

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 836**

51 Int. Cl.:

C12N 7/01 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

C07K 14/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.08.2009 PCT/US2009/053249**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2010 WO10017542**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2009 E 09805653 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2324113**

54 Título: **Partículas similivíricas que comprenden secuencias de aminoácidos de la cápside compuestas para reactividad cruzada potenciada**

30 Prioridad:

08.08.2008 US 87504 P

19.06.2009 US 218603 P

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

22.05.2018

73 Titular/es:

TAKEDA VACCINES, INC. (100.0%)

**75 Sidney Street
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**RICHARDSON, CHARLES;
BARGATZE, ROBERT;
HAYNES, JOEL y
STEADMAN, BRYAN**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 668 836 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

Partículas similivíricas que comprenden secuencias de aminoácidos de la cápside compuestas para reactividad cruzada potenciada

5

Campo

La invención se refiere al campo de las vacunas, particularmente de las vacunas que comprenden partículas similivíricas con una secuencia de aminoácidos compuesta derivada de una secuencia consenso que representa dos o más proteínas de la cápside de virus sin envoltura. Además, se proporcionan también métodos de preparación de composiciones de vacuna y métodos de inducción de una respuesta inmunitaria protectora usando las composiciones de vacuna de la invención.

10

Antecedentes de la invención

15

El enfoque prevalente para preparar vacunas para virus con patrones estacionales o anuales se modela mediante vacunas antigripales comerciales que requieren la anticipación, publicación y posterior síntesis de una nueva vacuna cuando el virus evoluciona para presentar un perfil antigénico diferente. Este enfoque provoca demoras en el desarrollo cronológico y costes significativos ya que se sintetizan nuevos antígenos con anticipación a la cepa vírica del año siguiente. Además, según evidencian los fracasos de la vacuna antigripal del 2008, los errores en la cepa predicha pueden dar como resultado costes relacionados con la enfermedad significativos ya que los pacientes están menos protegidos. Por tanto, son deseables métodos mejorados para diseñar y preparar vacunas para proteger frente a múltiples cepas circulantes de virus patógenos.

20

Los norovirus son calicivirus humanos no cultivables que han surgido como la causa individual más importante de brotes epidémicos de gastroenteritis no bacteriana (Glass *et al.* (2000) *J Infect Dis*, vol. 181 (sup. 2): S254-S261; Hardy *et al.* (1999) *Clin Lab Med*, vol. 19(3): 675-90). Estos virus se han agrupado en cinco genogrupos diferentes de los que los genogrupos I y II se dividen adicionalmente en más de 25 genotipos y son los agentes para la amplia mayoría de la enfermedad en seres humanos atribuida a este virus. Existen retos importantes para el desarrollo de vacunas contra norovirus, incluyendo la incapacidad para propagar el virus en cultivo y modelos animales adecuados de gastroenteritis aguda. Por tanto, hoy en día no son posibles las técnicas virológicas convencionales, incluyendo ensayos de neutralización *in vitro* o atenuación vírica.

25

30

Los norovirus contienen un genoma de ARN de sentido positivo monocatenario de 7,5 Kb que contiene tres marcos abiertos de lectura. La proteína principal de la cápside vírica (VP1) está codificada por ORF2 y la expresión de esta proteína da como resultado el ensamblaje espontáneo de partículas similivíricas (VLP, *virus-like particles*), que imitan la estructura del virus pero no pueden replicarse. Esta estructura se compone de 180 subunidades monoméricas de VP1 y son vacunas experimentales para prevenir la gastroenteritis aguda. El monómero de VP1 tiene dos dominios: un dominio de cubierta (S) que forma el núcleo vírico interno y un dominio protuberante prominente (P) unidos por una región bisagra flexible. El dominio P se divide adicionalmente en dos subdominios P1 y P2, que es la región más expuesta a la superficie y se cree que contienen importantes sitios de reconocimiento celular y antigénicos. El análisis de homología indica que la mayoría de las regiones de aminoácidos hipervariables de VP1 están ubicadas en el dominio P2 (Allen *et al.* (2008) *PLoS One*, vol. 1: 1-9).

35

40

Los estudios epidemiológicos recientes han conducido a la hipótesis de que la evolución de norovirus es por épocas con periodos de estasis seguidos por el surgimiento de nuevas cepas epidémicas, de forma similar a lo observado para el virus de la gripe. Los brotes epidémicos más recientes parecen estar relacionados con el surgimiento de virus variantes en el genotipo GII.4 en un intervalo persistente de alrededor de dos años. Existe la necesidad en la técnica de obtener una vacuna experimental que proporcione epítomos antigénicos que serán de protección cruzada para múltiples norovirus, u otras cepas de virus sin envoltura, lo que obviaría la necesidad de construir vacunas para cada cepa de brote epidémico actual.

45

50

Sumario

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

55

1. Una partícula similivírica que comprende al menos un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos compuesta, en la que la secuencia de aminoácidos compuesta comprende SEQ ID NO: 1; en la que SEQ ID NO: 1 deriva de cepas de norovirus circulantes; en la que la partícula similivírica tiene propiedades antigénicas de las cepas circulantes de norovirus usadas para derivar SEQ ID NO: 1; y en la que las cepas de norovirus circulantes se seleccionan del grupo que consiste en virus Houston, Minerva y Laurens.

60

2. La partícula similivírica del punto 1, en la que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos compuesta codificada por una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3

65

3. La partícula similivírica del punto 1 o 2, que comprende además una proteína de la cápside de un norovirus.

4. La partícula similivírica del punto 3, en la que la proteína de la cápside del norovirus es una proteína VP1 de un norovirus del genogrupo I.

5 5. Un polipéptido o fragmento del mismo que tiene una secuencia de aminoácidos compuesta, en el que la secuencia de aminoácidos compuesta es SEQ ID NO: 1.

6. Una formulación de vacuna que comprende la partícula similivírica de uno cualquiera de los puntos 1-4 o el polipéptido o fragmento del mismo del punto 5.

10 7. Una formulación de vacuna que comprende la partícula similivírica de uno cualquiera de los puntos 1-4 o el polipéptido o fragmento del mismo del punto 5 y una segunda partícula similivírica, en la que dicha segunda partícula similivírica comprende una proteína de la cápside de un norovirus.

15 8. La formulación de vacuna del punto 7, en la que dicho norovirus es un norovirus del genogrupo I o del genogrupo II.

9. La formulación de vacuna del punto 6 o 7, que comprende además un adyuvante.

20 10. La formulación de vacuna del punto 9, en la que la formulación de vacuna es una formulación líquida o una formulación en polvo seco.

11. La formulación de vacuna del punto 6 o 7, para su uso en un método de inducción de inmunidad protectora frente a una infección vírica en un sujeto que lo necesita.

25 La presente invención está basada, en parte, en el descubrimiento de que puede usarse un polipéptido que comprende una secuencia de la cápside compuesta, que combina epítomos de varias cepas víricas circulantes, para producir una respuesta inmunológica más fuerte frente a múltiples cepas víricas. Un polipéptido de este tipo puede usarse para preparar formulaciones de vacuna que son protectoras frente a varias cepas circulantes del virus, y por tanto mejorar la protección cepa a cepa y año tras año.

30 La presente divulgación proporciona al menos un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos compuesta, en el que dicha secuencia de aminoácidos compuesta deriva de una secuencia consenso que representa las proteínas de la cápside de dos o más cepas circulantes de un virus sin envoltura, y en el que el al menos un polipéptido forma una partícula similivírica cuando se expresa en una célula huésped y contiene al menos un aminoácido diferente en comparación con cada una de las secuencias de la cápside de dichas dos o más cepas circulantes. En una realización, la partícula similivírica que comprende el al menos un polipéptido compuesto tiene propiedades antigénicas de las dos o más cepas circulantes del virus sin envoltura. En otra realización, el polipéptido compuesto o la partícula similivírica compuesta proporciona un aumento de la reactividad cruzada de antiseros contra una o más cepas circulantes del virus sin envoltura en comparación con la reactividad cruzada de antiseros obtenida mediante inmunización con una partícula similivírica que contiene solo proteína de dichas una o más cepas circulantes.

45 La partícula similivírica puede comprender al menos un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos compuesta derivada de una secuencia consenso que representa proteínas de la cápside de dos o más cepas circulantes de un virus sin envoltura, en la que el virus sin envoltura se selecciona del grupo que consiste en calicivirus, picornavirus, astrovirus, adenovirus, reovirus, poliomavirus, papilomavirus, parvovirus y virus de la hepatitis E. En una realización, el virus sin envoltura es un calicivirus. En otra realización, el calicivirus es un norovirus o sapovirus. El norovirus puede ser un norovirus del genogrupo I o del genogrupo II.

50 La secuencia consenso puede derivar de dos o más cepas de norovirus clasificadas en el mismo genogrupo y genotipo. En una realización, la secuencia consenso deriva de cepas de norovirus del genogrupo II, genotipo 4, tales como las cepas Houston, Minerva y Laurens. En otra realización, la secuencia consenso deriva de cepas de norovirus de al menos dos genotipos diferentes dentro de un genogrupo. En todavía otra realización, la secuencia consenso deriva de cepas de norovirus de al menos dos genogrupos diferentes.

55 La presente divulgación también proporciona una partícula similivírica que comprende al menos un polipéptido compuesto derivado de dos o más cepas de calicivirus circulantes y una proteína de la cápside de un segundo virus sin envoltura, tales como norovirus. La proteína de la cápside puede ser una proteína VP1 y/o VP2 de un norovirus del genogrupo I o del genogrupo II. En otra realización, la partícula similivírica comprende al menos un polipéptido compuesto derivado de dos o más cepas circulantes de un calicivirus y un segundo polipéptido compuesto derivado de dos o más cepas circulantes de un segundo calicivirus. Preferiblemente, la partícula similivírica tiene propiedades antigénicas de las dos o más cepas circulantes del primer calicivirus y las dos o más cepas circulantes del segundo calicivirus.

65 La presente divulgación también proporciona un polipéptido aislado o fragmento del mismo que tiene una secuencia

de aminoácidos compuesta, en el que dicha secuencia de aminoácidos compuesta deriva de una secuencia consenso que representa las proteínas de la cápside de dos o más cepas circulantes de un virus sin envoltura, y en el que el polipéptido contiene al menos 1 aminoácido diferente en comparación con cada una de las secuencias de la cápside de dichas dos o más cepas circulantes. El virus sin envoltura puede ser un calicivirus, tal como un sapovirus o norovirus. Alternativamente, el virus sin envoltura puede ser un papilomavirus.

La presente divulgación contempla formulaciones de vacuna que comprenden uno o más polipéptidos compuestos o partículas similivíricas compuestas de la invención. Cada una de las partículas similivíricas compuestas comprende al menos un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos compuesta derivada de una secuencia consenso que representa las proteínas de la cápside de dos o más cepas circulantes de un virus sin envoltura. El virus sin envoltura puede ser un norovirus del genogrupo I o del genogrupo II. En algunas realizaciones, la formulación de vacuna comprende además un adyuvante. En otras realizaciones, la formulación de vacuna comprende además un agente de administración. En todavía otras realizaciones, la formulación de vacuna comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. La formulación de vacuna puede ser una formulación líquida o una formulación en polvo seco.

La divulgación también proporciona un método de inducción de inmunidad protectora frente a una infección vírica en un sujeto que comprende administrar al sujeto una formulación de vacuna divulgada en el presente documento. En una realización, la infección vírica es una infección por norovirus. En otra realización, la formulación de vacuna confiere protección frente a uno o más síntomas de infección por norovirus.

La presente divulgación también contempla un método de producción de una partícula similivírica compuesta. En una realización, el método comprende alinear secuencias de aminoácidos de proteínas de la cápside de dos o más cepas circulantes de un virus sin envoltura; determinar una secuencia consenso a partir de dichas secuencias de aminoácidos alineadas; preparar una secuencia compuesta basada en dicha secuencia consenso que contiene al menos 1 aminoácido diferente en comparación con cada una de las secuencias de la cápside de dichas dos o más cepas circulantes; y expresar dicha secuencia compuesta en una célula huésped, produciendo de ese modo una partícula similivírica. El virus sin envoltura puede ser un calicivirus, picornavirus, astrovirus, adenovirus, reovirus, poliomavirus, papilomavirus, parvovirus y virus de la hepatitis E.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Secuencia consenso de aminoácidos de proteínas VP1 de norovirus del genogrupo II, genotipo 4 (SEQ ID NO: 2). La secuencia consenso se determinó a partir de una alineación de las cepas Houston, Minerva y Laurens.

Figura 2. Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína VP1 compuesta de norovirus del genogrupo II, genotipo 4 (SEQ ID NO: 3).

Figura 3. Análisis mediante SDS-PAGE/Coomassie de VLP compuestas purificadas en gradiente de sacarosa.

Figura 4. Cromatograma de HPLC-SEC de lecturas a 220 nm (parte superior) y 280 nm (parte inferior) de sobrenadante de cultivo celular de expresión compuesta purificado mediante gradiente de sacarosa.

Figura 5. Análisis mediante SDS-PAGE/tinción de plata de VLP de secuencia compuesta purificadas mediante cromatografía en columna.

Figura 6. Cromatograma de HPLC-SEC de lecturas a 280 nm de VLP compuestas.

Figura 7. La inmunización con VLP compuesta (CVLP) produce IgG específica de antígeno. Se inmunizaron (por vía i.p.) grupos de siete ratones con diversas concentraciones de CVLP (indicadas en el eje X) en los días 0 y 7. Se recogió suero en el día 14 y se midió mediante ELISA la IgG específica de CVLP. Las líneas horizontales indican las medias geométricas de cada grupo de tratamiento.

Figura 8. La inmunización con una combinación de VLP compuesta/VLP de Norwalk (CVLP/NVLP) produce IgG específica de NVLP. Se inmunizaron (por vía i.p.) grupos de siete ratones con diversas concentraciones de NVLP sola (barras de color púrpura) o en combinación con cantidades iguales de CVLP (barras de color negro) en los días 0 y 14. Se recogió suero en el día 21 y se midió mediante ELISA la IgG específica de NVLP. Los datos se notifican como la media + el error estándar de la media (E.E.M.).

Figura 9. La inmunización con una combinación de VLP compuesta/VLP de Norwalk (CVLP/NVLP) produce IgG específica de CVLP. Se inmunizaron (por vía i.p.) grupos de siete ratones con diversas concentraciones de o bien VLP compuesta sola (barras de color verde) o bien en combinación con cantidades iguales de NVLP (barras de color negro) en los días 0 y 14. Se recogió suero en el día 21 y se midió mediante ELISA la IgG específica de CVLP. Los datos se notifican como la media + el error estándar de la media (E.E.M.).

Figura 10. La IgG específica de CVLP da reacción cruzada con otras cepas aisladas de norovirus. Los títulos de

anticuerpos medidos 21 días después de una única inmunización con o bien las VLP compuestas o bien las VLP de GII.4 2002 muestran que las VLP compuestas producen títulos ~10 veces mayores en comparación con las VLP de GII.4 2002. Los títulos de anticuerpos para animales inmunizados con todas las VLP de GII.4 muestran escasa reactividad cruzada con las VLP de GI.1. Los datos se expresan como la media geométrica + el error estándar de la media (E.E.M.).

Figura 11. Se inmunizaron por vía i.m. conejos en los días 0 y 21 con cantidades iguales de VLP de Norwalk (NVLP) y VLP compuesta (CVLP). Se recogió suero en el día 28 y se evaluó la IgG específica de VLP. Los datos resultantes se transformaron de forma logarítmica y se evaluaron mediante análisis de regresión lineal. Los títulos de IgG se expresan como diluciones inversas y se muestran como las medias geométricas de los títulos.

Figura 12. Se inmunizaron por vía i.m. conejos en los días 0 y 21 con cantidades iguales de VLP de Norwalk (NVLP) y VLP compuesta (CVLP). Se recogieron los bazo en el día 75 y se estimularon en cultivo células no fraccionadas durante 5 días o bien con NVLP o bien con CVLP y se midió la cantidad de incorporación de timidina. Se muestran la media y la D.E. para cada conejo en los grupos de tratamiento indicados en el eje X. Los datos se expresan como la media + la D.E.

Figura 13. Se inmunizaron por vía i.m. conejos en los días 0 y 21 con cantidades iguales de VLP de Norwalk (NVLP) y VLP compuesta (CVLP). Se recogieron los bazo y ganglios linfáticos (GL) mesentéricos en el día 75 y se analizaron mediante ELISPOT para determinar la presencia de células B de memoria específicas de VLP. Se muestran respuestas individuales para NVLP y CVLP. Los datos se representan como el número de células secretoras de IgG específica de VLP por millón de células presentes.

Figura 14. Se inmunizaron por vía i.m. conejos en los días 0, 14 y 21 con cantidades iguales de VLP de Norwalk (NVLP) y VLP compuesta (CVLP) tal como se indica en las leyendas. Se recogió suero en los días 21 y 35 y se midieron mediante ELISA la IgG e IgA específicas de NVLP. Los resultados se presentan como medias geométricas de grupos + el E.E.M.

Figura 15. Se inmunizaron por vía i.m. conejos en los días 0, 14 y 21 con cantidades iguales de VLP de Norwalk (NVLP) y VLP compuesta (CVLP) tal como se indica en las leyendas. Se recogió suero en los días 21 y 35 y se midieron mediante ELISA la IgG e IgA específicas de CVLP. Los resultados se presentan como medias geométricas de grupos + el E.E.M.

Figura 16. Se inmunizaron por vía i.m. conejos en los días 0, 14 y 21 con cantidades iguales de VLP de Norwalk (NVLP) y VLP compuesta (CVLP). Se recogieron los bazo en el día 35 y se estimularon *in vitro* células no fraccionadas durante 5 días. Se estimularon esplenocitos con diversas VLP de los dos genogrupos tal como se indica en las leyendas del gráfico. Los resultados se presentan como medias geométricas de grupos + la D.E.

Figura 17. Se inmunizaron por vía i.p. ratones en los días 0 y 7 con cantidades iguales de VLP de Norwalk (NVLP) y VLP compuesta (CVLP) tal como se indica en el eje X. Se recogió suero en el día 14 y se analizó mediante ELISA para determinar la presencia de IgG específica de VLP. Se muestran respuestas individuales y se expresan los títulos como diluciones inversas. Las barras horizontales representan medias geométricas de grupos.

Figura 18. Se inmunizaron por vía i.p. ratones en los días 0 y 7 con cantidades iguales de VLP de Norwalk (NVLP) y VLP compuesta (CVLP) tal como se indica en el eje X. Se recogió suero en el día 14 y se analizó para determinar la presencia de anticuerpos que pueden inhibir la hemaglutinación de glóbulos rojos humanos (de tipo O positivo). Se muestran respuestas individuales y se expresan los títulos como diluciones inversas. Las barras horizontales representan medias geométricas de grupos.

Figura 19. IgG anti-VLP sérica en conejos inmunizados por vía intranasal en los días 0 y 21 con 50 µg de formulación de vacuna de VLP (VLP de Norwalk + VLP de GII.4 compuestas). Se muestran respuestas individuales y se expresan en µg/ml de suero recogido en el día 35. Las barras indican medias geométricas de grupos.

Figura 20. Secuencia consenso de aminoácidos de proteínas VP1 de norovirus del genogrupo II (SEQ ID NO: 7). La secuencia consenso se determinó a partir de una alineación de cepas GII.1 (número de acceso: AAL13001), GII.2 Snow Mountain (número de acceso: AAB61685) y GII.3 (número de acceso: AAL12998). La "x" indica posiciones en las que el aminoácido era diferente en las tres cepas.

Figura 21. Secuencia consenso de aminoácidos de proteínas VP1 de norovirus del genogrupo I (SEQ ID NO: 12). La secuencia consenso se determinó a partir de una alineación de cepas de virus Norwalk (número de acceso: M87661), Southampton (número de acceso: Q04542) y virus Chiba (número de acceso: BAB 18267). La "x" indica posiciones en las que el aminoácido era diferente en las tres cepas.

Figura 22. Secuencia consenso de aminoácidos de proteínas L1 de papilomavirus humano (SEQ ID NO: 17). La secuencia consenso se determinó a partir de una alineación de cepas víricas HPV-11, HPV-16 y HPV-18. La "x" indica posiciones en las que el aminoácido era diferente en las tres cepas.

Descripción detallada

5 La presente divulgación proporciona formulaciones de vacuna que comprenden un polipéptido que tiene una
 10 secuencia de aminoácidos compuesta, en las que la secuencia de aminoácidos compuesta deriva de secuencias de
 la cápside de cepas circulantes de virus sin envoltura. Las partículas similivíricas producidas a partir de tales
 secuencias de polipéptidos proporcionan epítomos antigénicos para varias cepas víricas y pueden usarse para
 inducir una respuesta inmunitaria que es protectora frente a la infección vírica por múltiples cepas. Por consiguiente,
 la presente divulgación proporciona una partícula similivírica que comprende al menos un polipéptido que tiene una
 15 secuencia de aminoácidos compuesta. Una "secuencia de aminoácidos compuesta" o "secuencia compuesta", tal
 como se usa en el presente documento, es una secuencia derivada de una secuencia consenso de al menos dos
 secuencias de proteínas víricas. En una realización, las secuencias de proteínas víricas son secuencias de la
 cápside. Una secuencia de aminoácidos compuesta puede derivar de una secuencia consenso seleccionándose uno
 de dos o más aminoácidos en las posiciones variables en la secuencia consenso.

15 Tal como se usa en el presente documento, una "secuencia consenso" es una secuencia que contiene uno o más
 aminoácidos variables, y se determina alineando y comparando las secuencias de proteínas víricas de dos o más
 virus. Una secuencia consenso también puede determinarse alineando y comparando las secuencias de nucleótidos
 de dos o más virus. La secuencia consenso puede determinarse a partir de secuencias de proteínas o de
 20 nucleótidos de dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, o nueve o
 más cepas circulantes de un virus sin envoltura.

El polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos compuesta puede contener al menos un aminoácido
 25 diferente, al menos dos diferentes, al menos tres diferentes, al menos cuatro diferentes, al menos cinco diferentes,
 al menos seis diferentes, al menos siete diferentes, al menos ocho diferentes, al menos nueve diferentes, al menos
 diez diferentes, al menos quince diferentes, al menos veinte diferentes, al menos veinticinco diferentes, al menos
 treinta diferentes, al menos treinta y cinco diferentes, al menos cuarenta diferentes, al menos cuarenta y cinco
 diferentes o al menos cincuenta diferentes en comparación con cada una de las secuencias de proteínas de las dos
 o más cepas circulantes usadas para determinar la secuencia consenso. En algunas realizaciones, el polipéptido
 30 que tiene una secuencia de aminoácidos compuesta puede formar una partícula similivírica cuando se expresa en
 una célula huésped.

En una realización, la partícula similivírica (VLP) comprende al menos un polipéptido que tiene una secuencia de
 35 aminoácidos compuesta, en la que dicha secuencia de aminoácidos compuesta deriva de una secuencia consenso
 que representa las proteínas de la cápside de dos o más cepas circulantes de un virus sin envoltura, y en la que al
 menos un polipéptido forma una partícula similivírica cuando se expresa en una célula huésped y contiene al menos
 1 aminoácido diferente en comparación con cada una de las secuencias de la cápside de dichas dos o más cepas
 circulantes. Preferiblemente, la partícula similivírica tiene propiedades antigénicas de las dos o más, tres o más,
 40 cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, o nueve o más cepas circulantes de un virus sin
 envoltura. En algunas realizaciones, la partícula similivírica proporciona un aumento de la reactividad cruzada de
 antisueros contra una o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o
 más, o nueve o más cepas circulantes del virus sin envoltura en comparación con la reactividad cruzada de
 45 antisueros obtenida mediante inmunización con una partícula similivírica que contiene solo proteína de una o más
 cepas circulantes. En una realización, la partícula similivírica proporciona al menos un aumento de dos veces de la
 reactividad cruzada de antisueros.

En otra realización, la partícula similivírica comprende al menos un polipéptido que tiene una secuencia de
 50 aminoácidos compuesta derivada de una secuencia consenso que representa las proteínas de la cápside de dos o
 más cepas circulantes de un virus sin envoltura, en la que el virus sin envoltura se selecciona del grupo que consiste
 en calicivirus, picornavirus, astrovirus, adenovirus, reovirus, poliomavirus, papilomavirus, parvovirus y virus de la
 hepatitis E. La divulgación incluye también cepas de virus sin envoltura que no se hayan caracterizado o descubierto
 aún en el momento de la presentación. En algunas realizaciones, entre otros, el virus sin envoltura es un calicivirus.
 Los calicivirus se dividen en cuatro géneros: norovirus y sapovirus, que provocan infección en seres humanos, y
 55 lagovirus y vesivirus, que están asociados con infecciones veterinarias. En realizaciones preferidas, el calicivirus es
 un sapovirus o norovirus.

El género norovirus se divide principalmente en dos genogrupos principales (GI y GII). Se han propuesto otros dos
 genogrupos (GIII y GIV), generalmente aceptados. La cepa Jena bovina es representativa de GIII. GIV contiene un
 60 virus, Alphatron, en este momento. Los grupos GI y GII pueden segregarse adicionalmente en agrupamientos o
 genotipos basándose 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). Tal como se usa en el presente documento, el
 término agrupamientos genéticos se usa indistintamente con el término genotipos. Dentro del genogrupo I, hay 6
 agrupamientos de GI (con el nombre de la cepa del virus prototipo): GI.1 (Norwalk); GI.2 (Southampton); GI.3
 (Desert Shield); GI.4 (virus Cruise Ship/Chiba); GI.5 (318/Musgrove); y GI.6 (Hesse). Dentro del genogrupo II, hay 9
 65 agrupamientos de GII (con el nombre de la cepa del virus prototipo): GII.1 (Hawaii); GII.2 (Snow
 Mountain/Melksham); GII.3 (Toronto); GII.4 (Bristol/Lordsdale); GII.5 (290/Hillingdon); GII.6 (269/Seacroft); GII.7

(273/Leeds); GII.8 (539/Ámsterdam); y GII.9 (378). Las cepas de norovirus circulantes se clasifican por comparación con cepas prototipo que pertenecen a estos agrupamientos genéticos. Las cepas circulantes más prevalentes pertenecen al genogrupo II.

5 Se conocen secuencias de ácidos nucleicos y de proteínas de varias cepas aisladas de norovirus. Se enumeran secuencias representativas adicionales, no limitativas que incluyen secuencias de ORF1, ORF2, ORF3, y sus polipéptidos codificados de cepas aisladas de norovirus en la base de datos del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI). En un ejemplo de la divulgación, el norovirus puede ser un norovirus del genogrupo I o del genogrupo II. Las secuencias de aminoácidos compuestas y consenso pueden determinarse a partir de cualquiera de las cepas de norovirus conocidas. Véanse, por ejemplo, las entradas de GenBank: cepa de genogrupo 1 de norovirus Hu/NoV/West Chester/2001/USA, número de acceso a GenBank: AY502016; cepa de genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/Braddock Heights/1999/USA, número de acceso a GenBank: AY502015; cepa de genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/Fayette/1999/USA, número de acceso a GenBank: AY502014; cepa de genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/Fairfield/1999/USA, número de acceso a GenBank: AY502013; cepa de genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/Sandusky/1999/USA, número de acceso a GenBank: AY502012; cepa de genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/Canton/1999/USA, número de acceso a GenBank: AY502011; cepa de genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/Tiffin/1999/USA, número de acceso a GenBank: AY502010; cepa de genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/CS-E1/2002/USA, número de acceso a GenBank: AY50200; cepa de genogrupo 1 de norovirus Hu/NoV/Wisconsin/2001/USA, número de acceso a GenBank: AY502008; cepa de genogrupo 1 de norovirus Hu/NoV/CS-841/2001/USA, número de acceso a GenBank: AY502007; cepa de genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/Hiram/2000/USA, número de acceso a GenBank: AY502006; cepa de genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/Tontogany/1999/USA, número de acceso a GenBank: AY502005; virus Norwalk, genoma completo, número de acceso a GenBank: NC.sub.--001959; ARN genómico de norovirus Hu/GI/Otofuke/1979/JP, genoma completo, número de acceso a GenBank: AB187514; norovirus Hu/Hokkaido/133/2003/JP, número de acceso a GenBank: AB212306; norovirus Sydney 2212, número de acceso a GenBank: AY588132; cepa SN2000JA del virus Norwalk, número de acceso a GenBank: AB190457; genoma completo del virus Lordsdale, número de acceso a GenBank: X86557; ARN genómico de virus similar a Norwalk, Gifu'96, número de acceso a GenBank: AB045603; cepa Vietnam 026 del virus Norwalk, genoma completo, número de acceso a GenBank: AF504671; norovirus Hu/GII.4/2004/NL, número de acceso a GenBank: AY883096; norovirus Hu/GII/Hokushin/03/JP, número de acceso a GenBank: AB195227; norovirus Hu/GII/Kamo/03/JP, número de acceso a GenBank: AB 195228; norovirus Hu/GII/Sinsiro/97/JP, número de acceso a GenBank: AB195226; norovirus Hu/GII/Ina/02/JP, número de acceso a GenBank: AB195225; norovirus Hu/NLV/GII/Neustrelitz260/2000/DE, número de acceso a GenBank: AY772730; norovirus Hu/NLV/Dresden174/pUS-NorII/1997/GE, número de acceso a GenBank: AY741811; norovirus Hu/NLV/Oxford/B2S16/2002/UK, número de acceso a GenBank: AY587989; norovirus Hu/NLV/Oxford/B4S7/2002/UK, número de acceso a GenBank: AY587987; norovirus Hu/NLV/Witney/B7S2/2003/UK, número de acceso a GenBank: AY588030; norovirus Hu/NLV/Banbury/B9S23/2003/UK, número de acceso a GenBank: AY588029; norovirus Hu/NLV/ChippingNorton/2003/UK, número de acceso a GenBank: AY588028; norovirus Hu/NLV/Didcot/B9S2/2003/UK, número de acceso a GenBank: AY588027; norovirus Hu/NLV/Oxford/B8S5/2002/UK, número de acceso a GenBank: AY588026; norovirus Hu/NLV/Oxford/B6S4/2003/UK, número de acceso a GenBank: AY588025; norovirus Hu/NLV/Oxford/B6S5/2003/UK, número de acceso a GenBank: AY588024; norovirus Hu/NLV/Oxford/B5S23/2003/UK, número de acceso a GenBank: AY588023; norovirus Hu/NLV/Oxford/B6S2/2003/UK, número de acceso a GenBank: AY588022; norovirus Hu/NLV/Oxford/B6S6/2003/UK, número de acceso a GenBank: AY588021; cepa aislada de virus similar a Norwalk Bo/Thirsk10/00/UK, número de acceso a GenBank: AY126468; cepa aislada de virus similar a Norwalk Bo/Penrith55/00/UK, número de acceso a GenBank: AY126476; cepa aislada de virus similar a Norwalk Bo/Aberystwyth24/00/UK, número de acceso a GenBank: AY126475; cepa aislada de virus similar a Norwalk Bo/Dumfries/94/UK, número de acceso a GenBank: AY126474; norovirus NLV/IF2036/2003/Iraq, número de acceso a GenBank: AY675555; norovirus NLV/IF1998/2003/Iraq, número de acceso a GenBank: AY675554; norovirus NLV/BUDS/2002/USA, número de acceso a GenBank: AY660568; norovirus NLV/Paris Island/2003/USA, número de acceso a GenBank: AY652979; virus Snow Mountain, genoma completo, número de acceso a GenBank: AY134748; virus similar a Norwalk NLV/Fort Lauderdale/560/1998/US, número de acceso a GenBank: AF414426; Hu/norovirus/Hiroshima/1999/JP(9912-02F), número de acceso a GenBank: AB044366; cepa 11MSU-MW de virus similar a Norwalk, número de acceso a GenBank: AY274820; cepa B-1SVD de virus similar a Norwalk, número de acceso a GenBank: AY274819; cepa de genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/Farmington Hills/2002/USA, número de acceso a GenBank: AY502023; cepa de genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/CS-G4/2002/USA, número de acceso a GenBank: AY502022; cepa de genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/CS-G2/2002/USA, número de acceso a GenBank: AY502021; cepa de genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/CSG12002/USA, número de acceso a GenBank: AY502020; cepa de genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/Anchorage/2002/USA, número de acceso a GenBank: AY502019; cepa de genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/CS-D1/2002/CAN, número de acceso a GenBank: AY502018; cepa de genogrupo 2 de norovirus Hu/NoV/Germanton/2002/USA, número de acceso a GenBank: AY502017; calicivirus humano NLV/GII/Langen1061/2002/DE, genoma completo, número de acceso a GenBank: AY485642; poliproteína de norovirus murino 1, número de acceso a GenBank: AY228235; virus Norwalk, número de acceso a GenBank: AB067536; calicivirus humano NLV/Mex7076/1999, número de acceso a GenBank: AF542090; calicivirus humano NLV/Oberhausen 455/01/DE, número de acceso a GenBank: AF539440; calicivirus humano NLV/Herzberg 385/01/DE, número de acceso a GenBank: AF539439; calicivirus humano NLV/Boxer/2001/US, número de acceso a GenBank: AF538679; ARN genómico de virus similar a Norwalk, genoma completo, número de acceso a GenBank:

AB081723; ARN genómico de virus similar a Norwalk, genoma completo, cepa aislada: Saitama U201, número de acceso a GenBank: AB039782; ARN genómico de virus similar a Norwalk, genoma completo, cepa aislada: Saitama U18, número de acceso a GenBank: AB039781; ARN genómico de virus similar a Norwalk, genoma completo, cepa aislada: Saitama U25, número de acceso a GenBank: AB039780; cepa de virus Norwalk: U25GII, número de acceso a GenBank: AB067543; cepa de virus Norwalk: U201 GII, número de acceso a GenBank: AB067542; cepa de virus similares a Norwalk 416/97003156/1996/LA, número de acceso a GenBank: AF080559; cepa de virus similares a Norwalk 408/97003012/1996/FL, número de acceso a GenBank: AF080558; virus similar a Norwalk NLV/Burwash Landing/331/1995/US, número de acceso a GenBank: AF414425; virus similar a Norwalk NLV/Miami Beach/326/1995/US, número de acceso a GenBank: AF414424; virus similar a Norwalk NLV/White River/290/1994/US, número de acceso a GenBank: AF414423; virus similar a Norwalk NLV/New Orleans/306/1994/US, número de acceso a GenBank: AF414422; virus similar a Norwalk NLV/Port Canaveral/301/1994/US, número de acceso a GenBank: AF414421; virus similar a Norwalk NLV/Honolulu/314/1994/US, número de acceso a GenBank: AF414420; virus similar a Norwalk NLV/Richmond/283/1994/US, número de acceso a GenBank: AF414419; virus similar a Norwalk NLV/Westover/302/1994/US, número de acceso a GenBank: AF414418; virus similar a Norwalk NLV/UK3-17/12700/1992/GB, número de acceso a GenBank: AF414417; virus similar a Norwalk NLV/Miami/81/1986/US, número de acceso a GenBank: AF414416; cepa Snow Mountain, número de acceso a GenBank: U70059; virus Desert Shield DSV395, número de acceso a GenBank: U04469; virus Norwalk, genoma completo, número de acceso a GenBank: AF093797; calicivirus Hawaii, número de acceso a GenBank: U07611; virus Southampton, número de acceso a GenBank: L07418; virus Norwalk (SRSV-KY-89/89/J), número de acceso a GenBank: L23828; virus Norwalk (SRSV-SMA/76/US), número de acceso a GenBank: L23831; virus Camberwell, número de acceso a GenBank: U46500; cepa Melksham de calicivirus humano, número de acceso a GenBank: X81879; cepa MX de calicivirus humano, número de acceso a GenBank: U22498; TV24 de Minirreovirus, número de acceso a GenBank: U02030; y virus similar a Norwalk NLV/Gwynedd/273/1994/US, número de acceso a GenBank: AF414409. Se divulgan secuencias de norovirus adicionales en las siguientes publicaciones de patente: documentos WO 2005/030806, WO 2000/79280, JP2002020399, US2003129588, patente estadounidense n.º 6.572.862, documentos WO 1994/05700 y WO 05/032457. Véanse 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 comparaciones de secuencias y un análisis sobre la diversidad genética y el análisis filogenético de los norovirus.

Se conocen también secuencias de ácidos nucleicos y de proteínas para varias cepas aisladas de sapovirus. Se enumeran secuencias representativas de sapovirus, que incluyen secuencias de ORF1 y ORF2, y sus polipéptidos codificados a partir de cepas aisladas de sapovirus en la base de datos del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI). Véanse, por ejemplo, las entradas de GenBank: sapovirus Mc10, número de acceso a GenBank: NC.sub.--010624; virus Sapporo, número de acceso a GenBank: U65427; sapovirus Mc10, número de acceso a GenBank: AY237420; sapovirus SaKaeo-15/Thailand, número de acceso a GenBank: AY646855; virus Sapporo, número de acceso a GenBank: NC.sub.--006269; C12 de sapovirus, número de acceso a GenBank: NC.sub.--006554; C12 de sapovirus, número de acceso a GenBank: AY603425; sapovirus Hu/Dresden/pJG-Sap01/DE, número de acceso a GenBank: AY694184; calicivirus humano SLV/cruise ship/2000/USA, número de acceso a GenBank: AY289804; calicivirus humano SLV/Arg39, número de acceso a GenBank: AY289803; cepa LL14 de calicivirus entérico porcino, número de acceso a GenBank: AY425671; calicivirus entérico porcino, número de acceso a GenBank: NC.sub.--000940; cepa Mc37 de calicivirus humano, número de acceso a GenBank: AY237415; cepa Canadá 151A de calicivirus entérico de visón, número de acceso a GenBank: AY144337; calicivirus humano SLV/Hou7-1181, número de acceso a GenBank: AF435814; calicivirus humano SLV/Mex14917/2000, número de acceso a GenBank: AF435813; calicivirus humano SLV/Mex340/1990, número de acceso a GenBank: AF435812; calicivirus entérico porcino, número de acceso a GenBank: AF182760; virus Sapporo-London/29845, número de acceso a GenBank: U95645; virus Sapporo-Manchester, número de acceso a GenBank: X86560; virus Sapporo-Houston/86, número de acceso a GenBank: U95643; virus Sapporo-Houston/90, número de acceso a GenBank: U95644; y cepa HuCV/Potsdam/2000/DEU de calicivirus humano, número de acceso a GenBank: AF294739. Véanse también Schuffenecker *et al.* (2001) *Arch Virol.*, vol. 146(11):2115-2132; Zintz *et al.* (2005) *Infect. Genet. Evol.*, vol. 5:281-290; Farkas *et al.* (2004) *Arch. Virol.*, vol. 149:1309-1323; para comparaciones de secuencias y un análisis sobre la diversidad genética y el análisis filogenético de los norovirus.

Las secuencias de aminoácidos compuestas y consenso pueden derivar de las secuencias de la cápside de al menos dos cepas de norovirus del genogrupo I o del genogrupo II. En una realización, la VLP comprende un polipéptido que tiene una secuencia compuesta derivada de una secuencia consenso de las proteínas de la cápside de dos o más cepas de norovirus del genogrupo II, genotipo 4. Los ejemplos no limitativos de cepas de norovirus del genogrupo II, genotipo 4 incluyen cepa Houston, cepa Minerva, cepa Laurens, cepa Bristol, cepa Lordsdale, cepa Farmington Hills, cepa Hunter, cepa Carlow y las cepas US95/96-US, 2006a y 2006b.

En otra realización, la partícula similitvica se compone de al menos un polipéptido compuesto en la que la secuencia del polipéptido compuesto deriva de las secuencias de VP1 de Houston, Minerva y Laurens. En otra realización, la secuencia compuesta es SEQ ID NO: 1. En todavía otra realización, las secuencias compuestas

basadas en Houston, Minerva y Laurens pueden derivar de la secuencia consenso definida por SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, la secuencia consenso puede determinarse a partir de cepas de norovirus de al menos dos genotipos diferentes o al menos dos genogrupos diferentes. En un ejemplo, la partícula similivírica se compone de al menos un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos compuesta, en la que la secuencia de aminoácidos compuesta deriva de una secuencia consenso de proteínas de la cápside de cepas de norovirus de al menos dos genotipos diferentes dentro de un genogrupo. A modo de ejemplo, la secuencia consenso puede derivar de las secuencias de la cápside de cepas de norovirus del genogrupo II, genotipo 2 y del genogrupo II, genotipo 4. En otra realización, la secuencia consenso puede derivar de las secuencias de la cápside de tres o más genotipos dentro de un genogrupo.

En otros ejemplos, la secuencia consenso puede determinarse a partir de cepas de norovirus de al menos dos genogrupos diferentes. Una realización tal, entre otras, sería una VLP que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos compuesta, en la que dicha secuencia de aminoácidos compuesta deriva de una secuencia consenso de proteínas de la cápside de cepas de norovirus del genogrupo I, genotipo 1 y del genogrupo II, genotipo 4.

La presente divulgación también proporciona una partícula similivírica (VLP) que comprende un polipéptido compuesto derivado de una secuencia consenso de proteínas de la cápside de dos o más cepas circulantes de norovirus y una proteína de la cápside de un segundo norovirus. El segundo norovirus puede ser un norovirus del genogrupo I o del genogrupo II. La proteína de la cápside del segundo norovirus puede ser la proteína principal de la cápside, VP1, que está codificada por ORF 2, o la proteína secundaria de la cápside, VP2, que está codificada por ORF 3, o combinaciones de VP1 y VP2. En una realización, la proteína de la cápside del segundo norovirus es una proteína VP1 de un norovirus del genogrupo I.

En otro ejemplo, se proporciona una VLP que comprende un polipéptido compuesto derivado de una secuencia consenso que representa las proteínas de la cápside de dos o más cepas circulantes de calicivirus y un segundo polipéptido que tiene una segunda secuencia de aminoácidos compuesta, en la que dicha segunda secuencia de aminoácidos compuesta deriva de una secuencia consenso que representa las proteínas de la cápside de dos o más cepas circulantes de un segundo calicivirus. Preferiblemente, la partícula similivírica tiene propiedades antigénicas de las dos o más cepas circulantes del primer calicivirus y de las dos o más cepas circulantes del segundo calicivirus.

El segundo polipéptido contiene al menos un aminoácido diferente, al menos tres diferentes, al menos cinco diferentes, al menos diez diferentes, al menos quince diferentes, al menos veinte diferentes, al menos veinticinco diferentes, al menos treinta diferentes, al menos treinta y cinco diferentes, al menos cuarenta diferentes, al menos cuarenta y cinco diferentes o al menos cincuenta diferentes en comparación con cada una de las secuencias de la cápside de dichas dos o más cepas circulantes del segundo calicivirus. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido forma una partícula similivírica cuando se expresa en una célula huésped. En otra realización, el segundo calicivirus es un norovirus. En otra realización, el norovirus es un norovirus del genogrupo I. El norovirus del genogrupo I puede ser cualquiera de las cepas del genogrupo I divulgadas en el presente documento. En una realización, el norovirus del genogrupo I se selecciona del grupo que consiste en el virus Norwalk, el virus Southampton, el virus Hesse y el virus Chiba.

La presente divulgación también comprende polipéptidos aislados o fragmentos de los mismos que tienen las secuencias de aminoácidos compuestas definidas en el presente documento, así como los ácidos nucleicos o los vectores que codifican los mismos. En una realización, el polipéptido aislado o fragmento del mismo tiene una secuencia de aminoácidos compuesta, en la que dicha secuencia de aminoácidos compuesta deriva de una secuencia consenso que representa las proteínas de la cápside de dos o más cepas circulantes de un virus sin envoltura, y en el que el polipéptido contiene al menos 1 aminoácido diferente en comparación con cada una de las secuencias de la cápside de dichas dos o más cepas circulantes. En otra realización, la secuencia compuesta contiene al menos 3 aminoácidos diferentes en comparación con la secuencia de la cápside de una o más cepas circulantes del virus sin envoltura. En otra realización, la secuencia compuesta contiene 5-50 aminoácidos diferentes en comparación con la secuencia de la cápside de una o más cepas circulantes del virus sin envoltura. En todavía otra realización, la secuencia consenso es SEQ ID NO: 2.

El polipéptido compuesto puede tener una secuencia derivada de dos o más cepas circulantes de cualquier virus sin envoltura divulgado en el presente documento. En una realización, el virus sin envoltura es un calicivirus. En otra realización, el calicivirus es un norovirus o sapovirus. En otra realización, el norovirus es un norovirus del genogrupo I o del genogrupo II, o combinaciones de los mismos. En aún otra realización, el polipéptido aislado tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

La presente divulgación proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos compuesta, en la que dicha secuencia de aminoácidos compuesta deriva de una secuencia consenso que representa las proteínas de la cápside de dos o más cepas circulantes de un virus sin envoltura, y en el que el polipéptido contiene al menos 1 aminoácido diferente en comparación con cada una de las secuencias de la cápside

de dichas dos o más cepas circulantes. En otra realización, el ácido nucleico tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3. En otra realización, se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido compuesto. En aún otra realización, se proporciona una célula huésped que comprende un vector que codifica un polipéptido compuesto.

5 Las moléculas antigénicas de la presente invención (por ejemplo, VLP, polipéptidos y fragmentos de los mismos) pueden prepararse mediante aislamiento y purificación a partir de los organismos en los que se producen de manera natural, o pueden prepararse mediante técnicas recombinantes. Una vez que se han aislado o sintetizado las secuencias codificantes para los polipéptidos formadores de partículas deseados, pueden clonarse en cualquier vector o replicón adecuado para su expresión. Los expertos en la técnica conocen numerosos vectores de clonación, y la selección de un vector de clonación apropiado está dentro de los conocimientos de un experto habitual. El vector se usa entonces para transformar una célula huésped apropiada. Los sistemas de expresión recombinante adecuados incluyen, pero no se limitan a, sistemas de expresión bacterianos (por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus*), de baculovirus/insectos, del virus de la viruela vacunoide, del virus del bosque de Semliki (VBS), de Alfavirus (tales como, Sindbis, encefalitis equina venezolana (EEV)), de mamíferos (por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células HEK-293, células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido (BHK), mieloma de ratón (SB20) y células de riñón de mono (COS)), de levaduras (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Pichia pastoris* y otros sistemas de expresión de *Pichia*), vegetales y de *Xenopus*, así como otros conocidos en la técnica. Los sistemas de expresión particularmente preferidos son líneas celulares de mamíferos, bacterias, células de insectos y sistemas de expresión de levaduras.

25 Cada uno de los antígenos anteriormente mencionados (por ejemplo, VLP, polipéptidos, o fragmentos de los mismos) se usa preferiblemente en estado sustancialmente puro. Dependiendo del sistema de expresión y del huésped seleccionados, las VLP se producen haciendo crecer células huésped transformadas mediante un vector de expresión en condiciones mediante las cuales se expresa el polipéptido formador de partículas y pueden formarse VLP. La selección de las condiciones de crecimiento apropiadas está dentro de los conocimientos de la técnica.

30 Preferiblemente, los antígenos de VLP se preparan a partir de células de insectos tales como Sf9, High Five, TniPro, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*. Los procedimientos para producir VLP en cultivo de células de insectos se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.942.865). En resumen, los baculovirus recombinantes que portan la secuencia de la cápside compuesta se construyen a partir de los ADNc sintéticos. Los baculovirus recombinantes se usan entonces para infectar cultivos de células de insectos (por ejemplo, células Sf9, High Five y TniPro) y pueden aislarse VLP compuestas a partir del cultivo celular. Una "VLP compuesta" es una VLP que comprende al menos un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos compuesta derivada de una secuencia consenso que representa las proteínas de la cápside de dos o más cepas circulantes de un virus sin envoltura.

40 Si las VLP se forman de manera intracelular, las células se perturban luego, usando medios físicos, químicos o mecánicos, que lisan las células aunque manteniendo las VLP sustancialmente intactas. Tales métodos se conocen por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Protein Purification Applications: A Practical Approach, (E. L. V. Harris y S. Angal, eds., 1990).

45 Se aíslan entonces (o se purifican sustancialmente) las partículas usando métodos que preservan la integridad de las mismas, tales como, mediante centrifugación en gradiente de densidad, por ejemplo, gradientes de sacarosa, precipitación con PEG, sedimentación y similares (véase, por ejemplo, Kirnbauer *et al.* J. Virol. (1993) 67:6929-6936), así como mediante técnicas de purificación convencionales incluyendo, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico y de filtración en gel.

50 Los textos generales que describen técnicas de biología molecular, que son aplicables a la presente invención, tales como clonación, mutación y similares, incluyen Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, volumen 152, Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger); Sambrook *et al.*, Molecular Cloning—A Laboratory Manual (3.ª ed.), vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 2000 ("Sambrook") y Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., ("Ausubel"). Estos textos describen mutagénesis, el uso de vectores, promotores y muchos otros temas relevantes relacionados con, por ejemplo, la clonación y expresión de proteínas de la cápside de virus sin envoltura, tales como calicivirus.

60 En algunas realizaciones, las moléculas antigénicas (por ejemplo, VLP, polipéptidos y fragmentos de los mismos) se producen *in vivo* mediante la administración de un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido compuesto. Los vectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, vectores víricos, tales como vector del virus de la estomatitis vesicular (VEV), vector de virus de la encefalitis equina (VEE), vector de poxvirus, vector de adenovirus, virus adenoasociado (AAV), vector retrovírico y plásmidos de expresión, tales como pFastBac1, pWINEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG, pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL. Otros vectores adecuados serán fácilmente evidentes para el experto en la técnica.

65

La presente divulgación también abarca una formulación de vacuna que comprende las VLP, los polipéptidos, o ácidos nucleicos descritos en el presente documento. En una realización, la formulación de vacuna comprende una VLP compuesta y una segunda partícula similitvrica, en la que dicha segunda partícula similitvrica comprende una proteína de la cápside de un norovirus. La segunda VLP puede comprender una proteína de la cápside nativa de un norovirus del genogrupo I o del genogrupo II. La segunda VLP puede comprender una proteína de la cápside de norovirus de longitud completa tal como proteína VP1 y/o VP2 o ciertos derivados de VP1 o VP2. Alternativamente, la segunda VLP comprende una proteína de la cápside troncada, tal como una proteína VP1 troncada. El truncamiento puede ser un truncamiento N-terminal o C-terminal. Las proteínas de la cápside troncadas son derivados de proteínas de la cápside funcionales adecuadamente. Los derivados de proteínas de la cápside pueden producir una respuesta inmunitaria del mismo modo que se produce la respuesta inmunitaria por una VLP que consiste en la proteína de la cápside de longitud completa. Se describen formulaciones de vacuna que comprenden mezclas de VLP en el documento WO 2008/042789. Simplemente a modo de ejemplo, la formulación de vacuna puede contener VLP de una o más cepas del genogrupo I de norovirus junto con VLP que comprenden una proteína compuesta de una o más cepas del genogrupo II de norovirus. Preferiblemente, la mezcla de VLP de norovirus se compone de las cepas de Norwalk y de norovirus del genogrupo II, genotipo 4. En otra realización, la formulación de vacuna comprende una VLP compuesta y una VLP de Norwalk, en la que la VLP compuesta comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En todavía otra realización, la formulación de vacuna comprende una primera VLP compuesta y una segunda VLP compuesta, en la que dichas VLP compuestas primera y segunda comprenden al menos un polipéptido derivado de diferentes secuencias consenso. Por ejemplo, una primera VLP compuesta comprende una proteína compuesta de una o más cepas del genogrupo I de norovirus y una segunda VLP compuesta comprende una proteína compuesta de una o más cepas del genogrupo II de norovirus. En una realización, la primera VLP compuesta comprende una proteína compuesta de una o más cepas del genogrupo I, genotipo 1 (GI.1) de norovirus y una segunda VLP compuesta comprende una proteína compuesta de una o más cepas del genogrupo II, genotipo 4 (GII.4) de norovirus.

En algunas realizaciones, la formulación de vacuna comprende además un adyuvante. La mayor parte de los adyuvantes contienen una sustancia diseñada para proteger el antígeno frente al catabolismo rápido, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral, y un estimulador de respuestas inmunitarias, tal como proteínas derivadas de *Bordetella pertussis* o *Mycobacterium tuberculosis*. Los adyuvantes adecuados están disponibles comercialmente como, por ejemplo, adyuvante incompleto de Freund y adyuvante completo de Freund (Pifco Laboratories, Detroit, Mich.); adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.); sales minerales, incluyendo sales de aluminio tales como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio y sales de calcio, hierro o zinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados; polisacáridos derivatizados catiónica o aniónicamente; polifosfacenos; microsferas biodegradables; y Quil A.

Los adyuvantes adecuados también incluyen, pero no se limitan a, agonistas de receptores de tipo Toll (TLR), monofosforil lípido A (MPL), lípido A sintético, miméticos o análogos de lípido A, sales de aluminio, citocinas, saponinas, derivados de muramil dipéptido (MDP), oligonucleótidos CpG, lipopolisacárido (LPS) de bacterias gramnegativas, polifosfacenos, emulsiones, virosomas, cocleatos, micropartículas de poli(ácido láctico-co-glicólido) (PLG), partículas de poloxámeros, micropartículas, liposomas, emulsión de aceite en agua, MF59 y escualeno. En algunas realizaciones, los adyuvantes son exotoxinas derivadas de bacterias. En otras realizaciones, pueden usarse adyuvantes que estimulan una respuesta de tipo Th1, tales como 3DMPL o QS21. En determinadas realizaciones, el adyuvante es una combinación de MPL e hidróxido de aluminio.

En algunas realizaciones, el adyuvante es monofosforil lípido A (MPL). MPL es un derivado no tóxico del lípido A de Salmonella, es un potente agonista de TLR-4 que se ha desarrollado como adyuvante de vacuna (Evans *et al.* (2003) Expert Rev Vaccines, vol. 2: 219-229). En estudios murinos preclínicos, se ha mostrado que MPL por vía intranasal potencia las respuestas secretoras, así como humorales, sistémicas (Baldrige *et al.* (2000) Vaccine, vol. 18: 2416-2425; Yang *et al.* (2002) Infect Immun., vol. 70: 3557-3565). También se ha demostrado que es seguro y eficaz como adyuvante de vacuna en estudios clínicos de más de 120.000 pacientes (Baldrick *et al.* (2002) Regul Toxicol Pharmacol, vol. 35: 398-413). MPL estimula la inducción de inmunidad innata a través del receptor TLR-4 y, por tanto, puede producir respuestas inmunitarias no específicas frente a una amplia gama de patógenos infecciosos, incluyendo bacterias tanto gramnegativas como grampositivas, virus y parásitos (Persing *et al.* (2002) Trends Microbiol, vol. 10: S32-37). La inclusión de MPL en formulaciones intranasales debe proporcionar una inducción rápida de respuestas innatas, produciendo respuestas inmunitarias no específicas frente a la exposición vírica mientras que potencia las respuestas específicas generadas por los componentes antigénicos de la vacuna. En algunas realizaciones, MPL puede combinarse con uno o más adyuvantes adicionales. Por ejemplo, MPL puede combinarse con hidróxido de aluminio para crear un adyuvante adecuado para la administración intramuscular de una formulación de vacuna.

En otras realizaciones, el adyuvante es un aceite que se produce de manera natural, tal como escualeno. El escualeno es un aceite hidrocarbonado triterpenoide (C₃₀H₅₀) producido por plantas y está presente en muchos alimentos. El escualeno lo producen también abundantemente los seres humanos, para los que sirve como precursor del colesterol y hormonas esteroideas. Se sintetiza en el hígado y en la piel, se transporta en la sangre por lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y por lipoproteínas de baja densidad (LDL), y se secreta en grandes cantidades por las glándulas sebáceas.

Dado que es un componente natural del cuerpo humano y es biodegradable, se ha usado el escualeno como componente de adyuvantes de vacuna. Uno de estos adyuvantes de escualeno es MF59, una emulsión de aceite en agua desarrollada por Chiron. Se ha mostrado en diversos estudios preclínicos y clínicos que MF59 potencia significativamente la respuesta inmunitaria frente a una amplia variedad de antígenos de vacuna. MF59 forma parte de una vacuna de subunidades antigripal, que se ha autorizado en diversos países europeos desde 1997. Se han administrado más de 20 millones de dosis de esta vacuna, y ha mostrado tener un perfil de seguridad excelente. La seguridad de las vacunas con el adyuvante MF59 también se ha mostrado mediante diversos estudios clínicos de investigación que usan antígenos recombinantes del virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, citomegalovirus, virus del herpes simple, virus de la inmunodeficiencia humana, *Escherichia coli* uropatógena, etc., en diversos grupos de edad, incluyendo recién nacidos de 1 a 3 días de edad.

El término “cantidad de adyuvante eficaz” o “cantidad eficaz de adyuvante” se entenderá bien por los expertos en la técnica, e incluye una cantidad de uno o más adyuvantes que puede estimular la respuesta inmunitaria frente a un antígeno administrado, es decir, una cantidad que aumenta la respuesta inmunitaria de una composición antigénica administrada, tal como se mide en cuanto a los niveles de IgA en los lavados nasales, niveles de IgG o IgM sérica, o de proliferación de células B y T. Los aumentos eficaces de manera adecuada de los niveles de inmunoglobulina incluyen en más del 5%, preferiblemente en más del 25% y en particular en más del 50%, en comparación con la misma composición antigénica sin ningún adyuvante.

En otra realización, la formulación de vacuna puede comprender además un agente de administración, que funciona potenciando la captación de antígenos basándose en, pero no restringido a, aumento de la viscosidad fluida debido al efecto individual o combinado de deshidratación parcial de mucopolisacáridos del huésped, las propiedades físicas del agente de administración, o por interacciones iónicas entre el agente de administración y los tejidos del huésped en el sitio de exposición, lo que proporciona un efecto prolongado. Alternativamente, el agente de administración puede aumentar el tiempo de retención de antígeno en el sitio de administración (por ejemplo, retardar la expulsión del antígeno). Un agente de administración de este tipo puede ser un agente bioadhesivo. En algunas realizaciones, el agente bioadhesivo puede ser un agente mucoadhesivo seleccionado del grupo que consiste en glucosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, condroitina, sulfato de queratano, heparina, sulfato de heparano, hialuronano), polímeros de hidratos de carbono (por ejemplo, pectina, alginato, glucógeno, amilasa, amilopectina, celulosa, quitina, estaquiosa, inulina, dextrina, dextrano), derivados reticulados de poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polisacáridos (incluyendo mucina, otros mucopolisacáridos y GelSite[®], un polisacárido ácido natural extraído de la planta de aloe), poliiones, derivados de celulosa (por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa), proteínas (por ejemplo, lectinas, proteínas de la fimbria) y ácido desoxirribonucleico. En una realización, las formulaciones de vacuna comprenden un polisacárido tal como quitosano, sal de quitosano, base de quitosano, o un polisacárido natural (por ejemplo, GelSite[®]).

El quitosano, un polisacárido lineal cargado positivamente derivado de quitina en las conchas de los crustáceos, es un bioadhesivo para células epiteliales y su capa de mucosidad subyacente. La formulación de antígenos con quitosano aumenta su tiempo de contacto con la membrana nasal, aumentando por tanto la captación en virtud de un efecto prolongado (Illum *et al.* (2001) *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 51: 81-96; Illum *et al.* (2003) *J Control Release*, vol. 87: 187-198; Davis *et al.* (1999) *Pharm Sci Technol Today*, vol. 2: 450-456; Bacon *et al.* (2000) *Infect Immun.*, vol. 68: 5764-5770; van der Lubben *et al.* (2001) *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 52: 139-144; van der Lubben *et al.* (2001) *Eur J Pharm Sci*, vol. 14: 201-207; Lim *et al.* (2001) *AAPS Pharm Sci Tech*, vol. 2: 20). El quitosano se ha sometido a prueba como sistema de administración nasal para varias vacunas, incluyendo vacunas antigripal, tosferina y difteria, tanto en modelos humanos como animales (Illum *et al.* (2001) *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 51: 81-96; Illum *et al.* (2003) *J Control Release*, vol. 87: 187-198; Bacon *et al.* (2000) *Infect Immun.*, vol. 68: 5764-5770; Jabbal-Gill *et al.* (1998) *Vaccine*, vol. 16: 2039-2046; Mills *et al.* (2003) *A Infect Immun*, vol. 71: 726-732; McNeela *et al.* (2004) *Vaccine*, vol. 22: 909-914). En estos ensayos, se mostró que el quitosano potenciaba las respuestas inmunitarias sistémicas hasta niveles equivalentes a la vacunación parental. Además, también se midieron niveles de IgA específica de antígeno significativos en secreciones mucosas. Por tanto, el quitosano puede potenciar grandemente la eficacia de una vacuna nasal. Además, debido a sus características físicas, el quitosano está particularmente bien adaptado para vacunas intranasales formuladas como polvos (van der Lubben *et al.* (2001) *Eur J Pharm Sci*, vol. 14: 201-207; Mikszta *et al.* (2005) *J Infect Dis*, vol. 191: 278-288; Huang *et al.* (2004) *Vaccine*, vol. 23: 794-801).

En otra realización, la formulación de vacuna puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable, incluyendo cualquier diluyente o excipiente adecuado, incluye cualquier agente farmacéutico que no induce por sí mismo la producción de una respuesta inmunitaria dañina para el sujeto que recibe la formulación de vacuna, y que puede administrarse sin toxicidad indebida. Tal como se usa en el presente documento, el término “farmacéuticamente aceptable” significa que está aprobado por una agencia normativa del gobierno federal o de un gobierno estatal o enumerado en la Farmacopea de los EE.UU., en la Farmacopea Europea o en otra Farmacopea de reconocimiento general para su uso en mamíferos, y más particularmente en humanos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, tampón acuoso isotónico estéril, y combinaciones de los mismos. Se presenta un análisis exhaustivo de vehículos farmacéuticamente aceptables, diluyentes y otros excipientes en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co. N.J. edición actual). La formulación debe

adaptarse al modo de administración. En una realización preferida, la formulación es adecuada para su administración a seres humanos, preferiblemente la formulación es estéril, no particulada y apirógena. La formulación de vacuna, si se desea, también puede contener pequeñas cantidades de agentes humectantes o emulsionantes, o de agentes tamponantes del pH.

En algunas realizaciones, entre otras, las formulaciones de vacuna comprenden quitosano, una sal de quitosano o una base de quitosano. El peso molecular del quitosano puede estar entre 10 kDa y 800 kDa, preferiblemente entre 100 kDa y 700 kDa y más preferiblemente entre 200 kDa y 600 kDa. La concentración de quitosano en la composición será normalmente de hasta aproximadamente el 80% (p/p), por ejemplo, el 5%, el 10%, el 30%, el 50%, el 70% o el 80%. El quitosano es uno que está preferiblemente desacetilado al menos al 75%, por ejemplo, al 80-90%, más preferiblemente desacetilado al 82-88%, siendo ejemplos particulares desacetilación al 83%, al 84%, al 85%, al 86% y al 87%.

Las composiciones tal como se describen pueden formularse para su administración como vacunas o como formulaciones antigénicas. Tal como se usa en el presente documento, el término "vacuna" se refiere a una formulación que contiene VLP u otros antígenos tal como se describieron anteriormente, que están en una forma que pueda administrarse a un vertebrado y que induce una respuesta protectora suficiente como para inducir inmunidad para prevenir y/o mejorar una infección y/o para reducir al menos un síntoma de una infección y/o para potenciar la eficacia de otra dosis de VLP o antígeno. Tal como se usa en el presente documento, el término "formulación antigénica" o "composición antigénica" se refiere a una preparación que, cuando se administra a un vertebrado, por ejemplo, un mamífero, inducirá una respuesta inmunitaria. Tal como se usa en el presente documento, el término "respuesta inmunitaria" se refiere tanto a la respuesta inmunitaria humoral como a la respuesta inmunitaria mediada por células. La respuesta inmunitaria 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 células huésped frente a la infección y destrucción. La respuesta inmunitaria mediada por células se refiere a una respuesta inmunitaria que está mediada por linfocitos T y/u otras células, tales como macrófagos, frente a un agente infeccioso, presentada por un vertebrado (por ejemplo, un humano), que previene o mejora la infección o reduce al menos un síntoma de la misma. En particular, "inmunidad protectora" o "respuesta inmunitaria protectora" se refiere a inmunidad o a producir una respuesta inmunitaria frente a un agente infeccioso, que se presenta por un vertebrado (por ejemplo, un humano), que previene o mejora una infección o reduce al menos un síntoma de la misma. Específicamente, la inducción de una respuesta inmunitaria protectora a partir de la administración de la vacuna resulta evidente por la eliminación o reducción de la presencia de uno o más síntomas de gastroenteritis o de una reducción de la duración o intensidad de tales síntomas. Los síntomas clínicos de gastroenteritis por norovirus incluyen náusea, diarrea, heces sueltas, vómitos, fiebre y malestar general. Una respuesta inmunitaria protectora que reduce o elimina los síntomas de enfermedad reducirá o detendrá la propagación de un brote epidémico de norovirus en una población. La preparación de vacunas se describe en general en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds. Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press Nueva York). Las composiciones de la presente invención pueden formularse, por ejemplo, para la administración a un sujeto por las vías de administración mucosa o parenteral (por ejemplo, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intradérmica, subdérmica o transdérmica). Tal administración mucosa podría ser, pero no se limita a, mediante administración gastrointestinal, intranasal, oral o vaginal. En una realización, la formulación de vacuna está en forma de una pulverización nasal, gotas nasales o polvo seco. En otra realización, la formulación de vacuna está en una forma adecuada para su administración intramuscular.

Las formulaciones de vacuna de la invención pueden ser formulaciones líquidas o formulaciones en polvo seco. Cuando la composición está destinada para su administración a la mucosa respiratoria (por ejemplo, nasal), normalmente se formula como una disolución acuosa para su administración como aerosol o como gotas nasales, o alternativamente, como polvo seco, por ejemplo, para la deposición rápida dentro de las fosas nasales. Las composiciones para su administración como gotas nasales pueden contener uno o más excipientes del tipo incluido habitualmente en tales composiciones, por ejemplo, conservantes, agentes de ajuste de la viscosidad, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes tamponantes, y similares. Los agentes de viscosidad pueden ser celulosa microcristalina, quitosano, almidones, polisacáridos, y similares. Las composiciones para su administración como polvo seco pueden contener también uno o más excipientes incluidos habitualmente en tales composiciones, por ejemplo, agentes mucoadhesivos, agentes de carga y agentes para suministrar características de flujo de polvo y tamaño apropiadas. Los agentes de carga y de flujo de polvo y de tamaño pueden incluir manitol, sacarosa, trehalosa y xilitol.

En una realización, la formulación de vacuna contiene una o más VLP compuestas como inmunógeno, un coadyuvante tal como MPL[®], escualeno o MF59[®], un biopolímero tal como quitosano o GelSite[®] para promover adhesión a superficies mucosas y agentes de carga tales como manitol y sacarosa.

Por ejemplo, una vacuna puede formularse como 10 mg de un polvo seco que contiene una o más VPL compuestas tal como se analiza en el presente documento, tal como la VPL compuesta de GII.4, el adyuvante MPL[®], agente mucoadhesivo de quitosano, y manitol y sacarosa como agentes de carga y para proporcionar características de flujo apropiadas. La formulación puede comprender aproximadamente 7,0 mg (intervalo del 25 al 90% p/p) de

quitosano, aproximadamente 1,5 mg de manitol (intervalo del 0 al 50% p/p), aproximadamente 1,5 mg de sacarosa (intervalo del 0 al 50% p/p), aproximadamente 25 µg de MPL® (intervalo del 0,1 al 5% p/p) y aproximadamente 100 µg de antígeno de VLP compuesta (intervalo del 0,05 al 5% p/p).

5 Pueden estar presentes VLP compuestas/antígenos en una concentración de desde aproximadamente el 0,01% (p/p) hasta aproximadamente el 80% (p/p). En una realización, las VLP pueden formularse a dosificaciones de aproximadamente 5 µg, aproximadamente 15 µg, aproximadamente 25 µg, aproximadamente 50 µg, aproximadamente 100 µg, aproximadamente 200 µg, aproximadamente 500 µg y aproximadamente 1 µg por 10 mg de formulación en polvo seco (el 0,05, el 0,15, el 0,25, el 0,5, el 1,0, el 2,0, el 5,0 y el 10,0% p/p) para su administración en ambas narinas (10 mg por narina) o aproximadamente 10 µg, aproximadamente 30 µg, aproximadamente 50 µg, aproximadamente 100 µg, aproximadamente 200 µg, aproximadamente 400 µg, aproximadamente 1 mg y aproximadamente 2 mg (el 0,1, el 0,3, el 0,5, el 1,0, el 2,0, el 4,0, el 10,0 y el 20,0% p/p) por 20 mg de formulación en polvo seco para su administración dentro de una narina. La formulación puede administrarse en una o ambas narinas durante cada administración. Puede haber una administración de refuerzo de una a doce semanas después de la primera administración para mejorar la respuesta inmunitaria. El contenido de cada VLP/antígeno en las formulaciones de vacuna y antigénicas puede estar en el intervalo de 1 µg a 100 mg, preferiblemente en el intervalo de 1-1000 µg, más preferiblemente 5-500 µg, lo más normalmente en el intervalo de 10-200 µg. La VLP/antígeno total administrado en cada dosis puede ser o bien aproximadamente 10 µg, aproximadamente 30 µg, aproximadamente 200 µg, aproximadamente 250 µg, aproximadamente 400 µg, aproximadamente 500 µg o aproximadamente 1000 µg. La dosis de vacuna total puede administrarse dentro de una narina o puede dividirse a la mitad para la administración a ambas narinas. Las características del polvo seco son tales que menos del 10% de las partículas son de menos de 10 µm de diámetro. Los tamaños de partícula promedio oscilan entre 10 y 500 µm de diámetro.

25 En otra realización, la formulación en polvo seco puede estar en combinación con uno o más dispositivos para administrar una o más dosis de la formulación. Un dispositivo de este tipo puede ser un dispositivo de administración nasal. En otra realización, una o más dosis son dosis unitarias.

30 En algunas realizaciones, las formulaciones antigénicas y de vacuna son formulaciones líquidas para la posterior administración a un sujeto. Una formulación líquida deseada para su administración intranasal comprenderá VLP compuesta(s)/antígeno(s), adyuvante y un agente de administración tal como quitosano. Las formulaciones líquidas para su administración parenteral (por ejemplo, subcutánea, intradérmica o intramuscular (i.m.)) comprenderán VLP compuesta(s)/antígeno(s), adyuvante y un tampón, sin un agente de administración (por ejemplo, quitosano).

35 Preferiblemente, las formulaciones antigénicas y de vacuna descritas anteriormente en el presente documento se liofilizan y se almacenan en condiciones anhidras hasta que están listas para su uso, momento en el que se reconstituyen con diluyente. Alternativamente, pueden almacenarse diferentes componentes de la composición por separado en un kit (liofilizándose cualquiera de o todos los componentes). Los componentes pueden permanecer en forma liofilizada para formulación seca o reconstituirse para formulaciones líquidas y, o bien mezclarse antes de usarse o bien administrarse por separado al paciente. Para la administración de polvo seco, la formulación de vacuna o antigénica puede precargarse en un dispositivo de administración intranasal y almacenarse hasta su uso. Preferiblemente, tal dispositivo de administración intranasal protegerá y garantizará la estabilidad de su contenido.

45 La divulgación también proporciona composiciones que comprenden uno o más de las VLP, polipéptidos y/o ácidos nucleicos inmunogénicos, descritos en el presente documento. Los diferentes polipéptidos, incluyendo polipéptidos compuestos y polipéptidos de la cápside o fragmentos de los mismos pueden mezclarse conjuntamente en una formulación individual. Dentro de tales combinaciones, un antígeno de la composición inmunogénica puede estar presente en más de un polipéptido, o polipéptido de múltiples epítopos.

50 Las composiciones inmunogénicas pueden comprender una mezcla de polipéptidos compuestos y de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos compuestos, que pueden administrarse a su vez usando los mismos o diferentes vehículos. Los antígenos pueden administrarse individualmente o en combinación, por ejemplo, en composiciones inmunogénicas profilácticas (es decir, para prevenir una infección) o terapéuticas (para tratar una infección). La composición inmunogénica puede administrarse más de una vez (por ejemplo, una administración "de sensibilización" seguida por uno o más "refuerzos") para lograr los efectos deseados. La misma composición puede administrarse en una o más etapas de sensibilización y en una o más de refuerzo. Alternativamente, pueden usarse composiciones diferentes para la sensibilización y el refuerzo.

60 La presente divulgación también contempla un método de inducción de inmunidad protectora frente a una infección vírica en un sujeto que comprende administrar cualquiera de las formulaciones de vacuna descritas en el presente documento. En una realización, la infección vírica es una infección por norovirus. En otra realización, la formulación de vacuna confiere protección frente a uno o más síntomas de infección por norovirus.

65 La presente divulgación también proporciona un método para producir una VLP que comprende un polipéptido compuesto. En una realización, el método comprende alinear secuencias de aminoácidos de proteínas de la cápside

de dos o más cepas circulantes de un virus sin envoltura; determinar una secuencia consenso a partir de dichas secuencias de aminoácidos alineadas; preparar una secuencia compuesta basada en dicha secuencia consenso que contiene al menos un aminoácido diferente en comparación con cada una de las secuencias de la cápside de dichas dos o más cepas circulantes; y expresar dicha secuencia compuesta en una célula huésped, produciendo de ese modo una partícula similivírica. En otra realización, la secuencia compuesta contiene al menos tres aminoácidos diferentes en comparación con cada una de las secuencias de la cápside de dichas dos o más cepas circulantes. En otra realización, la secuencia compuesta contiene al menos cinco aminoácidos diferentes en comparación con cada una de las secuencias de la cápside de dichas dos o más cepas circulantes. En aún otra realización, la secuencia compuesta contiene al menos nueve aminoácidos diferentes en comparación con cada una de las secuencias de la cápside de dichas dos o más cepas circulantes. En algunas realizaciones, la secuencia consenso puede determinarse a partir de alinear secuencias de nucleótidos de proteínas de la cápside de dos o más cepas circulantes de un virus sin envoltura; y preparar una secuencia de nucleótidos compuesta basada en dicha secuencia consenso. Los ejemplos no limitativos de un virus sin envoltura adecuados para su uso en el método son calicivirus, picornavirus, astrovirus, adenovirus, reovirus, poliomavirus, papilomavirus, parvovirus y virus de la hepatitis E. En algunas realizaciones, el virus sin envoltura es un calicivirus. El calicivirus puede ser un norovirus o sapovirus. En otra realización, el norovirus es un norovirus del genogrupo I o del genogrupo II.

La invención se ilustrará en mayor detalle con referencia a las realizaciones específicas descritas en los siguientes ejemplos. Se pretende que los ejemplos sean meramente ilustrativos de la invención y no pretenden limitar su alcance en modo alguno.

Ejemplos

Ejemplo 1. Diseño de un gen consenso de GII.4 de norovirus

Se determinó una secuencia consenso de aminoácidos para la proteína principal de la cápside (VP1) de norovirus del genogrupo II, genotipo 4 (GII.4) por comparación de homología de dos cepas de GII.4 circulantes recientes, Minerva, AKA 2006-a; y Laurens, AKA 2006-b, con una cepa Houston de GII.4 obtenida en 2002. Se muestra a continuación la alineación de las tres cepas aisladas de GII.4 de norovirus diferentes. Se muestra la secuencia consenso (SEQ ID NO: 2) determinada a partir de la comparación de homología de tres cepas de GII.4 en la figura 1.

Se derivó una secuencia compuesta de la secuencia consenso seleccionando aminoácidos de la secuencia de Minerva en posiciones variables de la secuencia consenso en las que eran diferentes las tres cepas. Los aminoácidos elegidos estaban presentes en regiones antigénicas próximas a pero que no incluían el dominio de unión a hidratos de carbono propuesto. Se usó la secuencia de GII.4 compuesta para la producción de un gen sintético que codifica una proteína VP1 de norovirus de GII.4 compuesta (SEQ ID NO: 1). Se muestra la secuencia de aminoácidos de VP1 compuesta de GII.4 (GII.4 Comp) en la alineación a continuación como SEQ ID NO: 1 con las secuencias de aminoácidos de las proteínas VP1 de virus Houston, Laurens y Minerva (SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente). Se muestra la secuencia de ADN que codifica la VP1 compuesta de GII.4 (SEQ ID NO: 3) en la figura 2.

	Houston	MKMASSDASPSDGSTANLVPEVNNEVMALEPVVGAIAAPVAGQQNVIDPWIR	53
	Laurens	MKMASSDANPSDGSTANLVPEVNNEVMALEPVVGAIAAPVAGQQNVIDPWIR	53
	Minerva	MKMASSDANPSDGSTANLVPEVNNEVMALEPVVGAIAAPVAGQQNVIDPWIR	53
	GII.4 Comp	MKMASSDANPSDGSTANLVPEVNNEVMALEPVVGAIAAPVAGQQNVIDPWIR	53
	Houston	NNFVQAPGGFEFTVSPRNAPGEILWSAPLGPDLNPYLSHLARMYNGYAGGFVQ	106
	Laurens	NNFVQAPGGFEFTVSPRNAPGEILWSAPLGPDLNPYLSHLARMYNGYAGGFVQ	106
	Minerva	NNFVQAPGGFEFTVSPRNAPGEILWSAPLGPDLNPYLSHLARMYNGYAGGFVQ	106
	GII.4 Comp	NNFVQAPGGFEFTVSPRNAPGEILWSAPLGPDLNPYLSHLARMYNGYAGGFVQ	106
	Houston	VILAGNAFTAGKIIFAAVPPNFPTBGLSPSQVTMFPHIIVDVRQLEPVLIPLP	159
	Laurens	VILAGNAFTAGKIIFAAVPPNFPTBGLSPSQVTMFPHIIVDVRQLEPVLIPLP	159
	Minerva	VILAGNAFTAGKIIFAAVPPNFPTBGLSPSQVTMFPHIIVDVRQLEPVLIPLP	159
	GII.4 Comp	VILAGNAFTAGKIIFAAVPPNFPTBGLSPSQVTMFPHIIVDVRQLEPVLIPLP	159
	Houston	DVRNNFYHYNQSNDPSTIKLIAMLYTPLRANNAGDDVFTVSCRVLTRPSPDFDF	212
	Laurens	DVRNNFYHYNQSNDPSTIKLIAMLYTPLRANNAGDDVFTVSCRVLTRPSPDFDF	212
	Minerva	DVRNNFYHYNQSNDPSTIKLIAMLYTPLRANNAGDDVFTVSCRVLTRPSPDFDF	212
	GII.4 Comp	DVRNNFYHYNQSNDPSTIKLIAMLYTPLRANNAGDDVFTVSCRVLTRPSPDFDF	212
	Houston	IFLVPPTVESRTPKPFVPIILTVEMTNSRFPPIPLEKLFPGPSGAFVVPQNGR	265
	Laurens	IFLVPPTVESRTPKPFVPIILTVEMTNSRFPPIPLEKLFPGPSGAFVVPQNGR	265
	Minerva	IFLVPPTVESRTPKPFVPIILTVEMTNSRFPPIPLEKLFPGPSGAFVVPQNGR	265
	GII.4 Comp	IFLVPPTVESRTPKPFVPIILTVEMTNSRFPPIPLEKLFPGPSGAFVVPQNGR	265
	Houston	CTTDGVLGTTQLSPVNICTFRGDVTHIAGTQEVYTMNLASQNWNNYDPTEEIP	318
	Laurens	CTTDGVLGTTQLSPVNICTFRGDVTHIAGTQEVYTMNLASQNWNNYDPTEEIP	318
	Minerva	CTTDGVLGTTQLSPVNICTFRGDVTHIAGTQEVYTMNLASQNWNNYDPTEEIP	318
	GII.4 Comp	CTTDGVLGTTQLSPVNICTFRGDVTHIAGTQEVYTMNLASQNWNNYDPTEEIP	318
	Houston	APLGTPDFVGKIQGVLTQTTTRGDGSTRGHKATVSTGSHVFTPKLGSVQFSTDT	371
	Laurens	APLGTPDFVGKIQGVLTQTTTRGDGSTRGHKATVSTGSHVFTPKLGSVQFSTDT	371
	Minerva	APLGTPDFVGKIQGVLTQTTTRGDGSTRGHKATVSTGSHVFTPKLGSVQFSTDT	371
	GII.4 Comp	APLGTPDFVGKIQGVLTQTTTRGDGSTRGHKATVSTGSHVFTPKLGSVQFSTDT	371
	Houston	NNDFETGQNTKFTPVGVVQDGSSTHONEPQQWVLPYSGRSHNVHLAPAVAP	424
	Laurens	NNDFETGQNTKFTPVGVVQDGSSTHONEPQQWVLPYSGRSHNVHLAPAVAP	424
	Minerva	NNDFETGQNTKFTPVGVVQDGSSTHONEPQQWVLPYSGRSHNVHLAPAVAP	424
	GII.4 Comp	NNDFETGQNTKFTPVGVVQDGSSTHONEPQQWVLPYSGRSHNVHLAPAVAP	424
	Houston	TFFPGEQLLFFRSTMPGCSGYPNMNLDCLLPQEWVQHIFYQEAAPAQSDVALLRF	477
	Laurens	TFFPGEQLLFFRSTMPGCSGYPNMNLDCLLPQEWVQHIFYQEAAPAQSDVALLRF	477
	Minerva	TFFPGEQLLFFRSTMPGCSGYPNMNLDCLLPQEWVQHIFYQEAAPAQSDVALLRF	477
	GII.4 Comp	TFFPGEQLLFFRSTMPGCSGYPNMNLDCLLPQEWVQHIFYQEAAPAQSDVALLRF	477
	Houston	VNPDTGRVLFECKLHKSGYVTVHAHTGQHDLVIPPNGYFRFDSWVNQFYTLAPM	530
	Laurens	VNPDTGRVLFECKLHKSGYVTVHAHTGQHDLVIPPNGYFRFDSWVNQFYTLAPM	530
	Minerva	VNPDTGRVLFECKLHKSGYVTVHAHTGQHDLVIPPNGYFRFDSWVNQFYTLAPM	530
	GII.4 Comp	VNPDTGRVLFECKLHKSGYVTVHAHTGQHDLVIPPNGYFRFDSWVNQFYTLAPM	530
	Houston	GNGTGRRRAL (SEQ ID NO: 4)	539
	Laurens	GNGTGRRRAL (SEQ ID NO: 5)	539
	Minerva	GNGTGRRRAL (SEQ ID NO: 6)	539
	GII.4 Comp	GNGTGRRRAL (SEQ ID NO: 1)	539

5 Ejemplo 2. Purificación de VLP compuestas

Se clonó la construcción génica sintética de secuencia compuesta de GII.4 de norovirus para dominios de la cápside descrito en el ejemplo 1 en baculovirus recombinantes. La infección de células de insecto demostró alto rendimiento de producción de VLP. Se procesó una alícuota de 40 ml de una reserva de baculovirus recombinante P2 pFastBac para el gen VP1 de VLP compuesta con un gradiente de sacarosa para verificar la expresión y el ensamblaje de VLP compuestas. Los medios acondicionados se dispusieron primero en capas sobre un lecho de agarosa al 30% y después se centrifugaron a 140 K x g para sedimentar la VLP. Se resuspendió el sedimento, se dispuso en capas sobre un gradiente de sacarosa y luego se centrifugó a 140 K x g. Se observó una capa blanca visible dentro del gradiente después de la centrifugación. Se recogieron fracciones de 500 µl del gradiente y después se analizaron mediante gel de SDS-PAGE/Coomassie (figura 3). Se observó el patrón de formación de bandas esperado para VLP compuesta a ~56 kDa dentro de las fracciones de gradiente de sacarosa.

Usando un sistema de cromatografía de líquidos de alta presión con un tampón de migración de Tris 20 mM, NaCl 150 mM a pH 7 a un caudal de 0,5 ml/minuto, se cargó una alícuota de 50 µl del sobrenadante de cultivo celular de expresión compuesta en una columna de exclusión por tamaño de Superose-6. Se observó un pico de VLP intacta a ~15,3 minutos a 280 nm y 220 nm confirmando la integridad de las VLP compuestas (figura 4).

También se purificaron VLP compuestas a partir de medios acondicionados usando cromatografía en columna. Se procesaron los medios acondicionados mediante cromatografía de intercambio catiónico. La fracción de elución de

intercambio catiónico se purificó adicionalmente mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Se concentró la fracción de elución de HIC y se sometió a intercambio de tampón mediante filtración de flujo tangencial. Se esterilizó por filtración el producto final y se almacenó a 4°C. Se analizaron 500 ng de las VLP compuestas purificadas (lote CM3) mediante SDS-PAGE con tinción de plata (figura 5).

Usando un sistema de cromatografía de líquidos de alta presión con un tampón de migración de Tris 20 mM, NaCl 150 mM a pH 7 a un caudal de 1,0 ml/minuto, se cargó una alícuota de 50 µl de las VLP compuestas de CM3 purificadas en una columna de exclusión por tamaño de Superose-6. Se observó un pico de VLP intacta a ~7,5 minutos a 280 nm que confirma la integridad de las VLP compuestas (figura 6).

Ejemplo 3. Inmunogenicidad compuesta

Se inmunizaron por vía intraperitoneal ratones C57BL/6 hembra de aproximadamente 8-10 semanas de edad con concentraciones decrecientes de VLP compuesta (CVLP) partiendo de 50 µg y disminuyendo en 2 veces hasta 0,19 µg. La CVLP contenía un polipéptido que tenía la secuencia de SEQ ID NO: 1 tal como se describe en el ejemplo 1. Se incluyó un grupo de animales inmunizados con PBS solo como control negativo. Se recogieron y analizaron muestras de suero para determinar la presencia de IgG específica de CVLP mediante ELISA (figura 7). Los resultados de este experimento indican que el intervalo lineal de la curva de dosis está entre aproximadamente 6 µg y 0,2 µg. Las dosis por encima de 6,25 µg de CVLP no parecen potenciar las respuestas inmunitarias de una manera dependiente de la dosis. Se calculó que el valor de CE_{50} (definido como la dosis eficaz que proporciona una respuesta del 50%) era de aproximadamente 1,0 µg/ml usando el software Softmax Pro (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA).

Ejemplo 4. Efecto antigénico múltiple de VLP compuestas

Se inmunizaron por vía intraperitoneal ratones C57BL/6 hembra (8-10 semanas de edad) con dosis variables o bien de VLP de Norwalk (NVLP) sola, o bien de VLP compuesta (CVLP) sola o bien en combinación. Se incluyó un grupo de animales inmunizados con PBS solo como control negativo. Se recogieron y analizaron muestras de suero para determinar la presencia de IgG específica de antígeno mediante ELISA (figuras 8 y 9). Los resultados indican que la inmunización con la combinación de las CVLP y NVLP potencia la respuesta inmunitaria de tal forma que se logra un mayor nivel de IgG con una menor dosis de antígeno. Por ejemplo, la inmunización con 1 µg de cada NVLP y CVLP produce una respuesta inmunitaria más fuerte cuando se administra con cualquier VLP sola. Los anticuerpos de animales inmunizados con CVLP no dan reacción cruzada con NVLP y viceversa (datos no mostrados).

Ejemplo 5. VLP compuestas producen anticuerpos con reactividad cruzada

Se inmunizaron por vía intraperitoneal ratones C57BL/6 hembra, de aproximadamente 10-12 semanas de edad, o bien con 30 µg de VLP de Houston o bien con VLP compuestas formuladas con MPL (20 mg) como coadyuvante. Las VLP compuestas contenían un polipéptido que tenía la secuencia de SEQ ID NO: 1 tal como se describe en el ejemplo 1. Se extrajo sangre a los ratones en el día 21 tras la inmunización y se sometieron a ensayo los sueros en un ELISA específico de antígeno para determinar títulos de anticuerpos para VLP compuestas de Houston, Laurens y Norwalk. Se muestran los datos en la figura 10. La inmunización con VLP compuesta induce una respuesta más amplia a través de más serotipos tal como se evidencia por la mayor respuesta frente a la cepa Laurens mientras que se mantiene la respuesta frente a la cepa Houston. La inmunización con VLP de Houston también induce anticuerpos con reactividad cruzada frente a VLP compuestas y de Laurens pero la magnitud de la respuesta no es tan grande como la observada con la inmunización con las VLP compuestas. No hubo respuesta detectable a VLP de Norwalk, que es un novovirus de GI.1.

Ejemplo 6. Eficacia de vacuna bivalente en conejos

Se llevó a cabo un estudio para evaluar la eficacia de una vacuna de norovirus bivalente que comprende VLP compuestas de GII.4 de norovirus (CVLPS) tal como se describe en el ejemplo 2 y VLP de Norwalk (NVLP, GI.1). Se inmunizaron por vía intramuscular conejos con esta vacuna bivalente en los días 0 y 21. Las dosis de VLP oscilaron entre 20 µg y 0,002 µg de cada tipo de VLP y cada formulación de vacuna contenía 25 µg de MPL y 250 µg de AIOH. Se recogió suero de cada conejo en el día 28 y se evaluó la IgG específica para VLP. Se recogieron los bazos y los ganglios linfáticos mesentéricos en el día 75 y se evaluaron para determinar la presencia de inmunidad celular específica de antígeno.

Se midieron los títulos de IgG sérica mediante ELISA usando placas de microtitulación recubiertas o bien con NVLP o bien con CVLP como captura. Se expresan los títulos como diluciones inversas (figura 11). Se evaluó la capacidad de respuesta de células T específicas de antígeno mediante la incorporación de timidina titulada después de una estimulación *in vitro* de 5 días con 5 µg o bien de NVLP o bien de CVLP (figura 12). Se evaluaron las células B de memoria mediante ELISPOT específico de VLP y se expresan los resultados como células secretoras de anticuerpo por millón de células (figura 13).

Los resultados de este estudio demuestran que la vacuna frente a norovirus bivalente i.m. formulada con los adyuvantes MPL y AIOH produce altas respuestas de IgG específica de VLP, células T de respuesta y células B de memoria que pueden responder a estimulación tanto con NVLP como con CVLP.

5 Ejemplo 7. Vacunación bivalente a alta dosis en conejos

Este ejemplo esquematiza los experimentos diseñados para determinar si altas dosis de las VLP compuestas y de Norwalk en la vacuna bivalente conducirán a cualquiera acontecimiento adverso. Se inmunizaron por vía intramuscular conejos con la vacuna bivalente (véase el ejemplo 6) en los días 0, 14 y 21. Las dosis de VLP oscilaron entre 150 µg y 5 µg de cada VLP (de Norwalk y compuesta) y cada formulación contenía 50 µg de MPL y 500 µg de AIOH. Se supervisaron la salud general, condición del pelaje y sitio de inyección de los conejos inmunizados cada 12 horas durante las primeras 72 horas y luego diariamente a partir de ahí. Se recogió suero de cada conejo en el día 21 y en el día 35 y se evaluaron la IgG e IgA específicas de VLP de Norwalk (NVLP) (figura 14) y de VLP compuesta (CVLP) (figura 15). También se recogieron los bazos en el día 35 y se evaluaron para determinar la presencia de inmunidad celular específica de antígeno (figura 16).

Se midieron los títulos de IgG sérica mediante ELISA usando placas de microtitulación recubiertas o bien con NVLP o bien con CVLP como captura. Se expresan los títulos como diluciones inversas. Se evaluó la capacidad de respuesta de células T específicas de antígeno mediante la incorporación de timidina titulada después de una estimulación *in vitro* de 5 días con los antígenos indicados (por ejemplo, VLP compuestas, VLP de GII.4 (2002), VLP de GII.4 (2006) y VLP de Norwalk).

Los resultados de este estudio muestran que la vacuna bivalente contra norovirus es segura a las dosis sometidas a prueba tal como se evidencia por el hecho de que todos los conejos parecían estar sanos en toda la duración del estudio y no se observaron reacciones en el sitio de inyección. Las respuestas inmunitarias medidas a partir de conejos vacunados confirman que la vacuna contra norovirus bivalente es eficaz para producir tanto anticuerpos específicos de VLP como células T de respuesta a VLP.

30 Ejemplo 8. Ensayo de potencia en ratones para determinar la eficacia de la vacuna contra norovirus

Este ejemplo esquematiza el desarrollo de un ensayo de potencia en ratones para evaluar la potencia de la vacuna contra norovirus bivalente. Se inmunizaron por vía i.p. ratones en los días 0 y 7 con concentraciones iguales que oscilaban entre 0,002 µg y 30 µg de VLP de Norwalk V (NVLP) y VLP compuesta (CVLP). Se recogió suero de cada ratón en el día 14 y se evaluó la IgG específica de VLP (figura 17). También se midió la actividad neutralizante de los anticuerpos mediante ensayo de inhibición de hemaglutinación (HAI) usando glóbulos rojos humanos del grupo O positivo (figura 18). Solo se pudieron valorar títulos de HAI específicos de Norwalk debido a que los genotipos de GII.4 no producen hemaglutinación de glóbulos rojos.

Se midieron los títulos de IgG sérica mediante ELISA usando placas de microtitulación recubiertas o bien con NVLP o bien con CVLP como captura. Se expresan los títulos como diluciones inversas. Se midieron los títulos de HAI usando un ensayo de hemaglutinación convencional.

Los resultados de este estudio indican que la vacunación con la vacuna contra norovirus bivalente produce títulos de IgG potentes y funcionales de tal manera que puedan inhibir la hemaglutinación de glóbulos rojos humanos. Estos resultados son de particular importancia debido a que demuestran que los anticuerpos producidos en respuesta a la vacunación tienen funcionalidad, lo que puede conducir a la neutralización del virus real durante una infección.

45 Ejemplo 9. Formulación de quitosano de una vacuna bivalente contra norovirus

Se llevó a cabo un estudio en conejos con la vacuna de VLP contra norovirus bivalente para evaluar el papel del quitosano en esta formulación de vacuna. La formulación contenía cantidades iguales de una VLP de VP1 de Norwalk y de una VLP de GII.4 compuesta (véase el ejemplo 2). Se inmunizaron por vía intranasal los conejos con formulaciones en polvo seco en los días 0 y 21. Las dosis de VLP oscilaron entre 150 µg y 5 µg de cada tipo de VLP y cada formulación contenía 50 µg de MPL. La concentración de quitosano se varió para cada intervalo de dosis (7 mg, 0,7 mg y 0 mg) para determinar su papel en la inmunogenicidad. Se recogió suero de cada conejo y se evaluó la IgG específica de VLP (figura 19).

Se midieron los títulos de IgG sérica mediante ELISA usando placas de microtitulación recubiertas con VLP como captura. Se usaron diluciones en serie de un suero anti-VLP de conejo interno de la empresa para generar curvas patrón. Se expresan los títulos en unidades anti-VLP/ml (una unidad es aproximadamente igual a 1 µg).

Los resultados de estos experimentos indican que se requiere quitosano a la mayor dosis (7 mg) para lograr la inmunogenicidad máxima. Se muestran los datos de IgG para la dosis de 50 µg en la figura 19 y se representan los resultados como U/ml. Se muestra la respuesta de anticuerpos IgA a continuación en la tabla 1.

65

VLP (µg)	50	50	50
Quitosano (mg)	7	0,7	0
Media geométrica de los títulos de IgA (IC del 95%)	770 (474, 1253)	67 (32, 142)	83 (38, 179)

Ejemplo 10. Diseño de un gen consenso de GII de norovirus

- 5 Los métodos tal como se describen en el presente documento pueden usarse también para generar secuencias consenso de la cápside entre cepas aisladas de GII de norovirus a partir de diferentes genotipos de GII, GII.1, GII.2, GII.3. Se generó la siguiente alineación a partir de secuencias de VP1 de tres cepas aisladas de GII de norovirus diferentes. Se muestra la secuencia consenso (SEQ ID NO: 7) determinada a partir de la comparación de homología de las tres cepas de GII en la figura 20.
- 10 Una secuencia compuesta deriva de la secuencia consenso seleccionándose aminoácidos a partir de una secuencia de una de las cepas para posiciones variables de la secuencia consenso en las que son diferentes dos o más cepas. Preferiblemente, la secuencia de la que se seleccionan los aminoácidos es una cepa circulante reciente, o una cepa que está asociada más comúnmente con la enfermedad o que se produce más comúnmente entre las cepas que están evaluándose. En este ejemplo, se seleccionaron los aminoácidos de la secuencia de Snow Mountain en posiciones variables de la secuencia consenso en las que son diferentes las tres cepas para generar una secuencia de GII de VP1 compuesta. Se usa la secuencia de GII compuesta para la producción de un gen sintético que codifica una proteína VP1 de GII compuesta para la inducción de inmunidad cruzada entre cepas aisladas de norovirus de GII.
- 15
- 20 Se muestra la secuencia de aminoácidos de VP1 de GII compuesta (Compuesta) en la alineación a continuación como SEQ ID NO: 11 con las secuencias de aminoácidos de las proteínas VP1 de virus GII.1 (número de acceso: AAL13001), GII.2 Snow Mountain (número de acceso: AAB61685) y GII.3 (número de acceso: AAL12998) (SEQ ID NO: 8, 9 y 10, respectivamente).

```

Compuesta MKMASNDAAPSNDGAAGLVPEINNEVMALEPVAGAAIAAPLTGQNNIIDPWIR 53
GII.1 MKMASNDAAPSNDGAAGLVPEINNETMALEPVAGAAIAAPLTGQNNIIDPWIR 53
GII.2 Snow MKMASNDAAPSNDGAAGLVPEINNEVMALEPVAGAAIAAPLTGQNNIIDPWIR 53
GII.3 MKMASNDAAPSNDGAAGLVPEINNEVMALEPVAGAAIAAPLTGQNNIIDPWIR 53

Compuesta INFVQAPNGEFTVSPRNSPGEVLLNLELGPENLPYLAHLARMYNGYAGGMEVQ 106
GII.1 INFVQAPNGEFTVSPRNSPGEVLLNLELGPENLPYLAHLARMYNGYAGGMEVQ 106
GII.2 Snow INFVQAPNGEFTVSPRNSPGEVLLNLELGPENLPYLAHLARMYNGYAGGMEVQ 106
GII.3 INFVQAPNGEFTVSPRNSPGEVLLNLELGPENLPYLAHLARMYNGYAGGMEVQ 106

Compuesta VMLAGNAFTAGKLVFAAIPPHFPIENLSPOQITMFPHVIIDVRTLEPVLLPLP 159
GII.1 VMLAGNAFTAGKLVFAAIPPHFPIENLSPOQITMFPHVIIDVRTLEPVLLPLP 159
GII.2 Snow VMLAGNAFTAGKLVFAAIPPHFPIENLSPOQITMFPHVIIDVRTLEPVLLPLP 159
GII.3 VMLAGNAFTAGKLVFAAIPPHFPIENLSPOQITMFPHVIIDVRTLEPVLLPLP 159

Compuesta DVRNFFHYNQKDDPRMRLVAMLYTPLRSNGSGDDVFTVSCRVLTRPSPDFDF 212
GII.1 DVRNFFHYNQKDDPRMRLVAMLYTPLRSNGSGDDVFTVSCRVLTRPSPDFDF 212
GII.2 Snow DVRNFFHYNQKDDPRMRLVAMLYTPLRSNGSGDDVFTVSCRVLTRPSPDFDF 212
GII.3 DVRNFFHYNQKDDPRMRLVAMLYTPLRSNGSGDDVFTVSCRVLTRPSPDFDF 212

Compuesta NYLVPPTVESKTKPFTLPILTIGELSNRFPVVIDLYTSPNEVIVVQCQNGR 265
GII.1 NYLVPPTVESKTKPFTLPILTIGELSNRFPVVIDLYTSPNEVIVVQCQNGR 265
GII.2 Snow NYLVPPTVESKTKPFTLPILTIGELSNRFPVVIDLYTSPNEVIVVQCQNGR 265
    
```

25

ES 2 668 836 T3

GII.3	NELVPPPTVESKTKLFTLPILTISEMNSRFPVPIDSLHTSPTENIVVQCQNGR	265
Compuesta	CTLDGELGTTQLQPSGICAFRGEVTR--AHLSDON-----DHRWNIQET	318
GII.1	CTLDGELGTTQLQPSNICSLRG--RINAHLSD--N-----QHRWNMOVT	306
GII.2 Snow	CTLDGELGTTQLQVSGICAFKGEVT--AHL--QDN-----DHLVNIHTT	306
GII.3	CTLDGELGTTQLQPSGICAFRGLTRSTSRASDQALPTPTRLFNHRWIIQLL	318
Compuesta	NLNGTFFDPSIEDIPAPLGTPDFGGRVFGVLSQRNPNT-----NRAHDVV	371
GII.1	NANGTFFDPTEDVPAPLGTPDFLANIYGVTSQRNPNT-----GRAHDSII	352
GII.2 Snow	NLNGSFFDPSIEDIPAPLGVPDFGGRVFGVITQRDKQNAACQSOPANRGHDVV	359
GII.3	NLNGTFFDPAEDIPAPLGTPDFRGKVFVGVSQRNPNT-----TRAHEAKV	364
Compuesta	ITYSAGFTPKLGSVQIGTWETDDFDYNQPTKFTPV--GLNDTEHFNQWVLPVY	424
GII.1	ATWSPKFTPKLGSVVEGTWEDRDFDINQPTKFTPV--GLYDTEHFNQWVLPVY	403
GII.2 Snow	ITYFAQYTPKLGQVQIGTWQITDDIYNQPVKFTPV--GLNDTEHFNQWVLPVY	410
GII.3	ITTSRFRFTPKLGSRLIIT--EAGDFDINQSTKFTPVQIGVDKFAEFCQWALPNY	416
Compuesta	SGALTLNMNLA PSVAPVFPGEQLLFFRSYLPKGGY SNGAIDCLLPQEWVQHF	477
GII.1	SGALTLNMNLA PSVAPVFPGEQLLFFRSHVPLKGGY SNGAIDCLLPQEWVQHF	456
GII.2 Snow	SGALTLNMNLA PSVAPVFPGEQLLFFRSYLPKGGY SNGAIDCLLPQEWVQHF	463
GII.3	SGQETLNMNLA PSVAPVFPGEQLLFFRSQLPSSGGRSNGAIDCLLPQEWVQHF	469
Compuesta	YQESAPSMTEVALVRYINPDTGRVLF EAKLHRAGFMTVA SNGSAPIVVPPNGY	530
GII.1	YQESAPSSDVALVRYINPDTGRVLF EAKLHRGFTVANS GSRPIVVPPNGY	509
GII.2 Snow	YQESAPSMTEVALVRYINPDTGRVLF EAKLHRAGFMTV SNTSAPVVPPNGY	516
GII.3	YQESAPACTOVALVRYINPDTGRVLF EAKLHKGCFMTVA SNGSPTIVVPPNGY	522
Compuesta	FRFDSWVNQFYSLAPMGTGNRRRI (SEQ ID NO: 11)	555
GII.1	FRFDSWVNQFYSLAPMGTGNRRRI (SEQ ID NO: 8)	534
GII.2 Snow	FRFDSWVNQFYSLAPMGTGNRRRI (SEQ ID NO: 9)	541
GII.3	FRFDSWVNQFYSLAPMGTGNRRRI (SEQ ID NO: 10)	547

Ejemplo 11. Diseño de un gen consenso de GI de norovirus

- 5 Los métodos tal como se describen en el presente documento pueden usarse también para generar secuencias consenso de la cápside entre cepas aisladas de GI de norovirus. Se generó la siguiente alineación a partir de secuencias VP1 de tres cepas aisladas de GI de norovirus diferentes. Se muestra la secuencia consenso de GI (SEQ ID NO: 12) determinada a partir de la comparación de homología de las tres cepas de GI en la figura 21.
- 10 Una secuencia compuesta deriva de la secuencia consenso seleccionándose aminoácidos de una secuencia de una de las cepas para posiciones variables de la secuencia consenso en las que son diferentes dos o más cepas. Preferiblemente, la secuencia de la que se seleccionan los aminoácidos es una cepa circulante reciente, o una cepa que está asociada más comúnmente con enfermedad o que se produce más comúnmente entre las cepas que están evaluándose. En este ejemplo, se seleccionaron los aminoácidos a partir de la secuencia de Southampton en
- 15 posiciones variables de la secuencia consenso en la que son diferentes las tres cepas para generar una secuencia consenso de GI de VP1. Se usa la secuencia de GI compuesta para la producción de un gen sintético que codifica una proteína VP1 de GI compuesta para la inducción de inmunidad cruzada entre cepas aisladas de norovirus de GI.
- 20 Se muestra la secuencia de aminoácidos de VP1 de GI compuesta (Compuesta) en la alineación a continuación como SEQ ID NO: 16 con las secuencias de aminoácidos de las proteínas VP1 de virus Norwalk (número de acceso: M87661), Southampton (número de acceso: Q04542) y virus Chiba (número de acceso: BAB18267) (SEQ ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente).

Compuesta	MMASKDATQ SADGASGAGQLVPEVNTADPLPMDPVAGSSTAVATAGQVNMID	53
Norwalk VP	MMASKDATSSVDGASGAGQLVPEVNASDPLAMDPVAGSSTAVATAGQVNFID	53
Southampto	MMASKDATQ SADGASGAGQLVPEVNTADPLPMEPVAGSTTAVATAGQVNMID	53
Chiba VP1	MMASKDATE SADGATGAGQLVPEVNTADPIPIDPVAGSSTALATAGQVNLID	53
Compuesta	PWIINNFBVQAPQGEFTTISPNNTPGDVLFDLQLGPHLNPFLSHLSQMYNGWVGN	106
Norwalk VP	PWIINNFBVQAPQGEFTTISPNNTPGDVLFDLSLGPPLNPFLHLSQMYNGWVGN	106
Southampto	PWIINNFBVQAPQGEFTTISPNNTPGDILFDLQLGPHLNPFLSHLSQMYNGWVGN	106
Chiba VP1	PWIINNFBVQAPQGEFTTISPNNTPGDVLFDLQLGPHLNPFLSHLSQMYNGWVGN	106
Compuesta	MRVRIILAGNAFTAGKIIVCCVPPGFTSSSLTIAQATLFPHVIADVRLDPIE	159
Norwalk VP	MRVRIILAGNAFTAGKIIVSCIPPGFGSHNLTIAQATLFPHVIADVRLDPIE	159
Southampto	MRVRIILAGNAFTAGKIIVCCVPPGFTSSSLTIAQATLFPHVIADVRLDPIE	159
Chiba VP1	MRVRIILAGNAFTAGKIIICCVPPGFGSRTLSIAQATLFPHVIADVRLDPIE	159
Compuesta	VPLEDVRNVLYHNND-NQPTMRLVCMLYTPLRRTGGGSGNSDSFVVAGRVLTC	212
Norwalk VP	VPLEDVRNVLYHNNDNQPTMRLVCMLYTPLRRTGGGTGDSFVVAGRVLTC	210
Southampto	VPLEDVRNVLYHNND-NQPTMRLVCMLYTPLRRTGGGSGNSDSFVVAGRVLTC	211
Chiba VP1	VPLEDVRNVLYHNND-NQPTMRLVCMLYTPLRRTGGGSGGDSFVVAGRVLTC	211
Compuesta	SPDFNLFVLPPTVEQKTRPFTVPNIPLQTLNSRFPSPPIQGMILSPDASQVV	265
Norwalk VP	SPDFNLFVLPPTVEQKTRPFTIPNIPLSSLSNSRAPLPISSIGISPDNVQSV	263
Southampto	SPDFNLFVLPPTVEQKTRPFTVPNIPLQTLNSRFPSPPIQGMILSPDASQVV	264
Chiba VP1	SPDFNLFVLPPTVEQKTRPFTVPNIPLKYLNSRIPNPIEGMSLSPDOTQNV	264
Compuesta	QFQNGRCTIDGQLLGTTPVVSXSOLEKVRGKITSGARVLNLTDELGKPFMAFDS	318
Norwalk VP	QFQNGRCTIDGRLVGTTPVSLSHVAKIRG-TSNGTVINLTDELGTTFHFHFEFEG	314
Southampto	QFQNGRCTIDGQLLGTTPATSGQLFRVRGKINQGARTLNLTTEVDGKPFMAFDS	317
Chiba VP1	QFQNGRCTIDGQLLGTTPVVSXOLEKVRGKITSGARVLNLTDELGKPFMAFAA	317
Compuesta	PAPVGFDDLGC CDWHIEMSKIPNSSGQDPMRSVSVQTNVQGFVPHLGSIQED	371
Norwalk VP	PAPVGFDDLGC CDWHINMTQFGHSS-OTC---YDVTTPDTFVPHLGSIQAN	362
Southampto	PAPVGFDDLGC CDWHIEMSKIPNNTSGDPMRSVSVQTNVQGFVPHLGSIQED	370
Chiba VP1	PAPVGFDDLGC CDWHIEMSKIPNSSTQNNPIVINSVKPNSQGFVPHLSSITLED	370
Compuesta	EYFS-PTGDYIGTIEWISPPSTPEGTIDINLWKIPDYGSSLSQAANLAPFVYPP	424
Norwalk VP	GIGS---GNVYGVLSWISPPSHPSGSOVDLWKIPNYGSSITEATHLAPSVYPP	412
Southampto	EVENHPTGDYIGTIEWISQPSSTPEGTIDINLWEIPDYGSSLSQAANLAPFVYPP	423
Chiba VP1	EYFS-SQGDYIGTIEWISPPSDSGGANTNEWKIPDYGSSLAEASQLAPAVYPP	422
Compuesta	GFGEVLVYFMSAEPGPNRISAPNDVPCLLPQEYIITHFVSEQAPTMCDAALLHY	477
Norwalk VP	GFGEVLVYFMSKMPGP---GAYN-EPCLLPQEYIISHLASEQAPTMCDAALLHY	461
Southampto	GFGEVLVYFMSAEPGPNRISAPNDVPCLLPQEYIITHFVSEQAPTMCDAALLHY	476
Chiba VP1	GFNEVIVYFMSAEPGPNRISAPNDVPCLLPQEYIITHFVSEQAPTMCDAALLHY	475
Compuesta	VDPDTNRNLGEFKLYPGGYLTCVPNGVSGAGPQQLPLNGVVFVSVWSRFRYQLK	530
Norwalk VP	VDPDTNRNLGEFKLYPGGYLTCVPNGVSGAGPQQLPLNGVVFVSVWSRFRYQLK	514
Southampto	VDPDTNRNLGEFKLYPGGYLTCVPNGVSGAGPQQLPLNGVVFVSVWSRFRYQLK	529
Chiba VP1	VDPDTNRNLGEFKLYPGGYLTCVPNSSSTGPGQQLPLDGVVFVFAVSVWSRFRYQLK	528
Compuesta	PVGTASSTARGRLGVRR (SEQ ID NO: 16)	546
Norwalk VP	PVGTASSTARGRLGVRR (SEQ ID NO: 13)	530
Southampto	PVGTASSTARGRLGVRR (SEQ ID NO: 14)	545
Chiba VP1	PVGTASSTARGRLGVRR (SEQ ID NO: 15)	544

Ejemplo 12. Diseño de un gen consenso de papilomavirus humano para L1

- 5 Los métodos tal como se describen en el presente documento también pueden usarse para generar secuencias consenso entre otros virus sin envoltura. Se generó la siguiente alineación a partir de tres papilomavirus humanos (HPV): HPV-11, HPV-16 y HPV-18. Se muestra la secuencia consenso de proteína de la cápside L1 (SEQ ID NO: 17) determinada a partir de la comparación de homología de las tres cepas de HPV en la figura 22.
- 10 Una secuencia compuesta deriva de la secuencia consenso seleccionándose aminoácidos de una secuencia de una de las cepas para posiciones variables de la secuencia consenso en las que son diferentes dos o más cepas. Preferiblemente, la secuencia de la que se seleccionan los aminoácidos es una cepa circulante reciente, o una cepa que está asociada más comúnmente con la enfermedad o que se produce más comúnmente entre las cepas que están evaluándose. En este ejemplo, se seleccionaron aminoácidos de la secuencia de HPV-18 en posiciones
- 15 variables de la secuencia consenso en las que son diferentes las tres cepas para generar una secuencia de HPV de L1 compuesta. Se usa la secuencia de HPV compuesta para la producción de un gen sintético que codifica un

polipéptido de L1 compuesto para la inducción de inmunidad cruzada entre una variedad de cepas de HPV.

Se muestra la secuencia de aminoácidos de L1 de HPV (Compuesta) se muestra en la alineación a continuación como SEQ ID NO: 21 con las secuencias de aminoácidos de las proteínas de L1 de virus HPV-11, HPV-16 y HPV-18 (SEQ ID NO: 18, 19 y 20, respectivamente).

5

Compuesta	MCLYTRVLIILHYHLLPLYGPLYHPRPLP	LSILVYMVHIIICGHVILLELRNV	53
HPV16 L1		MOVTFIYIL-VITC	YENNV 18
HPV18 L1	MCLYTRVLIILHYHLLPLYGPLYHPRPLP	LSILVYMVHIIICGHVILLELRNV	53
Compuesta	NVFFIFLQMALWRPSDNTVYLLPPP	-PVSKVVNTDDYVTRTNIFYHAGSSRLLA	106
HPV11 L1		MWRPSDSTVYVPPPNPVSKVVA	TDAYVKRTNIFYHAGSSRLLA 43
HPV16 L1	NVYHIFLQMLWLPSEATVYLLPPP	-PVSKVVS	TDEYVARTNIFYHAGSSRLLA 70
HPV18 L1	NVFFIFLQMALWRPSDNTVYLLPPP	-PVSKVVNTDDYVTRTNIFYHAGSSRLLA	105
Compuesta	VGHYPYFIKKCGGNKQDVPKVS	GYQYRFRVQLPDPNKFGLPDTSYNPTQR	159
HPV11 L1	VGHYPYFIKK	VNKIVVPKVS	GYQYRFRVQLPDPNKFGLPDTSYNPTQR 94
HPV16 L1	VGHYPYFIKKPNNKTLV	PKVSGLYQYRFRVQLPDPNKFGLPDTSYNPTQR	123
HPV18 L1	VGNPYFRVYDAGCGGNKQDIPKVS	AYQYRFRVQLPDPNKFGLPDTSYNPTQR	158
Compuesta	LWVACAGVEVGRGQPLGVGLSGHPLLNKLD	TENSHAYTSNVEEDNREINVSMD	212
HPV11 L1	LWVACAGVEVGRGQPLGVGVSGHP	LLNKLDDEVENS	GGYGANEGQDNREINVSMD 147
HPV16 L1	LWVACAGVEVGRGQPLGVGLSGHPLLNKLD	TENSHAYTSNVEEDNREINVSMD	176
HPV18 L1	LWVACAGVEVGRGQPLGVGLSGHPLLNKLD	TENSHAYTSNVEEDNREINVSMD	211
Compuesta	YKQTQLCIIIGCAPPIGEHWGKGTACKNRP	VSGDCPPELINTVIOQDGMVDT	265
HPV11 L1	YKQTQLCIIIGCAPPIGEHWGKGTACKNRP	VSGDCPPELINTVIOQDGMVDT	200
HPV16 L1	YKQTQLCIIIGCAPPIGEHWGKGTACKNRP	VSGDCPPELINTVIOQDGMVDT	229
HPV18 L1	YKQTQLCIIIGCAPPIGEHWKGTACKNRP	VSGDCPPELINTVIOQDGMVDT	264
Compuesta	GFGAMDFS	TLQDNKSEVPLDICTSICKYPDYLQMSADPYGDSLFFYLRRQMF	318
HPV11 L1	GFGAMDF	ADLQDNKSEVPLDICTSICKYPDYLQMSADPYGDSLFFYLRRQMF	253
HPV16 L1	GFGAMDF	TLQDNKSEVPLDICTSICKYPDYIKMVESEPYGDSLFFYLRRQMF	282
HPV18 L1	GFGAMDFS	TLQDNKSEVPLDICTSICKYPDYLQMSADPYGDSLFFYLRRQMF	317
Compuesta	ARHFFNRAGTVGETVPDDLYIKGTCMPAS	PASSVYSPTPSGSEVTSDAQLFNK	371
HPV11 L1	ARHFFNRAGTVGETVPDDLYIKGTCMPAS	PASSVYSPTPSGSEVTSDAQLFNK	306
HPV16 L1	ARHFFNRAGTVGENVPDDLYIKGTCMPAS	PASSVYSPTPSGSEVTSDAQLFNK	335
HPV18 L1	ARHFFNRAGTMGDTVPQSLYIKGTCMPAS	PASSVYSPTPSGSEVTSDAQLFNK	370
Compuesta	PYWLQKAQGHNNGICWGNQLFVTVVD	TTRSTNMTLCAS-QSSEPGTYDNTKFK	424
HPV11 L1	PYWLQKAQGHNNGICWGNQLFVTVVD	TTRSTNMTLCAS-VSKSA-TYTNSDYK	357
HPV16 L1	PYWLQKAQGHNNGICWGNQLFVTVVD	TTRSTNMTLCAS-TSSETTYKNTNFK	387
HPV18 L1	PYWLQKAQGHNNGICWGNQLFVTVVD	TTRSTNMTLCAS-QSSEPGTYDNTKFK	423
Compuesta	EYSRHVEEYDLQFIFQLCSITL	TADVMYIHSMNSSILEDWNFGLEPPPTGTL	477
HPV11 L1	EYMRHVEEYDLQFIFQLCSITL	SAEVMAYIHTMNSVLEDWNFGLEPPPTGTL	410
HPV16 L1	EYSRHVEEYDLQFIFQLCSITL	TADVMYIHSMNSSILEDWNFGLEPPPTGTL	440
HPV18 L1	EYSRHVEEYDLQFIFQLCSITL	TADVMYIHSMNSSILEDWNFGLEPPPTGTL	476
Compuesta	EDTYRFVQSQAITCQKHTPPAEK	KDPYKIKFWEVNLKEKFS	DLQFPLGRK 530
HPV11 L1	EDTYRFVQSQAITCQKHTPPAEK	KDPYKIKFWEVNLKEKFS	DLQFPLGRK 463
HPV16 L1	EDTYRFVQSQAITCQKHTPPAEK	KDPYKIKFWEVNLKEKFS	DLQFPLGRK 493
HPV18 L1	EDTYRFVQSQAITCQKHTPPAEK	KDPYKIKFWEVNLKEKFS	DLQFPLGRK 529
Compuesta	FLLQAGLRKPTI	GGRKRSAPSASTSSTAKRKRKAR	(SEQ ID NO: 21) 569
HPV11 L1	FLLQAGLRKPTI	GGRKRSAPSASTSSTAKRKRKAR	(SEQ ID NO: 18) 500
HPV16 L1	FLLQAGLRKPTI	GGRKRSAPSASTSSTAKRKRKAR	(SEQ ID NO: 19) 531
HPV18 L1	FLLQAGLRKPTI	GGRKRSAPSASTSSTAKRKRKAR	(SEQ ID NO: 20) 567

10

Ejemplo 13. Estudio de seguridad de ampliación a escala de la dosis de la formulación de vacuna de VLP compuesta en seres humanos

15

Se lleva a cabo un estudio de fase 1 de ampliación a escala de la dosis, controlado, doble ciego, de la seguridad e inmunogenicidad de una vacuna contra norovirus. La vacuna consiste en partículas similivíricas (VLP) de norovirus compuestas en una matriz en polvo seco diseñada para su administración intranasal. Las VLP compuestas contienen un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Los vacunados incluyen voluntarios adultos sanos que son secretores de antígeno H tipo 1. La justificación para el reclutamiento de secretores de antígeno H tipo 1 es que los secretores de antígeno H tipo 1 son susceptibles a infecciones por norovirus mientras que los no secretores son resistentes. Como control, 2 voluntarios adicionales en cada nivel de

20

dosis reciben matriz sola. La matriz en polvo seco incluye 25 µg de adyuvante MPL[®], 7 mg de quitosano, 1,5 mg de manitol y 1,5 mg de sacarosa. Los voluntarios reciben dosis en los días 0 y 21 y están obligados a llevar un diario de 7 días de síntomas después de cada dosis. Se extraen muestras de sangre para serología, células secretoras de anticuerpos (ASC), y se recogen muestras de heces y saliva para la evaluación de anticuerpos de la mucosa.

Los componentes de la vacuna se enumeran en la tabla 2. Se acondiciona la vacuna en un dispositivo de administración intranasal. Se acondicionan administraciones individuales de la vacuna de VLP compuesta en un dispositivo de administración intranasal en dosis individuales Bepak (Milton Keynes, R.U.) de polvo seco UniDose DP. Cada dispositivo administra 10 mg de la formulación de vacuna en polvo seco. Cada dosis de vacuna consiste en dos dispositivos de administración, uno en cada narina. La dosis total de vacuna es de 20 mg de polvo seco. La formulación de adyuvante/excipientes es la misma que en la vacuna de VLP compuesta excepto en que no se incluye ningún antígeno de VLP compuesta en la formulación. La formulación del adyuvante/excipientes (también denominada matriz en polvo seco) se resume en la tabla 3.

Tabla 2. Composición de vacuna de VLP compuesta

Componente	Clase molecular	Cantidad por 10 mg de polvo seco	% de formulación final
VLP compuesta	Proteína recombinante	2,5, 7,5 o 25, 50 µg	0,025, 0,075, 0,25 o 0,50%
Monofosforil lípido A	Fosfolípido	25 µg	0,25%
Quitosano	Polisacárido	7,0 mg	70%
Manitol	Azúcar	1,5 mg	15%*
Sacarosa	Azúcar	1,5 mg	15%

Tabla 3. Adyuvante/excipientes (matriz en polvo seco)

Componente	Clase molecular	Cantidad por 10 mg de polvo seco	% de formulación final
Monofosforil lípido A	Fosfolípido	25 µg	0,25%
Quitosano	Polisacárido	7,0 mg	70%
Manitol	Azúcar	1,5 mg	15%
Sacarosa	Azúcar	1,5 mg	15%

Específicamente, la ampliación a escala de la dosis de la vacuna se lleva a cabo tal como sigue: después de un examen apropiado para determinar su buena salud, se aleatoriza un grupo de tres voluntarios a recibir o bien 5 µg de la vacuna de VLP compuesta más matriz en polvo seco (n = 2) o bien matriz en polvo seco sola (n = 1) por vía intranasal. Estos tres voluntarios se someten a seguimiento para determinar su seguridad durante 21 días, y el supervisor de seguridad independiente (ISM, *independent safety monitor*) revisa sus datos de seguridad. Después de la aprobación del ISM, estos individuos recibieron su segunda dosis de vacuna o matriz en el día 21 y se aleatorizan 4 voluntarios adicionales a recibir o bien 5 µg de proteína VLP más matriz en polvo seco (n = 3) o bien matriz sola (n = 1) por vía intranasal. El ISM revisa los datos de seguridad de este segundo grupo y después de la aprobación del ISM, se administra la segunda dosis intranasal 21 días después de la primera dosis. Los voluntarios llevan un diario de 7 días de los síntomas después de cada dosis. Después de que el ISM determina que la ampliación a escala hasta la siguiente dosis mayor es aceptable, se aleatoriza otro grupo de 7 voluntarios a recibir o bien la vacuna de VLP compuesta que contiene 15 µg de proteína VLP (n = 5) o bien matriz en polvo seco sola (n = 2) por vía intranasal en el día 0 y el día 21. De nuevo, se registran diarios de los síntomas de 7 días y se revisan por el ISM antes de la segunda dosis en el día 21. Finalmente, después de la revisión de los datos de seguridad de las primeras dos cohortes de dosificación, el ISM determina si la ampliación a escala de la dosis es aceptable y se aleatoriza un grupo final de 7 voluntarios a recibir o bien la vacuna de VLP compuesta que contiene 50 µg de proteína VLP (n = 5) o bien matriz en polvo seco sola (n = 2) por vía intranasal en el día 0 y el día 21. De nuevo, el ISM revisa los diarios de síntoma de siete días y otros datos de seguridad antes de la segunda dosis en el día 21.

Los voluntarios llevan diariamente un diario de síntomas (incluyendo síntomas locales tales como: rinorrea, dolor/molestia nasal, congestión nasal, goteo nasal, picor nasal, hemorragia nasal, dolor de cabeza y síntomas sistémicos tales como: temperatura bucal diaria, mialgia, náuseas, vómitos, cólicos, diarrea y pérdida de apetito) durante 7 días después de recibir la vacuna de VLP compuesta o matriz en polvo seco sola. Se obtienen los historiales médicos provisionales en cada visita de seguimiento (días 7 ± 1, 21 ± 2, 28 ± 2, 56 ± 2 y 180 ± 14); se pregunta a los voluntarios sobre sus enfermedades, medicaciones y visitas al médico intermedias. Se les pide a los voluntarios que notifiquen todos los acontecimientos adversos graves o intensos incluyendo acontecimientos que no se han solicitado durante las visitas de seguimiento. Se ha valorado el hemograma completo y la creatinina, glucosa, transaminasas y alanina-transaminasas séricas de los voluntarios en los días 7 y 28 (7 días después de cada inmunización) y, si son anómalos, se realiza un seguimiento de la prueba de laboratorio anómala hasta que la prueba llega a ser normal o se estabiliza.

Se extrae sangre antes de la inmunización y en los días 7 ± 1 , 21 ± 2 , 28 ± 2 , 56 ± 2 y 180 ± 14 para medir los anticuerpos séricos contra la vacuna de VLP compuesta mediante ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA). Antes de y en el día 7 después de la administración de cada dosis de vacuna o matriz en polvo seco sola se recogieron linfocitos de sangre periférica para detectar células secretoras de anticuerpos mediante el ensayo ELISPOT. Antes de y en los días 21 ± 2 , 28 ± 2 , 56 ± 2 y 180 ± 14 después de la vacunación, se obtiene sangre completa para separar las células y congelarlas para estudios futuros de inmunidad mediada por células, incluyendo la producción de citocinas en respuesta a antígeno de VLP compuesta y linfoproliferación. Se recogen muestras de heces completas antes de la inmunización y en los días 7 ± 1 , 21 ± 2 , 28 ± 2 , 56 ± 2 y el día 180 ± 14 para la detección de sIgA anti-VLP compuesta. Se recoge saliva con un dispositivo disponible comercialmente (Salivette, Sarstedt, Newton, NC) antes de la inmunización y en los días 7 ± 1 , 21 ± 2 , 28 ± 2 , 56 ± 2 , y si es positiva para anticuerpos de la mucosa en el día 56, se recoge una muestra en el día 180 ± 14 y se examina para detectar sIgA anti-VLP compuesta. Se examina finalmente la sangre de voluntarios que reciben la mayor dosis de VLP compuestas ($50 \mu\text{g}$, tercera cohorte descrita anteriormente) para determinar células B de memoria en los días 0, 21, 56 y 180.

Se usan los siguientes métodos para analizar las muestras de sangre, heces y saliva recogidas de individuos inmunizados o de individuos que recibieron la matriz en polvo seco sola:

A. Mediciones de anticuerpos séricos mediante ELISA

Se recogen 20 ml de sangre antes y en múltiples puntos de tiempo después de la vacunación para la medición de anticuerpos contra VLP compuesta mediante ELISA, usando VLP compuestas recombinantes purificadas como antígeno diana para examinar los especímenes codificados. En resumen, se usan las VLP compuestas en tampón de recubrimiento de carbonato de pH 9,6 para recubrir las placas de microtitulación. Se lavaron las placas recubiertas, se bloquearon y se incubaron con diluciones de dos veces en serie de suero de prueba seguido por lavado e incubación con reactivos de anticuerpos secundarios conjugados con enzimas para IgG, IgM e IgA humanas. Se añaden disoluciones de sustrato apropiadas, se deja que se desarrolle color, se leen las placas y se determinan los títulos de punto final de IgG, IgM e IgA en comparación con una curva patrón de referencia para cada clase de anticuerpos. Una respuesta positiva se define como una elevación de 4 veces del título después de la vacunación.

B. Ensayos de células secretoras de anticuerpos

Se recogen células mononucleares de sangre periférica (PMBC) a partir de treinta ml de sangre heparinizada para ensayos de ASC para detectar células que secretan anticuerpos contra VLP compuestas. Estos ensayos se realizaron en los días 0, 7 ± 1 , 21 ± 2 y 28 ± 2 después de la administración de la vacuna de VLP compuesta o matriz en polvo seco sola. Se define una respuesta positiva como un recuento de ASC tras la vacunación por 10^6 PBMC que está al menos 3 desviaciones estándar (D.E.) por encima del recuento medio antes de la vacunación para todos los sujetos (en la métrica logarítmica) y al menos 8 manchas de ASC, lo que corresponde a la media de pocillos de control negativo estimulados con medio (2 manchas) más 3 D.E. tal como se determina en ensayos similares.

C. Medición de células B de memoria específicas de VLP compuesta

Se recoge sangre heparinizada de la cohorte 3 (30 ml los días 0 y 21, 50 ml los días 56 y 180) para medir las células B de memoria en los días 0, 21, 56 y 180 después de la vacunación usando un ensayo ELISPOT precedido por una estimulación antigénica *in vitro*. Se usó satisfactoriamente un ensayo similar para medir la frecuencia de las células B de memoria producidas por formulaciones de VLP de Norwalk en conejos (véase el documento WO 2008/042789). Se incuban células mononucleares de sangre periférica (5×10^6 células/ml, a 1 ml/pocillo en placas de 24 pocillos) durante 4 días con antígeno de VLP compuesta ($2-10 \mu\text{g/ml}$) para permitir la expansión clonal de células B de memoria específicas de antígeno y la diferenciación en células secretoras de anticuerpos. Los controles incluyen células incubadas en las mismas condiciones en ausencia de antígeno y/o células incubadas con un antígeno no relacionado. Tras la estimulación, se lavan las células, se cuentan y se transfieren a placas de ELISPOT recubiertas con VLP compuesta. Para determinar la frecuencia de células B de memoria específicas de VLP por linfocitos B que secretan IgG totales, se añaden también células B expandidas a pocillos recubiertos con anticuerpos anti-IgG humana y anti-IgA humana. Se relevan los anticuerpos unidos con anticuerpos anti-IgG humana o anti-IgA humana marcados con HRP seguido por sustrato True Blue. Pueden usarse también conjugados a las subclases de IgA e IgG (IgA1, IgA2 e IgG1-4) para determinar respuestas de subclases específicas de antígeno que pueden estar relacionadas con distintos mecanismos efectores y ubicaciones de sensibilización inmunitaria. Se cuentan las manchas con un lector de ELISPOT. Se examinan las poblaciones celulares expandidas para cada voluntario mediante citometría de flujo para confirmar su fenotipo de células B de memoria, es decir CD19+, CD27+, IgG+, IgM+, CD38+, IgD-.

D. Respuestas inmunitarias celulares

Se recoge sangre heparinizada (50 ml de las cohortes 1 y 2, 25 ml de la cohorte 3) como especímenes codificados y se aíslan PBMC y se crioconservan en nitrógeno líquido para una posible evaluación futura de respuestas inmunitarias mediadas por células (CMI) frente al antígeno de VLP compuesta. Los ensayos que pueden realizarse incluyen respuestas proliferativas de PBMC y de citocinas frente a antígeno de VLP compuesta y pueden determinarse midiendo los niveles de interferón (IFN)- γ e interleucina (IL)-4 según las técnicas establecidas.

E. Recogidas de heces y saliva para determinar sIgA anti-VLP compuesta

Se mide la IgA anti-VLP compuesta en muestras de heces y saliva. Los especímenes de saliva se tratan con inhibidores de proteasas (es decir, AEBSF, leupeptina, bestatina y aprotinina) (Sigma, St. Louis, MO), se almacenan a -70°C y se someten a ensayo usando una modificación de un ensayo descrito previamente (Mills *et al.* (2003) Infect. Immun. 71: 726-732). Se recogen heces en múltiples días después de la vacunación y se almacenan los especímenes a -70°C hasta su análisis. Se descongelan los especímenes, y se añade tampón de inhibidor de proteasas para preparar una suspensión de heces al 10% p/v. Se someten a ensayo los sobrenadantes de heces para determinar IgA de la mucosa específica de VLP compuesta mediante ELISA, tal como se describe a continuación.

Se recogen aproximadamente 2-3 ml de saliva completa antes y en múltiples puntos de tiempo después de la vacunación. Se recoge saliva mediante un dispositivo disponible comercialmente (Salivette, Sarstedt, Newton, NC), en el que se mastica un hisopo Salivette o se coloca bajo la lengua durante 30-45 segundos hasta que se satura con saliva. Se recoge saliva a partir del hisopo mediante centrifugación.

F. Medición de anticuerpos anti-VLP compuesta en heces y saliva

Se realizan ELISA, utilizando placas recubiertas o bien con reactivos de anticuerpos anti-IgA humana o bien con recubrimientos de antígenos de VLP compuesta diana, para determinar IgA total y para titular las respuestas de IgA anti-VLP específicas para cada espécimen. Se revelan IgA totales o específicas con anticuerpo anti-IgA humana marcado con HRP tal como se describió anteriormente. Se incluye una curva patrón de IgA total internas para cuantificar el contenido de IgA. La respuesta se define como un aumento de 4 veces de anticuerpo específico.

Ejemplo 14. Estudio de seguridad e inmunogenicidad de dos dosificaciones de vacuna de VLP compuesta intranasal en seres humanos

Se lleva a cabo un estudio doble ciego, aleatorizado, en adultos sanos para comparar la seguridad y la inmunogenicidad de dos niveles de dosificación de una partícula similitvrica (VLP) de norovirus compuesta con adyuvantes/excipientes y controles de placebo (dispositivo vacío). La vacuna consiste en partículas similitvricas (VLP) de norovirus compuestas en una matriz en polvo seco diseñada para su administración intranasal tal como se describe en el ejemplo 13. Los vacunados incluyen voluntarios adultos sanos que son secretores de antígeno H tipo 1. Se asignan aleatoriamente los voluntarios humanos a uno de cuatro grupos y cada grupo recibe uno de los siguientes tratamientos: una dosis de 50 μg de la vacuna de VLP compuesta, una dosis de 100 μg de la vacuna de VLP compuesta, el adyuvante/excipiente, o placebo. A los voluntarios se les administra una dosis en los días 0 y 21 y están obligados a llevar un diario de 7 días de síntomas después de cada dosis. Se extraen muestras de sangre para serología, células secretoras de anticuerpos (ASC) y se recogen muestras de heces y saliva para evaluación de anticuerpos de la mucosa.

Los componentes de la vacuna se enumeran en la tabla 2 en el ejemplo 13. Se acondiciona la vacuna en un dispositivo de administración intranasal. Se acondicionan administraciones individuales de la vacuna de VLP compuesta en un dispositivo de administración intranasal en dosis individuales Bepak (Milton Keynes, Reino Unido) de polvo seco UniDose DP. Cada dispositivo administra 10 mg de la formulación de vacuna en polvo seco. Cada dosis de vacuna consiste en dos dispositivos de administración, uno en cada narina. La dosis total de vacuna es de 20 mg de polvo seco. Por tanto, la dosis de vacuna de 50 μg consiste en dos dispositivos que administran cada uno 10 mg de formulación en polvo seco, en los que cada 10 mg de formulación en polvo seco consisten en 25 μg de VLP compuesta, 25 μg de adyuvante MPL[®], 7 mg de quitosano, 1,5 mg de manitol y 1,5 mg de sacarosa. De forma similar, la dosis de vacuna de 100 μg consiste en dos dispositivos que administran cada uno 10 mg de formulación en polvo seco, en los que cada 10 mg de formulación en polvo seco consisten en 50 μg de VLP compuesta, 25 μg de adyuvante MPL[®], 7 mg de quitosano, 1,5 mg de manitol y 1,5 mg de sacarosa. La formulación de adyuvante/excipiente es la misma que en la vacuna de VLP compuesta excepto en que no se incluye ningún antígeno de VLP compuesta en la formulación. La formulación del adyuvante/excipiente (también denominada matriz en polvo seco) se resume en la tabla 3 en el ejemplo 13. El grupo de placebo recibe dos dispositivos vacíos.

Los voluntarios llevan diariamente un diario de síntomas (incluyendo síntomas locales tales como: rinorrea, dolor/molestia nasal, congestión nasal, goteo nasal, picor nasal, hemorragia nasal, dolor de cabeza y síntomas sistémicos tales como: temperatura bucal diaria, mialgia, náuseas, vómitos, cólicos, diarrea y pérdida de apetito) durante 7 días después de recibir o bien una de dos dosis de la vacuna de VLP compuesta, o bien matriz en polvo seco sola o bien el placebo. Se obtienen los historiales médicos provisionales en cada visita de seguimiento (días 7

± 1, 21 ± 2, 28 ± 2, 56 ± 2 y 180 ± 14); se pregunta a los voluntarios sobre sus enfermedades, medicaciones y visitas al médico intermedias. Se les pide a los voluntarios que notifiquen todos los acontecimientos adversos graves o intensos incluyendo acontecimientos que no se han solicitado durante las visitas de seguimiento. Se ha valorado el hemograma completo y la creatinina sérica, glucosa, transaminasas y alanina-transaminasas de los voluntarios en los días 7 y 28 (7 días después de cada inmunización) y, si son anómalos, se realiza un seguimiento de la prueba de laboratorio anómala hasta que la prueba llega a ser normal o se estabiliza.

Se extrae sangre antes de la inmunización y en los días 7 ± 1, 21 ± 2, 28 ± 2, 56 ± 2 y 180 ± 14 para medir anticuerpos séricos con la vacuna de VLP compuesta mediante ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA). Antes de y en el día 7 después de la administración de cada dosis de vacuna o matriz en polvo seco sola se recogieron linfocitos de sangre periférica para detectar células secretoras de anticuerpos mediante el ensayo ELISPOT. Antes de y en los días 21 ± 2, 28 ± 2, 56 ± 2 y 180 ± 14 después de la vacunación, se obtiene sangre completa para separar las células y congelarlas para estudios futuros de inmunidad mediada por células, incluyendo producción de citocinas en respuesta a antígeno de VLP compuesta y linfoproliferación. Se recogen muestras de heces completas antes de la inmunización y en los días 7 ± 1, 21 ± 2, 28 ± 2, 56 ± 2 y el día 180 ± 14 para la detección de sIgA anti-VLP compuesta. Se recoge saliva con un dispositivo disponible comercialmente (Salivette, Sarstedt, Newton, NC) antes de la inmunización y en los días 7 ± 1, 21 ± 2, 28 ± 2, 56 ± 2, y si es positiva para anticuerpos de la mucosa en el día 56, se recoge una muestra en el día 180 ± 14 y se examina para detectar sIgA anti-VLP compuesta. También se examina la sangre para determinar células B de memoria en los días 0, 21, 56 y 180.

Los métodos usados para analizar las muestras de sangre, heces y saliva recogidas de individuos inmunizados, o de individuos que reciben la matriz en polvo seco sola o el placebo se describen en detalle en el ejemplo 13.

Ejemplo 15. Estudio experimental de exposición en seres humanos con norovirus infeccioso tras vacunación con vacuna de VLP contra norovirus compuesta

Se lleva a cabo un estudio de exposición de fase 1-2 controlado por placebo, multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, en 80 voluntarios humanos inmunizados con la vacuna de VLP contra norovirus compuesta. Los sujetos elegibles incluyen aquellos de 18-50 años de edad, con buena salud, que expresan el oligosacárido H tipo 1 (tal como se mide mediante el estado de secretor salival positivo) y que son de grupos sanguíneos distintos del B o el AB. Se notifica que los sujetos que no son secretores de H tipo 1 o que tienen sangre del grupo B o AB son más resistentes a la infección por virus Norwalk y se excluyen del estudio. Se espera que al menos el 80% de los voluntarios sean elegibles basándose en estos dos criterios.

Tras el cribado, los voluntarios elegibles que cumplen todos los criterios de aceptación se aleatorizan (1:1) a una de dos cohortes de igual tamaño con aproximadamente 40 voluntarios en cada cohorte. Se inmuniza la cohorte 1 con VLP compuesta y la cohorte 2 recibe placebo. Los voluntarios se inmunizan con 10 mg de vacuna de VLP compuesta en cada narina (20 mg de polvo seco total) o placebo. Cada 10 mg de vacuna de VLP compuesta contienen 50 µg de VLP compuesta, 7 µg de quitosano, 25 µg de MPL[®], 1,5 mg de sacarosa y aproximadamente 1,5 mg de manitol. Por tanto, cada voluntario en la cohorte 1 recibe una dosificación total de 100 µg de antígeno de VLP compuesta en cada inmunización. Los voluntarios reciben vacuna o placebo en los días 0 y 21 del estudio.

Se valora la seguridad de la vacuna de VLP vírica compuesta en comparación con placebo. Los voluntarios llevan un diario durante 7 días tras cada inmunización con la vacuna o placebo para documentar la intensidad y duración de los acontecimientos adversos. Se realiza un seguimiento de acontecimientos adversos graves (AAG) y la aparición de cualquier estado médico nuevo significativo durante 6 meses después de la última dosis de vacuna o placebo y durante 4 meses después de la exposición a virus infeccioso.

Se expusieron todos los voluntarios a norovirus infeccioso entre 21 y 42 días después de la segunda dosis de vacuna o placebo (entre los días del estudio 42 y 56). Cada voluntario recibe la dosis infecciosa humana al 50% (DIH 50), es decir la cantidad de virus infeccioso que se espera que produzca enfermedad en al menos el 50% de voluntarios en el grupo de placebo, o más. La HID 50 está entre aproximadamente 48 y aproximadamente 480 equivalentes de la cepa de virus de exposición. El norovirus de exposición se mezcla con agua estéril y se administra por vía oral. La inoculación está precedida por la ingestión de 500 mg de bicarbonato de sodio en agua, para evitar la degradación de los virus por el ácido y la pepsina del estómago. Se toma una segunda ingestión de disolución de bicarbonato de sodio (500 mg de bicarbonato de sodio en agua) 5 minutos después de la inoculación oral del virus infeccioso. Los voluntarios permanecen en la instalación de la exposición durante al menos 4 días y al menos 18 horas después de que estén ausentes síntomas/signos de gastroenteritis aguda (vómitos, diarrea, heces sueltas, dolor abdominal, náuseas y fiebre).

Se supervisan varios parámetros para determinar la eficacia de la vacuna de VLP compuesta en la prevención o reducción de síntomas/signos de gastroenteritis aguda inducidos por la exposición vírica. Todos los voluntarios registran sus síntomas clínicos de gastroenteritis aguda y estos síntomas se documentan por el personal investigador en los centros de estudio. Se comparan los síntomas/signos de enfermedad de la cohorte 1 que recibe

la vacuna con los de los receptores de placebo de la cohorte 2.

5 Se recogen normalmente las muestras de sueros y heces de todos los voluntarios antes de la inmunización con la vacuna o placebo, y después de la exposición. Se analizan las muestras de suero mediante ELISA para determinar IgA e IgG, los títulos frente a las VLP de la exposición. Se someten a prueba el antígeno del virus de la exposición y el ARN del virus de la exposición en muestras de heces mediante ELISA y PCR, respectivamente, que indican la presencia del virus, la cantidad de virus que ha eliminado el intestino y la duración de la eliminación vírica. Los sujetos que se ponen enfermos después de la exposición, se someten a estudios de laboratorio adicionales incluyendo bioquímica sérica, BUN, creatinina y pruebas de función hepática hasta que se resuelven los síntomas/signos.

10 Se comparan los resultados del grupo de vacuna (cohorte 1) y del grupo de placebo (cohorte 2) para valorar la eficacia protectora de la vacuna contra la enfermedad por norovirus global (criterio de valoración primario), y/o su eficacia en la mejora de los síntomas/signos (intensidad y n.º de días de enfermedad) y/o la reducción de la presencia, la cantidad y/o la duración de eliminación vírica (criterios de valoración secundarios).

15 De hecho, resultarán evidentes diversas modificaciones de la invención, además de aquellas amostradas y descritas en el presente documento, para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y los dibujos adjuntos usando nada más que experimentación de rutina.

20 La cita o el análisis sobre una referencia en el presente documento no se interpretará como un reconocimiento de que el mismo es la técnica anterior de la presente invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Partícula similivírica que comprende al menos un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos compuesta, en la que la secuencia de aminoácidos compuesta comprende SEQ ID NO: 1; en la que SEQ ID NO: 1 deriva de cepas de norovirus circulantes; en la que la partícula similivírica tiene propiedades antigénicas de las cepas circulantes de norovirus usadas para derivar SEQ ID NO: 1; y en la que las cepas de norovirus circulantes se seleccionan del grupo que consiste en virus Houston, Minerva y Laurens.
- 10 2. Partícula similivírica de la reivindicación 1, en la que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos compuesta codificada por una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3.
3. Partícula similivírica de la reivindicación 1 o 2, que comprende además una proteína de la cápside de un norovirus.
- 15 4. Partícula similivírica de la reivindicación 3, en la que la proteína de la cápside del norovirus es una proteína VP1 de un norovirus del genogrupo I.
- 20 5. Polipéptido o fragmento del mismo que tiene una secuencia de aminoácidos compuesta, en el que la secuencia de aminoácidos compuesta es SEQ ID NO: 1.
6. Formulación de vacuna que comprende la partícula similivírica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o el polipéptido o fragmento del mismo de la reivindicación 5.
- 25 7. Formulación de vacuna que comprende la partícula similivírica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o el polipéptido o fragmento del mismo de la reivindicación 5 y una segunda partícula similivírica, en la que dicha segunda partícula similivírica comprende una proteína de la cápside de un norovirus.
8. Formulación de vacuna de la reivindicación 7, en la que dicho norovirus es un norovirus del genogrupo I o del genogrupo II.
- 30 9. Formulación de vacuna de la reivindicación 6 o 7, que comprende además un adyuvante.
10. Formulación de vacuna de la reivindicación 9, en la que la formulación de vacuna es una formulación líquida o una formulación en polvo seco.
- 35 11. Formulación de vacuna de la reivindicación 6 o 7, para su uso en un método de inducción de inmunidad protectora frente a una infección vírica en un sujeto que lo necesita.
- 40

FIGURA 1

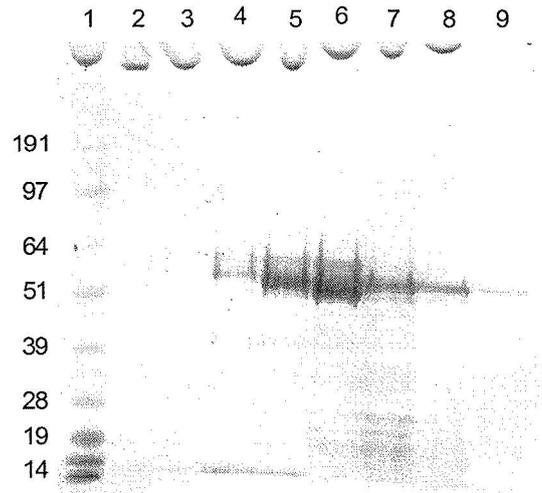
MKMAS-X₁-DA-X₂-PSDGS-X₃-ANLVPEVNNEVMALPVPVGAIAAPVAGQQNVIDPWIRNNFVQAPGG
 EFTVSPRNAPGEILWSAPLGPDLNPLYLSHLARMYNGYAGGFVQVILAGNAFTAGKIIFAAVPPNFPTEG
 LSPSQVTMFPHIIVDVRQLEPVLIPLPDVRNNEFYHYNQSN-DX₄-TIKLIAMLYTPLRANNAG-X₅-DVFT
 VSCRVLTRPSPDFDFIFLVPPTVESRTKPF-X₆-VPILTVEEMTNSRFPIPLEKLEFTGPS-X₇-AFVVQPQ
 NGRCTTDGVLLGTTQLSPVNICFRGDVTHIAG-X₈-X₉-X₁₀-YTMNLAS-X₁₁-NWNNYDPTEEIPAPLGT
 PDFVGKIQGVLTQTT-X₁₂-X₁₃-DGSTRGHKATV-X₁₄-TGS-X₁₅-X₁₆-FTPKLG-X₁₇-X₁₈-QF-X₁₉-TD
 T-X₂₀-ND-X₂₁-ET-X₂₂-QNT-X₂₃-FTPVGX₂₄-QDG-X₂₅-X₂₆-X₂₇-H-X₂₈-NEPQQWVLP-X₂₉-YSG
 R-X₃₀-X₃₁-HNVHLAPAVAP-X₃₂-FPGEQLLFFRSTMPGCSGYPNM-X₃₃-LDCLLPQEWV-X₃₄-HFYQEA
 APAQSDVALLRFVNPDTGRVLFECKLHKSGYVTVAHG-X₃₅-HDLVIPPNGYFRFDSWVNQFYTLAPMGN
 G-X₃₆-GRRRA

en la que X₁ = S o N; X₂ = S o N; X₃ = T o A; X₄ = S o P; X₅ = D o E;
 X₆ = S o T; X₇ = G o S; X₈ = S o T; X₉ = Q, R, o H; X₁₀ = E, D, o N;
 X₁₁ = Q o L; X₁₂ = R o K; X₁₃ = G o R; X₁₄ = S o Y; X₁₅ = V o A; X₁₆ =
 P o H; X₁₇ = S o R; X₁₈ = V o I; X₁₉ = S o T; X₂₀ = S, E, o N; X₂₁ = F
 o L; X₂₂ = G o H; X₂₃ = R o K; X₂₄ = V o I; X₂₅ = S o N; X₂₆ = S o T;
 X₂₇ = A o T; X₂₈ = Q o R; X₂₉ = D, S, o N; X₃₀ = D, N, o T; X₃₁ = S, V,
 o G; X₃₂ = S o T; X₃₃ = N o D; X₃₄ = Q o L; X₃₅ = Q o P; y X₃₆ = T o
 A. (SEQ ID NO: 2)

FIGURA 2

TTAATTAAGCGGCCGCCCCCTTACCCATGAAGATGGCTTCCTCCGACGCTAACCCCTCCG
 ACGGTTCCACCGCTAACCTGGTGCCCGAGGTGAACAACGAGGTGATGGCTCTCGAGCCCG
 TGGTGGGCGCTGCTATCGCTGCTCCCGTGGCTGGCCAGCAGAACGTGATCGACCCCTGGA
 TCCGTAACAACCTTCGTGCAGGCTCCCGTGGCGAGTTCACCGTGTCCCCCGTAACGCTC
 CCGGCGAGATCCTGTGGTCCGCTCCCGTGGGTCCCGACCTGAACCCCTACCTGTCCCACC
 TGGCTCGTATGTACAACGGTTACGCTGGCGGTTTCGAGGTGCAGGTGATCCTGGCTGGTA
 ACGCTTTCACCGCTGGCAAGATCATCTTCGCTGCTGTGCCCCCAACTTCCCCACCGAGG
 GCCTGAGCCCTCCCAGGTGACCATGTTCCCCACATCATCGTGGACGTGCGCCAGCTCG
 AGCTGTGCTGATCCCCCTGCCCGACGTGCGCAACAACCTTCTACCACTACAACCAGTCCA
 ACGACCCACCATCAAGCTGATCGCTATGCTGTACACCCCTGCGTGCTAACAACGCTG
 GTGACGACGTGTTCACTGTGCTGCTGCCGTGTGCTGACCCGTCCCTCCCCGACTTCGACT
 TCATCTTCCTGGTGCCCCCTACCGTGGAGTCCCGTACCAAGCCCTTACCGTGCCCATCC
 TGACCGTGGAGGAGATGACCAACTCCCGTTTTCCCATCCCCCTCGAGAAGCTGTTACCCG
 GTCCCTCCGGTGTTCGTGGTGCAGCCCCAGAACGGTTCGTTGCACCACCGACGGTGTCC
 TGCTGGGCACCACTCAGCTGTCCCCGTGAACATCTGCACCTTCCGTGGTGACGTGACCC
 ACATCGCTGGCACCACAAGAGTACACCATGAACCTGGCCTCCCAGAACTGGAACAACACTAG
 ACCCTACCGAGGAGATCCCCGCTCCTCTGGGCACCCCTGACTTCGTGGGCAAGATCCAGG
 GTGTCCCTGACCCAGACCACCCGCGGTGACGGCTCCACCCGTGGTCACAAGGCTACCGTGT
 CCACCGGTTCCGTGCACTTCACCCCCAAGCTGGGTTCCGTCCAGTTCTCCACCGACACCT
 CCAACGACTTCGAGACTGGCCAGAACACCAAGTTACCCCCGTGGGTGTGGTGCAGGACG
 GTTCTACCACCCACCAGAACGAGCCCCAGCAGTGGGTGCTGCCTGACTACTCCGGTTCGTG
 ACTCCCACAACGTGCACCTGGCTCCCGCTGTGGCTCCCACCTTCCCCGGCGAGCAGCTGC
 TGTTCTTCCGTTCCACCATGCCCGGTTGCTCCGGTTACCCCAACATGAACCTCGACTGCC
 TGCTGCCTCAGGAGTGGGTCCAGCACTTCTACCAGGAGGCTGCTCCCGCTCAGTCCGACG
 TGGCTCTGCTGCGTTTTCGTGAACCCGACACCGGTTCGTGTGCTGTTTCGAGTGCAAGCTGC
 ACAAGTCCGGTTACGTGACCGTGGCTCACACCGGCCAGCACGACCTGGTGATCCCTCCCA
 ACGGTTACTTCCGTTTCGACTCCTGGGTGAACAGTTCTACACCCTGGCTCCCATGGGTA
 ACGGCACCGGTCGTGCTGCTCTGTAATGGCTGGAGCTTCTTTGCTGGATTGGCATC
 TGATGTCCCTGGCTCTGGACTTGGTTCCCTAATCAATGCTGGGGCTGGGGCCATCAACCA
 AAAAGTTGAATTTGAAAATAACAGAAAATTGCAACAAGCTTGGCGCGCC (SEQ ID NO: 3)

FIGURA 3



Carril 1	Marcador de peso molecular
Carril 2	Fracción de gradiente de sacarosa 1
Carril 3	Fracción de gradiente de sacarosa 2
Carril 4	Fracción de gradiente de sacarosa 3
Carril 5	Fracción de gradiente de sacarosa 4
Carril 6	Fracción de gradiente de sacarosa 5
Carril 7	Fracción de gradiente de sacarosa 6
Carril 8	Fracción de gradiente de sacarosa 7
Carril 9	Fracción de gradiente de sacarosa 8

FIGURA 4

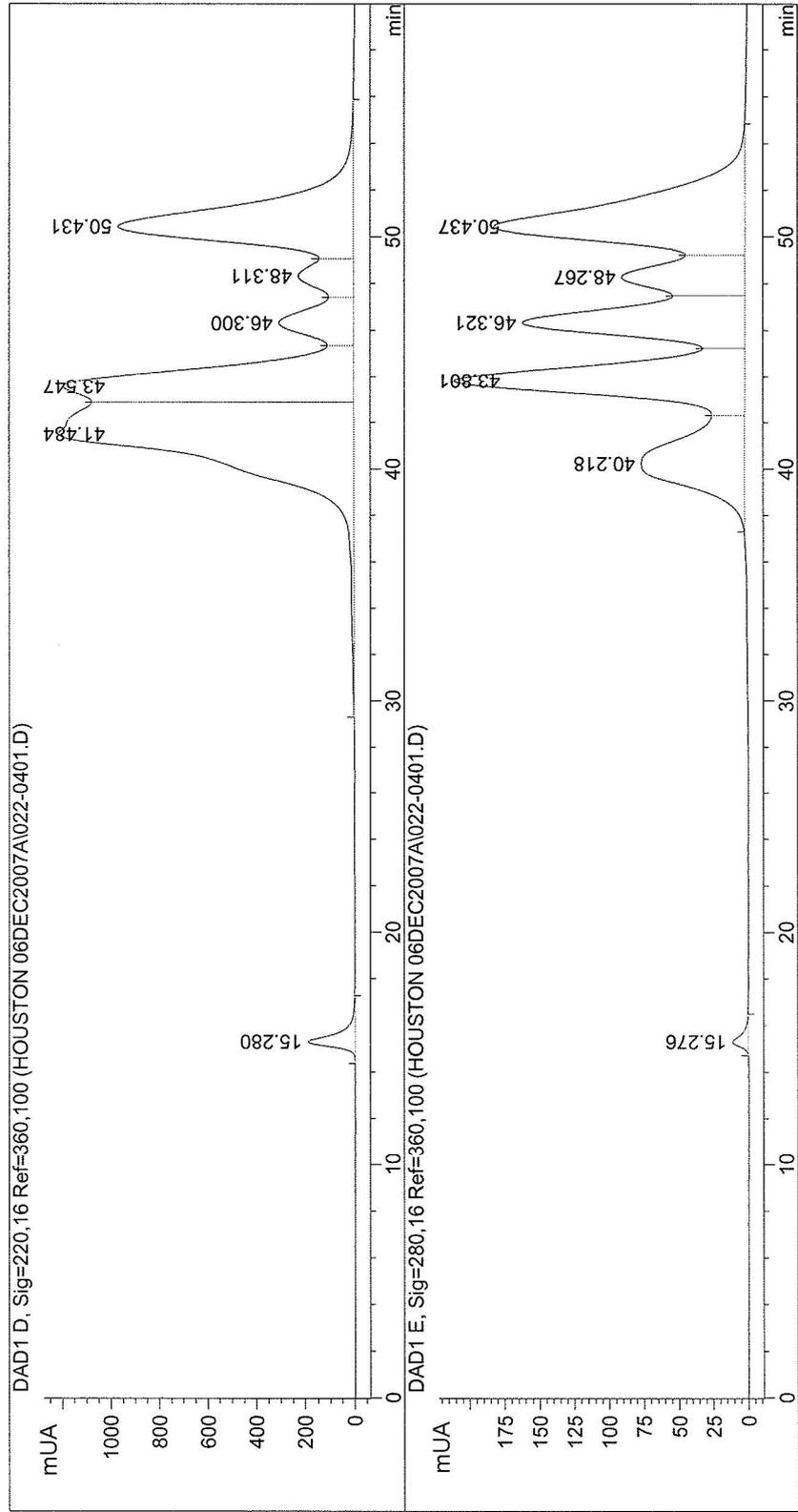


FIGURA 5

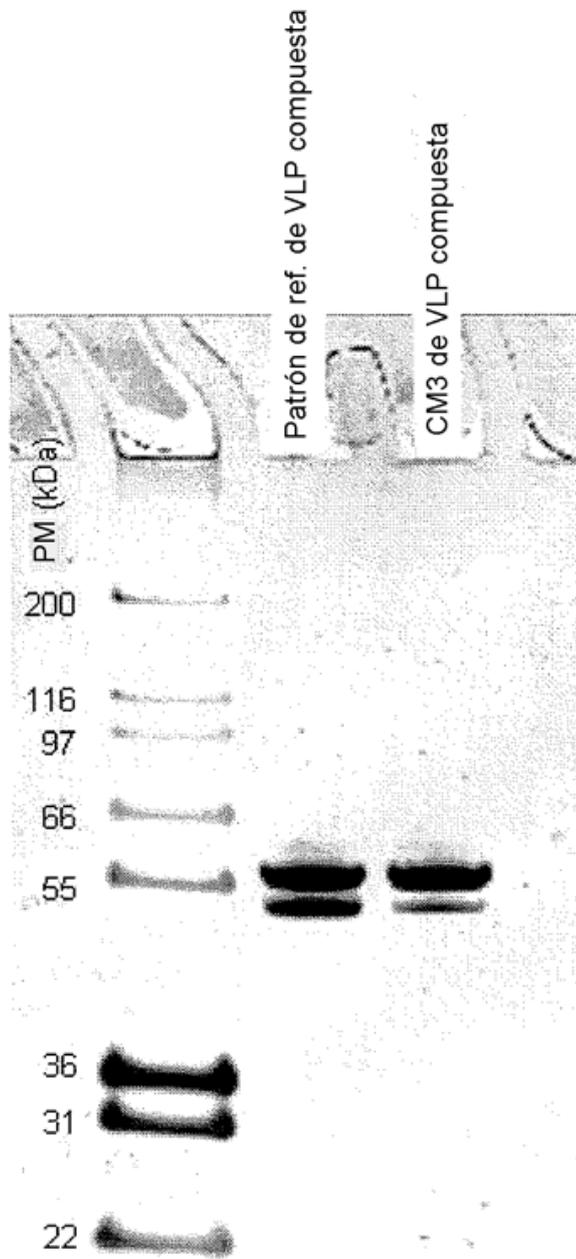


FIGURA 6

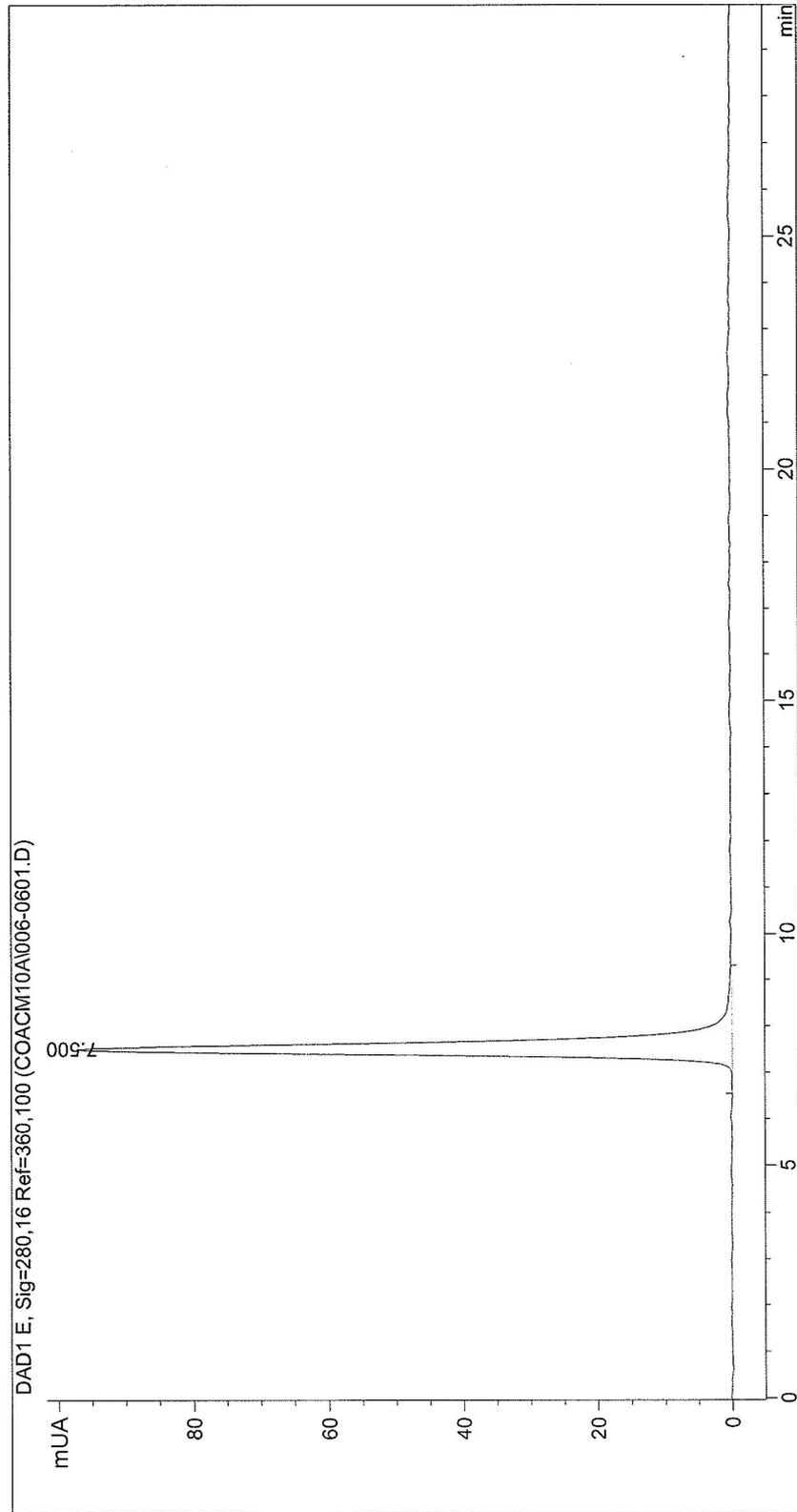


FIGURA 7

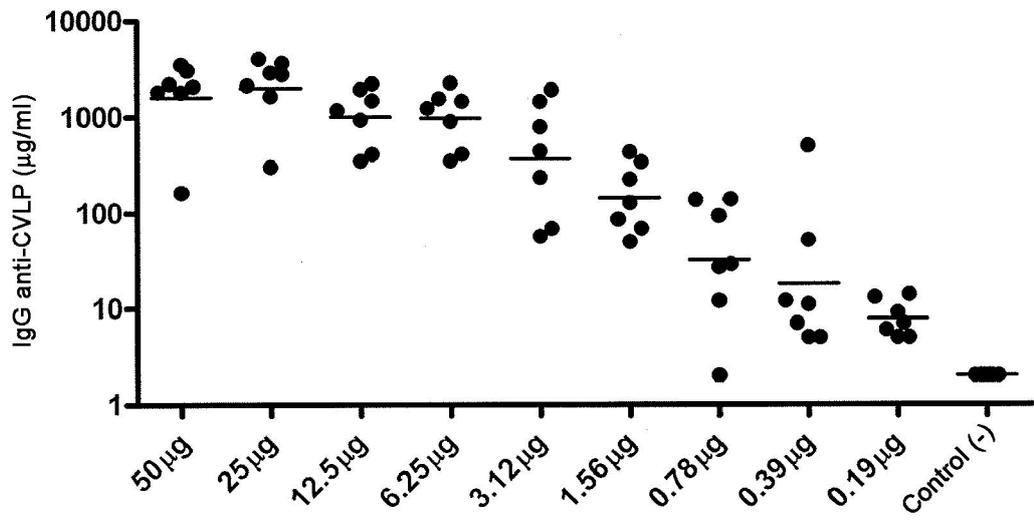


FIGURA 8

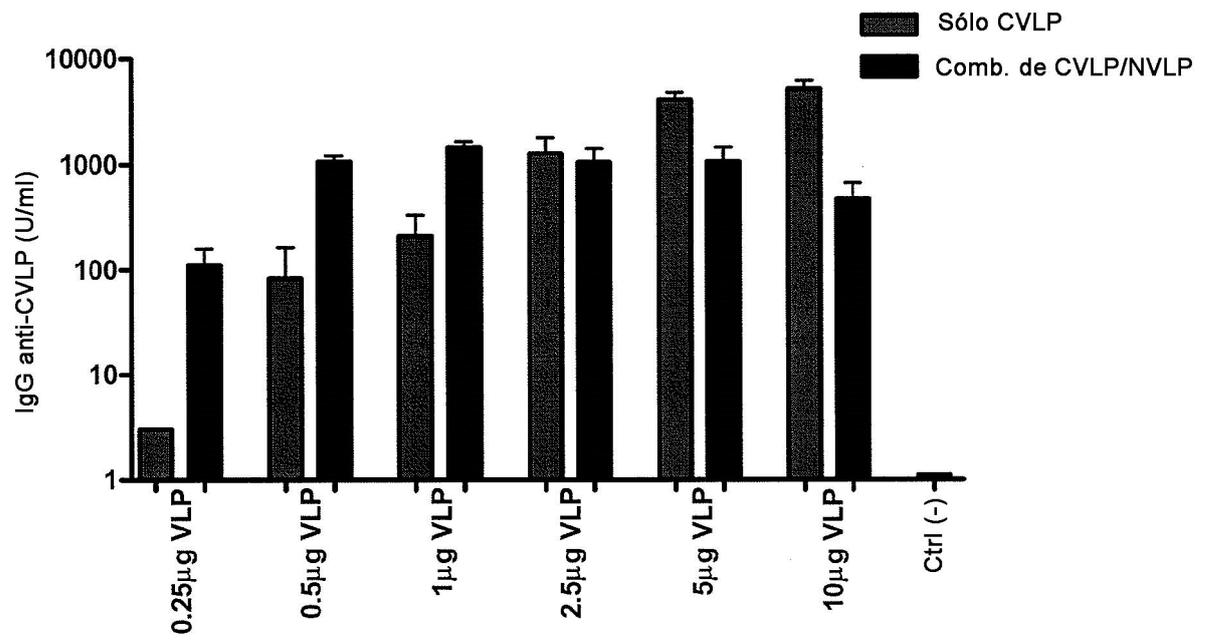


FIGURA 9

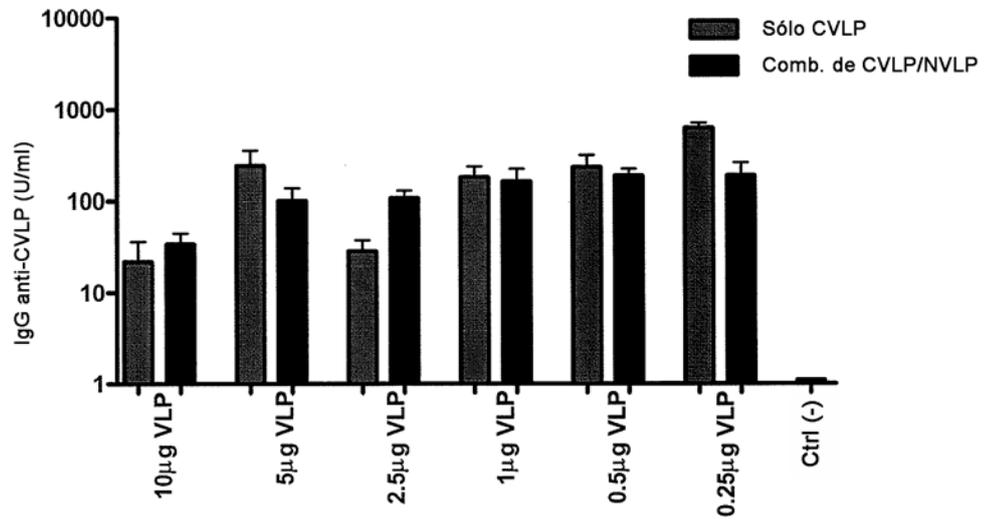


FIGURA 10

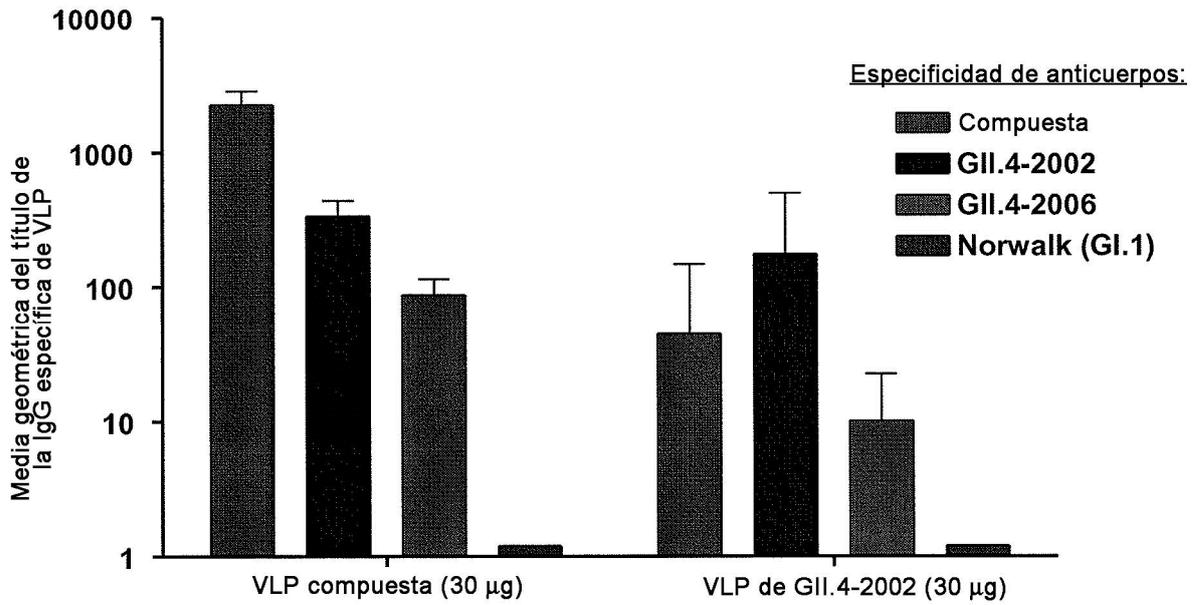


FIGURA 11

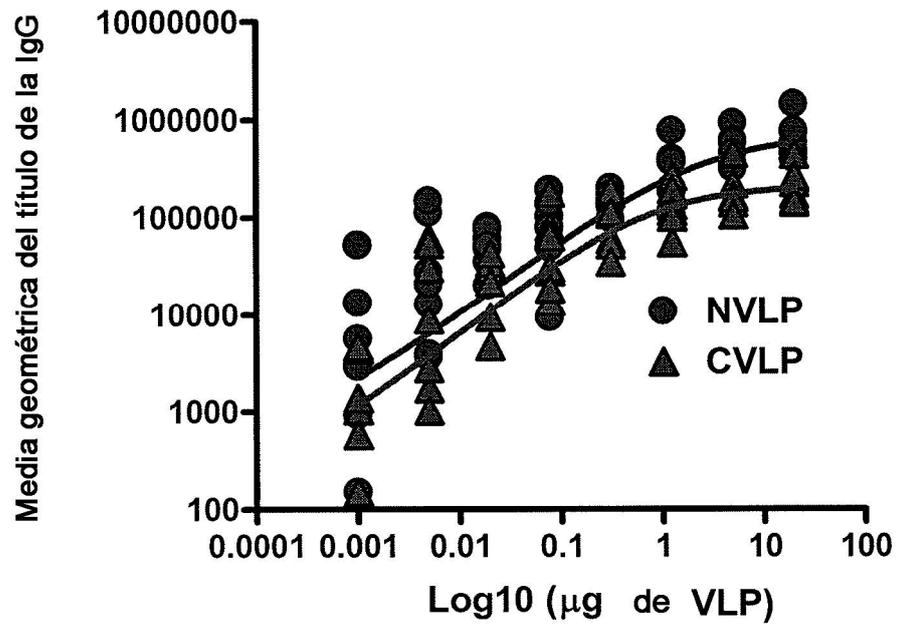


FIGURA 12

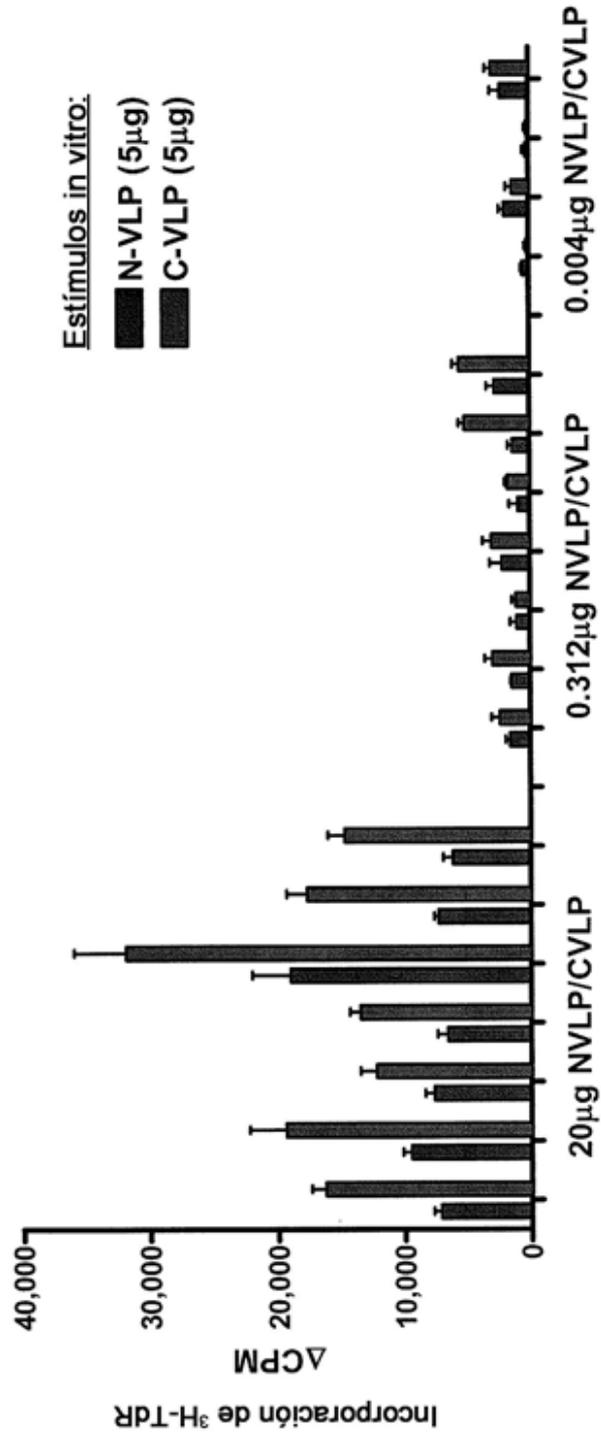


FIGURA 13

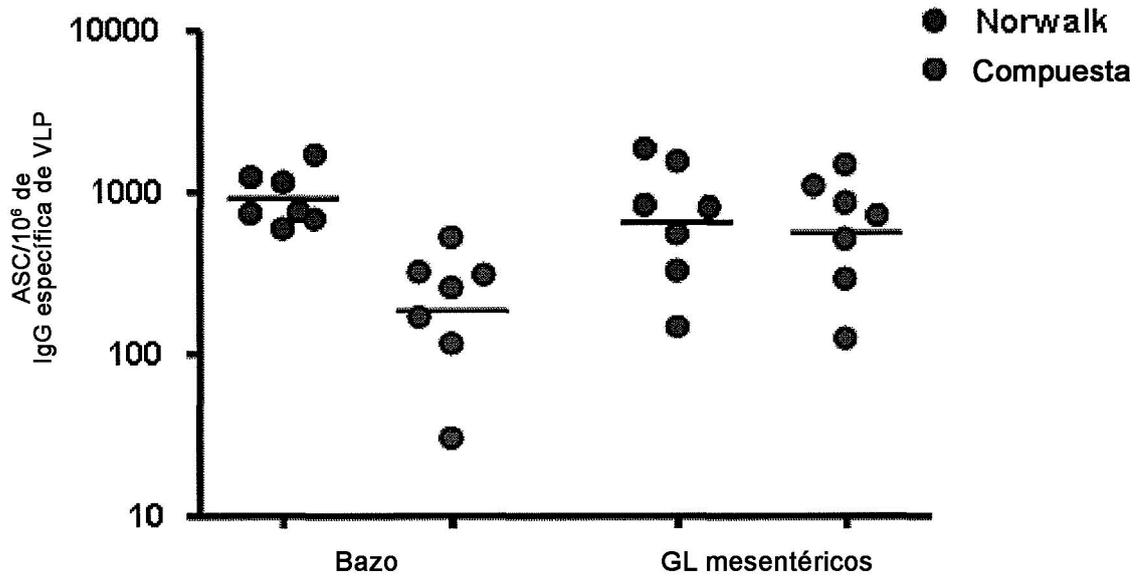


FIGURA 14

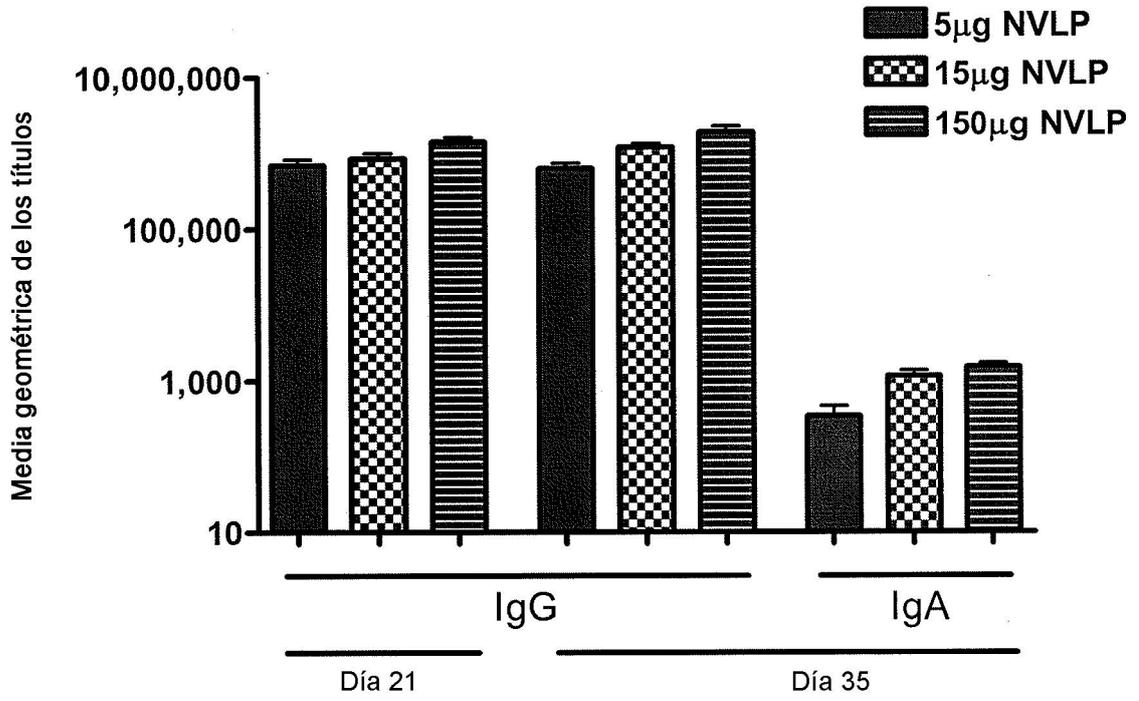


FIGURA 15

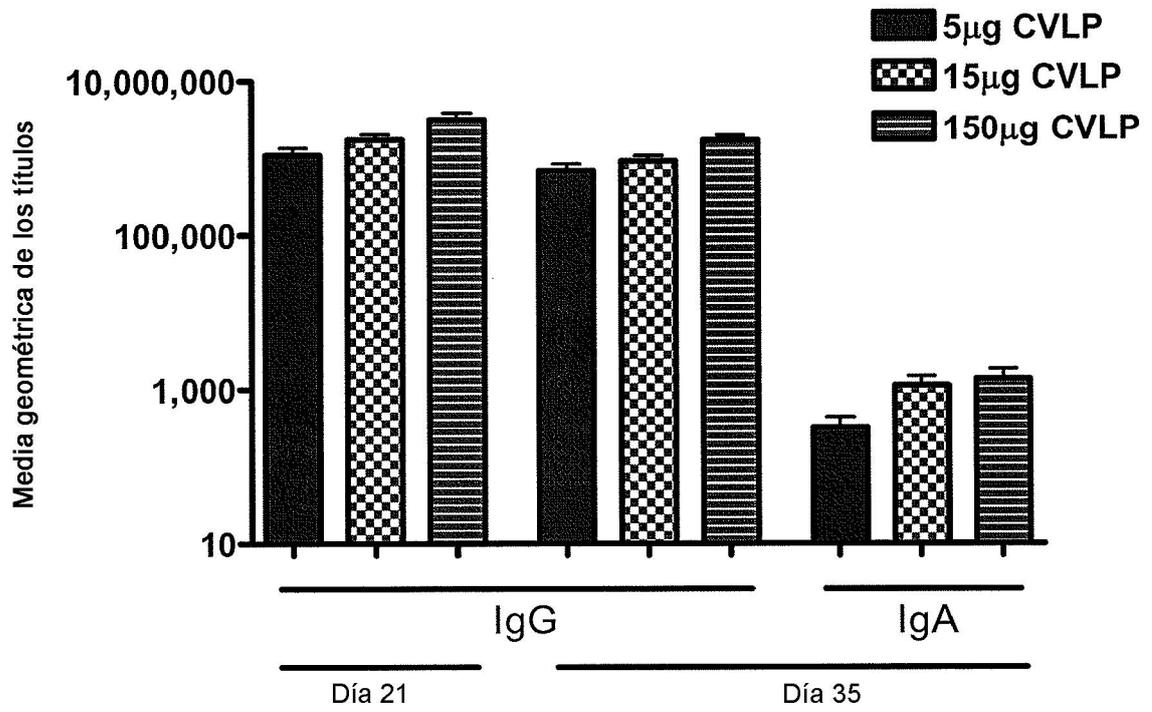


FIGURA 16

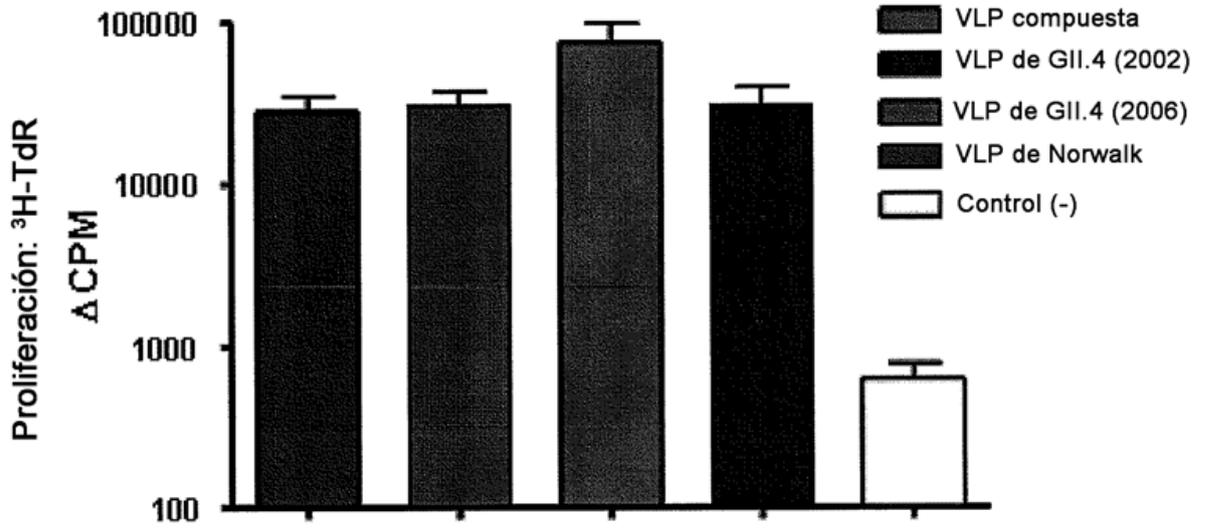


FIGURA 17

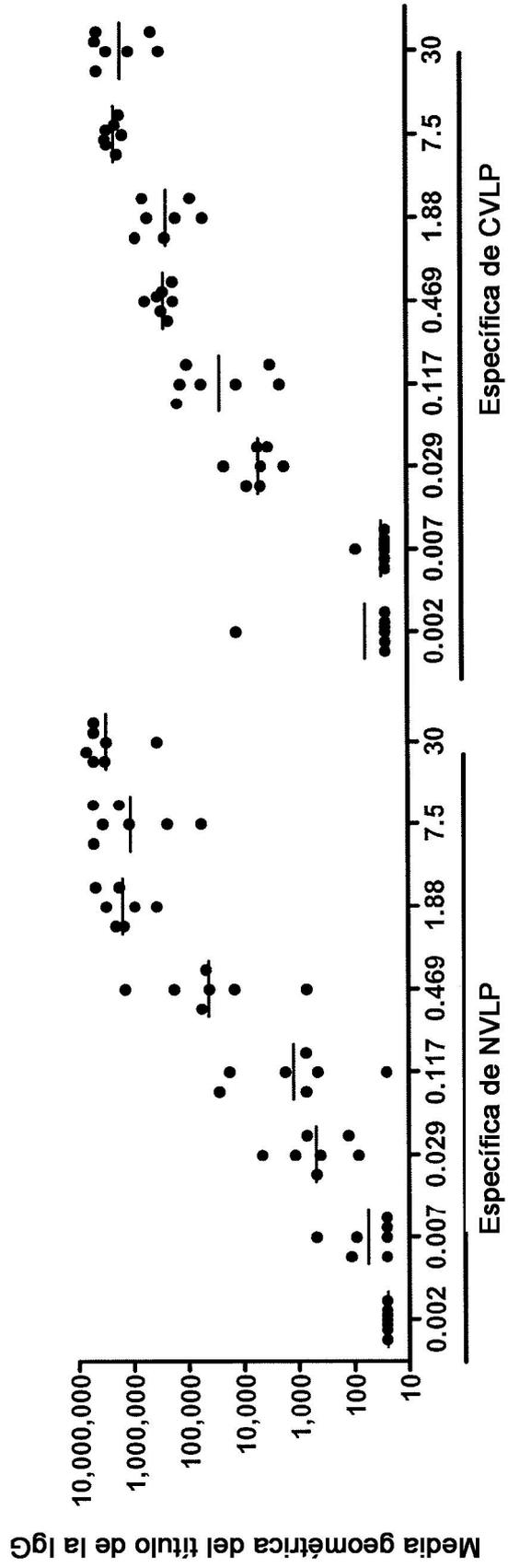


FIGURA 18

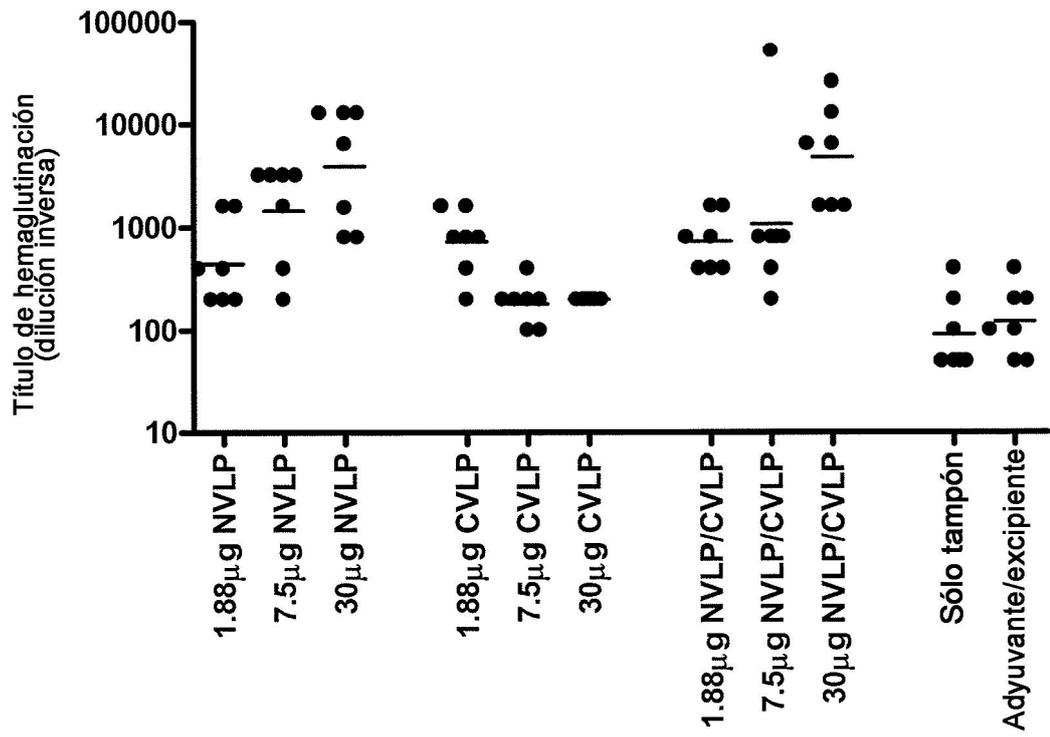


FIGURA 19

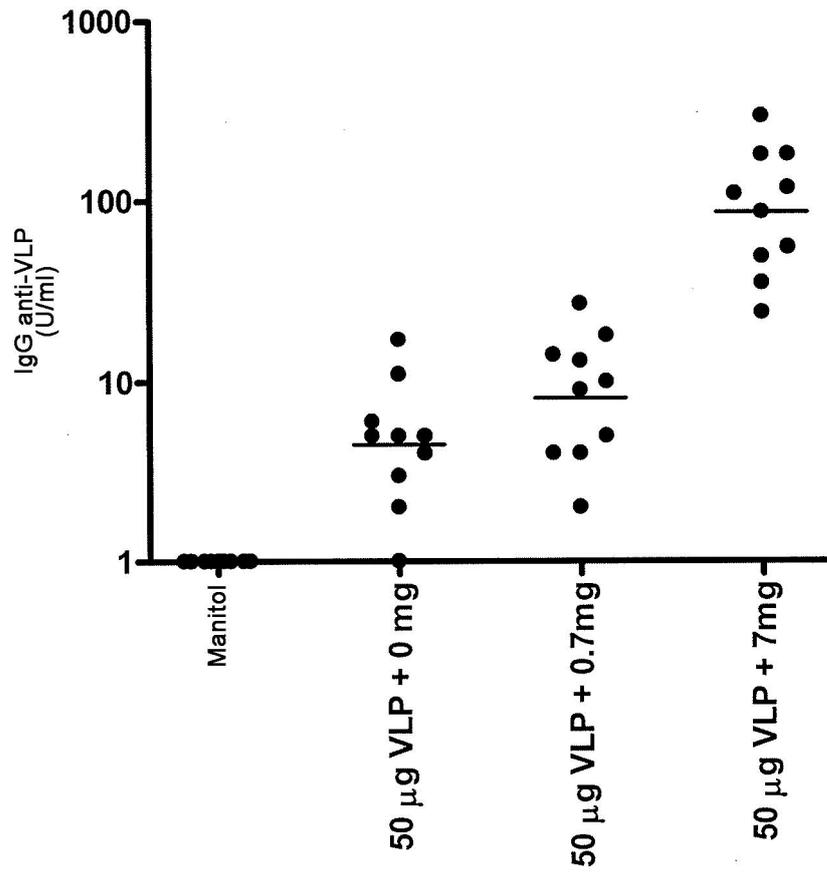


FIGURA 20

MKMASNDAAPSNDGAAGLVPExNNExMALEPVAGAAIAAPLTGQxNIIDPWIRxNFVQAPNGEFTVSPRNSPGEVLL
NLELGPELNPYLAHLARMYNGYAGGxEVQVxLAGNAFTAGKLVFAAIPPHFPIxNLSPxQITMFPHVIIDVRTLEPV
LLPLPDVRNFFHYNQxxDPRMRLVAMLYTPLRSNGSGDDVFTVSCRVLTRPSPDFDFNYLVPPTVESKTKPFTLPI
LTIGELSNSRFPVPIDxLYTSPNExIVVQCQNGRxTLDGELxGTTQLxPSxICAFRGxxTRxxAHLSDQxN-----
-xHRWNIQxTNLNGTFFDPPxEDI PAPLGTPDFxGxVFGVxSQRNPDNT-----xRAHDAxVxTxSxxFTPKLGSV
xIGTWExxDFDxNQPTKFTPV-GLxDTxHFNQWVLPxYSGALTLNMNLAPSVAxFPGEQLLFFRSxLPLKGGxSNG
AIDCLLPQEWVQHfyQESAPSxTxVALVRYxNPDTGRVLFEAKLHRxGFMTVAxNGSxPIVVPNGYFRFDSWVNQF
YSLAPMGTGNGRRRI (SEQ ID NO: 7)

FIGURA 21

MMASKDATxSADGASGAGQLVPEVNTADPLPMDPVAGSSTAVATAGQVNxIDPWIINNFVQAPQGEFTISPNTP
GDVLFDLQLGPHLNPFLSHLSQMYNGWVGNMVRIxLAGNAFTAGKIIVCCVPPGFxSxxLTIAQATLFPHVIADVR
TLDPiEVPLEDVRNVLYHNND-NQP TMRLVCMLYTPLRTGGGSGxxDSFVVAGRVLTCPSPDFNLFLLVPPTVEQKT
RPF'TVPNIPLxxLSNSRXPxPIxGMxLSPDxxQxVQFQNGRCTIDGQLLGTTPVSxSQLxKxRGxITSGxRVLNLTE
LDGxPFMAFxxPAPxGFPDLGxCDWHI xMSKxPNSSxQxxPxxxxSVxTNxQxFVPHLGSIQxDExxS-xxGDYIGT
IxWISPPSxPxGxxxNLWKIPDYGSSLxEAxLAPxVYPPGFGEVLVYFMSxxPGPNxxGAPNxVPCLLPQEYITHF
xSEQAPTxGEAALLHYVDPDTNRNLGEFKLYPGGYLTCVPNGxSxGPQQLPLNGVVFVFSWVSRFYQLKPVGTASxA
RGR LGVRR (SEQ ID NO: 12)

FIGURA 22

MCLYTRVLILHYHLLPLYGPLYHPRPLPxxxxxxxxYxxxxIxCxxxxxxxxxxxxxVNVxxIFxQMxLWRPSDxTVYLP
-PVSKVVxTDxYVxRTNIFYHAGSSRLLAVGHPYF×IKKxxxNKxxVPKVSGYQYRVFRVxLPDPNKFGLPDTSxYN
P×TQRLVWACxGVEVGRGQPLGVGxSGHPLLNKLDDTENSxAYxxN×G×DNRxNVSM DYKQTQLCxxGCAPPIGEHW
GKGTxCxNxxVxxGDCPPLELINTVIQDGMVDTGFGAMDFxTLQxNKSEVPLDICxSICKYPDYLQMxADPYGDSL
FFYLRRREQMFARHFFNRAGTVGE×VPDDLYIKGxGxxASxASSxYxPTPSGSxVTSDAQLFNKPYWLQKAQGHNGI
CWGNQLFVTVVDTRSTNMTLCAS-xSxSxxTYxNTx×FKEYxRHVEEYDLQFIFQLC×ITLTADVMxYIHSMNSSIL
EDWNFGLxPPP×GTLEDTYRFVQSQAITCQK×TPPAEKxDPYKKxxFWEVNLKEKFSxDLQDFPLGRKFLLQAGLR×
KPxxxxGxKRxxPxxSxxSTxAKRKR×Kxx (SEQ ID NO: 17)