferiblemente, la mezcla de VLP de norovirus está compuesta por las cepas de Norwalk y una secuencia de cápside consensuada derivada de Norovirus del genogrupo II. Las secuencias de cápside de consenso derivadas de secuencias de norovirus circulantes y las VLP preparadas con tales secuencias se describen en el documento WO 2010/017542, que es incorporado en este documento como referencia en su totalidad. Por ejemplo, en una realización, una secuencia de cápside de consenso derivada de cepas virales del genotipo 4 (GII.4) del genogrupo II comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la composición de vacuna comprende una mezcla de VLP monovalentes, en donde una VLP monovalente comprende una proteína de la cápside de un norovirus del genogrupo I (p. ej. Norwalk) y la otra VLP monovalente comprende una proteína de la cápside de consenso que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1.

M K M A S S D A N P S D G S T A N L V P E V N N E V M A L E P V
V G A A I A A P V A G Q Q N V I D P W I R N N F V Q A P G G E F
T V S P R N A P G E I L W S A P L G P D L N P Y L S H L A R M Y
N G Y A G G F E V Q V I L A G N A F T A G K I I F A A V P P N F
P T E G L S P S Q V T M F P H I I V D V R Q L E P V L I P L P D
V R N N F Y H Y N Q S N D P T I K L I A M L Y T P L R A N N A G
D D V F T V S C R V L T R P S P D F D F I F L V P P T V E S R T
K P F T V P I L T V E E M T N S R F P I P L E K L F T G P S G A
F V V Q P Q N G R C T T D G V L L G T T Q L S P V N I C T F R G
D V T H I A G T Q E Y T M N L A S Q N W N N Y D P T E E I P A P
L G T P D F V G K I Q G V L T Q T T R G D G S T R G H K A T V S
T G S V H F T P K L G S V Q F S T D T S N D F E T G Q N T K F T
P V G V V Q D G S T T H Q N E P Q Q W V L P D Y S G R D S H N V
H L A P A V A P T F P G E Q L L F F R S T M P G C S G Y P N M N
L D C L L P Q E W V Q H F Y Q E A A P A Q S D V A L L R F V N P
D T G R V L F E C K L H K S G Y V T V A H T G Q H D L V I P P N
G Y F R F D S W V N Q F Y T L A P M G N G T G R R R A L (SEQ ID

NO: 1)

5 Sin embargo, en una realización alternativa de la invención, las VLP pueden ser VLP multivalentes que comprenden, por ejemplo, proteínas VP1 y/o VP2 de un genogrupo de norovirus entremezclado con proteínas VP1 y/o VP2 de un segundo genógeno del norovirus, en donde las diferentes proteínas VP1 y VP2 no son proteínas VP1 y VP2 quiméricas, sino que se asocian juntas dentro de la misma estructura de la cápside para formar VLP inmunogénicas. Tal como se usa en la presente memoria, el término "multivalente" significa que las proteínas antigénicas se derivan de dos o más genogrupos o cepas del norovirus. Las VLP multivalentes pueden contener antígenos de VLP tomados de dos o más cepas virales. Puramente, a modo de ejemplo, la composición puede contener VLP multivalentes constituidas por monómeros de cápside o multímeros de una o más cepas del genogrupo I de norovirus (p. ej. virus de Norwalk) junto con monómeros de cápside o multímeros de una o más cepas del genogrupo II del norovirus (p. ej. virus de Houston). Preferiblemente, las VLP multivalentes contienen proteínas de la cápside de las cepas de norovirus Norwalk y Houston, u otras cepas predominantemente circulantes en un momento dado.

15 La combinación de VLP monovalentes o multivalentes dentro de la composición preferiblemente no reduciría la inmunogenicidad de cada tipo de VLP. En particular, se prefiere que no haya interferencia entre las VLP de norovirus en la combinación de la invención, de manera que la composición de VLP combinada de la invención sea capaz de provocar inmunidad contra la infección por cada genotipo del norovirus representado en la vacuna. Adecuadamente, la respuesta inmune contra un tipo de VLP dado en la combinación es al menos 50% de la respuesta inmune del mismo tipo de VLP cuando se mide individualmente, preferiblemente 100% o sustancialmente 100%. La respuesta inmune se puede medir adecuadamente, por ejemplo, mediante respuestas de anticuerpos, como se ilustra en los ejemplos de este documento.

20 Como se usa en el presente documento, "VLP de norovirus del genogrupo I" se refiere a VLP monovalentes o multivalentes que comprenden una proteína de cápside derivada de una o más cepas del norovirus del genogrupo I. En algunas realizaciones, las VLP del norovirus del genogrupo I comprenden una proteína de la cápside de longitud completa de un norovirus del genogrupo I (p. ej. el virus de Norwalk). En otras realizaciones, las VLP del norovirus del genogrupo I comprenden una proteína de cápside consenso derivada de diversas cepas del genogrupo I. Las cepas del genogrupo I de las que se deriva la secuencia de la cápside consenso pueden estar dentro del mismo genotipo o grupo genético o de diferentes genotipos o grupos genéticos. De forma similar, como se usa en el presente documento, "VLP de norovirus del genogrupo II" se refiere a VLP monovalentes o multivalentes que comprenden una proteína de cápside derivada de una o más cepas del norovirus del genogrupo II. En algunas realizaciones, las VLP del norovirus del genogrupo II comprenden una proteína de cápside de longitud completa procedente de un norovirus del genogrupo II (p. ej. el virus Laurens o Minerva). En otras realizaciones, las VLP del norovirus del genogrupo II comprenden una proteína de cápside consenso derivada de diversas cepas del

genogrupo II. Las cepas del genogrupo II de las que se deriva la secuencia de la cápside de consenso pueden estar dentro del mismo genotipo o grupo genético o de diferentes genotipos o grupos genéticos. En una realización, las VLP del norovirus del genogrupo II comprenden una secuencia de consenso de la cápside del norovirus del genogrupo II, genotipo 4 (GII.4). Por lo tanto, en algunas realizaciones, las VLP del norovirus del genogrupo II comprenden una secuencia de la cápside de la SEQ ID NO: 1.

Las VLP multivalentes se pueden producir por expresión separada de las proteínas de la cápside individual seguidas de la combinación para formar las VLP. Alternativamente, se pueden expresar múltiples proteínas de la cápside dentro de la misma célula, a partir de uno o más constructos de ADN. Por ejemplo, pueden transformarse o transfectarse múltiples construcciones de ADN en células hospedadoras, codificando cada vector una proteína de cápside diferente. Alternativamente, puede usarse un único vector que tenga múltiples genes de cápside, controlados por un promotor compartido o múltiples promotores individuales. Los elementos IRES también pueden incorporarse al vector, según corresponda. Usando tales estrategias de expresión, las proteínas de la cápside coexpresadas pueden co-purificarse para la posterior formación de VLP, o pueden formar espontáneamente VLPs multivalentes que luego pueden ser purificadas.

Un proceso preferido para la producción de VLP multivalentes comprende la preparación de proteínas o derivados de la cápside de VLP, tales como proteínas VP1, a partir de diferentes genotipos de norovirus, la mezcla de las proteínas y el ensamblaje de las proteínas para producir VLP multivalentes. Las proteínas VP1 pueden estar en forma de un extracto crudo, ser parcialmente purificadas o purificadas antes del mezclado. Las VLP monovalentes ensambladas de diferentes genogrupos se pueden ensamblar, mezclar y reensamblar en VLP multivalentes. Preferiblemente, las proteínas o VLP se purifican, al menos parcialmente, antes de combinarse. Opcionalmente, se puede llevar a cabo una purificación adicional de las VLP multivalentes después del ensamblaje.

Adecuadamente, las VLP de la invención se preparan mediante el desensamblaje y el reensamblaje de VLP para proporcionar VLP homogéneas y puras. En una realización, las VLP multivalentes pueden prepararse mediante el desensamblaje de dos o más VLP, seguido de la combinación de los componentes de VLP desensamblados en cualquier punto adecuado antes del reensamblaje. Este enfoque es adecuado 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 se reduce a la formación espontánea de VLP, se pueden combinar las preparaciones de las proteínas VP1 o capsómeros antes del ensamblaje en las VLP. Cuando se usan VLP multivalentes, preferiblemente los componentes de las VLP se mezclan en las proporciones en que se desean en la VLP mezclada final. 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) proporciona una VLP multivalente con cantidades aproximadamente iguales de cada proteína.

Las composiciones que comprenden VLP multivalentes pueden estabilizarse mediante soluciones conocidas en la técnica, tales como las de los documentos WO 98/44944, WO 00/45841.

Las composiciones de la invención pueden comprender otras proteínas o fragmentos de proteínas además de proteínas o derivados de norovirus VP1 y VP2. Otras proteínas o péptidos también se pueden coadministrar con la composición de la invención. Opcionalmente, la composición también se puede formular o coadministrar con antígenos que no sean de Norovirus. Adecuadamente, estos antígenos pueden proporcionar protección contra otras enfermedades.

La proteína VP1 o el derivado de proteína funcional es adecuadamente capaz de formar una VLP, y la formación de VLP puede evaluarse mediante técnicas estándar tales como, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaños, microscopía electrónica y dispersión de luz láser dinámica.

Las moléculas antigénicas de la presente invención se pueden preparar mediante aislamiento y purificación a partir de los organismos en los que se producen de forma natural, o se pueden preparar mediante técnicas recombinantes. Preferiblemente los antígenos de VLP de norovirus se preparan a partir de células de insecto tales como células Sf9 o H5, aunque también puede usarse cualquier célula adecuada tal como E. coli o células de levadura, por ejemplo, S. cerevisiae, S. pombe, Pichia pastori u otros sistemas de expresión de Pichia, expresión de células de mamífero, tal como los sistemas CHO o HE. Cuando se prepara mediante un método recombinante o mediante síntesis, se pueden realizar una o más inserciones, deleciones, inversiones o sustituciones de los aminoácidos que constituyen el péptido. Cada uno de los antígenos mencionados anteriormente se usa preferiblemente en 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 los Estados Unidos N° 6.942.865.

Brevemente, se clona un ADNc del extremo 3' del genoma que contiene el gen de la cápside viral (ORF2) y un gen estructural menor (ORF3). Los baculovirus recombinantes que portan los genes de la cápside viral se construyen a partir de los ADNc clonados. Las VLP del norovirus se producen en cultivos de células de insectos Sf9 o H5.

La composición de vacuna comprende uno o más adyuvantes en combinación con el antígeno del norovirus. La mayoría de los adyuvantes contienen una sustancia diseñada para proteger al antígeno del catabolismo rápido, tal como el hidróxido de aluminio o el aceite mineral, y un estimulador de respuestas inmunes, tales como las proteínas derivadas de Bordetella pertussis o Mycobacterium tuberculosis. Se dispone comercialmente de adyuvantes adecuados tales como, por ejemplo, el adyuvante incompleto y el adyuvante completo de Freund (Pifco Laboratories, Detroit, Mich.); Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.); sales de aluminio tales como el gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o el fosfato de aluminio; sales de calcio, hierro o zinc; una suspensión insoluble de azúcares acilados de tirosina acilada; polisacáridos derivatizados catiónicamente o aniónicamente; polifosfazenos; microesferas biodegradables; y Quil A.

Los adyuvantes adecuados también incluyen, pero no se limitan a, agonistas del receptor tipo toll (TLR), particularmente agonistas del receptor tipo 4 tipo toll (TLR-4) (por ejemplo, monofosforil lípido A (MPL), lípido sintético A, miméticos o análogos del lípido A), sales de aluminio, citocinas, saponinas, derivados del dipéptido de muramilo (MDP), oligos CpG, lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram-negativas, polifosfazenos, emulsiones, virosomas, cocleatos, micropartículas de poli(lactida-co-glicólidos) (PLG), partículas de poloxámero, micropartículas, liposomas, emulsiones de aceite en agua, MF59 y escualeno. En algunas realizaciones, los adyuvantes no son exotoxinas derivadas bacterianamente. Los adyuvantes preferidos incluyen adyuvantes que estimulan una respuesta de tipo Th1, tal como 3DMPL o QS21.

El monofosforil lípido A (MPL), un derivado no tóxico del lípido A de la Salmonella, es un potente agonista de TLR-4 que se ha desarrollado como un adyuvante de vacuna (Evans et al., 2003). En estudios preclínicos murinos, el MPL intranasal ha demostrado mejorar las respuestas humorales secretoras, así como las sistémicas (Baldrige et al., 2000; Yang et al., 2002). También se ha demostrado que es seguro y eficaz como adyuvante de vacunas en estudios clínicos de más de 120.000 pacientes (Baldrick et al., 2002; Baldrige et al., 2004). El MPL estimula la inducción de la inmunidad innata a través del receptor TLR-4 y es capaz de provocar respuestas inmunitarias inespecíficas contra una amplia gama de patógenos infecciosos, incluidas bacterias gram negativas y gram positivas, virus y parásitos (Baldrige et al., 2004; Persing et al. 2002). La inclusión de MPL en formulaciones de vacunas debería proporcionar una inducción rápida de respuestas innatas, provocando respuestas inmunes inespecíficas a partir de la estimulación viral a la vez que mejora las respuestas específicas generadas por los componentes antigénicos de la vacuna.

La presente descripción proporciona una composición que comprende monofosforil lípido A (MPL) o 3 monofosforil lípido A 3 des-O-acilado (3D-MPL) como un potenciador de la inmunidad adaptativa e innata. Químicamente, el 3D-MPL es una mezcla de 3 monofosforil lípido A 3 des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Una forma preferida del monofosforil lípido A 3 des-O-acilado se describe en la patente europea 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals S A), que se incorpora en este documento como referencia. Se describe en este documento una composición que comprende lípido A sintético, miméticos o análogos del lípido A, tales como PET Lípido A de BioMira, o derivados sintéticos diseñados para funcionar como agonistas de TLR-4.

La composición de vacuna comprende dos adyuvantes. Los dos adyuvantes son MPL e hidróxido de aluminio (por ejemplo, alumbre).

La expresión "cantidad adyuvante efectiva" o "cantidad efectiva de adyuvante" será bien comprendida por los expertos en la técnica, e incluye una cantidad de uno o más adyuvantes que es capaz de estimular la respuesta inmune frente a un antígeno administrado, es decir, una cantidad que aumenta la respuesta inmune de una composición de antígeno administrada, medida en términos de los niveles de IgA en los lavados nasales, niveles séricos de IgG o IgM, o proliferación de células B y T. Los incrementos adecuadamente efectivos en los niveles de inmunoglobulina incluyen más del 5%, preferiblemente en más del 25%, y en particular en más de 50%, en comparación con la misma composición de antígeno sin ningún adyuvante.

En una realización, la presente invención proporciona una composición de vacuna formulada para la administración parenteral, en la que la composición incluye al menos dos tipos de VLP de norovirus en combinación con hidróxido de aluminio y un tampón. El tampón puede seleccionarse del grupo que consiste en L-histidina, imidazol, ácido succínico, tris, ácido cítrico, bis-tris, pipes, mes, hepes, glicinamida y tricina. En una realización, el tampón es L-histidina o imidazol. Preferiblemente, el tampón está presente en una concentración de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 50 mM, más preferiblemente de aproximadamente 18 mM a aproximadamente 40 mM, o lo más preferiblemente de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 25 mM. En algunas realizaciones, el pH de la composición antigénica o de vacuna es de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,0, o de aproximadamente 6,2 a aproximadamente 6,8 o aproximadamente 6,5. La composición de vacuna puede ser una formulación acuosa. En algunas realizaciones, la composición de vacuna es un polvo liofilizado y reconstituido en una formulación acuosa.

La composición de vacuna comprende además al menos un adyuvante además de los dos o más tipos de VLP de norovirus, hidróxido de aluminio y un tampón. El adyuvante es MPL.

Las VLP del norovirus incluidas en las composiciones de vacuna de la descripción pueden ser cualquiera de las VLP descritas en este documento. En una realización, los dos tipos de VLP de norovirus comprenden cada uno una

proteína de cápside de diferentes genogrupos (por ejemplo, genogrupo I y genogrupo II). Por ejemplo, un tipo de VLP de norovirus comprende una proteína de cápside derivada de un norovirus del genogrupo I y el otro tipo de VLP de norovirus comprende una proteína de cápside derivada de un norovirus del genogrupo II. En una realización, un tipo de VLP de norovirus comprende una proteína de cápside del virus Norwalk y el otro tipo de VLP de norovirus comprende una proteína de cápside consenso derivada de norovirus del genotipo 4 del genogrupo II (por ejemplo, una proteína de cápside que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1). La composición de vacuna puede comprender de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 200 µg de cada VLP del norovirus, más preferiblemente de aproximadamente 15 µg a aproximadamente 50 µg de cada VLP del norovirus. En algunas realizaciones, la dosis de un tipo de VLP de norovirus es diferente de la dosis del otro tipo de VLP de norovirus. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la composición de vacuna comprende de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 15 µg de una VLP del genogrupo I y de aproximadamente 15 µg a aproximadamente 50 µg de una VLP del genogrupo II. En otras realizaciones, la composición de vacuna comprende de aproximadamente 15 µg a aproximadamente 50 µg de una VLP del genogrupo I y de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 150 µg de una VLP del genogrupo II.

En algunas realizaciones, las composiciones de vacuna comprenden además una sal farmacéuticamente aceptable, que incluye, pero no se limita a, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, sulfato de amonio y citrato de sodio. En una realización, la sal farmacéuticamente aceptable es el cloruro de sodio. La concentración de la sal farmacéuticamente aceptable puede ser de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM, con concentraciones preferidas en el intervalo de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 150 mM. Preferiblemente, las composiciones de vacuna de la invención contienen menos de 2 mM de fosfato libre. En algunas realizaciones, las composiciones de vacuna comprenden menos de 1 mM de fosfato libre. Las composiciones de vacuna también pueden comprender otros excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como azúcares (por ejemplo, sacarosa, trehalosa, manitol) y tensioactivos.

Como se discutió en este documento, las composiciones de la descripción pueden formularse para su administración como formulaciones de vacunas. Como se usa en este documento, el término "vacuna" se refiere a una formulación que contiene VLP de norovirus u otros antígenos de norovirus de la presente descripción, tal como se describió anteriormente, que está en una forma que es capaz de administrarse a un vertebrado, particularmente un ser humano, y que induce una respuesta inmune protectora suficiente para inducir inmunidad para prevenir y/o mejorar una infección por norovirus o una enfermedad inducida por norovirus y/o reducir al menos un síntoma de una infección o enfermedad por norovirus.

Como se usa en este documento, la expresión "respuesta inmune" se refiere tanto a una respuesta inmune humoral como a una respuesta inmune mediada por células. La respuesta inmune humoral implica la estimulación de la producción de anticuerpos por linfocitos B que, por ejemplo, neutralizan agentes infecciosos, bloquean la entrada de agentes infecciosos en las células, bloquean la replicación de dichos agentes infecciosos y/o protegen a las células anfitrionas de su infección y destrucción. La respuesta inmune mediada por células se refiere a una respuesta inmune que está mediada por linfocitos T y/u otras células, tales como macrófagos, contra un agente infeccioso, exhibido por un vertebrado (por ejemplo, un ser humano), que previene o mejora la infección o reduce al menos un síntoma del mismo. En particular, "inmunidad protectora" o "respuesta inmune protectora" se refiere a la inmunidad o a provocar una respuesta inmune contra un agente infeccioso, que es exhibida por un vertebrado (por ejemplo, un ser humano), que previene o mejora una infección o reduce al menos uno de sus síntomas. Específicamente, la inducción de una respuesta inmune protectora a partir de la administración de la vacuna es evidente mediante la eliminación o reducción de la presencia de uno o más síntomas de gastroenteritis aguda o una reducción en la duración o gravedad de tales síntomas. Los síntomas clínicos de gastroenteritis por norovirus incluyen náuseas, diarrea, deposiciones sueltas, vómitos, fiebre y malestar general. Una respuesta inmune protectora que reduce o elimina los síntomas de la enfermedad reducirá o detendrá la propagación de un brote de norovirus en una población. La preparación de vacunas se describe generalmente en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds. Powell M. F. y Newman M. J.) (1995) Plenum Press New York). Las composiciones de la presente descripción se pueden formular, por ejemplo, para su administración por inyección, tal como inyección parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea, intradérmica o intramuscular).

Cuando la composición está destinada a la inyección parenteral, tal como la inyección intravenosa (iv), subcutánea (sc), intradérmica o intramuscular (im), típicamente se formula como una suspensión líquida (es decir, formulación acuosa) compuesta de la VLP del norovirus y el adyuvante.

La vacuna líquida formulada parenteralmente (por ejemplo, formulada im, iv o sc) comprende VLP del norovirus genogrupo I y/o genogrupo II con hidróxido de aluminio (por ejemplo, alumbre) y monofosforil lípido A (MPL) como adyuvantes. En una realización, una formulación líquida para su administración parenteral comprende antígeno(s) del genogrupo del Norovirus, tales como las VLP del norovirus que se describe en este documento, MPL, hidróxido de aluminio y un tampón.

En ciertas realizaciones, el tampón en las formulaciones de vacunas parenterales es L-histidina o imidazol. La administración parenteral de vacunas líquidas puede realizarse mediante aguja y jeringa, como es bien conocido en la técnica.

En ciertas realizaciones, una composición de vacuna de la descripción para provocar una respuesta inmune protectora contra norovirus en seres humanos comprende VLP de norovirus del genogrupo I y/o genogrupo II a una dosis de no más de 150 µg. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición de vacuna comprende no más de 150 µg, no más de 100 µg, no más de 50 µg, no más de 25 µg, no más de 15 µg, o no más de 10 µg de VLPs del norovirus del genogrupo I. En otras realizaciones, la composición de vacuna comprende no más de 150 µg, no más de 100 µg, no más de 50 µg, no más de 25 µg, no más de 15 µg, o no más de 10 µg de VLPs del norovirus del genogrupo II. En ciertas realizaciones, la composición de vacuna comprende no más de 150 µg de cada VLP del norovirus del genogrupo I y genogrupo II. En tales realizaciones, la dosis de VLP del norovirus del genogrupo I y VLP del genogrupo II puede ser la misma o diferente. Por ejemplo, en una realización, la composición de vacuna puede comprender no más de 50 µg de VLP del norovirus del genogrupo I y no más de 150 µg de VLP del norovirus del genogrupo II. En otra realización, la composición de vacuna puede comprender no más de 25 µg de VLP del norovirus del genogrupo I y no más de 50 µg de VLP del norovirus del genogrupo II. En otras realizaciones, la composición de vacuna puede comprender no más de 15 µg de VLP del norovirus del genogrupo I y no más de 50 µg de VLP del norovirus del genogrupo II. En otras realizaciones más, la composición de vacuna puede comprender no más de 25 µg de VLP del norovirus del genogrupo I y no más de 150 µg de VLP del norovirus del genogrupo.

Las VLP del norovirus del genogrupo I y del genogrupo II pueden derivarse de cualquiera de las cepas de norovirus descritas en este documento. En una realización, las VLP del norovirus del genogrupo I son VLP del genogrupo I, genotipo 1 (GI.1) (es decir, comprenden una proteína de la cápside de un norovirus GI.1). En otra realización, las VLP del norovirus del genogrupo I son VLP de Norwalk. En otra realización, las VLP del norovirus del genogrupo II son VLP del genogrupo II, genotipo 4 (GII.4). En otra realización más, las VLP del norovirus del genogrupo II son VLP generadas a partir de la expresión de una secuencia consenso del norovirus del genogrupo II. En una realización particular, las VLP del norovirus del genogrupo II comprenden una proteína de la cápside que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 1.

Las composiciones de vacuna descritas anteriormente en esta memoria pueden liofilizarse y almacenarse anhidras hasta que estén listas para su uso, en cuyo punto se reconstituyen con diluyente. Alternativamente, diferentes componentes de la composición pueden almacenarse por separado en un kit (estando cualquiera o todos los componentes liofilizados). Los componentes pueden permanecer en forma liofilizada para una formulación seca o reconstituirse para formulaciones líquidas, y mezclarse antes del uso o administrarse por separado al paciente. En algunas realizaciones, las composiciones de vacuna se almacenan en kits en formulaciones líquidas y pueden estar acompañadas por dispositivos de suministro, tales como jeringas equipadas con agujas. En otras realizaciones, las composiciones de vacuna líquida pueden almacenarse dentro de los dispositivos de administración en un kit. Por ejemplo, un kit puede comprender jeringas previamente rellenas, dispositivos de autoinyección o dispositivos de bolígrafo de inyección que contienen una formulación líquida de una composición de vacuna descrita en este documento.

La liofilización de vacunas es bien conocida en la técnica. Típicamente, el antígeno líquido se liofiliza en presencia de agentes para proteger el antígeno durante el proceso de liofilización y para producir una torta con características de polvo deseables. Azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o lactosa (presentes a una concentración inicial de 10-200 mg/ml) se usan comúnmente para la crioprotección de antígenos proteicos y para producir tortas liofilizadas con características de polvo deseables. La liofilización de las composiciones teóricamente da como resultado una composición más estable.

La cantidad de antígeno en cada composición de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmune robusta sin efectos secundarios adversos significativos. Dicha cantidad variará dependiendo de qué antígeno(s) específico(s) se emplee, vía de administración y adyuvantes usados. En general, la dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, debería ser suficiente para efectuar una respuesta inmune protectora en el paciente a lo largo del tiempo, o para inducir la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por lo tanto, la composición se administra a un paciente en una cantidad suficiente para provocar una respuesta inmune frente a los antígenos específicos y/o para prevenir, aliviar, reducir o curar los síntomas y/o las complicaciones de una enfermedad o infección, y así reducir o detener la propagación de un brote de norovirus en una población. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente efectiva".

Las composiciones de vacuna de la presente descripción se pueden administrar a través de una ruta no mucosal. Estas administraciones pueden incluir la administración in vivo a través de una inyección parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intradérmica e intramuscular).

Otras vías de administración adecuadas incluyen transcutánea, subdérmica y vía supositorio. En una realización, la vacuna se administra por una vía de administración parenteral, tal como intravenosa, subcutánea, intradérmica o intramuscular. En ciertas realizaciones, la vacuna se administra por vía de la administración intramuscular. La administración se puede llevar a cabo simplemente mediante una administración directa usando una aguja, catéter o dispositivo relacionado (por ejemplo, jeringas previamente preparadas o autoinyectores), en un punto de tiempo único o en puntos múltiples de tiempo. Otras formulaciones parenterales pueden administrarse por vía subcutánea o intradérmica mediante métodos de microinyección o de parches cutáneos.

La presente descripción proporciona métodos para provocar inmunidad protectora contra norovirus en un sujeto que comprende administrar por vía parenteral al sujeto no más de una única dosis de una composición de vacuna de la descripción, en donde dicha vacuna comprende VLP de norovirus del genogrupo I y/o del genotipo II como se describe en el presente documento y un adyuvante. En tales realizaciones, la composición de vacuna de dosis única induce al menos un aumento de tres veces en el título de anticuerpos en suero específico de norovirus en comparación con el título en el ser humano antes de la administración de la composición. En algunas realizaciones, la composición de vacuna de dosis única induce al menos un aumento de seis veces en el título de anticuerpos en suero específicos de norovirus en comparación con el título en el ser humano antes de la administración de la composición. En otras realizaciones, la composición de vacuna de dosis única induce un título de anticuerpo sérico específico de norovirus comparable al título de anticuerpo inducido por la exposición al norovirus vivo en una infección natural; es decir, un aumento de anticuerpo en suero específico de norovirus mayor que diez veces comparado con el título en el ser humano antes de la administración de la composición. En ciertas realizaciones, la composición de vacuna de dosis única induce el aumento en el título de anticuerpos en suero específicos de norovirus dentro de los siete días siguientes a la administración de la composición. Preferiblemente, la composición de vacuna de dosis única se administra por vía de administración intravenosa, subcutánea o intramuscular. En una determinada realización, la composición de vacuna de dosis única se administra por vía intramuscular al ser humano.

Como se describe en el presente documento, en algunas realizaciones, las composiciones de vacuna de dosis única adecuadas para su uso en el método comprenden no más de 150 µg de cada uno de los norovirus del genogrupo I y/o del genogrupo II. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición de vacuna comprende no más de 150 µg, no más de 100 µg, no más de 50 µg, no más de 25 µg, no más de 15 µg, o no más de 10 µg de VLP del norovirus del genogrupo I. En otras realizaciones, la composición de vacuna comprende no más de 150 µg, no más de 100 µg, no más de 50 µg, no más de 25 µg, no más de 15 µg, o no más de 10 µg de VLP del norovirus del genogrupo II. En ciertas realizaciones, la composición de vacuna comprende no más de 50 µg de cada VLP del norovirus del genogrupo I y genogrupo II. En realizaciones en las que la composición de vacuna de dosis única comprende tanto VLP del norovirus del genogrupo I como del genogrupo II, la dosis de VLP del norovirus del genogrupo I y VLP del genogrupo II puede ser la misma o diferente. Por ejemplo, en una realización, la composición de vacuna puede comprender no más de 50 µg de VLP del norovirus del genogrupo I y no más de 150 µg de VLP del norovirus del genogrupo II. En otra realización, la composición de vacuna puede comprender no más de 25 µg de VLP del norovirus del genogrupo I y no más de 50 µg de VLP del norovirus del genogrupo II. En otras realizaciones, la composición de vacuna puede comprender no más de 15 µg de VLP del norovirus del genogrupo I y no más de 50 µg de VLP del norovirus del genogrupo II. En otras realizaciones más, la composición de vacuna puede comprender no más de 25 µg de VLP de norovirus del genogrupo I y no más de 150 µg de VLP del norovirus del genogrupo II,

En una realización del método, el sujeto es un ser humano y la vacuna confiere protección contra uno o más síntomas de la infección por norovirus. Aunque se hayan publicado otros métodos para inducir una respuesta inmune con antígenos de norovirus (véase la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° US 2007/0207526), todavía no se han identificado claramente a los indicadores de una respuesta inmune protectora contra los norovirus en los seres humanos (Herbst-Kralovetz et al. (2010) Expert Rev, Vaccines 9 (3), 299-307). A diferencia de varias vacunas actualmente autorizadas en EE.UU. donde la efectividad de la vacuna se correlaciona con anticuerpos séricos, los estudios han demostrado que los marcadores de una respuesta inmune, tales como títulos elevados de anticuerpos IgG en suero contra el virus Norwalk, no están asociados con una inmunidad protectora en seres humanos (Johnson et al. (1990) J. Infectious Diseases 161: 18-21). Además, otro estudio que examinó la exposición viral de Norwalk en seres humanos indicó que la susceptibilidad frente a la infección por Norwalk era multifactorial e incluía factores tales como el estado secretor y la respuesta inmune de la mucosa de la memoria (Lindesmith et al. (2003) Nature Medicine 9: 548 - 553).

Debido a que el norovirus no se puede cultivar in vitro, actualmente no se dispone de ensayos de neutralización vírica. Un ensayo funcional que sirve como un sustituto para el ensayo de neutralización es el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HAI) (véase el Ejemplo 1). El HAI mide la capacidad de los anticuerpos inducidos por la vacuna de norovirus para inhibir la aglutinación de los glóbulos rojos recubiertos de antígeno por las VLP de norovirus porque las VLP de norovirus se unen a los antígenos de los glóbulos rojos (por ejemplo, antígenos de los grupos sanguíneos histo). Este ensayo también se conoce como el ensayo de bloqueo de carbohidratos, ya que es indicativo de la capacidad funcional de los anticuerpos para bloquear la unión del virus o VLP a los carbohidratos del antígeno del grupo sanguíneo en un glóbulo rojo. En este ensayo, se mezcla una cantidad fija de VLP de norovirus con una cantidad fija de glóbulos rojos y suero de sujetos inmunizados. Si la muestra de suero contiene anticuerpos funcionales, los anticuerpos se unirán a las VLP, inhibiendo así la aglutinación de los glóbulos rojos. Como se usa en este documento, "anticuerpos funcionales" se refiere a anticuerpos que son capaces de inhibir la interacción entre partículas de norovirus y antígenos de glóbulos rojos. En otras palabras, el título de anticuerpos funcionales es equivalente al título del antígeno del grupo sanguíneo histo (HBGA) o al título de anticuerpos bloqueantes de carbohidratos. El título sérico de anticuerpos funcionales específicos de norovirus se puede medir mediante el ensayo de HAI descrito anteriormente. El título sérico de anticuerpos funcionales específicos de norovirus también se puede medir utilizando un ensayo basado en ELISA en el que un antígeno H de carbohidrato se une a pocillos de microtitulación y se detecta la unión de VLP de norovirus al antígeno H en presencia de suero (véase el Ejemplo 1 y Reek et al. (2010) J Infect Dis, Vol. 202(8): 1212-1218). Un aumento en el nivel de anticuerpos funcionales

específicos de norovirus puede ser un indicador de una respuesta inmune protectora. Por lo tanto, en una realización, la administración de la vacuna provoca una inmunidad protectora que comprende un aumento en el título de suero de anticuerpos funcionales específicos de norovirus en comparación con el título sérico en un ser humano que no recibe la vacuna. El título en suero de anticuerpos funcionales específicos de norovirus indicativos de una respuesta inmune protectora es preferiblemente un título de la media geométrica mayor que 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 medido por el ensayo HAI o el título de bloqueo (BT)₅₀ (50% de inhibición de la unión del antígeno H por VLP de norovirus), título de la media geométrica superior a 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 ó 500, medido por el ensayo de unión al antígeno H. En una realización, el título en suero de anticuerpos funcionales específicos de norovirus es un título de la media geométrica mayor que 40 según se mide mediante el ensayo HAI. En otra realización, el título en suero de anticuerpos funcionales específicos de norovirus es un título de la media geométrica mayor que 100 según se mide mediante el ensayo HAI. En otra realización, el título en suero de anticuerpos funcionales específicos de norovirus es un título de la media geométrica BT₅₀ mayor que 100, medido por el ensayo de unión al antígeno H. En otra realización más, el título en suero de anticuerpos funcionales específicos de norovirus es un título de la media geométrica BT₅₀ mayor que 200 según se mide mediante el ensayo de unión al antígeno H.

En un aspecto adicional, la administración de la vacuna provoca una inmunidad protectora que comprende una respuesta inmune de la mucosa IgA y una respuesta inmune sistémica de IgG, administrando por vía parenteral (preferiblemente intramuscular) al sujeto no más de una única dosis de una composición antigénica o de vacuna que comprende uno o más tipos de antígenos de norovirus y opcionalmente al menos un adyuvante. Los inventores han descubierto sorprendentemente que la administración parenteral de las composiciones de vacuna de norovirus descritas en la presente memoria induce una respuesta de IgA robusta además de una fuerte respuesta de IgG. Típicamente, las respuestas fuertes de IgA solo se observan cuando las vacunas se administran a través de una vía de administración de la mucosa.

En ciertas realizaciones, la administración de la vacuna provoca una inmunidad protectora que comprende un aumento en el nivel de células secretoras de anticuerpos específicos de norovirus IgA en la sangre en comparación con el nivel en un ser humano que no recibe la vacuna. En algunas realizaciones, la administración de la vacuna provoca una inmunidad protectora que comprende un aumento en el nivel de células secretoras de anticuerpos específicos de norovirus IgA en la sangre en comparación con el nivel en el ser humano antes de recibir la vacuna. En una realización, las células secretoras de anticuerpos específicas de norovirus de IgA son CCR10+, CD19+, CD27+, CD62L+ y $\alpha 4\beta 7+$. Las células secretoras de anticuerpos con este perfil de marcador son capaces de dirigirse tanto al tejido linfoide periférico, tal como el parche de Peyer en el intestino, como al tejido linfoide de la mucosa, tal como la mucosa intestinal. En una realización, el número de células secretoras de anticuerpos IgA CCR10+, CD19+, CD27+, CD62L+ y $\alpha 4\beta 7+$ es mayor que aproximadamente 500, aproximadamente 700, aproximadamente 1.000, aproximadamente 1.500 o mayor que aproximadamente 2.000 células por 1×10^6 monocitos de sangre periférica. En otra realización, las células secretoras de anticuerpos específicas de norovirus de IgA son CCR10+, CD19+, CD27+, CD62L- y $\alpha 4\beta 7+$. Las células secretoras de anticuerpos con este perfil de marcador generalmente exhiben una dirección solo a los sitios de la mucosa y pueden ser indicativos de una respuesta de la memoria de las células B. En algunas realizaciones en las que la vacuna se administra por vía intramuscular, el número de células secretoras de anticuerpos IgA CCR10+, CD19+, CD27+, CD62L- y $\alpha 4\beta 7+$ es mayor que aproximadamente 5.000, aproximadamente 6.500, aproximadamente 7.000, aproximadamente 10.000, aproximadamente 13.000, aproximadamente 15.000, o más de aproximadamente 20.000 células por 1×10^6 monocitos de sangre periférica.

Se han observado hallazgos similares con vacunas para otros virus, tales como el rotavirus. Para las vacunas contra el rotavirus, existe controversia sobre si los anticuerpos séricos están directamente implicados en la protección o simplemente reflejan una infección reciente (Jiang, 2002; Franco, 2006). Definir tales correlaciones de protección es particularmente difícil en el contexto de enfermedades diarreicas, tales como rotavirus o norovirus, donde los estudios preclínicos que infieren protección pueden ser multifacéticos con contribuciones de la inmunidad de la mucosa (como la IgA intestinal), la elaboración de citocinas y la inmunidad mediada por células. La dificultad para medir tales respuestas inmunitarias durante el desarrollo clínico y la falta de correlación con las mediciones de anticuerpos en el suero requieren que la eficacia de una vacuna para estos tipos de virus solo pueda demostrarse mediante experimentos de exposición clínica en seres humanos.

Como se menciona anteriormente, la administración de una composición de vacuna de la presente invención previene y/o reduce al menos un síntoma de infección por norovirus. Los síntomas de la infección por norovirus son bien conocidos en la técnica e incluyen náuseas, vómitos, diarrea y calambres estomacales. Además, un paciente con una infección por norovirus puede tener fiebre baja, dolor de cabeza, escalofríos, dolores musculares y fatiga. La descripción también abarca un método para inducir una respuesta inmune protectora en un sujeto que experimenta una infección por norovirus, administrando al sujeto una formulación de vacuna de la descripción de manera que al menos un síntoma asociado con la infección por norovirus se alivie y/o reduzca. Una reducción en un síntoma se puede determinar de forma subjetiva u objetiva, por ejemplo, autoevaluación por un sujeto, por evaluación de un médico o realizando un ensayo o medida apropiada (por ejemplo, temperatura corporal), incluyendo, por ejemplo, una evaluación de la calidad de vida, una progresión lenta de una infección por norovirus o síntomas adicionales, una gravedad reducida de los síntomas del norovirus o ensayos adecuados (por ejemplo, título de anticuerpos,

detección de antígenos RT-PCR y ensayo de activación de células B o células T). También se puede determinar una respuesta efectiva midiendo directamente (por ejemplo, RT-PCR) la carga del virus en muestras de heces, lo que refleja la cantidad de virus liberado de los intestinos). La evaluación objetiva comprende evaluaciones tanto animales como humanas.

- 5 La descripción también proporciona un método para generar anticuerpos contra uno o más antígenos del norovirus, comprendiendo dicho método la administración de una composición de vacuna de la descripción como se describió anteriormente a un sujeto. Estos anticuerpos se pueden aislar y purificar mediante métodos rutinarios en la técnica. Los anticuerpos aislados específicos para antígenos de norovirus se pueden usar en el desarrollo de ensayos inmunológicos de diagnóstico. Estos ensayos podrían emplearse para detectar un norovirus en muestras clínicas e identificar el virus particular que causa la infección (p. ej., Norwalk, Houston, Snow Mountain, etc.). Alternativamente, los anticuerpos aislados pueden administrarse a sujetos susceptibles a la infección por norovirus para conferir inmunidad pasiva o de corto plazo.

La invención se ilustrará ahora con mayor detalle por referencia a las realizaciones específicas descritas en los siguientes ejemplos.

15 **Ejemplos**

Ejemplo 1. Estudio del escalamiento de dosis, seguridad e inmunogenicidad de la vacuna de partículas similares a virus (VLP) bivalente de norovirus Intramuscular en seres humanos (Estudio LV03-104), Cohorte A

20 Este ejemplo describe la cohorte A de un estudio de escalado de dosis aleatorizado, de múltiples sitios de la seguridad e inmunogenicidad de cuatro niveles de dosificación de una vacuna VLP bivalente de norovirus intramuscular (IM) adyuvada con monofosforil lípido A (MPL) e hidróxido de aluminio (AlOH) en comparación con placebo en sujetos adultos. Aproximadamente 48 sujetos de 18 a 49 años de edad se inscribieron en la cohorte. Los sujetos recibieron dos dosis de la vacuna o placebo, por inyección intramuscular (IM), con una separación de 28 días con una aguja de 1,5 pulgadas (38 mm).

25 La vacuna VLP bivalente de norovirus contenía VLP del genogrupo I, genotipo 1 (GI.1) y genogrupo II, genotipo IV (GII.4) como los antígenos, y monofosforil lípido A (MPL) e hidróxido de aluminio (AlOH) como adyuvantes, cloruro de sodio (NaCl) y L-histidina (L-His) como tampón (pH 6,3-6,7), etanol y agua para inyección. La composición de la vacuna VLP bivalente intramuscular de norovirus se resume en la Tabla 1. Las VLP GII.4 comprendían una secuencia de la cápsida de la SEQ ID NO: 1, que se derivaba de tres cepas de GII.4.

30 Tabla 1. Composición final del producto farmacológico para cuatro formulaciones de vacuna de VLP bivalente de norovirus IM por 0,5 mL

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

* como hidróxido de aluminio

35 El placebo fue solución salina normal estéril para inyección (0,9% de NaCl y sin conservantes). La escalada de dosis de la vacuna se realizó de la siguiente manera: después de un examen apropiado sobre buena salud, los sujetos en la cohorte A se inscribieron secuencialmente en cada uno de cuatro grupos de dosificación de ~12 sujetos cada uno (Grupos de dosificación A1, A2, A3 y A4). Los grupos de dosificación A1, A2, A3 y A4 representan dosificaciones antigénicas bivalentes de 5/5 µg, 15/15 µg, 50/50 µg y 150/150 µg, respectivamente, de los norovirus GI.1 y GII.4. Los sujetos en cada grupo de dosificación se aleatorizaron 5:1 para recibir la vacuna o el placebo. Los sujetos del Grupo A1 de dosificación recibieron su tratamiento aleatorizado respectivo (10 sujetos recibieron 5/5 µg de vacuna y 2 sujetos recibieron placebo). Los sujetos fueron seguidos para una evaluación de seguridad mediante la revisión de los síntomas registrados en la ayuda de memoria (Días 0-7) y los historiales médicos provisionales de las visitas del Día 7, 21, 28, 35 y 56. Los datos de seguridad fueron revisados por el Central Safety Monitor (CSM). Después de los 7 días posteriores a la dosis 2 de seguridad (Día de Estudio 35) estuvieron disponibles para su revisión los sujetos en el Grupo A1 de dosificación y fueron considerados aceptables, los sujetos en el Grupo A2 de dosificación fueron elegibles para recibir su dosis inicial. La misma regla aplicada para la dosificación en los siguientes grupos de dosificación; es decir, después del día 7 los datos de seguridad de la dosis 2 (día de estudio 35) estuvieron disponibles para su revisión en un grupo de dosificación, el siguiente grupo de dosificación fue elegible para recibir su dosis inicial.

Al final de la inscripción en la cohorte A, aproximadamente 10 sujetos en cada grupo de dosificación recibieron la vacuna (un total de 40 vacunados) y 2 sujetos en cada grupo recibieron solución salina (un total de aproximadamente 8 receptores de control de solución salina).

5 Los sujetos mantuvieron una ayuda de memoria diaria de síntomas solicitados que incluyeron cuatro reacciones locales en el sitio de inyección, tales como dolor, sensibilidad, enrojecimiento e hinchazón, y 10 signos o síntomas sistémicos que incluyeron temperatura oral diaria, dolor de cabeza, fatiga, dolores musculares, escalofríos y dolores en las articulaciones y síntomas gastrointestinales de náuseas, vómitos, diarrea, calambres abdominales/dolor durante los días 0 a 7 después de cada dosis de vacuna o control con VLP bivalente IM de norovirus. El enrojecimiento y la hinchazón en el sitio de inyección se midieron y registraron diariamente durante los 7 días después de cada inyección.

10 Se obtuvieron historiales médicos provisionales en cada visita de seguimiento en los días 7 + 3, 21 + 3, 28 + 3, 35 + 3, 56 + 7, 180 + 14 y 393 + 14 y en la llamada de seguimiento del Día 265 +14; se les preguntó a los sujetos acerca de enfermedades temporales, visitas al médico, cualquier evento adverso grave (EAG) y el inicio de cualquier nueva condición médica significativa. Los sujetos tuvieron CBC con diferencial de WBC y recuento de plaquetas, y BUN, creatinina, glucosa, AST y ALT en suero evaluados en el cribado y en los días 21 y 35 (~ 7 días después de cada dosis) para evaluar la elegibilidad y seguridad continuas, respectivamente.

15 Se recogió sangre de los sujetos antes de la vacunación en el día 0 y en los días 7 + 3, 21 + 3, 28 + 3, 35 + 3, 56 + 7, 180 + 14 y 393 +14 para medir los anticuerpos séricos (IgG, IgA, e IgM por separado y combinados) frente a la vacuna de VLP bivalente de IM de norovirus por ensayos inmunoabsorbentes unidos a enzima (ELISA). También se midieron la actividad bloqueante de carbohidratos en suero y los anticuerpos séricos de HAI. Para los sujetos en la cohorte A, se analizaron las células secretoras de anticuerpos (ASC), los marcadores de referencia, los cebos de memoria B y las respuestas inmunitarias celulares.

Los siguientes métodos se usaron para analizar las muestras de sangre recolectadas de personas inmunizadas o personas que reciben el placebo.

25 Mediciones de anticuerpos en suero por ELISA

La medición de anticuerpos contra el norovirus por ELISA se realizó para todos los sujetos, utilizando VLP de norovirus recombinantes purificados (GI.1 y GI.4 por separado) como antígenos diana para seleccionar las muestras codificadas. Brevemente, se usaron VLP de norovirus en tampón de recubrimiento de carbonato pH 9,6 para recubrir placas de microlitros. Las placas recubiertas se lavaron, bloquearon e incubaron con diluciones dobles en serie de suero de prueba seguido de lavado e incubación con reactivos de anticuerpos secundarios conjugados con enzimas específicos para IgG total humana, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgM. Se agregaron soluciones de sustrato apropiadas, se desarrollaron colores, se leyeron las placas y se determinaron los títulos de los puntos finales IgG, IgA e IgM en comparación con una curva estándar de referencia para cada clase de anticuerpo. Se determinaron los títulos de la media geométrica (GMT), los aumentos en veces de la media geométrica (GMFR) y las tasas de respuestas en suero para cada grupo. La sero-respuesta se definió como un aumento de 4 veces en el título de anticuerpos en comparación con los títulos de preinmunización.

Actividad de bloqueo de los antígenos del grupo histo-sanguíneo de los carbohidratos de los norovirus (HBGA)

30 Se realizaron ensayos de bloqueo para medir la capacidad de los anticuerpos séricos para inhibir la unión de NV VLP frente a carbohidratos sintéticos de H tipo 1 o H tipo 3 tal, como se describió previamente (Reeck et al. (2010) J Infect Dis, Vol. 202(8): 1212 - 1218). Brevemente, las VLP de NV para los ensayos de bloqueo se incubaron con un volumen igual de suero, y se diluyeron dos veces en serie a partir de una dilución inicial de 1:25. Se lavaron placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas de neutravidina y se recubrieron con 2,5 µg/ml de H-polivalente sintético tipo 1-PPA-biotina o H tipo 3 polivalente -PAA-biotina. Se agregaron las soluciones suero-VLP. Las placas se lavaron y se añadieron sueros policlonales de conejo específicos para VLP de NV, se lavaron y se siguieron incubando con IgG de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante. El color se desarrolló con sustrato líquido de tetrametilbenzidina peroxidasa y se detuvo con ácido fosfórico 1M. La densidad óptica se midió a 450°C. Se realizaron controles positivos y negativos. Se determinaron títulos de bloqueo del cincuenta por ciento (BT50), definidos como el título en el que las lecturas de OD (después de la resta del blanco) son 50% del control positivo. Se asignó un valor de 12,5 a las muestras con un BT50 menor a 25. Se determinaron los títulos de la media geométrica (GMT), los aumentos en veces de la media geométrica (GMFR) y las tasas de sero-respuestas para cada grupo. La sero-respuesta se definió como un aumento de 4 veces en el título de anticuerpos en comparación con los títulos de preinmunización. Se usó una muestra de suero de control de bloqueo como control interno. Se realizó un ensayo para confirmar la especificidad del bloqueo utilizando el mismo protocolo para el ensayo de bloqueo con las siguientes excepciones: después del recubrimiento con carbohidratos, los sueros se incubaron directamente en la placa sin preincubado previo con VLP. Después del lavado, se incubaron las VLP en la placa y se detectaron como para el ensayo de bloqueo.

Ensayo de inhibición del anticuerpo de hemaglutinación del norovirus (HAI)

Los anticuerpos inducidos por vacuna se examinaron para determinar la capacidad de inhibir la hemaglutinación de glóbulos rojos humanos de tipo O mediante las VLP de norovirus como se describió previamente (El Kamary et al. (2010) *J Infect Dis*, Vol. 202(11): 1649-58). Los títulos de HAI se calcularon como el inverso de la dilución más alta que inhibía la hemaglutinación con un patrón de glóbulos rojos negativo compacto y se presentan como GMTs, GMFRs y aumenta > 4 veces.

Las VLP GI.1 y GII.4 del norovirus se diluyeron en serie por separado y se incubaron con un volumen igual de una suspensión de glóbulos rojos humanos al 0,5% en una placa inferior de 96 pocillos. La cantidad de antígenos de VLP de norovirus correspondientes a 4 unidades de HA se determinó y confirmó por retrovaloración. Los sueros de prueba se inactivaron por calor a 56°C durante 30 minutos y se trataron con suspensión de caolín al 25% recién preparada. Para eliminar los inhibidores del suero, las muestras de prueba se preadsorbieron con glóbulos rojos. El ensayo HAI se realizó como sigue: se añadieron sueros pretratados (diluidos 2 veces en PBS, pH 5,5) a placas en V de 96 pocillos y se incubaron con un volumen igual de antígeno VLP de norovirus GI.1 y GII.4, respectivamente, que contiene 4 unidades de HA. Se añadió una suspensión de 0,5% de glóbulos rojos a cada pocillo y las placas se incubaron durante 90 minutos adicionales a 4°C. Los pocillos que contenían solo PBS o antígeno sin suero sirvieron como controles negativos y positivos, respectivamente. Se determinaron los títulos de la media geométrica (GMT), los aumentos en veces de la media geométrica (GMFRs) y las tasas de sero-respuesta para cada grupo. La sero-respuesta se definió como un aumento de 4 veces en el título de anticuerpos en comparación con los títulos de preinmunización.

Ensayos de células secretoras de anticuerpos

Las PBMC se aislaron a partir de aproximadamente 60 ml de sangre anticoagulada los días 0, 7 + 3, 28 + 3 y 35 + 3 después de la administración de vacuna de VLP bivalente IM de norovirus o placebo. Se obtuvieron aproximadamente 25 ml de sangre para ensayos recién preparados de PBMC y 35 ml de sangre para la crioconservación de PBMC. Los ensayos ASC detectan células que secretan anticuerpos contra las VLP de norovirus (Tacket et al. (2000) *J. Infect. Dis.*, Vol. 182: 302-305; Tacket et al. (2003) *Clin. Immunol.*, Vol. 108: 241-247; El Kamary et al. (2010) *J Infect Dis*, vol. 202(11): 1649-58). Se evaluaron PBMC recientes para la frecuencia de ASC y la determinación de marcadores de referencia de un subconjunto de sujetos. Las PBMC criopreservadas de sujetos que participaban en la cohorte A se evaluaron para determinar la frecuencia ASC. Se describen la tasa de respuesta y el número medio de ASC por 10^6 PBMC en cada punto de tiempo para cada grupo. Una respuesta positiva se define como un recuento de ASC posvacunación por 10^6 PBMC que es al menos 3 desviaciones estándar (DE) por encima del recuento medio de prevacunación, para todos los sujetos (en la métrica logarítmica) y al menos 8 puntos ASC, que corresponde a la media de los pocillos de control negativo estimulados por medio (2 puntos) más 3 SD como se determina en ensayos similares.

Medición de células B de memoria específicas de virus del norovirus

Se recolectó sangre anticoagulada solo en sujetos de la cohorte A (aproximadamente 25 mL en los días 0, 28, 56 y 180) para medir las células B de memoria en los días 0, 28, 56 y 180 después de la vacunación usando un ensayo ELISpot precedido por estimulación antigénica in vitro (Crotty et al. (2004) *J. Immunol. Methods*, Vol 286: 111-122; Li et al. (2006) *J. Immunol. Methods*, vol. 313: 110-118). Se incubaron células mononucleares de sangre periférica (5×10^6 células/mL, 1 ml/pocillo en placas de 24 pocillos) durante 4 días con antígenos de VLP de norovirus GI.1 y GII.4 por separado para permitir la expansión clonal de las células B de memoria específicas del antígeno y la diferenciación en células secretoras de anticuerpos. Los controles incluyeron células incubadas en las mismas condiciones en ausencia de antígeno y/o células incubadas con un antígeno no relacionado. Después de la estimulación, las células se lavaron, se contaron y se transfirieron a placas ELISpot recubiertas con VLP de Norwalk. Para determinar la frecuencia de las células B de memoria específicas de virus por linfocitos B que secretan Ig total, también se añadieron células B expandidas a pocillos recubiertos con anticuerpos IgG antihumano e IgA antihumano. Los anticuerpos unidos se revelaron con IgG antihumana o IgA antihumana marcadas con HRP seguido del sustrato apropiado. Los conjugados de las subclases IgA e IgG (IgA1, IgA2 e IgG1-4) también se usan para determinar respuestas de subclases específicas de antígeno que pueden estar relacionadas con mecanismos efectores y ubicaciones distintas del cebado inmune. Las manchas se contaron con un lector ELISpot. Las poblaciones de células expandidas para cada sujeto se examinaron mediante citometría de flujo para confirmar su fenotipo de células B de memoria, es decir, CD19+, CD27+, IgG+, IgM+, CD38+, IgD, entre otros (Crotty et al. (2004) *J. Immunol. Methods*, vol. 286: 111-122; Li et al. (2006) *J. Immunol. Methods*, vol. 313: 110-118).

Respuestas inmunes celulares

Se recogió sangre anticoagulada (aproximadamente 25 ml en los días 0, 28, 56 y 180) de los sujetos en la cohorte A como muestras codificadas y se aislaron las PBMC y se crioconservaron en nitrógeno líquido para una posible evaluación futura de las respuestas de CMI frente a antígenos de VLP IG del norovirus GI.1 y GII.4. Los ensayos que se realizan incluyen respuestas proliferativas y citocinas de PBMC frente a antígenos de VLP GI del norovirus GI.1 y GII.4 midiendo los niveles de interferón (IFN)- γ e interleucina (IL)-4 entre otros de acuerdo con técnicas establecidas (Samandari et al. (2000) *J. Immunol.*, Vol. 164: 2221 - 2232; Tacket et al. (2003) *Clin. Immunol.*, Vol. 108:241 - 247). Las respuestas de las células T también se evalúan.

Resultados

La evaluación de la seguridad incluyó los síntomas locales y sistémicos solicitados durante 7 días y síntomas no solicitados durante 28 días después de cada dosis. Los eventos adversos graves se controlan durante 12 meses. La inmunogenicidad se evaluó con suero obtenido antes y después de cada vacunación para anticuerpos Pan-ELISA (IgG, IgA e IgM combinados) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para células secretoras de anticuerpos IgG e IgA (ASC) a través de Elispot.

Los cuatro grupos de dosificación se han inscrito para la cohorte A con dos datos de seguridad posteriores a la dosis disponibles de los cuatro grupos de dosificación (40 vacunados en total). Entre los 40 vacunados, el dolor o la sensibilidad fueron los síntomas locales más comunes informados después de cada dosis, mientras que la hinchazón o el enrojecimiento fueron poco frecuentes. No se informaron síntomas locales graves. Los síntomas sistémicos de dolor de cabeza, mialgia o malestar después de cada dosis fueron informados por menos de la mitad de los vacunados. Ningún vacunado reportó fiebre. No se informaron SAE relacionados.

Como se muestra en las Figuras 1 - 3, se observaron respuestas de anticuerpos Pan - ELISA anamnésicas robustas (IgG, IgA e IgM combinadas) a ambos antígenos VLP 7 días después de la primera dosis de la dosis más baja (VLPs de 5 µg GI.1 + 5 µg de GII.4). La segunda dosis no aumentó las respuestas posteriores a la dosis. Se observaron resultados similares para las respuestas de IgG sérica específica de antígeno e IgA sérica medidas por separado (Figuras 4-9). Se observaron respuestas dependientes de la dosis para las respuestas de anticuerpos para ambos antígenos (Figuras 1 - 9). Sin embargo, la respuesta máxima frente a VLP GI.1 pareció lograrse con una dosis más baja que la respuesta máxima frente a VLP de GII.4 (15 µg frente a 50 µg). Curiosamente, la dosis única de la vacuna bivalente del norovirus administrada intramuscularmente indujo un título de anticuerpo específico de antígeno, sorprendentemente, significativamente mayor que el título inducido por dos dosis de una vacuna VLP monovalente administrada intranasalmente que comprendía una dosis de VLP 20 veces mayor (Figura 10; comparar LV03 -104 grupo de 5 µg frente a LV01-103, grupo de 100 µg). Además, la dosis baja (5 µg) de la vacuna de norovirus bivalente IM produjo un título de anticuerpos específicos de norovirus similar al inducido en seres humanos expuestos al norovirus natural (Figura 10).

También se observaron respuestas robustas de IgG e IgA Elispot a los 7 días después de la primera dosis de la dosis más baja (5 µg) para ambos antígenos VLP (Tabla 2). Notablemente, las respuestas de células secretoras de anticuerpos (ASC) estaban sesgadas a IgA vs. IgG y ASCs exhibieron una migración mucosa (alfa 4/beta7) y fenotipo del receptor de quimioquina (CCR10) según se evaluó por citometría de flujo (Figura 11, Tabla 3). Como se muestra en la Tabla 3, un mayor número de ASC exhiben marcadores migradores mucosales (beta 7+, CD62L-) en comparación con marcadores migradores duales mucosos/periféricos (beta 7+, CD62L+). La Tabla 4 muestra el porcentaje de células B de memoria por 10⁶ monocitos de sangre periférica que responden a los antígenos de VLP. Un porcentaje más grande de células B de memoria específicas de antígeno también expresa marcadores migradores mucosales en comparación con los marcadores migradores duales mucosos/periféricos o periféricos. También se observaron respuestas similares en los receptores que recibieron las dosis de 15 µg y 50 µg (Tablas 2-4).

Tabla 2. Día 7, Caracterización de la respuesta de PBMC. Aproximación de células secretoras de anticuerpos (ASC)/millón de células CD19+.

	ASC/millón células CD19+ - Día 7				Porcentaje de respuesta frente a la vacuna		Específico de vacuna
	IgA GI.1	IgG GI.1	IgA GII.4	IgG GII.4	Específico a GI.1	Específico a GII.4	Porcentaje de PBMC circulantes total
Células B específicas de norovirus							
Media geométrica A1 dosis de 5 µg (n = 5)	30947	13807	10947	3945	4,48%	1,49%	5,96%
Desviación estándar A1 dosis de 5 µg	6674	9780	3651	2261			
Media geométrica A2 dosis de 15 µg (n = 4)	25296	17004	7108	4336	4,23%	1,14%	5,37%
Desviación estándar A2 dosis de 15 µg	10846	18770	6055	5697			
Media geométrica A3 dosis de 50 µg (n = 4)	36158	20572	14103	2549	5,67%	1,67%	7,34%
Desviación estándar A3 dosis de 50 µg	11470	418	7627	2230			
Media geométrica A4 dosis de 150 µg (n = 4)	34183	9566	26213	11310	4,37%	3,75%	8,13%

ES 2 656 527 T3

Células B específicas de norovirus	ASC/millón células CD19+ - Día 7				Porcentaje de respuesta frente a la vacuna		Específico de vacuna
	IgA GI.1	IgG GI.1	IgA GII.4	IgG GII.4	Específico a GI.1	Específico a GII.4	Porcentaje de PBMC circulantes total
Desviación estándar A4 dosis de 150 µg	32938	4466	89769	15226			
Placebo (n = 2)	0	152	0	108	0,02%	0,01%	0,03%

Tabla 3. Marcadores de ASC en receptores con vacunas y placebo mediante citometría de flujo-Día 7

	% de células B CD19+ totales que son CD27+ y CD38+	% de total de CD27+, CD38+, CCR10+, Beta 7+, CD62L-	% de total de CD27+, CD38+, CCR10+, Beta 7+, CD62L+	Porcentaje total de ASC CD27+, CD38+, CCR10+, Beta 7+, CD62L(+)&(-)	Total específico de vacuna por millón de células* CD27+, CD38+, CCR10+, Beta 7+, CD62L(+)&(-)	Porcentaje específico de vacuna de migración mucosa de PBMC circulante total*
Media geométrica A1 dosis de 5 µg (n = 5)	25,10%	6,86%	1,06%	2,78%	1656	0,17%
Desviación estándar A1 dosis de 5 µg	10,45	3,13	1,01			
Media geométrica A2 dosis de 15 µg (n = 4)	12,99%	16,98%	2,43%	4,63%	1355	0,14%
Desviación estándar A2 dosis de 15 µg	9,13	1,56	0,23			
Media geométrica A3 dosis de 50 µg (n = 4)	31,71%	26,43%	3,63%	12,01%	23915	2,39%
Desviación estándar A3 dosis de 50 µg	6,32	1,82	1,38			
Media geométrica A4 dosis de 150 µg (n = 4)	33,46%	30,06%	5,68%	15,74%	31350	3,14%
Desviación estándar A4 dosis de 150 µg	9,86	2,97	1,70			
Placebo (n = 2)	1,26%	22,00%	0,87%	1,20%	5	0,001%

*Se asume que la mayoría de los ASC son específicos de norovirus.

Tabla 4. Respuestas de células B de memoria en receptores de vacunas y placebo-Día 7

	% de células B CD19+ totales que son CD27+, CD38+, CD138+	% de % del total de CD27+, CD38+, CD138+, CCR10+, Beta 7+, CD62L-	% de % del total de CD27+, CD38+, CD138+, CCR10+, Beta 7+, CD62L+	Porcentaje total de CD27+, CD38+, CD138+, CCR10+, Beta 7+, CD62L(+)&(-) de memoria	Total específico de vacuna por millón de células* CD27+, CD38+, CD138+, CCR10+, Beta 7+, CD62L(+)&(-)	Porcentaje específico de vacuna de migración de mucosa de PBMC circulante total*
Media geométrica A1 dosis de 5 µg	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Media geométrica A2 dosis de 15 µg (n = 4)	1,54%	11,58%	1,92%	0,21%	61	0,01%
Desviación estándar A2 dosis de 15 µg	1,54	3,94	0,94			
Media geométrica A3 dosis de 50 µg (n = 4)	3,31%	16,10%	4,60%	0,68%	1364	0,14%
Desviación estándar A3 dosis de 50 µg	1,11	2,16	0,97			
Media geométrica A4 dosis de 150 µg (n = 4)	1,56%	16,90%	8,10%	0,39%	778	0,08%
Desviación estándar A4 dosis de 150 µg	0,22	3,26	4,57			
Placebo (n = 1)	0,10%	12,50%	0,00%	0,01%	0	0%

*Se asume que la mayoría de los ASC son específicos de norovirus.

5 En ausencia de un ensayo de neutralización viral directa disponible debido a la incapacidad de cultivar norovirus in vitro, se realizaron ensayos funcionales que sirven como sustitutos de los ensayos de neutralización viral para medir anticuerpos funcionales en vacunados.

10 Usando el ensayo de actividad de bloqueo del antígeno H de carbohidrato descrito anteriormente, se midió la inhibición de la unión de VLP de GI.1 al antígeno H mediada por anticuerpos séricos inducidos por la vacuna. Los datos se presentan como el aumento en veces de la media geométrica (GMFR) y la sero-respuesta (aumento de 4 pliegues) en la Tabla 5, y como el título de la media geométrica (GMT) en la Tabla 6. Sorprendentemente, después de solo una inyección intramuscular de la formulación de vacuna, se observó una actividad significativa de bloqueo de carbohidratos en todos los grupos de dosis; de hecho, la administración de una segunda dosis de vacuna no aumentó significativamente la actividad de bloqueo en comparación con los niveles posteriores a la dosis 1. La inhibición de la actividad de unión se mantuvo durante todo el período de prueba, hasta 56 días después de la dosis 1.

15

Tabla 5. Actividad de bloqueo de carbohidratos (HBGA BT50), Aumento en veces de la media geométrica de anti-norovirus GI.1 (GMFR) y serorespuesta (Aumento de 4 veces)

Grupo de tratamiento	Día de estudio														
	7 días después de la dosis 1			21 días después de la dosis 1			28 días después de la dosis 1 (Pre-dosis 2)			7 días después de la dosis 2 (35 días después de la dosis 1)			28 días después de la dosis 2 (56 días después de la dosis 1)		
	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)
Vacuna 5/5 mcg VLP	9	26,6 (8,3, 85,1)	88,9 (51,8, 99,7)	9	25,1 (8,9, 70,3)	88,9 (51,8, 99,7)	9	19,7 (8,2, 47,1)	100,0 (66,4, 100,0)	9	20 (7,7, 51,7)	88,9 (51,8, 99,7)	9	16,6 (5,7, 48,1)	77,8 (40,0, 97,2)
Vacuna 15/15 mcg VLP	8	33,2 (13,6, 80,8)	100,0 (63,1, 100,0)	8	25,5 (10,5, 61,8)	100,0 (63,1, 100,0)	8	18,5 (8,4, 40,6)	100,0 (63,1, 100,0)	7	22,2 (8,8, 56)	100,0 (59,0, 100,0)	7	8,4 (2,4, 29,6)	57,1 (18,4, 90,1)
Vacuna 50/50 mcg VLP	1	38,6 (18,3, 81,6)	100,0 (69,2, 100,0)	1	27,9 (13,4, 58)	100,0 (69,2, 100,0)	1	20,9 (10, 43,5)	100,0 (69,2, 100,0)	1	19 (9,9, 36,4)	100,0 (69,2, 100,0)	9	10,2 (4,6, 22,8)	77,8 (40,0, 97,2)
Vacuna 150/150 mcg VLP	7	30,6 (16,3, 57,6)	100,0 (59,0, 100,0)	8	19,4 (13,1, 28,5)	100,0 (63,1, 100,0)	8	16,3 (11,7, 22,6)	100,0 (63,1, 100,0)	8	18,8 (12,8, 27,5)	100,0 (63,1, 100,0)	8	23,8 (17, 33,3)	100,0 (63,1, 100,0)
Placebo	8	0,9 (0,8, 1)	0,0 (0,0, 36,9)	8	0,8 (0,7, 1,1)	0,0 (0,0, 36,9)	8	0,8 (0,6, 1,1)	0,0 (0,0, 36,9)	8	0,8 (0,7, 1,1)	0,0 (0,0, 36,9)	8	0,6 (0,3, 1,2)	0,0 (0,0, 36,9)

Resultados basados en todos los sujetos que recibieron ambas dosis del producto del estudio.

Los puntos de datos de dos sujetos están excluidos debido a una posible confusión de muestras; uno de estos puntos de datos es una muestra de referencia que da como resultado que el sujeto no tenga datos de aumento en veces disponibles para cualquier punto de tiempo.

Tabla 6. Actividad de bloqueo de carbohidratos (HBGA BT50), Título de la media geométrica de anti-norovirus GI.1 (GMT)

Grupo de tratamiento	Día de estudio											
	Pre-dosis 1		7 días después de la dosis 1		21 días después de la dosis 1		28 días después de la dosis 1 (Pre-dosis 2)		7 días después de la dosis 2 (35 días después de la dosis 1)		28 días después de la dosis 2 (56 días después de la dosis 1)	
	N	GMT (95% IC)	N	GMT (95% IC)	N	GMT (95% IC)	N	GMT (95% IC)	N	GMT (95% IC)	N	GMT (95% IC)
Vacuna 5/5 mcg VLP	9	28,9 (12,7, 65,9)	9	768,5 (344,1, 1716)	9	723,7 (398,1, 1316)	9	568 (321,8, 1003)	9	577,1 (351,2, 948,3)	9	478,3 (293,3, 780,1)
Vacuna 15/15 mcg VLP	8	24,9 (12,7, 48,7)	8	826,1 (524,9, 1300)	8	634,3 (285,9, 1407)	8	459,8 (225,3, 938,6)	7	610,3 (354,6, 1050)	7	230,9 (105,2, 506,7)
Vacuna 50/50 mcg VLP	1 0	17,3 (9,9, 30,3)	1 0	669,2 (329,1, 1361)	1 0	483,7 (258,7, 904,2)	10	362,4 (192,9, 680,7)	1 0	328,9 (191,9, 563,8)	9	184 (97,2, 348,3)
Vacuna 150/150 mcg VLP	8	15,5 (11,1, 21,8)	7	435 (262,5, 720,8)	8	300,7 (173,9, 520)	8	252,7 (146,7, 435,2)	8	291,5 (171,5, 495,4)	8	369,7 (233,8, 584,6)
Placebo	8	29 (9,1, 92,8)	9	24,6 (9,8, 62,1)	9	22,5 (8,8, 57,3)	9	22,2 (8,9, 55,5)	8	24,6 (8,4, 72,6)	8	18,3 (10,1, 33,3)

Resultados basados en todos los sujetos que recibieron ambas dosis del producto del estudio.

Los puntos de datos de dos sujetos están excluidos debido a una posible confusión de muestras.

De forma similar, se midió la actividad de bloqueo de carbohidratos de los anticuerpos séricos contra las VLP GI.4. Se observó una respuesta significativa en todos los grupos de dosificación, medida por GMFR y la sero-respuesta (Tabla 7), así como GMT (Tabla 8). De forma similar al bloqueo mediado por anticuerpos de la unión de GI.1 descrita anteriormente, se detectó un bloqueo sólido de la actividad de unión a carbohidratos VLP de GI.4 después de una sola dosis, y una segunda dosis no pareció mejorar la actividad de bloqueo.

Tabla 7. Actividad de bloqueo de carbohidratos (HBGA BT50), Aumento en veces de la media geométrica de anti-norovirus GII.4 (GMFR) y serorespuesta (Aumento de 4 veces)

Grupo de tratamiento	Día de estudio														
	7 días después de la dosis 1			21 días después de la dosis 1			28 días después de la dosis 1 (Pre-dosis 2)			7 días después de la dosis 2 (35 días después de la dosis 1)			28 días después de la dosis 2 (56 días después de la dosis 1)		
	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)
Vacuna 5/5 mcg VLP	9	5 (1,6, 16,1)	33,3 (7,5, 70,1)	9	5,9 (1,7, 20,3)	55,6 (21,2, 86,3)	9	4,7 (1,4, 15,7)	44,4 (13,7, 78,8)	9	4,7 (1,6, 13,8)	44,4 (13,7, 78,8)	9	5 (1,6, 15,9)	55,6 (21,2, 86,3)
Vacuna 15/15 mcg VLP	8	11 (2,7, 45,3)	62,5 (24,5, 91,5)	8	9,2 (3, 27,9)	62,5 (24,5, 91,5)	8	7,4 (2,5, 21,8)	62,5 (24,5, 91,5)	7	7 (2,1, 23)	57,1 (18,4, 90,1)	7	5,6 (2,3, 14)	57,1 (18,4, 90,1)
Vacuna 50/50 mcg VLP	1	18,6 (4,9, 70,8)	70,0 (34,8, 93,3)	1	12,2 (3,8, 39,4)	70,0 (34,8, 93,3)	1	8,4 (2,9, 24,1)	70,0 (34,8, 93,3)	1	8,7 (2,9, 26,1)	70,0 (34,8, 93,3)	9	5,2 (2,2, 12)	66,7 (29,9, 92,5)
Vacuna 150/150 mcg VLP	7	10,1 (2, 51,8)	57,1 (18,4, 90,1)	8	5,5 (1,9, 16,5)	50,0 (15,7, 84,3)	8	4,4 (1,6, 12,2)	50,0 (15,7, 84,3)	8	4,3 (1,7, 10,7)	37,5 (8,5, 75,5)	8	3,1 (1,3, 7,2)	25,0 (3,2, 65,1)
Placebo	8	1 (0,9, 1,1)	0,0 (0,0, 36,9)	8	1,1 (1, 1,3)	0,0 (0,0, 36,9)	8	1,3 (0,9, 2,1)	12,5 (0,3, 52,7)	8	1,8 (0,5, 6,7)	12,5 (0,3, 52,7)	8	2 (0,7, 6,1)	12,5 (0,3, 52,7)

Resultados basados en todos los sujetos que recibieron ambas dosis del producto del estudio.

Los puntos de datos de dos sujetos están excluidos debido a una posible confusión de muestras; uno de estos puntos de datos es una muestra de referencia que da como resultado que el sujeto no tenga datos de aumento en veces disponibles para cualquier punto de tiempo.

Tabla 8. Actividad de bloqueo de carbohidratos (HBGA BT50), Título de la media geométrica de anti-norovirus GII.4 (GMT)

		Día de estudio											
Pre-dosis 1		7 días después de la dosis 1		21 días después de la dosis 1		28 días después de la dosis 1 (Pre-dosis 2)		7 días después de la dosis 2 (35 días después de la dosis 1)		28 días después de la dosis 2 (56 días después de la dosis 1)			
Grupo de tratamiento	N	GMT (95% IC)	N	GMT (95% IC)	N	GMT (95% IC)	N	GMT (95% IC)	N	GMT (95% IC)	N	GMT (95% IC)	
Vacuna 5/5 mcg VLP	9	40,3 (18,90)	9	202,1 (106,3, 384,3)	9	236,9 (133,4, 420,6)	9	189,7 (108,6, 331,3)	9	188,7 (118,7, 300,1)	9	201,6 (116,4, 349,5)	
Vacuna 15/15 mcg VLP	8	23,7 (12,8, 43,8)	8	260,1 (95,1, 711,1)	8	218,1 (104,2, 456,3)	8	175,4 (82,7, 372)	7	182,3 (89,1, 372,8)	7	146,3 (92,4, 231,5)	
Vacuna 50/50 mcg VLP	10	28,4 (13,1, 61,5)	10	527,2 (271,1, 1025)	10	345,2 (195,5, 609,6)	10	238,3 (139,4, 407,3)	10	246,5 (138,7, 438,2)	9	160,2 (107,4, 238,8)	
Vacuna 150/150 mcg VLP	8	63 (24,8, 160,4)	7	721,8 (344,6, 1512)	8	347,7 (186,1, 649,5)	8	277 (145,6, 527)	8	267,9 (158,7, 452,2)	8	193,5 (121,6, 308,2)	
Placebo	8	24,1 (12,9, 45)	9	22,8 (12,6, 41,6)	9	24,9 (12,7, 48,7)	9	29,1 (15,1, 56,1)	8	44 (12,6, 154,2)	8	48,2 (16,7, 139,5)	

Resultados basados en que todos los sujetos recibían ambas dosis del producto del estudio.

Dos puntos de datos de sujetos están excluidos debido a una posible confusión de las muestras.

Los ensayos de inhibición de hemaglutinación (HAI) también se utilizaron para evaluar la respuesta de anticuerpos en suero de sujetos vacunados contra antígenos de VLP del norovirus objetivo. Similar a los estudios de unión a antígeno H de carbohidratos, solo una dosis de vacuna VLP indujo anticuerpos que inhibieron la hemaglutinación en todos los grupos de dosificación, medidos por GMFR (Tabla 9), aumento de 4 veces (Tabla 9) y GMT (Tabla 10). Aunque el nivel de inhibición de la hemaglutinación se mantuvo hasta el último día de la prueba (28 días después de la dosis 2, 56 días después de la dosis 1), la segunda dosis de la vacuna VLP no pareció mejorar la inhibición de la hemaglutinación mediada por el anticuerpo e inducida por la vacuna.

Tabla 9. Ensayo de inhibición de la hemaglutinación Aumento en veces de la media geométrica anti-norovirus GI.1 (GMFR) y sero-respuesta (Aumento de 4 veces)

Grupo de tratamiento	Día de estudio														
	7 días después de la dosis 1			21 días después de la dosis 1			28 días después de la dosis 1 (Pre-dosis 2)			7 días después de la dosis 2 (35 días después de la dosis 1)			28 días después de la dosis 2 (56 días después de la dosis 1)		
	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)
Vacuna 5/5 mcg VLP	9	5,4 (3, 9,8)	77,8 (40,0, 97,2)	9	7 (4,6, 10,7)	88,9 (51,8, 99,7)	9	6,1 (4,1, 9,3)	88,9 (51,8, 99,7)	9	6 (3,7, 9,5)	77,8 (40,0, 97,2)	9	6,3 (3,9, 10,3)	88,9 (51,8, 99,7)
Vacuna 15/15 mcg VLP	8	8,9 (4,4, 18)	100,0 (63,1, 100,0)	8	9,5 (4, 22,5)	87,5 (47,3, 99,7)	8	7,1 (3,1, 16,1)	75,0 (34,9, 96,8)	7	8,5 (4,1, 17,7)	85,7 (42,1, 99,6)	7	8,1 (4,4, 15,2)	100,0 (59,0, 100,0)
Vacuna 50/50 mcg VLP	1	22,4 (11,6, 43)	100,0 (69,2, 100,0)	1	16,7 (9,3, 29,8)	100,0 (69,2, 100,0)	1	13,9 (8,1, 24)	100,0 (69,2, 100,0)	1	14,5 (9,3, 22,7)	100,0 (69,2, 100,0)	9	11,8 (6,3, 21,9)	100,0 (66,4, 100,0)
Vacuna 150/150 mcg VLP	7	12,6 (5,7, 28)	85,7 (42,1, 99,6)	8	11,1 (6,4, 19,3)	100,0 (63,1, 100,0)	8	8,4 (5, 14)	100,0 (63,1, 100,0)	8	8,4 (5, 14)	100,0 (63,1, 100,0)	8	7,3 (4,5, 11,9)	100,0 (63,1, 100,0)
Placebo	8	1 (0,8, 1,2)	0,0 (0,0, 36,9)	8	1 (0,9, 1,2)	0,0 (0,0, 36,9)	8	1 (0,9, 1,1)	0,0 (0,0, 36,9)	8	0,9 (0,7, 1,1)	0,0 (0,0, 36,9)	8	1 (0,8, 1,2)	0,0 (0,0, 36,9)

Resultados basados en todos los sujetos que recibieron ambas dosis del producto del estudio.

Los puntos de datos de dos sujetos están excluidos debido a una posible confusión de muestras; uno de estos puntos de datos es una muestra de referencia que da como resultado que el sujeto no tenga datos de aumento en veces disponibles para cualquier punto de tiempo.

Tabla 10, Ensayo de inhibición de la hemaglutinación. Título de la media geométrica de GI.1 anti-norovirus (GMT)

Grupo de tratamiento	Día de estudio											
	Pre-dosis 1		7 días después de la dosis 1		21 días después de la dosis 1		28 días después de la dosis 1 (Pre-dosis 2)		7 días después de la dosis 2 (35 días después de la dosis 1)		28 días después de la dosis 2 (56 días después de la dosis 1)	
	N	GMT (95% IC)	N	GMT (95% IC)	N	GMT (95% IC)	N	GMT (95% IC)	N	GMT (95% IC)	N	GMT (95% IC)
Vacuna 5/5 mcg VLP	9	26,4 (14,1, 49,4)	9	143,5 (53,6, 383,8)	9	185,3 (88,6, 387,6)	9	162,1 (83,3, 315,6)	9	157 (80,3, 307,1)	9	167,4 (88,4, 316,8)
Vacuna 15/15 mcg VLP	8	11,9 (6,1, 23,4)	8	105,3 (56,1, 197,6)	8	113,1 (42,5, 301,3)	8	84,2 (31,1, 227,6)	7	103,3 (43,3, 246,6)	7	99,2 (46,9, 209,7)
Vacuna 50/50 mcg VLP	1 0	7,2 (5,3, 9,6)	1 0	160 (79,4, 322,6)	1 0	119,2 (60,4, 235,1)	1 0	99,7 (51,8, 191,8)	1 0	103,8 (58,4, 184,5)	9	81,1 (38,8, 169,5)
Vacuna 150/150 mcg VLP	8	9,2 (7,5, 11,3)	7	114,1 (50,9, 255,7)	8	101,6(62, 166,4)	8	77,2 (51,8, 115)	8	77,2 (51,8, 115)	8	67,3 (44,7, 101,3)
Placebo	8	16,8 (10,1, 28,1)	9	16,6(11,7, 23,7)	9	16,1 (10,7, 24,1)	9	16,6(11, 25)	8	15,4(10, 23,7)	8	16,2 (10,8, 24,4)

Resultados basados en todos los sujetos que recibieron ambas dosis del producto del estudio.

Los puntos de datos de dos sujetos están excluidos debido a una posible confusión de muestras.

La inhibición de la hemaglutinación también se logró cuando el VLP objetivo era un virus no coincidente. Los anticuerpos séricos inducidos por vacuna inhibieron la hemaglutinación por una VLP de la cepa del virus Houston, medida por GMFR y la sero-respuesta (Tabla 11) así como GMT (Tabla 12). En este caso, las dosis de vacuna de VLP más altas proporcionaron respuestas más fuertes, particularmente como se midió por un aumento de 4 veces o GMT. El GMFR y el aumento de 4 veces también aumentaron significativamente cuando la VLP objetivo era la cepa del virus Cincinnati 2003, medida solo 7 días después de la dosis 1 (Tabla 13).

Tabla 11. Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (VLP de la cepa del virus Houston), Aumento en veces de la media geométrica de GII.4 anti-norovirus (GMFR) y sero-respuesta (aumento de 4 veces)

Grupo de tratamiento	Día de estudio														
	7 días después de la dosis 1			21 días después de la dosis 1			28 días después de la dosis 1 (Pre-dosis 2)			7 días después de la dosis 2 (35 días después de la dosis 1)			28 días después de la dosis 2 (56 días después de la dosis 1)		
	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)
Vacuna 5/5 mcg VLP	9	1,2 (1, 1,5)	0,0 (0,0, 33,6)	9	1,3 (0,9, 1,7)	0,0 (0,0, 33,6)	9	1,3 (0,9, 1,7)	0,0 (0,0, 33,6)	9	1,3 (1, 1,7)	0,0 (0,0, 33,6)	9	1,3 (1, 1,6)	0,0 (0,0, 33,6)
Vacuna 15/15 mcg VLP	8	1,7 (0,9, 3)	12,5 (0,3, 52,7)	8	1,6 (1,1, 2,4)	12,5 (0,3, 52,7)	8	1,5 (1,1, 2,2)	0,0 (0,0, 36,9)	7	1,5 (1, 2,2)	0,0 (0,0, 41,0)	7	1,6 (1,1, 2,4)	0,0 (0,0, 41,0)
Vacuna 50/50 mcg VLP	1 0	2 (0,9, 4,3)	10,0 (0,3, 44,5)	1 0	1,6 (0,8, 3,1)	10,0 (0,3, 44,5)	1 0	1,7 (0,9, 3,1)	10,0 (0,3, 44,5)	1 0	1,5 (0,9, 2,4)	10,0 (0,3, 44,5)	9	1,3 (0,8, 2)	11,1 (0,3, 48,2)
Vacuna 150/150 mcg VLP	7	4,3 (1,5, 12,4)	57,1 (18,4, 90,1)	8	2,6 (1,2, 5,8)	50,0 (15,7, 84,3)	8	1,9 (1,1, 3,3)	12,5 (0,3, 52,7)	8	1,9 (1,1, 3,5)	12,5 (0,3, 52,7)	8	1,7 (1,1, 2,6)	12,5 (0,3, 52,7)
Placebo	8	1 (0,9, 1,1)	0,0 (0,0, 36,9)	8	1,1 (0,9, 1,3)	0,0 (0,0, 36,9)	8	1,1 (1, 1,2)	0,0 (0,0, 36,9)	8	1,2 (0,8, 1,9)	12,5 (0,3, 52,7)	8	1,1 (0,7, 1,8)	12,5 (0,3, 52,7)

Resultados basados en todos los sujetos que recibieron ambas dosis del producto del estudio.

Los puntos de datos de dos sujetos están excluidos debido a un posible mezcla de las muestras; uno de estos puntos de datos es una muestra de referencia que da como resultado que el sujeto no tenga datos de aumento en veces disponibles para cualquier punto de tiempo.

Tabla 12. Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (VLP de la cepa del virus de Houston), Título de la media geométrica de GII.4 anti-Noro (GMT)

Grupo de tratamiento		Día de estudio											
		Pre-dosis 1		7 días después de la dosis 1		21 días después de la dosis 1		28 días después de la dosis 1 (Pre-dosis 2)		7 días después de la dosis 2 (35 días después de la dosis 1)		28 días después de la dosis 2 (56 días después de la dosis 1)	
	N	GMT (95% IC)	N	GMT (95% IC)	N	GMT (95% IC)	N	GMT (95% IC)	N	GMT (95% IC)	N	GMT (95% IC)	
Vacuna 5/5 mcg VLP	9	143,5 (97,9, 210,3)	9	177,4 (122,7, 256,5)	9	180,8 (114,4, 285,6)	9	180,8 (114,4, 285,6)	9	189,1 (119,2, 299,9)	9	180,8 (122,7, 266,3)	
Vacuna 15/15 mcg VLP	8	129,8 (86,4, 194,9)	8	218,3 (129,2, 368,8)	8	207,5 (134,8, 319,3)	8	200,2 (132,8, 301,7)	7	169,5 (114,1, 252)	7	187,2 (119,1, 294,2)	
Vacuna 50/50 mcg VLP	1	161,9 (119,7, 219)	1	323,8 (156,5, 669,8)	1	252,5 (130,4, 489,2)	1	273,9 (150,9, 497,2)	1	242,5 (150,2, 391,5)	9	195,2(125, 304,9)	
Vacuna 150/150 mcg VLP	8	210,6 (108,8, 407,5)	7	853,5 (297,4, 2449)	8	546,2 (237,6, 1255)	8	406,3 (201,5, 819,1)	8	406,3 (180,3, 915,4)	8	354,1 (184,6, 679,5)	
Placebo	8	148,9 (73,8, 300,3)	9	150,1 (80,1, 281,1)	9	157 (77,9, 316,5)	9	167,4 (91,4, 306,4)	8	183,6 (95, 354,5)	8	162,4 (88,5, 297,9)	

Resultados basados en todos los sujetos que recibieron ambas dosis del producto del estudio.

Los puntos de datos de dos sujetos están excluidos debido a una posible confusión de las muestras.

Tabla 13. Inhibición de la hemaglutinación en placebo versus vacuna VLP 50/50 µg

Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (VLP de la cepa del virus de 2003 Cincinnati), Aumento en veces de la media geométrica de GII.4 anti-norovirus (GMFR) y sero-respuesta geométrica (aumento de 4 veces)			
Resultados por el grupo de tratamiento 7 días después de la dosis 1			
Grupo de tratamiento	N	GMFR (95% IC)	Aumento de 4 veces (95% IC)
Placebo	2	1,0 (0,6, 1,8)	0,0 (0,0, 84,2)
Vacuna 50/50 µg VLP	10	4,4 (1,6, 11,9)	50,0 (18,7, 81,3)

- 5 Los resultados de este estudio demostraron que la vacuna VLP de norovirus Bivalente IM generalmente fue bien tolerada. Los datos de inmunogenicidad sugieren que una sola dosis de vacuna puede ser suficiente para proteger a los adultos humanos seropositivos. Los resultados de la actividad de bloqueo de carbohidratos y los ensayos de inhibición de hemaglutinación proporcionaron evidencias adicionales de que una sola dosis de vacuna inducía anticuerpos séricos con una potente actividad anti-norovirus. La magnitud y la rapidez de las respuestas inmunes observadas después de una sola dosis parenteral en seres humanos fueron dramáticas cuando se compararon con las respuestas inmunes anteriores mostradas por las administraciones de la vacuna VLP nasal múltiple a dosis 10 mucho más altas de VLP (El Kamary et al. (2010) J Infect Dis, Vol. 202(11): 1649-1658). Estas respuestas también fueron superiores a las inducidas por la administración oral de VLP de norovirus (Tacket et al. (2003) Clin Immunol 108: 241 - 247; Ball et al. (1999, Gastroenterology 117: 40-48), así como aquellas inducidas por VLP de norovirus producidos por plantas transgénicas (Tacket et al. (2000) J Infect Dis 182: 302-305). En particular, esta formulación de vacuna intramuscular produjo respuestas anamnésicas dentro de los siete días de la inmunización y se 15 observaron respuestas de anticuerpos séricos máximos después de una sola dosis, incluyendo una respuesta de IgA significativa y una actividad de bloqueo de carbohidratos funcionales y actividad de inhibición de la hemaglutinación. Por lo tanto, esta vacuna bivalente de norovirus indujo una respuesta inmune fuerte y protectora en seres humanos que fue superior a las respuestas inmunes inducidas por cualquier vacuna de norovirus actualmente disponible.
- 20 **Ejemplo 2. Estudio de escalada de dosis, seguridad e inmunogenicidad de la vacuna intramuscular de partículas tipo virus (VLP) bivalentes del norovirus en seres humanos (Estudio LV03-104)**
- El siguiente ejemplo proporciona la parte planificada restante del estudio clínico descrito en el Ejemplo 1, en el que se lleva a cabo un estudio aleatorizado, de sitios múltiples, de aumento de la dosis en adultos ≥ 18 años de la 25 seguridad e inmunogenicidad de cuatro niveles de dosificación de una vacuna VLP bivalente de norovirus intramuscular (IM) adyuvada con monofosforil lípido A (MPL) e hidróxido de aluminio (AIOH), en comparación con placebo. Los sujetos recibirán dos dosis de la vacuna o placebo, mediante inyección intramuscular (IM), con una separación de 28 días con una aguja de 1,5 pulgadas (38 mm). Este ejemplo está destinado a ilustrar adicionalmente los principios de la presente invención.
- 30 La cohorte A completó la inscripción en el estudio y se describió anteriormente en el Ejemplo 1. La cohorte B contiene ~ 20 sujetos de 50-64 años de edad. La cohorte C contiene ~ 30 sujetos de 65-85 años de edad. Aproximadamente 98 sujetos están inscritos en el estudio como un todo.
- 35 En la cohorte B, se inscribieron ~ 20 sujetos de 50-64 años de edad y se aleatorizaron 1:1 para recibir la vacuna (N = 10) o el placebo (N = 10). Después de los 7 días posteriores a la dosis 2 los datos de seguridad (día de estudio 35) están disponibles para su revisión en sujetos de la cohorte B, los sujetos de la cohorte C son elegibles para recibir su dosis inicial. En la cohorte C, aproximadamente 30 sujetos de 65 a 85 años de edad se inscribieron y aleatorizaron 1:1:1 para recibir la vacuna con adyuvante MPL y AIOH (N = 10), o una vacuna con adyuvante con AIOH solo, es decir, sin MPL (N = 10), o placebo (N = 10). Las concentraciones de antígeno de las VLP de norovirus y de AIOH en las dos formulaciones de vacuna que se evaluaron en la cohorte C son idénticas; solo la presencia o ausencia de MPL es diferente.
- 40 La vacuna VLP bivalente del norovirus contiene VLP del genogrupo I, genotipo 1 (GI.1) y genogrupo II, genotipo IV (GII.4) como antígenos y monofosforil Lípido A (MPL) e hidróxido de aluminio (AIOH) como adyuvantes, cloruro de sodio (NaCl) y L-histidina (L-His) como tampón (pH 6,3-6,7), etanol y agua para inyección. Las VLP de GII.4 comprendieron una secuencia de la cápside de SEQ ID NO: 1, que se derivó de tres cepas GII.4.
- 45 La dosis única de la vacuna seleccionada para una evaluación adicional en las cohortes B y C es la dosis más baja en la cohorte A que resulta en la respuesta inmune más robusta y reproducible que generalmente también se tolera bien. Los datos de seguridad e inmunogenicidad del día 56 de los sujetos de la cohorte A son revisados por el CSM/SMC y la dosificación bivalente se selecciona para su evaluación en las cohortes B y C.

5 Los sujetos mantienen una memoria diaria de síntomas solicitados que incluyen cuatro reacciones locales en el sitio de inyección, tales como dolor, sensibilidad, enrojecimiento e hinchazón, y 10 signos o síntomas sistémicos que incluyen temperatura oral diaria, dolor de cabeza, fatiga, dolores musculares, escalofríos, dolores en las articulaciones y síntomas gastrointestinales de náuseas, vómitos, diarrea, calambres abdominales/dolor durante los días 0 a 7 después de cada dosis de vacuna o control con VLP bivalente IM de norovirus. El enrojecimiento y la hinchazón en el sitio de inyección se miden y registran diariamente durante 7 días después de cada inyección.

10 Los historiales médicos provisionales se obtienen en cada visita de seguimiento en los días 7 + 3, 21 + 3, 28 + 3, 35 + 3, 56 + 7, 180 + 14 y 393 + 14 y en la llamada telefónica de seguimiento del Día 265 +14; se consulta a los sujetos sobre enfermedades temporales, visitas al médico, cualquier evento adverso grave (EAG) y el inicio de cualquier nueva afección médica significativa. Los sujetos tienen CBC con diferencial de WBC y recuento de plaquetas, BUN sérico, creatinina, glucosa, AST y ALT evaluados en el cribado y en los días 21 y 35 (~ 7 días después de cada dosis) para evaluar la elegibilidad y seguridad continuas, respectivamente.

15 La sangre de los sujetos se recoge antes de la vacunación en el día 0 y en los días 7 + 3, 21 + 3, 28 + 3, 35 + 3, 56 + 7, 180 + 14 y 393 +14 para medir los anticuerpos séricos (IgG, IgA, e IgM por separado y combinados) a la vacuna de VLP bivalente de IM norovirus por ensayos inmunoabsorbentes unidos a enzima (ELISA). También se miden la actividad bloqueante de los carbohidratos en suero y los anticuerpos séricos de HAI.

20 Los métodos descritos anteriormente para la Cohorte A se utilizan para analizar las muestras de sangre recolectadas de individuos inmunizados o de individuos que recibieron el placebo. Los resultados del estudio se emplearán en el desarrollo de un protocolo clínico para la administración de las formulaciones de vacuna de la invención,

Referencias

1. Glass, RI, JS Noel, T Ando, RL Fankhauser, G Belloit, A Mounts, UD Parasher, JS Bresee and SS Monroe. The Epidemiology of Enteric Caliciviruses from Human: A Reassessment Using New Diagnostics. *J Infect Dis* 2000; 181 (Sup 2): S254-S261.

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

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

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

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

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

35 7. Parrino, TA, DS Schreiber, JS Trier, AZ Kapikian, and NR Blacklow. Clinical Immunity in Acute Gastroenteritis Caused by Norwalk Agent. *N Engl J Med* 1977; 297: 86-89.

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

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

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

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

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

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

14. Isaka, M, Y Yasuda, S Kozuka, T Taniguchi, K Matano, J Maeyama, T Komiya, K Ohkuma, N Goto, and K Tochikubo. Induction of systemic and mucosal antibody responses in mice immunized intranasally with aluminum-non-adsorbed diphtheria toxoid together with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine* 1999; 18: 743-751.
- 5 15. Kozlowski, PA, S Cu-Uvin, MR Neutra, and TP Flanigan. Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women. *Infect Immun* 1997; 65: 1387-1394.
16. Mestecky, J, SM Michalek, Z Moldoveanu, and MW Russell. Routes of immunization and antigen delivery systems for optimal mucosal immune responses in humans. *Behring Inst Mitt* 1997; 33-43.
- 10 17. Wu, HY, and MW Russell. Nasal lymphoid tissue, intranasal immunization, and compartmentalization of the common mucosal immune system. *Immunol Res* 1997; 16: 187-201.
18. Evans, JT, CW Cluff, DA Johnson, MJ Lacy, DH Persing, and JR Baldrige. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi 529. *Expert Rev Vaccines* 2003; 2: 219-229.
19. Baldrige, JR, Y Yorgensen, JR Ward, and JT Ulrich. Monophosphoryl lipid A enhances mucosal and systemic immunity to vaccine antigens following intranasal administration [In Process Citation]. *Vaccine* 2000; 18: 2416-2425.
- 15 20. Yang, QB, M Martin, SM Michalek, and J Katz. Mechanisms of monophosphoryl lipid A augmentation of host responses to recombinant HagB from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 2002; 70: 3557-3565.
21. Baldrick, P, D Richardson, G Elliott, and AW Wheeler. Safety evaluation of monophosphoryl lipid A (MPL): an immunostimulatory adjuvant. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002; 35: 398-413.
- 20 22. Baldrige, JR, P McGowan, JT Evans, C Cluff, S Mossman, D Johnson, and D Persing. Taking a toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4: 1129-1138.
23. Persing, DH, RN Coler, MJ Lacy, DA Johnson, JR Baldrige, RM Hershberg, and SG Reed. Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. *Trends Microbiol* 2002; 10: S32-37.

LISTA DE SECUENCIAS

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

<120> FORMULACIONES PARENTERALES DE VACUNAS DE NOROVIRUS

<130> LIGO-024/01WO

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

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 540
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia compuesta de aminoácidos VP1 del Norovirus GII.4

<400> 1
 Met Lys Met Ala Ser Ser Asp Ala Asn Pro Ser Asp Gly Ser Thr Ala
 1 5 10 15
 Asn Leu Val Pro Glu Val Asn Asn Glu Val Met Ala Leu Glu Pro Val
 20 25 30
 Val Gly Ala Ala Ile Ala Ala Pro Val Ala Gly Gln Gln Asn Val Ile
 35 40 45
 Asp Pro Trp Ile Arg Asn Asn Phe Val Gln Ala Pro Gly Gly Glu Phe
 50 55 60
 Thr Val Ser Pro Arg Asn Ala Pro Gly Glu Ile Leu Trp Ser Ala Pro
 65 70 75 80
 Leu Gly Pro Asp Leu Asn Pro Tyr Leu Ser His Leu Ala Arg Met Tyr
 85 90 95
 Asn Gly Tyr Ala Gly Gly Phe Glu Val Gln Val Ile Leu Ala Gly Asn
 100 105 110
 Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Ile Phe Ala Ala Val Pro Pro Asn Phe
 115 120 125
 Pro Thr Glu Gly Leu Ser Pro Ser Gln Val Thr Met Phe Pro His Ile
 130 135 140
 Ile Val Asp Val Arg Gln Leu Glu Pro Val Leu Ile Pro Leu Pro Asp

ES 2 656 527 T3

His Leu Ala Pro Ala Val Ala Pro Thr Phe Pro Gly Glu Gln Leu Leu
 420 425 430

Phe Phe Arg Ser Thr Met Pro Gly Cys Ser Gly Tyr Pro Asn Met Asn
 435 440 445

Leu Asp Cys Leu Leu Pro Gln Glu Trp Val Gln His Phe Tyr Gln Glu
 450 455 460

Ala Ala Pro Ala Gln Ser Asp Val Ala Leu Leu Arg Phe Val Asn Pro
 465 470 475 480

Asp Thr Gly Arg Val Leu Phe Glu Cys Lys Leu His Lys Ser Gly Tyr
 485 490 495

Val Thr Val Ala His Thr Gly Gln His Asp Leu Val Ile Pro Pro Asn
 500 505 510

Gly Tyr Phe Arg Phe Asp Ser Trp Val Asn Gln Phe Tyr Thr Leu Ala
 515 520 525

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

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna para su uso en un método para prevenir y/o mejorar la infección por norovirus o enfermedades inducidas por norovirus y/o reducir al menos un síntoma de una infección o enfermedad por norovirus, en donde el método induce al menos un aumento de tres veces en el título de los anticuerpos en suero específicos de norovirus en un ser humano, en comparación con el título en el ser humano antes de la administración de la composición, comprendiendo el método administrar por vía parenteral al ser humano no más de una dosis única de la composición de vacuna, comprendiendo dicha composición de 15 µg a 50 µg de partículas tipo virus (VLP) del norovirus del genogrupo I y de 50 µg a 150 µg de VLP del norovirus del genogrupo II, en donde dichas VLP del norovirus del genogrupo I comprenden una proteína de cápside de una cepa viral del genogrupo I y en donde dichas VLP del norovirus del genogrupo II comprenden una proteína de cápside de una cepa viral del genogrupo II,
- 5
- 10 en el que dicha composición comprende además los adyuvantes monofosforil lípido A (MPL) e hidróxido de aluminio.
2. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que la composición induce al menos un aumento de seis veces en el título de anticuerpos en suero específicos de norovirus en comparación con el título en el ser humano antes de la administración de la composición.
- 15 3. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dichas VLP de norovirus son VLP monovalentes.
4. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dichas VLP del norovirus del genogrupo II comprenden una proteína de cápside de cepas virales del genotipo 4, genogrupo II.
5. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dichas VLP del norovirus del genogrupo II son VLP generadas a partir de la expresión de una secuencia consenso del norovirus del genogrupo II.
- 20 6. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dichas VLP del norovirus del genogrupo I son VLP del virus de Norwalk y dichas VLP del norovirus del genogrupo II son VLP generadas a partir de la expresión de una secuencia consenso del norovirus del genogrupo II.
7. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha composición comprende además un tampón seleccionado del grupo que consiste en L-histidina, imidazol, ácido succínico, tris y ácido cítrico.
- 25 8. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la composición de vacuna se formula como un líquido.

FIGURA 1

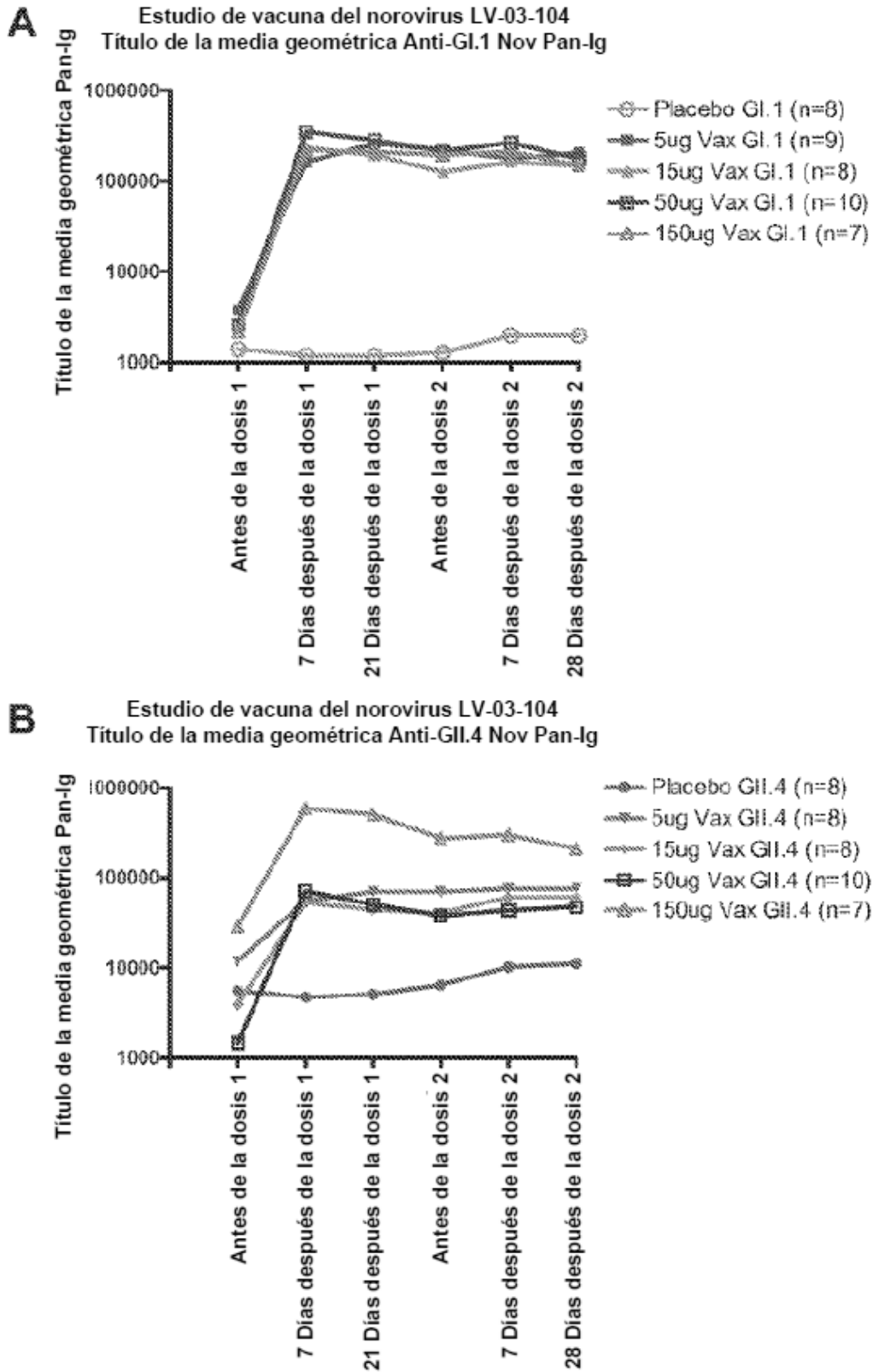


FIGURA 2

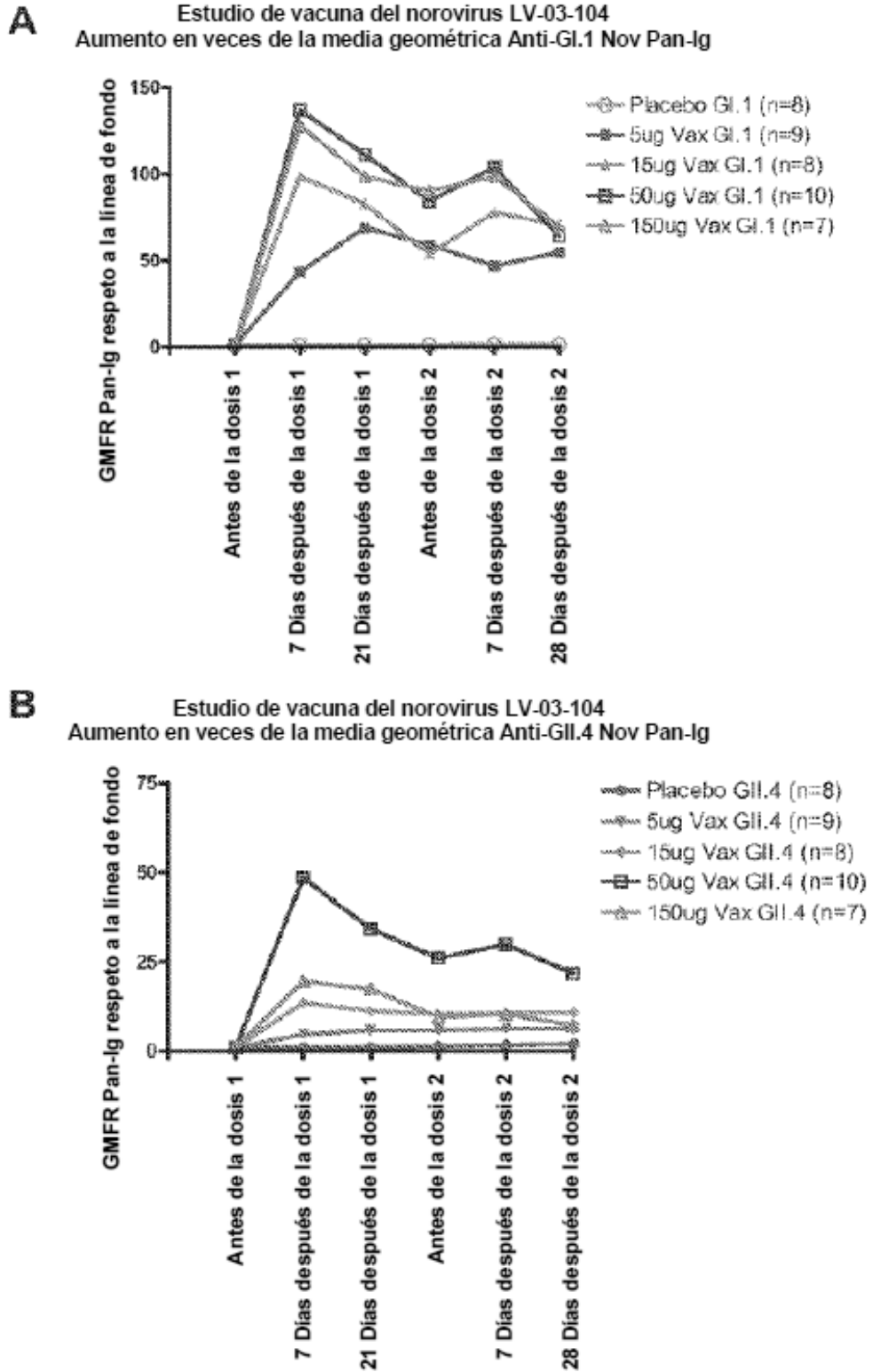


FIGURA 3

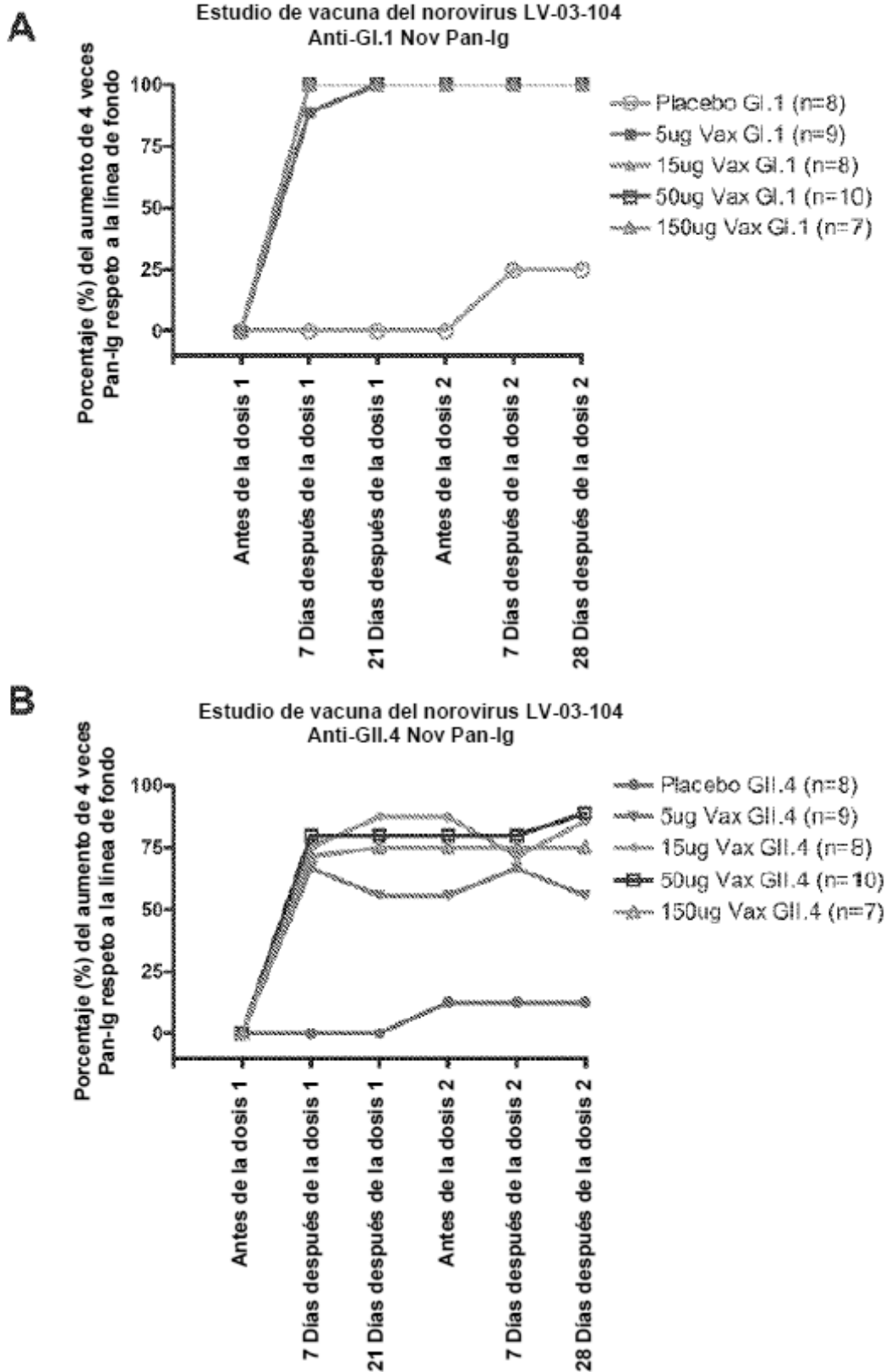
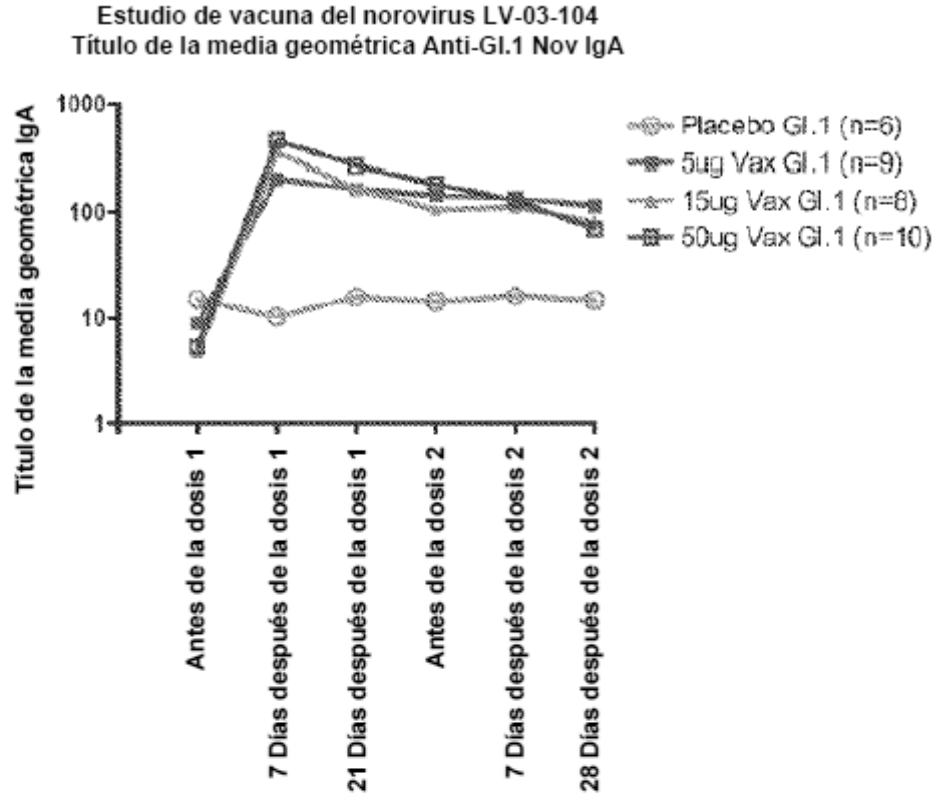


FIGURA 4

A



B

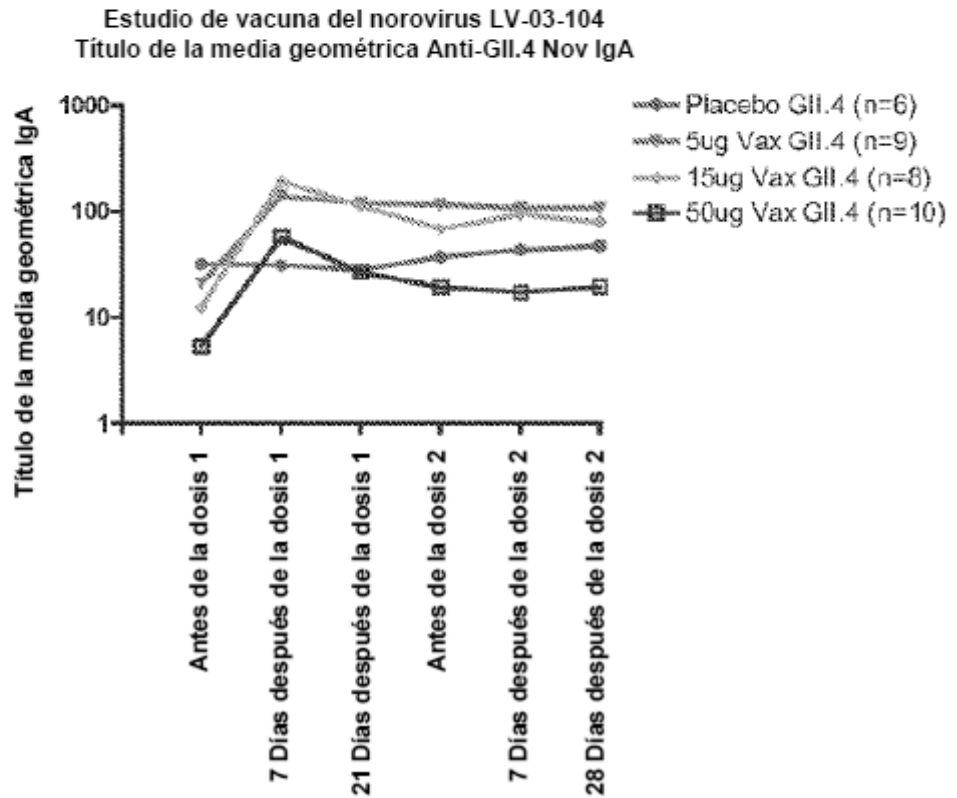
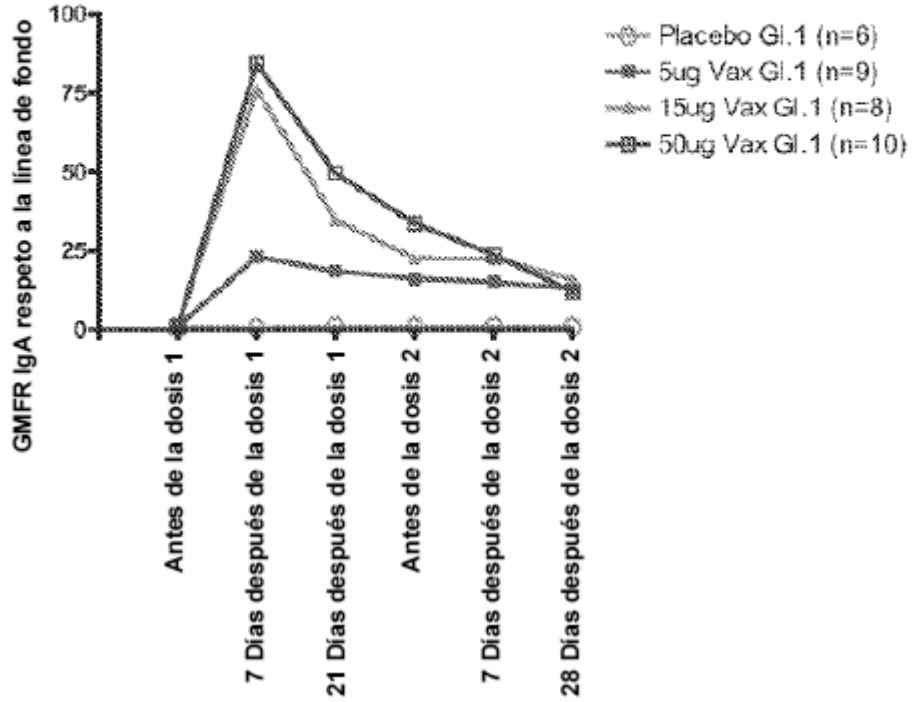


FIGURA 5

A

Estudio de vacuna del norovirus LV-03-104
Aumentos en veces de la media geométrica Anti-GI.1 Nov IgA



B

Estudio de vacuna del norovirus LV-03-104
Aumentos en veces de la media geométrica Anti-GII.4 Nov IgA

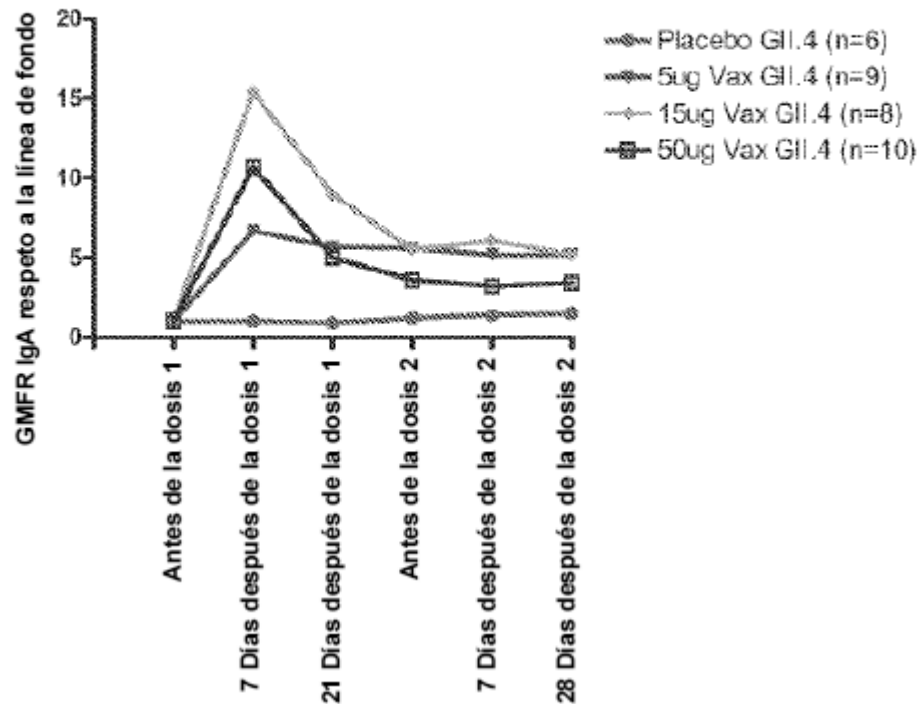
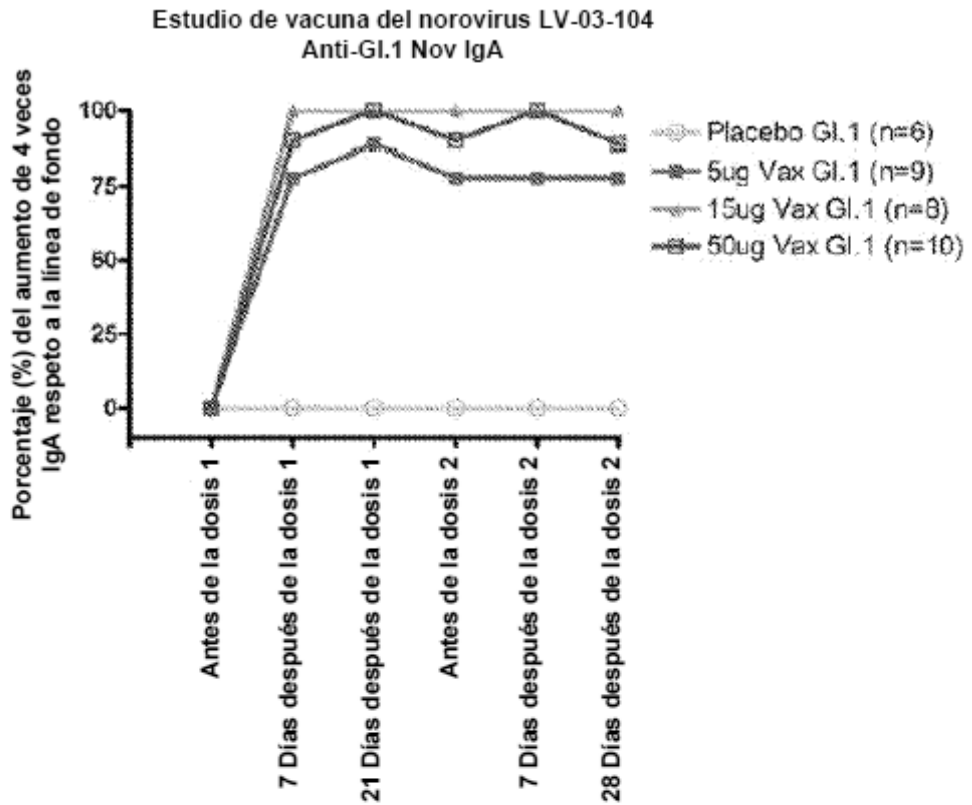


FIGURA 6

A



B

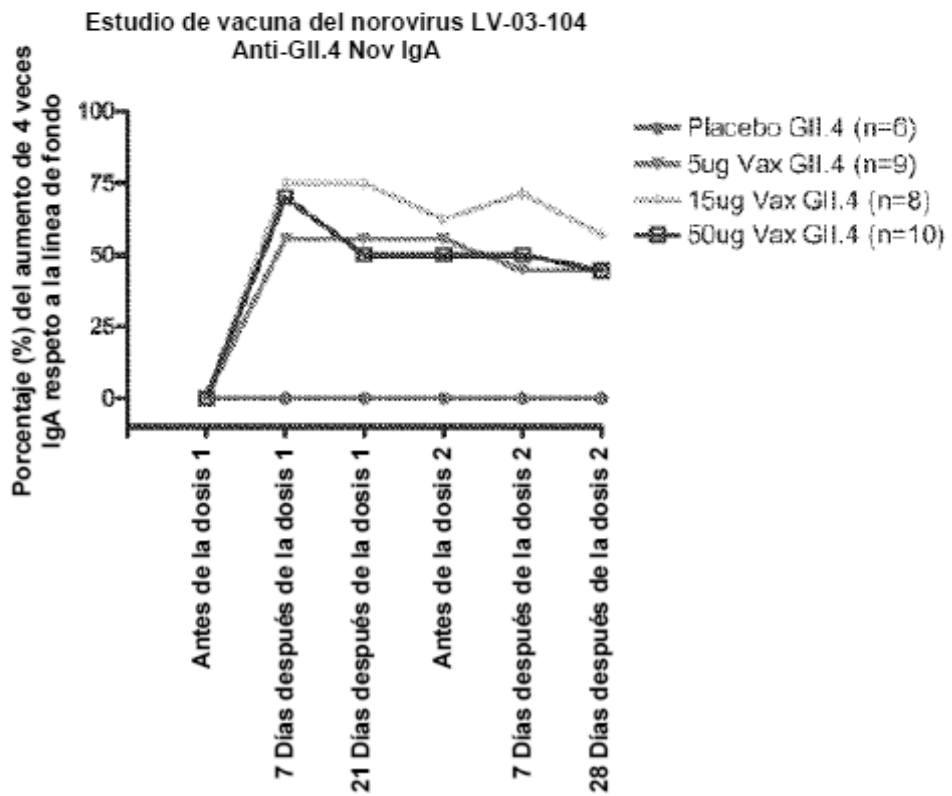
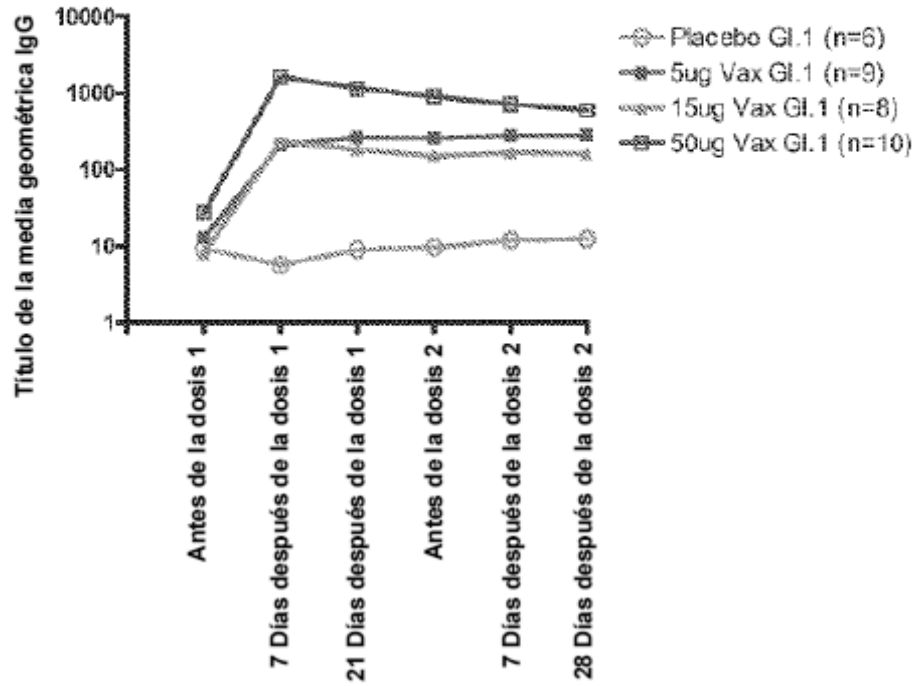


FIGURA 7

A

Estudio de vacuna del norovirus LV-03-104
Título de la media geométrica Anti-GI.1 Nov IgG



B

Estudio de vacuna del norovirus LV-03-104
Título de la media geométrica Anti-GII.4 Nov IgG

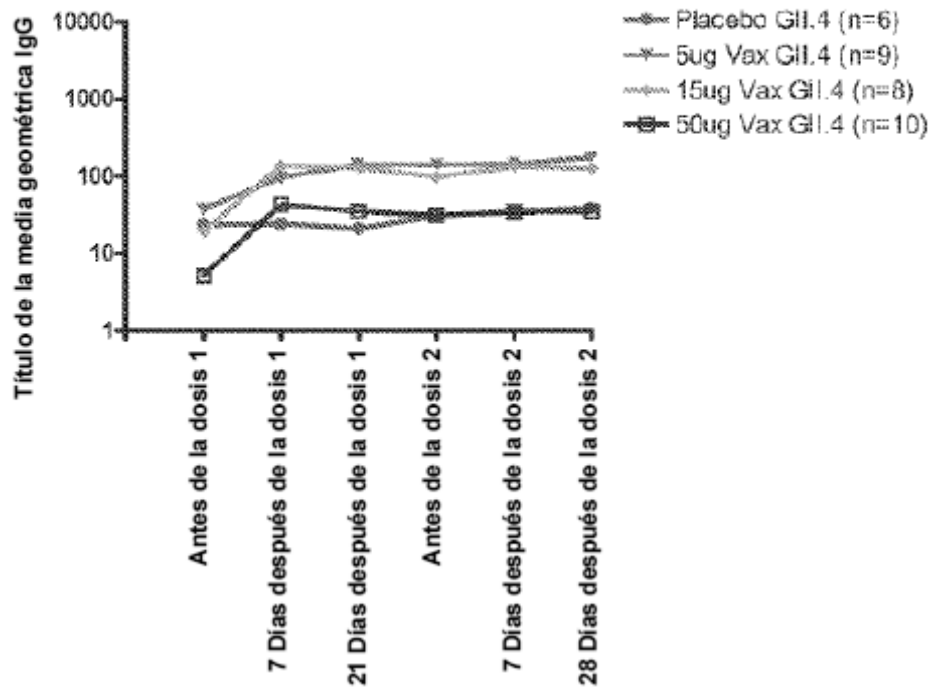
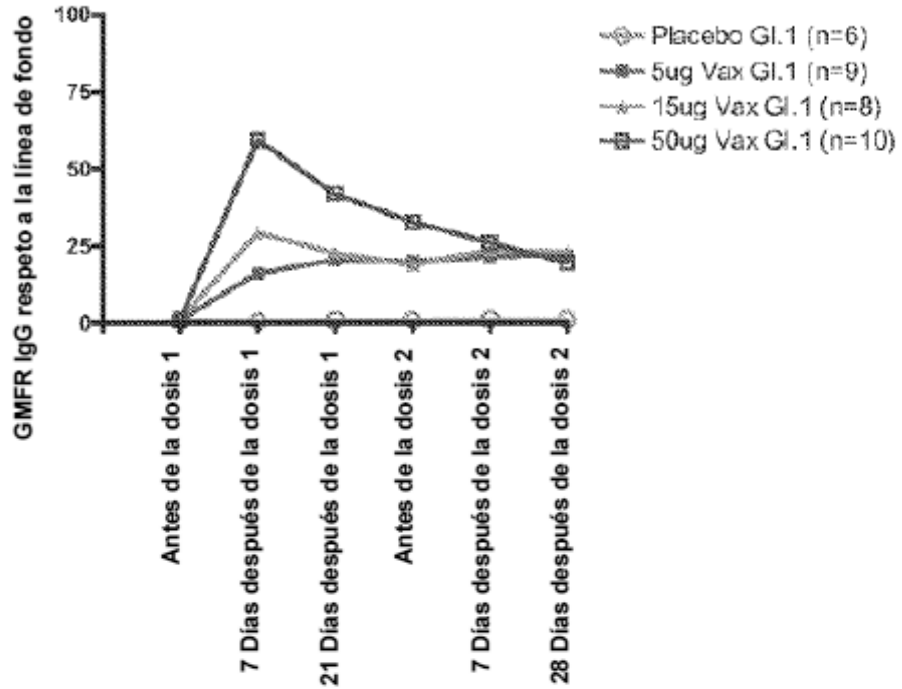


FIGURA 8

A

Estudio de vacuna del norovirus LV-03-104
Aumentos en veces de la media geométrica Anti-GI.1 Nov IgG



B

Estudio de vacuna del norovirus LV-03-104
Aumentos en veces de la media geométrica Anti-GII.4 Nov IgG

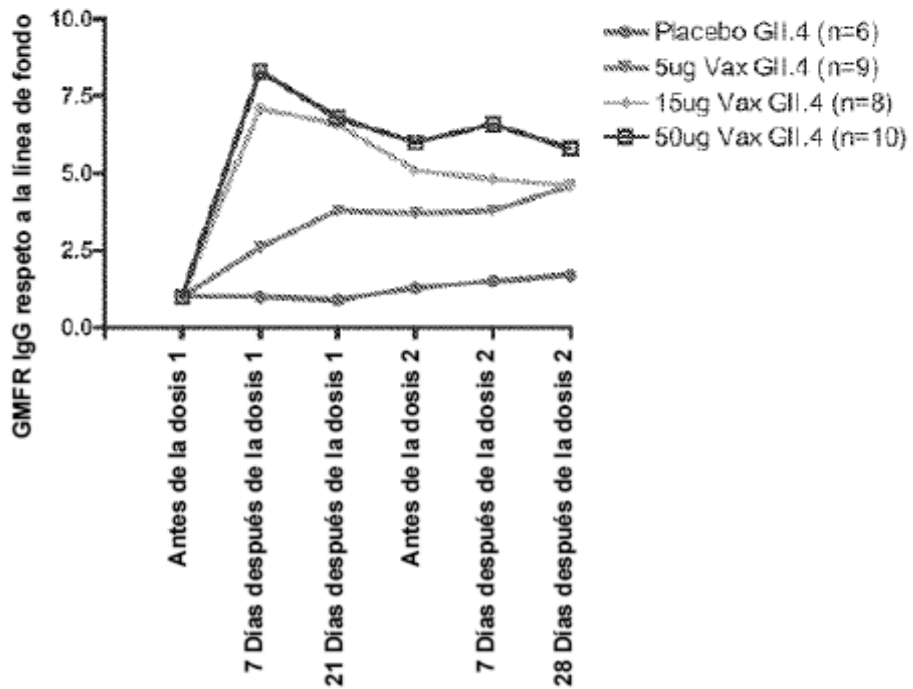


FIGURA 9

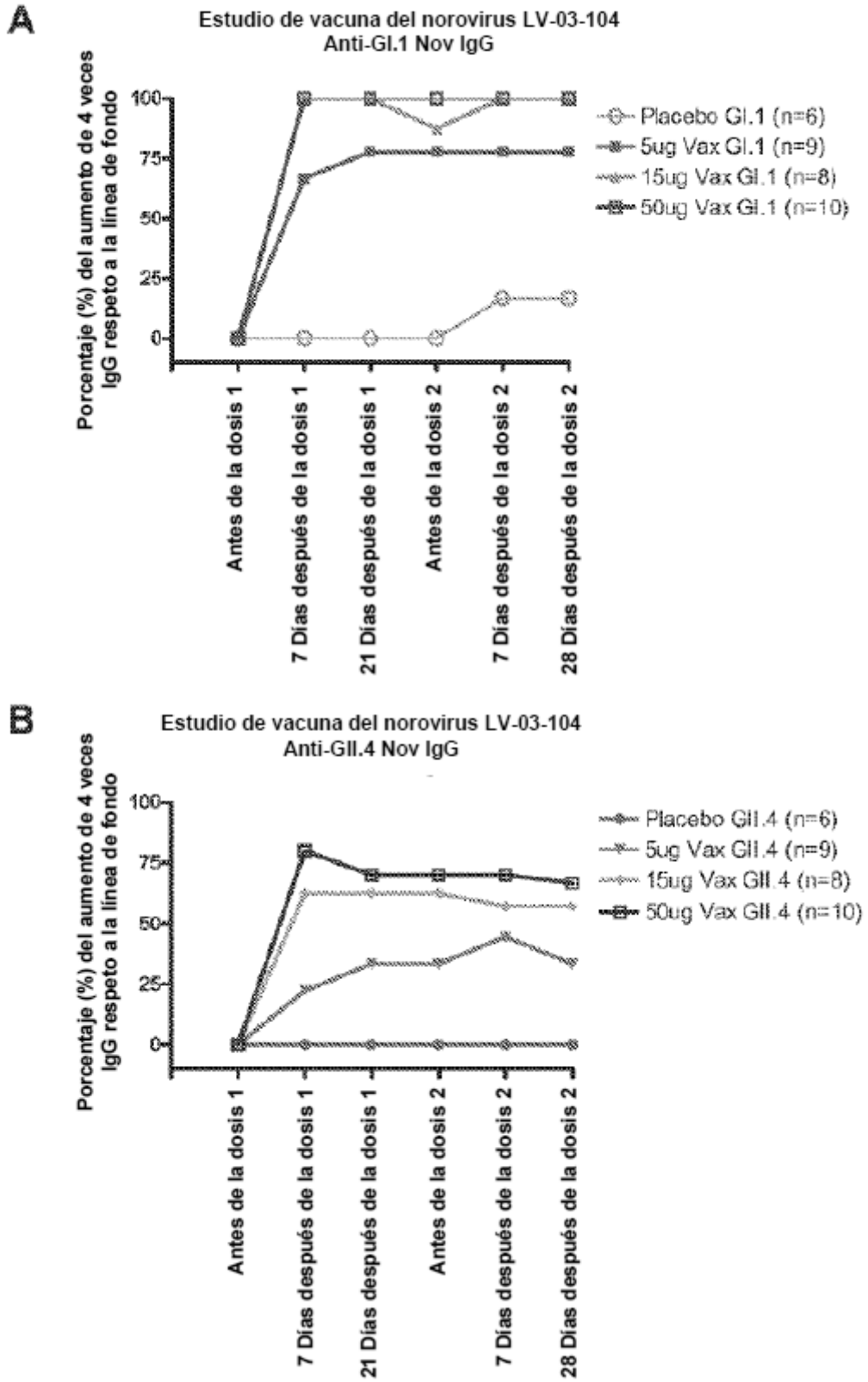


FIGURA 10

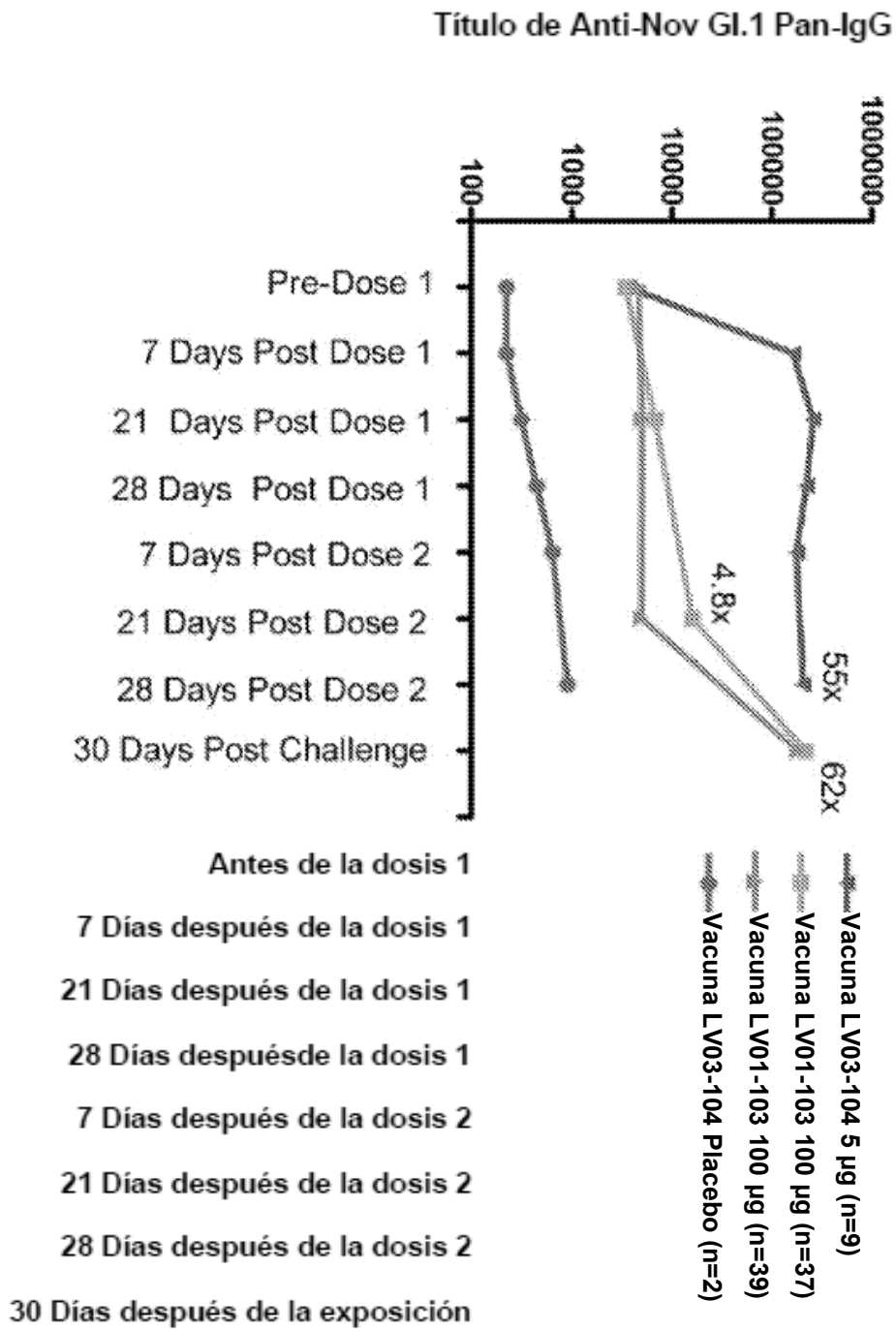


FIGURA 11A

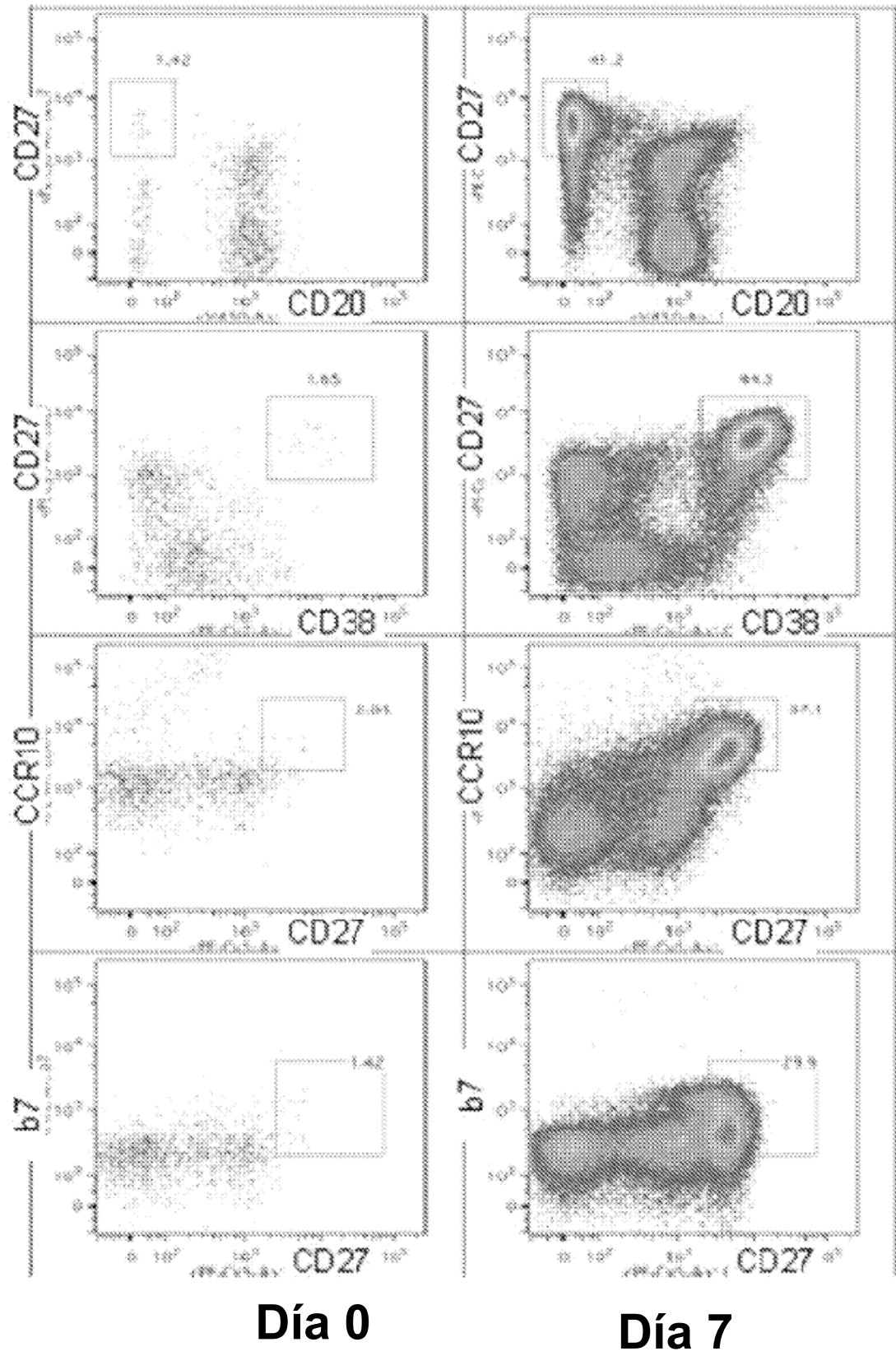


FIGURA 11B

