

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 238**

51 Int. Cl.:

A61K 39/125 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2015 PCT/EP2015/071288**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2016 WO16042059**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2015 E 15763360 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3193922**

54 Título: **Vacuna**

30 Prioridad:

18.09.2014 US 201462052145 P

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

16.04.2020

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**CASTADO, CINDY;
LABBE, STEVE y
RHEAULT, PATRICK**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 754 238 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

Vacuna

Antecedentes

5 La presente divulgación se refiere al campo de las vacunas humanas. Más particularmente, la presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas e inmunogénicas, para la prevención o tratamiento de infecciones o enfermedades en seres humanos, en particular la infección o enfermedad por rinovirus humano (HRV).

10 Los rinovirus son virus sin envoltura y están compuestos de una cápside formada por cuatro proteínas virales VP1, VP2, VP3 y VP4. VP1, VP2 y VP3 forman la mayor parte de la cápside proteica. La proteína VP4, mucho más pequeña, de aproximadamente 70 aminoácidos de longitud tiene una estructura más extendida y se sitúa en la interfaz entre la cápside y el genoma de ARN. La cápside está compuesta de 60 copias de cada una de esas proteínas ensambladas como un icosaedro.

15 El genoma de rinovirus consiste en un ARN lineal, de una sola cadena, de sentido positivo de entre 7,2 y 8,5 kb de longitud. En la región 5' del genoma se codifican las proteínas estructurales (empezando por el extremo 5': VP4, VP2, VP3 y VP1) y las no estructurales en el extremo 3', como es el caso de todos los picornavirus. El ARN se traduce en una única poliproteína que se escinde cotraduccionalmente y postraduccionalmente en las cuatro proteínas estructurales y las siete proteínas no estructurales. Los genes no estructurales están implicados en el procesamiento del genoma viral, en la replicación viral y en la detención de la producción de proteínas de la célula hospedadora.

20 Actualmente, hay alrededor de 100 serotipos de HRV. Basándose en la identidad nucleotídica y la susceptibilidad de compuestos antivirales, se ha clasificado a los HRV en los clados A, B, C y posiblemente D (Rollinger y Schmidtke, 2011; Palmenberg, Rathe y Liggett, 2010), véase la Tabla mostrada a continuación.

Clados	Tipo de receptor	Número de serotipos	Ejemplos de serotipos	Comentarios
HRV-A	<i>Principal</i>	62	16	
HRV-A	<i>Secundario</i>	12	1A, 1B, 2, 23, 25, 29, 30, 31, 44, 47, 49, 62	
HRV-B	<i>Principal</i>	25	3, 14	
HRV-C	?	7		Clado nuevo, emergente
HRV87	?	1		Mismo virus que el Enterovirus 68 humano, de la especie HEV-D (Blomqvist y col., 2002)
(HRV-D)	<i>Principal</i>	3	8, 45, 95	Clado potencialmente separado (distinto de otros clados basados en VP3 y proteínas no estructurales que no sean VP1 y VP4)

25 Además, la especificidad del receptor de la célula hospedadora se ha utilizado para clasificar adicionalmente estos virus en los grupos principal y secundario. Los serotipos que utilizan el receptor de molécula (ICAM-1) de adhesión intercelular 1 (62 serotipos HRV-A y todos los serotipos B) pertenecen al grupo de receptores principal y los 12 serotipos HRV-A restantes utilizan miembros de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y pertenecen al grupo de receptores secundario. Por tanto, se utilizan los términos "HRV-A principal", "HRV-A secundario" y "HRV-B principal".

30 Los serotipos se clasifican adicionalmente por los sitios antigénicos que utilizan para eludir el sistema inmunitario del hospedador. Para el grupo de receptores principal se han mapeado cuatro sitios inmunogénicos neutralizantes (NIm) principales en regiones que sobresalen en las proteínas de cápside externa VP1, VP2 y VP3. Estos se conocen como NIm-IA, NIm-IB, NIm-II y NIm-III. Para los serotipos de receptores del grupo secundario hay tres sitios antigénicos diferentes A, B y C que están localizados en el mismo entorno que los sitios NIm (revisado en Lewis-Rogers y col. 2009 Mol Biol Evol 26:969).

35 Los rinovirus son la causa principal de infecciones agudas del tracto respiratorio superior en seres humanos, conocidas como el resfriado común. Son también la causa viral más común de exacerbación severa de enfermedades respiratorias crónicas tales como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC, en inglés COPD).

Proporcionar una vacuna contra HRV es un reto particular debido al gran número de serotipos del virus y a la falta de una respuesta protectora generada en individuos infectados con un serotipo contra la infección con otro serotipo.

Hasta ahora no se ha desarrollado ninguna vacuna. Una vacuna de rinovirus, que necesitaría ser capaz de proteger contra múltiples serotipos, por tanto, representa una gran necesidad no cubierta de la medicina.

40 Un enfoque objeto de evaluación es el suministro de péptidos que estén conservados entre los serotipos HRV. Se ha demostrado que anticuerpos inducidos con proteínas VP1 recombinantes de HRV-14 o HRV-89 o un péptido que abarca los aminoácidos 147-162 de VP1 de HRV14 muestran actividad neutralizante específica y cruzada (McCray y Werner, 1998 Nature 329:736; Edlmayr y col., 2011 Eur. Respir 37:44). Se encontró que anticuerpos producidos contra

los 30 aminoácidos N-terminales de VP4 neutralizan HRV14, HRV16 y HRV29. Además, los anticuerpos producidos para una secuencia consenso de los primeros 24 restos de VP4 de rinovirus también tuvieron alguna actividad neutralizante cruzada (Katpally y col., 2009 J. Virol 83:7040).

5 El documento WO 2006/078648 se refiere a vacunas peptídicas contra HRV derivadas de las regiones expuestas transitoriamente de VP4 en aminoácidos particulares 1-31 o 1-24 de VP4; el documento WO 2011/050384 se refiere a péptidos del extremo N terminal de VP1 que incluye los aminoácidos 1-8; el documento WO 2008/057158 se refiere al NIm IV de rinovirus, en concreto a un péptido que comprende los aminoácidos 277-283 o 275-285 de la región carboxilo terminal de VP1, en particular de HRV-14.

10 Las partículas similares a virus (VLP) son un vehículo atractivo para la presentación de antígenos, dado que proporcionan antígenos en un entorno estructural similar al entorno estructural en el virus, aunque no son infecciosos. Sin embargo, las estrategias para producir VLP o subVLP (protómeros, pentámeros u otros) que han funcionado para otros picornavirus, tales como enterovirus (Chung y col. 2010 Vaccine 28, 6951) y FMDV (Porta y col. 2013 J Virol Methods 187:406), han fracasado para los rinovirus humanos.

Sumario breve

15 Empleando un procedimiento novedoso, en el que se expresaron proteínas de cápside como proteínas de fusión con secuencias SUMO, los inventores han sido ahora capaces de generar VLP rinovirales.

Por consiguiente en un primer aspecto, la invención se refiere a una partícula similar a virus (VLP), que comprende las proteínas de cápside de rinovirus humano VP0, VP1 y VP3 o que comprende las proteínas de cápside de rinovirus humano VP1, VP2, VP3 y VP4.

20 En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende una VLP de acuerdo con la invención y un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a la VLP o a la composición inmunogénica de acuerdo con la invención para su uso en un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria contra rinovirus en un ser humano.

25 La presente divulgación también se refiere al uso de una composición inmunogénica como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de infecciones rinovirales, tal como la prevención o tratamiento del resfriado común.

30 La presente divulgación también se refiere a un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta inmunitaria que implica anticuerpos neutralizantes y/o una respuesta celular, contra rinovirus en seres humanos, que comprende administrar una composición inmunogénica a un ser humano como se describe en el presente documento.

La presente divulgación también se refiere a un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta inmunitaria que implica anticuerpos de neutralización cruzada y/o una respuesta celular, contra rinovirus en seres humanos, que comprende administrar una composición inmunogénica a un ser humano como se describe en el presente documento.

35 La presente divulgación también se refiere a un procedimiento para prevenir infecciones de rinovirus o enfermedades relacionadas con rinovirus, comprendiendo dicho procedimiento administrar una composición inmunogénica a un ser humano como se describe en el presente documento.

40 La presente divulgación también se refiere al empleo de una composición inmunogénica como se describe en el presente documento, en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de EPOC (en inglés, COPD) o exacerbaciones de asma.

En una realización, la invención se refiere a la VLP o a la composición inmunogénica de la invención en la que la VLP se produce por un procedimiento para producir VLP rinovirales que comprende las etapas de:

- a. producir constructos que codifican proteínas de cápside necesarias para la formación de una VLP, en la que cada una de las proteínas de cápside está codificada como una proteína de fusión con una proteína chaperona, tal como SUMO,
- b. coexpresar dichos constructos en la misma célula hospedadora o expresar uno o más de dichos constructos en células hospedadoras separadas y
- c. lisar dichas células hospedadoras y reunir, en caso de expresión separada, todas las proteínas de cápside necesarias para un VLP.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Transferencia de Western anti-His que muestra la expresión y solubilidad de His-SUMO-VP transfectados individualmente y cotransfectados.

Figura 2: MET (en inglés, TEM) después de tinción negativa de muestras de VLP-VP-SUMO.

Figura 3: LDS-PAGE con tinción de Coomassie que muestra el cambio de peso molecular después del tratamiento con SUMO proteasa de proteínas de fusión SUMO-VP semipurificadas.

5 Figura 4: Transferencia de Western (anticuerpo anti-VPI) que muestra el cambio de peso molecular antes (A) y después (B) del tratamiento con SUMO proteasa de la proteína de fusión His-SUMO-VP1.

Descripción detallada

Definiciones

10 La expresión "partícula similar a virus" (VLP) se refiere a una cápside viral que se parece a la estructura proteica externa de un virus natural pero no es infecciosa porque no contiene material genético viral. Típicamente, el tamaño de la VLP es similar al del virus y/o de su estructura icosaédrica, compuesta de subunidades proteicas idénticas repetidas conocidas como capsómeros.

15 Las referencias a posiciones de aminoácidos, cuando se utilizan en el presente documento, se refieren a posiciones en proteínas de cápside de HRV14 (expuestas en las SEQ ID NO: 14 a 18), o a posiciones equivalentes estructuralmente en proteínas de cápside de otros serotipos de HRV. Tales posiciones estructuralmente equivalentes son posiciones que se alinean con una posición dada en el alineamiento más óptimo entre la otra secuencia de proteína de la cápside del serotipo y aquella de la secuencia del HRV14. Por ejemplo, la posición 33 en un serotipo dado puede ser estructuralmente equivalente a la posición 32 en HRV14 si estas posiciones se alinean en el alineamiento más óptimo de las dos secuencias de proteínas.

20 Los términos "modificar" o "modificación", cuando se utilizan en el presente documento en relación con una proteína de la cápside, indican una modificación de la proteína en comparación con la secuencia de la proteína que se encuentra en la naturaleza. Una modificación es preferentemente una delección, sustitución o inserción de un aminoácido, es decir delección, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos. Sin embargo, la modificación puede ser, como alternativa, una modificación post-traduccional, tal como una modificación que enmascara una región de la proteína. Se entenderá, que en el contexto de esta divulgación, hay numerosos serotipos de HRV (y proteínas de HRV) que son naturales, por ejemplo, obtenidos de diferentes serotipos de HRV naturales.

25 Las "proteínas de cápside" de un rinovirus incluyen VP0, VP1, VP2, VP3 y VP4.

30 La expresión "rinovirus humano", abreviada como HRV, se refiere a cualquier serotipo de rinovirus de la familia *Picornaviridae* que es capaz de infectar seres humanos y se ha identificado o aún tiene que identificarse como un rinovirus. Hay varias maneras diferentes de agrupar los HRV como se describe en el presente documento y cada agrupación contiene múltiples "serotipos" o "cepas" de virus (por ejemplo, HRV-14, HRV-8, HRV-25, etc.) categorizados por similitudes genéticas.

35 Una "variante", cuando se refiere a un ácido nucleico o a una proteína (por ejemplo, un ácido nucleico o polipéptido VP1 o VP4), es un ácido nucleico o una proteína que difiere de un ácido nucleico o proteína de referencia. Normalmente, la(s) diferencia(s) entre la variante y el ácido nucleico o polipéptido de referencia constituye un número proporcionalmente pequeño de diferencias en comparación con el referente. Una variante de proteína puede diferir de la proteína de referencia a la que se la compara por la adición, delección o sustitución de uno o más aminoácidos o por la sustitución de un análogo de aminoácido.

40 Como se utiliza en el presente documento, que una primera secuencia de aminoácidos tenga "identidad de x %" respecto a una segunda secuencia de aminoácidos significa que x % representa el número de aminoácidos en la primera secuencia que son idénticos a sus aminoácidos emparejados de la segunda secuencia cuando ambas secuencias están alineadas óptimamente, con respecto a la longitud total de la segunda secuencia de aminoácidos. Ambas secuencias están óptimamente alineadas cuando x es un valor máximo. El alineamiento y la determinación del porcentaje de identidad puede llevarse a cabo manualmente o automáticamente empleando BLAST.

45 El término "epítipo" hace referencia a un sitio en un antígeno ante el que responden linfocitos B y/o T. Los "epítipos inmunodominantes" son aquellos epítipos para los que se fabrica principalmente una respuesta inmunitaria del hospedador funcionalmente considerable, por ejemplo, una respuesta de anticuerpo o una respuesta de linfocitos T.

50 Una "composición inmunogénica" es una composición de materia adecuada para la administración a un sujeto humano o animal (por ejemplo, en un escenario experimental) que es capaz de provocar o inducir una respuesta inmunitaria específica, por ejemplo, contra un patógeno, tal como un rinovirus. Como tal, una composición inmunogénica incluye uno o más antígenos, por ejemplo las VLP como se describe en el presente documento. Una composición inmunogénica puede también incluir uno o más componentes adicionales, tales como un excipiente, un vehículo y/o un adyuvante. En ciertos casos, las composiciones inmunogénicas se administran para provocar o inducir una respuesta inmunitaria que protege el sujeto contra síntomas o afecciones inducidas por un patógeno. En el contexto de esta divulgación, se entenderá que la expresión composición inmunogénica incluye composiciones que están dirigidas a la administración a un sujeto o población de sujetos con el fin de provocar o inducir una respuesta

55

inmunitaria protectora o paliativa contra, por ejemplo, HRV (esto es, composiciones vacunales o vacunas).

Una "respuesta inmunitaria" es una respuesta de una célula del sistema inmunitario, tal como un linfocito B, un linfocito T o un monocito, frente a un estímulo. Una respuesta inmunitaria puede ser una respuesta de linfocitos B, que tiene como resultado la producción de anticuerpos específicos, tales como anticuerpos neutralizantes específicos de antígenos. Una respuesta inmunitaria puede ser también una respuesta de linfocitos T, tal como una respuesta de CD4+ o una respuesta de CD8+. Una respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria de reacción cruzada cuando es provocada por un antígeno de un serotipo y reacciona no solo con virus de ese serotipo, sino también con virus de un serotipo diferente.

La "Atenuación" de un epítipo, cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a la modificación de un epítipo que hace que el epítipo sea menos inmunogénico.

Aspectos y realizaciones de la invención

Como se describió anteriormente, en un primer aspecto, la invención se refiere a una partícula similar a virus (VLP) que comprende las proteínas de cápside de rinovirus humano VP0, VP1 y VP3 o que comprende las proteínas de cápside de rinovirus humano VP1, VP2, VP3 y VP4.

Las proteínas de cápside en la VLP pueden ser de un serotipo o de diferentes serotipos. Por tanto, en una realización, todas las proteínas de cápside tienen su origen en el mismo serotipo. En otra realización, las proteínas de cápside tienen su origen en dos o más serotipos diferentes, tales como dos o más serotipos diferentes seleccionados del grupo que consiste en: HRV 1B, 2, 3, 8, 10, 14, 26, 29, 31, 39, 47, 61, 62, 63, 66, 77, 97 y 100.

Modificaciones proteicas

La VLP de acuerdo con la invención puede comprender solo proteínas de cápside naturales, por ejemplo de un serotipo específico mencionado en el presente documento. Sin embargo, en otra realización, una o más proteínas de cápside se han modificado para hacerlas inmunogénicamente más similares a otros serotipos, incrementando así su potencial para inducir una respuesta inmunitaria que reconocerá rinovirus de otros serotipos.

Por tanto, en una realización, una o más de las proteínas de cápside comprenden al menos una modificación que incrementa la capacidad de la VLP para inducir una respuesta inmunitaria de reacción cruzada contra múltiples serotipos, en comparación con una VLP en la que dicha modificación no está presente. Tal respuesta inmunitaria de reacción cruzada puede implicar anticuerpos de reactividad cruzada y/o respuestas celulares de reactividad cruzada.

En una realización, la modificación consiste en la inserción de un péptido de una proteína de la cápside de un rinovirus, en la que dicho péptido es capaz de inducir una respuesta inmunitaria de reacción cruzada contra dos o más serotipos. Típicamente, los péptidos insertados comprenden secuencias que están conservadas entre múltiples serotipos. El sitio de inserción para el péptido debe ser escogido de manera que no eviten la formación de VLP. La formación de VLP puede ensayarse como se describe en los Ejemplos en el presente documento.

En una realización adicional del presente documento, dicha VLP (es decir, las proteínas de cápside de la VLP) comprende 2, 3, 4 o más inserciones de péptidos de proteínas de cápside rinoviral, opcionalmente de 2 o más proteínas de cápside diferentes, por ejemplo, inserción de un péptido de VP1 e inserción de un péptido de VP4. En una realización adicional, uno, más o todos los mencionados péptidos consisten en menos de 50 aminoácidos de la proteína de la cápside, tal como entre 10 y 30, por ejemplo entre 8 y 18 aminoácidos de la proteína de la cápside. En otra realización adicional, uno de los péptidos está formado por los aminoácidos 32-45 de VP1 o una variante de aminoácidos 32-45 de VP1 que tiene adiciones o deleciones de 1-4 aminoácidos en algún extremo y/o sustituciones o adiciones o deleciones de 1-2 aminoácidos dentro de la secuencia peptídica. En una realización específica, el péptido se selecciona de:

HRV14 (B):	32-PI LTANETGATMPV-45	[SEQ ID NO: 7]
HRV8 (A-M):	32-PALDAAETGHTSSV-45	[SEQ ID NO: 8]
HRV25(A-m):	32-PILDAAETGHTSNV-45	[SEQ ID NO: 9]
HRV_C_026:	32-QALGAVEIGATADV-45	[SEQ ID NO: 10]

o una variante del mismo que tiene adiciones o deleciones de 1-4 aminoácidos en algún extremo y/o sustituciones o adiciones o deleciones de 1-2 aminoácidos dentro de la secuencia peptídica.

En una realización adicional, uno de los péptidos está formado por los aminoácidos 1-16 de VP4 o una variante de aminoácidos 1-16 de VP4 que tiene adiciones o deleciones de 1-4 aminoácidos en algún extremo y/o sustituciones o adiciones o deleciones de 1-2 aminoácidos dentro de la secuencia peptídica. En una realización específica, el péptido se selecciona de:

HRV14 (B):	1-GAQVSTQKSGSHENQN-16	[SEQ ID NO: 11]
HRV100(A-M):	1-GAQVSRQNVGTHSTQN-16	[SEQ ID NO: 12]

HRV_C_026: 1-GAQVSRQSVGSSETMI-16 [SEQ ID NO: 13]

o una variante del mismo que tiene adiciones o deleciones de 1-4 aminoácidos en algún extremo y/o sustituciones o adiciones o deleciones de 1-2 aminoácidos dentro de la secuencia peptídica.

5 En una realización adicional, uno de los péptidos está formado por los aminoácidos 147-162 de VP1 (por ejemplo, VP1 de HRV14) o una variante de los aminoácidos 147-162 de VP1 que tiene adiciones o deleciones de 1-4 aminoácidos en algún extremo y/o sustituciones o adiciones o deleciones de 1-2 aminoácidos dentro de la secuencia peptídica.

En una realización adicional, uno de los péptidos está formado por los aminoácidos 1-30 de VP4 (por ejemplo, VP4 de HRV14) o una variante de los aminoácidos 1-30 de VP4 que tiene adiciones o deleciones de 1-4 aminoácidos en algún extremo y/o sustituciones o adiciones o deleciones de 1-2 aminoácidos dentro de la secuencia peptídica.

10 En una realización adicional, uno de los péptidos está formado por los aminoácidos 1-24 de VP4 (por ejemplo, VP4 de HRV14) o una variante de los aminoácidos 1-24 de VP4 que tiene adiciones o deleciones de 1-4 aminoácidos en algún extremo y/o sustituciones o adiciones o deleciones de 1-2 aminoácidos dentro de la secuencia peptídica.

15 En una realización adicional, uno de los péptidos está formado por los aminoácidos 1-8 de VP1 (por ejemplo, VP1 de HRV14) o una variante de los aminoácidos 1-8 de VP1 que tiene adiciones o deleciones de 1-4 aminoácidos en algún extremo y/o sustituciones o adiciones o deleciones de 1-2 aminoácidos dentro de la secuencia peptídica.

En una realización adicional, uno de los péptidos está formado por los aminoácidos 277-283 de VP1 (por ejemplo, VP1 de HRV14) o una variante de los aminoácidos 277-283 de VP1 que tiene adiciones o deleciones de 1-4 aminoácidos en algún extremo y/o sustituciones o adiciones o deleciones de 1-2 aminoácidos dentro de la secuencia peptídica.

20 En una realización adicional, uno de los péptidos está formado por los aminoácidos 275-285 de VP1 (por ejemplo, VP1 de HRV14) o una variante de los aminoácidos 275-285 de VP1 que tiene adiciones o deleciones de 1-4 aminoácidos en algún extremo y/o sustituciones o adiciones o deleciones de 1-2 aminoácidos dentro de la secuencia peptídica.

25 En realizaciones particulares, las sustituciones de aminoácidos como se mencionan en el presente documento son sustituciones conservativas.

Algunas posiciones en la proteína de la cápside son adecuadas para la inserción de tales péptidos.

En una realización, el péptido se ha insertado en VP0, tal como en VP0 de HRV14, por ejemplo en una o más de las regiones que corresponden a 72-76, 131-175, 133-145, 158-165, 228-238, 231-237 o 255-262 de VP2.

30 En una realización adicional, el péptido se ha insertado en VP1, tal como en VP1 de HRV14, por ejemplo en una o más de las regiones 73-102, 85-92, 129-149, 136-145, 160-168, 204-212, 208-215, 230-236 o 264-289 de VP1.

En una realización adicional, el péptido se ha insertado en VP2, tal como en VP2 de HRV14, por ejemplo, en una o más de las regiones que corresponden a 72-76, 131-175, 133-145, 158-165, 228-238, 231-237 o 255-262 de VP2.

En una realización adicional, el péptido se ha insertado en VP3 tal como en VP3 de HRV14, por ejemplo en una o más de las regiones 54-95, 57-64, 72-77, 193-212, 196-204 o 226-236 de VP3.

35 En una realización adicional, el péptido se ha insertado en VP4 tal como en VP4 de HRV14.

Además, o como alternativa para la inserción de un péptido, la VLP puede comprender al menos una modificación que da como resultado la atenuación de un epítipo inmunodominante. Los epítipos inmunodominantes son a menudo hipervariables y, por tanto, mediante la atenuación de tales epítipos, la respuesta inmunitaria puede llegar a ser más dirigida a otro epítipo de la cápside, más conservado.

40 En una de tales realizaciones, VP0 comprende dicha modificación, por ejemplo, en la que VP0 se ha modificado de manera que el epítipo del sitio N1m-II se ha atenuado y/o en la que uno o más restos en una o más de las regiones correspondientes a 131-175, 228-238 o 255-262 en VP2 se han modificado, por ejemplo en la que un resto correspondiente al resto 158, 159, 161 y/o 162 se ha modificado.

45 En otra de tales realizaciones, VP1 comprende dicha modificación, por ejemplo en la que VP1 se ha modificado de manera que el epítipo del sitio N1m-I se ha atenuado y/o VP1 se ha modificado de manera que el epítipo del sitio N1m-IB se ha atenuado y/o en la que uno o más restos en una o más de las regiones 73-102, 129-149, 204-212 y 264-289 se ha modificado, por ejemplo en la que el resto 91 y/o 95 se ha modificado o en la que el resto 83, 85, 138 y/o 139 se ha modificado.

50 En otra de tales realizaciones, VP2 comprende dicha modificación, por ejemplo en la que VP2 se ha modificado de manera que el epítipo del sitio N1m-II se ha atenuado y/o en la que uno o más restos en una o más de las regiones

correspondientes a 131-175, 228-238 o 255-262 se ha modificado, por ejemplo en la que un resto 158, 159, 161 y/o 162 se ha modificado.

5 En otra de tales realizaciones, VP3 comprende dicha modificación, por ejemplo en la que VP3 se ha modificado de manera que el epítipo del sitio NIm-III se ha atenuado y/o en la que uno o más restos en una o más de las regiones correspondientes a 54-95, 193-212 o 226-236 se ha modificado, por ejemplo en la que un resto correspondiente al resto 72, 75 y/o 78 se ha modificado.

En otra de tales realizaciones, VP4 comprende dicha modificación.

10 Independientemente de si las modificaciones descritas anteriormente implican inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos, las secuencias de las proteínas de cápside permanecerán similares a las secuencias de las proteínas naturales de las que derivan. La VLP puede contener una mezcla de proteínas de cápside modificadas y no modificadas.

En una realización, la proteína VP0 es la proteína VP0 de HRV14 o una variante de la misma, en la que la variante tiene más de un 90% de identidad de secuencia con VP0 de HRV14.

15 En otra realización, la proteína VP0 es la proteína VP0 de HRV14 o una variante de la misma que tiene 1-25, tal como adiciones o deleciones de 1-10 aminoácidos en cualquier extremo y 1-50, tales como 1-25, por ejemplo sustituciones o adiciones o deleciones de 1-15 de aminoácidos dentro de la secuencia.

En otra realización, la proteína VP1 es la proteína VP1 de HRV14 o una variante de la misma, en la que la variante tiene más de un 90% de identidad de secuencia con VP1 de HRV14.

20 En otra realización, la proteína VP1 es la proteína VP1 de HRV14 o una variante de la misma que tiene 1-25, tal como adiciones o deleciones de 1-10 aminoácidos en cualquier extremo y 1-50, tales como 1-25, por ejemplo sustituciones o adiciones o deleciones de 1-15 de aminoácidos dentro de la secuencia.

En otra realización, la proteína VP2 es la proteína VP2 de HRV14 o una variante de la misma, en la que la variante tiene más de un 90% de identidad de secuencia con VP2 de HRV14.

25 En otra realización, la proteína VP2 es la proteína VP2 de HRV14 o una variante de la misma que tiene 1-25, tal como adiciones o deleciones de 1-10 aminoácidos en cualquier extremo y 1-50, tales como 1-25, por ejemplo sustituciones o adiciones o deleciones de 1-15 de aminoácidos dentro de la secuencia.

En otra realización, la proteína VP3 es la proteína VP3 de HRV14 o una variante de la misma, en la que la variante tiene más de un 90% de identidad de secuencia con VP3 de HRV14.

30 En otra realización, la proteína VP3 es la proteína VP3 de HRV14 o una variante de la misma que tiene 1-25, tal como adiciones o deleciones de 1-10 aminoácidos en cualquier extremo y 1-50, tales como 1-25, por ejemplo sustituciones o adiciones o deleciones de 1-15 de aminoácidos dentro de la secuencia.

En otra realización, la proteína VP4 es la proteína VP4 de HRV14 o una variante de la misma, en la que la variante tiene más de un 90% de identidad de secuencia con VP4 de HRV14.

35 En otra realización, la proteína VP4 es la proteína VP4 de HRV14 o una variante de la misma que tiene 1-25, tal como adiciones o deleciones de 1-10 aminoácidos en cualquier extremo y 1-50, tales como 1-25, por ejemplo sustituciones o adiciones o deleciones de 1-15 de aminoácidos dentro de la secuencia.

40 Como se describió anteriormente, En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende una VLP de la invención y un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y pueden seleccionarse por los expertos en la materia. Por ejemplo, el vehículo o excipiente puede incluir favorablemente un tampón. Opcionalmente, el vehículo o excipiente contiene también al menos un componente que estabiliza la solubilidad y/o estabilidad. Entre los ejemplos de agentes solubilizadores/estabilizadores se incluyen detergentes, por ejemplo, lauril sarcosina y/o Tween. Otros agentes solubilizadores/estabilizadores alternativos incluyen arginina y polioles que forman cristales (tales como la sacarosa, trehalosa y similares). En la técnica se conocen y se han descrito numerosos vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª Edición (1975).

45 Por consiguiente, los excipientes y vehículos adecuados pueden seleccionarse por los expertos en la materia para producir una formulación adecuada para suministrar a un sujeto mediante una vía de administración seleccionada. Entre los excipientes adecuados se incluyen, aunque de forma no limitante: glicerol, polietilenglicol (PEG), sorbitol, trehalosa, sal de sodio de N-lauroilsarcosina, L-prolina, sulfobetaína no detergente, hidrocloreto de guanidino, urea, óxido de trimetilamina, KCl, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ y otras sales de cationes divalentes relacionadas, ditioeritol, ditioeritol y β-mercaptoetanol. Otros excipientes pueden ser detergentes (incluidos: Tween80, Tween20, Triton X-00, NP-40, Empigen BB, octilglucósido, lauril maltósido, Zwittergent 3-08, Zwittergent 3-0, Zwittergent 3-2, Zwittergent 3-4, Zwittergent 3-6, CHAPS, desoxicolato de sodio, dodecilsulfato sódico, Bromuro de cetiltrimetilamonio).

En una realización, la composición comprende 2, 3, 4 o más VLP diferentes de la invención como se describe en el presente documento.

5 Un aspecto importante de una vacuna contra rinovirus es que protegerá contra un número suficiente de serotipos de rinovirus para proporcionar protección efectiva contra la infección por rinovirus. Por tanto, una combinación de las realizaciones anteriormente descritas puede proporcionar una composición óptima. Por ejemplo, la composición inmunogénica de la invención puede contener múltiples VLP procedentes de diferentes serotipos y/o VLP que comprenden proteínas de cápside procedentes de diferentes serotipos y/o proteínas de cápside modificadas en las que se han insertado uno o más péptidos conservados y/o proteínas de cápside modificadas en las que uno o más epítopos inmunodominantes se han atenuado.

10 En otra realización, la composición inmunogénica comprende además un adyuvante, tal como el adyuvante Th1. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen suspensiones de minerales (alumbre, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio) en las que se adsorbe el antígeno; emulsiones, incluyendo agua en aceite y aceite en agua (y variantes de las mismas, incluyendo emulsiones dobles y emulsiones reversibles), liposacáridos, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos inmunoestimuladores (tales como oligonucleótidos CpG), liposomas, agonistas de receptores tipo Toll (particularmente
15 agonistas de TLR2, TLR4, TLR7/8 y TLR9) y varias combinaciones de tales componentes.

En una realización preferida, el adyuvante es una sal de aluminio, tal como el hidróxido de aluminio. En otra realización preferida, el adyuvante comprende un agonista de TLR4, tal como el monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MPL) y/o una saponina, tal como la QS21 (documento WO 96/33739), preferentemente en una formulación liposomal.

20 En otra realización, la composición inmunogénica comprende antígenos adicionales derivados de patógenos distintos del HRV, tales como *Moraxella catarrhalis* (MCat) o *Haemophilus influenzae* no-tipable (NTHI). Se contempla particularmente la inclusión de antígenos dirigida a MCat y NTHI en la prevención o tratamiento de EPOC (en inglés, COPD).

25 En un aspecto, la invención se refiere a la VLP o a la composición inmunogénica como se describe en el presente documento para su uso en la prevención o tratamiento en seres humanos de una infección rinoviral, tal como la prevención o tratamiento del resfriado común.

En otro aspecto, la invención se refiere a la VLP o a la composición inmunogénica como se describe en el presente documento para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria que implica anticuerpos neutralizantes y/o una respuesta celular, contra rinovirus en seres humanos. En una realización, los anticuerpos neutralizantes son anticuerpos de neutralización cruzada.

30 La presente divulgación también se refiere al uso de una VLP o una composición inmunogénica como se describe en el presente documento, en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento en seres humanos de infecciones rinovirales, tal como la prevención o tratamiento del resfriado común.

35 La presente divulgación también se refiere al uso de una VLP o una composición inmunogénica como se describe en el presente documento, en la fabricación de un medicamento que induce una respuesta inmunitaria que implica anticuerpos neutralizantes y/o una respuesta celular, contra rinovirus en seres humanos. En una realización, los anticuerpos neutralizantes son anticuerpos de neutralización cruzada.

40 La presente divulgación también se refiere a un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta inmunitaria que implica anticuerpos neutralizantes y/o una respuesta celular, contra rinovirus en seres humanos, que comprende la administración a un ser humano de un VLP o una composición inmunogénica como se describe en el presente documento.

La presente divulgación también se refiere a un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta inmunitaria que implica anticuerpos de neutralización cruzada y/o una respuesta celular, contra rinovirus en seres humanos, que comprende la administración a un ser humano de un VLP o una composición inmunogénica como se describe en el presente documento.

45 La presente divulgación también se refiere a un procedimiento para prevenir infecciones de rinovirus o enfermedades relacionadas con rinovirus, tales como el resfriado común, EPOC (en inglés, COPD) o exacerbaciones de asma, dicho procedimiento comprende la administración a un ser humano de una VLP o una composición inmunogénica como se describe en el presente documento.

50 En otro aspecto, la invención se refiere a la VLP o a la composición inmunogénica como se describe en el presente documento para su uso en la prevención o tratamiento en seres humanos de EPOC (en inglés, COPD) o exacerbaciones de asma.

La presente divulgación también se refiere al uso de una VLP o una composición inmunogénica como se describe en el presente documento, en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de EPOC (en inglés, COPD) o exacerbaciones de asma en seres humanos.

Las composiciones inmunogénicas pueden ser para provocar una respuesta inmunitaria contra HRV en bebés humanos (es decir, bebés entre el nacimiento y 1 año, tal como entre 0 y 6 meses, a la edad de la dosis inicial). O en otra realización, las composiciones inmunogénicas pueden ser para provocar una respuesta inmunitaria contra HRV en humanos ancianos. O la composición inmunogénica puede ser para la administración a adultos o niños. Se apreciará que la elección de adyuvante puede ser distinta en estas aplicaciones diferentes y el adyuvante óptimo y la concentración para cada situación puede determinarse empíricamente por los expertos en la materia.

Las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento pueden administrarse como vacunas por cualquiera de una diversidad de rutas. Se prefieren las administraciones intramusculares, sublinguales e intradérmicas.

La dosis de las VLP puede variar con la condición, sexo, edad y peso del individuo y la vía de administración de la vacuna. La cantidad puede también variar con el número de diferentes VLP.

Típicamente, la cantidad de proteína en cada dosis de la composición inmunogénica se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos importantes en el sujeto típico. En este contexto, inmunoprotector no significa necesariamente completamente protector contra infección; significa protección contra los síntomas o la enfermedad, especialmente la enfermedad severa asociada con el virus. La cantidad de antígeno puede variar dependiendo del inmunógeno específico que se emplee. En general, es de esperar que cada dosis humana comprenda 1-1000 µg de proteína. Adecuadamente, cada dosis de vacuna comprende 1-100 µg de cada VLP, adecuadamente al menos 5 µg, o al menos 10 µg, por ejemplo, entre 5-50 µg de cada VLP.

Las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento adecuadamente generan una respuesta inmunitaria en un sujeto humano o animal contra al menos 2 rinovirus diferentes o dos serotipos diferentes de un rinovirus tales como dos serotipos diferentes de HRV, adecuadamente 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, o 10 o más serotipos diferentes de HRV. La protección cruzada contra diferentes serotipos de HRV puede identificarse, por ejemplo, utilizando un modelo animal, por ejemplo modelos de ratón (Bartlett y col. 2008).

De manera adecuada, la composición inmunogénica se administra con un régimen de 2 o 3 dosis, por ejemplo en un régimen de 0, 1 o de 0, 2 o de 0, 3 o de 0, 4 o de 0, 5 o de 0, 6 o de 0, 12 meses respectivamente, o un régimen de 0, 1, 6 o de 0, 2, 6 o de 0, 6, 12 meses respectivamente.

Procedimientos para producir VLP rinovirales

En una realización, las etapas VLP de la invención se produce por un procedimiento para producir VLP rinovirales que comprende las etapas de:

- a. producir constructos que codifican proteínas de cápside necesarias para la formación de una VLP, en la que cada una de las proteínas de cápside está codificada como una proteína de fusión con una proteína chaperona,
- b. coexpresar dichos constructos en la misma célula hospedadora o expresar uno o más de dichos constructos en células hospedadoras separadas y
- c. lisar dichas células hospedadoras y, en caso de expresión separada, reunir todas las proteínas de cápside necesarias para una VLP.

La expresión "proteína chaperona" o "secuencia chaperona", cuando se emplea en el presente documento, se refiere a una proteína que ayuda a otras proteínas a plegarse adecuadamente y que estabiliza proteínas. Típicamente, un plegamiento y estabilización adecuados conllevan la mejora de la solubilidad. Son ejemplos de tales proteínas chaperonas SUMO y Hsp90. En una realización, dicha proteína chaperona es SUMO o Hsp90, preferentemente SUMO. En una realización alternativa, se coexpresan tanto constructos que utilizan SUMO como chaperona como constructos que utilizan Hsp90 como chaperona.

En una realización, el procedimiento comprende adicionalmente la etapa d. eliminar dicha proteína chaperona. En una realización específica, la proteína chaperona es SUMO. La eliminación de SUMO en la etapa d. puede realizarse, pero no necesariamente, utilizando SUMOstar proteasa.

En la técnica se conocen bien procedimientos para la producción de constructos de ácidos nucleicos. En ciertas realizaciones, se optimizan los codones de los ácidos nucleicos recombinantes que codifican las proteínas para la expresión en una célula hospedadora seleccionada. Para facilitar la replicación y la expresión, los constructos de ácido nucleico que codifican las proteínas pueden incorporarse en un vector, tal como un vector de expresión procariota o eucariota.

Entre las células hospedadoras adecuadas se incluyen células hospedadoras procariotas (es decir, bacterias), tales como *E. coli*, así como numerosas células hospedadoras eucariotas, incluyendo células fúngicas (por ejemplo, levaduras), células de insectos, células vegetales y células de mamíferos (tales como células CHO y HEK293). Las células hospedadoras preferidas son células eucariotas, por ejemplo, células de mamíferos, en concreto las células HEK293.

Las células hospedadoras pueden cultivarse en un medio nutriente convencional modificado de manera adecuada para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar las secuencias polinucleotídicas insertadas. Las

condiciones de cultivo, tales como la temperatura, pH y similares, son típicamente aquellas utilizadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para expresión y serán evidentes para los expertos en la materia y en las referencias citadas en el presente documento, que incluyen, por ejemplo, Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, Tercera Edición, Wiley-Liss, New York y las referencias allí citadas. Además de Sambrook, Berber y Ausubel, pueden encontrarse detalles respecto al cultivo celular en Payne y col. (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamburg and Phillips (Eds) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods* Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) y Atlas and Parks (Eds) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

Típicamente, el procedimiento para producir VLP tal como se describió anteriormente en el presente documento comprenderá adicionalmente una o más etapas de purificación, por ejemplo, una etapa de purificación entre las etapas pasos c. y d. y/o una etapa de purificación después de la etapa d.

La adición de una etiqueta a la proteína de fusión puede facilitar la purificación. En una realización, la proteína de fusión comprende una etiqueta histidina. Las proteínas que comprenden una etiqueta histidina se pueden purificar empleando cromatografía de afinidad de metales inmovilizados. Por tanto, en una realización, el procedimiento comprende una etapa de purificación que comprende la cromatografía de afinidad de metales inmovilizados.

Cuando se emplea en el presente documento el término "Hsp90" se refiere a la proteína de choque térmico 90. Entre las alternativas se incluyen otros miembros de la familia de chaperonas moleculares de 90 kDa, tal como describió Csermely P. y col. ("The 90-kDa Molecular Chaperone Family: Structure, Function, and Clinical Applications. A Comprehensive Review" *Pharmacol. Ther.* Vol. 79, n.º 2, pág. 129-168, 1998).

Cuando se emplea en el presente documento una "secuencia SUMO" o "SUMO" se hace referencia a una secuencia o proteína modificadora pequeña relacionada con la ubiquitina. Las secuencias SUMO, como otras proteínas chaperonas, aumentan la solubilidad de proteínas de fusión expresadas. Se han descrito secuencias SUMO adecuadas en Ulrich "SUMO Protocols" *Methods in Mol Biol* 497. Humana Press 2009 e incluyen SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3, SUMO-4, Smt3 y Pmt3. Un sistema de expresión pET SUMO para expresión bacteriana está disponible en Life Technologies, por ejemplo. La tecnología de fusión de SUMO se ha revisado por Panavas y col. 2009 *Methods Mol Biol* 497:303.

En una realización preferida, la secuencia SUMO es Smt3.

En una realización, la secuencia SUMO se elimina empleando SUMO proteasa.

De manera adecuada, uno de los constructos codifica VP0 y dicho constructo codifica la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2.

De manera adecuada, uno de los constructos codifica VP3 y dicho constructo codifica la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 4.

De manera adecuada, uno de los constructos codifica VP1 y dicho constructo codifica la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 6.

Ejemplos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Generación de los plásmidos de expresión

Optimización de codones

Como referencia se utilizó la secuencia genómica HRV14 de rinovirus de NCBI (número de referencia NC_001490). Se optimizaron los codones de la porción de la secuencia genómica del HRV14 que codifica el precursor de la proteína estructural P1 para alinear con la tabla de uso de codones de *Homo sapiens* para facilitar la expresión en la hospedadora de expresión seleccionada derivada de humano que es la línea celular de Riñón Embrionario Humano 293 (HEK293). Aunque se optimizó la secuencia de nucleótidos, ninguna de estas sustituciones tuvo como resultado la alteración de la secuencia de aminoácidos.

Construcción de constructo

Se aplica el mismo procedimiento a los tres constructos SUMO-VP quiméricos (SUMO-VP0 (SEQ ID NO: 1, que codifica la SEQ ID NO: 2), SUMO-VP3 (SEQ ID NO: 3, que codifica la SEQ ID NO: 4) y SUMO-VP1 (SEQ ID NO: 5, que codifica la SEQ ID NO: 6)) generados para el experimento.

El fragmento de ADN que codifica el SUMO-VP quimérico se generó mediante ensamblaje de dos fragmentos de ADN más pequeños. El primer fragmento de ADN consistió en la secuencia codificante completa para la proteína de fusión SUMOstar y una porción de la proteína estructural VP de HRV. El segundo fragmento se amplificó mediante PCR a partir de un molde de ADN de HRV14 con codones optimizados. Los dos fragmentos se ensamblaron utilizando PCR.

Clonación molecular

Se utilizaron el fragmento ensamblado y el vector de expresión eucariótico pTT5 (Zhang y col. (2009) Protein Expr Purif 65:77) para generar los plásmidos de expresión. En las siguientes referencias pueden encontrarse suficientes procedimientos para guiar a un experto en la materia: Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2000; y Ausubel y col. Short Protocols in Molecular Biology, 4ª ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999.

2. Descripción de las condiciones de expresión de proteínas

Mantenimiento de células

El experimento se realizó en un sistema de expresión de mamífero. Las células se cultivaron en suspensión en un medio de expresión F17 libre de origen animal, definido químicamente, libre de proteínas (Life Technologies, CA, USA) suplementado con Glutamina 4 mM y Pluronic F-68 0,1 % a 37 °C, CO₂ 5 % y 120 rpm. Se realizaron pases por dilución en medio fresco regularmente. Las células se mantuvieron dentro del intervalo de densidad de células viables 0,2 - 4,0 X 10⁶ células/ml. Se monitorizó la densidad celular y la viabilidad mediante un contador de células Cellometer (Nexcelom Bioscience).

Transfección transitoria

En adelante se proporciona un ejemplo de una transfección transitoria a una escala de 30 ml. Los volúmenes aumentaron a escala de acuerdo con esto para una mayor producción de hasta 4 litros. Para la etapa de transfección se utilizó el mismo medio de cultivo (F17 libre de origen animal, definido químicamente, libre de proteínas suplementado con Glutamina 4 mM y Pluronic F-68 0,1 %) que para la sección anterior de mantenimiento de células.

En resumen, el día antes de la transfección, se sembró un matraz de agitación para cultivo celular de 125 ml con 30 ml de células HEK293-6E a una densidad de células viables de 5,0 X 10⁵ células/ml y estas se dejaron crecer durante la noche a 37 °C, CO₂ 5 % 110-120 rpm. El día de la transfección, la densidad celular se ajustó a 1,0 X 10⁶ células/ml. Las mezclas de transfección se prepararon como sigue; 12,5 µg de plásmidos de expresión de calidad de transfección His-SUMO-VP0, His-SUMO-VP3 y His-SUMO-VP1 (en total 37,5 µg de plásmidos de expresión) se diluyeron en tampón Opti-Pro™ SFM (Life Technologies, CA, USA) hasta un volumen total de 0,6 ml. De manera similar, se diluyeron también 37,5 µl del reactivo de transfección FreeStyle Max en Opti-Pro™ SFM hasta un volumen total de 0,6 ml. El ADN diluido y el reactivo de transfección se mezclaron después y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después del tiempo de incubación, la mezcla de transfección se añadió lentamente a las células y se pusieron de nuevo en cultivo a 37 °C, CO₂ 5 % 110-120 rpm durante un periodo de expresión de 6 días. En ese momento, las células se recogieron por centrifugación a 6000 x g durante 10 minutos a 4 °C.

3. Descripción de la purificación de proteínas

Lisis celular

El sedimento celular correspondiente a 2 L de cultivo, se resuspendió en 50 ml de tampón Bicine 20 mM (pH 8,3) que contenía NaCl 0,5 M. La suspensión celular se interrumpió, utilizando un disruptor de células TS Bench Top Constant Cell Disrupter System 1,1 KW (Constant Systems, Ltd), mediante dos pases a 15 000 PSI (libras por pulgada cuadrada). El material soluble (sobrenadante) e insoluble (sedimento) se separaron mediante centrifugación a 20 000 x g durante 20 min a 4 °C.

Etapas de purificación IMAC

Se purificó el material soluble que contenía los tres SUMO-VP quiméricos coexpresados bajo condiciones naturales en cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC) utilizando un sistema de purificación de proteínas (PROFINIA™ Bio-Rad Laboratories, Inc. o el sistema AKTA, GE Healthcare, Inc.). La preparación de proteínas se cargó a 2 ml/min en columnas His Trap FF de 5 ml (GE Healthcare, Inc.) preequilibradas con tampón Bicine 20 mM (pH 8,3), NaCl 0,5 M, (que produce una "fracción que fluye a través de la columna"). A continuación, se lavó la columna con un caudal de 10 ml/min, utilizando 5 volúmenes de columna (CV) del mismo tampón (produciendo una "fracción de lavado n.º 1"), seguido de 5CV del tampón suplementado con imidazol 10 mM (produciendo una "fracción de lavado n.º 2"). La etapa de elución se llevó a cabo empleando dos CV de tampón Bicine 20 mM (pH 8,3), NaCl 0,5 M, imidazol 250 mM y a un caudal de 2 ml/min, produciendo una "fracción de elución".

Etapas de purificación SEC

Se cargó una fracción de la "fracción de elución" IMAC en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (HiLoad™ Superdex™ 200pg, GE Healthcare, Inc) preequilibrada en tampón Bicine 20 mM (pH 8,3) que contenía NaCl 0,5 M, con y sin TCEP 1 mM, a 2,5 ml/min. Las fracciones se analizaron y agruparon según los resultados de la electroforesis en gel poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Cuando fue necesario, se concentraron proteínas usando la unidad de filtración ultracentrífuga de Amicon Ultra Centrifugal Filter Unit-10.000 NMWL (EMD Millipore, Inc.).

4. Utilización de la SUMOstar proteasa

Se trataron las proteínas quiméricas purificadas SUMO-VP con la SUMOstar proteasa (SUMOstar kit (cat n.º 7110) de Life Sensors) para eliminar las partes de la proteína de fusión His-SUMO y liberar las proteínas VP. Se añadió la SUMOstar proteasa a la preparación de proteínas según la proporción recomendada (1 U/100 µg) en presencia del tampón de SUMOstar proteasa y DTT de 1 a 5 mM y se incubó a 30 °C, durante más de 60 minutos. Los experimentos de proteólisis se pueden realizar en presencia de resina de IMAC sefarosa 6 FF, GE Healthcare, Inc).

5. Descripción de la caracterización de partículas

Preparación de muestra para SDS-PAGE

Por ejemplo, se centrifugó 1 ml de cultivo a 14 000 RPM durante 2 min. El sedimento celular se resolubilizó usando 140 o 210 µl de tampón de urea 8 M, 10 o 15 µl de ditiotretitol (DTT) 1 M y 50 o 75 µl de Tampón de Muestra NUPAGE® LDS (dodecil sulfato de litio) 4X (Life Technologies). Se lisaron las células en suspensión mediante sonicación, con 10 a 15 ciclos de 2 segundos de sonicación a 0,08 vatios de salida, amplitud de 40-50, seguido de una etapa de pausa de un segundo (Vibra Cell, Sonics & Materials, Inc.). Después, se centrifugaron los lisados celulares a 14 000 RPM durante 2 min para separar los componentes insolubles. A continuación, se calentaron las muestras a 70 °C durante 10 minutos.

Como alternativa, cuando se deseó ver el efecto de la secuencia SUMO sobre la solubilidad de las proteínas coexpresadas, por ejemplo en el caso de la Figura 1, las muestras se prepararon como sigue. Se aislaron las células contenidas en 1 ml de cultivo mediante centrifugación a 5000 g durante 5 minutos. Se resuspendió el sedimento celular en 200 µl de Bicine 20 mM y 150 ml de NaCl y se sonicó. Las proteínas solubles e insolubles se separaron por centrifugación a 14000 rpm durante 10 minutos. Se resuspendió el sedimento obtenido en 200 µl de Bicine 20 mM, urea 8 M y se sonicó. La parte soluble quedó así contenida en el sobrenadante.

Las proteínas purificadas se prepararon para análisis con SDS-PAGE añadiendo 70 µl de muestra, 5 µl de DTT 1 M y 25 µl de Tampón de Muestra LDS 4X.

Análisis de SDS-PAGE

Se realizaron análisis de SDS-PAGE según las recomendaciones del fabricante (Life Technologies) empleando geles NUPAGE® Bis-Tris al 4-12 %. Las preparaciones de muestras, tampones y condiciones de migración se realizaron en condiciones recomendadas por los proveedores.

DLS

Se evaluó el estado de oligomerización de VLP-VP-SUMO por dispersión de luz dinámica (DLS), la cual se utiliza para evaluar radios hidrodinámicos en solución, para proporcionar información sobre homogeneidad y detectar la presencia de partículas de elevado peso molecular. Esto está basado en el cálculo del coeficiente de difusión de las diferentes especies que se obtienen mediante la medición de la fluctuación de la dispersión de luz, que depende del peso molecular y la forma de la proteína y de otros constituyentes menores de la muestra. En resumen, se centrifugaron muestras obtenidas de la etapa de purificación SEC a 20 000 g durante 2 minutos antes de cargarlos en una placa de bajo volumen de 384 pocillos de fondo negro transparente plano Corning 3540 y se sometieron a análisis DLS utilizando un lector de placas DynaPro® Plate de Wyatt Technology a 25 °C. Para cada muestra analizada con DLS, se cargaron cinco pocillos consecutivos con la misma muestra y se tomaron seis mediciones consecutivas en el mismo pocillo que se midieron recogiendo datos de dispersión de luz durante 15 s. La distribución del tamaño de partículas de análisis por ajuste de cumulantes o de normalización y el índice de polidispersidad se calcularon a partir de la función de correlación utilizando el software Dynamics Software versión 7.1.7 (Wyatt Technology).

MET

Se prepararon muestras obtenidas de la etapa de purificación SEC para tinción negativa para MET (Microscopia Electrónica de Transmisión) utilizando ácido fosfotungsténico 3 % como agente de contraste y las muestras se adsorbieron en rejillas de MET (malla 200) usando un Airfuge (una ultracentrífuga accionada por aire fabricada por Beckman). Se dejó secar completamente el material al aire y se examinó con microscopia electrónica de transmisión (Hitachi H-7100) a 75 kV.

RESULTADOS

Expresión en HEK293

Se utilizaron tres plásmidos de expresión (His-SUMO-VP0, His-SUMO-VP3 y His-SUMO-VP1) para transfectar de forma simultánea e individualmente células HEK293-6E. Después de un periodo de expresión de 6 días, se recogieron las células HEK293-6E transfectadas, se resuspendieron y se lisaron. Las fracciones solubles e insolubles se cargaron en LDS-PAGE y se sometieron a transferencia de Western. El análisis de transferencia de Western utilizando anticuerpo polivalente anti-His de conejo reveló que individualmente los 3 His-SUMO-VP se expresaron a un nivel relativamente alto, pero principalmente en la fracción insoluble. Por otro lado, la solubilidad mejoró cuando los 3 His-

SUMO-VP se coexpresaron (**Figura 1**).

Etapas de purificación 1

La totalidad del sedimento de HEK293 se resuspendió en un tampón adecuado para mantener las proteínas en una condición natural (sin desnaturalización). La suspensión celular se interrumpió y las fases se separaron por centrifugación. La fracción soluble se usó para realizar una purificación IMAC convencional en condiciones naturales.

Etapas de purificación 2

Las proteínas / partículas purificadas en condiciones naturales de IMAC se sometieron a una etapa adicional de purificación. Mediante la realización de una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), los presentes solicitantes tenían por objeto separar el material cargado en función de su tamaño en solución. Se agruparon muestras de diferentes fracciones que contenían His-SUMO-VP y se caracterizó por su contenido de partículas.

Dispersión de luz dinámica (DLS) y Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Las diferentes fracciones agrupadas se analizaron en paralelo en DLS (**Tabla 1**) y MET (**Figura 2**).

Tabla 1. Resultados de los diámetros del experimento de dispersión de luz dinámica en modo discontinuo.

Muestra	Ajuste de cumulante	Ajuste de normalización			
	Diámetro (nm)	Diámetro (nm)	% Masa	% Polidispersidad	% Intensidad
His-SUMO-VP	37,0 ± 8,6	27,6 ± 1,4	94,8	34,6	97,8

El diámetro hidrodinámico de 27,6 nm medido es coherente con el intervalo de tamaños esperado para una partícula similar a virus (VLP). Además, el elevado porcentaje de masa e intensidad de la población objetivo y el bajo diámetro hidrodinámico de la muestra en su conjunto (ajuste de cumulante) sugieren una buena homogeneidad de la muestra.

Ambos procedimientos proporcionan a los presentes solicitantes buenas indicaciones de que las estructuras se obtuvieron en el intervalo de 30 nm de diámetro (**Tabla 2**).

Tabla 2. Resumen de diámetros y amplitudes de distribución y comparación entre MET y DLS

Muestra	Diámetro hidrodinámico DLS	Diámetro externo MET
	Media (nm)	Media (nm)
His-SUMO-VP	27,6 ± 1,4	30 ± 3

Procesamiento de SUMO proteasa

Los datos descritos anteriormente se generaron empleando las proteínas purificadas His-SUMO-VP. Se realizó una digestión *in vitro* de las proteínas His-SUMO-VP utilizando la SUMOstar proteasa para liberar la His-SUMO de la porción VP. Como

resultado, una clara indicación de que una buena proporción de His-SUMO-VP se escindió adecuadamente (en His-SUMO y VP) se evidenció por el hecho de que se observaron bandas nuevas en la porción derecha de la Figura 3 correspondientes al peso molecular de las proteínas procesadas. Se realizaron análisis de transferencia de Western empleando anti-His y anti-VPI y se confirmó ese resultado (Figura 4). Las Figuras 3 y 4 también parecen mostrar alguna escisión de la His-SUMO de la porción VP antes de la digestión usando SUMO proteasa.

Listado de secuencias

SEQ ID NO: 1
 Secuencia de nucleótidos que codifica SUMO-VP0 de HRV14 (LVL1053-43)

ES 2 754 238 T3

atgggtcatcaccatcatcatcacgggtccctgcaggactcagaagtcaatcaagaagctaagccagagg
tcaagccagaagtcaagcctgagactcacatcaatttaaggtgtccgatggatcttcagagatcttctt
caagatcaaaaagaccactcctttaagaaggctgatggaagcgttcgctaaaagacagggttaaggaaatg
gactccttaacgttcttgtacgacggtattgaaattcaagctgatcagaccctgaagatttgacatgg
aggataacgatattattgaggctcacagagaacagattggaggtggcgcccaggtgagcaccagaagag
cggcagccacgagaaccagaacatcctgaccaacggcagcaaccagaccttcaccgtgatcaactactac
aaggacgccgccagcaccagcagcggccagagcctgagcatggacccagcaagttcaccgagcccg
tgaaggacctgatgctgaagggcgccccgccctgaacagcccaacgtggaggcctgcggctacagcga
ccgggtgcagcagatcacctgggcaacagcaccatcaccaccagggccccaacgccgtggtgtgc
tacgccgagtggcccagtagctgcccagcgtggacgccagcagcgtgaacaagaccagcaagcccgaca
ccagcgtgtgccggttctacaccctggacagcaagacctggaccaccggcagcaagggctggtgctggaa
gctgcccgacgccctgaaggacatgggcgtgttcggccagaacatgttctccacagcctgggccggagc
ggctacaccgtgcacgtgcagtgcacgccaccaagttccacagcggctgcctgctggtggtggtgatcc
ccgagcaccagctggccagccagagggcggaacgtgagcgtgaagtacacctcaccaccaccggcga
gcggggcatcgacctgagcagcggccaacgaggtggcgccccgtgaaggacgtgatctacaacatgaac
ggcaccctgctgggcaacctgctgatctccccaccagttcatcaacctgcccagcaacaacaccgcca
ccatcgtgatcccctacatcaacagcgtgccatcgacagcatgacccggcacaacaacgtgagcctgat
ggtgatccccatcgccccctgaccgtgcccaccggcgccacccccagcctgcccataccgtgaccatc
gccccatgtgcaccgagttcagcggcatccggagcaagagcatcgtgccccagtgataa

SEQ ID NO: 2

Secuencia de aminoácidos de SUMO-VP0 de HRV14 (LVL1053-43)

MGHHHHHGHSLQDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFKRQKEM
DSLTFLYDGEIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGGGAQVSTQKSGSHENQNILTNGSNQTFVINY
KDAASTSSAGQSLSMPSKFTEPVKDLMLKGAPALNSPNVEACGYSDRVQQITLGNSTITTQEANAVVC
YAEWPEYLPVDASDVNKTSPDTSVCRFYTLDSKTWTTGSKGWCWKLDPALKDMGVFGQNMFFHSLGRS
GYTVHVQCNAKTFHSGCLLVVVIPEHQLASHEGGNVSVKYTFTHPGERGIDLSSANEVGGPVKDVYINMN
GTLGNLLIFPHQFINLRTNNTATIVIPYINSVPIDSMTRHNNVSLMVIPIAPLTVPTGATPSLPITVTI
APMCTEFSGIRSKSIVPQ

5

SEQ ID NO: 3

Secuencia de nucleótidos que codifica SUMO-VP3 de HRV14 (LVL1054-21)

ES 2 754 238 T3

atgggtcatcaccatcatcatcacgggtccctgcaggactcagaagtcaatcaagaagctaagccagagg
tcaagccagaagtcaagcctgagactcacatcaatTTAAAGGTGTCCGATGGATCTTCAGAGATCTTCTT
caagatcaaaaagaccactcctTTAAGAAGGCTGATGGAAGCGTTCGCTAAAAGACAGGGTAAGGAAATG
gactccttaacgttcttGTACGACGGTATTGAAATTCAGCTGATCAGACCCCTGAAGATTTGGACATGG
aggataacgatattattgaggctcacagagaacagattggaggtggcctgcccaccaccacctgcccgg
cagcggccagttcctgaccaccgacgaccggcagagccccagcgcctgcccactacgagcccaccccc
cggatacacatccccggcaaggtgcacaacctgctggagatcatccaggtggacacctgatccccatga
acaacacccacaccaaggacgaggtgaacagctacctgatccccctgaacgccaaccggcagaacgagca
gggtgttcggcaccaacctgttcatcggcgacggcgtgttcaagaccacctgctgggagagatcgtgcag
tactacacccactggagcggcagcctgcggttcagcctgatgtacaccggccccgcctgagcagcgcga
agctgatcctggcctacacccccccggcgccccggggccccaggaaccggcgggaggccatgctgggac
ccacgtgggtgtgggacatcggcctgacagcaccatcgtgatgaccatcccctggaccagcggcgtgcag
ttccggtacaccgaccccgacacctacaccagcgcggcttccctgagctgctggtatcagaccagcctga
tccctgccccccgagaccaccggccaggtgtacctgctgagcttcatcagcgcctgccccgacttcaagct
gcggtgatgaaggacaccagaccatcagccagaccgtggcctgaccgagtataa

SEQ ID NO: 4

Secuencia de aminoácidos de SUMO-VP3 de HRV14 (LVL1054-21)

MGHHHHHHSGLQDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFKRQKEM
DSLTFLYDGLIEIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGGLPTTTLPGSGQFLTTDDRQSPSALPNYEPTP
RIHIPGKVHNLLEIQVDTLIPMNNHTKDEVNSYLIPLNANRQNEQVFGTNLFIGDGVFKTTLLGEIVQ
YYTHWSGSLRFSLMYTGPALSSAKLILAYTPPGARGPQDRREAMLGTHVVWDIGLQSTIVMTIPWTSQVQ
FRYTDPDYTSAGFLSCWYQTSLLILPPETTQVYLLSFISACPDFKLRLMKDTQTISQTVALTE

5

Seq ID NO: 5

Secuencia de nucleótidos que codifica SUMO-VP1 de HRV14 (LVL1055-12)

atgggtcatcaccatcatcatcacgggtccctgcaggactcagaagtcaatcaagaagctaagccagagg
tcaagccagaagtcaagcctgagactcacatcaatTTAAAGGTGTCCGATGGATCTTCAGAGATCTTCTT
caagatcaaaaagaccactcctTTAAGAAGGCTGATGGAAGCGTTCGCTAAAAGACAGGGTAAGGAAATG
gactccttaacgttcttGTACGACGGTATTGAAATTCAGCTGATCAGACCCCTGAAGATTTGGACATGG
aggataacgatattattgaggctcacagagaacagattggaggtggcctgggagcagagctggaggaggt
gatcgtggagaagaccaagcagaccgtggccagcatcagcagcggcccccaagcacaccagaaggtgccc
atcctgaccgccaacgagaccggcgccaccatgcccgtgctgcccagcagcagcatcgagaccggacca
cctacatgcacttcaacggcagcagaccgacgtggagtgcttccctgggccccggcctgctgacgt
gaccgagatccagaacaaggacgccaccggcatcgacaaccaccgggaggccaagctgttcaacgactgg
aagatcaacctgagcagcctggtgcagctgcggaagaagctggagctgttcacctacgtgcggttcgaca

ES 2 754 238 T3

gcgagtacaccatcctggccaccgccagccagcccgacagcgccaactacagcagcaacctgggtggtgca
ggccatgtacgtgcccccgcgcccccaaccccaaggagtgggacgactacacctggcagagcgccagc
aaccaccagcgtgttcttcaaggtggcgacaccagccggttcagcgtgccctacgtgggcctggccagcg
cctacaactgcttctacgacggctacagccacgacgacgcccagaccagtcagcgtgacctacgtgggcctggccagcg
ccacatgggacgcatggccttccggatcgtgaacgagcagcagcagcagcacaagacctgggtgaagatccgg
gtgtaccaccgggccaagcacgtggaggcctggattccccgggcccccgggccctgacctacaccagca
tcggccggaccaactacccaagaacaccgagcccgatcaagaagcggaagggcgacatcaagagcta
ctgataa

SEQ ID NO: 6

Secuencia de aminoácidos de SUMO-VP1 de HRV14 (LVL1055-12)

MGHHHHHHGSLQDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFKRQKEM
DSLTFLYDGLIEIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGGGLGDELEEVIVEKTKQTVASISSGPKHTQKVP
ILTANETGATMPVLPSPDSIETRRTYMHFNSETDVECFLGRAACVHVTEIQNKDATGIDNHREAKLFNDW
KINLSSLVQLRKKLELFTYVRFDSEYTIILATASQPDSANYSSNLVVQAMYVPPGAPNPKEWDDYTWQSAS
NPSVFFKVGDTSRFSVPYVGLASAYNCFYDGYSHDDAETQYGITVLNHMGSMFRIVNEHDEHKTIVKIR
VYHRAKHVEAWIPRAPRALPYTSIGRTNYPKNTEPVIKKRKGDIKSY

5

SEQ ID NO: 14

>sp|P03303|2-331 - VP0 - HRV14

GAQVSTQKSGSHENQNILTNGSNQTFVINYKDAASTSSAGQSLSDPDKFTEPVKDLML
LKGAPALNSPNVEACGYSDRVQQITLGNSTITTTQEAANAVVCYAEWPEYLPDVDASDVNK
TSKPDTSVCRFYTLDSKTWTGSKGWCWKLDPALKDMGVFGQNMFFHSLGRSGYTVHVQC
NATKFHSGCLLVVVIPEHQLASHEGGNVSVKYTFTHPGERGIDLSSANEVGGPVKDVINY
MNGTLLGNLLIFPHQFINLRTNNTATIVIPYINSVPIDSMTRHNNVSLMVIPAPIPLTVPT
GATPSLPITVTIAPMCTEFGIRSKSIVPQ

SEQ ID NO: 15

>sp|P03303|568-856 - VP1 - HRV14

GLGDELEEVIVEKTKQTVASISSGPKHTQKVPILTANETGATMPVLPSPDSIETRRTYMHF
NGSETDVECFLGRAACVHVTEIQNKDATGIDNHREAKLFNDWKINLSSLVQLRKKLELFT
YVRFDSEYTIILATASQPDSANYSSNLVVQAMYVPPGAPNPKEWDDYTWQSASNPSVFFKV
GDTSRFSVPYVGLASAYNCFYDGYSHDDAETQYGITVLNHMGSMFRIVNEHDEHKTIVK
IRVYHRAKHVEAWIPRAPRALPYTSIGRTNYPKNTEPVIKKRKGDIKSY

10

SEQ ID NO: 16

>sp|P03303|70-331 - VP2 - HRV14

SPNVEACGYSDRVQQITLGNSTITTTQEAANAVVCYAEWPEYLPDVDASDVNKTSKPDTSV
CRFYTLDSKTWTGSKGWCWKLDPALKDMGVFGQNMFFHSLGRSGYTVHVQCNATKFHSG
CLLVVVIPEHQLASHEGGNVSVKYTFTHPGERGIDLSSANEVGGPVKDVINYMNGTLLGN
LLIFPHQFINLRTNNTATIVIPYINSVPIDSMTRHNNVSLMVIPAPIPLTVPTGATPSLP
ITVTIAPMCTEFGIRSKSIVPQ

ES 2 754 238 T3

SEQ ID NO: 17

>sp|P03303|332-563 - VP3 - HRV14

GLPTTTLPGSGQFLTTDDRQSPSALPNYEPTPRIHIPGKVHNLLEIIQVDTLIPMNNHT
KDEVNSYLIPLNANRQNEQVFGTNLFIGDGVFKTTLLGEIVQYYTHWSGSLRFSLMYTGP
ALSSAKLILAYTPPGARGPQDRREAMLGTHVWWDIGLQSTIVMTIPWTSQVFRYTD PDT
YTSAGFLSCWYQTSLLILPPETTGQVYLLSFISACPDFKLRLMKDTQTISQTV ALTE

SEQ ID NO: 18

5 >sp|P03303|2-69 - VP4 - HRV14

GAQVSTQKSGSHENQNILTNGSNQTFVINYKDAASTSSAGQSLSM DPSKFTEPVK DLM
LKGAPALN

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> GlaxoSmithKline Biologicals SA
- <120> Vacuna
- 10 <130> VB65763
- <160> 18
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 1320
- 15 <212> ADN
- <213> Rinovirus humano
- <400> 1

ES 2 754 238 T3

atgggtcatc accatcatca tcacgggtcc ctgcaggact cagaagtcaa tcaagaagct 60
aagccagagg tcaagccaga agtcaagcct gagactcaca tcaatttaa ggtgtccgat 120
ggatcttcag agatcttctt caagatcaaa aagaccactc ctttaagaag gctgatggaa 180
gcgttcgcta aaagacagg taaggaaatg gactccttaa cgttcttgta cgacggtatt 240
gaaattcaag ctgatcagac ccctgaagat ttggacatgg aggataacga tattattgag 300
gctcacagag aacagattgg aggtggcgcc caggtgagca cccagaagag cggcagccac 360
gagaaccaga acatcctgac caacggcagc aaccagacct tcaccgtgat caactactac 420
aaggacgccg ccagcaccag cagcgccggc cagagcctga gcatggacc cagcaagttc 480
accgagcccg tgaaggacct gatgctgaag ggcgcccccg ccctgaacag cccaacgtg 540
gaggcctgcg gctacagcga ccgggtgcag cagatcacc tgggcaacag caccatcacc 600
accaggagg ccgccaacgc cgtggtgtgc tacgccgagt ggcccagta cctgcccgac 660
gtggacgcca gcgacgtgaa caagaccagc aagcccgaca ccagcgtgtg ccggttctac 720
accctggaca gcaagacctg gaccaccggc agcaagggct ggtgctggaa gctgcccgac 780
gccctgaagg acatgggctg gttcggccag aacatgttct tccacagcct gggccggagc 840
ggctacaccg tgcacgtgca gtgcaacgcc accaagttcc acagcggctg cctgctggtg 900
gtggtgatcc ccgagcacca gctggccagc cagcagggcg gcaacgtgag cgtgaagtac 960
acctcacc ccccggcga gcggggcatc gacctgagca gcgccaacga ggtgggcggc 1020
cccgtgaagg acgtgatcta caacatgaac ggcaccctgc tgggcaacct gctgatcttc 1080
ccccaccagt tcatcaacct gcggaccaac aacaccgcca ccatcgtgat ccctacatc 1140
aacagcgtgc ccatcgacag catgaccggc cacaacaacg tgagcctgat ggtgatcccc 1200
atcgcccc tgaccgtgcc caccggcgcc acccccagcc tgcccatcac cgtgaccatc 1260
gccccatgt gcaccgagtt cagcggcatc cggagcaaga gcatcgtgcc ccagtataa 1320

<210> 2
<211> 438
<212> PRT
<213> Rinovirus humano
<400> 2

5

ES 2 754 238 T3

Met Gly His His His His His His Gly Ser Leu Gln Asp Ser Glu Val
 1 5 10 15

Asn Gln Glu Ala Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Thr
 20 25 30

His Ile Asn Leu Lys Val Ser Asp Gly Ser Ser Glu Ile Phe Phe Lys
 35 40 45

Ile Lys Lys Thr Thr Pro Leu Arg Arg Leu Met Glu Ala Phe Ala Lys
 50 55 60

Arg Gln Gly Lys Glu Met Asp Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Asp Gly Ile
 65 70 75 80

Glu Ile Gln Ala Asp Gln Thr Pro Glu Asp Leu Asp Met Glu Asp Asn
 85 90 95

Asp Ile Ile Glu Ala His Arg Glu Gln Ile Gly Gly Gly Ala Gln Val
 100 105 110

Ser Thr Gln Lys Ser Gly Ser His Glu Asn Gln Asn Ile Leu Thr Asn
 115 120 125

Gly Ser Asn Gln Thr Phe Thr Val Ile Asn Tyr Tyr Lys Asp Ala Ala
 130 135 140

Ser Thr Ser Ser Ala Gly Gln Ser Leu Ser Met Asp Pro Ser Lys Phe
 145 150 155 160

Thr Glu Pro Val Lys Asp Leu Met Leu Lys Gly Ala Pro Ala Leu Asn
 165 170 175

Ser Pro Asn Val Glu Ala Cys Gly Tyr Ser Asp Arg Val Gln Gln Ile
 180 185 190

Thr Leu Gly Asn Ser Thr Ile Thr Thr Gln Glu Ala Ala Asn Ala Val
 195 200 205

Val Cys Tyr Ala Glu Trp Pro Glu Tyr Leu Pro Asp Val Asp Ala Ser
 210 215 220

ES 2 754 238 T3

Asp Val Asn Lys Thr Ser Lys Pro Asp Thr Ser Val Cys Arg Phe Tyr
225 230 235 240

Thr Leu Asp Ser Lys Thr Trp Thr Thr Gly Ser Lys Gly Trp Cys Trp
245 250 255

Lys Leu Pro Asp Ala Leu Lys Asp Met Gly Val Phe Gly Gln Asn Met
260 265 270

Phe Phe His Ser Leu Gly Arg Ser Gly Tyr Thr Val His Val Gln Cys
275 280 285

Asn Ala Thr Lys Phe His Ser Gly Cys Leu Leu Val Val Val Ile Pro
290 295 300

Glu His Gln Leu Ala Ser His Glu Gly Gly Asn Val Ser Val Lys Tyr
305 310 315 320

Thr Phe Thr His Pro Gly Glu Arg Gly Ile Asp Leu Ser Ser Ala Asn
325 330 335

Glu Val Gly Gly Pro Val Lys Asp Val Ile Tyr Asn Met Asn Gly Thr
340 345 350

Leu Leu Gly Asn Leu Leu Ile Phe Pro His Gln Phe Ile Asn Leu Arg
355 360 365

Thr Asn Asn Thr Ala Thr Ile Val Ile Pro Tyr Ile Asn Ser Val Pro
370 375 380

Ile Asp Ser Met Thr Arg His Asn Asn Val Ser Leu Met Val Ile Pro
385 390 395 400

Ile Ala Pro Leu Thr Val Pro Thr Gly Ala Thr Pro Ser Leu Pro Ile
405 410 415

Thr Val Thr Ile Ala Pro Met Cys Thr Glu Phe Ser Gly Ile Arg Ser
420 425 430

Lys Ser Ile Val Pro Gln
435

- <210> 3
- <211> 1038
- <212> ADN
- <213> Rinovirus humano
- <400> 3

ES 2 754 238 T3

```

atgggtcatc accatcatca tcacgggtcc ctgcaggact cagaagtcaa tcaagaagct      60

aagccagagg tcaagccaga agtcaagcct gagactcaca tcaatttaa ggtgtccgat      120

ggatcttcag agatcttctt caagatcaaa aagaccactc ctttaagaag gctgatggaa      180

gcgttcgcta aaagacaggg taaggaaatg gactccttaa cgttcttgta cgacgggtatt      240

gaaattcaag ctgatcagac ccctgaagat ttggacatgg aggataacga tattattgag      300

gctcacagag aacagattgg aggtggcctg cccaccacca ccctgcccgg cagcggccag      360

ttcctgacca ccgacgaccg gcagagcccc agcgcctgc ccaactacga gcccaccccc      420

cggatacaca tccccggcaa ggtgcacaac ctgctggaga tcatccaggt ggacaccctg      480

atccccatga acaacacca caccaaggac gaggtgaaca gctacctgat ccccctgaac      540

gccaaaccggc agaacgagca ggtgttcggc accaacctgt tcatcggcga cggcgtgttc      600

aagaccaccc tgctgggcca gatcgtgcag tactacaccc actggagcgg cagcctgcgg      660

ttcagcctga tgtacaccgg ccccgccctg agcagcgcca agctgatcct ggcctacacc      720

ccccccggcg cccggggccc ccaggaccgg cgggaggcca tgctgggcac ccacgtggtg      780

tgggacatcg gcctgcagag caccatcgtg atgaccatcc cctggaccag cggcgtgcag      840

ttccggtaca ccgaccccga cacctacacc agcgcggct tctgagctg ctggtatcag      900

accagcctga tcctgcccc cgagaccacc ggccaggtgt acctgctgag cttcatcagc      960

gcctgccccg acttcaagct gcggctgatg aaggacaccc agaccatcag ccagaccgtg     1020

gcctgaccg agtgataa                                     1038
    
```

<210> 4
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> Rinovirus humano

5

```

<400> 4
Met Gly His His His His His His Gly Ser Leu Gln Asp Ser Glu Val
1                               5                               10                               15

Asn Gln Glu Ala Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Thr
20                               25                               30

His Ile Asn Leu Lys Val Ser Asp Gly Ser Ser Glu Ile Phe Phe Lys
35                               40                               45

Ile Lys Lys Thr Thr Pro Leu Arg Arg Leu Met Glu Ala Phe Ala Lys
50                               55                               60

Arg Gln Gly Lys Glu Met Asp Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Asp Gly Ile
65                               70                               75                               80
    
```

ES 2 754 238 T3

Glu Ile Gln Ala Asp Gln Thr Pro Glu Asp Leu Asp Met Glu Asp Asn
 85 90 95
 Asp Ile Ile Glu Ala His Arg Glu Gln Ile Gly Gly Gly Leu Pro Thr
 100 105 110
 Thr Thr Leu Pro Gly Ser Gly Gln Phe Leu Thr Thr Asp Asp Arg Gln
 115 120 125
 Ser Pro Ser Ala Leu Pro Asn Tyr Glu Pro Thr Pro Arg Ile His Ile
 130 135 140
 Pro Gly Lys Val His Asn Leu Leu Glu Ile Ile Gln Val Asp Thr Leu
 145 150 155 160
 Ile Pro Met Asn Asn Thr His Thr Lys Asp Glu Val Asn Ser Tyr Leu
 165 170 175
 Ile Pro Leu Asn Ala Asn Arg Gln Asn Glu Gln Val Phe Gly Thr Asn
 180 185 190
 Leu Phe Ile Gly Asp Gly Val Phe Lys Thr Thr Leu Leu Gly Glu Ile
 195 200 205
 Val Gln Tyr Tyr Thr His Trp Ser Gly Ser Leu Arg Phe Ser Leu Met
 210 215 220
 Tyr Thr Gly Pro Ala Leu Ser Ser Ala Lys Leu Ile Leu Ala Tyr Thr
 225 230 235 240
 Pro Pro Gly Ala Arg Gly Pro Gln Asp Arg Arg Glu Ala Met Leu Gly
 245 250 255
 Thr His Val Val Trp Asp Ile Gly Leu Gln Ser Thr Ile Val Met Thr
 260 265 270
 Ile Pro Trp Thr Ser Gly Val Gln Phe Arg Tyr Thr Asp Pro Asp Thr
 275 280 285
 Tyr Thr Ser Ala Gly Phe Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Thr Ser Leu Ile
 290 295 300
 Leu Pro Pro Glu Thr Thr Gly Gln Val Tyr Leu Leu Ser Phe Ile Ser
 305 310 315 320
 Ala Cys Pro Asp Phe Lys Leu Arg Leu Met Lys Asp Thr Gln Thr Ile
 325 330 335
 Ser Gln Thr Val Ala Leu Thr Glu
 340

ES 2 754 238 T3

<210> 5
 <211> 1197
 <212> ADN
 <213> Rinovirus humano

5 <400> 5

```

atgggtcatc accatcatca tcacgggtcc ctgcaggact cagaagtcaa tcaagaagct      60
aagccagagg tcaagccaga agtcaagcct gagactcaca tcaatttaa ggtgtccgat      120
ggatcttcag agatcttctt caagatcaaa aagaccactc ctttaagaag gctgatggaa      180
gcgttcgcta aaagacaggg taaggaaatg gactccttaa cgttcttgta cgacggtatt      240
gaaattcaag ctgatcagac ccctgaagat ttggacatgg aggataacga tattattgag      300
gctcacagag aacagattgg aggtggcctg ggcgacgagc tggaggagggt gatcgtggag      360
aagaccaagc agaccgtggc cagcatcagc agcggcccca agcacacca gaagtgcccc      420
atcctgaccg ccaacgagac cggcgcacc atgcccgtgc tggccagcga cagcatcgag      480
acccggacca cctacatgca cttcaacggc agcgagaccg acgtggagtg cttcctgggc      540
cgggccgcct gcgtgcacgt gaccgagatc cagaacaagg acgccaccgg catcgacaac      600
caccgggagg ccaagctggt caacgactgg aagatcaacc tgagcagcct ggtgcagctg      660
cggaagaagc tggagctggt cacctacgtg cggttcgaca gcgagtacac catcctggcc      720
accgccagcc agcccagacag cgccaactac agcagcaacc tggtggtgca ggccatgtac      780
gtgccccccg gcgcccccaa cccaaggag tgggacgact acacctggca gagcgccagc      840
aaccacagcg tgttcttcaa ggtgggcgac accagccggt tcagcgtgcc ctacgtgggc      900
ctggccagcg cctacaactg cttctacgac ggctacagcc acgacgacgc cgagaccag      960
tacggcatca ccgtgctgaa ccacatgggc agcatggcct tccggatcgt gaacgagcac     1020
gacgagcaca agaccctggt gaagatccgg gtgtaccacc gggccaagca cgtggaggcc     1080
tggattcccc gggccccccg ggcctgccc tacaccagca tcggccggac caactacccc     1140
aagaacaccg agcccgtgat caagaagcgg aagggcgaca tcaagagcta ctgataa      1197
    
```

<210> 6
 <211> 397
 <212> PRT
 <213> Rinovirus humano

10 <400> 6

```

Met Gly His His His His His His Gly Ser Leu Gln Asp Ser Glu Val
1           5           10           15
    
```

ES 2 754 238 T3

Asn Gln Glu Ala Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Thr
 20 25 30

His Ile Asn Leu Lys Val Ser Asp Gly Ser Ser Glu Ile Phe Phe Lys
 35 40 45

Ile Lys Lys Thr Thr Pro Leu Arg Arg Leu Met Glu Ala Phe Ala Lys
 50 55 60

Arg Gln Gly Lys Glu Met Asp Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Asp Gly Ile
 65 70 75 80

Glu Ile Gln Ala Asp Gln Thr Pro Glu Asp Leu Asp Met Glu Asp Asn
 85 90 95

Asp Ile Ile Glu Ala His Arg Glu Gln Ile Gly Gly Gly Leu Gly Asp
 100 105 110

Glu Leu Glu Glu Val Ile Val Glu Lys Thr Lys Gln Thr Val Ala Ser
 115 120 125

Ile Ser Ser Gly Pro Lys His Thr Gln Lys Val Pro Ile Leu Thr Ala
 130 135 140

Asn Glu Thr Gly Ala Thr Met Pro Val Leu Pro Ser Asp Ser Ile Glu
 145 150 155 160

Thr Arg Thr Thr Tyr Met His Phe Asn Gly Ser Glu Thr Asp Val Glu
 165 170 175

Cys Phe Leu Gly Arg Ala Ala Cys Val His Val Thr Glu Ile Gln Asn
 180 185 190

Lys Asp Ala Thr Gly Ile Asp Asn His Arg Glu Ala Lys Leu Phe Asn
 195 200 205

Asp Trp Lys Ile Asn Leu Ser Ser Leu Val Gln Leu Arg Lys Lys Leu
 210 215 220

Glu Leu Phe Thr Tyr Val Arg Phe Asp Ser Glu Tyr Thr Ile Leu Ala
 225 230 235 240

Thr Ala Ser Gln Pro Asp Ser Ala Asn Tyr Ser Ser Asn Leu Val Val
 245 250 255

Gln Ala Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala Pro Asn Pro Lys Glu Trp Asp
 260 265 270

ES 2 754 238 T3

Asp Tyr Thr Trp Gln Ser Ala Ser Asn Pro Ser Val Phe Phe Lys Val
 275 280 285

Gly Asp Thr Ser Arg Phe Ser Val Pro Tyr Val Gly Leu Ala Ser Ala
 290 295 300

Tyr Asn Cys Phe Tyr Asp Gly Tyr Ser His Asp Asp Ala Glu Thr Gln
 305 310 315 320

Tyr Gly Ile Thr Val Leu Asn His Met Gly Ser Met Ala Phe Arg Ile
 325 330 335

Val Asn Glu His Asp Glu His Lys Thr Leu Val Lys Ile Arg Val Tyr
 340 345 350

His Arg Ala Lys His Val Glu Ala Trp Ile Pro Arg Ala Pro Arg Ala
 355 360 365

Leu Pro Tyr Thr Ser Ile Gly Arg Thr Asn Tyr Pro Lys Asn Thr Glu
 370 375 380

Pro Val Ile Lys Lys Arg Lys Gly Asp Ile Lys Ser Tyr
 385 390 395

<210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Rinovirus humano

5

<400> 7

Pro Ile Leu Thr Ala Asn Glu Thr Gly Ala Thr Met Pro Val
 1 5 10

<210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Rinovirus humano

10

<400> 8

Pro Ala Leu Asp Ala Ala Glu Thr Gly His Thr Ser Ser Val
 1 5 10

<210> 9
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Rinovirus humano

15

<400> 9

Pro Ile Leu Asp Ala Ala Glu Thr Gly His Thr Ser Asn Val

1 5 10

<210> 10
 <211> 14
 <212> PRT

20

ES 2 754 238 T3

<213> Rinovirus humano

<400> 10

Gln Ala Leu Gly Ala Val Glu Ile Gly Ala Thr Ala Asp Val
 1 5 10

5

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Rinovirus humano

<400> 11

Gly Ala Gln Val Ser Thr Gln Lys Ser Gly Ser His Glu Asn Gln Asn
 1 5 10 15

10

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Rinovirus humano

<400> 12

Gly Ala Gln Val Ser Arg Gln Asn Val Gly Thr His Ser Thr Gln Asn
 1 5 10 15

15

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Rinovirus humano

20

<400> 13

Gly Ala Gln Val Ser Arg Gln Ser Val Gly Ser His Glu Thr Met Ile
 1 5 10 15

25

<210> 14

<211> 330

<212> PRT

<213> Rinovirus humano

<400> 14

Gly Ala Gln Val Ser Thr Gln Lys Ser Gly Ser His Glu Asn Gln Asn
 1 5 10 15

Ile Leu Thr Asn Gly Ser Asn Gln Thr Phe Thr Val Ile Asn Tyr Tyr
 20 25 30

Lys Asp Ala Ala Ser Thr Ser Ser Ala Gly Gln Ser Leu Ser Met Asp

ES 2 754 238 T3

Met Val Ile Pro Ile Ala Pro Leu Thr Val Pro Thr Gly Ala Thr Pro
 290 295 300

Ser Leu Pro Ile Thr Val Thr Ile Ala Pro Met Cys Thr Glu Phe Ser
 305 310 315 320

Gly Ile Arg Ser Lys Ser Ile Val Pro Gln
 325 330

<210> 15
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> Rinovirus humano

5

<400> 15

Gly Leu Gly Asp Glu Leu Glu Glu Val Ile Val Glu Lys Thr Lys Gln
 1 5 10 15

Thr Val Ala Ser Ile Ser Ser Gly Pro Lys His Thr Gln Lys Val Pro
 20 25 30

Ile Leu Thr Ala Asn Glu Thr Gly Ala Thr Met Pro Val Leu Pro Ser
 35 40 45

Asp Ser Ile Glu Thr Arg Thr Thr Tyr Met His Phe Asn Gly Ser Glu
 50 55 60

Thr Asp Val Glu Cys Phe Leu Gly Arg Ala Ala Cys Val His Val Thr
 65 70 75 80

Glu Ile Gln Asn Lys Asp Ala Thr Gly Ile Asp Asn His Arg Glu Ala
 85 90 95

Lys Leu Phe Asn Asp Trp Lys Ile Asn Leu Ser Ser Leu Val Gln Leu
 100 105 110

Arg Lys Lys Leu Glu Leu Phe Thr Tyr Val Arg Phe Asp Ser Glu Tyr
 115 120 125

Thr Ile Leu Ala Thr Ala Ser Gln Pro Asp Ser Ala Asn Tyr Ser Ser
 130 135 140

Asn Leu Val Val Gln Ala Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala Pro Asn Pro
 145 150 155 160

Lys Glu Trp Asp Asp Tyr Thr Trp Gln Ser Ala Ser Asn Pro Ser Val
 165 170 175

ES 2 754 238 T3

Phe Phe Lys Val Gly Asp Thr Ser Arg Phe Ser Val Pro Tyr Val Gly
 180 185 190

Leu Ala Ser Ala Tyr Asn Cys Phe Tyr Asp Gly Tyr Ser His Asp Asp
 195 200 205

Ala Glu Thr Gln Tyr Gly Ile Thr Val Leu Asn His Met Gly Ser Met
 210 215 220

Ala Phe Arg Ile Val Asn Glu His Asp Glu His Lys Thr Leu Val Lys
 225 230 235 240

Ile Arg Val Tyr His Arg Ala Lys His Val Glu Ala Trp Ile Pro Arg
 245 250 255

Ala Pro Arg Ala Leu Pro Tyr Thr Ser Ile Gly Arg Thr Asn Tyr Pro
 260 265 270

Lys Asn Thr Glu Pro Val Ile Lys Lys Arg Lys Gly Asp Ile Lys Ser
 275 280 285

Tyr

- <210> 16
- <211> 262
- <212> PRT
- <213> Rinovirus humano

5

<400> 16

Ser Pro Asn Val Glu Ala Cys Gly Tyr Ser Asp Arg Val Gln Gln Ile
 1 5 10 15

Thr Leu Gly Asn Ser Thr Ile Thr Thr Gln Glu Ala Ala Asn Ala Val
 20 25 30

Val Cys Tyr Ala Glu Trp Pro Glu Tyr Leu Pro Asp Val Asp Ala Ser
 35 40 45

Asp Val Asn Lys Thr Ser Lys Pro Asp Thr Ser Val Cys Arg Phe Tyr
 50 55 60

Thr Leu Asp Ser Lys Thr Trp Thr Thr Gly Ser Lys Gly Trp Cys Trp
 65 70 75 80

Lys Leu Pro Asp Ala Leu Lys Asp Met Gly Val Phe Gly Gln Asn Met
 85 90 95

ES 2 754 238 T3

Phe Phe His Ser Leu Gly Arg Ser Gly Tyr Thr Val His Val Gln Cys
 100 105 110

Asn Ala Thr Lys Phe His Ser Gly Cys Leu Leu Val Val Val Ile Pro
 115 120 125

Glu His Gln Leu Ala Ser His Glu Gly Gly Asn Val Ser Val Lys Tyr
 130 135 140

Thr Phe Thr His Pro Gly Glu Arg Gly Ile Asp Leu Ser Ser Ala Asn
 145 150 155 160

Glu Val Gly Gly Pro Val Lys Asp Val Ile Tyr Asn Met Asn Gly Thr
 165 170 175

Leu Leu Gly Asn Leu Leu Ile Phe Pro His Gln Phe Ile Asn Leu Arg
 180 185 190

Thr Asn Asn Thr Ala Thr Ile Val Ile Pro Tyr Ile Asn Ser Val Pro
 195 200 205

Ile Asp Ser Met Thr Arg His Asn Asn Val Ser Leu Met Val Ile Pro
 210 215 220

Ile Ala Pro Leu Thr Val Pro Thr Gly Ala Thr Pro Ser Leu Pro Ile
 225 230 235 240

Thr Val Thr Ile Ala Pro Met Cys Thr Glu Phe Ser Gly Ile Arg Ser
 245 250 255

Lys Ser Ile Val Pro Gln
 260

<210> 17
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Rinovirus humano

5

<400> 17

Gly Leu Pro Thr Thr Thr Leu Pro Gly Ser Gly Gln Phe Leu Thr Thr
 1 5 10 15

Asp Asp Arg Gln Ser Pro Ser Ala Leu Pro Asn Tyr Glu Pro Thr Pro
 20 25 30

Arg Ile His Ile Pro Gly Lys Val His Asn Leu Leu Glu Ile Ile Gln
 35 40 45

ES 2 754 238 T3

Val Asp Thr Leu Ile Pro Met Asn Asn Thr His Thr Lys Asp Glu Val
50 55 60

Asn Ser Tyr Leu Ile Pro Leu Asn Ala Asn Arg Gln Asn Glu Gln Val
65 70 75 80

Phe Gly Thr Asn Leu Phe Ile Gly Asp Gly Val Phe Lys Thr Thr Leu
85 90 95

Leu Gly Glu Ile Val Gln Tyr Tyr Thr His Trp Ser Gly Ser Leu Arg
100 105 110

Phe Ser Leu Met Tyr Thr Gly Pro Ala Leu Ser Ser Ala Lys Leu Ile
115 120 125

Leu Ala Tyr Thr Pro Pro Gly Ala Arg Gly Pro Gln Asp Arg Arg Glu
130 135 140

Ala Met Leu Gly Thr His Val Val Trp Asp Ile Gly Leu Gln Ser Thr
145 150 155 160

Ile Val Met Thr Ile Pro Trp Thr Ser Gly Val Gln Phe Arg Tyr Thr
165 170 175

Asp Pro Asp Thr Tyr Thr Ser Ala Gly Phe Leu Ser Cys Trp Tyr Gln
180 185 190

Thr Ser Leu Ile Leu Pro Pro Glu Thr Thr Gly Gln Val Tyr Leu Leu
195 200 205

Ser Phe Ile Ser Ala Cys Pro Asp Phe Lys Leu Arg Leu Met Lys Asp
210 215 220

Thr Gln Thr Ile Ser Gln Thr Val Ala Leu Thr Glu
225 230 235

<210> 18
<211> 68
<212> PRT
<213> Rinovirus humano
5
<400> 18

Gly Ala Gln Val Ser Thr Gln Lys Ser Gly Ser His Glu Asn Gln Asn
1 5 10 15

Ile Leu Thr Asn Gly Ser Asn Gln Thr Phe Thr Val Ile Asn Tyr Tyr
20 25 30

ES 2 754 238 T3

Lys Asp Ala Ala Ser Thr Ser Ser Ala Gly Gln Ser Leu Ser Met Asp
35 40 45

Pro Ser Lys Phe Thr Glu Pro Val Lys Asp Leu Met Leu Lys Gly Ala
50 55 60

Pro Ala Leu Asn
65

REIVINDICACIONES

1. Una partícula similar a virus (VLP), que comprende las proteínas de cápside de rinovirus humano VP0, VP1 y VP3 o que comprende las proteínas de cápside de rinovirus humano VP1, VP2, VP3 y VP4.
2. La VLP de la reivindicación 1, en la que las proteínas de cápside se originan del mismo serotipo de rinovirus humano.
- 5 3. La VLP de la reivindicación 1, en la que las proteínas de cápside tienen su origen en dos o más serotipos diferentes de rinovirus humanos.
4. La VLP de cualquier reivindicación anterior, en la que una o más proteínas de cápside comprenden al menos una modificación que incrementa la capacidad de la VLP para inducir una respuesta inmunitaria de reactividad cruzada contra múltiples serotipos de rinovirus humanos, en comparación con una VLP en la que dicha modificación no está presente, en la que la modificación consiste en la inserción de al menos un péptido de una proteína de cápside rinoviral, siendo dicho péptido capaz de inducir una respuesta inmunitaria de reacción cruzada contra dos o más serotipos de rinovirus humanos.
- 10 5. La VLP de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la VLP comprende al menos una modificación que da como resultado la atenuación de un epítipo inmunodominante.
- 15 6. La VLP de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína VP0 tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en (a) la SEQ ID NO: 14; (b) una secuencia que tiene más de un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 14, (c) la SEQ ID NO: 14 que tiene adiciones o deleciones de 1-25 aminoácidos en cualquier extremo y (d) la SEQ ID NO: 14 que tiene sustituciones o deleciones de 1-50 aminoácidos dentro de la secuencia.
- 20 7. La VLP de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína VP1 tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en (a) la SEQ ID NO: 15, (b) una secuencia que tiene más de un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15, (c) la SEQ ID NO: 15 que tiene adiciones o deleciones de 1-25 aminoácidos en cualquier extremo y (d) la SEQ ID NO: 15 que tiene sustituciones o deleciones de 1-50 aminoácidos dentro de la secuencia.
- 25 8. La VLP de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína VP2 tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en (a) la SEQ ID NO: 16, (b) una secuencia que tiene más de un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 16, (c) la SEQ ID NO: 16 que tiene adiciones o deleciones de 1-25 aminoácidos en cualquier extremo y (d) la SEQ ID NO: 16 que tiene sustituciones o deleciones de 1-50 aminoácidos dentro de la secuencia.
- 30 9. La VLP de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína VP3 tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en (a) la SEQ ID NO: 17, (b) una secuencia que tiene más de un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17, (c) la SEQ ID NO: 17 que tiene adiciones o deleciones de 1-25 aminoácidos en cualquier extremo y (d) la SEQ ID NO: 17 que tiene sustituciones o deleciones de 1-50 aminoácidos dentro de la secuencia.
- 35 10. La VLP de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína VP4 tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en (a) la SEQ ID NO: 18, (b) una secuencia que tiene más de un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 18 de VP4 de HRV14, (c) la SEQ ID NO: 18 que tiene adiciones o deleciones de 1-25 aminoácidos en cualquier extremo y (d) la SEQ ID NO: 18 que tiene sustituciones o deleciones de 1-50 aminoácidos dentro de la secuencia.
- 40 11. Una composición inmunogénica que comprende la VLP de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. La VLP de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o la composición inmunogénica de la reivindicación 11 para su uso en un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria en un ser humano contra rinovirus humanos.
- 45 13. La VLP de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o la composición inmunogénica de la reivindicación 11 en la que la VLP se produce por un procedimiento para producir VLP rinovirales que comprende las etapas de:
 - a. producir constructos que codifican proteínas de cápside necesarias para la formación de una VLP, en la que cada una de las proteínas de cápside está codificada como una proteína de fusión con una proteína chaperona,
 - b. coexpresar dichos constructos en la misma célula hospedadora o expresar uno o más de dichos constructos en células hospedadoras separadas y
 - 50 c. lisar dichas células hospedadoras y reunir, en caso de expresión separada, todas las proteínas de cápside necesarias para un VLP.
14. La VLP o la composición inmunogénica de la reivindicación 13, en la que el procedimiento comprende adicionalmente la etapa d. eliminar dicha proteína chaperona.

15. La VLP o la composición inmunogénica de la reivindicación 13 en la que la proteína chaperona es una proteína modificadora pequeña relacionada con la ubiquitina (SUMO).

Fig. 1

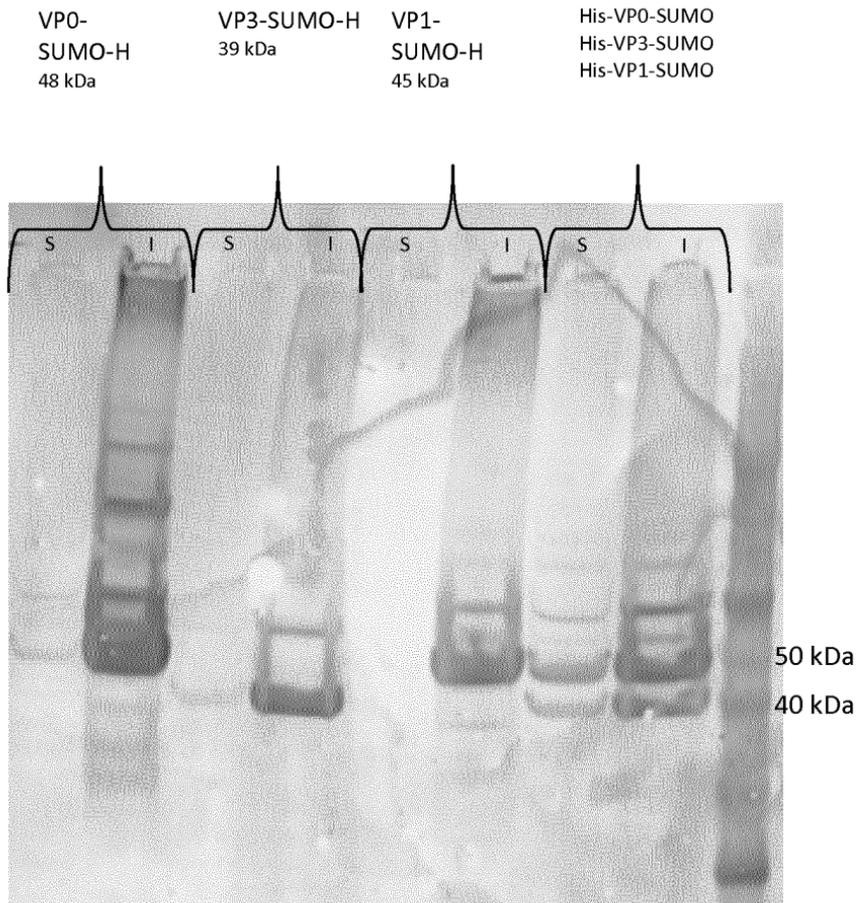


Fig. 2

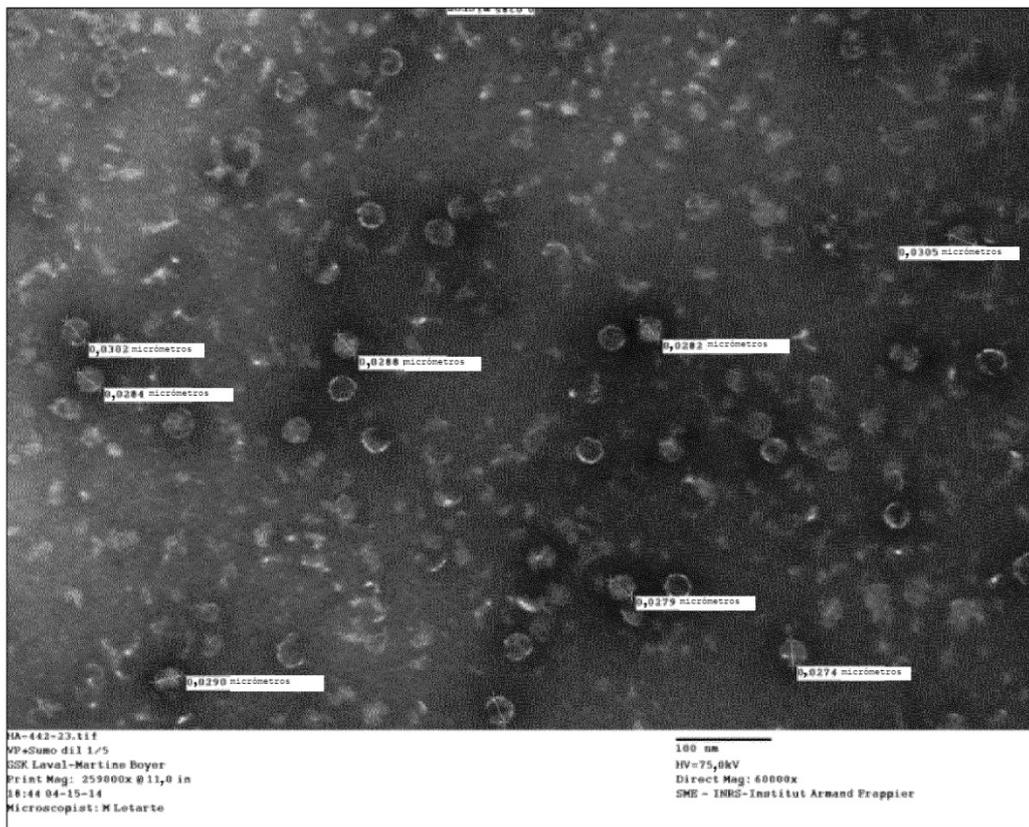
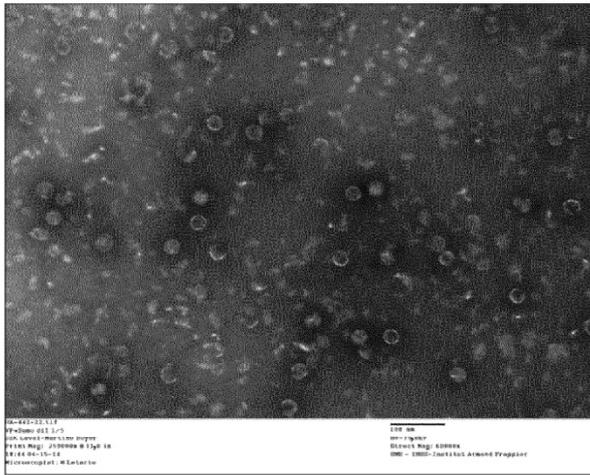


Fig. 3

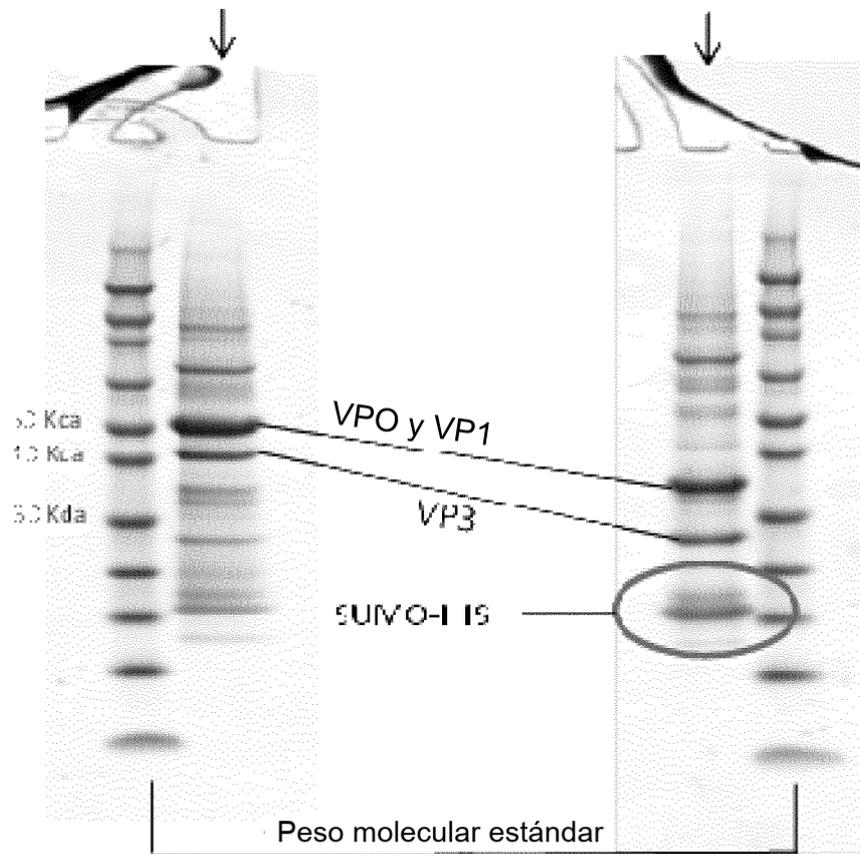


Fig 4.

