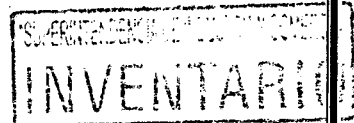


Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD



PATENTE DE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-028640- -00000-0000

21. EXPEDIENTE No.

Fecha: 2014-02-11 15:27:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 112

Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 112

54. TITULO: FORMULACIONES PARENTERALES DE VACUNAS CONTRA LOS NOROVIRUS

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL A61K 39/125

71. SOLICITANTE: TAKEDA VACCINES, INC

DOMICILIO: Montana, Estados Unidos de América.

74. APODERADO SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ

22. BOGOTÁ, D.C.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-028640- -00000-0000

Fecha: 2014-02-11 15:27:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve. 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 112 112

de radicación

DIRECCIÓN DE NUEVAS
SOLICITUD FASE NACH

No. 14-028640- -00000-0000

Fecha: 2014-02-11 15:27:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 112

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de inven ☒ Capítulo I
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)	
Solicitud Internacional No.		PCT/US2012/046222
Publicación Internacional No.		WO 2013/009849 A1
Fecha		11 de Julio de 2012
Fecha		17 de Enero de 2013
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)	
FORMULACIONES PARENTERALES DE VACUNAS CONTRA LOS NOROVIRUS		
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) A61K 39/125	
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria	
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE
TAKEDA VACCINES, INC		IDENTIFICACIÓN
TIPO		
6	DATOS DEL SOLICITANTE	
DIRECCIÓN: 2155 Analysis Drive Bozeman,		No. TELÉFONO:
CIUDAD: Montana 59718,		CORREO ELECTRONICO:
PAÍS DE RESIDENCIA: Estados Unidos de América		LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Estados Unidos de América
7	INVENTOR (ES)	
APELLIDOS		NOMBRES
1.RICHARDSON,		Charles
2.BARGATZE,		Robert, F.
3.MENDELMAN,		Paul, M.
NACIONALIDAD		
Estadounidense		
Estadounidense		
Estadounidense		
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:		
8	DATOS INVENTOR (ES)	
DIRECCIÓN		CIUDAD
1. c/o LIGOCYTE PHARMACEUTICALS, INC 2155 Analysis Drive,		Bozeman,
2. c/o LIGOCYTE PHARMACEUTICALS, INC 2155 Analysis Drive,		Bozeman,
3. c/o LIGOCYTE PHARMACEUTICALS, INC 2155 Analysis Drive,		Bozeman,
ESTADO		PAÍS RESIDENCIA
Montana 59718,		Estados Unidos de América
Montana 59718,		Estados Unidos de América
Montana 59718,		Estados Unidos de América
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)		
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.		
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO	
APELLIDOS		NOMBRES
LÓPEZ DÍAZ		SILVANA MARIA
IDENTIFICACIÓN		
C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ		
DIRECCIÓN		No. TELÉFONO
Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6		6181088
CIUDAD		CORREO
Bogotá, D.C.		ELECTRÓNICO
PAÍS		clarkemodet@clarkemodet.com.co
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO	
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS
Estados Unidos de América		US
(31) NÚMERO		(32) FECHA AAA/MM/DD
61/506,447		2011/07/11

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 14-005930 // 14-00	Fecha 20/01/2014 11/02/2014
16	FIRMA DEL APODERADO :		
SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios: 86		9. ☐ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 38		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 12		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

FORMULACIONES PARENTERALES DE VACUNAS CONTRA LOS NOROVIRUS

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud invoca prioridad de la Solicitud Provisional de Patente de los EE.UU. Nº: 61/506.447, presentada el 11 de julio, 2011, cuyos contenidos se incorporan por completo en la presente a modo de referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] La invención pertenece al campo de las vacunas, en particular de vacunas contra los Norovirus. Además, la invención se relaciona con métodos de preparación de composiciones de vacunas y métodos para inducir y evaluar las respuestas inmunes protectoras contra los Norovirus en seres humanos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] Los Norovirus son Calicivirus humanos no cultivables que representan la principal causa individual de brotes epidémicos de gastroenteritis no bacteriana (Glass *et al.*, 2000; Hardy *et al.*, 1999). Previo al desarrollo de ensayos precisos de diagnóstico molecular, el significado clínico de los Norovirus fue subestimado. La clonación del genogrupo I prototipo del genoma del virus Norwalk (NV) y la producción de partículas tipo virus (VLP) con un sistema de expresión en Baculovirus recombinante condujo al desarrollo de ensayos que revelaron infecciones de Norovirus ampliamente distribuidas (Jiang *et al.*, 1990; 1992).

[0004] Los Norovirus son virus a ARN de cadena simple, de orientación positiva, que contienen un genoma de ARN no segmentado. El genoma viral codifica tres marcos de lectura abiertos, de los cuales los últimos dos especifican la producción de la proteína principal de la cápside y una proteína estructural menor, respectivamente (Glass *et al.*, 2000). Cuando se expresa a niveles altos en sistemas de expresión eucariotas, la proteína de la cápside de NV, y otros determinados Norovirus, se autoensambla forman VLP que imitan estructuralmente a los viriones nativos de Norovirus. Cuando se visualizan por microscopía electrónica de transmisión, no es posible distinguir morfológicamente las VLP de los viriones infecciosos aislados de muestras de heces humanas.

[0005] Las respuestas inmunes a los Norovirus son complejas, y actualmente se están dilucidando sus correlaciones de protección. Estudios en voluntarios humanos realizados usando virus nativos demostraron que las respuestas inmunes de memoria derivados de mucosas proporcionaron una protección a corto plazo contra una infección y sugirieron que era factible una protección mediada por vacunas (Lindesmith *et al.*, 2003; Parrino *et al.*, 1977; Wyatt *et al.*, 1974).

[0006] Aunque no se pueden cultivar Norovirus *in vitro*, debido a la disponibilidad de las VLP y su capacidad para ser producidas en grandes cantidades, se ha logrado un progreso considerable en la definición de la topografía antigénica y estructural de la cápside de Norovirus. Las VLP conservan la confirmación de autenticación de la proteína de la cápside viral en tanto carecen del material genético infeccioso. En consecuencia, las VLP imitan las interacciones funcionales del virus con los receptores celulares, generando de esa manera una respuesta inmune apropiada en el huésped en tanto carecen de la capacidad para reproducirse o para causar una infección. En un trabajo conjunto con el NIH, en el Baylor College of Medicine se estudiaron las respuestas inmunes humores, de mucosas y celulares a las VLP de NV en voluntarios humanos en un estudio clínico académico, de fase I patrocinado por investigadores. Las VLP administradas por vía oral eran seguras e inmunogénicas en adultos saludables (Ball *et al.*, 1999; Tacket *et al.*, 2003). Pero se necesitaron múltiples dosis de una cantidad relativamente alta de VLP para observar una respuesta inmune. En otros centros académicos se demostró en experimentos preclínicos en modelos de animales una mejora de las respuestas inmunes a las VLP cuando son administradas por vía intranasal con adyuvantes de exotoxinas bacterianas (Guerrero *et al.*, 2001; Nicollier-Jamot *et al.*, 2004; Periwai *et al.*, 2003; Souza *et al.*, (2007) Vaccine, volumen 25(50): 8448-59). Sin embargo, la inmunidad protectora contra los Norovirus en humanos continúa siendo difícil de lograr debido a que aún no se han podido identificar claramente los indicadores de una respuesta inmune protectora en humanos (Herbst-Kralovetz *et al.*, (2010) *Expert Rev. Vaccines* 9(3), 299-307).

RESUMEN DE LA INVENCION

[0007] La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento que una sola dosis de una vacuna contra los Norovirus genera una respuesta inmune protectora rápida y robusta contra los Norovirus en humanos cuando es administrada por vía parenteral. Por lo tanto, la presente invención provee un método para generar inmunidad protectora contra los Norovirus en un ser humano que comprende administrar por vía parenteral a dicho ser humano no más de una sola dosis de una composición de vacuna, donde dicha composición comprende VLP del genogrupo I y/o del genogrupo II de Norovirus, en donde dicha composición induce un aumento de por lo menos tres veces en el título de anticuerpos específicos de Norovirus en suero en comparación con el título en el ser humano antes de la administración de la composición. En determinadas formas de realización, el aumento del título de anticuerpos específicos de Norovirus es inducido dentro de los siete días después de la administración de la dosis única de la composición. En algunas formas de realización, la composición de vacuna se administra a dicho ser humano por una ruta de administración intravenosa, subcutánea, intradérmica o intramuscular. En una forma de realización, la composición de vacuna se administra a dicho ser humano por una ruta de administración intramuscular.

[0008] Las composiciones de vacuna de dosis única pueden comprender dosis de entre aproximadamente 5 µg y aproximadamente 150 µg de las VLP del genogrupo I de Norovirus, las VLP del genogrupo II de Norovirus o de ambas. En las formas de realización donde las composiciones de vacuna de dosis única comprenden VLP del genogrupo I y del genogrupo II de Norovirus, la dosis de cada VLP puede ser igual o diferente. En una forma de realización, la composición no comprende más que 50 µg de VLP del genogrupo I de Norovirus. En otra forma de realización, la composición no comprende más que 25 µg de VLP del genogrupo I de Norovirus. En aún otra forma de realización, la composición no comprende más que 150 µg de VLP del genogrupo II de Norovirus. En aún otra forma de realización, la composición no comprende más que 50 µg de VLP del genogrupo II de Norovirus. Las VLP de Norovirus pueden ser VLP monovalentes o

VLP multivalentes.

[0009] En algunos aspectos de la invención, las VLP del genogrupo I de Norovirus en las composiciones de vacuna comprenden una proteína de la cápside derivada de una cepa viral del genogrupo I. En una forma de realización, las VLP del genogrupo I de Norovirus comprenden una proteína de la cápside del genotipo 1 del genogrupo I de Norovirus. En otra forma de realización, las VLP del genogrupo I de Norovirus comprenden una proteína de la cápside del virus Norwalk. En otros aspectos de la invención, las VLP del genogrupo I de Norovirus en las composiciones de vacuna comprenden una proteína de la cápside derivada de una cepa viral del genogrupo I. En algunas formas de realización, las VLP del genogrupo II de Norovirus comprenden una proteína de la cápside del genotipo 4 del genogrupo II de Norovirus. En determinadas formas de realización, las VLP del genogrupo II de Norovirus son VLP generadas a partir de la expresión de una secuencia consenso del genogrupo II de Norovirus. En una forma de realización particular, las VLP del genogrupo II de Norovirus comprenden una proteína de la cápside cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 1.

[0010] En determinadas formas de realización, la composición de vacuna comprende además por lo menos un adyuvante. Preferiblemente, el adyuvante no es un adyuvante de una exotoxina bacteriana. En una forma de realización, el adyuvante es un agonista de un receptor tipo toll, tal como monofosforil lípido A (MPL), flagelina o CpG. En otra forma de realización, el adyuvante es hidróxido de aluminio (por ejemplo, alúmina). En determinadas formas de realización, la composición de vacuna comprende dos adyuvantes, tales como MPL e hidróxido de aluminio. En algunas formas de realización, la composición de vacuna puede comprender además una solución amortiguadora, tal como L-histidina, imidazol, ácido succínico, tris y ácido cítrico. La composición de vacuna se puede formular como un polvo seco o como un líquido. En una forma de realización, la composición de vacuna se formula como un líquido (por ejemplo, como una formulación acuosa).

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

[0011] Figura 1. Resultados de ensayos de pan-ELISA que miden los niveles séricos combinados de IgG, IgA e IgM de voluntarios humanos inmunizados intramuscularmente con placebo (solución salina) o una formulación para vacuna que contiene 5, 15, 50 o 150 µg de cada uno de VLP genogrupo I.1 de Norovirus y VLP genogrupo II.4 de Norovirus. La media geométrica del título para los anticuerpos anti-GI.1 (A) y anti-GII.4 (B) se muestra para cada uno de los niveles de dosificación a los 7 y 21 días después de la primera inmunización y 7 y 28 días después de la segunda inmunización. Los voluntarios recibieron inmunizaciones en los días de estudio 0 y 28.

[0012] Figura 2. Resultados de ensayos de pan-ELISA que miden los niveles séricos combinados de IgG, IgA e IgM de voluntarios humanos inmunizados intramuscularmente con placebo (solución salina) o una formulación para vacuna que contiene 5, 15, 50 o 150 µg de cada uno de VLP genogrupo I.1 de Norovirus y VLP genogrupo II.4 de Norovirus. El aumento en veces de la media geométrica para los anticuerpos anti-GI.1 (A) y anti-GII.4 (B) se muestra para cada uno de los niveles de dosificación a los 7 y 21 días después de la primera inmunización y 7 y 28 días después de la segunda inmunización. Los voluntarios recibieron inmunizaciones en los días de estudio 0 y 28.

[0013] Figura 3. Resultados de ensayos de pan-ELISA que miden los niveles séricos combinados de IgG, IgA e IgM de voluntarios humanos inmunizados intramuscularmente con placebo (solución salina) o una formulación para vacuna que contiene 5, 15, 50 o 150 µg de cada uno de VLP genogrupo I.1 de Norovirus y VLP genogrupo II.4 de Norovirus. Las tasas de serorespuesta porcentual (es decir aumento de cuatro veces en el título de anticuerpo en comparación a los títulos previos a la inmunización) para los anticuerpos anti-GI.1 (A) y anti-GII.4 (B) se muestran para cada uno de los niveles de dosificación a los 7 y 21 días después de la primera inmunización y 7 y 28 días después de la segunda inmunización. Los voluntarios recibieron inmunizaciones en los días de estudio 0 y 28.

[0014] Figura 4. Resultados de ensayos de ELISA que miden IgA sérica de voluntarios humanos inmunizados intramuscularmente con placebo (solución

salina) o una formulación para vacuna que contiene 5, 15 o 50 µg de cada uno de VLP genogrupo I.1 de Norovirus y VLP genogrupo II.4 de Norovirus. La media geométrica del título para los anticuerpos anti-GI.1 (A) y anti-GII.4 (B) se muestra para cada uno de los niveles de dosificación a los 7 y 21 días después de la primera inmunización y 7 y 28 días después de la segunda inmunización. Los voluntarios recibieron inmunizaciones en los días de estudio 0 y 28.

[0015] Figura 5. Resultados de ensayos de ELISA que miden IgA sérica de voluntarios humanos inmunizados intramuscularmente con placebo (solución salina) o una formulación para vacuna que contiene 5, 15 o 50 µg de cada uno de VLP genogrupo I.1 de Norovirus y VLP genogrupo II.4 de Norovirus. El aumento en veces de la media geométrica para los anticuerpos anti-GI.1 (A) y anti-GII.4 (B) se muestra para cada uno de los niveles de dosificación a los 7 y 21 días después de la primera inmunización y 7 y 28 días después de la segunda inmunización. Los voluntarios recibieron inmunizaciones en los días de estudio 0 y 28.

[0016] Figura 6. Resultados de ensayos de ELISA que miden IgA sérica de voluntarios humanos inmunizados intramuscularmente con placebo (solución salina) o una formulación para vacuna que contiene 5, 15 o 50 µg de cada uno de VLP genogrupo I.1 de Norovirus y VLP genogrupo II.4 de Norovirus. Las tasas de serorespuesta porcentual (es decir aumento de cuatro veces en el título de anticuerpo en comparación a los títulos previos a la inmunización) para los anticuerpos anti-GI.1 (A) y anti-GII.4 (B) se muestran para cada uno de los niveles de dosificación a los 7 y 21 días después de la primera inmunización y 7 y 28 días después de la segunda inmunización. Los voluntarios recibieron inmunizaciones en los días de estudio 0 y 28.

[0017] Figura 7. Resultados de ensayos de ELISA que miden IgG sérica de voluntarios humanos inmunizados intramuscularmente con placebo (solución salina) o una formulación para vacuna que contiene 5, 15 o 50 µg de cada uno de VLP genogrupo I.1 de Norovirus y VLP genogrupo II.4 de Norovirus. La media geométrica del título para los anticuerpos anti-GI.1 (A) y anti-GII.4 (B) se muestra para cada uno de los niveles de dosificación a los 7 y 21 días después de la

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

[0018] Figura 8. Resultados de ensayos de ELISA que miden IgG sérica de voluntarios humanos inmunizados intramuscularmente con placebo (solución salina) o una formulación para vacuna que contiene 5, 15 o 50 µg de cada uno de VLP genogrupo I.1 de Norovirus y VLP genogrupo II.4 de Norovirus. El aumento en veces de la media geométrica para los anticuerpos anti-GI.1 (A) y anti-GII.4 (B) se muestra para cada uno de los niveles de dosificación a los 7 y 21 días después de la primera inmunización y 7 y 28 días después de la segunda inmunización. Los voluntarios recibieron inmunizaciones en los días de estudio 0 y 28.

[0019] Figura 9. Resultados de ensayos de ELISA que miden IgG sérica de voluntarios humanos inmunizados intramuscularmente con placebo (solución salina) o una formulación para vacuna que contiene 5, 15 o 50 µg de cada uno de VLP genogrupo I.1 de Norovirus y VLP genogrupo II.4 de Norovirus. Las tasas de serorespuesta porcentual (es decir aumento de cuatro veces en el título de anticuerpo en comparación a los títulos previos a la inmunización) para los anticuerpos anti-GI.1 (A) y anti-GII.4 (B) se muestran para cada uno de los niveles de dosificación a los 7 y 21 días después de la primera inmunización y 7 y 28 días después de la segunda inmunización. Los voluntarios recibieron inmunizaciones en los días de estudio 0 y 28.

[0020] Figura 10. Resultados de ensayos de pan-ELISA que miden los niveles séricos combinados de IgG, IgA e IgM de voluntarios humanos inmunizados con una vacuna de Norovirus intranasal, monovalente como se describe en El Kamary *et al.* (2010) J Infect Dis, Vol. 202(11): 1649-1658 (grupos LV01-103) o una vacuna de Norovirus intramuscular, bivalente como se describe en el Ejemplo 1 (grupos LV03-104) a los puntos de tiempo indicados. Los voluntarios humanos recibieron placebo o dos dosis de la formulación para vacuna intramuscular o intranasal. La vacuna de Norovirus intramuscular, bivalente contenía 5 µg de cada uno de VLP genogrupo I.1 de Norovirus y VLP genogrupo II.4 de Norovirus. La vacuna intranasal, monovalente contenía 100 µg de un

genogrupo I.1 Norovirus. Los voluntarios que recibieron la vacuna intranasal o placebo fueron desafiados con Norovirus vivo luego de la segunda inmunización.

[0021] Figura 11. Análisis por FACS de células mononucleares de sangre periférica obtenidas de voluntarios humanos en el Día 0 antes de la inmunización con una dosis de 5 µg de vacuna de Norovirus intramuscular, bivalente (A) o placebo (B) y el Día 7 luego de la inmunización. Las PBMC CD19+ están dirigidas a mucosa tal como resulta evidente de la expresión del receptor de migración alfa 4/beta 7 y el receptor de quimoquina CCR10.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0022] La presente invención se relaciona con métodos para generar una inmunidad protectora contra infecciones por Norovirus en un sujeto. En particular, la presente invención provee métodos para generar una inmunidad protectora contra los Norovirus en un ser humano mediante la administración por vía parenteral a dicho ser humano de no más de una sola dosis de una vacuna que comprende VLP de Norovirus y opcionalmente por lo menos un adyuvante, en donde la vacuna confiere protección contra por lo menos un síntoma de infección por Norovirus, la mejora del mismo. Los inventores han descubierto sorprendentemente que la administración intramuscular de no más de una sola dosis de una composición de vacuna que comprende VLP de Norovirus a seres humanos induce una seroconversión sérica rápida (es decir, dentro de los 7 días desde la inmunización) (o sea, un aumento de por lo menos tres veces del título de anticuerpos específicos del antígeno en suero por encima de los niveles de prevacunación) que es indicativa de una respuesta inmune protectora contra una infección y enfermedad debidas a Norovirus. Las respuestas inmunes inducidas por esta composición de vacuna de dosis única alcanzan un plateau a títulos altos de anticuerpos similares a los observados con una infección natural con la administración de virus vivos en estudios de desafío en humanos. Notablemente, no es necesaria una dosis de refuerzo de la vacuna ya que la respuesta inmune no aumenta con otra administración de una dosis de vacuna adicional.

[0023] La invención provee una composición de vacuna que comprende uno o más antígenos de Norovirus. Los términos "Norovirus", "Norovirus (NOR)",

“norovirus” y equivalentes gramaticales utilizados en la presente, se refieren a los miembros del género Norovirus de la familia Caliciviridae. En algunas formas de realización, un Norovirus puede incluir un grupo de virus con envoltura a ARN, de cadena simple, de orientación positive, relacionados que pueden ser infecciosos para especies de mamíferos humanos o no humanos. En algunas formas de realización, un Norovirus puede causar una gastroenteritis aguda en seres humanos. Los Norovirus también se conocen como virus estructurados redondos pequeños (SRSV) que tienen una estructura de superficie definida o un borde irregular cuando se observa por microscopía electrónica.

[0024] Los Norovirus incluyen por lo menos cinco genogrupos (GI, GII, GIII, GIV y GV). Los Norovirus de los grupos GI, GII, y GIV son infecciosos en seres humanos, en tanto los Norovirus del grupo GIII infectan primariamente especies de bovinos. El grupo GV fue aislado recientemente de ratones (Zheng *et al.*, (2006) *Virology*, volumen 346: 312-323). Son representativas de GIII las cepas Jena y Newbury, en tanto las cepas Alpatron, Fort Lauderdale y Saint Cloud son representativas de GIV. Los grupos GI y GII pueden segregarse además en agrupaciones genéticas o genotipos basado en la clasificación genética (Ando *et al.*, (2000) *J. Infectious Diseases*, volumen 181 (Supl. 2): S336-S348; Lindell *et al.*, (2005) *J. Clin. Microbiol.*, volumen 43(3): 1086-1092). Según se usa en la presente, el término agrupaciones genéticas se usa indistintamente con el término genotipos. En el genogrupo I, hasta la fecha se conocen 8 agrupaciones GI (con el nombre de la cepa del virus prototipo): GI.1 (Norwalk (NV-USA93)); GI.2 (Southampton (SOV-GBR93)); GI.3 (Desert Shield (DSV-USA93)); GI.4 (virus Cruise Ship/Chiba (Chiba-JPN00)); GI.5 (318/Musgrove (Musgrove-GBR00)); GI.6 (Hesse (Hesse-DEU98)); GI.7 (Winchest-GBR00); y GI.8 (Boxer-USA02). En el genogrupo II, hasta la fecha se conocen 19 agrupaciones GII (con el nombre de la cepa del virus prototipo): GII.1 (Hawaii (Hawaii-USA94)); GII.2 (Snow Mountain/Melksham (Msham-GBR95)); GII.3 (Toronto (Toronto-CAN93)); GII.4 (Bristol/Lordsdale (Bristol-GBR93)); GII.5 (290/Hillingdon (Hillingdon-GBR00)); GII.6 (269/Seacroft (Seacroft-GBR00)); GII.7 (273/Leeds (Leeds-GBR00)); GII.8 (539/Amsterdam (Amsterdam-NLD99)); GII.9 (378 (VABeach-USA01)), GII.10

(Erfurt-DEU01); GII.11 (SW9180JPN01); GII.12 (Wortley-GBR00); GII.13 (Faytville-USA02); GII.14 (M7-USA03); GII.15 (J23-USA02); GII.16 (Tiffin-USA03); GII.17 (CSE1-USA03); GII.18 (QW101/2003/US) y GII.19 (QW170/2003/US).

[0025] En la presente, el término "Norovirus" también significa partículas tipo virus de Norovirus recombinante (VLP de rNOR). En algunas formas de realización, la expresión recombinante de por lo menos la proteína de la cápside de Norovirus codificada por ORF2 en las células, por ejemplo, a partir de un vector de baculovirus en células Sf9, puede dar como resultado el autoensamblaje espontáneo de la proteína de la cápside en VLP. En algunas formas de realización, la expresión recombinante de por lo menos las proteínas de Norovirus codificadas por ORF1 y ORF2 en las células, por ejemplo, a partir de un vector de baculovirus en las células Sf9, puede dar como resultado el autoensamblaje espontáneo de la proteína de la cápside en VLP. Las VLP son estructuralmente similares a los Norovirus pero carecen del genoma de ARN viral y por ello no son infecciosas. Por lo tanto, el término "Norovirus" incluye los viriones que pueden ser partículas infecciosas o no infecciosas, que incluyen partículas defectuosas.

[0026] Los ejemplos no taxativos de Norovirus incluyen la cepa Hu/NoV/West Chester/2001/USA del genogrupo 1 de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY502016; virus Chiba (CHV, GenBank AB042808); cepa Hu/NoV/Braddock Heights/1999/USA del genogrupo 2 de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY502015; cepa Hu/NoV/Fayette/1999/USA del genogrupo 2 de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY502014; cepa Hu/NoV/Fairfield/1999/USA del genogrupo 2 de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY502013; cepa Hu/NoV/Sandusky/1999/USA del genogrupo 2 de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY502012; cepa Hu/NoV/Canton/1999/USA del genogrupo 2 de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY502011; cepa Hu/NoV/Tiffin/1999/USA del genogrupo 2 de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY502010; cepa Hu/NoV/CS-E1/2002/USA del genogrupo 2 de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY50200; cepa Hu/NoV/Wisconsin/2001/USA del genogrupo 1 de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY502008; cepa Hu/NoV/CS-841/2001/USA del genogrupo 1 de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY502007; cepa Hu/NoV/Hiram/2000/USA del genogrupo

2 de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY502006; cepa Hu/NoV/Tontogany/1999/USA del genogrupo 2 de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY502005; virus Norwalk, genoma completo, Acceso de GenBank N° NC.sub.--001959; ARN genómico Hu/GI/Otofuke/1979/JP de Norovirus, genoma completo, Acceso de GenBank N° AB187514; Hu/Hokkaido/133/2003/JP de Norovirus, Acceso de GenBank N° AB212306; Sydney 2212 de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY588132; cepa SN2000JA del virus Norwalk, Acceso de GenBank N° AB190457; genoma completo del virus Lordsdale, Acceso de GenBank N° X86557; ARN genómico del virus tipo Norwalk, Gifu'96, Acceso de GenBank N° AB045603; cepa Vietnam 026 del virus Norwalk, genoma completo, Acceso de GenBank N° AF504671; Hu/GII,4/2004/N/L de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY883096; Hu/GII/Hokushin/03/JP de Norovirus, Acceso de GenBank N° AB195227; Hu/GII/Kamo/03/JP de Norovirus, Acceso de GenBank N° AB195228; Hu/GII/Sinsiro/97/JP de Norovirus, Acceso de GenBank N° AB195226; Hu/GII/Ina/02/JP de Norovirus, Acceso de GenBank N° AB195225; Hu/NLV/GII/Neustrelitz260/2000/DE de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY772730; Hu/NLV/Dresden174/pUS-NorII/1997/GE de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY741811; Hu/NLV/Oxford/B2S16/2002/UK de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY587989; Hu/NLV/Oxford/B4S7/2002/UK de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY587987; Hu/NLV/Witney/B7S2/2003/UK de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY588030; Hu/NLV/Banbury/B9S23/2003/UK de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY588029; Hu/NLV/ChippingNorton/2003/UK de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY588028; Hu/NLV/Didcot/B9S2/2003/UK de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY588027; Hu/NLV/Oxford/B8S5/2002/UK de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY588026; Hu/NLV/Oxford/B6S4/2003/UK de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY588025; Hu/NLV/Oxford/B6S5/2003/UK de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY588024; Hu/NLV/Oxford/B5S23/2003/UK de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY588023; Hu/NLV/Oxford/B6S2/2003/UK de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY588022; Hu/NLV/Oxford/B6S6/2003/UK de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY588021; forma aislada Bo/Thirsk10/00/UK del virus tipo Norwalk, Acceso de GenBank N° AY126468; forma aislada Bo/Penrith55/00/UK

del virus tipo Norwalk, Acceso de GenBank N° AY126476; forma aislada Bo/Aberystwyth24/00/UK del virus tipo Norwalk, Acceso de GenBank N° AY126475; forma aislada Bo/Dumfries/94/UK del virus tipo Norwalk, Acceso de GenBank N° AY126474; NLV/IF2036/2003/Iraq de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY675555; NLV/IF1998/2003/Iraq de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY675554; NLV/BUDS/2002/USA de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY660568; NLV/Paris Island/2003/USA de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY652979; virus Snow Mountain, genoma completo, Acceso de GenBank N° AY134748; NLV/Fort Lauderdale/560/1998/US del virus tipo Norwalk, Acceso de GenBank N° AF414426; Hu/Norovirus/hiroshima/1999/JP(9912-02F), Acceso de GenBank N° AB044366; cepa 11MSU-MW del virus tipo Norwalk, Acceso de GenBank N° AY274820; cepa B-1SVD del virus tipo Norwalk, Acceso de GenBank N° AY274819; cepa Hu/NoV/Farmington Hills/2002/USA del genogrupo 2 de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY502023; cepa Hu/NoV/CS-G4/2002/USA del genogrupo 2 de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY502022; cepa Hu/NoV/CS-G2/2002/USA del genogrupo 2 de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY502021; cepa Hu/NoV/CS-G12002/USA del genogrupo 2 de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY502020; cepa Hu/NoV/Anchorage/2002/USA del genogrupo 2 de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY502019; cepa Hu/NoV/CS-D1/2002/CAN del genogrupo 2 de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY502018; cepa Hu/NoV/Germanton/2002/USA del genogrupo 2 de Norovirus, Acceso de GenBank N° AY502017; NLV/GII/Langen1061/2002/DE del calicivirus humano, genoma completo, Acceso de GenBank N° AY485642; poliproteína de Norovirus 1 de Murinos, Acceso de GenBank N° AY228235; virus Norwalk, Acceso de GenBank N° AB067536; NLV/Mex7076/1999 del Calicivirus humano, Acceso de GenBank N° AF542090; NLV/Oberhausen 455/01/DE del Calicivirus humano, Acceso de GenBank N° AF539440; NLV/Herzberg 385/01/DE del Calicivirus humano, Acceso de GenBank N° AF539439; NLV/Boxer/2001/US del Calicivirus humano, Acceso de GenBank N° AF538679; ARN genómico del virus tipo Norwalk, genoma completo, Acceso de GenBank N° AB081723; ARN genómico del virus tipo Norwalk, genoma completo, forma aislada: Saitama U201, Acceso de GenBank N°

AB039782; ARN genómico del virus tipo Norwalk, genoma completo, forma aislada: Saitama U18, Acceso de GenBank N° AB039781; ARN genómico del virus tipo Norwalk, genoma completo, forma aislada: Saitama U25, Acceso de GenBank N° AB039780; virus Norwalk cepa: U25GII, Acceso de GenBank N° AB067543; virus Norwalk cepa: U201 GII, Acceso de GenBank N° AB067542; cepa 416/97003156/1996/LA del virus tipo Norwalk, Acceso de GenBank N° AF080559; cepa 408/97003012/1996/FL de virus tipo Norwalk, Acceso de GenBank N° AF080558; NLV/Burwash Landing/331/1995/US del virus tipo Norwalk, Acceso de GenBank N° AF414425; NLV/Miami Beach/326/1995/US del virus tipo Norwalk, Acceso de GenBank N° AF414424; NLV/White River/290/1994/US del virus tipo Norwalk, Acceso de GenBank N° AF414423; NLV/New Orleans/306/1994/US del virus tipo Norwalk, Acceso de GenBank N° AF414422; NLV/Port Canaveral/301/1994/US del virus tipo Norwalk, Acceso de GenBank N° AF414421; NLV/Honolulu/314/1994/US del virus tipo Norwalk, Acceso de GenBank N° AF414420; NLV/Richmond/283/1994/US del virus tipo Norwalk, Acceso de GenBank N° AF414419; NLV/Westover/302/1994/US del virus tipo Norwalk, Acceso de GenBank N° AF414418; NLV/UK3-17/12700/1992/GB del virus tipo Norwalk, Acceso de GenBank N° AF414417; NLV/Miami/81/1986/US del virus tipo Norwalk, Acceso de GenBank N° AF414416; cepa Snow Mountain, Acceso de GenBank N° U70059; virus Desert Shield DSV395, Acceso de GenBank N° U04469; virus Norwalk, genoma completo, Acceso de GenBank N° AF093797; calicivirus de Hawaii, Acceso de GenBank N° U07611; virus Southampton, Acceso de GenBank N° L07418; virus Norwalk (SRSV-KY-89/89/J), Acceso de GenBank N° L23828; virus Norwalk (SRSV-SMA/76/US), Acceso de GenBank N° L23831; virus Camberwell, Acceso de GenBank N° U46500; cepa Melksham de Calicivirus humano, Acceso de GenBank N° X81879; cepa MX de Calicivirus humano, Acceso de GenBank N° U22498; Minireovirus TV24, Acceso de GenBank N° U02030; y NLV/Gwynedd/273/1994/US del virus tipo Norwalk, Acceso de GenBank N° AF414409; todas cuyas secuencias (para la fecha de presentación de esta solicitud) se incorporan en la presente a modo de referencia. Otras secuencias de Norovirus se divulgan en las siguientes publicaciones de patentes:

WO 2005/030806, WO 2000/79280, JP2002020399, US2003129588, Patente de los EE.UU. N°: 6.572.862, WO 1994/05700 y WO 05/032457, todas las cuales se incorporan por completo en la presente a modo de referencia. Véase también Green *et al.*, (2000) *J. Infect. Dis.*, volumen 181 (Supl. 2): S322-330; Wang *et al.*, (1994) *J. Virol.*, volumen 68: 5982-5990; Chen *et al.*, (2004) *J. Virol.*, volumen 78: 6469-6479; Chakravarty *et al.*, (2005) *J. Virol.*, volumen 79: 554-568; Hansman *et al.*, (2006) *J. Gen. Virol.*, volumen 87: 909-919; Bull *et al.*, (2006) *J. Clin. Micro.*, volumen 44(2): 327-333; Siebenga, *et al.*, (2007) *J. Virol.*, volumen 81(18): 9932-9941, y Fankhauser *et al.*, (1998) *J. Infect. Dis.*, volumen 178: 1571-1578; por la comparaciones de secuencias y una discusión sobre la diversidad genética y el análisis filogenético de los Norovirus. El ácido nucleico y la correspondiente secuencia de aminoácidos de cada una se incorporan todos por completo en la presente a modo de referencia. En algunas formas de realización, se puede usar un criptograma para la identificación y se organiza según: especie de huésped a partir de la cual se aisló el virus/abreviatura del género/abreviatura de la especie/nombre de la cepa/año de aparición/país de origen. (Green *et al.*, *Human Caliciviruses*, en *Fields Virology* volumen 1 841-874 (Knipe y Howley, editores ejecutivos, 4a. ed., Lippincott Williams & Wilkins 2001)). En algunas formas de realización se prefieren las cepas virales del genotipo 4 (GII.4) del genogrupo II, (por ejemplo, las cepas Houston, Minerva (también conocida como Den Haag) y Laurens (también conocida como Yerseke)). A medida que se identifican nuevas cepas y se vuelven disponibles secuencias genéticas, el especialista en el arte podría emplear VLP usando estas cepas contemporáneas en las composiciones y los métodos de la presente invención usando conocimientos comunes. Por consiguiente, la presente invención contempla las VLP elaboradas a partir de dichas cepas como antígenos adecuados para su uso en las composiciones y los métodos que se describen en la presente.

[0027] El antígeno de Norovirus se puede encontrar en la forma de péptidos, proteínas o partículas tipo virus (VLP). En una forma de realización preferida, el antígeno de Norovirus comprende VLP. Según se usa en la presente, "las partículas tipo virus o VLP" se refieren a partículas tipo virus, fragmento(s),

agregados o porciones de las mismas producidas a partir de la secuencia que codifica la proteína de la cápside de Norovirus y que comprende características antigénicas similares a las de partículas infecciosas de Norovirus. Los antígenos de Norovirus también se pueden encontrar en la forma de monómeros de la cápside, multímeros de la cápside, proteínas o fragmentos de péptidos de VLP, o agregados o mezclas de los mismos. Las proteínas o los péptidos antigénicos de Norovirus también se pueden encontrar en una forma desnaturalizada, producida usando métodos conocidos en el arte.

[0028] Las VLP de la presente invención se pueden formar ya sea a partir de la proteína de la cápside de Norovirus de longitud completa tales como las proteínas VP1 y/o VP2 o determinados derivados de VP1 o VP2 usando métodos estándar en el arte. Como alternativa, la proteína de la cápside usada para formar la VLP es una proteína de la cápside truncada. En algunas formas de realización, por ejemplo, por lo menos una de las VLP comprende una proteína VP1 truncada. En otras formas de realización, todas las VLP comprenden proteínas VP1 truncadas. El truncamiento puede ser un truncamiento N- o C-terminal. Las proteínas de la cápside truncadas convenientemente son derivados funcionales de la proteína de la cápside. Los derivados funcionales de la proteína de la cápside tienen la capacidad para generar una respuesta inmune (si fuera necesario, con el uso adyuvantes apropiados) de la misma manera que la respuesta inmune generada por una VLP que consiste en la proteína de la cápside de longitud completa.

[0029] Las VLP pueden contener proteínas VP1 principales y/o proteínas VP2 menores. En algunas formas de realización, cada VLP contiene una proteína VP1 y/o VP2 de un sólo genogrupo de Norovirus lo que origina una VLP monovalente. Según se usa en la presente, el término "monovalente" significa que las proteínas antigénicas derivan de un solo genogrupo de Norovirus. Por ejemplo, las VLP contienen VP1 y/o VP2 de una cepa de virus del genogrupo I (por ejemplo, VP1 y VP2 del virus Norwalk). Preferiblemente la VLP está compuesta predominantemente por proteínas VP1. En una forma de realización de la invención, el antígeno es una mezcla de VLP monovalentes, en donde la

composición incluye VLP compuestas por VP1 y VP2 de un solo genogrupo de Norovirus mezcladas con VLP compuestas por VP1 y VP2 de un genogrupo de Norovirus diferente (por ejemplo, del virus Norwalk y del virus Houston) tomadas de múltiples cepas virales. A modo de ejemplo solamente, la composición puede contener VLP monovalentes de una o más cepas del genogrupo I de Norovirus junto con VLP monovalentes de una o más cepas del genogrupo II de Norovirus. Las cepas se pueden seleccionar basado en su predominancia en la circulación en un momento dado. En determinadas formas de realización, la mezcla de VLP de Norovirus está compuesta por las cepas virales GI.1 y GII.4. Más preferiblemente, la mezcla de VLP de Norovirus está compuesta por cepas de Norwalk y una secuencia consenso de la cápside derivada del genogrupo II de Norovirus. Las secuencias consenso de la cápside derivadas de secuencias de Norovirus Norovirus y las VLP elaboradas con dichas secuencias se describen en WO 2010/017542, que se incorpora por completo en la presente a modo de referencia. Por ejemplo, en una forma de realización, la secuencia consenso de la cápside derivada de cepas virales del genotipo 4 (GII.4) del genogrupo II comprende una secuencia de la SEQ ID N°: 1. Por consiguiente, en algunas formas de realización, la composición de vacuna comprende una mezcla de VLP monovalentes, en donde una VLP monovalente comprende una proteína de la cápside del genogrupo I de Norovirus (por ejemplo, Norwalk) y la otra VLP monovalente comprende una proteína de la cápside consenso que comprende una secuencia de la SEQ ID N°: 1.

```

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

```

Q L S P V N I C T F R G D V T H I A G T Q E Y T M N L A S Q N
W N N Y D P T E E I P A P L G T P D F V G K I Q G V L T Q T T
R G D G S T R G H K A T V S T G S V H F T P K L G S V Q F S T
D T S N D F E T G Q N T K F T P V G V V Q D G S T T H Q N E P
Q Q W V L P D Y S G R D S H N V H L A P A V A P T F P G E Q L
L F F R S T M P G C S G Y P N M N L D C L L P Q E W V Q H F Y
Q E A A P A Q S D V A L L R F V N P D T G R V L F E C K L H K
S G Y V T V A H T G Q H D L V I P P N G Y F R F D S W V N Q F
Y T L A P M G N G T G R R R A L (SEQ ID N°:1)

[0030] Sin embargo, en una forma de realización alternativa de la invención, las VLP pueden ser VLP multivalentes que comprenden, por ejemplo, proteínas VP1 y/o VP2 de uno genogrupo de Norovirus entremezcladas con proteínas VP1 y/o VP2 de un segundo genogrupo de Norovirus, en donde las diferentes proteínas VP1 y VP2 no son proteínas VP1 y VP2 quiméricas, pero se asociado juntos dentro de la misma estructura de cápside para formar VLP inmunogénicas. Según se usa en la presente, el término "multivalente" significa que las proteínas antigénicas derivan de dos o más genogrupos o cepas de Norovirus. Las VLP multivalentes pueden contener antígenos VLP tomados de dos o más cepas virales. A modo de ejemplo solamente, la composición puede contener VLP multivalentes compuestas por monómeros o multímeros de la cápside de una o más cepas del genogrupo I de Norovirus (por ejemplo, del virus Norwalk) junto con monómeros o multímeros de la cápside de una o más cepas del genogrupo I de Norovirus (por ejemplo, el virus Houston). Preferiblemente, las VLP multivalentes contienen proteínas de la cápside de las cepas de Norwalk y Houston de Norovirus, u otras cepas predominantes en la circulación en un momento dado.

[0031] La combinación de VLP monovalentes o multivalentes en la composición preferiblemente no reducirá la inmunogenicidad de cada tipo de VLP. En particular se prefiere que no haya interferencia entre las VLP de Norovirus en la combinación de la invención, de modo tal que la composición de VLP combinadas de la invención puede generar inmunidad contra una infección por

cada genotipo de Norovirus representado en la vacuna. Convenientemente, la respuesta inmune contra un tipo de VLP dado en la combinación es por lo menos un 50% de la respuesta inmune del mismo tipo de VLP cuando se mide individualmente, preferiblemente un 100% o sustancialmente un 100%. La respuesta inmune se puede medir convenientemente, por ejemplo, por las respuestas de anticuerpos, como se ilustra en los ejemplos en la presente.

[0032] Según se usa en la presente, las "VLP del genogrupo I de Norovirus" se refieren ya sea a VLP monovalentes o multivalentes que comprenden una proteína de la cápside derivada de una o más cepas del genogrupo I de Norovirus. En algunas formas de realización, las VLP del genogrupo I de Norovirus comprenden una proteína de la cápside de longitud completa de una del genogrupo I de Norovirus (por ejemplo, el virus Norwalk). En otras formas de realización, las VLP del genogrupo I de Norovirus comprenden una proteína consenso de la cápside derivada de diversas cepas del genogrupo I. Las cepas del genogrupo I a partir de las cuales deriva la secuencia consenso de la cápside pueden ser del mismo genotipo o agrupación genética o de genotipos o agrupaciones genéticas diferentes. De manera similar, las "VLP del genogrupo II de Norovirus" se refieren ya sea a VLP monovalentes o multivalentes que comprenden una proteína de la cápside derivada de una o más cepas del genogrupo II de Norovirus. En algunas formas de realización, las VLP del genogrupo II de Norovirus comprenden una proteína de la cápside de longitud completa de una del genogrupo II de Norovirus (por ejemplo, los virus Laurens o Minerva). En otras formas de realización, las VLP del genogrupo II de Norovirus comprenden una proteína consenso de la cápside derivada de diversas cepas del genogrupo II. Las cepas del genogrupo II a partir de las cuales deriva la secuencia consenso de la cápside pueden ser del mismo genotipo o agrupación genética o de genotipos o agrupaciones genéticas diferentes. En una forma de realización, las VLP del genogrupo II de Norovirus comprenden una secuencia consenso de la cápside del genotipo 4 (GII.4) del genogrupo II de Norovirus. Por consiguiente, en algunas formas de realización, las VLP del genogrupo II de Norovirus comprenden una secuencia de la cápside cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 1.

[0033] Las VLP multivalentes se pueden producir por expresión separada de proteínas individuales de la cápside seguido por combinación para formar VLP. Como alternativa, se pueden expresar múltiples proteínas de la cápside en la misma célula, de una o más construcciones de ADN. Por ejemplo, se pueden transformar o transfectar múltiples construcciones de ADN en células huésped, donde cada vector codifica una proteína de la cápside diferente. Como alternativa, se puede usar un solo vector que contiene múltiples genes de la cápside, controlados por un promotor compartido o múltiples promotores individuales. También se pueden incorporar elementos IRES en el vector, cuando fuera apropiado. Cuando se usan tales estrategias de expresión, las proteínas de la cápside coexpresadas se pueden copurificar para la subsiguiente formación de VLP, o pueden formar espontáneamente VLP multivalentes que luego se pueden purificar.

[0034] Un proceso preferido para la producción de VLP multivalentes comprende la preparación de las proteínas de la cápside de VLP o derivados de las mismas, tales como proteínas VP1, de diferentes genotipos de Norovirus, el mezclado de las proteínas y el ensamblaje de las proteínas para producir dichas VLP multivalentes. Las proteínas VP1 se pueden encontrar en la forma de un extracto crudo, se pueden purificar parcialmente o se pueden purificar antes del mezclado. Las VLP monovalentes ensambladas de diferentes genogrupos se pueden desensamblar, mezclar y volver a ensamblar en VLP multivalentes. Preferiblemente, las proteínas o VLP se purifican por lo menos parcialmente antes de combinarlas. Opcionalmente, se puede llevar a cabo una purificación adicional de las VLP multivalentes después del ensamblaje.

[0035] Convenientemente las VLP de la invención se elaboran por desensamblaje y reensamblaje de las VLP, para proveer VLP homogéneas y puras. En una forma de realización, las VLP multivalentes se pueden elaborar por desensamblaje de dos o más VLP, seguido por combinación de los componentes de VLP desensamblados en cualquier momento adecuado antes del reensamblaje. Este abordaje es adecuado cuando las VLP se forman espontáneamente a partir de una proteína VP1 expresada, como es el caso, por

ejemplo, en algunas cepas de levadura. Cuando la expresión de la proteína VP1 no conduce a la formación espontánea de VLP, las preparaciones de proteínas VP1 o capsómeros se pueden combinar antes de su ensamblaje en VLP.

[0036] Cuando se usan VLP multivalentes, los componentes de las VLP preferiblemente se mezclan en las proporciones que se desean en la VLP mezclada final. Por ejemplo, una mezcla de la misma cantidad de una proteína VP1 parcialmente purificada de los virus Norwalk y Houston (u otras cepas de Norovirus) provee una VLP multivalente con cantidades aproximadamente iguales de cada proteína.

[0037] Las composiciones que comprenden VLP multivalentes se pueden estabilizar con soluciones conocidas en el arte, tales como las descritas en WO 98/44944, WO 00/45841, incorporadas en la presente a modo de referencia.

[0038] Las composiciones de la invención pueden comprender otras proteínas o fragmentos de proteínas además de las proteínas VP1 y VP2 de Norovirus o derivados de las mismas. También se pueden coadministrar otras proteínas o péptidos con la composición de la invención. Opcionalmente, la composición también se puede formular o coadministrar con antígenos que no son de Norovirus. Convenientemente, estos antígenos pueden proporcionar protección contra otras enfermedades.

[0039] La proteína VP1, o un derivado funcional de la proteína, convenientemente puede formar una VLP, y la formación de VLP puede ser evaluada mediante técnicas estándar tales como, por ejemplo, cromatografía por exclusión de tamaño, microscopía electrónica y dispersión dinámica de luz.

[0040] Las moléculas antigénicas de la presente invención se pueden preparar por aislamiento y purificación a partir de los organismos en los cuales se encuentran naturalmente, o se pueden preparar mediante técnicas recombinantes. Preferiblemente, los antígenos VLP de Norovirus se preparan a partir de células de insecto tales como células Sf9 o H5, aunque también se puede usar cualquier célula adecuada, tales como células de *E. coli* o de levadura, por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Pichia pastori* u otros sistemas de expresión de *Pichia*, expresión en células de mamífero tal como en sistemas CHO o HEK. Cuando se

preparan mediante un método recombinante o mediante síntesis, se pueden efectuar una o más inserciones, supresiones, inversiones o sustituciones de los aminoácidos que constituyen al péptido. Cada uno de los antígenos mencionados previamente se usa preferiblemente en un estado sustancialmente puro.

[0041] Los procedimientos de producción de las VLP de Norovirus en cultivo de células de insecto ya fueron divulgados con anterioridad en la Patente de los EE.UU. N°: 6.942.865, que se incorpora por completo en la presente a modo de referencia. Brevemente, se clona un ADNc del extremo 3' del genoma que contiene al gen de la cápside viral (ORF2) con un gen estructural menor (ORF3). Los baculovirus recombinantes que comprenden a los genes de la cápside viral se construyen a partir de los ADNc clonados. Las VLP de Norovirus se producen en cultivos de células de insecto Sf9 o H5.

[0042] En algunas formas de realización, la composición de vacuna comprende uno o más adyuvantes en combinación con el antígeno de Norovirus. La mayoría de los adyuvantes contienen una sustancia diseñada para proteger al antígeno contra un catabolismo rápido, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral, y un estimulante de respuestas inmunes, tal como proteínas derivadas de *Bordatella pertussis* o *Mycobacterium tuberculosis*. Los adyuvantes adecuados se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo, el adyuvante incompleto y el adyuvante completo de Freund (Pifco Laboratories, Detroit, Mich.); el adyuvante Merck 65 (Merck y Company, Inc., Rahway, N.J.); sales de aluminio tal como hidróxido de aluminio en gel (alúmina) o fosfato de aluminio; sales de calcio, hierro o zinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada y azúcares acilados; polisacáridos derivatizados catiónicamente o aniónicamente; polifosfazenos; microesferas biodegradables; y Quil A.

[0043] Los adyuvantes adecuados también incluyen, pero en un sentido no taxativo, agonistas de receptores tipo toll (TLR), en particular agonistas de receptores tipo toll tipo 4 (TLR-4) (por ejemplo, el lípido A monofosforilo (MPL), lípido A sintético, miméticos o análogos de lípido A), sales de aluminio, citoquinas, saponinas, derivados muramilo dipéptido (MDP), oligos CpG, lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas, polifosfazenos, emulsiones, virosomas,

cocleatos, micropartículas de poli(láctido-co-glicólidos) (PLG), partículas, micropartículas de poloxámero, liposomas, emulsiones de aceite en agua, MF59 y escualeno. En algunas formas de realización, los adyuvantes no son exotoxinas derivadas de bacterias. Los adyuvantes preferidos incluyen adyuvantes que estimulan una respuesta tipo Th1, tal como 3DMPL o QS21.

[0044] El Lípido A monofosforilo (MPL), un derivado no tóxico del lípido A de *Salmonella*, es un potente agonista de TLR-4 que fue desarrollado como un adyuvante de vacuna (Evans et al., 2003). Se ha demostrado en estudios preclínicos en murinos que la administración de MPL intranasal mejora las respuestas humorales secretoras, así como sistémicas (Baldrige et al., 2000; Yang et al., 2002). También se ha demostrado que es segura y efectiva como un adyuvante de vacuna en estudios clínicos con más de 120.000 pacientes (Baldrick et al., 2002; Baldrige et al., 2004). La MPL estimula la inducción de la inmunidad innata a través del receptor TLR-4 y por consiguiente tiene la capacidad para generar respuestas inmunes no específicas contra un amplio rango de patógenos infecciosos, incluyendo bacterias Gram negativas y Gram positivas, virus y parásitos (Baldrige et al., 2004; Persing et al., 2002). La inclusión de MPL en las formulaciones de vacunas debería proveer una inducción rápida de respuestas innatas, generar respuestas inmunes no específicas a partir de pruebas virales al tiempo que mejora las respuestas específicas generadas por los componentes antigénicos de la vacuna.

[0045] En una forma de realización, la presente invención provee una vacuna que comprende lípido A monofosforilo (MPL) o lípido A monofosforilo 3-des-O-acilado (3D-MPL) como un mejorador de la inmunidad adaptativa e innata. Químicamente, la 3D-MPL es una mezcla de lípido A monofosforilo 3-des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Una forma preferida del lípido A monofosforilo 3-des-O-acilado se divulga en la Patente Europea 0 689 454 B1 (Smith Kline Beecham Biologicals SA), incorporada en la presente a modo de referencia. En otra forma de realización, la presente invención provee una composición que comprende el lípido A sintético, miméticos o análogos del lípido

A, tal como el Lípido A PET de BioMira, o derivados sintéticos diseñados para funcionar como los agonistas TLR-4.

[0046] En determinadas formas de realización, la composición de vacuna comprende dos adyuvantes. Se puede seleccionar una combinación de adyuvantes entre los que se describieron previamente. En una forma de realización particular, los dos adyuvantes son MPL e hidróxido de aluminio (por ejemplo, alúmina). En otra forma de realización particular, los dos adyuvantes son MPL y aceite.

[0047] El término "cantidad eficaz como adyuvante" o "cantidad eficaz de adyuvante" son bien conocidos por los especialistas en el arte, e incluyen una cantidad de uno o más adyuvantes capaz de estimular la respuesta inmune a un antígeno administrado, es decir, una cantidad que aumenta la respuesta inmune de una composición de antígeno administrada, medida en términos de los niveles de IgA en los lavados nasales, los niveles séricos de IgG o IgM o la proliferación de células B y T. Los aumentos convenientemente eficaces de los niveles de inmunoglobulina incluyen más que un 5%, preferiblemente más que un 25% y en particular más que un 50%, en comparación con la misma composición de antígeno sin ningún adyuvante.

[0048] En una forma de realización, la presente invención provee una composición de vacuna formulada para una administración parenteral, en donde la composición incluye al menos dos tipos de Norovirus VLP purificadas en combinación con hidróxido de aluminio y una solución amortiguadora. La solución amortiguadora se puede seleccionar del grupo que consiste de L-histidina, imidazol, ácido succínico, Tris, ácido cítrico, bis-Tris, Pipes, Mes, Hepes, glicinamida y tricina. En una forma de realización, la solución amortiguadora es L-histidina o imidazol. Preferiblemente, la solución amortiguadora está presente a una concentración de entre aproximadamente 15 mM y aproximadamente 50 mM, más preferiblemente entre aproximadamente 18 mM y aproximadamente 40 mM o con mayor preferencia entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 25 mM. En algunas formas de realización, el pH de la composición antigénica o de vacuna es de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,0 o entre

aproximadamente 6,2 y aproximadamente 6,8 o es de aproximadamente 6,5. La composición de vacuna puede ser una formulación acuosa. En algunas formas de realización, la composición de vacuna es un polvo liofilizado y se reconstituye en una formulación acuosa.

[0049] En determinadas formas de realización, la composición de vacuna además comprende por lo menos un adyuvante además de los dos o más tipos de VLP de Norovirus, hidróxido de aluminio y una solución amortiguadora. Por ejemplo, el adyuvante puede ser un agonista del receptor tipo toll, tal como MPL, flagelina, oligos CpG, lípido A sintético o miméticos o análogos del lípido A. En una forma de realización particular, el adyuvante es MPL.

[0050] Las VLP de Norovirus incluidas en las composiciones de vacuna de la invención pueden comprender cualquiera de las VLP descritas en la presente. En una forma de realización, cada uno de los dos tipos de VLP de Norovirus comprenden una proteína de la cápside de diferentes genogrupos (por ejemplo, del genogrupo I y del genogrupo II). Por ejemplo, un tipo de VLP de Norovirus comprende una proteína de la cápside derivada de un genogrupo I de Norovirus y el otro tipo de VLP de Norovirus comprende una proteína de la cápside derivada de un genogrupo II de Norovirus. En una forma de realización, un tipo de VLP de Norovirus comprende una proteína de la cápside del virus Norwalk y el otro tipo de VLP de Norovirus comprende una proteína de la cápside consenso derivada del genotipo 4 del genogrupo II de Norovirus (por ejemplo, una proteína de la cápside que comprende una secuencia de la SEQ ID N°: 1). La composición de vacuna puede comprender entre aproximadamente 5 µg y aproximadamente 200 µg de cada VLP de Norovirus, más preferiblemente entre aproximadamente 15 µg y aproximadamente 50 µg de cada VLP de Norovirus. En algunas formas de realización, la dosis de un tipo de VLP de Norovirus es diferente de la dosis del otro tipo de VLP de Norovirus. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la composición de vacuna comprende entre aproximadamente 5 µg y aproximadamente 15 µg de una VLP del genogrupo I y entre aproximadamente 15 µg y aproximadamente 50 µg de una VLP del genogrupo II. En otras formas de realización, en determinadas formas de realización, la composición de vacuna

comprende entre aproximadamente 15 µg y aproximadamente 50 µg de una VLP del genogrupo I y entre aproximadamente 50 µg y aproximadamente 150 µg de una VLP del genogrupo II.

[0051] En algunas formas de realización, las composiciones de vacuna además comprenden una sal farmacéuticamente aceptable, incluyendo, pero en un sentido no taxativo, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, sulfato de amonio y citrato de sodio. En una forma de realización, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio. La concentración de la sal farmacéuticamente aceptable puede ser de entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 200 mM, con concentraciones preferidas en el rango de entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 150 mM. Preferiblemente, las composiciones de vacuna de la invención contienen menos que 2 mM de fosfato libre. En algunas formas de realización, las composiciones de vacuna comprenden menos que 1 mM de fosfato libre. Las composiciones de vacuna también pueden comprender además otros excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como azúcares (por ejemplo, sacarosa, trehalosa, manitol) y agentes tensioactivos.

[0052] Según se describe en la presente, las composiciones de la invención se pueden formular para su administración como formulaciones de vacunas. Según se usa en la presente, el término "vacuna" se refiere a una formulación que contiene VLP de Norovirus u otros antígenos de Norovirus de la presente invención descritos previamente, que se encuentra en una forma que se puede administrar a un vertebrado, en particular a un ser humano, y que induce una respuesta inmune protectora suficiente como para inducir inmunidad con el fin de prevenir y/o mejorar una infección por Norovirus o una enfermedad inducida por Norovirus y/o de reducir por lo menos un síntoma de una infección o enfermedad por Norovirus.

[0053] Según se usa en la presente, el término "respuesta inmune" se refiere a una respuesta inmune humoral y a una respuesta inmune mediada por células. La respuesta inmune humoral comprende la estimulación de la producción de anticuerpos por linfocitos B que, por ejemplo, neutralizan los agentes infecciosos, bloquean el ingreso de los agentes infecciosos en las células,

bloquean la replicación de dichos agentes infecciosos y/o protegen a las células huésped contra una infección y destrucción. La respuesta inmune mediada por células se refiere a una respuesta inmune que está mediada por linfocitos T y/u otras células, tales como macrófagos, contra un agente infeccioso, que se observa en un vertebrado (por ejemplo, un ser humano), que previene o mejora una infección o reduce por lo menos un síntoma de la misma. En particular, una "inmunidad protectora" o una "respuesta inmune protectora" se refiere a la inmunidad o a la generación de una respuesta inmune contra un agente infeccioso, que se observa en un vertebrado (por ejemplo, un ser humano), que previene o mejora una infección o reduce al menos un síntoma de la misma. Específicamente, la inducción de una respuesta inmune protectora con la administración de la vacuna se evidencia por la eliminación o reducción de la presencia de uno o más síntomas de gastroenteritis aguda o por una reducción en la duración o severidad de dichos síntomas. Los síntomas clínicos de gastroenteritis por Norovirus incluyen náuseas, diarrea, deposiciones blandas, vómitos, fiebre y malestar general. Una respuesta inmune protectora que reduce o elimina los síntomas de la enfermedad reducirá o detendrá la dispersión de un brote 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 se pueden formular, por ejemplo, para su administración a una o más de las mucosas oral, gastrointestinal y respiratoria (por ejemplo, nasal). Las composiciones de la presente invención se pueden formular, por ejemplo, para su administración mediante inyección, tal como inyección parenteral (por ejemplo, una inyección intravenosa, subcutánea, intradérmica o intramuscular).

[0054] Cuando la composición se pretende administrar en la mucosa respiratoria (por ejemplo, nasal), típicamente se formula como una solución acuosa para su administración como un aerosol o como gotas nasales o, como alternativa, como un polvo seco, por ejemplo para una deposición rápida dentro del pasaje nasal. Las composiciones destinadas a una administración como gotas nasales pueden contener uno o más excipientes del tipo habitualmente incluido en

dichas composiciones, por ejemplo conservantes, agentes para ajustar la viscosidad, agentes para ajustar la tonicidad, agentes amortiguadores y semejantes. Los agentes para la viscosidad pueden ser celulosa microcristalina, quitosán, almidones, polisacáridos y semejantes. Las composiciones destinadas a una administración como un polvo seco también pueden contener uno o más de los excipientes incluidos habitualmente en dichas composiciones, por ejemplo, agentes mucoadhesivos, agentes de relleno y agentes para distribuir un flujo de polvo y proveer características de tamaño apropiados. Los agentes de relleno y de flujo de polvo y características de tamaño pueden incluir manitol, sacarosa, trehalosa y xilitol.

[0055] Cuando se pretende administrar la composición como una inyección parenteral, tal como una inyección intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), intradérmica o intramuscular (i.m.), típicamente se formula como una suspensión líquida (es decir, una formulación acuosa) compuesta por al menos un tipo de VLP de Norovirus y opcionalmente por al menos un adyuvante. En una forma de realización, el adyuvante puede ser MPL. En otra forma de realización, la vacuna líquida formulada para la administración parenteral puede tener más de un adyuvante. En una forma de realización preferida, una vacuna líquida formulada para la vía parenteral (por ejemplo, formulada para la vía i.m., i.v. o s.c.) comprende VLP del genogrupo I y/o del genogrupo II de Norovirus con hidróxido de aluminio (por ejemplo, alúmina) y monofosforil lípido A (MPL) como adyuvantes. En una forma de realización, una formulación líquido para una administración parenteral comprende uno o más antígenos del genogrupo de Norovirus, tal como uno o más de los tipos de VLP de Norovirus descritos en la presente, MPL, hidróxido de aluminio y una solución amortiguadora. En otra forma de realización, una formulación líquido para una administración parenteral comprende uno o más antígenos del genogrupo de Norovirus, MPL, aceite y una solución amortiguadora. En determinadas formas de realización, la solución amortiguadora en las formulaciones de vacunas parenterales es L-histidina o imidazol. La administración parenteral de vacunas líquidas puede efectuarse con aguja y jeringa, como es bien conocido en el arte.

[0056] En determinadas formas de realización, una composición de vacuna de la invención para generar una respuesta inmune protectora contra los Norovirus en seres humanos comprende VLP del genogrupo I y/o del genogrupo II de Norovirus a una dosis no mayor que 150 µg. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la composición de vacuna no comprende más que 150 µg, no más que 100 µg, no más que 50 µg, no más que 25 µg, no más que 15 µg o no más que 10 µg de las VLP del genogrupo I de Norovirus. En otras formas de realización, la composición de vacuna no comprende más que 150 µg, no más que 100 µg, no más que 50 µg, no más que 25 µg, no más que 15 µg o no más que 10 µg de las VLP del genogrupo II de Norovirus. En determinadas formas de realización, la composición de vacuna no comprende más que 150 µg de cada VLP del genogrupo I y del genogrupo II de Norovirus. En dichas formas de realización, la dosis de las VLP del genogrupo I de Norovirus y de las VLP del genogrupo II pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, en una forma de realización, la composición de vacuna pueden comprender no más que 50 µg de las VLP del genogrupo I de Norovirus y no más que 150 µg de las VLP del genogrupo II de Norovirus. En otra forma de realización, la composición de vacuna pueden comprender no más que 25 µg de las VLP del genogrupo I de Norovirus y no más que 50 µg de las VLP del genogrupo II de Norovirus. En otras formas de realización, la composición de vacuna pueden comprender no más que 15 µg de las VLP del genogrupo I de Norovirus y no más que 50 µg de las VLP del genogrupo II de Norovirus. En aún otras formas de realización, la composición de vacuna pueden comprender no más que 25 µg de las VLP del genogrupo I de Norovirus y no más que 150 µg de las VLP del genogrupo II de Norovirus.

[0057] Las VLP del genogrupo I y del genogrupo II de Norovirus pueden derivar de cualquiera de las cepas de Norovirus descritas en la presente. En una forma de realización, las VLP del genogrupo I de Norovirus son VLP del genogrupo I, del genotipo 1 (GI.1) (es decir, comprenden una proteína de la cápside de un GI.1 de Norovirus). En otra forma de realización, las VLP del genogrupo I de Norovirus son VLP de Norwalk. En otra forma de realización, las VLP del genogrupo II de Norovirus son VLP del genotipo 4 (GII.4) del genogrupo

II. En a aún otra forma de realización, las VLP del genogrupo II de Norovirus son VLP generadas a partir de la expresión de una secuencia consenso del genogrupo II de Norovirus. En una forma de realización particular, las VLP del genogrupo II de Norovirus comprenden una proteína de la cápside cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 1.

[0058] Las composiciones de vacuna descritas precedentemente se pueden liofilizar y guardar en forma anhidra hasta el momento del uso, en cuyo momento se reconstituyen con un diluyente. Como alternativa, los diferentes componentes de la composición se pueden guardar por separado en un conjunto de elementos (cualquiera o todos los componentes pueden estar liofilizados). Los componentes pueden permanecer en la forma liofilizada para una formulación seca o se pueden reconstituir para las formulaciones líquidas, y luego se pueden mezclar antes del uso o administrar por separado al paciente. En algunas formas de realización, las composiciones de vacuna se guardan en conjuntos de elementos en formulaciones líquidas y pueden venir con dispositivos de suministro, tales como jeringas equipadas con agujas. En otras formas de realización, las composiciones de vacuna líquidas se pueden guardar en los dispositivos de suministro en un conjunto de elementos. Por ejemplo, el conjunto de elementos puede comprender dispositivos de jeringas llenadas previamente, autoinyectores o lápices de inyección que contienen la formulación líquida de una composición de vacuna descrita en la presente.

[0059] La liofilización de vacunas es bien conocida en el arte. Típicamente el antígeno líquido se seca por congelamiento en la presencia de agentes para proteger al antígeno durante el proceso de liofilización y para obtener una torta con las características de polvo deseables. Los azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o lactosa (presentes a una concentración inicial de 10-200 mg/ml), se usan comúnmente para la crioprotección de antígenos proteicos y para obtener una torta liofilizada con las características de polvo deseables. La liofilización de las composiciones teóricamente da como resultado en una composición más estable.

[0060] La cantidad de antígeno en cada composición de vacuna se

selecciona como aquella cantidad que induce una respuesta inmune robusta sin efectos secundarios adversos significativos. Dicha cantidad puede variar dependiendo de los antígenos específicos empleados, la ruta de administración y los adyuvantes utilizados. En general, la dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención debería ser suficiente para obtener una respuesta inmune protectora en el paciente en el tiempo, o para inducir la producción de anticuerpos específicos del antígeno. Por consiguiente, la composición se administra a un paciente en una cantidad suficiente como para generar una respuesta inmune a los antígenos específicos y/o para prevenir, aliviar, reducir o curar los síntomas y/o las complicaciones debidas a la enfermedad o infección, y por consiguiente reducir o detener la dispersión de un brote de Norovirus en una población. La cantidad adecuada para lograrlo se define como una "dosis terapéuticamente eficaz".

[0061] Las composiciones de vacuna de la presente invención se puede administrar por una ruta no mucosa o mucosa. Estas administraciones pueden incluir la administración *in vivo* mediante inyección parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intradérmica e intramuscular) u otras rutas directas tradicionales, tales como las rutas bucal/sublingual, rectal, oral, nasal, tópica (tal como transdérmica y oftálmica), vaginal, pulmonar, intraarterial, intraperitoneal, intraocular o intranasal o directamente en un tejido específico. Otras rutas de administración adecuadas incluyen las vías transcutánea, subdérmica y con supositorio. En una forma de realización, la vacuna se administra por una ruta de administración parenteral, tal como la ruta intravenosa, subcutánea, intradérmica o intramuscular. En determinadas formas de realización, la vacuna se administra por una ruta de administración intramuscular. La administración se puede llevar a cabo simplemente por administración directa usando una aguja, un catéter o un dispositivo relacionado (por ejemplo jeringas llenadas previamente o autoinyectores), en un único punto de tiempo o en múltiples puntos de tiempo. Otras formulaciones parenterales se pueden administrar por vía subcutánea o intradérmica utilizando métodos de suministro por microinyección o parches en la piel.

[0062] La presente invención provee métodos para generar inmunidad protectora contra los Norovirus en un sujeto que comprende administrar por vía parenteral al sujeto no más de una sola dosis de una composición de vacuna de la invención, en donde dicha vacuna comprende VLP del genogrupo I y/o del genogrupo II de Norovirus como se describe en la presente, y opcionalmente por lo menos un adyuvante. En dichas formas de realización, la composición de una sola dosis induce un aumento de por lo menos tres veces del título de anticuerpos específicos de Norovirus en suero en comparación con el título en el ser humano antes de la administración de la composición. En algunas formas de realización, la composición de una sola dosis induce un aumento de por lo menos seis veces del título de anticuerpos específicos de Norovirus en suero en comparación con el título en el ser humano antes de la administración de la composición. En otras formas de realización, la composición de vacuna de dosis única induce un título de anticuerpos específicos de Norovirus en suero comparables al título de anticuerpos inducido por exposición a Norovirus vivos en una infección natural; es decir, un aumento de más de diez veces de anticuerpos séricos específicos de Norovirus en comparación con el título en el ser humano antes de la administración de la composición. En determinadas formas de realización, la composición de vacuna de dosis única induce el aumento en el título de anticuerpos específicos de Norovirus en suero dentro de los siete días después de la administración de la composición. Preferiblemente, la composición de vacuna de dosis única se administra por una ruta de administración intravenosa, subcutánea o intramuscular. En una forma de realización determinada, la composición de vacuna de dosis única se administra por vía intramuscular a dicho ser humano.

[0063] Según se describe en la presente, en algunas formas de realización, las composiciones de vacuna de dosis única adecuadas para su uso en el método comprenden no más que 150 μg de cada genogrupo I y/o genogrupo II de Norovirus. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la composición de vacuna no comprende más que 150 μg , no más que 100 μg , no más que 50 μg , no más que 25 μg , no más que 15 μg o no más que 10 μg de las VLP del genogrupo I

de Norovirus. En otras formas de realización, la composición de vacuna no comprende más que 150 µg, no más que 100 µg, no más que 50 µg, no más que 25 µg, no más que 15 µg o no más que 10 µg de las VLP del genogrupo II de Norovirus. En determinadas formas de realización, la composición de vacuna no comprende más que 50 µg de cada VLP del genogrupo I y del genogrupo II de Norovirus. En las formas de realización en las cuales la composición de vacuna de dosis única comprende VLP tanto del genogrupo I como del genogrupo II de Norovirus, la dosis de las VLP del genogrupo I y las VLP del genogrupo II de Norovirus pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, en una forma de realización, la composición de vacuna pueden comprender no más que 50 µg de las VLP del genogrupo I de Norovirus y no más que 150 µg de las VLP del genogrupo II de Norovirus. En otra forma de realización, la composición de vacuna pueden comprender no más que 25 µg de las VLP del genogrupo I de Norovirus y no más que 50 µg de las VLP del genogrupo II de Norovirus. En otras formas de realización, la composición de vacuna pueden comprender no más que 15 µg de las VLP del genogrupo I de Norovirus y no más que 50 µg de las VLP del genogrupo II de Norovirus. En aún otras formas de realización, la composición de vacuna pueden comprender no más que 25 µg de las VLP del genogrupo I de Norovirus y no más que 150 µg de las VLP del genogrupo II de Norovirus.

[0064] En una forma de realización del método, el sujeto es un ser humano y la vacuna confiere protección contra uno o más síntomas de una infección por Norovirus. Aunque otros han descrito métodos para inducir una respuesta inmune con antígenos de Norovirus (véase la publicación de Patente de los EE.UU. N°: US 2007/0207526), los indicadores de una respuesta inmune protectora contra los Norovirus en seres humanos aún no han sido claramente identificados (Herbst-Kralovetz *et al.*, (2010) *Expert Rev. Vaccines* 9(3), 299-307). A diferencia de las diferentes vacunas que actualmente cuentan con licencia en los EE.UU., donde la eficacia de la vacuna se correlaciona con los anticuerpos séricos, los estudios han mostrado que los marcadores de una respuesta inmune, tal como mayores títulos de anticuerpos de IgG contra el virus Norwalk en suero, no están asociados con una inmunidad protectora en seres humanos (Johnson *et al.*, (1990) *J. Infectious*

Diseases 161: 18-21). Aún más, en otro estudio se examinó un desafío viral con Norwalk en seres humanos e indicó que la susceptibilidad a una infección por Norwalk era multifactorial e incluyó factores tales como el estado secretor y la respuesta inmune de memoria de mucosas (Lindesmith *et al.*, (2003) *Nature Medicine* 9: 548-553).

[0065] Dado que no se puede cultivar el Norovirus *in vitro*, no existen actualmente ensayos de neutralización viral. Un ensayo funcional que se puede usar en lugar del ensayo de neutralización es el ensayo de inhibición de hemaglutinación (HAI) (véase el Ejemplo 1). En el HAI se mide la capacidad de una vacuna contra anticuerpos inducidos por Norovirus para inhibir la aglutinación de glóbulos rojos recubiertos con antígeno por las VLP de Norovirus porque dichas VLP de Norovirus se unen a los antígenos de los glóbulos rojos (por ejemplo antígenos de grupo histológico sanguíneo). Este ensayo también se conoce como ensayo de bloqueo de carbohidratos, ya que es indicativo de la capacidad funcional de los anticuerpos para bloquear la unión del virus o de las VLP a los carbohidratos de los antígenos de grupo sanguíneos sobre los glóbulos rojos. En este ensayo, se mezcla una cantidad fija de VLP de Norovirus con una cantidad fija de glóbulos rojos y suero de los sujetos inmunizados. Si la muestra de suero contiene anticuerpos funcionales, los anticuerpos se unirán a las VLP, inhibiendo de esa manera la aglutinación de los glóbulos rojos. Según se usa en la presente, los "anticuerpos funcionales" se refieren a los anticuerpos que pueden inhibir la interacción entre las partículas de Norovirus y los antígenos de glóbulos rojos. En otras palabras, el título de anticuerpos funcionales es equivalente al título de anticuerpos para antígenos de grupos histológicos sanguíneos (HBGA) o para el bloqueo de carbohidratos. El título en suero de anticuerpos funcionales específicos de Norovirus se pueden medir con el ensayo HAI descrito previamente. El título en suero de anticuerpos funcionales específicos de Norovirus también se pueden medir usando un ensayo basado en ELISA, en donde se une un antígeno de carbohidrato H a los pocillos de microtitulación y se detecta la unión de las VLP de Norovirus al antígeno H en la presencia de suero (véase el Ejemplo 1 y Reeck *et al.*, (2010) *J Infect Dis*, volumen 202(8): 1212-1218). Un aumento en el nivel de

anticuerpos funcionales específicos de Norovirus puede ser un indicador de la respuesta inmune protectora. Por consiguiente, en una forma de realización, la administración de la vacuna genera una inmunidad protectora que comprende un aumento en el título en suero de anticuerpos funcionales específicos de Norovirus en comparación con el título en suero en un ser humano que no recibió la vacuna. El título en suero de los anticuerpos funcionales específicos de Norovirus indicativo de una respuesta inmune protectora preferiblemente es una media geométrica del título mayor que 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 medida con el ensayo HAI o título de bloqueo (BT)₅₀ (50% de inhibición de la unión del antígeno H por las VLP de Norovirus), media geométrica del título mayor que 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 ó 500 medida en el ensayo de unión al antígeno H. En una forma de realización, el título en suero de los anticuerpos funcionales específicos de Norovirus es una media geométrica del título mayor que 40, medida con el ensayo HAI. En otra forma de realización, el título en suero de los anticuerpos funcionales específicos de Norovirus es una media geométrica del título mayor que 100, medida con el ensayo HAI. En otra forma de realización, el título en suero de los anticuerpos funcionales específicos de Norovirus es una media geométrica BT₅₀ del título mayor que 100, medida con el ensayo de unión al antígeno H. En aún otra forma de realización, el título en suero de los anticuerpos funcionales específicos de Norovirus es una media geométrica BT₅₀ del título mayor que 200, medida con el ensayo de unión al antígeno H.

[0066] En un aspecto adicional, la administración de la vacuna genera una inmunidad protectora que comprende una respuesta inmune de IgA en mucosa y una respuesta inmune de IgG sistémica por administración parenteral (preferiblemente intramuscular) al sujeto de no más de una sola dosis de una composición antigénica o de vacuna que comprende uno o más tipos de antígenos de Norovirus y opcionalmente por lo menos un adyuvante eficaz. Los inventores han encontrado sorprendentemente que la administración parenteral de las composiciones de vacuna contra los Norovirus descritas en la presente induce una respuesta de IgA robusta además de una fuerte respuesta de IgG. Típicamente, las respuestas de IgA fuertes solo se observan cuando las vacunas se administran

por una ruta de administración en mucosas.

[0067] En determinadas formas de realización, la administración de la vacuna genera una inmunidad protectora que comprende un aumento en el nivel de células secretoras de anticuerpos de IgA específicos de Norovirus en la sangre en comparación con el nivel en un ser humano que no recibió la vacuna. En algunas formas de realización, la administración de la vacuna genera una inmunidad protectora que comprende un aumento en el nivel de células secretoras de anticuerpos de IgA específicos de Norovirus en la sangre en comparación con el nivel en el ser humano antes de recibir la vacuna. En una forma de realización, las células secretoras de anticuerpos de IgA específicos de Norovirus son CCR10+, CD19+, CD27+, CD62L+ y $\alpha 4\beta 7$ +. Las células secretoras de anticuerpos con este perfil marcador tienen la capacidad de migrar tanto hacia el tejido linfóide periférico, tal como el parche de Peyer en el intestino, como hacia el tejido linfóide de las mucosas, tal como la mucosa del intestino. En una forma de realización, el número de células secretoras de anticuerpos de IgA CCR10+, CD19+, CD27+, CD62L+ y $\alpha 4\beta 7$ + es mayor que aproximadamente 500, aproximadamente 700, aproximadamente 1.000, aproximadamente 1.500 o mayor que aproximadamente 2.000 células por 1×10^6 monocitos de sangre periférica. En otra forma de realización, las células secretoras de anticuerpos de IgA específicos de Norovirus son CCR10+, CD19+, CD27+, CD62L- y $\alpha 4\beta 7$ +. Las células secretoras de anticuerpos con este perfil marcador generalmente sólo migran hacia sitios de las mucosas y pueden ser indicativos de una respuesta de células B de memoria. En algunas formas de realización, en las cuales la vacuna se administra por vía intramuscular, el número de células secretoras de anticuerpos de IgA CCR10+, CD19+, CD27+, CD62L- y $\alpha 4\beta 7$ + es mayor que aproximadamente 5.000, aproximadamente 6.500, aproximadamente 7.000, aproximadamente 10.000, aproximadamente 13.000, aproximadamente 15.000, o mayor que aproximadamente 20.000 células por 1×10^6 monocitos de sangre periférica.

[0068] Se han observado hallazgos similares con las vacunas para otros virus, tal como un rotavirus. En el caso de las vacunas contra rotavirus, existe una controversia acerca de si los anticuerpos en suero están involucrados

directamente en la protección o si meramente reflejan una infección reciente (Jiang, 2002; Franco, 2006). La definición de tales correlaciones de protección es particularmente difícil en el contexto de las enfermedades de diarrea, tales como por rotavirus o norovirus, donde los estudios preclínicos que infieren la protección pueden ser de múltiples facetas, con contribuciones de inmunidad mucosa (tal como con IgA intestinal), elaboración de citoquina e inmunidad mediada por células. La dificultad de medir tales respuestas inmunes durante el desarrollo clínico, y la falta de correlación con las mediciones de anticuerpos en suero, requieren que la eficacia de una vacuna para estos tipos de virus solamente pueda demostrarse mediante experimentos de desafío clínico en humanos.

[0069] Según se mencionó previamente, la administración de una composición de vacuna de la presente invención previene y/o reduce por lo menos un síntoma de una infección por Norovirus. Los síntomas de una infección por Norovirus son bien conocidos en el arte e incluyen náuseas, vómitos, diarrea y calambres de estómago. Adicionalmente, un paciente con una infección por Norovirus puede sufrir de un grado bajo de fiebre, cefalea, escalofríos, dolor muscular y fatiga. La invención también abarca un método para inducir una respuesta inmune protectora en un sujeto que experimenta una infección por Norovirus mediante la administración al sujeto de una formulación de vacuna de la invención de manera tal que se alivia y/o reduce por lo menos un síntoma asociado con la infección por Norovirus. La reducción de un síntoma se puede determinar subjetivamente u objetivamente, por ejemplo, por autoevaluación por un sujeto, por evaluación de un médico clínico o mediante un ensayo o una medición apropiada (por ejemplo, la temperatura corporal), incluyendo, por ejemplo, la evaluación de la calidad de vida, la progresión lenta de una infección por Norovirus o de síntomas adicionales, la severidad reducida de los síntomas del Norovirus o ensayos adecuados (por ejemplo, título de anticuerpos, detección de antígenos con RT-PCR y/o un ensayo de activación de células T o B). Una respuesta eficaz también se puede determinar mediante medición directa (por ejemplo, con RT-PCR) de la carga viral en muestras de heces, lo cual refleja la cantidad de virus desprendida de los intestinos). La evaluación objetiva

comprende evaluaciones tanto en animales como en humanos.

[0070] La invención también provee un método para generar anticuerpos contra uno o más antígenos de Norovirus, donde dicho método comprende la administración de una composición de vacuna de la invención descrita previamente a un sujeto. Estos anticuerpos se pueden aislar y purificar mediante métodos que son de rutina en el arte. Los anticuerpos aislados específicos de los antígenos de Norovirus se pueden usar en el desarrollo de ensayos de diagnóstico inmunológicos. Estos ensayos se podrían emplear para detectar Norovirus en muestras clínicas y para identificar el virus particular que causa la infección (por ejemplo Norwalk, Houston, Snow Mountain, etc.). Como alternativa, los anticuerpos aislados pueden administrarse a sujetos susceptibles a una infección por Norovirus para conferir una inmunidad pasiva o de corto plazo.

[0071] A continuación la invención se ilustrará con mayor detalle con referencia a las formas de realización específicas que se describen en los siguientes ejemplos. Los ejemplos son puramente ilustrativos de la invención y no pretenden limitar su alcance en modo alguno.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Estudio de escalado de dosis, seguridad e inmunogenicidad de vacuna de partícula similar a virus de Norovirus intramuscular bivalente en humanos (Estudio LV03-104), Cohorte A

[0072] Este ejemplo describe la Cohorte A de un estudio randomizado, multisitio, con escalado de dosis de la seguridad e inmunogenicidad de cuatro niveles de dosificación de una vacuna bivalente intramuscular (IM) de VLP de Norovirus con adyuvante de lípido monofosforil A (MPL) e hidróxido de aluminio (AlOH) en comparación a placebo en sujetos adultos. En la cohorte se enrolaron aproximadamente 48 sujetos entre 18 y 49 años de edad. Los sujetos recibieron dos dosis de la vacuna o placebo, por inyección intramuscular (IM), 28 días después usando una aguja de 1,5 pulgadas (38 mm).

[0073] La vacuna bivalente de VLP de Norovirus contenía las VLP genogrupo I, genotipo 1 (GI.1) y genogrupo II, genotipo IV (GII.4) como antígenos, y lípido monofosforil A (MPL) e hidróxido de aluminio (AlOH) como adyuvantes,

cloruro de sodio (NaCl) y L-histidina (L-His) como solución amortiguadora (pH entre 6,3 y 6,7), etanol y agua para inyección. La composición de la vacuna bivalente intramuscular de VLP de Norovirus se resume en la Tabla 1. Las VLP GII.4 comprendieron una secuencia de cápside de SEQ ID NO: 1, que se derivó de tres cepas GII.4.

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

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

* como hidróxido de aluminio

[0074] El placebo fue solución salina estéril normal para inyección (NaCl 0,9% y libre de conservantes). El escalado de dosis de la vacuna se realizó como a continuación: luego del tamizaje apropiado de buena salud, los sujetos en la Cohorte A se enrolaron secuencialmente en cada uno de los cuatro grupos de dosificación de aproximadamente 12 sujetos cada uno (Grupos de dosificación A1, A2, A3 y A4). Los grupos de dosificación A1, A2, A3 y A4 representan dosificaciones antigénicas bivalentes de 5/5 µg, 15/15 µg, 50/50 µg y 150/150 µg, respectivamente, del norovirus GI.1 y GII.4. Los sujetos en cada grupo de dosificación se randomizaron 5:1 para recibir vacuna o placebo. Los sujetos en el Grupo de dosificación A1 recibieron su respectivo tratamiento de randomización (10 sujetos recibieron 5/5 µg de vacuna y 2 sujetos recibieron placebo). Los sujetos fueron seguidos para evaluación de seguridad por revisión de los síntomas registrados en el ayuda memoria (Días 0-7) e historias clínicas internas de las

Visitas del Día 7, 21, 28, 35 y 56. Los datos de seguridad fueron revisados por el Monitor de Seguridad Central (CSM). Luego de estar disponibles los datos de seguridad de 7 días después de la dosis 2 (Día de estudio 35) para revisión de sujetos en el Grupo de dosificación A1 y que fueron considerados aceptables, los sujetos en el Grupo de dosificación A2 fueron elegibles para recibir su dosis inicial. La misma regla se aplicó para la dosificación en los otros grupos de dosificación; es decir, luego de estar disponibles los datos de seguridad de 7 días luego de la dosis 2 (Día de estudio 35) para revisión de un grupo de dosificación, el siguiente grupo de dosificación fue elegible para recibir la dosis inicial.

[0075] Al final del enrolamiento en la Cohorte A, aproximadamente 10 sujetos en cada Grupo de dosificación recibieron vacuna (total de 40 vacunas) y 2 sujetos en cada uno de los grupos recibieron solución salina (total de aproximadamente 8 receptores control de solución salina).

[0076] Los sujetos llevaron el registro en un ayuda memoria diario de los síntomas solicitados que incluyen cuatro reacciones en el sitio de inyección local, tal como dolor, sensibilidad al contacto, coloración rojiza e hinchazón, y 10 signos o síntomas sistémicos que incluyen temperatura oral diaria, dolor de cabeza, fatiga, dolores musculares, escalofríos, dolores de articulaciones y síntomas gastrointestinales de náuseas, vómitos, diarrea, calambres/dolor abdominales para los Días 0 a 7 luego de cada dosis de vacuna bivalente IM de VLP de Norovirus o control. La coloración rojiza e hinchazón en el sitio de inyección se midió y se registró diariamente durante los 7 días luego de cada inyección.

[0077] Las historias clínicas internas se obtuvieron en cada visita de seguimiento en los Días 7+3, 21+3, 28+3, 35+3, 56+7, 180+14 y 393+14 y en la llamada telefónica de seguimiento en el Día 265 +14; los sujetos fueron cuestionados sobre enfermedad, visitas al doctor, cualquier evento adverso serio (SAE), e inicio de cualquier condición médica nueva significativa durante el período. Los sujetos tuvieron un CBC con recuento diferencial de WBC y plaquetas, y BUN sérico, creatinina, glucosa, AST y ALT evaluados durante el tamizaje a los Días 21 y 35 aproximadamente 7 días después de cada dosis) para evaluar la continua elegibilidad y seguridad, respectivamente.

[0078] Se recolectó sangre de sujetos antes de la vacunación en el Día 0 y a los Días 7+3, 21+3, 28+3, 35+3, 56+7, 180+14 y 393 +14 para medir los anticuerpos séricos (IgG, IgA e IgM separadamente y combinados) contra la vacuna bivalente IM de VLP de Norovirus por ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA). También se midieron la actividad de bloqueo de hidratos de carbono séricos y los anticuerpos HAI séricos. Para los sujetos en la Cohorte A, se ensayaron las células secretoras de anticuerpo (ASC), marcadores de migración, células B de memoria y respuestas inmunes celulares.

[0079] Se usaron los siguientes métodos para analizar las muestras de sangre recolectadas de individuos inmunizados o individuos que recibieron el placebo.

Medidas de anticuerpo sérico por ELISA

[0080] Las medidas por ELISA de anticuerpos dirigidos contra los Norovirus se realizaron para todos los sujetos, usando VLP de Norovirus purificadas recombinantes (GI.1 y GII.4 separadamente) como antígenos blanco para tamizar las muestras codificadas. Brevemente, Se usaron VLP de norovirus en solución amortiguadora de recubrimiento de carbonato de pH 9,6 para recubrir placas para microtitulación. Las placas recubiertas se lavaron, se bloquearon y se incubaron con diluciones en serie de dos veces de suero de prueba seguido por lavado e incubación con los reactivos de anticuerpo secundario conjugado a enzima específicos para IgG total, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgM humanas. Se agregaron soluciones de sustrato apropiadas, se desarrolló color, se leyeron las placas y se determinaron los títulos de puntos de valoración para IgG, IgA e IgM en comparación a una curva de estándar de referencia para cada clase de anticuerpo. Se determinaron la media geométrica de los títulos (GMT), los aumentos en veces de la media geométrica (GMFR) y tasas de serorespuesta para cada grupo. La serorespuesta se definió como un aumento de 4 veces en el título del anticuerpo en comparación a títulos previos a la inmunización.

Actividad bloqueadora de antígenos de grupo histológico de sangre (HBGA) de hidratos de carbono de Norovirus

[0081] Se realizaron ensayos de bloqueo para medir la capacidad de los anticuerpos séricos para inhibir la unión de VLP de NV a los hidratos de carbono sintéticos tipo H 1 o tipo H 3 de acuerdo a lo previamente descrito (Reeck *et al.* (2010) J Infect Dis, Vol. 202(8):1212-1218). Brevemente, se incubaron las VLP de NV para los ensayos de bloqueo con un volumen igual de suero, y se diluyeron en series de dos veces a partir de una dilución de inicio de 1:25. Se lavaron placas para microtitulación de 96 pocillos, recubiertas con Neutravidina, y se recubrieron con 2,5 µg/mL de PAA-biotina tipo H 1 polivalente sintética o PAA-biotina tipo H 3 polivalente. Se agregaron soluciones de suero-VLP. Las placas se lavaron y se agregó suero policlonal de conejo específico para las VLP de NV, se lavaron, y luego se incubaron con IgG de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante. El color se desarrolló con sustrato líquido para peroxidasa tetrametilbenzidina y se detuvo con ácido fosfórico 1M. Se midió la densidad óptica a 450. Se realizaron controles positivo y negativo. Se determinaron los títulos de bloqueo del 50 por ciento (BT50), definidos como el título al cual las lecturas de OD (luego de la sustracción del blanco) fueron el 50% del control positivo. Se asignó un valor de 12,5 a las muestras con una BT50 menor de 25. Se determinaron los títulos de la media geométrica (GMT), aumentos en veces de la media geométrica (GMFR) y tasa de serorespuesta para cada grupo. La serorespuesta se definió como un aumento de 4 veces el título de anticuerpo en comparación a los títulos previos a la inmunización. Se usó una muestra de suero control de bloqueo como control interno. Se realizó un ensayo para confirmar la especificidad del bloqueo usando el mismo protocolo para el ensayo de bloqueo con las siguientes excepciones: luego del recubrimiento con hidrato de carbono, se incubó el suero directamente en la placa sin preincubar primero con VLP. Luego del lavado, las VLP se incubaron en la placa y se realizó la detección como para el ensayo de bloqueo.

Ensayo de inhibición por anticuerpos de la hemaglutinación (HAI) por Norovirus

[0082] Se examinaron los anticuerpos inducidos por vacuna para estudiar la capacidad de inhibir la hemaglutinación de RBC humanos tipo O por las VLP de

norovirus como se describió previamente (El Kamary *et al.* (2010) J Infect Dis, Vol. 202(11): 1649-58). Los títulos de HAI se calcularon como la inversa de la mayor dilución que inhibió la hemaglutinación con un patrón de RBC negativo compacto y se presentan como GMT, GMFR y $\geq$ aumentos de 4 veces.

[0083] Las VLP de Norovirus GI.1 y GII.4 se diluyeron serialmente por separado y se incubaron con un volumen igual de una suspensión 0,5% de RBC humanos en una placa de 96 pocillos con fondo en V. La cantidad de antígenos de VLP de norovirus correspondiente a 4 unidades de HA se determinó y se confirmó por titulación por retroceso. Los sueros de prueba se inactivaron por calor a 56 °C durante 30 minutos y se trataron con suspensión preparada fresca de caolín al 25%. Para eliminar los inhibidores séricos, las muestras de prueba se preadsorbieron con RBC. Los ensayos de HAI se realizaron como a continuación: se agregaron los sueros pretratados (diluidos 2 veces en PBS pH 5,5) a placas de 96 pocillos en V y se incubaron con un volumen igual de antígeno VLP de Norovirus GI.1 y GII.4, respectivamente, que contenía 4 unidades de HA. Se agregó una suspensión de RBC al 0,5% a cada pocillo y se incubaron las placas durante 90 minutos adicionales a 4 °C. Los pocillos que contenían solo PBS o antígeno sin suero sirvieron como controles negativos y positivos, respectivamente. Se determinaron las medias geométricas de los títulos (GMT), aumentos en veces de la media geométrica (GMFR) y tasas de serorespuesta para cada grupo. La serorespuesta se definió como un aumento de 4 veces en el título de anticuerpo respecto a los títulos previos a la inmunización.

Ensayo de células secretoras de anticuerpos

[0084] Las PBMC se aislaron de aproximadamente 60 mL de sangre anticoagulada en los Días 0, 7+3, 28+3 y 35+3 luego de la administración de vacuna bivalente IM de VLP de Norovirus o placebo. Se obtuvieron aproximadamente 25 mL de sangre para ensayos de PBMC frescas y 35 mL de sangre para criopreservación de PBMC. Los ensayos de ASC detectan las células que secretan anticuerpos dirigidos contra las VLP de norovirus (Tacket *et al.* (2000) J. Infect. Dis., Vol. 182:302-305; Tacket *et al.* (2003) Clin. Immunol., Vol. 108:241-247; El Kamary *et al.* (2010) J Infect Dis, Vol. 202(11): 1649-58). Las

PBMC frescas se evaluaron según la frecuencia y determinación de ASC de marcadores de migración de un subconjunto de sujetos. Se evaluaron las PBMC de sujetos participando en la Cohorte A según la frecuencia de ASC. Se describe la tasa de respuesta y media del número de ASC cada 10^6 PBMC en cada punto de tiempo para cada grupo. Una respuesta positiva se define como un recuento de ASC luego de la vacunación cada 10^6 PBMC que está al menos 3 desviaciones estándares (SD) por encima de la media del recuento para todos los sujetos (en métrica de logaritmo) y al menos 8 puntos de ASC, que corresponde con la media de los pocillos controles negativos estimulados con medio (2 puntos) más 3 SD como se determinó en ensayos similares.

Medida de células B de memoria específicas por el virus Norovirus

[0085] Se recolectó sangre anticoagulada solo en sujetos de la Cohorte A (aproximadamente 25 mL en los Días 0, 28, 56 y 180) para medir las células B de memoria en los Días 0, 28, 56 y 180 luego de la vacunación usando un ensayo ELISpot precedido por estimulación *in vitro* por antígeno (Crotty *et al.* (2004) J. Immunol. Methods, Vol. 286:111-122.; Li *et al.* (2006) J. Immunol. Methods, Vol. 313:110-118). Se incubaron las células mononucleares de sangre periférica (5×10^6 células/mL, 1 mL/pocillo en placas de 24 pocillos) durante 4 días con antígenos de VLP de norovirus GI.1 y GII.4 por separado para permitir la expansión clonal de las células B de memoria específicas de antígeno y la diferenciación a células secretoras de anticuerpo. Los controles incluyeron células incubadas en las mismas condiciones en ausencia de antígeno y/o células incubadas con antígeno no relacionado. Luego de la estimulación, las células se lavaron, se contaron, y se transfirieron a placas de ELISpot recubiertas con VLP de Norwalk. Para determinar la frecuencia de células B de memoria específicas de virus por total linfocitos B secretores de Ig, también se agregaron células B expandidas a los pocillos recubiertos con anticuerpos IgG anti-humano e IgA anti-humano. Los anticuerpos unidos se revelaron con IgG anti-humano o IgA anti-humano marcada con HRP seguido por el sustrato apropiado. Los conjugados a las subclases IgA e IgG (IgA1, IgA2 e IgG1-4) también se usaron para determinar las respuestas a

subclases específicas de antígeno que pueden estar relacionados con diferentes mecanismos efectores y lugares de sensibilización inmune. Los puntos se contaron con un lector de ELISpot. Las poblaciones de células expandidas para cada sujeto se examinaron por citometría de flujo para confirmar su fenotipo de célula B de memoria, es decir CD19+, CD27+, IgG+, IgM+, CD38+, IgD, entre otros (Crotty *et al.* (2004) J. Immunol. Methods, Vol. 286:111-122.; Li *et al.* (2006) J. Immunol. Methods, Vol. 313:110-118).

Respuestas inmunes celulares

[0086] Se recolectó sangre anticoagulada (aproximadamente 25 mL en los Días 0, 28, 56 y 180) de sujetos en la Cohorte A como muestras codificadas y las PBMC aisladas y criopreservadas en nitrógeno líquido para una posible evaluación futura de respuestas CMI a antígenos de VLP de norovirus GI.1 y GII.4. Los ensayos que se realizan incluyen respuestas proliferativas de PBMC y citoquinas contra los antígenos de VLP de norovirus GI.1 y GII.4 por medida de los niveles de interferón (IFN)- γ e interleuquina (IL)-4 entre otros de acuerdo a técnicas establecidas (Samandari *et al.* (2000) J. Immunol., Vol. 164:2221-2232; Tacket *et al.* (2003) Clin. Immunol., Vol. 108:241-247). También se evaluaron las respuestas de células T.

Resultados

[0087] La evaluación de seguridad incluyó síntomas solicitados locales y sistémicos durante 7 días y síntomas no solicitados durante 28 días luego de cada dosis. Los eventos adversos serios son monitoreados durante 12 meses. La inmunogenicidad se evaluó con suero obtenido antes y después de cada vacunación para anticuerpos Pan-ELISA (IgG, IgA e IgM combinados) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para células secretoras de anticuerpos (ASC) IgG e IgA por medio de ELISpot.

[0088] Los cuatro grupos de dosificación han sido enrolados para la Cohorte A con los datos de seguridad luego de la dosis dos disponibles de los cuatro grupos de dosificación (40 vacunas en total). Entre las 40 vacunas, los síntomas locales más comunes informados luego de cada dosis estuvieron el dolor o sensibilidad al tacto, mientras que la hinchazón o coloración rojiza fue menos

frecuente. No se informaron síntomas locales severos. Los síntomas sistémicos de dolor de cabeza, mialgia o malestar luego de cada dosis se informaron en menos de la mitad de las vacunas. Ninguna vacuna se reportó con fiebre. No se informaron SAE relacionados.

[0089] Como se muestra en las Figuras 1-3, se observaron respuestas de anticuerpos Pan-ELISA robustas anamnéticas (IgG, IgA e IgM combinadas) para ambos antígenos de VLP 7 días después de la primera dosis de de la dosificación menor (VLP 5 µg de GI.1 + 5 µg de GII.4). La segunda dosis no potenció las respuestas luego de la dosis uno. Se observaron resultados similares para las respuestas de IgG sérica e IgA sérica específicas de antígeno medidas por separado (Figuras 4-9). Las respuestas dependientes de la dosis se observaron para las respuestas de anticuerpos para ambos antígenos (Figuras 1-9). Sin embargo, la respuesta máxima a la VLP de GI.1 pareció alcanzarse con una dosis menor que la de la respuesta máxima a la VLP de GII.4 (15 µg vs. 50 µg). interesantemente, la dosis única de la vacuna bivalente administrada intramuscularmente de Norovirus indujo un título de anticuerpo específico de antígeno sorprendentemente y significativamente mayor que el título inducido por las dos dosis de una vacuna de VLP monovalente administrada intranasalmente que comprende una dosis de VLP 20 veces mayor (Figura 10; comparar el grupo 5 µg de LV03-104 con el grupo 100 µg de LV01-103). Adicionalmente, la dosis baja (5 µg), de vacuna bivalente IM de Norovirus produjo un título de anticuerpo específico de Norovirus similar al inducido en humanos expuestos al Norovirus nativo (Figura 10).

[0090] También se observaron respuestas robustas de ELIspot de IgG e IgA a los 7 días luego de la primera dosis de la dosificación menor (5 µg) para ambos antígenos de VLP (Tabla 2). Notablemente, las respuestas de células secretoras de anticuerpo (ASC) se desplazaron hacia IgA vs. IgG y las ASC exhibieron un fenotipo de migración a mucosas (alfa 4/beta7) y receptor de quimoquina (CCR10) evaluado por citometría de flujo (Figura 11; Tabla 3). Como se muestra la Tabla 3, un mayor número de ASC exhiben marcadores de migración a mucosa (beta 7+, CD62L-) en comparación con marcadores de

migración duales a mucosa/periféricos (beta 7+, CD62L+). La Tabla 4 muestra el porcentaje de células B de memoria cada 10⁶ de monocitos de sangre periférica que responden a los antígenos de VLP. Un mayor porcentaje de células B específicas de antígeno también expresan marcadores de migración a mucosa en comparación con los marcadores duales a mucosa/periféricos o periféricos. También se observaron respuestas similares en receptores que recibieron las dosis de 15 µg y 50 µg (Tablas 2-4).

Tabla 2. Día 7, Caracterización de la respuesta de PBMC. Aproximación de anticuerpo

Células secretoras (ASC)/millón de células CD19+.

	ASC/millón de células CD19+ - Día 7				Porcentaje de respuesta a vacuna		Específico de vacuna
Células B específicas de Norovirus	IgA GI.1	IgG GI.1	IgA GII.4	IgG GII.4	Específica por GI.1	Específica por GII.4	Porcentaje de PBMC circulantes totales
Media geométrica de A1 con dosis 5 µg (n=5)	30947	13807	10947	3945	4,48%	1,49%	5,96%
Desviación estándar de A1 con dosis de 5 µg	6674	9780	3651	2261			
Media geométrica de A2 con dosis de 15 µg (n=4)	25296	17004	7108	4336	4,23%	1,14%	5,37%
Desviación	10846	18770	6055	5697			

	ASC/millón de células CD19+ - Día 7				Porcentaje de respuesta a vacuna		Específico de vacuna
Células B específicas de Norovirus	IgA GI.1	IgG GI.1	IgA GII.4	IgG GII.4	Específica por GI.1	Específica por GII.4	Porcentaje de PBMC circulantes totales
estándar de A2 con dosis de 15 µg							
Media geométrica de A3 con dosis de 50 µg (n=4)	36158	20572	14103	2549	5,67%	1,67%	7,34%
Desviación estándar de A3 con dosis de 50 µg	11470	418	7627	2230			
Media geométrica de A4 con dosis de 150 µg (n=4)	34183	9566	26213	11310	4,37%	3,75%	8,13%
Desviación estándar de A4 con dosis de 150 µg	32938	4466	89769	15226			
Placebo (n=2)	0	152	0	108	0,02%	0,01%	0,03%

Tabla 3. Marcadores de ASC en receptores de vacuna y placebo por citometría de flujo-Día 7

	% de células B CD19+ totales que son CD27+ & CD38+	% de % CD27+, CD38+, CCR10+ Beta 7+, CD62L- totales	% de % CD27+, CD38+, CCR10+ Beta 7+, CD62L+ totales	Porcentaje de ASC CD27+, CD38+, CCR10+, Beta 7+ CD62L(+)&(-) totales	Específico de vacuna. Total por millón de células* CD27+, CD38+, CCR10+, Beta 7+ CD62L(+)&(-)	Específico de vacuna. Porcentaje de migración a mucosa de PBMC circulantes totales*
Media geométrica de A1 con dosis de 5 µg (n=5)	25,10%	6,86%	1,06%	2,78%	1656	0,17%
Desviación estándar de A1 con dosis de 5 µg	10,45	3,13	1,01			
Media geométrica de A2 con dosis de 15 µg	12,99%	16,98%	2,43%	4,63%	1355	0,14%

49

	% de células B CD19+ totales que son CD27+ & CD38+	% de % CD27+, CD38+, CCR10+ Beta 7+, CD62L- totales	% de % CD27+, CD38+, CCR10+ Beta 7+, CD62L+ totales	Porcentaje de ASC CD27+, CD38+, CCR10+, Beta 7+ CD62L(+)&(-) totales	Específico de vacuna. Total por millón de células* CD27+, CD38+, CCR10+, Beta 7+ CD62L(+)&(-)	Específico de vacuna. Porcentaje de migración a mucosa de PBMC circulantes totales*
(n=4)						
Desviación estándar de A2 con dosis de 15 µg	9,13	1,56	0,23			
Media geométrica de A3 con dosis de 50 µg (n=4)	31,71%	26,43%	3,63%	12,01%	23915	2,39%
Desviación estándar de A3 con dosis de 50 µg	6,32	1,82	1,38			
Media geométrica de A4	33,46%	30,06%	5,68%	15,74%	31350	3,14%

48
50

	% de células B CD19+ totales que son CD27+ & CD38+	% de % CD27+, CD38+, CCR10+ Beta 7+, CD62L- totales	% de % CD27+, CD38+, CCR10+ Beta 7+, CD62L+ totales	Porcentaje de ASC CD27+, CD38+, CCR10+, Beta 7+ CD62L(+)&(-) totales	Específico de vacuna. Total por millón de células* CD27+, CD38+, CCR10+, Beta 7+ CD62L(+)&(-)	Específico de vacuna. Porcentaje de migración a mucosa de PBMC circulantes totales*
con dosis de 150 µg (n=4)						
Desviación estándar de A4 con dosis de 150 µg	9,86	2,97	1,70			
Placebo (n=2)	1,26%	22,00%	0,87%	1,20%	5	0,001%

* Asume que la mayoría de las ASC son específicas por norovirus.

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

	% de células B CD19+ totales	% de % CD27+, CD38+, CD138+,	% de % CD27+, CD38+, CD138+,	Porcentaje de CD27+, CD38+,	Específico de vacuna. Total	Específico de vacuna. Porcentaje de
--	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--

4/5
51

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

Placebo (n=1)	0,10%	12,50%	0,00%	0,01%	0	0%
---------------	-------	--------	-------	-------	---	----

* Se asume que la mayoría de las ASC son específicas por norovirus.

En ausencia de un ensayo de neutralización viral directo disponible debido a la incapacidad de cultivar Norovirus *in vitro*, se realizaron ensayos funcionales que sirvieron como sustitutos para los ensayos de neutralización viral para medir los anticuerpos funcionales en vacunas.

6/8
S3

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

Tabla 5. Actividad bloqueadora de hidratos de carbono (HBGA BT50), aumento en veces de la media geométrica (GMFR) y serorespuesta (aumento de 4 veces) de anti-Norovirus GI.1

		Día del estudio														
		7 Días luego de la dosis 1			21 Días luego de la dosis 1			28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)			7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)			28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)		
Grupo de tratamiento	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	
Vacuna de VLP 5/5 mcg	9	26,6 (8,3, 85,1)	88,9 (51,8, 99,7)	9	25,1 (8,9, 70,3)	88,9 (51,8, 99,7)	9	19,7 (8,2, 47,1)	100,0 (66,4, 100,0)	9	20 (7,7, 51,7)	88,9 (51,8, 99,7)	9	16,6 (5,7, 48,1)	77,8 (40,0, 97,2)	
Vacuna de VLP 15/15 mcg	8	33,2 (13,6, 80,8)	100,0 (63,1, 100,0)	8	25,5 (10,5, 61,8)	100,0 (63,1, 100,0)	8	18,5 (8,4, 40,6)	100,0 (63,1, 100,0)	7	22,2 (8,8, 56)	100,0 (59,0, 100,0)	7	8,4 (2,4, 29,6)	57,1 (18,4, 90,1)	

	Día del estudio														
	7 Días luego de la dosis 1			21 Días luego de la dosis 1			28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)			7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)			28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)		
Grupo de tratamiento	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)
Vacuna de VLP 50/50 mcg	10	38,6 (18,3, 81,6)	100,0 (69,2, 100,0)	10	27,9 (13,4, 58)	100,0 (69,2, 100,0)	10	20,9 (10, 43,5)	100,0 (69,2, 100,0)	10	19 (9,9, 36,4)	100,0 (69,2, 100,0)	9	10,2 (4,6, 22,8)	77,8 (40,0, 97,2)
Vacuna de VLP 150/150 mcg	7	30,6 (16,3, 57,6)	100,0 (59,0, 100,0)	8	19,4 (13,1, 28,5)	100,0 (63,1, 100,0)	8	16,3 (11,7, 22,6)	100,0 (63,1, 100,0)	8	18,8 (12,8, 27,5)	100,0 (63,1, 100,0)	8	23,8 (17, 33,3)	100,0 (63,1, 100,0)
Placebo	8	0,9 (0,8, 0,0)	0,0 (0,0, 0,0)	8	0,8 (0,7, 0,0)	0,0 (0,0, 0,0)	8	0,8 (0,6, 0,0)	0,0 (0,0, 0,0)	8	0,8 (0,7, 0,0)	0,0 (0,0, 0,0)	8	0,6 (0,3, 0,0)	0,0 (0,0, 0,0)

Día del estudio																									
	7 Días luego de la dosis 1					21 Días luego de la dosis 1					28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)					7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)					28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)				
Grupo de tratamiento	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)				
		1)	36,9)		1,1)	36,9)		1,1)	36,9)		1,1)	36,9)		1,1)	36,9)		1,2)	36,9)							

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

Se excluyen puntos de datos de dos sujetos debido a una posible mezcla de muestras; uno de estos puntos de datos es una muestra basal que resulta en que el sujeto no tenga datos de aumento en veces para ningún punto en el tiempo.

Tabla 6. Actividad bloqueadora de hidratos de carbono (HBGA BT50), media geométrica del título (GMT) de anti-Norovirus GI.1

Día del estudio													
-----------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

59

59

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

		Día del estudio											
		Previo a la dosis 1		7 Días luego de la dosis 1		21 Días luego de la dosis 1		28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)		7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)		28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)	
Grupo de tratamiento		N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)
Placebo		8	29 (9,1, 92,8)	9	24,6 (9,8, 62,1)	9	22,5 (8,8, 57,3)	9	22,2 (8,9, 55,5)	8	24,6 (8,4, 72,6)	8	18,3 (10,1, 33,3)

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

Se excluyen puntos de datos de dos sujetos debido a una posible mezcla de muestras.

[0091] Similarmente, se midió la actividad bloqueadora de hidratos de carbono de anticuerpos séricos dirigidos contra VLP de GII.4. Se observó una respuesta significativa en todos los grupos de dosificación medido por GMFR y serorespuesta (Tabla 7) así como GMT (Tabla 8). Similar al bloqueo mediado por anticuerpos de la unión de GI.1 descrito anteriormente, se detectó un bloqueo robusto de la actividad de unión a hidrato de carbono de VLP de GII.4 luego de solo una dosis, y una segunda dosis no pareció potenciar la actividad bloqueadora.

Tabla 7. Actividad bloqueadora de hidratos de carbono (HBGA BT50), aumento en veces de la media geométrica (GMFR) y serorespuesta (aumento de 4 veces) de anti-Norovirus GII.4

Día del estudio															
	7 Días luego de la dosis 1				21 Días luego de la dosis 1			28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)			7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)			28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)	
Grupo de tratamiento	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)
Vacuna de VLP 5/5 mcg	9	5 (1,6, 16,1)	33,3 (7,5, 70,1)	9	5,9 (1,7, 20,3)	55,6 (21,2, 86,3)	9	4,7 (1,4, 15,7)	44,4 (13,7, 78,8)	9	4,7 (1,6, 13,8)	44,4 (13,7, 78,8)	9	5 (1,6, 15,9)	55,6 (21,2, 86,3)

Día del estudio															
	7 Días luego de la dosis 1			21 Días luego de la dosis 1			28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)			7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)			28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)		
Grupo de tratamiento	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)
Vacuna de VLP 15/15 mcg	8	11 (2,7, 45,3)	62,5 (24,5, 91,5)	8	9,2 (3, 27,9)	62,5 (24,5, 91,5)	8	7,4 (2,5, 21,8)	62,5 (24,5, 91,5)	7	7 (2,1, 23)	57,1 (18,4, 90,1)	7	5,6 (2,3, 14)	57,1 (18,4, 90,1)
Vacuna de VLP 50/50 mcg	10	18,6 (4,9, 70,8)	70,0 (34,8, 93,3)	10	12,2 (3,8, 39,4)	70,0 (34,8, 93,3)	10	8,4 (2,9, 24,1)	70,0 (34,8, 93,3)	10	8,7 (2,9, 26,1)	70,0 (34,8, 93,3)	9	5,2 (2,2, 12)	66,7 (29,9, 92,5)

Día del estudio															
	7 Días luego de la dosis 1			21 Días luego de la dosis 1			28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)			7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)			28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)		
Grupo de tratamiento	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)
			93,3)												
Vacuna de VLP 150/150 mcg	7	10,1 (2, 51,8)	57,1 (18,4, 90,1)	8	5,5 (1,9, 16,5)	50,0 (15,7, 84,3)	8	4,4 (1,6, 12,2)	50,0 (15,7, 84,3)	8	4,3 (1,7, 10,7)	37,5 (8,5, 75,5)	8	3,1 (1,3, 7,2)	25,0 (3,2, 65,1)
Placebo	8	1 (0,9, 0,0)	0,0 (0,0, 0,0)	8	1,1 (1, 0,0)	0,0 (0,0, 0,0)	8	1,3 (0,9, 0,0)	12,5 (0,3, 0,0)	8	1,8 (0,5, 0,0)	12,5 (0,3, 0,0)	8	2 (0,7, 0,0)	12,5 (0,3, 0,0)

	Día del estudio														
	7 Días luego de la dosis 1			21 Días luego de la dosis 1			28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)			7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)			28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)		
Grupo de tratamiento	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)
		1,1)	36,9)		1,3)	36,9)		2,1)	52,7)		6,7)	52,7)		6,1)	52,7)

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

Se excluyen puntos de datos de dos sujetos debido a una posible mezcla de muestras; uno de estos puntos de datos es una muestra basal que resulta en que el sujeto no tenga disponibles datos de aumentos en veces para ningún punto en el tiempo.

Tabla 8. Actividad bloqueadora de hidratos de carbono (HBGA BT50), media geométrica del título (GMT) de anti-Norovirus GII.4

Tabla 6. Actividad bloqueadora de miridos de carbono (HCO/DT50), media geométrica del título (GMT)													
	Día del estudio												
	Previo a la dosis 1		7 Días luego de la dosis 1		21 Días luego de la dosis 1		28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)		7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)		28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)		
Grupo de tratamiento	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	
Vacuna de VLP 5/5 mcg	9	40,3 (18, 90)	9	202,1 (106,3, 384,3)	9	236,9 (133,4, 420,6)	9	189,7 (108,6, 331,3)	9	188,7 (118,7, 300,1)	9	201,6 (116,4, 349,5)	
Vacuna de VLP 15/15 mcg	8	23,7 (12,8, 43,8)	8	260,1 (95,1, 711,1)	8	218,1 (104,2, 456,3)	8	175,4 (82,7, 372)	7	182,3 (89,1, 372,8)	7	146,3 (92,4, 231,5)	
Vacuna de VLP 50/50 mcg	10	28,4 (13,1, 61,5)	10	527,2 (271,1, 1025)	10	345,2 (195,5, 609,6)	10	238,3 (139,4, 407,3)	10	246,5 (138,7, 438,2)	9	160,2 (107,4, 238,8)	
Vacuna de VLP	8	63 (24,8, 145,6)	7	721,8 (344,6, 1587,7)	8	347,7 (186,1, 670,3)	8	277 (145,6, 527)	8	267,9 (158,7, 438,2)	8	193,5 (121,6, 300,1)	

		Día del estudio											
		Previo a la dosis 1		7 Días luego de la dosis 1		21 Días luego de la dosis 1		28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)		7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)		28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)	
Grupo de tratamiento		N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)
150/150 mcg			160,4)		1512)		649,5)				452,2)		308,2)
Placebo		8	24,1 (12,9, 45)	9	22,8 (12,6, 41,6)	9	24,9 (12,7, 48,7)	9	29,1 (15,1, 56,1)	8	44 (12,6, 154,2)	8	48,2 (16,7, 139,5)

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

Se excluyen puntos de datos de dos sujetos debido a una posible mezcla de muestras.

[0092] Los ensayos de inhibición de hemaglutinación (HAI) también se utilizaron para probar la respuesta de anticuerpos séricos de sujetos vacunados contra los antígenos VLP de Norovirus blanco. De manera similar a los estudios de antígeno H de hidratos de carbono, solo una dosis de vacuna de VLP indujo anticuerpos que inhibieron la hemaglutinación en todos los grupos de dosificación, medido por GMFR (Tabla 9), aumento de 4 veces (Tabla 9) y GMT (Tabla 10). Aunque el nivel de inhibición de hemaglutinación se mantuvo hasta el último día ensayado (28 días luego de la dosis 2, 56 días luego de la dosis 1), la segunda dosis de vacuna de VLP no pareció aumentar la inhibición de hemaglutinación mediada por anticuerpos inducidos por la vacuna.

Tabla 9. Ensayo de inhibición de hemaglutinación, aumento en veces de la media geométrica (GMFR) y serorespuesta (aumento de 4 veces) de anti-Norovirus GI.1

Día del estudio															
	7 Días luego de la dosis 1			21 Días luego de la dosis 1			28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)			7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)			28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)		
Grupo de tratamiento	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)
Vacuna de VLP 5/5 mcg	9	5,4 (3, 9,8)	77,8 (40,0, 97,2)	9	7 (4,6, 10,7)	88,9 (51,8, 99,7)	9	6,1 (4,1, 9,3)	88,9 (51,8,	9	6 (3,7, 9,5)	77,8 (40,0, 97,2)	9	6,3 (3,9, 10,3)	88,9 (51,8,

Día del estudio																	
	7 Días luego de la dosis 1				21 Días luego de la dosis 1				28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)				7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)				28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)
Grupo de tratamiento	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)		
									99,7)							99,7)	
Vacuna de VLP 15/15 mcg	8	8,9 (4,4, 18)	100,0 (63,1, 100,0)	8	9,5 (4, 22,5)	87,5 (47,3, 99,7)	8	7,1 (3,1, 16,1)	75,0 (34,9, 96,8)	7	8,5 (4,1, 17,7)	85,7 (42,1, 99,6)	7	8,1 (4,4, 15,2)	100,0 (59,0, 100,0)		
Vacuna de VLP	10	22,4 (11,6,	100,0	10	16,7 (9,3,	100,0	10	13,9 (8,1,	100,0	10	14,5 (9,3,	100,0	9	11,8 (6,3,	100,0		

		Día del estudio														
		7 Días luego de la dosis 1			21 Días luego de la dosis 1			28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)			7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)			28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)		
Grupo de tratamiento	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	
50/50 mcg		43)	(69,2, 100,0)		29,8)	(69,2, 100,0)		24)	(69,2, 100,0)		22,7)	(69,2, 100,0)		21,9)	(66,4, 100,0)	
Vacuna de VLP 150/150 mcg	7	12,6 (5,7, 28)	85,7 (42,1, 99,6)	8	11,1 (6,4, 19,3)	100,0 (63,1, 100,0)	8	8,4 (5, 14)	100,0 (63,1, 100,0)	8	8,4 (5, 14)	100,0 (63,1, 100,0)	8	7,3 (4,5, 11,9)	100,0 (63,1, 100,0)	

Handwritten mark

Día del estudio															
	7 Días luego de la dosis 1			21 Días luego de la dosis 1			28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)			7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)			28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)		
Grupo de tratamiento	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)
Placebo	8	1 (0,8, 1,2)	0,0 (0,0, 36,9)	8	1 (0,9, 1,2)	0,0 (0,0, 36,9)	8	1 (0,9, 1,1)	0,0 (0,0, 36,9)	8	0,9 (0,7, 1,1)	0,0 (0,0, 36,9)	8	1 (0,8, 1,2)	0,0 (0,0, 36,9)

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

Se excluyen puntos de datos de dos sujetos debido a una posible mezcla de muestras; uno de estos puntos de datos es una muestra basal que resulta en que el sujeto no tenga disponibles datos de aumentos en veces para ningún punto en el tiempo.

Tabla 10. Ensayo de inhibición de hemaglutinación. Media geométrica del título (GMT) de anti-Norovirus GI.1

	Día del estudio												
	Previo a la dosis 1		7 Días luego de la dosis 1		21 Días luego de la dosis 1		28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)		7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)		28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)		
Grupo de tratamiento	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	
Vacuna de VLP 5/5 mcg	9	26,4 (14,1, 49,4)	9	143,5 (53,6, 383,8)	9	185,3 (88,6, 387,6)	9	162,1 (83,3, 315,6)	9	157 (80,3, 307,1)	9	167,4 (88,4, 316,8)	
Vacuna de VLP 15/15 mcg	8	11,9 (6,1, 23,4)	8	105,3 (56,1, 197,6)	8	113,1 (42,5, 301,3)	8	84,2 (31,1, 227,6)	7	103,3 (43,3, 246,6)	7	99,2 (46,9, 209,7)	
Vacuna de VLP 50/50 mcg	10	7,2 (5,3, 9,6)	10	160 (79,4, 322,6)	10	119,2 (60,4, 235,1)	10	99,7 (51,8, 191,8)	10	103,8 (58,4, 184,5)	9	81,1 (38,8, 169,5)	
Vacuna de VLP 150/150	8	9,2 (7,5, 11,1)	7	114,1 (50,9, 258,1)	8	101,6 (62, 166,4)	8	77,2 (51,8, 115)	8	77,2 (51,8, 115)	8	67,3 (44,7, 101,3)	

	Día del estudio											
	Previo a la dosis 1		7 Días luego de la dosis 1		21 Días luego de la dosis 1		28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)		7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)		28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)	
Grupo de tratamiento	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)
mcg		11,3)		255,7)								
Placebo	8	16,8 (10,1, 28,1)	9	16,6 (11,7, 23,7)	9	16,1 (10,7, 24,1)	9	16,6 (11, 25)	8	15,4 (10, 23,7)	8	16,2 (10,8, 24,4)

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

Se excluyen puntos de datos de dos sujetos debido a una posible mezcla de muestras.

68

73

[0093] La inhibición de la hemaglutinación se produjo cuando la VLP blanco era un virus no coincidente. Los anticuerpos séricos inducidos por la vacuna inhibieron la hemaglutinación por una VLP de una cepa de virus Houston, medido por GMFR y serorespuesta (Tabla 11) así como GMT (Tabla 12). En este caso, las mayores dosis de vacuna de VLP lograron respuestas más fuertes, particularmente medido por el aumento de 4 veces o GMT. El GMFR y el aumento de 4 veces también aumentaron significativamente cuando la VLP blanco fue la cepa del virus Cincinnati 2003, medido justo 7 días luego de la dosis 1 (Tabla 13).

Tabla 11. Ensayo de inhibición de hemaglutinación (VLP de cepa de virus Houston), aumento en veces de la media geométrica (GMFR) y serorespuesta (aumento de 4 veces) de anti-Norovirus GII.4

	Día del estudio														
	7 Días luego de la dosis 1			21 Días luego de la dosis 1			28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)			7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)			28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)		
Grupo de tratamiento	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)
Vacuna de VLP 5/5 mcg	9	1,2 (1, 1,5)	0,0 (0,0, 33,6)	9	1,3 (0,9, 1,7)	0,0 (0,0, 33,6)	9	1,3 (0,9, 1,7)	0,0 (0,0, 33,6)	9	1,3 (1, 1,7)	0,0 (0,0, 33,6)	9	1,3 (1, 1,6)	0,0 (0,0, 33,6)

Día del estudio																
	7 Días luego de la dosis 1			21 Días luego de la dosis 1			28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)			7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)			28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)			
Grupo de tratamiento	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	
Vacuna de VLP 15/15 mcg	8	1,7 (0,9, 3)	12,5 (0,3, 52,7)	8	1,6 (1,1, 2,4)	12,5 (0,3, 52,7)	8	1,5 (1,1, 2,2)	0,0 (0,0, 36,9)	7	1,5 (1, 2,2)	0,0 (0,0, 41,0)	7	1,6 (1,1, 2,4)	0,0 (0,0, 41,0)	
Vacuna de VLP 50/50	10	2 (0,9, 4,3)	10,0 (0,3, 44,5)	10	1,6 (0,8, 3,1)	10,0 (0,3, 44,5)	10	1,7 (0,9, 3,1)	10,0 (0,3, 44,5)	10	1,5 (0,9, 2,4)	10,0 (0,3, 44,5)	9	1,3 (0,8, 2)	11,1 (0,3, 48,2)	

	Día del estudio														
	7 Días luego de la dosis 1			21 Días luego de la dosis 1			28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)			7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)			28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)		
Grupo de tratamiento	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)
mcg															
Vacuna de VLP 150/150 mcg	7	4,3 (1,5, 12,4)	57,1 (18,4, 90,1)	8	2,6 (1,2, 5,8)	50,0 (15,7, 84,3)	8	1,9 (1,1, 3,3)	12,5 (0,3, 52,7)	8	1,9 (1,1, 3,5)	12,5 (0,3, 52,7)	8	1,7 (1,1, 2,6)	12,5 (0,3, 52,7)
Placebo	8	1 (0,9, 1,1)	0,0 (0,0, 0,0)	8	1,1 (0,9, 1,1)	0,0 (0,0, 0,0)	8	1,1 (1, 1,2)	0,0 (0,0, 0,0)	8	1,2 (0,8, 1,2)	12,5 (0,3, 12,5)	8	1,1 (0,7, 1,1)	12,5 (0,3, 12,5)

Handwritten signature

77

Día del estudio															
	7 Días luego de la dosis 1			21 Días luego de la dosis 1			28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)			7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)			28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)		
Grupo de tratamiento	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)	N	GMFR (IC del 95%)	aumento de 4 veces (IC del 95%)
			36,9)		1,3)	36,9)			36,9)		1,9)	52,7)		1,8)	52,7)

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

Se excluyen puntos de datos de dos sujetos debido a una posible mezcla de muestras; uno de estos puntos de datos es una muestra basal que resulta en que el sujeto no tenga disponibles datos de aumentos en veces para ningún punto en el tiempo.

~~88~~

Tabla 12. Ensayo de inhibición de hemaglutinación (VLP de cepa de virus Houston), título de media geométrica (GMT) de anti-Norovirus GII.4

Día del estudio																								
	Previo a la dosis 1				7 Días luego de la dosis 1				21 Días luego de la dosis 1				28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)				7 Días luego de la dosis 2 (35 Días luego de la dosis 1)				28 Días luego de la dosis 2 (56 Días luego de la dosis 1)			
Grupo de tratamiento	N	GMT (IC del 95%)		N	GMT (IC del 95%)		N	GMT (IC del 95%)		N	GMT (IC del 95%)		N	GMT (IC del 95%)		N	GMT (IC del 95%)		N	GMT (IC del 95%)				
Vacuna de VLP 5/5 mcg	9	143,5	(97,9, 210,3)	9	177,4	(122,7, 256,5)	9	180,8	(114,4, 285,6)	9	180,8	(114,4, 285,6)	9	189,1	(119,2, 299,9)	9	180,8	(122,7, 266,3)						
Vacuna de VLP 15/15 mcg	8	129,8	(86,4, 194,9)	8	218,3	(129,2, 368,8)	8	207,5	(134,8, 319,3)	8	200,2	(132,8, 301,7)	7	169,5	(114,1, 252)	7	187,2	(119,1, 294,2)						
Vacuna de VLP 50/50 mcg	10	161,9	(119,7, 219)	10	323,8	(156,5, 669,8)	10	252,5	(130,4, 489,2)	10	273,9	(150,9, 497,2)	10	242,5	(150,2, 391,5)	9	195,2	(125, 304,9)						
Vacuna de VLP	8	210,6	(108,8, 210,6)	7	853,5	(297,4, 853,5)	8	546,2	(237,6, 546,2)	8	406,3	(201,5, 406,3)	8	406,3	(180,3, 406,3)	8	354,1	(184,6, 354,1)						

		Día del estudio											
										7 Días luego de la dosis 2		28 Días luego de la dosis 2	
				7 Días luego de la dosis 1		21 Días luego de la dosis 1		28 Días luego de la dosis 1 (Previo a la dosis 2)		(35 Días luego de la dosis 1)		(56 Días luego de la dosis 1)	
Grupo de tratamiento	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	N	GMT (IC del 95%)	
150/150 mcg		407,5)		2449)		1255)		819,1)		915,4)		679,5)	
Placebo	8	148,9 (73,8, 300,3)	9	150,1 (80,1, 281,1)	9	157 (77,9, 316,5)	9	167,4 (91,4, 306,4)	8	183,6 (95, 354,5)	8	162,4 (88,5, 297,9)	

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

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

[0094] Los resultados de este estudio demostraron que la vacuna de VLP IM de IM de Norovirus bivalente fue en general bien tolerada. Los datos de inmunogenicidad sugirieron que una dosis de vacuna única puede ser suficiente para proteger los adultos humanos seropositivos. Los resultados de los ensayos de actividad bloqueadora de hidratos de carbono y de inhibición de hemaglutinación proveyeron evidencia adicional de que una dosis de vacuna única indujo anticuerpos séricos con actividad potente anti-Norovirus. La magnitud y rapidez de las respuestas inmunes observadas luego de una dosis parenteral única en humanos fueron dramáticas cuando se compararon con respuestas inmunes anteriores por administraciones de vacunas de VLP nasales múltiples con dosificaciones de VLP mucho mayores (El Kamary *et al.* (2010) J Infect Dis, Vol. 202(11): 1649-1658). Estas respuestas fueron también superiores a aquellas inducidas por las VLP de Norovirus administradas oralmente (Tacket *et al.* (2003) Clin Immunol 108:241-247; Ball *et al.* (1999, Gastroenterology 117:40-48) así como aquellas inducidas por VLP de Norovirus producidas por plantas transgénicas (Tacket *et al.* (2000) J Infect Dis 182:302-305). En particular, esta formulación para vacuna intramuscular produjo respuestas anamnéticas dentro de los siete días de inmunización y se observaron respuestas máximas de anticuerpos séricos luego de una dosis única, que incluyen una respuesta de IgA

significativa y actividad bloqueadora funcional de hidratos de carbono y actividad de inhibición de hemaglutinación. Por lo tanto, esta vacuna bivalente de Norovirus indujo una respuesta inmune fuerte, protectora, en humanos que fue superior a las respuestas inmunes inducidas por cualquier vacuna de Norovirus disponible.

Ejemplo 2. Estudio de escalado de dosis, seguridad e inmunogenicidad de vacuna intramuscular de partícula similar a virus (VLP) de Norovirus bivalente en humanos (estudio LV03-104)

[0095] El siguiente ejemplo provee la porción planeada remanente del estudio clínico descrito en el Ejemplo 1, en donde se realizó un estudio randomizado, multisitio, con escalado de dosis en adultos ≥ 18 años de edad para la seguridad e inmunogenicidad de cuatro niveles de dosificación de una vacuna intramuscular (IM) bivalente de VLP de Norovirus con lípido monofosforil A (MPL) e hidróxido de aluminio (AlOH) como adyuvante, en comparación a placebo. Los sujetos recibirán dos dosis de la vacuna o placebo, por inyección intramuscular (IM), separadas 28 días usando una aguja de 1,5 pulgadas (38 mm). Este ejemplo tiene como intención ilustrar adicionalmente los principios de la presente invención.

[0096] La cohorte A ha completado el enrolamiento en el estudio y se describió anteriormente en el Ejemplo 1. La Cohorte B contiene aproximadamente 20 sujetos de entre 50 y 64 años de edad. La Cohorte C contiene aproximadamente 30 sujetos de entre 65 y 85 años de edad. Aproximadamente 98 sujetos se enrolaron en el estudio en total.

[0097] En la Cohorte B, aproximadamente 20 sujetos de entre 50 y 64 años de edad se enrolaron y se randomizaron 1:1 para recibir vacuna (N=10) o placebo (N=10). Luego de que los datos de seguridad 7 días luego de la dosis 2 (Día de estudio 35) se encuentran disponibles para revisión de sujetos en la Cohorte B, los sujetos en la Cohorte C son elegibles para recibir su dosis inicial. En la Cohorte C, aproximadamente 30 sujetos de entre 65 y 85 años de edad se enrolan y se randomizan 1:1:1 para recibir vacuna con MPL y AlOH como adyuvante (N=10) o vacuna con AlOH solo como adyuvante, es decir sin MPL (N=10) o placebo (N=10). Las concentraciones de antígeno de las VLP de norovirus y del AlOH en

las dos formulaciones de vacuna a ser evaluadas en la Cohorte C son idénticas; solo es diferente la presencia o ausencia de MPL.

[0098] La vacuna de VLP bivalente de Norovirus contiene VLP de genogrupo I, genotipo 1 (GI.1) y genogrupo II, genotipo IV (GII.4) como los antígenos, y Lípido monofosforil A (MPL) e hidróxido de aluminio (AlOH) como adyuvantes, cloruro de sodio (NaCl) y L-histidina (L-His) como solución amortiguadora (pH entre 6,3 y 6,7), etanol y agua para inyección. Las VLP de GII.4 comprendían una secuencia de cápside de la SEQ ID NO: 1, que se derivó de tres cepas de GII.4.

[0099] La dosificación única de vacuna seleccionada para la evaluación adicional en las Cohortes B y C es la menor dosificación en la Cohorte A que da como resultado la respuesta inmune más robusta y reproducible que también es generalmente bien tolerada. Los datos de seguridad e inmunogenicidad del Día 56 de sujetos en la Cohorte A son revisados por el CSM/SMC y se selecciona la dosificación bivalente para evaluación en las Cohortes B y C.

[00100] Los sujetos mantienen un ayuda memoria diario de los síntomas solicitados que incluyen cuatro reacciones en el sitio de inyección local, tal como dolor, sensibilidad al contacto, coloración rojiza e hinchazón, y 10 signos o síntomas sistémicos que incluyen temperatura oral diaria, dolor de cabeza, fatiga, dolores musculares, escalofríos, dolores de articulaciones y síntomas gastrointestinales de náuseas, vómitos, diarrea, calambres/dolor abdominales para los Días 0 a 7 luego de cada dosis de vacuna bivalente IM de VLP de Norovirus o control. La coloración rojiza e hinchazón en el sitio de inyección se midió y se registró diariamente durante los 7 días luego de cada inyección.

[00101] Las historias clínicas internas se obtienen en cada visita de seguimiento en los Días 7+3, 21+3, 28+3, 35+3, 56+7, 180+14 y 393+14 y en la llamada telefónica de seguimiento en el Día 265 +14; los sujetos son cuestionados sobre enfermedad, visitas al doctor, cualquier evento adverso serio (SAE), e inicio de cualquier condición médica nueva significativa durante el período. Los sujetos tienen un CBC con recuento diferencial de WBC y plaquetas, y BUN sérico, creatinina, glucosa, AST y ALT evaluados durante el tamizaje a los Días 21 y 35

aproximadamente 7 días después de cada dosis) para evaluar la continua elegibilidad y seguridad, respectivamente.

[00102] Se recolecta sangre de sujetos antes de la vacunación en el Día 0 y a los Días 7+3, 21+3, 28+3, 35+3, 56+7, 180+14 y 393 +14 para medir los anticuerpos séricos (IgG, IgA e IgM separadamente y combinados) contra la vacuna bivalente IM de VLP de Norovirus por ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA). También se midieron la actividad de bloqueo de hidratos de carbono séricos y los anticuerpos HAI séricos. Para los sujetos en la Cohorte A, se ensayaron las células secretoras de anticuerpo (ASC), marcadores de migración, células B de memoria y respuestas inmunes celulares.

[00103] Se usan los métodos descritos anteriormente para la Cohorte A para analizar las muestras de sangre recolectadas de individuos inmunizados o individuos que reciben placebo. Los resultados del estudio se emplearán en el desarrollo de un protocolo clínico para la administración de las formulaciones para vacuna de la invención.

[00104] La presente invención no pretende estar limitada en el alcance por las formas de realización específicas que tienen como intención la simple ilustración de los aspectos individuales de la invención, y los métodos y componentes funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. De hecho, diferentes modificaciones de la invención, además de aquellas mostradas y descritas en la presente, resultarán evidentes para aquellos con experiencia en el arte a partir de la descripción anterior y figuras anexas usando no más de una experimentación de rutina. Dichas modificaciones y equivalentes tienen como intención caer dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

[00105] Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan a la presente a modo de referencia a esta memoria descriptiva en la misma medida que si cada publicación, patente o solicitud de patente individual fue específica e individualmente indicada como incorporada a la presente a modo de referencia.

[00106] La cita o exposición de una referencia no se debe interpretar como una admisión de que la misma es arte previo para la presente invención.

REFERENCIAS

1. Glass, RI, JS Noel, T Ando, RL Fankhauser, G Belloit, A Mounts, UD Parasher, JS Bresee y SS Monroe. The Epidemiology of Enteric Caliciviruses from Human: A Reassessment Using New Diagnostics. *J Infect Dis* 2000; 181 (Sup 2): S254-S261.
2. Hardy, ME. Norwalk and "Norwalk-like Viruses" in Epidemic Gastroenteritis. *Clin Lab Med* 1999;19(3): 675-90.
3. Jiang, X, DY Graham, KN Wang, y MK Estes. Norwalk Virus Genome Cloning and Characterization. *Science* 1990; 250: 1580-1583.
4. Jiang, X, M Want, DY Graham, y MK Estes. Expression, Self-Assembly, and Antigenicity of the Norwalk Virus Capsid Protein. *J Virol* 1992; 66: 6527-6532.
5. Glass, P, LJ White, JM Ball, I Leparac-Goffart, ME Hardy, y MK Estes. Norwalk Virus Open Reading Frame 3 Encodes a Minor Structural Protein. *J Virol* 2000; 74: 6581-6591.
6. Lindesmith, L, C Moe, S Marionneau, N Ruvoen, X Jiang, L Lindblad, P Stewart, J LePendou, y R Baric. Human Susceptibility and Resistance to Norwalk Virus Infection. *Nat Med* 2003; 9: 548-553.
7. Parrino, TA, DS Schreiber, JS Trier, AZ Kapikian, y NR Blacklow. Clinical Immunity in Acute Gastroenteritis Caused by Norwalk Agent. *N Engl J Med* 1977; 297: 86-89.
8. Wyatt, RG, R Dolin, NR Blacklow, HL DuPont, RF Buscho, TS Thornhill, AZ Kapikian, y RM Chanock. Comparison of Three Agents of Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis by Cross-challenge in Volunteers. *J Infect Dis* 1974; 129: 709.
9. Ball, JM, DY Graham, AR Opekum, MA Gilger, RA Guerrero, y MK Estes. Recombinant Norwalk Virus-like Particles Given Orally to Volunteers: Phase I Study. *Gastroenterology* 1999; 117: 40-48.

10. Tacket, CO, MB Sztein, GA Losonky, SS Wasserman, y MK Estes. Humoral, Mucosal, and Cellular Immune Responses to Oral Norwalk Virus-like Particles in Volunteers. *Clin Immunol* 2003; 108: 241.
11. Guerrero, RA, JM Ball, SS Krater, SE Pacheco, JD Clements, y MK Estes. Recombinant Norwalk Virus-like Particles Administered Intranasally to Mice Induce Systemic and Mucosal (Fecal and Vaginal) Immune Responses. *J Virol* 2001; 75: 9713.
12. Nicollier-Jamot, B, A Ogier, L Piroth, P Pothier, y E Kohli. Recombinant Virus-like Particles of a Norovirus (Genogroup II Strain) Administered Intranasally and Orally with Mucosal Adjuvants LT and LT(R192G) in BALB/c Mice Induce Specific Humoral and Cellular Th1/Th2-like Immune Responses. *Vaccine* 2004; 22:1079-1086.
13. Periwal, SB, KR Kourie, N Ramachandaran, SJ Blakeney, S DeBruin, D Zhu, TJ Zamb, L Smith, S Udem, JH Eldridge, KE Shroff, y PA Reilly. A Modified Cholera Holotoxin CT-E29H Enhances Systemic and Mucosal Immune Responses to Recombinant Norwalk Virus- like Particle Vaccine. *Vaccine* 2003; 21: 376-385.
14. Isaka, M, Y Yasuda, S Kozuka, T Taniguchi, K Matano, J Maeyama, T Komiya, K Ohkuma, N Goto, y K Tochikubo. Induction of systemic and mucosal antibody responses in mice immunized intranasally with aluminum-non-adsorbed diphtheria toxoid together with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine* 1999; 18: 743-751.
15. Kozlowski, PA, S Cu-Uvin, MR Neutra, y TP Flanigan. Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women. *Infect Immun* 1997; 65: 1387-1394.
16. Mestecky, J, SM Michalek, Z Moldoveanu, y MW Russell. Routes of immunization and antigen delivery systems for optimal mucosal immune responses in humans. *Behring Inst Mitt* 1997; 33-43.
17. Wu, HY, y MW Russell. Nasal lymphoid tissue, intranasal immunization, and compartmentalization of the common mucosal immune system. *Immunol Res* 1997; 16: 187-201.

18. Evans, JT, CW Cluff, DA Johnson, MJ Lacy, DH Persing, y JR Baldrige. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi 529. *Expert Rev Vaccines* 2003; 2: 219-229.

19. Baldrige, JR, Y Yorgensen, JR Ward, y JT Ulrich. Monophosphoryl lipid A enhances mucosal and systemic immunity to vaccine antigens following intranasal administration [In Process Citation]. *Vaccine* 2000; 18: 2416-2425.

20. Yang, QB, M Martin, SM Michalek, y J Katz. Mechanisms of monophosphoryl lipid A augmentation of host responses to recombinant HagB from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 2002; 70: 3557-3565.

21. Baldrick, P, D Richardson, G Elliott, y AW Wheeler. Safety evaluation of monophosphoryl lipid A (MPL): an immunostimulatory adjuvant. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002; 35: 398-413.

22. Baldrige, JR, P McGowan, JT Evans, C Cluff, S Mossman, D Johnson, y D Persing. Taking a toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4: 1129-1138.

23. Persing, DH, RN Coler, MJ Lacy, DA Johnson, JR Baldrige, RM Hershberg, y SG Reed. Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. *Trends Microbiol* 2002; 10: S32-37.

REIVINDICACIONES:

1. Un método para generar inmunidad protectora contra los Norovirus en un ser humano, CARACTERIZADO PORQUE comprende administrar por vía parenteral a dicho ser humano no más de una sola dosis de una composición de vacuna, donde dicha composición comprende partículas tipo virus (VLP) del genogrupo I de Norovirus, en donde dicha composición induce un aumento de por lo menos tres veces del título de anticuerpos específicos de Norovirus en suero en comparación con el título en dicho ser humano antes de la administración de la composición, y en donde dichas VLP del genogrupo I de Norovirus comprenden una proteína de la cápside derivada de una cepa viral del genogrupo I.

2. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la composición no comprende más que 150 µg de dichas VLP del genogrupo I de Norovirus.

3. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la composición no comprende más que 50 µg de dichas VLP del genogrupo I de Norovirus.

4. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la composición no comprende más que 25 µg de dichas VLP del genogrupo I de Norovirus.

5. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la composición no comprende más que 15 µg de dichas VLP del genogrupo I de Norovirus.

6. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la composición induce un aumento de por lo menos seis veces del título de anticuerpos específicos de Norovirus en suero en comparación con el título en el ser humano antes de la administración de la composición.

7. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE dichas VLP de Norovirus son VLP monovalentes o VLP multivalentes.

8. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE dicha composición además comprende VLP del genogrupo II de Norovirus, donde dichas VLP del genogrupo II de Norovirus comprenden una proteína de la cápside derivada de una cepa viral del genogrupo II.

9. El método de la reivindicación 8, CARACTERIZADO PORQUE dicha composición no comprende más que 150 µg de VLP del genogrupo II de Norovirus.

10. El método de la reivindicación 8, CARACTERIZADO PORQUE dicha

composición no comprende más que 50 µg de VLP del genogrupo II de Norovirus.

11. El método de la reivindicación 8, CARACTERIZADO PORQUE dicha composición no comprende más que 25 µg de VLP del genogrupo II de Norovirus.

12. El método de la reivindicación 8, CARACTERIZADO PORQUE dicha composición no comprende más que 15 µg de VLP del genogrupo II de Norovirus.

13. El método de la reivindicación 8, CARACTERIZADO PORQUE dichas VLP del genogrupo I de Norovirus son VLP del virus Norwalk y dichas VLP del genogrupo II de Norovirus son VLP generadas a partir de la expresión de una secuencia consenso del genogrupo II de Norovirus.

14. Un método para generar inmunidad protectora contra los Norovirus en un ser humano que comprende administrar por vía parenteral a dicho ser humano no más de una sola dosis de una composición de vacuna, CARACTERIZADO PORQUE dicha composición comprende partículas tipo virus (VLP) del genogrupo II de Norovirus, en donde dicha composición induce un aumento de por lo menos tres veces del título de anticuerpos específicos de Norovirus en suero en comparación con el título en dicho ser humano antes de la administración de la composición, y en donde dichas VLP del genogrupo II de Norovirus comprenden una proteína de la cápside derivada de una cepa viral del genogrupo II.

15. El método de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE la composición no comprende más que 150 µg de dichas VLP del genogrupo II de Norovirus.

16. El método de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE la composición no comprende más que 50 µg de dichas VLP del genogrupo II de Norovirus.

17. El método de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE la composición no comprende más que 25 µg de dichas VLP del genogrupo II de Norovirus.

18. El método de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE la composición no comprende más que 15 µg de dichas VLP del genogrupo II de Norovirus.

19. El método de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE dichas VLP del genogrupo II de Norovirus comprenden una proteína de la cápside derivada de cepas virales del genotipo 4 del genogrupo II.

20. El método de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE la composición induce un aumento de por lo menos seis veces del título de anticuerpos

específicos de Norovirus en suero en comparación con el título en el ser humano antes de la administración de la composición.

21. El método de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE dichas VLP de Norovirus son VLP monovalentes o VLP multivalentes.

22. El método de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE dicha composición además comprende VLP del genogrupo I de Norovirus, donde dichas VLP del genogrupo I de Norovirus comprenden una proteína de la cápside derivada de una cepa viral del genogrupo I.

23. El método de la reivindicación 22, CARACTERIZADO PORQUE dicha composición no comprende más que 150 µg de VLP del genogrupo I de Norovirus.

24. El método de la reivindicación 22, CARACTERIZADO PORQUE dicha composición no comprende más que 50 µg de VLP del genogrupo I de Norovirus.

25. El método de la reivindicación 22, CARACTERIZADO PORQUE dicha composición no comprende más que 25 µg de VLP del genogrupo I de Norovirus.

26. El método de la reivindicación 22, CARACTERIZADO PORQUE dicha composición no comprende más que 15 µg de VLP del genogrupo I de Norovirus.

27. El método de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE dichas VLP del genogrupo II de Norovirus son VLP generadas a partir de la expresión de una secuencia consenso del genogrupo II de Norovirus.

28. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, CARACTERIZADO PORQUE la composición además comprende por lo menos un adyuvante.

29. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE dicho por lo menos un adyuvante es un agonista de un receptor tipo toll.

30. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, CARACTERIZADO PORQUE dicha composición además comprende dos adyuvantes.

31. El método de la reivindicación 30, CARACTERIZADO PORQUE dichos dos adyuvantes son monofosforil lípido A e hidróxido de aluminio.

32. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, CARACTERIZADO PORQUE dicha composición además comprende una solución amortiguadora.

33. El método de la reivindicación 32, CARACTERIZADO PORQUE dicha solución amortiguadora se selecciona del grupo que consiste en L-histidina, imidazol,

ácido succínico, tris y ácido cítrico.

34. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, CARACTERIZADO PORQUE la composición de vacuna se administra a dicho ser humano por una ruta de administración intravenosa, subcutánea, intradérmica o intramuscular.

35. El método de la reivindicación 34, CARACTERIZADO PORQUE la composición de vacuna se administra a dicho ser humano por una ruta de administración intramuscular.

36. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, CARACTERIZADO PORQUE la composición de vacuna se formula como un líquido.

37. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, CARACTERIZADO PORQUE el aumento del título de anticuerpos específicos de Norovirus es inducido dentro de los siete días de la administración de la dosis individual de la composición.

38. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, CARACTERIZADO PORQUE dicha composición de vacuna confiere protección contra uno o más síntomas de una infección por Norovirus.

FORMULACIONES PARENTERALES DE VACUNAS CONTRA LOS NOROVIRUS

RESUMEN

Composiciones de vacuna parenterales de dosis individuales que comprenden mezclas de partículas tipo virus monovalentes de Norovirus. También se divulgan métodos para conferir una inmunidad protectora contra infecciones por Norovirus en un ser humano por administración de dichas composiciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> FORMULACIONES PARENTERALES DE VACUNAS CONTRA LOS NOROVIRUS

<130> LIGO-024/01WO

<150> US 61/506.447
 <151> 2011-07-11

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

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

<220>
 <223> secuencial de aminoácidos de la VP1 GII.4 compuesta de Norovirus

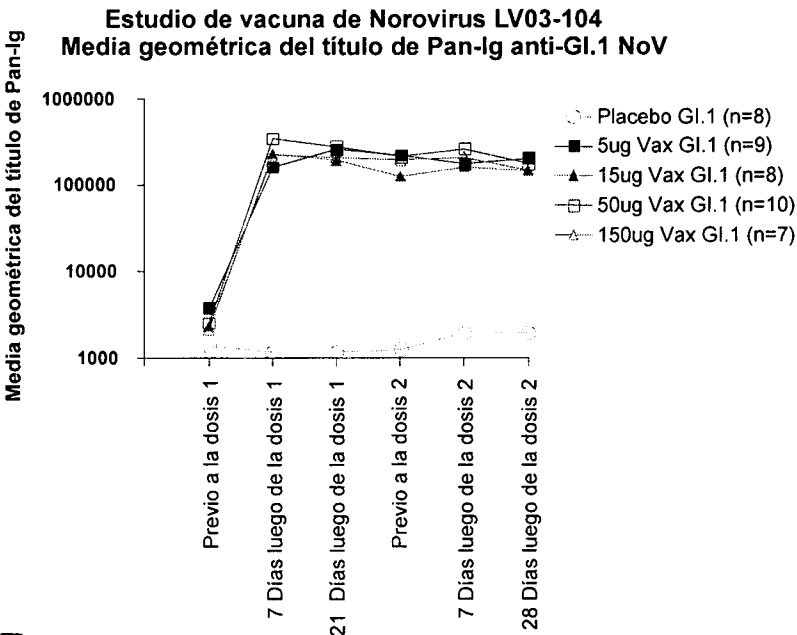
<400> 1

Met Lys Met Ala Ser Ser Asp Ala Asn Pro Ser Asp Gly Ser Thr Ala
 1 5 10 15
 Asn Leu Val Pro Glu Val Asn Asn Glu Val Met Ala Leu Glu Pro Val
 20 25 30
 Val Gly Ala Ala Ile Ala Ala Pro Val Ala Gly Gln Gln Asn Val Ile
 35 40 45
 Asp Pro Trp Ile Arg Asn Asn Phe Val Gln Ala Pro Gly Gly Glu Phe
 50 55 60
 Thr Val Ser Pro Arg Asn Ala Pro Gly Glu Ile Leu Trp Ser Ala Pro
 65 70 75 80
 Leu Gly Pro Asp Leu Asn Pro Tyr Leu Ser His Leu Ala Arg Met Tyr
 85 90 95
 Asn Gly Tyr Ala Gly Gly Phe Glu Val Gln Val Ile Leu Ala Gly Asn
 100 105 110
 Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Ile Phe Ala Ala Val Pro Pro Asn Phe
 115 120 125
 Pro Thr Glu Gly Leu Ser Pro Ser Gln Val Thr Met Phe Pro His Ile
 130 135 140
 Ile Val Asp Val Arg Gln Leu Glu Pro Val Leu Ile Pro Leu Pro Asp
 145 150 155 160
 Val Arg Asn Asn Phe Tyr His Tyr Asn Gln Ser Asn Asp Pro Thr Ile
 165 170 175
 Lys Leu Ile Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ala Asn Asn Ala Gly
 180 185 190
 Asp Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Arg Pro Ser Pro
 195 200 205

Asp Phe Asp Phe Ile Phe Leu Val Pro Pro Thr Val Glu Ser Arg Thr
 210 215 220
 Lys Pro Phe Thr Val Pro Ile Leu Thr Val Glu Glu Met Thr Asn Ser
 225 230 235 240
 Arg Phe Pro Ile Pro Leu Glu Lys Leu Phe Thr Gly Pro Ser Gly Ala
 245 250 255
 Phe Val Val Gln Pro Gln Asn Gly Arg Cys Thr Thr Asp Gly Val Leu
 260 265 270
 Leu Gly Thr Thr Gln Leu Ser Pro Val Asn Ile Cys Thr Phe Arg Gly
 275 280 285
 Asp Val Thr His Ile Ala Gly Thr Gln Glu Tyr Thr Met Asn Leu Ala
 290 295 300
 Ser Gln Asn Trp Asn Asn Tyr Asp Pro Thr Glu Glu Ile Pro Ala Pro
 305 310 315 320
 Leu Gly Thr Pro Asp Phe Val Gly Lys Ile Gln Gly Val Leu Thr Gln
 325 330 335
 Thr Thr Arg Gly Asp Gly Ser Thr Arg Gly His Lys Ala Thr Val Ser
 340 345 350
 Thr Gly Ser Val His Phe Thr Pro Lys Leu Gly Ser Val Gln Phe Ser
 355 360 365
 Thr Asp Thr Ser Asn Asp Phe Glu Thr Gly Gln Asn Thr Lys Phe Thr
 370 375 380
 Pro Val Gly Val Val Gln Asp Gly Ser Thr Thr His Gln Asn Glu Pro
 385 390 395 400
 Gln Gln Trp Val Leu Pro Asp Tyr Ser Gly Arg Asp Ser His Asn Val
 405 410 415
 His Leu Ala Pro Ala Val Ala Pro Thr Phe Pro Gly Glu Gln Leu Leu
 420 425 430
 Phe Phe Arg Ser Thr Met Pro Gly Cys Ser Gly Tyr Pro Asn Met Asn
 435 440 445
 Leu Asp Cys Leu Leu Pro Gln Glu Trp Val Gln His Phe Tyr Gln Glu
 450 455 460
 Ala Ala Pro Ala Gln Ser Asp Val Ala Leu Leu Arg Phe Val Asn Pro
 465 470 475 480
 Asp Thr Gly Arg Val Leu Phe Glu Cys Lys Leu His Lys Ser Gly Tyr
 485 490 495
 Val Thr Val Ala His Thr Gly Gln His Asp Leu Val Ile Pro Pro Asn
 500 505 510
 Gly Tyr Phe Arg Phe Asp Ser Trp Val Asn Gln Phe Tyr Thr Leu Ala
 515 520 525
 Pro Met Gly Asn Gly Thr Gly Arg Arg Arg Ala Leu
 530 535 540

FIGURA 1

A



B

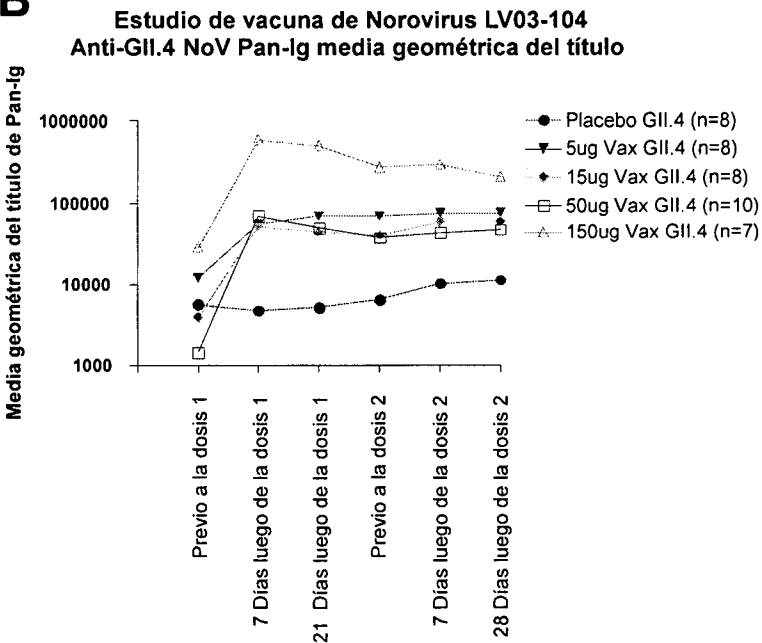


FIGURA 2

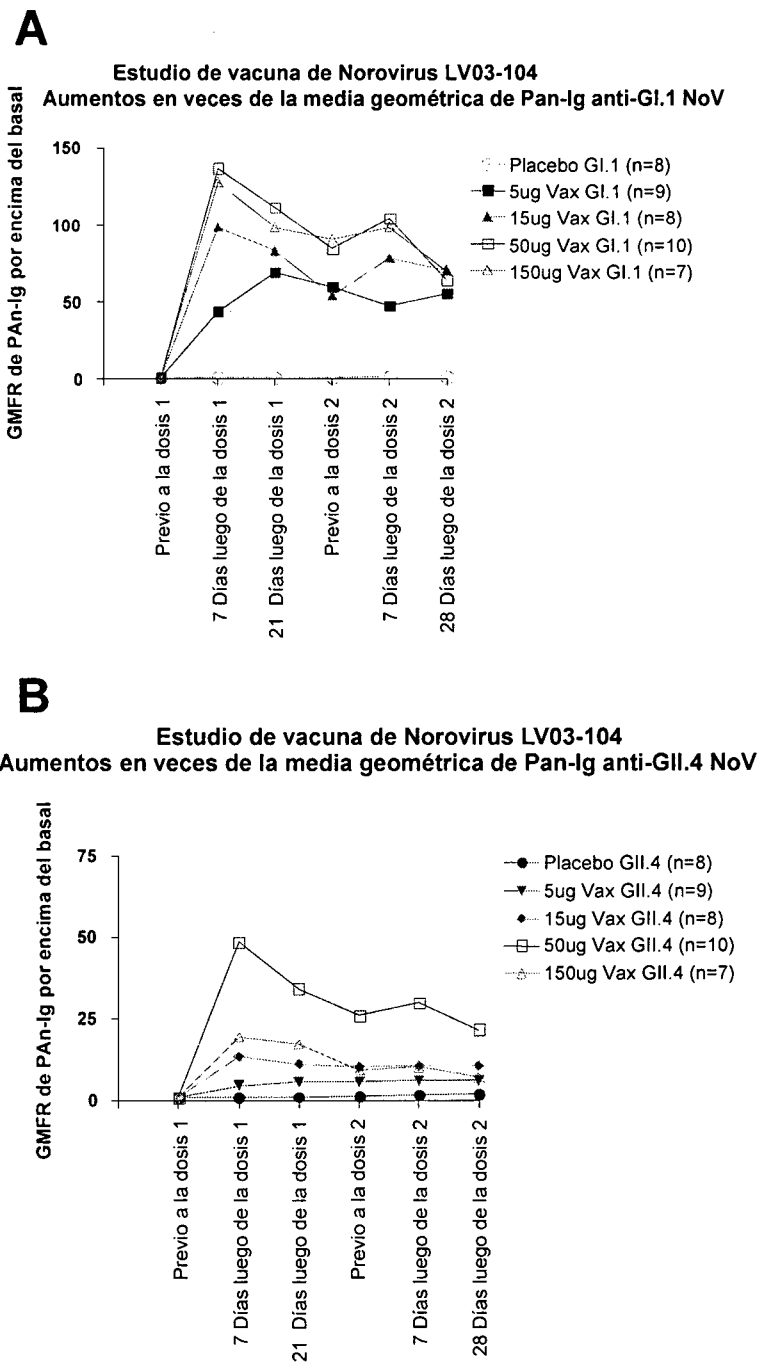
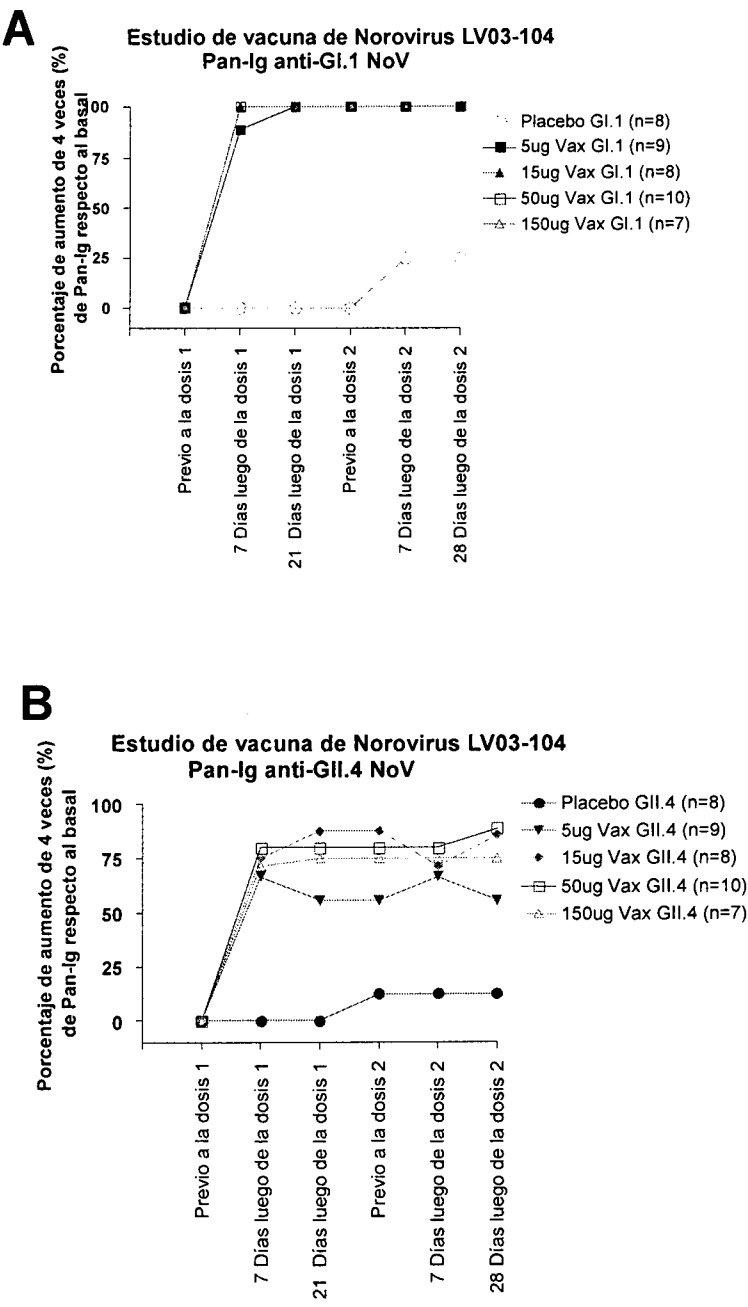
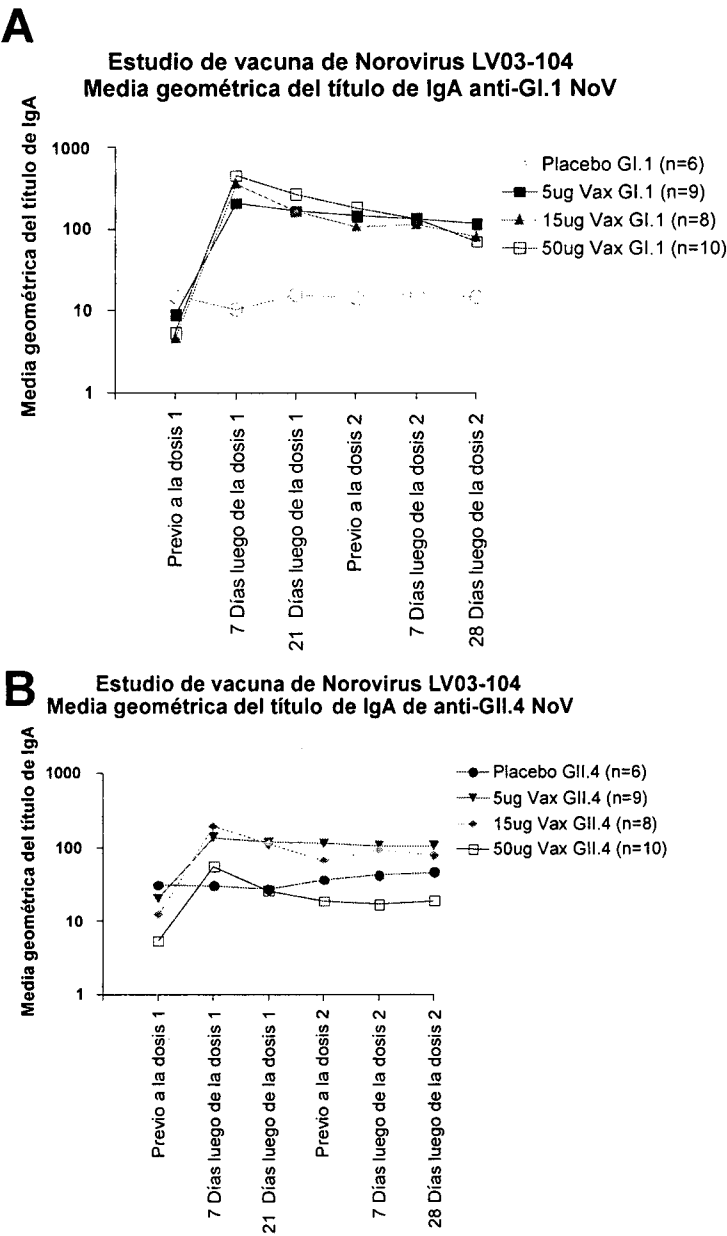


FIGURA 3



27
99

FIGURA 4

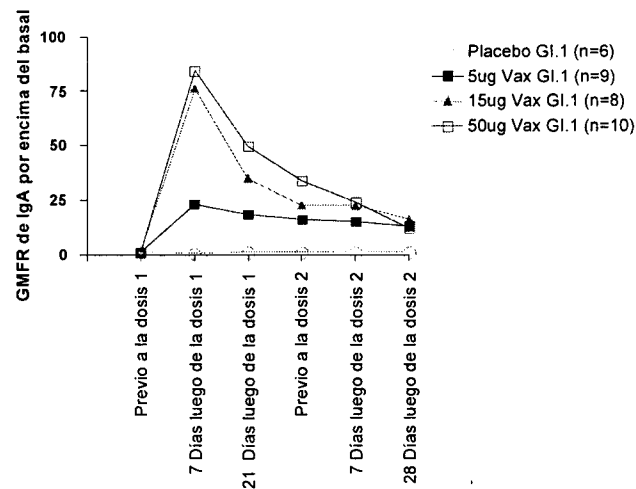


93.
93

FIGURA 5

A

Estudio de vacuna de Norovirus LV03-104
Aumentos en veces de la media geométrica de IgA de Anti-GI.1 NoV



B

Estudio de vacuna de Norovirus LV03-104
Aumentos en veces de la media geométrica de IgA anti-GII.4 NoV

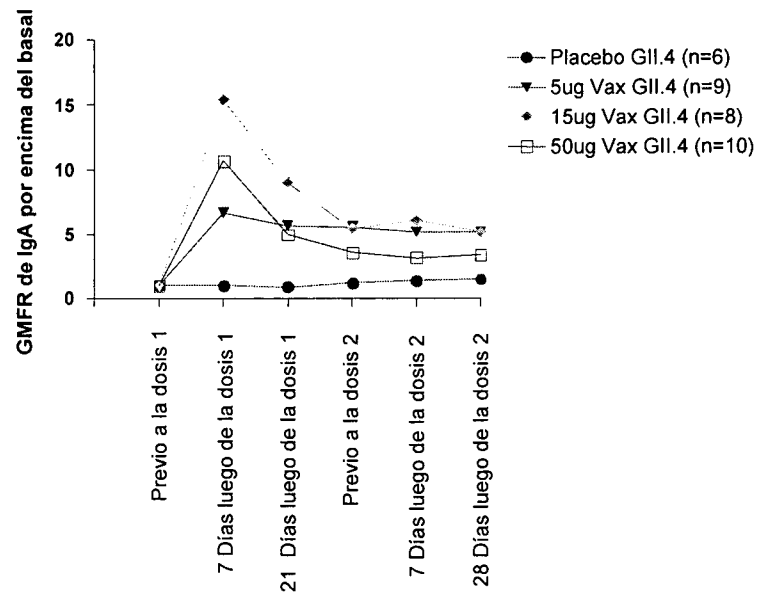


FIGURA 6

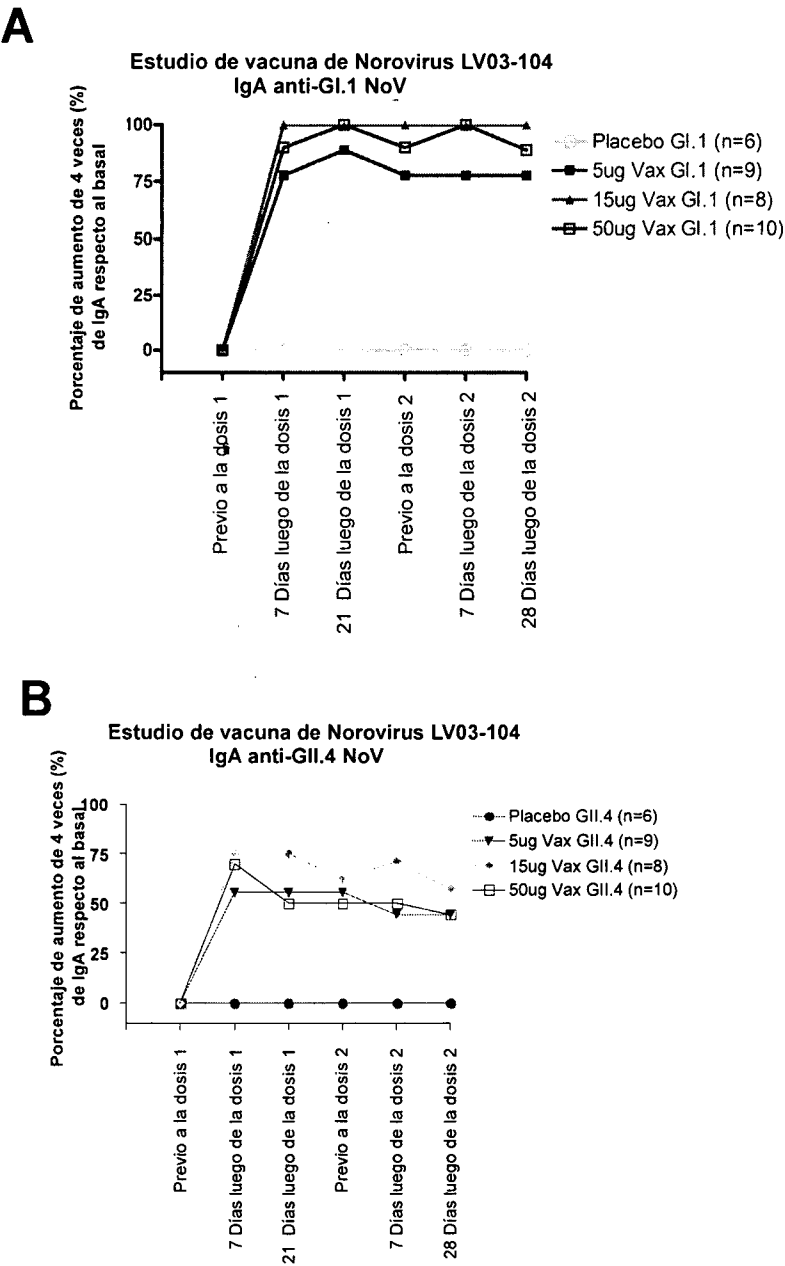
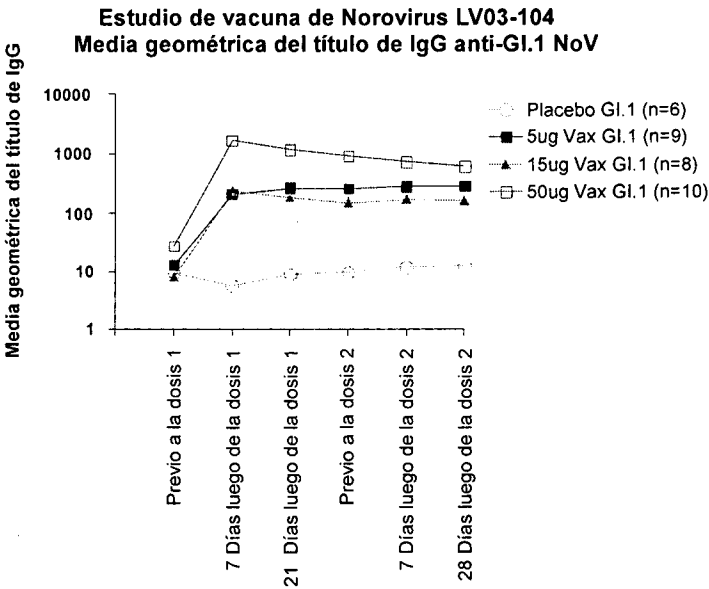


FIGURA 7

A



B

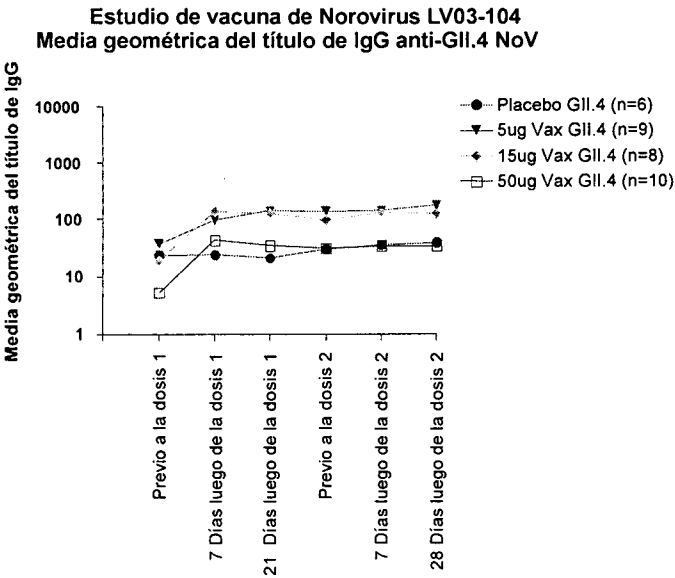
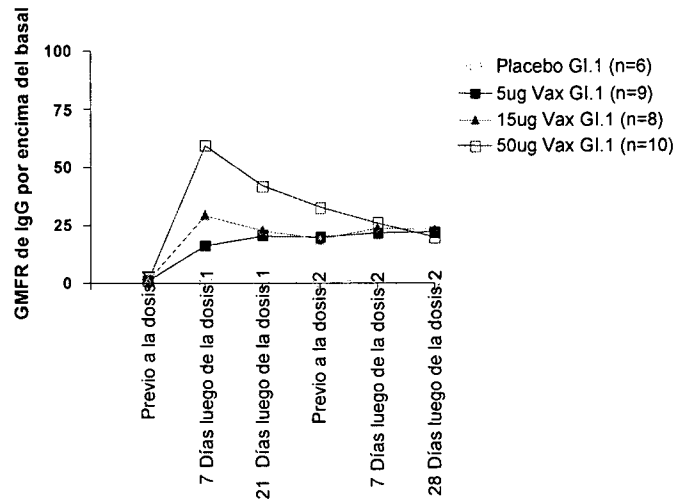


FIGURA 8

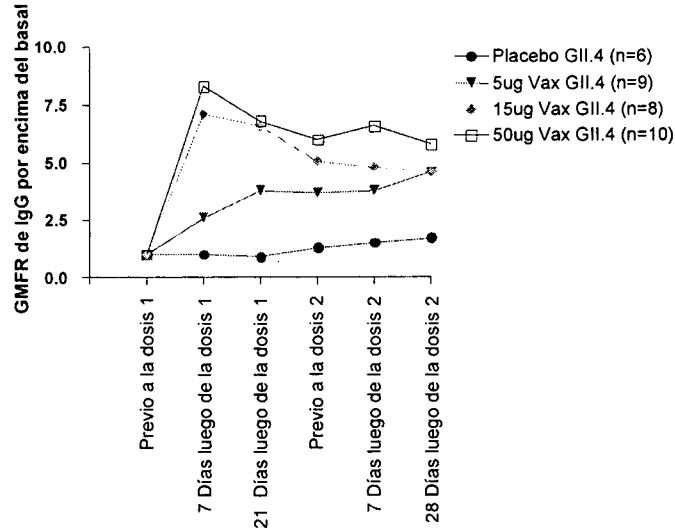
A

Estudio de vacuna de Norovirus LV03-104
Aumentos en veces de la media geométrica de IgG anti-GI.1 NoV



B

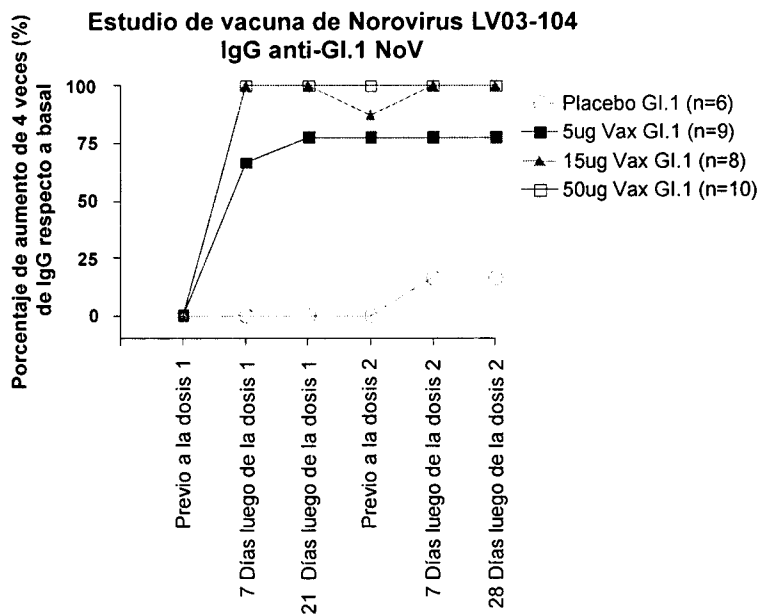
Estudio de vacuna de Norovirus LV03-104
Aumentos en veces de la media geométrica de IgG anti-GII.4 NoV



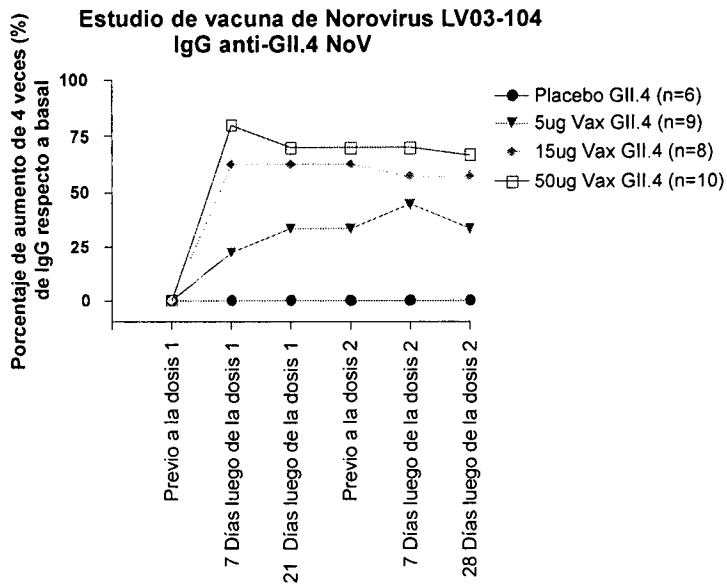
102
102

FIGURA 9

A



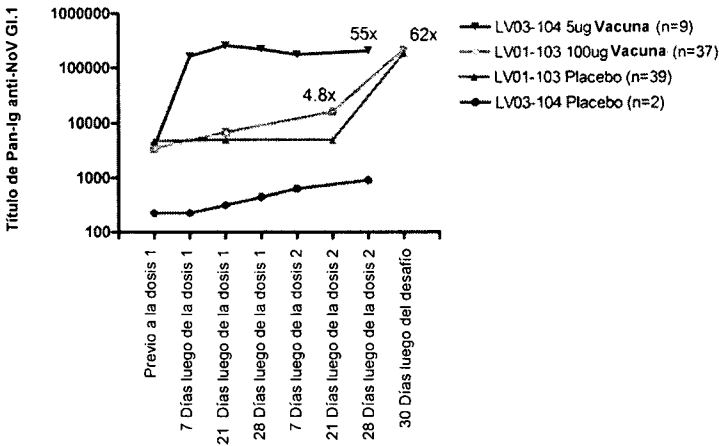
B



103
105

FIGURA 10

Estudios de vacuna de Norovirus LV01-103 y LV03-104
Pan-Ig anti-GI.1 NoV



109
106

FIGURA 11A

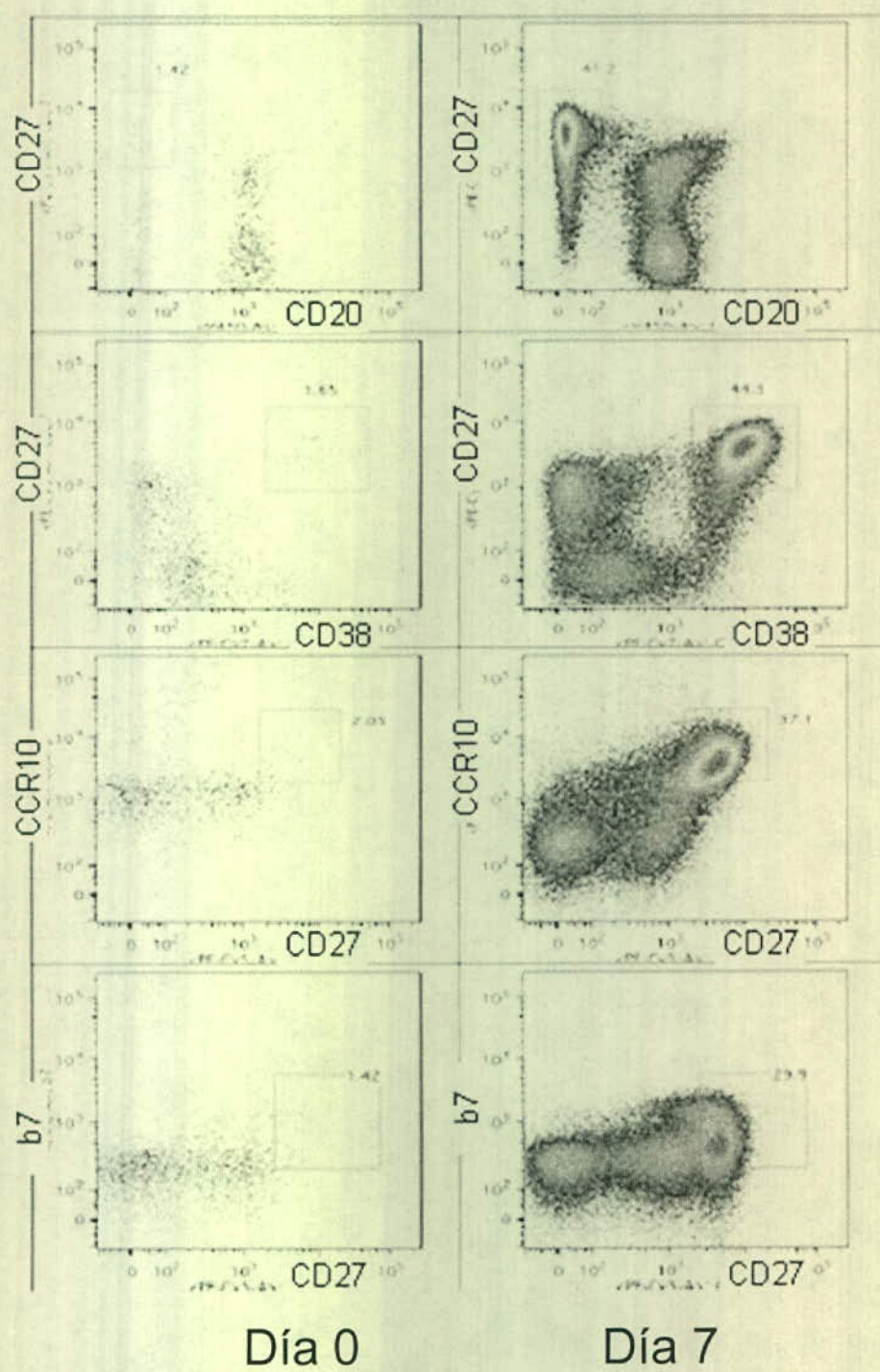
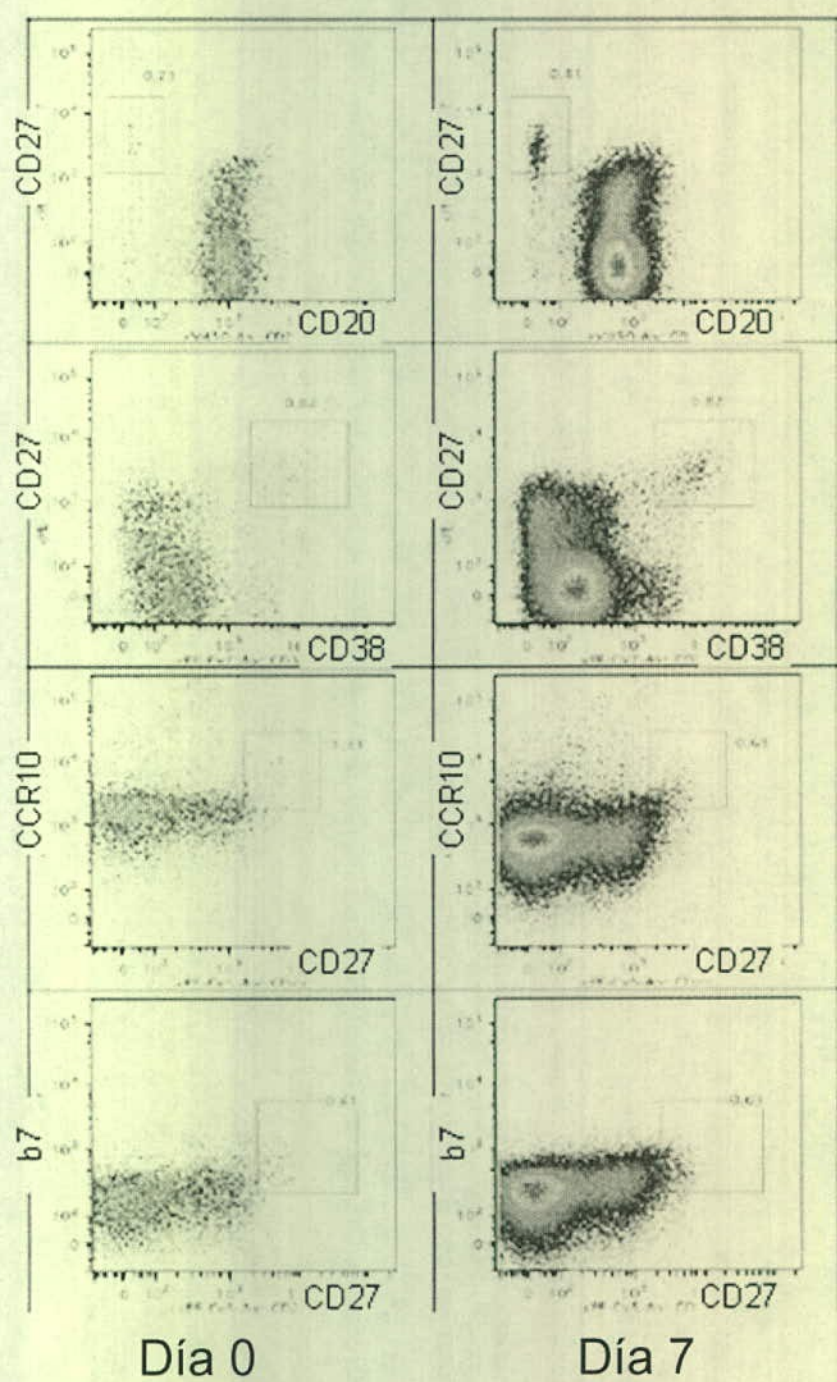


FIGURA 11B



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
17 January 2013 (17.01.2013)

(10) International Publication Number
WO 2013/009849 A1

- (51) International Patent Classification:
A61K 39/125 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2012/046222
- (22) International Filing Date:
11 July 2012 (11.07.2012)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/506,447 11 July 2011 (11.07.2011) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **LIGOCYTE PHARMACEUTICALS, INC.** [US/US]; 2155 Analysis Drive, Bozeman, Montana 59718 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **RICHARDSON, Charles** [US/US]; c/o LIGOCYTE PHARMACEUTICALS, INC, 2155 Analysis Drive, Bozeman, Montana 59718 (US). **BARGATZE, Robert, F.** [US/US]; c/o LIGOCYTE PHARMACEUTICALS, INC, 2155 Analysis Drive, Bozeman, MY 59718 (US). **MENDELMAN, Paul, M.** [US/US]; c/o LIGOCYTE PHARMACEUTICALS, INC, 2155 Analysis Drive, Bozeman, Montana 59718 (US).
- (74) Agents: **MCLEOD, Bonnie, Weiss et al.**; Cooley LLP, 777 6th Street, N.W., Suite 1100, Washington, District of Columbia 20001 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
- with international search report (Art. 21(3))
 - with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

WO 2013/009849 A1

(54) Title: PARENTERAL NOROVIRUS VACCINE FORMULATIONS

(57) Abstract: The present invention relates to single dose parenteral vaccine compositions comprising mixtures of monovalent Norovirus virus-like particles. Methods of conferring protective immunity against Norovirus infections in a human subject by administering such compositions are also disclosed.

107
107

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2012/046222

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

MCLEOD, Bonnie, Weiss
Cooley LLP
777 6th Street, N.W.
Suite 1100
Washington, District of Columbia 20001
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 15 January 2014 (15.01.2014)	
Applicant's or agent's file reference LIGO-02401WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2012/046222	International filing date (day/month/year) 11 July 2012 (11.07.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address LIGOCYTE PHARMACEUTICALS, INC. 2155 Analysis Drive Bozeman, Montana 59718 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address TAKEDA VACCINES (MONTANA), INC 2155 Analysis Drive Bozeman, Montana 59718 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 89 75	Authorized officer Bouvier Alexandre e-mail pt05.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 05
---	---

108
100

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2012/046222

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

MCLEOD, Bonnie, Weiss
Cooley LLP
777 6th Street, N.W.
Suite 1100
Washington, District of Columbia 20001
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)
15 January 2014 (15.01.2014)

Applicant's or agent's file reference
LIGO-02401WO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2012/046222

International filing date (day/month/year)
11 July 2012 (11.07.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address TAKEDA VACCINES (MONTANA), INC 2155 Analysis Drive Bozeman, Montana 59718 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address TAKEDA VACCINES, INC 2155 Analysis Drive Bozeman, Montana 59718 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Bouvier Alexandre
Facsimile No. +41 22 338 89 75	e-mail pt05.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 05

109
109

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 14 - 005930

Bogotá D.C., Enero 20 de 2014 - 16:06:50

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 83.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	5924	20/01/2014		20.149.800.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00

SON: **QUIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-028640-00000-0000

Fecha: 2014-02-11 15:27:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 112

Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 111

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 20 de 2014 - 16:06:57

110

110

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0015813

Bogotá D.C., Febrero 11 de 2014 - 14:57:37

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 83.008.643

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	1120	08/01/2014		196.000.00
RECIBO DE CA	999999999	1198	08/01/2014		278.000.00
RECIBO DE CA	999999999	1199	08/01/2014		278.000.00
RECIBO DE CA	999999999	1301	08/01/2014		515.000.00
RECIBO DE CA	999999999	1302	08/01/2014		515.000.00
RECIBO DE CA	999999999	1303	08/01/2014		515.000.00
RECIBO DE CA	999999999	1304	08/01/2014		515.000.00

*** Conceptos Pagados ***

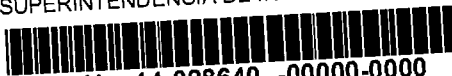
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
28 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	868.000.00
			\$868.000.00

SON: **OCHOCIENTOS SESENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-028640- -00000-0000

Fecha: 2014-02-11 15:27:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 112

Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 112

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 11 de 2014 - 14:57:38

111



No. 14-028640-00000-0000

Fecha: 2014-02-11 15:27:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve. 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 112

SIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

MC

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-028640-00000-0000

Fecha: 2014-02-11 15:27:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 112

486/00

☐

Indicación que se solicita una

☐

Datos de identificación del sol

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐

Indicación que se solicita una PCT

☐

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐