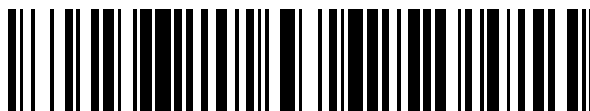


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 684**

51 Int. Cl.:

A61K 39/125 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2010 PCT/AT2010/000416**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO11050384**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2010 E 10775690 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2493500**

54 Título: **Composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de una infección por rinovirus**

30 Prioridad:

30.10.2009 EP 09174613

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

13.12.2018

73 Titular/es:

**VIRAVAXX AG (100.0%)
Mariannengasse 14/9
1090 Vienna , AT**

72 Inventor/es:

**VALENTA, RUDOLF;
NIESPODZIANA, KATARZYNA;
EDLMAYR, JOHANNA;
BLAAS, DIETER;
NIEDERBERGER-LEPPIN, VERENA;
PAPADOPOULOS, NIKOS y
POPOW-KRAUPP, THERESIA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 693 684 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de una infección por rinovirus

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de una infección por rinovirus.

5 Los rinovirus son virus sin envoltura que contienen un genoma de ARN monocatenario dentro de una cápside icosaédrica. Los rinovirus pertenecen a la familia de Picornaviridae, que incluye los géneros *Enterovirus* (poliovirus, grupos A y B del virus de Coxsackie, ecovirus, enterovirus numerados, parecovirus) y *Hepatovirus* (virus de la hepatitis A). Se han identificado más de 110 serotipos.

10 Los rinovirus se transmiten habitualmente mediante aerosol o contacto directo. El sitio primario de inoculación es la mucosa nasal, aunque la conjuntiva puede estar implicada en menor grado. El rinovirus se une al epitelio respiratorio y se propaga localmente, en el que el receptor de rinovirus humano principal es la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1). La respuesta natural del sistema de defensa humano frente a lesión implica ICAM-1, lo que respalda la unión entre células endoteliales y leucocitos. El rinovirus se aprovecha de la ICAM-1 usándola como receptor para la unión.

15 Una respuesta inflamatoria local frente al virus en las vías respiratorias puede conducir a descarga nasal, congestión nasal, estornudos e irritación de garganta. No se produce daño al epitelio nasal, y la inflamación está mediada por la producción de citocinas y otros mediadores.

20 Las concentraciones de histamina en las secreciones nasales no aumentan. A los días 3-5 de la enfermedad, la descarga nasal puede volverse mucopurulenta a causa de leucocitos polimorfonucleares que han migrado hasta el sitio de infección en respuesta a quimiocinas, tales como interleucina-8. El transporte mucociliar nasal se reduce notablemente durante la enfermedad y puede verse afectado durante semanas. Tanto la inmunoglobulina A secretora y los anticuerpos de suero están implicados en resolver la enfermedad y proteger contra la reinfección.

25 Los resfriados comunes provocados por infección por rinovirus son más frecuentes desde septiembre hasta abril en climas templados. Las infecciones por rinovirus, que están presentes en todo el año, justifican el aumento inicial de la incidencia de frío durante el otoño y un segundo pico de incidencias al final de la estación de primavera. Varios estudios demuestran que la incidencia del resfriado común es la más alta en niños con edades de preescolar y primaria. Se observa un promedio de 3-8 resfriados al año en este grupo de edad, con una incidencia incluso mayor en niños que asisten a guardería y educación infantil. Debido a los numerosos agentes virales implicados y los numerosos serotipos de rinovirus, no es inusual que niños más pequeños tengan nuevos resfriados cada mes durante la estación de invierno. Los adultos y adolescentes tienen normalmente 2-4 resfriados al año.

La manifestación más común de rinovirus, el resfriado común, es leve y autolimitada. Sin embargo, en raras ocasiones puede producirse enfermedad respiratoria grave, incluyendo bronquiolitis y neumonía.

35 Puesto que los primeros intentos de prevenir infecciones por rinovirus mediante vacunación no han tenido éxito (Mc Cray *et al.* Nature 329: 736-738 (1987); Brown *et al.* Vaccine 9: 595-601 (1991); Francis *et al.* PNAS EE.UU. 87: 2545-2549 (1990)), el actual tratamiento contra rinovirus está limitado a un tratamiento sintomático con analgésicos, descongestionantes, antihistaminas y antitusivos. Debido a la diversidad de los serotipos de rinovirus y la carencia de protección cruzada durante reinfección con serotipos heterólogos, se considera imposible una prevención exitosa mediante vacunación (Bardin PG, Intern. Med. J. 34 (2004): 358-360). Por tanto, el desarrollo de compuestos farmacéuticos respectivos se centra principalmente en el desarrollo de moléculas antivirales, tales como interferones y compuestos anti-rinovirus sintéticos, que podrían usarse terapéuticamente así como profilácticamente.

40 El documento WO 2008/057158 se refiere a vacunas que comprenden péptidos inmunógenos que neutralizan los rinovirus, derivados de la región C-terminal de la proteína de la cápside VP1 de rinovirus humano. Sin embargo, algunos de los péptidos dados a conocer en el mismo pueden inducir la formación de anticuerpos dirigidos a un amplio miembro de serotipos de rinovirus.

45 Katpally U *et al.* (J Virol 83(2009):7040-7048) describen que el extremo N-terminal de VP4 de la cepa de rinovirus humana 14 puede unirse a anticuerpos dirigidos a proteínas de la cápside de otras cepas de rinovirus. Según los autores de esta publicación, el extremo N-terminal de VP4 está altamente conservado entre todas las cepas de rinovirus.

50 En el documento EP 0 358 48, se da a conocer un epítipo de células T que contiene péptidos de la proteína de la cápside VP2 del serotipo 2 de rinovirus que tienen menos de 40 residuos de aminoácido.

55 Los rinovirus humanos (HRV) son la causa principal de enfermedad de las vías respiratorias aguda (ARTI) e infecciones de las vías respiratorias altas (URT), generalmente conocidas como resfriado común. Sin embargo, este virus también puede replicarse en las vías respiratorias bajas contribuyendo a disfunciones más graves de las vías aéreas. Un conjunto de pruebas significativa y en aumento demuestra que HRV es responsable del ~50% de las exacerbaciones de asma y es uno de los factores que pueden dirigir un sistema inmunitario de lactante hacia un

fenotipo asmático. Pruebas adicionales de la implicación de HRV en asma se basan en la estacionalidad de las exacerbaciones. Las infecciones por HRV se producen en todo el año pero habitualmente con picos en la primavera y el otoño. También se han encontrado fuertes correlaciones entre patrones estacionales de las infecciones respiratorias de las vías altas y admisiones hospitalarias por asma.

5 No hay un patrón obvio para los síntomas de las infecciones por HRV, por lo que se remite al laboratorio de diagnóstico solamente con el fin de confirmar la presencia de HRV. De manera decepcionante, el examen de rutina para detectar cepas de HRV se produce de manera infrecuente porque las pruebas no están siempre disponibles o la infección por HRV se considera inofensiva. Actualmente, el diagnóstico de infecciones por rinovirus se realiza principalmente mediante detección directa de virus mediante métodos basados en PCR pero rara vez se caracterizan resultados positivos más allá del nivel de género y se notifican habitualmente como “picornavirus respiratorios”. El serodiagnóstico usado comúnmente basado en la neutralización específica de la cepa de la infección tampoco es práctico para estudios de grandes poblaciones. Por tanto, existe la necesidad de mejorar las técnicas serológicas para el diagnóstico de infecciones por HRV y para determinar si los rinovirus humanos han desencadenado otras enfermedades respiratorias tales como asma.

10
15 Por tanto, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar *in vitro* una infección por rinovirus provocada por cepas de rinovirus que muestran reactividad cruzada con la cepa de rinovirus 89 ó 14 en un mamífero que comprende las etapas de:

- proporcionar un anticuerpo que comprende una muestra de un mamífero,

20 - poner en contacto dicha muestra con al menos un péptido que consiste en un mínimo de 8 y un máximo de 50 residuos de aminoácido que comprenden los residuos de aminoácido 1 a 8 de una proteína de la cápside de rinovirus VP1 de la cepa de rinovirus 89 o cepa de rinovirus 14,

- diagnosticar una infección por rinovirus cuando se detecta la unión de anticuerpos a dicho al menos un polipéptido.

En el presente documento, se da a conocer por primera vez una formulación farmacéutica que va a usarse como vacuna para el tratamiento o la prevención de infecciones por rinovirus.

25 Dicha composición farmacéutica puede comprender al menos un péptido que consiste en un mínimo de 8 y un máximo de 50 residuos de aminoácido que comprenden los residuos de aminoácido 1 a 8 de una proteína de la cápside de rinovirus seleccionada del grupo que consiste en VP1, VP2, VP3 y VP4.

30 Resultó que los péptidos derivados de proteínas de la cápside de rinovirus VP1, VP2, VP3 y VP4 que comprenden los 8 primeros residuos de aminoácido N-terminales de dichas proteínas de la cápside pueden inducir la formación *in vivo* de anticuerpos dirigidos a partículas de rinovirus. El al menos un péptido puede comprender en total 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50 residuos de aminoácido. Por tanto, el al menos un péptido comprende los residuos de aminoácido 1 a 8, preferiblemente 1 a 9, 1 a 10, 1 a 11, 1 a 12, 1 a 13, 1 a 14, 1 a 15, 1 a 16, 1 a 17, 1 a 18, 1 a 19, 1 a 20, 1 a 21, 1 a 22, 1 a 23, 1 a 24, 1 a 25, 1 a 26, 1 a 27, 1 a 28, 1 a 29, 1 a 30, 1 a 31, 1 a 32, 1 a 33, 1 a 34, 1 a 35, 1 a 36, 1 a 37, 1 a 38, 1 a 39, 1 a 40, 1 a 41, 1 a 42, 1 a 43, 1 a 44, 1 a 45, 1 a 46, 1 a 47, 1 a 48, 1 a 49 ó 1 a 50 de proteínas de la cápside de rinovirus VP1, VP2, VP3 o VP4.

Estos péptidos pueden usarse en una composición respectiva en la prevención y/o el tratamiento de una infección por rinovirus.

40 Una composición farmacéutica puede comprender al menos un polipéptido (proteína) que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un tramo de al menos 80 residuos de aminoácido consecutivos de al menos una proteína de la cápside de longitud completa de un rinovirus para prevenir y/o tratar una infección por rinovirus.

45 Resultó sorprendentemente que la administración de al menos un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en un tramo de al menos 80 residuos de aminoácido consecutivos de al menos una proteína de la cápside de longitud completa de un rinovirus induce en un individuo la formación de anticuerpos dirigidos a rinovirus, en particular a las proteínas de la cápside de rinovirus.

50 Los polipéptidos y péptidos de la composición dada a conocer en el presente documento inducen, tal como se mencionó anteriormente, la formación de anticuerpos, en particular, la formación de IgA. IgA desempeña un papel importante en la inmunidad de la mucosa. Se produce más IgA en los revestimientos de la mucosa que todos los demás tipos de anticuerpo combinados. En su forma secretora, IgA es la principal inmunoglobulina encontrada en secreciones mucosas, incluyendo lágrimas, saliva, jugo intestinal y secreciones del epitelio respiratorio. También se encuentra en pequeñas cantidades en la sangre. Se encontró sorprendentemente que los anticuerpos de la clase de IgA se forman de manera predominante (en comparación con otras clases de anticuerpo) cuando los péptidos según la presente invención se administran a un individuo. Esto muestra que los péptidos dados a conocer en el presente documento permiten una protección superior contra infecciones por rinovirus puesto que la vía de infección primaria de rinovirus son las vías respiratorias, en particular las membranas mucosas de las mismas, y se sabe que IgA desempeña un papel crítico en la inmunidad de la mucosa. El tramo de residuos de aminoácido consecutivos puede

consistir preferiblemente en al menos 90, 100, 110, 120, 150, 200, 250, 260, 270, 280, 290, o incluso todos los residuos de aminoácido de la al menos una proteína de la cápside de longitud completa. El tramo de residuos de aminoácido consecutivos puede comprender al menos 90, en particular 100, residuos de aminoácido.

5 Los rinovirus están compuestos por una cápside que contiene cuatro proteínas virales VP1, VP2, VP3 y VP4. VP1, VP2 y VP3 forman la mayor parte de la cápside de proteína. Por tanto, la proteína de la cápside preferida es VP1, VP2 o VP3.

10 En una realización particular preferida, la proteína de la cápside de rinovirus es VP1, preferiblemente VP1 de rinovirus humano 89. Un polipéptido particular preferido que va a usarse en la presente invención consiste en o comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: MNPVENYIDSVLNEVLVVPNIQPSTSVSSHA
APALDAAETGHTSSVQPEDIETRYVITDQTRDETSIESFLGRSGGCIAMIEFNTSS
DKTEHDKIGKGFK (residuos de aminoácido 1 a 100 de VP1 de rinovirus humano 89) .

Las proteínas de la cápside a modo de ejemplo incluyen proteínas VP1 de cepas de rinovirus 1 humanas, en particular 1A y 1B, 2, 3, 6, 14, 15, 16, 18, 23, 25, 29, 35, 37, 44, 54, 72, 83, 86, 89, 92 y C. Las respectivas secuencias de aminoácidos se identifican en la siguiente tabla:

15 Tabla A.

N.º	Rinovirus humano (HRV)	GenBank	Secuencia de aminoácidos
1	HRV_1A	AAQ19855.1	NPVENYIDEV LNEVLVVPNI KESHHTTSNS APLLDAAETG HTSNVQPEDA IETRYVITSQ TRDEMSIESF LGRSGCVHIS RIKVDYTDYN GQDINFTKWK ITLQEMAQIR RKFELFTYVR FDSEITLVPC IAGRGDDIGH IVMQMYVPP GAPIPSKRND FSWQSGTNMS IFWQHGGQFPF RFSLPFLSIA SAYYMFYDGY DGDNTSSKYG SVVTNDMGTI CSRIVTEKQK HSVVITTHIY HKAKHTKAWC PRPPRAVPYT HSHVTNYMPE TGDVTTAIVR RNTITTA
2	HRV_1B	AAQ19856.1	NPVENYIDEV LNEVLVVPNI KESHHTTSNS APLLDAAETG HTSNVQPEDA IETRYVMTSQ TRDEMSIESF LGRSGCVHIS RIKVDYNDYN GVNKNFTTWK ITLQEMAQIR RKFELFTYVR FDSEVTLVPC IAGRGDDIGH VVMQMYVPP GAPIP- KTRND FSWQSGTNMS IFWQHGGQFPF RFSLPFLSIA SAYYMFYDGY DGDNSSSKYG SIVTNDMGTI CSRIVTEKQE HPVVITTHIY HKAKHTKAWC PRPPRAVPYT HSRVTNYVPK TGDVTTAIVP RASMKTIV

ES 2 693 684 T3

3	HRV_2	AAQ19857.1	<p>NPVENYIDEV LNEVLVVPNI NSSNPTTSNS APAL- DAAETG HTSSVQPEDV IETRYVQTSQ TRDEMSLESF LGRSGCIHES KLEVTLANYN KENFTVWAIN IQEMAQIRRK FELFTYTRFD SEITLVPCIS ALSQDIGHIT MQYMYVPPGA PVPNSRDDYA WQSGTNASVF WQHGGAYPRF SLPFLSVASA YYMFYDGYDE QDQNYGTAST NNMGSLSRSRI VTEKHIHKVH IMTRIYHKAK HVKAWCPRPP RALEYTRAHR TNFKIEDRSI QTAVTRPII TTA</p>
4	HRV_3	AAQ19858.1	<p>GLSDELEEEVI VEKTKQTLAS VSSGPKHTQS VPALTA- NETG ATLPTRPSDN VETRRTTYMHF NGSETDVESF LGRAACVHVT EIKNKNAAGL DNHRKEGLFN DWKINLSSLV QLRKKLELFT YVRFDSEYTI LATASQPEAS SYSSNLTVQA MYVPP- GAPNP KEWDDYTWQS ASNPSVFFKV GETSRFSVPP VGIASAYNCF YDGYSHDDPD TPYGITVLNH MGSMAFRVVN EHDVHTTIVK IRVYHRAKHV EAWIPRAPRA LPYVSIGRTN YPRDSKTIK KRTNIKY</p>
5	HRV_6	AAQ19861.1	<p>GLGDELEEEVI VEKTKQTLAS VSSGPKHTQS VPILTA- NETG ATMPTNPSDN VETRRTTYMHF NGSETDVESF LGRAACVHIT EIENKNPADI QNQKEEKLFN DWKINFSSLV QLRKKLELFT YIRFDSEYTI LATASQPKSN YASNLVVQAM YVPP- GAPNPE KWDDFTWQSA SNPSVFFKVG DTSRFSVPFV GLASAYNCFY DGYSHDDKDT PYGITVLNHM GSIAFRVVNE HDAHKTIVKI RVYHRAKHVE AWIPRAPRAL PYETIGRTNY PKKNKIVPVI KKRENITTY</p>
6	HRV_14	AAQ19869.1	<p>GLGDELEEEVI VEKTKQTVAS ISSGPKHTQK VPILTA- NETG ATMPVLPSDS IETRRTTYMHF NGSETDVECF LGRAACVHVT EIQNKDATGI DNHREAKLFN DWKINLSSLV QLRKKLELFT YVRFDSEYTI LATASQPDSA NYSSNLVQA MYVPP- GAPNP KEWDDYTWQS ASNPSVFFKV GDTSRFSVPY VGLASAYNCF YDGYSHDDAE TQYGITVLNH MGSMAFRIVN EHDEHKTIVK IRVYHRAKHV EAWIPRAPRA LPYTSIGRTN YP- KNTEPVIK KRKGDIKSY</p>

ES 2 693 684 T3

7	HRV_15	AAQ19870.1	<p>NPVENYIDEV LNEVLVVPNI KESHSSSTSNS APAL- DAAETG HTSSVQPEDM IETRYVQTSQ TRDEMSIESF LGRSGCVHIS DLKIHVEDYN KDGKNFTKWQ INLKEMAQIR RKFELFTYVR FDSEITLVPC IAAKSDNIGH VVMQMYVPP GAPLPNKRND YTWQSGTNAS VFWQHGQPYP RFSLPFLSIA SAYYMFYDGY DGDSTESHYG TVVTNDMGTL CSRIVTEEHG TRVEITTRVY HKAKHVKAWC PRPPRAVEYT HTHVTNYKPKQ DGDVTTVIPT RENVRAIVNV</p>
8	HRV_16	AAQ19871.1	<p>NPVERYVDEV LNEVLVVPNI NESHPTTSNA APVLDAAEETG HTNKIQPEDT IETRYVQSSQ TLDEMSVESF LGRSGCIHES VLDIVDNYND QSFTKWKINL QEMAQIRRK EMFTYARFDS EITMVPSVAA KDGHIGHIVM QYMYVPPGAP IPTTRN- DYAW QSGTNASVFW QHGQPFPRFS LPFLSIASAY YMFYDGYDGD TYKSRYGTVV TNDMGTLCSR IVTSEQLHKV KVVTRIYHKA KHTKAWCPRP PRAVQYSHTH TTNYKLSSEV HNDVAIRPRT NLTTV</p>
9	HRV_18	ACK37374.1	<p>NPVE NYIDEVLNEV LVVPNVNESH AITSNSAPAL DAAETGHTSN VQPEDMIETR YVQTSQTRDE MSIESFLGRS GCIHISKLHV HYEDYNAETR NFVKWQINLQ EMAQIRRKFE MFTYVRFDSE ITLVPSVAAK GDDIGHIVMQ YMYVPPGAPI PKTRDDFAWQ SGTNASIFWQ HGQTYPRFSL PFLSIASAYY MFYDGYDGDQ TSSRYGTVAT NDMGTLCSR VTDKHKNEVE ITTRIYHKAK HVKAW- CPRPP RAVEYTHTHV TNYKPKEGRE KTAIVPRARI TMA</p>
10	HRV_23	AAQ19878.1	<p>NPIENYVDEV LNEVLVVPNI NSSHPTTSNS APAL- DAAETG HTSNVQPEDV IETRYVQTSQ TRDEMSLESF LGRSGCIHES KLVVEIGNYD ENNFNTWNIN LQEMAQIRRK FELFTYTRFD SEITLVPCIS ALSQDIGHIT MQYMYVPPGA PIPESRN- DYA WQSGTNASIF WQHGQTYPRF SLPFLSVASA YMFYDGYNE KGTHYGTVST NNMGTLCSR VTEKHIHDMR IMTRVYHKAK HVKAWCPRPP RALEYTRAHR TNFKIEGENV KSRVAHRPAV ITA</p>

ES 2 693 684 T3

11	HRV_25	ACK37379.1	<p>NPIENYV DQVLNEVLVV PNIKESH PST</p> <p>SNSAPILDA A ETGHTSNVQP EDTIETRYVQ TTQTR-</p> <p>DEMSI ESFLGRSGCV HTSTIETK LK</p> <p>HDERFKT WNI NLQEMAQIRR KFEMFTYVRF</p> <p>DSEITLVPSI AGRGADIGHI VMQYMYVPPG</p> <p>APLPTDRKHF AWQSSTNASI FWQHGQPFPR</p> <p>FSLPFLSVAS AYYMFYDGYN GDDHTARYGT</p> <p>TVVNRMGALC MRIVTNKQVH DVEVTTNIYH KAKHV-</p> <p>KAWCP RPPRAVPYKY VDFNNYAASD</p> <p>NVDIFIQPRN SLKTA</p>
12	HRV_29	ACK37381.1	<p>NPVENYV DEVLNEVLVV PNIRESH PST</p> <p>SNSAPILDA A ETGHTSNVQP EDTIETRYVQ TSHTR-</p> <p>DEMSI ESFLGRSGCI HVSTIKANQA</p> <p>HDAKFDKWNV NLQEMAQIRR KFEMFTYVRF</p> <p>DSEITLVPCI AGRGNDIGHI VMQYMYVPPG</p> <p>APVPNDRNH F AWQSGTNASI FWQHGQPFPR</p> <p>FSLPFLSVAS AYYMFYDGYN GGDHTATYGT</p> <p>TVVNRMG TLC VRIVTGKQAH DVQVTTSIYH KAKHV-</p> <p>KAWCP RPPRVVPYKY VGLTNYTLKE</p> <p>EDTVVESRPS LMTA</p>
13	HRV_35	ACK37443.1	<p>GLGEELEEV IVEKTKQTV A SIASGSKHTQ</p> <p>SVPTLTANET GASMPVXPSD SVETRLTYMH FKGS-</p> <p>ETDVES FLGRAACVHM TEIVNKNPAX</p> <p>STNQKQDKLF NDWRINLSSL VQFRKKLELF</p> <p>TYVRFDSEYT ILATASQPDN SKYSSNLTVQ</p> <p>AMYVPPGAPN PEAWNDYTWQ SASNPSVFFK</p> <p>VGDTSRFSVP FVGLASAYNC FYDGYSHDDE</p> <p>NTPYGITVLN HMGSMFRIV NDHDVHTTLV</p> <p>KIRVYHRAKH VQAWIPRAPR ALPYVSIGRS</p> <p>NYDKSAKPI KRREQITKY</p>
14	HRV_37	AAQ19892.1	<p>GLGDELEEV I VEKTKQLAS ISSGPKHTQS VPTLTA-</p> <p>NETG ATMPTNPSDN VETRRTYMHF</p> <p>NGSETDIESF LGRAACVHIT EIKNSTGS VNHKS-</p> <p>DKLFN DWKINLSSLV QLRKKLELFT</p> <p>YVRFDSEYTI LATASQPSKS NYASNLVVQA MYVPP-</p> <p>GAPNP KEWNDFTWQS ASNPSVFFKV</p> <p>GDTARFSVPF VGLASAYNCF YDGYSHDDEN</p> <p>TPYGITVLNH MGSMAFRV N EHD AHTTLVK</p> <p>IRVYHRAKHV EAWIPRAPRA LPYEAIGKTN YPKMIT-</p> <p>PVIK KRDNITTY</p>

ES 2 693 684 T3

15	HRV_44	AAQ19899.1	<p>NPVENYVDEVLNEVLVVPNI RESHPSISNS APILDAAETG HTSNVQPEDT IETRYVQTSQ TRDEMSIESF LGRSGCIHVS TIKTNQAHNT KFDKWNINLQ EMAQIRRKFE MFTYVRFDSE ITLVPCIAGR GDDIGHIVMQ YMYVPPGAPV PDDRI- HFAWQ SGNNASIFWQ HGQPFPRFSL PFLSVASAYY MFYDGYNGGD HTATYGTTVV NRMGTLCVRI VTGKQAHDVQ VTTSIYHKAK HVKAWCPRPP RVVPYKYVGL TNYTLKETDT VVE- PRHSIMT A</p>
16	HRV_54	ACK37394.1	<p>NPVERYVD EVLNEVLVVP NIRESHPATS NSAPALDAAE TGHTSGIQPE DTIETRFVQT SQTR- DEMSIE SFLGRAGCIH ESTITIQNDV EYNDHHFKKW DITLQEMAQI RRKFEFFTYV RFDSEITLVP CIAGKGV DIG HIVMQFMYP PGAPKPEKRN DYTWESSTNP SIFWQHQQAY PRFSLPFLSI ASAYYMFYDG YGDAPGSRY GTSVTNHMGT LCSRVTGKQ KHPVEITTRV YHKAKHIRAW CPRAPRAVPY THTRSTNYMP REGDPTIFLK HRTNLVTA</p>
17	HRV_72	ACK37409.1	<p>LN DELEEVIK TKQTLASISS GPKYTQSVPT LTANETGATM PTLPSDNVET RTTYMHFNCS ETDIECFLGR AACVHVTEIE NKNPNGISNH KAEKLFNDWK ISLSSLVQLR KKLELFTYVR FDSEYTLAT ASQPDTANYS SNLVVQAMYV PPGAPNPVEW DDYTWQSASN PSVFFKVGDT SRFVSVYVGL ASAYNCFYDG YSHDDAETQY GISVLNHMGS MAFRIVNEHD THRTLKIRV YHRAKHIEAW VPRAPRALPY TSIGRTNYPK NPKPVIKKRE GDIKTY</p>
18	HRV_83	ACK37417.1	<p>GLNDELEEV IVEKTRQTLA SVASGPKHTQ SVPILTANET GATMPTQPSD NVETRRTTYMH FNCS- ETDIES FLGRAACVHM VEIVNKNPLN IKNQKREKLF NEWRINLSSL VQLRKKLELF TYARFD- SEYT ILATASQPTN SSSYSSDLTVQ AMYVPPGAPN PTKWDDYTWQ SASNPSVFFK VGDTARFSVP FVGLASAYNC FYDGYSHDDE DTPYGITVLN HMGSMFRVV NEHDAHTTEV KIRVYHRAKH VQVWVPRAPR ALPYVSIKRT NYERQNIKPV IEKRTSIKQY</p>

19	HRV_86	ACK37420.1	<p>LG DELEEVIVEK TKQTLASVAT GSKYTQKVPS LSANETGATM PTVPSDNIET RTTYMNFTGS ETDVECFLGR AACVHITEIE NKDPTDIENQ KEAKLFNDWK INLSSLVQLR KKLELFTYVR FDSEYTIAT ASQPTQSSYS SNLTVQAMYV PPGAPNPKTW NDYTWQSASN PSVFFKVGDT ARFSVPPFVGL ASAYSCFYDG YSHDNEDTPY GITVLNHMGS IAFRVVNDHD LHKTVVKIRV YHRAKHIQTW IPRAPRALPY ETIGRTNFPR NPPKIIKKRD TINTY</p>
20	HRV_89	AAQ19944.1	<p>NPVENYIDSV LNEVLVVPNI QPSTSVSSHA APAL- DAAETG HTSSVQPEDM IETRYVITDQ TRDETSIESF LGRSGCIAMI EFNTSSDKTE HDKIGKGFKT WKVSLQEMAAQ IRRKYELFTY TRFDSEITIV TAAAAQGNDS GHIVLQFMYV PPGAPVPEKR DDYTWQSGTN ASVFWQEGQP YPRFTIPFMS IASAYMYFYD GYDGDASAASK YGSVVTNDMG TICVRIVTSN QKHDLNIVCR IYHKAKHIKA WCPRPPRAVA YQHTHSTNYI PSNGEATTQI KTRPDVFTVT NV</p>
21	HRV_92	ACK37425.1	<p>GLNDELEEV IVEKTKQTLA SITSGPKHTQ SVPTLTANET GATMPTQPSD NVETRRTTYMH FNGS- ETDVEN FLGRAACVHM VEIVNKNPEG LENQKEHKLF NDWRINLSSL VQLRKKLELF TYVRFD- SEYT ILATASQPTS SKYSSSLTVQ AMYVPPGAPN PTKWDDYTWQ SASNPSVFFK VGDTARFSVP FVGLASAYNC FYDGYSHDDE DTPYGITVLN HMGSMARIV NEHDAHTTEV KIRVYHRAKH VEAWIPRAPR ALPYVSIKRT NYNKQAIQPV IKKRSLITNY</p>
22	HRV_C	ACN94256.1	<p>NPVEQFVDNV LEEVLVVPNT QPSGPIHTTK PTAL- SAMEIG ASSDVKPEDM IETRYVVNSR TNDEATIENF LGRSALWANV NMTDGYATWS ITYQGNAQIR KKLELFTYVR FDLEITIITS SSDLIQIMYV PPGANTPRSN NATEWNTASN PSIFFQPGNG FPRFTIPFTG LGSAYMYFYD GYDIVSHENG IYGISTTNDM GSLCFRTPNN SSGTEIIRVF GKPKHTRAWI PRPPRATG</p>

23	HRV_C	YP_001552435.1	NPVEDYIDKVVDTVLQVPNTQPSGPQHSHIQPSAL- GAMEIGASSTTIPGDLIETRYVINSNTNSEALIEN- FMGRSALWAKIQVANGFAKWDINFQEHAQVRK- KFEMFTYARFDMEVTVVTNNTGLVQIM- FVPPGIDAPDSIDSR- WDSASNPSVIFYQPKSGFPRFTIPFTGLGSAYYMFYD- GYDVPRNKSNVYGIT- STNDMGTLCFRAMEDETHSIRVVFVKPKHTIAWIPRP- PRATQYTHKFSTNYHVKKPDDTTGLLIQKH- FINHRTDIKTA
----	-------	----------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Las proteínas de la cápside más preferidas se derivan de rinovirus humano 89.

Según una realización preferida de la presente invención, el rinovirus es una cepa de rinovirus seleccionada del grupo que consiste en la cepa de rinovirus 89 y cepa de rinovirus 14.

- 5 Por supuesto, con el fin de potenciar adicionalmente la reactividad cruzada de la vacuna, pueden usarse una o más de otras proteínas de la cápside de uno o más de otros serotipos de rinovirus en dicha vacuna (por ejemplo VP1 de rinovirus humano 89 en combinación con VP1 de rinovirus humano 14).

- 10 Las proteínas de la cápside de la cepa de rinovirus 89 y cepa de rinovirus 14 muestran reactividad cruzada con la mayoría de las aproximadamente 100 cepas de rinovirus conocidas. La administración de un polipéptido derivado de una de dichas cepas de rinovirus induce la formación de anticuerpos, en particular de IgA, dirigidos contra la mayoría de serotipos humanos de rinovirus. Por tanto, se prefiere especialmente usar polipéptidos derivados de las proteínas de la cápside de dichas cepas de rinovirus.

Según una realización particular preferida, la proteína de la cápside es de rinovirus humano 89 y comprende la siguiente secuencia de ácidos nucleicos y aminoácidos:

- 15 VP1 de rinovirus humano 89:

ES 2 693 684 T3

	ATG	AAC	CCG	GTG	GAA	AAC	TAT	ATT	GAT	AGC	GTG
		N	P	V	E	N	Y	I	D	S	V
CTG	AAC	GAA	GTG	CTG	GTG	GTG	CCG	AAC	ATT	CAG	CCG
L	N	E	V	L	V	V	P	N	I	Q	P
AGC	ACC	AGC	GTG	AGC	AGC	CAT	GCG	GCG	CCG	GCG	CTG
S	T	S	V	S	S	H	A	A	P	A	L
GAT	GCG	GCG	GAA	ACC	GGC	CAT	ACC	AGC	AGC	GTG	CAG
D	A	A	E	T	G	H	T	S	S	V	Q
CCG	GAA	GAT	ATG	ATT	GAA	ACC	CGT	TAT	GTG	ATT	ACC
P	E	D	M	I	E	T	R	Y	V	I	T
GAT	CAG	ACC	CGT	GAT	GAA	ACC	AGC	ATT	GAA	AGC	TTT
D	Q	T	R	D	E	T	S	I	E	S	F
CTG	GGC	CGT	AGC	GGC	TGC	ATT	GCG	ATG	ATT	GAA	TTT
L	G	R	S	G	C	I	A	M	I	E	F
AAC	ACC	AGC	AGC	GAT	AAA	ACC	GAA	CAT	GAT	AAA	ATT
N	T	S	S	D	K	T	E	H	D	K	I
GGC	AAA	GGC	TTT	AAA	ACC	TGG	AAA	ATT	AGC	CTG	CAG
G	K	G	F	K	T	W	K	I	S	L	Q
GAA	ATG	GCG	CAG	ATT	CGT	CGT	AAA	TAT	GAA	CTG	TTT
E	M	A	Q	I	R	R	K	Y	E	L	F

ES 2 693 684 T3

ACC TAT ACC CGT TTT GAT AGC GAA ATT ACC ATT GTG
T Y T R F D S E I T I V
ACC GCG GCG GCG GCG CAG GGC GAT GAT AGC GGC CAT
T A A A A Q G D D S G H
ATT GTG CTG CAG TTT ATG TAT GTG CCG CCG GGC GCG
I V L Q F M Y V P P G A
CCG GTG CCG GAA AAA CGT GAT GAT TAT ACC TGG CAG
P V P E K R D D Y T W Q
AGC GGC ACC AAC GCG AGC GTG TTT TGG CAG GAA GGC
S G T N A S V F W Q E G
CAG CCG TAT CCG CGT TTT ACC ATT CCG TTT ATG AGC
Q P Y P R F T I P F M S
ATT GCG AGC GCG TAT TAT ATG TTT TAT GAT GGC TAT
I A S A Y Y M F Y D G Y
GAT GGC GAT AGC GCG GCG AGC AAA TAT GGC AGC GTG
D G D S A A S K Y G S V
GTG ACC AAC GAT ATG GGC ACC ATT TGC GTG CGT ATT
V T N D M G T I C V R I
GTG ACC AGC AAC CAG AAA CAT GAT CTG AAC ATT GTG
V T S N Q K H D L N I V
TGC CGT ATT TAT CAT AAA GCG AAA CAT ATT AAA GCG
C R I Y H K A K H I K A
TGG TGC CCG CGT CCG CCG CGT GCG GTG GCG TAT CAG
W C P R P P R A V A Y Q
CAT ACC CAT AGC ACC AAC TAT ATT CCG AGC AAC GGC
H T H S T N Y I P S N G
GAA GCG ACC ACC CAG ATT AAA ACC CGT CCG GAT GTG
E A T T Q I K T R P D V
TTT ACC GGC ACC AAC GTG
F T G T N V

TAA

terminación

3'

VP2 de rinovirus humano 89:

5'

ATG AGC CCA ACC GTG GAA GCG TGC GGT TAC AGC
S P T V E A C G Y S
GAC CGT CTG ATC CAG ATT ACC CGT GGT GAC AGT ACT
D R L I Q I T R G D S T

ES 2 693 684 T3

ATT	ACT	TCT	CAG	GAT	ACG	GCG	AAC	GCG	GTT	GTT	GCA
I	T	S	Q	D	T	A	N	A	V	V	A
TAC	GGT	GTT	TGG	CCG	AGC	TAT	CTG	ACG	CCG	GAT	GAT
Y	G	V	W	P	S	Y	L	T	P	D	D
GCT	ACT	GCA	ATT	GAT	AAA	CCT	ACC	CAG	CCT	GAT	ACT
A	T	A	I	D	K	P	T	Q	P	D	T
AGC	AGC	AAC	CGT	TTC	TAT	ACC	CTG	GAC	TCT	CGC	AGC
S	S	N	R	F	Y	T	L	D	S	R	S
TGG	ACG	AGT	GCC	AGC	AGC	GGG	TGG	TGG	TGG	AAA	CTG
W	T	S	A	S	S	G	W	W	W	K	L
CCA	GAC	GCA	CTG	AAG	AAT	ATG	GGT	ATC	TTT	GGT	GAA
P	D	A	L	K	N	M	G	I	F	G	E
AAT	ATG	TTT	TAT	CAT	TTT	CTG	GGT	CGT	TCT	GGC	TAT
N	M	F	Y	H	F	L	G	R	S	G	Y
ACG	ATC	CAC	GTA	CAG	TGC	AAT	AGC	AGC	AAA	TTT	CAT
T	I	H	V	Q	C	N	S	S	K	F	H
CAG	GGC	CTG	CTG	ATC	GTG	GCG	GCT	ATT	CCG	GAG	CAT
Q	G	L	L	I	V	A	A	I	P	E	H
CAG	CTG	GCC	AGC	GCT	ACC	AGC	GGT	AAT	GTA	AGC	GTG
Q	L	A	S	A	T	S	G	N	V	S	V
GGT	TAC	AAT	CAT	ACA	CAT	CCA	GGT	GAA	CAG	GGC	CGC
G	Y	N	H	T	H	P	G	E	Q	G	R
GAG	GTA	GTG	CCG	TCT	CGC	ACC	AGT	AGT	GAT	AAC	AAG
E	V	V	P	S	R	T	S	S	D	N	K
CGT	CCG	TCT	GAT	GAT	TCT	TGG	CTG	AAT	TTT	GAT	GGC
R	P	S	D	D	S	W	L	N	F	D	G
ACG	CTG	CTG	GGC	AAC	CTG	CCA	ATT	TAC	CCG	CAC	CAG
T	L	L	G	N	L	P	I	Y	P	H	Q
TAT	ATC	AAT	CTG	CGC	ACC	AAC	AAC	AGC	GCC	ACA	CTG
Y	I	N	L	R	T	N	N	S	A	T	L
ATC	CTG	CCT	TAT	GTC	AAC	GCC	GTG	CCT	ATG	GAC	TCT
I	L	P	Y	V	N	A	V	P	M	D	S
ATG	CTG	CGC	CAC	AAC	AAT	TGG	TCT	CTG	GTG	ATT	ATC
M	L	R	H	N	N	W	S	L	V	I	I
CCG	ATT	TGT	CCG	CTG	CAA	GTT	CAA	CCA	GGT	GGC	ACA
P	I	C	P	L	Q	V	Q	P	G	G	T
CAA	TCT	ATT	CCG	ATC	ACC	GTT	TCT	ATT	AGT	CCG	ATG
Q	S	I	P	I	T	V	S	I	S	P	M
TTC	AGT	GAG	TTC	AGT	GGC	CCA	CGT	AGT	AAG	GTC	GTC
F	S	E	F	S	G	P	R	S	K	V	V

ES 2 693 684 T3

TTC AGT ACA ACC CAA
F S T T Q

TAA

terminación

3'

VP3 de rinovirus humano 89:

5'

	<u>ATG</u>	GGC	CTG	CCA	GTG	ATG	CTG	ACA	CCG	GGG	AGT
		G	L	P	V	M	L	T	P	G	S
GGT	CAG	TTC	CTG	ACG	ACA	GAC	GAT	ACC	CAA	AGC	CCG
G	Q	F	L	T	T	D	D	T	Q	S	P
AGT	GCA	TTC	CCG	TAT	TTT	CAT	CCA	ACA	AAG	GAA	ATC
S	A	F	P	Y	F	H	P	T	K	E	I
TTT	ATT	CCG	GGG	CAG	GTT	CGT	AAC	CTG	ATT	GAG	ATG
F	I	P	G	Q	V	R	N	L	I	E	M
TGT	CAA	GTA	GAC	ACT	CTG	ATC	CCG	GTG	AAC	AAC	ACT
C	Q	V	D	T	L	I	P	V	N	N	T
CAG	GAA	AAC	GTG	CGC	AGC	GTG	AAT	ATG	TAC	ACG	GTC
Q	E	N	V	R	S	V	N	M	Y	T	V
GAT	CTG	CGC	ACT	CAG	GTA	GAC	CTG	GCA	AAG	GAG	GTG
D	L	R	T	Q	V	D	L	A	K	E	V
TTC	TCT	ATC	CCG	GTG	GAT	ATT	GCG	AGC	CAA	CCA	CTG
F	S	I	P	V	D	I	A	S	Q	P	L
GCG	ACG	ACC	CTG	ATC	GGC	GAA	CTG	GCG	AGC	TAT	TAC
A	T	T	L	I	G	E	L	A	S	Y	Y
ACT	CAT	TGG	ACG	GGT	AGT	CTG	CGT	TTT	AGT	TTC	ATG
T	H	W	T	G	S	L	R	F	S	F	M
TTT	TGT	GGC	TCT	GCA	AGT	AGC	ACT	CTG	AAA	CTG	CTG
F	C	G	S	A	S	S	T	L	K	L	L
ATT	GCG	TAC	ACC	CCG	CCG	GGT	GTC	GGT	AAA	CCA	AAG
I	A	Y	T	P	P	G	V	G	K	P	K
AGC	CGC	CGC	GAA	GCT	ATG	CTG	GGT	ACG	CAT	CTG	GTG
S	R	R	E	A	M	L	G	T	H	L	V
TGG	GAT	GTA	GGC	CTG	CAA	AGT	ACG	GCT	TCT	CTG	GTA
W	D	V	G	L	Q	S	T	A	S	L	V
GTC	CCT	TGG	GTC	TCT	GCG	AGC	CAC	TTT	CGT	TTC	ACC
V	P	W	V	S	A	S	H	F	R	F	T
ACA	CCG	GAC	ACC	TAT	TCT	TCT	GCC	GGC	TAT	ATT	ACC
T	P	D	T	Y	S	S	A	G	Y	I	T
TGT	TGG	TAT	CAG	ACC	AAT	TTT	GTG	GTT	CCT	GAT	AGC

C	W	Y	Q	T	N	F	V	V	P	D	S
ACC	CCT	GAT	AAT	GCC	AAA	ATG	GTT	TGC	ATG	GTT	AGC
T	P	D	N	A	K	M	V	C	M	V	S
GCC	TGC	AAA	GAT	TTC	TGC	CTG	CGT	CTG	GCC	CGT	GAC
A	C	K	D	F	C	L	R	L	A	R	D
ACC	AAT	CTG	CAC	ACA	CAG	GAA	GGC	GTT	CTG	ACC	CAA
T	N	L	H	T	Q	E	G	V	L	T	Q
TAA											

terminación

3'

VP4 de rinovirus humano 89:

5'	<u>CAT</u>	<u>ATG</u>	GGC	GCC	CAG	GTG	TCT	CGT	CAG	AAC	GTC	GGC
	<i>Ndel</i>		G	A	Q	V	S	R	Q	N	V	G
ACG	CAT	AGC	ACG	CAG	AAC	AGT	GTG	TCC	AAC	GGC	TCG	
T	H	S	T	Q	N	S	V	S	N	G	S	
TCG	CTG	AAC	TAC	TTC	AAC	ATC	AAC	TAT	TTT	AAA	GAT	
S	L	N	Y	F	N	I	N	Y	F	K	D	
GCA	GCC	AGC	TCT	GGT	GCG	AGC	CGT	CTG	GAT	TTT	AGT	
A	A	S	S	G	A	S	R	L	D	F	S	
CAG	GAC	CCG	TCC	AAA	TTC	ACC	GAC	CCG	GTC	AAA	GAT	
Q	D	P	S	K	F	T	D	P	V	K	D	
GTC	CTG	GAA	AAA	GGT	ATC	CCG	ACC	CTG	CAA	CAC	CAC	
V	L	E	K	G	I	P	T	L	Q	H	H	
CAC	CAC	CAC	CAC	TAA	<u>CTC</u>	<u>CAG</u>						
H	H	H	H	<i>stop</i>	<i>XhoI</i>							
								3'				

5 Según una realización preferida de la presente invención, los residuos de aminoácido 1 a 8 de la proteína de la cápside de rinovirus VP1 tienen la secuencia de aminoácidos NPVENYID.

La información de secuencia dada en el presente documento y conocida en la técnica anterior permite determinar los péptidos preferiblemente usados en la presente invención. Se mencionan anteriormente los respectivos rangos de aminoácido

10 Según una realización particularmente preferida de la presente invención, el al menos un péptido se selecciona del grupo que consiste en NPVENYIDSVLNEVLVVPNIQPSTSVSSHAA y NPVENYIDSVLNEVLVVPNIQ.

El péptido puede fusionarse o acoplarse a un portador.

15 Los portadores adecuados incluyen pero no se limitan a hemocianina de *Limulus polyphemus* (LPH), hemocianina de *Tachypleus tridentatus* (TTH) y albúmina de suero bovino (BSA), toxoide tetánico y toxina diftérica, DHBcAg, polirribitol ribosil fosfato (PRP), PncPDII, proteínas de unión a maltosa (MBP) y formulaciones de nanopartículas. En una realización, una proteína de portador inmunogénico adecuado es hemocianina de lapa californiana (KLH).

Con el fin de estimular el sistema inmunitario y aumentar la respuesta a una vacuna, la composición puede comprender al menos un excipiente y/o adyuvante farmacéutico.

El adyuvante puede ser alumbre, preferiblemente fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio, o partículas a base de hidratos de carbono (CBP).

20 Con el fin de aumentar la eficacia de la formulación, pueden usarse todos los tipos de adyuvantes. Adyuvantes preferidos son, sin embargo, compuestos a base de aluminio. Otros adyuvantes que pueden usarse incluyen compuestos que contienen lípidos o micobacterias inactivadas. Se conocen PBC, por ejemplo, a partir del documento EP 1 356 826.

25 El alumbre se conoce como un adyuvante de conducción de Th2 que da como resultado la formación de moléculas de IgG. Sin embargo, se encontró sorprendentemente que el uso de alumbre en combinación con el al menos un polipéptido de la presente invención da como resultado una inducción de IgA en vez de IgG. La inducción de IgA es particularmente ventajosa, porque IgA es una inmunoglobulina secretora encontrada en las secreciones mucosas y es, por tanto, una primera línea de defensa contra un virus entrante.

- 5 Generalmente, los adyuvantes pueden ser de formas diferentes, siempre que sean adecuados para la administración a seres humanos. Ejemplos adicionales de tales adyuvantes son emulsiones de aceite de origen mineral o vegetal, compuestos minerales, tales como hidróxido o fosfato de aluminio, o fosfato de calcio, productos y derivados bacterianos, tales como P40 (derivado de la pared celular de *Corynebacterium granulosum*), monofosforil lípido A (MPL, derivado de LPS) y derivados de péptido muramilo y conjugados del mismo (derivados de componentes de micobacteria), alumbre, adyuvante de Freund incompleto, liposina, saponina, escualeno, etc. (véase, por ejemplo, Gupta R. K. *et al.* (Vaccine 11:293-306 (1993)) y Johnson A. G. (Clin. Microbiol. Rev. 7:277-289)).
- 10 La formulación puede comprender de 10 ng a 1 g, preferiblemente de 100 ng a 10 mg, especialmente de 0,5 µg a 200 µg de dicho polipéptido. El polipéptido de la presente invención se administra a un mamífero en estas cantidades. Sin embargo, la cantidad de polipéptido aplicado depende de la constitución del sujeto que va a tratarse (por ejemplo, el peso). Además, la cantidad que va a aplicarse también depende de la vía de administración.
- La composición puede adaptarse para administración intradérmica, intramuscular, subcutánea, oral, rectal, vaginal o epicutánea.
- 15 Los modos preferidos de administración de la formulación de la presente invención incluyen todos los regímenes de administración convencionales descritos y sugeridos para la vacunación en general (oral, transdérmica, intravenosa, intranasal, por vía mucosa, rectal, etc). Sin embargo, se prefiere particularmente administrar las moléculas y proteínas según la presente invención por vía subcutánea o por vía intramuscular.
- 20 El péptido de la presente invención consiste en un mínimo de 8 y un máximo de 50 residuos de aminoácido que comprenden los residuos de aminoácido 1 a 8 de la proteína de la cápside de rinovirus VP1.
- El polipéptido o péptido tal como se definió anteriormente puede usarse para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una infección por rinovirus.
- El medicamento se administra preferiblemente por vía intradérmica, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía oral, por vía rectal, por vía vaginal o por vía epicutánea aplicando, por ejemplo, parches.
- 25 Se da a conocer un método para diagnosticar *in vitro* una infección por rinovirus en un mamífero que comprende las etapas de:
- proporcionar una muestra de un mamífero,
 - poner en contacto dicha muestra con al menos un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que
- 30 consiste en un tramo de al menos 80 residuos de aminoácido consecutivos de proteína de la cápside de longitud completa de la cepa de rinovirus 89 y/o cepa de rinovirus 14,
- diagnosticar una infección por rinovirus cuando se detecta la unión de inmunoglobulinas a dicho al menos un polipéptido.
- Los anticuerpos dirigidos a las proteínas de la cápside (en particular a VP1) de cepas de rinovirus 89 y 14 también pueden sorprendentemente unirse a proteínas de la cápside de una amplia variedad de cepas de rinovirus. Este
- 35 hecho sorprendente se usa para diagnosticar una infección por rinovirus provocada por cualquier cepa de rinovirus en un mamífero, preferiblemente en un ser humano. El método de la presente invención permite diagnosticar una infección por rinovirus provocada por cepas de rinovirus que muestran reactividad cruzada con la cepa de rinovirus 89 ó 14. El al menos un polipéptido tiene las características que se definieron anteriormente.
- 40 El al menos un polipéptido según la presente invención se inmoviliza preferiblemente sobre un soporte sólido. Esto permite unir los anticuerpos que se unen a dicho al menos un polipéptido a un soporte sólido y detectar si la muestra analizada comprende anticuerpos dirigidos a proteínas de la cápside rinovíricas. La presencia de tales anticuerpos permite el diagnóstico de una infección por rinovirus.
- En el método según la presente invención, IgA, IgG, IgM y/o IgE se miden preferiblemente.
- 45 Según una realización preferida de la presente invención, la muestra es una muestra de sangre, preferiblemente suero o plasma, una muestra de esputo, muestra de fluido de lavado neural o muestra de lágrima.
- Según la presente invención, la proteína de la cápside es VP1.
- Se da a conocer un método para diagnosticar *in vitro* una enfermedad respiratoria asociada con una infección por rinovirus en un mamífero que comprende las etapas de:
- proporcionar un anticuerpo que comprende una muestra de un mamífero,
- 50 - poner en contacto dicha muestra con un polipéptido de VP1, VP2, VP3 y VP4 de un rinovirus o un fragmento del mismo,

- determinar la clase de los anticuerpos que se unen a dicho polipéptido, y
 - diagnosticar
 - bronquiolitis cuando se detectan anticuerpos IgG1 específicos de VP3 y específicos de VP4 y anticuerpos IgM específicos de VPS,
- 5
- asma cuando se detectan los anticuerpos IgG1 específicos de VP4 y anticuerpos IgA específicos de VP1 y VP2,
 - laringitis aguda cuando se detectan anticuerpos IgG1 específicos de VP4,
 - convulsiones cuando se detectan anticuerpos IgM específicos de VP1,
 - doble infección viral (HRV/virus de la gripe) cuando se detectan IgA específicas de VP1, VP2, VP3 y VP4.
- 10
- Se encontró que la presencia de anticuerpos de un isotipo/una clase específico/a dirigidos a polipéptido de VP1, VP2, VP3 y VP4 de rinovirus indica qué tipo de enfermedad respiratoria puede padecer un individuo. Por tanto, la determinación de la clase de anticuerpo y la especificidad de anticuerpo permite diagnosticar una enfermedad respiratoria en un individuo. En la técnica se conocen medios y métodos para determinar la presencia de anticuerpos que se unen a una diana específica. Además, la determinación del isotipo/la clase de un anticuerpo la conoce un experto en la técnica.
- 15
- Según una realización preferida de la presente invención, la muestra es una muestra de sangre, preferiblemente suero o plasma, una muestra de esputo, muestra de fluido de lavado neural o muestra de lágrima.
- El fragmento del polipéptido de VP1, VP2, VP3 y/o VP4 consiste preferiblemente en un mínimo de 8 y un máximo de 50 residuos de aminoácido que comprenden los residuos de aminoácido 1 a 8 de una proteína de la cápside de rinovirus seleccionada del grupo que consiste en VP1, VP2, VP3 y VP4.
- 20
- Según otra realización preferida de la presente invención, el rinovirus es la cepa de rinovirus 89 y la proteína de la cápside es VP1.
- Los residuos de aminoácido 1 a 8 de la proteína de la cápside de rinovirus tienen preferiblemente la secuencia de aminoácidos NPVENYID.
- 25
- El fragmento se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en NPVENYIDSVLNEVLVVPNIQPSTSVSSHAA y NPVENYIDSVLNEVLVVPNIQ.
- La presente invención se ilustra además mediante las siguientes figuras y ejemplos, pero sin limitarse a los mismos.
- La figura 1 muestra la estacionalidad de la respuesta de IgA a VP1 en sueros humanos tomados a lo largo de un periodo de un año. Los sueros de 8 pacientes alérgicos y 6 no alérgicos se tomaron en invierno, primavera, verano y otoño y se determinaron títulos de anticuerpos IgA específicos de VP1 mediante ELISA y se expresan como valor óptico (DO 405 nm) en el eje y. Los valores ópticos corresponden al nivel de anticuerpo en los sueros humanos. Los resultados se muestran en diagramas de cajas, donde el 50% de los valores están dentro de las cajas y los resultados no atípicos entre barras. La línea dentro de las cajas indica los valores medianos.
- 30
- La figura 2 muestra los niveles de IgA específica de VP1 en un individuo vacunado durante el periodo del estudio. Los títulos de IgA específicas de VP1 se midieron mediante ELISA. El día de la donación de sangre se aplica en el eje x, la densidad óptica (DO) en el eje y. El valor óptico corresponde al nivel de anticuerpo IgA en sueros humanos.
- 35
- La figura 3 muestra la respuesta de IgA específica de VP1 en ratones. Se inmunizaron grupos de ratones con antígeno de VP1. Los títulos de IgA específicas de VP1 se midieron mediante ELISA y se expresan como valor óptico (DO 405 nm) en el eje y. El valor óptico corresponde al nivel de anticuerpo IgA en sueros de ratón.
- 40
- La figura 4 muestra una prueba de neutralización con VP1 de serotipo de rinovirus humano 14.
- La figura 5 muestra una prueba de neutralización con VP1 de serotipo de rinovirus humano 89.
- La figura 6 muestra la purificación de proteínas VP1 recombinantes. (A) 89VP1 y (B) 14VP1 se tiñeron con azul de Coomassie tras SDS-PAGE (izquierda) y con un anticuerpo anti-His6 (derecha) tras la transferencia sobre nitrocelulosa. Los pesos moleculares en kDa se indican a la izquierda.
- 45
- La figura 7 muestra respuestas inmunitarias específicas de VP1 de conejos y ratones inmunizados. (A) Respuestas de IgG específicas de 89VP1 y 14VP1 en conejos. Los conejos se inmunizaron con 89VP1 o 14VP1. Se tomaron muestras de suero el día de la primera inmunización (suero preinmunitario) y después de la segunda y tercera inyección en intervalos de 3-4 semanas (parte superior de la caja: suero inmunitario 1; suero inmunitario 2). Las diluciones de los sueros (α 89VP1 de conejo; α 14VP1 de conejo) se presentan en el eje x (10^{-3} - 10^{-6} indicado como

log). Las reactividades de IgG a los inmunogenes (89VP1, 14VP1) se presentan como barras. (B) Se inmunizó un grupo de cinco ratones con 89VP1. Se tomaron muestras de suero el día de la primera inmunización (0) y en intervalos de tres semanas (s3-s9) (eje x). Las reactividades de IgG1 se presentan para el grupo con diagrama de cajas donde el 50% de los valores están dentro de las cajas y los resultados no atípicos entre barras. Las líneas dentro de las cajas indican los valores medianos. Los niveles de IgG1 específica de 89VP1 se presentan como valores de densidad óptica (eje y).

La figura 8 muestra que el anticuerpo anti-VP1 producido contra VP1 recombinante reacciona con VP1 derivada de rinovirus y virus completo. (A) Se incubaron extracto de proteína de HRV14 transferido con nitrocelulosa y 14VP1 recombinante con anticuerpos anti-14VP1 y el correspondiente suero preinmunitario (pre-IS). Los pesos moleculares en kDa se indican a la izquierda. (B) Micrográficos electrónicos de preparaciones de virus marcados tras tinción negativa. Se incubó HRV89 inmovilizado con anticuerpos IgG anti-89VP1 y los sitios de unión se visualizaron mediante una sonda de anticuerpo IgG secundario acoplada a partículas de oro coloidal con un diámetro de 10 nm. El micrográfico de la izquierda proporciona un detalle de una partícula de virus (VP) conectada con cuatro partículas de oro (GP). El micrográfico de la derecha muestra la preparación de control usando la Ig preinmunitaria. Barras: micrográfico de la izquierda, 50 nm; micrográfico de la derecha, 100 nm.

La figura 9 muestra la reactividad de antisueros de conejo producidos contra proteína 14VP1 recombinante o péptidos derivados de 14VP1. Se inmunizaron los conejos con 14VP1, PVP1A, PVP1B o PVP3A recombinante (parte superior de la caja) y los sueros se expusieron a 14VP1 (parte superior) o 89VP1 (parte inferior). Las diluciones de los sueros se presentan en el eje x (10^{-3} - 10^{-6} indicado como log). Los niveles de IgG específica de 14VP1 y 89VP1 corresponden a los valores de densidad óptica (barras: eje y).

La figura 10 muestra que HRV14 se neutraliza mediante anticuerpos anti-14VP1. Se preincubó HRV14 a 100 TCID₅₀ con diluciones en serie de antisuero tal como se indica durante 2 h a 37°C y la mezcla se añadió a células HeLa subconfluentes en placas de 24 pocillos. Tras 4 días a 34°C, las células restantes se tiñeron con violeta cristal. Se usó suero preinmunitario pre-IS como control.

La figura 11 muestra (A) el árbol filogenético las secuencias de VP1 de los HRV investigados. Las secuencias de VP1 se recuperaron del banco de datos y se analizó su similitud con ClustalW. (B) Inhibición de infecciones por HRV por los respectivos anticuerpos específicos de VP1. Se preincubaron HRV a 100 TCID₅₀ con diluciones en serie de dos veces de los respectivos antisueros a de 1:2 (a) a 1:16 (d) durante 3 horas a 37°C y las mezclas se aplicaron a células HeLa subconfluentes en placas de 96 pocillos. Tras la incubación durante 3 días a 34°C, las células se tiñeron con violeta cristal, se lavaron, se disolvió el tinte, y se leyó la DO a 560 nm. Se muestra la media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes.

La figura 12 muestra geles SDS-PAGE al 12,5% teñidos con azul de Coomassie que contienen proteínas con etiqueta his VP1, VP2, VP3 y VP4 purificadas (carril 1: 5 μ l de marcador molecular; carril 2: 10 μ l de VP1; 10 μ l de VP2; 10 μ l de VP3; 10 μ l de VP4, respectivamente).

La figura 13 muestra las respuestas de IgA, IgM, IgG₁ e IgG₂ a VP1, VP2, VP3 y VP4 detectadas en sangre humana de pacientes con resultados de prueba de PCR específica de HRV positivos. Los sueros de cincuenta y siete pacientes se sometieron a prueba para determinar la presencia de cuatro anticuerpos específicos de proteínas de la cápside derivadas de rinovirus. Los títulos se midieron mediante ELISA y se expresan como valor óptico (DO 405 nm) en el eje y. Los valores ópticos corresponden a los niveles de anticuerpos en los sueros humanos. Los resultados se muestran en diagramas de cajas, donde el 50% de los valores están dentro de las cajas y los resultados no atípicos entre barras. La línea dentro de las cajas indica los valores medianos.

La figura 14A muestra la alineación múltiple de las secuencias de aminoácidos de VP1 de cepas prototipo de HRV. Se recuperaron las secuencias de la base de datos de proteínas y se alinearon con GeneDoc seguido por edición manual. Representan serotipos de HRV que pertenecen a diferentes especies y diferente grupo receptor: HRV37 y 89 son el género A de grupo principal, HRV3, 14 y 72 son el género B de grupo principal, HRV1A, 18 y 54 son los tipos K y HRV1A, HRV29 y 44 son el género A de grupo minoritario. Los cuadrados negros denotan tres epítomos derivados de VP1 de la cepa HRV89.

La figura 14B muestra las respuestas de IgA, IgM, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄ a Ep₁, Ep₂ y Ep₃ detectados en sangre humana de pacientes con resultados de prueba de PCR específica de HRV positivos. Los sueros de cincuenta y siete pacientes se sometieron a prueba para determinar seis anticuerpos específicos de epítomos derivados de VP1. Los títulos se midieron mediante ELISA y se expresan como valor óptico (DO 405 nm) en el eje y. Los valores ópticos corresponden al nivel de anticuerpo en la sangre humana. Los resultados se muestran en diagramas de cajas, donde el 50% de los valores están dentro de las cajas y los resultados no atípicos entre barras. La línea dentro de las cajas indica los valores medianos.

La figura 15 muestra la reactividad cruzada de IgG de cobaya frente a epítomos derivados de VP1, VP2, VP3 y VP1 recombinantes. Sin embargo, esto sólo se refiere al reconocimiento de los antígenos (que van a usarse para diagnóstico). No es una prueba de la neutralización de cada virus pero indica protección cruzada. La neutralización de diferentes cepas de HRV se muestra en la figura 11B. Puesto que los datos se correlacionan, podría asumirse

que los anticuerpos contra VP1 o fragmento N-terminal derivado de VP1 de HRV89 también neutralizarán otras cepas cuando se someten a prueba mediante pruebas de neutralización.

La figura 16 muestra el mapeo de epítomos de la principal proteína de la cápside VP1.

5 La figura 17 muestra la respuesta inmunitaria de IgG1 frente a péptidos sintéticos derivados del epítomo N-terminal de VP1 en comparación con péptidos descritos previamente (Mc Cray *et al.*, Nature 329 (1987): 736-738) detectada en sangre humana de pacientes con resultados de prueba de PCR específica de HRV positivos.

La figura 18 muestra una curva ROC para los valores de anticuerpo en pacientes con doble infección viral por HRV/virus de la gripe.

10 La figura 19 muestra respuestas de IgG₁ a péptidos derivados de P1, comprendiendo cada uno aproximadamente 30 (figura 19A) o 20 (figura 19B) aminoácidos, o péptidos derivados de P1A (B), comprendiendo cada uno 20 aminoácidos, detectadas en sangre humana de cincuenta y siete pacientes con resultados de prueba de PCR específica de HRV positivos. Las reactividades de IgG₁ se midieron mediante ELISA y se expresan como valor óptico (DO 405 nm) en el eje y. Los valores ópticos corresponden a los niveles de anticuerpos en los sueros humanos. Los resultados se muestran en diagramas de cajas, donde el 50% de los valores están dentro de las cajas y los resultados no atípicos entre barras. La línea dentro de las cajas indica los valores medianos.

15 La figura 20 muestra la inhibición de infecciones por HRV mediante anticuerpos anti-VP1, anti-VP2, anti-VP3, anti-VP4. Se preincubaron HRV a 10 TCID₅₀ (A), 100 TCID₅₀ (B) o 1000 TCID₅₀ (C) con diluciones en serie de dos veces de los respectivos antisueros de 1:2 a 1:1:128 durante 3 horas a 37°C y la mezcla se aplicó a células HeLa subconfluentes en placas de 96 pocillos. Tras la incubación durante 3 días a 34°C, las células se tiñeron con violeta cristal, se lavaron, se disolvió el tinte y la DO se leyó a 560 nm.

20 La figura 21 muestra la reactividad de anticuerpos anti-89VP1 y anti-14VP1 de conejo con 14VP1, 89VP1 y tres fragmentos de 89VP1 recombinantes. Se diluyeron los sueros de conejo 1:5000 y A₅₆₀ correspondiente a anticuerpos IgG unidos se muestra en el eje y.

Ejemplos:

25 Ejemplo 1: Respuesta de *anticuerpo IgA específica de VP1 de tres pacientes alérgicos determinada en diferentes estaciones.*

30 Se tomaron muestras de sangre en el invierno de 2006 (inv06), la primavera de 2007 (prim), el verano de 2007 (ver), el otoño de 2007 (ot) y el invierno de 2007 (inv07). Se midió el título de anticuerpo mediante experimentos de ELISA. Se recubrieron placas para ELISA (Nunc Maxisorb, Dinamarca) con 5 µg/ml de VP1 (de la cepa de rinovirus 89) y se incubaron con sueros de ratón diluidos 1:50. Se realizaron todos los experimentos en dobletes y se calcularon las DO medias. Se detectaron anticuerpos unidos con anticuerpos monoclonales de ratón anti-IgA humana (BD Pharmingen, San Diego, CA, EE.UU.) diluidos 1:1000, y luego con anticuerpos de rata acoplados a POX anti-IgG de ratón (Amersham Bioscience) diluidos 1:2000. Se midió la DO a 405 nm y 490 nm en un lector de ELISA (Dynatech, Alemania).

35 El título de anticuerpo varía entre las estaciones y entre pacientes. Esto conduce a la conclusión de que la exposición a rinovirus puede determinarse mediante VP1 (figura 1).

Ejemplo 2: *La proteína rinovírica VP1 induce una fuerte respuesta de IgA en un voluntario sano*

40 Se vacunó un voluntario sano con una formulación que contenía la molécula de VP1 completa, una proteína rinovírica, adsorbida a Al(OH)₃ (20 µg/inyección). Se inyectó esta vacuna por vía subcutánea en la parte superior del brazo del sujeto tres veces (día 0, 21, 42). Antes de la primera vacunación y en los días 65, 79, 91, 98 y 119 se extrajo sangre para analizar el desarrollo de la respuesta inmunitaria específica de antígeno.

45 En la figura 2, se demuestra el aumento de anticuerpos IgA específicos de VP1 mediante mediciones de ELISA. El eje x muestra las fechas del muestreo de sangre y el eje y los valores de densidad óptica (DO) correspondientes. La cantidad máxima de anticuerpos IgA específicos de VP1 se alcanza en el día 65 (DO= 0,551) en el que, en comparación con el suero preinmunitario (día 0), podía medirse un aumento de tres veces de anticuerpos IgA específicos de VP1. Tras el día 65, pudo detectarse una lenta disminución del nivel de IgA. Pero en el día 119, el nivel de anticuerpos IgA específicos de VP1 (DO= 0,372) era casi el doble que en el día 0 (DO= 0,195).

Ejemplo 3: *Respuesta de IgA específica de VP1 de ratones inmunizados.*

50 Con el fin de determinar la respuesta de IgA específica de VP1, se inmunizó un grupo de cinco ratones por vía subcutánea con 5 µg de antígeno de VP1 adsorbido a hidróxido de aluminio en intervalos de tres semanas. Se tomaron muestras de suero de las venas de la cola el día anterior a la primera inmunización (0) y después de la segunda inmunización (6s). Se determinaron los niveles de anticuerpos IgA específicos de VP1 mediante ELISA. Se recubrieron las placas con 5 µg/ml de la proteína VP1 y se incubaron durante la noche con suero de ratón diluido

adsorbidos a alumbre en intervalos de tres semanas y a los que se les extrajo sangre de las venas de la cola.

Experimentos de ELISA

Se recubrieron 5 µg/ml de 89VP1 o 14VP1 a placas para ELISA. Se diluyeron los sueros de ratón 1:500 y los sueros de conejo 1:10³-1:10⁶. Se detectaron anticuerpos IgG1 de ratón específicos de antígeno con anticuerpos de ratón anti-IgG1 de ratón monoclonales acoplados a fosfatasa alcalina diluidos 1:1000 (Pharmingen). Se desarrollaron anticuerpos IgG de ratón específicos de antígeno con una 1:2000 dilución de anticuerpos de burro anti-IgG de conejo acoplados a peroxidasa (Amersham Bioscience). Se midieron las DO correspondientes a anticuerpos unidos a 405 nm y 490 nm para anticuerpos de conejo y a 405 nm y 450 nm para anticuerpos de ratones en un lector de ELISA (Dynatech, Alemania).

10 *Reactividad de anticuerpos anti-VP1 con extracto de rinovirus transferido y rinovirus*

Se centrifugaron sobrenadantes de cultivo celular de células HeLa infectadas por HRV en una centrifuga de mesa (15.000 rpm, 10 min, 20°C) para retirar partículas insolubles. Entonces, se añadieron 0,5 ml de PEG (polietilenglicol 6000 al 40% v/v, NaCl al 2,4% p/v, pH 7,2) a 2 ml de sobrenadante que contenía el virus. Se incubó la disolución a 4°C durante la noche y después se centrifugó a 2.300 x rpm durante 45 minutos en una centrifuga de mesa a TA. Se resuspendió el sedimento en 100 µl de PBS y se lisó en 50 µl de tampón de muestra SDS. Se separaron 10 µl de este extracto de proteína HRV14 y 0,5 µg de 14VP1 purificado mediante SDS PAGE al 12% y se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa. Se incubaron transferencias preparadas de manera idéntica con diluciones 1:500 de anticuerpos de conejo anti-14VP1 o la correspondiente Ig preinmunitaria. Se detectaron anticuerpos unidos con anti-IgG de conejo de burro marcada con 125I y se visualizaron mediante autorradiografía.

20 Para la microscopía electrónica con oro inmunitario, se pipetearon 4,2 µl de alícuotas del precipitado viral resuspendido sobre rejillas de cobre limpias de plasma, recubiertas con carbono y secadas al aire. Tras 5 minutos, se retiró el líquido restante con un trozo de papel de filtro. Entonces se incubaron las rejillas boca abajo (cámara de humedad a temperatura ambiente) en los siguientes tampones: en primer lugar, PBS que contiene BSA al 1% (p/v) a pH 7,4 y después tampón Tris que contiene BSA al 1% (p/v) a pH 8,2.

25 Después, se realizaron las siguientes etapas de incubación: (a) BSA al 5%, 5 min; (b) Ig anti-VP1 purificada con proteína G o Ig preinmunitaria ajustada hasta una DO 280 nm de 0,6, 45 min; (c) 6 x tampón PBS, 5 segundos cada uno; (d) 6 x tampón Tris, 5 segundos cada uno; (e) Ig de cabra anti-conejo acoplada a partículas de oro coloidal con un diámetro de 10 nm (Plano, Wetzlar, Alemania), diluida 1:20 en tampón Tris, 30 min; (f) 6 x tampón Tris, 5 segundos cada uno; (g) 6 x agua destilada, 5 segundos cada uno. Tras el marcaje, se realizó tinción negativa pipeteando una disolución saturada de acetato de uranilo sobre las rejillas. Tras 1 minuto, se retiró tinte negativo en exceso con un papel de filtro húmedo. Entonces se secaron al aire las rejillas y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión EM 410 de Philips equipado con una cámara CCD de alta resolución. Se tomaron micrográficos a una ampliación de 165.000 x o 240.000 x.

Prueba de neutralización de HRV

35 Se usaron reservas de rinovirus y la cepa "Ohio" sensible a HRV de células HeLa (Stott EJ y Tyrrell DA, Arch. Gesamte Virusforsch. 1968; 23:236-244.). Se sembraron células HeLa en placas de 24 pocillos y se hicieron crecer hasta aproximadamente el 90% de confluencia. En un primer conjunto de experimentos, se incubaron 300 µl de alícuotas de HRV14 (100 TCID₅₀) en medio durante 2 h a 37°C con 300 µl de anti-sueros de conejo (anti-14VP1, anti-PVPIA, anti-PVPIB o PVP3A) o los correspondientes sueros preinmunitarios (sin diluir o diluidos 1:2-1:32) y se añadieron a las células. Se usó medio MEM-Eagle (Invitrogen, EE.UU.) que contenía FCS al 1% y MgCl₂ 40 mM como diluyente en los experimentos. Se incubaron las placas a 34°C en una atmósfera del 5% de CO₂ humidificada y se tiñeron células viables con violeta cristal después de tres días. Se llevaron a cabo pruebas de neutralización cruzada en placas de 96 pocillos; se sembraron células HeLa en medio esencial mínimo (MEM) que contenía suero bovino fetal al 2%, MgCl₂ 30 mM y glutamina 1 mM (medio de infección) y se hicieron crecer durante la noche a 37°C hasta aproximadamente el 70% de confluencia. Se mezclaron HRV (100 TCID₅₀ en 100 µl de medio de infección) con 100 µl del respectivo antisuero no diluido y diluciones en serie de dos veces del mismo en el mismo medio. Después de incubación durante 3 h a 37°C, se cubrieron las células con estas disoluciones y se continuó la incubación a 34°C durante 3 días. Se retiró el medio y se tiñeron las células con violeta cristal (0,1% en agua) durante 10 min. Después de lavar con agua, se secó la placa, se disolvió el tinte en 30 µl de SDS al 1% con agitación durante 1 hora y se cuantificó la protección celular como DO a 560 nm en un lector de placas.

Resultados

Expresión y purificación de proteínas VP1 recombinantes de HRV89 y HRV14

Se expresaron VP1 recombinante de HRV89 (89VP1; la figura 6A) y HRV14 (14VP1; la figura 6B) en *E. coli* con una etiqueta His6 en sus extremos C-terminales y se purificaron a partir de cuerpos de inclusión solubilizados mediante cromatografía de afinidad de níquel de una única etapa. Las bandas de proteína purificadas aparecen tras la tinción con azul de Coomassie en aproximadamente 34 kDa en SDS-PAGE. Las proteínas recombinantes 89VP1 y 14VP1

reaccionaron específicamente con el anticuerpo anti-etiqueta His debido a su etiqueta hexa-histidina C-terminal (carriles derechos; figura 6).

5 89VP1 y 14VP1 inducen una respuesta inmunitaria específica de VP1 en animales. La inmunización de conejos con 89VP1 y 14VP1 recombinantes indujo respuestas de IgG específicas de VP1 (figura 7A). La respuesta inmunitaria a 89VP1 fue más fuerte que la de 14VP1 con anticuerpos detectados hasta una dilución de suero de 10^{-5} tras la segunda inmunización y hasta una dilución de 10^{-6} tras la tercera inmunización. La respuesta de IgG específica de 14VP1 fue detectable hasta una dilución de suero de 10^{-3} tras la segunda inmunización y hasta una dilución de 10^{-4} tras la tercera inmunización (figura 7A). También se obtuvieron respuestas de anticuerpo específicas de VP1 en ratones inmunizados con proteínas VP1 adsorbidas a alumbre. Se detectaron anticuerpos IgG1 específicos de 10 89VP1 ya después de la primera inmunización y continuaron aumentando a la segunda y tercera inmunización (figura 7B).

Reactividad de anticuerpos producidos contra proteínas VP1 recombinantes con respecto a VP1 derivada de virus y viriones completos

15 Se estudió la reactividad de anticuerpos inducidos por inmunización con proteínas VP1 recombinantes con VP1 natural, derivada de virus y virus completo mediante inmunotransferencia y microscopía electrónica, respectivamente. Como ejemplo representativo, la unión de anticuerpos de conejo anti-14VP1 y de Ig preinmunitaria a proteínas HRV14 transferidas en nitrocelulosa y 14VP1 se muestra la figura 8A. Los anticuerpos producidos contra 14VP1 recombinante, pero no la Ig preinmunitaria, reaccionaron con 14VP1 natural y recombinante a aproximadamente 34 kDa (figura 8A). Se visualizó la unión específica de anticuerpos anti-89VP1 a HRV89 usando el 20 método de microscopía electrónica con oro inmunitario. Cuando se expusieron viriones inmovilizados a anticuerpos anti-89VP1 y anticuerpos secundarios conjugados con oro, aproximadamente el 10% de las partículas de virus aparecieron recubiertas con de una hasta cinco partículas de oro coloidal (figura 8B). No se encontró unión de oro a los viriones en las preparaciones de control con la Ig preinmunitaria; estaban presentes pocas partículas de oro pero no estaban asociadas con partículas de virus (figura 8B; panel derecho).

25 *La inmunización de conejos con 14VP1 recombinante da mayores títulos de anticuerpo específico de 14VP1 y 89VP1 que la inmunización con péptidos derivados de HRV14 acoplados a KLH*

Se produjeron antisueros contra péptidos acoplados a KLH que se han descrito anteriormente como posibles candidatos de vacuna. Los antisueros anti-péptido contenían títulos altos de anticuerpos específicos de péptido (PVP1A: 10^{-3} ; PVP1B: 10^{-5} ; PVP3A: 10^{-5}). Sin embargo, en comparación con antisueros producidos contra 14VP1 30 recombinante, reaccionaron sólo débilmente con la proteína 14VP1 y mostraron reactividad cruzada débil con 89VP1 (figura 9). Lo más notablemente, el antisuero producido contra 14VP1 recombinante mostró una reactividad comparable con 14VP1 y 89VP1. El antisuero contra la proteína VP1 reaccionó con ambas proteínas virales al menos diez veces más fuerte que los antisueros de péptido (figura 9).

35 *Anticuerpos específicos de 14VP1 inhiben la infección por HRV de células HeLa mejor que los anticuerpos específicos de péptido*

A continuación, se investigó si anticuerpos IgG de conejo producidos contra la proteína 14VP1 recombinante pueden inhibir la infección por HRV de células HeLa. Los resultados de un conjunto de experimentos de protección celular realizados con HRV14 se muestran en la figura 10. La presencia de anticuerpos 14VP1 evitó la muerte celular al exponerse a HRV14 a 100 TCID₅₀ hasta una dilución 1:32 del antisuero.

40 Además, se analizó la capacidad de anticuerpos producidos contra 14VP1 completa con anticuerpos producidos contra péptidos derivados de 14VP1 para la protección de las células frente a infección viral. Se incubaron diluciones en serie (sin diluir o diluidas 1:2-1:32) de antisueros anti-14VP1, - PVP1A, -PVP1B o -PVP3A junto con HRV14 y se añadieron a células HeLa. La capacidad para inhibir la infección celular de los tres antisueros anti-péptido fue comparable entre sí. Se observó una clara reducción de CPE a una dilución de 1:8 con anti-PVP1A y anti-PVPIB y a 45 una dilución de 1:4 con anti-PVP3A. Se obtuvo un grado similar de inhibición de infección (es decir, CPE parcial) con el antisuero anti-14VP1 hasta una dilución de 1:32. Esto sugiere que el último antisuero era aproximadamente 8 veces más potente en la inhibición de infecciones virales (tabla 1).

Tabla 1. Inhibición de infección por HRV14 con antisueros producidos contra péptidos derivados de 14VP1 y HRV14

	sin diluir	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
α 14VP1	+++	+++	++	++	+	+	-
α PVP1A	+++	+++	+	+	+/-	+/-	-
α PVP1B	+++	+++	+	+	+/-	+/-	-
α PVP3A	+++	+++	+	+/-	+/-	+/-	-

50 En la tabla 1 se muestra la neutralización de infección mediante anticuerpos producidos contra péptidos derivados de 14VP1 y HRV14. Se preincubó una dilución de anticuerpos anti-14VP1, anti-PVPIA, anti-PVPIB o anti-PVP3A (sin

diluir o diluidos 1:2-1:32) con 100 TCID₅₀ HRV14 y se añadió a células HeLa. Las neutralizaciones de virus y los efectos citopáticos (CPE) observados se indican: +++: neutralización completa; ++: CPE mínimos; +: CPE parciales; +/-: CPE casi completos; - CPE completos.

5 *Anticuerpos producidos contra proteínas VP1 recombinantes muestran protección cruzada contra cepas de HRV poco relacionadas entre sí.*

La figura 11A muestra la relación evolutiva de los tipos de rinovirus usados para los experimentos de protección cruzada. Se seleccionaron para pertenecer a diferentes especies y diferentes grupos de receptor: HRV37 y 89 son el género A de grupo principal, HRV3, 14 y 72 son el género B de grupo principal, HRV1A, 18 y 54 son tipos K (es decir, HRV de grupo principal que poseen una lisina en el bucle HI de VP1) y HRV29 y 44 son el género A de grupo minoritario. Ambos, los anticuerpos anti-89VP1 y anti-14VP1 inhibieron la infección de células HeLa por la mitad de los serotipos de HRV de manera dependiente de la concentración independiente de su relación evolutiva (figura 11B). De manera interesante, anticuerpos anti-14VP1 inhibieron la infección por HRV89 más fuertemente que los anticuerpos anti-89VP1 mientras que los anticuerpos anti-89VP1 sólo inhibieron débilmente la infección por HRV14 (figura 11B). De manera notable, ambos antisueros mostraron una amplia reacción cruzada con HRV escasamente relacionados (comparar con la figura 11A).

Conclusiones:

Una vacuna que protege contra infecciones por rinovirus puede ser útil para reducir exacerbaciones de asma inducidas por rinovirus. Se investigó la proteína de la cápside VP1 derivada de HRV como posible antígeno de vacuna por varios motivos. El trabajo de Rossmann *et al.*, que elucida la estructura cristalina de HRV14, demuestra que VP1 está implicada críticamente en la unión de HRV a su receptor en células epiteliales humanas. Se encontró que cinco copias de VP1 forman una depresión, denominada cañón y que el receptor de ICAM-1 se une en la parte central de este cañón. Además, estudios de mutaciones espontáneas en la cubierta viral condujeron a la identificación de cuatro sitios inmunogénicos neutralizantes (NIm) sobre la superficie de HRV14. Investigaciones adicionales revelaron que anticuerpos que se dirigieron a dos de los cuatro sitios antigénicos que se sitúan en la proteína VP1 bloquearon la unión celular.

Las proteínas VP1 completas de HRV89 y HRV14, que pertenecen a las especies filogenéticamente distantes HRV-A y HRV-B, respectivamente, se expresaron en *E. coli* y se purificaron después. Usando el programa ClustalW para alineación (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) sólo pudo encontrarse el 45% de identidad de nucleótidos y el 41% de identidad de aminoácidos entre 89VP1 y 14VP1. Se purificaron 14VP1 y 89VP1 recombinantes por medio de una etiqueta His C-terminal mediante cromatografía de afinidad de níquel en un procedimiento de una única etapa. La inmunización de ratones y conejos con 14VP1 recombinante así como proteínas 89VP1 condujo al desarrollo de respuestas de anticuerpo específicas de VP1 que reconocen VP1 natural del virus e incluso virus intacto tal como se demuestra mediante microscopía electrónica con oro inmunitario.

Las respuestas de anticuerpo obtenidas con las proteínas VP1 se compararon con las inducidas por péptidos derivados de VP1 y VP3 de HRV14 que se habían descrito anteriormente como candidatos de vacuna y con las obtenidas con un péptido PVP1B ubicado en el extremo C-terminal de la proteína VP1, siendo parte del sitio de unión de ICAM-1 en HRV14. Se encontró que los antisueros de VP1 anti-HRV14 reaccionaron mucho más fuerte con VP1 que los antisueros anti-péptido y presentaron un mayor título de neutralización. La mayor capacidad de neutralización de los anticuerpos producidos contra las proteínas completas se debe probablemente al hecho de que el antisuero producido contra la proteína completa reconoce varios epítomos diferentes en la proteína VP1 y, por tanto, puede presente una mayor avidez que los anticuerpos específicos de péptido.

Existe un grado relativamente bajo de identidad de secuencia del 45% en el nivel de nucleótido y del 41% en el nivel de aminoácido entre 89VP1 y 14VP1. Sin embargo, se encontró que anticuerpos producidos contra las proteínas VP1 recombinantes de cada de una de estas cepas inhibieron la infección de células HeLa cultivadas por una variedad de diferentes cepas de rinovirus que pertenecen al grupo principal y minoritario. El último hallazgo puede ser importante porque indica que puede ser posible generar por ingeniería genética una vacuna de amplia protección cruzada y eficaz contra HRV combinando proteínas VP1 de unas pocas cepas de rinovirus. La eficacia de una vacuna de este tipo también puede mejorarse mediante la adición de otras proteínas de la cápside tales como VP2, VP3 y/o VP4. La última ha recibido atención recientemente puesto que también tiene protección cruzada inducida.

Las principales ventajas de una vacuna basada en proteínas de la cápside de rinovirus recombinantes son que los antígenos de la vacuna pueden producirse fácilmente en condiciones controladas mediante expresión recombinante a gran escala en huéspedes foráneos, tales como *E. coli* a costes razonables. Una vacuna contra HRV de amplia protección cruzada puede ser especialmente útil para la vacunación de pacientes que padecen ataques de asma inducidos por rinovirus y puede, por tanto, reducir exacerbaciones de asma.

55 Ejemplo 5: *Construcción de vectores que contienen los ADNc de VP1, VP2, VP3 y VP4 de HRV89*

Se optimizaron los codones de los ADNc que codifican para VP1, VP2, VP3 y VP4 de HRV89 para *Escherichia coli* y se sintetizaron de manera sintética con la adición de seis residuos de histidina en el extremo 3'. Los genes completos se insertaron en el fragmento NdeI/XhoI de sitios de clonación múltiples de pET-27b (ATG Biosynthetics,

Alemania). Los constructos resultantes se denominan vectores p89VP1, p89VP2, p89VP3 y p89VP4 y productos génicos VP1, VP2, VP3 y VP4. Las secuencias de ADN de VP1, VP2, VP3 y VP4 se confirmaron mediante secuenciación de nucleótidos y digestión doble y se muestran en la figura 11.

Ejemplo 6: *Expresión y purificación de VP1, VP2, VP3 y VP4 recombinantes*

5 Con el fin de lograr la expresión de proteínas de la cápside recombinantes, se transformaron las cepas *Escherichia coli* BL21 (DE3) con p89VP1, p89VP2, p89VP3 o p89VP4, respectivamente, y se sembraron en placas LB que contenían kanamicina 100 µg/ml. Se usó una única colonia para inocular 250 ml de medio LB que contenía kanamicina 100 mg/l. Se hizo crecer este cultivo hasta una densidad óptica (600 nm) de 0,6 y se indujo la expresión de proteínas añadiendo IPTG hasta una concentración final de 1 mM. Se recogieron las células mediante
10 centrifugación a 3500 rpm a 40C durante 10 min. Se realizó purificación con el protocolo Qiagen usando Ni-NTA. Se resuspendió el sedimento celular en condiciones desnaturalizantes en 10 ml de clorhidrato de guanidina 6 M durante 4 horas. Tras la centrifugación (20 min, 18 000 rpm) se incubó el sobrenadante con 2 ml de Ni-NTA durante 2 horas adicionales. Entonces se cargó la suspensión en una columna, se lavó dos veces con 10 ml de tampón de lavado (urea 8 M, NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 6,1) y después se eluyó con 12 ml de tampón de elución (urea 8 M, NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 3,5). Se logro renaturalización tras la diálisis con molaridad decreciente de urea.

Se analizaron la pureza y el tamaño de las proteínas recombinantes mediante SDS-PAGE tal como se muestra en la figura 12. Las bandas de proteína se correlacionaron con los tamaños de proteína calculados de 33,6 kDa para VP1, 30,8 kDa para VP2, 27,8 kDa para VP3 y 8,3 kDa para VP4. Los tamaños de proteína también se confirmaron
20 mediante análisis MALDI-TOF.

Ejemplo 7: *Clonación de constructos que expresan proteínas de fusión de epítomos MBP-VP1*

Se usó el ADNc que codificaba para VP1 como molde para la amplificación de epítomos derivados de VP1 mediante PCR (tabla I). Se usaron los sitios de restricción EcoRI y BamHI (subrayados en la tabla I) del vector pMalc4X para la inserción de productos de PCR aguas abajo del gen *malE* de *E. coli*, que codifica para proteína de unión a maltosa (MBP), dando como resultado la expresión de proteínas de fusión de MBP (New England BioLabs). Se confirmó la inserción de ADNc para epítomos derivados de VP1 mediante secuenciación de nucleótidos y los productos génicos se denominan Ep_1, Ep_2 y Ep_3 (figura 14A).

Tabla I. Cebadores usados para la clonación de fragmentos de PCR (5' a 3').

Cebadores		SEQ ID No.
Ep_1 directo	CG <u>GAATTC</u> ATG AAC CCA GTT GAA AAT TAT ATA GAT	1
Ep_1 inverso	CG <u>GGATCC</u> TTA TTT GAA TCC TTT ACC AAT TTT ATC	2
Ep_2 directo	CG <u>GAATTC</u> ACA TGG AAG GTT AGT CTT CAA GAA ATG	3
Ep_2 inverso	CG <u>GGATCC</u> TTA ATA AAA CAT GTA ATA GGC TGA TGC	4
Ep_3 directo	CG <u>GAATTC</u> GAT GGT TAT GAT GGT GAT AGT GCA GCA TC	5
Ep_3 inverso	CG <u>GGATCC</u> TTA GAC GTT TGT AAC GGT AAA AAC ATC AG	6

30 Secuencias de aminoácidos del epítomo N-terminal (epítomo 1):

Ep_1a: MNPVENYIDSVLNEVLVVPNIQPSTSVSSHAA

Ep_1b: PALDAAETGHTSSVQPEDIETRYVITDQTRDET

Ep_1c: SIESFLGRSGCIAMIEFNTSSDKTEHDKIGKGFK

Ejemplo 8: *Expresión y purificación de proteínas de fusión de MBP*

35 Se expresaron proteínas de fusión recombinantes (Ep_1, Ep_2, Ep_3) en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) tal como se describió en el ejemplo 6. Se realizó la purificación usando la afinidad de MBP por maltosa. Se solubilizó la fracción del cuerpo de inclusión con urea 8 M, NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM y se dializó contra el tampón de columna (Tris 20 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM pH=7,4). Se cargó el lisado transparente en una columna de afinidad de

resina amilosa equilibrada, se lavó dos veces con 60 ml de tampón de columna y se eluyó con 20 ml de tampón de columna que contenía maltosa 10 mM.

Se confirmó la identidad de las proteínas de fusión mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando antisuero de conejo anti-VP1.

5 Ejemplo 9: *Detección de anticuerpos específicos de VP1, VP2, VP3 y VP4 en sangre de pacientes con resultados de prueba de PCR específica de HRV positivos*

Para investigar la aparición de anticuerpos específicos de VP1, VP2, VP3 y VP4 en sangre humana, se realizó ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se recubrieron placas para ELISA (Nunc) con 5 µg/ml de proteínas de la cápside derivadas de rinovirus recombinantes (VP1, VP2, VP3, VP4) y se usó albúmina sérica humana (HSA) como control. Se diluyó la sangre completa de 57 pacientes positivos para HRV 1:50. Se detectaron IgA, IgM, IgG₁ e IgG₂ humanas unidas (BD Pharmingen) 1:1000 con anticuerpos de oveja anti-ratón acoplados a peroxidasa (Amersham Bioscience) 1:2000. Se presenta el valor óptico (DO 405 nm) en el eje y y corresponde al nivel de anticuerpos específicos de VP1, VP2, VP3 y VP4 en sangre humana (figura 13). Se encontraron buenas especificidades interesantes de respuestas inmunitarias específicas del isotipo y la subclase en pacientes positivos para HRV. De las cuatro proteínas virales de la cápside, VP1 y VP2 se reconocieron predominantemente por IgG₁ e IgA, mientras que VP3 y VP4 reaccionaron principalmente con IgM. Estos resultados muestran que los pacientes infectados por HRV reconocen diferentes proteínas derivadas de rinovirus (VP1, VP2, VP3 y VP4) preferiblemente mediante anticuerpos IgG₁ y IgA y que aquellas proteínas pueden usarse para el diagnóstico y la monitorización de infecciones por rinovirus en general y en particular para la identificación de pacientes que padecen exacerbaciones de enfermedades respiratorias inducidas por rinovirus.

Ejemplo 10: *Reactividad de IgG de cobaya anti-HRV frente a epítomos derivados de VP1, VP2, VP3 y VP1*

Con el fin de evaluar si las proteínas de la cápside recombinantes de HRV89 y epítomos derivados de VP1 reaccionan de manera cruzada con una variedad de diferentes cepas de rinovirus, se recubrieron placas para ELISA con 5 µg/ml de cada antígeno. Se diluyeron sueros de cobaya producidos contra veintisiete cepas de rinovirus, que pertenecían a diferentes especies y diferentes grupos de receptor, 1:1000. Se detectaron IgG específicas de antígeno con anticuerpos de cabra acoplados a peroxidasa anti-cobaya diluidos 1:2000 (Jackson ImmunoResearch). Se midieron las DO correspondientes a anticuerpos unidos a 405 nm y 490 nm en un lector de ELISA. Se usaron suero anti-HRV89 y suero anti-cobaya como controles (Sigma) (figura 15).

Pudo detectarse un alto título de IgG anti-VP1 en sueros producidos contra casi la mitad de las cepas sometidas a pruebas y se encontró un título de IgG anti-Ep_1 potenciado en sueros con un alto nivel de anticuerpo anti-VP1. Estos hallazgos tienen implicaciones importantes para el diagnóstico de infecciones por HRV, especialmente en el contexto de enfermedades de las vías aéreas, porque muestran que VP1 y sus epítomos ubicados en su mayoría dentro del extremo N-terminal de toda la proteína se reconocen no sólo por sueros anti-cobaya producidos contra el grupo principal sino por sueros producidos contra rinovirus del grupo minoritario.

35 Ejemplo 11: *Comparación de respuestas de anticuerpo específicas de HRV con diversos datos clínicos de los pacientes*

Con el fin de investigar si es posible encontrar una correlación entre respuestas de anticuerpo específicas de VP1, VP2, VP3 y VP4 y diferentes manifestaciones clínicas, se usó un análisis de única variante usando la prueba de "Mann-Whitney" (valores de $p < 0,05$ se consideraron positivos). Se consideraron los siguientes datos clínicos:

- 40 • Fiebre
- Convulsiones
- Sexo
- Laringitis aguda
- PCR de HRV y PCR de virus de la gripe
- 45 • Tiempo de gestación
- Rinitis
- Tos
- Exposición al humo
- Sibilancia
- 50 • Pitidos

- Administración de broncodilatadores
- Asma
- Bronquiolitis

Se encontró una conexión estadística significativa entre:

- 5
- IgM específica de VP1 y convulsiones
 - IgG1 específica de VP4 y laringitis aguda
 - IgA específica de VP1, VP2, VP3 y VP4 y PCR de doble de HRV/virus de la gripe positiva
 - IgG1 específica de VP3 y VP4, IgM específica de VP3 y bronquiolitis
 - IgG1 específica de VP4 e IgA específica de VP1 y VP2 y asma
- 10
- IgG2 específica de VP1 e IgA específica de VP3 y VP4 y exposición al humo

A continuación, se realizó un análisis de múltiples variantes. Básicamente, en esta prueba, se agruparon datos clínicos con diversos modos y se compararon entonces con los valores de anticuerpo como en las pruebas de única variante. Los únicos 2 grupos que dieron una hipótesis correcta ($p < 0,05$) fueron los siguientes:

Grupo 1:

- 15
- Asma/bronquiolitis/convulsión/laringitis aguda

Grupo 2:

Asma, bronquiolitis, PCR positiva viral, convulsión, laringitis aguda

- 20
- El grupo 2 produjo diversos resultados estadísticos significativos. Estos se vieron afectados principalmente por la presencia del factor de infección viral doble que parecía ser muy importante en la totalidad de los análisis de única y múltiples variantes. Para IgM específica de VP2, hubo una conexión entre la infección viral doble y la convulsión, mientras que para IgA específica de VP1, se encontró una relación entre la infección viral doble y el asma.

- 25
- Además, se encontró que los niveles de anticuerpos podían usarse como marcador biológico para la doble infección viral por HRV/virus de la gripe. La figura 20 muestra la curva ROC para los valores de Ig en pacientes con infección doble. No sólo hay una significancia estadística en la hipótesis (valores de Ig como marcador biológico) sino también la posibilidad de establecer valores umbral para IgA específica de VP1, VP2, VP3 y VP4.

Basándose en estos resultados, se supone que será posible desarrollar pruebas serológicas para el diagnóstico de infecciones por rinovirus y su asociación con enfermedades respiratorias.

Ejemplo 12: *Mapeo de los determinantes antigénicos de la principal proteína de la cápside VP1*

- 30
- Se ha encontrado que VP1 recombinante de HRV89 es la proteína de superficie más importante inmunológicamente en muestras de sangre humana (figura 13). Por tanto, se amplificaron tres fragmentos derivados de VP1 mediante PCR usando ADNc que codificaba para VP1 como molde y se fusionaron al extremo C-terminal de la proteína de unión a maltosa (MBP). Las proteínas de fusión de MBP que contenían fragmentos derivados de VP1, comprendiendo cada una aproximadamente 100 aminoácidos (figura 14A), se expresaron en *E. coli*. Se purificaron las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad y se analizaron mediante SDS-PAGE. Se confirmó la integridad de las proteínas de fusión mediante inmunotransferencia con antisuero de conejo anti-MBP y anti-VP1 (datos no mostrados). Se usaron las proteínas de fusión de MBP purificadas para evaluar si pueden encontrarse anticuerpos específicos de epítopos en sangre humana y qué subclases de anticuerpo pueden identificarse. Tal como se muestra en la figura 14B, los principales epítopos de IgG₁ se ubicaron en el fragmento de VP1 recombinante N-terminal que comprende los 100 primeros aminoácidos de toda la proteína. Se detectó reactividad potenciada para IgA, mientras que no se encontró reactividad para IgM, IgG₂, IgG₃ e IgG₄ (figura 14B). Para analizar adicionalmente la especificidad de epítipo, se sintetizaron diferentes péptidos derivados del extremo N-terminal de VP1, comprendiendo cada uno aproximadamente 30 (figura 19A) o 20 (figura 19B) aminoácidos. Entonces se usaron los péptidos para investigar la aparición de respuestas de anticuerpo en pacientes infectados por HRV. En ambos experimentos, los principales epítopos de IgG₁ se ubicaron dentro de los 32 (figura 19A) o incluso 15 (figura 19B) primeros aminoácidos de la proteína VP1.
- 35
- 40
- 45

Las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en este ejemplo y en la figura 19 son las siguientes

Residuos de aminoácido 1 a 100 de VP1 de HRV89 (denominados P 1)

ES 2 693 684 T3

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

Péptidos derivados de P 1 de VP1 de 89HRV:

1. P1A, 32 aa

NPVENYIDSVLNEVLVVPNIQPSTSVSSHAA

5 2. P1B, 34 aa

P A L D A A E T G H T S S V Q P E D M I E T R Y V I T D Q T R D
E T

3. P1C, 34 aa

S I E S F L G R S G C I A M I E F N T S S D K T E H D K I G K G
F K

Péptidos derivados de P1A de VP1 de 89HRV

10 1. P1a

NPVENYIDSVLNEVLVVPNIQ

2. P1b

VVPNIQPSTSVSSHAAPALD

3. P1c

15 APALDAAETGHTSSVQPEDM

4. P1d

QPEDMIETRYVITDQTRDET

5. P1e

TRDETSIESFLGRSGCIAMI

20 6. P1f

CIAMIEFNTSSDKTEHDKIG

7. P1g

HDKIGKGFKTWKISLQEMAQ

25 *Ejemplo 13: Anticuerpos producidos contra proteínas de la cápside recombinantes inhiben la infección por HRV de células HeLa*

Se investigó si los anticuerpos IgG de conejo producidos contra proteínas de la cápside VP1, VP2, VP3 y VP4 recombinantes pueden inhibir la infección por HRV de células HeLa. Se muestran los resultados de un conjunto de experimentos en la figura 19. Se incubaron diluciones en serie (1:2 a 1:128) de anti-VP1, anti-VP2, anti-VP3, anti-VP4 junto con HRV89 a 10 TCID₅₀, 100 TCID₅₀ y 1000 TCID₅₀ y se añadieron a las células HeLa. Los cuatro antisueros mostraron la capacidad para inhibir la infección celular al exponerse a HRV89 a 10 TCID₅₀. Cuando se usaron mayores cantidades de virus, se obtuvo una reducción significativa de CPE con anti-VP1, anti-VP2 y anti-VP4.

30 Esto sugiere que no sólo los anticuerpos producidos contra VP1, sino también contra VP2 y VP4, pueden proteger a las células HeLa de infección por HRV (figura 20). Por tanto, puede suponerse que una vacuna que consiste en una

mezcla de diferentes proteínas de la cápside recombinantes puede mostrar una reacción cruzada más extensa con otras cepas de HRV.

Ejemplo 14: *Reactividad de anticuerpos de conejo anti-89VP1 y anti-14VP1 con 14VP1, 89VP1 y tres fragmentos de 89VP1 recombinantes.*

- 5 Con el fin de confirmar la especificidad de los antisueros de conejo anti-HRV14VP1 y anti-HRV89VP1, se realizó un experimento de ELISA usando proteínas VP1 purificadas recombinantes de HRV14 y 89 así como tres fragmentos recombinantes de VP1 derivada de HRV89. Se ha encontrado que los anticuerpos anti-HRV14VP1 reaccionaron de manera cruzada con VP1 y tres fragmentos de VP1 que abarcaban los aa 1-100 (véase el ejemplo 12), aa 101-200 y
- 10 aa 201-293 tenían sin embargo un título mucho menor que los anticuerpos anti-HRV89VP1. En este contexto, cabe destacar que los antisueros anti-VP1 obtenidos mediante inmunización con VP1 de HRV14 y HRV89 reaccionaron de manera diferencial con estos fragmentos de 89VP1 recombinantes. Por tanto, parece que este último antisuero contiene IgG que reaccionan con muchos más epítomos que el antisuero producido contra 14VP1. Además, confirma el supuesto de que usando fragmentos derivados de VP1 es posible detectar anticuerpos dirigidos contra especies de rinovirus poco relacionadas entre sí.

15

REIVINDICACIONES

1. Método para diagnosticar *in vitro* una infección por rinovirus provocada por cepas de rinovirus que muestran reactividad cruzada con la cepa de rinovirus 89 ó 14 en un mamífero que comprende las etapas de:
 - proporcionar un anticuerpo que comprende una muestra de un mamífero,
- 5
 - poner en contacto dicha muestra con al menos un péptido que consiste en un mínimo de 8 y un máximo de 50 residuos de aminoácido que comprenden los residuos de aminoácido 1 a 8 de una proteína de la cápside de rinovirus VP1 de la cepa de rinovirus 89 o cepa de rinovirus 14,
 - diagnosticar una infección por rinovirus cuando se detecta la unión de anticuerpos a dicho al menos un péptido.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra es una muestra de sangre, preferiblemente suero o plasma, una muestra de esputo, muestra de fluido de lavado neural o muestra de lágrima.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el rinovirus es la cepa de rinovirus 89.
- 15 4. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque los residuos de aminoácido 1 a 8 de la proteína de la cápside de rinovirus tienen la secuencia de aminoácidos NPVENYID.
5. Método según las reivindicaciones 3 ó 4, caracterizado porque el al menos un péptido se selecciona del grupo que consiste en NPVENYIDSVLNEVLVVPNIQPSTSVSSHAA y NPVENYIDSVLNEVLVVPNIQ.

Fig. 1

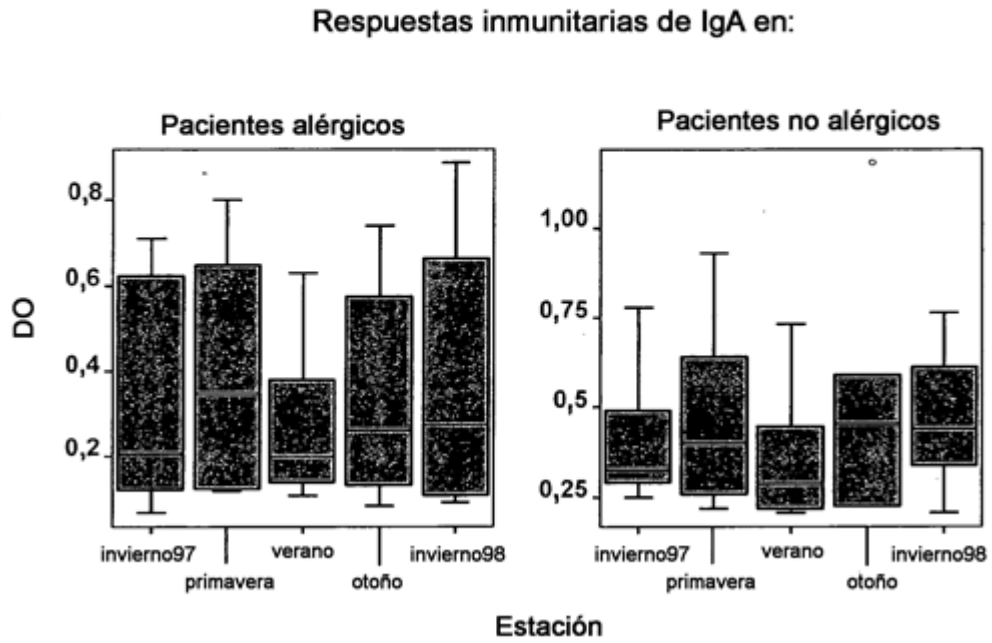


Fig. 2

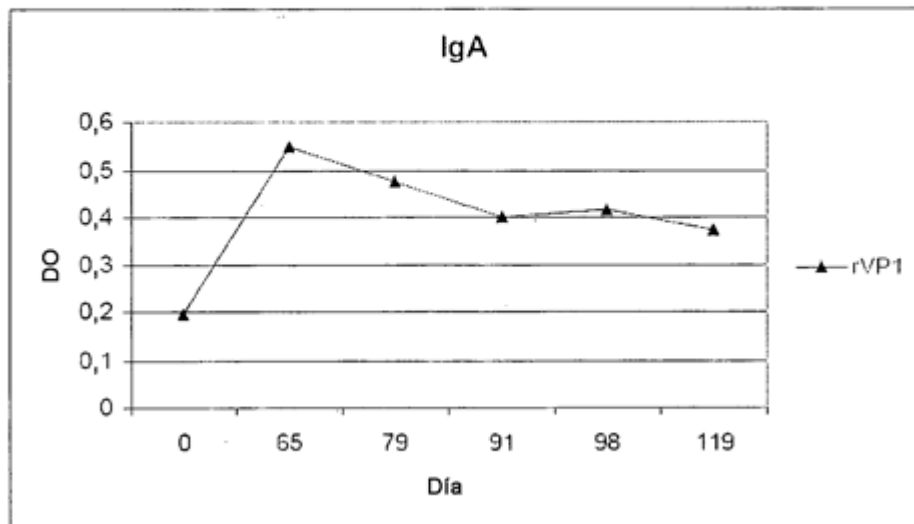


Fig. 3

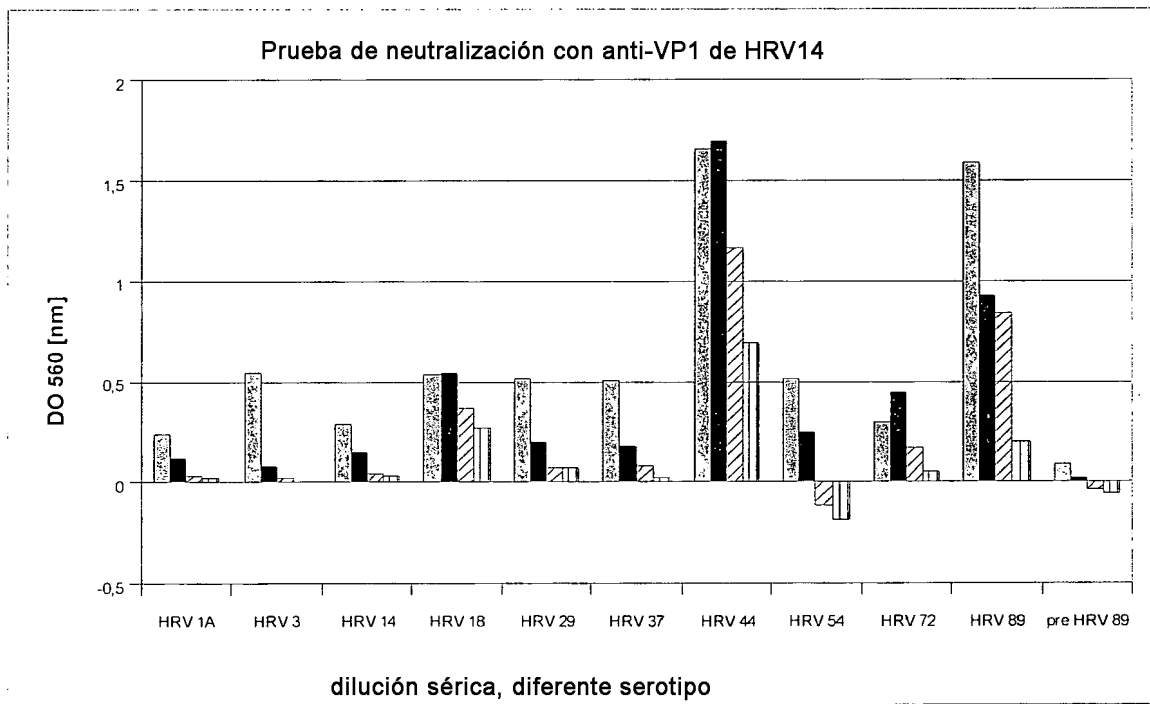
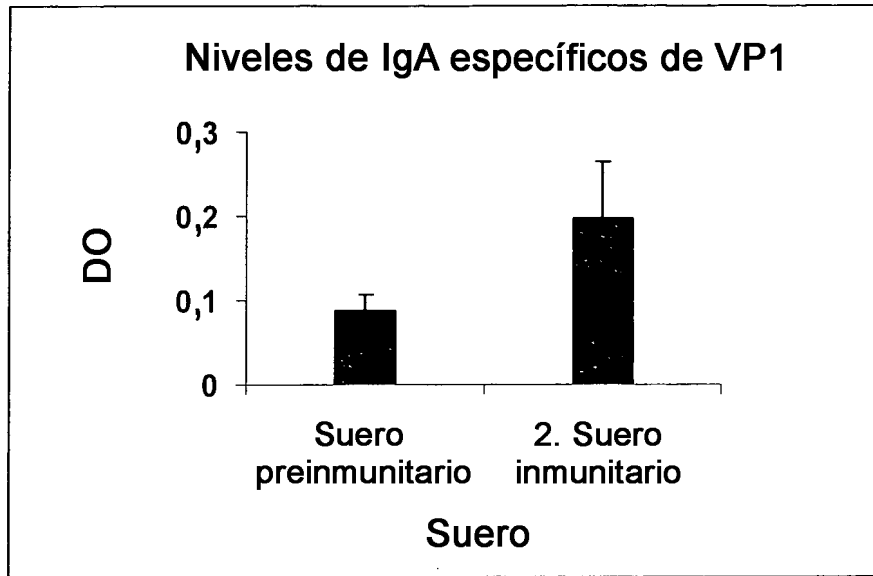


Fig. 4

Fig. 5

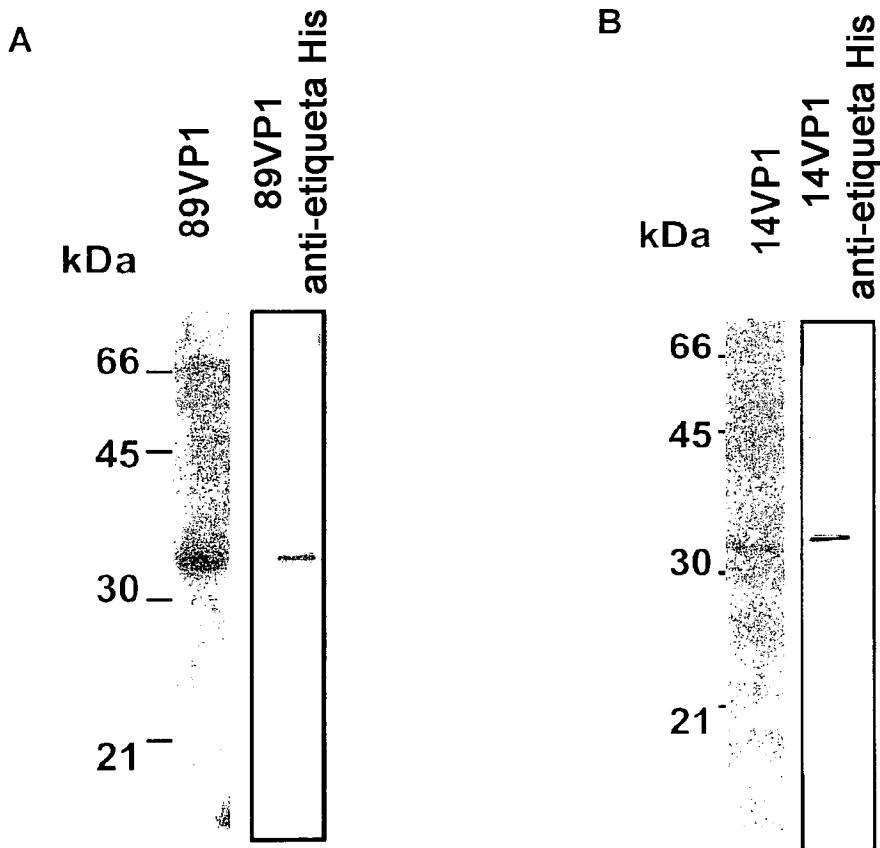
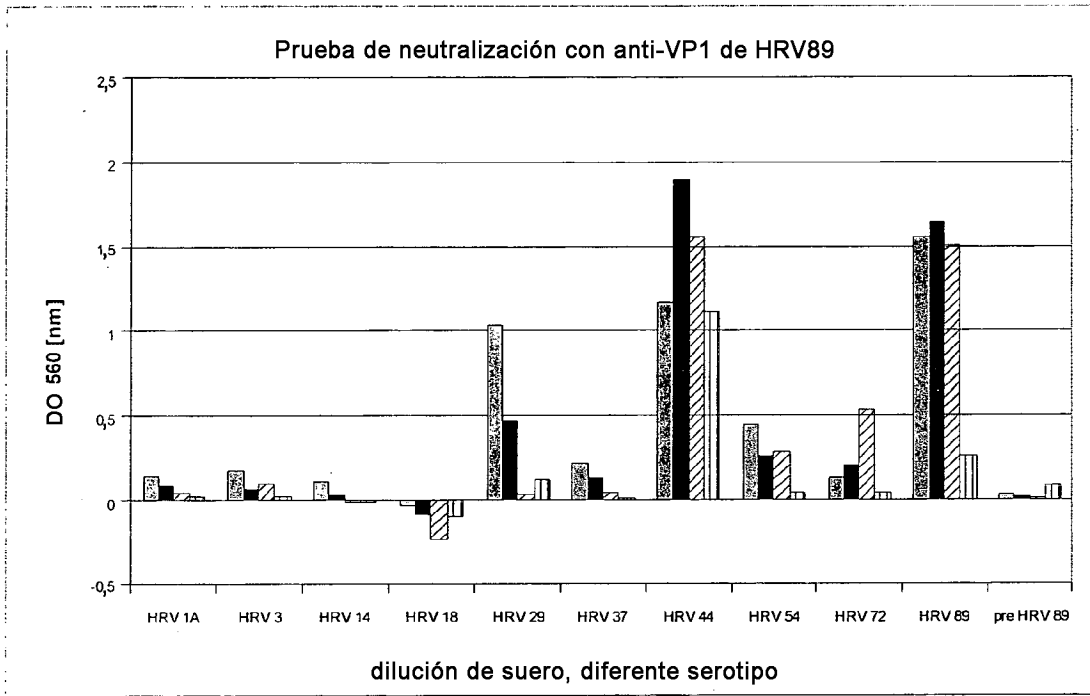


Fig. 6

Fig. 7A

A

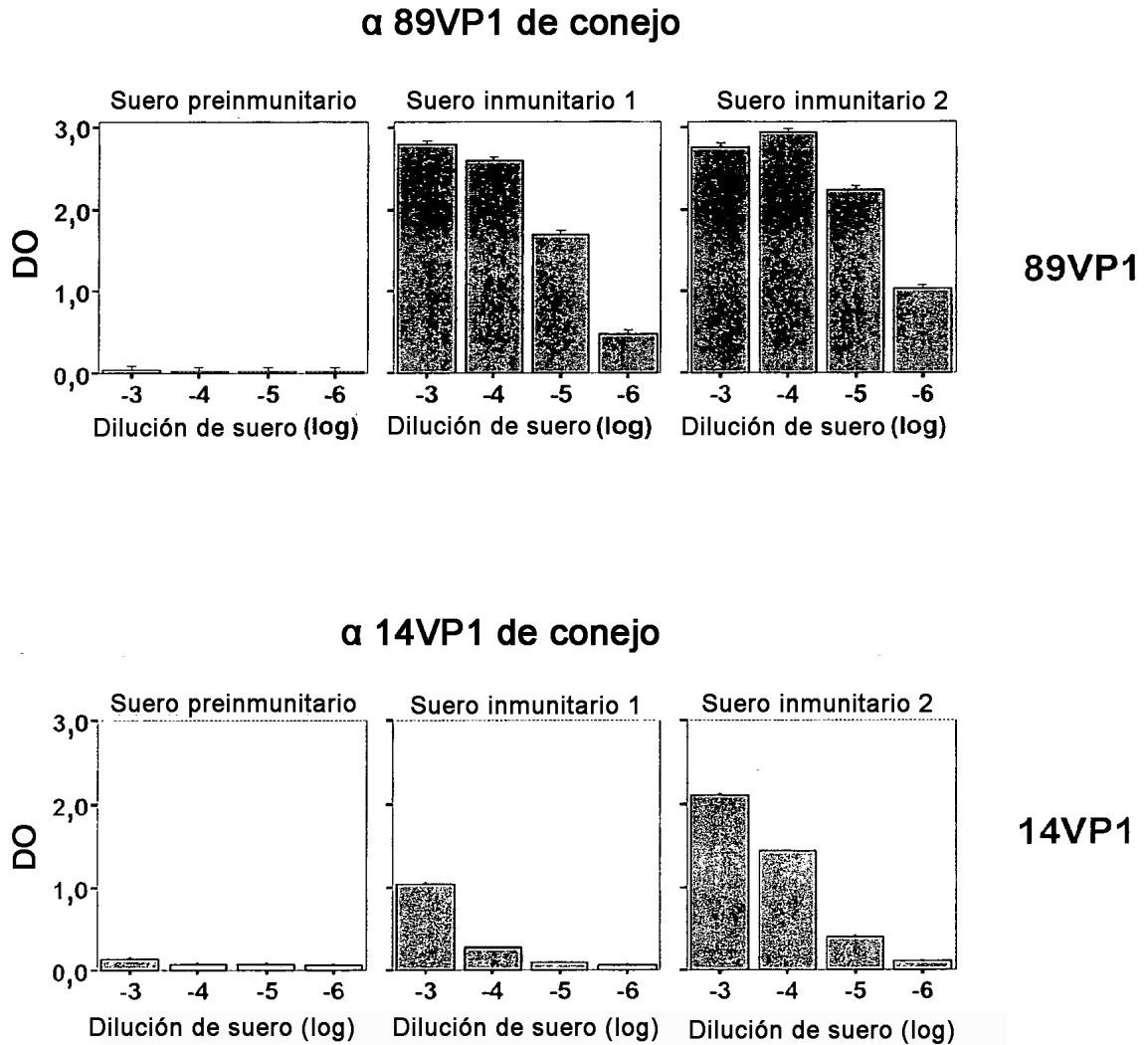


Fig. 7B

B

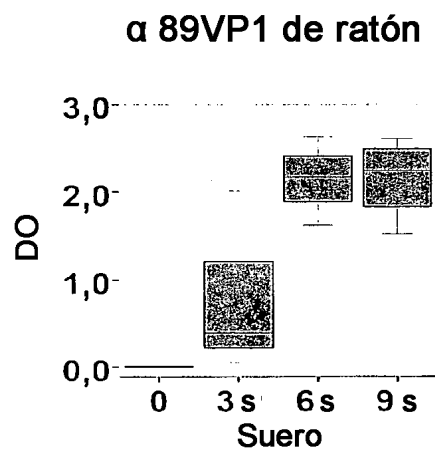


Fig. 8A

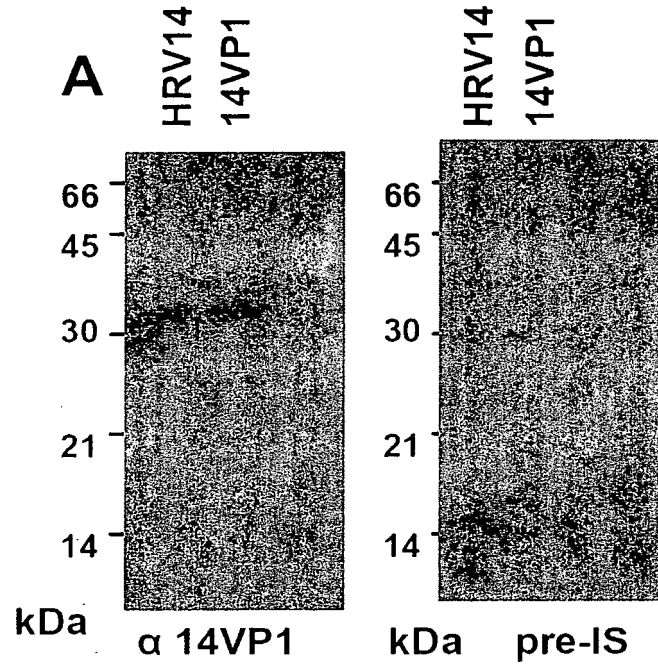


Fig. 8B

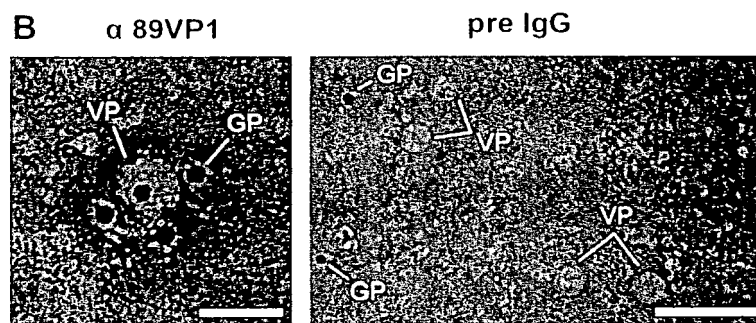


Fig. 9

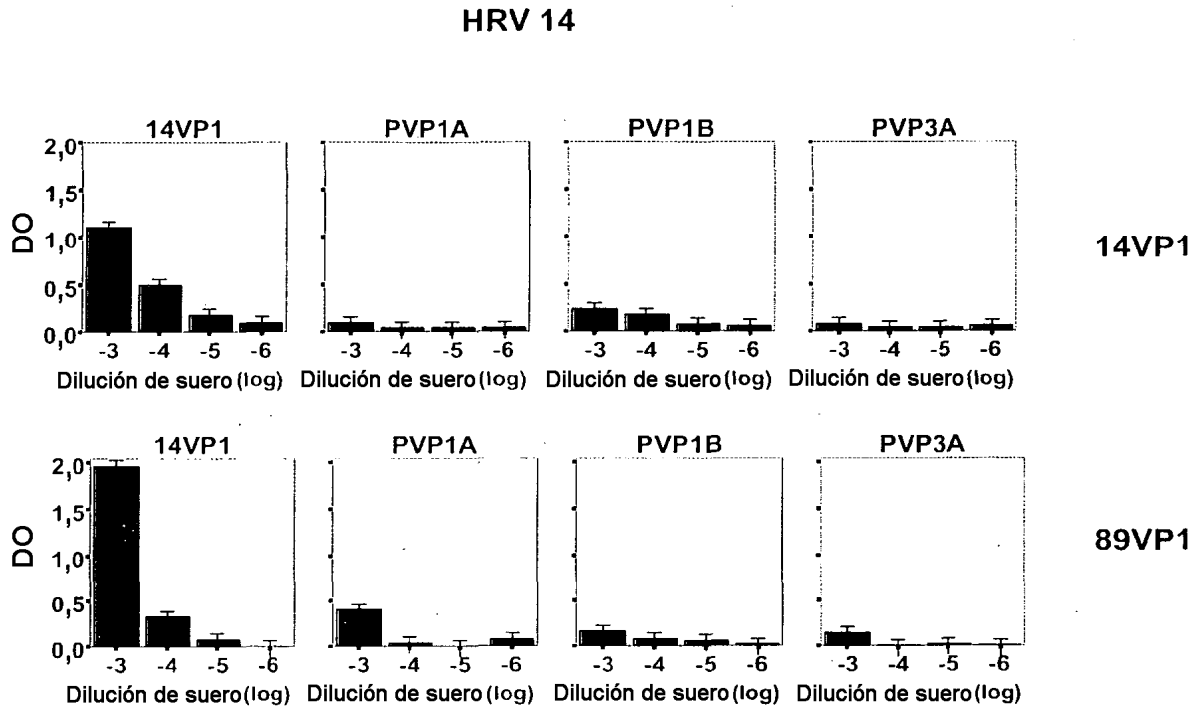


Fig. 10

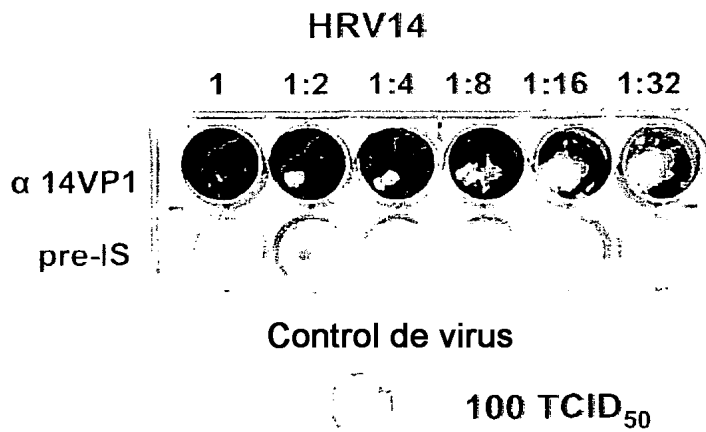


Fig. 11A

A

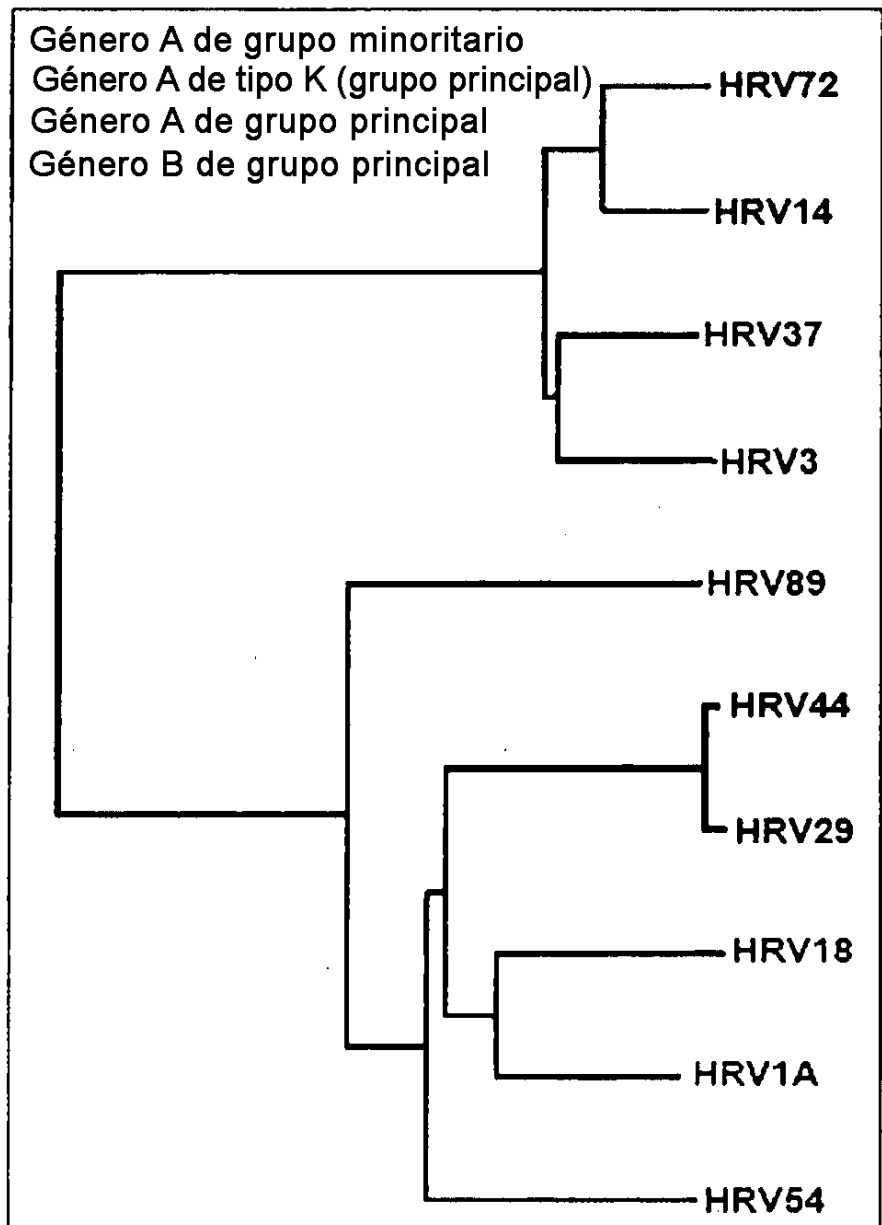


Fig. 11B

B

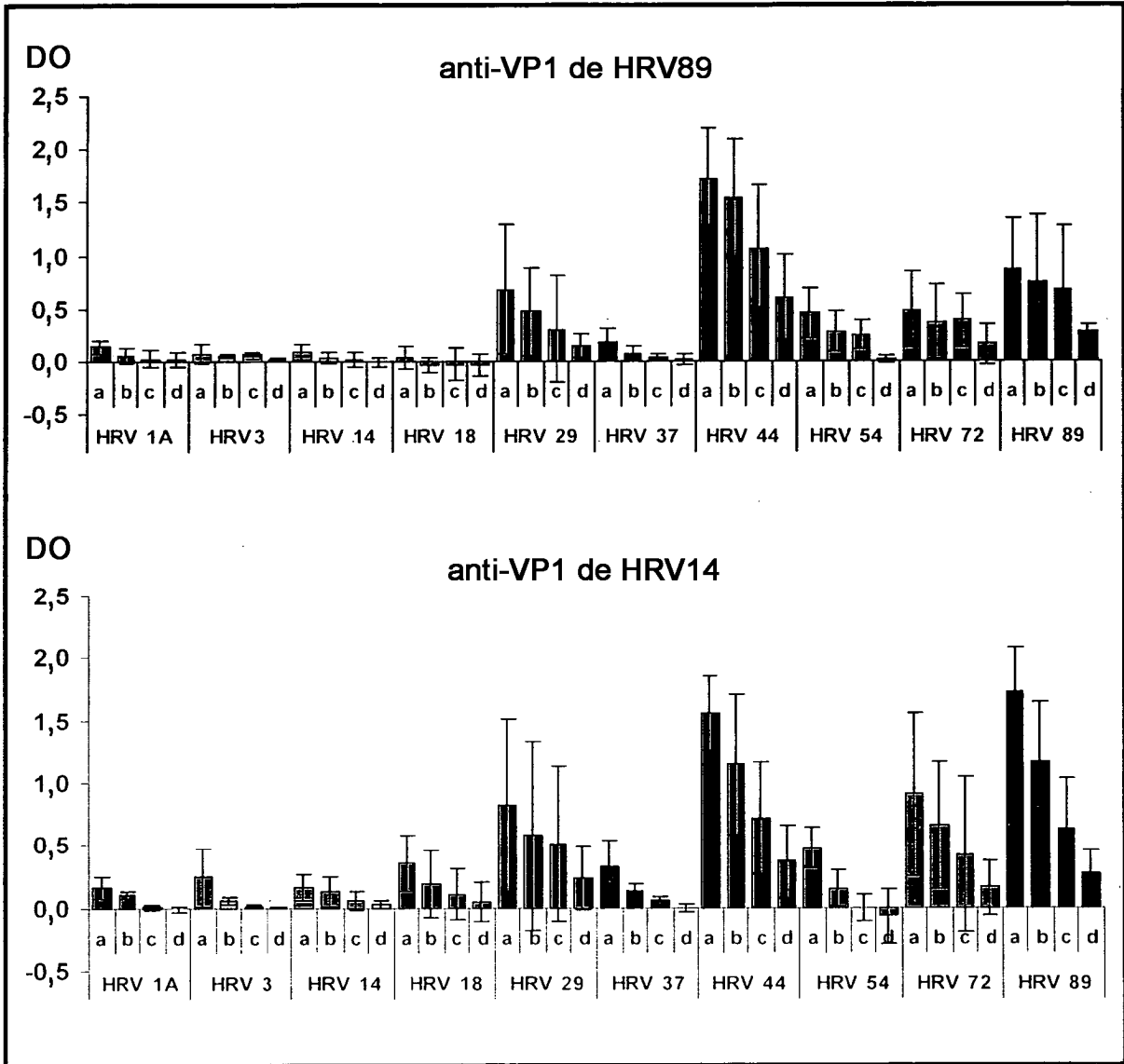


Fig. 12

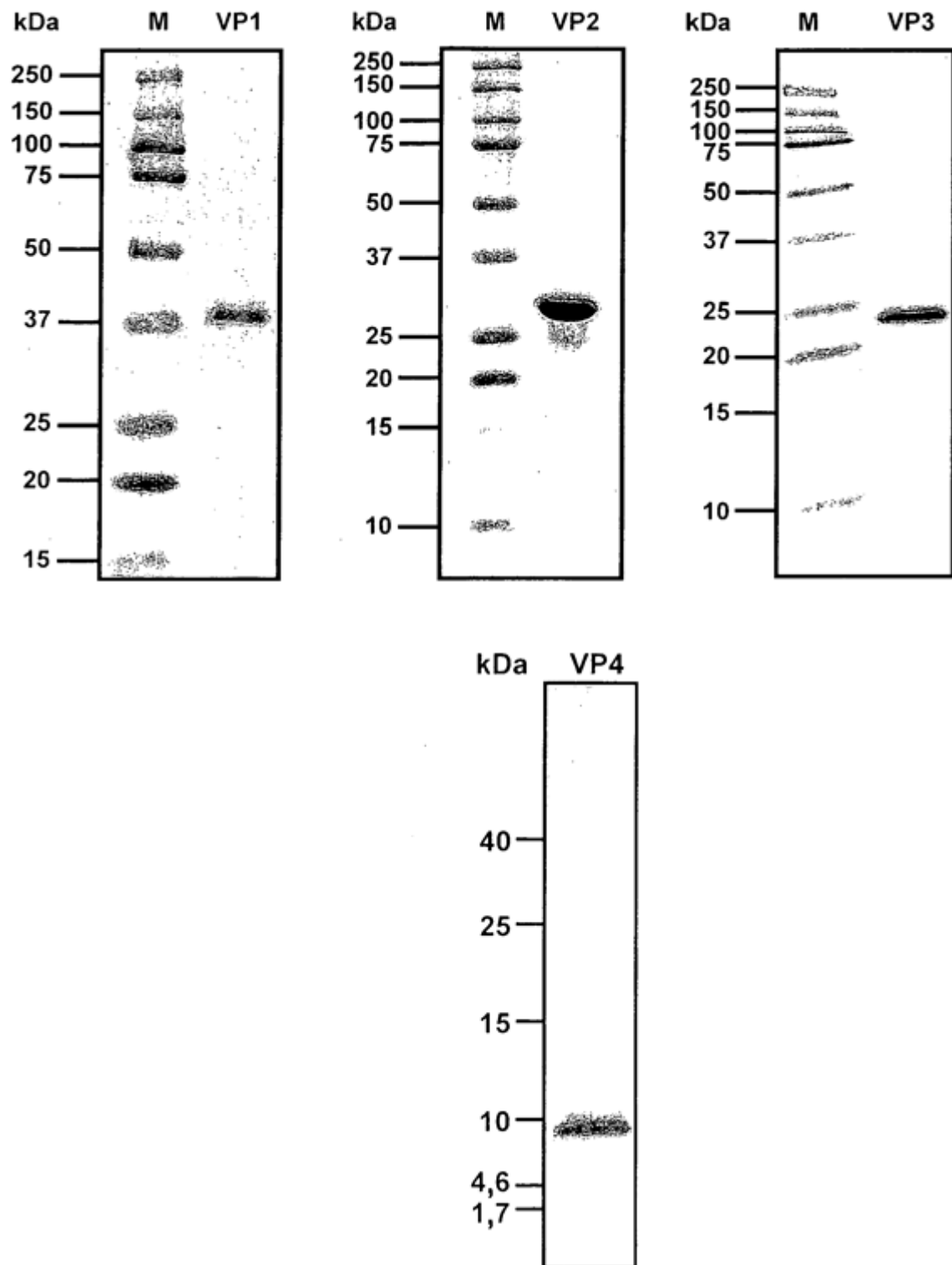
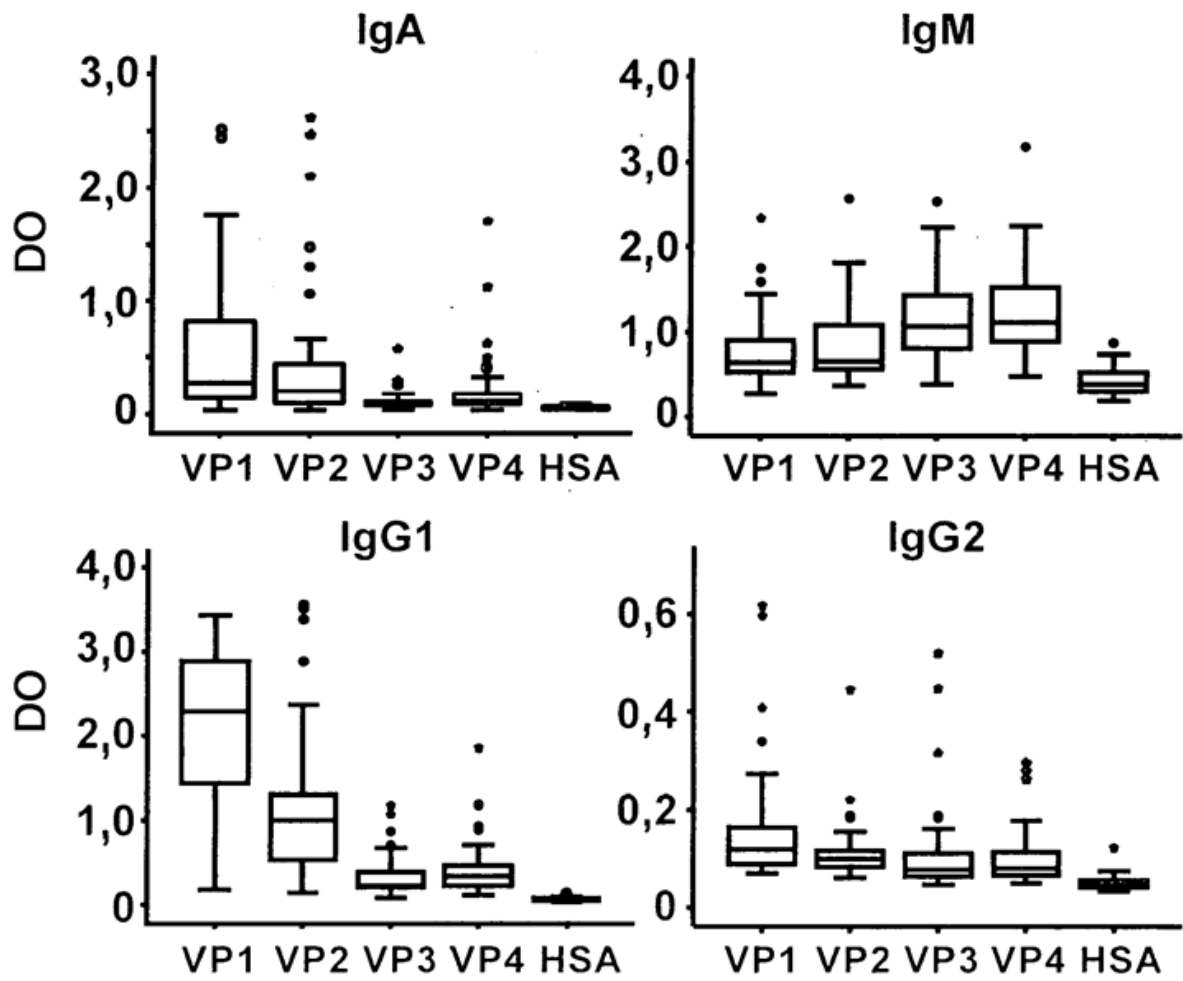


Fig. 13



EPÍTOPO_1

HRV_89	NPVENYIDSVLNEVLVVPNIQPTSSVSSHAAPALDAAETGHTSSVQPEDMIETRYVITDQTRDETSIESPLGRSGCIAMIEFNTSSD-KTEHDKIGKGFK	99
HRV_37	GLGDELEEV..EKTRQTLASIS.GPKH.QSV.T.T.N...A.MPTN.S.N...TTYMHFNGS..D.....AA..H.T.IENKNSTG.VNH.SD.L.N	100
HRV_18E.....NE.HA..NS.....N.....Q.S.....M..C.....H.SKLVVHYE-DYNAETR--N.V	97
HRV_54	...R...E.....RE.HPA..NS.....G.....T.....Q.S.....M.....A..HESTITIQN--DV.Y.DH--H..	97
HRV_1AE.....KE.HHT..NS..L.....N.....A.....S.....M.....H.SRIKVDYT-DYNGQD.--N.T	97
HRV_29E.....RE.HPS..NS..I.....N.....T.....Q.SH.....M.....H.STIKAN-----AHDA--K.D	93
HRV_44E.....RE.HPSI.NS..I.....N.....T.....Q.S.....M.....H.STIK.N-----AHNT--K.D	93
HRV_3	GLSDELEEV..EKTRQTLASVS.GPKH.QSV..T.N...A.LPTR.S.N...TTYMHFNGS..D.....AA..H.T.IKNNAAGLDNH.KEGL.N	100
HRV_14	GLGDELEEV..EKTRQTLASIS.GPKH.QKV.I.T.N...A.MP.L.S.S...TTYMHFNGS..D.C....AA..H.T.IQNKDATGIDNH.EA.L.N	100
HRV_72	GLNDELEEV..EKTRQTLASIS.GPKY.QSV.T.T.N...A.MPTL.S.N...TTYMHFNGS..D.C....AA..H.T.IENKNPENGISNH.AE.L.N	100

EPÍTOPO_2

HRV_89	TWKVSLQEMAQIRRKVELFTYTRFDSEITIVTAAAA--QGNDSGHIVLQFMVPPGAPVPEKRDDYTQSGTNASVFWQEGQPPRFTIPFMSIASAYMYFY	199
HRV_37	D...N.SS.V...L...V...Y...AT.SQPSKS.YASN...A...N.KEW...A.P...KV.DTA...G...NC..	201
HRV_18	K.Q.N...V...PSV.--K..I...RT...A...H..T.....	197
HRV_54	K.D...F...V...PCI.G--K.V.I...K...S.P...H..A.....	196
HRV_1A	K...V...PCI.G--R..I...S...M...H.....	197
HRV_29	K.N.N...V...PCI.G--R..I...ND..H.A...H.....	193
HRV_44	K.N.N...V...PCI.G--R..I...DD.IH.A...N...H.....	193
HRV_3	D...N.SS.V...L...V...Y...AT.SQPEASSY.SM.T.A...N.KEW...A.P...KV.TS...G...NC..	201
HRV_14	D...N.SS.V...L...V...Y...AT.SQPSDA.Y.SN...A...N.KEW...A.P...KV.DTS...G...NC..	201
HRV_72	D...SS.V...L...V...Y...AT.SQPDTA.Y.SN...A...N.VEW...A.P...KV.DTS...G...NC..	201

EPÍTOPO_3

HRV_89	DGYDGLSAASKYGSVVNTDMGTICVRIVTSNQKHDNLNIVCRIYHRAKHAKWCPRPPRAVAYQHTSTNYIPSNGEATTQIKTRP-DVFTVTNV	292
HRV_37	..SH.DEN.P..IT.L.H...AF...NEHDA.TTL.KI...E..I..A...P..AIGK...KM--I.PV..K.D...T.Y---	288
HRV_18	...QTS...A...S...DKH.NE.E.TT...E.T...V...K.KE.REK.A.VP.A-R.TMA---	287
HRV_54	...APG...S...H...S...DK...P.E.TT...A...P.T.R...RE.DP.IF..H.T...V.A---	286
HRV_1A	...NTS...S...EK...S.V.TTH...T...P.T...V...ET.DV..A.VR.N-T.T.A---	287
HRV_29	...GDHTAT...T.V.R...GK.A...Q.TTS...V.P.KYVGL...TLKE--ED.V.E...S.M.A---	281
HRV_44	...GDHTAT...T.V.R...GK.A...Q.TTS...V.P.KYVGL...TLKE--TD.V.EP.H-S.M.A---	281
HRV_3	..SH.DPD.P..IT.L.H...AF...NEHDV.TTL.KI...E..I..A...P..VSIGR...R--SK.I..K.T...K.Y---	288
HRV_14	..SH.D.E.Q..IT.L.H...AF...NEHDE.KTL.KI...E..I..A...P..TSIGR...K--TEPV..K.KG..K.Y---	289
HRV_72	..SH.D.E.Q..IS.L.H...AF...NEHDT.RTL.KI...E..V..A...P..TSIGR...K--PKPV..K.EG..K.Y---	289

- Género A de grupo principal
- Género A de tipo K (grupo principal)
- Género B de grupo principal
- Género A del grupo minoritario

Fig. 14A

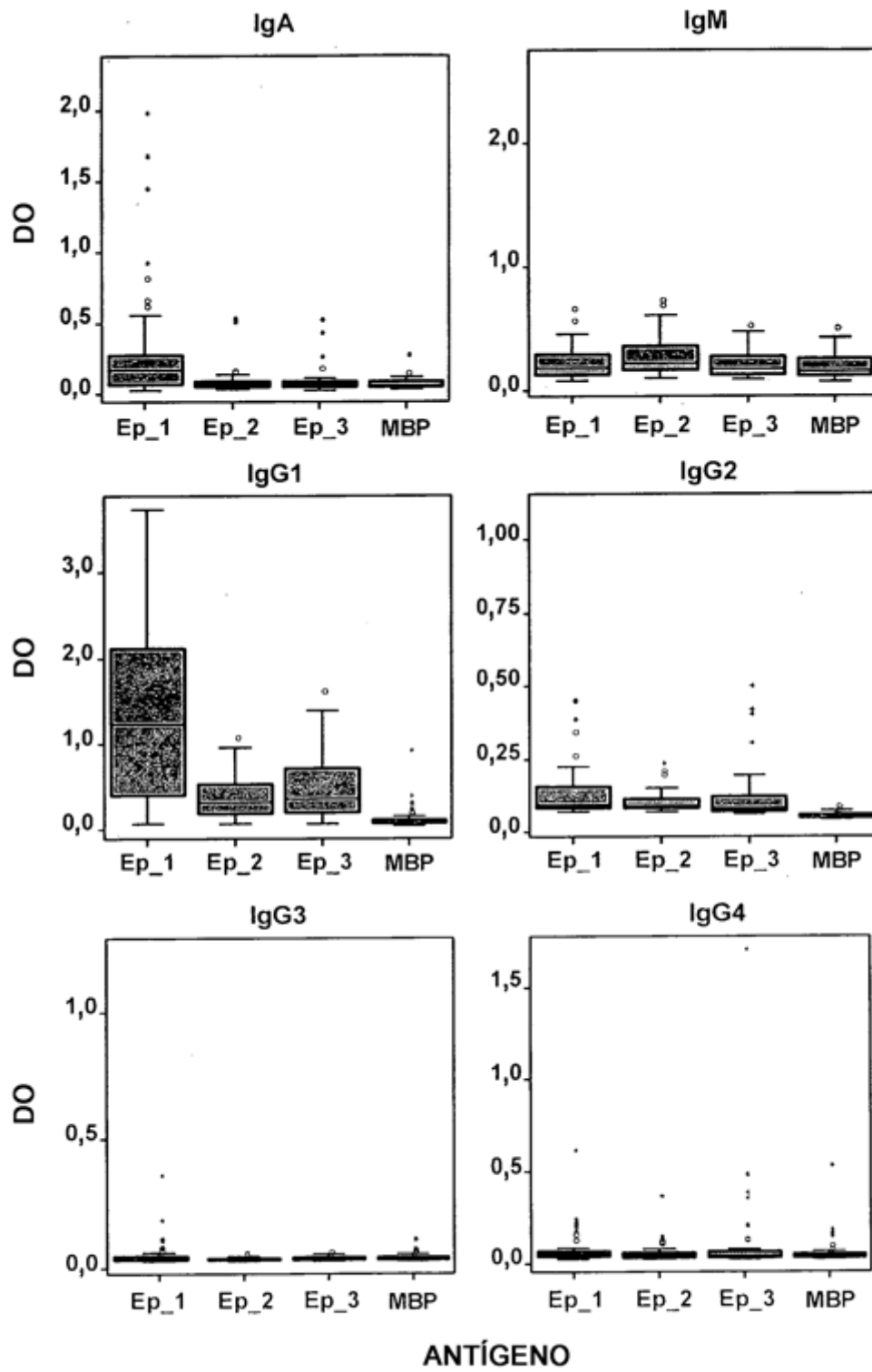


Fig. 14B

Fig. 15

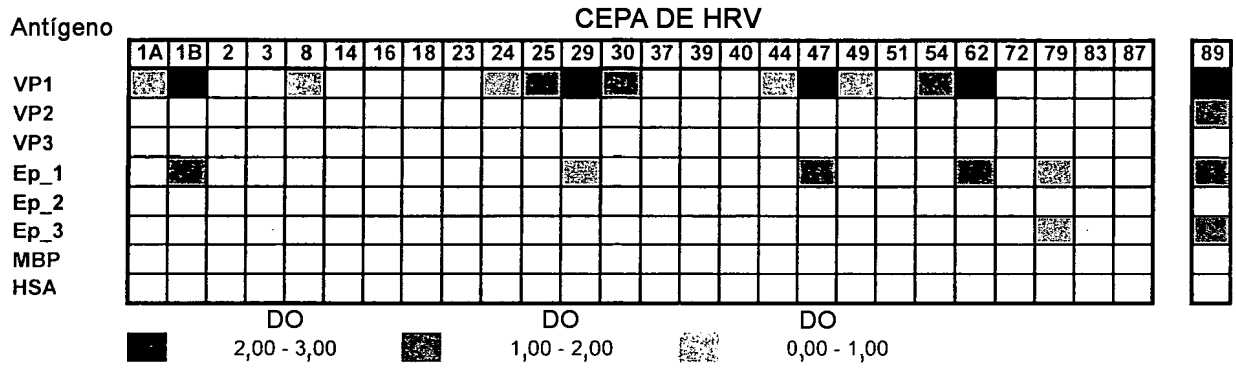


Fig. 16

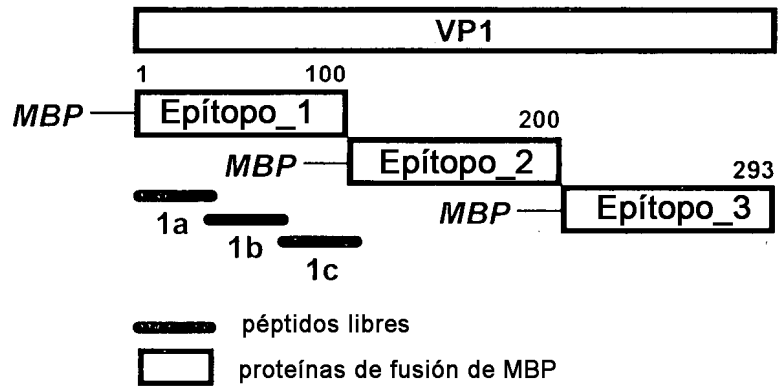


Fig. 17

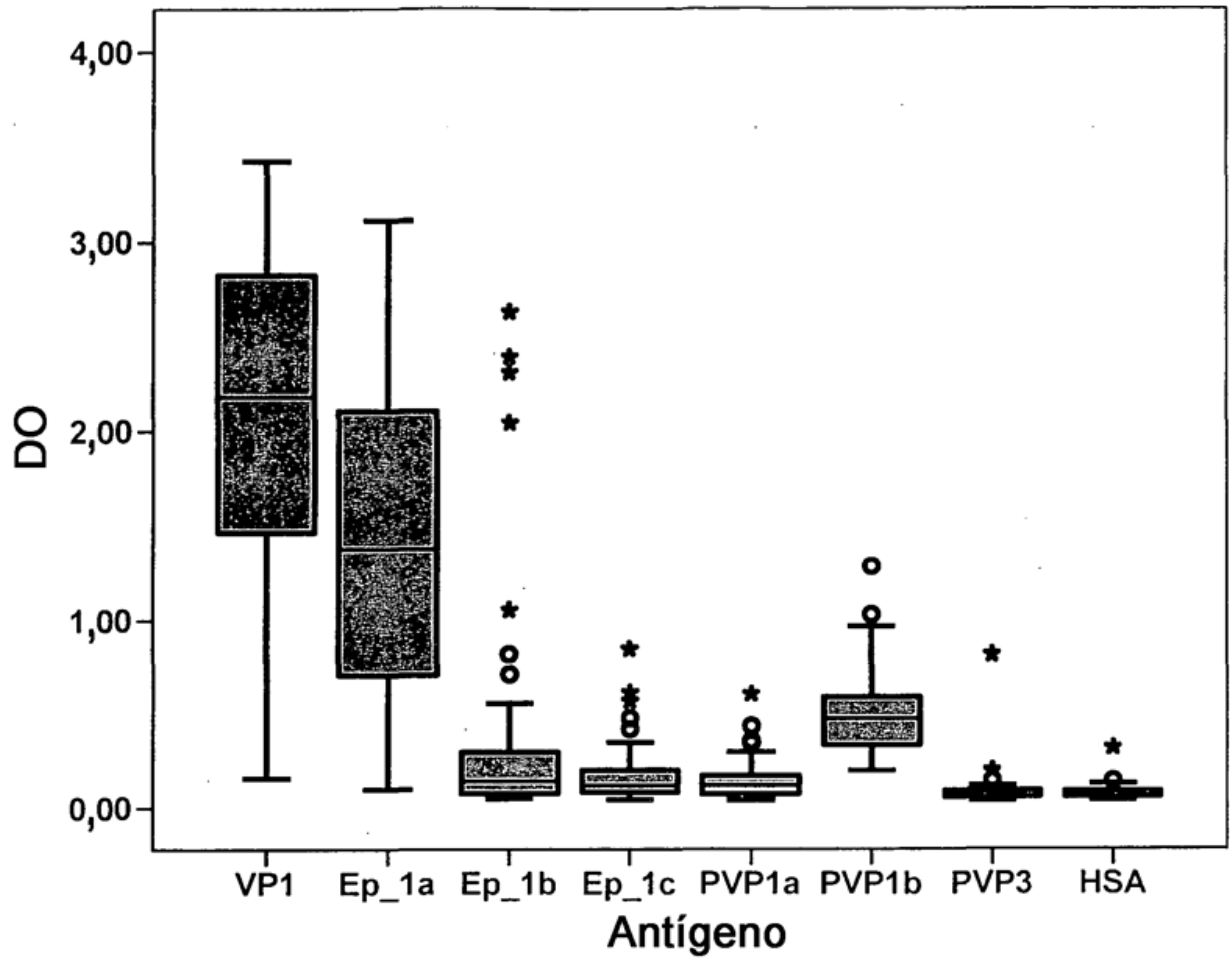


Fig. 18

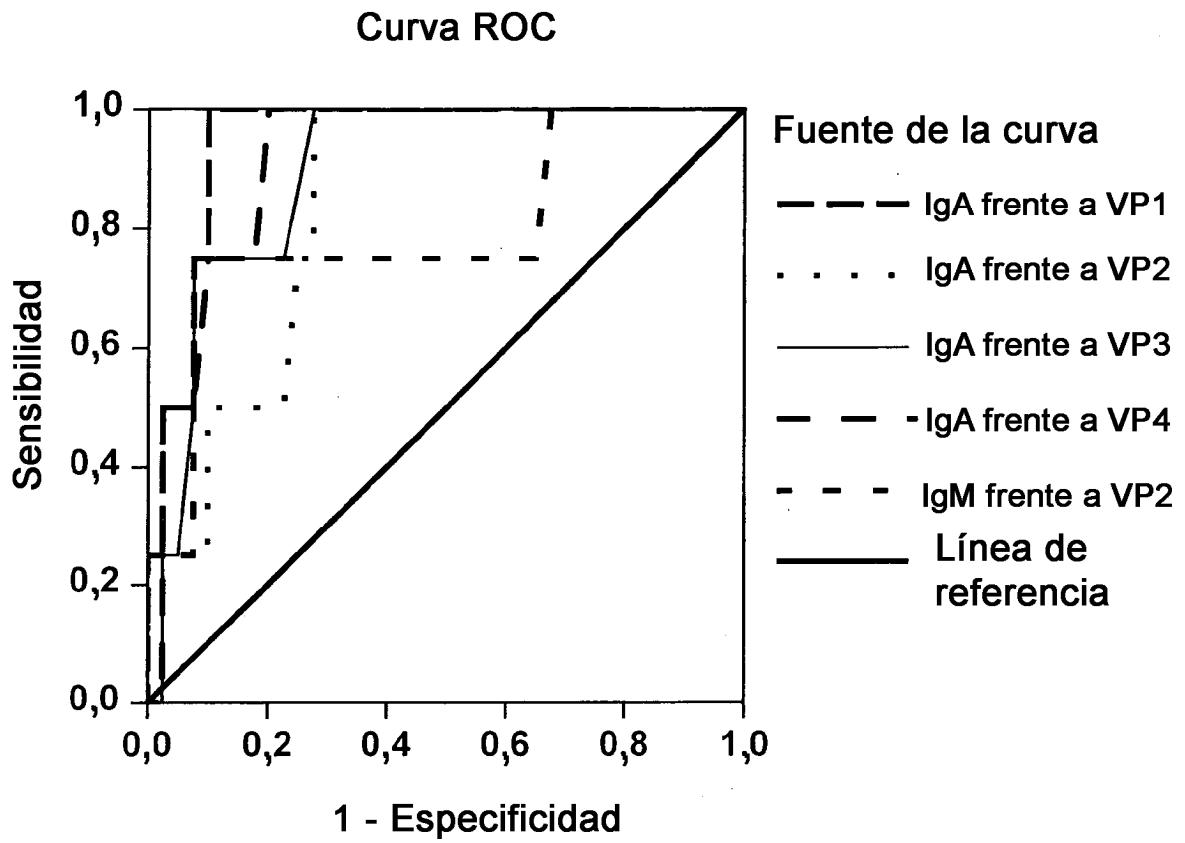


Fig. 19A

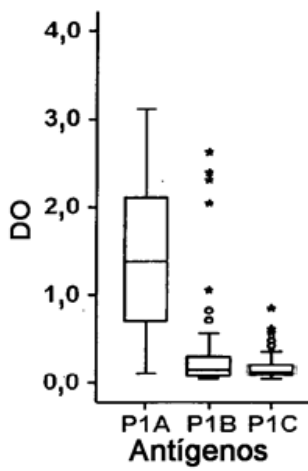
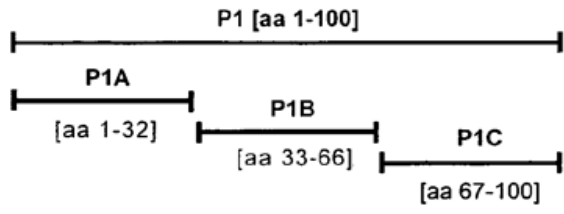


Fig. 19B

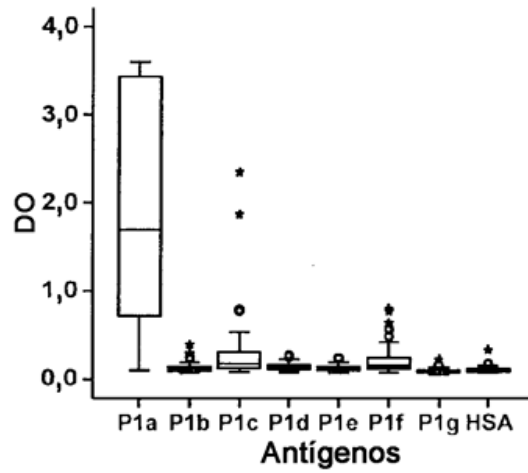
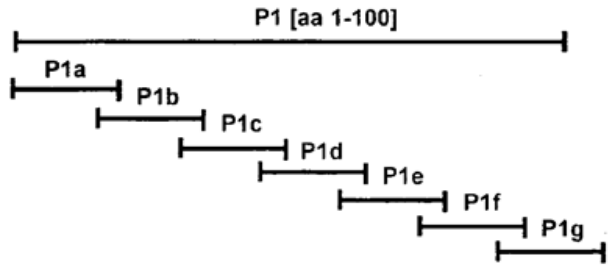


Fig. 20A

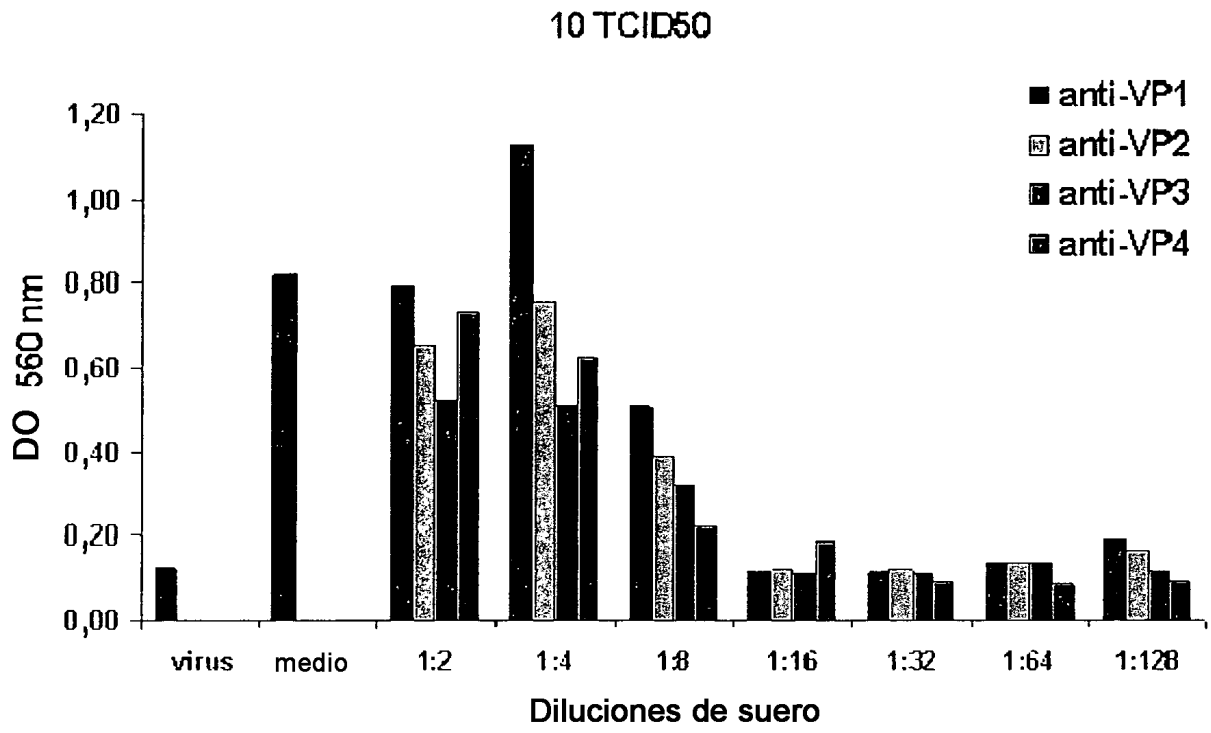


Fig. 20B

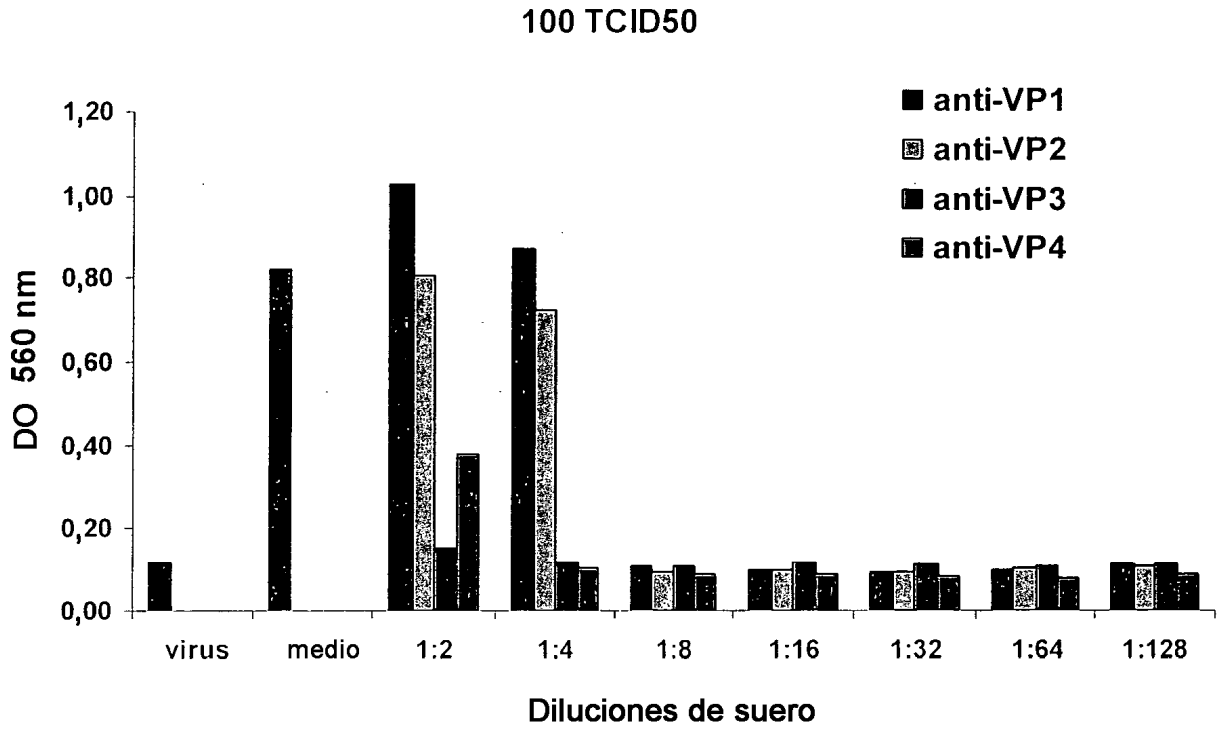


Fig. 20C

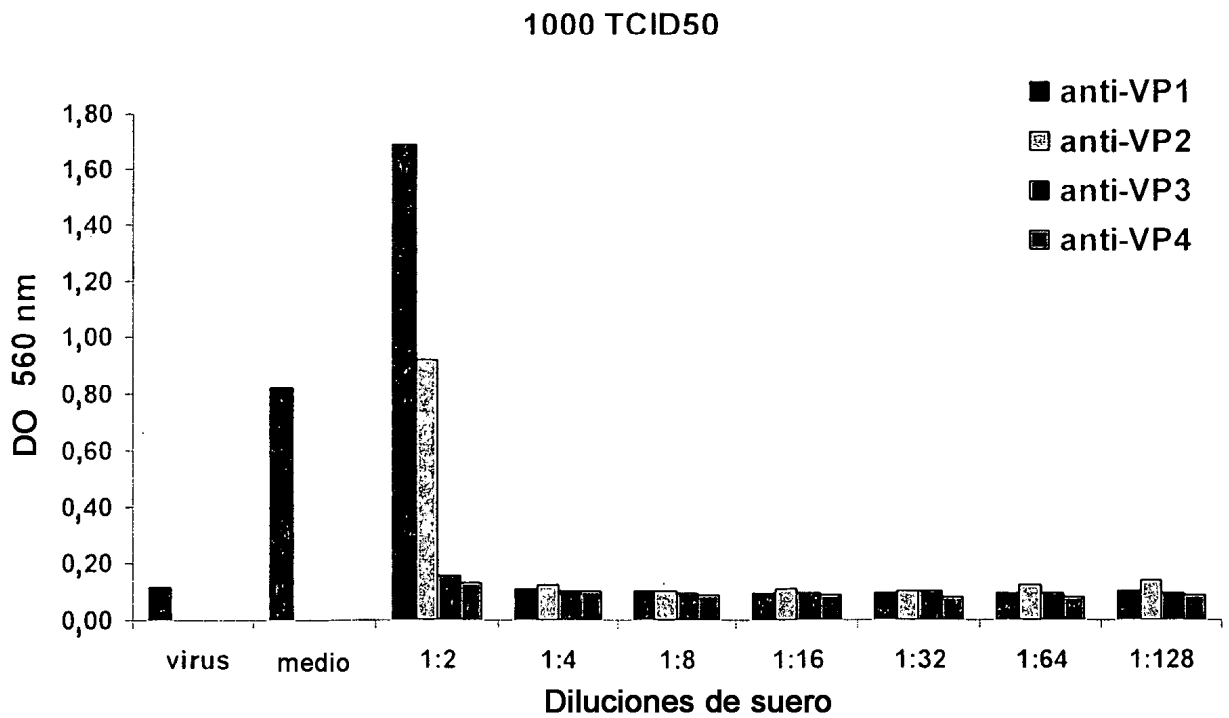


Fig. 21

