

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 924 914**

51 Int. Cl.:

C07K 14/095 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014** **E 19198428 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2022** **EP 3608332**

54 Título: **Vacuna contra rinovirus humano**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361786765 P

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

11.10.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BAUDOUX, GUY;
BOXUS, MATHIEU;
COLAU, BRIGITTE y
MARCHAND, MARTINE**

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

ES 2 924 914 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 contra rinovirus humano

5 Campo técnico

La presente divulgación se refiere al campo de la vacunas humanas. Más particularmente, la presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas e inmunogénicas, para la prevención o el tratamiento de una infección o enfermedad por picornavirus humano, en particular, infección o enfermedad por rinovirus humano (HRV).

10 Antecedentes

Picornaviridae es una de las familias víricas más grandes y está compuesta de 14 géneros, seis de los cuales incluyen patógenos humanos. Los picornavirus bien conocidos son enterovirus (que incluye el poliovirus, y el rinovirus), el virus de enfermedad de pies y boca (FMDV) y el virus de la hepatitis A (HAV). Otros miembros de la familia *Picornaviridae* son coxsackievirus, ecovirus, parecovirus humano y virus aichi. Los *Picornaviridae* causan enfermedad tipo el resfriado común, gastroenteritis, hepatitis, neumonía, poliomielitis, meningitis, enfermedad de mano, pies y boca. Aunque las infecciones con frecuencia son leves, determinadas cepas pueden causar brotes pandémicos acompañados de meningitis y/o parálisis.

Los rinovirus son la principal causa de las infecciones agudas de las vías respiratorias superiores en los seres humanos, conocidas como el resfriado común. También son la causa vírica más común de la exacerbación grave de enfermedades respiratorias crónicas tales como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Actualmente existen más de 100 serotipos de HRV. Existe poca o ninguna protección cruzada entre los serotipos debido a la existencia de epítomos neutralizantes inmunodominantes específicos a tipo, y hasta ahora no se ha desarrollado ninguna vacuna. Por lo tanto, una vacuna de rinovirus, que tendría que ser capaz de proteger contra múltiples serotipos, representa una gran necesidad médica no cubierta.

Los documentos WO2011/050384 y EP0358485 divulgan los epítomos peptídicos inmunogénicos de rinovirus.

30 Breve resumen

La presente divulgación se refiere a vacunas contra picornavirus humanos que contienen antígenos que proporcionan protección contra diferentes picornavirus, ya sea de diferentes serotipos o de cepas del mismo picornavirus, o de diferentes miembros de la familia de picornavirus. Las realizaciones específicas se refieren a vacunas contra enterovirus humanos, en particular, el rinovirus que contiene antígenos que proporcionan protección contra diferentes enterovirus o serotipos de HRV. Las vacunas contienen péptidos de picornavirus de regiones conservadas de las proteínas estructurales de los picornavirus, que generan una respuesta reactiva cruzada o neutralizante cruzada para proporcionar protección cruzada frente a un rango de picornavirus, por ejemplo, frente a un rango de diferentes serotipos de HRV.

La invención proporciona un péptido de rinovirus humano acoplado a una proteína portadora, en donde dicho péptido de rinovirus humano consiste en no más de 40 aminoácidos de la región N terminal de HRV14 VP1 e incluye la secuencia PLITANETGATMPV [SEQ ID NO:1].

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un péptido de la invención, junto con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición inmunogénica descrita en el presente documento, para su uso en la prevención o el tratamiento de la infección por HRV. En un aspecto adicional la invención proporciona un método para preparar una composición inmunogénica y dicho método comprende combinar un péptido de rinovirus humano acoplado a una proteína portadora como se describe en el presente documento y un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra un diagrama esquemático del genoma de picornavirus.

La FIG. 2 muestra los anticuerpos específicos a péptido generados en conejos inmunizados con péptidos de VP1 conjugados con KLH.

La FIG. 3 muestra los anticuerpos específicos a péptido generados en conejos inmunizados con péptidos de VP4 conjugados con KLH o en construcciones quiméricas del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg).

La FIG. 4 muestra los anticuerpos específicos a péptido generados en conejos inmunizados con VP4 completa en forma de concatámero.

La FIG. 5 muestra anticuerpos neutralizantes contra diversas cepas de HRV, obtenidos de conejos inmunizados con péptidos de VP1 conjugados con KLH.

La FIG. 6 muestra anticuerpos neutralizantes contra diversas cepas de HRV, obtenidos de conejos inmunizados con péptidos de VP4 conjugados con KLH o en una construcción quimérica con HBsAg o con concatámeros completos de VP4.

La FIG. 7 muestra anticuerpos específicos a la región 1-16 de VP4 en conejos inmunizados con VP4 1-31 o VP4 completa, en relación con VP4 1-16.

La FIG. 8 muestra un alineamiento de los aminoácidos 32-45 de VP1 de diferentes serotipos de HRV clado A alineados con HRV14.

La FIG. 9 muestra un alineamiento de los aminoácidos 32-45 de VP1 de diferentes serotipos de HRV clado B alineados con HRV14.

La FIG. 10 muestra un alineamiento de los aminoácidos 32-45 de VP1 de diferentes serotipos de HRV clado C alineados con HRV14.

La FIG. 11 muestra un alineamiento de los aminoácidos 1-16 de VP4 de diferentes serotipos de HRV clado A alineados con HRV14.

La FIG. 12 muestra un alineamiento de los aminoácidos 1-16 de VP4 de diferentes serotipos de HRV clado B alineados con HRV14.

La FIG. 13 muestra un alineamiento de los aminoácidos 1-16 de VP4 de diferentes serotipos de HRV clado C alineados con HRV14.

Las FIG. 14A, 14B, 14C y 14D muestran un alineamiento de los residuos N-terminales de las proteínas VP1 de algunos picornavirus. Los péptidos similares a HRV14 32-45 están marcados en el recuadro.

La FIG. 15 muestra un alineamiento de las proteínas VP4 de picornavirus seleccionados. Los péptidos son similares al péptido HRV14 VP4 1-16 marcado en el recuadro.

Las FIG. 16-24 muestran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos y los plásmidos para el polipéptido quimérico VP4-S construido en el Ejemplo 2 más adelante en el presente documento.

Descripción detallada

INTRODUCCIÓN

La presente divulgación se refiere a composiciones y métodos para la prevención y el tratamiento de infección con un picornavirus, en particular, un picornavirus del género de los enterovirus, más particularmente, un enterovirus humano tal como el rinovirus humano (HRV).

Los rinovirus son virus no encapsulados y están compuestos de una cápside formada por cuatro proteínas víricas VP1, VP2, VP3 y VP4. VP1, VP2 y VP3 forman la parte principal de la cápside proteica. La proteína VP4 mucho más pequeña de aproximadamente 70 aminoácidos de longitud tiene una estructura más extendida, y se encuentra en la interfase entre la cápside y el genoma del ARN. La cápside está compuesta de 60 copias de cada una de estas proteínas ensambladas como un icosaedro.

El genoma del rinovirus consiste en un ARN lineal, monocatenario, en sentido positivo de entre 7,2 y 8,5 kb de longitud. Las proteínas estructurales están codificadas en la región 5' del genoma (comenzando desde el extremo 5': VP4, VP2, VP3 y VP1) y no estructurales en el extremo 3', como es el caso de todos los picornavirus. El ARN se traduce en una poliproteína sencilla que se escinde de manera cotraducional y postraducional en cuatro proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales. Los genes no estructurales están implicados en el procesamiento del genoma vírico, la replicación vírica, y en la inhibición de la producción proteica de la célula hospedadora.

Actualmente existen más de 100 serotipos de HRV. Basándose en la identidad y la susceptibilidad del nucleótido de los compuestos antivíricos los HRV se han clasificado en clados A, B, C y posiblemente D (Rollinger & Schmidtke, 2011; Palmenberg, Rathe & Liggett, 2010), véase la Tabla 1.

Tabla 1

Clados	Tipo de receptor	Números de serotipos	Ejemplos de serotipos	Observaciones
HRV-A	<i>Principal</i>	62	16	

HRV-A	<i>Menor</i>	12	1A, 1B, 2, 23, 25, 29, 30, 31, 44, 47, 49, 62	
HRV-B	<i>Principal</i>	25	3, 14	
HRV-C	?	7		Nuevo, emergente, clado
HRV87	?	1		El mismo virus que el enterovirus humano 68, de especie HEV-D (Blomqvist et al., 2002)
(HRV-D)	<i>Principal</i>	3	8, 45, 95	El clado potencialmente separado (distinto de otros clados basados en VP3 y proteínas no estructurales, pero no en VP1 y VP4)

Además, se ha usado la especificidad de la célula hospedadora para clasificar más estos virus en grupos principales y menores. Los serotipos que usan el receptor de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) (62 serotipos HRV-A y todos los serotipos B) pertenecen al grupo receptor principal y los 12 serotipos HRV-A restantes usan miembros de la familia del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL) y pertenece al grupo receptor menor. Por lo tanto, se usan los términos "HRV-A principal", "HRV-A menor", y "HRV-B principal".

Además, los serotipos se clasifican por los sitios antigénicos que utilizan para evadir el sistema inmunitario del hospedador. Para el grupo receptor principal se han mapeado cuatro sitios inmunogénicos neutralizantes principales (NIm) para regiones salientes en las proteínas de la cápside externa VP1, VP2 y VP3. Estos son conocidos como NIm-IA, NIm-IB, NIm-II y NIm-III. Para los serotipos de receptor menor existen tres sitios antigénicos distintos A, B y C que están localizados en las mismas inmediaciones que los sitios NIm (revisado en Lewis-Rogers et al. 2009). Se ha demostrado que los anticuerpos inducidos con proteínas HRV-14 o -89 VP1 recombinantes o un péptido que abarca los aminoácidos 147-162 de HRV14 VP1 presentan actividad neutralizante específica y cruzada (McCray & Werner, 1998; Edlmayr et al., 2011). Se ha observado que la estructura de la cápside del rinovirus es dinámica y parece oscilar entre dos estados estructurales diferentes: uno en el que la VP4 está profundamente enterrada, y otro donde el extremo N de la VP4 y de la VP1 son accesibles a las proteasas (Lewis et al. 1998). Se encontró que los anticuerpos creados contra los 30 aminoácidos N terminales de la VP4, pero no de la VP1, neutralizaron satisfactoriamente la infectividad vírica *in vitro* (Katpally et al. 2009). Se encontró que los anticuerpos creados contra los 30 aminoácidos N terminales de la VP4 neutralizaban el HRV14, HRV16 y HRV29. Asimismo, los anticuerpos creados contra una secuencia consenso de los primeros 24 residuos de la VP4 de rinovirus también tuvieron cierta actividad neutralizante cruzada (Katpally et al., 2009).

Otros hechos de los péptidos y/o epítomos del rinovirus se pueden encontrar en la bibliografía en: Niespodziana et al. 2012 en el que una respuesta contra un 20 mero N-terminal de la VP1 no era una respuesta neutralizante, es decir, epítipo no protector; Miao et al. 2009- Mab generados contra la parte N terminal de la VP1 de enterovirus que está altamente conservada son útiles en el reconocimiento de un amplio intervalo de enterovirus; 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 N de la VP1 que incluyen los aminoácidos 1-8; el documento WO 2008/057158 relativo al NIm 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.

El suministro de una vacuna contra HRV es, en particular, un reto debido al gran número de serotipos del virus y la falta de una respuesta protectora generada en los individuos infectados con un serotipo contra la infección con otro serotipo. Un aspecto importante de una vacuna contra HRV que protegerá contra un número suficiente de serotipos de HRV para proporcionar protección eficaz frente a la infección por HRV, es el suministro de epítomos de más de una proteína estructural de HRV, por ejemplo, de VP4 y de VP1. Otro aspecto importante es el suministro de péptidos que están conservados entre los serotipos de HRV. Otro aspecto importante es el suministro de péptidos que generan una respuesta de anticuerpo neutralizante. En el presente documento se proporcionan péptidos de HRV de HRV14 VP1 y construcciones que contienen el péptido. En el suministro de péptidos que están conservados entre los serotipos de HRV, los inventores también han descubierto péptidos que están notablemente conservados entre los picornavirus en general.

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a péptidos de proteínas estructurales de picornavirus que se seleccionan por ser capaces de inducir una respuesta inmunitaria neutralizante cruzada contra diferentes picornavirus, que pueden ser picornavirus diferentes o serotipos diferentes del mismo picornavirus, por ejemplo, diferentes serotipos de rinovirus. Estos péptidos pueden administrarse en una cantidad de maneras que incluyen como péptidos acoplados o conjugados con proteínas portadoras tales como CRM197, o en una construcción química con un polipéptido en el que está insertado el péptido o los péptidos, por ejemplo, un polipéptido que forma una partícula, tal como una partícula tipo virus, o una partícula subviral.

El péptido del rinovirus humano de acuerdo con la invención se acopla a una proteína portadora y consiste en no más de 40 aminoácidos de la región N terminal de HRV14 VP1 e incluye la secuencia PILTANETGATMPV [SEQ ID NO: 1].

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.

Los péptidos de HRV14 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 manera 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.

El péptido de HRV14 VP1 de acuerdo con la invención se acopla a una proteína portadora tal como CRM197. Las proteínas portadoras adecuadas incluyen CRM197, proteína D procedente de *Haemophilus influenza*, no tipificable, PhtD, PhtDE, adenilato ciclasa, toxoide tetánico (TT), fragmento C de toxoide tetánico, mutantes no tóxicos de la toxina del tétanos, toxoide diftérico (DT), Pneumolisina (Ply), exotoxina A (ExoA) y nanopartículas tales como nanopartículas sintéticas. Otras proteínas portadoras adecuadas incluyen el picornavirus, por ejemplo, proteínas no estructurales de HRV tales como la proteasa vírica, la polimerasa y otras proteínas implicadas en la replicación del picornavirus u otros virus. Favorablemente, la proteína portadora es una proteína no estructural del picornavirus tal como HRV, que proporciona un beneficio añadido de una respuesta inmunitaria contra la proteína no estructural. Los péptidos primero y segundo en la composición inmunogénica descrita en el presente documento pueden acoplarse a las mismas proteínas portadoras o diferentes que pueden seleccionarse de la lista anterior. Cuando se acoplan a la misma proteína portadora, los vehículos pueden acoplarse por separado a la misma proteína portadora y, a continuación, los péptidos acoplados se combinan, o los péptidos pueden primero mezclarse y, a continuación, acoplarse a la proteína portadora.

Las composiciones inmunogénicas proporcionadas en el presente documento pueden comprender además un adyuvante que puede ser, por ejemplo, una sal mineral tal como una sal de aluminio, por ejemplo, hidróxido de aluminio. En una realización adicional el adyuvante comprende monofosforil lípido A 3-desacilado (3D-MPL). En otra realización, el adyuvante comprende QS21.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican un péptido como se describe en el presente documento. Dichos ácidos nucleicos pueden estar presentes en un vector de expresión procariota o eucariota. Los vectores de expresión adecuados incluyen, por ejemplo, levadura tal como *Pichia pastoris*. Los ácidos nucleicos recombinantes, por ejemplo, los vectores de expresión pueden introducirse (por ejemplo, infectar, transfectarse o transformarse) en una célula hospedadora. Dichas células hospedadoras también son una característica de la presente divulgación. Estas células hospedadoras pueden usarse para producir el péptido, por ejemplo, mediante replicación de la célula hospedadora en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido recombinante. Opcionalmente, a continuación, el polipéptido se puede aislar y/o purificar, por ejemplo, antes de la formulación en una composición inmunogénica.

Los péptidos de HRV acoplados a una proteína portadora divulgados en el presente documento pueden usarse en medicina, por ejemplo, como composiciones inmunogénicas (tales como vacunas) para la prevención o el tratamiento de la infección causada por picornavirus tal como HRV. Estas composiciones son adecuadas para su uso en métodos para inducir anticuerpos contra picornavirus tal como HRV en seres humanos administrando la composición inmunogénica a un sujeto humano. Favorablemente, la administración de la composición inmunogénica al sujeto humano provoca anticuerpos que previenen, mejoran o tratan la infección o enfermedad por picornavirus, tal como la infección o la enfermedad por HRV.

Por tanto, la presente divulgación también proporciona composiciones inmunogénicas para su uso en la prevención, mejora o tratamiento de la infección o enfermedad por picornavirus. Dichas composiciones inmunogénicas incluyen un péptido de rinovirus humano acoplado a una proteína portadora como se describe en el presente documento, junto con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica también incluye un adyuvante. Los adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio, 3D-MPL y QS21. Combinaciones adecuadas de adyuvantes incluyen hidróxido de aluminio y 3D-MPL; y 3D-MPL y QS21 opcionalmente formuladas con liposomas.

TÉRMINOS

Con el fin de facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la presente divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de los términos. Se pueden proporcionar términos y explicaciones adicionales en el contexto de la presente divulgación.

A menos que se explique de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia a la cual pertenece la presente divulgación. Pueden encontrarse definiciones de términos comunes en biología molecular en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH

Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Los términos en singular "un", "uno/una", y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, se pretende que la palabra "o" incluya "y", a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término "pluralidad" se refiere a dos o más. Se entiende además que todos los tamaños de bases o los tamaños de aminoácidos y todos los valores de peso molecular o masa molecular, proporcionados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para la descripción. Adicionalmente, las limitaciones numéricas dadas con respecto a las concentraciones o los niveles de una sustancia, tal como un antígeno, pretenden ser aproximadas. Por tanto, cuando se indica que una concentración es de al menos (por ejemplo) 200 pg, se pretende que se entienda que la concentración es de al menos aproximadamente (o "alrededor de" o "~") 200 pg.

Aunque en la práctica o en las pruebas de la presente divulgación pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación, se describen métodos y materiales adecuados. El término "comprende" significa "incluye". Por tanto, a menos que el contexto requiera lo contrario, el término "comprende", y las variaciones tales como "comprenden" y "que comprende" se entenderá que implican la inclusión de un compuesto o composición establecida (por ejemplo, ácido nucleico, polipéptido, antígeno) o etapa, o grupo de compuestos o etapas, pero no la exclusión de algún otro compuesto, composición, etapa o grupo de los mismos.

Un "polipéptido" es un polímero en el que los monómeros son residuos de aminoácidos que se unen mediante enlaces amida. Un "péptido" es una secuencia de aminoácidos corta, por ejemplo, aproximadamente de 10-50 o 10-40 aminoácidos de longitud. Los términos "polipéptido" o "proteína" o "péptido" como se usan en el presente documento pretenden abarcar cualquier secuencia de aminoácidos e incluyen secuencias modificadas tales como glucoproteínas. Los términos "polipéptido" y "péptido" pretenden específicamente cubrir las proteínas de origen natural, así como las que se producen de forma recombinante o sintética. El término "fragmento", en referencia a un polipéptido, se refiere a una parte (es decir, una subsecuencia) de un polipéptido. La expresión "fragmento inmunogénico" se refiere a todos los fragmentos de un polipéptido que conservan al menos un epítipo inmunogénico predominante de la proteína o el polipéptido de referencia de longitud completa. La orientación dentro de las proteínas estructurales del picornavirus y los péptidos ilustrativos se enumera en una dirección N-terminal a C-terminal, definida por la orientación de los restos amino y carboxi de los aminoácidos individuales. Los polipéptidos y los péptidos son traducidos desde el extremo amino o N hacia el extremo carboxi o C.

Las "proteínas estructurales" de un virus tal como un picornavirus son proteínas que son componentes de la partícula vírica ensamblada madura y pueden incluir la proteína nuclear nucleocápside, enzimas empaquetadas dentro de la partícula vírica y proteínas de membrana. Las proteínas estructurales de picornavirus tal como el HRV incluyen VP1, VP2, VP3, VP4. Las proteínas estructurales no incluyen "proteínas no estructurales" del virus, que son proteínas que se producen en células infectadas pero que no están presentes en la partícula vírica madura. La "región N terminal" de las proteínas estructurales de picornavirus se refiere a la mitad N terminal de las proteínas completas, favorablemente una región dentro de la mitad N terminal de la proteína y en o cerca del extremo N de la proteína completa. Por tanto, para VP4, que es de solo alrededor 70 aminoácidos de longitud, se considera que la región N terminal son los aminoácidos 1 a 35 de la proteína completa o una región dentro de los aminoácidos 1-35 en o cerca del extremo N de la proteína completa, los aminoácidos 1 a 30 o 1 a 25 o 1 a 20 de la proteína completa o una región dentro de los aminoácidos 1 a 30 o 1 a 25 o 1 a 20 en o cerca del extremo N de la proteína completa. Para VP1, que es una proteína mayor de hasta 300 aminoácidos, la región N terminal se considera que son los aminoácidos 1-100, favorablemente 1-80 o 1-70 o 1-60 o 1-50 de la proteína completa o una región dentro de 100 u 80 o 70 o 60 o 50 aminoácidos N-terminales y en o cerca del extremo N de la proteína completa.

El término "Picornavirus" se refiere a cualquier virus de la familia *Picornaviridae* que incluye virus humanos y animales. La expresión "rinovirus humano" abreviado como HRV se refiere a cualquier serotipo de rinovirus de la familia *Picornaviridae* que es capaz de infectar seres humanos y se ha identificado o aún tiene que ser identificado como un rinovirus. Existen diferentes maneras de agrupar los HRV descritos en el presente documento, y cada agrupamiento contiene múltiples "serotipos" o "cepas" de virus (por ejemplo, HRV-14, HRV-8, HRV-25, etc.) categorizados por la similitud genética. En el contexto de la presente divulgación, el término "serotipo" puede usarse para designar un HRV y/o un polipéptido o péptido de un tipo especificado de HRV.

El término "polinucleótido" y la expresión "secuencia de ácido nucleico" se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud. Los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o formas modificadas de cualquiera de los nucleótidos. El término incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN. Por "polinucleótido aislado" se entiende un polinucleótido que no es inmediatamente contiguo a las dos secuencias codificantes con las que es inmediatamente contiguo (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma de origen natural del organismo del que procede. En una realización, un polinucleótido codifica un polipéptido. La dirección 5' y 3' de un ácido nucleico se define por referencia a la conectividad de las unidades nucleotídicas individuales, y se designa de acuerdo con las posiciones del carbono del anillo de azúcar desoxirribosa (o ribosa). El contenido informativo (codificante) de una secuencia polinucleotídica se lee en una dirección 5' o 3'.

La expresión "proteína portadora" se refiere a cualquier proteína a la que se acopla o se une o con la que se conjuga

el péptido, normalmente con el fin de aumentar o facilitar la detección del antígeno por el sistema inmunitario. El término pretende cubrir tanto los péptidos pequeños como los polipéptidos grandes (>10 kDa). La proteína portadora puede comprender uno o más epítomos de linfocitos T ayudantes. El péptido puede acoplarse a la proteína portadora por cualquier medio tal como la conjugación química.

La expresión "partícula tipo virus" (VLP) se refiere a una cápside vírica que se asemeja a la estructura proteica externa del virus nativo pero no es infecciosa debido a que no contiene material genético vírico. La expresión de las proteínas estructurales víricas, conocidas como envoltura o cápside o proteínas de superficie, puede dar como resultado el autoensamblaje de las VLP. Las VLP pueden ser encapsuladas o no encapsuladas. Las VLP generalmente tienen una estructura icosaédrica compuesta de subunidades proteicas idénticas repetidas conocidas como capsómeros. Los capsómeros se autoensamblan para formar las VLP. Las "partículas" de construcciones polipeptídicas químicas son estructuras tales como agregados amorfos, o estructuras más ordenadas, por ejemplo, un capsómero o una partícula tipo virus (VLP) o estructuras no VLP pequeñas. Las partículas, incluyendo las VLP, los capsómeros y las estructuras menos ordenadas incluyen partículas del virus de la hepatitis B HBsAg compuestas por el antígeno de superficie de HBV pequeño, partículas de HPV compuestas por la proteína L1 o L1 y L2 de HPV, partículas de HRV compuestas por VP1, VP2, VP3 y VP4 o VP1, VP2 y VP3 de HRV, y partículas de otros virus tales como influenza o norovirus o enterovirus, por ejemplo, EV-71. Más recientemente, las partículas, incluyendo las VLP, se han producido a partir de componentes de una amplia variedad de familias de virus que incluyen *Parvoviridae* (por ejemplo, virus adenoasociado), *Retroviridae* (por ejemplo, VIH) y *Flaviviridae* (por ejemplo, virus de la hepatitis C). Las VLP de EV71 se describen en Cheng-Yu Chung et al. 2010. Las VLP se pueden producir en una diversidad de sistemas de cultivo celular que incluyen líneas celulares de mamíferos, líneas celulares de insectos, levadura, células vegetales y *E.coli*.

El término "heterólogo" con respecto a un ácido nucleico, un polipéptido u otro componente celular, indica que el componente se da cuando normalmente no se encuentra en la naturaleza y/o que se origina a partir de una diferente fuente o especie.

El término "nativo" y la expresión "de origen natural" se refieren a un elemento, tal como una proteína, polipéptido o ácido nucleico, que está presente en el mismo estado en que se encuentra en la naturaleza. Es decir, el elemento no se ha modificado artificialmente. Se entenderá que, en el contexto de la presente divulgación, existen numerosos serotipos nativos/de origen natural de HRV (y proteínas y polipéptidos de HRV), por ejemplo, obtenidos de diferentes serotipos de origen natural de HRV.

Una "variante" cuando se refiere a un ácido nucleico o un polipéptido (por ejemplo, un ácido nucleico o polipéptido de VP1 o VP4 de picornavirus) es un ácido nucleico o un polipéptido que difiere de un ácido nucleico o polipéptido de referencia. Habitualmente, la diferencia o diferencias entre la variante y el ácido nucleico o polipéptido de referencia constituyen un número proporcionalmente pequeño de diferencias en comparación con el referente. Un ácido nucleico variante puede diferir del ácido nucleico de referencia con el que se compara mediante la adición, delección o sustitución de uno o más nucleótidos, o mediante la sustitución de un análogo de nucleótido artificial. De manera similar, un péptido o polipéptido variante puede diferir del polipéptido de referencia con el que se compara mediante la adición, delección o sustitución de uno o más aminoácidos, o mediante la sustitución de un análogo de aminoácido. Las variantes de los péptidos de VP1 y VP4 se describen adicional y más específicamente en el presente documento.

Un "antígeno" es un compuesto, composición o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos y/o una respuesta de linfocitos T en un animal, incluyendo las composiciones que se inyectan, se absorben o de otra manera se introducen en un animal. El término "antígeno" incluye todos los epítomos antigénicos relacionados. El término "epítomo" o la expresión "determinante antigénico" se refiere también a un lugar sobre un antígeno al que responden los linfocitos B y/o T. Los "epítomos antigénicos dominantes" o el "epítomo dominante" son aquellos epítomos a los cuales se produce una respuesta inmunitaria hospedadora significativa, por ejemplo, una respuesta de anticuerpo o una respuesta de linfocitos T. Por tanto, con respecto a una respuesta inmunitaria protectora contra un patógeno, los epítomos antigénicos dominantes son aquellos restos antigénicos que cuando son reconocidos por el sistema inmunitario del hospedador dan como resultado la protección frente a la enfermedad causada por el patógeno. La expresión "epítomo de linfocitos T" se refiere a un epítomo que cuando se une a una molécula MHC apropiada se une específicamente por un linfocito T (vía un receptor de linfocitos T). Un "epítomo de linfocitos B" es un epítomo que es específicamente unido por un anticuerpo (o molécula receptora de linfocitos B). Un "epítomo neutralizante" es uno que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria neutralizante.

Un "adyuvante" es un agente que aumenta la producción de una respuesta inmunitaria de una manera no específica. Adyuvantes comunes incluyen suspensiones de minerales (alumbre, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio) sobre las cuales se adsorbe el antígeno; emulsiones, que incluyen de agua en aceite y de aceite en agua (y sus variantes, incluidas las emulsiones dobles y las emulsiones reversibles), liposacáridos, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos inmuoestimulantes (tales como oligonucleótidos CpG), liposomas, agonistas del receptor de tipo Toll (particularmente, TLR2, TLR4, TLR7/8 y TLR9) y diversas combinaciones de dichos componentes.

Una "composición inmunogénica" es una composición de materia adecuada para la administración a un sujeto humano o animal (por ejemplo, en un ajuste experimental) que es capaz de provocar o inducir una respuesta

inmunitaria específica, por ejemplo, contra un patógeno, tal como picornavirus. De este modo, una composición inmunogénica incluye uno o más antígenos (por ejemplo, antígenos polipeptídicos) o epítomos antigénicos. Una composición inmunogénica puede incluir también uno o más componentes adicionales capaces de provocar o inducir o aumentar una respuesta inmunitaria, tal como un excipiente, vehículo y/o adyuvante. En determinados casos, las composiciones inmunogénicas se administran para provocar o inducir una respuesta inmunitaria que proteja al sujeto frente a los síntomas o afecciones inducidos por el patógeno. En algunos casos, los síntomas o la enfermedad causados por un patógeno se previenen (o reducen o alivian) inhibiendo la replicación del patógeno (por ejemplo, picornavirus) tras la exposición del sujeto al patógeno. En el contexto de la presente divulgación, se entenderá que la expresión composición inmunogénica abarca las composiciones que están destinadas a la administración a un sujeto o población de sujetos con el fin de provocar o inducir una respuesta inmunitaria protectora o paliativa contra los picornavirus, por ejemplo, HRV (es decir, composiciones de vacuna o vacunas).

Una "respuesta inmunitaria" es una respuesta de una célula del sistema inmunitario, tal como un linfocito B, linfocito T o monocito, a un estímulo. Una respuesta inmunitaria puede ser una respuesta de linfocitos B, que da como resultado la producción de anticuerpos específicos, tales como anticuerpos neutralizantes específicos a antígeno. Una respuesta inmunitaria puede ser también una respuesta de linfocitos B, tal como una respuesta de CD4+ o una respuesta de CD8+. En algunos casos, la respuesta es específica a un antígeno particular (es decir, una "respuesta específica a antígeno"). Si el antígeno procede de un patógeno, la respuesta específica a antígeno es una "respuesta específica a patógeno". Una "respuesta inmunitaria protectora" es una respuesta inmunitaria que presenta una función o actividad perjudicial de un patógeno, reduce la infección por un patógeno, o disminuye los síntomas (incluida la muerte) que resultan de la infección por el patógeno. Una respuesta inmunitaria protectora puede medirse, por ejemplo, mediante la inhibición de la replicación vírica o la formación de placa en un ensayo de reducción de placa o ensayo de neutralización ELISA, o midiendo la resistencia a la exposición al patógeno *in vivo*. Una respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria neutralizante cruzada cuando es provocada por un antígeno de un serotipo de picornavirus y neutraliza no solo el virus de ese serotipo sino también el virus de un serotipo de picornavirus diferente. Por tanto, por ejemplo, un péptido de HRV de un serotipo de HRV puede provocar una respuesta inmunitaria neutralizante cruzada contra otro serotipo de HRV. O un péptido de un picornavirus puede provocar una respuesta neutralizante cruzada contra otro picornavirus. La neutralización cruzada puede ser, por tanto, entre virus o entre serotipos o cepas del mismo virus. Una respuesta inmunitaria neutralizante cruzada contra dos o más virus o serotipos incluye la respuesta inmunitaria contra el virus del cual procede el antígeno y una respuesta inmunitaria contra un virus o serotipo adicional. Una respuesta inmunitaria neutralizante cruzada puede incluir la generación de los anticuerpos neutralizantes que pueden medirse mediante un ensayo de neutralización adecuado usando el virus o el pseudovirus para evaluar la capacidad de neutralización de los anticuerpos.

Los péptidos de los picornavirus descritos en el presente documento pueden denominarse de reactividad cruzada o de neutralización cruzada o de protección cruzada. Los péptidos de reactividad cruzada son péptidos que son capaces de provocar una respuesta inmunitaria contra virus o serotipos adicionales al péptido del que procede. Los péptidos de neutralización cruzada son péptidos que son capaces de provocar una respuesta inmunitaria neutralizante cruzada, que es una respuesta inmunitaria que neutraliza el virus contra el cual se provocó la respuesta y también otro virus relacionado, por ejemplo, el mismo virus pero de un serotipo diferente, o un virus diferente de la misma familia. Un péptido de protección cruzada es uno que provoca una respuesta inmunitaria que puede prevenir la infección o la enfermedad causada por el virus contra el que se provocó la respuesta y también la infección o la enfermedad causada por otro virus relacionado, por ejemplo, de un serotipo diferente.

Un "adyuvante" es un agente que aumenta la producción de una respuesta inmunitaria de una manera no específica. Adyuvantes comunes incluyen suspensiones de minerales (alumbre, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio) sobre las cuales se adsorbe el antígeno; emulsiones, que incluyen de agua en aceite y de aceite en agua (y sus variantes, incluidas las emulsiones dobles y las emulsiones reversibles), liposacáridos, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos inmunoestimulantes (tales como oligonucleótidos CpG), liposomas, agonistas del receptor de tipo Toll (particularmente, TLR2, TLR4, TLR7/8 y TLR9) y diversas combinaciones de dichos componentes.

Una "composición inmunogénica" es una composición de materia adecuada para la administración a un sujeto humano o animal (por ejemplo, en un ajuste experimental) que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria específica, por ejemplo, contra un patógeno, tal como rinovirus humano. De este modo, una composición inmunogénica incluye uno o más antígenos (por ejemplo, subunidades antigénicas de virus, por ejemplo, polipéptidos de los mismos) o epítomos antigénicos. Una composición inmunogénica puede incluir también uno o más componentes adicionales capaces de provocar o aumentar una respuesta inmunitaria, tal como un excipiente, vehículo y/o adyuvante. En determinados casos, las composiciones inmunogénicas se administran para provocar una respuesta inmunitaria que protege al sujeto frente a los síntomas o afecciones inducidas por el patógeno. En algunos casos, los síntomas o la enfermedad causada por un patógeno se previenen (o tratan, por ejemplo, reducen o alivian) inhibiendo la replicación del patógeno (por ejemplo, rinovirus humano) tras la exposición del sujeto al patógeno. Por ejemplo, en el contexto de la presente divulgación, dichas realizaciones de las composiciones inmunogénicas que están destinadas a la administración a un sujeto o población de sujetos con el fin de provocar una respuesta inmunitaria protectora o paliativa contra rinovirus humano son composiciones de vacuna o vacunas.

PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS ESTRUCTURALES DE HRV

La presente invención se enfoca en la necesidad de una vacuna de rinovirus y se dirige al uso de las proteínas estructurales y péptidos de rinovirus que pueden estimular una respuestas inmunitaria contra un número de serotipos de HRV y, por tanto, proporcionar protección frente a la infección y la enfermedad por HRV.

Las proteínas y los péptidos de rinovirus empleados en la invención son del HRV serotipo14. Los serotipos de particular interés incluyen los serotipos HRV 8, HRV 25 y HRV 100 de clado A, el serotipo HRV 14 de clado B, y el serotipo HRV_C_026 de clado C. Los serotipos de HRV A y C están asociados con la mayor gravedad de la enfermedad y, por lo tanto, se contempla específicamente la presencia de la combinación de una secuencia del serotipo HRV A y una de HRV C en cualquier composición descrita en el presente documento.

Están disponibles varias estructuras 3-dimensionales (3D) de cápsides de HRV. Para HRV 14, por ejemplo, un análisis muy detallado ha sido publicado por Arnold & Rossmann (1990). La cápside tiene una pseudosimetría icosaédrica $T = 3$. La superficie del virus se define por las 12 mesetas en forma de estrella, una en cada eje de simetría de 5 pliegues. Están rodeadas por una hendidura o "cañón", 20 Profundidad de ang. También hay 20 protuberancias triangulares, una en cada eje de simetría de 3 pliegues. También se han determinado las estructuras 3D de HRV 1A, HRV 2, HRV 3 y HRV 16, algunas veces en complejo con los receptores o los fragmentos de anticuerpo.

Se ha demostrado que las dinámicas de la cápside de HRV 14 se asemejan a la "respiración" (Lewis et al. 1998). La estructura de la cápside parece oscilar entre dos estados estructurales diferentes, uno observado en las estructuras 3D con VP4 profundamente enterrada, y otro donde el extremo N de la VP4 y de la VP1 son accesibles a las proteasas. Esto también se ha demostrado mediante la accesibilidad de diferentes fragmentos de cápside a lo largo del tiempo mediante proteólisis y espectroscopia de masas (Lewis et al. 1998). Esta "respiración" puede ser parada por compuestos antivíricos uniéndose en una bolsa detrás del cañón de la cápside.

Katpally et al. (2009) demostraron que los anticuerpos creados contra una secuencia consenso de los primeros 24 residuos más probables de VP4 de rinovirus pueden neutralizar de manera cruzada HRV 14 y 16, y que un péptido correspondiente a los primeros 30 aminoácidos de HRV 14 VP4 generaron antisuero que neutralizó HRV 16 y HRV 29.

Miao et al. (2009) han demostrado que un péptido conservado del extremo N de otros enterovirus, específicamente Polio 1 y Cox B3, es reconocido por anticuerpos monoclonales (Mab) generados contra proteínas VP1 completas de diferentes especies de enterovirus.

Un péptido conservado equivalente de HRV VP1 también es capaz de generar una respuesta de anticuerpo neutralizante cruzada contra diferentes serotipos de HRV. El péptido de VP1 de HRV procede de la región N terminal de VP1, en particular, los aminoácidos 32-45 de VP1 y sus variantes. Mediante el alineamiento de secuencia de VP1 y VP4 de todos los picornavirus, sorprendentemente se ha descubierto que hay péptidos similares a HVR14 VP4 1-16 y HVR14 32-45. Por tanto, los picornavirus en lugar de rinovirus también tienen potencialmente péptidos de neutralización cruzada equivalentes a HVR14 VP4 1-16 y HVR14 32-45. Estos péptidos de picornavirus son un aspecto adicional de la invención descrita en el presente documento.

A lo largo de la memoria descriptiva las secuencias de VP1 y VP4 de HRV 14 se usan como las secuencias de referencia para determinar la región a partir de la cual proceden las secuencias peptídicas de VP1 y VP4 (Palmenberg et al. 2010).

Los péptidos de rinovirus seleccionados son capaces de inducir una respuesta inmunitaria neutralizante cruzada contra HRV. Esto significa que cuando se presenta apropiadamente, los péptidos generan una respuesta inmunitaria, por ejemplo, una respuesta de anticuerpo, contra más de un serotipo de HRV. Por tanto, por ejemplo, la respuesta inmunitaria generada neutraliza el serotipo de HRV del cual se origina el péptido y al menos otro serotipo de HRV. Por ejemplo, la repuesta neutralizante cruzada puede neutralizar más de 2 o más de 5 o más de 10 serotipos de HRV diferentes. En una realización, la repuesta neutralizante cruzada puede neutralizar más de 2 o más de 5 o más de 10 serotipos de HPV diferentes seleccionados de HRV 1B, 2, 3, 8, 10, 14, 26, 29, 31, 39, 47, 61, 62, 63, 66, 77, 97, 100.

Adecuadamente, se selecciona el péptido de HRV que muestra un alto nivel de identidad de secuencia ("homología") entre los serotipos de HRV que es mayor del 80 % entre dos (o más) serotipos. En algunos casos, el péptido de HRV tiene identidad de secuencia mayor del 85 % entre serotipos, o identidad de secuencia mayor del 90 % entre serotipos, o identidad de secuencia mayor del 95 % entre serotipos. La identidad de secuencia también puede evaluarse observando el número de diferencias de aminoácidos, por tanto, por ejemplo, se puede seleccionar el péptido de HRV que muestra solo una o solo dos diferencias de aminoácidos, o solo una o solo dos diferencias conservadoras de aminoácido o ninguna diferencia de aminoácidos entre dos o más serotipos a lo largo de la longitud del péptido.

El péptido 1-16 de VP4 de HRV descrito en el presente documento de HRV 14 tiene un 100 % de identidad de secuencia dentro del clado B para los serotipos de clado B actualmente conocidos. El péptido de VP4 de HRV descrito en el presente documento de HRV 100 (A-M) tiene un 100 % de identidad de secuencia dentro del clado A

para los serotipos de clado A actualmente conocidos.

La enumeración comienza en el aminoácido 1 en el extremo N, con el extremo N en el extremo izquierdo de cualquier secuencia que aparezca en el presente documento y el extremo C en el derecho. Será evidente que puede haber alguna variabilidad alrededor de los péptidos. Por tanto, por ejemplo, los péptidos pueden ser uno o dos o tres o cuatro aminoácidos más largos o cortos en cada extremo en comparación con las secuencias peptídicas específicas dadas. Por tanto, por ejemplo, para el péptido 32-45 de VP1, puede ser posible usar un péptido mayor que contenga los aminoácidos 32-45, tal como 32-43 o 32-44 o 32-46 o 32-47, o 30-45 o 31-45 o 33-45 o 34-44, o un péptido equivalente con una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos, o una o dos deleciones de aminoácido, sin alterar las propiedades inmunológicas del péptido o sin eliminar el epítipo. Un péptido VP1 como se describe en el presente documento puede comenzar, por ejemplo, en el aminoácido 28, 29, 39, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 y terminar, por ejemplo, en el aminoácido 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50, usando el número como para HRV14. Se entenderá que dicha variabilidad está dentro del alcance de los péptidos descritos en el presente documento y que los péptidos específicos descritos en el presente documento se dan a modo de ejemplo y no son limitantes como los péptidos que son capaces de proporcionar una respuesta inmunitaria neutralizante cruzada como se describe en el presente documento.

Los péptidos de VP1 de HRV de reacción cruzada que son capaces de provocar una respuesta inmunitaria contra serotipos de HRV adicionales pueden identificarse de acuerdo con la presente divulgación. Como se muestra en el presente documento, las secuencias de HRV de diferentes serotipos de HRV pueden alinearse para identificar regiones con alta similitud entre serotipos de HRV. Numerosos programas de secuencia están disponibles para realizar dichos alineamientos e identificar dónde hay homología de secuencia. Esto puede posibilitar la selección de péptidos de VP1 de HRV que son los más similares entre los serotipos de HRV de interés y son, por lo tanto, potencialmente de reactividad cruzada entre algunos o todos aquellos serotipos de HRV.

Adecuadamente, el péptido o los péptidos de VP1 de HRV son péptidos de reactividad cruzada, de manera que son capaces de provocar una respuesta inmunitaria que reconozca no solo la VP1 del serotipo de HRV del cual procede el péptido VP1, sino también un péptido o proteína VP1 de un serotipo de HRV distinto del que procede. Adecuadamente, el péptido es de reactividad cruzada con 1 o 2 o más serotipos diferentes, dentro del mismo clado o un clado diferente. Adecuadamente, el péptido o los péptidos de VP1 de HRV usados en la invención son capaces de generar una respuesta inmunitaria neutralizante cruzada, es decir, una respuesta inmunitaria que es capaz de neutralizar HRV de un serotipo de HRV diferente del serotipo de HRV del cual procede el péptido VP1, dentro del mismo clado o un clado diferente. La neutralización cruzada se puede ensayar usando análisis conocidos en la técnica tal como el ensayo descrito por Katpally et al. (2009) o Phillips et al. (2011), o el ensayo descrito en el presente documento en el Ejemplo 1 que se adapta a partir de los ensayos publicados.

Adecuadamente, el péptido VP1 es capaz de proporcionar protección cruzada, y adecuadamente comprende un epítipo de neutralización cruzada.

La protección cruzada adecuadamente ocurre cuando un péptido de VP1 es capaz de generar una respuesta inmunitaria protectora frente a la infección/enfermedad causada por al menos dos serotipos de HRV. La protección cruzada puede ocurrir cuando un péptido de VP1 consenso se selecciona y se presenta en el contexto de una proteína portadora tal como CRM197.

La protección cruzada puede evaluarse comparando la incidencia de la infección y/o la enfermedad para un grupo de serotipos de HRV en individuos vacunados con un péptido de VP1 de HRV dado o combinación del mismo en comparación con un grupo no vacunado. No se requiere protección cruzada completa contra un serotipo, o grupo de serotipos, de acuerdo con la presente divulgación; de hecho, cualquier nivel de protección cruzada proporciona un beneficio. Adecuadamente, el nivel de protección cruzada observado es de modo que el grupo vacunado tenga un 5 % de menos infección y/o enfermedad asociada a un serotipo o serotipos de HRV de no vacuna, que un grupo no vacunado comparable, más adecuadamente hasta un 10 %, hasta un 15 %, hasta un 20 %, hasta un 25 %, hasta un 30 %, hasta un 35 %, hasta un 40 %, hasta un 45 %, hasta un 50 %, hasta un 55 %, hasta un 60 %, hasta un 65 %, hasta un 70 %, hasta un 80 %, hasta un 90 % o incluso hasta un 100 % menos de infección y/o enfermedad.

Los péptidos de VP1 de HRV y las construcciones que los contienen pueden ensayarse para la inmunogenicidad, la reactividad cruzada y la neutralización cruzada mediante técnicas convencionales bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, los péptidos pueden inyectarse en modelos animales o humanos y la medición de las respuestas inmunitarias del anticuerpo y/o celular puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante ELISA o análisis/medición de citocina respectivamente. Los métodos de cribado de anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Puede usarse un ELISA para evaluar la reactividad cruzada de los anticuerpos. Las propiedades de neutralización y neutralización cruzada pueden ensayarse en los anticuerpos usando un ensayo tal como el descrito en el presente documento en el Ejemplo 1.

La protección cruzada frente a distintos serotipos de HRV diferentes del cual procede el péptido VP1, puede identificarse usando un modelo animal, por ejemplo, modelos de ratón (Bartlett et al. 2008).

Los péptidos de picornavirus tales como los péptidos VP1 de rinovirus en el presente documento pueden sintetizarse

químicamente mediante técnicas convencionales, o producidos de manera recombinante. Los péptidos pueden estar en forma de péptidos individuales o concatámeros de péptidos unidos en una serie de, por ejemplo, 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 o 9 o 10 o más péptidos.

5 PROTEÍNAS PORTADORAS PARA PÉPTIDOS DE PICORNAVIRUS

Los péptidos de picornavirus divulgados en el presente documento, tal como péptidos de HRV, pueden acoplarse a una proteína portadora. El acoplamiento puede ser por cualquier medio adecuado, por ejemplo, mediante la expresión como una construcción con la proteína portadora, o mediante acoplamiento o conjugación química del péptido con la proteína portadora usando una etapa de conjugación química. Las proteínas portadoras incluyen CRM197 que es bien conocida. Las proteínas portadoras también incluyen KLH que puede usarse en una composición inmunogénica para uso en animal pero no en ser humano.

CRM197 es una forma no tóxica de la toxina diftérica pero es inmunológicamente indistinguible de la toxina diftérica. CRM197 está producida por *C. diphtheriae* infectada por la fase no toxigénica β 197tox- creada por mutagénesis de nitrosoguanidina del carinefago b toxigénico (Uchida et al. *Nature New Biology* (1971) 233; 8-11). La proteína CRM197 tiene el mismo peso molecular que la toxina diftérica pero difiere de la misma en un único cambio de bases en el gen estructural. Esto conduce a un cambio de aminoácido de glicina a glutamina en la posición 52 que hace que el fragmento A no pueda unirse a NAD y, por lo tanto, lo hace no tóxico (Pappenheimer 1977, *Ann Rev, Biochem.* 46; 69-94, Rappuoli *Applied and Environmental Microbiology*, sept. de 1983 páginas 560-564).

La conjugación de los péptidos con una proteína portadora puede llevarse a cabo mediante un cantidad de diferentes métodos químicos bien conocidos. Ejemplos de métodos químicos conocidos incluyen la conjugación de grupos amino entre el péptido y el vehículo por reactivos aminoreactivos tales como el glutaraldehído o el reactivo bis-succinimidil éster (DSG - glutarato de disuccinimidilo o DSS - suberato de disuccinimidilo (Greg T. Hermanson. *Bioconjugate techniques*. Academic Press. 1996, 218-220 y 194-196); o condensando los grupos carboxilo y los grupos amino con reactivos de carbodiimida (Greg T. Hermanson. *Bioconjugate techniques*. Academic Press. 1996, 171-173). También es posible usar un enlace tio-éter para conjugar los péptidos con las proteínas portadoras. Esto puede conseguirse, por ejemplo, añadiendo un residuo con un grupo tiol terminal en el péptido, por ejemplo, añadiendo una cisteína y, a continuación, haciendo reaccionar el grupo tiol reactivo con una proteína portadora derivatizada con maleimida (véase, Greg T. Hermanson. *Bioconjugate techniques*. Academic Press. 1996). Un método alternativo es acoplar un vehículo tiolado a un grupo sulfhidrilo en el péptido para formar un puente disulfuro. Los péptidos pueden sintetizarse también con un grupo haloalquilo adicional tal como un grupo yodoalquilo o bromoalquilo. Adecuadamente, el grupo bromoalquilo es un grupo bromoacetilo. En la bibliografía se describe el uso de grupos bromoacetilo para unir péptidos a vehículos (Ivanov et al., 1995, *Bioconjugate Chemistry*, 6, 269-277).

También puede usarse la aminación reductora para conjugar una molécula que contiene aldehído con una molécula que contiene amina. Los péptidos pueden sintetizarse también con un grupo hidrazida adicional. Las macromoléculas que contienen aldehído pueden reaccionar también espontáneamente con compuestos hidrazida para formar enlaces de hidrazona. Las hidrazidas son nucleófilos más fuertes y reaccionan más fácilmente con aldehídos que las aminas primarias. El enlace de hidrazona es una forma de base Schiff que es más estable que el formado a partir de la interacción de un aldehído y una amina. Por tanto, puede obtenerse una conjugación específica mediante aminación reductora usando péptidos que tienen una hidrazida adicional (Shannessy D.J. y Wilcheck. 1990. *Analytical Biochemistry* 191: 1-8).

En una realización los péptidos se acoplan a CRM197 de acuerdo con las técnicas químicas de conjugación bien conocidas, véase, por ejemplo, Mattson et al., *Mol. Biol. Reports*, 17, 167-183, 1993. En una realización se purifica CRM197 a partir de *Corynebacterium* y la fermentación de CRM197 se realiza como se describe en el documento WO 2006/100108. En una realización, el procedimiento de purificación implica tres etapas cromatográficas (Q-sepharose-XL, hidroxipatita de tipo I y Octil-sepharose) y una etapa de ultrafiltración. La química de maleimida puede usarse para conjugar péptidos que tienen una cisteína en el N o C-terminal.

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS Y MÉTODOS

Otro aspecto de la presente invención concierne a composiciones inmunogénicas que contienen un péptido de rinovirus humano acoplado a una proteína portadora de la invención. Las composiciones inmunogénicas de la invención normalmente incluyen al menos un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un adyuvante. Los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y pueden ser seleccionados por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el vehículo o excipiente puede incluir favorablemente un tampón. Opcionalmente, el vehículo o excipiente también contiene al menos un componente que estabiliza la solubilidad y/o la estabilidad. Ejemplos de los agentes solubilizantes/estabilizantes incluyen detergentes, por ejemplo, lauroil sarcosina y/o tween. Agentes solubilizantes/estabilizantes alternativos incluyen arginina, y polioles formadores de cristal (tales como sacarosa, trehalosa y similares). Numerosos vehículos farmacéuticamente aceptables y/o excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, 5ª Edición (1975).

Por consiguiente, los expertos en la materia pueden seleccionar los excipientes y vehículos adecuados para producir una formulación adecuada para la administración a un sujeto mediante una vía de administración seleccionada.

Excipientes adecuados incluyen, sin limitación: glicerol, polietilenglicol (PEG), sorbitol, trehalosa, sal sódica de N-lauroilsarcosina, L-prolina, sulfobetaina no detergente, clorhidrato de guanidina, urea, óxido de trimetilamina, KCl, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y otras sales relacionadas con el catión divalente, ditiotreitól, ditioeritrol y β -mercaptoetanol. Otros excipientes pueden ser detergentes (que incluyen: Tween80, Tween20, Triton X-00, NP-40, Empigen BB, octilglucósido, lauroil maltósido, Zwittergent 3-08, Zwittergent 3-0, Zwittergent 3-2, Zwittergent 3-4, Zwittergent 3-6, CHAPS, desoxicolato de sodio, dodecilsulfato de sodio, bromuro de cetiltrimetilamonio).

Opcionalmente, las composiciones inmunogénicas también incluyen un adyuvante. El adyuvante se selecciona por ser seguro y bien tolerado en la población diana. Por ejemplo, en el caso de un adyuvante seleccionado para la seguridad y la eficacia en niños pequeños o bebés, puede seleccionarse una dosis de adyuvante, es decir, una dilución (por ejemplo, una dosis fraccional) de una dosis normalmente administrada a un sujeto adulto.

Un adyuvante adecuado es un derivado de lipopolisacárido bacteriano no tóxico. Un ejemplo de un derivado no tóxico de lípido A adecuado, es 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. Véase, 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- γ (Th1). El 3D-MPL puede producirse de acuerdo con los métodos divulgados en el documento GB 2220211A. Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido A 3-desacilado con 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas. En las composiciones de la presente invención pueden usarse 3D-MPL de partícula pequeña. El 3D-MPL de partícula pequeña 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 WO94/21292.

Un lipopolisacárido, tal como 3D-MPL, puede usarse en unas cantidades de entre 1 y 50 μg , por dosis en seres humanos de la composición inmunogénica. El 3D-MPL puede usarse a un nivel de alrededor de 25 μg , por ejemplo entre 20 y 30 μg , adecuadamente entre 21 y 29 μg o entre 22 y 28 μg o entre 23 y 27 μg o entre 24 y 26 μg , o 25 μg . En otra realización, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende 3D-MPL a un nivel de alrededor de 10 μg , por ejemplo entre 5 y 15 μg , adecuadamente entre 6 y 14 μg , por ejemplo entre 7 y 13 μg o entre 8 y 12 μg o entre 9 y 11 μg , o 10 μg . En una realización adicional, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende 3D-MPL a un nivel de alrededor de 5 μg , por ejemplo entre 1 y 9 μg , o entre 2 y 8 μg o adecuadamente entre 3 y 7 μg o 4 y μg , o 5 μg .

En otras realizaciones, el lipopolisacárido puede ser un β (1-6) glucosamina disacárido, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.005.099 y la patente europea n.º 0 729 473 B1. Un experto en la materia sería capaz de producir fácilmente diversos lipopolisacáridos, tal como 3D-MPL, basándose en las enseñanzas de estas referencias. Sin embargo, cada una de estas referencias se incorpora en el presente documento como referencia. Además de los inmunoestimulantes anteriormente mencionados (que son similares en estructura a la de LPS o MPL o 3D-MPL), derivados de monosacárido y disacárido acilados que son una subparte de la estructura anterior de MPL son también adyuvantes adecuados. En otras realizaciones, el adyuvante es un derivado sintético del lípido A, algunos de los cuales se describen como agonistas de TLR-4, e incluyen, pero sin limitación: OM174 (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetra-decanoilamino]-4-o-fosfono- β -D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]- α -D-glucopiranosildihidrogenofosfato), (WO 95/14026); OM 294 DP (3S, 9 R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetra-decanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol, 1,10-bis(dihidrogenofosfato) (WO 99/64301 y WO 00/0462); y OM 197 MP-Ac DP (3S-, 9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol, 1,1-dihidrogenofosfato 10-(6-aminohexanoato) (WO 01/46127).

Otros ligandos de TLR4 que pueden usarse son fosfatos de alquil glucosamida (AGPs) tales como los descritos en el documento WO 98/50399 o la patente de Estados Unidos n.º 6.303.347 (también se divulgan los procedimientos para la preparación de AGP), adecuadamente RC527 o RC529 o sales farmacéuticamente aceptables de AGP como se divulga en la patente de Estados Unidos n.º 6.764.840. Algunos AGP son agonistas de TLR4, y algunos son antagonistas de TLR4. Se cree que ambos son útiles como adyuvantes.

Otros ligandos de TLR-4 adecuados, capaces de causar una respuesta de señalización a través de TLR-4 (Sabroe et al., JI 2003 páginas 1630-5) son, por ejemplo, el lipopolisacárido de bacterias gramnegativas y sus derivados o fragmentos de los mismos, en particular, un derivado no tóxico de LPS (tal como 3D-MPL). Otros agonistas de TLR adecuados son: proteína de choque térmico (HSP) 10, 60, 65, 70, 75 o 90; tensioactivo Proteína A, oligosacáridos de hialuronano, fragmentos de sulfato de heparán, fragmentos de fibronectina, péptidos de fibrinógeno y b-defensina-2, y muramíl dipéptido (MDP). En una realización el agonista de TLR es HSP 60, 70 o 90. Otros ligandos de TLR-4 se describen en el documento WO 2003/011223 o en el documento WO 2003/099195, tal como el compuesto I, el compuesto II y el compuesto III divulgados en las páginas 4-5 del documento WO2003/011223 o en las páginas 3-4 del documento WO2003/099195 y, en particular, aquellos compuestos divulgados en el documento WO2003/011223 como ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057, ER804058, ER804059, ER804442, ER804680 y ER804764. Por ejemplo, un ligando de TLR-4 adecuado es ER804057.

Los agonistas de TLR adicionales son útiles también como adyuvantes. La expresión "agonista de TLR" se refiere a un agente que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de una ruta de señalización de TLR, ya sea un ligando directo o indirectamente a través de la generación de un ligando endógeno o exógeno. Dichos agonistas de TLR naturales o sintéticos pueden usarse como adyuvantes alternativos o adicionales. Una breve revisión del papel de los TLR como receptores adyuvantes se proporciona en Kaisho & Akira, *Biochimica et Biophysica Acta* 1589:1-13, 2002. Estos adyuvantes potenciales incluyen, pero sin limitación, los agonistas para TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9. Por consiguiente, en una realización, la composición inmunogénica y adyuvante comprende además un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en: un agonista de TLR-1, un agonista de TLR-2, agonista de TLR-3, un agonista de TLR-4, agonista de TLR-5, un agonista de TLR-6, agonista de TLR-7, un agonista de TLR-8, agonista de TLR-9 o una combinación de los mismos.

En una realización de la presente invención, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-1. Adecuadamente, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-1 se selecciona entre: lipopéptidos triacilados (LP); modulina soluble en fenol; LP de *Mycobacterium tuberculosis*; S-(2,3-bis(palmitoiloxi)-(2-RS)-propil)-N-palmitoil-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH, triclorigidato (Pam3Cys) LP que imita el extremo amino acetilado de una lipoproteína bacteriana y OspA LP de *Borrelia burgdorferi*.

En una realización alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-2. Adecuadamente, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-2 es uno o más de una lipoproteína, un peptidoglucano, un lipopéptido bacteriano de *M. tuberculosis*, *B. burgdorferi* o *T. pallidum*; peptidoglucanos de especies incluyendo *Staphylococcus aureus*; ácidos lipoteicoicos, ácidos manurónicos, porinas de *Neisseria*, fimbrias bacterianas, factores de la virulencia de *Yersinia*, viriones de CMV, hemaglutinina del sarampión y zimosán de levadura.

En una realización alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-3. Adecuadamente, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-3 es ARN bicatenario (ARNbc), o ácido poliinosínico-policitidílico (Poly IC), un patrón de ácido nucleico molecular asociado a la infección vírica.

En una realización alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-5. Adecuadamente, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-5 es flagelina bacteriana.

En una realización alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-6. Adecuadamente, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-6 es lipoproteína micobacteriana, LP diacilado y modulina soluble en fenol. Además, los agonistas de TLR6 se describen en el documento WO 2003/043572.

En una realización alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-7. Adecuadamente, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-7 es un ARN monocatenario (ARNmc), loxoribina, un análogo de guanosina en las posiciones N7 y C8 o un compuesto de imidazoquinolina, o un derivado de los mismos. En una realización, el agonista de TLR es imiquimod. Además, los agonistas de TLR7 se describen en el documento WO 2002/085905.

En una realización alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-8. Adecuadamente, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-8 es un ARN monocatenario (ARNmc), una molécula de imidazoquinolina con actividad antivírica, por ejemplo, resiquimod (R848); resiquimod también es capaz de ser reconocido por TLR-7. Otros agonistas de TLR-8 que se pueden usar incluyen los descritos en el documento WO 2004/071459.

En una realización alternativa, se usa un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-9. En una realización, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-9 es HSP90. Alternativamente, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-9 es ADN bacteriano o vírico, conteniendo el ADN nucleótidos de CpG no metilados, en particular, contextos de secuencias conocidos como motivos CpG. Los oligonucleótidos con CpG inducen a una respuesta de predominantemente Th1. Dichos oligonucleótidos son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 96/02555, WO 99/33488 y las patentes de Estados Unidos n.º 6.008.200 5.856.462. Adecuadamente, los nucleótidos CpG son oligonucleótidos CpG. Los oligonucleótidos adecuados para su uso en las composiciones inmunogénicas de la presente invención son oligonucleótidos con CpG, opcionalmente con dos o más motivos CpG dinucleotídicos separados por al menos tres, adecuadamente al menos seis o más nucleótidos. Un motivo CpG es un nucleótido de citosina seguido de un nucleótido de guanina. Los oligonucleótidos CpG de la presente invención son normalmente desoxinucleótidos. En una realización específica el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o adecuadamente un enlace de fosforotioato, aunque el fosfodiéster y otros enlaces internucleótidos están dentro del alcance de la invención. También se incluyen dentro del alcance de la invención los oligonucleótidos con enlaces internucleótidos mezclados. Los métodos para producir oligonucleótidos

de fosforotioato o fosforoditioato se describen en la patentes de Estados Unidos n.º 5.666.153, 5.278.302 y el documento WO 95/26204.

Otros adyuvantes que pueden usarse en las composiciones inmunogénicas con péptidos de picornavirus o construcciones polipeptídicas quiméricas, por ejemplo, por sí mismos o en combinación con 3D-MPL, u otro adyuvante descrito en el presente documento, son saponinas, tales como QS21.

Las saponinas se enseñan en: Lacaille-Dubois, M y Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* vol 2 págs. 363-386). Las saponinas son glucósidos esteroides o triterpénicos ampliamente distribuidos en los reinos vegetal y animal marino. Las saponinas se caracterizan por formar soluciones coloidales en el agua que forman espuma al agitarlas y por precipitar el colesterol. Cuando las saponinas están cerca de las membranas celulares, crean estructuras en forma de poros en la membrana que hacen que se rompa. La hemólisis de eritrocitos es un ejemplo de este fenómeno, que es una propiedad de determinadas, aunque no todas, las saponinas.

Las saponinas se conocen como adyuvantes en vacunas para administración sistémica. La actividad adyuvante y hemolítica de saponinas individuales se ha estudiado extensamente en la materia (Lacaille-Dubois y Wagner, mencionados anteriormente). Por ejemplo, Quil A (procedente de la corteza del árbol sudamericano *Quillaja Saponaria* Molina), y fracciones del mismo, se describen en el documento US 5.057.540 y en "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.*, 1996, 12 (1-2): 1-55; y el documento EP 0 362 279 B1. Las estructuras de partículas, denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), que comprenden fracciones de Quil A son hemolíticas y se han utilizado en la fabricación de vacunas (Morein, B., los documentos EP 0 109 942 B1; WO 96/11711; WO 96/33739). Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas por HPLC de Quil A) se han descrito como potentes adyuvantes sistémicos, y el método de su producción se divulga en la Patente de Estados Unidos n.º 5.057.540 y el documento EP 0 362 279 B1, que se incorporan en el presente documento por referencia. Otras saponinas que se han usado en estudios de vacunación sistémica incluyen las procedentes de otras especies de plantas tales como *Gypsophila* y *Saponaria* (Bomford et al., *Vaccine*, 10(9):572-577, 1992).

La QS21 es una fracción no tóxica purificada por HPLC procedente de la corteza de *Quillaja saponaria* Molina. En la patente de Estados Unidos n.º 5.057.540 se divulga un método para producir QS21. En el documento WO 96/33739 se describen formulaciones adyuvantes no reactógenas que contienen QS21. Las referencias anteriormente mencionadas se incorporan por referencia en el presente documento. Dicha saponina inmunológicamente activa, tal como QS21, puede usarse en cantidades de entre 1 y 50 µg, por dosis en seres humanos de la composición inmunogénica. De manera ventajosa, QS21 se usa a un nivel de alrededor de 25 µg, por ejemplo entre 20-30 µg, adecuadamente entre 21-29 µg o entre 22-28 µg o entre 23-27 µg o entre 24-26 µg, o 25 µg. En otra realización, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende QS21 a un nivel de alrededor de 10 µg, por ejemplo entre 5 y 15 µg, adecuadamente entre 6-14 µg, por ejemplo entre 7-13 µg o entre 8-12 µg o entre 9-11 µg, o 10 µg. En una realización adicional, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende QS21 a un nivel de alrededor de 5 µg, por ejemplo entre 1-9 µg o entre 2-8 µg o adecuadamente entre 3-7 µg o 4-6µg, o 5 µg. Se ha demostrado que dichas formulaciones que comprenden QS21 y colesterol son adyuvantes estimulantes de Th1 con éxito cuando se formulan junto con un antígeno. Por tanto, por ejemplo, los péptidos de picornavirus y las construcciones polipeptídicas quiméricas pueden emplearse favorablemente en composiciones inmunogénicas con un adyuvante que comprende una combinación de QS21 y colesterol.

Opcionalmente, el adyuvante puede incluir también sales minerales tales como una sal de calcio o aluminio, en particular, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato de calcio. Por ejemplo, un adyuvante que contiene 3D-MPL junto con una sal de aluminio (por ejemplo, hidróxido de aluminio o "alumbre") es adecuado para la formulación en una composición inmunogénica que contiene péptidos de picornavirus o una construcción polipeptídica quimérica para la administración a un ser humano.

Otra clase de adyuvantes que influyen en Th1 adecuados para su uso en formulaciones con péptidos de picornavirus y construcciones polipeptídicas quiméricas incluye composiciones inmunoestimulantes basadas en OMP. Las composiciones inmunoestimulantes basadas en OMP son particularmente adecuadas como adyuvantes mucosos, por ejemplo, para administración intranasal. Las composiciones estimulantes basadas en OMP son un género de preparaciones de proteínas de membrana externa (OMP, incluyendo algunas purinas) de bacterias gramnegativas, tales como, aunque sin limitación, especies de *Neisseria* (véase, por ejemplo, Lowell et al., *J. Exp. Med.* 167:658, 1988; Lowell et al., *Science* 240:800, 1988; Lynch et al., *Biophys. J.* 45:104, 1984; Lowell, en "New Generation Vaccines" 2º ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Basil, Hong Kong, página 193, 1997; patente de Estados Unidos n.º 5.726.292; patente de Estados Unidos n.º 4.707.543), que son útiles como vehículo o en composiciones para los inmunógenos, tales como antígenos bacterianos o víricos. Algunas composiciones inmunoestimulantes basadas en OMP pueden denominarse "Proteosomas", que son hidrófobas y seguras para uso humano. Los proteosomas tienen la capacidad de autoensamblarse en vesículas o grupos de OMP tipo vesícula de alrededor de 20 nm a alrededor de 800 nm, e incorporarse de manera no covalente, combinarse, asociarse (por ejemplo, de manera electrostática o hidrófoba), o de otra manera cooperar con otros antígenos proteicos (Ags), particularmente antígenos que tienen un resto hidrófobo. Cualquier método de preparación que da como resultado el componente proteico de la membrana exterior en forma vesicular o tipo vesícula, incluyendo estructuras membranosas multimoleculares o composiciones de OMP tipo globular fundidas, se incluye en la definición de proteosoma. Los proteosomas se pueden preparar, por

ejemplo, como se describe en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.726.292 o la patente de Estados Unidos n.º 5.985.284). Los proteosomas pueden contener también un lipopolisacárido o lipooligosacárido endógeno (LPS o LOS, respectivamente) con origen bacteriano usado para producir las porinas OMP (por ejemplo, especie de *Neisseria*), que generalmente serán menos del 2 % de la preparación de la OMP total.

Los proteosomas principalmente están compuestos de proteínas de membrana externa (OMP) químicamente extraídas de *Neisseria meningitidis* (en su mayor parte porinas A y B, así como OMP clase 4), mantenidas en solución por detergente (Lowell GH. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. En: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, eds, New Generation Vaccines. Nueva York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206). Los proteosomas pueden formularse con una diversidad de antígenos tales como proteínas purificadas o recombinantes procedentes de fuentes víricas, incluyendo los péptidos picornavirus y las construcciones polipeptídicas quiméricas divulgados en el presente documento, por ejemplo, mediante diafiltración o procedimientos de diálisis tradicionales. La eliminación gradual del detergente permite la formación de complejos hidrófobos particulados de aproximadamente 100-200 nm de diámetro (Lowell GH. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. En: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, eds, New Generation Vaccines. Nueva York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206).

"Proteosoma: LPS o Protollin" como se usa en el presente documento se refiere a preparaciones de proteosomas mezcladas, por ejemplo, mediante la adición exógena, con al menos un tipo de lipopolisacárido para proporcionar una composición de OMP-LPS (que puede funcionar como una composición inmunoestimulante). Por tanto, la composición de OMP-LPS puede comprender dos de los componentes básicos de Protollin, que incluyen (1) una preparación de proteína de membrana externa de proteosomas (por ejemplo, Proyuvante) preparada a partir de bacteria gramnegativa, tal como *Neisseria meningitidis*, y (2) una preparación de uno o más liposacáridos. Un lipooligosacárido puede ser endógeno (por ejemplo, naturalmente contenido con la preparación de proteosoma de OMP), puede estar mezclado o combinado con una preparación de OMP de un lipooligosacárido exógenamente preparado (por ejemplo, preparado a partir de un cultivo o microorganismo diferente que la preparación de OMP), o puede ser una combinación de los mismos. Tales LPS exógenamente añadidos pueden ser de la misma bacteria gramnegativa a partir de la cual se produjo la preparación de OMP o a partir de una bacteria gramnegativa diferente. También se debe entender que la protollin incluye opcionalmente lípidos, glucolípidos, glucoproteínas, pequeñas moléculas, o similares, y combinaciones de los mismos. La Protollin puede prepararse, por ejemplo, como se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0044425.

Las combinaciones de diferentes adyuvantes, tales como las mencionadas anteriormente, pueden usarse también en composiciones con los péptidos de picornavirus y las construcciones polipeptídicas quiméricas. Por ejemplo, como ya se señaló, QS21 puede formularse junto con 3D-MPL. La relación de QS21:3D-MPL será normalmente del orden de 1:10 a 10:1; tal como de 1:5 a 5:1 y con frecuencia sustancialmente de 1: 1. Normalmente, la relación está en el intervalo de 2,5:1 a 1:1 3D-MPL: QS21. Otra combinación de la formulación del adyuvante incluye 3D-MPL y una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio. Cuando se formula en combinación, esta combinación puede aumentar una respuesta inmunitaria de Th1 específica a antígeno.

En algunos casos, la formulación del adyuvante incluye una sal mineral, tal como una sal de calcio o de aluminio (alumbre), por ejemplo, fosfato de calcio, fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio. Cuando está presente alumbre, por ejemplo, en combinación con 3D-MPL, la cantidad normalmente está entre alrededor de 100 µg y 1 mg, tal como alrededor de 100 µg, o alrededor de 200 µg a alrededor de 750 µg, tal como alrededor de 500 µg por dosis.

En algunas realizaciones, el adyuvante incluye una emulsión de aceite y agua, por ejemplo, una emulsión de aceite en agua. Un ejemplo de emulsión de aceite en agua comprende un aceite metabolizable, tal como escualeno, un tocol tal como tocoferol, por ejemplo, alfa-tocoferol y un tensioactivo, tal como triolato de sorbitano (Span 85™) o monooleato de polioxietilensorbitano (Tween 80™), en un vehículo acuoso. En determinadas realizaciones, la emulsión de aceite en agua no contiene ningún inmunoestimulante adicional, (en particular, no contiene un derivado de lípido A no tóxico, tal como 3D-MPL, o una saponina, tal como QS21). El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato. Adicionalmente, la emulsión de aceite en agua puede contener span 85 y/o lecitina y/o tricaprilina.

En otra realización de la invención se proporciona una composición de vacuna que comprende un antígeno o una composición de antígeno y una composición de adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua y opcionalmente uno o más inmunoestimulantes adicionales, en donde dicha emulsión de aceite en agua comprende 0,5-10 mg de aceite metabolizable (adecuadamente escualeno), 0,5-11 mg de tocol (adecuadamente un tocoferol, tal como alfa-tocoferol) y 0,4-4 mg de agente emulsionante.

En una realización específica, la formulación de adyuvante incluye 3D-MPL preparada en forma de una emulsión, tal como una emulsión de aceite en agua. En algunos casos, la emulsión tiene un tamaño de partícula pequeño de menos de 0,2 µm de diámetro, como se divulga en el documento WO 94/21292. Por ejemplo, las partículas de 3D-MPL pueden ser lo suficientemente pequeñas para ser esterilizadas por filtración a través de una membrana de 0,22 micras (como se describe en la patente europea número 0 689 454). Alternativamente, el 3D-MPL puede prepararse en una forma farmacéutica liposomal. Opcionalmente, el adyuvante que contiene 3D-MPL (o un derivado del mismo)

también incluye un componente inmunoestimulante adicional.

Debe señalarse que sin tener en cuenta el adyuvante seleccionado, la concentración en la formulación final se calcula para ser segura y eficaz en la población diana. Por ejemplo, las composiciones inmunogénicas pueden ser para provocar una respuesta inmunitaria contra picornavirus tal como HRV en bebés humanos (por ejemplo, bebés entre el nacimiento y 1 año, por ejemplo, entre 0 y 6 meses, a la edad de la dosis inicial). Otras composiciones inmunogénicas ejemplo pueden ser para provocar una respuesta inmunitaria contra picornavirus tal como HRV en humanos ancianos. O la composición inmunogénica puede ser para la administración a adultos o niños. Se apreciará que la elección de adyuvante puede ser diferente en estas diferentes aplicaciones, y el adyuvante y la concentración óptima para cada situación puede ser determinada empíricamente por el experto en la técnica.

La composición inmunogénica puede comprender también aluminio o un compuesto de aluminio como estabilizador, y la presente divulgación también se refiere a una composición estabilizada en donde las construcciones polipeptídicas quiméricas tales como VLP se adsorben sobre una sal de aluminio. Adecuadamente, las VLP son más estables con el tiempo después de la adsorción sobre una sal de aluminio que en ausencia de aluminio.

Las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento pueden administrarse como vacunas por cualquiera de una diversidad de vías tales como oral, tópica, subcutánea, mucosal, intravenosa, intramuscular, intranasal, sublingual, intradérmica y vía supositorio. Las administraciones intramusculares, sublinguales e intradérmicas son preferidas. La dosis de los péptidos puede variar dependiendo de la afección, el sexo, la edad y el peso del individuo y la vía de administración de la vacuna. La cantidad puede variar también dependiendo del número de diferentes péptidos.

Una composición inmunogénica normalmente contiene una cantidad inmunoprotectora (o una dosis fraccional de la misma) del antígeno y puede prepararse mediante técnicas convencionales. La preparación de composiciones inmunogénicas, que incluyen aquellas para la administración a sujetos humanos, generalmente se describe en *Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 61 *Vaccine Design- the subunit and adjuvant approach*, editado por Powell and Newman, Plenum Press, 1995. *New Trends and Developments in Vaccines*, editado por Avis et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, EE. UU. 1978. La encapsulación en liposomas se describe, por ejemplo, por Fullerton, patente de Estados Unidos n.º 4.235.877. La conjugación de proteínas con macromoléculas se describe, por ejemplo, por Likhite, patente de Estados Unidos n.º 4.372.945 y por Armor et al., patente de Estados Unidos n.º 4.474.757.

Normalmente, la cantidad de proteína en cada dosis de la composición inmunogénica se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en el sujeto típico. Inmunoprotector en este contexto no necesariamente significa completamente protector frente a la infección; significa protección frente a los síntomas o la enfermedad, especialmente enfermedad grave asociada al virus. La cantidad de antígeno puede variar dependiendo del inmunógeno específico que se emplee. Generalmente, se espera que cada dosis humana comprenda 1-1.000 µg de proteína. Adecuadamente, cada dosis de vacuna comprende 1-100 µg de cada conjugado peptídico o construcción polipeptídica quimérica, adecuadamente al menos 5 µg o al menos 10 µg, por ejemplo, entre 5-50 µg de cada conjugado peptídico o construcción polipeptídica quimérica, más adecuadamente 10-50 µg de cada uno, tal como 10 µg, 15 µg, 20 µg, 40 µg o 50 µg. Por ejemplo, puede haber 10 o 15 o 20 o 30 o 40 µg de cada conjugado peptídico o construcción polipeptídica quimérica, en una dosis de vacuna. La cantidad utilizada en una composición inmunogénica se selecciona basándose en la población diana (por ejemplo, bebés o ancianos). Una cantidad óptima para una composición particular puede determinarse mediante estudios convencionales que implican la observación de títulos de anticuerpo y otras respuestas en los sujetos. Después de la vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una dosis de recuerdo en aproximadamente 4 semanas.

Las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento adecuadamente generan una respuesta inmunitaria en un sujeto humano o animal contra al menos 2 picornavirus diferentes o dos serotipos diferentes de un picornavirus tal como dos serotipos diferentes de HRV, adecuadamente de 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, o 10 o más serotipos diferentes.

Las composiciones de HRV descritas en el presente documento proporcionan adecuadamente protección frente a la infección y/o la enfermedad por al menos 2 serotipos de HRV diferentes, adecuadamente de 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, o 10 o más serotipos diferentes.

Además, las composiciones descritas en el presente documento que incluyen una proteína portadora generarán también una respuesta inmunitaria contra la propia proteína portadora. Esto puede ser una respuesta protectora. Opcionalmente, la composición inmunogénica de HRV o vacuna puede formularse también o coadministrarse con otros antígenos tales como antígenos de otros virus respiratorios tales como influenza o RSV, u otros que causan EPOC tales como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catharralis* y *Streptococcus pneumoniae* no tipificables.

Para todas las vacunas descritas en el presente documento, la vacuna se usa adecuadamente para la vacunación de cualquier grupo de edad, particularmente, para la vacunación de poblaciones de niños y ancianos.

Adecuadamente, la vacuna se administra en un régimen de 2 o 3 dosis, por ejemplo, un régimen de 0, 1 o 0, 2 o 0, 3 o 0, 4 o 0, 5 o 0, 6, o 0, 12 meses, o un régimen de 0, 1, 6 o 0, 2, 6 o 0, 6, 12 meses respectivamente.

Adecuadamente, la vacuna es una formulación de vacuna líquida, aunque la vacuna puede liofilizarse y reconstituirse antes de la administración.

Ejemplos

Ejemplo 1

Inmunogenicidad de péptidos y proteínas completas relacionados con rinovirus humano

Objetivos

En este experimento, se evaluó lo siguiente:

- (1) la inmunogenicidad de péptidos relacionados con VP1/VP4 conjugados con KLH o proteínas completas y
- (2) el funcionamiento de las construcciones polipeptídicas quiméricas de antígeno de superficie de la Hepatitis B/péptidos de HRV.

Los péptidos se seleccionaron basándose en las predicciones informáticas y comparando con los datos publicados que muestran una capacidad de diversos péptidos para provocar anticuerpos de neutralización (cruzada) (McCray & Werner, 1987, 1989; Katpally et al., 2009; Miao et al., 2009; Edlmayr et al., 2011). Junto con los péptidos, se produjeron concatámeros de proteínas VP4 de clado B completas y se purificaron. Estos concatámeros se diseñaron, basándose en el análisis de secuencia de aminoácidos, para cubrir el panel completo de secuencias existentes dentro del clado B.

Se midieron la reactividad cruzada y específica de sueros de conejo usando ensayos ELISA basado en péptido y de neutralización cruzada.

Material y métodos

Diseño del estudio

La inmunogenicidad de los péptidos relacionados con HRV y las proteínas completas se investigó en cuatro experimentos, diseñados de manera similar.

Los grupos de conejos NZW (N=2-3/grupo) se inmunizaron intramuscularmente (en el músculo tibial) los días 0, 14, 42 y 70 con 20 a 100 µg de antígeno formulado con un adyuvante en agua en aceite (Specol, Leonards et al., 1994). La extracción de sangre se llevó a cabo a los 14 días después de la 2ª, 3ª y 4ª inyección. A menos que se indique otra cosa, se midió la respuesta humoral 14 días después de la 4ª inyección mediante los ensayos ELISA y de neutralización.

La Tabla 2 de a continuación muestra los péptidos que se inyectaron y también las construcciones de concatámero de 5x VP4 completas que se usaron. Las construcciones polipeptídicas quiméricas de HBsAg con péptidos de VP4 de rinovirus se prepararon como se describe en el Ejemplo 2.

TABLA 2

Origen	Secuencia	Vehículo	Dosis	Estudio
	NaCl 150 mM - CONTROL			
VP1	HRV14: 147-VVQAMYVPPGAPNPKE-162	KLH	20-100 µg	20110375
VP4	HRV14: 39-SSAGQSLMDPSKFTEPVKDLMLKGAPALN-68	KLH		
VP1	HRV14: 1-GLGDELEEIVIVEKTKQTVASISSGPKHTQK-30	KLH		
VP1	HRV14: 32-PILTANETGATMPV-45	KLH		
VP1	HRV8: 32-PALDAAETGHTSSV-45	KLH		
VP1	HRV25: 32-PILDAAETGHTSNV-45	KLH		
VP1	HRV_C_026: 32-QALGAVEIGATADV-45	KLH		
VP4	HRV14: 1-GAQVSTQKSGSHENQN-16	KLH		
VP4	HRV100: 1-GAQVSRQNVGTHSTQN-16	KLH		
VP4	HRV_C_026: 1-GAQVSRQSVGSHETMI-16	KLH		
VP4	HRV14: 1-GAQVSTQKSGSHENQNILTNNGSNQTFTVINY-31	HB-S N Term	20 µg	20110765

VP4	HRV14: 1-GAQVSTQKSGSHENQNILTNGSNQTFTVINY-31	HB-S Bucle A		
VP4	HRV14: 1-GAQVSTQKSGSHENQNILTNGSNQTFTV INY-31	KLH		
	NaCl 150 mM - CONTROL			
VP4	Concatámero de VP4 completa de clado B (5x) (HRV14, 26, 35, 52 y CU003) (Rhi004)		20 µg	20120174
VP4	Concatámero de VP4 completa de HRV14 (5x) (Rhi008)			
	NaCl - CONTROL			

Péptidos

Los péptidos de HRV fueron proporcionados por Polypeptide Laboratories. Los péptidos se conjugaron con KLH usando N-hidroxisuccinimida éster de ácido m-maleimidobenzóico (MBS) después de la adición de cisteína en la región N-terminal y amidación de la región C-terminal.

Clonación, expresión y purificación de la poliproteína VP4 Clado A (Rhi002), Clado B (Rhi004), Clado C (Rhi006) y 5x proteínas del serotipo HRV14 Clado B (Rhi008)

Plásmido de expresión y cepa recombinante

Los genes codificantes de proteínas de longitud completa de poliproteínas VP4

(Rhi002/Rhi004/Rhi006/Rhi008) y una etiqueta His se clonaron dentro del vector de expresión pET24b(+) (Novagen) usando los sitios de restricción *NdeI/XhoI* usando los procedimientos convencionales. Las construcciones finales se generaron mediante la transformación de la cepa C43 (DE3) de *E. coli* (Rhi004/Rhi006/Rhi008) o Rosetta2 (DE3) (Rhi002) con el vector de expresión recombinante de acuerdo con el método convencional con células tratadas con CaCl_2 (Hanahan D. Plasmid transformation by Simanis. En Glover, D. M. (Ed), DNA Cloning. IRL Press London. (1985): págs. 109-135.).

Cepa hospedadora:

C43(DE3) es un derivado de la cepa C41 que es un derivado de BL21. Las cepas que tienen la designación (DE3) son lisogénicas para un profago λ que contiene una T7 ARN polimerasa inducible por IPTG. Los lisógenos λ DE3 están diseñados para la expresión proteica de vectores pET. Esta cepa también es deficiente en las proteasas *lon* y *ompT*. Las cepas C43 contienen mutaciones genéticas fenotípicamente seleccionadas para conferir tolerancia a proteínas tóxicas. Esta cepa tiene al menos una mutación, que previene la muerte celular asociada a la expresión de muchas proteínas tóxicas recombinantes y seleccionadas para la resistencia a una proteína tóxica diferente y puede expresar un conjunto diferente de proteínas tóxicas.

Genotipo: cepa C43::DE3 de *E. coli*, F^- *ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) n.^o*

Rosetta2(DE3) es un derivado de BL21 diseñado para aumentar la expresión de proteínas eucariotas que contienen condones raramente usados en *E. coli*. Estas cepas suministran ARNt para 7 codones raros (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC y CGG). Las cepas que tienen la designación (DE3) son lisogénicas para un profago λ que contiene una T7 ARN polimerasa inducible por IPTG. Los lisógenos λ DE3 están diseñados para la expresión proteica de vectores pET. Esta cepa también es deficiente en las proteasas *lon* y *ompT*.

Genotipo: cepa Rosetta2::DE3 de *E. coli*, F^- *ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pRARE2 (Cam^R).*

Expresión de las proteínas recombinantes:

Los transformantes de *E. coli* se extrajeron de las placas de agar y se usaron para inocular 200 ml de caldo LBT $\pm$ 1 % (p/v) de glucosa + kanamicina (50 µg/ml) para obtener una D.O._{600nm} entre 0,1-0,2. Los cultivos se incubaron durante la noche a 37 °C, 250 RPM.

Estos cultivos de toda la noche se diluyeron a 1:20 en 500 ml de medio LBT que contenía kanamicina (50 µg/ml) y se cultivaron a 37 °C a una velocidad de agitación de 250 rpm hasta que la D.O.₆₂₀ alcanzó 0,5/0,6.

A una D.O._{600nm} de alrededor de 0,6, los cultivos se indujeron para la expresión de proteína recombinante mediante la adición de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido 1 mM (IPTG; EMD Chemicals Inc., número de catálogo: 5815) y se incubaron durante la noche a 37°C, 250 RPM para la cepa C43 (DE3) (Rhi004/Rhi006/Rhi008) o 3 h a 37 °C, 250 RPM para la cepa Rosetta2(DE3) (Rhi002).

Después de inducción durante la noche (alrededor de 16 horas) o 3 h, la D.O._{600nm} se evaluó y los cultivos se centrifugaron a 14.000 RPM durante 15 minutos y los sedimentos se congelaron a -20 °C por separado.

Purificación de Rhi02:

5 El sedimento bacteriano se suspendió en PBS (pH 7,4). Las bacterias se sometieron a lisis usando un sistema de prensa French 3 X 20 000 PSI. Los componentes solubles (sobrenadante) e insolubles (sedimentos) se separaron mediante centrifugación a 20.000 g durante 30 min a 4 °C.

10 La proteína etiquetada con 6-His se purificó en condiciones desnaturizantes en IMAC. Los componentes insolubles se solubilizaron en tampón Bicina 50 mM pH 8,0, que contenía guanidina 6M, NaCl 500 mM. El componente solubilizado se cargó en una columna GE Histrap de 5 ml (GE) precalibrada con el mismo tampón usado para la solubilización del sedimento. Después de cargar la columna, la columna se lavó con un tampón bicina 50 mM pH 8,0, que contenía, urea 6M y NaCl 500 mM. La elución se realizó usando un tampón bicina 50 mM pH 8,0, que contenía, urea 6 M, NaCl 500 mM e imidazol (250 mM).

15 Después del análisis del gel, la elución de IMAC que contenía fragmento de Rhi002 se dializó frente a tampón bicina (Bicina 25 mM, urea 4 M, NaCl 500 mM, 0,1 % de ácido plurónico - EDTA 5 mM, 1 % de sacarosa pH 9,5). La fracción dializada se cargó en cromatografía SEC para la etapa de purificación adicional.

20 Después de la cromatografía SEC, se seleccionaron más fracciones puras y se dializaron frente a PBS pH 7,4 que contenía 1 % de empigen.

La concentración de proteína se determinó usando el ensayo de proteína Lowry RC/DC de BioRad. Las proteínas así se agruparon, se esterilizaron por filtración en 0,22 µm, se almacenaron a -80 °C.

25 Purificación de Rhi004:

30 El sedimento bacteriano se resuspendió en tampón bicina 20 mM pH 8,3 que contenía NaCl 500 mM - benzonasa y cóctel inhibidor de proteasa sin EDTA (Roche). Las bacterias se sometieron a lisis usando un sistema de prensa French 2 X 20 000 PSI. Los componentes solubles (sobrenadante) e insolubles (sedimentos) se separaron mediante centrifugación a 20.000 g durante 30 min a 4 °C.

35 La proteína etiquetada con 6-His se purificó en condiciones nativas en IMAC. Los componentes solubles (sobrenadante) se cargaron en una columna GE Histrap de 5 ml (GE) precalibrada con el mismo tampón usado para la lisis de células, sin benzonasa y cóctel inhibidor de proteasa sin EDTA (Roche). Después de cargar la columna, la columna se lavó con un tampón bicina 20 mM pH 8,3 que contenía NaCl 500 mM. La elución se realizó usando un tampón bicina 20 mM pH 8,3, que contenía, NaCl 500 mM e imidazol (500 mM-gradiente). Después del análisis del gel, se seleccionaron más fracciones puras, se concentraron y se cargaron en cromatografía SEC superdex 75 para la etapa de purificación adicional.

40 Después de la cromatografía SEC en bicina 20 mM pH 8,3 que contenía NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, se seleccionaron más fracciones puras para la etapa de purificación adicional. Se agruparon y cargaron más fracciones puras en la cromatografía SEC G25 en bicina 20 mM pH 8,3 que contenía NaCl 500 mM.

45 Después del análisis del gel, se seleccionaron y cargaron más fracciones puras en la columna GE Histrap de 5 ml (GE) precalibrada con tampón bicina 20 mM pH 8,3 que contenía NaCl 500 mM. Después de cargar la columna, la columna se lavó con un tampón bicina 20 mM pH 8,3 que contenía NaCl 500 mM. La elución se realizó usando un tampón bicina 20 mM pH 8,3, que contenía, NaCl 500 mM e imidazol (500 mM-gradiente). Después del análisis del gel, se seleccionaron más fracciones puras, se agruparon y se dializaron frente a tampón bicina 20 mM que contenía NaCl 150 mM y EDTA 5 mM.

50 La concentración de proteína se determinó usando el ensayo de proteína Lowry DC de BioRad. Las proteínas así se agruparon, se esterilizaron por filtración en 0,22 µm, se almacenaron a -80 °C.

Purificación de Rhi006:

55 El sedimento bacteriano se suspendió en PBS (pH 7,4). Las bacterias se sometieron a lisis usando un sistema de prensa French 1 X 20 000 PSI. Los componentes solubles (sobrenadante) e insolubles (sedimentos) se separaron mediante centrifugación a 20.000 g durante 30 min a 4 °C.

60 La proteína etiquetada con 6-His se purificó en condiciones desnaturizantes en IMAC. Los componentes insolubles se solubilizaron en tampón Bicina 50 mM pH 8,0, que contenía guanidina 6M, NaCl 500 mM, cóctel inhibidor de proteasa completo sin EDTA (Roche). El componente solubilizado se cargó en una columna GE Histrap de 5 ml (GE) precalibrada con el mismo tampón usado para la solubilización del sedimento. Después de cargar la columna, la columna se lavó con un tampón bicina 50 mM pH 8,0, que contenía, urea 6M y NaCl 500 mM. La elución se realizó usando un tampón bicina 50 mM pH 8,0, que contenía, urea 6 M, NaCl 500 mM e imidazol (250 mM).

Después del análisis del gel, la elución de IMAC que contenía fragmento de Rhi06 se dializó frente a PBS pH 8 que

contenía urea 4 M. La fracción dializada se cargó en cromatografía SEC para la etapa de purificación adicional. Después de la cromatografía SEC, se seleccionaron más fracciones puras y se dializaron frente a PBS pH 8 que contenía urea 1 M y EDTA 5 mM.

- 5 La concentración de proteína se determinó usando el ensayo de proteína Lowry RC/DC de BioRad. Las proteínas así se agruparon, se esterilizaron por filtración en 0,22 µm, se almacenaron a -80 °C.

Purificación de Rhi008:

- 10 El sedimento bacteriano se resuspendió en PBS (pH 7,4) que contenía cóctel inhibidor de proteasa completo sin EDTA (Roche). Las bacterias se sometieron a lisis usando un sistema de prensa French 2 X 20 000 PSI. Los componentes solubles (sobrenadante) e insolubles (sedimentos) se separaron mediante centrifugación a 20.000 g durante 30 min a 4 °C.
- 15 La proteína etiquetada con 6-His se purificó en condiciones desnaturalizantes en IMAC. Los componentes insolubles se solubilizaron en tampón Bicina 50 mM pH 8,3, que contenía urea 8 M, NaCl 500 mM, cóctel inhibidor de proteasa completo sin EDTA (Roche). El componente solubilizado se cargó en 10 ml de resina NiNTA precalibrada con el mismo tampón usado para la solubilización del sedimento. Después de cargar la columna, la columna se lavó con un tampón bicina 50 mM pH 8,3, que contenía, urea 8M y NaCl 500 mM. La elución se realizó usando un tampón bicina
- 20 50 mM pH 8,0, que contenía, urea 6 M, NaCl 500 mM e imidazol (500 mM).

Después del análisis del gel, la elución de IMAC que contenía fragmento de Rhi08 se dializó en una etapa frente a tampón bicina 25 mM pH 8.3 que contenía urea 4 M y NaCl 250 mM, seguido de una segunda etapa de diálisis frente a PBS pH 7,4.

- 25 La concentración de proteína se determinó usando el ensayo de proteína Lowry RC/DC de BioRad. Las proteínas así se agruparon, se esterilizaron por filtración en 0,22 µm, se almacenaron a -80 °C.

Las construcciones polipeptídicas quiméricas de HRV-HBsAg se describen en el Ejemplo 2.

- 30 ***ELISA para la detección de los anticuerpos a proteínas o péptidos***

La cuantificación de anticuerpos anti-proteína o péptido relacionado con VP1/VP4 se realizaron por ELISA usando péptidos o concatámeros específicos de proteínas completas como antígeno de recubrimiento. Los antígenos se

35 diluyeron a una concentración final de 2 µg/ml en PBS y se adsorbieron durante la noche a 4 °C a los pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorp Immuno-plate, Nunc, Dinamarca). A continuación, las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C con PBS + 0,1 % de Tween20 + 1 % de BSA (tampón de saturación). Los sueros diluidos en el tampón de saturación se añadieron a las placas y se incubaron durante 1 h y 30 min a 37 °C. Las

40 placas se lavaron cuatro veces con PBS con 0,1 % de Tween20 y a cada pocillo se añadió un anti-Ig de conejo conjugado con biotina (Amersham Biosciences, UK) diluido en tampón de saturación y se incubó durante 1 h y 30 min a 37 °C. Después de que se lavaran las placas cuatro veces con PBS con 0,1 % de Tween20, se añadió una estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Roche), diluida en tampón de saturación durante unos 30 min

45 adicionales a 37 °C. Las placas se lavaron 4 veces con PBS con 0,1 % de Tween20 de nuevo y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente con una solución de 0,04 % de o-fenilenodiamina (Sigma), 0,03 % de H₂O₂ en 0,1 % de Tween20, tampón de citrato 0,05 M pH 4,5. La reacción se paró con H₂SO₄ 2 N [¿debería esto ser 2 M?] y se leyó a 492/620 nm. Los títulos de ELISA se calcularon a partir de una referencia de SoftMaxPro (usando una ecuación de cuatro parámetros) y se expresó en EU/ml.

Producción de rinovirus

- 50 Las cepas HRV2, 8, 10, 14, 39 y 61 se adquirieron en ATCC y se amplificaron en células Hela-H1 cultivadas en medio de infección (MEM que contenía 2 % de FCS, MgCl₂ 30 mM y glutamina 1 mM). Para este fin, se sembraron 5 millones de células Hela-H1 en placas de 75 cm² y se cultivaron durante la noche a 34 °C. A continuación, las placas se infectaron a una multiplicidad de infección de 15 y se incubaron más hasta completar la lisis de las monocapas
- 55 celulares (24 h a 48 h dependiendo de la cepa). Los sobrenadantes se recogieron y los restos se eliminaron mediante centrifugación (1.000 g-10 min). Los sobrenadantes aclarados se dividieron en alícuotas, se almacenaron a -80 °C y se titularon en Hela-H1.

Titulación de la producción de rinovirus

- 60 Las células H1 se sembraron en placas de 96 pocillos (5.000 células/pocillo) y se cultivaron a 34 °C con CO₂ al 5 % durante la noche. A continuación, las placas se infectaron con diluciones seriadas con factor de dilución de 2 (dilución de inicio = 1/1.000) de suspensiones de rinovirus ensayadas por octuplicado. Tres a cinco días después de la infección, se reveló la presencia de efectos citopáticos mediados por HRV mediante la medición de la viabilidad
- 65 celular. Para este fin, las células se incubaron con el reactivo WST-1 según la recomendación del fabricante (Promega). A continuación, se definió el valor de corte para cada placa como la media - 3 desviaciones estándar de las densidades ópticas (D.O) de los pocillos que contenían células no infectadas. Los pocillos que muestran la D.O

por debajo de este valor de corte se puntuaron como positivos para ECP. La concentración vírica se calculó de acuerdo con la fórmula de Reed y Muench.

Ensayo de neutralización

Se sembraron en placas de ensayo de 96 pocillos células Hela-H1 (5.000 células/pocillo) y se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 % durante la noche. 100 TCID₅₀ de HRV (del serotipo relevante, dependiendo de si se estaba ensayando la neutralización o la neutralización cruzada) se pusieron en presencia de diluciones seriadas (diluciones con factor de dilución de 2 que comienzan en la dilución = 1/2) de suero de conejo a 37 °C durante 2 h. A continuación, la mezcla se recubrió sobre las monocapas celulares y las placas se incubaron más a 37 °C durante 3 a 5 días hasta que se produjo la lisis completa de las monocapas celulares control. A continuación, la viabilidad celular se midió usando el reactivo WST-1 según la recomendación del fabricante (Promega). A continuación, la D.O se convirtió en un porcentaje del efecto citopático y el recíproco de la dilución dando una reducción del 50 % del efecto citopático (ECP) en relación con las células control. A continuación, ECP se extrapola usando regresión no lineal con el programa informático GraphpadPrism.

Resultados

1. Inmunogenicidad de los péptidos - respuesta específica a péptido

La respuesta específica a péptido en conejos que recibieron péptidos conjugados con KLH o HB-S se midieron 14 días después de la 4ª inmunización usando el ELISA basado en péptido descrito en el presente documento. Los resultados eran los siguientes y se muestran en las Figuras 2 y 3.

No se detectó respuesta en el grupo de control con NaCl.

Conjugados VP1- KLH (Figura 2)

Se detectaron altos niveles de anticuerpos específicos a péptido de VP1 en conejos que recibieron

- HRV14 VP1 147-162,
- HRV14 VP1 1-30 y
- HRV14 VP1 32-45

Se obtuvieron bajos niveles de anticuerpos por

- HRV8, HRV25 o péptidos HRV_C_026 VP1 32-45

aunque incrementando los títulos del anticuerpo afectados positivamente por la dosis del antígeno.

Conjugados VP4- KLH (Figura 3)

En términos generales, los péptidos relacionados con VP4 indujeron niveles inferiores de anticuerpos que los péptidos de VP1. No obstante, se midieron altos títulos de anticuerpos específicos a péptido de VP4 en conejos que recibieron

- HRV14 VP4 39-68 o
- HRV14, HRV100 y HRVC VP41-16.

A diferencia del artículo publicado por Katpally et al. (2009), el HRV14 VP4 1-31 era escasamente inmunogénico. No obstante, esto posiblemente se explicaba por la agregación y la escasa solubilidad de este péptido observado tras la conjugación con KLH.

Construcciones quiméricas VP4 - HbsAg (Figura 3)

La inserción de HRV14 VP4 1-31 en el bucle A, pero no en el extremo N de HBsAg indujo altos niveles de anticuerpos específicos a péptidos en 2 de cada 3 conejos. Los resultados se muestran en la Figura 3.

2. Inmunogenicidad de proteínas completas - respuesta específica a proteína

La inmunogenicidad de las proteínas completas en forma de concatámeros se midieron 14 días después de la 4ª inmunización por ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 4.

- No se detectó respuesta en el grupo con NaCl
- Se detectaron altos niveles de anticuerpos dirigidos a VP4 en conejos que recibieron los concatámeros de clado B o proteínas VP4 de HRV14.

3. Comparación de los títulos de anticuerpo neutralizante obtenidos por péptidos y proteínas completas

Los niveles de los anticuerpos neutralizantes obtenidos por proteínas y péptidos relacionados con VP1NP4 se midieron 14 días después de la 4ª vacunación usando un panel de cepas de HRV (es decir, HRV2, 8, 10, 14, 3 9 y 61). Los resultados se muestran en la Figura 5 y la Figura 6.

- No se detectaron anticuerpos neutralizantes en el grupo de control con NaCl
- Se detectaron anticuerpos de neutralización cruzada y/o específicos en todos los grupos que recibieron péptidos relacionados con VP1. De manera importante, el péptido HRV14 VP1 32-45 indujo la reactividad cruzada más amplia puesto que este péptido particular era capaz de neutralizar todas las cepas ensayadas.
- Se detectaron niveles significativos de anticuerpos de neutralización cruzada y específicos en conejos inmunizados con péptidos HRV14 VP4 39-68, VP4 1-16 and HRV100 VP4 1-16 mientras se observaba respuesta incoherente en otros grupos vacunados con péptidos conjugados con KLH o proteínas completas. Particularmente, el péptido HRV100 VP4 1-16 indujo la reactividad cruzada más amplia puesto que este péptido particular era capaz de neutralizar todas las 6 cepas ensayadas. Por tanto, en VP4 1-16, se identificó que un péptido más corto que VP4 1-31 está más conservado y es capaz de inducir una actividad de neutralización cruzada más amplia.

4. Las proteínas VP4 completas provocan bajos niveles de anticuerpos específicos para las regiones 1-16.

Los datos recogidos en los ensayos de neutralización sugirieron que un epítipo neutralizante se encuentra dentro de las regiones 1-16 de VP4 y que la inmunización con secuencias peptídicas mayores (1-31) o proteína VP4 completa podría dirigir mal la respuesta inmunitaria contra epítopos no neutralizantes. Un mecanismo similar, que contribuye a la evasión inmunitaria de HRV, se describió para la proteína VP1 (Niespodziana et al. 2012). De hecho, la parte principal de los anticuerpos se dirigía contra la región 1-30 de VP1 después de la inmunización con la proteína VP1 completa, y es bien sabido que esta región provoca pocos anticuerpos de neutralización (cruzada) (Niespodziana et al. 2012) (y como se observa en estos experimentos). Por lo tanto, se revisó si la proteína completa provocaba anticuerpos dirigidos a la región 1-16 de VP4. En los sueros de conejo se ensayó la presencia de anticuerpos específicos a VP4 1-16 por ELISA y (en función del grupo vacunado con HRV14 VP4 1-16) se calcularon los títulos. Se detectaron niveles muy bajos de anticuerpos de VP4 1-16 en conejos que recibieron VP4 1-31 en el bucle de HBsAg o la proteína completa VP4. Los resultados se muestran en la Figura 7. En términos generales, estos resultados sugieren que la inmunización con la proteína VP4 completa (o VP1) dirige mal la respuesta inmunitaria contra epítopos no neutralizantes.

Tabla 3. Títulos del anticuerpo anti-péptido HRV14 VP4 1-16 inducidos por el péptido HRV14 VP4 1-16, el péptido HRV14 VP4 1-31 y la proteína completa	
HRV14 VP4 1-16	17561,5
HRV14 VP4 1-31 in HBS (bucle A)	2163
5x HRV14 de longitud completa	427
NaCl	<25

5. Proteínas VP4 completas

Conejos: Inmunogenicidad de proteínas VP4 de clado A y C completas y proteína VP1 de HRV14

En un experimento adicional, se realizaron ensayos ELISA y de neutralización 14 días después de IV. Como se muestra en la Tabla 4 a continuación, se indujeron altos niveles de anti-VP4 IgG de reactividad cruzada por concatámeros de proteínas VP4, y a un menor alcance, por la construcción quimérica VP4-HBs. No obstante, incluso si se observaba alguna neutralización de la cepa HRV14, ninguna de estas construcciones era capaz de inducir anticuerpos que neutralizasen HRV39. Estos datos confirman resultados previos que sugieren que las proteínas VP4 de HRV completas provocan altos niveles de anticuerpos no neutralizantes. De manera similar, la proteína VP1 de HRV14 era altamente inmunogénica, pero fallaba en la obtención de anticuerpos funcionales.

Tabla 4

		VP4 completa clado A	VP4 completa clado B	VP4 completa HRV14	VP1 completa HRV14	HRV14 neutro	HRV39 neutro
	n.º de conejo	PIV	PIV	PIV	PIV		
Concatámero de VP4 completa clado A	TA 114	716093	171617	133378		15,17	<2
	TA 115	474532	106675	22081		11,48	<2
	TA 116	755820	64151	157835		<2	<2
Concatámero de VP4	TA 117	414859	992334	42522		15,94	<2
	TA 118	466868	889650	63881		20,78	<2

completa clado C	TA 119	97803	541508	32296		<2	<2
VP4 completa HRV14 (HBs)	TA 123	317	2217	69266		2,542	<2
	TA 124	35022	41333	101670		3,615	<2
	TA 125	148	2596	18933		<2	<2
VP1 de HRV14	TA 120				365792	11,5	<2
	TA 121				597110	<2	<2
	TA 122				174395	2,542	<2

Conclusiones

Este estudio demuestra que HRV14 VP1 32-45 y HRV100 VP4 1-16 son inmunogénicos y provocan ampliamente anticuerpos de reactividad cruzada. En cambio, las proteínas VP4 completas inducían altos niveles de anticuerpos que no demostraban ser funcionales. Los datos sugieren que la inmunización con proteínas VP4 completas dirige mal la respuesta inmunitaria contra epítomos no neutralizantes. Esto se confirmaba por el hecho de que las proteínas VP4 completas no inducían anticuerpos dirigidos a la región 1-16 de VP4. Dicho mecanismo se demostró también para la proteína HRV14 VP1 y además soporta la necesidad de una vacunación de péptido para dirigir la respuesta inmunitaria a los anticuerpos de neutralización cruzada, bien conservados.

Ejemplo 2 - Construcción de la cepa de *Pichia pastoris* que expresa partículas mezcladas VP4-S,S

Introducción

Se generó una construcción que codificaba el péptido 1-31 de VP4 (serotipo HRV14) genéticamente fusionado en el extremo N del antígeno S del virus de la hepatitis B (HBsAg). La proteína de fusión (VP4-S) se coexpresó, en la levadura *Pichia pastoris*, con un fragmento de HBsAg tipo silvestre de 230 aa (S). La cepa resultante sintetiza dos polipéptidos, S y la proteína de fusión VP4-S, que espontáneamente se coensamblan en partículas de lipoproteína mezcladas (VP4-S,S).

La cepa de *Pichia pastoris*, usada para la producción de estas partículas lleva casetes de expresión separados para cada proteína. Estos casetes se integraron de manera estable en el genoma de *Pichia* usando vectores de integración lineal.

Construcción del plásmido recombinante VP4péptido-pMK

Se generó un fragmento de ADN sintético para el péptido de VP4 (31 aa) por Geneart. El fragmento se clonó en el vector pMK usando los sitios de clonación *PacI* y *Ascl* (plásmido propiedad de Geneart). La secuencia de nucleótidos (optimizada por codón para la expresión de *Pichia*) y la correspondiente secuencia de aminoácidos se ilustran en la Figura 16-A. El mapa del plásmido VP4péptido-pMK se ilustra en la Figura 16-B.

Construcción del vector de integración PHIL-D2mod/VP4-S

El fragmento de ADN sintético de VP4 se amplificó por PCR usando el plásmido VP4péptido-pMK como patrón y los siguientes pares de cebadores:

VP4-Fw: CTCACTATAGGGCGAATTGAAGGAAGG

VP4-Rv: TTTGAATAGTATCCCGGGGTAGTTGATAAC

El producto de la PCR se restringió con *NcoI* y *SmaI*, se purificó en gel y se clonó en el vector PHIL-D2mod, el cual ya lleva el gen S del virus de la hepatitis B

(vector de fusión PHIL-D2mod/S). El plásmido recombinante resultante lleva el gen de fusión VP4-S y se denominó vector PHIL-D2mod/VP4-S. El gen de fusión VP4-S y la correspondiente secuencia de aminoácidos se detallan en la Figura 17.

El mapa del vector PHIL-D2mod/VP4-S se ilustra en la Figura 20. En este vector de expresión, el gen recombinante está bajo el control del fuerte promotor AOX1 inducible por metanol firmemente regulado.

El vector de la cadena principal de PHIL-D2-mod es un derivado del vector PHIL-D2 comercial (Invitrogen). El vector comercial PHIL-D2 se modificó de manera que la expresión de una proteína heteróloga comienza en el codón de inicio ATG nativo del gen AOX1 de *Pichia* y producirá potencialmente una proteína recombinante con una etiqueta de histina C-terminal. El vector PHIL-D2-mod se ilustra en la Figura 19.

Construcción del vector de integración PHIL-D2mod/S

El vector PHIL-D2mod/ S se ha diseñado para permitir la producción de solo el antígeno S (sin ningún compañero de fusión).

Se generó un fragmento de ADN sintético codificante del antígeno S (227 aa) por Geneart. El gen sintético se optimizó por codón para la expresión en *Pichia pastoris* (denominado gen Sco). El fragmento de ADN sintético se clonó en el vector PHIL-D2mod entre los sitios *NcoI* y *EcoRI*. El plásmido recombinante que contenía el gen Sco se denominó PHIL-D2mod/S. El mapa del vector PHIL-D2mod/S se ilustra en la Figura 21. En este vector de expresión, el gen recombinante está bajo el control del fuerte promotor AOX1 inducible por metanol firmemente regulado.

Generación de la cepa de *P. pastoris* que coexpresa las proteínas VP4-S y S

Los vectores de expresión PHIL-D2mod/VP4-S y PHIL-D2mod/S se usaron para transformar

la cepa de *Pichia pastoris* GS115 (*his4*). Antes de la transformación, se digirieron los vectores con la enzima *NotI* con el fin de liberar un fragmento de ADN que contenga el casete de expresión (VP4-S o S) más el gen de HIS4 (para complementar *his4* en el genoma hospedador).

Puesto que ambos extremos del fragmento integrador del ADN de *NotI* son homólogos a la región de AOX1 del genoma de *Pichia*, puede integrarse en el locus de AOX1 por recombinación homóloga. Se obtuvieron un total de 100 transformantes His⁺ y se seleccionaron los clones integrantes "multicopia" por análisis de transferencia de mancha ("dot blot") de ADN semicuantitativo. Algunos candidatos de "alta-copia" se seleccionaron, se indujeron por metanol y se analizó su producción proteica recombinante mediante gel teñido con Coomassie y transferencia Western. El clon transformante final n.º 49 se seleccionó para más análisis.

Evaluación de la formación de partícula

Con el fin de determinar si las proteínas VP4-S y S producidas en el clon recombinante n.º 49 de *Pichia* se ensamblan en estructuras particuladas, se preparó extracto soluble (después de la inducción por metanol) y se analizó por centrifugación por gradiente de densidad de CsCl. El extracto soluble (15 mg de proteína total) se cargó en 10 ml de gradiente de CsCl 1,5 M (72 horas a 40.000 rpm, +8 °C en un rotor Beckman 50 Ti). Se recogieron fracciones (0,5 ml) y se corrieron en SDS-PAGE 12 %, se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y se analizaron usando un anticuerpo monoclonal anti-S (panel A). Como se muestra en la Figura 22 los picos de la transferencia Western que correspondía a la proteína de fusión VP4-S aparecen en la misma fracción del gradiente correspondiente a una densidad de flotación (ρ) de $\rho = 1,20$ lo que sugiere que las partículas mezclas, que contienen tanto monómeros de VP4-S como de S, se forman en esta cepa.

La densidad de flotación (ρ) de la fracción pico se calculó a partir de una medición de su índice de refracción (Panel A).

Panel B: se analizaron dos fracciones pico mediante tinción con plata (izquierda) y tinción con Coomassie (derecha).

Purificación de partículas mezcladas VP4-S,S

El siguiente método se usó para partículas mezcladas VP4-S,S de la fracción soluble del clon recombinante de n.º 49 de *Pichia*.

El método de purificación comprende las siguientes etapas:

- homogeneización de pasta celular (prensa French)
- aclaración por centrifugación
- 2 gradientes de CsCl 1,5 M sucesivos
- 1 etapa de filtración en gel (HR300)
- Concentración (Amicon)
- Esterilización por filtración (0,22 μ m)

Como ejemplo, la masa purificada de BMP201 se ilustra en la Figura 23.

Análisis EM

El análisis por microscopía electrónica se realizó en la masa purificada de BMP201.

Las partículas se visualizaron después de la tinción negativa con ácido fosfotúngstico. La escala es equivalente a 100 nm (Figura 24). Pueden identificarse claramente muchas partículas (20-40 nm).

LISTA DE REFERENCIAS

- Arnold E, Rossmann MG (1990). Analysis of the structure of a common cold virus, human rhinovirus 14, refined at a resolution of 3.0 Å. *J. Mol. Biol.* 211(4):763-801.
- 5 Bartlett NW et al. (2008) Mouse models of rhinovirus-induced disease and exacerbation of allergic airway inflammation. *Nat. Med.*;14(2): 199-204. 10.1038/nm1713. Epub 3 de febrero de 2008.
- Chen et al. (2000). *Mol. Cell* 5, 557-567.
- Cheng-Yu Chung et al. (2010). *Vaccine* 28 (2010) 6951-6957.
- 10 Edlmayr et al. (2011). Antibodies induced with recombinant VP1 from human rhinovirus exhibit cross-neutralisation. *Eur. Respir. J.* 37:44-52.
- Katpally U, Fu TM, Freed DC, Casimiro DR, Smith TJ (2009). Antibodies to the buried N terminus of rhinovirus VP4 exhibit cross-serotypic neutralization. *J. Virol.* 83(14): 7040-8.
- Leenaars PP, Hendriksen CF, Angulo AF, Koedam MA, Claassen E. (1994) Evaluation of several adjuvants as alternatives to the use of Freund's adjuvant in rabbits. *Vet Immunol Immunopathol.* Mar;40(3):225-41.
- 15 Lewis JK, Bothner B, Smith TJ, Siuzdak G (1998). Antiviral agent blocks breathing of the common cold virus. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 95(12):6774-8.
- Lewis-Rogers N, Bendall ML, Crandall KA (2009). Phylogenetic Relationships and Molecular Adaptation Dynamics of Human Rhinoviruses. *Mol. Biol. Evol.* 26(5):969-981.
- Miao LY et al. (2009). Monoclonal Antibodies to VP1 Recognize a Broad Range of Enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* vol. 47, n.º 10, 3108, 3113.
- 20 McCray J, Werner G (1987). Different rhinovirus serotypes neutralized by antipeptide antibodies. *Nature.* 22-28 de octubre;329(6141):736-8.
- Niespodziana K et al. (2012). Misdirected antibody responses against an N-terminal epitope on human rhinovirus VP1 as explanation for recurrent RV infections. *The FASEB Journal.* vol 26, 1001-1008.
- 25 Palmenberg AC, Rathe JA, Liggett SB (2010). Analysis of the complete genome sequences of human rhinovirus. *J. Allergy Clin. Immunol.* vol. 125, n.º 6, 1190, 1199.
- Phillips T, Jenkinson L, McCrae C, Thong B, Unitt J. (2011). Development of a high-throughput human rhinovirus infectivity cell-based assay for identifying antiviral compounds. *J. Virol. Methods.* mayo; 173(2):182-8.
- Rollinger JM y Schmidtke M (2009). The Human Rhinovirus: Human-Pathological Impact, Mechanisms of Antirhinoviral Agents, and Strategies for Their Discovery. *Medicinal Research Reviews*, 31, N.º 1, 42-92.
- 30

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> GlaxoSmithKline Biologicals s.a.
- 35 <120> Vacuna
- <130> VB65368D1 EP
- 40 <160> 11
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 45 <211> 14
- <212> PRT
- <213> Rinovirus humano 14
- <400> 1
- 50
- | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Ile | Leu | Thr | Ala | Asn | Glu | Thr | Gly | Ala | Thr | Met | Pro | Val |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | |
- <210> 2
- <211> 14
- 55 <212> PRT
- <213> Rinovirus humano 8
- <400> 2
- 60
- | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Ala | Leu | Asp | Ala | Ala | Glu | Thr | Gly | His | Thr | Ser | Ser | Val |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | |
- <210> 3
- <211> 14
- <212> PRT

ES 2 924 914 T3

<213> Rinovirus humano 25

<400> 3

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

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

10 <213> Rinovirus humano C

<400> 4

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

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

20 <213> Rinovirus humano 14

<400> 5

	Gly	Ala	Gln	Val	Ser	Thr	Gln	Lys	Ser	Gly	Ser	His	Glu	Asn	Gln	Asn
25	1				5					10					15	

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Rinovirus humano 100

30 <400> 6

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

<210> 7

35 <211> 16

<212> PRT

<213> Rinovirus humano C

<400> 7

	Gly	Ala	Gln	Val	Ser	Arg	Gln	Ser	Val	Gly	Ser	His	Glu	Thr	Met	Ile
40	1				5					10					15	

<210> 8

<211> 16

45 <212> PRT

<213> Rinovirus humano 14

<400> 8

	Val	Val	Gln	Ala	Met	Tyr	Val	Pro	Pro	Gly	Ala	Pro	Asn	Pro	Lys	Glu
50	1				5					10					15	

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

55 <213> Rinovirus humano 14

<400> 9

ES 2 924 914 T3

Ser Ser Ala Gly Gln Ser Leu Ser Met Asp Pro Ser Lys Phe Thr Glu
1 5 10 15

Pro Val Lys Asp Leu Met Leu Lys Gly Ala Pro Ala Leu Asn
20 25 30

<210> 10

<211> 30

<212> PRT

<213> Rinovirus humano 14

<400> 10

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

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

<210> 11

<211> 31

<212> PRT

<213> Rinovirus humano 14

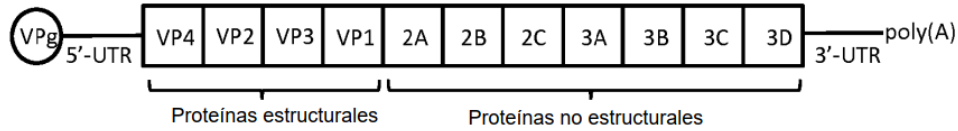
<400> 11

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de rinovirus humano acoplado a una proteína portadora, en donde dicho péptido de rinovirus humano consiste en no más de 40 aminoácidos de la región N terminal de HRV 14 VP1 e incluye la secuencia PLITANETGATMPV [SEQ ID NO:1].
5
2. El péptido de rinovirus humano acoplado a una proteína portadora de la reivindicación 1, en donde dicho péptido de rinovirus humano tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.
- 10 3. El péptido de rinovirus humano acoplado a una proteína portadora de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha proteína portadora es CRM197.
4. Una composición inmunogénica que comprende un péptido de rinovirus humano acoplado a una proteína portadora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
15
5. La composición inmunogénica de la reivindicación 4, que comprende además un adyuvante.
- 20 6. La composición inmunogénica de la reivindicación 5, en donde dicho adyuvante comprende QS21.
7. La composición inmunogénica de la reivindicación 6, en donde dicho adyuvante comprende 3D-MPL y QS21 en una formulación de liposoma.
- 25 8. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, para su uso en la prevención o el tratamiento de infecciones por rinovirus humano.
9. Un método para preparar una composición inmunogénica, comprendiendo el método combinar un péptido de rinovirus humano acoplado a una proteína portadora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
30
10. El método de la reivindicación 9, que comprende además combinar un adyuvante.
11. El método de la reivindicación 10, en donde dicho adyuvante comprende QS21.
- 35 12. El método de la reivindicación 11, en donde dicho adyuvante comprende 3D-MPL y QS21 en una formulación de liposoma.

Figura 1

Proteínas	Funciones
------------------	------------------

VPg	Proteína vírica pequeña.
VP1-VP4	Proteínas de la cápside.
2A	Proteasa, inhibición de la proteína hospedadora, estimulación de la iniciación de la síntesis de la hebra negativa.
2B	Permeabilidad de membrana, implicada en el inicio de la síntesis de ARN vírica, inhibición de la secreción proteica desde el sistema de Golgi.
2C	Formación de vesícula, dirigir los complejos de replicación a las membranas celulares, causar el desmontaje del sistema de Golgi, y el retículo endoplasmático, NTPasa.
2BC	Unión a ARN, formación de vesícula, permeabilidad de membrana (fusión 2B-2C).
3A	Inhibición del transporte intracelular.
3B	VPg, cebador proteico para la síntesis de ARN vírico.
3AB	Ancias de VPg en membranas para la etapa de cebado de la síntesis de ARN, interacción de la asociación de membrana 3D y 3CD de los complejos de replicación (fusión 3A-3B).
3C	Proteasa, inhibe la transcripción del hospedador.
3D	ARN polimerasa dependiente de ARN, uridilación de VPg.
3CD	Procesamiento de proteína vírica (fusión 3C-3D).

Figura 2

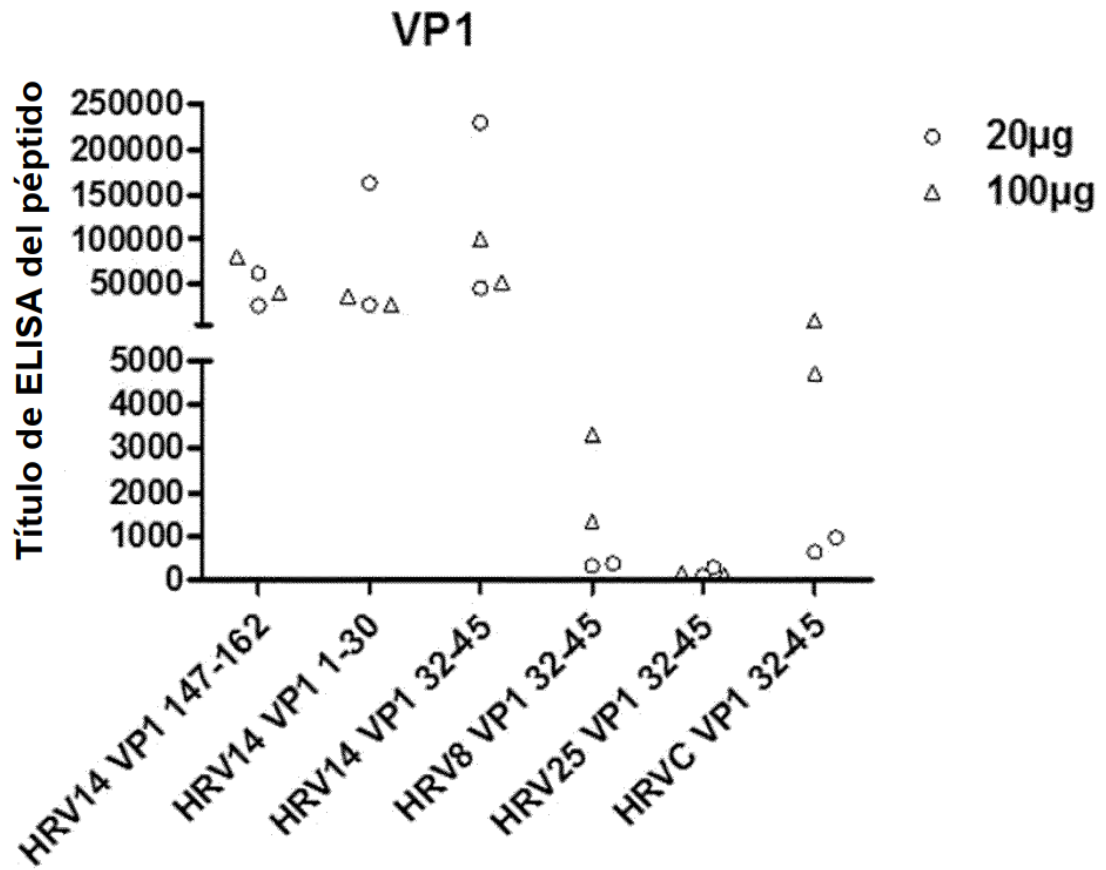


Figura 3

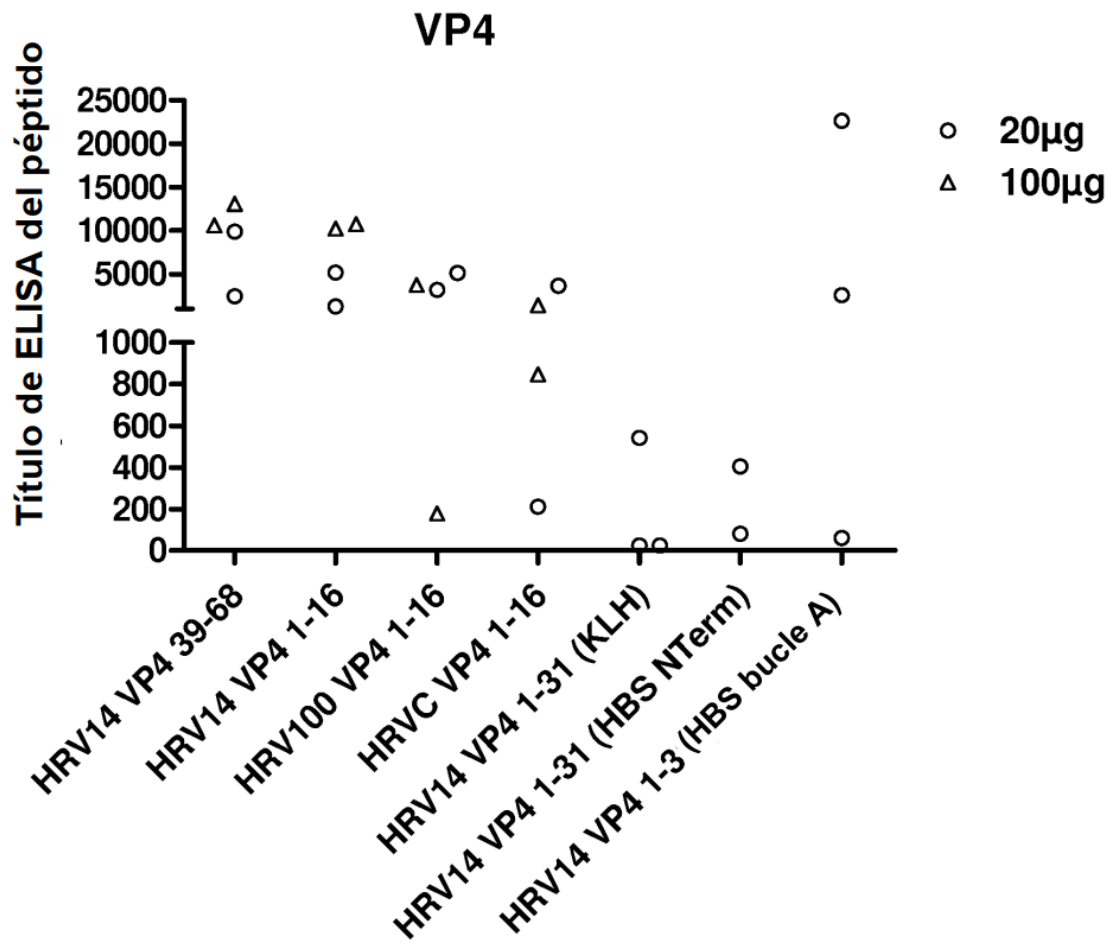


Figura 4

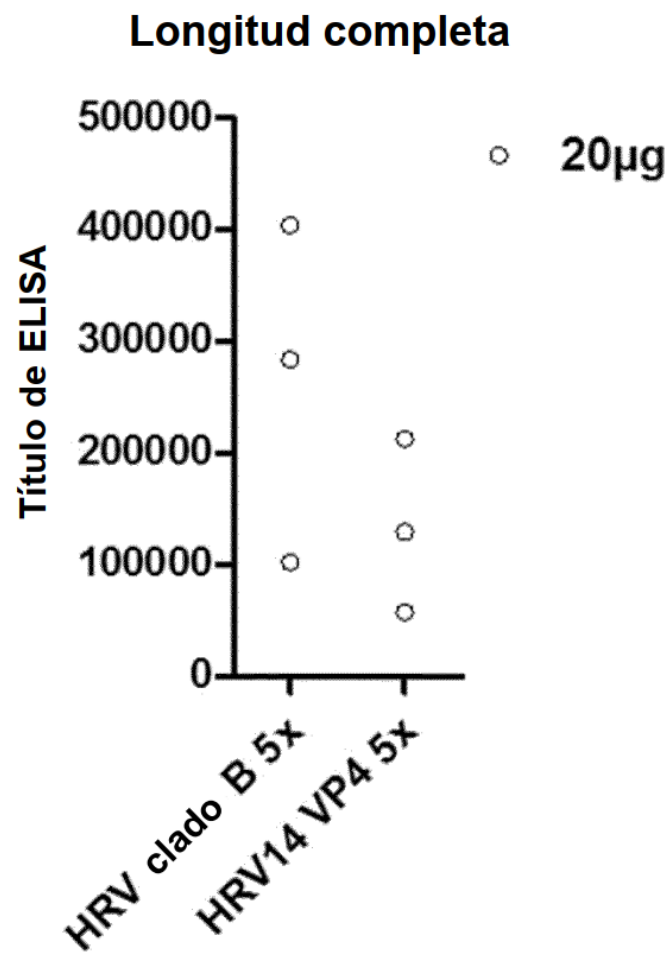
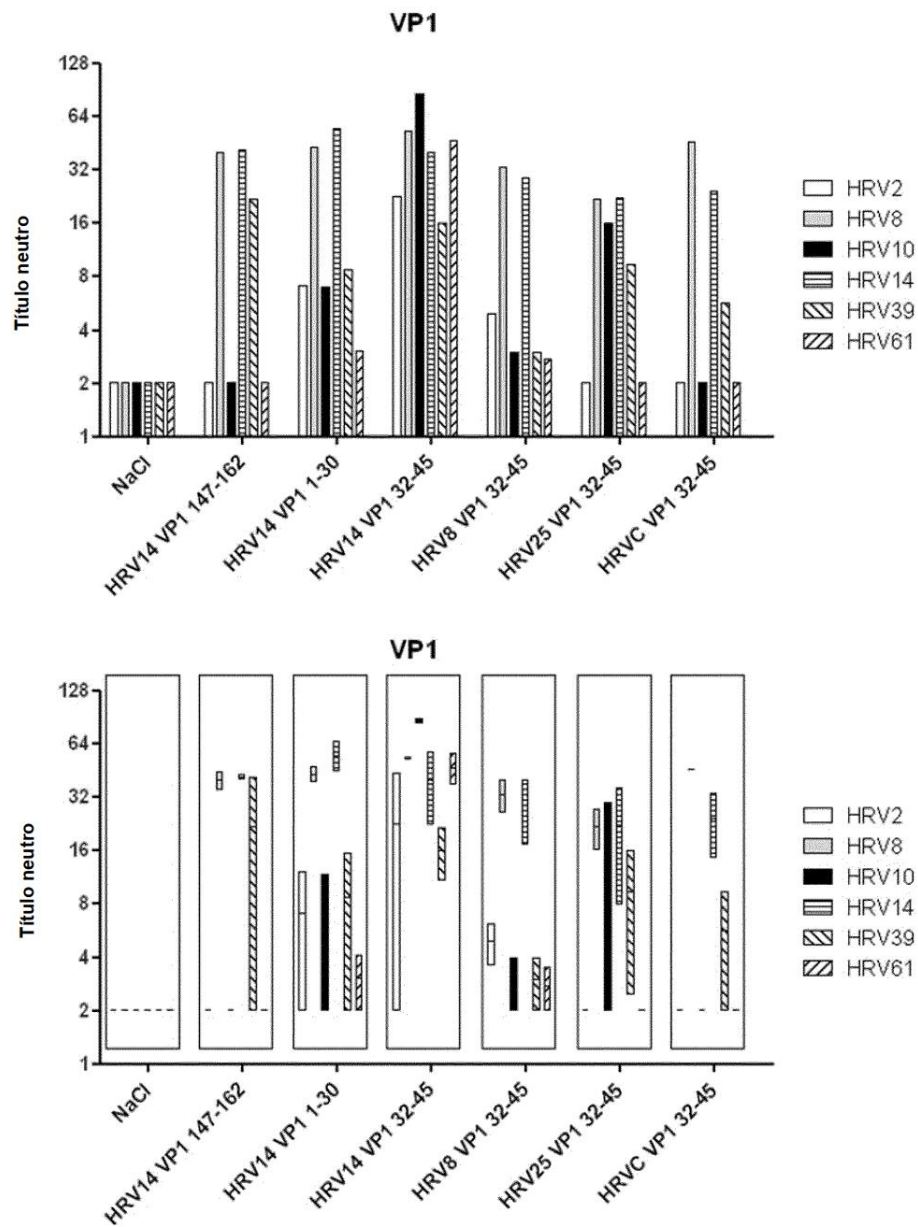
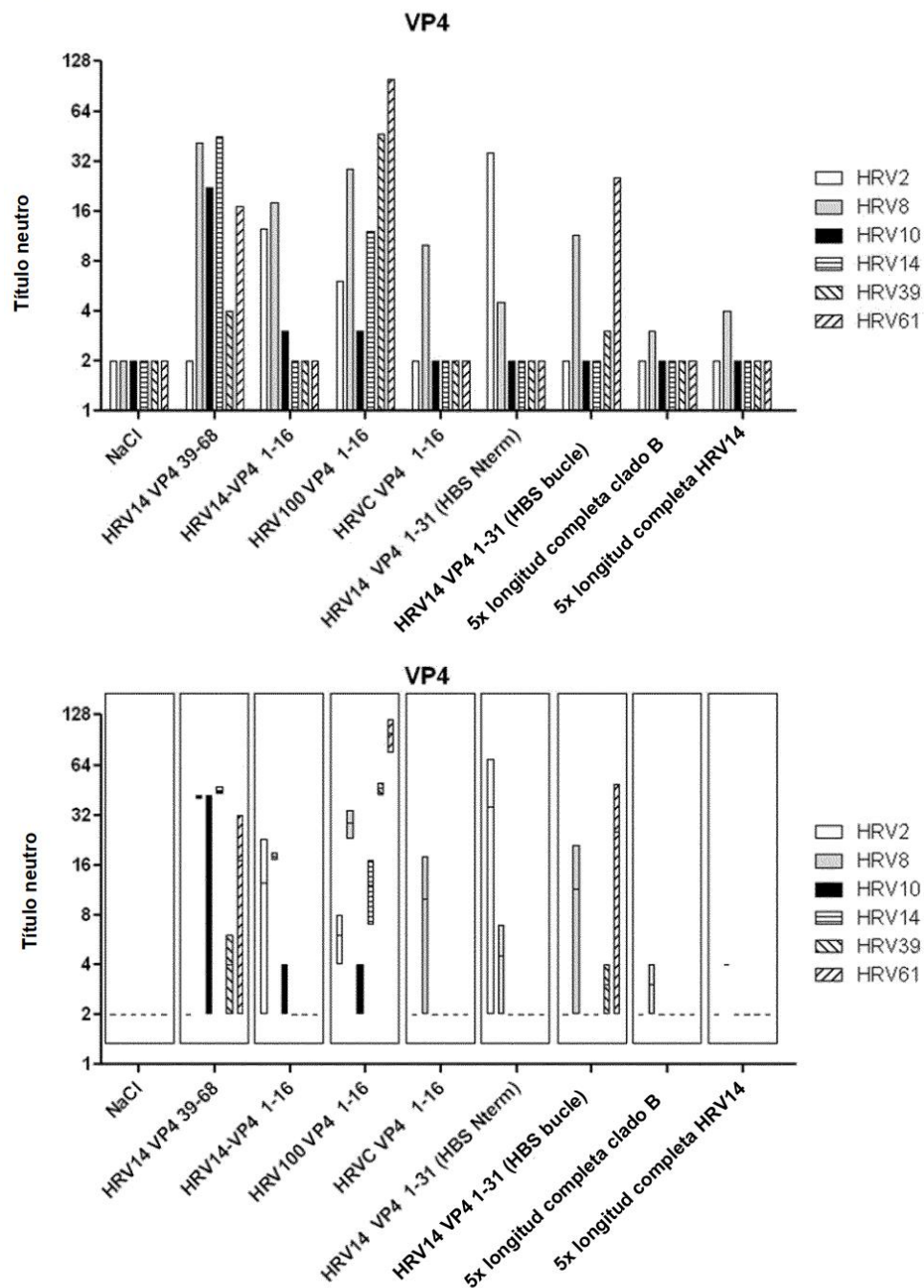


Figura 5



En las 2 versiones de la Figura 5 anterior, la primera muestra las barras clásicas (=media) y la segunda muestra las barras flotantes (min y máx= títulos de los 2 animales + media)

Figura 6



En las 2 versiones de la Figura 6 anterior, la primera muestra las barras clásicas (=media) y la segunda muestra las barras flotantes (min y máx= títulos de los 2 animales + media)

Figura 7

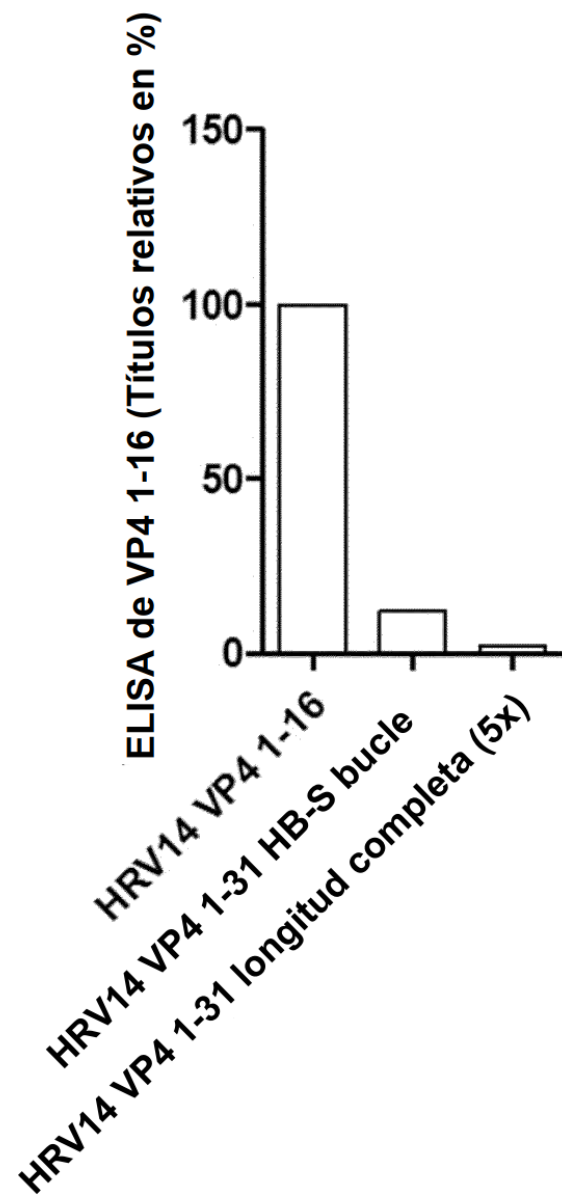


Figura 8 - alineamiento de los péptidos de HRV A VP1 que son similares por alineamiento al péptido 32-45 de HRV14

hrv1_A_B9V432	:	PILDAAETGHTSNV	:	14
hrv1b_A_P12916	:	PILDAAETGHTSNV	:	14
hrv2_A_P04936	:	PALDAAETGHTSSV	:	14
hrv7_A_A5GZF2	:	PALDAAETGHTSSV	:	14
hrv8_A_B9V434	:	PALDAAETGHTSSV	:	14
hrv9_A_B9V435	:	PALDAAETGHTSNV	:	14
hrv10_A_A5GZE7	:	PILDAAETGHTSSV	:	14
hrv11_A_A7KC06	:	PALDAAETGHTSKV	:	14
hrv12_A_A7KC07	:	PALDAAETGHTSQT	:	14
hrv13_A_B9V437	:	PALDAAETGHTSSV	:	14
hrv15_A_A5GZE2	:	PALDAAETGHTSSV	:	14
hrv16_A_Q82122	:	PVLDAAETGHTNKI	:	14
hrv18_A_B9V439	:	PALDAAETGHTSNV	:	14
hrv19_A_B9V440	:	PALDAAETGHTSNV	:	14
hrv20_A_B9V441	:	PALDAAETGHTNOV	:	14
hrv21_A_B9V442	:	PALDAAETGHTSNV	:	14
hrv22_A_B9V443	:	PALDAAETGHTSNV	:	14
hrv23_A_A5GZE6	:	PALDAAETGHTSNV	:	14
hrv24_A_A7KC08	:	PALDAAETGHTSSV	:	14
hrv25_A_B9V444	:	PILDAAETGHTSNV	:	14
hrv28_A_A5GZF7	:	PALDAAETGHTSQT	:	14
hrv29_A_B9V446	:	PILDAAETGHTSNV	:	14
hrv30_A_A5GZG1	:	PALDAAETGHTSNV	:	14
hrv31_A_B9V447	:	PILDAAETGHTSNV	:	14
hrv32_A_B9V448	:	PALDAAETGHTSNV	:	14
hrv33_A_B9V449	:	PALDAAETGHTNNV	:	14
hrv34_A_A5GZF0	:	PALDAAETGHTSSV	:	14
hrv36_A_A5GZF4	:	PALDAAETGHTSSV	:	14
hrv38_A_A5GZE4	:	PALDAAETGHTSNV	:	14
hrv39_A_Q5XLP5	:	TALDAAETGHTSSI	:	14
hrv40_A_B9V450	:	PALDAAETGHTSNI	:	14
hrv41_A_A5GZE0	:	PALDAAETGHTSNV	:	14
hrv43_A_B9V452	:	PALDAAETGHTSQV	:	14
hrv44_A_A5GZE8	:	PILDAAETGHTSNV	:	14
hrv45_A_B9V453	:	PALDAAETGHTSSV	:	14
hrv46_A_A5GZF5	:	PALDAAETGHTSQI	:	14
hrv47_A_B9V454	:	PILDAAETGHTSNV	:	14
hrv49_A_A5GZE5	:	PALDAAETGHTSNV	:	14
hrv50_A_B9V456	:	PALDAAETGHTSNV	:	14
hrv51_A_B9V457	:	PALDAAETGHTSQV	:	14
hrv53_A_A5GZF6	:	PALDAAETGHTSQT	:	14
hrv54_A_B9V459	:	PALDAAETGHTSGI	:	14
hrv55_A_A5GZG0	:	PVLDAAETGHTSNV	:	14
hrv56_A_B9V461	:	PALDAAETGHTSAI	:	14
hrv57_A_B9V462	:	PALDAAETGHTSNV	:	14
hrv58_A_B9V463	:	PALDAAETGHTSSV	:	14
hrv59_A_A5GZE9	:	PALDAAETGHTSSI	:	14
hrv60_A_B9V464	:	PALDAAETGHTSNV	:	14
hrv61_A_B9V465	:	PVLDAAETGHTSNV	:	14

ES 2 924 914 T3

hrv62_A_B9V466	:	PTLDAAETGHTSNV	:	14
hrv63_A_B9V467	:	PVLDAAETGHTSSI	:	14
hrv64_A_A7KC09	:	PALDAAETGHTSNV	:	14
hrv65_A_B9V468	:	PALDAAETGHTSQV	:	14
hrv66_A_B9V469	:	PILDAETGHTSKV	:	14
hrv67_A_B9V470	:	PALDAAETGHTSSV	:	14
hrv68_A_B9V471	:	PALDAAETGHTNQV	:	14
hrv71_A_B9V473	:	PALDAAETGHTNQV	:	14
hrv73_A_A5GZE1	:	PALDAAETGHTSGV	:	14
hrv74_A_A5GZE3	:	PALDAAETGHTSNV	:	14
hrv75_A_A5GZF9	:	PALDAAETGHTSHV	:	14
hrv76_A_A5GZF1	:	PALDAAETGHTSSV	:	14
hrv77_A_B9V475	:	PILDAETGHTSSV	:	14
hrv78_A_A7KC10	:	PVLDAAETGHTNQV	:	14
hrv80_A_B9V477	:	PTLDAAETGHTSQV	:	14
hrv81_A_B9V478	:	PVLDAAETGHTSNI	:	14
hrv82_A_B9V481	:	PALDAAETGHTSTV	:	14
hrv85_A_B9V484	:	PALDAAETGHTSSI	:	14
hrv88_A_A5GZF3	:	PALDAAETGHTSSV	:	14
hrv89_A_B9V486	:	PALDAAETGHTSSV	:	14
hrv90_A_B9V488	:	PALDAAETGHTSDV	:	14
hrv94_A_A7KC11	:	PALDAAETGHTSNV	:	14
hrv95_A_B9V491	:	PALDAAETGHTSSV	:	14
hrv96_A_B9V492	:	PVLDAAETGHTSNV	:	14
hrv98_A_B9V494	:	PTLDAAETGHTSGI	:	14
hrv100_A_B9V496	:	PILDAETGHTSNV	:	14
hrv_A_A101	:	PVLDAAETGHTSQT	:	14
hrv_A_AMS323	:	PALDAAETGHTNQV	:	14
hrv_A_CU107	:	PALDAAETGHTSQT	:	14
hrv_A_CU150	:	PVLDAAETGHTSNI	:	14
hrv_A_N13	:	PILDAETGHTSNV	:	14
hrvA_A_A101v1	:	PALDAAETGHTNQT	:	14
hrvA_A_A5GZF8	:	PALDAAETGHTSTV	:	14

Figura 9 - alineamiento de los péptidos de HRV B VP1 que son similares por alineamiento al péptido 32-45 de HRV14



Figura 10 - alineamiento de los péptidos de HRV C VP1 que son similares por alineamiento al péptido 32-45 de HRV14

*

hrv_C_C15	:	SILG A MEIGASSNA	:	14
hrv_C_024	:	SALG A MEIGASSTT	:	14
hrv_C_025	:	TAL S A M EIGASSDV	:	14
hrv_C_026	:	QAL G A V EIGATADV	:	14
hrv_C_CL170085	:	TAL S A M EIGASSDV	:	14
hrv_C_CU072	:	TALG A MEIGASSDA	:	14
hrv_C_CU184	:	QTL G A L EIGATAEI	:	14
hrv_C_N10	:	SAL N A M EVGVTPDV	:	14
hrv_C_N4	:	SALG A MEIGASSSV	:	14
hrv_C_NAT001	:	QTL G A L EIGATAEI	:	14
hrv_C_NAT045	:	TVL N A M EVGVTPDA	:	14
hrv_C_NY074	:	QAL G A L EIGATADV	:	14
hrv_C_QCE	:	QAL G A L EIGATADL	:	14
hrv_C_QPM	:	QAL G A V EIGATADV	:	14

Figura 11 - alineamiento de los péptidos de HRV A VP4 que son similares por alineamiento al péptido 1-16 de HRV14

hrv1_A_B9V432	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv1b_A_P12916	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv2_A_P04936	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv7_A_A5GZF2	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv8_A_B9V434	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv9_A_B9V435	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv10_A_A5GZE7	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv11_A_A7KC06	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv12_A_A7KC07	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv13_A_B9V437	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv15_A_A5GZE2	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv16_A_Q82122	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv18_A_B9V439	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv19_A_B9V440	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv20_A_B9V441	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv21_A_B9V442	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv22_A_B9V443	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv23_A_A5GZE6	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv24_A_A7KC08	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv25_A_B9V444	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv28_A_A5GZF7	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv29_A_B9V446	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv30_A_A5GZG1	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv31_A_B9V447	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv32_A_B9V448	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv33_A_B9V449	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv34_A_A5GZF0	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv36_A_A5GZF4	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv38_A_A5GZE4	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv39_A_Q5XLP5	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv40_A_B9V450	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv41_A_A5GZE0	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv43_A_B9V452	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv44_A_A5GZE8	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv45_A_B9V453	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv46_A_A5GZF5	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv47_A_B9V454	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv49_A_A5GZE5	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv50_A_B9V456	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv51_A_B9V457	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv53_A_A5GZF6	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv54_A_B9V459	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv55_A_A5GZG0	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv56_A_B9V461	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv57_A_B9V462	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv58_A_B9V463	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv59_A_A5GZE9	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv60_A_B9V464	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv61_A_B9V465	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv62_A_B9V466	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv63_A_B9V467	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv64_A_A7KC09	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv65_A_B9V468	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16
hrv66_A_B9V469	:	GAQVSRQNVGTHSTON	:	16

ES 2 924 914 T3

hrv67_A_B9V470	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv68_A_B9V471	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv71_A_B9V473	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv73_A_A5GZE1	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv74_A_A5GZE3	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv75_A_A5GZF9	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv76_A_A5GZF1	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv77_A_B9V475	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv78_A_A7KC10	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv80_A_B9V477	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv81_A_B9V478	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv82_A_B9V481	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv85_A_B9V484	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv88_A_A5GZF3	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv89_A_B9V486	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv90_A_B9V488	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv94_A_A7KC11	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv95_A_B9V491	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv96_A_B9V492	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv98_A_B9V494	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv100_A_B9V496	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv_A_A101	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv_A_AMS323	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrv_A_CU107	:	GAQVSRQNVGTHLTHN	:	16
hrv_A_CU150	:	GAQVPRQKVGTHSTQN	:	16
hrv_A_N13	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrvA_A_A101v1	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16
hrvA_A_A5GZF8	:	GAQVSRQNVGTHSTQN	:	16

Figura 12 - alineamiento de los péptidos de HRV B VP4 que son similares por alineamiento al péptido 1-16 de HRV14

hrv3_B_A5GZD4	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv4_B_A5GZD9	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv5_B_B9V433	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv6_B_A5GZD5	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv14_B_P03303	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv17_B_A7KC12	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv26_B_B9V445	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv27_B_A7KC13	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv35_B_A5GZD6	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv37_B_A7KC15	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv42_B_B9V451	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv48_B_A5GZD7	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv52_B_A7KC16	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv69_B_B9V472	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv70_B_A5GZD8	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv72_B_B9V474	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv79_B_B9V476	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv83_B_B9V482	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv84_B_B9V483	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv86_B_B9V485	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv91_B_B9V489	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv92_B_B9V490	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv93_B_A7KC17	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv97_B_B9V493	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv99_B_B9V495	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv_B_CU003	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16
hrv_B_CU211	:	GAQVSTQKSGSHENQN	:	16

Figura 13 - alineamiento de los péptidos de HRV C VP4 que son similares por alineamiento al péptido 1-16 de HRV14

hrv_C_C15	:	GAQVSRQNNNGTHENG	:	16
hrv_C_024	:	GAQVSKQNVGSHENSV	:	16
hrv_C_025	:	GAQVSKQNVGSHESGI	:	16
hrv_C_026	:	GAQVSRQSVGSSETMI	:	16
hrv_C_CL170085	:	GAQVSKQNVGSHESGI	:	16
hrv_C_CU072	:	GAQVSKQNVGSHENTV	:	16
hrv_C_CU184	:	GAQVSRQSVGSSETMI	:	16
hrv_C_N10	:	GAQVSRQKVGSHDNAT	:	16
hrv_C_N4	:	GAQVSKQNTGSHESAI	:	16
hrv_C_NAT001	:	GAQVSRQSVGSSETMI	:	16
hrv_C_NAT045	:	GAQVSKQNVGSHENSV	:	16
hrv_C_NY074	:	GAQVSKQSVGAHETMV	:	16
hrv_C_QCE	:	GAQVSRQSVGSSETMI	:	16
hrv_C_QPM	:	GAQVSRQSVGSSETMI	:	16

Figura 14 - Alineamiento de los residuos N-terminales de las proteínas VP1 de picornavirus seleccionados. Los péptidos similares al HRV14 32-45 están marcados en el recuadro

	20	40	60	80	100	120
POLY_HRV14_B	LGDELEEVIVKTK	QIVASISSE	KHTQKV	ITAE	CAIMPT	SSBIERTYTHFNGS
POLY_HRV100_A	PVENVYEVGIN	EVLYPNRISH	STNSA	IDAE	CHSNP	EDVERVYOTQSOTD
POLY_HRV25_A	PIEYQVAVIN	EVLYPNKESH	STNSA	IDAE	CHSNP	EDVERVYOTQSOTD
POLY_HRV26_A	PIEYQVAVIN	EVLYPNKESH	STNSA	IDAE	CHSNP	EDVERVYOTQSOTD
POLY_HRV_C_026	PVEVEVHTLK	EVLYP	CAS	VHTK	PLAC	AD
POLY_COX16-G10	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ENTERO71	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ENTERO68	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ENTERO70	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_POL1M	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_POL12L	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_POL13-23sp1P	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_COX24-BH24	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO12	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO3	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_COX39-Grig	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO11	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO19	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO7	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO32	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_COXB1-Japan	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_COXB3-Nan	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_COXB5-Peter	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_COXB6-Schmi	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_COXB2-01	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_COXB4-F2	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO13	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ENTERO69	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO21	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO30	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO25	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO29	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO6	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO20	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO24	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO4	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO16	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO31	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO14	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO15	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO2	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO18	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO17	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO27	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO26	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE
POLY_ECHO1-Bry	---DGLADMDQAVTSVGRALTSIQEVP	TAAN	SHRUGITGV	AL	CAS	NADENLIE

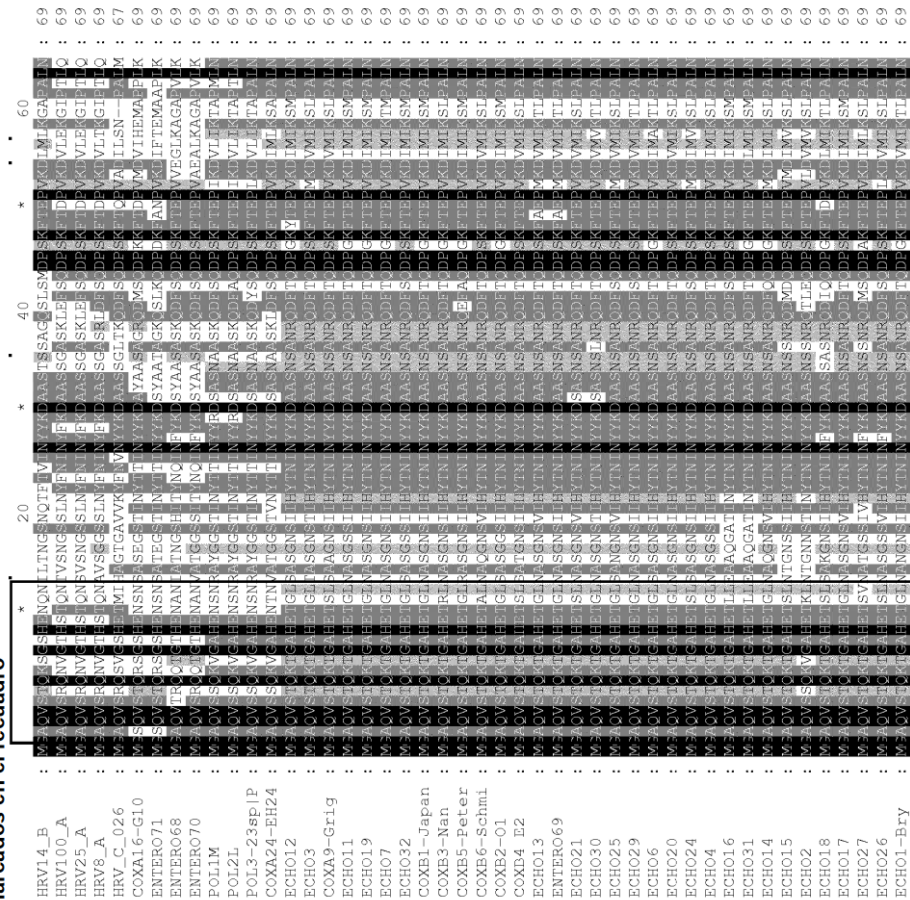


Figura 16:
A - mapa del ADN sintético de VP4 y del plásmido VP4péptido-pMK

Nombre del gen	VP4_péptido
optimizado para	<i>Pichia pastoris</i>

```

                                BssHII
                                AvrII
                                StuI  AscI   NcoI
CTCACTATAGGGCGAATTGAAGGAAGGCCGTCAGGCCTAGGCGGCCACCATGGTTGGT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGTGATATCCCGCTTAACCTTCCTTCCGGCAGTTCGGATCCGCGCGGTGGTACCAACCA
                                M  V  G

GCTCAAGTTTCCACTCAAAAGTCTGGTTCCACGAGAACGAGAACATCTTGACTAACGGT
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGAGTTCAAAGGTGAGTTTTCAGACCAAGGGTGCTCTTGGTCTTGTAGAACTGATTGCCA
A  Q  V  S  T  Q  K  S  G  S  H  E  N  Q  N  I  L  T  N  G

                                BspHI  PacI
TCCAACCAGACTTTCACCTGTTATCAACTACCTCATGAATTAATTAACTGGGCTCATGGGC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGGTGGTCTGAAAGTGACAATAGTTGATGGAGTACTTAATTAATTGACCGGAGTACCCG
S  N  Q  T  P  T  V  I  N  Y  L  M

CTTCCTTTCACCTGCCCGCTTTCAGT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAAGGAAAGTGACCGGCGAAAGGTCA

```

Figura 16:
B - mapa del plásmido VP4péptido-pMK

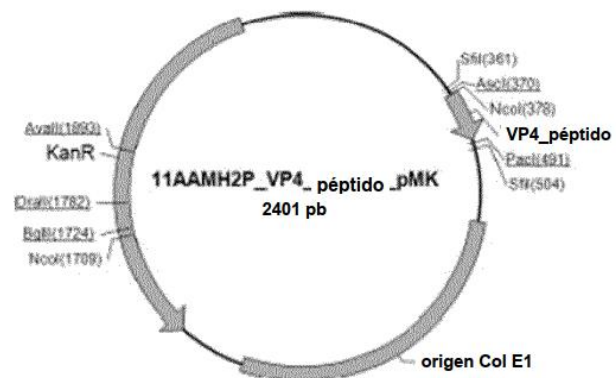


Figura 17: secuencias de fusión VP4-S**1. Secuencia de nucleótidos**

gen fusión VP4-S : 792 pb

```

1  ATGGTTGGTG CTCAAGTTTC CACTCAAAAG TCTGGTTCCC ACGAGAACCA GAACATCTTG
61 ACTAACGGTT CCAACCAGAC TTTCACGTGT ATCAACTACc ccgtgaccaa cATGGAAAAC
121 ATCACCTCTG GTTTCCTTGGG TCCATTATTG GTTTTACAAG CTGGTTTCTT CTTGTTGACC
181 AGAATTTTAA CTATTCCACA ATCTTTGGAC TCATGGTGGA CCTCCTTGAA CTTCTTGGGT
241 GGTTCTCCAG TTTGTTTGGG TCAAACTCC CAATCCCCAA CTTCCAACCA TTCTCCTACT
301 TCTTGTCAC CAATCTGTCC AGGTTACAGA TGGATGTGTT TGAGAAGATT TATCATTTTC
361 TTGTTTCATCC TATTGTTGTG TTTGATCTTC CTATTGGTTT TGTGGGATTA CCAAGGTATG
421 TTACCAGTTT GTCCATTGAT CCCAGGTTCC ACTACTACCA ACACTGGTCC ATGTAAGACC
481 TGTACTACTC CAGCTCAAGG TAACTCAATG TTTCCATCTT GTTGTGTGAC CAAGCCAACC
541 GACGGTAACT GTACTTGTAT CCCAATTCCA TCTTCCTGGG CTTTCGCTAA GTACTTGTGG
601 GAATGGGCTT CCGTTAGATT CTCTTGTTG TCTTTGTTGG TTCCATTCGT TCAATGGTTC
661 GTTGTTTGT CCCCACCCT CIGGTTGTCT GCTATCTGGA TGATGTGGTA CTGGGGTCCA
721 TCTTTGTACT CTATCGTCTC TCCATTATC CCATTGTTAC CAATCTTCTT CTGTTTGTGG
781 GTCTACATTT AA

```

Negrita: 2 aminoácidos introducidos por construcción genética, codificados por ATGGTT*Cursiva: Rhinovirus humano cepa HRV14: péptido procedente de VP4 (proteína de la cápside) (31aa)*

Minúscula: 4 aminoácidos de pre-S2

Negro: proteína S (HBsAg)

2. Secuencia de aminoácidos

gen fusión VP4-S : 263 aa

```

1  MGAQVSTQK SGSHENQNIL TNGSNQTFTV INYpvtbMEN ITSGFLGPLL VLQAGFFLLT
61 RILTIPQSLD SWWTSLNFLG GSPVCLGQNS QSPTSNSHPT SCPPICPGYR WMCLRRFIIF
121 LFILLCLIF LLVLLDYQGM LPVCPLIPGS TTTNTGPCKT CTTPAQGNSM FPSCCCTKPT
181 DGNCCTCPIP SSWAFAYLW EWASVRFSL SLLVPFVQWF VGLSPTVWLS AIWMMWYWGP
241 SLYSIVSPFI PLLPIFFCLW VYI

```

NEGRITA: 2 aminoácidos introducidos por construcción genética, codificados por ATGGTT*Cursiva: Rhinovirus humano cepa HRV14: péptido procedente de VP4 (proteína de la cápside) (31aa)*

Minúscula: 4 aminoácidos de pre-S2

Negro: proteína S (HBsAg)

Figura 18: secuencias de Sco**1. Secuencia de nucleótidos**

```

1  ATGGTTGAGA ACATCACTTC CGGTTTCTTG GGACCATTGT TGGTTTTGCA GGCTGGATTG
61  TTCTTATTGA CTAGAATCTT GACTATCCCA CAGTCTTTGG ACTCTTGGTG GACTTCCTTG
121 AACTTCTTGG GAGGTTCTCC AGTTTGTTTG GGACAAAACCT CCCAATCTCC AACTTCTAAC
181 CACTCCCCAA CTTCATGTCC ACCAATCTGT CCAGGTTACA GATGGATGTG TTTGAGAAGA
241 TTCATCATTT TCTGTTCAT CTGTGTGTTG TGTGTGATCT TCTGTGTGGT TTTGTGGAC
301 TACCAGGGAA TGTGCCAGT TTGTCCATTG ATTCCAGGTT CCACTACTAC AAACACTGGT
361 CCATGTAAGA CTTGTACTAC TCCAGCTCAG GGAAACTCTA TGTTCCTATC CTGTTGTTGT
421 ACTAAGCCAA CTGACGGTAA CTGTACTTGT ATCCCAATTC CATCCTCTTG GGCTTTTCGCT
481 AAGTACTTGT GGGAAATGGG TTCTGTTAGA TTCTCCTGGT TGTCTTGTG GGTTCATTG
541 GTTCAGTGGT TCGTTGGTTT GTCTCCAAC TTTTGGTTGT CCGCTATCTG GATGATGTGG
601 TACTGGGGAC CATCTTTGTA CTTCCATCGT TCCCATTCA TCCCATTGTT GCCAATCTTT
661 TTCTGTTTGT GGGTTTACAT CTAG

```

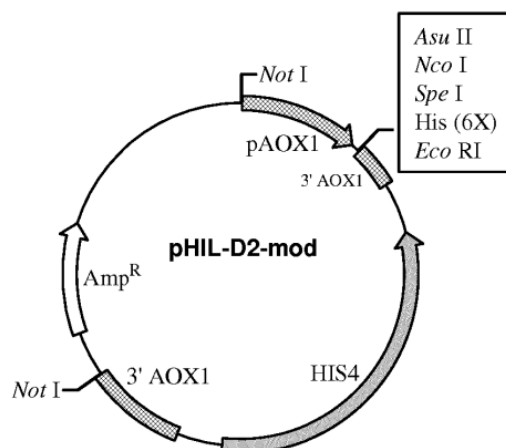
2. Secuencia de aminoácidos

```

1  MVENITSGFL GPLLVLQAGF FLLTRILTIP QSLDSWWTSL NFLGGSPVCL GQNSQSPTSN
61  HSPTSCPPIC PGYRWMCLRR FIIFLFILL CLIFLLVLLD YQGMLPVCPL IPGSTTTNTG
121 PKTCTTPAQ GNSMFPSCC TKPTDGNCTC IPIPSWAFA KYLWEWASVR FSWLSLLVPF
181 VQWFEVGLSPT VWLSAIWMMW YWGPSLYSIV SPFIPLLPF FCLWVYI

```

Figura 19: Mapa plasmídico del vector PHIL-D2mod



Codón de inicio ATG nativo del gen de AOX1

Asu II
TTCGAAACG.ATG

Sitio de clonación *EcoRI* en el vector PHIL-D2 (Invitrogen)

Asu II *Eco RI*
TTCGAAACGAGGAATTC.ATG

Las secuencias extrañas en la 5'UTR están en cursiva

POLICONECTOR MCS en PHIL-D2-mod

Asu II *Nco I* *Spe I* *Eco RI*
TTCGAA.ACC.ATGGCCGCGGACTAGT.GGC.CAC.CAT.CAC.CAT.CAC.CAT.TAA.CGCGAATTC
Thr .Ser . Gly. His . His . His . His . His . His .

Figura 20: Mapa plasmídico del vector recombinante PHIL-D2mod/VP4-S

La integración se realizó cortando el plásmido recombinante con la enzima de restricción *NotI*. El fragmento *NotI* que contenía el casete de expresión VP4-S más el marcador de selección se usaron para transformar la cepa GS115.

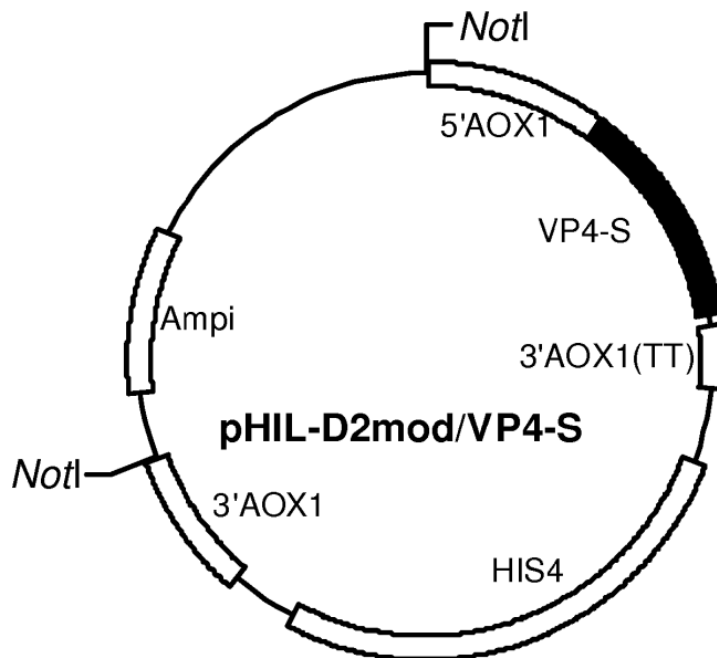


Figura 21: Mapa plasmídico del vector recombinante PHIL-D2mod/S

La integración se realizó cortando el plásmido recombinante con la enzima de restricción *NotI*. El fragmento *NotI* que contenía el casete de expresión S más el marcador de selección se usaron para transformar la cepa GS115.

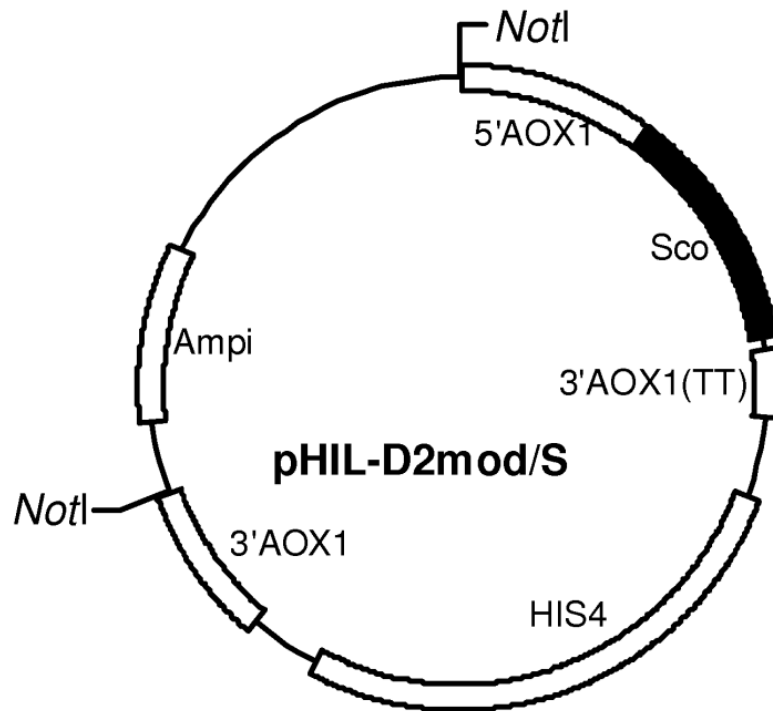


Figura 22: análisis de gradiente de CsCl

Cepa 49 (VP4-S,S)

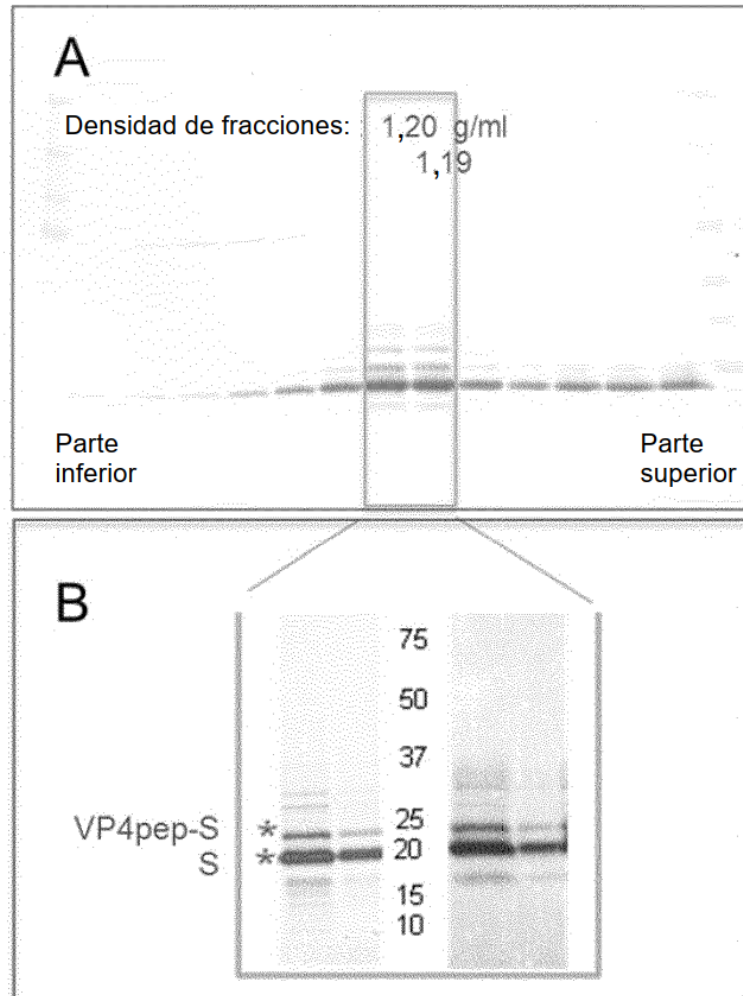


Figura 23: masa purificada de BMP201

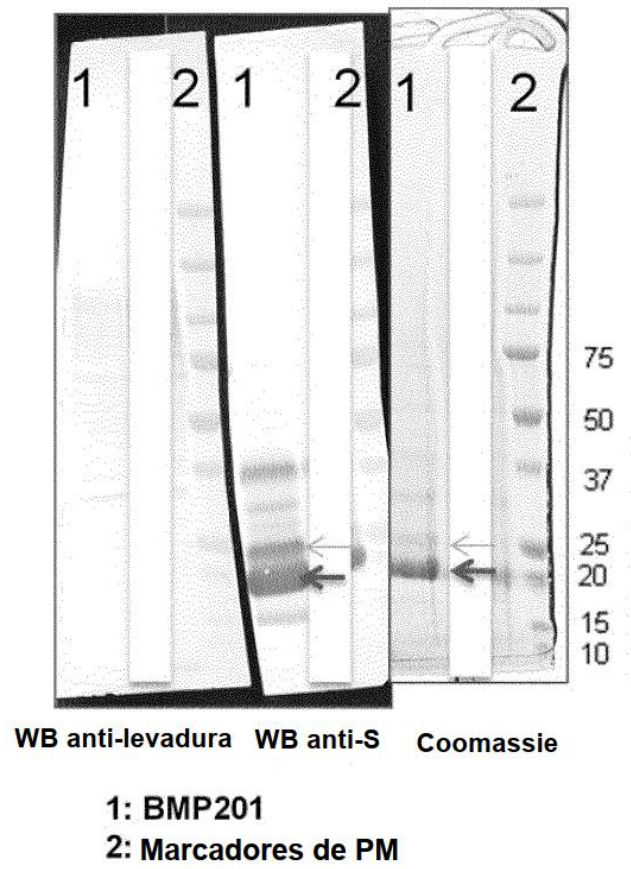
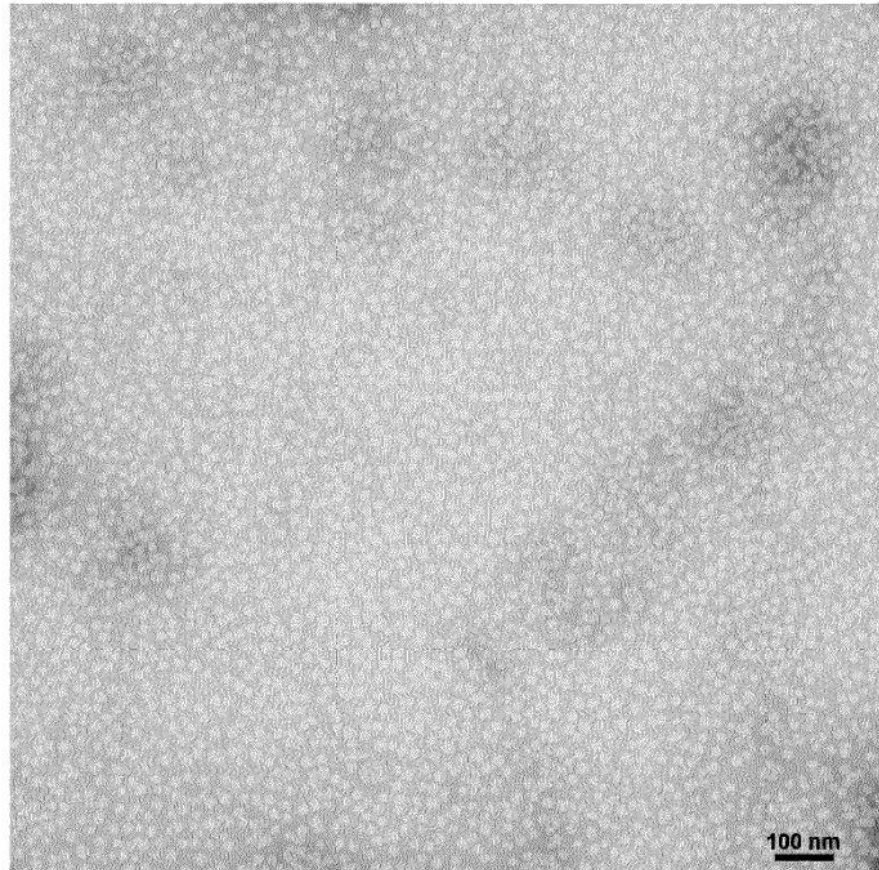


Figura 24: análisis EM realizado sobre BMP201



Tinción negativa con ácido fosfotúngstico