

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 893 542**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/12** (2006.01)

**C07K 14/005** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2017 PCT/IB2017/056147**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2018 WO18065931**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2017 E 17804940 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.07.2021 EP 3522919**

54 Título: **Vacuna**

30 Prioridad:

**05.10.2016 GB 201616904**

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

**09.02.2022**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)  
rue de l'Institut 89  
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**GERARD, CATHERINE MARIE GHISLAINE;  
GIANNINI, SANDRA y  
MASSAUX, JULIEN THIERRY**

74 Agente/Representante:

**ARIZTI ACHA, Monica**

ES 2 893 542 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

## 5 Antecedentes

La presente invención se refiere a composiciones inmunógenas para usar en la prevención o la mejora de la enfermedad causada por el rinovirus humano.

10 Los rinovirus humanos (HRV) son los agentes infecciosos víricos más frecuentes en los seres humanos y son la causa predominante del resfriado común. Los HRV también están relacionados con las exacerbaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), el desarrollo del asma, y, más recientemente, la bronquiolitis grave en bebés y niños, así como neumonía mortal en ancianos y en adultos inmunodeprimidos. Como consecuencia, el desarrollo de una vacuna contra el HRV es muy recomendable, pero los esfuerzos se ven obstaculizados por la existencia de más de 100 serotipos del HRV, con una variabilidad en la secuencia muy alta en los sitios antigénicos. Las respuestas inmunitarias humores son importantes para prevenir la infección por un HRV. La infección por un HRV en sujetos sin anticuerpos va seguida del desarrollo de anticuerpos séricos neutralizantes específicos del serotipo (IgG), así como de anticuerpos secretores (IgA) en las vías respiratorias. Los estudios de exposición en seres humanos han demostrado que los anticuerpos preexistentes específicos de tipo contra el HRV pueden proteger contra la infección por HRV (Alper *et al.*, 1998). Las respuestas celulares específicas de los CD4 se desarrollan como consecuencia de la infección por un HRV. Los linfocitos CD4 son en gran medida del tipo Th1 y su producción de IFN- $\gamma$  contribuye a la respuesta inmunitaria antiviral, pero estos linfocitos CD4 también podrían facilitar el desarrollo de la respuesta inmunitaria humoral.

25 La bibliografía indica que el cebado con la proteína VP0 del HRV16 adyuvada con IFA afectó directamente a la magnitud de los anticuerpos neutralizantes heterotípicos inducidos frente a la infección por rinovirus (Glanville *et al.*, 2013). En el documento WO 2014/122220, tomando como base los resultados de Glanville, se identificó que la proteína VP4 tenía una alta homología entre los HRV y, por lo tanto, se consideró responsable de los linfocitos T CD4 cooperadores inducidos por reacción cruzada por la VP0, que podrían acelerar la generación de anticuerpos neutralizantes tras las infecciones naturales por el HRV. En el documento WO 2016/134288, se identificaron los epítopos peptídicos de los linfocitos T CD4+.

35 El documento WO2014/145174 divulga antígenos del HRV derivados de proteínas de la cápside, tales como la VP2, y que son adecuados para usar en composiciones vacunales. El documento WO2016/042059 divulga partículas similivíricas (VLP) que comprenden proteínas de la cápside del HRV, tales como la VP2.

## Sumario

40 En el presente documento se proporcionan proteínas VP2 de un HRV útiles como componentes de composiciones inmunógenas para la inducción de una inmunidad celular con una amplia reactividad cruzada contra la infección por rinovirus. En algunas realizaciones, se proporciona una composición inmunógena que comprende la proteína VP2 de un HRV y un adyuvante, en donde dicha proteína VP2 está aislada, en donde dicho adyuvante comprende una saponina y un lipopolisacárido A, y en donde la proteína VP2 de un HRV es la proteína VP2 de un HRV del HRV39, o una variante inmunógena de la misma, con al menos un 90 % de identidad, a lo largo de toda la longitud, con la SEQ ID NO: 1.

50 En algunas realizaciones de la divulgación, se proporciona una secuencia de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la proteína VP2 de un HRV. En algunas realizaciones de la divulgación, se proporciona un vector que comprende dicha secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la proteína VP2 de un HRV, tal como un vector adenovírico. En algunas realizaciones de la divulgación, se proporciona una molécula de ARN autoamplificable que comprende la secuencia de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la proteína VP2 de un HRV, tal como un vector SAM. En realizaciones adicionales de la divulgación, se proporcionan composiciones inmunógenas que comprenden dichos vectores o secuencias de ácidos nucleicos.

55 En algunas realizaciones, se proporcionan dichas composiciones inmunógenas que comprenden la proteína VP2 de un HRV en combinación con un adyuvante, para usar en medicina, por ejemplo, para usar en la prevención o la mejora de una enfermedad o de los síntomas de una enfermedad causados por la infección por un HRV o asociados a ella en un sujeto, o, para usar en un sujeto para reducir el tiempo de recuperación y/o de disminuir la gravedad de la enfermedad causada por la infección de un HRV en un sujeto, o, para usar en un sujeto para reducir o prevenir los síntomas clínicos tras la infección por un HRV en el sujeto, o, para usar en un sujeto para inducir una respuesta inmunitaria de reacción cruzada contra al menos tres serotipos del HRV, tal como en donde al menos uno de los al menos tres serotipos del HRV pertenece al tipo A del HRV, y al menos otro de los al menos tres serotipos del HRV pertenece al tipo B del HRV o al tipo C del HRV.

En algunas realizaciones, la composición inmunógena es para usar en sujetos que padecen EPOC (tales como ancianos) o asma (tales como bebés o niños).

En algunas realizaciones, métodos para reducir el tiempo de recuperación y/o disminuir la gravedad de la enfermedad causada por la infección por un HRV en un sujeto que lo necesite, que comprenden administrar a dicho sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunógena como se divulga en el presente documento.

En algunas realizaciones, métodos para reducir o prevenir los síntomas clínicos tras la infección por un HRV en un sujeto que lo necesite, que comprenden administrar a dicho sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunógena como se divulga en el presente documento.

En algunas realizaciones, métodos para inducir una respuesta inmunitaria de reacción cruzada contra al menos tres serotipos del HRV en un sujeto que lo necesite, que comprenden administrar a dicho sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición inmunógena como se divulga en el presente documento.

### Breve descripción de las figuras

**Figura 1:** cuantificación del genoma de ARN monocatenario positivo en los líquidos del LBA el D2 después de la exposición intranasal al HRV1b; cada punto representa los valores individuales de un ratón ( $n = 5/\text{grupo}$ ) y los resultados se muestran con la mediana (líneas horizontales)

**Figura 2:** recuentos diferenciales de glóbulos blancos (linfocitos, neutrófilos, macrófagos, eosinófilos) en los líquidos del LBA recogidos 2 días después de la exposición al HRV1b. Cada punto representa los valores individuales de un ratón ( $n = 5/\text{grupo}$ ) y los resultados se muestran con la mediana (líneas horizontales).

**Figura 3:** los niveles de citocinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-6, IL-10 e IL-12p70) y de quimiocinas (MCP-1) secretadas en los líquidos del LBA se investigaron 2 días después de la exposición al HRV1b. Cada punto representa los valores individuales de un ratón ( $n = 5/\text{grupo}$ ) y los resultados se muestran con la mediana (líneas horizontales).

**Figura 4:** respuesta específica de los linfocitos T CD4+ tras la estimulación *in vitro* con péptidos VP2 del HRV39. Se muestran los datos para ratones individuales (puntos;  $n = 5/\text{grupo}$ ) con la mediana/grupo (línea horizontal).

**Figura 5:** respuesta específica de los linfocitos T CD4+ tras la estimulación *in vitro* con péptidos VP4 del HRV2. Se muestran los datos para ratones individuales (puntos;  $n = 5/\text{grupo}$ ) con la mediana/grupo (línea horizontal).

**Figura 6:** respuesta específica de los linfocitos T CD4+ tras la estimulación *in vitro* con péptidos VP4 del HRV39. Se muestran los datos para ratones individuales (puntos;  $n = 5/\text{grupo}$ ) con la mediana/grupo (línea horizontal).

**Figura 7:** respuesta específica de los linfocitos T CD4+ tras la estimulación *in vitro* con péptidos VP2 del HRV2. Se muestran los datos para ratones individuales (puntos;  $n = 5/\text{grupo}$ ) con la mediana/grupo (línea horizontal).

**Figura 8:** respuesta específica de los linfocitos T CD4+ tras la estimulación *in vitro* con péptidos VP2 del HRV14. Se muestran los datos para ratones individuales (puntos;  $n = 5/\text{grupo}$ ) con la mediana/grupo (línea horizontal).

**Figura 9:** respuesta específica de los linfocitos T CD4+ tras la estimulación *in vitro* con partículas UC del HRV25. Se muestran los datos para ratones individuales (puntos;  $n = 5/\text{grupo}$ ) con la mediana/grupo (línea horizontal).

**Figura 10:** respuesta específica de los linfocitos T CD4+ tras la estimulación *in vitro* con péptidos UC del HRV3. Se muestran los datos para ratones individuales (puntos;  $n = 5/\text{grupo}$ ) con la mediana/grupo (línea horizontal).

**Figura 11:** respuesta específica de los linfocitos T CD4+ tras la estimulación *in vitro* con partículas UC del HRV28. Se muestran los datos para ratones individuales (puntos;  $n = 5/\text{grupo}$ ) con la mediana/grupo (línea horizontal).

**Figura 12:** respuesta específica de los linfocitos T CD8+ tras la estimulación *in vitro* con partículas UC del HRV25. Se muestran los datos para ratones individuales (puntos;  $n = 5/\text{grupo}$ ) con la mediana/grupo (línea horizontal).

**Figura 13:** respuesta de anticuerpos neutralizantes específicos del HRV1b detectados antes y después de la exposición al HRV1b. Se muestran los datos para sueros agrupados de ratones (5 o 7 grupos de 3 ratones/grupo) con la mediana/grupo (línea horizontal).

**Figura 14:** producción de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T CD4+ CD44+ en ratones inmunizados con la VP2, la VP4 o la VP0 del HRV39; se indujo el IFN- $\gamma$  en ratones inmunizados con la VP2 y la VP0 del HRV39 en respuesta a grupos de péptidos generados a partir de la VP2 de virus HRV homólogos (14A) o heterólogos (14B, 14C, 14D o 14E). Los datos mostrados son de ratones individuales ( $n = 6$  por grupo), con la mediana indicada con una línea horizontal. De izquierda a derecha en cada figura, las columnas muestran los datos de los ratones inmunizados con la VP2 del HRV39, la VP4 del HRV39, la VP0 del HRV39, el virus HRV39 vivo y solución salina, respectivamente. Nótese las diferencias en el límite superior en el eje Y.

**Figura 15:** producción de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T CD4+ CD44+ en ratones inmunizados con la VP2, la VP4 o la VP0 del HRV39: se produjo poco o ningún IFN en respuesta a los grupos de péptidos generados a partir de la VP4 de tipos de HRV homólogos (15A) o heterólogos (15B, 15C, 15D, 15E). Los datos mostrados son de ratones individuales ( $n = 6$  por grupo), con la mediana indicada con una línea horizontal. De izquierda a derecha en cada figura, las columnas muestran los datos de los ratones inmunizados con la VP2 del HRV39, la VP4 del HRV39, la VP0 del HRV39, el virus HRV39 vivo y solución salina, respectivamente.

**Figura 16A:** alineaciones de la secuencia de aminoácidos de la proteína VP2 de los tipos de HRV usados en el ejemplo 4. Visión global del grado de conservación de cada aminoácido dentro de los tipos incluidos. La altura de la barra en la línea de "identidad" está directamente relacionada con el grado de conservación de ese aminoácido.

**Figura 16B:** gráfico cromático de los tipos de HRV usados en el ejemplo 4, que muestra el porcentaje de identidad a nivel de aminoácidos mediante comparaciones por parejas.

**Figura 16C:** alineaciones de aminoácidos en texto para los tipos de HRV usados en el ejemplo 4; HRV\_39-VP2 (SEQ ID NO: 1), HRV\_89-VP2 (SEQ ID NO: 15), HRV\_1B-VP2 (SEQ ID NO: 16), HRV\_02-VP2 (SEQ ID NO: 17) y HRV\_14-VP2 (SEQ ID NO: 18).

## Descripción detallada

### Construcciones de la proteína VP2 de un HRV

Se proporcionan construcciones de la proteína VP2 de un HRV útiles como componente antigénico de composiciones inmunógenas para la inducción de una respuesta inmunitaria de reacción cruzada en un sujeto contra el rinovirus humano (HRV). Como se utiliza en el presente documento, el término "antígeno" se refiere a una molécula que contiene uno o más epítomos (por ejemplo, lineal, conformacional o ambos) que estimularán el sistema inmunitario de un hospedador para que cree una respuesta inmunológica humoral y/o celular específica frente al antígeno (es decir, una respuesta inmunitaria que reconozca específicamente un polipéptido natural). Un "epítomo" es aquella porción de un antígeno que determina su especificidad inmunológica. Los epítomos de los linfocitos T y B pueden identificarse empíricamente (por ejemplo, usando PEPSCAN o métodos similares). En el contexto de la invención, inducir una "respuesta inmunitaria de reacción cruzada" significa que se induce una respuesta inmunitaria tanto contra el tipo de HRV como contra el antígeno del HRV de la composición inmunógena, por ejemplo, la proteína VP2 de un HRV de la invención, deriva (es decir, una respuesta inmunitaria homóloga), y, es contra uno o más tipos de HRV diferentes del tipo de HRV del que deriva el antígeno del HRV de la composición inmunógena (es decir, respuesta inmunitaria heteróloga). En una realización, la composición inmunógena de la invención induce una respuesta inmunitaria frente a serotipos tanto homólogos como heterólogos de los rinovirus humanos.

Para el fin de la presente invención, las expresiones "construcción de la proteína VP2 de un HRV", "proteína VP2 de un rinovirus humano" o "proteína VP2 de un HRV" o "proteína VP2" se usan indistintamente y se refieren a cualquier secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside VP2 de cualquier serotipo del HRV. Las variantes inmunógenas de una construcción de la proteína VP2 de un HRV son secuencias de aminoácidos con al menos o exactamente el 75 %, el 77 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 % o el 99 % de identidad, a lo largo de toda la longitud, con respecto a la secuencia natural de la VP2 de un HRV. La proteína VP2 tiene aproximadamente 270 aminoácidos de longitud. La tabla 1 indica los números de registro de uniprot de las secuencias de poliproteínas del genoma completo para los serotipos del HRV seleccionados entre los tres subtipos. En general, la proteína VP2 está situada entre los aminoácidos 70 y 339 del precursor de la poliproteína. Por lo tanto, tomando como base estas secuencias, el experto puede derivar las secuencias de las proteínas VP2 y/o VP4 naturales del HRV para los serotipos del HRV, para usar en los presentes ejemplos y en la presente invención.

Como sabrá también el experto en la materia, la longitud de la secuencia de aminoácidos de la proteína VP2 puede variar ligeramente de acuerdo con el serotipo del HRV. Por ejemplo, la proteína VP2 del HRV39 natural corresponde a los aminoácidos 70 a 334 de la secuencia de la VP0 del HRV39 natural (SEQ ID NO: 4).

Se han identificado tres especies de HRV en las que se clasifican los más de cien tipos, es decir, HRV-A, HRV-B y HRV-C.

La especie HRV-A incluye, en particular, los siguientes serotipos: HRV1a, HRV1b, HRV2, HRV7, HRV8, HRV9, HRV10, HRV11, HRV12, HRV13, HRV15, HRV16, HRV18, HRV19, HRV20, HRV21, HRV22, HRV23, HRV24, HRV25, HRV28, HRV29, HRV30, HRV31, HRV32, HRV33, HRV34, HRV36, HRV38, HRV39, HRV40, HRV41, HRV43, HRV44, HRV45, HRV46, HRV47, HRV49, HRV50, HRV51, HRV53, HRV54, HRV55, HRV56, HRV57, HRV58, HRV59, HRV60, HRV61, HRV62, HRV63, HRV64, HRV65, HRV66, HRV67, HRV68, HRV71, HRV73, HRV74, HRV75, HRV76, HRV77, HRV78, HRV80, HRV81, HRV82, HRV85, HRV88, HRV89, HRV90, HRV94, HRV95, HRV96, HRV98, HRV100, HRV101, HRV102 y HRV103.

La especie HRV-B incluye, en particular, los siguientes serotipos: HRV3, HRV4, HRV5, HRV6, HRV14, HRV17, HRV26, HRV27, HRV35, HRV37, HRV42, HRV48, HRV52, HRV69, HRV70, HRV72, HRV79, HRV83, HRV84, HRV86, HRV91, HRV92, HRV93, HRV97 y HRV99.

La especie HRV-C incluye, en particular, los siguientes serotipos: HRV-C1, HRV-C2, HRV-C3, HRV-C4, HRV-C5, HRV-C6, HRV-C7, HRV-C8, HRV-C9, HRV-C10, HRV-C11, HRV-C12, HRV-C13, HRV-C14, HRV-C15, HRV-C16, HRV-C17, HRV-C18, HRV-C19, HRV-C20, HRV-C21, HRV-C22, HRV-C23, HRV-C24, HRV-C25, HRV-C26, HRV-C27, HRV-C28, HRV-C29, HRV-C30, HRV-C31, HRV-C32, HRV-C33, HRV-C34, HRV-C35, HRV-C36, HRV-C37, HRV-C38, HRV-C39, HRV-C40, HRV-C41, HRV-C42, HRV-C43, HRV-C44, HRV-C45, HRV-C46, HRV-C47, HRV-C48 y HRV-C49.

Tabla 1

| Subtipo | HRV    | Registro de Uniprot | Subtipo | HRV                | Registro de Uniprot |
|---------|--------|---------------------|---------|--------------------|---------------------|
| A       | HRV1   | B9V432              | A       | HRV75              | A5GZF9              |
| A       | HRV10  | A5GZE7              | A       | HRV76              | B9V4A3              |
| A       | HRV100 | B9V496              | A       | HRV77              | B9V475              |
| A       | HRV101 | D2IW01              | A       | HRV78              | B9V4A4              |
| A       | HRV11  | A7KC06              | A       | HRV8               | B9V434              |
| A       | HRV12  | A7KC07              | A       | HRV80              | B9V477              |
| A       | HRV13  | B9V437              | A       | HRV81              | B9V478              |
| A       | HRV15  | A5GZE2              | A       | HRV82              | B9V481              |
| A       | HRV16  | Q82122              | A       | HRV85              | B9V484              |
| A       | HRV18  | B9V439              | A       | HRV88              | A5GZF3              |
| A       | HRV19  | B9V440              | A       | HRV89              | P07210              |
| A       | HRV1B  | P12916              | A       | HRV9               | B9V436              |
| A       | HRV2   | P04936              | A       | HRV90              | B9V488              |
| A       | HRV20  | B9V441              | A       | HRV94              | B9V4A6              |
| A       | HRV21  | B9V442              | A       | HRV95              | B9V491              |
| A       | HRV22  | B9V443              | A       | HRV96              | B9V492              |
| A       | HRV23  | A5GZE6              | A       | HRV98              | B9V494              |
| A       | HRV24  | B9V4B1              | B       | HRV14              | P03303              |
| A       | HRV25  | B9V444              | B       | HRV17              | A7KC12              |
| A       | HRV28  | A5GZF7              | B       | HRV26              | B9V445              |
| A       | HRV29  | B9V446              | B       | HRV27              | A7KC13              |
| A       | HRV30  | B9V4A0              | B       | HRV3               | A7KC14              |
| A       | HRV31  | B9V447              | B       | HRV35              | B9V4A8              |
| A       | HRV32  | B9V448              | B       | HRV37              | A7KC15              |
| A       | HRV33  | B9V449              | B       | HRV4               | A5GZD9              |
| A       | HRV34  | B9V4B0              | B       | HRV42              | B9V451              |
| A       | HRV36  | A5GZF4              | B       | HRV48              | A5GZD7              |
| A       | HRV38  | A5GZE4              | B       | HRV5               | B9V433              |
| A       | HRV39  | Q5XLP5              | B       | HRV52              | B9V458              |
| A       | HRV40  | B9V450              | B       | HRV6               | A5GZD5              |
| A       | HRV41  | A5GZE0              | B       | HRV69              | B9V472              |
| A       | HRV43  | B9V452              | B       | HRV70              | A5GZD8              |
| A       | HRV44  | A5GZE8              | B       | HRV72              | D6PT65              |
| A       | HRV45  | B9V453              | B       | HRV79              | B9V476              |
| A       | HRV46  | A5GZF5              | B       | HRV83              | B9V482              |
| A       | HRV47  | B9V454              | B       | HRV84              | B9V483              |
| A       | HRV49  | B9V455              | B       | HRV86              | B9V485              |
| A       | HRV50  | B9V456              | B       | HRV91              | B9V489              |
| A       | HRV51  | B9V457              | B       | HRV92              | B9V490              |
| A       | HRV53  | A5GZF6              | B       | HRV93              | A7KC17              |
| A       | HRV54  | B9V459              | B       | HRV97              | B9V493              |
| A       | HRV55  | A5GZG0              | B       | HRV99              | B9V495              |
| A       | HRV56  | B9V461              | C       | HRVC-11            | C5HDF8              |
| A       | HRV57  | B9V462              | C       | HRVC - CEPA CU072  | E9LS20              |
| A       | HRV58  | B9V463              | C       | HRVC - CU184       | E9LS23              |
| A       | HRV59  | A5GZE9              | C       | HRVC-15            | E5D8F2              |
| A       | HRV60  | B9V464              | C       | HRVC-24            | A8S322              |
| A       | HRV61  | B9V465              | C       | HRVC-25            | A8S330              |
| A       | HRV62  | B9V466              | C       | HRVC-26            | A8S334              |
| A       | HRV63  | B9V467              | C       | HRVC - CEPA NAT045 | A7TUB2              |
| A       | HRV64  | B9V4A2              | C       | HRVC - CEPA NAT001 | A7TUB1              |
| A       | HRV65  | B9V468              | C       | HRVC - CEPA NY-074 | A0MHB7              |
| A       | HRV66  | B9V469              | C       | HRVC-04            | C7DUC6              |
| A       | HRV67  | B9V470              | C       | HRVC-10            | C7DUC7              |
| A       | HRV68  | B9V471              | C       | HRVC-03            | A4UHT9              |
| A       | HRV7   | B9V497              | C       | HRVC - CEPA QCE    | C9DDK2              |
| A       | HRV71  | B9V473              | C       | HRVC-54            | A0A0B5HPB2          |
| A       | HRV73  | A5GZE1              | C       | HRVC-35            | H8Y6P9              |
| A       | HRV74  | A5GZE3              |         |                    |                     |

Los tipos de HRV también pueden agruparse, de acuerdo con el uso de los receptores, en virus del grupo menor y virus del grupo mayor. Los virus del grupo menor, tales como el HRV2, usan la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad como receptor. Son lábiles a los ácidos y tienen una dependencia absoluta de un pH bajo para la

desencapsidación. Los virus del grupo mayor, tales como el HRV14 y el HRV16, usan la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) como receptor. Generalmente son lábiles a los ácidos pero, a diferencia de los virus del grupo menor, no tienen una dependencia absoluta de un pH bajo para la desencapsidación. Como es bien conocido por el experto en la materia, los HRV del grupo menor incluyen 11 serotipos, que incluyen HRV1A, HRV1B, HRV2, HRV23, HRV25, HRV29, HRV30, HRV31, HRV44, HRV47, HRV49 y HRV62.

Para los fines de la invención, la proteína VP2 de un HRV es la proteína VP2 del HRV39 (SEQ ID NO: 1) o una variante inmunógena de la misma con al menos el 90 %, el 95 %, el 97 % o el 99 % de identidad, a lo largo de toda la longitud, con la SEQ ID NO: 1.

La identidad u homología con respecto a una secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos de la secuencia candidata que son idénticos a la secuencia de aminoácidos de referencia después de alinear las secuencias y de introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia.

La identidad de secuencia puede determinarse mediante los métodos convencionales que se usan habitualmente para comparar la similitud en la posición de los aminoácidos de dos polipéptidos. Usando un programa informático tal como BLAST o FASTA, se alinean dos polipéptidos para lograr una coincidencia óptima de sus respectivos aminoácidos (ya sea a lo largo de toda la longitud de una o de ambas secuencias o a lo largo de una porción predeterminada de una o de ambas secuencias). Los programas proporcionan una penalización de apertura por defecto y una penalización de hueco por defecto, y puede usarse una matriz de puntuación tal como PAM 250 [una matriz de puntuación convencional; véase Dayhoff *et al.*, en Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, sup. 3 (1978)] junto con el programa informático. Por ejemplo, el porcentaje de identidad se puede calcular a continuación como: el número total de coincidencias idénticas multiplicado por 100 y dividido a continuación por la suma de la longitud de la secuencia más larga dentro del tramo coincidente y el número de huecos introducidos en las secuencias más cortas para alinear las dos secuencias.

Cuando se hace referencia a una secuencia en el presente documento mediante un código de registro de UniProt o Genbank, la secuencia a la que se hace referencia es la versión en la fecha de presentación de la presente solicitud.

Las proteínas VP2 de un HRV descritas en el presente documento están adecuadamente aisladas. Una proteína VP2 de un HRV "aislada" es aquella que se ha retirado de su entorno original. De manera similar, los polinucleótidos descritos en el presente documento están adecuadamente aislados. Por ejemplo, una proteína natural está aislada si está separada de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Un polinucleótido se considera aislado si, por ejemplo, está clonado en un vector que no forma parte de su entorno natural o si está comprendido dentro de un ADNc.

En una realización, una variante inmunógena de la proteína VP2 de un HRV corresponde a la proteína VP2 de un HRV en donde se puede insertar, sustituir o delecionar una secuencia de aminoácidos de hasta 25, o de hasta 20, aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos. En una realización más específica, dicha inserción, sustitución o delección se localiza en aquellas partes de las secuencias de aminoácidos de la proteína VP2 que corresponden a regiones muy variables de la proteína VP2 de un HRV. Las regiones de la proteína VP2 de un HRV adecuadas para dicha inserción, sustitución o delección incluyen los aa 155-170 (es decir, el bucle N1m-II), los aa 134-146, los aa 232-238 y los aa 72-75, la numeración de cada uno de los cuales se basa en la secuencia de completa de la VP2 del HRV39 (SEQ ID NO: 1). En una realización particular, una inserción, delección y/o sustitución se localiza en los aa 155-170 (es decir, el bucle N1m-II). En una realización específica, la proteína VP2 de un HRV es la proteína VP2 del HRV39 que tiene una mutación en su bucle N1m-II (SEQ ID NO: 2) o una variante inmunógena de la misma con al menos el 90 %, el 95 %, el 97 % o el 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 2, a lo largo de toda la longitud. Alternativamente, una inserción, delección y/o sustitución se localiza en el extremo carboxílico de la VP2.

En una realización adicional, se inserta o se sustituye un péptido de un HRV en una de dichas regiones muy variables de la proteína VP2 de un HRV; el péptido deriva de una de las proteínas de la cápside del HRV, la VP1, la VP2, la VP3 o la VP4, y es capaz de inducir una respuesta inmunitaria de reacción cruzada y/o de neutralización cruzada frente a dos o más serotipos del HRV. Dichos péptidos se seleccionan o derivan de regiones conservadas de las proteínas estructurales de los rinovirus humanos. Se puede conseguir una respuesta de reacción cruzada y/o neutralizante cuando la secuencia de aminoácidos del HRV tiene una longitud limitada. Por lo tanto, el péptido del HRV puede consistir en un fragmento de 5 a 40 aminoácidos contiguos, o de 8 a 30 aminoácidos contiguos, de una proteína de la cápside del HRV natural de longitud completa (la VP1, la VP2, la VP3 o la VP4). De manera favorable, el péptido del HRV consiste en no más de 20 aminoácidos, tal como de 8 a 20 aminoácidos, por ejemplo, 16 aminoácidos. En cualquier realización, un péptido del HRV o una variante del mismo tendrá una longitud mínima de 8 aminoácidos.

La proteína VP2 de la invención puede incluir o comprender fragmentos de aminoácidos o péptidos del HRV que han

sido descritos en la bibliografía. Por ejemplo, se ha demostrado que los anticuerpos inducidos con fragmentos de aminoácidos recombinantes de la VP1 del HRV-14 u 89 que abarcan los aminoácidos 147-162 de la VP1 del HRV14 presentan una actividad específica y de neutralización cruzada (McCray & Werner, 1998 Nature, 22-28 de octubre; 329 (6141): 736-8; Edlmayr *et al.*, 2011, Eur. Respir. J. 37: 44-52). Se ha observado que la estructura de la cápside del rinovirus es dinámica y parece oscilar entre dos estados estructurales diferentes: uno en la que la VP4 está profundamente enterrada, y otro donde el aminoterminal de la VP4 y de la VP1 son accesibles a las proteasas (Lewis *et al.* 1998, Proc Natl Acad Sci U S A. 95 (12): 6774-8). Se averiguó que los anticuerpos creados contra los 30 aminoácidos aminoterminales de la VP4, pero no de la VP1, neutralizaron satisfactoriamente la infectividad vírica *in vitro* (Katpally *et al.*, 2009, J Virol. 83 (14): 7040-8). Se averiguó que los anticuerpos creados contra los 30 aminoácidos aminoterminales de la VP4 neutralizaban el HRV14, el HRV16 y el HRV29. Además, los anticuerpos creados contra una secuencia consenso de los primeros 24 restos de la VP4 de rinovirus también tuvieron cierta actividad de neutralización cruzada (Katpally *et al.*, 2009, J Virol. 83 (14): 7040-8).

En la bibliografía se pueden encontrar otras descripciones de péptidos y/o epítomos del HRV, en: Niespodziana *et al.*, 2012 (The FASEB Journal. Vol 26, 1001-1008) en el que una respuesta contra un 20 mer aminoterminal de la VP1 no era una respuesta neutralizante, es decir, un epítomo no protector; Miao *et al.*, 2009, (J. Clin. Microbiol. vol. 47, n.º 10, 3108-3113) - MABs generated against the N terminal part of enterovirus VP1 which is highly conserved are useful in recognizing a broad range of enteroviruses; el documento WO 2006/078648 relativo a vacunas peptídicas contra el HRV derivadas de regiones expuestas temporalmente de la VP4, en particular los aminoácidos 1-31 o 1-24 de la VP4; el documento WO 2011/050384 relativo a los péptidos del extremo amínico de la VP1 que incluyen los aminoácidos 1-8; el documento WO 2008/057158 relativo al N1m IV de rinovirus, en particular, un péptido que comprende los aminoácidos 277-283 o 275-285 de la región carboxiterminal de la VP1, en particular, del HRV-14.

Se han identificado péptidos adicionales del HRV derivados de las secuencias aminoterminales de la VP1 y la VP4, es decir, fragmentos de aminoácidos del HRV que comprenden los aminoácidos 32-45 de la VP1 y fragmentos de aminoácidos del HRV que comprenden los aminoácidos 1-16 de la VP4, o variantes de los mismos que tienen 1-4 adiciones o deleciones de aminoácidos en cualquiera de los extremos y/o 1-2 sustituciones o adiciones o deleciones de aminoácidos con la secuencia peptídica. Cuando una variante de una secuencia peptídica tiene de 1-4 adiciones o deleciones de aminoácidos en cualquiera de los extremos y/o de 1 a 2 sustituciones o adiciones o deleciones de aminoácidos dentro de la secuencia peptídica, esto significa que la variante tiene al menos un aminoácido de diferencia en comparación con la secuencia peptídica de referencia, lo que puede incluir entre 0 y 4 adiciones o deleciones de aminoácidos en un extremo y entre 0 y 4 adiciones o deleciones en el otro extremo, y entre 0 y 2 sustituciones o adiciones o deleciones de aminoácidos dentro de la secuencia.

En una realización, un péptido consiste en al menos 8 y no más de 20 aminoácidos del extremo amínico de la VP4, péptido del HRV que incluye los aminoácidos 1-16 de la VP4 o una variante de los aminoácidos 1-16 que tiene 1-4 adiciones o deleciones de aminoácidos en cualquiera de los extremos y/o 1-2 sustituciones o adiciones o deleciones de aminoácidos dentro de la secuencia peptídica. En una realización particular, el péptido VP4 de un HRV consiste en los aminoácidos 1-16 de la VP4 o una variante que tiene una, dos, tres o cuatro adiciones o deleciones o sustituciones de aminoácidos. Algunos fragmentos de aminoácidos específicos adicionales de la VP4 de un HRV incluyen, por ejemplo, los aminoácidos 1 a [16-20], los aminoácidos 2 a [17-21], del 3 a [18-22], del 4 a [19-23], del 5 a [20-24], en donde se entenderá que los números entre corchetes incluyen todos los números en el intervalo especificado individualmente. De manera favorable, el péptido VP4 de un HRV consiste en no más de 16 aminoácidos contiguos de la VP4. Debe entenderse que la numeración del péptido VP4 de un HRV o de cualquier péptido o proteína (expresados recombinantemente) como se utiliza en el presente documento es independiente de la metionina, debido al codón de inicio.

En otra realización, un péptido de un HRV consiste en al menos 8 y no más de 40 aminoácidos de la región aminoterminal de la VP1, péptido de un HRV que incluye los aminoácidos 32-45 de la VP1 o una variante de los aminoácidos 32-45 que tiene 1-4 adiciones o deleciones de aminoácidos en cualquiera de los extremos y/o 1-2 sustituciones o adiciones o deleciones de aminoácidos dentro de la secuencia peptídica. En una realización particular, el fragmento de aminoácidos de la VP1 de un HRV consiste en los aminoácidos 32-45 de la VP4 o una variante que tiene una, dos, tres o cuatro adiciones o deleciones o sustituciones de aminoácidos. Los péptidos VP1 incluyen, por ejemplo, los aminoácidos [5-35] a 45, [6-35] a 46, [7-35] a 47, [8-35] a 48, [9-35] a 49 y, de forma similar, 32 a [45-72], 33 a [45-73], 34 a [45-74], 35 a [45-75] y 36 a [45-76], en donde los números entre corchetes incluyen todos los números en el intervalo especificado individualmente.

Los péptidos de un HRV para el fin de la invención incluyen, por tanto:

- los aminoácidos 147-162 de la VP1 del HRV14 o una variante de los aminoácidos 147-162 de la VP1 del HRV14 que tenga 1-4 adiciones o deleciones de aminoácidos en cualquiera de los extremos y/o 1-2 sustituciones o adiciones o deleciones de aminoácidos dentro de la secuencia peptídica;
- los aminoácidos 1-30 de la VP4 del HRV14 o una variante de los aminoácidos 1-30 de la VP4 del HRV14 que tenga 1-4 adiciones o deleciones de aminoácidos en cualquiera de los extremos y/o 1-2 sustituciones o adiciones

- o deleciones de aminoácidos dentro de la secuencia peptídica;
- los aminoácidos 1-24 de la VP4 del HRV14 o una variante de los aminoácidos 1-24 de la VP4 del HRV14 que tenga 1-4 adiciones o deleciones de aminoácidos en cualquiera de los extremos y/o 1-2 sustituciones o adiciones o deleciones de aminoácidos dentro de la secuencia peptídica;
- 5 - los aminoácidos 1-8 de la VP1 del HRV14 o una variante de los aminoácidos 1-8 de la VP1 del HRV14 que tenga 1-4 adiciones o deleciones de aminoácidos en cualquiera de los extremos y/o 1-2 sustituciones o adiciones o deleciones de aminoácidos dentro de la secuencia peptídica;
- los aminoácidos 277-283 de la VP1 del HRV14 o una variante de los aminoácidos 277-283 de la VP1 del HRV14 que tenga 1-4 adiciones o deleciones de aminoácidos en cualquiera de los extremos y/o 1-2 sustituciones o adiciones o deleciones de aminoácidos dentro de la secuencia peptídica;
- 10 - los aminoácidos 275-285 de la VP1 del HRV14 o una variante de los aminoácidos 275-285 de la VP1 del HRV14 que tenga 1-4 adiciones o deleciones de aminoácidos en cualquiera de los extremos y/o 1-2 sustituciones o adiciones o deleciones de aminoácidos dentro de la secuencia peptídica;
- los aminoácidos 32-45 de la VP1 o una variante de los aminoácidos 32-45 que tenga 1-4 adiciones o deleciones de aminoácidos en cualquiera de los extremos y/o 1-2 sustituciones o adiciones o deleciones de aminoácidos dentro de la secuencia peptídica;
- 15 - los aminoácidos 1-16 de la VP4 o una variante de los aminoácidos 1-16 que tenga 1-4 adiciones o deleciones de aminoácidos en cualquiera de los extremos y/o 1-2 sustituciones o adiciones o deleciones de aminoácidos dentro de la secuencia peptídica.

En una realización particular, el péptido de un HRV deriva de la VP1 y tiene o comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

HRV14 (B): 32-PILTANETGATMPV-45 (SEQ ID NO: 5)  
 HRV8 (A-M): 32-PALDAAETGHTSSV-45 (SEQ ID NO: 6)  
 HRV25 (A-m): 32-PILDAAETGHTSNV-45 (SEQ ID NO: 7)  
 HRV\_C\_026: 32-QALGAVEIGATADV-45 (SEQ ID NO: 8)

o una variante de las mismas que tenga 1-4 adiciones o deleciones de aminoácidos en cualquiera de los extremos y/o 1-2 sustituciones o adiciones o deleciones de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos.

En otra realización particular, el péptido de un HRV deriva de la VP4 y tiene o comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

HRV14 (B): 1-GAQVSTQKSGSHENQN-16 (SEQ ID NO: 9)  
 HRV100 (A-M): 1-GAQVSRQNVGTHSTQN-16 (SEQ ID NO: 10)  
 HRV\_C\_026: 1-GAQVSRQSVGSHETMI-16 (SEQ ID NO: 11)

o una variante de las mismas que tenga 1-4 adiciones o deleciones de aminoácidos en cualquiera de los extremos y/o 1-2 sustituciones o adiciones o deleciones de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos. Para el fin de la presente invención, las variantes inmunógenas consisten en o comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos o exactamente el 75 %, el 77 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 % o el 99 % de identidad, a lo largo de toda la longitud, con respecto a la secuencia natural.

En una realización particular adicional, los péptidos derivados de la VP2 del HRV2 pueden introducirse en la proteína VP2, en donde el péptido derivado de la VP2 del HRV2 se selecciona entre:

SSKGWWWKLPDALKDMGIFGENMFYHYLGRS (VP2 del HRV2, aa 143-173) (SEQ ID NO: 12),  
 IPEHQIASALHGNVNVGYNYTHPGETGREVK (VP2 del HRV2, aa 196-226) (SEQ ID NO: 13), y  
 INTIPITISIPMCAEFSGARAKRQGLPVFI (VP2 del HRV2, aa 306-336) (SEQ ID NO: 14).

En una realización, la composición no comprende una proteína VP4 (o un polinucleótido que comprende una secuencia de un ácido nucleico que codifica la proteína VP4 de un HRV). Para el fin de la presente invención, la expresión "proteína VP4 del rinovirus humano" o "proteína VP4 del HRV" o "proteína VP4" se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside de la VP4 de cualquier serotipo del HRV, así como a una variante de la misma, en donde la variante es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la VP4 de un HRV.

La proteína VP2 de un HRV puede sintetizarse químicamente usando técnicas convencionales, o producirse recombinantemente.

#### Proteína VP2 de un HRV adyuvada

La composición inmunógena o vacuna comprende la proteína VP2 de un HRV como se define en el presente

documento y en combinación con un adyuvante, en donde dicho adyuvante comprende una saponina y un lipopolisacárido A.

Para el fin de la presente invención, el término "adyuvante" se refiere a un compuesto o a una composición que potencia la respuesta inmunitaria frente a un antígeno, tal como la respuesta inmunitaria frente a la proteína VP2 de un HRV en un sujeto humano. Algunos ejemplos de adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvantes inorgánicos (por ejemplo, sales metálicas inorgánicas tales como fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio), adyuvantes orgánicos (por ejemplo, saponinas, tales como QS21 o escualeno), adyuvantes a base de aceite (por ejemplo, el adyuvante completo de Freund y el adyuvante incompleto de Freund), citocinas (por ejemplo, IL-1  $\beta$ , IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, GM-CSF e INF- $\gamma$ ), adyuvantes particulados (por ejemplo, complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), liposomas o microesferas biodegradables), virosomas, adyuvantes bacterianos (por ejemplo, monofosforil lípido A, tal como monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL), o péptidos de muramilo), adyuvantes sintéticos (por ejemplo, copolímeros en bloque no iónicos, análogos del péptido de muramilo o el lípido A sintético), adyuvantes polinucleotídicos sintéticos (por ejemplo, poliarginina o polilisina) y oligonucleótidos inmunoestimulantes que contienen dinucleótidos CpG no metilados ("CpG").

En el presente documento, el adyuvante es un adyuvante que contiene saponina. Una saponina adecuada para usar en la presente invención es Quil A y sus derivados. La Quil A es una preparación de saponina aislada a partir del árbol sudamericano *Quillaja saponaria* Molina, y fue la primera que se describió con actividad adyuvante por Dalsgaard *et al.* en 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, vol. 44, Springer Verlag, Berlín, págs. 243-254). Se han aislado fragmentos purificados de Quil A mediante HPLC que conservan la actividad adyuvante sin la toxicidad asociada con la Quil A (documento EP 0 362 278), por ejemplo, QS7 y QS21 (también conocidas como QA7 y QA21). La QS-21 es una saponina natural derivada de la corteza de *Quillaja saponaria* Molina, que induce los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+, los linfocitos Th1 y una respuesta de anticuerpos predominante de la IgG2a, y es una saponina preferida en el contexto de la presente invención. En una forma adecuada de la presente invención, el adyuvante de saponina dentro de la composición inmunógena es un derivado de la quil A de *Quillaja saponaria* Molina, preferentemente una fracción inmunológicamente activa de la Quil A, tal como QS-7, QS-17, QS-18 o QS-21, adecuadamente, QS-21.

En una realización, la saponina comprende una combinación de fracciones de saponina tal como la divulgada en el documento WO 1996/011711. Alternativamente, se consideran útiles las saponinas (semi)sintéticas, tales como las revisadas por Govind Ragupathi *et al.* (Expert Rev Vaccines 2011; 10 (4): 463-470).

La saponina se proporciona normalmente en su composición menos reactógena, donde se inactiva con un esteroil exógeno, tal como colesterol. Algunos esteroides adecuados incluyen  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ergocalciferol y colesterol. Estos esteroides son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el colesterol se divulga en el Índice Merck, 11ª ed., página 341, como un esteroil natural que se encuentra en la grasa animal. Existen varias formas particulares de composiciones menos reactógenas en donde la QS21 se inactiva con un esteroil exógeno tal como colesterol. En una realización, la saponina/esteroil se presenta en una estructura de formulación liposomal. En el documento WO 96/33739 se describen métodos para obtener saponina/esteroil en una formulación liposomal, en particular el ejemplo 1.

Una saponina, tal como QS21, puede usarse en unas cantidades de entre 1 y 100  $\mu\text{g}$  por dosis en seres humanos de la composición adyuvante. La QS21 puede usarse a un nivel de aproximadamente 50  $\mu\text{g}$ , tal como de al menos 40  $\mu\text{g}$ , de al menos 45  $\mu\text{g}$  o de al menos 49  $\mu\text{g}$ , o, menos de 100  $\mu\text{g}$ , menos de 80  $\mu\text{g}$ , menos de 60  $\mu\text{g}$ , menos de 55  $\mu\text{g}$  o menos de 51  $\mu\text{g}$ . Algunos ejemplos de intervalos adecuados son entre 40-60  $\mu\text{g}$ , adecuadamente entre 45-55  $\mu\text{g}$  o entre 49 y 51  $\mu\text{g}$  o 50  $\mu\text{g}$ . En una realización adicional, la dosis en seres humanos de la composición adyuvante comprende QS21 a un nivel de aproximadamente 25  $\mu\text{g}$ , tal como de al menos 20  $\mu\text{g}$ , de al menos 21  $\mu\text{g}$ , de al menos 22  $\mu\text{g}$  o de al menos 24  $\mu\text{g}$ , o, menos de 30  $\mu\text{g}$ , menos de 29  $\mu\text{g}$ , menos de 28  $\mu\text{g}$ , menos de 27  $\mu\text{g}$  o menos de 26  $\mu\text{g}$ . Algunos ejemplos de intervalos menores incluyen entre 20-30  $\mu\text{g}$ , adecuadamente entre 21-29  $\mu\text{g}$  o entre 22-28  $\mu\text{g}$  o entre 28 y 27  $\mu\text{g}$  o entre 24 y 26  $\mu\text{g}$ , o 25  $\mu\text{g}$ .

Cuando la fracción de saponina activa es la QS21 y se incluye un esteroil, la relación de QS21:esteroil será normalmente del orden de 1:100 a 1:1 (p/p), adecuadamente de 1:10 a 1:1 (p:p) y preferentemente de 1:5 a 1:1 (p/p). Adecuadamente, hay presente un exceso de esteroil, siendo la relación de QS21:esteroil de al menos 1:2 (p/p). En una realización, la relación de QS21:esteroil es de 1:5 (p/p). En una realización específica, el esteroil es colesterol.

En el presente documento, el adyuvante también comprende un agonista del TLR-4 que es un lipopolisacárido, adecuadamente un derivado no tóxico del lípido A, particularmente monofosforil lípido A o más particularmente monofosforil lípido A 3-desacilado (3D-MPL).

El 3D-MPL es vendido con el nombre de MPL por GlaxoSmithKline Biologicals N.A. y se menciona a lo largo de todo el documento como MPL o 3D-MPL. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034 y 4.912.094. El 3D-MPL promueve principalmente las respuestas de los linfocitos T CD4+ con un fenotipo

IFN-g (Th1). El 3D-MPL se puede producir de acuerdo con los métodos descritos en el documento GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido A 3-desacilado con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. En las composiciones de la presente invención pueden usarse partículas pequeñas de 3D-MPL para preparar el adyuvante. La partícula pequeña de 3D-MPL tiene un tamaño de partícula tal que puede esterilizarse por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. Dichas preparaciones se describen en el documento WO 94/21292.

Un ligando del TLR-4, tal como un lipopolisacárido, tal como 3D-MPL, puede usarse en unas cantidades de entre 1 y 100 µg por dosis en seres humanos de la composición adyuvante. El 3D-MPL puede usarse a un nivel de aproximadamente 50 µg, tal como de al menos 40 µg, de al menos 45 µg o de al menos 49 µg, o, menos de 100 µg, menos de 80 µg, menos de 60 µg, menos de 55 µg o menos de 51 µg. Algunos ejemplos de intervalos adecuados son entre 40-60 µg, adecuadamente entre 45-55 µg o entre 49 y 51 µg o 50 µg. En una realización adicional, la dosis en seres humanos de la composición adyuvante comprende 3D-MPL a un nivel de aproximadamente 25 µg, tal como de al menos 20 µg, de al menos 21 µg, de al menos 22 µg o de al menos 24 µg, o, menos de 30 µg, menos de 29 µg, menos de 28 µg, menos de 27 µg o menos de 26 µg. Algunos ejemplos de intervalos menores incluyen entre 20-30 µg, adecuadamente entre 21-29 µg o entre 22-28 µg o entre 28 y 27 µg o entre 24 y 26 µg, o 25 µg.

En el presente documento, el adyuvante comprende tanto una saponina como un agonista del TLR4. En un ejemplo específico, el adyuvante comprende QS21 y 3D-MPL. En una realización alternativa, el adyuvante comprende QS21 y GLA.

Cuando en el adyuvante hay presentes tanto un agonista del TLR4 como una saponina, entonces la relación ponderal entre el agonista del TLR4, y la saponina está adecuadamente entre 1:5 y 5:1, adecuadamente 1:1. Por ejemplo, cuando el 3D-MPL está presente en una cantidad de 50 µg o 25 µg, entonces adecuadamente también puede estar presente el QS21 en una cantidad de 50 µg o 25 µg por dosis en seres humanos del adyuvante.

En una realización, la saponina, con el agonista del TLR4, se administra en una formulación liposomal. Por "formulación liposomal" se entiende que la saponina (y opcionalmente el agonista del TLR-4) está formulada con liposomas, o, dicho de otro modo, presentada en una composición a base de liposomas. Los liposomas previstos en la presente invención contienen un lípido neutro o consisten esencialmente en un lípido neutro. Por "lípido neutro" se entiende que la carga neta global del lípido es (aproximadamente) cero. Por lo tanto, el lípido puede ser no iónico globalmente o puede ser dipolar. En una realización, los liposomas comprenden un lípido dipolar. Algunos ejemplos de lípidos adecuados son fosfolípidos tales como especies de fosfatidilcolina. En una realización, los liposomas contienen fosfatidilcolina como lípido formador de liposomas, que es adecuadamente no cristalino a la temperatura ambiente. Algunos ejemplos de estos lípidos de fosfatidilcolina no cristalinos incluyen la fosfatidilcolina de yema de huevo, la dioleil fosfatidilcolina (DOPC) o la dilauril fosfatidilcolina (DLPC). En una realización particular, los liposomas de la presente invención contienen DOPC o consisten esencialmente en DOPC. Los liposomas también pueden contener una cantidad limitada de un lípido con carga que aumenta la estabilidad de la estructura liposoma-saponina para los liposomas compuestos por lípidos saturados. En estos casos, la cantidad de lípido con carga es adecuadamente del 1-20 % p/p, preferentemente del 5-10 % p/p de la composición de liposomas. Algunos ejemplos adecuados de dichos lípidos con carga incluyen fosfatidilglicerol y fosfatidilserina. Adecuadamente, los liposomas neutros contendrán menos del 5 % p/p de lípidos con carga, tal como menos del 3 % p/p o menos del 1 % p/p. En una realización particular, la formulación liposomal comprende colesterol como el estero.

#### Construcciones de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la proteína VP2 de un HRV

En un aspecto de la divulgación, la composición inmunógena o la vacuna comprende el polinucleótido que comprende una secuencia de un ácido nucleico que codifica la proteína VP2 de un HRV como se define en el presente documento. En un adicional de la divulgación, la secuencia de un ácido nucleico que codifica la proteína VP2 de un HRV se coloca bajo el control de elementos que permiten su expresión en una célula, tal como en una célula de mamífero.

En un aspecto de la divulgación, la secuencia de un ácido nucleico se incorpora en un vector vírico, tal como un vector adenovírico. Por lo tanto, en una realización específica, la composición comprende un vector adenovírico que comprende un transgén que codifica la proteína VP2 de un HRV como se define en el presente documento.

El adenovirus se ha usado ampliamente para aplicaciones de transferencia de genes debido a su capacidad para lograr una transferencia de genes muy eficiente en una variedad de tejidos objetivo y una gran capacidad de transgénicos. Los vectores adenovíricos pueden derivar de un intervalo de hospedadores mamíferos. Se han aislado más de 100 serotipos distintos de adenovirus que infectan a diversas especies de mamíferos. Estos serotipos adenovíricos se han clasificado en seis subgéneros (A-F; B se subdivide en B1 y B2) de acuerdo con la homología de la secuencia y la capacidad de aglutinar los glóbulos rojos (Tatsis y Ertl, Molecular Therapy (2004) 10: 616-629).

En un aspecto de la divulgación, el vector adenovírico deriva de un ser adenovirus humano. Algunos ejemplos de dichos adenovirus derivados del ser humano son Ad1, Ad2, Ad4, Ad5, Ad6, Ad11, Ad24, Ad34, Ad35, particularmente Ad5, Ad11 y Ad35. Aunque los vectores basados en Ad5 se han usado ampliamente en varios ensayos de terapia

génica, puede haber limitaciones en el uso de Ad5 y de otros vectores adenovíricos del grupo C humano debido a la inmunidad preexistente en la población general a causa de la infección natural. El Ad5 y otros miembros del grupo C humano tienden a estar entre los serotipos más seroprevalentes. Adicionalmente, la inmunidad a los vectores existentes puede desarrollarse como resultado de la exposición al vector durante el tratamiento. Estos tipos de inmunidad preexistente o desarrollada a los vectores seroprevalentes pueden limitar la eficacia de los esfuerzos de terapia génica o de vacunación.

Por lo tanto, en otro aspecto de la divulgación, el vector adenovírico deriva de un adenovirus símico no humano, también se denomina simplemente adenovirus símico. Se han aislado numerosos adenovirus a partir de simios no humanos, tales como chimpancés, bonobos, macacos de la India y gorilas, y los vectores derivados de estos adenovirus inducen fuertes respuestas inmunitarias frente a los transgenes codificados por estos vectores (Colloca *et al.* (2012) *Sci. Transl. Med.* 4: 1-9; Roy *et al.* (2004) *Virology* 324: 361-372; Roy *et al.* (2010) *J. of Gene Med.* 13: 17-25). Algunas de las ventajas de los vectores basados en adenovirus de simios no humanos incluyen la relativa ausencia de anticuerpos de neutralización cruzada contra estos adenovirus en la población humana objetivo. Por ejemplo, la reacción cruzada de ciertos adenovirus de chimpancé con las respuestas de anticuerpos neutralizantes preexistentes está presente únicamente en el 2 % de la población humana objetivo, en comparación con el 35 % en el caso de ciertos vectores adenovíricos humanos candidatos.

En aspectos específicos de la divulgación, el vector adenovírico deriva de un adenovirus no humano, tal como un adenovirus símico, y en particular, un adenovirus de chimpancé tal como ChAd3, ChAd63, ChAd83, ChAd155, Pan 5, Pan 6, Pan 7 (denominado también C7) o Pan 9. Algunos ejemplos de dichas cepas se describen en los documentos WO03/000283, WO2010/086189 y GB1510357.5, y también están disponibles en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, y otras fuentes. Alternativamente, los vectores adenovíricos pueden derivar de adenovirus de simios no humanos aislados a partir de bonobos, tales como PanAd1, PanAd2 o PanAd3. Algunos ejemplos de dichos vectores descritos en el presente documento se pueden encontrar, por ejemplo, en los documentos WO2005/071093 y WO2010/086189. Los vectores adenovíricos también pueden derivar de adenovirus aislados a partir de gorilas, como se describe en los documentos WO2013/52799, WO2013/52811 y WO2013/52832.

Para administrar la secuencia deseada de un ácido nucleico o una proteína pueden usarse vectores adenovíricos, por ejemplo, secuencias (génicas) heterólogas, para la expresión *in vivo*. Un vector puede incluir cualquier elemento genético, incluyendo ADN desnudo, un fago, un transposón, un cósmido, un episoma, un plásmido o un virus para la administración. Por "casete de expresión" se entiende la combinación de un gen (transgén) heterólogo seleccionado y los demás elementos reguladores necesarios para impulsar la traducción, la transcripción y/o la expresión del producto génico en una célula hospedadora.

Normalmente, un vector adenovírico se diseña de forma que el casete de expresión esté situado en una molécula de un ácido nucleico que contenga otras secuencias adenovíricas en la región natural de un gen adenovírico seleccionado. El casete de expresión puede insertarse en una región génica existente para alterar la función de esa región, si se desea. Alternativamente, el casete de expresión puede insertarse en el sitio de un gen adenovírico parcial o totalmente delecionado. Por ejemplo, el casete de expresión puede estar situado en el lugar de una mutación, una inserción o una delección que hace no funcional al menos a un gen de una región genómica seleccionada del grupo que consiste en E1A, E1B, E2A, E2B, E3 y E4. El término "que hace no funcional" significa que se elimina o se altera de otro modo una cantidad suficiente de la región génica, por lo que la región génica ya no es capaz de producir productos de expresión génica funcionales. Si se desea, se puede eliminar toda la región génica (y sustituirla adecuadamente por el casete de expresión). Adecuadamente, los genes E1 de un adenovirus se delecionan y se sustituyen por un casete de expresión que consiste en el promotor de elección, la secuencia de ADNc del gen de interés y una señal de poli A, lo que da como resultado un virus recombinante de replicación defectuosa.

En otro aspecto de la divulgación, se incorpora la secuencia de un ácido nucleico a un vector de ARNm autoamplificable (denominado a continuación en el presente documento, SAM). Las moléculas de ARN SAM son bien conocidas en la técnica y pueden producirse usando elementos de replicación derivados de, por ejemplo, alfavirus, y sustituyendo las proteínas víricas estructurales por una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés. Una molécula de ARN SAM es normalmente una molécula de cadena + que puede ser traducida directamente después de ser administrada a una célula, y esta traducción proporciona una ARN polimerasa dependiente de ARN que a continuación produce transcritos tanto antisentido como sentido a partir del ARN administrado. Por lo tanto, el ARN administrado da lugar a la producción de múltiples ARN hijos. Estos ARN hijos, así como los transcritos subgenómicos colineales, pueden autotraducirse para proporcionar la expresión *in situ* de un antígeno codificado (es decir, una construcción de la proteína VP2 de un HRV), o pueden transcribirse para proporcionar transcritos adicionales, con el mismo sentido que el ARN administrado, que son traducidos para proporcionar la expresión *in situ* del antígeno. El resultado global de esta secuencia de transcripciones es una enorme amplificación en el número de ARN replicones introducidos, y por tanto, el antígeno codificado se convierte en un producto polipeptídico principal de las células.

Un sistema adecuado para lograr la autorreplicación de esta manera es usar un replicón basado en alfavirus. Estos

replicones son ARN de cadena + que dan lugar a la traducción de una replicasa (o replicasa-transcriptasa) tras su administración a una célula. La replicasa se traduce como una poliproteína que se autoescinde para proporcionar un complejo de replicación que crea copias de cadena genómica del ARN administrado de cadena +. Estos transcritos de cadena - pueden transcribirse a su vez para dar copias adicionales del ARN progenitor de cadena + y también para dar un transcrito subgenómico que codifica el antígeno. La traducción del transcrito subgenómico da lugar por tanto a la expresión *in situ* del antígeno por parte de la célula infectada. Los replicones de alfavirus adecuados pueden usar una replicasa de un virus Sindbis, un virus del bosque de Semliki, un virus de la encefalitis equina oriental, un virus de la encefalitis equina venezolana, etc. Se pueden usar secuencias de virus mutantes o naturales, por ejemplo, el mutante atenuado TC83 del VEEV se ha usado en replicones, véase la siguiente referencia: el documento WO2005/113782.

En ciertos aspectos de la divulgación, la molécula de ARN SAM descrita en el presente documento codifica (i) una ARN polimerasa dependiente de ARN que puede transcribir el ARN de la molécula de ARN SAM y (ii) un antígeno de la proteína VP2 de un HRV como se describe en el presente documento. La polimerasa puede ser una replicasa de alfavirus, por ejemplo, que comprenda una o más de las proteínas de alfavirus nsPI, nsP2, nsP3 y nsP4.

Mientras que los genomas de los alfavirus naturales codifican proteínas estructurales del virión, además de la poliproteína replicasa no estructural, en ciertas realizaciones, las moléculas de ARN SAM no codifican las proteínas estructurales del alfavirus. Por lo tanto, el ARN SAM puede dar lugar a la producción de copias de ARN genómico de sí mismo en una célula, pero no a la producción de viriones que contengan ARN. La incapacidad para producir estos viriones significa que, a diferencia de un alfavirus natural, la molécula de ARN SAM no puede autoperpetuarse en forma infecciosa. Las proteínas estructurales de los alfavirus que son necesarias para la perpetuación en los virus naturales están ausentes en los ARN SAM de la presente divulgación, y su lugar lo ocupan el o los genes que codifican el inmunógeno de interés, de manera que el transcrito subgenómico codifica el inmunógeno en lugar de las proteínas estructurales de los viriones del alfavirus.

Por lo tanto, una molécula de ARN SAM puede tener dos marcos abiertos de lectura. El primer marco abierto de lectura (5') codifica una replicasa; el segundo marco abierto de lectura (3') codifica un antígeno. En algunas realizaciones, el ARN puede tener marcos abiertos de lectura adicionales (por ejemplo, posteriores), por ejemplo, para codificar antígenos adicionales o para codificar polipéptidos secundarios.

En ciertos aspectos de la divulgación, la molécula de ARN SAM divulgada en el presente documento tiene una caperuza en 5' (por ejemplo, una 7-metilguanósina). Esta caperuza puede mejorar la traducción *in vivo* del ARN. En algunas realizaciones, la secuencia 5' de la molécula de ARN SAM debe ser seleccionada para asegurar la compatibilidad con la replicasa codificada.

Una molécula de ARN SAM puede tener una cola de poli-A en 3'. También puede incluir una secuencia de reconocimiento de la polimerasa poli-A (por ejemplo, AAUAAA) cerca de su extremo 3'.

Las moléculas de ARN SAM pueden tener diversas longitudes, pero normalmente tienen 5.000-25.000 nucleótidos. Las moléculas de ARN SAM normalmente son monocatenarias. En general, los ARN monocatenarios pueden iniciar un efecto adyuvante al unirse al TLR7, TLR8, a las helicasas de ARN y/o a la PKR. El ARN administrado en forma bicatenaria (ARNbc) puede unirse al TLR3, y este receptor también puede ser activado por el ARNbc que se forma durante la replicación de un ARN monocatenario o dentro de la estructura secundaria de un ARN monocatenario.

El ARN SAM puede prepararse adecuadamente mediante una transcripción *in vitro* (IVT). La IVT puede usar un molde (ADNc) creado y propagado en forma de plásmido en bacterias, o creado sintéticamente (por ejemplo, mediante síntesis génica y/o métodos de modificación con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)). Por ejemplo, se puede usar una ARN polimerasa dependiente de ADN (como las ARN polimerasas de los bacteriófagos T7, T3 o SP6) para transcribir el ARN SAM a partir de un molde de ADN. Se pueden usar las apropiadas reacciones de protección y adición de poli-A según sea necesario (aunque la poli-A del replicón está codificada normalmente dentro del molde de ADN). Estas ARN polimerasas pueden tener unos requisitos rigurosos para el o los nucleótidos en 5' transcritos, y en algunas realizaciones, estos requisitos deben coincidir con los requisitos de la replicasa codificada, para garantizar que el ARN transcrito en la IVT pueda funcionar eficazmente como sustrato para su replicasa autocodificada.

Un ARN SAM puede incluir (además de cualquier estructura de caperuza en 5') uno o más nucleótidos que tengan una nucleobase modificada. Un ARN incluye idealmente únicamente enlaces fosfodiéster entre nucleósidos, pero en algunas realizaciones puede contener enlaces de fosforamidoato, de fosforotioato y/o de metilfosfonato.

La molécula de ARN SAM puede codificar un único antígeno polipeptídico heterólogo (es decir, un antígeno de la proteína VP2 de un HRV, como se describe en el presente documento) u, opcionalmente, dos o más antígenos heterólogos unidos entre sí de forma que cada una de las secuencias conserve su identidad (por ejemplo, unidas en serie) cuando se exprese como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos heterólogos generados a partir del ARN SAM pueden producirse a continuación como un polipéptido de fusión o modificados de tal forma que den como

resultado secuencias de polipéptidos o péptidos individuales.

Las moléculas de ARN SAM descritas en el presente documento pueden estar modificadas para que expresen múltiples secuencias de nucleótidos, a partir de uno o más marcos abiertos de lectura, permitiendo así la expresión conjunta de proteínas, tal como uno, dos o más antígenos del HRV (por ejemplo, uno, dos o más antígenos del HRV) junto con citocinas u otros inmunomoduladores, que pueden potenciar la generación de una respuesta inmunitaria. Dicha molécula de ARN SAM podría ser particularmente útil, por ejemplo, en la producción de varios productos génicos (por ejemplo, proteínas) al mismo tiempo, por ejemplo, como vacuna bivalente o multivalente.

Si se desea, las moléculas de ARN SAM pueden ser cribadas o analizadas para confirmar sus propiedades terapéuticas y profilácticas usando diversos métodos de ensayo *in vitro* o *in vivo* que son conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, las vacunas que comprenden la molécula de ARN SAM pueden ensayarse para comprobar su efecto en la inducción de la proliferación o la función efectora del tipo de linfocitos de interés en particular, por ejemplo, linfocitos B, linfocitos T, estirpes de linfocitos T y clones de linfocitos T. Por ejemplo, se pueden aislar células de bajo de ratones inmunizados y la capacidad de los linfocitos T citotóxicos para lisar las células objetivo autólogas que contienen una molécula de ARN SAM que codifica la proteína VP2 de un HRV, como se describe en el presente documento. Además, puede analizarse la diferenciación de los linfocitos T cooperadores midiendo la proliferación o la producción de citocinas TH1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) y/o TH2 (IL-4 e IL-5) mediante un ELISA, o directamente en los linfocitos T CD4+ mediante tinción de las citocinas citoplasmáticas y citometría de flujo.

Las moléculas de ARN SAM que codifican un antígeno del HRV, por ejemplo, el antígeno peptídico del HRV como se describe en el presente documento, también pueden ensayarse para comprobar la capacidad de inducir respuestas inmunitarias humorales, como se demuestra, por ejemplo, mediante la inducción de la producción por parte de los linfocitos B de anticuerpos específicos para un antígeno del HRV de interés. Estos ensayos pueden realizarse usando, por ejemplo, linfocitos B periféricos de individuos inmunizados. Dichos métodos de ensayo son conocidos por los expertos en la materia. Otros ensayos que pueden usarse para caracterizar las moléculas de ARN SAM pueden implicar la detección de la expresión del antígeno del HRV codificado por las células objetivo. Por ejemplo, puede usarse una FACS para detectar la expresión del antígeno en la superficie celular o intracelularmente. Otra ventaja de la selección por FACS es que se puede clasificar según los diferentes niveles de expresión; a veces puede desearse una expresión más baja. Otro método adecuado para identificar las células que expresan un antígeno en particular implica la selección usando anticuerpos monoclonales en una placa o la captura mediante perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos monoclonales.

La vacuna basada en ácidos nucleicos puede comprender un sistema de administración vírico o no vírico. El sistema de administración (denominado también en el presente documento vehículo de administración) puede tener efectos adyuvantes que potencien la inmunogenia del antígeno o antígenos del HRV codificados. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede estar encapsulada en liposomas, en micropartículas poliméricas biodegradables no tóxicas o en partículas de replicón vírico (VRP), o complejada con partículas de una emulsión catiónica de aceite en agua. En algunas realizaciones, la vacuna basada en ácidos nucleicos comprende un sistema de administración de nanoemulsión catiónica (CNE) o un sistema de administración de nanopartículas lipídicas (LNP). En algunas realizaciones, la vacuna basada en ácidos nucleicos comprende un sistema de administración no vírico, es decir, la vacuna basada en ácidos nucleicos está sustancialmente exenta de cápsides víricas. Alternativamente, la vacuna basada en ácidos nucleicos puede comprender partículas de replicones víricos. En otras realizaciones, la vacuna basada en ácidos nucleicos puede comprender un ácido nucleico desnudo, tal como un ARN desnudo (por ejemplo, ARNm), pero se prefiere la administración a través de CNE o LNP.

En ciertas realizaciones, la vacuna basada en ácidos nucleicos comprende un sistema de administración de nanoemulsión catiónica (CNE). Los sistemas de administración de CNE y los métodos para su preparación se describen en la siguiente referencia: el documento WO2012/006380. En un sistema de administración de CNE, la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ARN) que codifica el antígeno está complejada con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua. Las emulsiones catiónicas de aceite en agua pueden usarse para administrar moléculas con carga negativa, tales como una molécula de ARN, a las células. Las partículas de emulsión comprenden un núcleo oleoso y un lípido catiónico. El lípido catiónico puede interactuar con la molécula con carga negativa, anclando así la molécula a las partículas de la emulsión. Pueden encontrarse más detalles sobre las CNE útiles en las siguientes referencias: el documento WO2012/006380; el documento WO2013/006834; y el documento WO2013/006837.

Por lo tanto, en una vacuna basada en ácidos nucleicos divulgada en el presente documento, una molécula de ARN que codifica un antígeno de la proteína VP2 de un HRV puede complejarse con una partícula de una emulsión catiónica de aceite en agua. Las partículas comprenden normalmente un núcleo oleoso (por ejemplo, un aceite vegetal o escualeno) que está en fase líquida a 25 °C, un lípido catiónico (por ejemplo, un fosfolípido) y, opcionalmente, un tensioactivo (por ejemplo, trioleato de sorbitán, polisorbato 80); también puede incluirse polietilenglicol. En algunas realizaciones, la CNE comprende escualeno y un lípido catiónico, tal como 1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP). En algunas realizaciones preferidas, el sistema de administración es un sistema de administración no vírico,

tal como una CNE, y la vacuna basada en ácidos nucleicos comprende un ARN SAM (ARNm). Esto puede ser particularmente eficaz para desencadenar respuestas inmunitarias humores y celulares. Las ventajas también incluyen la ausencia de una respuesta inmunitaria limitante contra el vector y la ausencia de riesgo de integración genómica.

En las siguientes referencias se describen los sistemas de administración de PNL y micropartículas poliméricas biodegradables no tóxicas, y los métodos para su preparación: documento WO2012/006376 (LNP y sistemas de administración de micropartículas); Geall *et al.* (2012) PNAS USA. 4 de septiembre; 109 (36): 14604-9 (sistema de administración de LNP); y el documento WO2012/006359 (sistemas de administración de micropartículas). Las LNP son partículas liposomales no viriónicas en las que se puede encapsular una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ARN). Las partículas pueden incluir algún ARN externo (por ejemplo, en la superficie de las partículas), pero al menos la mitad del ARN (e idealmente todo) está encapsulado. Las partículas liposomales pueden estar formadas, por ejemplo, por una mezcla de lípidos dipolares, catiónicos y aniónicos que pueden estar saturados o insaturados, por ejemplo; DSPC (dipolar, saturado), DlinDMA (catiónico, insaturado) y/o DMG (aniónico, saturado). Las LNP preferidas incluyen un lípido anfifílico que puede formar liposomas, opcionalmente en combinación con al menos un lípido catiónico (tal como DOTAP, DSDMA, DODMA, DlinDMA, DLenDMA, etc.). Una mezcla de DSPC, DlinDMA, PEG-DMG y colesterol es particularmente eficaz. Otras LNP útiles se describen en las siguientes referencias: documento WO2012/006376; documento WO2012/030901; documento WO2012/031046; documento WO2012/031043; documento WO2012/006378; documento WO2011/076807; documento WO2013/033563; documento WO2013/006825; documento WO2014/136086; documento WO2015/095340; documento WO2015/095346; documento WO2016/037053. En algunas realizaciones, las LNP son liposomas RV01, véanse las siguientes referencias: el documento WO2012/006376 y Geall *et al.* (2012) PNAS USA. 4 de septiembre; 109 (36): 14604-9

#### Composiciones inmunógenas

Las composiciones de acuerdo con la invención pueden ser una composición farmacéutica, por ejemplo, una composición inmunógena o una composición vacunal. Por consiguiente, la composición también puede comprender un portador farmacéuticamente aceptable.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier portador que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición individual. Los portadores adecuados son normalmente macromoléculas grandes y de metabolización lenta, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarosa, trehalosa, lactosa y agregados lipídicos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Dichos portadores son bien conocidos por los expertos en la materia. Las composiciones también pueden contener un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como agua, solución salina, glicerol, etc. Adicionalmente, puede haber presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH, y similares. Un portador típico es una solución salina fisiológica estéril apirógena tamponada con fosfato.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir las construcciones, las secuencias de ácidos nucleicos y/o las secuencias polipeptídicas descritas en cualquier otro sitio del presente documento en agua estéril simple (por ejemplo, agua para inyectables o "API") o en un tampón, por ejemplo, un tampón de fosfato, un tampón Tris, un tampón de borato, un tampón de succinato, un tampón de histidina o un tampón de citrato. Las sales tamponantes se incluirán normalmente en el intervalo de 5-20 mM. Las composiciones farmacéuticas pueden tener un pH de entre 5,0 y 9,5, por ejemplo, de entre 6,0 y 8,0. Las composiciones pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) para dar tonicidad. Una concentración de  $10 \pm 2$  mg/ml de NaCl es típica, por ejemplo, aproximadamente 9 mg/ml. Las composiciones pueden incluir quelantes de iones metálicos. Éstos pueden prolongar la estabilidad del ARN al eliminar los iones que pueden acelerar la hidrólisis de los fosfodiésteres. Por lo tanto, una composición puede incluir uno o más de EDTA, EGTA, BAPTA, ácido pentético, etc. Estos quelantes están normalmente presentes entre 10-500  $\mu$ M, por ejemplo, 0,1 mM. Una sal de citrato, tal como citrato sódico, también puede actuar como quelante, mientras proporciona también ventajosamente una actividad tamponante. Las composiciones farmacéuticas pueden tener una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, por ejemplo, de entre 240-360 mOsm/kg o de entre 290-310 mOsm/kg. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir uno o más conservantes, tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Se prefieren las composiciones sin mercurio y se pueden preparar vacunas sin conservantes. Las composiciones farmacéuticas pueden ser asépticas o estériles. Las composiciones farmacéuticas pueden ser apirógenas, por ejemplo, que contienen  $<1$  UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis y preferentemente  $<0,1$  UE por dosis. Las composiciones farmacéuticas pueden ser sin gluten. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse en forma de dosis unitarias. En algunas realizaciones, una dosis unitaria puede tener un volumen de entre 0,1-1,0 ml, por ejemplo, aproximadamente 0,5 ml.

Las composiciones divulgadas en el presente documento generalmente se administrarán directamente a un sujeto. La administración directa puede realizarse por inyección parenteral (por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intradérmica o en el espacio intersticial de un tejido). Algunas vías de administración alternativas incluyen rectal, oral (por ejemplo, comprimidos, aerosol), bucal, sublingual, vaginal, tópica, transdérmica

o transcutánea, intranasal, ocular, ótica, pulmonar u otra administración en mucosa. La administración intradérmica e intramuscular son dos vías preferidas. La inyección puede ser a través de una aguja (por ejemplo, una aguja hipodérmica), pero alternativamente se puede usar una inyección sin aguja. Una dosis intramuscular típica es de 0,5 ml.

5

Una dosis en seres humanos o una cantidad inmunológicamente eficaz del antígeno proteico puede ser de aproximadamente o menos de 50 µg de la proteína VP2 de un HRV, como se describe en el presente documento; por ejemplo, de 1-50 µg, tal como de aproximadamente de aproximadamente 1 µg, de aproximadamente 2,5 µg, de aproximadamente 5 µg, de aproximadamente 7,5 µg, de aproximadamente 10 µg, de aproximadamente 15 µg, de aproximadamente 20 µg, de aproximadamente 25 µg, de aproximadamente 30 µg, de aproximadamente 35 µg, de aproximadamente 40 µg, de aproximadamente 45 µg o de aproximadamente 50 µg. En realizaciones adicionales, una dosis en seres humanos del antígeno proteico puede ser de 10-50 µg o de 20-50 µg. Una dosis de un ácido nucleico (por ejemplo, una vacuna basada en ácidos nucleicos) puede variar de acuerdo con el vector de ácido nucleico usado. Una dosis en seres humanos o una cantidad inmunológicamente eficaz de un ácido nucleico puede ser adecuada de entre 1 ng y 100 mg. Por ejemplo, una cantidad adecuada puede ser de entre 1 µg y 100 mg. Una cantidad apropiada del ácido nucleico particular (por ejemplo, del vector) puede ser fácilmente determinada por los expertos en la materia. Las cantidades eficaces ilustrativas de un componente de ácido nucleico pueden estar entre 1 ng y 100 µg, tales como entre 1 ng y 1 µg (por ejemplo, 100 ng-1 µg) o entre 1 µg y 100 µg, tal como 10 ng, 50 ng, 100 ng, 150 ng, 200 ng, 250 ng, 500 ng, 750 ng o 1 µg. Las cantidades eficaces de un ácido nucleico también pueden incluir entre 1 µg y 500 µg, tal como entre 1 µg y 200 µg, tal como entre 10 y 100 µg, por ejemplo, 1 µg, 2 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg, 50 µg, 75 µg, 100 µg, 150 µg o 200 µg. Alternativamente, una cantidad eficaz ilustrativa de un ácido nucleico puede ser de entre 100 µg y 1 mg, tal como de entre 100 µg y 500 µg, por ejemplo, 100 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg, 300 µg, 400 µg, 500 µg, 600 µg, 700 µg, 800 µg, 900 µg o 1 mg.

Generalmente, una dosis en seres humanos estará en un volumen de entre 0,1 ml y 2 ml, normalmente de entre 0,2 y 1 ml, tal como de 0,5 o de 0,625 ml. Por lo tanto, la composición descrita en el presente documento puede formularse en un volumen de, por ejemplo, aproximadamente 0,1, 0,15, 0,2, 0,5, 1,0, 1,5 o 2,0 ml de dosis en seres humanos por componentes inmunógenos individuales o combinados. En una realización particular, una dosis en seres humanos está contenida en 0,5 ml de la composición.

30

Para cualquier componente de las composiciones inmunógenas divulgadas en el presente documento, la dosis puede variar dependiendo de la afección, el sexo, la edad y el peso del sujeto o población objetivo, y la vía de administración de la composición inmunógena o la vacuna.

Los rinovirus humanos son la principal causa de las infecciones agudas de las vías respiratorias altas en los seres humanos, conocidas como resfriado común. También son la causa vírica más frecuente de exacerbación grave de enfermedades respiratorias crónicas tales como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Los inventores averiguaron que el uso de las composiciones de la invención (es decir, que comprenden un antígeno de la proteína VP2), opcionalmente adyuvadas, puede generar una respuesta inmunitaria que proteja parcial o totalmente al sujeto frente a posteriores infecciones y/o enfermedades por el mismo u otro tipo de HRV, siendo por tanto la respuesta inmunitaria de reacción cruzada. Los inventores también averiguaron que la respuesta inmunitaria generada era, al menos, celular. En una realización adicional, también se inducen anticuerpos de reacción cruzada, que pueden ser neutralizantes o no.

En algunas realizaciones, las composiciones divulgadas en el presente documento son para usar en un sujeto para: prevenir la infección por un HRV (uso profiláctico), reducir la carga vírica de la infección por el HRV, reducir el tiempo de recuperación y/o disminuir la gravedad de la enfermedad causada por un HRV en ese sujeto. La expresión "tiempo de recuperación" se refiere a la reducción del tiempo de recuperación de una infección por un HRV. Alternativamente, las composiciones son para usar en un método para reducir o prevenir una enfermedad en un sujeto, es decir, reducir o prevenir los síntomas clínicos tras la infección por un HRV, por ejemplo, reduciendo la gravedad de las exacerbaciones en un paciente con asma o EPOC.

Un experto habitual en la materia comprenderá que no se pretende que la prevención o el uso profiláctico de las composiciones divulgadas en el presente documento implique una eficacia del 100 % en cualquier población dada. Más bien, hay diversos grados de prevención o profilaxis, que un experto en la materia reconoce que tienen un efecto o efectos beneficiosos. A este respecto, los métodos inventivos pueden proporcionar cualquier nivel de prevención o profilaxis. Las composiciones descritas en el presente documento y su uso pueden prevenir o reducir simultáneamente la infección por un HRV y los síntomas clínicos relacionados con el HRV, tales como las exacerbaciones del asma o de la EPOC.

60

En algunas realizaciones, las composiciones divulgadas en el presente documento son para usar en un método para inducir una respuesta inmunitaria (de reacción cruzada) contra los HRV de al menos tres serotipos diferentes. La respuesta inmunitaria generada al administrar a un sujeto una composición que comprende una proteína VP2 derivada de un tipo de HRV perteneciente al HRV-A puede tener una reacción cruzada frente a la exposición del sujeto a un

tipo de HRV perteneciente al HRV-A, el HRV-B y/o el HRV-C. De manera similar, la respuesta inmunitaria generada al administrar a un sujeto una composición que comprende una proteína VP2 derivada de un serotipo de HRV perteneciente al HRV-B puede tener una reacción cruzada frente a la exposición del sujeto a un tipo de HRV perteneciente al HRV-B, el HRV-A y/o el HRV-C, o, la respuesta inmunitaria generada al administrar a un sujeto una composición que comprende una proteína VP2 derivada de un tipo de HRV perteneciente al HRV-C puede tener una reacción cruzada frente a la exposición del sujeto a un tipo de HRV perteneciente al HRV-A y/o al HRV-B.

En realizaciones adicionales de los usos y métodos divulgados en el presente documento, la población objetivo para los usos o métodos divulgados en el presente documento son pacientes humanos con EPOC o asma. La población objetivo puede limitarse a pacientes humanos con EPOC.

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para prevenir la infección vírica por un HRV, reducir la carga vírica de la infección por un HRV y/o reducir o prevenir los síntomas clínicos de la infección por un HRV en un sujeto humano que lo necesite, que comprenden administrar a dicho sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunógenas proporcionadas en el presente documento.

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para inducir una respuesta inmunitaria de reacción cruzada frente a al menos tres tipos de HRV en un sujeto humano que lo necesite, que comprenden administrar a dicho sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de cualquiera de las composiciones inmunógenas proporcionadas en el presente documento.

En algunas realizaciones, se proporciona el uso de la proteína VP2 de un HRV como se divulga en el presente documento en la fabricación de una composición inmunógena para prevenir o reducir la duración de la infección por un HRV en un sujeto humano, y/o para reducir o prevenir los síntomas clínicos de la infección por un HRV en un sujeto humano.

En algunas realizaciones, se proporciona el uso de la proteína VP2 de un HRV como se divulga en el presente documento en la fabricación de una composición inmunógena que induce una respuesta inmunitaria de reacción cruzada frente a al menos tres serotipos del HRV en un sujeto humano que lo necesite.

En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto humano. En realizaciones específicas, el sujeto humano es un paciente con asma, o, el sujeto humano es un paciente con EPOC.

En algunas realizaciones, el sujeto humano es un sujeto de corta edad, tal como un bebé, un preescolar o un niño. En realizaciones adicionales, el ser humano sujeto es un bebé, un preescolar o un niño que es un paciente de asma. En algunas realizaciones, el sujeto humano es un sujeto anciano, por ejemplo, de 50 años o más, de 60 años o más, o, de 70 años o más. En realizaciones adicionales, el sujeto humano es un sujeto anciano que es un paciente con EPOC. En esas realizaciones, la población objetivo se define en consecuencia.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

El objetivo del experimento era comparar la calidad, la diversidad y la magnitud de los anticuerpos neutralizantes inducidos antes y después de la exposición intranasal al HRV1b en ratones primovacunados con la combinación de proteínas VP2 y VP4 adyuvada con AS01b en comparación con ratones primovacunados con las proteínas VP4 adyuvadas con AS01b o únicamente con AS01b.

#### 1.1 Modelo animal

Se eligieron las razas de ratón CB6/F1 para estudiar la inmunogenia de las vacunas candidatas contra el HRV, ya que estos animales son capaces de imitar las respuestas inmunitarias tanto humores como celulares inducidas tras las infecciones naturales por un HRV. Además, los ratones CB6/F1 son capaces de recapitular los signos virológicos e histológicos observados en los seres humanos (reclutamiento de neutrófilos y producción de citocinas en los pulmones) cuando se les expone a HRV pertenecientes al grupo menor (replicativo en ratones).

#### 1.2 Diseño experimental

En este estudio se inmunizaron 3 grupos de ratones CB6/F1 (n = 30/grupo) por vía intramuscular dos veces (en el músculo gastrocnemio) los días 0 y 14 (D0 y D14) con 5 µg de:

GRUPO 1 - Una combinación de la VP2 del HRV39 (SEQ ID NO: 1) + concatémico de proteínas VP4 de longitud

completa del subtipo A (SEQ ID NO: 3; proteínas VP4 específicas para los tipos de HRV2, 8, 10, 21, 39, 60, 71, 77, CU107 y CU150) formuladas en AS01b.

GRUPO 2 - Concatémoro de proteínas VP4 de longitud completa del subtipo A (SEQ ID NO: 3; proteínas VP4 específicas para los tipos de HRV2, 8, 10, 21, 39, 61, 77, CU107 y CU150) formuladas en AS01b

GRUPO 3 - AS01b solo como control negativo.

El AS01b comprende 3D-MPL y QS21 en liposomas que contienen colesterol. Una dosis en seres humanos (HD) de AS01b contiene 50 µg de MPL, 50 µg de QS21, en liposomas que contienen colesterol.

Cuatro semanas más tarde (D42), los ratones se expusieron por vía intranasal a  $10^6$  unidades de la TCID<sub>50</sub> del virus HRV1b purificado y se investigaron los niveles de respuestas de reacción cruzada de los linfocitos T CD4+/CD8+ y la calidad, la diversidad y la magnitud de los anticuerpos neutralizantes en muestras de suero y células de bazo recogidas en los 14 días posteriores a la segunda inmunización (antes de la exposición) y en los 14 días posteriores a la exposición al HRV1b.

Los niveles de genomas de ARN monocatenario positivo, de producción de citocinas (MCP-1, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF-α, INF-γ) y los recuentos celulares diferenciales se investigaron en los líquidos del lavado broncoalveolar (LBA) el día 2 después de la exposición al HRV1b (D44) para asegurar que la exposición al HRV1b se había realizado satisfactoriamente. La descripción completa de cada grupo y el calendario de inmunización se indican en la tabla 2.

**Tabla 2**

| Grupo | N  | Primovacunación                                                                                   |                            | Calendario de inmunización | Calendario de exposición intranasal ( $10^6$ unidades de la TCID <sub>50</sub> ) |
|-------|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
|       |    | Inmunógeno (5 µg/inmunógeno/dosis)                                                                | Dosis de adyuvante (AS01b) |                            |                                                                                  |
| 1     | 30 | Proteína VP2 del HRV39 (SEQ ID NO: 1) + concatémoro de proteínas VP4 del subtipo A (SEQ ID NO: 3) | 1/10 de la HD              | Días 0,14                  | Día 42                                                                           |
| 2     | 30 | Concatémoro de proteínas VP4 (SEQ ID NO: 3)                                                       | 1/10 de la HD              | Días 0,14                  |                                                                                  |
| 3     | 30 | Ninguno                                                                                           | 1/10 de la HD              | Días 0,14                  |                                                                                  |

N: número de ratones por grupo; HD = dosis en seres humanos; NA = no aplicable.

### 1.3 Material - Antígenos y adyuvantes

Los antígenos usados en este experimento se produjeron como sigue:

La proteína VP2 del HRV39 (SEQ ID NO: 1 con la secuencia de etiqueta de His carboxiterminal GGHHHHHH) se expresó en el sistema *Pichia* (levadura) y se purificó mediante una centrifugación en gradiente de densidad de CsCl seguida de una cromatografía de exclusión por tamaño en un Sephacryl S-500 HR/concentración en Amicon y una diálisis. El concatémoro de proteínas VP4 de longitud completa del subtipo A (SEQ ID NO: 3) se expresó en *E. coli* (BL21). La purificación se realizó usando una columna trampa de Ni-NTA GE His, seguida de una cromatografía de exclusión por tamaño en Superdex75 usando tampón de bicina 25 mM-urea 4 M (urea 4 M-bicina 25 mM-NaCl 500 mM, 1 % de sacarosa-0,1 % de pluronic F68, a pH 8,0). El material se dializó finalmente en tampón PBS suplementado con un 1 % de emipen.

Todos los antígenos se formularon con el adyuvante AS01b (1/10 de la HD).

El material vírico HRV1b muy purificado usado para la exposición IN se adquirió en Virapur Laboratories (VIRAPUR, San Diego, CA, Estados Unidos).

### Ejemplo 2: Métodos

#### 2.1 Ensayo de neutralización de rinovirus

La cuantificación de los anticuerpos neutralizantes se realizó usando el siguiente ensayo de neutralización. Se sembró una suspensión de 5.000 células H1-HeLa/pocillo en placas de fondo plano de 96 pocillos (Nuncclon Delta Surface, Nunc, Dinamarca) y se incubó hasta el día siguiente a 37 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub>.

Los sueros se diluyeron mediante una dilución en serie de dos veces (empezando por 1/10) en el medio de infección del HRV (MEM suplementado con un 2 % de FCS, MgCl<sub>2</sub> 30 mM, L-glutamina 2 mM, 1 % de aminoácidos no esenciales y 1 % de penicilina/estreptomicina) en placas de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) y se incubaron con una concentración de 100 TCID<sub>50</sub> de virus durante 2 h a 37 °C (5 % de CO<sub>2</sub>). Los bordes de las placas no se usaron, y una columna de cada placa se dejó sin sueros y se usó como control negativo (sin neutralización). El medio de las placas

de 96 pocillos sembradas con células H1-HeLa se decantó, y las mezclas de virus-anticuerpos se superpusieron sobre las células H1-HeLa subconfluentes y se incubaron a 34 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub> durante 72 horas o 120 horas (dependiendo de las cepas del HRV usadas - véase la tabla 3).

5

Tabla 3

| Tres días de infección (72 h)  | Cinco días de infección (120 h) |
|--------------------------------|---------------------------------|
| HRV1b, 2, 3, 8, 14, 16, 28, 39 | HRV25, 29.                      |

10 Tres o cinco días después de la infección, las células H1-HeLa se lavaron y se incubaron a 37 °C durante 8 h (5 % de CO<sub>2</sub>) con una solución de WST-1 (reactivo para medir la viabilidad celular) diluida 15x (Roche, 1164807001, número de lote 12797000) en medio de revelación de HRV (DMEM suplementado con un 2 % de FCS, MgCl<sub>2</sub> 30 mM, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, β-mercaptoetanol 50 μM, 1 % de aminoácidos no esenciales y 1 % de penicilina/estreptomicina). A continuación, las placas se leen a una longitud de onda de 450 nm usando el programa informático Softmaxpro.

15 Para calcular los títulos de anticuerpos neutralizantes, los conjuntos de datos se normalizaron tomando como base la media de la D.O. de WST-1 en los pocillos de "células sin virus" y de "células sin suero" al 0 y al 100 % de efecto citopático (CPE), respectivamente. El porcentaje de inhibición del CPE a una dilución *i* estaba dado entonces por:

$$\% \text{ de inhibición} = (D.O._i - D.O. \text{ media de células sin suero}) / (D.O. \text{ media de células sin virus} - D.O. \text{ media de células sin suero})$$

20 A continuación, se extrapoló el recíproco de la dilución, dando una reducción del 50 % del CPE usando una regresión no lineal.

## 2.2 Medición de los linfocitos T CD4+/CD8+ específicos del rinovirus mediante una tinción de las citocinas intracelulares.

25

Las frecuencias de los linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos de antígeno que producen IL-2, IFN-γ y/o TNF-α se evaluaron mediante una tinción de las citocinas intracelulares (ICS) en el bazo recogido (a) el día 14 después de la segunda inmunización (D28 antes de la exposición), y (b) los días 14 después de la exposición al HRV1b (D56 después de la segunda inmunización).

30

### Aislamiento de esplenocitos

35 Los bazos se recogieron en medio RPMI 1640 sin L-glutamina suplementado con aditivos RPMI (= medio RPMI) y se disociaron en una suspensión unicelular que se transfirió a un colador celular de 100 μm y se enjuagó con 5 ml del medio RPMI. A continuación, las células del bazo se centrifugaron a 335 g durante 10 min (4 °C) y el sedimento se resuspendió en 5 ml de medio RPMI. Esta etapa previa de lavado se repitió una vez más y el sedimento final se resuspendió en 5 ml de medio RPMI suplementado con un 5 % de FCS.

40 A continuación, la suspensión de células se diluyó 20x (10 μl) en tampón PBS (190 μl) para el recuento de células (usando el analizador MACSQuant). Después del recuento, las células se centrifugaron de nuevo (335 g, 10 min, TA) y el sedimento celular se resuspendió a 10<sup>7</sup> células/ml en medio RPMI.

### Preparación de las células

45 Los esplenocitos se sembraron en placas de fondo redondo de 96 pocillos aproximadamente a 1 millón de células por pocillo. Los esplenocitos se estimularon *in vitro* con 100 μl de:

- un conjunto de péptidos 15mer que solapan en 11 aa que cubren toda la secuencia de aminoácidos de las proteínas VP2, VP4 de las cepas 14 y 39 del HRV2, a una concentración de trabajo de 1 μg/ml por péptido.
- 50 - Partículas de los HRV3 y 28 ultracentrifugadas (UC) a 1,4 x 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/ml (~MOI 1).
- Partículas UC del HRV25 a 1,4 x 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/ml (~MOI 0,1).
- Lisado de células UC no infectadas o medio (como controles negativos del ensayo).
- Solución de PMA-ionomicina a unas concentraciones de trabajo de 0,25 μg/ml y 2,5 μg/ml, respectivamente (como control positivo del ensayo).

55

Se añadieron los anticuerpos CD4 T 49d y CD28 (1 μg/ml) y se incubaron las células durante:

- 2 h a 37 °C, seguido de 4 h en presencia de brefeldina (1 μg/ml) para inhibir la secreción de citocinas para la estimulación *in vitro* usando los conjuntos de péptidos de las proteínas VP2, VP4 de las cepas HRV2, 14 y 39.
- 60 - 16 h a 37 °C, seguido de 4 h en presencia de brefeldina (1 μg/ml) para inhibir la secreción de citocinas para la estimulación *in vitro* usando preparaciones víricas UC (HRV3-25-28).

**Tinción de las citocinas intracelulares (ICS)**

La tinción de las células se realizó como sigue: las suspensiones celulares se colocaron en placas de 96 pocillos con fondo en V, se sedimentaron (150 g, 5 min a 4 °C) y se lavaron con 250 µl de PBS, 1 % de FCS. Las células se sedimentaron de nuevo y se resuspendieron en 50 µl de PBS al 1 % de FCS que contenía un reactivo de bloqueo de Fc al 2 % (1/50; CD16/32). Después de una incubación de 10 min a 4 °C, se añadieron 50 µl de una mezcla de anti-T CD4-V450 (1/200), anti-T CD8 perCp-cy 5.5 (1/100) y PO vivo y muerto (1/1.000) y se incubaron 30 min en la oscuridad a 4 °C. Tras un lavado con PBS al 1% de FCS, las células se permeabilizaron en 200 µl de Cytofix-Cytoperm (Kit BD) y se incubaron 20 min a 4 °C.

A continuación, las células se lavaron con Perm Wash (Kit BD) y se resuspendieron con 50 µl de APC anti-IFNγ (1/200) + FITC anti-IL-2 (1/400) + PE anti-TNFα (1/700) diluidos en PermWash. Después de 1 h de incubación a 4 °C, las células se lavaron con Perm Wash y se resuspendieron en 220 µl de PBS.

**Adquisición y análisis de las células**

Las células teñidas se analizaron por citometría de flujo usando un LSRII y el programa informático FlowJo. Las células vivas se identificaron con la tinción Live/Dead y luego se seleccionaron con FSC/SSC, y la adquisición se realizó sobre ~20.000 eventos (linfocitos T CD4+). Se calcularon los porcentajes de células productoras de IFN-γ +/- IL-2+ +/- TNFα en las poblaciones T CD4+ y T CD8+ seleccionadas.

**Lista de reactivos usados** (números de referencia disponibles en el momento de la presentación)

| Reactivos                         | N.º de catálogo | Números de lote | Proveedores      |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Medio RPMI 1640                   | 31870-025       | 1683050/1734648 | Gibco            |
| Aditivos RPMI                     | SR120           | D16R001083      | Interno          |
| PBS sin Ca++ ni Mg++              | BE17512Q        | 5MB165          | Lonza            |
| Suero bovino fetal inactivado     | FBS-HI-12A      | CP15-1084       | Capricorn        |
| anti-CD16/32 de ratón             | 553142          | 5154726         | BD               |
| V450 anti-CD4 de ratón            | 560468          | 5065793         | BD               |
| PerCp Cy 5.5 anti-CD8 de ratón    | 551162          | 5156801         | BD               |
| PO Live & Dead                    | L34959          | 1733112         | Molecular Probes |
| Cytofix/Cytoperm                  | 51-2090K2       | 5075560         | BD               |
| Permash 10x cc                    | 554723          | 4198590         | BD               |
| FITC anti-IL-2 de ratón           | 554427          | 4344599         | BD               |
| APC anti-IFN-γ de ratón           | 554413          | 4226904         | BD               |
| PE anti-TNF-α de ratón            | 554419          | 3018857         | BD               |
| anti-CD28 de ratón                | 553294          | 83839           | BD               |
| anti-CD49d de ratón               | 553313          | 4105875         | BD               |
| Acetato miristato de forbol (PMA) | P8139-1MG       | MKBS5634V       | Sigma            |
| Ionomicina                        | I0634-1MG       | RNBD5728        | Sigma            |
| Tapón de Golgi (brefeldina)       | 555029          | 4309737         | BD               |
| EPI                               | LOG081D         | D16R001486      | Interno          |
| Perlas de calibración CS&T        |                 | 94851           | BD               |

**2.3 Recuentos diferenciales de células en los líquidos del LBA.**

Las frecuencias de los leucocitos recuperados en los LBA el día 2 después de la exposición al HRV1b se evaluaron mediante el fenotipado de las células inmunitarias usando una citometría de flujo. Un panel de anticuerpos conjugados con fluorocromos específicos para Ly6C-FITC, SiglecFPE, Ly6G-PerCP, CD11-PB, CD3-APC-Cy7, CD11C PE-Cy7, se usó para discriminar fácilmente los macrófagos (CD11c+/CD11b-/SiglecF+), los monocitos (CD11c-/CD11b+/Ly6c+/Ly6g-), los eosinófilos (CD11b+/CD11c-/SiglecF+), los neutrófilos (CD11c-/CD11b+/Ly6c+/Ly6g+) y los linfocitos (CD11c-/CD11b-/CD3+).

Los ratones fueron sacrificados y los pulmones se lavaron y se masajearon suavemente 3 veces con 500 µl de PBS-EDTA 5 mM. A continuación, el líquido recuperado se centrifugó (1.000 g-10 min-25 °C) y se usó para los ensayos de qRT-PCR específicos de CBAflex y HRV1b, mientras que el sedimento celular se resuspendió en PBS-EDTA 2 mM (suplementado con un 2 % de FCS) y las células se sembraron en un polipropileno de 96 pocillos (dependiendo del número de células recuperadas - de 7,2 10<sup>3</sup> a 1,2 x 10<sup>5</sup> células/pocillo).

A continuación, las placas se lavaron con PBS + EDTA 2 mM + 2 % de FCS y se centrifugaron (1.000 g-5 min-4 °C). Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 25 µl de RFc de bloqueo (anti-CD16/CD32 de ratón de rata (2,4 G2), (ref: 553142, número de lote 4198965) prediluido a 1/50 en PBS + EDTA 2 mM + 2 % de FCS e incubado durante 10 min a 4 °C.

25 µl de una mezcla de anticuerpos conjugados con fluorocromos diluidos como sigue: Ly6C-FITC(1/200) (ref: 553104, número de lote: 4330779) SiglecF-PE(1/150) (ref: 552126, número de lote: 3277625), Ly6G-PerCP(1/100) (ref: 560602, número de lote: 5188651), CD11b-PB(1/300) (ref: RM2828, número de lote: 1642766), CD3-APC-Cy7(1/100) (ref: 100222, número de lote: B199708), CD11c-PE-Cy7(1/400) (ref: 558079, número de lote: 4286714) se añadieron a continuación durante 30 minutos a 4 °C. A continuación, las placas se centrifugaron (1.000 g-5 min-4 °C) y el sedimento se resuspendió en PBS, y el análisis de la muestra se realizó mediante una citometría de flujo. Se seleccionaron las células vivas (FSC/SSC) y la adquisición se realizó sobre ~100.000 eventos.

## 2.4 Cuantificación de las citocinas secretadas en los líquidos del LBA (ensayo CBA Flex)

La cuantificación de las citocinas secretadas (IL-6, TNF-α, INF-γ, IL-12p-70, IL-10, MCP-1) en los líquidos del LBA recogidos el día 2 después de la exposición al HRV1b también se realizó usando BD™ Cytometric Bead Array (CBA, BD, Estados Unidos - ref. 552364; número de lote 5261593) siguiendo las instrucciones del fabricante con muestras no diluidas.

Los procedimientos de configuración de los instrumentos de la FACS se llevaron a cabo usando la comprobación del rendimiento (usando perlas CS&T) y el protocolo de limpieza diaria. Los patrones se reconstituyeron en el diluyente de ensayo (concentración madre a 50.000 pg/ml), se dejaron equilibrar a la temperatura ambiente durante al menos 15 min, se realizaron diluciones en serie mixtas y de dos veces comenzando la dilución desde 5.000 pg/ml hasta 5 pg/ml.

A una placa de 96 pocillos se añadieron 50 µl de curva patrón mixta o de muestras sin diluir a los apropiados pocillos de ensayo, y se añadieron 50 µl/pocillo de perlas de captura mixtas (IL6, TNF-α, INF-γ, IL-12p-70, IL-10, MCP-1) a cada pocillo de ensayo. Las placas se mezclaron durante 5 minutos usando un agitador digital. A continuación, las placas se incubaron durante 1 hora a la temperatura ambiente, protegidas de la luz.

Se añadieron 50 µl/pocillo del reactivo de detección PE mixto a cada pocillo y se mezcló durante 5 minutos usando el agitador digital. Las placas se incubaron de nuevo durante 1 hora a la temperatura ambiente, protegidas de la luz.

Las placas se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 min (con freno), el sobrenadante se eliminó cuidadosamente usando una pipeta multicanal y las perlas se resuspendieron en 200 µl de tampón de lavado. A continuación, las muestras se adquirieron mediante una FACS (Fortessa) y se analizaron con el programa informático FlowJo (FCAP Array).

## 2.5 Detección de genomas de ARN monocatenario positivo en los líquidos del LBA

Para asegurar que los ratones eran expuestos satisfactoriamente a la cepa HRV1b, se investigaron los niveles de ARN genómico monocatenario positivo del HRV1b en los líquidos del LBA recogidos el día 2 después de la exposición al HRV1b. Las muestras de LBA se centrifugaron (1.000 g-10 min-25 °C) y el sobrenadante se usó para detectar/cuantificar el ARN genómico (cadena positiva) mediante el ensayo de qRT-PCR. El ARN se purificó a partir de 100 µl de muestra de LBA (50 µl de LBA/50 µl de ARN posterior) usando el mini kit QIAamp Viral RNA (Qiagen) 2, 6 o 14 días después de la inoculación.

El ARN genómico (cadena positiva) se detectó como sigue: Transcripción inversa: el ARN, el cebador aleatorio y el dNTP se calentaron durante 10 min a 65 °C y luego se colocaron en hielo. El ADNc se sintetizó con la transcriptasa inversa Superscript III durante 50 min a 55 °C y luego se inactivó por calor a 70 °C durante 15 min.

La PCR en tiempo real se llevó a cabo con 2 µl de ADNc con cebador directo 900 nM (RV-F1), cebador inverso 300 nM (RV-R1) y sonda 200 nM (RV-Probe) usando la mezcla maestra de expresión génica de TAQMAN. Las condiciones de ciclación de la qPCR eran: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, seguido de 45 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C.

## EJEMPLO 3: RESULTADOS

### 3.1 Cuantificación del genoma de ARN monocatenario positivo

Se obtuvieron los siguientes resultados:

- Se detectaron altos niveles de genomas de ARN positivos (~10<sup>7</sup>/10<sup>8</sup> número de copias de ARN/ml de LBA) en los líquidos del LBA de los ratones expuestos, lo que atestigua que la exposición IN al HRV1b se logró satisfactoriamente (figura 1).
- No se investigó la capacidad de replicación de las partículas del virus debido al escaso nivel de la cadena negativa expresada en los líquidos del LBA.

### 3.2 Recuentos diferenciales sanguíneos totales

La respuesta inmunitaria inflamatoria se investigó contando el número de células sanguíneas completas (linfocitos, neutrófilos, macrófagos, eosinófilos) recuperados en los líquidos del LBA el día 2 después de la exposición al HRV1b. Se obtuvieron los siguientes resultados:

- Se detectaron unos niveles de neutrófilos de dos a cinco veces superiores (2.000-9.000 células/ml de LBA) en algunos ratones expuestos a la cepa HRV1b en comparación con los ratones expuestos a NaCl 150 mM (exp 20140293 - <2.000 células/ml de LBA) (figura 2), lo que sugiere que la exposición al HRV1b induce la infiltración de neutrófilos. Sin embargo, es importante destacar que los niveles de neutrófilos detectados en los líquidos del LBA después de la exposición son variables de un ratón a otro.

### 3.3 Cuantificación de las citocinas/quimiocinas secretadas en los líquidos del LBA usando el ensayo CBA Flex

La medición de los niveles de proteínas de 6 citocinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-6, IL-10 e IL-12p70) y de quimiocinas (MCP-1) se realizó mediante el ensayo CBAflex en los líquidos del LBA recogidos el día 2 después de la exposición al HRV1b. Se obtuvieron los siguientes resultados:

- Se detectó un alto nivel de quimiocinas proinflamatorias MCP-1 (>20 pg/ml) en algunos de los líquidos del LBA de algunos ratones expuestos (figura 3). También es importante destacar que la inducción de quimiocinas MCP-1 era variable de unos ratones a otros y dentro del mismo grupo.
- En los líquidos del BAL no se detectaron niveles de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , citocinas de tipo IL-6, IL-10, IL-12p-70, o bien eran limitados (figura 3).

### 3.4 Respuestas de los linfocitos T CD4/CD8+específicas del rinovirus detectadas en las células del bazo recogidas antes y después de la exposición al HRV1b

Se investigaron los niveles de las respuestas de los linfocitos T CD4+/CD8+ específicas del HRV en las células del bazo recogidas los 14 días posteriores a la segunda inmunización (antes de la exposición) y los 14 días posteriores a la exposición al HRV1b.

Las respuestas de los linfocitos T CD4+/CD8+ específicas del tipo se investigaron usando un conjunto de péptidos que cubrían la secuencia completa de las proteínas VP2 (del HRV39) o VP4 (de los serotipos HRV2 y 39), mientras que las respuestas de reacción cruzada de los linfocitos T CD4+/CD8+ se investigaron usando un conjunto de péptidos derivados de HRV2 o de HRV14 que cubrían la secuencia completa de las proteínas VP2 o VP4, o partículas ultracentrifugadas (UC) del HRV3, 25 o 28 (multiplicidad de infección (MOI) 0,1-1, dependiendo de las cepas del HRV usadas). Se obtuvieron los siguientes resultados.

#### Respuestas específicas de tipo de los linfocitos T CD4+

Se detectó una alta frecuencia (0,8-1,7 %) de respuestas de los linfocitos T CD4+ específicas de la VP2 del HRV39 antes de la exposición al HRV1b en el grupo 1 (VP2/VP4), pero no en los otros grupos. Curiosamente, esta respuesta se vio reforzada (~2 veces más alta) 14 días después de la exposición al HRV1b (1,7-3,2 %) en el grupo 1 (figura 4).

En todos los grupos se detectó una frecuencia nula o baja (0,1-0,5 %) de respuestas de los linfocitos T CD4+ específicas de la VP4 de los HRV2/39. No se detectó ningún efecto de refuerzo 14 días después de la exposición al HRV1b (figuras 5 y 6).

#### Respuestas de reacción cruzada de los linfocitos T CD4+

No se detectó ninguna respuesta de reacción cruzada de los linfocitos T CD4+ contra la proteína VP4 del HRV14 (subtipo B) antes y después de la exposición al HRV1b (datos no mostrados).

Ya se detectaron respuestas de reacción cruzada de los linfocitos T CD4+ contra la VP2 del HRV2 (subtipo A/m) o del HRV14 (subtipo B) antes de la exposición al HRV1b en el grupo 1 (intervalo de frecuencia del 0,2-0,8 %), pero no en otros grupos. En cuanto a la respuesta específica de los linfocitos T CD4+, las respuestas de reacción cruzada a la VP2 también se reforzaron (~4 veces mayores) 14 días después de la exposición al HRV1b (1,0-2,9 %) (figuras 7 y 8).

Ya se detectaron linfocitos T CD4+ de reacción cruzada contra las partículas del HRV25 (subtipo A/m) antes de la exposición al HRV1b en el grupo 1 (intervalo de frecuencia del 0,5-1,5 %), pero no en los otros grupos. Se detectó un efecto de refuerzo de la respuesta 14 días después de la exposición al HRV1b (figura 9).

Se detectaron unos niveles nulos o bajos de reacción cruzada de los linfocitos T CD4+ (<0,2 %) contra las partículas de los HRV3 (subtipo B) y 28 (subtipo A/M) antes de la exposición al HRV1b. Las respuestas de los linfocitos T CD4+

contra la cepa HRV3 (0,25-0,5 %) o HRV28 (0,35-1 %) se reforzaron 14 días después de la exposición al HRV1b en el grupo 1, pero no en los otros grupos (figuras 10 y 11).

#### Respuestas de los linfocitos T CD8+

- 5 No se detectaron respuestas de los linfocitos T CD8+ antes y después de la exposición al HRV1b tras las estimulaciones *in vitro* con péptidos derivados de las VP2/VP4 de los HRV2/14/39 o con partículas de los HRV3 y 28 UC (datos no mostrados).
- 10 Se detectaron respuestas de los linfocitos T CD8+ específicas para el HRV25 antes de la exposición al HRV1b en el grupo 1 y en el grupo 2. La frecuencia de esta respuesta de los linfocitos T CD8+ se reforzó 14 días después de la exposición al HRV1b (0,4-1 %), pero únicamente en el grupo 1 (figura 12).

### **3.5 Medición de las respuestas de anticuerpos neutralizantes específicos del HRV en muestras de suero recogidas antes y después de la exposición al HRV1b**

15 Se investigaron los niveles de anticuerpos neutralizantes específicos del HRV en sueros de ratones agrupados (5 o 7 grupos de 3 ratones/gr) recogidos 14 días después de la segunda inmunización (antes de la exposición) o 14 días después de la exposición al HRV1b. La actividad neutralizante se ensayó contra las siguientes cepas:

- 20 Subtipo A/m: HRV1b, 2, 25, 29  
 Subtipo A/M: HRV8, 16, 28, 39  
 Subtipo B: HRV3 y 14

25 Se obtuvieron los siguientes resultados:

- no se detectaron anticuerpos neutralizantes (Acn) contra las cepas HRV2, 3, 8, 14, 16, 25, 28, 29, 39 antes y después de la exposición al HRV1b (datos no mostrados).
- se detectaron unos niveles más altos de Acn específicos para el virus del serotipo de la exposición (HRV1b) 14 días después de la exposición en los sueros de los ratones del grupo 1 en comparación con los otros grupos (GMR de 13,00 entre los grupos 1 y 2, GMR de 6,99 entre los grupos 1 y 3) (figura 13). Esto indica que la primovacunación con la proteína VP2 del HRV39 potencia la generación de Acn frente a la infección por la cepa heterosubtípica (HRV1b).

### **EJEMPLO 4: Estudio de inmunogenia en ratones**

Se inició un estudio de inmunogenia en ratones con la proteína recombinante VP0, VP2 o VP4 del HRV39, adyuvada con AS01B. El objetivo principal de este estudio era demostrar las respuestas homólogas y heterólogas específicas del antígeno de los linfocitos T en ratones vacunados con la proteína recombinante VP0, VP2 o VP4 del HRV39 usando un ensayo de tinción de las citocinas intracelulares.

#### 4.1 Materiales y métodos:

45 Se inmunizaron cinco grupos de ratones CB6F1 hembra (de 6 a 8 semanas de edad) fueron inmunizados en los días 0 y 28 mediante inyección intramuscular con solución salina (control), proteína VP0 recombinante del HRV39 adyuvada con AS01B, VP2 del HRV39 adyuvada con AS01B, VP4 del HRV39 adyuvada con AS01B o virus HRV39 vivo (Virapur).

El día 42, se generó suero a partir de todos los ratones para los ensayos serológicos y se recogieron los bazo de 6 ratones por grupo para los ensayos de inmunogenia mediante una tinción de las citocinas intracelulares. Los esplenocitos se incubaron hasta el día siguiente con grupos de péptidos (15-mers con 11 solapamientos de aminoácidos) de la VP2 o la VP4 de cinco tipos de HRV (HRV39, HRV1b, HRV2, HRV14, y HRV89), seguido de una incubación de 4 horas con brefeldina A. Las células se tiñeron para comprobar su viabilidad, se fijaron, se permeabilizaron y luego se tiñeron con anticuerpos marcados con fluorescencia contra CD3, CD4, CD8, CD44, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, CD107a, IL-13, IL-4, IL-17A e IL-17F. Los datos se adquirieron usando un citómetro de flujo BD Fortessa y se analizaron usando FLOWJO X antes de representarlos gráficamente con GraphPad Prism.

Los ratones restantes fueron inmunizados por vía intranasal con el virus HRV1b vivo, con la excepción del grupo de control tratado con solución salina, el día 56. Los bazo y el suero se recogerán el día 70 del estudio para realizar ensayos inmunológicos adicionales.

#### 4.2 Resultados:

En los esplenocitos recogidos el día 42, se detectaron respuestas de linfocitos T CD4+ específicas del antígeno en los ratones inmunizados con la VP2 o la VP0 del HRV39, como se describe en el apartado 4.1 anterior, en respuesta a la

estimulación con un conjunto de péptidos VP2 homólogos del HRV39 (fig. 14A) y con conjuntos de péptidos VP2 heterólogos de los HRV1B (fig. 14B), HRV2 (fig. 14C), HRV89 (fig. 14D) y HRV14 (fig. 14E). En las figs. 14A-14E, los datos mostrados son de ratones individuales (n = 6 por grupo), con la mediana indicada por una línea horizontal. De izquierda a derecha en cada una de las fig. 14A-14E, las columnas muestran los datos de los ratones inmunizados con la VP2 del HRV39 (círculo), la VP4 del HRV39 (cuadrado), la VP0 del HRV39 (triángulo), el virus HRV39 vivo (rombo) y solución salina (hexágono), respectivamente. Nótese las diferencias en el límite superior en el eje Y.

Los esplenocitos de los ratones inmunizados con la VP4 del HRV39 produjeron poco o ningún IFN- $\gamma$  en respuesta a la estimulación con el conjunto de péptidos VP2 homólogos (HRV39) o heterólogos (HRV1B, HRV2, HRV89 o HRV14) (fig. 15). Se detectaron pocas o nulas respuestas de los linfocitos T CD8+ específicas del antígeno frente a las estimulaciones con conjuntos de péptidos homólogos o heterólogos (datos no mostrados).

Los linfocitos T CD4+CD44+ de los esplenocitos de los ratones inmunizados con la VP2, la VP4 o la VP0 del HRV39 produjeron poco o ningún IFN- $\gamma$  en respuesta a la estimulación con péptidos VP4 de tipos de HRV homólogos (15A) o heterólogos (15B, 15C, 15D, 15E). Los datos mostrados son de ratones individuales (n = 6 por grupo), con la mediana indicada por una línea horizontal. De izquierda a derecha en cada una de las figuras 15A-15E, las columnas muestran los datos de los ratones inmunizados con la VP2 del HRV39 (círculo), la VP4 del HRV39 (cuadrado), la VP0 de HRV (triángulo), el virus HRV39 vivo (rombo) y solución salina (hexágono), respectivamente.

Se realizó un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la VP2 de los cinco tipos de HRV usados en este estudio para identificar las regiones con un alto grado de identidad de aminoácidos como posibles áreas de reactividad cruzada. La figura 16A proporciona una visión global del grado de conservación de cada aminoácido en los cinco tipos de HRV incluidos. La altura de la barra en la línea de "identidad" está directamente relacionada con el grado de conservación de ese aminoácido. Se detectan múltiples regiones de alta homología que podrían explicar el fenotipo de linfocitos T CD4+ de reacción cruzada. La figura 16C proporciona una alineación textual de las secuencias completas de la VP2 de estos cinco tipos de HRV (HRV\_39-VP2 (SEQ ID NO: 1), HRV\_89-VP2 (SEQ ID NO: 15), HRV\_1B-VP2 (SEQ ID NO: 16), HRV\_02-VP2 (SEQ ID NO: 17) y HRV\_14-VP2 (SEQ ID NO: 18)).

Como se muestra en la figura 16B, existe un mayor grado de identidad de aminoácidos cuando se comparan las secuencias entre los tipos A del HRV (HRV39, HRV89, HRV1B, y HRV2) con respecto al grado de identidad de aminoácidos cuando se comparan cada uno de estos tipos A con el tipo B del HRV14 (fig. 16B).

El día 70 del estudio, se cuantificarán las respuestas esperadas de los linfocitos T específicas del antígeno frente a los homólogos (HRV39 y/o HRV1b) y a los heterólogos (HRV2, HRV89 y/o HRV14).

**SEQ ID NO: 1: VP2 del HRV39 natural**

SPTVEACGYS DRIIQITRGD STITSQDVAN AVVGYGWPH YLTADDASAI DKPTQPDTS  
NRFYTLESKV WKRD SKGWWW KLPDALKDMG IFGENMYYHF LGRSGYTVHV QCNASKFHQG  
TLLIAMVPEH QLASANYGNV TAGYNYTHPG EAGRDVGQQR TNNEKQPSDD NWLNFDGTLL  
GNLLIFPHQF INLR SNNSAT IIVPYVNAV P MDSMLRHNNW SLLIIPVSPL EADTSATAIV  
PITVSISPMF SEFSGARARP AAAT -264

**SEQ ID NO: 2: VP2 del HRV39 mutante**

SPTVEACGYS DRIIQITRGD STITSQDVAN AVVGYGWPH YLTADDASAI DKPTQPDTS  
NRFYTLESKV WKRD SKGWWW KLPDALKDMG IFGENMYYHF LGRSGYTVHV QCNASKFHQG  
TLLIAMVPEH QLASANYGNV TAGYNYTHPG EAGRDVGAGA TGAGKQPSDD NWLNFDGTLL  
GNLLIFPHQF INLR SNNSAT IIVPYVNAV P MDSMLRHNNW SLLIIPVSPL EADTSATAIV  
PITVSISPMF SEFSGARARP AAAT -264

**SEQ ID NO: 3: concatémoro de proteínas VP4 de longitud completa del subtipo A**

GTQVSRQNVG THSTQNSVSN GSSLNYFNIN YFKDAASSGA SKLEFSQDPS KFTDPVKDVL  
 EKGIPITLQGG AQVSRQNVGT HSTQNAVSNG SSLNYFNIN YFKDAASSGAS KLEFSQDPSK  
 FTDVPKDVLE KGIPTLQGGGA QVSRQNVGTH STQNMVSNNGS SLNYFNIN YFKDAASSGASK  
 LEFSQDPSKF TDPVKDVLEK GIPTLQGGGAQ VSRQNVGTHS TQNVVSSGSS LNYFNIN YFKDAASSGASK  
 DAASSGASKL EFSQDPSKFT DPKVDVLEK IPTLQGGGAQV SRQNVGTHST QNSVSNNGSSL  
 NYFNIN YFKDAASSGASKLE FTQDPSKFTD PVKDVLEKGI PTLQGGGAQVP RQKVGTHSTQ  
 NSVSNNGSSLN YFNIN YFKDAASSGASRLDF SQDPSKFTDP VKDVLEKGI PTLQGGGAQVSR  
 QNVGTHLTHN SVSNNGSSLN YFNIN YFKDAASSGASRLDFS QDPSKFTDPV KDVLTGKIPT  
 LQGGGAQVSRQ NVGTHSTQNT VANGSSLN YFNIN YFKDAASSGASRLDFSQ DPSKFTDPVK  
 DVLIKGVPTL QGGGAQVSRQ NVGTHSTQNAV SGGSSLN YFNIN YFKDAASSGASRLDFSQD  
 PSKFTDPVKD VLTGKIPTLQ GGAQVSRQNV GTHSTQNSVS GGSSLN YFNIN YFKDAASSG  
 ASKLEFSQDP SKFTDPVKDV LEKGIPTLQ

**SEQ ID NO: 4: poliproteína VPO del HRV39 - secuencia uniprot Q5XLP5**

MGAQVSRQNV GTHSTQNSVS GGSSLN YFNIN YFKDAASSG ASKLEFSQDP SKFTDPVKDV  
 LEKGIPTLQS PTVEACGYSD RIIQITRGDS TITSQDVANA VVGYGWPHY LTADDASAI  
 KPTQPDTSN RFYTLESKVW KRDSKGWWK LPDALKDMGI FGENMYHFL GRSYTVHVQ  
 CNASKFHQGT LLIAMVPEHQ LASANYGNVT AGYNYTHPGE AGRDVGQRT NNEKQPSDDN  
 WLNFDGTLG NLLIFPHQFI NLRNNSATI IVPYVNAVPM DSMLRHNNS LLIIPVSPLE  
 ADTSATAIVP ITVSISPMFS EFSGARARPA AATQGLPVYM TPGSGQFLT DDLQSPSALP  
 WYHPTKEIFI PGQVRNLIEM CQVDTMIPIN NTNERIGNVN MYTVSLTSQT NTAEQIFA  
 VDIASQPLSS TLIGEIASYY THWTGSLRFS FMFCGTANTT LKLLLAYTPP GIDKPTTRKQ  
 AMLGTHIVD VGLQSTVSLV VPWVSASHFR YTTPTDYSMA GYITCWYQTN FVFPNTPN  
 ANMICFVSGC KDFCLRMARD TDMHVQNVPI TQNPVENYID EVLNEVLVVP NIRESHPTTS  
 NAATALDAE TGHTSSIQPE DTIETRYVQT SHTRDEMSVE SFLGRSGCIH ISTITMKKEN  
 YNEHNFVDWK ITLQEMAQVR RKFEMFTYVR FDSEITLVPC IAGRGEDIGH IVMQMYVPP  
 GAPVPKKRDD YTWQSGTNAS VFWQHGPYP RFSLPFLSIA SAYYMFYDGY DGDKSSSRYG  
 VSVTNDMGTL CTRIVTNQOK HIVEVTRVY HKAKHVKAWC PRAPRAVPT HSNVTNYKVR  
 DGEPTLFIKP RENLTAGPS DMVHVGNLI YRNLHLFNSE MHSILVSYS SDLVIYRTNT  
 QGDDYIPTC CTQATYYCKH KNRYFPITV SHDWYEQES EYYPKHIQYN LLIGEGPCEP  
 GDCGKLLCK HGVIGIITAG GDNHVAIFDL RHFHCAEEQG VTDYIHLGE AFGNGFVDSV  
 KEHVKAIPV GNISKKIWK MLRIISAMVI IIRNSSDPQT ILATLTLLIGC SGSPWRFLKE  
 KFCKWTQLTY IHKESDSWLK KFTMCNAAR GLEWIGNKIS KFIEWMKSML PQAQLKVYL  
 NELKRLNLYE KQVENLRVAD IKTQEKIKME IDTLHDLCK FLPLYASEAK RIKILHNKCD  
 TIKQKKRSE PVAIVVHGPP GTGKSITTSF LARMITNDS IYSLPPDPKY FDGYDQQSVV  
 IMDDIMQNPT GEDMTLFCQM VSSVTFIPPM ADLPDKGKAF DSRFVLCSTN HSLAPPTIT

SLPAMNRRFF LDLDIIVHDN YKDAQGKLV AAARPCDVN TKIGNARCCP FVCGKAVSFK  
 DRNSCNKYTL AQIYNIMLEE DKRRRQVIDV MSAIFQGPIS LQNPPPPAIA DLLQSVRTP  
 VIKYCEENKW IIPAECKIEK ELNLANTIIT IANVINIAG IYVYIKLFC TLQGPYSGEP  
 KPKTKIPERR VVAQGPEEF GRSLIKHNSC VTTQNGKFT GLGIYDRVM IPTHADPDKE  
 VQIDGITTKV LDSYDLYNKD GVKLEITVLK LDRNEKFRDI RYIPENEDD YPECNLALSA  
 NQPETTILNV GDVVSYGNIL LSGNQATARM KYNYPKSGY CGGILYKIGQ VLGIHVGGNG  
 RDGFSAMLLR SYFTDTQGI TLSKKTSECG LPSIHNPST KLQPSVFYDI FPGSKQPAVL  
 SEKDTRLQVD FNEALFSKYK GNVDCEPMNDH IKIASSHYAA QLITLDINPN PITLEDGVFG  
 TEGLEALDLN TSAGFPYITM GIKKRDILNN KTKDISRLKQ AIDKYGVDLP MVTFLKDEL  
 KEEKIAKGKT RVIEASSVND TLLFRITFGN LFSKFHLNPG IVTGSVAGCD PETFWSKIP  
 MLDDKCIAMF DYTNYDGSIH PVWFQALKQV LSDLSFDPST IDRLCKSKHI FRNTYVEVEG  
 GVPSGCSGTS IFNTMMNNII IRTLVLDAYK NIDLDKLKII AYGDVIFSY VYELDMEAIA  
 MEGKKYGLTI TPADKSDIFR KLDYSNVTF LKRGFRQDEKY NFLIHPTFPE SEIFESIRWT  
 KKPSQMGEHV LSLCHLMWHN QGSAYKSFE RIRSVSAGRA LYIPPYDL L HEWYEKF

5

**SEQ ID NO: 5 péptido del HRV derivado de la VP1 del HRV14 (B)**  
PILTANETGA TMPV

10

**SEQ ID NO: 6 péptido del HRV derivado de la VP1 del HRV8 (A-M)**  
PALDAAETGH TSSV

**SEQ ID NO: 7 péptido del HRV derivado de la VP1 del HRV25 (A-M)**  
PILDAAETGH TSNV

**SEQ ID NO: 8 péptido del HRV derivado de la VP1 del HRVC026**  
QALGAVEIGA TADV

**SEQ ID NO: 9 péptido del HRV derivado de la VP4 del HRV14 (B)**  
GAQVSTQKSG SHENQN

**SEQ ID NO: 10 péptido del HRV derivado de la VP4 del HRV100 (A-M)**  
GAQVSRQNVG THSTQN

**SEQ ID NO: 11 péptido del HRV derivado de la VP4 del HRV\_C\_026**  
GAQVSRQSVG SHETMI

**SEQ ID NO: 12 péptido del HRV derivado de la VP2 del HRV2**  
SSKGWWWKLP DALKDMGIFG ENMFYHYLGR S

**SEQ ID NO: 13 péptido del HRV derivado de la VP2 del HRV2**  
IPEHQIASAL HGNVNVGYNY THPGETGREV K

**SEQ ID NO: 14 péptido del HRV derivado de la VP2 del HRV2**  
INTIPITISI SPMCAEFSGA RAKRQGLPVF I

**SEQ ID NO: 15 VP2 del HRV\_89**

SPTVEACGYS DRLIQITRGD STITSQDTAN AVVAYGVWPS YLTPDDATAI DKPTQPDTS  
NRFYTLDSRS WTSASSGWWW KLPDALKNMG IFGENMFYHF LGRSGYTIHV QCNSSKFHQG  
LLIVAAIPEH QLASATSGNV SVGYNHTHPG EQGREVVPSR TSSDNKRPSD DSWLNFDGTL  
LGNLPIYPHQ YINLRTNNSA TLILPYVNAV PMDSMLRHNN WSLVIIPICP LQVQPGGTQS  
IPITVSISPM FSEFSGPRSK VVFSTTQ - 267

**SEQ ID NO: 16 VP2 del HRV\_1B**

SPSVEACGYS DRIIQITRGD STITSQDVAN AVVGYGWVPH YLTPQDATAI DKPTQPDTS  
NRFYTLSEKH WNGDSKGWWW KLPDALKEMG IFGENMYHF LGRSGYTVHV QCNASKFHQG  
TLLVAMIPEH QLASAKNGSV TAGYNLTHPG EAGRVVGQQR DANLRQPSDD SWLNFDGTLL  
GNLLIFPHQF INLRSNNSAT LIVPYVNAV MDSMLRHNNW SLVIIPISPL RSETTSSNIR  
PITVSISPMC AEFSGARAKN VRQ - 263

**SEQ ID NO: 17 VP2 del HRV\_02**

SPTVEACGYS DRIIQITRGD STITSQDVAN AIVAYGVWPH YLSSKDASAI DKPSQPDTS  
NRFYTLRSVT WSSSSKGWWW KLPDALKDMG IFGENMFYHY LGRSGYTIHV QCNASKFHQG  
TLIVALIPEH QIASALHGNV NVGYNHTHPG ETGREVKAET RLNPDLQPT EYWLNFDTLL  
LGNITIFPHQ FINLRSNNSA TIIAPYVNAV PMDSMRSHNN WSLVIIPICP LETSSAINTI  
PITISISPMC AEFSGARAKR Q -261

**SEQ ID NO: 18 VP2 del HRV\_14**

SPNVEACGYS DRVQQITLGN STITTQEAAN AVVCYAEWPE YLPDVDASDV NKTSKPDTSV  
CRFYTLDSKT WTTGSKGWCW KLPDALKDMG VFGQNMFFHS LGRSGYTVHV QCNATKFHSG  
CLLVVVIPEH QLASHEGGNV SVKYTFTHPG ERGIDLSSAN EVGGPVKDVI YNMNGTLLGN  
LLIFPHQFIN LRTNNTATIV IPYINSVPID SMTRHNNVSL MVIPIAPLTV PTGATPSLPI  
TVTIAPMCTE FSGIRSKSIV PQ - 262

LISTADO DE SECUENCIAS

|    |                                       |
|----|---------------------------------------|
|    | <110> GlaxoSmithKline Biologicals, SA |
| 5  | <120> VACUNA                          |
|    | <130> VB66184                         |
|    | <140> desconocido                     |
| 10 | <141> 05/10/2017                      |
|    | <150> 1616904,7                       |
|    | <151> 05/10/2016                      |
| 15 | <160> 18                              |
|    | <170> PatentIn versión 3.5            |
|    | <210> 1                               |
| 20 | <211> 265                             |
|    | <212> PRT                             |
|    | <213> Rinovirus humano                |
|    | <400> 1                               |
| 25 |                                       |

# ES 2 893 542 T3

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

# ES 2 893 542 T3

Thr Asn Asn Glu Lys Gln Pro Ser Asp Asp Asn Trp Leu Asn Phe Asp  
165 170 175

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

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

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

Ile Pro Val Ser Pro Leu Glu Ala Asp Thr Ser Ala Thr Ala Ile Val  
225 230 235 240

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

Arg Ala Arg Pro Ala Ala Ala Thr Gln  
260 265

<210> 2  
<211> 265  
<212> PRT  
<213> Rinovirus humano  
  
<400> 2

# ES 2 893 542 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| Ser | Pro | Thr | Val | Glu | Ala | Cys | Gly | Tyr | Ser | Asp | Arg | Ile | Ile | Gln | Ile | 1   | 5   | 10  | 15 |
| Thr | Arg | Gly | Asp | Ser | Thr | Ile | Thr | Ser | Gln | Asp | Val | Ala | Asn | Ala | Val | 20  | 25  | 30  |    |
| Val | Gly | Tyr | Gly | Val | Trp | Pro | His | Tyr | Leu | Thr | Ala | Asp | Asp | Ala | Ser | 35  | 40  | 45  |    |
| Ala | Ile | Asp | Lys | Pro | Thr | Gln | Pro | Asp | Thr | Ser | Ser | Asn | Arg | Phe | Tyr | 50  | 55  | 60  |    |
| Thr | Leu | Glu | Ser | Lys | Val | Trp | Lys | Arg | Asp | Ser | Lys | Gly | Trp | Trp | Trp | 65  | 70  | 75  | 80 |
| Lys | Leu | Pro | Asp | Ala | Leu | Lys | Asp | Met | Gly | Ile | Phe | Gly | Glu | Asn | Met | 85  | 90  | 95  |    |
| Tyr | Tyr | His | Phe | Leu | Gly | Arg | Ser | Gly | Tyr | Thr | Val | His | Val | Gln | Cys | 100 | 105 | 110 |    |

# ES 2 893 542 T3

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

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

Asn Tyr Thr His Pro Gly Glu Ala Gly Arg Asp Val Gly Ala Gly Ala  
145 150 155 160

Thr Gly Ala Gly Lys Gln Pro Ser Asp Asp Asn Trp Leu Asn Phe Asp  
165 170 175

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

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

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

Ile Pro Val Ser Pro Leu Glu Ala Asp Thr Ser Ala Thr Ala Ile Val  
225 230 235 240

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

Arg Ala Arg Pro Ala Ala Ala Thr Gln  
260 265

<210> 3  
<211> 689  
<212> PRT  
<213> Rinovirus humano

<400> 3

# ES 2 893 542 T3

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

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

Lys Asp Ala Ala Ser Ser Gly Ala Ser Lys Leu Glu Phe Ser Gln Asp  
35 40 45

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

# ES 2 893 542 T3

Pro Thr Leu Gln Gly Gly Ala Gln Val Ser Arg Gln Asn Val Gly Thr  
 65 70 75 80  
 His Ser Thr Gln Asn Ala Val Ser Asn Gly Ser Ser Leu Asn Tyr Phe  
 85 90 95  
 Asn Ile Asn Tyr Phe Lys Asp Ala Ala Ser Ser Gly Ala Ser Lys Leu  
 100 105 110  
 Glu Phe Ser Gln Asp Pro Ser Lys Phe Thr Asp Pro Val Lys Asp Val  
 115 120 125  
 Leu Glu Lys Gly Ile Pro Thr Leu Gln Gly Gly Ala Gln Val Ser Arg  
 130 135 140  
 Gln Asn Val Gly Thr His Ser Thr Gln Asn Met Val Ser Asn Gly Ser  
 145 150 155 160  
 Ser Leu Asn Tyr Phe Asn Ile Asn Tyr Phe Lys Asp Ala Ala Ser Ser  
 165 170 175  
 Gly Ala Ser Lys Leu Glu Phe Ser Gln Asp Pro Ser Lys Phe Thr Asp  
 180 185 190  
 Pro Val Lys Asp Val Leu Glu Lys Gly Ile Pro Thr Leu Gln Gly Gly  
 195 200 205  
 Ala Gln Val Ser Arg Gln Asn Val Gly Thr His Ser Thr Gln Asn Val  
 210 215 220  
 Val Ser Ser Gly Ser Ser Leu Asn Tyr Phe Asn Ile Asn Tyr Phe Lys  
 225 230 235 240  
 Asp Ala Ala Ser Ser Gly Ala Ser Lys Leu Glu Phe Ser Gln Asp Pro  
 245 250 255  
 Ser Lys Phe Thr Asp Pro Val Lys Asp Val Leu Glu Lys Gly Ile Pro  
 260 265 270  
 Thr Leu Gln Gly Gly Ala Gln Val Ser Arg Gln Asn Val Gly Thr His  
 275 280 285  
 Ser Thr Gln Asn Ser Val Ser Asn Gly Ser Ser Leu Asn Tyr Phe Asn  
 290 295 300  
 Ile Asn Tyr Phe Lys Asp Ala Ala Ser Asn Gly Ala Ser Lys Leu Glu

|                 |                 |                 |                 |         |     |     |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------|-----|-----|
| 305             |                 | 310             |                 | 315     |     | 320 |
| Phe Thr Gln Asp | Pro Ser Lys     | Phe Thr Asp     | Pro Val Lys Asp | Val Leu |     |     |
|                 | 325             |                 | 330             |         | 335 |     |
| Glu Lys Gly Ile | Pro Thr Leu Gln | Gly Gly Ala Gln | Val Pro Arg Gln |         |     |     |
|                 | 340             |                 | 345             |         | 350 |     |
| Lys Val Gly Thr | His Ser Thr     | Gln Asn Ser     | Val Ser Asn Gly | Ser Ser |     |     |
|                 | 355             |                 | 360             |         | 365 |     |
| Leu Asn Tyr Phe | Asn Ile Asn Tyr | Phe Lys Asp     | Ala Ala Ser Ser | Gly     |     |     |
|                 | 370             |                 | 375             |         | 380 |     |
| Ala Ser Arg Leu | Asp Phe Ser Gln | Asp Pro Ser Lys | Phe Thr Asp     | Pro     |     |     |
|                 | 385             |                 | 390             |         | 395 | 400 |
| Val Lys Asp Val | Leu Glu Lys Gly | Ile Pro Thr     | Leu Gln Gly     | Gly Ala |     |     |
|                 | 405             |                 | 410             |         | 415 |     |
| Gln Val Ser Arg | Gln Asn Val Gly | Thr His Leu Thr | His Asn Ser     | Val     |     |     |
|                 | 420             |                 | 425             |         | 430 |     |
| Ser Asn Gly Ser | Ser Leu Asn Tyr | Phe Asn Ile Asn | Tyr Phe Lys Asp |         |     |     |
|                 | 435             |                 | 440             |         | 445 |     |
| Ala Ala Ser Ser | Gly Ala Ser Arg | Leu Asp Phe     | Ser Gln Asp     | Pro Ser |     |     |
|                 | 450             |                 | 455             |         | 460 |     |
| Lys Phe Thr Asp | Pro Val Lys Asp | Val Leu Thr     | Lys Gly Ile     | Pro Thr |     |     |
|                 | 465             |                 | 470             |         | 475 | 480 |
| Leu Gln Gly Gly | Ala Gln Val Ser | Arg Gln Asn     | Val Gly Thr     | His Ser |     |     |
|                 | 485             |                 | 490             |         | 495 |     |
| Thr Gln Asn Thr | Val Ala Asn Gly | Ser Ser Leu     | Asn Tyr Phe     | Asn Ile |     |     |
|                 | 500             |                 | 505             |         | 510 |     |
| Asn Tyr Phe Lys | Asp Ala Ala Ser | Asn Gly Ala     | Ser Arg Leu     | Asp Phe |     |     |
|                 | 515             |                 | 520             |         | 525 |     |
| Ser Gln Asp Pro | Ser Lys Phe Thr | Asp Pro Val     | Lys Asp Val     | Leu Ile |     |     |
|                 | 530             |                 | 535             |         | 540 |     |
| Lys Gly Val Pro | Thr Leu Gln Gly | Gly Ala Gln     | Val Ser Arg     | Gln Asn |     |     |
|                 | 545             |                 | 550             |         | 555 | 560 |

# ES 2 893 542 T3

Val Gly Thr His Ser Thr Gln Asn Ala Val Ser Gly Gly Ser Ser Leu  
565 570 575

Asn Tyr Phe Asn Ile Asn Tyr Phe Lys Asp Ala Ala Ser Ser Gly Ala  
580 585 590

Ser Arg Leu Asp Phe Ser Gln Asp Pro Ser Lys Phe Thr Asp Pro Val  
595 600 605

Lys Asp Val Leu Thr Lys Gly Ile Pro Thr Leu Gln Gly Gly Ala Gln  
610 615 620

Val Ser Arg Gln Asn Val Gly Thr His Ser Thr Gln Asn Ser Val Ser  
625 630 635 640

Gly Gly Ser Ser Leu Asn Tyr Phe Asn Ile Asn Tyr Phe Lys Asp Ala  
645 650 655

Ala Ser Ser Gly Ala Ser Lys Leu Glu Phe Ser Gln Asp Pro Ser Lys  
660 665 670

Phe Thr Asp Pro Val Lys Asp Val Leu Glu Lys Gly Ile Pro Thr Leu  
675 680 685

Gln

<210> 4

<211> 2157

<212> PRT

<213> Rinovirus humano

<400> 4

# ES 2 893 542 T3

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

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

Phe Lys Asp Ala Ala Ser Ser Gly Ala Ser Lys Leu Glu Phe Ser Gln  
35 40 45

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

Ile Pro Thr Leu Gln Ser Pro Thr Val Glu Ala Cys Gly Tyr Ser Asp  
65 70 75 80

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

|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Pro        | Val        | Tyr        | Met<br>340 | Thr        | Pro        | Gly        | Ser        | Gly<br>345 | Gln        | Phe        | Leu        | Thr        | Thr<br>350 | Asp        | Asp        |
| Leu        | Gln        | Ser<br>355 | Pro        | Ser        | Ala        | Leu        | Pro<br>360 | Trp        | Tyr        | His        | Pro        | Thr<br>365 | Lys        | Glu        | Ile        |
| Phe        | Ile<br>370 | Pro        | Gly        | Gln        | Val        | Arg<br>375 | Asn        | Leu        | Ile        | Glu        | Met<br>380 | Cys        | Gln        | Val        | Asp        |
| Thr<br>385 | Met        | Ile        | Pro        | Ile        | Asn<br>390 | Asn        | Thr        | Asn        | Glu        | Arg<br>395 | Ile        | Gly        | Asn        | Val        | Asn<br>400 |
| Met        | Tyr        | Thr        | Val        | Ser<br>405 | Leu        | Thr        | Ser        | Gln        | Thr<br>410 | Asn        | Thr        | Ala        | Glu        | Gln<br>415 | Ile        |
| Phe        | Ala        | Ile        | Lys<br>420 | Val        | Asp        | Ile        | Ala        | Ser<br>425 | Gln        | Pro        | Leu        | Ser        | Ser<br>430 | Thr        | Leu        |
| Ile        | Gly        | Glu<br>435 | Ile        | Ala        | Ser        | Tyr        | Tyr<br>440 | Thr        | His        | Trp        | Thr        | Gly<br>445 | Ser        | Leu        | Arg        |
| Phe<br>450 | Ser        | Phe        | Met        | Phe        | Cys        | Gly<br>455 | Thr        | Ala        | Asn        | Thr        | Thr<br>460 | Leu        | Lys        | Leu        | Leu        |
| Leu<br>465 | Ala        | Tyr        | Thr        | Pro        | Pro<br>470 | Gly        | Ile        | Asp        | Lys        | Pro<br>475 | Thr        | Thr        | Arg        | Lys        | Gln<br>480 |
| Ala        | Met        | Leu        | Gly        | Thr<br>485 | His        | Ile        | Val        | Trp        | Asp<br>490 | Val        | Gly        | Leu        | Gln        | Ser<br>495 | Thr        |
| Val        | Ser        | Leu        | Val<br>500 | Val        | Pro        | Trp        | Val        | Ser<br>505 | Ala        | Ser        | His        | Phe        | Arg<br>510 | Tyr        | Thr        |
| Thr        | Pro        | Asp<br>515 | Thr        | Tyr        | Ser        | Met        | Ala<br>520 | Gly        | Tyr        | Ile        | Thr        | Cys<br>525 | Trp        | Tyr        | Gln        |
| Thr<br>530 | Asn        | Phe        | Val        | Phe        | Pro        | Pro<br>535 | Asn        | Thr        | Pro        | Asn        | Asn<br>540 | Ala        | Asn        | Met        | Ile        |
| Cys<br>545 | Phe        | Val        | Ser        | Gly        | Cys<br>550 | Lys        | Asp        | Phe        | Cys        | Leu<br>555 | Arg        | Met        | Ala        | Arg        | Asp<br>560 |
| Thr        | Asp        | Met        | His        | Val<br>565 | Gln        | Asn        | Val        | Pro        | Ile<br>570 | Thr        | Gln        | Asn        | Pro        | Val<br>575 | Glu        |
| Asn        | Tyr        | Ile        | Asp<br>580 | Glu        | Val        | Leu        | Asn        | Glu<br>585 | Val        | Leu        | Val        | Val<br>590 | Pro        | Asn        | Ile        |

Arg Glu Ser His Pro Thr Thr Ser Asn Ala Ala Thr Ala Leu Asp Ala  
 595 600 605

Ala Glu Thr Gly His Thr Ser Ser Ile Gln Pro Glu Asp Thr Ile Glu  
 610 615 620

Thr Arg Tyr Val Gln Thr Ser His Thr Arg Asp Glu Met Ser Val Glu  
 625 630 635 640

Ser Phe Leu Gly Arg Ser Gly Cys Ile His Ile Ser Thr Ile Thr Met  
 645 650 655

Lys Lys Glu Asn Tyr Asn Glu His Asn Phe Val Asp Trp Lys Ile Thr  
 660 665 670

Leu Gln Glu Met Ala Gln Val Arg Arg Lys Phe Glu Met Phe Thr Tyr  
 675 680 685

Val Arg Phe Asp Ser Glu Ile Thr Leu Val Pro Cys Ile Ala Gly Arg  
 690 695 700

Gly Glu Asp Ile Gly His Ile Val Met Gln Tyr Met Tyr Val Pro Pro  
 705 710 715 720

Gly Ala Pro Val Pro Lys Lys Arg Asp Asp Tyr Thr Trp Gln Ser Gly  
 725 730 735

Thr Asn Ala Ser Val Phe Trp Gln His Gly Gln Pro Tyr Pro Arg Phe  
 740 745 750

Ser Leu Pro Phe Leu Ser Ile Ala Ser Ala Tyr Tyr Met Phe Tyr Asp  
 755 760 765

Gly Tyr Asp Gly Asp Lys Ser Ser Ser Arg Tyr Gly Val Ser Val Thr  
 770 775 780

Asn Asp Met Gly Thr Leu Cys Thr Arg Ile Val Thr Asn Gln Gln Lys  
 785 790 795 800

His Leu Val Glu Val Thr Thr Arg Val Tyr His Lys Ala Lys His Val  
 805 810 815

Lys Ala Trp Cys Pro Arg Ala Pro Arg Ala Val Pro Tyr Thr His Ser  
 820 825 830

Asn Val Thr Asn Tyr Lys Val Arg Asp Gly Glu Pro Thr Leu Phe Ile

# ES 2 893 542 T3

| 835 |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 840 |     |     |     |     |     |      |  |  |  | 845 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|--|--|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Lys | Pro | Arg | Glu | Asn | Leu | Thr | Thr | Ala | Gly | Pro | Ser | Asp | Met | Tyr | Val |      |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 850 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 855  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 860  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| His | Val | Gly | Asn | Leu | Ile | Tyr | Arg | Asn | Leu | His | Leu | Phe | Asn | Ser | Glu |      |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 865 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 870  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 875  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 880  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Met | His | Asp | Ser | Ile | Leu | Val | Ser | Tyr | Ser | Ser | Asp | Leu | Val | Ile | Tyr |      |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 885  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 890  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 895  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Arg | Thr | Asn | Thr | Gln | Gly | Asp | Asp | Tyr | Ile | Pro | Thr | Cys | Asp | Cys | Thr |      |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 900  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 905  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 910  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Gln | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Lys | His | Lys | Asn | Arg | Tyr | Phe | Pro | Ile | Thr |      |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 915  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 920  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 925  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Val | Thr | Ser | His | Asp | Trp | Tyr | Glu | Ile | Gln | Glu | Ser | Glu | Tyr | Tyr | Pro |      |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 930  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 935  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 940  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Lys | His | Ile | Gln | Tyr | Asn | Leu | Leu | Ile | Gly | Glu | Gly | Pro | Cys | Glu | Pro |      |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 945  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 950  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 955  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 960 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Gly | Asp | Cys | Gly | Gly | Lys | Leu | Leu | Cys | Lys | His | Gly | Val | Ile | Gly | Ile |      |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 965  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 970  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 975  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Ile | Thr | Ala | Gly | Gly | Asp | Asn | His | Val | Ala | Phe | Ile | Asp | Leu | Arg | His |      |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 980  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 985  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 990  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Phe | His | Cys | Ala | Glu | Glu | Gln | Gly | Val | Thr | Asp | Tyr | Ile | His | Met | Leu |      |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 995  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1000 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1005 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Gly | Glu | Ala | Phe | Gly | Asn | Gly | Phe | Val | Asp | Ser | Val | Lys | Glu | His |     |      |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1010 |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1015 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1020 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Val | Lys | Ala | Ile | Asn | Pro | Val | Gly | Asn | Ile | Ser | Lys | Lys | Ile | Ile |     |      |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1025 |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1030 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1035 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Lys | Trp | Met | Leu | Arg | Ile | Ile | Ser | Ala | Met | Val | Ile | Ile | Ile | Arg |     |      |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1040 |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1045 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1050 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Asn | Ser | Ser | Asp | Pro | Gln | Thr | Ile | Leu | Ala | Thr | Leu | Thr | Leu | Ile |     |      |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1055 |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1060 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1065 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Gly | Cys | Ser | Gly | Ser | Pro | Trp | Arg | Phe | Leu | Lys | Glu | Lys | Phe | Cys |     |      |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1070 |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1075 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1080 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

|      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Lys  | Trp | Thr | Gln | Leu | Thr | Tyr  | Ile | His | Lys | Glu | Ser  | Asp | Ser | Trp |
| 1085 |     |     |     |     |     | 1090 |     |     |     |     | 1095 |     |     |     |
| Leu  | Lys | Lys | Phe | Thr | Glu | Met  | Cys | Asn | Ala | Ala | Arg  | Gly | Leu | Glu |
| 1100 |     |     |     |     |     | 1105 |     |     |     |     | 1110 |     |     |     |
| Trp  | Ile | Gly | Asn | Lys | Ile | Ser  | Lys | Phe | Ile | Glu | Trp  | Met | Lys | Ser |
| 1115 |     |     |     |     |     | 1120 |     |     |     |     | 1125 |     |     |     |
| Met  | Leu | Pro | Gln | Ala | Gln | Leu  | Lys | Val | Lys | Tyr | Leu  | Asn | Glu | Leu |
| 1130 |     |     |     |     |     | 1135 |     |     |     |     | 1140 |     |     |     |
| Lys  | Arg | Leu | Asn | Leu | Tyr | Glu  | Lys | Gln | Val | Glu | Asn  | Leu | Arg | Val |
| 1145 |     |     |     |     |     | 1150 |     |     |     |     | 1155 |     |     |     |
| Ala  | Asp | Ile | Lys | Thr | Gln | Glu  | Lys | Ile | Lys | Met | Glu  | Ile | Asp | Thr |
| 1160 |     |     |     |     |     | 1165 |     |     |     |     | 1170 |     |     |     |
| Leu  | His | Asp | Leu | Ser | Cys | Lys  | Phe | Leu | Pro | Leu | Tyr  | Ala | Ser | Glu |
| 1175 |     |     |     |     |     | 1180 |     |     |     |     | 1185 |     |     |     |
| Ala  | Lys | Arg | Ile | Lys | Ile | Leu  | His | Asn | Lys | Cys | Asp  | Thr | Ile | Ile |
| 1190 |     |     |     |     |     | 1195 |     |     |     |     | 1200 |     |     |     |
| Lys  | Gln | Lys | Lys | Arg | Ser | Glu  | Pro | Val | Ala | Ile | Val  | Val | His | Gly |
| 1205 |     |     |     |     |     | 1210 |     |     |     |     | 1215 |     |     |     |
| Pro  | Pro | Gly | Thr | Gly | Lys | Ser  | Ile | Thr | Thr | Ser | Phe  | Leu | Ala | Arg |
| 1220 |     |     |     |     |     | 1225 |     |     |     |     | 1230 |     |     |     |
| Met  | Ile | Thr | Asn | Asp | Ser | Asp  | Ile | Tyr | Ser | Leu | Pro  | Pro | Asp | Pro |
| 1235 |     |     |     |     |     | 1240 |     |     |     |     | 1245 |     |     |     |
| Lys  | Tyr | Phe | Asp | Gly | Tyr | Asp  | Gln | Gln | Ser | Val | Val  | Ile | Met | Asp |
| 1250 |     |     |     |     |     | 1255 |     |     |     |     | 1260 |     |     |     |
| Asp  | Ile | Met | Gln | Asn | Pro | Thr  | Gly | Glu | Asp | Met | Thr  | Leu | Phe | Cys |
| 1265 |     |     |     |     |     | 1270 |     |     |     |     | 1275 |     |     |     |
| Gln  | Met | Val | Ser | Ser | Val | Thr  | Phe | Ile | Pro | Pro | Met  | Ala | Asp | Leu |
| 1280 |     |     |     |     |     | 1285 |     |     |     |     | 1290 |     |     |     |
| Pro  | Asp | Lys | Gly | Lys | Ala | Phe  | Asp | Ser | Arg | Phe | Val  | Leu | Cys | Ser |
| 1295 |     |     |     |     |     | 1300 |     |     |     |     | 1305 |     |     |     |
| Thr  | Asn | His | Ser | Leu | Leu | Ala  | Pro | Pro | Thr | Ile | Thr  | Ser | Leu | Pro |
| 1310 |     |     |     |     |     | 1315 |     |     |     |     | 1320 |     |     |     |

# ES 2 893 542 T3

|                 |                             |                             |             |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------|
| Ala Met<br>1325 | Asn Arg Arg Phe Phe<br>1330 | Leu Asp Leu Asp Ile<br>1335 | Ile Val His |
| Asp Asn<br>1340 | Tyr Lys Asp Ala Gln<br>1345 | Gly Lys Leu Asn Val<br>1350 | Ala Ala Ala |
| Phe Arg<br>1355 | Pro Cys Asp Val Asn<br>1360 | Thr Lys Ile Gly Asn<br>1365 | Ala Arg Cys |
| Cys Pro<br>1370 | Phe Val Cys Gly Lys<br>1375 | Ala Val Ser Phe Lys<br>1380 | Asp Arg Asn |
| Ser Cys<br>1385 | Asn Lys Tyr Thr Leu<br>1390 | Ala Gln Ile Tyr Asn<br>1395 | Ile Met Leu |
| Glu Glu<br>1400 | Asp Lys Arg Arg Arg<br>1405 | Gln Val Ile Asp Val<br>1410 | Met Ser Ala |
| Ile Phe<br>1415 | Gln Gly Pro Ile Ser<br>1420 | Leu Gln Asn Pro Pro<br>1425 | Pro Pro Ala |
| Ile Ala<br>1430 | Asp Leu Leu Gln Ser<br>1435 | Val Arg Thr Pro Glu<br>1440 | Val Ile Lys |
| Tyr Cys<br>1445 | Glu Glu Asn Lys Trp<br>1450 | Ile Ile Pro Ala Glu<br>1455 | Cys Lys Ile |
| Glu Lys<br>1460 | Glu Leu Asn Leu Ala<br>1465 | Asn Thr Ile Ile Thr<br>1470 | Ile Ile Ala |
| Asn Val<br>1475 | Ile Asn Ile Ala Gly<br>1480 | Ile Ile Tyr Val Ile<br>1485 | Tyr Lys Leu |
| Phe Cys<br>1490 | Thr Leu Gln Gly Pro<br>1495 | Tyr Ser Gly Glu Pro<br>1500 | Lys Pro Lys |
| Thr Lys<br>1505 | Ile Pro Glu Arg Arg<br>1510 | Val Val Ala Gln Gly<br>1515 | Pro Glu Glu |
| Glu Phe<br>1520 | Gly Arg Ser Leu Ile<br>1525 | Lys His Asn Ser Cys<br>1530 | Val Val Thr |
| Thr Gln<br>1535 | Asn Gly Lys Phe Thr<br>1540 | Gly Leu Gly Ile Tyr<br>1545 | Asp Arg Val |
| Met Ile<br>1550 | Ile Pro Thr His Ala<br>1555 | Asp Pro Asp Lys Glu<br>1560 | Val Gln Ile |

|                 |                             |                             |             |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------|
| Asp Gly<br>1565 | Ile Thr Thr Lys Val<br>1570 | Leu Asp Ser Tyr Asp<br>1575 | Leu Tyr Asn |
| Lys Asp<br>1580 | Gly Val Lys Leu Glu<br>1585 | Ile Thr Val Leu Lys<br>1590 | Leu Asp Arg |
| Asn Glu<br>1595 | Lys Phe Arg Asp Ile<br>1600 | Arg Lys Tyr Ile Pro<br>1605 | Glu Asn Glu |
| Asp Asp<br>1610 | Tyr Pro Glu Cys Asn<br>1615 | Leu Ala Leu Ser Ala<br>1620 | Asn Gln Pro |
| Glu Thr<br>1625 | Thr Ile Leu Asn Val<br>1630 | Gly Asp Val Val Ser<br>1635 | Tyr Gly Asn |
| Ile Leu<br>1640 | Leu Ser Gly Asn Gln<br>1645 | Thr Ala Arg Met Leu<br>1650 | Lys Tyr Asn |
| Tyr Pro<br>1655 | Thr Lys Ser Gly Tyr<br>1660 | Cys Gly Gly Ile Leu<br>1665 | Tyr Lys Ile |
| Gly Gln<br>1670 | Val Leu Gly Ile His<br>1675 | Val Gly Gly Asn Gly<br>1680 | Arg Asp Gly |
| Phe Ser<br>1685 | Ala Met Leu Leu Arg<br>1690 | Ser Tyr Phe Thr Asp<br>1695 | Thr Gln Gly |
| Gln Ile<br>1700 | Thr Leu Ser Lys Lys<br>1705 | Thr Ser Glu Cys Gly<br>1710 | Leu Pro Ser |
| Ile His<br>1715 | Asn Pro Ser Lys Thr<br>1720 | Lys Leu Gln Pro Ser<br>1725 | Val Phe Tyr |
| Asp Ile<br>1730 | Phe Pro Gly Ser Lys<br>1735 | Gln Pro Ala Val Leu<br>1740 | Ser Glu Lys |
| Asp Thr<br>1745 | Arg Leu Gln Val Asp<br>1750 | Phe Asn Glu Ala Leu<br>1755 | Phe Ser Lys |
| Tyr Lys<br>1760 | Gly Asn Val Asp Cys<br>1765 | Pro Met Asn Asp His<br>1770 | Ile Lys Ile |
| Ala Ser<br>1775 | Ser His Tyr Ala Ala<br>1780 | Gln Leu Ile Thr Leu<br>1785 | Asp Ile Asn |
| Pro Asn         | Pro Ile Thr Leu Glu         | Asp Gly Val Phe Gly         | Thr Glu Gly |

|                                                                               |  |      |  |      |
|-------------------------------------------------------------------------------|--|------|--|------|
| 1790                                                                          |  | 1795 |  | 1800 |
| Leu Glu Ala Leu Asp Leu Asn Thr Ser Ala Gly Phe Pro Tyr Ile<br>1805 1810 1815 |  |      |  |      |
| Thr Met Gly Ile Lys Lys Arg Asp Leu Ile Asn Asn Lys Thr Lys<br>1820 1825 1830 |  |      |  |      |
| Asp Ile Ser Arg Leu Lys Gln Ala Ile Asp Lys Tyr Gly Val Asp<br>1835 1840 1845 |  |      |  |      |
| Leu Pro Met Val Thr Phe Leu Lys Asp Glu Leu Arg Lys Glu Glu<br>1850 1855 1860 |  |      |  |      |
| Lys Ile Ala Lys Gly Lys Thr Arg Val Ile Glu Ala Ser Ser Val<br>1865 1870 1875 |  |      |  |      |
| Asn Asp Thr Leu Leu Phe Arg Thr Thr Phe Gly Asn Leu Phe Ser<br>1880 1885 1890 |  |      |  |      |
| Lys Phe His Leu Asn Pro Gly Ile Val Thr Gly Ser Ala Val Gly<br>1895 1900 1905 |  |      |  |      |
| Cys Asp Pro Glu Thr Phe Trp Ser Lys Ile Pro Ala Met Leu Asp<br>1910 1915 1920 |  |      |  |      |
| Asp Lys Cys Ile Met Ala Phe Asp Tyr Thr Asn Tyr Asp Gly Ser<br>1925 1930 1935 |  |      |  |      |
| Ile His Pro Val Trp Phe Gln Ala Leu Lys Gln Val Leu Ser Asp<br>1940 1945 1950 |  |      |  |      |
| Leu Ser Phe Asp Pro Ser Leu Ile Asp Arg Leu Cys Lys Ser Lys<br>1955 1960 1965 |  |      |  |      |
| His Ile Phe Arg Asn Thr Tyr Tyr Glu Val Glu Gly Gly Val Pro<br>1970 1975 1980 |  |      |  |      |
| Ser Gly Cys Ser Gly Thr Ser Ile Phe Asn Thr Met Met Asn Asn<br>1985 1990 1995 |  |      |  |      |
| Ile Ile Ile Arg Thr Leu Val Leu Asp Ala Tyr Lys Asn Ile Asp<br>2000 2005 2010 |  |      |  |      |
| Leu Asp Lys Leu Lys Ile Ile Ala Tyr Gly Asp Asp Val Ile Phe<br>2015 2020 2025 |  |      |  |      |

# ES 2 893 542 T3

|      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Ser  | Tyr | Val | Tyr | Glu | Leu | Asp  | Met | Glu | Ala | Ile | Ala  | Met | Glu | Gly |
| 2030 |     |     |     |     |     | 2035 |     |     |     |     | 2040 |     |     |     |
|      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
| Lys  | Lys | Tyr | Gly | Leu | Thr | Ile  | Thr | Pro | Ala | Asp | Lys  | Ser | Asp | Ile |
| 2045 |     |     |     |     |     | 2050 |     |     |     |     | 2055 |     |     |     |
|      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
| Phe  | Arg | Lys | Leu | Asp | Tyr | Ser  | Asn | Val | Thr | Phe | Leu  | Lys | Arg | Gly |
| 2060 |     |     |     |     |     | 2065 |     |     |     |     | 2070 |     |     |     |
|      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
| Phe  | Arg | Gln | Asp | Glu | Lys | Tyr  | Asn | Phe | Leu | Ile | His  | Pro | Thr | Phe |
| 2075 |     |     |     |     |     | 2080 |     |     |     |     | 2085 |     |     |     |
|      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
| Pro  | Glu | Ser | Glu | Ile | Phe | Glu  | Ser | Ile | Arg | Trp | Thr  | Lys | Lys | Pro |
| 2090 |     |     |     |     |     | 2095 |     |     |     |     | 2100 |     |     |     |
|      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
| Ser  | Gln | Met | Gln | Glu | His | Val  | Leu | Ser | Leu | Cys | His  | Leu | Met | Trp |
| 2105 |     |     |     |     |     | 2110 |     |     |     |     | 2115 |     |     |     |
|      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
| His  | Asn | Gly | Gln | Ser | Ala | Tyr  | Lys | Ser | Phe | Val | Glu  | Arg | Ile | Arg |
| 2120 |     |     |     |     |     | 2125 |     |     |     |     | 2130 |     |     |     |
|      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
| Ser  | Val | Ser | Ala | Gly | Arg | Ala  | Leu | Tyr | Ile | Pro | Pro  | Tyr | Asp | Leu |
| 2135 |     |     |     |     |     | 2140 |     |     |     |     | 2145 |     |     |     |
|      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
| Leu  | Leu | His | Glu | Trp | Tyr | Glu  | Lys | Phe |     |     |      |     |     |     |
| 2150 |     |     |     |     |     | 2155 |     |     |     |     |      |     |     |     |

<210> 5  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Rinovirus humano

<400> 5

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

<210> 6  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Rinovirus humano

<400> 6

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

<210> 7  
 <211> 14  
 <212> PRT

<213> Rinovirus humano

<400> 7

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

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> Rinovirus humano

<400> 8

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

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Rinovirus humano

<400> 9

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

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Rinovirus humano

<400> 10

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

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Rinovirus humano

<400> 11

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

<210> 12

<211> 31

<212> PRT

<213> Rinovirus humano

<400> 12

# ES 2 893 542 T3

Ser Ser Lys Gly Trp Trp Trp Lys Leu Pro Asp Ala Leu Lys Asp Met  
1 5 10 15

Gly Ile Phe Gly Glu Asn Met Phe Tyr His Tyr Leu Gly Arg Ser  
20 25 30

<210> 13  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Rinovirus humano  
<400> 13

Ile Pro Glu His Gln Ile Ala Ser Ala Leu His Gly Asn Val Asn Val  
1 5 10 15

Gly Tyr Asn Tyr Thr His Pro Gly Glu Thr Gly Arg Glu Val Lys  
20 25 30

<210> 14  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Rinovirus humano  
<400> 14

Ile Asn Thr Ile Pro Ile Thr Ile Ser Ile Ser Pro Met Cys Ala Glu  
1 5 10 15

Phe Ser Gly Ala Arg Ala Lys Arg Gln Gly Leu Pro Val Phe Ile  
20 25 30

<210> 15  
<211> 267  
<212> PRT  
<213> Rinovirus humano  
<400> 15

# ES 2 893 542 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|
| Ser | Pro | Thr | Val | Glu | Ala | Cys | Gly | Tyr | Ser | Asp | Arg | Leu | Ile | Gln | Ile | 1  | 5  | 10 | 15 |
| Thr | Arg | Gly | Asp | Ser | Thr | Ile | Thr | Ser | Gln | Asp | Thr | Ala | Asn | Ala | Val | 20 | 25 | 30 |    |
| Val | Ala | Tyr | Gly | Val | Trp | Pro | Ser | Tyr | Leu | Thr | Pro | Asp | Asp | Ala | Thr | 35 | 40 | 45 |    |
| Ala | Ile | Asp | Lys | Pro | Thr | Gln | Pro | Asp | Thr | Ser | Ser | Asn | Arg | Phe | Tyr | 50 | 55 | 60 |    |
| Thr | Leu | Asp | Ser | Arg | Ser | Trp | Thr | Ser | Ala | Ser | Ser | Gly | Trp | Trp | Trp | 65 | 70 | 75 | 80 |
| Lys | Leu | Pro | Asp | Ala | Leu | Lys | Asn | Met | Gly | Ile | Phe | Gly | Glu | Asn | Met | 85 | 90 | 95 |    |

# ES 2 893 542 T3

```

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

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

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

Asn His Thr His Pro Gly Glu Gln Gly Arg Glu Val Val Pro Ser Arg
      145                      150                      155                      160

Thr Ser Ser Asp Asn Lys Arg Pro Ser Asp Asp Ser Trp Leu Asn Phe
      165                      170                      175

Asp Gly Thr Leu Leu Gly Asn Leu Pro Ile Tyr Pro His Gln Tyr Ile
      180                      185                      190

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

Ala Val Pro Met Asp Ser Met Leu Arg His Asn Asn Trp Ser Leu Val
      210                      215                      220

Ile Ile Pro Ile Cys Pro Leu Gln Val Gln Pro Gly Gly Thr Gln Ser
      225                      230                      235                      240

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

Pro Arg Ser Lys Val Val Phe Ser Thr Thr Gln
      260                      265

```

<210> 16  
 <211> 263  
 <212> PRT  
 <213> Rinovirus humano  
  
 <400> 16

5

# ES 2 893 542 T3

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

Thr Arg Gly Asp Ser Thr Ile Thr Ser Gln Asp Val Ala Asn Ala Val  
20 25 30

Val Gly Tyr Gly Val Trp Pro His Tyr Leu Thr Pro Gln Asp Ala Thr  
35 40 45

# ES 2 893 542 T3

Ala Ile Asp Lys Pro Thr Gln Pro Asp Thr Ser Ser Asn Arg Phe Tyr  
 50 55 60  
 Thr Leu Glu Ser Lys His Trp Asn Gly Asp Ser Lys Gly Trp Trp Trp  
 65 70 75 80  
 Lys Leu Pro Asp Ala Leu Lys Glu Met Gly Ile Phe Gly Glu Asn Met  
 85 90 95  
 Tyr Tyr His Phe Leu Gly Arg Ser Gly Tyr Thr Val His Val Gln Cys  
 100 105 110  
 Asn Ala Ser Lys Phe His Gln Gly Thr Leu Leu Val Ala Met Ile Pro  
 115 120 125  
 Glu His Gln Leu Ala Ser Ala Lys Asn Gly Ser Val Thr Ala Gly Tyr  
 130 135 140  
 Asn Leu Thr His Pro Gly Glu Ala Gly Arg Val Val Gly Gln Gln Arg  
 145 150 155 160  
 Asp Ala Asn Leu Arg Gln Pro Ser Asp Asp Ser Trp Leu Asn Phe Asp  
 165 170 175  
 Gly Thr Leu Leu Gly Asn Leu Leu Ile Phe Pro His Gln Phe Ile Asn  
 180 185 190  
 Leu Arg Ser Asn Asn Ser Ala Thr Leu Ile Val Pro Tyr Val Asn Ala  
 195 200 205  
 Val Pro Met Asp Ser Met Leu Arg His Asn Asn Trp Ser Leu Val Ile  
 210 215 220  
 Ile Pro Ile Ser Pro Leu Arg Ser Glu Thr Thr Ser Ser Asn Ile Arg  
 225 230 235 240  
 Pro Ile Thr Val Ser Ile Ser Pro Met Cys Ala Glu Phe Ser Gly Ala  
 245 250 255  
 Arg Ala Lys Asn Val Arg Gln  
 260

<210> 17  
 <211> 261  
 <212> PRT  
 <213> Rinovirus humano

# ES 2 893 542 T3

<400> 17

```

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

Thr Arg Gly Asp Ser Thr Ile Thr Ser Gln Asp Val Ala Asn Ala Ile
          20          25          30

Val Ala Tyr Gly Val Trp Pro His Tyr Leu Ser Ser Lys Asp Ala Ser
          35          40          45

Ala Ile Asp Lys Pro Ser Gln Pro Asp Thr Ser Ser Asn Arg Phe Tyr
50          55          60

Thr Leu Arg Ser Val Thr Trp Ser Ser Ser Ser Lys Gly Trp Trp Trp
65          70          75          80

Lys Leu Pro Asp Ala Leu Lys Asp Met Gly Ile Phe Gly Glu Asn Met
          85          90          95

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

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

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

Asn Tyr Thr His Pro Gly Glu Thr Gly Arg Glu Val Lys Ala Glu Thr
145          150          155          160

Arg Leu Asn Pro Asp Leu Gln Pro Thr Glu Glu Tyr Trp Leu Asn Phe
          165          170          175

Asp Gly Thr Leu Leu Gly Asn Ile Thr Ile Phe Pro His Gln Phe Ile
          180          185          190

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

Ala Val Pro Met Asp Ser Met Arg Ser His Asn Asn Trp Ser Leu Val
210          215          220

Ile Ile Pro Ile Cys Pro Leu Glu Thr Ser Ser Ala Ile Asn Thr Ile
225          230          235          240

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

Arg Ala Lys Arg Gln
          260

```

<210> 18  
 <211> 262  
 <212> PRT  
 <213> Rinovirus humano

5

<400> 18

```

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

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

```

# ES 2 893 542 T3

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

## REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunógena que comprende la proteína VP2 de un rinovirus humano (HRV) y un adyuvante, en donde dicha proteína VP2 está aislada, en donde dicho adyuvante comprende una saponina y un lipopolisacárido A, y en donde la proteína VP2 de un HRV es la proteína VP2 de un HRV del HRV39, o una variante inmunógena de la misma, con al menos un 90 % de identidad, a lo largo de toda la longitud, con la SEQ ID NO: 1.
2. Una composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición no comprende la proteína VP4 de un HRV, o, un polinucleótido que comprende una secuencia de un ácido nucleico que codifica la proteína VP4 de un HRV.
3. Una composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la proteína VP2 de un HRV tiene una inserción, una sustitución o una delección de hasta, e incluyendo, 20 aminoácidos, adecuadamente situada en la posición de aminoácido correspondiente a los aa 155-170 (bucle N1m-II), los aa 134-146, los aa 232-238 o los aa 72-75 de la VP2 del HRV 39 (SEQ ID NO: 1).
4. Una composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la proteína VP2 de un HRV tiene una inserción o una sustitución en su secuencia de aminoácidos de un péptido de un HRV capaz de inducir una respuesta inmunitaria de reacción cruzada y/o de neutralización cruzada.
5. Una composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la proteína VP2 de un HRV tiene una inserción o una sustitución en su secuencia de aminoácidos de un péptido seleccionado entre (a) péptidos correspondientes a los aminoácidos 32-45 de la VP1, (b) una variante de los aminoácidos 32-45 de la VP1 que tiene 1-4 adiciones o deleciones de aminoácidos en cualquiera de los extremos y/o 1-2 sustituciones o adiciones o deleciones de aminoácidos dentro de la secuencia peptídica, (c) un péptido que comprende una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NO: 5, 6, 7 y 8, (d) péptidos correspondientes a los aminoácidos 1-16 de la VP4, (e) una variante de los aminoácidos 1-16 de la VP4 que tiene 1-4 adiciones o deleciones de aminoácidos en cualquiera de los extremos y/o 1-2 sustituciones o adiciones o deleciones de aminoácidos dentro de la secuencia peptídica, o (f) un péptido que comprende una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NO: 9, 10 y 11.
6. Una composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde se delecionan al menos 5 aminoácidos de la región N1m-II de la proteína VP2.
7. Una composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha saponina es QS21.
8. Una composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho lipopolisacárido A es 3D-MPL.
9. Una composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde el adyuvante comprende además un esterol, tal como colesterol y/o un derivado de colesterol.
10. Una composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el adyuvante comprende además liposomas.
11. Una composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para usar en la prevención o la mejora de la enfermedad o de los síntomas de la enfermedad causados por, o asociados a, la infección por un HRV en un sujeto.
12. Una composición inmunógena para usar de acuerdo con la reivindicación 11 para inducir una respuesta inmunitaria de reacción cruzada contra al menos tres serotipos del HRV, tal como en donde al menos uno de los al menos tres serotipos del HRV pertenece al tipo A del HRV, y al menos otro de los al menos tres serotipos del HRV pertenece al tipo B del HRV o al tipo C del HRV.
13. Una composición inmunógena para usar de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde el sujeto tiene EPOC o asma.
14. Una composición inmunógena para usar de acuerdo con las reivindicaciones 11 a 13, en donde la respuesta inmunitaria se refuerza tras la posterior exposición a un HRV.

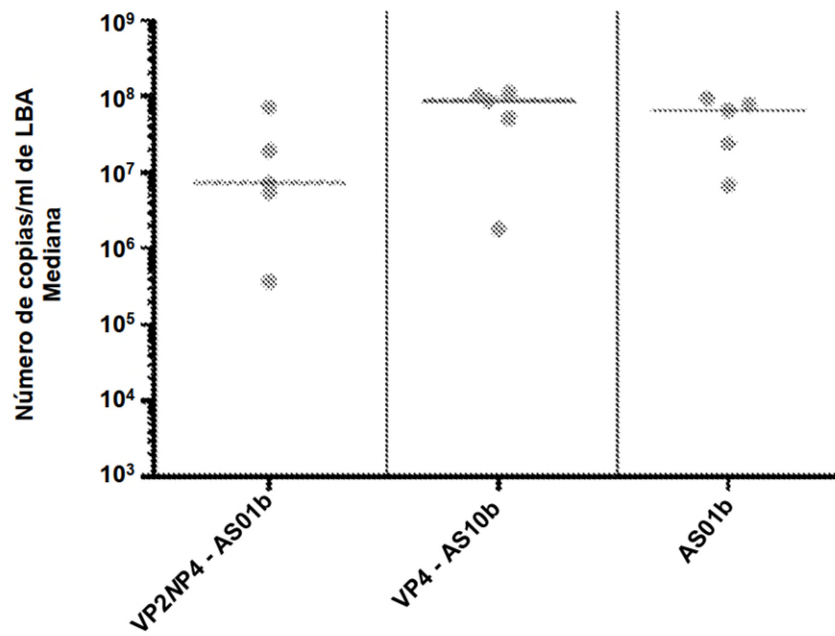


Figura 1

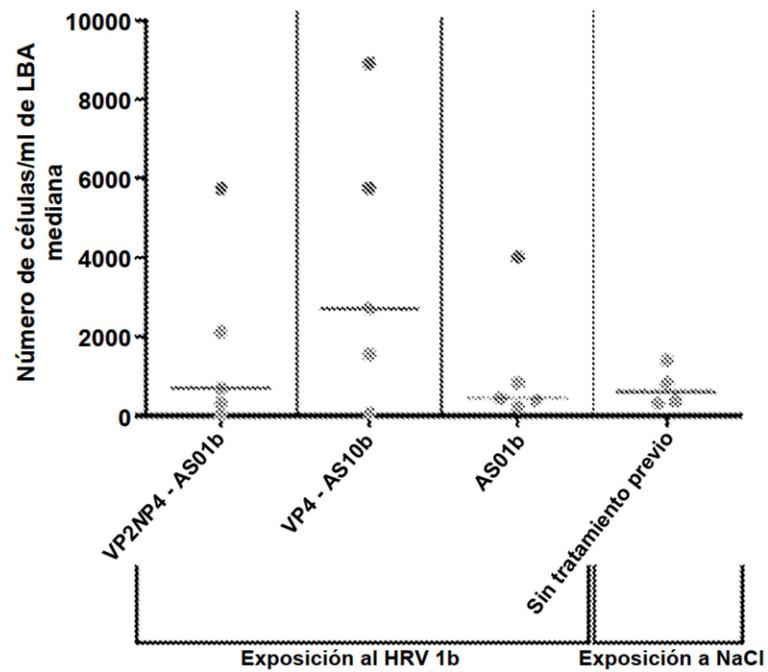


Figura 2

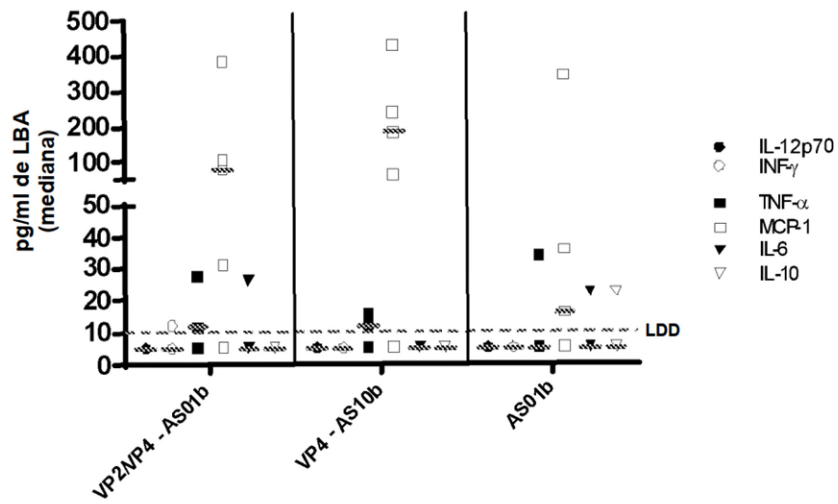


Figura 3

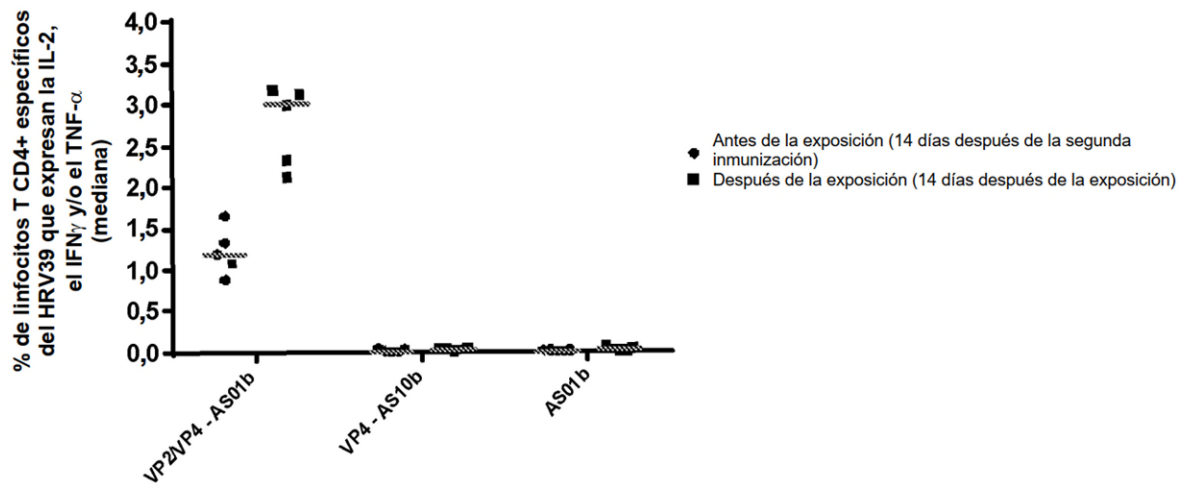


Figura 4

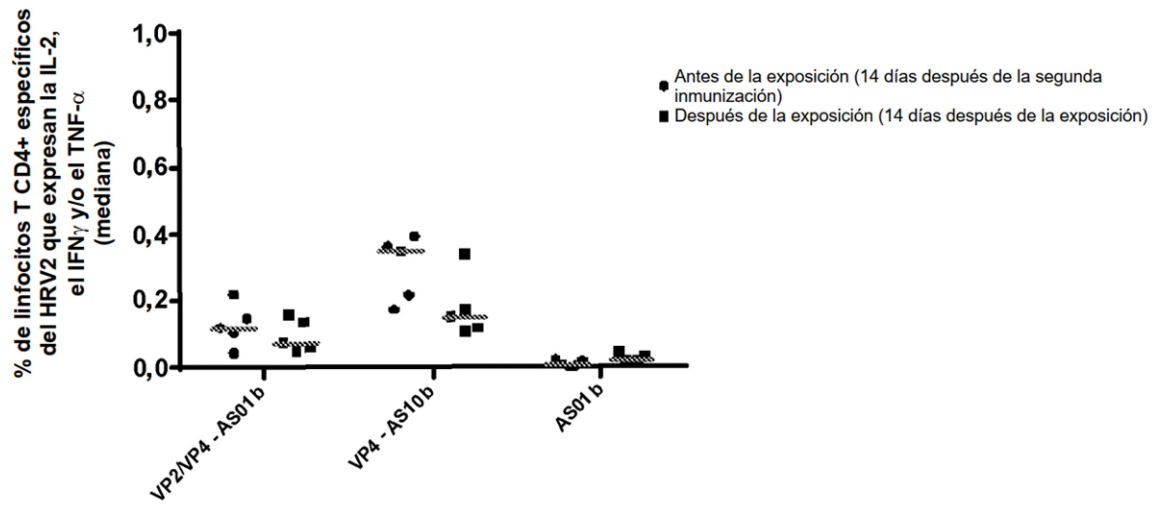


Figura 5

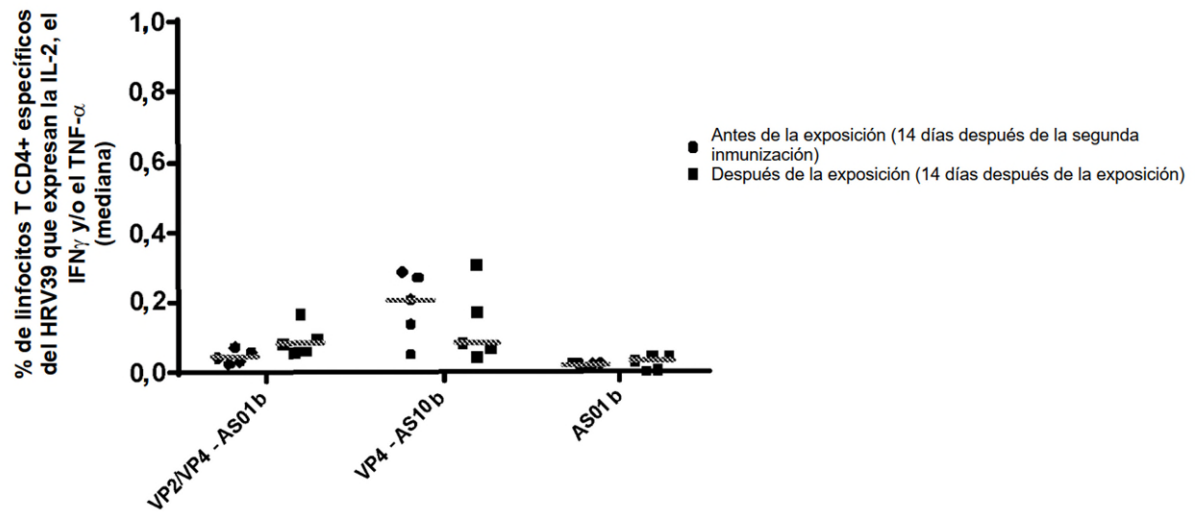


Figura 6

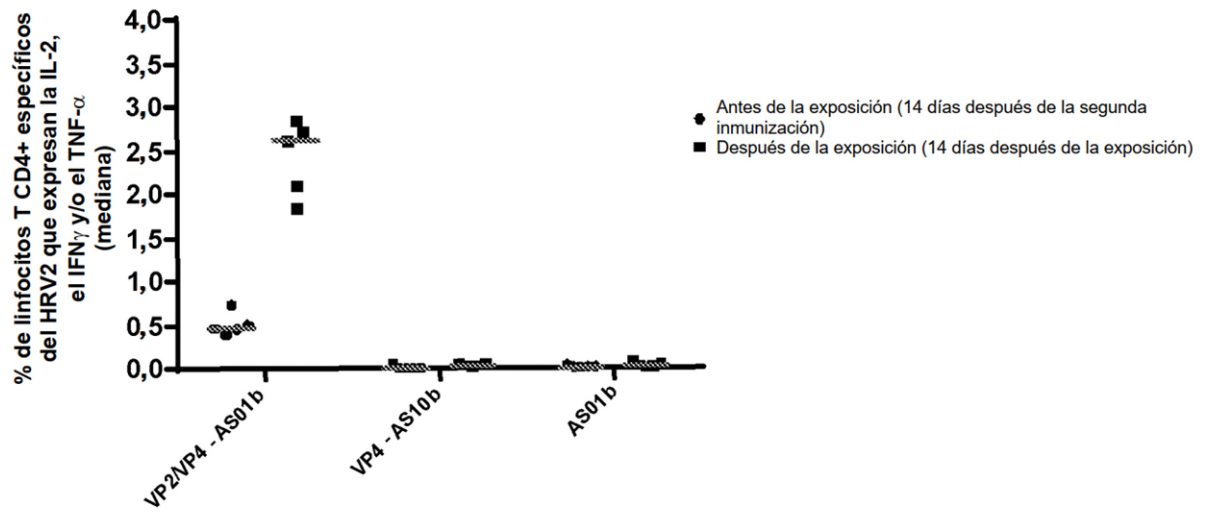


Figura 7

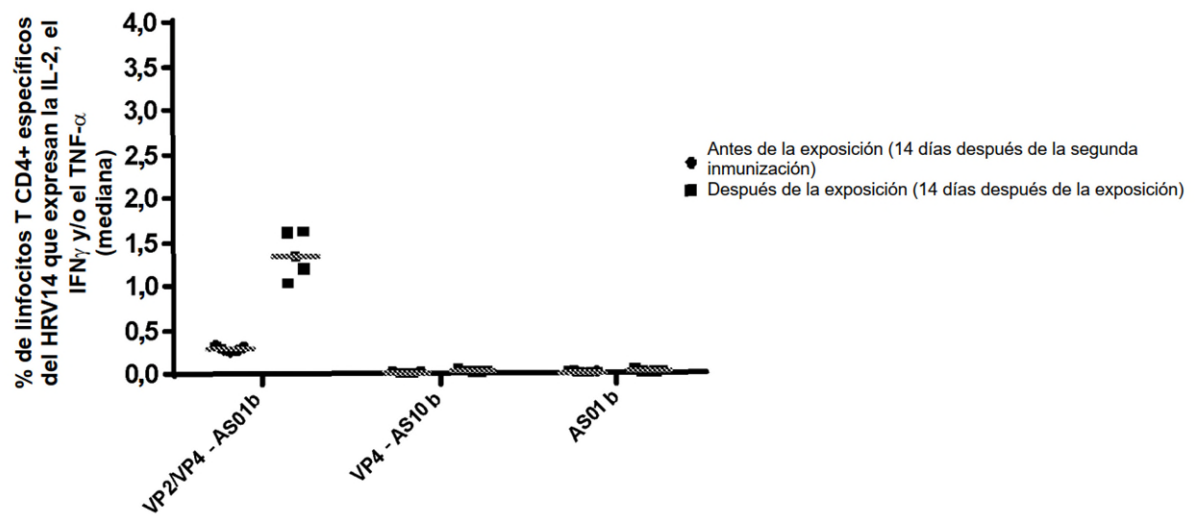


Figura 8

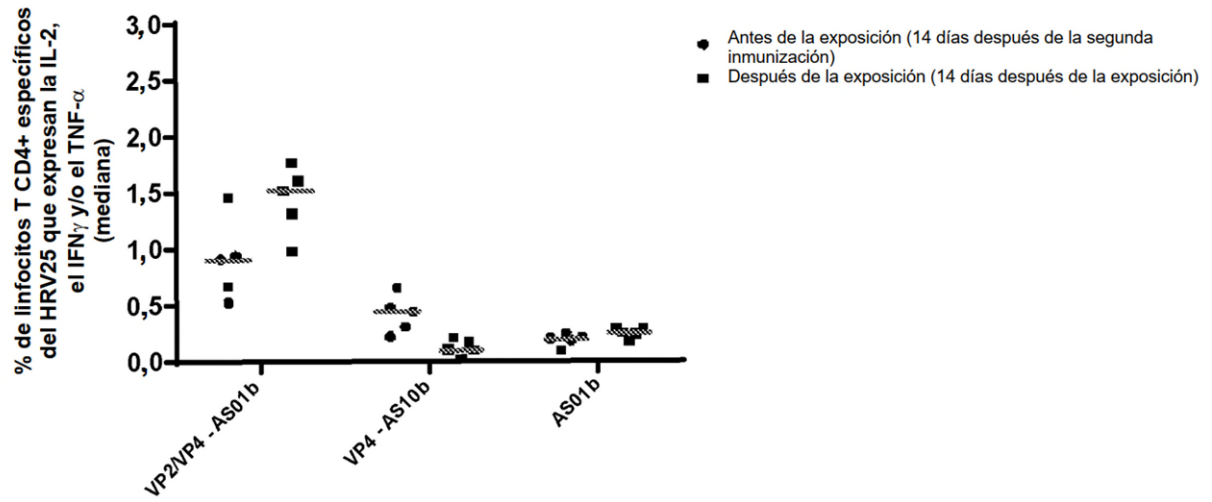


Figura 9

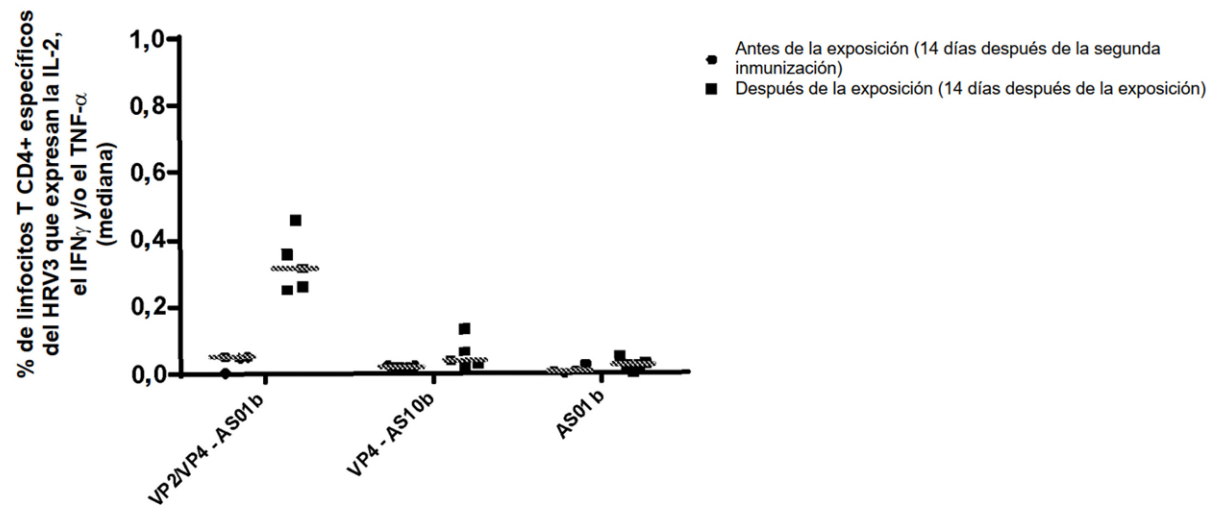


Figura 10

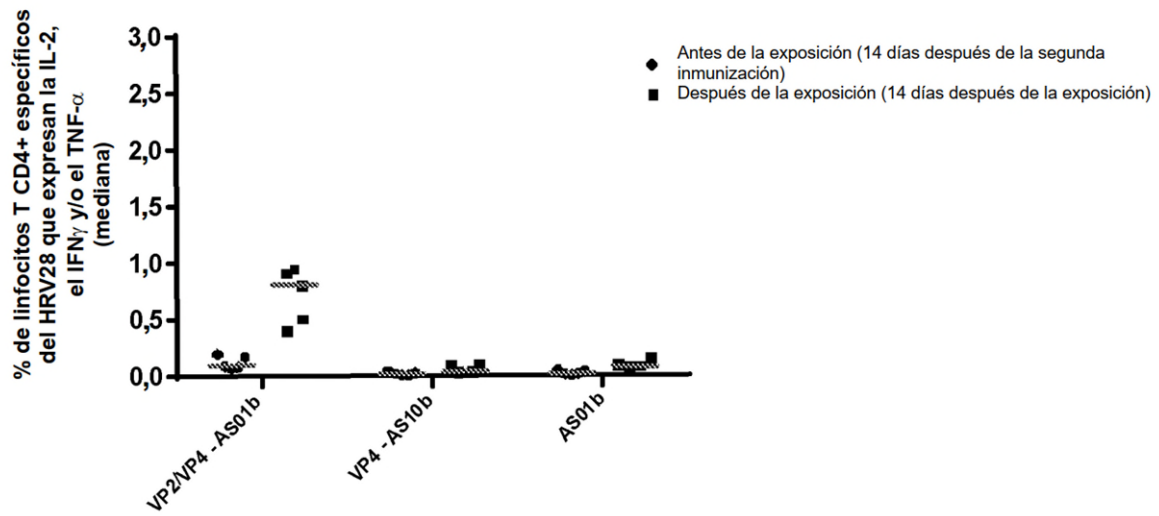


Figura 11

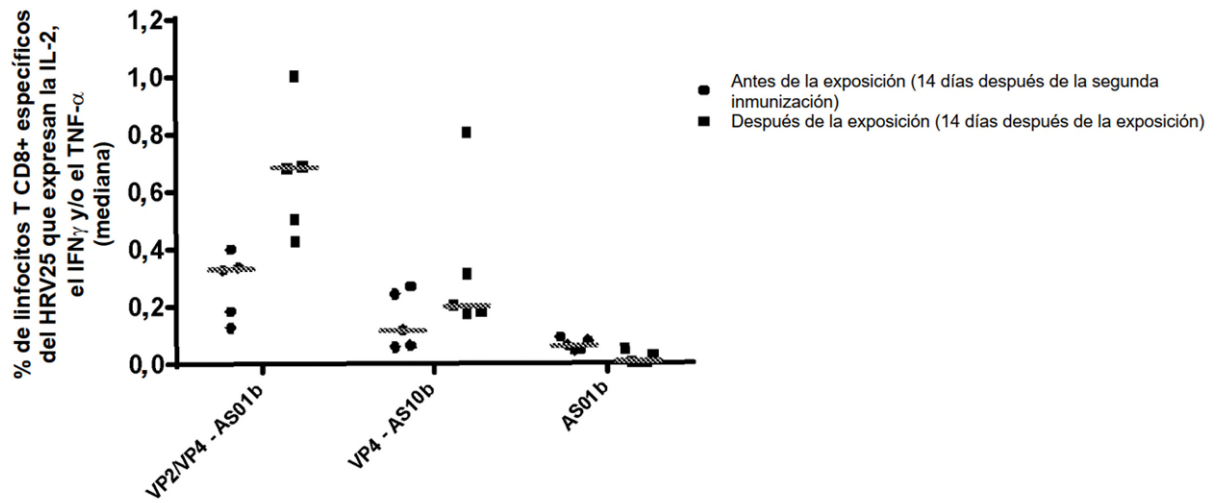


Figura 12

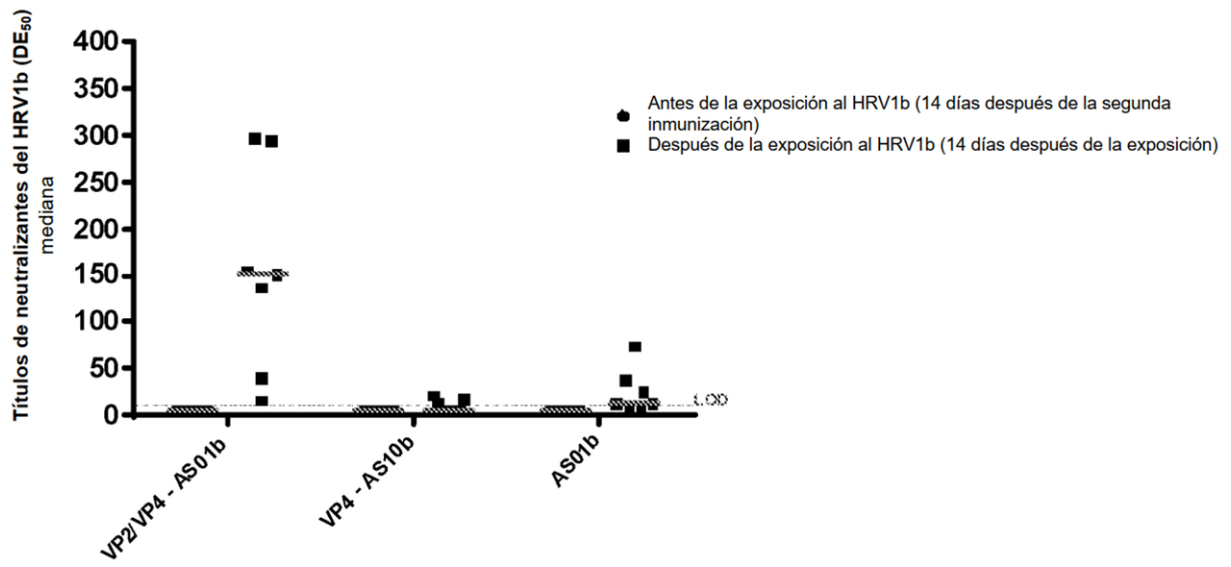


Figura 13

Figura 14A

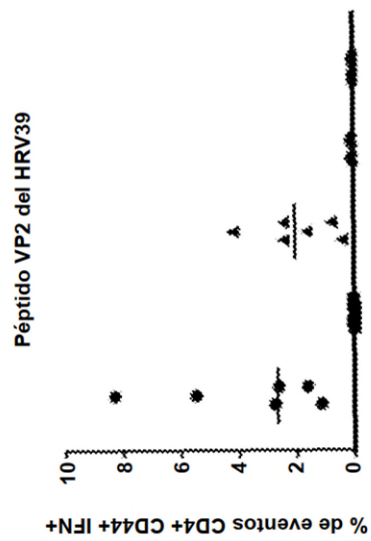


Figura 14B

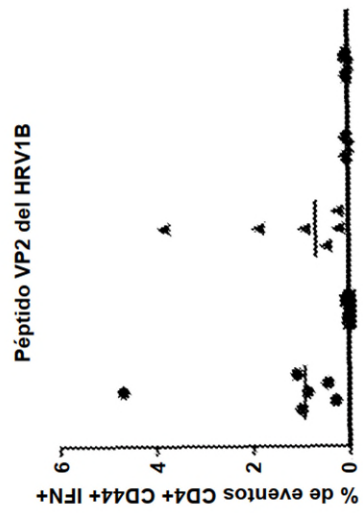


Figura 14C

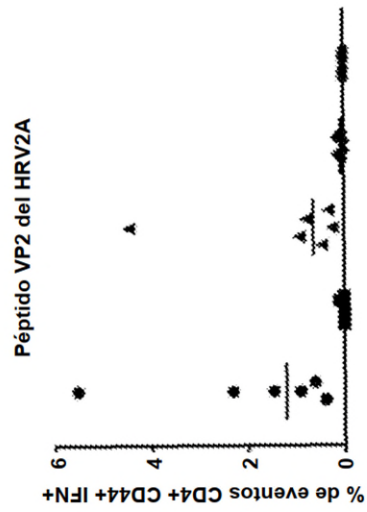


Figura 14D

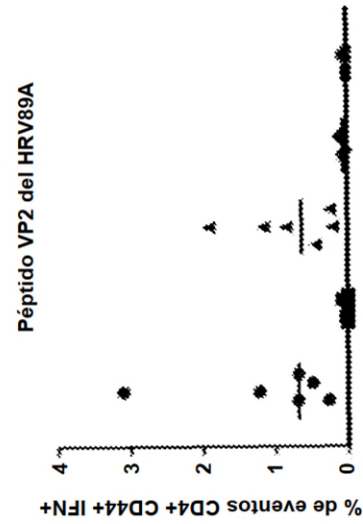


Figura 14E

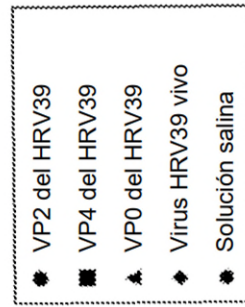
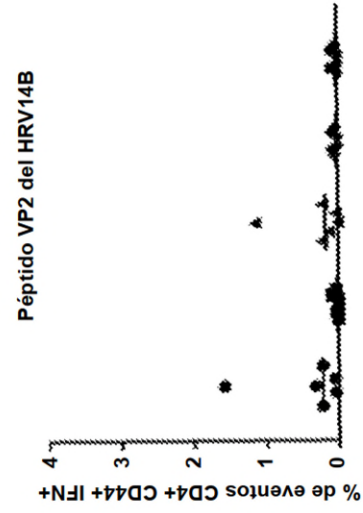


Figura 14D

Figura 14E

Figura 15A

Péptido VP4 del HRV39



Figura 15B

Péptido VP4 del HRV1B

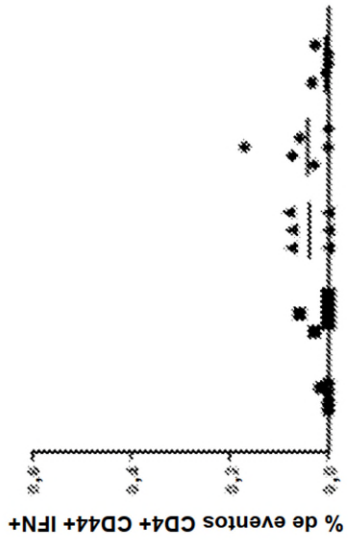
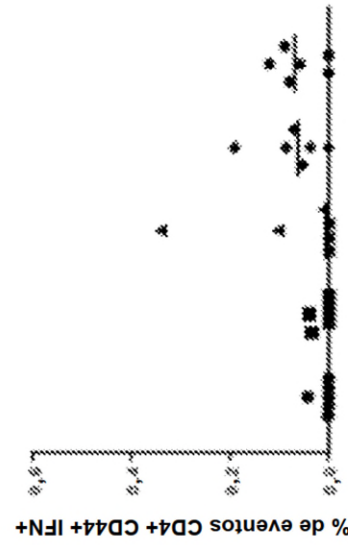
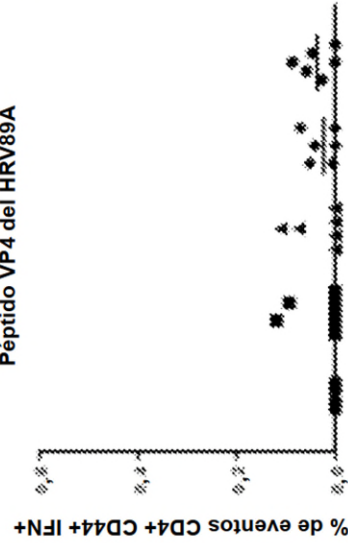


Figura 15C

Péptido VP4 del HRV2A



Péptido VP4 del HRV89A



Péptido VP4 del HRV14B

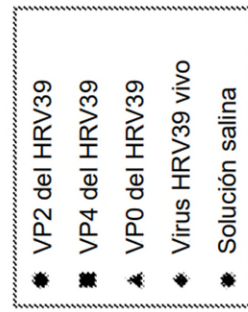
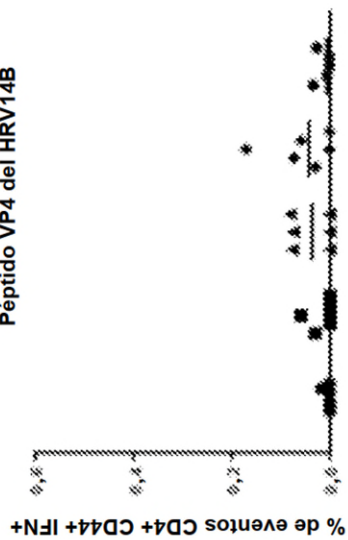


Figura 15D

Figura 15E



**Figura 16B****Porcentaje de identidad de aminoácidos a lo largo de secuencias seleccionadas de la proteína VP2**

|        | HRV_39 | HRV_89 | HRV_1B | HRV_02 | HRV_14 |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| HRV_39 | 100%   | 75,5%  | 85,2%  | 77,5%  | 62,1%  |
| HRV_89 | 75,5%  | 100%   | 76,9%  | 74,8%  | 61,5%  |
| HRV_1B | 85,2%  | 76,9%  | 100%   | 76,7%  | 61,0%  |
| HRV_02 | 77,5%  | 74,8%  | 76,7%  | 100%   | 61,1%  |
| HRV_14 | 62,1%  | 61,5%  | 61,0%  | 61,1%  | 100%   |

Figura 16C

|              | 1                                                             | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|--------------|---------------------------------------------------------------|----|----|----|----|----|----|
| HRV_39 - VP2 | 1                                                             | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |
| HRV_89 - VP2 | SPTVEACGYSDRIIQITRGDSTITSQDVANAVVGYGVWPHYLTDADDASAIKPTQPDTS   |    |    |    |    |    |    |
| HRV_18 - VP2 | SPTVEACGYSDRIIQITRGDSTITSQDVANAVVGYGVWPHYLTPQDATAIDKPTQPDTS   |    |    |    |    |    |    |
| HRV_02 - VP2 | SPTVEACGYSDRIIQITRGDSTITSQDVANAVVGYGVWPHYLSSKSDASAIKPSQPDTS   |    |    |    |    |    |    |
| HRV_14 - VP2 | SPNVEACGYSDRVQQTILGNSTITTQEAANAVVGYAEWPEYLPDVDASDVNKTSPDTS    |    |    |    |    |    |    |
| HRV_39 - VP2 | NRFTTLESKVWKRDSKGNWKLDPALKDMGIFGENMYHFLGRSGYTVHVQCNAKPFHQ     |    |    |    |    |    |    |
| HRV_89 - VP2 | NRFTTLDSSRSWTSASSGWWKLDPALKDMGIFGENMYHFLGRSGYTIHVQCNSKPFHQ    |    |    |    |    |    |    |
| HRV_18 - VP2 | NRFTTLESKVWNGDSKGNWKLDPALKDMGIFGENMYHFLGRSGYTVHVQCNAKPFHQ     |    |    |    |    |    |    |
| HRV_02 - VP2 | NRFTTLRSVTWSSSSKGNWKLDPALKDMGIFGENMYHFLGRSGYTIHVQCNAKPFHQ     |    |    |    |    |    |    |
| HRV_14 - VP2 | CRFTTLDSTWTTGSKGNWKLDPALKDMGIFGENMYHFLGRSGYTVHVQCNAKPFHQ      |    |    |    |    |    |    |
| HRV_39 - VP2 | TLLIAMVPERQLASANYGNVTAGYNTHPGEAGRDV-CQQRTNNEKQPSDDNWLNFDTL    |    |    |    |    |    |    |
| HRV_89 - VP2 | LLIVAAIPEHQLASATSGNVSVGYNHEHPGEQGREVVPSRTSSDNKRPSDDSWLNFDTL   |    |    |    |    |    |    |
| HRV_18 - VP2 | TLLVAMIPERQLASAKNGSVTAGYNLTHPGEAGR-VVGQQORDANLRQPSDDSWLNFDTL  |    |    |    |    |    |    |
| HRV_02 - VP2 | TLIVALIPEHQLASALHGNVNVGYNTHPGETGREVKRETRLNPDLPSTEEYWLNFDTL    |    |    |    |    |    |    |
| HRV_14 - VP2 | CLLVVVIPEHQLASHEGNNVSVKYITFTHPGERGIDL---SSANEVGGFVKDVIYNMNGTL |    |    |    |    |    |    |
| HRV_39 - VP2 | LGNLLIFPHQFINLRNNNSATIIVPYVNAVPMDSMLRNNWLSLIIIPVSPLEADTSATAI  |    |    |    |    |    |    |
| HRV_89 - VP2 | LGNLPIYPRQYINLRNNNSATLILPYVNAVPMDSMLRNNWLSLIIIPICPLQVQPGGTQS  |    |    |    |    |    |    |
| HRV_18 - VP2 | LGNLLIFPHQFINLRNNNSATLIVPYVNAVPMDSMLRNNWLSLIIIPISPLASETTSSNI  |    |    |    |    |    |    |
| HRV_02 - VP2 | LGNITIFPHQFINLRNNNSATIIVPYVNAVPMDSMLRNNWLSLIIIPICPLET-SSAINT  |    |    |    |    |    |    |
| HRV_14 - VP2 | LGNLLIFPHQFINLRNNNSATIIVPYVNAVPMDSMLRNNWLSLIIIPICPLET-SSAINT  |    |    |    |    |    |    |
| HRV_39 - VP2 | VPITVVISPMFSEFSGARARPAAR--                                    |    |    |    |    |    |    |
| HRV_89 - VP2 | IPITVVISPMFSEFSGERSEKVFSTTQ                                   |    |    |    |    |    |    |
| HRV_18 - VP2 | RPITVVISPMCAEFSEARAKNVRQ---                                   |    |    |    |    |    |    |
| HRV_02 - VP2 | IPITVVISPMCAEFSEARAKRQ----                                    |    |    |    |    |    |    |
| HRV_14 - VP2 | LPITVVIAPMCTEFSGIRSYIVPQ--                                    |    |    |    |    |    |    |