



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 706**

51 Int. Cl.:
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03787750 .3**
96 Fecha de presentación : **18.07.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1524994**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.04.2005**

54 Título: **Composiciones de vacuna que contienen disposiciones de antígeno beta 1-6 amiloide.**

30 Prioridad: **19.07.2002 US 396639 P**
15.05.2003 US 470432 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.10.2011

73 Titular/es: **CYTOS BIOTECHNOLOGY AG.**
Wagistrasse 25
8952 Zurich-Schlieren, CH
NOVARTIS PHARMA AG.

72 Inventor/es: **Bachmann, Martin, F.;**
Tissot, Alain;
Ortmann, Rainer;
Lüönd, Rainer;
Staufenbiel, Matthias y
Frey, Peter

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 365 706 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

Composiciones de vacuna que contienen disposiciones de antígeno beta 1-6 amiloide

Antecedente de la invención

Campo de la Invención

5 La presente invención se relaciona con los campos de la biología molecular, virología, inmunología y medicina. La invención proporciona una composición que comprende un antígeno repetitivo y ordenado o disposición determinante antigénica, y en particular una composición de A β 1-6 péptido-VLP. Más específicamente, la invención proporciona una composición que comprende una partícula similar a virus de un bacteriófago de ARN y por lo menos un péptido A β 1-6 unido a este. La invención también proporciona un proceso para producir los conjugados y las
10 disposiciones repetitivas y ordenadas, respectivamente. Las composiciones de la invención son útiles en la producción de vacunas para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer y como un fármaco/vacuna para evitar o curar la enfermedad de Alzheimer y para inducir eficientemente las respuestas inmunes, en particular las respuestas de anticuerpo. Adicionalmente, las composiciones de la invención son particularmente útiles para inducir eficientemente respuestas inmunes autoespecíficas dentro del contexto indicado.

15 Técnica Relacionada

La enfermedad de Alzheimer (AD) es la causa más común de demencia entre los ancianos (65 años de edad y más) y una carga pesada para la salud pública. Por ejemplo, se reporta que 4 millones de personas sufren de la enfermedad en los Estados Unidos de América. Se espera que la incidencia de la enfermedad se incremente con el envejecimiento de la población.

20 Los principales signos patológicos de la enfermedad de Alzheimer son los cambios en el comportamiento relacionados con la edad, depósito de β - amiloide en placas insolubles, llamadas las placas neuríticas o placas AD, ovillos neurofibrilares compuestos de la proteína tau dentro de las neuronas, y pérdida de neuronas a través del prosencéfalo. En adición al inicio tardío de AD, que ocurre en la vejez (65 años y más), existe un inicio temprano de AD, AD hereditario (FAD) que ocurre entre la edad de 35 y 60. Las anomalías patológicas de AD son más
25 extensas, severas y ocurren temprano en FAD que en el AD de inicio tardío o esporádico. Las mutaciones en el gen APP, los genes presenilina 1 y presenilina 2 se han correlacionado con FAD.

Como se indica, uno de los eventos clave en la enfermedad de Alzheimer (AD) es el depósito de amiloides como masas fibrosas insolubles (amiloidogénesis) que resulta en placas neuríticas extracelulares y depósitos alrededor de las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales (para revisión ver Selkoe, D. J. (1999) Nature. 399, A23-31). El
30 constituyente principal de las placas neuríticas y la angiopatía congófilica es amiloide β (A β), aunque estos depósitos también contienen otras proteínas tal como glicosaminoglicanos y apolipoproteínas. El A β se divide proteolíticamente de una glucoproteína mucho más grande conocida como Proteína Precursora Amiloide (APP), que comprende isoformas de 695-770 aminoácidos con una única región de transmembrana hidrófoba. El A β forma un grupo de péptidos de hasta 43 aminoácidos de longitud que muestra considerable heterogeneidad del terminal
35 carboxi y amino (truncación) así como también modificaciones (Roher, A. E., Palmer, K. C., Chau, V., & Ball, M. J. (1988) J. Cell Biol. 107, 2703-2716. Roher, A. E., Palmer, K. C., Yurewicz, E. C., Ball, M. J., & Greenberg, B. D. (1993) J. Neurochem. 61, 1916-1926). Las isoformas prominentes son A β 1-40 y 1-42. Este tiene una alta propensión a formar láminas β que se agregan en las fibrilas, que finalmente conducen al amiloide.

40 El péptido A β tiene un papel central en la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer. La región específica, la acumulación extracelular del péptido A β se acompaña por microgliosis, cambios citoesqueléticos, neuritis distrófica y pérdida sináptica. Estas alteraciones patológicas se considera que están ligadas a la disminución cognitiva que define la enfermedad.

45 La administración de la proteína beta amiloide o, en particular, A β 1-28 en cantidades de hasta 10-2 mg/dosis en la ausencia de cualesquier adyuvantes y sin ningún ligando de la proteína beta amiloide o A β 1-28 a un portador, para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, se describe en la EP 526'511.

Otros han utilizado la administración de péptidos A β en combinación con adyuvantes, para inducir una respuesta inmune, celular o humoral, contra A β 1-42. En un modelo de ratón transgénico de enfermedad de Alzheimer, los animales sobreexpresan la proteína precursora amiloide humana que contiene la mutación APP(717)V-F (ratones PDAPP; Johnson-Wood, K. et al., Proc. Natl. Acad. USA 94: 1550-1555, Games, D. et al., Nature 373: 523-527 (1995a)), que conduce a la sobreproducción de A β 1-42, desarrollan placas, neuritis distrófica, pérdida de terminales
50

presinápticos, astrocitosis y microgliosis. En un estudio reciente, Schenk, D. et al., (Nature 400:173-77 (1999) y WO 99/27944) reporta que la administración de A β 1-42 agregado mezclado con un adyuvante fuerte (CFA/IFA), que no se puede utilizar en humanos, en las primeras 4 inmunizaciones, seguido por la administración del A β 1-42 agregado en PBS en las inmunizaciones posteriores, a ratones PDAPP de 6 semanas de edad, evita esencialmente la formación de placa y la neuritis distrófica asociada. Los mismos autores reportan que la inmunización de ratones más viejos (11 meses de edad) utilizando la misma estrategia reduce marcadamente el grado y progresión de las neuropatologías similares a enfermedad de Alzheimer (AD). La proliferación de esplenocitos de ratones inmunizados utilizando la estrategia mencionada anteriormente se reporta en el Ejemplo III (Detección de la Eficacia Terapéutica contra AD Establecido) de la WO 99/27944, que muestra que las células T específicas A β 1-42 se inducen por el procedimiento de vacunación. El acoplamiento de los fragmentos A β a IgG antiratón de oveja, y la inmunización de dicho fragmento acoplado en la presencia del adyuvante CFA/IFA se reporta en la WO 99/27944. El uso de composiciones que comprenden los fragmentos A β ligados a los polipéptidos tal como toxina difteria para promover una respuesta inmune contra A β también se describe en la WO 99/27944. Sin embargo, no se proporcionan datos de inmunización.

Un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo dentro del terminal N (1-16) de A β (anticuerpo 6C6) se ha mostrado que protege las células PC 12 de neurotoxicidad del β -amiloide fibrilar, y para desagregar el β -amiloide in vitro (Solomon B. et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA (1997)). Un anticuerpo monoclonal que surge contra A β 1-28, también muestra que suprime la agregación β -amiloide in vitro (Solomon B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996)). Frenkel et al., (J. Neuroimmunol. 88: 85-90 (1998)) que ha identificado finalmente el epítipo de los dos anticuerpos antiagregantes, 10D5 y 6C6, cuando es el epítipo "EFRH", es decir A β 3-6. En contraste, un anticuerpo específico para A β 1-7 es incapaz de evitar la agregación β -amiloide (Frenkel D. et al., J. Neuroimmunol. 95: 136-142 (1999)).

El A β 1-42 es fibrillogénico y de hecho, la composición de vacuna descrita en la WO 99/27944 que utiliza A β 1-42 se trata en tal una forma que esta puede formar agregados. Se ha mostrado que aquellas fibrilas son tóxicas para los cultivos celulares neuronales (Yankner et al., Science 245: 417-420 (1989)), y que también se observa un efecto tóxico cuando se inyecta en cerebros de animal (Sigurdson et al., Neurobiol. Aging 17: 893-901 (1996); Sigurdson et al., Neurobiol. Aging 18: 591-608 (1997)). Walsh et al., (Nature 416:535-539 (2002)) reporta que los oligómeros naturales de A β se forman dentro de vesículas intracelulares. Aquellos oligómeros inhiben la potenciación a largo plazo en ratas in vivo y la plasticidad sináptica interrumpida en las concentraciones encontradas en el cerebro humano y el fluido cerebrospinal.

En otro estudio, Bard, F. et al. (Nature Medicine 6:916-19 (2000)) reporta que la administración periférica de los anticuerpos elevados contra A β 1-42, es capaz de reducir la carga amiloide, a pesar de los niveles de suero relativamente modestos. Este estudio utiliza anticuerpos policlonales elevados contra A β 1-42, o anticuerpos monoclonales elevados contra los fragmentos sintéticos derivados de diferentes regiones de A β . Así la inducción de anticuerpos contra los péptidos A β tiene promesas como un tratamiento terapéutico potencial para la enfermedad de Alzheimer.

La administración mucosal de un antígeno asociado con placas β -Amiloide, tal como el péptido β -amiloide y A β 1-40, se ha descrito en la WO99/27949. Se dice que la administración mucosal suprime ciertas respuestas de citoquina asociadas con enfermedad de Alzheimer, y mejora ciertas otras respuestas de citoquina asociadas con la supresión de las respuestas inflamatorias ligadas a la enfermedad. Se considera que la supresión de las respuestas inflamatorias se efectúa por la "provocación de células T caracterizado por un perfil de citoquina antiinflamatorio". Los antígenos adecuados, como se describe en la WO99/27949, incluyen antígenos específicos para AD, y que se reconocen por células T inmunes de un anfitrión humano o animal.

En la WO 01/18169 se describe la fusión de los epítopos de un anticuerpo monoclonal que reconoce A β para cubrir proteínas de fagos filamentosos. La inmunización de ratones con los fagos filamentosos exhiben el epítipo 15-mer VHEPHEFRHVALNPV (SEQ ID NO: 89) sobre la proteína de la cubierta VIII que resulta en anticuerpos que reconocen A β 1-16, y A β -40. Esto se demuestra en la inhibición de ELISA que utiliza los péptidos A β , y se encuentra un IC50 de 1 μ M para la inhibición de la unión del suero a A β - 16 con A β 1-40. Solomon (WO 01/18169), sin embargo, no proporciona indicación que el suero provocado contra los fagos filamentosos lleva el epítipo VHEPHEFRHVALNPV (SEQ ID NO: 89), que se une a placas amiloide o placas neuríticas de AD.

Existe un número de inconvenientes en utilizar las secuencias que difieren del antígeno contra el cual se ha provocado una respuesta inmune para inmunización. Primero, los anticuerpos contra la parte de la secuencia externa al antígeno o se puede inducir el determinante antigénico. Segundo, la confirmación del antígeno en el contexto del elemento de la secuencia de flanqueo anterior puede ser diferente que en el contexto del antígeno de longitud completa. Así, aunque se pueden provocar anticuerpos que reaccionan en forma cruzada con el antígeno, puede ser subóptima su unión al antígeno. La especificidad fina de aquellos anticuerpos provocados tampoco puede

5 corresponden a la especificidad de los anticuerpos provocados contra el antígeno en sí mismo, como diferentes cadenas laterales adicionales de los actuales residuos en el A β de longitud completa están presentes en el epítipo. Finalmente, una secuencia de aminoácido 15-mer puede contener los epítipos de célula T. La exhibición del epítipo YYEFRH (SEQ ID NO: 90) sobre la proteína III del recubrimiento de fago filamentoso, del cual solo están usualmente
 10 presentes 3-5 copias en cada fago, también se describe en la WO 01/18169. Surgen varios problemas cuando se utilizan fagos infecciosos como portador para inmunización. Primero, es problemática la producción de agentes infecciosos a gran escala y en suficiente cantidad para campañas de inmunización mayores. Segundo, la presencia del ADN del fago que contiene genes de resistencia a antibiótico en la vacuna lo que es problemático y es un tema de seguridad. Finalmente, la factibilidad y eficacia de la irradiación de grandes cantidades de fagos, no se resuelve en el caso en donde se utilizan fagos no infecciosos como vacuna.

Se han descrito los análogos A β , en donde se modifica el A β que incluye los epítipos auxiliares T (WO 01/62284). La inmunización de ratones TgRND8+, transgénicos para el APP humano, con el análogo A β resulta en un título de anticuerpo 4- a 7.5 veces mayor sobre la inmunización con A β 1-42 en la ausencia del adyuvante.

15 Estudios recientes demuestran que una reducción inducida por vacunación en depósitos Amiloides del cerebro tienen el potencial de mejorar las funciones cognitivas (Schenk, D., et al. Nature 400: 173-177 (1999); Janus, C. et al., Nature 408: 979-982 (2000); Morgan, D. et al., Nature 408: 982-985 (2000)).

La autopsia de un paciente inmunizado con A- β 1-42 agregado en el Adyuvante QS21 ha revelado la presencia de meningoencefalitis de linfocito T y la infiltración de la materia blanca cerebral mediante los macrófagos (Nicoll, J.A. et al., Nature Med. 9: 448-452 (2003)).

20 Recientemente, una publicación ha reportado 18 casos de meningoencefalitis en pacientes inmunizados por el AN1792, una vacuna compuesta del A β 1-42 agregado y QS-21 como adyuvante (Orgogozo J.-M. et al., Neurology 61: 46-54 (2003)). Se reporta la activación de célula T como un mecanismo potencial responsable de la enfermedad, mientras no sea clara la relación entre la enfermedad y los títulos anti-A β 1-42 en el suero.

25 Es bien establecido que la administración de proteínas purificadas solas no es usualmente suficiente para provocar una respuesta inmune fuerte; el antígeno aislado generalmente se puede dar junto con sustancias auxiliares llamadas adyuvantes. Dentro de estos adyuvantes, el antígeno administrado se protege contra la degradación rápida, y el adyuvante proporciona una liberación extendida de bajo nivel del antígeno. En la presente invención, se hacen inmunogénicos los péptidos A β a través de la unión a un VLP y no requiere un adyuvante.

30 Una forma para mejorar la eficiencia de la vacunación es aumentar así el grado de repetitividad del antígeno aplicado. A menos que las proteínas aisladas, virus que inducen prompt y las respuestas inmunes eficientes en la ausencia de cualquiera de los adyuvantes con y sin el auxiliar de célula T (Bachmann y Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol: 15:235-270 (1991)). Aunque los virus consisten frecuentemente de pocas proteínas, ellos son capaces de activar las respuestas inmunes mucho más fuertes que sus componentes aislados. Para las respuestas de célula B, se sabe que un factor crucial para la inmunogenicidad de los virus es la repetitividad y orden de los epítipos de superficie. Muchos virus exhiben una superficie casi cristalina que exhibe una disposición regular de los epítipos
 35 que reticulan eficientemente las inmunoglobulinas específicas de epítipo en las células B (Bachmann y Zinkernagel, Immunol. Today 17: 553-558 (1996)). Esta reticulación de las inmunoglobulinas de superficie en las células B es una señal de activación fuerte que induce directamente la progresión del ciclo celular y la producción de los anticuerpos IgM. Adicionalmente, tales células B activadas son capaces de activar las células auxiliares T, que a su vez inducen un cambio de la producción de anticuerpo IgM a IgG en las células B y la generación de la memoria de célula B de larga vida – el objetivo de cualquier vacunación (Bachmann y Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol. 15:235-270 (1997)). La estructura vírica aún se liga a la generación de los anti-anticuerpos en la enfermedad autoinmune y como una parte de la respuesta natural a los patógenos (ver Fehr, T., et al., J Exp. Med. 185:1785-1792 (1997)). Así, los anticuerpos presentados por una superficie vírica altamente organizada son capaces de inducir fuertes respuestas
 40 de anti-anticuerpo.

Como se indica, sin embargo, el sistema inmune falla en producir anticuerpos contra las estructuras autoderivadas. Para los antígenos solubles presentes en bajas concentraciones, esto se debe a la tolerancia al nivel de célula Th. Bajo estas condiciones, el acoplamiento del autoantígeno a un portador que puede suministrar el auxiliar T puede romper la tolerancia. Para las proteínas solubles presentes en altas concentraciones o las proteínas de membrana
 50 ser reversible (energía) y se puede romper mediante la administración del antígeno en una forma altamente organizada acoplada a un portador externo (Bachmann y Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol. 15:235-270 (1997)). Como se muestra en la US2003/0175290 presentada en Enero 18, 2002, se pueden inducir fuertes respuestas inmunes con las composiciones que comprenden los péptidos A β (A β 1-15, A β 1-27 y A β 33-42, que es un auto-antígeno en los ratones) unidos a un VLP. En particular, los péptidos A β humanos mencionados anteriormente
 55

unidos al VLP del fago de ARN Q β induce títulos específicos Ap altos en ratones transgénicos de APP humano (como se describe en los Ejemplos) que demuestra que la tolerancia al auto-antígeno A β se puede superar al inmunizar mediante con péptidos A β unidos a un VLP.

5 Las composiciones que comprenden una partícula de núcleo, tal como un virus o una partícula similar a virus, a la cual por lo menos un antígeno o un determinante antigénico se asocia por medio de por lo menos un enlace no péptido que conduce a una disposición de antígeno repetitiva se ha descrito en la WO00/32227. Estas composiciones son útiles para la producción de vacunas para la prevención de enfermedades infecciosas, el tratamiento de alergias y el tratamiento de cánceres.

10 Subsiste así una necesidad para composiciones y vacunas seguras altamente inmunogénicas, respectivamente, para tratar la enfermedad de Alzheimer, en particular, utilizando inmunógenos que carecen de los epítomos de célula T y adyuvantes, respectivamente, que pueden provocar efectos colaterales, y que son aún capaces de inducir los títulos altos del anticuerpo, cuyos anticuerpos, adicionalmente, son capaces de unirse a las placas amiloides.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

15 Hemos encontrado que el péptido A β 1-6, que se une a una partícula de núcleo tiene una estructura con organización repetitiva inherente, y por lo tanto en particular con partículas similares a virus (VLP) y subunidades de VLP, respectivamente, que conduce a conjugados repetitivos y altamente ordenados que representan un inmunógeno potente para la inducción de anticuerpos específicos para A β 1-6. Por lo tanto, la presente invención proporciona un medio profiláctico y terapéutico para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, que se basa en una disposición de partícula de núcleo A β 1-6 repetitiva y ordenada, y en particular en un conjugado y disposición de péptido VLP A β 1-6, respectivamente. Estos medios profilácticos y terapéuticos son capaces de inducir títulos altos de los anticuerpos anti-péptido A β 1-6, que se reticular con el A β soluble y son capaces de unirse a las placas amiloide humanas de un modelo de ratón transgénico APP de humano y con placas AD amiloides. Adicionalmente, los anticuerpos provocados no se unen a APP en las secciones del cerebro.

25 Más aún, la presente invención proporciona nuevas composiciones, vacunas y métodos para el tratamiento de AD. Las composiciones y vacunas que comprenden los péptidos A β 1-6 están carentes de los epítomos de célula T e inducen los anticuerpos unidos a las placas AD y el A β soluble. Los péptidos A β 1-6 se presentan en el sistema inmune del paciente en una forma ordenada y altamente repetitiva a través de la unión a los péptidos A β o a una partícula de núcleo, preferiblemente a un VLP, y aún más preferiblemente a un VLP de un fago de ARN.

30 En una realización preferida, el antígeno o determinante antigénico es el péptido A β 1-6 beta amiloide humano (DAEFRH; SEQ ID NO: 75) que es un fragmento de A β (DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 91), en donde el péptido A β 1-6 beta amiloide humano se une a la partícula de núcleo y VLP, respectivamente. La proteína beta amiloide se proporciona en la SEQ ID NO: 92. La proteína precursora beta amiloide se proporciona en la SEQ ID NO: 93.

35 La presente invención, así, proporciona una composición que comprende: (a) una partícula de núcleo con por lo menos un primer sitio de adhesión en donde dicha partícula de núcleo es una partícula similar a virus de un bacteriófago de ARN; y (b) por lo menos un antígeno o determinante antigénico con por lo menos un segundo sitio de adhesión, en donde dicho antígeno o determinante antigénico es un péptido A β -6, y en donde dicho segundo sitio de adhesión se selecciona del grupo que consiste de (i) un sitio de adhesión de ocurrencia no natural con dicho antígeno o determinante antigénico; y (ii) un sitio de adhesión de ocurrencia natural con dicho antígeno o determinante antigénico, en donde dicho segundo sitio de adhesión es capaz de asociación a dicho primer sitio de adhesión a través de por lo menos un enlace no péptido; y en donde dicho antígeno o determinante antigénico y dicha partícula de núcleo interactúa a través de dicha asociación para formar una disposición de antígeno repetitivo y ordenado.

45 Los fragmentos A β de la presente invención son solubles y de manera general no forman agregados. Más aún, ellos se unen, y preferiblemente se unen covalentemente a una partícula de núcleo y VLP, respectivamente. Por lo tanto, las composiciones de la invención no tienen riesgo de inducir efectos tóxicos tal como siembra del depósito amiloide.

50 Es un hallazgo inesperado de esta invención que un título alto de anticuerpos reticulados con las placas amiloide solubles A β y AD se pueda obtener con una composición que comprende el péptido A β 1-6 unido a una partícula de núcleo y VLP, respectivamente. En particular, se ha mostrado que el VLP media la inducción de los anticuerpos contra los auto-antígenos, rompiendo así la auto-tolerancia (WO 02/056905). Adicionalmente, el tamaño pequeño de este epítomo precluye la presencia de los epítomos de célula T, proporcionando así nuevas composiciones que no inducen respuestas de célula específicas TA β . Adicionalmente, los anticuerpos provocados no se unen a APP en las

secciones del cerebro. Así, la presente invención proporciona una composición de vacunas segura para la prevención y el tratamiento de AD.

5 Más específicamente, la invención proporciona una composición que comprende un antígeno repetitivo y ordenado o disposición determinante antigénica, y por lo tanto en particular los conjugados VLP del péptido A β 1-6. Más específicamente, la invención proporciona una composición que comprende una partícula similar a virus de un bacteriófago de ARN y por lo menos un péptido A β 1-6 unido a este. La invención también proporciona un proceso para producir los conjugados y las disposiciones repetitivas y ordenadas, respectivamente. Las composiciones de la invención son útiles en la producción de vacunas para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer y como un farmacéutico para evitar o curar enfermedad de Alzheimer y para inducir eficientemente las respuestas inmunes, en particular las respuestas de anticuerpo. Adicionalmente, las composiciones de la invención son particularmente útiles para inducir eficientemente las respuestas inmunes autoespecíficas dentro del contexto indicado.

15 En la presente invención, un péptido A β 1-6 se une a una partícula de núcleo y VLP, respectivamente, típicamente en una forma orientada, que produce una disposición de antígeno de péptido A β 1-6 ordenado y repetitivo. Adicionalmente, la estructura organizada y altamente repetitiva de las partículas de núcleo y los VLP, respectivamente, median la exhibición del péptido A β en una forma repetitiva y altamente ordenada que conduce a una disposición de antígeno repetitiva y altamente organizada. Adicionalmente, la unión del péptido A β 1-6 a la partícula núcleo y VLP, respectivamente, proporciona epítomos de célula auxiliar T, ya que la partícula de núcleo y el VLP son externos al anfitrión inmunizado con la disposición de péptido A β 1-6 de partícula núcleo y la disposición del péptido A β 1-6 VLP, respectivamente. Aquellas disposiciones difieren de los conjugados de la técnica anterior, en particular, en su estructura altamente organizada, dimensiones, y en la repetitividad del antígeno en la superficie de la disposición.

20 En un aspecto de la invención, el péptido A β 1-6 se sintetiza químicamente, mientras que la partícula núcleo y el VLP, respectivamente, se expresan y se purifican de un anfitrión de expresión adecuado para el plegado y el ensamble de la partícula núcleo y el VLP, respectivamente. La disposición del péptido A β 1-6 luego se ensambla mediante la unión del péptido A β 1-6 a la partícula núcleo y al VLP, respectivamente.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende (a) una partícula similar a virus de un bacteriófago de ARN, y (b) por lo menos un antígeno o determinante antigénico, en donde dicho antígeno o dicho determinante antigénico es un péptido A β 1-6, y en donde dicho por lo menos un antígeno o determinante antigénico se une a dicha partícula similar a virus.

30 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) la composición de la invención, y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

35 En todavía un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende una composición, en donde dicha composición comprende (a) una partícula similar a virus de un bacteriófago de ARN; y (b) por lo menos un antígeno o determinante antigénico, en donde dicho antígeno o dicho determinante antigénico es un péptido A β 1-6; y en donde dicho por lo menos un antígeno o determinante antigénico se une a dicha partícula similar a virus.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de inmunización que comprende administrar la composición de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención a un animal.

40 En todavía un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un proceso para producir una composición de la invención que comprende (a) proporcionar una partícula similar a virus de un bacteriófago de ARN; y (b) proporcionar por lo menos un antígeno o determinante antigénico, en donde dicho antígeno o dicho determinante antigénico es un péptido A β 1-6; (c) combinar dicha partícula similar a virus y dicho por lo menos un antígeno o determinante antigénico ya que dicho por lo menos un antígeno o determinante antigénico se une a dicha partícula similar a virus.

45 Análogamente, la presente invención proporciona un proceso para producir una composición de la reivindicación 1 que comprende: (a) proporcionar una partícula de núcleo con por lo menos un primer sitio de adhesión en donde dicha partícula de núcleo es una partícula similar a virus de un bacteriófago de ARN; (b) proporcionar por lo menos un antígeno o determinante antigénico con por lo menos un segundo sitio de adhesión, en donde dicho antígeno o determinante antigénico es un péptido A β 1-6, y en donde dicho segundo sitio de adhesión se selecciona del grupo que consiste de (i) un sitio de adhesión de ocurrencia natural con dicho antígeno o determinante antigénico; y (ii) un sitio de adhesión de ocurrencia natural con dicho antígeno o determinante antigénico; y en donde dicho segundo sitio de adhesión es capaz de asociación a dicho primer sitio de adhesión a través de por lo menos un enlace no

péptido; y (c) combinar dicha partícula de núcleo y dicho por lo menos un antígeno o determinante antigénico, en donde dicho antígeno o determinante antigénico y dicha partícula de núcleo interactúa a través de dicha asociación para formar una disposición de antígeno repetitivo y ordenado.

5 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un uso de una composición de la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer.

10 En un aspecto aún adicional, la presente invención proporciona un uso de una composición de la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento profiláctico y terapéutico de la enfermedad de Alzheimer. Adicionalmente, en un aspecto aún adicional, la presente invención proporciona un uso de una composición de la reivindicación 1, en aislamiento o en combinación con otros agentes, o con la ausencia explícita de sustancias específicas tal como adyuvantes, para la fabricación de una composición, composición farmacéutica, vacuna, fármaco o medicamento para la terapia o profilaxis de la enfermedad de Alzheimer, y/o para estimular el sistema inmune del mamífero.

15 Por lo tanto, la invención proporciona, en particular, composiciones de vacuna que son adecuadas para prevenir y/o atenuar la enfermedad de Alzheimer o afecciones relacionadas con la misma. La invención proporciona adicionalmente métodos de inmunización y vacunación, respectivamente, para prevenir y/o atenuar la enfermedad de Alzheimer o las afecciones relacionadas con esta en los humanos. Las composiciones de la invención se pueden utilizar profilácticamente o terapéuticamente.

20 En realizaciones específicas, la invención proporciona métodos para prevenir y/o atenuar la enfermedad de Alzheimer o las afecciones relacionadas a esta que se originan o exacerban mediante los productos de "auto" gen, es decir "auto-antígenos" como se utiliza aquí. En realizaciones relacionadas, la invención proporciona métodos para inducir las respuestas inmunológicas en animales e individuos, respectivamente, que conduce a la producción de anticuerpos que previenen y/o atenúan la enfermedad de Alzheimer o las afecciones relacionadas a esta, que se originan o exacerban mediante productos de "auto" gen.

25 Como se entenderá por una persona medianamente experta en la técnica, cuando se administran las composiciones de la invención a un animal o un humano, ellas pueden estar en una composición que contiene sales, amortiguadores, adyuvantes, u otras sustancias que son deseables para mejorar la eficacia de la composición. Se proporcionan ejemplos de materiales adecuados para uso en preparar las composiciones farmacéuticas en numerosas fuentes que incluyen Remington's Pharmaceutical Sciences (Osol, A, ed., Mack Publishing Co. (1990)).

30 Se dice que las composiciones de la invención son "farmacológicamente aceptables" si se puede tolerar su administración por un individuo receptor. Adicionalmente, las composiciones de la invención se administrarán en una "cantidad terapéuticamente efectiva" (es decir, una cantidad que produce un efecto fisiológico deseado).

35 Las composiciones de la presente invención se puede administrar mediante varios métodos conocidos en la técnica, pero se administrarán normalmente mediante inyección, infusión, inhalación, administración oral, u otros métodos físicos adecuados. Las composiciones se pueden administrar alternativamente intramuscularmente, intravenosamente, o subcutáneamente. Los componentes de las composiciones para administración incluyen soluciones acuosas estériles (por ejemplo solución salina fisiológica) o soluciones o suspensiones no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tal como oleato de etilo. Los portadores o vendajes oclusivos se pueden utilizar para incrementar permeabilidad en la piel y mejorar la absorción del antígeno.

40 Otras realizaciones de la presente invención serán evidentes para una persona medianamente experta en claridad de lo que se conoce en la técnica, los siguientes dibujos y la descripción de la invención, y las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

45 La FIGURA 1 describe el gel SDS-PAGE, que corre bajo condiciones de reducción, que muestra el resultado de acoplamiento del péptido A β 1-6 (NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂) (SEQ ID NO: 77) al VLP de la proteína de recubrimiento Q β .

La FIGURA 2 muestra el análisis ELISA de los anticuerpos específicos para A β 1-6 en el suero de ratones inmunizados con el péptido A β 1-6 acoplado al VLP de la proteína de recubrimiento Q β .

La FIGURA 3 muestra el análisis ELISA de los anticuerpos específicos para A β 1-40 en el suero de ratones inmunizados con el péptido A β 1-6 acoplado al VLP de la proteína de recubrimiento Q β .

La FIGURA 4 A-B muestra una sección del cerebro de un ratón APP23 (A) y una sección de corteza entorrinal de un paciente AD (B) teñido con el suero de ratones inmunizados con el péptido A β 1-6 acoplado al VLP de la proteína de recubrimiento Q β .

5 La FIGURA 5 A-E muestra las secciones de cerebro de un ratón APP23 reñido con el suero de ratones inmunizados con el péptido A β 1-6 acoplado al VLP de la proteína de recubrimiento Q β , o con un antisuero específico de conejo policlonal para el terminal C de APP humano o de ratón.

La FIGURA 6 muestra el resultado de la inmunización de monos rhesus con A β 1-6 humano acoplado a VLP Q β cuando se mide en un ensayo ELISA.

10 La FIGURA 7 muestra el resultado de la unión a las placas de suero de monos inmunizados con el A β 1-6 humano acoplado a VLP Q β , cuando se mide por la histología en el AD humano y las placas de ratón transgénico.

La FIGURA 8 describe el análisis SDS-PAGE del acoplamiento de A β 1-6 a AP205 VLP de murino.

La FIGURA 9 muestra el resultado de la inmunización de ratones con A β 1-6 de murino acoplado a AP205 cuando se mide en un ensayo ELISA.

15 La FIGURA 10 muestra el análisis mediante ELISA de los títulos anti-A β 40 y anti-A β 42 en el suero de ratones transgénicos "Suecia/Londres" inmunizados con Q β hA β 1-6 entre 9.5 y 19 meses de edad.

La FIGURA 11 muestra el teñido inmunohistoquímico de las secciones del cerebro de ratones transgénicos "Suecia/Londres" con Q β hA β 1-6 o PBS.

LA FIGURA 12 muestra la cuantificación del depósito de placa en ratones transgénicos "Suecia/Londres" inmunizados con Q β hA β 1-6, Q β o PBS entre 9.5 y 19 meses de edad.

20 LA FIGURA 13 muestra la cuantificación del depósito de placa en ratones transgénicos "Suecia/Londres" inmunizados con Q β hA β 1-6 o PBS entre 13.5 y 19 meses de edad.

LA FIGURA 14 muestra el análisis mediante ELISA de los títulos anti-A β 40 y anti-A β 42 en el suero de ratones transgénicos "Suecos" inmunizados con Q β hA β 1-6.

25 LA FIGURA 15 muestra el teñido histoquímico de las secciones del cerebro de ratones inmunizados "Suecos" con Q β hA β 1-6 o PBS.

LA FIGURA 16 muestra la cuantificación del depósito de placa en ratones transgénicos "Suecos" inmunizados con Q β hA β 1-6 o PBS.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

30 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por una persona medianamente experta en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar cualesquier métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí en la práctica o prueba de la presente invención, se describen de aquí en adelante los métodos y materiales preferidos.

1. Definiciones:

35 Péptido A β 1-6: Un péptido A β 1-6 como se utiliza aquí se refiere a péptidos que tienen una secuencia que corresponde a la secuencia A β 1-6 humana, o homóloga a la secuencia humana A β 1-6. Las secuencias homólogas a la secuencia A β 1-6 humana incluyen, pero no se limitan a las secuencias A β 1-6 de otras especies y por lo tanto incluyen, pero no se limitan a, la secuencia de primate, conejo, conejillo de indias, *Xenopus Laevis*, rana, ratón y rata A β 1-6. Las secuencias A β 1-6 de *Xenopus Laevis* o rana, aunque difieren de A β 1-6 humano en dos posiciones, tienen mutaciones conservadoras (Ala - Ser, Phe - Tyr), y todavía se considera que son homólogas a A β 1-6 de acuerdo con esta definición. De acuerdo con la presente invención, sin embargo, el péptido A β 1-6 se modifica típicamente, de tal manera que un segundo sitio de adhesión se adhiere a este. Preferiblemente, el segundo sitio de adhesión se modifica con un ligador o un ligador de aminoácido que comprende un segundo sitio de adhesión para la unión a una partícula de núcleo y VLP, respectivamente. Con referencia aquí al péptido A β 1-6, un péptido A β 1-6

40

modificado, como se indicó anteriormente, es decir se debe abarcar el péptido A β 1-6 con un segundo sitio de adhesión adherido a este. Típicamente, sin embargo, las modificaciones se indican explícitamente en la especificación. Las realizaciones preferidas adicionales de un péptido A β 1-6 es un antígeno o determinante antigénico de acuerdo con la presente invención que llegará a ser evidente cuando procede esta especificación.

5 Adyuvante: El término "adyuvante" como se utiliza aquí se refiere un estimulador no específico de la respuesta inmune o sustancias que permite la generación de un depósito en el anfitrión cuando se combina con la vacuna y la composición farmacéutica, respectivamente, de la presente invención puede proporcionar una respuesta inmune aún más mejorada. Se puede utilizar una variedad de adyuvantes. Ejemplos incluyen adyuvante de Freund completo e
10 tal como hidróxido de aluminio y muramildipéptido modificado. Los adyuvantes adicionales son geles minerales tal como hidróxido de aluminio, sustancias activas de superficie tal como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa de ojo de cerradura, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tal como BCG (bacille Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Tales adyuvantes también son bien conocidos en la técnica. Los adyuvantes adicionales que se pueden administrar con las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, inmunomodulador de lípido Monofosforilo, AdjuVax 100a, QS-21, QS-18,
15 CRL1005, sales de Aluminio (Alum), MF-59, OM-174, OM-197, OM-294, y tecnología de adyuvante Virosomal. Los adyuvantes también pueden comprender una mezcla de estas sustancias.

Se conocen en la técnica las fracciones de saponina inmunológicamente activas tienen actividad de adyuvante derivada de la corteza del árbol Sur Americano Quillaja Saponaria Molina. Por ejemplo QS21, también conocido como QA21, es una fracción purificada Hplc del árbol Quillaja Saponaria Molina y se describe su método de
20 producción (como QA21) en la Patente Estadounidense No. 5,057,540. También se ha descrito Quillaja saponin como un adyuvante por Scott et al, Int. Archs. Allergy Appl. Immun., 1985, 77, 409. El lípido A monofosforilo y sus derivados se conocen en la técnica. Un derivado preferido es lípido A monofosforilo 3 de-o-acilado, y se conoce de la Patente Británica No. 2220211. Los adyuvantes preferidos adicionales se describen en la WO00/00462.

Sin embargo, una característica ventajosa de la presente invención es la alta inmunogenicidad de la composición de
25 la invención. Como ya se destacó aquí o será evidente cuando procede esta especificación, se proporcionan vacunas y composiciones farmacéuticas carentes de los adyuvantes en alternativa adicional o realizaciones preferidas, que conduce a vacunas y composiciones farmacéuticas para tratar AD que están carentes de adyuvantes y, así, tiene un perfil de seguridad superior debido a que los adyuvantes puede causar efectos colaterales. El término "carente" como se utiliza aquí en el contexto de vacunas y composiciones farmacéuticas para tratar AD que se
30 refiere a vacunas y composiciones farmacéuticas que se utilizan sin adyuvantes.

Ligador de aminoácido: Un "ligador de aminoácido", o también recién denominado "ligador" dentro de esta especificación, como se utiliza aquí, asocia el antígeno o determinante antigénico con el segundo sitio de adhesión, o más preferiblemente, aún comprende o contiene el segundo sitio de adhesión, típicamente - pero no necesariamente - como un residuo de aminoácido, preferiblemente como un residuo cisteína. El término "ligador de
35 aminoácido" como se utiliza aquí, sin embargo, no está destinado a implicar tal un ligador de aminoácido que consiste exclusivamente de los residuos de aminoácido, aún si un ligador de aminoácido que consiste de los residuos de aminoácido es una realización preferida de la presente invención. Los residuos de aminoácido del ligador de aminoácido, preferiblemente, se componente de aminoácidos de ocurrencia natural o aminoácidos no naturales conocidos en la técnica, todos los L o todos los D o sus mezclas. Sin embargo, un ligador de aminoácido
40 que comprende una molécula con un grupo sulfhidrilo o residuo cisteína también se abarca dentro de la invención. Tal una molécula comprende preferiblemente un grupo funcional alquilo C1-C6-, cicloalquilo (C5, C6), arilo o heteroarilo. Sin embargo, en adición a un ligador de aminoácido, un ligador que comprende preferiblemente un grupo funcional alquilo C1-C6-, cicloalquilo- (C5,C6), arilo- o heteroarilo- y carente de cualquiera de los aminoácidos también se debe abarcar dentro del alcance de la invención. La asociación entre el antígeno o determinante
45 antigénico o opcionalmente el segundo sitio de adhesión y el ligador de aminoácido es preferiblemente por medio de por lo menos un enlace covalente, más preferiblemente por medio de por lo menos un enlace de péptido.

Animal: Como se utiliza aquí, el término "animal" significa que incluye, por ejemplo, humanos, ovejas, alces, ciervos, ciervos mula, visones, mamíferos, monos, caballos, ganado, cerdos, cabras, perros, gatos, ratas, ratones, pájaros, pollos, reptiles, peces, insectos y arácnidos.

50 Anticuerpo: Como se utiliza aquí, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas que son capaces de unirse a un epítipo o determinante antigénico. El término significa que incluye anticuerpos completos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que incluyen anticuerpos monocatenarios. Más preferiblemente los anticuerpos son fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno humano e incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fv ligados a disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden un
55 dominio VL o VH. Los anticuerpos pueden ser de cualquier origen animal que incluyen pájaros y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son humanos, murino, conejo, cabra, conejillo de indias, camello, caballo o pollo.

Como se utiliza aquí, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácido de una inmunoglobulina humana e incluye anticuerpos aislados de las colecciones de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos de una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan las inmunoglobulinas endógenas, como se describe, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 5,939,598 por Kucherlapati et al.

- 5 Antígeno: Como se utiliza aquí, el término "antígeno" se refiere a una molécula capaz de ser unido por un anticuerpo o un receptor de célula T (TCR) si se presenta por las moléculas MHC. El término "antígeno", como se utiliza aquí, también abarca epítomos de célula T. Un antígeno adicionalmente es capaz de ser reconocido por el sistema inmune y/o es capaz de inducir una respuesta inmune humoral y/o respuesta inmune celular que conduce a la activación de los linfocitos B- y/o T. Esto puede, sin embargo, requerir que, por lo menos en ciertos, el antígeno contiene o se liga a un epítomo de célula Th y se da en el adyuvante. Un antígeno puede tener uno o más epítomos (epítomos B- y T). La reacción específica denominada anteriormente significa que indica que el antígeno reaccionará preferiblemente, típicamente en una forma altamente selectiva, con su anticuerpo o TCR correspondiente y no con la multitud de otros anticuerpos o TCR que se pueden evocar por otros antígenos. Antígenos como se utiliza aquí también pueden ser mezclas de varios antígenos individuales.
- 10
- 15 Determinante antigénico: Como se utiliza aquí, el término "determinante antigénico" significa que se refiere a aquella porción de un antígeno que se reconoce específicamente por los linfocitos B o T. Los linfocitos B responden a los determinantes antigénicos que producen los anticuerpos, mientras que los linfocitos T responden a los determinantes antigénicos mediante proliferación y el establecimiento de las funciones efectoras críticas para la mediación de la inmunidad celular y/o humoral.
- 20 Asociación: Como se utiliza aquí, el término "asociación" cuando se aplica al primer y segundo sitios de adhesión, se refiere a la unión del primer y segundo sitios de adhesión que es preferiblemente por medio de por lo menos un enlace no péptido. La naturaleza de la asociación puede ser covalente, iónica, hidrófoba, polar o cualquier combinación de las mismas, preferiblemente la naturaleza de la asociación es covalente.
- 25 Sitio de Adhesión, Primero: Como se utiliza aquí, la frase "primer sitio de adhesión" se refiere a un elemento de origen natural o no natural, al que se puede asociar un segundo sitio de adhesión ubicado en el antígeno o determinante antigénico. El primer sitio de adhesión puede ser una proteína, un polipéptido, un aminoácido, un péptido, un azúcar, un polinucleótido, un polímero natural o sintético, un metabolito secundario o compuesto (biotina, fluoresceína, retinol, digoxigenina, iones de metal, fenilmetilsulfonilfluoruro), o una combinación de los mismos, o un grupo químicamente reactivo de los mismos. El primer sitio de adhesión se ubica, típicamente y preferiblemente en la superficie, de la partícula núcleo tal como, preferiblemente la partícula similar a virus. Los múltiples primeros sitio de adhesión están presentes en la superficie de la partícula similar a virus y núcleo, respectivamente, típicamente en una configuración repetitiva.
- 30
- 35 Sitio de adhesión, Segundo: Como se utiliza aquí, la frase "segundo sitio de adhesión" se refiere a un elemento asociado con el antígeno o determinante antigénico al cual el primer sitio de adhesión ubicado en la superficie de la partícula núcleo y partícula similar a virus, respectivamente, se puede asociar. El segundo sitio de adhesión del antígeno o determinante antigénico puede ser una proteína, un polipéptido, un péptido, un azúcar, un polinucleótido, un polímero natural o sintético, un metabolito o compuesto secundario (biotina, fluoresceína, retinol, digoxigenina, iones de metal, fenilmetilsulfonilfluoruro), o una combinación de los mismos, o un grupo químicamente reactivo de los mismos. Por lo menos un segundo sitio de adhesión está presente en el antígeno o determinante antigénico. El término "antígeno o determinante antigénico con por lo menos un segundo sitio de adhesión" se refiere, por lo tanto, a un antígeno o construcción antigénica que comprende por lo menos el antígeno o determinante antigénico y el segundo sitio de adhesión. Sin embargo, en particular para un segundo sitio de adhesión, que que es de origen no natural, es decir de ocurrencia no natural dentro del antígeno o determinante antigénico, este antígeno o construcciones antigénicas comprenden un "ligador de aminoácido".
- 40
- 45 Unido: Como se utiliza aquí, el término "unido" se refiere a la unión o adhesión que puede ser covalente, por ejemplo, mediante acoplamiento químico, o no covalente, por ejemplo, interacciones iónicas, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, etc. Los enlaces covalentes pueden ser, por ejemplo, éster, éter, fosfoéster, amida, péptido, imida, enlaces carbono-azufre, enlaces carbono-fósforo, y similares. El término "unido" es más amplio que e incluye términos tal como "acoplado," "fusionado" y "adherido".
- 50
- 55 Proteínas de recubrimiento: Como se utiliza aquí, el término "proteínas de recubrimiento" se refiere a las proteínas de un bacteriófago de ARN capaz de ser incorporado dentro del ensamblaje cápsido del bacteriófago de ARN. Sin embargo, cuando se refiere al producto de gen específico del gen de proteína de recubrimiento de los bacteriófagos de ARN se utiliza el término "CP". Por ejemplo, el producto de gen específico del gen de proteína de recubrimiento del bacteriófago de ARN Q β se denomina como "Q β CP", mientras que "las proteínas de recubrimiento" del bacteriófago Q β comprenden el "Q β CP" así como también la proteína A1. El cápsido del Bacteriófago Q β se

compone principalmente de Q β CP, con un contenido menor de la proteína A1. De forma similar, la proteína de recubrimiento VLP Q β contiene principalmente Q β CP, con un contenido menor de la proteína A1.

5 Partícula núcleo: Como se utiliza aquí, el término "partícula núcleo" se refiere a una estructura rígida con una organización repetitiva inherente. Una partícula de núcleo como se utiliza aquí puede ser el producto sintético o el producto de un proceso biológico.

Acoplado: El término "acoplado", como se utiliza aquí, se refiere a la adhesión mediante enlaces covalentes o mediante interacciones no covalentes fuertes, típicamente y preferiblemente a la adhesión mediante enlaces covalentes. Cualquier método normalmente utilizado por aquellos expertos en la técnica para el acoplamiento de materiales biológicamente activos se puede utilizar en la presente invención.

10 Cantidad efectiva: Como se utiliza aquí, el término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Una cantidad efectiva de la composición sería la cantidad que alcanza este resultado seleccionado, y tal una cantidad se puede determinar como una materia de rutina para una persona experta en la técnica. Por ejemplo, una cantidad efectiva para tratar una deficiencia del sistema inmune que puede ser la cantidad necesaria para causar activación del sistema inmune, que resulta en el desarrollo de una
15 respuesta inmune específica de antígeno luego de la exposición al antígeno. El término también es sinónimo con "cantidad suficiente."

La cantidad efectiva para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de tales factores como la enfermedad o afección a ser tratada, la composición particular a ser administrada, el tamaño del sujeto, y/o la severidad de la enfermedad o afección. Una persona medianamente experta en la técnica puede determinar
20 empíricamente la cantidad efectiva de una composición particular de la presente invención sin necesitar la debida experimentación.

Epítipo: Como se utiliza aquí, el término "epítipo" se refiere a porciones continuas o discontinuas de un polipéptido que tiene actividad inmunogénica o antigénica en un animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente en un humano. Un epítipo se reconoce por un anticuerpo o una célula T a través de su receptor de célula T en el
25 contexto de una molécula MHC. Un "epítipo inmunogénico," como se utiliza aquí, se define como una porción de un polipéptido que provoca una respuesta de anticuerpo o induce una respuesta de célula T en un animal, como se determina por cualquier método conocido en la técnica. (Ver, por ejemplo, Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002 (1983)). El término "epítipo antigénico," como se utiliza aquí, se define como una porción de la proteína a la cual un anticuerpo se puede unir inmunoespecíficamente a su antígeno como se determina por
30 cualquier método bien conocido en la técnica. La unión inmunoespecífica excluye la unión no específica pero no necesariamente excluye la reactividad cruzada con otros antígenos. Los epítipos antigénicos no necesitan ser necesariamente inmunogénicos. Los epítipos antigénicos también puede ser epítipos de célula T, en cuyo caso ellos se pueden unir inmunoespecíficamente mediante un receptor de célula T dentro del contexto de una molécula MHC.

35 Un epítipo puede comprender 3 aminoácidos en una conformación espacial que es única para el epítipo. De manera general, un epítipo consiste de por lo menos aproximadamente 5 tales aminoácidos, y más usualmente, consiste de por lo menos aproximadamente 8-10 tales aminoácidos. Si el epítipo es una molécula orgánica, esta puede ser tan pequeña como Nitrofenilo.

40 Fusión: Como se utiliza aquí, el término "fusión" se refiere a la combinación de las secuencias de aminoácido de diferente origen en una cadena de polipéptido mediante una combinación en estructura de sus secuencias de nucleótido codificante. El término "fusión" abarca explícitamente las fusiones internas, es decir, la inserción de las secuencias de diferente origen dentro de una cadena de polipéptido, en adición a la fusión a uno de sus terminales.

45 Respuesta inmune: Como se utiliza aquí, el término "respuesta inmune" se refiere a una respuesta inmune humoral y/o respuesta inmune celular que conduce a la activación y proliferación de linfocitos B- y/o T y/o células que presentan antígeno. En algunos casos, sin embargo, las respuestas inmunes pueden ser de baja intensidad y llegan a ser detectables solo cuando se utiliza por lo menos una sustancia de acuerdo con la invención. "Inmunogénico" se refiere a un agente utilizado para estimular el sistema inmune de un organismo vivo, ya que se incrementan una o más funciones del sistema inmune y se dirigen hacia el agente inmunogénico. Un "polipéptido inmunogénico" es un polipéptido que provoca una respuesta inmune celular y/o humoral, si solo o se liga a un portador en la presencia o
50 ausencia de un adyuvante. Preferiblemente, se puede activar el antígeno que presenta la célula.

Una sustancia que "mejora" una respuesta inmune se refiere a una sustancia en la cual se observa una respuesta que es mayor o se intensifica o se desvía en cualquier forma con la adición de la sustancia cuando se compara con

- la misma respuesta inmune medida sin la adición de la sustancia. Por ejemplo, la actividad lítica de las células T citotóxicas se puede medir, por ejemplo utilizando un ensayo de liberación ^{51}Cr , en muestras obtenidas con o sin la sustancia durante inmunización. La cantidad de la sustancia en la cual se mejora la actividad lítica CTL cuando se compara con la actividad lítica CTL sin la sustancia es dicha una cantidad suficiente para mejorar la respuesta inmune del animal al antígeno. En una realización preferida, la respuesta inmune se mejora por un factor de por lo menos aproximadamente 2, más preferiblemente mediante un factor de aproximadamente 3 o más. La cantidad o tipo de citoquinas secretadas también se puede alterar. Alternativamente, se puede alterar la cantidad de anticuerpos inducidos o sus subclases.
- 5
- Inmunización: Como se utiliza aquí, los términos "inmunizan" o "inmunización" o términos relacionados por conferir la cantidad de montar una respuesta inmune sustancial (que comprende anticuerpos y/o inmunidad celular tal como efector CTL) contra un antígeno o epítopo objetivo. Estos términos no requieren que se cree inmunidad completa, pero que se produce una respuesta inmune es sustancialmente mayor que los valores iniciales. Por ejemplo, se puede considerar que un mamífero se inmuniza contra un antígeno objetivo si la respuesta inmune celular y/o humoral para el antígeno objetivo ocurre luego de la aplicación de los métodos de la invención.
- 10
- Origen natural: Como se utiliza aquí, el término "origen natural" significa que todo o partes de los mismos no son sintéticos y existen o se producen en la naturaleza.
- 15
- No natural: Como se utiliza aquí, el término de manera general significa no se la naturaleza, más específicamente, el término significa a partir de la mano del hombre.
- Origen no natural: Como se utiliza aquí, el término "origen no natural" de manera general significa sintético o no de la naturaleza; más específicamente, el término significa a partir de la mano del hombre.
- 20
- Antígeno o disposición ordenada o repetitiva determinante antigénica: Como se utiliza aquí, el término "antígeno o disposición ordenada o repetitiva determinante antigénica" de manera general se refiere a un patrón de repetición del antígeno o determinante antigénico, caracterizado por una disposición espacial típicamente y preferiblemente uniforme de los antígenos o determinantes antigénicos con respecto a la partícula núcleo y partícula similar a virus, respectivamente. En una realización de la invención, el patrón de repetición puede ser un patrón geométrico. Ejemplos típicos y preferidos de antígenos o disposiciones ordenadas o repetitivas determinantes antigénicas adecuadas son aquellas que poseen órdenes paracrystalinos estrictamente repetitivos de antígenos o determinantes antigénicos, preferiblemente con espacios de 0.5 a 30 nanómetros, más preferiblemente 5 a 15 nanómetros.
- 25
- Polipéptido: Como se utiliza aquí, el término "polipéptido" se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) ligados linealmente mediante enlaces amida (también conocidos como enlaces de péptido). Esto indica una cadena molecular de aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto. Así, los péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos y proteínas se incluyen dentro de la definición de polipéptido. Este término también está destinado a referirse a modificaciones post-expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, y similares. Un polipéptido recombinante o derivado no se traduce necesariamente de una secuencia de ácido nucleico designada. También se puede generar en cualquier forma, que incluye síntesis química.
- 30
- Residuo: Como se utiliza aquí, el término "residuo" significa un aminoácido específico en una estructura de polipéptido o una cadena lateral.
- 35
- Auto-antígeno: Como se utiliza aquí, el término "auto-antígeno" se refiere a proteínas codificadas por el ADN del anfitrión y los productos generados por las proteínas o el ARN codificado por el ADN del anfitrión se definen como auto. Adicionalmente, las proteínas que resultan de una combinación de dos o varias auto-moléculas o que representan una fracción de una auto-molécula y las proteínas que tienen dos auto-moléculas de alta homología como se definió anteriormente (>95%, preferiblemente >97%, más preferiblemente >99%) también se pueden considerar auto.
- 40
- Tratamiento: Como se utiliza aquí, los términos "tratamiento", "tratar", "tratado" o "tratando" se refieren a la profilaxis y/o terapia. Cuando se utiliza con respecto a una enfermedad infecciosa, por ejemplo, el término se refiere a un tratamiento profiláctico que incrementa la resistencia de un sujeto a infección con un patógeno, o en otras palabras, reduce la probabilidad que el sujeto se llegue a infectar con el patógeno o muestre signos de enfermedad atribuibles a la infección, así como también un tratamiento después que un sujeto se ha llegado a infectar con el fin de luchar contra la infección, por ejemplo, reducir o eliminar la infección o prevenir que se llegue a empeorar.
- 45
- 50

5 Vacuna: Como se utiliza aquí, el término "vacuna" se refiere a una formulación que contiene la composición de la presente invención y que está en una forma que es capaz de ser administrada a un animal. Típicamente, la vacuna comprende una solución salina convencional o medio acuoso amortiguado en el que se suspende o se disuelve la composición de la presente invención. En esta forma, la composición de la presente invención se puede utilizar de forma conveniente para evitar, aliviar, o de otra forma tratar una afección. Luego de la introducción en un anfitrión, la vacuna es capaz de provocar una respuesta inmune que incluye, pero no se limita a, la producción de anticuerpos y/o citoquinas y/o la activación de células T citotóxicas, células que presentan antígeno, células T auxiliares, células dendríticas y/o otras respuestas celulares.

10 Opcionalmente, la vacuna de la presente invención incluye adicionalmente un adyuvante que puede estar presente en una proporción mayor o menos con relación al compuesto de la presente invención.

15 Partícula similar a virus (VLP): Como se utiliza aquí, el término "partícula similar a virus" se refiere a una estructura que reensambla una partícula de virus. Más aún, una partícula similar a virus de acuerdo con la invención no es replicativa y no infecciosa debido a que esta carece de todo o parte del genoma vírico, en particular los componentes replicativos e infecciosos del genoma vírico. Una partícula similar a virus de acuerdo con la invención puede contener ácido nucleico distinto de su genoma. Una realización preferida y típica de una partícula similar a virus de acuerdo con la presente invención es un cápsido vírico tal como el cápsido vírico del bacteriófago de ARN correspondiente. Los términos "cápsido vírico" o "cápsido", como se utiliza intercambiamente aquí, se refiere a un ensamblaje macromolecular compuesto de subunidades de proteína vírica. Típicamente y preferiblemente, las subunidades de proteína vírica que se ensamblan dentro de un cápsido vírico y cápsido, respectivamente, tienen una estructura con una organización repetitiva inherente, en donde dicha estructura es, típicamente, esférica o tubular. Por ejemplo, los cápsidos de los bacteriófagos de ARN o HBcAg tienen una forma esférica de simetría icosaédrica. El término "estructura similar a cápsido" como se utiliza aquí, se refiere a un ensamblaje macromolecular compuesto de subunidades de proteína vírica que reensambla la morfología del cápsido en el sentido definido anteriormente pero que se desvía de el ensamblaje simétrico típico mientras se mantiene un grado suficiente de orden y repetitividad.

25 Partícula similar a virus de un bacteriófago: Como se utiliza aquí, el término "partícula similar a virus de un bacteriófago" se refiere a una partícula similar a virus que reensambla la estructura de un bacteriófago, que no es replicativa y no infecciosa, y que carece por lo menos el gen o genes que codifican la maquinaria de replicación del bacteriófago, y típicamente también carecen del gen o los genes que codifican la proteína o proteínas responsables de adhesión vírica a o entrada dentro del anfitrión. Esta definición debe, sin embargo, también abarcar la partícula similar a virus de los bacteriófagos, en los que el gen o genes mencionados anteriormente todavía están presentes pero inactivos, y, por lo tanto, también conduce a partícula no infecciosa y no replicativa similar a virus de un bacteriófago.

35 Proteína de la cubierta con VLP de bacteriófago de ARN: La estructura de cápsido formada del auto-ensamblaje de 180 subunidades de proteína de la cubierta con bacteriófago de ARN y opcionalmente que contiene el ARN anfitrión se denomina como "proteína de la cubierta con VLP de bacteriófago de ARN". Un ejemplo específico es el VLP de la proteína de recubrimiento Q β . En este caso particular, el VLP de la proteína de recubrimiento Q β también se puede ensamblar exclusivamente de las subunidades Q β CP (generadas por la expresión de un gen Q β CP que contiene, por ejemplo, un codón de parada TAA que precluye cualquier expresión de la proteína más larga A1 a través de supresión, ver Kozlovska, T.M., et al., Intervirology 39: 9-15 (1996)), o adicionalmente contiene las subunidades de proteína A1 en el ensamblaje de cápsido.

40 Partícula de virus: El término "partícula de virus" como se utiliza aquí se refiere a la forma morfológica de un virus. En algunos tipos de virus este comprende un genoma rodeado por un cápsido de proteína; otros tienen estructuras adicionales (por ejemplo, envolturas, colas, etc.).

45 Uno, un, o una: Cuando los términos "uno," "un," o "una" se utilizan en esta descripción, ellos significan "por lo menos uno" o "uno o más," a menos que se indique otra cosa.

50 Como será claro para aquellos expertos en la técnica, ciertas realizaciones de la invención involucran el uso de tecnologías de ácido nucleico recombinante tal como clonación, reacción de la cadena polimerasa, la purificación del ADN y el ARN, la expresión de proteínas recombinantes en células eucarióticas y procarióticas, etc. Tales metodologías son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica y se puede encontrar de forma conveniente en los manuales de métodos de laboratorio publicados (por ejemplo, Sambrook, J. et al., eds., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2da. edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel, F. et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John H. Wiley & Sons, Inc. (1997)). Fundamental laboratory techniques for working with tissue culture cell lines (Celis, J., ed., Cell Biology, Academic Press, 2nd edition, (1998)) y antibody-based technologies (Harlow, E. y Lane, D., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor

Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988); Deutscher, M.P., "Guide to Protein Purification," Meth. Enzymol. 128, Academic Press San Diego (1990); Scopes, R.K., Protein Purification Principles y Practice, 3rd ed., Springer-Verlag, New York (1994)) también se describen de forma adecuada en la bibliografía.

2. Composiciones y Métodos para Mejorar una Respuesta Inmune

5 La invención descrita proporciona composiciones y métodos para inducir una respuesta inmune contra el péptido A β 1-6 en un animal, que induce los anticuerpos capaces de unir las placas A β amiloide y el A β soluble. Las composiciones de la invención comprenden, o alternativamente consisten de (a) una partícula de núcleo con por lo menos un primer sitio de adhesión en donde dicha partícula de núcleo es un VLP de un bacteriófago de ARN; y (b) por lo menos un antígeno o determinante antigénico con por lo menos un segundo sitio de adhesión, en donde dicho antígeno o determinante antigénico es un péptido A β 1-6, y en donde dicho segundo sitio de adhesión se selecciona del grupo que consiste de (i) un sitio de adhesión de ocurrencia no natural con dicho antígeno o determinante antigénico; y (ii) un sitio de adhesión de ocurrencia natural con dicho antígeno o determinante antigénico, en donde dicho segundo sitio de adhesión es capaz de asociación a dicho primer sitio de adhesión a través de por lo menos un enlace no péptido; y en donde dicho antígeno o determinante antigénico y dicha partícula de núcleo interactúa a través de dicha asociación para formar una disposición de antígeno repetitivo y ordenado. Más específicamente, las composiciones de la invención comprenden, o alternativamente consisten de, una partícula similar a virus y por lo menos un antígeno o determinante antigénico, en donde el antígeno o determinante antigénico es un péptido A β 1-6, y en donde el por lo menos un antígeno o determinante antigénico se une a la partícula similar a virus con el fin de formar un antígeno repetitivo y disposición ordenada VLP. Adicionalmente, la invención permite de manera conveniente al practicante construir tal una composición, inter alia, para el tratamiento y/o prevención profiláctica de la enfermedad de Alzheimer. Las partículas similares a virus en el contexto de la actual solicitud se refiere a estructuras que reensamblan la partícula de virus pero que no son patogénicas. En general, la partícula similar a virus carece del genoma vírico y, por lo tanto, no es infecciosa. También, la partícula similar a virus se puede producir en grandes cantidades mediante expresión heteróloga y se puede purificar fácilmente.

25 En una realización, la partícula núcleo comprende, o es una partícula similar a virus de un bacteriófago de ARN, una partícula de cápsido vírico o una forma recombinante de la misma. Cualquier bacteriófago de ARN conocido en la técnica tiene una estructura de proteína de núcleo y/o recubrimiento repetitivo u ordenado que se puede seleccionar como una partícula de núcleo de la invención; ejemplos de bacteriófagos adecuados incluyen bacteriófago Q β , bacteriófago R17, bacteriófago M11, bacteriófago MX1, bacteriófago NL95, bacteriófago fr, bacteriófago GA, bacteriófago SP, bacteriófago MS2, bacteriófago f2, bacteriófago PP7 (por ejemplo, ver Tabla 1 en Bachmann, M.F. and Zinkernagel, R.M., Immunol. Today 17:553-558 (1996)).

35 En una realización adicional, la invención utiliza ingeniería genética de un virus para crear una fusión entre la proteína de envoltura vírica repetitiva y ordenada y un primer sitio de adhesión que se comprende por, o alternativamente o preferiblemente es una proteína heteróloga, péptido, determinante antigénico o un residuo de aminoácido reactivo de elección. Otras manipulaciones genéticas conocidas por aquellos expertos en la técnica puede ser incluidas en la construcción de la composición de la invención; por ejemplo, puede ser deseable restringir la capacidad de replicación del virus recombinante a través de la mutación genética. Adicionalmente, los virus utilizados para la presente invención son de replicación incompetente debido a la inactivación física o química o, como se indica, debido a la carencia de un genoma competente de replicación. La proteína vírica seleccionada para fusión al primer sitio de adhesión debe tener una estructura organizada y repetitiva. Tal una estructura organizada y repetitiva incluye organizaciones paracrystalinas con un espacio de 5-30 nm, preferiblemente 5-15 nm, en la superficie del virus. La creación de este tipo de proteína de fusión resultará en múltiples, ordenados y repetitivos primeros sitios de adhesión en la superficie del virus y refleja la organización normal de la proteína vírica nativa. Como se entenderá por aquellos en la técnica, el primer sitio de adhesión puede estar o ser una parte de cualquier proteína, polipéptido, azúcar, polinucleótido, péptido (aminoácido), polímero natural o sintético, un metabolito secundario adecuado o combinación de los mismos que puede servir para unir específicamente al antígeno o determinante antigénico que conduce a una disposición de antígeno repetitivo y ordenado.

50 Se puede utilizar una variedad de diferentes células anfitrionas recombinantes para producir una partícula núcleo basada en virus para la adhesión del antígeno o determinante antigénico. Así, se pueden utilizar numerosas células anfitrionas recombinantes en la práctica de la invención. Las células BHK, COS, Vero, HeLa y CHO son particularmente adecuadas para la producción de proteínas heterólogas debido a que ellas tienen el potencial de glucosilar las proteínas heterólogas en una forma similar a células humanas (Watson, E. et al., Glycobiology 4:227, (1994)) y se pueden seleccionar (Zang, M. et al., Bio/Technology 13:389 (1995)) o construir por ingeniería genética (Renner W. et al., Biotech. Bioeng. 4:476 (1995); Lee K. et al. Biotech. Bioeng. 50:336 (1996)) para crecer en medio libre de suero, así como también en suspensión.

La introducción de los vectores de polinucleótido dentro de las células anfitrionas se puede efectuar mediante los métodos descritos en manuales de laboratorio estándar (ver, por ejemplo, Sambrook, J. et al., eds., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2da. edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Capítulo 9; Ausubel, F. et al., eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John H. Wiley & Sons, Inc. (1997), Capítulo 16), que incluye métodos tal como electroporación, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección, microinyección, transfección mediada por lípido catiónico, transducción, carga de extracción, introducción balística, e infección. Los métodos para la introducción de las secuencias de ADN exógeno dentro de las células anfitrionas se discuten en Felgner, P. et al., Patente Estadounidense No. 5,580,859.

También se pueden utilizar secuencias de ARN empacadas para infectar las células anfitrionas. Estas secuencias de ARN empacas se pueden introducir en las células anfitrionas al agregarlas al medio de cultivo. Cuando se utilizan células de mamífero como células anfitrionas recombinantes para la producción de núcleos de partículas basadas en virus, estas células de manera general crecerán en el cultivo de tejido. Los métodos para hacer crecer las células en el cultivo son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Celis, J., ed., CELL BIOLOGY, Academic Press, 2da edición, (1998); Sambrook, J. et al., eds., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2da edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel, F. et al., eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John H. Wiley & Sons, Inc. (1997); Freshney, R., CULTURE OF ANIMAL CELLS, Alan R. Liss, Inc. (1983)).

En una realización preferida, la partícula núcleo es una partícula similar a virus, en donde la partícula similar a virus es una partícula recombinante similar a virus. El artesano experto puede producir los VLP utilizando tecnología de ADN recombinante y secuencias que codifican el virus que están fácilmente disponibles para el público. Por ejemplo, la secuencia codificante de una envoltura de virus o proteína de núcleo se puede construir por ingeniería para la expresión en un vector de expresión baculovirus utilizando un vector baculovirus comercialmente disponible, bajo el control regulador de un promotor de virus, con modificaciones apropiadas de la secuencia para permitir el ligado funcional de la secuencia codificante en la secuencia reguladora. La secuencia codificante de una envoltura de virus o proteína núcleo también se puede construir por ingeniería para expresión en un vector de expresión bacteriano, por ejemplo.

Ejemplos de VLP incluyen, fagos de ARN, Ty, fago fr, fago GA, fago AP205 y fago Q β .

Como será evidente fácilmente para aquellos expertos en la técnica, el VLP de la invención no se limita por cualquier forma específica. La particular se puede sintetizar químicamente o a través de un proceso biológico, que puede ser natural o no natural. Por vía de ejemplo, este tipo de realización incluye una partícula similar a virus o una forma recombinante de la misma.

En una realización más específica, el VLP puede comprender, o alternativamente consistir esencialmente de, o alternativamente consistir de polipéptidos recombinantes, o fragmentos de las mismas, que se seleccionan de polipéptidos recombinantes de bacteriófagos de ARN, polipéptidos recombinantes de Ty, polipéptidos recombinantes de fago fr, polipéptidos recombinantes de fago GA y polipéptidos recombinantes de fago Q β . La partícula similar a virus puede comprender adicionalmente, o alternativamente consistir esencialmente de, o alternativamente consistir de, uno o más fragmentos de tales polipéptidos, así como también variantes de tales polipéptidos. Las variantes de polipéptidos pueden compartir, por ejemplo, por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, o 99% de identidad en el nivel de aminoácido con sus contrapartes tipo natural.

En una realización preferida, la partícula similar a virus comprende, consiste esencialmente de, o alternativamente consiste de proteínas recombinantes, o fragmentos de las mismas, de un bacteriófago de ARN. Preferiblemente, el bacteriófago de ARN se selecciona del grupo que consiste de a) bacteriófago Q β ; b) bacteriófago R17; c) bacteriófago fr; d) bacteriófago GA; e) bacteriófago SP; f) bacteriófago MS2; g) bacteriófago M11; h) bacteriófago MX1; i) bacteriófago NL95; k) bacteriófago f2; 1) bacteriófago PP7, y m) bacteriófago AP205.

En otra realización preferida de la presente invención, la partícula similar a virus comprende, o alternativamente consiste esencialmente de, o alternativamente consiste de proteínas recombinantes, o fragmentos de las mismas, del bacteriófago de ARN Q β o del bacteriófago de ARN fr, o del bacteriófago de ARN AP205.

En una realización preferida adicional de la presente invención, las proteínas recombinantes comprenden, o alternativamente consisten esencialmente de, o alternativamente consisten de proteínas cubiertas de bacteriófagos de ARN.

Las proteínas cubiertas con bacteriófago de ARN que forman cápsidos o VLP, o fragmentos de las proteínas cubiertas con bacteriófago compatibles con auto-ensamble dentro de un cápsido o un VLP, son, por lo tanto, las

realizaciones preferidas adicionales de la presente invención. Las proteínas cubiertas con bacteriófago Q β , por ejemplo, se pueden expresar recombinantemente en *E. coli*. Adicionalmente, luego de tal expresión estas proteínas forman espontáneamente cápsidos. Adicionalmente, estos cápsidos forman una estructura con una organización repetitiva inherente.

5 Los ejemplos preferidos específicos de las proteínas cubiertas con bacteriófago que se pueden utilizar para preparar las composiciones de la invención incluyen las proteínas cubiertas de bacteriófagos de ARN tal como bacteriófago Q β (SEQ ID NO:4; Base de datos PIR, No. de Acceso VCBPQ β denominado como Q β CP y SEQ ID NO: 5; No. de Acceso AAA16663 denominado como proteína Q β A1), bacteriófago R17 (SEQ ID NO:6; PIR No. de Acceso VCBPR7), bacteriófago fr (SEQ ID NO:7; PIR No. de Acceso VCBPFR), bacteriófago GA (SEQ ID NO:8; No. de Acceso GenBank NP-040754), bacteriófago SP (SEQ ID NO:9; No. de Acceso GenBank CAA30374 denominado como SP CP y SEQ ID NO: 10; No. de Acceso NP 695026 denominado como proteína SP A1), bacteriófago MS2 (SEQ ID NO:11; PIR No. de Acceso VCBPM2), bacteriófago M11 (SEQ ID NO:12; No. de Acceso GenBank AAC06250), bacteriófago MX1 (SEQ ID NO:13; No. de Acceso GenBank AAC 14699), bacteriófago NL95 (SEQ ID NO:14; No. de Acceso GenBank AAC14704), bacteriófago f2 (SEQ ID NO: 15; No. de Acceso GenBank P03611), bacteriófago PP7 (SEQ ID NO: 16), y bacteriófago AP205 (SEQ ID NO: 28). Adicionalmente, la proteína A1 de bacteriófago Q β (SEQ ID NO: 5) o las formas truncadas de terminal C pierden tanto como 100, 150 o 180 aminoácidos de su terminal C se pueden incorporar en un ensamble cápsido de la proteína de recubrimiento Q β . De manera general, el porcentaje de la proteína Q β A1 relacionada a Q β CP en el ensamble de cápsido se limitará, con el fin de asegura la formación de cápsido.

20 La proteína de la cubierta Q β también se ha encontrado que se auto-ensambla en los cápsidos cuando se expresa en *E. coli* (Kozlovskaya TM. et al., GENE 137: 133-137 (1993)). Los cápsidos obtenidos o partículas similares a virus muestran una estructura de cápsido similar a fago icosaédrico con un diámetro de 25 nm y T=3 casi simétrico. Adicionalmente, se ha resuelto la estructura de cristal del Q β . El cápsido contiene 180 copias de la proteína de recubrimiento, que se unen en pentámeros covalentes y hexámeros mediante puentes de disulfuro (Golmohammadi, R. et al., Structure 4: 543-5554 (1996)) que conduce a una estabilidad remarcable del cápsido de la proteína de recubrimiento Q β . Los cápsidos o VLP hechos de proteína de la cubierta recombinante Q β pueden contener, sin embargo, subunidades no ligadas por medio de enlaces de disulfuro a otras subunidades dentro del cápsido, o ligadas incompletamente. Sin embargo, típicamente más de aproximadamente 80% de las subunidades se ligan por medio de puentes de disulfuro uno al otro dentro de un VLP. Así, luego de cargar el cápsido recombinante Q β en SDS-PAGE sin reducción, las bandas que corresponden a la proteína de la cubierta Q β monomérica así como también las bandas que corresponden al hexámero o pentámero de la proteína de recubrimiento Q β son visibles. Las subunidades ligadas incompletamente a disulfuro pueden aparecer como bandas de dímero, trímero o aún tetramero en SDS-PAGE sin reducción. La proteína de cápsido Q β también muestra resistencia inusual a los disolventes orgánicos y agentes desnaturalizantes. De manera sorprendente, nosotros hemos observado que las concentraciones de DMSO y acetonitrilo tan altas como 30%, y las concentraciones de Guanidinio tan altas como 1 M no afectan la estabilidad del cápsido. La alta estabilidad del cápsido de la proteína de recubrimiento Q β es una característica ventajosa, en particular, para su uso en inmunización y vacunación de mamíferos y humanos de acuerdo de la presente invención.

40 Luego de la expresión en *E. coli*, la metionina de terminal N de la proteína de recubrimiento Q β se remueve usualmente, como observamos mediante el secuenciamiento de Edman de terminal N como se describe en Stoll, E. et al. J. Biol. Chem. 252:990-993 (1977). El VLP compuesto de las proteínas de recubrimiento Q β en donde la metionina de terminal N no se ha removido, o los VLP que comprenden una mezcla de la proteína de recubrimiento Q β en donde la metionina de terminal N se divide o están presentes también dentro del alcance de la presente invención.

45 La partícula similar a virus preferida adicional de los bacteriófagos de ARN, en particular de Q β , de acuerdo con esta invención se describen en la WO 02/056905.

Las proteínas cubiertas con bacteriófago de ARN adicionales también han mostrado auto-ensamble luego de la expresión en un anfitrión bacteriano (Kastelein, RA. et al., Gene 23: 245-254 (1983), Kozlovskaya, TM. et al., Dokl. Akad. Nauk SSSR 287: 452-455 (1986), Adhin, MR. et al., Virology 170: 238-242 (1989), Ni, CZ., et al., Protein Sci. 5: 2485-2493 (1996), Priano, C. et al., J. Mol. Biol. 249: 283-297 (1995)). El cápsido bacteriófago Q β contiene, en adición a la proteína de la cubierta, la así llamada proteína ultraleida A1 y la proteína de maduración A2. El A1 se genera mediante supresión en el codón de parada UGA y tiene una longitud de 329 aa. El cápsido de la proteína de la cubierta recombinante de bacteriófago Q β utilizado en la invención carece de la proteína de lisis A2, y contiene ARN del anfitrión. La proteína de la cubierta de los bacteriófagos de ARN es una proteína de unión de ARN, e interactúa con el bucle de tallo del sitio de unión ribosómico del gen replicasa que actúa como un represor traduccional durante el ciclo de vida del virus. La secuencia y los elementos estructurales de la interacción se conocen (Witherell, GW. & Uhlenbeck, OC. Biochemistry 28: 71-76 (1989); Lim F. et al., J. Biol. Chem. 271: 31839-

31845 (1996)). Se sabe que El bucle de tallo y el ARN en general están involucrados en el ensamble de virus (Golmohammadi, R. et al., Structure 4: 543-5554 (1996)).

5 En una realización preferida adicional de la presente invención, la partícula similar a virus comprende, o
alternativamente consiste esencialmente de, o alternativamente consiste de proteínas recombinantes, o fragmentos
de las mismas, de un bacteriófago de ARN, en donde las proteínas recombinantes comprenden, alternativamente
consisten esencialmente de o alternativamente consisten de proteínas mutantes cubiertas de a RNA bacteriófago,
preferiblemente de proteínas mutantes cubiertas de los bacteriófagos de ARN mencionados anteriormente. En otra
10 realización preferida, las proteínas mutantes cubiertas del bacteriófago de ARN se han modificado mediante la
remoción de por lo menos un, o alternativamente por lo menos dos, residuos lisina por vía de sustitución, o mediante
la adición de por lo menos un residuo lisina por vía de sustitución; alternativamente, las proteínas mutantes cubiertas
del bacteriófago de ARN se han modificado mediante la eliminación de por lo menos un, o alternativamente por lo
menos dos, residuos lisina, o mediante la adición de por lo menos un residuo lisina por vía de inserción. La
eliminación, sustitución o adición de por lo menos un residuo lisina permite variar el grado de acoplamiento, es decir
15 la cantidad de péptido Aβ1-6 por subunidades del VLP del bacteriófago de ARN, en particular, para que coincida con
la medida y los requerimientos de la vacuna.

20 En otra realización preferida, la partícula similar a virus comprende, o alternativamente consiste esencialmente de, o
alternativamente consiste de proteínas recombinantes, o fragmentos de las mismas, del bacteriófago de ARN Qβ, en
donde las proteínas recombinantes comprenden, o alternativamente consisten esencialmente de, o alternativamente
consisten de proteínas cubiertas que tienen una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:4, o una mezcla de
proteínas cubiertas que tienen las secuencias de aminoácido de la SEQ ID NO:4 y de la SEQ ID NO: 5 o mutantes
de la SEQ ID NO: 5 y en donde la metionina de terminal N se divide preferiblemente.

25 En una realización preferida adicional de la presente invención, la partícula similar a virus comprende, consiste
esencialmente de o alternativamente consiste de proteínas recombinantes de Qβ, o fragmentos de las mismas, en
donde las proteínas recombinantes comprenden, o alternativamente consisten esencialmente de, o alternativamente
consisten de proteínas cubiertas mutantes Qβ. En otra realización preferida, estas proteínas cubiertas mutantes se
han modificado mediante la remoción de por lo menos un residuo lisina por vía de sustitución, o mediante la adición
de por lo menos un residuo lisina por vía de sustitución. Alternativamente, estas proteínas cubiertas mutantes se han
modificado mediante la eliminación de por lo menos un residuo lisina, o mediante la adición de por lo menos un
residuo lisina por vía de inserción.

30 Se exponen cuatro residuos lisina en la superficie del cápsido de la proteína de recubrimiento Qβ. Los mutantes Qβ,
para los que se reemplazan los residuos lisina expuestos por argininas también se pueden utilizar para la presente
invención. Los siguientes mutantes de proteína de la cubierta Qβ y VLP Qβ mutantes, así, se pueden utilizar en la
práctica de la invención: "Qβ-240" (Lys13-Arg; SEQ ID NO:17), "Qβ-243" (Asn 10-Lys; SEQ ID NO:18), "Qβ-250"
(Lys 2-Arg, Lys13-Arg; SEQ ID NO:19), "Qβ-251" (SEQ ID NO:20) y "Qβ-259" (Lys 2-Arg, Lys16-Arg; SEQ ID
35 NO:21). Así, en la realización preferida adicional de la presente invención, la partícula similar a virus comprende,
consiste esencialmente de o alternativamente consiste de proteínas recombinantes de proteínas cubiertas mutantes
Qβ, que comprenden proteínas que tienen una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo de a) la secuencia
de aminoácido de la SEQ ID NO: 17; b) la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:18; c) la secuencia de
aminoácido de la SEQ ID NO: 19; d) la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:20; y e) la secuencia de
40 aminoácido de la SEQ ID NO: 21. La construcción, expresión y purificación de las proteínas cubiertas Qβ indicadas
anteriormente, los VLP de proteína de la cubierta Qβ mutante y cápsidos, respectivamente, se describen en la WO
02/056905. En particular se denomina por lo tanto en el Ejemplo 18 de la solicitud mencionada anteriormente.

45 En una realización preferida adicional de la presente invención, la partícula similar a virus comprende, o
alternativamente consiste esencialmente de, o alternativamente consiste de proteínas recombinantes de Qβ, o
fragmentos de las mismas, en donde las proteínas recombinantes comprenden, consisten esencialmente de o
alternativamente consisten de una mezcla de uno de los mutantes Qβ anteriores y la proteína A1 correspondiente.

En una realización preferida adicional de la presente invención, la partícula similar a virus comprende, o
alternativamente consiste esencialmente de, o alternativamente consiste de proteínas recombinantes, o fragmentos
de las mismas, de fago de ARN AP205.

50 El genoma AP205 consiste de una proteína de maduración, una proteína de la cubierta, una replicasa y dos
estructuras de lectura abierta no presentes en los fagos relacionados; un gen de lisis y una estructura de lectura
abierta cumplen una función en la traducción del gen de maduración (Klovins,J., et al., J. Gen. Virol. 83: 1523-33
(2002)). La proteína de la cubierta AP205 se puede expresar a partir del plásmido pAP283-58 (SEQ ID NO: 27), que
es un derivado de pQb10 (Kozlovska, T. M., et al., Gene 137:133-37 (1993)), y que contiene un sitio de unión AP205
55 ribosómico. Alternativamente, la proteína recubierta AP205 se puede clonar en pQb185, en la dirección 3' del sitio de

unión ribosómico presente en el vector. Ambos métodos conducen a la expresión de la proteína y la formación de cápsidos como se describe en la solicitud de patente provisional Estadounidense copendiente con el título "Molecular Antigen Arrays" (Atty. Docket No. 1700.0310000) y que se ha presentado en Julio 17, 2002, que se incorpora como referencia en su totalidad. Los vectores pQb10 y pQb185 son vectores derivados del vector pGEM, y la expresión de los genes clonados en estos vectores se controla por el promotor trp (Kozlovskaja, T. M. et al., Gene 137:133-37 (1993)). El plásmido pAP283-58 (SEQ ID NO:27) comprende un sitio de unión ribosómico putativo AP205 en la siguiente secuencia, que está en la dirección 3' del sitio XbaI, e inmediatamente en la dirección 5' del codón de inicio ATG de la proteína de la cubierta AP205: tctagaATTTTCTGCGCACCCAT CCGGGTGGCGCCCAAAGTGAGGAAAATCAC atg (SEQ ID NO:57). El vector pQb1885 comprende una secuencia Shine Delagarno en la dirección 3' del sitio XbaI y en la dirección 5' del codón de inicio (tctagaTTAACCCAACGCGTAGGAG TCAGGCC atg (SEQ ID NO:58), secuencia Shine Delagamo subrayada).

En una realización preferida adicional de la presente invención, la partícula similar a virus comprende, o alternativamente consiste esencialmente de, o alternativamente consiste de proteínas cubiertas recombinantes, o fragmentos de las mismas, del fago de ARN Asp205.

Esta realización preferida de la presente invención, así, comprende proteínas cubiertas AP205 que forman cápsidos. Tales proteínas se expresan recombinantemente, o se preparan a partir de fuentes naturales. Las proteínas cubiertas AP205 producidas en las bacterias espontáneamente forman cápsidos, como se evidencia por Microscopía de Electrón (EM) e inmunodifusión. Las propiedades estructurales del cápsido formado por la proteína recubierta AP205 (SEQ ID NO: 28) y aquellos formados por la proteína recubierta del fago de ARN AP205 son casi indistinguibles cuando se ve en EM. Los VLP AP205 son altamente inmunogénicos, y se pueden ligar con antígenos y/o determinantes antigénicos para generar las construcciones de vacuna que exhiben los antígenos y/o determinantes antigénicos orientados en una forma repetitiva. Se provocan títulos altos contra los antígenos así exhibidos que muestran que los antígenos y/o determinante antigénicos unidos son accesibles para interactuar con las moléculas de anticuerpo y son inmunogénicos.

En una realización preferida adicional de la presente invención, la partícula similar a virus comprende, o alternativamente consiste esencialmente de, o alternativamente consiste de proteínas cubiertas mutantes recombinantes, o fragmentos de las mismas, del fago de ARN AP205.

Las formas mutantes competentes de ensamble de los VLP AP205, que incluyen la proteína de la cubierta AP205 con la sustitución de prolina en el aminoácido 5 a treonina (SEQ ID NO: 29), también se puede utilizar en la práctica de la invención y conduce a una realización preferida adicional de la invención. Estos VLP, VLP AP205 derivados de fuentes naturales, o partículas víricas AP205, se pueden unir a los antígenos para producir disposiciones repetitivas ordenadas de los antígenos de acuerdo con la presente invención.

La proteína de la cubierta mutante P205 P5-T se puede expresar del plásmido pAP281-32 (SEQ ID No. 30), que se deriva directamente de pQb185, y que contiene la proteína de la cubierta mutante AP205 del gen de proteína de la cubierta Qβ. Los vectores para la expresión de la proteína de la cubierta AP205 se transfectan en E. coli para la expresión de la proteína de la cubierta AP205.

Los métodos para la expresión de la proteína de la cubierta y la proteína de la cubierta mutante, respectivamente, que conducen al auto-ensamble en los VLP se describen en el Ejemplo 1. Las cepas E. coli adecuadas incluyen, pero no se limitan a, E. coli K802, JM 109, RR1. Los vectores adecuados y cepas y combinaciones de las mismas se pueden identificar mediante expresión de prueba de la proteína de la cubierta y la proteína de la cubierta mutante, respectivamente, mediante SDS-PAGE y formación de cápsido y ensamble al opcionalmente primero purificar los cápsidos mediante filtración de gel y posteriormente probarlos en un ensayo de inmunodifusión (prueba Ouchterlony) o Microscopía de Electrón (Kozlovskaja, T. M. et al., Gene 137:133-37 (1993)).

Las proteínas cubiertas AP205 expresadas a partir de los vectores pAP283-58 y pAP281-32 pueden carecer del aminoácido Metionina inicial, debido al procesamiento en el citoplasma de E. coli. Las formas divididas, no divididas de AP205 VLP o mezclas de las mismas son las realizaciones preferidas adicionales de la invención.

En una realización preferida adicional de la presente invención, la partícula similar a virus comprende, o alternativamente consiste esencialmente de, o alternativamente consiste de una mezcla de proteínas cubiertas recombinantes, o fragmentos de las mismas, del fago ARN AP205 y de las proteínas cubiertas recombinantes mutantes, o fragmentos de las mismas, del fago de ARN AP205.

En una realización preferida adicional de la presente invención, la partícula similar a virus comprende, o alternativamente consiste esencialmente de, o alternativamente consiste de fragmentos de proteínas cubiertas recombinantes o proteínas mutantes cubiertas recombinantes del fago de ARN AP205.

5 Los fragmentos de proteína de la cubierta recombinante AP205 capaces de ensamblar en un VLP y un cápsido, respectivamente también son útiles en la práctica de la invención. Estos fragmentos se pueden generar mediante eliminación, internamente o en el terminal de la proteína de la cubierta y la proteína de la cubierta mutante, respectivamente. Las inserciones en la proteína de la cubierta y la secuencia de proteína de la cubierta mutante o las fusiones de las secuencias de antígeno para la proteína de la cubierta y la secuencia de proteína de la cubierta mutante, y compatible con ensamble en un VLP, son realizaciones adicionales de la invención y conduce a proteínas cubiertas AP205 quiméricas, y partículas, respectivamente. El resultado de las inserciones, eliminaciones y fusiones a la secuencia de proteína de la cubierta y si esta es compatible con el ensamble en un VLP se puede determinar mediante microscopía de electrón.

15 Las partículas formadas por la proteína de la cubierta AP205, los fragmentos de proteína de la cubierta y las proteínas cubiertas quiméricas descritas anteriormente, se pueden aislar en forma pura mediante una combinación de las etapas de fraccionamiento mediante precipitación y de las etapas de purificación mediante filtración de gel utilizando por ejemplo las columnas Sefarosa CL-4B, Sefarosa CL-2B, Sefarosa CL-6B y combinaciones de las mismas. Otros métodos para aislar partículas similares a virus se conocen en la técnica, y se pueden utilizar para aislar las partículas similares a virus (VLP) de bacteriófago AP205. Por ejemplo, el uso de ultracentrifugación para aislar los VLP del retrotransposón Ty de levadura se describe en la Patente Estadounidense No. 4,918,166.

20 se ha determinado la estructura de cristal de varios bacteriófagos de ARN (Golmohammadi, R. et al., Structure 4:543-554 (1996)). Utilizando tal información, se pueden identificar los residuos expuestos a superficie y, así, se pueden modificar las proteínas cubiertas con fago de ARN de tal manera que uno o más residuos de aminoácido reactivos se pueden insertar por vía de inserción o sustitución. Como una consecuencia, aquellas formas modificadas de proteínas cubiertas con bacteriófago también se pueden utilizar por la presente invención. Así, las variantes de las proteínas que forman cápsidos o estructuras similares a cápsido (por ejemplo, proteínas cubiertas de bacteriófago Q β , bacteriófago R17, bacteriófago fr, bacteriófago GA, bacteriófago SP, bacteriófago AP205, y bacteriófago MS2) también se pueden utilizar para preparar las composiciones de la presente invención.

30 Aunque la secuencia de las proteínas variantes discutidas anteriormente diferirá de sus contrapartes tipo natural, estas proteínas variantes de manera general mantendrán la capacidad de formar cápsidos o estructuras similares a cápsido. Así, la invención incluye adicionales composición y composiciones de vacuna, respectivamente, que incluyen adicionalmente variantes de proteínas que forman cápsidos o estructuras similares a cápsido, así como también métodos para preparar tales composiciones y composiciones de vacuna, respectivamente, subunidades de proteína individual utilizadas para preparar tales composiciones, y moléculas de ácido nucleico que codifican estas subunidades de proteína. Así, se incluyen dentro del alcance de la invención formas variantes de las proteínas tipo natural que forman cápsidos o estructuras similares a cápsido y retienen la capacidad de asociar y forman cápsidos o estructuras similares a cápsido.

40 Como un resultado, la invención incluye adicionalmente composiciones y composiciones de vacuna, respectivamente, que comprenden proteínas, que comprenden, o alternativamente consisten esencialmente de, o alternativamente consisten de secuencia de aminoácidos que son por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, o 99% idénticas a las proteínas tipo natural que forman disposiciones ordenadas y que tienen una estructura repetitiva inherente, respectivamente.

Se incluyen adicionalmente dentro del alcance de la invención moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas utilizadas para preparar las composiciones de la presente invención.

45 En otras realizaciones, la invención incluye adicionalmente composiciones que comprenden proteínas, que comprenden, o alternativamente consisten esencialmente de, o alternativamente consisten de secuencia de aminoácidos que son por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, o 99% idénticos a cualquiera de las secuencias de aminoácido mostradas en la SEQ ID NOs:4-21.

50 Las proteínas adecuadas para uso en la presente invención también incluyen mutantes de truncamiento de terminal C de proteínas que forman cápsidos o estructuras similares a cápsido, o VLP. Ejemplos específicos de tales mutantes de truncamiento incluyen proteínas que tiene una secuencia de aminoácido mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO:4-21 en donde 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, o 17 aminoácidos que se han removido del terminal C. Típicamente, estos mutantes de truncamiento de terminal C retendrán la capacidad de formar cápsidos o estructuras similares a cápsido.

Las proteínas adicionales adecuadas para uso en la presente invención también incluyen mutantes de truncamiento de terminal N de proteínas que forman cápsidos o estructuras similares a cápsido. Ejemplos específicos de tales mutantes de truncamiento incluyen proteínas que tienen una secuencia de aminoácido mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO:4-21 en donde 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, o 17 aminoácidos se han removido del terminal N. Típicamente, estos mutantes de truncamiento de terminal N retendrán la capacidad de formar cápsidos o estructuras similares a cápsido.

Las proteínas adicionales adecuadas para uso en la presente invención incluyen mutantes de truncamiento de terminal N- y C que forman cápsidos o estructuras similares a cápsido. Los mutantes de truncamiento adecuados incluyen proteínas que tienen una secuencia de aminoácido mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO:4-21 en donde 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, o 17 aminoácidos se han removido del terminal N y 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, o 17 aminoácidos se han removido del terminal C. Típicamente, estos mutantes de truncamiento de terminal N y de terminal C retendrán la capacidad de formar cápsidos o estructuras similares a cápsido.

La invención incluye adicionalmente composiciones que comprenden proteínas que comprenden, o alternativamente consisten esencialmente de, o alternativamente consisten de, secuencia de aminoácidos que son por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, o 99% idénticas a los mutantes de truncamiento descritos anteriormente.

La invención así incluye composiciones y composiciones de vacuna preparadas a partir de proteínas que forman cápsidos o VLP, métodos para preparar estas composiciones de subunidades individuales de proteína y VLP o cápsidos, métodos para preparar estas subunidades individuales de proteína, moléculas de ácido nucleico que codifican estas subunidades, y métodos para vacunar y/o provocar las respuestas inmunológicas en los individuos utilizando estas composiciones de la presente invención.

Como se indicó previamente, la invención incluye partículas similares a virus o formas recombinantes de las mismas.

En una realización preferida adicional de la presente invención, el por lo menos un péptido A β 1-6 se une a dicha partícula similar a virus y partícula núcleo, respectivamente, mediante por lo menos un enlace covalente. Preferiblemente, el por lo menos un péptido A β 1-6 se une a la partícula similar a virus y partícula núcleo, respectivamente, mediante por lo menos un enlace covalente, dicho enlace covalente es un enlace no péptido que conduce a una disposición de péptido A β 1-6 y conjugado de péptido A β 1-6 -VLP, respectivamente. Esta disposición y conjugado de péptido A β 1-6, respectivamente, tiene típicamente y preferiblemente una estructura repetitiva y ordenada debido a por lo menos un péptido A β 1-6 que se une al VLP y la partícula núcleo, respectivamente, en una forma orientada. La formación de una disposición VLP o conjugado de péptido A β 1-6 ordenado y repetitivo, respectivamente, se asegura mediante una forma orientada y dirigida así como también unión definida y adhesión, respectivamente, del por lo menos un péptido A β 1-6 al VLP y la partícula núcleo, respectivamente, como será evidente adelante. Adicionalmente, la estructura organizada y repetitiva altamente inherente típica de los VLP y las partículas núcleo, respectivamente, contribuye ventajosamente a la exhibición del péptido A β 1-6 en una forma altamente ordenada y repetitiva que conduce a una disposición y conjugado VLP de péptido A β 1-6 repetitivo y altamente organizado, respectivamente.

Por lo tanto, los conjugados y disposiciones preferidas de la invención, respectivamente, difieren de los conjugados de la técnica anterior en su estructura altamente organizada, dimensiones, y en la repetitividad del antígeno en la superficie de la disposición. La realización preferida de esta invención, adicionalmente, permite la expresión de la partícula en un anfitrión de expresión garantizando el plegado apropiado y el ensamble del VLP, al que luego se acopla adicionalmente el antígeno, es decir el péptido A β 1-6.

La presente invención describe métodos para la unión del péptido A β 1-6 a VLP. Como se indica, en un aspecto de la invención, el péptido A β 1-6 se une al VLP por medio de reticulación química, típicamente y preferiblemente al utilizar un reticulador heterobifuncional. Se conocen varios reticuladores hetero-bifuncionales en la técnica. En realizaciones preferidas, el reticulador hetero-bifuncional contiene un grupo funcional que puede reaccionar con primero los sitios de adhesión preferidos, es decir con el grupo amino de cadena lateral de residuo lisina del VLP o por lo menos una subunidad VLP, y un grupo funcional adicional que puede reaccionar con un segundo sitio de adhesión preferido, es decir un residuo cisteína fusionado al péptido A β 1-6 y opcionalmente también hecho disponible para reacción mediante reducción. La primera etapa del procedimiento, típicamente llamado la derivación, es la reacción del VLP con el reticulador. El producto de esta reacción es un VLP activado, también llamado portador activado. En la segunda etapa, se remueve el reticulador que no reacciona utilizando métodos usuales tal como filtración de gel o diálisis. En la tercera etapa, el péptido A β 1-6 se hace reaccionar con el VLP activado, y esta etapa se llama típicamente la etapa de acoplamiento. El péptido A β 1-6 que no reacciona opcionalmente se puede remover en una cuarta etapa, por ejemplo mediante diálisis. Se conocen en la técnica varios reticuladores hetero-bifuncionales. Estos incluyen los reticuladores preferidos SMPH (Pierce), Sulfo- MBS, Sulfo-EMCS, Sulfo-GMBS, Sulfo-SIAB, Sulfo-SMPB, Sulfo-SMCC, SVSB, SIA y otros reticuladores disponibles por ejemplo de la Compañía Pierce Chemical

(Rockford, IL, USA), y que tiene un grupo funcional que reacciona hacia el grupo aminos y un grupo funcional que reacciona hacia los residuos cisteína. Los reticuladores mencionados anteriormente todos conducen a la formación del ligador tioéter. Otra clase de reticuladores adecuados en la práctica de la invención se caracteriza por la introducción de un ligado de disulfuro entre el péptido Aβ1-6 y el VLP luego de acoplamiento. Los reticuladores preferidos que pertenecen a esta clase incluyen por ejemplo SPDP y Sulfo-LC-SPDP (Pierce). El grado de derivación del VLP con el reticulador se puede influenciar mediante varias condiciones experimentales tal como la concentración de cada uno de los patrones de reacción, el exceso de un reactivo sobre el otro, el pH, la temperatura y la resistencia iónica. El grado de acoplamiento, es decir la cantidad de péptido Aβ1-6 por subunidades del VLP se pueden ajustar al variar las condiciones experimentales descritas anteriormente para que coincida con los requerimientos de la vacuna.

Un método particularmente favorecido de la unión del péptido Aβ1-6 al VLP, es el ligado de un residuo lisina en la superficie del VLP con un residuo cisteína en el péptido Aβ1-6. En algunas realizaciones, se puede requerir la fusión de un ligador de aminoácido que contiene un residuo cisteína, como un segundo sitio de adhesión o como una parte del mismo, a Aβ1-6 para acoplar al VLP.

En general, se favorecen los ligadores flexibles de aminoácidos. Ejemplos del ligador de aminoácido se seleccionan del grupo que consiste de: (a) CGG; (b) ligador 1 gama de terminal N; (c) ligador 3 gama de terminal N; (d) regiones de bisagra Ig; (e) ligadores glicina de terminal N; (f) $(G)_kC(G)_n$ con $n=0-12$ y $k=0-5$ (SEQ ID NO: 34); (g) ligadores glicina-serina de terminal N; (h) $(G)_kC(G)_m(S)_l(GGGGS)_n$ con $n=0-3$, $k=0-5$, $m=0-10$, $l=0-2$ (SEQ ID NO: 35); (i) GGC; (k) GGC-NH₂; (l) ligador 1 gama de terminal C; (m) ligador 3 gama de terminal C; (n) ligadores glicina de terminal C; (o) $(G)_nC(G)_k$ con $n=0-12$ y $k=0-5$ (SEQ ID NO: 36); (p) ligadores glicina-serina de terminal C; (q) $(G)_m(S)_l(GGGGS)_n(G)OC(G)_k$ con $n=0-3$, $k=0-5$, $m=0-10$, $l=0-2$, y $o=0-8$ (SEQ ID NO: 37).

Ejemplos adicionales de los ligadores de aminoácido son la región de bisagra de Inmunoglobulinas, ligadores serina glicina $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 38), y ligadores glicina $(G)_n$ todos adicionalmente contienen un residuo cisteína como un segundo sitio de adhesión y opcionalmente residuos glicina adicionalmente. Típicamente los ejemplos preferidos de dichos ligadores de aminoácido son gama 1 de terminal N: CGDKTHTSPP (SEQ ID NO: 39); gama 1 de terminal C: DKTHTSPPCG (SEQ ID NO: 40); gama 3 de terminal N: CGGPKPSTPPGSSGGAP (SEQ ID NO: 41); gama 3 de terminal C: PKPSTPPGSSGGAPGGCG (SEQ ID NO: 42); ligador de glicina de terminal N: GCGGGG (SEQ ID NO: 43) y ligador de glicina de terminal C: GGGGCG (SEQ ID NO: 44).

Otros ligadores de aminoácido particularmente adecuados en la práctica de la invención, cuando un péptido Aβ hidrófobo se une a un VLP, son CGKKGG (SEQ ID NO: 46), o CGDEGG (SEQ ID NO: 31) para los ligadores de terminal N, o GGKKGC (SEQ ID NO: 45) y GGEDGC (SEQ ID NO: 32), para los ligadores de terminal C. Para los ligadores de terminal c, el terminal cisteína opcionalmente se amida en el terminal C.

En las realizaciones preferidas de la presente invención, ligadores GGCG (SEQ ID NO: 47), GGC o GGC-NH₂ ("NH₂" significa amidación) en el terminal C del péptido o CGG en su terminal N se prefieren como los ligadores de aminoácido. En general, los residuos glicina se insertarán entre los aminoácidos de masa y la cisteína a ser utilizada como segundo sitio de adhesión, para evitar el impedimento estérico potencial del aminoácido de masa en la reacción de acoplamiento. En la realización más preferida de la invención, el ligador de aminoácido GGC-NH₂ se fusiona en el terminal C de Aβ1-6.

El residuo cisteína presente en el péptido Aβ1-6 en su estado reducido tienen que reaccionar con el reticulador heterobifuncional en el VLP activado, que es una cisteína libre o tiene disponible un residuo cisteína con un grupo sulfhidrilo libre. En el caso en donde el residuo cisteína funcione como sitio de unión está en una forma oxidizada, por ejemplo si este forma un puente disulfuro, se requiere la reducción de este puente disulfuro con por ejemplo DTT, TCEP o β-mercaptoetanol. Las bajas concentraciones del agente de reducción son compatibles con el acoplamiento como se describe en la WO 02/056905, las concentraciones mayores inhiben la reacción de acoplamiento, como un artesano experto lo sabrá, en cuyo caso el reductor se ha removido o su concentración se reduce antes de acoplamiento, por ejemplo mediante diálisis, filtración de gel o HPLC de fase inversa.

La unión del péptido Aβ1-6 al VLP al utilizar un reticulador hetero-bifuncional de acuerdo con los métodos preferidos descritos anteriormente, permite el acoplamiento del péptido Aβ1-6 al VLP en una forma orientada. Otros métodos de unión del péptido Aβ1-6 al VLP incluyen los métodos en donde el péptido Aβ1-6 se reticula al VLP utilizando la carbodiimida EDC, y NHS. En métodos adicionales, el péptido Aβ1-6 se une al VLP utilizando un reticulador homobifuncional tal como glutaraldehído, DSG, BM[PEO]4, BS3, (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA) o otros reticuladores homobifuncionales conocidos con grupos funcionales reactivos hacia los grupos amina o los grupos carboxilo del VLP.

Otros métodos para la unión del VLP a un péptido A β 1-6 incluye métodos en donde se biotinila el VLP, y el péptido A β 1-6 se expresa como una proteína de fusión-estreptavidina, o métodos en donde el péptido A β 1-6 y el VLP se biotinilan, por ejemplo como se describe en la WO 00/23955. En este caso, el péptido A β 1-6 se puede unir primer a estreptavidina o avidina al ajustar la relación del péptido A β 1-6 a estreptavidina de tal manera que los sitios de unión libres están aún disponibles para la unión del VLP, que se agrega en la siguiente etapa. Alternativamente, todos los componentes se pueden mezclar en una reacción "un crisol". Otros pares de ligando-receptor, en donde está disponible una forma soluble del receptor y del ligando, y son capaces de ser reticulados en el VLP o el péptido A β 1-6, se pueden utilizar como agentes de unión para unir el péptido A β 1-6 al VLP. Alternativamente, el ligando o el receptor se pueden fusionar al péptido A β 1-6, y con el fin de mediar la unión al VLP químicamente unido o fusionado al receptor, o al ligando respectivamente. También se puede efectuar la fusión mediante inserción o sustitución.

Como ya se indicó, en una realización favorecida de la presente invención, el VLP es el VLP de un bacteriófago de ARN, y en una realización más preferida, el VLP es el VLP de la proteína recubierta Q β del bacteriófago de ARN.

Una o varias moléculas de antígeno, es decir un péptido A β 1-6, se puede unir a una subunidad del cápsido o VLP de las proteínas cubiertas con los bacteriófagos de ARN, preferiblemente a través de los residuos lisina expuestos del VLP de bacteriófagos de ARN, si es estéricamente permisible. Una característica específica del VLP de la proteína de la cubierta a bacteriófagos de ARN y en particular de la proteína VLP cubierta Q β es así la posibilidad de acoplar varios antígenos por subunidad. Esto permite la generación de una disposición densa de antígeno.

En una realización preferida de la invención, la unión y adhesión, respectivamente, del por lo menos un péptido A β 1-6 a la partícula similar a virus es por medio de interacción y asociación, respectivamente, entre por lo menos un primer sitio de adhesión de la partícula similar a virus y por lo menos una segunda adhesión del antígeno o determinante antigénico.

Los VLP o cápsidos de la proteína de recubrimiento Q β exhiben un número definido de residuos lisina en su superficie, con una topología definida con tres puntos de residuos lisina hacia el interior del cápsido y que interactúa con el ARN, y cuatro de otros residuos lisina expuestos al exterior del cápsido. Estas propiedades definidas favorecen la adhesión de los antígenos al exterior de la partícula, que en el interior de la partícula en donde los residuos lisina interactúan con el ARN. Los VLP de otras proteínas cubiertas con fago de ARN también tienen un número definido de residuos lisina en su superficie y una topología definida de estos residuos lisina.

En las realizaciones preferidas adicionales de la presente invención, el primer sitio de adhesión es un residuo lisina y/o el segundo sitio de adhesión comprende el grupo sulfhidrilo o un residuo cisteína. En una realización muy preferida de la presente invención, el primer sitio de adhesión es un residuo lisina y el segundo sitio de adhesión es un residuo cisteína.

En realizaciones muy preferidas de la invención, el péptido A β 1-6 se une por medio de un residuo cisteína, a residuos lisina del VLP de la proteína de la cubierta de fago de ARN, y en particular al VLP de la proteína de recubrimiento Q β .

Otra ventaja de los VLP derivados de los fagos de ARN es su alta expresión producida en las bacterias que permite la producción de grandes cantidades de material a costo asequible.

Como se indica, los conjugados y disposiciones de la invención, respectivamente, difieren de los conjugados de la técnica anterior en su estructura altamente organizada, dimensiones, y en la repetitividad del antígeno en la superficie de la disposición. Más aún, el uso de los VLP como portadores permite la formación de disposiciones y conjugados de antígeno robustos, respectivamente, con densidad variable de antígeno. En particular, el uso de VLP de fagos de ARN, y por lo tanto en particular el uso del VLP de la proteína de la cubierta Q β de fago de ARN que permite lograr densidad de epítipo muy alta. En particular, una densidad de más de 1.5 epítopos por subunidad se puede hacer reaccionar al acoplar el péptido humano A β 1-6 al VLP de la proteína de recubrimiento Q β . La preparación de las composiciones de VLP de las proteínas cubiertas de fago de ARN con una densidad alta de epítipo se puede efectuar utilizando la enseñanza de esta solicitud. En la realización preferida de la invención, cuando se acopla un péptido A β 1-6 al VLP de la proteína de recubrimiento Q β , se prefiere un número promedio del péptido A β 1-6 por subunidad de 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, o mayor.

El segundo sitio de adhesión, como se definió aquí, puede estar presente naturalmente o no naturalmente con el antígeno o el determinante antigénico. En el caso de la ausencia de un segundo sitio de adhesión de ocurrencia natural adecuado en el antígeno o determinante antigénico, tal un, entonces segundo sitio de adhesión no natural se ha construido con ingeniería para el antígeno.

Como se describió anteriormente, se exponen cuatro residuos lisinas en a superficie del VLP de la proteína de recubrimiento Q β . Típicamente estos residuos se derivan luego de la reacción con una molécula reticuladora. En el caso en donde no todos los residuos lisina expuestos se pueden acoplar a un antígeno, los residuos lisina que han reaccionado con el reticulador se dejan con una molécula reticuladora adherida al grupo amino ϵ después de la etapa de derivación. Esto conduce a la desaparición de una o varias cargas positivas, que pueden ser perjudiciales para la solubilidad y estabilidad del VLP. Al reemplazar algunos de los residuos lisina con argininas, como en los mutantes de proteína de la cubierta Q β descritos adelante, evitamos la desaparición excesiva de cargas positivas debido a que los residuos arginina no reaccionan con el reticulador. Más aún, el reemplazo de los residuos lisina por argininas puede conducir a disposiciones de antígeno más definidas, como están disponibles pocos sitios para reaccionar con el antígeno.

De acuerdo con lo anterior, se reemplazan los residuos lisina expuestos por argininas en los siguientes mutantes de proteína de la cubierta Q β y VLP mutantes Q β descritos en esta solicitud: Q β -240 (Lys13-Arg; SEQ ID NO: 17), Q β -250 (Lys 2-Arg, Lys13-Arg; SEQ ID NO: 19) y Q β -259 (Lys 2-Arg, Lys16-Arg; SEQ ID NO:21). Las construcciones se clonan, las proteínas se expresan, los VLP se purifican y se utilizan para acoplamiento al péptido y los antígenos de proteína. El Q β -251; (SEQ ID NO: 20 también se construye, y es guía de cómo expresar, purificar y acoplar el VLP de la proteína de la cubierta Q β -251 que se puede encontrar a través de la solicitud.

En una realización adicional, describimos una proteína de la cubierta mutante Q β con un residuo lisina adicional, adecuado para obtener aún disposiciones de mayor densidad de antígenos. Esta proteína de la cubierta mutante Q β , Q β -243 (Asn 10-Lys; SEQ ID NO: 18), se clona, la proteína se expresa, y el cápsido o VLP se aísla y purifica, que muestra que la introducción del residuo lisina adicional es compatible con auto-ensamble de las subunidades a un cápsido o VLP. Así, las disposiciones o conjugados de péptido A β 1-6, respectivamente, se pueden preparar utilizando VLP de la proteína de recubrimiento Q β mutante. Un método particularmente favorecido de la adhesión de los antígenos a los VLP, y en particular a los VLP de las proteínas de cubiertas de fago de ARN es el ligado de un residuo lisina presente en la superficie del VLP de las proteínas cubiertas de fago de ARN con un residuo cisteína agregado al antígeno, es decir el péptido A β 1-6. Con el fin de que sea efectivo un residuo cisteína como el segundo sitio de adhesión, puede estar disponible un grupo sulfhidrilo para acoplamiento. Así, un residuo cisteína está en su estado reducido, esto es, una cisteína libre o un residuo cisteína con un grupo sulfhidrilo libre que está disponible. En el momento en que el residuo cisteína funciona como el segundo sitio de adhesión está en una forma oxidizada, por ejemplo si este forma un puente disulfuro, se requiere la reducción de este puente disulfuro con por ejemplo DTT, TCEP o β -mercaptoetanol. La concentración del reductor, y el exceso molar del reductor sobre el antígeno se ha ajustado para cada antígeno. Un rango de titulación, partiendo de concentraciones tan bajas como 10 μ M o menos, hasta 10 a 20 mM o más reductos si se requiere se prueba, y se evalúa el acoplamiento del antígeno al portador. Aunque son compatibles bajas concentraciones del reductor con la reacción de acoplamiento como se describe en la WO 02/056905, las concentraciones mayores inhiben la reacción de acoplamiento, como lo sabrá un experto en la técnica, en cuyo caso el reductor se ha removido o se reduce su concentración, por ejemplo mediante diálisis, filtración de gel o HPLC de fase inversa. Ventajosamente, el pH del amortiguador de equilibrio o diálisis es menor de 7, preferiblemente 6. Tiene que ser probada la compatibilidad del amortiguador de pH bajo con la actividad del antígeno o la estabilidad.

La densidad del epítipo en el VLP de las proteínas cubiertas de fago de ARN se puede modular mediante la elección del reticulador y otras condiciones de reacción. Por ejemplo, los reticuladores Sulfo-GMBS y SMPH típicamente permite alcanzar el epítipo de alta densidad. La derivación se influencia positivamente mediante la alta concentración de reactivos, y la manipulación de las condiciones de reacción se puede utilizar para controlar el número de antígenos acoplados a los VLP de las proteínas cubiertas de fago de ARN, y en particular a los VLP de la proteína de recubrimiento Q β .

Antes del diseño de un segundo sitio de adhesión no natural se ha seleccionado la posición en la que este se debe fusionar, insertar o de manera general construir por ingeniería. La selección de la posición del segundo sitio de adhesión, por medio del ejemplo, se puede basar en una estructura de cristal del antígeno. Tal una estructura de cristal del antígeno puede proporcionar información de la disponibilidad del terminal C- o N de la molécula (determinado por ejemplo de su accesibilidad al disolvente), o de la exposición del disolvente a residuos adecuados para uso como los segundos sitio de adhesión, tal como residuos cisteína. Los puentes de disulfuro expuestos, como es el caso para los fragmentos Fab, también puede ser una fuente de un segundo sitio de adhesión, debido a que ellos de manera general se pueden convertir a residuos cisteína únicos a través de reducción moderada, con por ejemplo 2-mercaptoetilamina, TCEP, β -mercaptoetanol o DTT. Se seleccionarán las condiciones de reducción moderadas que no afectan la inmunogenicidad del antígeno. En general, en el caso en donde la inmunización con un auto-antígeno ayuda a inhibir la interacción de este auto-antígeno con sus ligandos naturales, el segundo sitio de adhesión se agregará de tal manera que esto permite la generación de anticuerpos contra el sitio de interacción con los ligandos naturales. Así, la ubicación del segundo sitio de adhesión se seleccionará de tal manera que se evita el impedimento estérico del segundo sitio de adhesión o cualquier ligador de aminoácido que contiene el mismo. En

realizaciones adicionales, se desea una respuesta de anticuerpo directa en un sitio distinto del sitio de interacción del auto-antígeno con su ligando natural. En tales realizaciones, el segundo sitio de adhesión se puede seleccionar de tal manera que este evita la generación de anticuerpos contra el sitio de interacción del auto-antígeno con sus ligandos naturales.

- 5 Otros criterios para seleccionar la posición del segundo sitio de adhesión incluyen el estado de oligomerización del antígeno, el sitio de oligomerización, la presencia de un cofactor, y la disponibilidad de la evidencia experimental que describe los sitios de estructura del y la secuencia en donde es compatible la modificación del antígeno con la función del auto-antígeno, o con la generación de los anticuerpos que reconocen el auto-antígeno.

10 En la mayor parte de las realizaciones preferidas, el péptido A β 1-6 comprende un segundo sitio de adhesión único o un sitio de adhesión reactivo único capaz de asociación con el primer sitio de adhesión en la partícula núcleo y los VLP o las subunidades VLP, respectivamente. Esto asegura una unión uniforme y definida y asociación, respectivamente, del por lo menos uno, pero típicamente más de uno, preferiblemente más de 10, 20, 40, 80, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 360, 400, 450 antígenos a la partícula núcleo y VLP, respectivamente. La provisión de un segundo sitio de adhesión único o un sitio de adhesión reactivo único en el antígeno, así, asegura un tipo
15 uniforme y único de unión y asociación, respectivamente que conduce a una disposición repetitiva y muy altamente ordenada. Por ejemplo, si la unión y asociación, respectivamente, se efectúa por medio de una interacción lisina- (como el primer sitio de adhesión) y cisteína- (como un segundo sitio de adhesión), se asegura, de acuerdo con esta realización preferida de la invención, que solo un residuo cisteína por antígeno, independiente si este residuo cisteína está presente naturalmente o no naturalmente en el antígeno, es capaz de unir y asociar, respectivamente,
20 con el VLP y el primer sitio de adhesión de la partícula núcleo, respectivamente.

En algunas realizaciones, la construcción por ingeniería de un segundo sitio de adhesión en el antígeno requiere la fusión de un ligador de aminoácido que contiene un aminoácido adecuado como un segundo sitio de adhesión de acuerdo con las descripciones de esta invención. Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención, un ligador de aminoácido se une al antígeno o el determinante antigénico por medio de por lo menos un enlace
25 covalente. Preferiblemente, el ligador de aminoácido comprende, o alternativamente consiste de, el segundo sitio de adhesión. En una realización preferida adicional, el ligador de aminoácido comprende un grupo sulfhidrilo o un residuo cisteína. En otra realización preferida, el ligador de aminoácido es cisteína. Algunos criterios de selección del ligador de aminoácido así como también las realizaciones preferidas adicionales del ligador de aminoácido de acuerdo con la invención ya se han mencionado anteriormente.

30 En una realización preferida adicional de la invención, el por lo menos un antígeno o determinante antigénico, es decir el péptido A β 1-6 se fusiona a la partícula similar a virus. Como se destacó anteriormente, un VLP se compone típicamente de por lo menos una subunidad que ensambla dentro de un VLP. Así, en una realización preferida adicional de la invención, el antígeno o determinante antigénico, preferiblemente el por lo menos un péptido A β 1-6 se fusiona a por lo menos una subunidad de la partícula similar a virus o de una proteína capaz de ser incorporada
35 en un VLP que genera una subunidad quimérica de VLP de la proteína fusión de péptido A β 1-6.

La fusión de los péptidos A β 1-6 se puede efectuar mediante inserción en la secuencia de subunidad VLP, o mediante fusión al terminal N- o C de la subunidad VLP o proteína capaz de ser incorporada en un VLP. De aquí en adelante, cuando se denominan como proteínas fusión de un péptido a una subunidad VLP, se abarcan la fusión a los extremos de la secuencia de subunidad o la inserción interna del péptido dentro de la secuencia de subunidad.

40 La fusión también se puede efectuar al insertar las secuencias de péptido A β 1-6 en una variante de una subunidad VLP en donde parte de la secuencia de subunidad se ha eliminado, que se denominan adicionalmente como mutantes de truncamiento. Los mutantes de truncamiento pueden tener terminal N- o C, o eliminaciones internas de parte de la secuencia de la subunidad VLP. Por ejemplo, el HBcAg VLP específico con, por ejemplo, la eliminación de los residuos de aminoácido 79 a 81 es un mutante de truncamiento con una eliminación interna. La fusión de los péptidos A β 1-6 al terminal N- o C de las subunidades VLP de los mutantes de truncamiento también conduce a las realizaciones de la invención. De forma similar, la fusión de un epítipo en la secuencia de la subunidad VLP también se puede efectuar mediante sustitución, en donde por ejemplo para el HBcAg VLP específico, se reemplazan los aminoácidos 79-81 con un epítipo externo. Así, fusión, como se denomina de aquí en adelante, se puede efectuar mediante la inserción de la secuencia de péptido A β 1-6 en la secuencia de una subunidad VLP, mediante sustitución
50 de parte de la secuencia de la subunidad VLP con el péptido A β 1-6, o mediante una combinación de eliminación, sustitución o inserciones.

La subunidad de péptido quimérico A β 1-6-VLP será en general capaz de auto-ensamble en un VLP. El VLP exhibe epítopos fusionados en las subunidades también denominados aquí como VLP quiméricos. Como se indicó, la partícula similar a virus comprende o alternativamente se compone de por lo menos una subunidad VLP. En una
55 realización adicional de la invención, la partícula similar a virus comprende o alternativamente se compone de una

mezcla de subunidades químicas VLP y subunidades no químicas VLP, es decir las subunidades VLP no tienen un antígeno fusionado allí, que conduce a las así llamadas partículas mosaico. Puede ser ventajoso asegurar la formación de, y ensamblar a un VLP. En aquellas realizaciones, la proporción de las subunidades químicas VLP puede ser 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% o más.

5 Se puede agregar residuos de aminoácido flanqueados al extremo de la secuencia del péptido o epítipo a ser fusionado al extremo de la secuencia de la subunidad de un VLP, o para inserción interna de tal secuencia peptídica en la secuencia de la subunidad de un VLP. Los residuos glicina y serina favorecen particularmente los aminoácidos a ser utilizados en las secuencias de flanqueo agregadas al péptido a ser fusionado. Los residuos glicina confieren flexibilidad adicional, que puede disminuir el efecto potencialmente desestabilizante de fusionar una secuencia
10 externa dentro de la secuencia de una subunidad VLP.

En una realización preferida adicional de la invención, el VLP es un VLP de un bacteriófago de ARN. Las proteínas cubiertas de bacteriófagos de ARN principales ensamblan espontáneamente los VLP luego de la expresión en bacterias, y en particular en *E. coli*. Ejemplos específicos de proteínas cubiertas de bacteriófago que se pueden utilizar para preparar las composiciones de la invención incluyen las proteínas cubiertas de bacteriófagos de ARN tal como bacteriófago Q β (SEQ ID NO:4; base de datos PIR, No. de Acceso VCBPQ β denominado como Q β CP y SEQ ID NO: 5; No. de Acceso AAA16663 denominado como proteína Q β A1) y bacteriófago fr (SEQ ID NO: 7; PIR No. de Acceso VCBPFR).

En una realización más preferida, el por lo menos un péptido A β 1-6 se fusiona a una proteína de la cubierta Q β . Se han descrito las construcciones de proteína de fusión en donde los epítopos se han fusionado al terminal C de una forma truncada de la proteína A1 de Q β , o insertado dentro de la proteína A1 (Kozlovská, T. M., et al., *Intervirology*, 39:9-15 (1996)). La proteína A1 se genera mediante supresión en el codón de parada UGA y tiene una longitud de 329 aa, o 328 aa, si se toma en cuenta la división de la metionina de terminal N. La división de la metionina de terminal N antes de una alanina (el segundo aminoácido codificado por el gen CP Q β) usualmente tiene lugar en *E. coli*, y tal es el caso para el terminal N de las proteínas cubiertas Q β . La parte del gen A1, 3' del codón ámbar UGA que codifica la extensión CP, que tiene una longitud de 195 aminoácidos. La inserción del por lo menos un péptido A β 1-6 entre la posición 72 y 73 de la extensión CP conduce a realizaciones adicionales de la invención (Kozlovská, T. M., et al., *Intervirology* 39:9-15 (1996)). La fusión de un péptido A β 1-6 en el terminal C de una proteína A1 Q β truncada de terminal C conduce a las realizaciones preferidas adicionales de la invención. Por ejemplo, Kozlovská et al., (*Intervirology*, 39: 9-15 (1996)) describe las proteínas de fusión A1 Q β en donde el epítipo se fusiona en el
20 terminal C de la extensión truncada en la posición 19.

Como se describe por Kozlovská et al. (*Intervirology*, 39: 9-15 (1996)), el ensamble de las partículas que exhiben los epítopos fusionados requiere típicamente la presencia del proteína-péptido A β 1-6 de fusión A1 y el CP para formar una partícula mosaico. Sin embargo, las realizaciones que comprenden partículas similares a virus, y por lo tanto en particular los VLP de la proteína de la cubierta de bacteriófago Q β de ARN, que se componen exclusivamente de las subunidades VLP que tienen por lo menos un péptido A β 1-6 fusionado allí, también están dentro del alcance de la presente invención.

La producción de las partículas mosaico se puede efectuar en un número de formas. Kozlovská et al., *Intervirology*, 39: 9-15 (1996), describe tres métodos, que se pueden utilizar en la práctica de la invención. En el primer método, la exhibición eficiente del epítipo fusionado en los VLP se media por la expresión del plásmido que codifica la proteína fusión A1 Q β que tiene un codón de parada UGA entre la extensión CP y CP en una cepa *E. coli* que cosecha un plásmido que codifica el supresor tARN UGA clonado que conduce a la traducción del codón UGA en Trp (plásmido pISM3001 (Smiley B.K., et al., *Gene* 134:33-40 (1993))). En otro método, el codón de parada del gen CP se modifica en UAA, y un segundo plásmido que expresa la proteína-péptido A β 1-6 de fusión A1 se cotransforma. El Segundo plásmido codifica una resistencia a antibiótico diferente y el origen de replicación es compatible con el primer plásmido (Kozlovská, T. M., et al., *Intervirology* 39:9-15 (1996)). En un tercer método, CP y la proteína-péptido A β 1-6 de fusión A1 se modifica en una forma bicistrónica, ligado operativamente a un promotor tal como el promotor Trp, como se describe en la FIGURA 1 de Kozlovská et al., *Intervirology*, 39:9-15 (1996).

En una realización adicional, el péptido A β 1-6 se inserta entre el aminoácido 2 y 3 (numeración del CP dividido, que es en donde se divide la metionina de terminal N) del fr CP, conduciendo así a un péptido A β 1-6-fr de la proteína de fusión CP. Se han descrito vectores y sistemas de expresión para la construcción y expresión de las fusión proteínas fr CP auto-ensamblan a VLP y son útiles en la práctica de la invención (Pushko P. et al., *Prot. Eng.* 6:883-891 (1993)). En una realización específica, la secuencia de péptido A β 1-6 se inserta en una variante de eliminación del fr CP después del aminoácido 2, en donde se han eliminado los residuos 3 y 4 del fr CP (Pushko P. et al., *Prot. Eng.* 6:883-891 (1993)).

La fusión de los epítomos en la horquilla β protuberante de terminal N de la proteína de la cubierta del bacteriófago de ARN MS-2 y la presentación posterior del epítomo fusionado en el VLP de auto-ensamble del bacteriófago de ARN MS-2 también se ha descrito (WO 92/13081), y la fusión del péptido A β 1-6 mediante inserción o sustitución en la proteína de cubierta del bacteriófago de ARN MS-2 también cae bajo el alcance de la invención.

5 En realizaciones preferidas de la invención, los péptidos A β 1-6 adecuados para generar las vacunas de la invención se modifican con un ligador de aminoácido para unión a un VLP. Aquellos péptidos A β 1-6 incluyen, pero no se limitan a: A β 1-6 fusionado al terminal C al ligador GGC. El ligador de aminoácidos adecuados para fusión en el terminal N de los fragmentos A β 1-6 incluyen pero no se limitan a la secuencia CGG y CGHGNKS. Los ligadores adecuados para fusión al terminal C de A β 1-6 incluyen pero no se limitan a la secuencia GGC. En una realización preferida, cuando se fusiona un ligador al terminal C de A β o los fragmentos A β , se amida la cisteína de terminal C-terminal. En una realización preferida, se fusiona el A β 1-6 a un ligador de aminoácido y tiene la secuencia: "NH2-DAEFRHGGC-CONH2, en donde se amida la Cisteína de terminal C, que se indica por el terminal C "-CONH2", y el terminal N del péptido es libre, que se indica adicionalmente por "NH2-". Los ligadores de aminoácido son preferiblemente cortos, para evitar la inducción de las respuestas inmunes contra los aminoácidos de dicho ligador, pero debe permitir la inducción de los anticuerpos se reticulando con placas solubles A β y AD y puede facilitar la interacción de los anticuerpos con el péptido A β 1-6. Otras propiedades adecuadas del ligador de aminoácido son flexibilidad, y preferiblemente carencia de aminoácidos de masa que pueden interferir con el acoplamiento, y/o generar una respuesta inmune contra el ligador en sí mismo. En más realizaciones preferidas, el ligador de aminoácido que contiene un residuo cisteína como el segundo sitio de adhesión se fusiona al terminal C del péptido A β 1-6.

Los fragmentos A β adicionales adecuados en la práctica de la invención incluyen los fragmentos A β que corresponden a los fragmentos mencionados anteriormente, también modificados como se describió anteriormente, de otras especies animales y provocan a los anticuerpos reticulados con las placas amiloide humanas y A β humano soluble. Ejemplos de tales fragmentos son A β 1-6 de primates (DAEFRH; SEQ ID NO: 84), conejo (DAEFRH; SEQ ID NO: 85), conejillo de indias (DAEFRH; SEQ ID NO: 88), ratón (DAEFGH; SEQ ID NO: 76), rata (DAEFGH SEQ ID NO: 87), y *Xaenopus laevis* (DSEYRH; 86).

Se ha reportado un número de modelos de animal de AD con base en ratones transgénicos que sobreexpresan las formas mutadas del APP humano (Games, D. et al., Nature 373: 523-527 (1995a); Sturchler-Pierrat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13287-13292 (1997); Hsiao, K., et al., Science 274: 99-102 (1996); Chen, G. et al., Nature 408: 975- 979 (2000); Janus, C. et al., Nature 408: 979-982 (2000); Morgan, D. et al., Nature 408: 982-985 (2000)). Aquellos modelos de ratón difieren uno del otro en el nivel de sobreexpresión del transgen, las mutaciones AD presentes en el transgen y el promotor bajo el cual se dirige la sobreexpresión del transgen. Estos modelos de animal fallan en exhibir los signos patológicos de AD, que son en particular cambios en el comportamiento relacionados con la edad, depósito de β -amiloide en placas insolubles, ovillos neurofibrilares dentro de las neuronas, y pérdida de neuronas a través de prosencéfalo (Chapman, P.F. Nature 408: 915-916 (2000)). Los déficits de memoria y métodos para identificarlos sin embargo se pueden identificar en aquellos modelos, y se pueden utilizar en probar el efecto de las composiciones de la invención en modelos de animal (Chen, G. et al., Nature 408: 975-979 (2000); Janus, C. et al., Nature 408: 979-982 (2000); Morgan, D. et al., Nature 408: 982-985 (2000)). Adicionalmente, el depósito de A β relacionado con la edad en placas amiloide se puede estudiar en aquellos modelos, que también desarrolla astrocitosis y microgliosis.

Ahora se ha descrito la presente invención en detalle, lo mismo se entenderá más claramente como referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen aquí para propósitos solo de ilustración y no están destinados a limitar la invención.

EJEMPLOS

45 EJEMPLO 1

Clonación y construcción, respectivamente, expresión y purificación de las partículas núcleo preferidas y VLP de fagos de ARN, respectivamente

A. Construcción y expresión de las proteínas cubiertas mutantes Q β , y purificación de las proteínas VLP cubiertas Q β mutantes o Cápsidos.

50 Construcción del plásmido y clonación de proteínas cubiertas mutantes

Construcción de pQ β -240:

El plásmido pQβ10 (Kozlovska, TM, et al., Gene 137:133-137) se utiliza como un plásmido inicial para la construcción de pQβ-240. La mutación se crea Lys13→Arg mediante PCR inverso. Los cebadores inversos se diseñan en direcciones cola a cola invertidas:

5'-GGTAACATCGGTTCGAGATGGAAAACAACTCTGGTCC-3' (SEQ ID NO: 48) y

5 5'-GGACCAGAGTTTGTTCATCTCGACCGATGTTACC-3' (SEQ ID NO: 49).

Los productos del primer PCR se utilizan como plantillas para el segunda reacción PCR, en los que se utilizan un cebador en la dirección 5' 5'-AGCTCGCCCGGGATCCTCTAG-3' (SEQ ID NO: 50) y una cebador en la dirección 3' 5'-CGATGCATTTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGTTTCAG-3' (SEQ ID NO: 51). El producto del segundo PCR se digiere con XbaI y Mph1103I y se clona en el vector de expresión pQβ10, que se divide por las mismas enzimas de restricción. Las reacciones PCR se desarrollan con reactivos de equipo PCR y de acuerdo con el protocolo productor (MBI Fermentas, Vilnius, Lituania).

10

El secuenciamiento utilizando el método de incorporación de etiqueta directa verifica las mutaciones deseadas. Las células E.coli que cosechan la síntesis eficiente soportada pQβ-240 de la proteína 14-kD comigra luego de SDS-PAGE con la proteína de la cubierta de control Qβ aislada de las partículas de fago Qβ.

15 Secuencia de aminoácido resultante: (SEQ ID NO: 17)

AKLETVTLGNIGRDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP
ALEKRVTVSVSQPSRNRKQVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ
KYADVTFSTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY

Construcción de pQβ-243:

El plásmido pQβ10 se utiliza como un plásmido inicial para la construcción de pQβ-243. La mutación Asn10→Lys se crea mediante PCR inverso. Los cebadores inversos se designan en las direcciones cola a cola invertidas:

20 5'-GGCAAATTAGAGACTGTTACTTTAGGTAAGATCGG -3' (SEQ ID NO: 52) y

5'-CCGATCTTACCTAAAGTAACAGTCTCTAATTTTGCC -3' (SEQ ID NO: 53).

Los productos del primer PCR se utilizan como plantillas para la segunda reacción PCR, en la que se utilizan un cebador en la dirección 5'

5'-AGCTCGCCCGGGATCCTCTAG-3' (SEQ ID NO: 50) y

25 Un cebador en la dirección 3'

5'-CGATGCATTTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGTTTCAG-3' (SEQ ID NO: 51). El producto del segundo PCR se digiere con XbaI y Mph1103I y se clona en el vector de expresión pQβ10, que se divide por las mismas enzimas de restricción. Las reacciones PCR se desarrollan con los reactivos del equipo PCR y de acuerdo con el protocolo del productor (MBI Fermentas, Vilnius, Lituania).

30 El secuenciamiento utilizando el método de incorporación de etiqueta directa verifica las mutaciones deseadas. Las células E.coli que cosechan la síntesis eficiente soportada pQβ-240 de la proteína 14-kD comigra luego de SDS-PAGE con la proteína de la cubierta de control Qβ aislada de las partículas de fago Qβ.

Secuencia de aminoácido resultante: (SEQ ID NO: 18)

AKLETVTLGKIGKDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP
ALEKRVTVSVSQPSRNRKQVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ
KYADVTFSTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY

35 Construcción de pQβ-250:

El plásmido pQβ-240 se utiliza como un plásmido inicial para la construcción de pQβ-250. La mutación Lys2→Arg se crea por mutagenia dirigida a sitio. Un cebador en la dirección 5'

5'-GGCCATGGCAGACTCGAGACTGT'TACTTTAGG-3' (SEQ ID NO: 54)

y un cebador en la dirección 3'

5 5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3' (SEQ ID NO: 55)

se utilizan para la síntesis del fragmento PCR mutante, que se introduce dentro del vector de expresión pQβ-185 en los sitios de restricción únicos NcoI y HindIII. Las reacciones PCR se desarrollan con reactivos de equipo PCR y de acuerdo con el protocolo del productor (MBI Fermentas, Vilnius, Lituania).

10 El secuenciamiento utilizando el método de incorporación de etiqueta directa verifica las mutaciones deseadas. Las células E.coli que cosechan la síntesis eficiente soportada pQB-250 de la proteína 4-kD que comigra luego de PAGE con la proteína de cubierta Qβ de control aislada de las partículas de fago Qβ.

Secuencia de aminoácido resultante: (SEQ ID NO: 19)

**ARLETVTLGNIGRDGKQTLVNLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP
ALEKRVTVSVSQPSRNRKNYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ
KYADVTFSTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLI DAIDQLNPAY**

Construcción de pQβ-251:

15 El plásmido pQβ10 se utiliza como un plásmido inicial para la construcción de pQβ-251. La mutación Lys16→Arg se crea por PCR inverso. Los cebadores inversos se designan en las direcciones cola a cola invertidas:

5'-GATGGACGTCAAACCTCTGGTCCTCAATCCGCGTGGGG -3' (SEQ ID NO: 56) y

5'-CCCCACGCGGATTGAGGACCAGAGTTTGACGTCCATC -3' (SEQ ID NO: 57).

20 Los productos del primer PCR se utilizan como plantillas para la segunda reacción PCR, en la que se utilizan un cebador en la dirección 5'

5'-AGCTCGCCCGGGGATCCTCTAG-3' (SEQ ID NO: 50)

y un cebador en la dirección 3'

5'-CGATGCATTTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGTTTCAG-3' (SEQ ID NO: 51).

25 El producto del segundo PCR se digiere con XbaI y Mph1103I y se clona en el vector de expresión pQβ10, que se divide por las mismas enzimas de restricción. Las reacciones PCR se desarrollan con reactivos de equipo PCR y de acuerdo con el protocolo del productor (MBI Fermentas, Vilnius, Lituania).

30 El secuenciamiento utilizando el método de incorporación de etiqueta directa verifica las mutaciones deseadas. Las células E. coli que cosechan la síntesis eficiente soportada pQB-251 de la proteína 4-kD que comigra luego de SDS-PAGE con la proteína de cubierta Qβ de control aislada de las partículas de fago Qβ. La secuencia de aminoácido resultante codificada por esta construcción se muestra en (SEQ. ID NO: 20).

Construcción de pQβ-259:

El plásmido pQβ-251 se utiliza como un plásmido inicial para la construcción de pQβ-259. La mutación Lys2→Arg se crea por mutagenia dirigida a sitio. Un cebador en la dirección 5'

5'-GGCCATGGCAGACTCGAGACTGTTACTTTAGG-3' (SEQ ID NO: 54)

35 y un cebador en la dirección 3'

5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3' (SEQ ID NO: 55)

se utilizan para la síntesis del fragmento PCR mutante, que se introduce dentro del vector de expresión pQ β -185 en los sitios de restricción únicos NcoI y HindIII. Las reacciones PCR se desarrollan con reactivos de equipo PCR y de acuerdo con el protocolo del productor (MBI Fermentas, Vilnius, Lituania).

- 5 El secuenciamiento utilizando el método de incorporación de etiqueta directa verifica las mutaciones deseadas. Las células E.coli que cosechan la síntesis eficiente soportada pQ β -259 de la proteína 4-kD que comigra luego de SDS-PAGE con la proteína de cubierta Q β de control aislada de las partículas de fago Q β .

Secuencia de aminoácido resultante: (SEQ ID NO: 21)

AKLETVTLGNIGKDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP
ALEKRVTVSVSQPSRNRKNYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ
KYADVTFSTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLI DAIDQLNPAY

- 10 Procedimientos generales para la expresión y purificación de los mutantes Q β y Q β

Expresión

- 15 El E.coli JM109 se transforma con los plásmidos de expresión de proteína de la cubierta Q β . Se inoculan 5 ml de medio líquido LB que contiene 20 μ g/ml de ampicilina con clones transformados con los plásmidos de expresión de proteína de la cubierta Q β . El cultivo inoculado se incuba a 37 °C durante 16- 24 h sin agitación. El inóculo preparado se diluye posteriormente 1:100 en 100-300 ml de medio LB fresco, que contiene 20 μ g/ml de ampicilina, y se incuba a 37°C durante la noche sin agitación. El segundo inóculo resultante se diluye 1:50 en medio M9 que contiene 1 % de Casaminoácidos y 0.2 % de glucosa en los matraces, y se incuba a 37 °C durante la noche bajo agitación.

Purificación

Soluciones y amortiguadores para el procedimiento de purificación:

- 20 1. Amortiguador de lisis LB

50mM de Tris-HCl pH 8,0 con 5mM de EDTA, 0,1% de tritonX100 y PMSF frescamente preparado en una concentración de 5 microgramos por ml. Sin lisozima y DNAsa.

2. SAS

Sulfato de amonio saturado en agua

- 25 3. Amortiguador NET.

20 mM de Tris-HCl, pH 7.8 con 5mM de EDTA y 150 mM de NaCl.

4. PEG

40% (p/v) de polietilenglicol 6000 en NET

Interrupción y lisis

- 30 Las células congeladas se resuspenden en LB a 2 ml/g de células. La mezcla se sonica con 22 kHz cinco veces durante 15 segundos, con intervalos de 1min para enfriar la solución en hielo. El lisato luego se centrifuga a 14 000 rpm, durante 1h utilizando un rotador Janecki K 60. Las etapas de centrifugación descritas adelante todas se desarrollan utilizando el mismo rotador, excepto indicado de otra forma. El sobrenadante se almacena a 4° C, mientras que se lavan los residuos celulares dos veces con LB. Después de centrifugación, se agrupan los sobrenadantes del lisato y las fracciones de lavado.
- 35

Fraccionamiento

5 Se agrega en forma de gotas una solución de sulfato de amonio saturada bajo agitación al lisato agrupado anterior. El volumen del SAS se ajusta para ser un quinto del volumen total, para obtener 20% de saturación. La solución se deja reposar durante la noche, y se centrifuga al día siguiente a 14 000 rpm, durante 20 min. El glóbulo se lava con una cantidad pequeña de 20% de sulfato de amonio, y se centrifuga de nuevo. Se agrupan los sobrenadantes obtenidos, y se agrega SAS en forma de gotas para obtener 40% de saturación. La solución se deja reposar durante la noche, y se centrifuga al siguiente día a 14 000 rpm, durante 20 min. El glóbulo obtenido se solubiliza en amortiguador NET.

Cromatografía

10 El cápsido o la proteína VLP resolubilizada en amortiguador NET se carga en una columna de Sefarosa CL-4B. Tres picos se eluyen durante cromatografía. La primera contiene principalmente membranas y fragmentos de membrana, y no se recolecta. Se contienen cápsidos en el Segundo pico, mientras que el tercero contiene otras proteínas E.coli.

15 Las fracciones pico se agrupan, y la concentración de NaCl se ajusta a una concentración final de 0.65 M. Un volumen de solución PEG que corresponde a la mitad de la fracción pico agrupada se agrega en forma de gotas bajo agitación. La solución se deja reposar durante la noche sin agitación. La proteína de cápsido se sedimenta mediante centrifugación a 14 000 rpm durante 20 min. Esta luego se solubiliza en un volumen mínimo de NET y se carga de nuevo en la columna Sefarosa CL- 4B. Las fracciones pico se agrupan, y se precipitan con sulfato de amonio a 60% de saturación (p/v). Después de centrifugación y resolubilización en amortiguador NET, la proteína de cápsido se carga en una columna de Sefarosa CL-6B para recromatografía.

Dialysis y secado

20 Las fracciones pico obtenidas anteriores se agrupan y se dializan extensivamente contra agua estéril, y se liofilizan para almacenamiento.

Expresión y purificación de Q β -240

25 Las células (E. coli JM 109, transformado con el plásmido pQ β -240) se resuspenden en LB, se sonicen cinco veces durante 15 segundos (chaqueta de agua helada) y se centrifugan a 13000 rpm durante una hora. El sobrenadante se almacena a 4°C hasta procesamiento adicional, mientras que se lavan los residuos 2 veces con 9 ml de LB, y finalmente con 9 ml de 0,7 M de urea en LB. Todos los sobrenadantes se agrupan, y se cargan en la columna de Sefarosa CL-4B. Las fracciones pico agrupadas se precipitan con sulfato de amonio y se centrifugan. La proteína resolubilizada luego se purifica adicionalmente en una columna Sefarosa 2B y finalmente en una columna de Sefarosa 6B. El pico de cápsido se dializa finalmente extensivamente contra agua y se liofiliza como se describió anteriormente. El ensamble de la proteína de cubierta en un cápsido se confirma mediante microscopía de electrón.

Expresión y purificación de Q β -243

35 Las células (E. coli RR1) se resuspenden en LB y se procesan como se describe en el procedimiento general. La proteína se purifica mediante dos etapas de filtración de gel sucesivas en la columna de sefarosa CL-4B y finalmente en una columna de sefarosa CL-2B. Las fracciones pico se agrupan y se liofilizan como se describió anteriormente. El ensamble de la proteína de cubrimiento en un cápsido se confirma mediante microscopía de electrón.

Expresión y purificación de Q β -250

40 Las células (E. coli JM 109, transformadas con pQ β -250) se resuspenden en LB y se procesan como se describió anteriormente. La proteína se purifica mediante filtración de gel en una columna de Sefarosa CL-4B y finalmente en una columna de Sefarosa CL-2B, y se liofiliza como se describió anteriormente. El ensamble de la proteína de cubrimiento en un cápsido se confirma mediante microscopía de electrón.

Expresión y purificación de Q β -259

45 Las células (E. coli JM 109, transformadas con pQ β -259) se resuspenden en LB y se sonicen. Los residuos se lavan una vez con 10 ml de LB y un segundo tiempo con 10 ml de 0,7 M de urea en LB. La proteína se purifica mediante dos etapas de cromatografía de filtración de gel, en una columna de Sefarosa CL-4 B. La proteína se dializa y se liofiliza, como se describió anteriormente. El ensamble de la proteína de cubrimiento en un cápsido se confirma mediante microscopía de electrón.

B. Clonación, Expresión y Purificación de VPL AP205 Recombinante

Clonación del gen de Proteína de cubrimiento AP205

- 5 El cADN de la proteína de cubrimiento AP205 (CP) (SEQ ID NO: 28) se ensambla a partir de dos fragmentos de cADN generados del fago de ARN AP205 al utilizar una técnica PCR de transcripción inversa y clonación en el plásmido comercial pCR 4-TOPO para secuenciación. Las técnicas de transcripción inversa son bien conocidas por aquellas personas medianamente expertas en la técnica relevante. El primer fragmento, contenido en el plásmido p205-246, contiene 269 nucleótidos en la dirección 5' de la secuencia CP y 74 nucleótidos que codifican los 24 aminoácidos de terminal N del CP. El Segundo fragmento, contenido en el plásmido p205-262, contiene 364 nucleótidos que codifican los aminoácidos 12-131 de CP y 162 nucleótidos adicionales en la dirección 3' de la secuencia CP. El p205-246 y p205-262 son un regalo generoso de J. Klovins.
- 10 El plásmido 283.-58 se diseña por PCR de dos etapas, con el fin de fusionar los fragmentos CP de los plásmidos p205-246 y p205-262 en una secuencia CP de longitud completa.

Se utilizan un cebador en la dirección 5' p1.44 que contiene el sitio NcoI para clonación en el plásmido pQb185, o p1.45 que contienen el sitio XbaI para clonación en el plásmido pQb10, y un cebador en la dirección 3' p1.46 que contiene el sitio de restricción HindIII (secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción subrayada):

- 15 p1.44 5'-AACC ATG GCA AAT AAG CCA ATG CAA CCG-3' (SEQ ID NO: 79)
- p1.45 5'-AATCTAGAATTTTCTGCGCACCCATCCCGG-3' (SEQ ID NO: 80)
- p1.46 5'-AAAAGC TTA AGC AGT AGT ATC AGA CGA TAC G-3' (SEQ ID NO: 81)

- 20 Los dos cebadores adicionales, p1.47, hibridan en el extremo 5' del fragmento contenido en p205-262, y p1.48, hibridan en el extremo 3' del fragmento contenido en el plásmido p205-246 se utilizan para amplificar los fragmentos en el primer PCR. Los cebadores p1.47 y p1.48 son complementarios uno al otro.

p1.47: 5'-GAGTGATCCAACCTCGTTTATCAACTACATTT-
TCAGCAAGTCTG-3' (SEQ ID NO: 82)

p1.48: 5'-CAGACTTGCTGAAAATGTAGTTGATAAACGA-
GTTGGATCACTC-3' (SEQ ID NO: 83)

- 25 En las primeras dos reacciones PCR, se generan dos fragmentos. El primer fragmento se genera con los cebadores p1.45 y p1.48 y la plantilla p205-246. El Segundo fragmento se genera con los cebadores p1.47 y p1.46, y la plantilla p205-262. Ambos fragmentos se utilizan como plantillas para la segunda reacción PCR, una extensión empalme-sobreposición, con la combinación de cebador p1.45 y p1.46 o p1.44 y p1.46. El producto de las dos reacciones PCR de segunda etapa se digieren con XbaI o NcoI respectivamente, y HindIII, y se clonan con los mismos sitios de restricción en pQb10 o pQb185 respectivamente, dos vectores de expresión derivados de pGEM bajo el control del promotor operón triptofan E.coli.

- 30 Se obtienen dos plásmidos, pAP283-58 (SEQ ID NO: 27), que contienen la codificación de gen para wt AP205 CP (SEQ ID NO: 28) en pQb10, y pAP281-32 (SEQ ID NO: 30) con mutación Pro5→Thr (SEQ ID NO: 29), en pQb185. Las secuencias de proteína de la cubierta se verifican mediante secuenciación de ADN. El PAP283-58 que contiene 49 nucleótidos en la dirección 5' del codón ATG del CP, en la dirección 3' del sitio XbaI, y contiene el sitio de unión ribosómico original putativo del mRNA de proteína de cubrimiento.

Expresión y Purificación del VLP Recombinante AP205.

- 35 A. Expresión del VLP recombinante AP205

El E. coli JM109 se transforma con el plásmido pAP283-58. Se inoculan 5 ml de medio líquido LB con 20 µg/ml de ampicilina con una colonia única, y se incuba a 37 °C durante 16-24 h sin agitación.

- 40 El inóculo preparado se diluye 1:100 en 100-300 ml de medio LB, que contiene 20 µg/ml de ampicilina y se incuba a 37 °C durante la noche sin agitación. El segundo inóculo resultante se diluye 1:50 en medio 2TY, que contiene 0.2 % de glucosa y fosfato para amortiguar, y se incuba a 37 °C durante la noche en un agitador. Las células se cosechan mediante centrifugación y se congelan a -80°C.

B. Purificación de VLP recombinante AP205

Soluciones y amortiguadores:

Amortiguador de lisis

50mM de Tris-HCl pH 8.0 con 5mM de EDTA, 0.1% de tritonX100 y PMSF a 5 microgramos por ml.

5 SAS

Sulfato de amonio saturado en agua

Amortiguador NET.

20 mM de Tris-HCl, pH 7.8 con 5mM de EDTA y 150 mM de NaCl.

PEG

10 40% (p/v) polietilenglicol 6000 en NET

Lisis:

15 Las células congeladas se resuspenden en amortiguador de lisis a 2 ml/g células. La mezcla se sonica con 22 kHz cinco veces durante 15 segundos, con intervalos de 1 min para enfriar la solución en hielo. El lisato luego se centrifuga durante 20 minutos a 12 000 rpm, utilizando un rotor F34-6-38 (Ependorf). Las etapas de centrifugación descritas adelante se desarrollan utilizando el mismo rotor, excepto como se indica de otra forma. El sobrenadante se almacena a 4°C, mientras que los residuos celulares se lavan dos veces con amortiguador de lisis. Después de la centrifugación, los sobrenadantes del lisato y se agrupan las fracciones de lavado.

20 La precipitación con sulfato de amonio se puede utilizar adicionalmente para purificar VLP AP205. En una primera etapa, se selecciona una concentración de sulfato de amonio en la que el VLP AP205 VLP no precipita. El glóbulo resultante se descarga. En la siguiente etapa, se selecciona una concentración de sulfato de amonio en la que se precipita cuantitativamente el VLP AP205, y el VLP AP205 se aísla del glóbulo de esta etapa de precipitación mediante centrifugación (14 000 rpm, durante 20 min). El glóbulo obtenido se solubiliza en amortiguador NET.

Cromatografía:

25 La proteína de cápsido de los sobrenadantes agrupados se carga en una columna de Sefarosa 4B (2.8 X 70 cm), y se eluye con amortiguador NET, en 4 ml/hora/fracción. Se recolectan las fracciones 28-40, y se precipitan con sulfato de amonio en 60% de saturación. Las fracciones se analizan por SDS-PAGE y Western Blot con un antisuero específico para AP205 antes de precipitación. El glóbulo aislado mediante centrifugación se resolubiliza en amortiguador NET, y se carga en una columna de Sefarosa 2B (2.3 X 65 cm), se eluye a 3 ml/h/fracción. Las fracciones se analizan mediante SDS-PAGE, y se recolectan las fracciones 44-50, se agrupan y se precipitan con sulfato de amonio en 60% de saturación. El glóbulo aislado mediante centrifugación se resolubiliza en amortiguador NET, y se purifica en una columna de Sefarosa 6B (2.5 X 47 cm), se eluye a 3 ml/hora/fracción. Las fracciones se analizan mediante SDS-PAGE. Las fracciones 23-27 se recolectan, la concentración de sal se ajusta a 0.5 M, y se precipita con PEG 6000, se agrega de 40% de materia prima en agua y en una concentración final de 13.3%. El glóbulo aislado mediante centrifugación se resolubiliza en amortiguador NET, y se carga en la misma columna de Sefarosa 2B como se hizo anteriormente, se eluye de la misma forma. Se recolectan las fracciones 43-53, y se precipitan con sulfato de amonio en una saturación de 60%. El glóbulo aislado mediante centrifugación se resolubiliza en agua, y la solución de proteína obtenida se dializa extensivamente contra agua. Se puede aislar aproximadamente 10 mg de proteína purificada por gramo de células.

40 El examen de la partícula similar a virus en microscopía de Electrón muestra que ellos son idénticos a las partículas de fago.

EJEMPLO 2

Inserción de un péptido que contiene un residuo lisina en el epítipo 1 c/e de HBcAg (1-149).

El epítipo 1 c/e (residuos 72 a 88) de HBcAg se ubica en la región de punta en la superficie de cápsido del virus de la Hepatitis B (HBcAg). Una parte de esta región (Prolina 79 y Alanina 80) se reemplaza genéticamente por el péptido Gly-Gly- Lys-Gly-Gly (SEQ ID NO: 33), que resulta en la construcción HBcAg-Lys (SEQ ID NO: 26). El residuo lisina introducido contiene un grupo amino reactivo en su cadena lateral que se puede utilizar para reticulación química intermolecular de las partículas HBcAg con cualquier antígeno que contiene un grupo cisteína libre.

El ADN HBcAg-Lys, que tiene la secuencia de aminoácido mostrada en la SEQ ID NO: 78, se genera mediante los PCR: Los dos fragmentos que codifican los fragmentos HBcAg (residuos de aminoácido 1 a 78 y 81 a 149) se amplifican separadamente mediante PCR. Los cebadores utilizados para estos PCR también introducen una secuencia de ADN que codifica el péptido Gly-Gly-Lys-Gly-Gly (SEQ ID NO: 33). El fragmento HBcAg (1 a 78) se amplifica de pEco63 utilizando los cebadores EcoRIHBcAg(s) y Lys-HBcAg(as). El fragmento HBcAg (81 a 149) se amplifica de pEco63 utilizando los cebadores Lys-HBcAg(s) y HBcAg(1-149)Hind(as). Los cebadores Lys-HBcAg(as) y Lys-HBcAg(s) introducen las secuencias de ADN complementarias en los extremos de los productos de PCR que permiten la fusión de los dos productos PCR en un PCR de ensamble posterior. Los fragmentos ensamblados se amplifican mediante PCR utilizando los cebadores EcoRIHBcAg(s) y HbcAg(1-149)Hind(as).

Para los PCR, 100 pmol de cada oligo y 50 ng de los ADN de plantilla se utilizan en las mezclas de reacción de 50 ml con 2 unidades de polimerasa Pwo, 0.1 mM de dNTP y 2 mM de MgSO₄. Para ambas reacciones, se lleva a cabo ciclización de temperatura como sigue: 94°C durante 2 minutos; 30 ciclos de 94°C (1 minuto), 50°C (1 m inuto), 72°C (2 minutos).

Secuencias cebadoras:

EcoRIHBcAg(s):

(5'-CCGGAATTCATGGACATTGACCCTTATAAAG-3') (SEQ ID NO: 58);

Lys-HBcAg(as):

(5'-CCTAGAGCCACCTTTGCCACCATCTTCTAAATTAG-TACCCACCCAGGTAGC-3') (SEQ ID NO: 59);

Lys-HBcAg(s):

(5'-GAAGATGGTGGCAAAGGTGGCTCTAGGGACC-TAGTAGTCAGTTATGTC -3') (SEQ ID NO: 60);

HBcAg(1-149)Hind(as):

(5'-CGCGTCCCAAGCTTCTAAACAACAGTAGTCTCCGGAAG-3') (SEQ ID NO: 61).

Para la fusión de los dos fragmentos de PCR mediante PCR 100 pmol de los cebadores EcoRIHBcAg(s) y HBcAg(1-149)Hind(as) se utilizan con 100 ng de los dos fragmentos PCR purificados en una mezcla de reacción de 50 ml que contiene 2 unidades de polimerasa Pwo, 0.1 mM de dNTP y 2 mM de MgSO₄. Las condiciones de ciclización de PCR son: 94°C durante 2 minutos; 30 ciclos de 94°C (1 minuto), 50°C (1 minuto), 72°C (2 minutos). El pro ducto PCR ensamblado se analiza mediante electroforesis de gel de agarosa, se purifica y se digiere durante 19 horas en un amortiguador apropiado con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII. El fragmento de AND digerido se liga en e vector EcoRI/HindIII- pKK digerido para generar el vector de expresión pKK-HBcAg-Lys. La inserción del producto PCR en el vector se analiza mediante análisis de restricción EcoRI/HindIII y secuenciamiento de ADN del inserto.

EJEMPLO 3

Expresión y purificación de HBcAg-Lys.

Las cepas E. coli K802 o JM109 se transforman con pKK-HBcAg-Lys. Se utiliza 1 ml de un cultivo de bacterias durante la noche para inocular 100 ml de medio LB que contiene 100 µg/ml de ampicilina. Este cultivo se hace crecer durante 4 horas a 37°C hasta que se alcanza un OD a 600 nm de aproximadamente 0.8. La inducción de la síntesis de HBcAg-Lys se desarrolla mediante la adición de IPTG en una concentración final de 1 mM. Después de

inducción, las bacterias se agitan adicionalmente a 37°C durante 4 horas. Las bacterias se cosechan mediante centrifugación a 5000 x g durante 15 minutos. El glóbulo se congela a - 80°C. El glóbulo se descongela y se resuspende en amortiguador de lisis de bacterias (10 mM de Na₂HPO₄, pH 7.0, 30 mM de NaCl, 0.25% de Tween-20, 10 mM de EDTA) complementado con 200 µg/ml de lisozima y 10 µl de Benzonasa (Merck). Las células se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente y se interrumpen mediante sonicación. Las células E. coli que cosechan el plásmido de expresión pKK-HBcAg-Lys o un plásmido de control se utilizan para la inducción de la expresión HBcAg-Lys con IPTG. Antes de la adición de IPTG, se remueve una muestra del cultivo de bacterias que lleva el plásmido pKK-HBcAg-Lys y de un cultivo que lleva el plásmido de control. Cuatro horas después de la adición de IPTG, las muestras remueven de nuevo el cultivo que contiene pKK-HBcAg-Lys y del cultivo de control. La expresión de la proteína se monitorea por SDS-PAGE seguido por tinte Coomassie.

El lisado luego se centrifuga durante 30 minutos a 12,000 x g con el fin de remover los residuos celulares insolubles. El sobrenadante y el glóbulo se analizan por Ensayo Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal contra HBcAg (YVS1841, comprado de Accurate Chemical and Scientific Corp., Westbury, NY, USA), que indica que una cantidad significativa de proteína HBcAg-Lys es soluble. En resumen, los lisatos de las células E. coli que expresan HBcAg-Lys y de las células de control se centrifugan a 14,000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante (= fracción soluble) y el glóbulo (= fracción insoluble) se separan y se diluyen con amortiguador de muestra SDS en volúmenes iguales. Se analizan las muestras por SDS-PAGE seguido por ensayo Western blot con el anticuerpo monoclonal anti-HBcAg YVS 1841.

Se utiliza el lisato celular depurado para la centrifugación de etapa - gradiente utilizando un gradiente de etapa de sacarosa que consiste de una solución al 4 ml de 65% de sacarosa superpuesta con solución al 3 ml de 15% de sacarosa seguido por 4 ml del lisato bacteriano. La muestra se centrifuga durante 3 hrs con 100,000 x g a 4°C. Después de centrifugación, se recolectan fracciones de 1 ml de la parte superior del gradiente y se analizan mediante SDS-PAGE seguido por tinte Coomassie. La proteína HBcAg-Lys se detecta por tinte Coomassie.

La proteína HBcAg-Lys se enriquece en la interface entre 15 y 65% de sacarosa que indica que esta ha formado una partícula de cápsido. La mayoría de las proteínas bacterianas permanecen en la capa superior libre de sacarosa del gradiente, por lo tanto la centrifugación de etapa - gradiente de las partículas HBcAg-Lys conduce al enriquecimiento y a una purificación parcial de las partículas.

Se desarrolla expresión y purificación de HBcAg-Lys a gran escala como sigue. Se prepara un cultivo durante la noche al inocular una única colonia en 100 ml de LB, 100 µg/ml de ampicilina y se hace crecer el cultivo durante la noche a 37°C. 25 ml del precultivo se diluyen en 800 ml de medio de Ampicilina LB al siguiente día, y el cultivo crece en una densidad óptica OD₆₀₀ d 0.6-0.8. El cultivo luego se induce con 1 mM de IPTG, y se deja crecer durante 4 horas. Las células se cosechan y se lisan esencialmente como se describió anteriormente.

El HBcAg-Lys luego se purifica al precipitar primero la proteína con sulfato de amonio (30% de saturación) del lisato celular depurado, luego cargar el glóbulo resolubilizado en una columna de filtración de gel (Sefacril S-400, Pharmacia). Las fracciones agrupadas se precipitan de nuevo con sulfato de amonio, el glóbulo se resolubiliza y se carga una segunda vez en la misma columna de filtración de gel. Las fracciones finalmente se agrupan y se concentran, y la concentración se evalúa utilizando una prueba Bradford test (BioRad).

EJEMPLO 4

Construcción de un HBcAg carente de residuos de cisteína libre y que contiene un residuo lisina insertado.

Un antígeno de núcleo de Hepatitis (HBcAg), denominado aquí como HBcAg-lys-2cys-Mut, carente de los residuos cisteína en las posiciones que corresponden a 48 y 107 en la SEQ ID NO: 25 y que contienen un residuo lisina insertado se construye utilizando los siguientes métodos.

Las dos mutaciones se introducen al amplificar separadamente primero tres fragmentos del gen HBcAg-Lys preparado como se describió anteriormente en el Ejemplo 2 con las siguientes combinaciones de cebador PCR. Los métodos PCR y las técnicas de clonación convencional se utilizan para preparar el gen HBcAg-lys-2cys-Mut.

En resumen, se utilizan los siguientes cebadores para preparar el fragmento 1:

Cebador 1: EcoRIHBcAg(s)

CCGGAATTCATGGACATTGACCCTTATAAAG (SEQ ID NO: 58)

Cebador 2: 48as

GTGCAGTATGGTGAGGTGAGGAATGCTCAGGAGACTC (SEQ ID NO: 62)

Se utilizan los siguientes cebadores para preparar el fragmento 2:

Cebador 3: 48s

5 GSGTCTCCTGAGCATTCTCACCTCACCATACTGCAC (SEQ ID NO: 63)

Cebador 4: 107as

CTTCCAAAAGTGAGGGAAGAAATGTGAAACCAC (SEQ ID NO: 64)

Se utilizan los siguientes cebadores para preparar el fragmento 3:

Cebador 5: HBcAg149hind-as

10 CGCGTCCCAAGCTTCTAAACAACAGTAGTCTCCGGAAGC-
GTTGATAG (SEQ ID NO: 65)

Cebador 6: 107s

GTGGTTTCACATTTCTTCCCTCACTTTTGGAAG (SEQ ID NO: 66)

15 Los fragmentos 1 y 2 luego se combinan con los cebadores PCR EcoRIHBcAg(s) y 107as para dar el fragmento 4. El fragmento 4 y el fragmento 3 luego se combinan con los cebadores EcoRIHBcAg(s) y HBcAg149hind-as para producir el gen de longitud completa. El gen de longitud completa luego se digiere con las enzimas EcoRI (GAATTC) y HindIII (AAGCTT) y se clona en el vector pKK (Pharmacia) que corta en los mismos sitios de restricción. La expresión y purificación de HBcAg-lys-2cys- Mut se desarrollan como se establece en el Ejemplo 3.

EJEMPLO 5

Construcción of HBcAg1-185-Lys.

20 Se modifica el antígeno núcleo de hepatitis (HBcAg) 1-185 como se describe en el Ejemplo 2. Una parte de la región de epitopo c/e1 (residuos 72 a 88) (Prolina 79 y Alanina 80) se reemplaza genéticamente por el péptido Gly-Gly-Lys-Gly-Gly (SEQ ID NO: 33), que resulta en la construcción HBcAg-Lys (SEQ ID NO: 26). El residuo lisina introducido contiene un grupo amino reactivo en su cadena lateral que se puede utilizar para reticulación química intermolecular de las partículas HBcAg con cualquier antígeno que contiene un grupo cisteína libre. Los métodos PCR y las técnicas de clonación convencional se utilizan para preparar el gen HBcAg1-185-Lys.

25

La secuencia Gly-Gly-Lys-Gly-Gly (SEQ ID NO: 33) se inserta al amplificar dos fragmentos separados del gen HBcAg de pEco63, como se describió anteriormente en el Ejemplo 2 y posteriormente fusionar dos fragmentos mediante PCR para ensamblar el gen de longitud completa. Se utilizan las siguientes combinaciones del cebador PCR:

30 fragmento 1:

Cebador 1: EcoRIHBcAg(s) (SEQ ID NO: 58) (ver Ejemplo 2)

Cebador 2: Lys-HBcAg(as) (SEQ ID NO: 59) (ver Ejemplo 2)

fragmento 2:

Cebador 3: Lys-HBcAg(s) (SEQ ID NO: 60) (ver Ejemplo 2)

35 Cebador 4: HBcAgwtHindIII

CGCGTCCCAAGCTTCTAACATTGAGATTCCCGAGATTG (SEQ ID NO: 67)

Ensamble:

Cebador 1: EcoRIHBcAg(s) (SEQ ID NO: 58) (ver ejemplo 2)

Cebador 2: HBcAgwtHindIII (SEQ ID NO: 67)

- 5 El gen de longitud completa ensamblado luego se digiere con las enzimas EcoRI (GAATTC) y HindIII (AAGCTT) y se clona en el vector pKK (Pharmacia) que se corta en los mismos sitios de restricción.

EJEMPLO 6

Fusión de un epítipo de péptido en la región MIR de HbcAg.

- 10 Los residuos 79 y 80 de HBcAg1-185 se sustituyen con el epítipo CεH3 de la secuencia VNLTWSRASG (SEQ ID NO: 68). Los tallos de secuencia CεH3 de la secuencia del tercer dominio constante de la cadena pesada del IgE humano. El epítipo se inserta en la secuencia HBcAg1-185 utilizando un método de ensamble PCR. En la primera etapa PCR, el gen HBcAg1-185 que se origina del clon ATCC pEco63 y se amplifica con los cebadores HBcAg-wt EcoR1 del y HBcAg-wt Hind III rev se utiliza como plantilla en dos reacciones separadas para amplificar dos fragmentos que contienen los elementos de secuencia que codifican la secuencia CεH3. Estos dos fragmentos luego se ensamblan en una segunda etapa PCR, en una reacción de ensamble PCR.

Las combinaciones de cebador en la primera etapa PCR: CεH3del con HBcAg-wt Hind III inv, y HBcAg-wt EcoRI del con CεH3inv. En la reacción de ensamble PCR, los dos fragmentos aislados en la primera etapa PCR primero se ensamblan durante 3 ciclos PCR sin cebadores exteriores, que se agregan después a la mezcla de reacción para los siguientes 25 ciclos. Cebadores externos: HBcAg-wt EcoRI del y HBcAg-wt Hind III inv.

- 20 El producto PCR se clona en el pKK223.3 utilizando los sitios EcoRI y HindIII, para expresión en E. coli (ver Ejemplo 2). El VLP quimérico se expresa en E. coli y se purifica como se describe en el Ejemplo 2. El volumen de elución en el que se eluye el HBcAg1-185- CεH3 de la filtración de gel muestra el ensamble de las proteínas de fusión a un VLP quimérico.

Secuencias cebadoras:

- 25 CεH3del:

5' GTT AAC TTG ACC TGG TCT CGT GCT TCT GGT GCA TCC AGG GAT CTA GTA GTC 3' (SEQ ID NO: 69)

V N L T W S R A S G A80 S R D L V V86 (SEQ ID NO: 70)

CεH3inv:

5' ACC AGA AGC ACG AGA CCA GGT CAA GTT AAC ATC TTC CAA ATT ATT ACC CAC 3' (SEQ ID NO: 71)

- 30 D78 E L N N G V72 (SEQ ID NO: 72)

HBcAg-wt EcoRI del:

5' CCGgaattcATGGACATTGACCCTTATAAAG (SEQ ID NO: 73)

HBcAg-wt Hind III inv:

5' CGCGTCCCaagcttCTAACATTGAGATTCCCGAGATTG (SEQ ID NO: 74)

- 35 **EJEMPLO 7**

Fusión del péptido Aβ1-6 en la región MIR de HBcAg.

5 Los residuos 79 y 80 de HBcAg1-185 se sustituyen con el péptido A β 1-6 de la secuencia: DAEFRH (SEQ ID NO: 75) o DAEFGH (SEQ ID NO: 76). Se diseñan dos cebadores superpuestos utilizando la misma estrategia descrita en el Ejemplo 6, y la proteína de fusión construida mediante PCR de ensamble. El producto PCR se clona en el vector pKK223.3, y se expresa en *E. coli* K802. Los VLP quiméricos se expresan y se purifican como se describe en el Ejemplo 3.

EJEMPLO 8

Fusión de un péptido A β 1-6 en el terminal C de la proteína Q β A1 troncada en la posición 19 de la extensión CP.

10 Un cebador que hibrida en el extremo 5' del gen Q β A1 y un cebador que hibrida en el extremo 3' del gen A1 y que comprende adicionalmente un elemento de secuencia que codifica el péptido A β 1-6, de la secuencia DAEFRH (SEQ ID NO: 75) o DAEFGH (SEQ ID NO: 76), se utilizan en una reacción PCR con pQ β 10 como plantilla. El producto PCR se clona en pQ β 10 (Kozlovska T.M. et al., *Gene* 137: 133-37 (1993)), y el VLP quimérico se expresa y se purifica como se describe en el Ejemplo 1.

EJEMPLO 9

Inserción de un péptido A β 1-6 entre las posiciones 2 y 3 de la proteína de cubrimiento fr.

15 Los cebadores de complementariedad que codifican la secuencia del péptido A β 1-6 de la secuencia DAEFRH (SEQ ID NO: 75) o DAEFGH (SEQ ID NO: 76), y que contienen los extremos compatibles Bsp119I y los nucleótidos adicionales que se permiten en la inserción de estructura, se insertan en el sitio Bsp119I del vector pFrd8 vector (Pushko, P. et al., *Prot. Eng.* 6: 883-91 (1993)) mediante técnicas de biología molecular estándar. Alternativamente, las salientes del vector pFrd8 se llenan con Klenow después de digestión con Bsp119I, y oligonucleótidos que
20 codifican la secuencia del péptido A β 1-6 y los nucleótidos adicionales para clonación en marco se ligan en pFrd8 después del tratamiento Klenow. Los clones con el inserto en la orientación derecha se analizan mediante secuenciamiento. La expresión y purificación de la proteína de fusión quimérica en *E. coli* JM109 o *E. coli* K802 se desarrolla como se describe en Pushko, P. et al, *Prot. Eng.* 6:883-91 (1993), pero para las etapas de cromatografía se desarrollan utilizando una columna de Sefarosa CL-4B o Sefacril S-400 (Farmacia). El lisato celular se precipita
25 con sulfato de amonio, y se purifica mediante dos etapas de purificación de filtración de gel sucesivas, de forma similar al procedimiento descrito para Q β en el Ejemplo 1.

EJEMPLO 10

Inserción de un péptido A β 1-6 entre las posiciones 67 y 68 de la proteína p1 Tyl en el vector pOGS8111.

30 Se sintetizan dos oligonucleótidos complementarios codifican el péptido A β 1-6, de la secuencia DAEFRH (SEQ ID NO: 75) o DAEFGH (SEQ ID NO: 76), con extremos compatibles con el sitio NheI de pOGS8111. Se agregan oligonucleótidos adicionales para permitir la inserción en marco de una secuencia que codifica el péptido A β 1-6 de acuerdo con la descripción de EP 677'111. Los aminoácidos AS y SS que flanquean el epitopo insertado se codifican por los sitios alterados NheI que resultan de la inserción del oligonucleótido en el gen TyA(d) de pOGS8111.

35 El pOGS8111 se transforma en la cepa *S. cerevisiae* MC2, para la expresión del Ty VLP quimérico como se describe en la EP0677111 y referencias allí. El Ty quimérico VLP se purifica mediante ultracentrifugación de gradiente de sacarosa como se describe en la EP 677'111.

EJEMPLO 11

Inserción de un péptido A β 1 -6 en la proteína de cápsido principal L1 de papilomavirus tipo I (BPV-1).

40 Una secuencia que codifica el péptido A β 1-6 que tiene la secuencia DAEFRH (SEQ ID NO: 75) o DAEFGH (SEQ ID NO: 76) se sustituye con la secuencia que codifica los aminoácidos 130-136 del gen BPV-1 L1 clonado en el vector pFastBac1 (GIBCO/BRL) como se describe (Chackerian, B. et al., *Proc. Natl. Acad. USA* 96: 2373-2378 (1999)). La secuencia de la construcción se verifica mediante análisis de secuencia de nucleótido. El baculovirus recombinante se genera utilizando el sistema baculovirus GIBCO/BRL como se describe por el fabricante. Los VLP quiméricos se
45 purifican de las células de baculovirus infectadas Sf9 como se describe por Kirnbauer, R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:12180-84 (1992) y Greenstone, H.L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:1800-05 (1998).

EJEMPLO 12

Inmunización de ratones con el péptido A β 1-6 fusionado a los VLP.

Los VLP quiméricos que exhiben el péptido N β 1-6 de la secuencia DAEFRH (SEQ ID NO: 75) o DAEFGH (SEQ ID NO: 76) generada en los Ejemplos 7-11 se utilizan para inmunización de ratones APP transgénicos humanos o ratones C57/BL6 como se describe en la Ejemplo 13 y 14. El suero obtenido de las ratones inmunizados se analizan en un péptido A β 1-6 o A β 1-40 o A β -42 específico ELISA como se describe en el Ejemplo 13.

Se examina el efecto protector de la vacuna al inmunizar un grupo grande de ratones transgénicos APP humanos como se describe en la Ejemplo 14.

EJEMPLO 13

Acoplamiento del péptido A β 1-6 a VLP Q β (Q β A β 1-6), e inmunización de ratones con Q β A β 1-6

10 A. Acoplamiento del péptido A β 1-6 Q VLP

El péptido A β 1-6 (secuencia: NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂) (SEQ ID NO: 77) se sintetiza químicamente; el grupo NH₂ inicial indica que el péptido tiene un terminal N libre, y el grupo termininal NH₂ indica que el péptido tiene un terminal carboxi amidado. Se expresa el VLP Q β y se purifica como se describe en el ejemplo 1. Q β VLP, en 20 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, pH 8.2 (HBS, pH 8.2) se hace reaccionar en una concentración de 2 mg/ml (determinado en un ensayo Bradford), con 1.43 mM de SMPH (Pierce, Rockford IL), se diluye de una solución madre en DMSO, durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). La mezcla de reacción luego se dializa contra HBS, amortiguador de pH 8.2 a 4°C, y se hace reaccionar con 0.36 mM de péptido A β 1-6, se diluye en la mezcla de reacción de una solución madre de 50 mM en DMSO. La reacción de acoplamiento se deja proceder durante 2 horas a 15°C, y la mezcla de reacción se dializa 2 X 2 ho ras contra un HBS volumen de 1000 veces, pH 8.2, y el matraz se congela en nitrógeno líquido en alícuotas para almacenamiento a - 80°C hasta uso adicional.

Una alícuota se descongela, y el acoplamiento del A1-6 péptido a las subunidades VLP Q se evalúa por SDS-PAGE y la concentración de la proteína medida en un ensayo Bradford. El resultado de las reacciones de acoplamiento se muestra en la FIGURA 1.

La FIGURA 1 muestra el análisis SDS-PAGE de la reacción de acoplamiento del péptido A β 1-6 y Q VLP. Las muestras corren bajo condiciones de reducción en 16% de gel Tris-glicina, se tiñen con azul brillante coomassie. Línea 1 es el marcador de proteína, con pesos moleculares correspondientes indicados en el límite izquierdo del gel; línea 2, la proteína VLP derivada Q β ; línea 3, el sobrenadante de la reacción de acoplamiento de la proteína VLP QP al péptido A β 1-6; línea 4, el glóbulo de la reacción de acoplamiento de la proteína Q VLP al péptido A β 1-6; Los productos de acoplamiento que corresponde al acoplamiento de los péptidos 1, 2 y 3 por monómero se indican por las flechas en la Figura. Más de 1.5 péptidos por subunidad se acoplan en promedio; casi no se dejan inacoplados.

B. Inmunización de ratones con el péptido A β 1-6 acoplado al Q VLP y análisis de la respuesta inmune

El VLP Q β acoplado al péptido A β 1-6 (denominado aquí Q β -Ab-1-6) se inyecta s.c. en ratones (3 ratones) en el día 0 y 14. El péptido A β 1-6 se acopla a la proteína VLP Q como se describió anteriormente. Cada ratón (C57BL/6) se inmuniza con 10 μ g de vacuna se diluye en PBS a 200 μ l. Los ratones se desangran retroorbitalmente en el día 21, y el título de los anticuerpos específicos para el péptido A β 1-6 se miden en un ELISA contra A β 1-6. El péptido A β 1-6 se acopla a ARNasa bovina A utilizando el reticulador químico sulfo-SPDP. Las placas ELISA se cubren con preparaciones ARNasa acopladas en una concentración de 10 μ g/ml. Las placas se bloquean y luego se incuban con suero de ratón serialmente diluidos. Los anticuerpos unidos se detectan con anticuerpos IgG anti-ratón enzimáticamente marcados. Como un control, también se prueba el suero preinmune de los mismos ratones. Los resultados se muestran en La FIGURA 2.

La FIGURA 2 muestra un análisis ELISA de los anticuerpos IgG específicos para el péptido A β 1-6 en el suero de ratones inmunizados contra el péptido A β 1-6 acoplado a VLP Q β . Los resultados se muestran para los tres ratones inmunizados (A 1-A3), el suero preinmune se indica como "pre" en la figura; se muestra el resultado para un suero preinmune. La comparación del suero preinmune con el suero de ratones inmunizados con "Q β -Ab-1-6" muestra que se puede obtener una respuesta de anticuerpo específico fuerte contra el péptido A β 1-6 en la ausencia del adyuvante.

C. ELISA contra el péptido A β 1-40

El péptido A β 1-40 o A β 1-42 humano se hace en DMSO y se diluye en amortiguador de cubrimiento antes de uso. Las placas ELISA se cubren con 0.1 μ g /pozo de péptido A β 1-40. Las placas se bloquean y luego se incuban con suero de ratón diluido serialmente obtenido anteriormente. Los anticuerpos unidos se detectan con anticuerpo IgG anti-ratón enzimáticamente marcado. Como un control, también se incluye el suero obtenido antes de vacunación.

5 La dilución del suero que muestra una media de tres desviaciones estándar por encima de los valores iniciales se calcula y se define como "título ELISA". No se detectan anticuerpos específicos en el suero preinmune. El título obtenido para los tres ratones es de 1:100000, que muestra una respuesta inmune específica fuerte contra A β 1-40. Así, la inmunización con A β 1-6 acoplado a VLP Q β provoca títulos de anticuerpo fuertes que reticulan con A β 1-40.

10 La FIGURA 3 muestra el resultado del ELISA. La señal ELISA como la densidad óptica a 405 nm, obtenida para el suero de tres ratones (A1-A3) inmunizados con el péptido A β 1-6 acoplado al VLP Q β como se describió anteriormente, se grafica para cada una de las diluciones, se indica en el eje x. Se muestra el resultado para los tres ratones desangrados en el día 21. También se incluye un suero preinmune. El título de los anticuerpos en el suero se determina como se describió anteriormente, y es de 1:100000 para todos los tres ratones.

EJEMPLO 14

15 Inmunización de ratones transgénicos APP humanos

Se utilizan para vacunación ratones APP23 hembra de 8 meses de edad que llevan un transgen humano APP (Sturchler-Pierrat et al., Proc.Natl. Acad.Sci. USA 94: 13287-13292 (1997)). Los ratones se inyectan subcutáneamente con vacuna de 25 μ g vacuna diluida en PBS estéril y 14 días después de inoculación con la misma cantidad de vacuna. Los ratones se desangran de la vena de la cola antes del inicio de inmunización y 7 días después de refuerzo de inyección. El suero se analiza para la presencia de anticuerpos específicos a A β 1-6, a A β 1-40 y A β 1-42 mediante ELISA como se describe en el ejemplo 13.

20

EJEMPLO 15

Acoplamiento de VLP A β 1-6 a P β de murino, inyección de la vacuna en ratones, y análisis de la respuesta inmune

25 El péptido A β 1-6 de murino (secuencia: NH₂-DAEFGHGGC-CONH₂) (SEQ ID NO: 78) se sintetiza químicamente, y se utiliza para acoplamiento a VLP Q β como se describe en el ejemplo 13. La vacuna se inyecta en ratones C57BL/6, y se determina el título de los anticuerpos provocados contra el A β 1-6 de murino, A β 1-40 de murino y A β 1-42 de murino. La inmunización y la determinación ELISA se desarrollan como se describe en el ejemplo 13.

EJEMPLO 16

Unión del suero provocado contra A β 1-6 a placas de ratón transgénico APP humano y placas AD

30 Inmunohistoquímica en secciones de cerebro

Las secciones de cerebro en parafina consecutivas de un ratón APP23 heterocigoto de 18 meses de edad y las secciones de corteza entorrinal de un paciente AD Braak Etapa III (Institute of Pathology, University Basel) se utilizan para tñido. Se mejora la antigenicidad al tratar las secciones de cerebro humano con ácido fórmico concentrado durante cinco minutos y las secciones de cerebro de ratón al calentar en microondas a 90 °C durante 3 minutos. El suero de los ratones se provoca contra el A β 1-6 humano (obtenido como se describe en el ejemplo 13) se diluyen 1:1000 en PBS con 3% de suero de cabra y se incuban durante la noche. Luego de enjuague, las secciones se incuban durante 1 hora con anticuerpos secundario anti-ratón biotinilado diluido 1:200 en PBS. Después de enjuague, las secciones se procesan adicionalmente con la técnica de avidina-biotina-peroxidasa (Equipo ABC-Elite PK6100; Vector Laboratories). Finalmente, las secciones se hacen reaccionar con sustrato mejorado con metal de Diaminobenzidina (DAB) (Boehringer, Code 1718096), contrateñido con Hemalum, deshidratado, depurado en Xileno y cubierto con portaobjetos.

35

40 El resultado de las cepas histológicas se muestra en la FIGURA 4A y B. Las secciones se tñen con el suero de los tres ratones inmunizados contra el A β 1-6 humano acoplado al VLP Q β . Cada suero tñe positivamente las placas amiloide de los ratones transgénicos y AD. Se muestran los resultados para uno de los tres sueros. El suero provocado contra A β 1-6 humano tñe claramente las placas amiloide del ratón transgénico APP23 humano, así como también las placas amiloide de los pacientes AD. Los sueros preinmunes son negativos. Las placas amiloide extracelulares y los vasos sanguíneos aislados se tñen por los anticuerpos.

45

EJEMPLO 17

Especificidad del suero provocado contra el A β 1-6 humano, se evalúa por histología de placas de ratón

Inmunohistoquímica en piezas de cerebro

5 Las secciones de cerebro en parafinas consecutivas de un ratón APP23 heterocigoto de 3 meses y 18 meses de edad que sobreexpresan el APP humano se tiñen como se describe en el ejemplo 16 con un suero de ratón representativo provocado contra el A β 1-6 humano como se describe en el ejemplo 13, o con un anticuerpo específico policlonal de conejo para los últimos 20 aminoácidos de APP de murino o de humano y que por lo tanto no reconoce el A β . Las secciones incubadas con el anticuerpo policlonal de conejo se tratan como se describe en el ejemplo 16, excepto para el uso de un anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado (BA 1000, Vector Laboratories).

10 El resultado de las cepas histológicas se muestra en la FIGURA 5A, B, C, D y E. A β 1-6, marcado en la parte izquierda inferior de las secciones que indican que el suero provocado contra A β 1-6 se ha utilizado para el teñido, mientras que el "Pab" indica que las secciones que se han teñido con el anticuerpo policlonal específico para los últimos 20 aminoácidos de APP de murino o de humano, corresponden a las posiciones 676-695 en APP695.

15 La comparación del teñido de las secciones de ratones de 18 meses de edad (FIGURA 5A y C) muestra que el suero provocado contra el A β 1-6 no reacciona en forma cruzada con el APP expresado en el cerebro, que sin embargo se tiñe por el anticuerpo policlonal de control. La FIGURA 5 B muestra una sección de cerebro de ratones de 3 meses de edad, un punto de tiempo en donde los depósitos amiloide todavía no son visibles, se tiñen con el anticuerpo policlonal específico para el APP. La FIGURA 5D y 5E muestra una magnificación de la capa piramidal CA1 del hipocampo de la FIGURA 5A. y la FIGURA 5B, respectivamente.

EJEMPLO 18

20 A. Acoplamiento de péptido A β 1-6 a la proteína de cápsido fr

25 Una solución de 120 μ M de la proteína de cápsido fr en 20 mM de Hepes, 150 mM de NaCl a pH 7.2 se hace reaccionar durante 30 minutos con un exceso molar de 10 veces de SMPH (Pierce), se diluye de una solución madre en DMSO, a 25 °C en un agitador oscilante. La solución de reacción se dializa posteriormente dos veces durante 2 horas contra 1 L de 20 mM de Hepes, 150 mM de NaCl, pH 7.2 a 4 °C. La mezcla de reacción fr dializada luego se hace reaccionar con un exceso molar de cinco veces del péptido A β 1-6 (secuencia: NH₂-DAEFRHGGC- CONH₂) (SEQ ID NO: 77) durante 2 horas a 16 °C en un agitador oscilante. Los productos de acoplamiento se analizan mediante SDS-PAGE.

B. Acoplamiento del péptido A β 1-6 a HBcAg-Lys-2cys-Mut

30 Una solución de 1 ml de 120 μ M de HBcAg-Lys-2cys-Mut en 20 mM de Hepes, 150 mM de NaCl a pH 7.2 se hace reaccionar durante 30 minutos con un exceso molar de 10 veces de SMPH (Pierce), se diluye a partir de una solución madre en DMSO, a 25 °C en un agitador oscilante. La solución de reacción se dializa posteriormente dos veces durante 2 horas contra 1 L de 20 mM de Hepes, 150 mM de NaCl, pH 7.2 a 4 °C. La mezcla de reacción dializada HBcAg-Lys-2cys-Mut luego se hace reaccionar con un exceso molar de cinco veces del péptido A β 1-6 (secuencia: NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂) (SEQ ID NO: 77) durante 2 horas a 16 °C en un agitador oscilante. Los productos de acoplamiento se analizan mediante SDS-PAGE.

C. Acoplamiento del péptido AV1-6 a Pili

40 Una solución de 125 μ M Tipo-1 pili de E.coli en 20 mM de Hepes, pH 7.4, se hace reaccionar durante 60 minutos con un exceso molar de 50 veces del reticulador SMPH (Pierce), se diluye a partir de una solución madre en DMSO, a TA en un agitador oscilante. La mezcla de reacción se desalina en una columna PD-10 (Amersham-Pharmacia Biotech). Las fracciones que contienen la proteína que se eluyen de la columna se agrupan, y la proteína pili derivada desalinada se hace reaccionar con un exceso molar de cinco veces del péptido A β 1-6 (secuencia: NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂) (SEQ ID NO: 77) durante 2 horas a 16 °C en un agitador oscilante. Los productos de acoplamiento se analizan mediante SDS-PAGE.

D. Inmunización de ratones con el péptido A β 1-6 acoplado a la proteína de cápsido fr, HBcAg-Lys-2cys-Mut o pili

45 El péptido A β 1-6 acoplado a la proteína de cápsido f, HBcAg-Lys-2cys-Mut o pili como se describió anteriormente se inyecta s.c. en ratones (3 ratones) en el día 0 y 14. Cada ratón (C57BL/6) ser inmuniza con 10 μ g de vacuna se diluye en PBS a 200 μ l. Los ratones se desangran retroorbitalmente en el día 21, y el título de los anticuerpos específicos para el péptido A β 1-6 o A β 1-40 o A β 1-42 se mide mediante ELISA como se describe en el ejemplo 13.

EJEMPLO 19Inmunización de *Macacus rhesus* con Q β hA β 1-6

5 Con el fin de probar la inducción de los anticuerpos contra el A β humano utilizando un péptido A β 1-6 humano con base en la vacuna en el caso en donde A β 1-6 es un auto-antígeno, se inmunizan *Macacus rhesus* con Q β hA β 1-6, cuando la secuencia A β es idéntica entre los humanos y los *Macacus rhesus*. Se hace la vacuna Q β hA β 1-6 como se describe en el ejemplo 13. Se inmunizan cuatro *Macacus rhesus*, entre 10 y 15 años de edad, en el día 0 con 50 μ g de vacuna, y se refuerzan dos veces en el día 28 y 56 con 25 μ g de la vacuna. Los monos se inmunizan subcutáneamente en la espalda. Los animales se desangran en el día 0 (presangrado), 42 y 70. Se recolectan 4 ml de sangre del V. cephalica antebrachii. El título de los anticuerpos específicos para el A β 1-40 se mide mediante ELISA esencialmente como se describe en el ejemplo 13, utilizando un anticuerpo secundario específico para el Mono IgG.

15 Como los humanos y los *Macacus rhesus* presentan la misma secuencia A β , la generación de los anticuerpos de alto título en *Macacus rhesus* específicos para el A β 1-40 muestra que la inmunización con hA β 1-6 acoplado a Q β rompe la tolerancia contra el auto-antígeno A β . Adicionalmente, los anticuerpos que reconocen el A β de longitud completa se generan con el fragmento acoplado A β 1-6 en los primates.

20 Los resultados del ELISA se muestran en La FIGURA 6. Se grafican en el diagrama los títulos de anticuerpos específicos A β 1-40 medidos en el suero de los 4 monos (1-4) inmunizados con Q β hA β 1-6 y el promedio de los títulos de los 4 monos. Los títulos se representan como títulos OD50. El OD50 es la dilución de los anticuerpos en los que la señal alcanza la mitad de su valor máximo. El valor máximo (OD max) se obtiene a partir de un suero de referencia que se origina de un mono inmunizado con Q β hA β 1-27 y reconoce muy bien el A β 1-40, y se mide en la misma placa ELISA.

25 Se desangran dos monos (descritos anteriormente) en el día 97, 110, 117, 124, 138, 143, 152, 159, 166, y reciben una tercera inoculación con 25 μ g de la vacuna en el día 110. Los sueros se agrupan (99 ml) y se utiliza para purificación de afinidad de los anticuerpos específicos A β 1-6. Estos anticuerpos se utilizan para tñido inmunohistoquímico en una concentración de 1.5 μ g/ml y se utiliza un anticuerpo anti-mono secundario biotinilado para detección. Las secciones de cerebro en parafina de ratones APP23 heterocigotos de 18 meses de edad y un paciente AD - Braak Etapa III - se utilizan para tñido. Se observa el tñido específico de placa en las secciones de cerebro de ratón APP23 y en las secciones de cerebro de paciente AD (FIGURA 7).

30 El resultado del análisis histológico se muestra en la FIGURA 7A y B. Se describe en la FIGURA 7A el tñido de placas de ratón transgénico APP humano (cepa APP23) con el antisuero de afinidad descrita anteriormente específico para el A β 1-6. La FIGURA 7B muestra el tñido de placas AD humanas con el mismo antisuero purificado. El antisuero purificado se utiliza en una concentración de 1.5 μ g/ml en ambos casos. Las placas típicas se indican por una flecha en ambas figuras.

EJEMPLO 20

35 Acoplamiento de VLP A β 1-6 a AP205 de murino, inmunización de ratones y análisis de la respuesta inmune

A. Acoplamiento de peptide VLP A β 1-6 a AP205 de murino

40 El péptido A β 1-6 de murino (mA β 1-6, secuencia: NH₂-DAEFGHGCG-CONH₂ (SEQ ID NO: 78) se sintetiza químicamente; el grupo NH₂ inicial indica que el péptido tiene un terminal N libre, y el grupo de terminal NH₂ indica que el péptido tiene un terminal carboxi amidado). El VLP AP205 (expresado y purificado como se describe en el ejemplo 1), en 20 mM de Hepes, 150 mM de NaCl, pH 8.0 (HBS, pH 8.0) se hace reaccionar en una concentración de 2 mg/ml (determinada en un ensayo Bradford), con 2.86 mM de SMPH (Pierce, Rockford IL), diluido de una solución madre 100 mM en DMSO, durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). La mezcla de reacción luego se dializa dos veces contra un volumen de 1000 veces de HBS, pH 7.4. a 4°C durante dos horas; el dializado resultante y el VLP AP205 derivado se pone en matraz congelado en nitrógeno líquido y se almacena a -20°C durante la noche. El VLP AP205 derivado se diluye con un volumen de 20 mM de HBS, pH 7.4, y se hace reaccionar 2 horas a 15°C bajo agitación con 719 μ M de mA β 1-6 de péptido que se diluye en la mezcla de reacción de una solución madre de 50 mM en DMSO. La reacción de acoplamiento se dializa dos veces contra un volumen de 1000 veces de HBS, pH 7.4, durante 2 horas y durante la noche. La mezcla de reacción dializada se pone en matraz congelado en nitrógeno líquido en alícuotas para almacenamiento a -80°C hasta uso adicional.

Una alícuota se descongela, y el acoplamiento del péptido mA β 1-6 a las subunidades VLP AP205 se evalúa por SDS-PAGE y la concentración de la proteína se mide en un ensayo Bradford. El resultado de la reacción de acoplamiento se muestra en la FIGURA 8.

5 LA FIGURA 8 muestra el análisis SDS-PAGE de la reacción de acoplamiento del péptido mA β 1-6 a VLP AP205. Las muestras corren bajo condiciones de reducción en un gel de Tris-glicina al 16% y se tiñen con azul brillante coomassie. línea 1 es el marcador de proteína, con pesos moleculares correspondientes indicados en el límite izquierdo del gel; línea 2, la proteína AP205VLP; línea 3, VLP AP205 derivado; línea 4, el sobrenadante de la reacción de acoplamiento de VLP AP205 al péptido mA β 1-6; línea 5, el glóbulo de la reacción de acoplamiento de VLP AP205 al péptido mA β 1-6. Las subunidades VLP No AP205 que se dejan inacopladas se pueden detectar en el gel, mientras que son visibles las bandas que corresponden a varios péptidos por subunidades, lo que demuestra una eficiencia de acoplamiento muy alta. En particular, existe mucho más de un péptido A β 1-6 por subunidad VLP AP205.

B. Inmunización de ratones con péptido mA β 1-6 acoplado a VLP AP205 y análisis de la respuesta inmune

15 El VLP AP205 acoplado al péptido mA β 1-6 se inyecta s.c. en ratones (3 ratones) en el día 0 y 14. El péptido mA β 1-6 se acopla a VLP AP205 como se describió anteriormente. Cada ratón (C57BL/6) se inmuniza con 25 μ g de vacuna se diluye en PBS a 200 μ l. Los ratones se desangran retroorbitalmente en el día 21, y el título de los anticuerpos específicos para el péptido mA β 1-6 se mide en un ELISA contra mA β 1-6. El péptido mA β 1-6 se acopla a ARNsa de bovino A utilizando el reticulador químico sulfo-SPDP. Las placas ELISA se cubren con preparaciones de ARNsa-mA β 1-6 en una concentración de 10 μ g/ml. Las placas se bloquean y luego se incuban con suero de ratón serialmente diluido. Los anticuerpos unidos se detectan con anticuerpos IgG anti-ratón enzimáticamente marcados. Como un control, el suero preinmune de los mismos ratones también se prueba. Los resultados se muestran en la FIGURA 9.

25 LA FIGURA 9 muestra un análisis ELISA de los anticuerpos IgG específicos para el péptido mA β 1-6 en el suero de ratones inmunizados con el péptido mA β 1-6 acoplado a VLP AP205. Los resultados se muestran para el suero de los tres ratones inmunizados recolectado en el día 21 (A1 d21 -A3 d21), el suero preinmune se indica como "pre inm" en la figura; se muestra el resultado para un suero preinmune. La comparación del suero pre-inmune con el suero de los ratones inmunizados con mA β 1-6 acoplado a VLP AP205 muestra que una respuesta de anticuerpo específico fuerte contra péptido mA β 1-6, que es un auto-antígeno, se puede obtener en la ausencia del adyuvante. Adicionalmente, el acoplamiento de un auto-péptido a VLP AP205 conduce al rompimiento de la tolerancia contra este péptido, y a una respuesta inmune específica muy alta. Así, el VLP AP205 es adecuado para generar títulos altos de anticuerpo contra los péptidos A β en la ausencia del adyuvante.

EJEMPLO 21

Inmunización con Q β hA β 1-6 reduce las placas amiloide en ratones transgénico que sobreexpresan la proteína precursora amiloide mutante "Suecia/Londres"

35 Este ejemplo demuestra que la inmunización con Q β hA β 1-6 en un modelo de ratón desarrolla enfermedad de Alzheimer- como difusa (Congo-Red negativo) placas amiloide, que resulta en una reducción masiva de la densidad de la placa en las áreas de cerebro neocortical y subcortical. La ocurrencia histológica de las placas amiloide difusas es una característica prominente de la patología del cerebro AD (Selkoe, 1994, Annu. Rev. Neurosci. 17:489-517) y, por lo tanto, el ejemplo demuestra que la inmunización con Q β hA β 1-6 proporciona un método efectivo para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

40 Se utilizan para evaluar la eficacia terapéutica de la inmunización con ratones transgénicos Q β -A β 1-6 que sobreexpresan la proteína precursora amiloide mutante "Suecia/Londres" bajo el control del promotor de ratón Thy-1 (APP24; K670N/M671L; V7171, patente No. WO980-36-4423). Esta cepa de ratón se caracteriza por un gran número de placas amiloide en la neocorteza, hipocampo, putamen caudado, y tálamo en la edad de 18 meses. Las placas se puede observar primero en una edad de 9 meses. Histológicamente, las placas amiloide en los ratones APP24 son predominantemente de un tipo difuso, es decir ellos son negativos en teñido Congo-Red. A un grado menor, también se pueden encontrar placas compactas amiloide (Congo-Red positivo).

50 El péptido A β 1-6 humano acoplado a VLP Q β (Q β hA β 1-6) se hace como se describe en el ejemplo 13. En términos del procedimiento experimental siguiente, que no es necesario describir o permitir la invención, los ratones APP24 transgénicos de 9.5 meses de edad se inyectan subcutáneamente en el día 0 con 25 μ g de Q β hA β 1-6 en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) (administrado como 2x100 μ l por ratón) (n=16) o como controles negativos con PBS (administrado como 2x100 μ l por ratón) (n=9) o con la partícula Q β similar a virus carece del antígeno acoplado

(n=11). Los ratones se inyectan posteriormente 25 µg de la vacuna QβhAβ1-6, Qβ, o PBS en el día 15, 49, 76, 106, 140, 169, 200, 230, 259, y 291. Los animales se desangran 1-2 días antes de la primera inmunización (día 0) y en el día 56, 90, 118, 188, 214, 246, y 272 por medio de la vena de la cola. El suero de sangre también se recolecta en el día 305, en cuyo tiempo también los cerebros se recolectan para histopatología (edad de los ratones en este punto de tiempo: 19.5 meses).

El título de los anticuerpos específicos para el Aβ1-40 se mide mediante ELISA esencialmente como se describe en el ejemplo 13. Los resultados del ELISA se muestran en la FIGURA 10. Se grafican en el diagrama los títulos de los anticuerpos específicos Aβ1-40 o Aβ1-42 medidos en el suero de ratones inmunizados con QβhAβ1-6. Los títulos se representan como títulos de OD50%. El OD50% es la dilución de los anticuerpos en los que la señal alcanza la mitad de su valor máximo. El valor máximo (OD max) se obtiene a partir de un anticuerpo de referencia que reconoce Aβ1-40 y Ab42, y se mide en la misma placa ELISA. Todos los ratones inmunizados QβhAβ1-6 desarrollan títulos de OD50% por encima de 1:8000 (los títulos de suero pre-inmune están por debajo de 1:100) lo que demuestra una respuesta de anticuerpo consistente a QβhAβ1-6 aún en ratones APP24 (FIGURA 10). Los títulos de OD50% media en el grupo inmunizado están en el rango de 1:20'000 a 1:50'000 a lo largo del periodo de inmunización.

Para la cuantificación de las placas amiloide, los cerebros se fijan mediante inmersión en 4% de formaldehído en 0.1 M de PBS a 4°C. Después de deshidratación con etanol, los cerebros se embeben en parafina y se corta sagitalmente con un microtoma a 4 µm de secciones. Las secciones se montan en portaobjetos supercongelados y se secan a 37°C. Las secciones se lavan en PBS y se mejora la antigenicidad mediante calentamiento en microondas a 90°C durante 3 minutos en amortiguador de ácido cítrico al 0.1 M. El antisuero NT11 (anti Aβ1-40, Sturchler- Pierrat et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 13287-13292) se diluye 1:1000 en PBS con 3% de suero de cabra y se incuba durante la noche a 4°C. Luego de enjuague, las secciones se incuban durante 1 hora con anticuerpo secundario IgG anti-conejo biotinilado (BA1000, Vector Laboratories) diluido 1:200 en PBS. Después de enjuague, las secciones se procesan adicionalmente con la técnica avidina-biotina-peroxidasa (Equipo ABC-Elite PK6100; Vector Laboratories). Finalmente, las secciones se hacen reaccionar con sustrato mejorado con metal Diaminobenzidina (DAB) (Boehringer, Code 1718096), se contratiñen con Hemalum, se deshidratan, se depuran en Xileno y se cubren con porta objetos. Se utilizan las series aleatorias sistemáticas de las secciones de cerebro en tres diferentes planos anatómicos por animal para el análisis. Las placas amiloide se cuantifican utilizando un analizador de imágenes MCID (Imaging Research, Brock University, Ontario-Canada, Programa Versión M5 elite). La imagen microscópica se digitaliza mediante el uso de una cámara de TV CCD blanco y negro Xillix y se almacena con resolución de 640x480 pixeles en 256 niveles de gris. El tamaño del pixel se calibra utilizando un micrómetro de objeto en magnificación de 5x (Leica Neoplan Objective). Se analiza utilizando un motor que conduce la etapa de microscopio para el posicionamiento exacto de los campos de objeto adyacentes de la neocorteza completa y el núcleo olfatorio de cada sección. Para cada campo de objeto el área anatómica se define mediante un esquema manual. Para cada sección individual el área de la muestra se define mediante configuración de umbral manual (nivel de gris) entre placas amiloide inmunopositivas y fondo de tejido. Los artefactos de tejido aislados se excluyen mediante esquema manual. Los datos brutos se miden como conteos individuales (depósitos amiloide) y los valores de área proporcionales (amiloide/corteza inmunopositivo o núcleo olfatorio).

Se normalizan los datos de cada ratón en un número de depósitos (placas) por mm² y el área de placa total en % de la neocorteza completa. Los ratones inmunizados QβhAβ1-6 revelan una reducción dramática de los depósitos amiloide en la corteza y las áreas subcorticales cuando se compara con los grupos de control inyectados PBS o Qβ (FIGURA 11). El número medio de depósitos y el área de placa total se reducen altamente significativamente entre 80-98 % comparado con el grupo PBS en la corteza, putamen caudado, hipocampo, y tálamo (p< 0.001 vs. grupo PBS, prueba Mann-Whitney; FIGURA 12).

En un Segundo estudio, los ratones transgénicos APP24 de 13.5 meses de edad se inyectan subcutáneamente en el día 0 con 25 µg de QβhAβ1-6 en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) (administrado como 2x100 µl por ratón) (n=15) o como controles negativos con PBS (administrado como 2x100 µl por ratón) (n=15). Los ratones se inyectan posteriormente con 25 µg de la vacuna QβhAβ1-6, o PBS en el día 16, 46, 76, 109, 140, y 170. Los animales se desangran 1-2 días antes de la primera inmunización (día 0) y en el día 31, 59, 128, y 154 por medio de la vena de la cola. El suero de la sangre también se recolecta en el día 184, en cuyo momento también se recolectan los cerebros para histopatología (edad de los ratones en este punto de tiempo: 19.5 meses). El título de los anticuerpos específicos para el Aβ1-40 se determina y se expresa como se describió anteriormente y de nuevo se encuentra que todos los ratones inmunizados responden a la inmunización QβhAβ1-6 con títulos de suero OD50% por lo menos por encima de 1:2000 (no mostrados). Los títulos de OD50% medios están en el rango de 1:10'000 a 1:50'000 a lo largo del periodo de inmunización. La cuantificación de los depósitos amiloide se hace como se describió anteriormente. Comparado con el experimento en donde se inicia la inmunización (es decir en una edad de 9.5 meses) la reducción del número de depósito de placa (-55 %) y área (- 32 %) es menos dramática en la neocorteza, pero es muy pronunciado (FIGURA 13) y altamente significativo (p>0.001 vs. PBS, prueba Mann-

Whitney). En el número de depósito de placa de las áreas subcorticales y el área se reducen por 60-90 % en el grupo inmunizado Q β hA β 1-6. El efecto más pronunciado en estas áreas cuando se compara con la corteza se relaciona probablemente con el transcurso de tiempo más prolongado de la formación de placas en estas áreas.

5 Tomados juntos, ambos experimentos demuestran que la inmunización Q β hA β 1-6 en ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína precursora amiloide mutante "Suecia/Londres" reduce dramáticamente la ocurrencia de los depósitos amiloide en estos ratones.

10 Figura 10: Títulos de anticuerpo anti A β 40/42 de suero (OD50%) en ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína precursora amiloide mutante "Suecia/Londres". Los ratones se inmunizan con Q β hA β 1-6 entre 9.5 y 19 meses de edad. Se muestran valores individuales (puntos negros) y gráficos de caja, en donde los extremos de las cajas definen el 25 y 75 percentiles, con una línea en la media y las barras de error definen el 10 y 90 percentiles (las capas externas se muestran como puntos).

Figura 11: Teñido inmunohistoquímico de las placas amiloide en secciones de cerebro sagitales. La sección de cerebro sagital de un ratón transgénico que sobreexpresa la proteína precursora amiloide mutante "Suecia/Londres" Q β (A) o la vacuna Q β hA β 1-6 (B) se muestra en la figura.

15 Figura 12: Cuantificación del depósito de placa en ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína precursora amiloide mutante "Suecia/Londres" después de la inmunización entre 9.5 y 19 meses de edad. (A) Densidad de placa cortical. (B) Área de la placa cortical. (C) Densidad de la placa en el putamen caudado. (D) El área de la placa en el putamen caudado. (E) Densidad de placa en el hipocampo. (F) Área de la placa en el hipocampo. (G) Densidad de la placa en el tálamo. (H) Área de la placa en el tálamo. La densidad de la placa se expresa en placas/mm², el área de placa en porcentaje de área de tejido se cubre por beta amiloide. Los datos se muestran como valores individuales (puntos negros) y gráfico de caja. Los extremos de las cajas definen el 25 y 75 percentiles, con una línea en la medida y las barras de error definen el 10 y 90 percentiles. ** p<0.001 (Prueba de suma de rangos Mann Whitney). PBS, n=9, Q β , n=11, Q β hA β 1-6, n=16.

EJEMPLO 22

25 Inmunización con Q β hA β 1-6 reduce las placas amiloide en ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína precursora amiloide mutante "Suecia".

30 Este ejemplo demuestra que la inmunización con Q β hA β 1-6 proporciona un método efectivo para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer aún cuando se inicia la inmunización en un estado muy avanzado de patología de la placa amiloide. El proceso de depósito de la placa amiloide en el modelo de ratón AD utilizado en este ejemplo inicia en una edad de aproximadamente 6 meses (Sturchler-Pierrat et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 13287-13292). En el estudio descrito aquí, la inmunización con Q β hA β 1-6 se inicia en una edad de 18 meses, en donde hay un alto número de placas compactas que se han formado en la corteza. El ejemplo también demuestra la capacidad del Q β hA β 1-6 para inducir los anticuerpos A β 40/42 en animales muy viejos (sin respondedores en 19 ratones inmunizados).

35 Para evaluar los efectos terapéuticos de la inmunización se utilizan ratones transgénicos Q β hA β 1-6 que sobreexpresan la proteína precursora amiloide "Suecia" (APP23; K670N/M671L, Sturchler-Pierrat et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 13287-13292). La patología similar a Alzheimer en estos ratones se ha caracterizado extensivamente (Calhoun et al., 1998, Nature 395: 755-756; Phinney et al., 1999, J. Neurosci. 19: 8552-8559; Bondolfi et al., 2002, J. Neurosci. 22: 515-522).

40 El péptido A β 31-6 humano acoplado a VLP Q β (Q β hA β 1-6) se hace como se describe en el ejemplo 13. En términos del procedimiento experimental siguiente, que no es necesario describir o permitir la invención, los ratones transgénicos APP23 de 18 meses de edad se inyectan subcutáneamente en el día 0 con 25 μ g de Q β hA β 1-6 disuelto en solución salina amortiguada con fosfato (administrado como 2x100 μ l por ratón) (n=19) o solución salina amortiguada con fosfato como un control negativo (n=17) y se inocula en el día 13, 27-34, 61-63, 90-96, y 123-130 con 25 μ g de vacuna. Los animales se desangran 1-2 días antes de la primera inmunización (día 0) y en el día 41-45, y día 68 por medio de la vena de la cola. El suero de la sangre también se recolecta en el día 152-154, en cuyo momento también se recolectan los cerebros para histopatología (edad de los ratones en este punto de tiempo: 23 meses).

50 El título de los anticuerpos específicos para el A β 1-40 se mide por ELISA esencialmente como se describe en el ejemplo 13 y los resultados se expresan como se describe en el ejemplo 21. Los resultados del ELISA se muestran en la FIGURA 14. Todos los ratones inmunizados Q β hA β 1-6 desarrollan títulos de OD50% por encima de 1:2000

(los títulos de suero pre-inmune están por debajo de 1:100) lo que demuestra una respuesta de anticuerpo consistente con Q β -A β 1-6 aún en ratones muy viejos (FIGURA 14). Los títulos de OD50% medios están en el rango de 1:9'000 a 1:20'000 a lo largo del periodo de inmunización.

5 Se hace la cuantificación de las placas amiloide como se describe en el ejemplo 21. Los datos de cada ratón se normalizan en un número de depósitos (placas) por mm² y el área de placa total en % de la neocorteza completa. Los ratones inmunizados Q β hA β 1-6 revelan un número más pequeño de depósitos en la corteza (Figura 15, FIGURA 16), en su mayoría debido a una reducción de placas de tamaño más pequeño. Comparado con el grupo no inmunizado el número de placa medio se reduce en 33 % en el grupo inmunizado Q β hA β 1-6 (p< 0.001 vs grupo PBS, prueba Mann-Whitney. Debido a que la mayor parte de las placas de tamaño más pequeño se afecta por la
10 reducción del área de la placa total es moderada y alcanza un 10 % (p<0.01 vs. grupo PBS, prueba Mann-Whitney).

15 Figura 14: Los títulos de anticuerpo anti A β 40/42 de suero (OD50%) en ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína precursora amiloide mutante "Suecia". Los ratones se inmunizan con Q β hA β 1-6 entre 18 y 23 meses de edad. Se muestran los valores individuales (puntos negros) y gráficos de caja, en donde los extremos de las cajas definen el 25 y 75 percentiles, con una línea en la media y las barras de error definen el 10 y 90 percentiles (las capas externas se muestran como puntos).

Figura 15: Teñido inmunohistoquímico de placas amiloide en secciones de cerebro sagital. Las flechas apuntan los depósitos de tamaño más pequeño. Se muestra en la figura una sección de cerebro sagital de un ratón transgénico que sobreexpresa la proteína precursora amiloide mutante "Suecia" inmunizada con PBS (A) o Q β -A β 1-6 (B).

20 Figura 16: Cuantificación de depósito de placa en ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína precursora amiloide mutante "Suecia" después de inmunización entre 18 y 23 meses de edad. (A) Densidad de la placa cortical. (B) Área de la placa cortical. La densidad de la placa se expresa en placas/mm², el área de placa en porcentaje de área de tejido se cubre por beta amiloide. Los datos se muestran como valores individuales (puntos negros) y gráfico de caja. Los extremos de las cajas definen el 25 y 75 percentiles, con una línea en la medida y las barras de error definen el 10 y 90 percentiles. ** p<0.001 (Prueba de suma de rangos Mann Whitney). PBS, n=17, Q β hA β 1-6, n=19.

25 Ahora se ha descrito la presente invención en algún detalle por medio de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de entendimiento, será obvio para una persona medianamente experta en la técnica que lo mismo se puede desarrollar al modificar o cambiar la invención dentro de un rango equivalente y amplio de condiciones, formulaciones y otros parámetros sin afectar el alcance de la invención o cualquier realización específica de la misma, y que tales modificaciones o cambios están destinados a estar abarcados dentro del alcance de las
30 reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Cytos Biotechnology AG

Novartis Pharma AG

35 Bachmann, Martin F

Tissot, Alain

Ortmann, Rainer

Lüönd, Rainer

staufenbiel, Matthias

40 Frey, Peter

<120> Disposiciones de Antígeno Amiloide Beta 1-6

<130> PA041wo

<150> us 60/396,639

<151> 2002-07-19

<150> US 60/470,432

<151> 2003-05-15

5 <160> 93

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 172

<212> PRT

10 <213> Escherichia coli

<400> 1

ES 2 365 706 T3

Met Ala Val Val Ser Phe Gly Val Asn Ala Ala Pro Thr Thr Pro Gln
1 5 10 15

Gly Gln Gly Arg Val Thr Phe Asn Gly Thr Val Val Asp Ala Pro Cys
20 25 30

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

Ser Lys Ser Phe Leu Ala Asn Asp Gly Gln Ser Lys Pro Met Asn Leu
50 55 60

Asp Ile Glu Leu Val Asn Cys Asp Ile Thr Ala Phe Lys Asn Gly Asn
65 70 75 80

Ala Lys Thr Gly Ser Val Lys Leu Ala Phe Thr Gly Pro Thr Val Ser
85 90 95

Gly His Pro Ser Glu Leu Ala Thr Asn Gly Gly Pro Gly Thr Ala Ile
100 105 110

Met Ile Gln Ala Ala Gly Lys Asn Val Pro Phe Asp Gly Thr Glu Gly
115 120 125

Asp Pro Asn Leu Leu Lys Asp Gly Asp Asn Val Leu His Tyr Thr Thr
130 135 140

Val Gly Lys Lys Ser Ser Asp Gly Asn Ala Gln Ile Thr Glu Gly Ala
145 150 155 160

Phe Ser Gly Val Ala Thr Phe Asn Leu Ser Tyr Gln
165 170

<210> 2

<211> 182

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 2

ES 2 365 706 T3

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

<210> 3

<211> 853

<212> ADN

5 <213> Escherichia coli

<400> 3

ES 2 365 706 T3

```

acgtttctgt ggctcgacgc atcttcctca ttcttctctc caaaaaccac ctcatgcaat    60
ataaacatct ataaataaag ataacaaata gaatattaag ccaacaaata aactgaaaaa    120
gtttgtccgc gatgctttac ctctatgagt caaaatggcc ccaatgtttc atcttttggg    180
ggaaactgtg cagtgttggc agtcaaactc gttgacaaac aaagtgtaca gaacgactgc    240
ccatgtcgat ttagaaatag ttttttgaag ggaaagcagc atgaaaatta aaactctggc    300
aatcgttggt ctgtcggctc tgtccctcag ttctacgacg gctctggccg ctgccacgac    360
ggttaatggt gggaccgctc actttaaagg ggaagtgtt aacgccgctt gcgcagttga    420
tgcaggctct gttgatcaaa ccgttcagtt aggacaggtt cgtaccgcat cgctggcaca    480
ggaaggagca accagttctg ctgtcgggtt taacattcag ctgaatgatt gcgataccea    540
tgttgcatct aaagccgctg ttgccttttt aggtacggcg attgatgcgg gtcataccea    600
cgttctggct ctgcagagtt cagctgcggg tagcgcaaca aacgttgggtg tgcagatcct    660
ggacagaacg ggtgctgcgc tgacgctgga tgggctgcaca tttagttcag aaacaaccct    720
gaataacgga accaatacca ttccgttcca ggcgcgttat tttgcaaccg gggccgcaac    780
cccgggtgct gctaatagcgg atgcgacctt caaggttcag tatcaataac ctacctaggt    840
tcagggacgt tca                                                    853

```

<210> 4

<211> 132

<212> PRT

5 <213> Bacteriófago Q-beta

<400> 4

ES 2 365 706 T3

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

115

120

125

Asn Pro Ala Tyr
 130

<210> 5

<211> 329

<212> PRT

5 <213> Bacteriófago Q-beta

<400> 5

Met Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly
 1 5 10 15
 Lys Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
 20 25 30
 Val Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
 35 40 45
 Val Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
 50 55 60
 Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser
 65 70 75 80
 Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser
 85 90 95
 Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu
 100 105 110
 Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln
 115 120 125
 Leu Asn Pro Ala Tyr Trp Thr Leu Leu Ile Ala Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Ser Lys Pro Asp Pro Val Ile Pro Asp Pro Pro Ile Asp Pro Pro Pro
 145 150 155 160
 Gly Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Pro Phe Ala Ile Trp Ser Leu Glu Glu
 165 170 175
 Val Tyr Glu Pro Pro Thr Lys Asn Arg Pro Trp Pro Ile Tyr Asn Ala
 180 185 190
 Val Glu Leu Gln Pro Arg Glu Phe Asp Val Ala Leu Lys Asp Leu Leu
 195 200 205
 Gly Asn Thr Lys Trp Arg Asp Trp Asp Ser Arg Leu Ser Tyr Thr Thr
 210 215 220

Phe Arg Gly Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp Ala Thr Tyr
 225 230 235 240

Leu Ala Thr Asp Gln Ala Met Arg Asp Gln Lys Tyr Asp Ile Arg Glu
 245 250 255

Gly Lys Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asn Ile Glu Arg Phe Ile Tyr Leu
 260 265 270

Lys Ser Ile Asn Ala Tyr Cys Ser Leu Ser Asp Ile Ala Ala Tyr His
 275 280 285

Ala Asp Gly val Ile val Gly Phe Trp Arg Asp Pro Ser Ser Gly Gly
 290 295 300

Ala Ile Pro Phe Asp Phe Thr Lys Phe Asp Lys Thr Lys Cys Pro Ile
 305 310 315 320

Gln Ala val Ile val val Pro Arg Ala
 325

<210> 6

<211> 129

<212> PRT

5 <213> Bacteriófago R17

<400> 6

ES 2 365 706 T3

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

Tyr

<210> 7

<211> 130

5 <212> PRT

<213> Bacteriófago fr

<400> 7

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

Ile Tyr
 130

<210> 8

<211> 130

<212> PRT

5 <213> Bacteriófago UGA

<400> 8

ES 2 365 706 T3

Met Ala Thr Leu Arg Ser Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr Gly
 1 5 10 15

Asn Val Thr Val Val Pro Val Ser Asn Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp
 20 25 30

Leu Ser Asn Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Arg Val Thr Ala Ser Tyr
 35 40 45

Arg Ala Ser Gly Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Ala Ile Lys Leu Glu Val
 50 55 60

Pro Lys Ile Val Thr Gln Val Val Asn Gly Val Glu Leu Pro Gly Ser
 65 70 75 80

Ala Trp Lys Ala Tyr Ala Ser Ile Asp Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala
 85 90 95

Ala Thr Asp Asp Val Thr Val Ile Ser Lys Ser Leu Ala Gly Leu Phe
 100 105 110

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

Tyr Ala
 130

<210> 9

<211> 132

<212> PRT

5 <213> Bacteriófago Sp

<400> 9

ES 2 365 706 T3

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

<210> 10

<211> 329

<212> PRT

5 <213> Bacteriófago SP

<400> 10

ES 2 365 706 T3

Ala Lys Leu Asn Gln Val Thr Leu Ser Lys Ile Gly Lys Asn Gly Asp
1 5 10 15

Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45

Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Phe Lys Val
50 55 60

Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Arg Asp Ala Cys Asp
65 70 75 80

Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Phe Ala Asp Val Thr Leu Ser Phe Thr
85 90 95

Ser Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu Ala
100 105 110

Ala Leu Leu Ala Asp Pro Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu Asn
115 120 125

Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Val Ala Ser Ser Gly Gly Gly Asp
130 135 140

Asn Pro Ser Asp Pro Asp Val Pro Val Val Pro Asp Val Lys Pro Pro
145 150 155 160

Asp Gly Thr Gly Arg Tyr Lys Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Leu Gly
165 170 175

Ser Ile Tyr Glu Val Gly Lys Glu Gly Ser Pro Asp Ile Tyr Glu Arg
180 185 190

Gly Asp Glu Val Ser Val Thr Phe Asp Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu
195 200 205

Gly Asn Thr Asn Trp Arg Asn Trp Asp Gln Arg Leu Ser Asp Tyr Asp
210 215 220

Ile Ala Asn Arg Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp
225 230 235 240

Ala Thr Ala Met Gln Ser Asp Asp Phe Val Leu Ser Gly Arg Tyr Gly
245 250 255

Val Arg Lys Val Lys Phe Pro Gly Ala Phe Gly Ser Ile Lys Tyr Leu
 260 265 270

Leu Asn Ile Gln Gly Asp Ala Trp Leu Asp Leu Ser Glu Val Thr Ala
 275 280 285

Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser
 290 295 300

Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Gln Phe Asn Ser Ala Asn Cys Pro
 305 310 315 320

Val Gln Thr Val Ile Ile Ile Pro Ser
 325

<210> 11

<211> 130

<212> PRT

5 <213> Bacteriófago MS2

<400> 11

Met Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr
 1 5 10 15

Gly Asp Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu
 20 25 30

Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser
 35 40 45

Val Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu
 50 55 60

Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val
 65 70 75 80

Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe
 85 90 95

Ala Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu
 100 105 110

Leu Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly
 115 120 125

Ile Tyr
 130

<210> 12

<211> 133

<212> PRT

<213> Bacteriófago m11

<400> 12

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

5 <210> 13

<211> 133

<212> PRT

<213> Bacteriófago Mx1

<400> 13

ES 2 365 706 T3

Met Ala Lys Leu Gln Ala Ile Thr Leu Ser Gly Ile Gly Lys Asn Gly
 1 5 10 15

Asp Val Thr Leu Asn Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
 20 25 30

Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
 35 40 45

Val Thr Ile Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
 50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr
 65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser
 85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu
 100 105 110

Leu Lys Ala Leu Leu Ala Asp Pro Met Leu Ile Asp Ala Ile Asp Asn
 115 120 125

Leu Asn Pro Ala Tyr
 130

<210> 14

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Bacteriófago NL95

<400> 14

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

Gly Ser Glu Ala Leu Val Glu Phe Glu Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu
 195 200 205

Gly Asn Glu Phe Trp Arg Asn Trp Asp Gly Arg Leu Ser Lys Tyr Asp
 210 215 220

Ile Glu Thr His Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Val Asp Leu Asp
 225 230 235 240

Ala Ser Val Met Gln Ser Asp Glu Tyr Val Leu Ser Gly Ala Tyr Asp
 245 250 255

Val Val Lys Met Gln Pro Pro Gly Thr Phe Asp Ser Pro Arg Tyr Tyr
 260 265 270

Leu His Leu Met Asp Gly Ile Tyr Val Asp Leu Ala Glu Val Thr Ala
 275 280 285

Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser
 290 295 300

Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Arg Phe Asn Arg His Asn Cys Pro
 305 310 315 320

Val Gln Thr Val Ile Val Ile Pro Ser Leu
 325 330

<210> 15

<211> 129

<212> PRT

5 <213> Bacteriófago f2

<400> 15

Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Gly Thr Gly
 1 5 10 15

Asn Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp
 20 25 30

Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val
 35 40 45

Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val
 50 55 60

Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala
 65 70 75 80

Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Leu Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala
 85 90 95

Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu
 100 105 110

Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile
 115 120 125

Tyr

<210> 16

<211> 128

<212> PRT

5 <213> Bacteriófago PP7

<400> 16

Met Ser Lys Thr Ile Val Leu Ser Val Gly Glu Ala Thr Arg Thr Leu
 1 5 10 15

Thr Glu Ile Gln Ser Thr Ala Asp Arg Gln Ile Phe Glu Glu Lys Val
 20 25 30

Gly Pro Leu Val Gly Arg Leu Arg Leu Thr Ala Ser Leu Arg Gln Asn
 35 40 45

Gly Ala Lys Thr Ala Tyr Arg Val Asn Leu Lys Leu Asp Gln Ala Asp
 50 55 60

Val Val Asp Cys Ser Thr Ser Val Cys Gly Glu Leu Pro Lys Val Arg
 65 70 75 80

Tyr Thr Gln Val Trp Ser His Asp Val Thr Ile Val Ala Asn Ser Thr
 85 90 95

Glu Ala Ser Arg Lys Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Lys Ser Leu Val Ala
 100 105 110

Thr Ser Gln Val Glu Asp Leu Val Val Asn Leu Val Pro Leu Gly Arg
 115 120 125

<210> 17

<211> 132

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Bacteriófago mutante Qbeta 240

<400> 17

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

<210> 18

<211> 132

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Bacteriófago mutante Q-beta 243

<400> 18

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

115

120

125

Asn Pro Ala Tyr
 130

<210> 19

<211> 132

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Bacteriófago mutante Q-beta 250

<400> 19

Ala Arg Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Arg Asp Gly Lys
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
 50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
 85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
 100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
 130

<210> 20

<211> 132

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Bacteriófago mutante Q-beta 251

<400> 20

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Arg
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val

Ala Arg Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Arg
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
 50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
 85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
 100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
 130

<210> 22

<211> 185

<212> PRT

5 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 22

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Asn Asn Leu Glu Asp Pro Ala
 65 70 75 80

Ser Arg Asp Leu Val Val Asn Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys
 85 90 95

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

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
 115 120 125

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
 130 135 140

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg
 145 150 155 160

Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg
 165 170 175

Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
 180 185

<210> 23

<211> 212

<212> PRT

5 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 23

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr
 1 5 10 15
 Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile
 20 25 30
 Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu
 35 40 45
 Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser
 50 55 60
 Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His
 65 70 75 80
 His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp Leu Met Asn
 85 90 95
 Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Glu Asp Pro Val Ser Arg Asp
 100 105 110
 Leu Val Val Gly Tyr Val Asn Thr Thr Val Gly Leu Lys Phe Arg Gln
 115 120 125
 Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val
 130 135 140
 Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala
 145 150 155 160
 Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr
 165 170 175
 Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro
 180 185 190
 Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg
 195 200 205
 Glu Ser Gln Cys
 210

<210> 24

<211> 188

<212> PRT

5 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 24

ES 2 365 706 T3

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu
 1 5 10 15

Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp
 20 25 30

Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys
 35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu
 50 55 60

Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Thr Ser Glu Gln
 65 70 75 80

Val Arg Thr Ile Ile Val Asn His Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys
 85 90 95

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

His Thr Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
 115 120 125

Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
 130 135 140

Glu His Thr Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ala Arg Ala Ser Arg Ser
 145 150 155 160

Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro
 165 170 175

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Ser Thr Asn Cys
 180 185

<210> 25

<211> 185

5 <212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 25

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Asn Asn Leu Glu Asp Pro Ala
 65 70 75 80

Ser Arg Asp Leu Val Val Asn Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys
 85 90 95

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

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
 115 120 125

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
 130 135 140

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg
 145 150 155 160

Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg
 165 170 175

Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
 180 185

<210> 26

<211> 152

<212> PRT

5 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 26

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

<210> 27

<211> 3635

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> plásmido pAP283-58

<400> 27

cgagctcgcc cctggcttat cgaaattaat acgactcact atagggagac cggaattcga	60
gctcgcccgg ggatcctcta gaattttctg cgcacccatc cggggtggcg cccaaagtga	120
ggaaaatcac atggcaaata agccaatgca accgatcaca tctacagcaa ataaaattgt	180
gtggtcggat ccaactcgtt tatcaactac attttcagca agtctgttac gccaacgtgt	240
taaagtgggt atagccgaac tgaataatgt ttcagggtcaa tatgtatctg tttataagcg	300
tcctgcacct aaaccggaag gttgtgcaga tgcctgtgtc attatgccga atgaaaacca	360
atccattcgc acagtgattt cagggtcagc cgaaaacttg gctaccttaa aagcagaatg	420
ggaaactcac aaacgtaacg ttgacacact cttcgcgagc ggcaacgccg gtttgggttt	480
ccttgacctt actcgggcta tcgtatcgtc tgatactact gcttaagctt gtattctata	540
gtgtcaccta aatcgtatgt gtatgataca taaggttatg tattaattgt agccgcgttc	600
taacgacaat atgtacaagc ctaattgtgt agcatctggc ttactgaagc agaccctatc	660
atctctctcg taaactgccc tcagagtcgg tttggttggc cgaaccttct gagtttctgg	720
taacgccgtt ccgcaccccg gaaatggtca ccgaaccaat cagcagggtc atcgctagcc	780
agatcctcta cgccggacgc atcgtggccg gcatcaccgg cgcacacagt gcggttgctg	840
gcgcctatat cgccgacatc accgatgggg aagatcgggc tcgccacttc gggctcatga	900
gcgcttgttt cggcgtgggt atggtggcag gccccgtggc cgggggactg ttgggcgcca	960
tctccttgca tgcaccattc cttgcggcgg cgggtgttca acggcctcaa cctactactg	1020
ggctgcttcc taatgcagga gtcgcataag ggagagcgtc gatatggtgc actctcagta	1080
caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc aactccgcta tcgctacgtg actgggtcat	1140
ggctgcgccc cgacacccgc caacacccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc	1200
ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcattgtgtc agaggttttc	1260
accgtcatca ccgaaacgcg cgaggcagct tgaagacgaa agggcctcgt gatacgccta	1320
ttttatagg ttaatgcat gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg	1380
ggaaatgtgc gcggaacccc ttttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg	1440

ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt	1500
attcaacatt tccgtgtcgc cttattccc tttttgctg cattttgcct tcctgttttt	1560
gctcaccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg	1620
ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa	1680
cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgctgtatt atcccgtatt	1740
gacgccggc aagagcaact cggctgccgc atacactatt ctcagaatga cttggttgag	1800
tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt	1860
gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaactac ttctgacaac gatcggagga	1920
ccgaaggagc taaccgcttt ttgacacaac atgggggac atgtaactcg ccttgatcgt	1980
tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgctgta	2040
gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg	2100
caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc	2160
cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgggt	2220
atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat ctacacgacg	2280
gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg	2340
attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa	2400
cttcattttt aatttaaaag gatctagggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaa	2460
atccctaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga	2520
tcttcttgag atcctttttt tctgctgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg	2580
ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact	2640
ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac	2700
cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgtc tgctaactct gttaccagtg	2760
gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttg actcaagacg atagttaccg	2820
gataaggcgc agcggctggg ctgaacgggg ggctcgtgca cacagcccag cttggagcga	2880
acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgcgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc	2940
gaaggagaaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg	3000
agggagctt cagggggaaa cgctgggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc	3060
tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc	3120
agcaacgcgg cttttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt	3180
cctgcttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cttttgagtg agctgatacc	3240
gctcggcga gccgaacgac gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg gaagagcgc	3300
caatacgcaa accgcctctc cccgcgcgtt ggccgattca ttaatgcagc tgtggtgtca	3360
tggtcgtgta tcgccagggg gccgacgcgc atctcactg catggtgcac caatgcttct	3420
ggcgtcaggc agccatcggg agctgtggta tggccgtgca ggctgtaaat cactgcataa	3480
ttcgtgtcgc tcaaggcgca ctcccgttct ggataatgtt ttttgcgccg acatcataac	3540
ggttctggca aatattctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcgaact agttaactag	3600
tacgcaagtt cacgtaaaaa gggatcgcg gaatt	3635

<211> 131

<212> PRT

<213> Bacteriófago AP205

<400> 28

```

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

Thr Thr Ala
130

```

5

<210> 29

<211> 131

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Proteína recubierta AP205

<400> 29

ES 2 365 706 T3

Met Ala Asn Lys Thr Met Gln Pro Ile Thr Ser Thr Ala Asn Lys Ile
 1 5 10 15

Val Trp Ser Asp Pro Thr Arg Leu Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ser Leu
 20 25 30

Leu Arg Gln Arg Val Lys Val Gly Ile Ala Glu Leu Asn Asn Val Ser
 35 40 45

Gly Gln Tyr Val Ser Val Tyr Lys Arg Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gly
 50 55 60

Cys Ala Asp Ala Cys Val Ile Met Pro Asn Glu Asn Gln Ser Ile Arg
 65 70 75 80

Thr Val Ile Ser Gly Ser Ala Glu Asn Leu Ala Thr Leu Lys Ala Glu
 85 90 95

Trp Glu Thr His Lys Arg Asn Val Asp Thr Leu Phe Ala Ser Gly Asn
 100 105 110

Ala Gly Leu Gly Phe Leu Asp Pro Thr Ala Ala Ile Val Ser Ser Asp
 115 120 125

Thr Thr Ala
 130

<210> 30

<211> 3607

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> plásmido pAP281-32

<400> 30

ES 2 365 706 T3

cgagctcgcc cctggcttat cgaaattaat acgactcact atagggagac cggaattcga	60
gctcgcccgg ggatcctcta gattaaccca acgcgtagga gtcaggccat ggcaaataag	120
acaatgcaac cgatcacatc tacagcaaat aaaattgtgt ggtcggatcc aactcgttta	180
tcaactacat tttcagcaag tctgttacgc caacgtgta aagttggtat agccgaactg	240
aataatgttt caggtaata tgtatctggt tataagcgtc ctgcacctaa accgaaggtc	300
agatgcctgt gtcattatgc cgaatgaaaa ccaatccatt cgcacagtga tttcagggtc	360
agccgaaaac ttggctacct taaaagcaga atgggaaact cacaaacgta acgttgacac	420
actcttcgcg agcggcaacg ccggtttggg tttccttgac cctactgagg ctatcgtatc	480
gtctgatact actgcttaag cttgtattct atagtgtcac ctaaactgta tgtgtatgat	540
acataagggt atgtattaat ggtagccgcg ttctaacgac aatatgtaca agcctaattg	600
tgtagcatct ggcttactga agcagaccct atcatctctc tcgtaaactg ccgtcagagt	660
cggttgggtt ggacagacct ctgagtttct ggtaacgccg ttccgcaccc cggaaatggt	720
caccgaacca ttcagcaggg tcatcgtag ccagatcctc tacgccggac gcatcgtggc	780
ccgcatcacc ggcgccacag gtgcgggtgct ggcgcctata tcgccgacat caccgatggg	840
gaagatcggg ctgcaccactt cgggctcatg atcgtctggt tccgcctggg tatggtggca	900

ggccccgtgg	cccgggggac	tgttgggagc	catctccttg	catgcaccat	tccttgaggc	960
ggcgggtgctc	aacggcctca	acctactact	gggctgcttc	ctaagcagg	agtcgcataa	1020
gggagagcgt	cgatatggtg	cactctcagt	acaatctgct	ctgatgccgc	atagttaagc	1080
caactccgct	atcgctacgt	gactgggtca	tggtgagcc	ccgacacccg	ccaacacccg	1140
ctgacgcgcc	ctgacgggct	tgctgcttc	cggcatccgc	ttacagacaa	gctgtgaccg	1200
tctccgggag	ctgcatgtgt	cagaggtttt	caccgtcatc	accgaaacgc	gagaggcagc	1260
ttgaagacga	aagggcctcg	tgatacgcct	atctttatag	gttaatgtca	tgataataat	1320
ggtttcttag	acgtcagggtg	gcacttttctg	gggaaatgtg	cgaggacccc	ctattggttt	1380
atctttctaa	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccct	gataaatgct	1440
tcaataatat	tgaaaaagga	agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	cccttattcc	1500
ctttttgctg	gcattttgct	ttcctgtttt	tgctcaccca	gaaacgctgg	tgaaagtaaa	1560
agatgctgaa	gatcagttgg	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	1620
taagatcctt	gagagttttc	gccccgaaga	acgtttttca	atgatgagca	cttttaaagt	1680
tctgctatgt	gtcgcgggtat	tatcccgtat	tgacgccggg	caagagcaac	tcggtcgcgg	1740
catacactat	tctcagaatg	acttgggtgt	acctaccagt	cacagaaaag	catcttacgg	1800
atggcatgac	agtaagagaa	ttatgcagtg	ctgccataac	catgagtgat	aacactgcgg	1860
ccaacttact	tctgacaacg	atcggaggac	cgaaggagct	aaccgctttt	ttgcacaaca	1920
tgggggatca	tgtaactcgc	cttgatcgtt	gggaaccgga	gctgaatgaa	gccataccaa	1980
acgacgagcg	tgacaccacg	atgcctgtac	gaacggcaac	aacgttgccg	aaactattaa	2040
ctggcgaact	acttactcta	gcttcccggc	aacaattaat	agactggatg	gaggcggata	2100
aagtgcagg	accacttctg	cgctcggccc	ttccggctgg	ctggtttatt	gctgataaat	2160
ctggagccgg	tgagcgtggg	tctcgcggta	tcattgcagc	actggggcca	gatggtaagc	2220
cctcccgtat	cgtagttatc	tacacgacgg	ggagtcaggc	aactatggat	gaacgaaata	2280
gacagatcgc	tgagataggt	gcctcactga	ttaagcattg	gtaactgtca	gaccaagttt	2340
actcatatat	acttttagatt	gattttaaac	ttcattttta	attttaaagg	atctaggtga	2400
agatcctttt	tgataatctc	atgacaaaa	tccttaacg	tgagttttcg	ttccactgag	2460
cggtcagacc	ccgtagaaaag	atcaaaggat	cttcttgaga	tccttttttt	ctgcgcgtaa	2520
tctgctgctt	gcaaacaaaa	aaaccaccgc	taccagcggg	ggtttgtttg	ccggatcaag	2580
agctaccaac	tctttttccg	aaggtaaactg	gcttcagcag	agcgcagata	ccaaatactg	2640
tccttctagt	gtagccgtag	ttaggccacc	acttcaagaa	ctctgtagca	ccgcctacat	2700
acctcgtctt	gctaactctg	ttaccagtgg	ctgctgccag	tggcgataag	tcgtgtctta	2760
ccgggttggg	ctcaagacga	taggtaccgg	ataaggcgca	gcggtcgggc	tgaacggggg	2820
gttcgtgcac	acagcccagc	ttggagcgaa	cgacctacac	cgaactgaga	tacctacagc	2880
gagagcattg	agaaagcggc	acgcttcccg	aagggagaaa	ggcggacagg	tatccggtaa	2940

```

gcggcagggg cggacaaga gagcgacga gggagcttc aggggaaac gcctggtatc 3000
tttatagtc tgctggggtt cgccacctt gacttgagcg tcgattttt tgatgctcgt 3060
caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcctggcct 3120
ttggctggcc ttttctcac atgttctttc ctgcttatt ccctgattct gtggataacc 3180
gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctgcccagc ccgaacgacc gacggcgagc 3240
cgagtcagtg agcgaggaag cggagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg 3300
ttggccgatt cattaatgca gctgtggtgt catggtcggg gatcgccagg gtgccgacgc 3360
gcatctcgac tgcattggtg accaatgctt ctggcgtcag gcagccatcg gaagctgtgg 3420
tatggccgty caggtcgtaa atcactgcat aattcgtgtc gctcaaggcg cactcccgtt 3480
ctggataatg tttttgcyg cgacatcata acggttctgg caaatattct gaaatgagct 3540
ggtgacaatt aatcatcga ctagttaact agtacgcaag ttcacgtaaa aagggtatcg 3600
cggaatt 3607

```

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ligador de terminal N

<400> 31

Cys Gly Asp Glu Gly Gly
1 5

10 <210> 32

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Ligador de terminal C

<400> 32

Gly Gly Glu Asp Gly Cys
1 5

<210> 33

<211> 5

20 <212> PRT

<221> REPETICIÓN<222> (1)..(1)

<223> Glicina se puede repetir de cero a cinco veces

<220>

<221> REPETICIÓN

5 <222> (3)..(3)

<223> Glicina se puede repetir de cero a diez veces

<220>

<221> REPETICIÓN

<222> (4)..(4)

10 <223> serine se puede repetir de cero a dos veces

<220>

<221> REPETICIÓN

<222> (5)..(9)

<223> Estos residuos se pueden repetir de cero a tres veces como un grupo

15 <400> 35

Gly cys Gly ser Gly Gly Gly Gly ser
1 5

<210> 36

<211> 3

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ligador glicina de terminal C

<220>

<221> REPETICIÓN

25 <222> (1)..(1)

<223> Glicina se puede repetir de cero a veinte veces

<220>

<221> REPETICIÓN

<222> (3)..(3)

<223> Glicina se puede repetir de cero a cinco veces

<400> 36

Gly Cys Gly
1

<210> 37

5 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ligadores serina glicina de terminal C

10 <220>

<221> REPETICIÓN

<222> (1)..(1)

<223> Glicina se puede repetir de cero a diez veces

<220>

15 <221> REPETICIÓN

<222> (2)..(2)

<223> serina se puede repetir de cero a dos veces

<220>

<221> REPETICIÓN

20 <222> (3)..(7)

<223> Estos residuos se puede repetir de cero a tres veces como un grupo

<220>

<221> REPETICIÓN

<222> (8)..(8)

25 <223> Glicina se puede repetir de cero a ocho veces

<220>

<221> REPETICIÓN

<222> (10)..(10)

<223> Glicina se puede repetir de cero a cinco veces

<400> 37

Gly ser Gly Gly Gly Gly ser Gly Cys Gly
1 5 10

<210> 38

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ligador serina glicina

<220>

10 <221> REPETICIÓN

<222> (1)..(5)

<223> Estos residuos se pueden repetir cualesquier veces como un grupo

<400> 38

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

15 <210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> gama 1 de terminal N

<400> 39

Cys Gly Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro
1 5 10

<210> 40

<211> 10

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Gama 1 de terminal C

<400> 40

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Gly
1 5 10

<210> 41

5 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> gama 3 de terminal N

10 <400> 41

Cys Gly Gly Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala
1 5 10 15

Pro

<210> 42

<211> 18

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Gama 3 de terminal C

<400> 42

Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Gly Gly
1 5 10 15

20 **cys Gly**

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Ligador glicina de terminal N

<400> 43

Gly Cys Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 44

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ligador glicina de terminal C

<400> 44

10 **Gly Gly Gly Gly Cys Gly**
1 5

<210> 45

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Ligador glicina-lisina de terminal C

<400> 45

Gly Gly Lys Lys Gly Cys
1 5

<210> 46

20 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ligador glicina-lisina de terminal N

25 <400> 46

Cys Gly Lys Lys Gly Gly
1 5

<210> 47

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Ligador de terminal C

<400> 47

gly gly cys gly
1

<210> 48

10 <211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido

15 <400> 48

ggtaacatcg gtcgagatgg aaaacaaact ctgtcc 37

<210> 49

<211> 37

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido

<400> 49

ggaccagagt ttgtttcca tctcgaccga tgttacc 37

25 <210> 50

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

- <223> cebador de oligonucleótido
<400> 50
agctcgcccg gggatcctct ag 22
<210> 51
- 5 <211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de oligonucleótido
- 10 <400> 51
cgatgcatt catccttagt tatcaatagc ctgggttcag 40
<210> 52
<211> 36
<212> ADN
- 15 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador de oligonucleótido
<400> 52
ggcaaaatta gagactgta ctttaggtaa gatcgg 36
- 20 <210> 53
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
- 25 <223> cebador de oligonucleótido
<400> 53
ccgatcttac ctaaagtaac agtctctaat tttgcc 36
<210> 54
<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido

5 <400> 54

ggccatggca cgactcgaga ctgttacttt agg 33

<210> 55

<211> 19

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido

<400> 55

gatttaggtg acactatag 19

15 <210> 56

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> cebador de oligonucleótido

<400> 56

gatggacgtc aaactctggt cctcaatccg cgtgggg 37

<210> 57

<211> 37

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido

<400> 57

ccccacgagg attgaggacc agagtttgac gtccatc 37

<210> 58

<211> 31

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador ECORIHBCAf(s)

<400> 58

ccggaattca tggacattga ccctataaa g 31

10 <210> 59

<211> 51

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador LyS-HBcAg(as)

<400> 59

cctagagcca ccttgccac catcttctaa attagtaccc acccaggtag c 51

<210> 60

<211> 48

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador Lys-HBCAg(s)

<400> 60

25 gaagatggtg gcaaaggtgg ctctagggac ctagtagtca gttatgtc 48

<210> 61

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador HBCAg(1-149)Hind(as)

<400> 61

cgcgccccaa gcttctaaac aacagtagtc tccggaag 38

5 <210> 62

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cebador 48as

<400> 62

gtgcagtatg gtgaggtgag gaatgctcag gagactc 37

<210> 63

<211> 37

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador 48s

<400> 63

20 gagtctcctg agcattcctc acctcaccat actgcac 37

<210> 64

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Cebador 107as

<400> 64

ctccaaaag tgaggaaga aatgtgaaac cac 33

<210> 65

<211> 47

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> HBCAg149hind-as

<400> 65

cgcgccccaa gcttctaac aacagtagtc tccggaagcg ttgatag 47

<210> 66

<211> 33

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador 107s

<400> 66

15 gtggttcac atttctccc tcactttgg aag 33

<210> 67

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Cebador HBCAgwtHindIII

<400> 67

cgcgccccaa gcttctaaca ttgagattcc cgagattg 38

<210> 68

25 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> epítipo ceH3

<400> 68

Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly
 1 5 10

<210> 69

<211> 51

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador CeH3del

<220>

10 <221> CDS <222> (1)..(51)

<400> 69

ggt aac ttg acc tgg tct cgt gct tct ggt gca tcc agg gat cta gta 48
 Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Ala Ser Arg Asp Leu Val
 1 5 10 15

gtc 51
 Val

<210> 70

<211> 17

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador CeH3del

<400> 70

Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Ala Ser Arg Asp Leu Val
 1 5 10 15

20 Val

<210> 71

<211> 51

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Cebador ceH3inv

<400> 71

accagaagca cgagaccagg tcaagttaac atctccaaa ttattacca c 51

<210> 72

5 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido cebador CeH3inv

10 <400> 72

Asp Glu Leu Asn Asn Gly Val
1 5

<210> 73

<211> 31

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador HBcAg-wt ECORI del

<400> 73

ccggaattca tggacattga ccctataaa g 31

20 <210> 74

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Cebador HBcAg-wt Hind III inv

<400> 74

cgcgccccaa gcttctaaca ttgagattcc cgagattg 38

<210> 75

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Asp Ala Glu Phe Arg His
1 5

5 <210> 76

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 76

Asp Ala Glu Phe Gly His
1 5

10

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Abeta 1-6 GGC

<400> 77

Asp Ala Glu Phe Arg His Gly Gly Cys
1 5

<210> 78

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> murine Abeta 1-6 GGC

25 <400> 78

Asp Ala Glu Phe Gly His Gly Gly Cys
1 5

- <210> 79
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 5 <220>
<223> Cebador p1.44
<400> 79
aaccatggca aataagccaa tgcaaccg 28
<210> 80
- 10 <211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador p1.45
- 15 <400> 80
aatctagaat ttctgcgca cccatccgg 30
<210> 81
<211> 30
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador p1.46
<400> 81
aaaagcttaa gcagtagtat cagacgatac 30
- 25 <210> 82
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

<223> Cebador p1.47

<400> 82

gagtgatcca actcgtttat caactacatt ttcagcaagt ctg 43

<210> 83

5 <211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador p1.48

10 <400> 83

cagacttgct gaaaatgtag ttgataaacg agttggatca ctc 43

<210> 84

<211> 6

<212> PRT

15 <213> homo sapiens

<400> 84

Asp Ala Glu Phe Arg His
1 5

<210> 85

<211> 6

20 <212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 85

Asp Ala Glu Phe Arg His
1 5

<210> 86

25 <211> 6

<212> PRT

<213> Xenopus laevis

<400> 86

Asp Ser Glu Tyr Arg His
1 5

<210> 87

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 87

Asp Ala Glu Phe Gly His
1 5

<210> 88

<211> 6

10 <212> PRT

<213> cavia porcellus

<400> 88

Asp Ala Glu Phe Arg His
1 5

<210> 89

15 <211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 89

Val His Glu Pro His Glu Phe Arg His Val Ala Leu Asn Pro Val
1 5 10 15

20 <210> 90

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 90

25 **Tyr Tyr Glu Phe Arg His**
1 5

<210> 91

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

5

<210> 92

<211> 770

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 92

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

Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
 195 200 205

Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
 210 215 220

Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
 225 230 235 240

Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
 245 250 255

Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
 260 265 270

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
 275 280 285

Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile
 290 295 300

Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe
 305 310 315 320

Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr
 325 330 335

Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr
 340 345 350

Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala
 355 360 365

Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp
 370 375 380

Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala
 385 390 395 400

Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala
 405 410 415

Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile
 420 425 430

Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn
 435 440 445

Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met
 450 455 460

Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu
 465 470 475 480
 Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys
 485 490 495
 Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe
 500 505 510
 Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser
 515 520 525
 Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser
 530 535 540
 Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp
 545 550 555 560
 Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val
 565 570 575
 Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala
 580 585 590
 Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro
 595 600 605
 Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe
 610 615 620
 Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val
 625 630 635 640
 Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser
 645 650 655
 Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
 660 665 670
 Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
 675 680 685
 Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly
 690 695 700
 Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu
 705 710 715 720
 Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val
 725 730 735

ES 2 365 706 T3

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met
 740 745 750

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
 755 760 765

Gln Asn
 770

<210> 93

<211> 82

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys
 1 5 10 15

Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln
 20 25 30

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

Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Ile Ile
 50 55 60

Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Asn His His Gly Val
 65 70 75 80

Val Glu

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
- (a) una partícula de núcleo con por lo menos un primer sitio de adhesión, en donde dicha partícula de núcleo es una partícula similar a virus de un bacteriófago de ARN; y
- 5 (b) por lo menos un antígeno o determinante antigénico con por lo menos un segundo sitio de adhesión, en donde dicho antígeno o determinante antigénico es un péptido A β 1-6, y en donde dicho segundo sitio de adhesión se selecciona del grupo que consiste de:
- (i) un sitio de adhesión de ocurrencia no natural con dicho antígeno o determinante antigénico; y
- 10 (ii) un sitio de adhesión de ocurrencia natural con dicho antígeno o determinante antigénico, en donde dicho segundo sitio de adhesión se asocia con dicho primer sitio de adhesión a través de por lo menos un enlace no péptido; y en donde dicho péptido A β 1-6 y dicha partícula de núcleo interactúa a través de dicha asociación para formar una disposición de antígeno repetitivo y ordenado.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha partícula similar a virus de un bacteriófago de ARN comprende, o alternativamente consiste de, proteínas recombinantes, o fragmentos de las mismas, de un bacteriófago de ARN.
- 15 3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho bacteriófago de ARN se selecciona del grupo que consiste de:
- (a) bacteriófago Q β ;
- (b) bacteriófago R 17;
- 20 (c) bacteriófago fr;
- (d) bacteriófago GA;
- (e) bacteriófago SP;
- (f) bacteriófago MS2;
- (g) bacteriófago M 11;
- 25 (h) bacteriófago MX 1;
- (i) bacteriófago NL95;
- (k) bacteriófago f2;
- (l) bacteriófago PP7; y
- (m) bacteriófago AP205.
- 30 4. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha partícula similar a virus de un bacteriófago de ARN comprende, o alternativamente consiste de, proteínas recombinantes, o fragmentos de las mismas, del bacteriófago de ARN Q β .
5. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha partícula similar a virus de un bacteriófago de ARN comprende, o alternativamente consiste de, proteínas recombinantes, o fragmentos de las mismas, del bacteriófago de ARN fr.
- 35

6. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha partícula similar a virus de un bacteriófago de ARN comprende, o alternativamente consiste de, proteínas recombinantes, o fragmentos de las mismas, del bacteriófago de ARN AP205.
- 5 7. La composición de la reivindicación 2, en donde las proteínas recombinantes comprenden, o alternativamente consisten esencialmente de, o alternativamente consisten de proteínas cubiertas de bacteriófagos de ARN.
8. La composición de la reivindicación 7, en donde dichas proteínas cubiertas de los bacteriófagos de ARN tienen una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:
- (a) SEQ ID NO: 4;
- 10 (b) una mezcla de la SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5;
- (c) SEQ ID NO: 6;
- (d) SEQ ID NO: 7;
- (e) SEQ ID NO: 8;
- (f) SEQ ID NO: 9;
- 15 (g) una mezcla de la SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10;
- (h) SEQ ID NO: 11;
- (i) SEQ ID NO: 12;
- (k) SEQ ID NO: 13;
- (l) SEQ ID NO: 14;
- 20 (m) SEQ ID NO: 15;
- (n) SEQ ID NO: 16; y
- (o) SEQ ID NO: 28.
9. La composición de la reivindicación 2, en donde las proteínas recombinantes comprenden, o alternativamente consisten esencialmente de, o alternativamente consisten de proteínas mutantes cubiertas de bacteriófagos de ARN.
- 25 10. La composición de la reivindicación 9, en donde dicho bacteriófago de ARN se selecciona del grupo que consiste de:
- (a) bacteriófago Q β ;
- (b) bacteriófago R 17;
- 30 (c) bacteriófago fr;
- (d) bacteriófago GA;
- (e) bacteriófago SP;
- (f) bacteriófago MS2;
- (g) bacteriófago M 11;

- (h) bacteriófago MX 1;
- (i) bacteriófago NL95;
- (k) bacteriófago f2;
- (l) bacteriófago PP7; y
- 5 (m) bacteriófago AP205.
11. La composición de la reivindicación 9 o 10, en donde dichas proteínas mutantes cubiertas de dicho bacteriófago de ARN se han modificado mediante la remoción de por lo menos un residuo lisina por vía de sustitución.
- 10 12. La composición de la reivindicación 9 o 10, en donde dichas proteínas mutantes cubiertas de dicho bacteriófago de ARN se han modificado mediante la adición de por lo menos un residuo lisina por vía de sustitución.
13. La composición de la reivindicación 9 o 10, en donde dichas proteínas mutantes cubiertas de dicho bacteriófago de ARN se han modificado mediante la eliminación de por lo menos un residuo lisina.
14. La composición de la reivindicación 9 o 10, en donde dichas proteínas mutantes cubiertas de dicho bacteriófago de ARN se han modificado mediante la adición de por lo menos un residuo lisina por vía de inserción.
- 15 15. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho segundo sitio de adhesión es capaz de asociación a dicho primer sitio de adhesión a través de por lo menos un enlace covalente.
16. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho péptido A β 1-6 se selecciona del grupo que consiste de:
- (a) péptido A β 1-6 humano que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 75;
- 20 (b) péptido A β 1-6 de murino que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 76;
- (c) péptido A β 1-6 de primate que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 84;
- (d) péptido A β 1-6 de conejo que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 85;
- (e) péptido A β 1-6 *Xenopus laevis* que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 86;
- (f) péptido A β 1-6 de rata que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 87; y
- 25 (g) péptido A β 1-6 de conejillo de indias que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 88.
17. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho péptido A β 1-6 tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 75.
18. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende adicionalmente un ligador de aminoácido, en donde dicho ligador de aminoácido comprende, o alternativamente consiste de, dicho
- 30 segundo sitio de adhesión.
19. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha segunda adhesión o dicho ligador de aminoácido con dicho segundo sitio de adhesión se une a dicho péptido A β 1-6 en su terminal C.
20. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho segundo sitio de adhesión o dicho ligador de aminoácido con dicho segundo sitio de adhesión se selecciona del grupo que consiste
- 35 de:
- (a) CGC;

- (b) GGC-CONH₂;
 - (c) GC;
 - (d) GC-CONH₂;
 - (e) C; y
- 5 (f) C-CONH₂.
21. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho péptido A β 1-6 con dicho por lo menos segundo sitio de adhesión es NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂ (SEQ ID NO: 77),
22. La composición de la reivindicación 21, en donde dicha partícula similar a virus es una partícula similar a virus del bacteriófago de proteína de la cubierta de ARN Q β .
- 10 23. Una composición farmacéutica que comprende:
- (a) la composición de cualquier reivindicación precedente; y
 - (b) un portador farmacéuticamente aceptable.
24. La composición farmacéutica de la reivindicación 23 que comprende adicionalmente un adyuvante.
- 15 25. La composición farmacéutica de la reivindicación 23 o la reivindicación 24, en donde dicha composición de vacuna carece de un adyuvante.
26. Una composición de vacuna que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
27. La composición de vacuna de la reivindicación 26, que comprende adicionalmente un adyuvante.
- 20 28. La composición de vacuna de la reivindicación 26, en donde dicha composición de vacuna carece de un adyuvante.
29. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en donde dicha partícula similar a virus comprende proteínas recombinantes, o fragmentos de las mismas, de un bacteriófago de ARN.
30. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29, en donde dicha partícula similar a virus comprende proteínas recombinantes o fragmentos de las mismas, del bacteriófago de ARN Q β .
- 25 31. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29, en donde dicha partícula similar a virus comprende proteínas recombinantes, o fragmentos de las mismas, del bacteriófago de ARN fr.
32. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29, en donde dicha partícula similar a virus comprende proteínas recombinantes, o fragmentos de las mismas, del bacteriófago de ARN AP205.
- 30 33. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32, en donde dicho péptido A β 1-6 se selecciona del grupo que consiste de:
- (a) péptido A β 1-6 humano que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 75;
 - (b) péptido A β 1-6 de murino que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 76;
 - (c) péptido A β 1-6 de primate que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 84;
 - (d) péptido A β 1-6 de conejo que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 85;
- 35 (e) péptido A β 1-6 *Xenopus laevis* que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 86;

- (f) péptido Aβ 1-6 de rata que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 87; y
- (g) péptido Aβ 1-6 de conejillo de indias que tiene una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 88.
34. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 33 que comprende adicionalmente un ligador de aminoácido, en donde dicho ligador de aminoácido comprende, o alternativamente
5 consiste de, dicho segundo sitio de adhesión.
35. La composición de vacuna de la reivindicación 34, en donde dicho ligador de aminoácido con dicho segundo sitio de adhesión se une a dicho péptido Aβ 1-6 en su terminal C.
36. La composición de vacuna de la reivindicación 34 o 35, en donde dicho ligador de aminoácido con dicho
10 segundo sitio de adhesión se selecciona del grupo que consiste de:
- (a) GGC;
- (b) GGC-CONH₂;
- (c) GC;
- (d) GC-CONH₂;
- (e) C; y
- 15 (f) C-CONH₂.
37. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 36, en donde dicho antígeno o determinante antigénico con dicho por lo menos segundo sitio de adhesión es NH₂- DAEFRHGGC-CONH₂ (SEQ ID NO: 77).
38. La composición de vacuna de la reivindicación 37, en donde dicha partícula similar a virus es una partícula
20 similar a virus del bacteriófago de proteína de la cubierta de ARN Qβ.
39. Un proceso para producir una composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende:
- (a) proporcionar una partícula de núcleo con por lo menos un primer sitio de adhesión, en donde dicha partícula de núcleo es una partícula similar a virus de un bacteriófago de ARN;
- 25 (b) proporcionar por lo menos un antígeno o determinante antigénico con por lo menos un segundo sitio de adhesión, en donde dicho antígeno o determinante antigénico es un péptido Aβ1-6, y en donde dicho segundo sitio de adhesión se selecciona del grupo que consiste de:
- (i) un sitio de adhesión de ocurrencia no natural con dicho antígeno o determinante antigénico; y
- (ii) un sitio de adhesión de ocurrencia natural con dicho antígeno o determinante antigénico; y en donde dicho
30 segundo sitio de adhesión se asocia con dicho primer sitio de adhesión a través de por lo menos un enlace no péptido; y
- (c) combinar dicha partícula de núcleo y dicho por lo menos un antígeno o determinante antigénico, en donde dicho antígeno o determinante antigénico y dicha partícula de núcleo interactúa a través de dicha asociación para formar una disposición de antígeno repetitivo y ordenado.
- 35 40. Composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 38 para uso como un medicamento.
41. Uso de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 38 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de Alzheimer y enfermedades relacionadas.

42. La composición de la reivindicación 1 en donde dicha composición comprende adicionalmente un reticulador heterobifuncional que contiene un grupo funcional que puede reaccionar con dicho primer sitio de adhesión y un grupo funcional adicional que puede reaccionar con dicho segundo sitio de adhesión.
- 5 43. La composición de la reivindicación 42 en donde dicho reticulador heterobifuncional contiene un grupo funcional que puede reaccionar con el grupo amino de cadena lateral del residuo lisina de la partícula similar a virus o por lo menos una subunidad de partícula similar a virus.
44. La composición de la reivindicación 42 en donde dicho grupo funcional adicional de dicho reticulador heterobifuncional reacciona con un residuo cisteína fusionado al péptido A β 1-6.
- 10 45. La composición de acuerdo con la reivindicación 42, en donde dicho reticulador heterobifuncional se selecciona de SMPH, Sulfo- MBS, Sulfo-EMCS, Sulfo-GMBS, Sulfo-SIAB, Sulfo-SMPB, Sulfo-SMCC, SVSB, SIA y otros reticuladores que tiene un grupo funcional que reacciona hacia el grupo amino y un grupo funcional que reacciona hacia los residuos cisteína.
46. La composición de acuerdo con la reivindicación 42, en donde dicho reticulador heterobifuncional es SPDP o Sulfo-LC- SPDP.

15

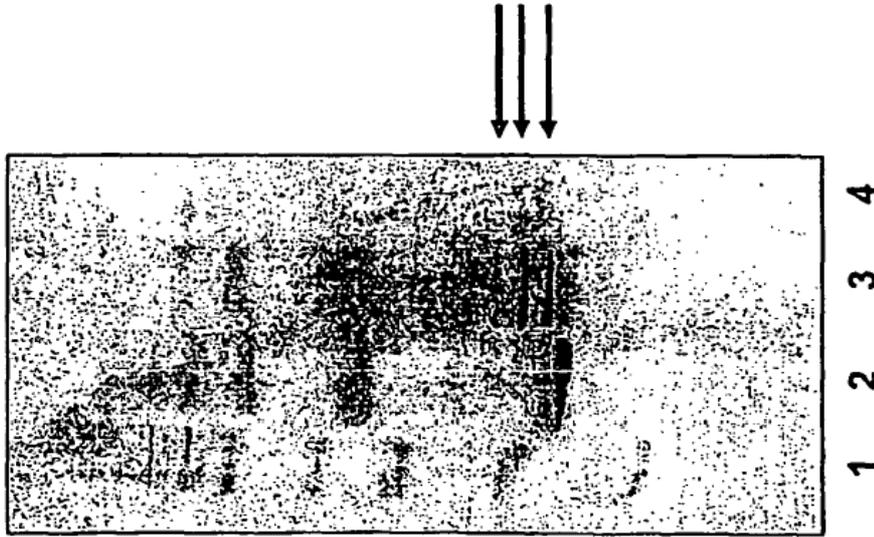


FIG. 1

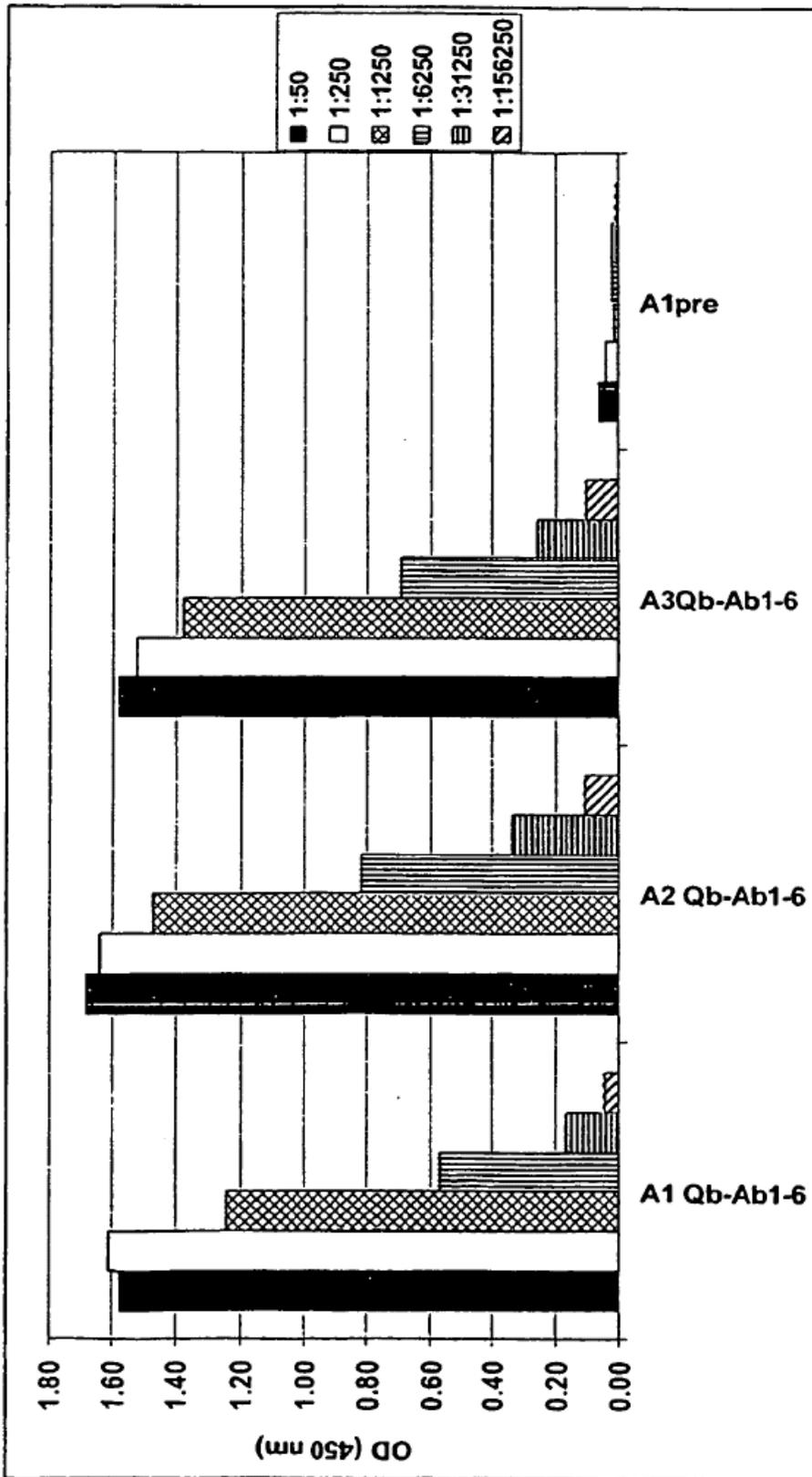


FIG. 2

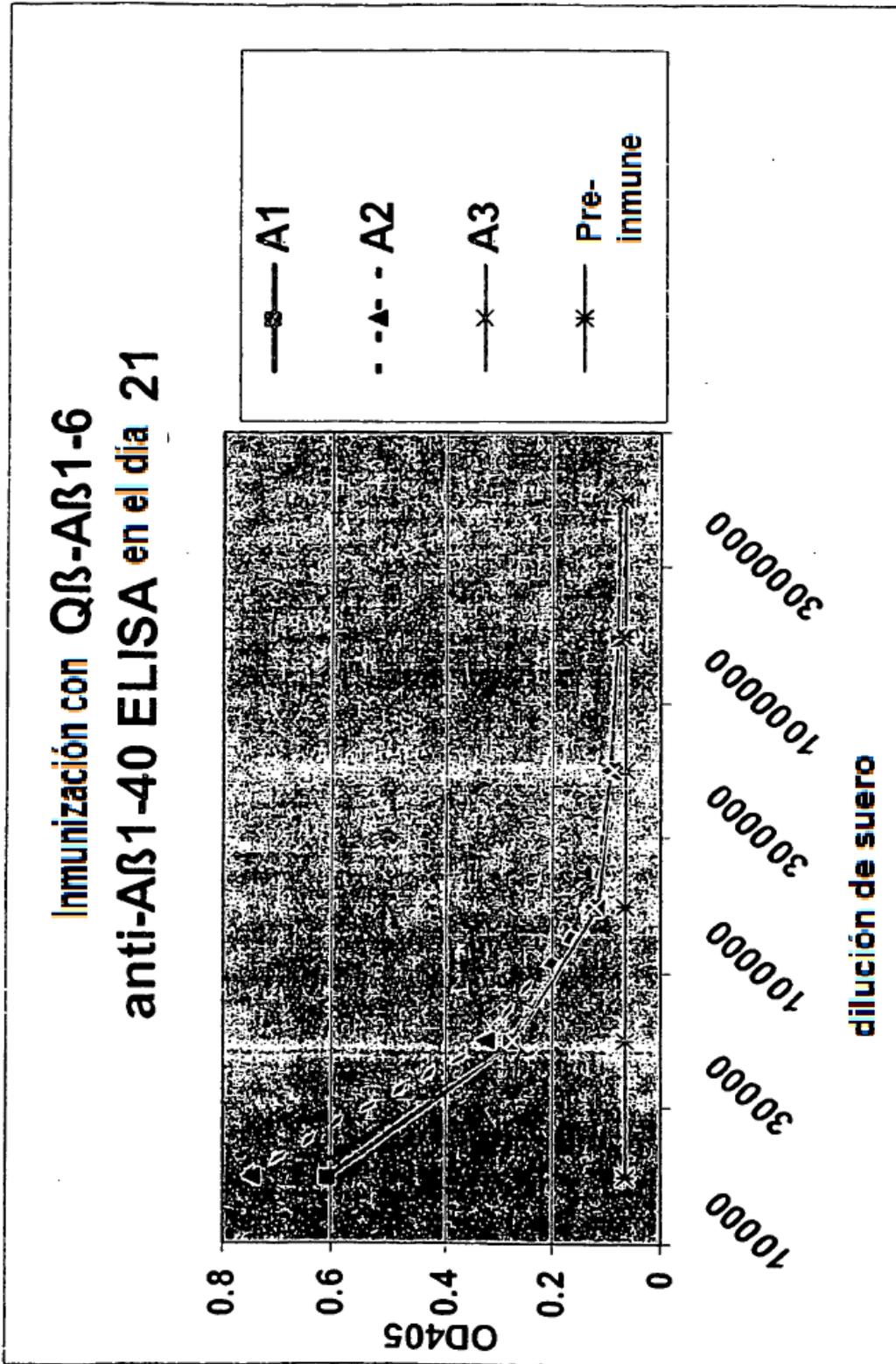


FIG. 3

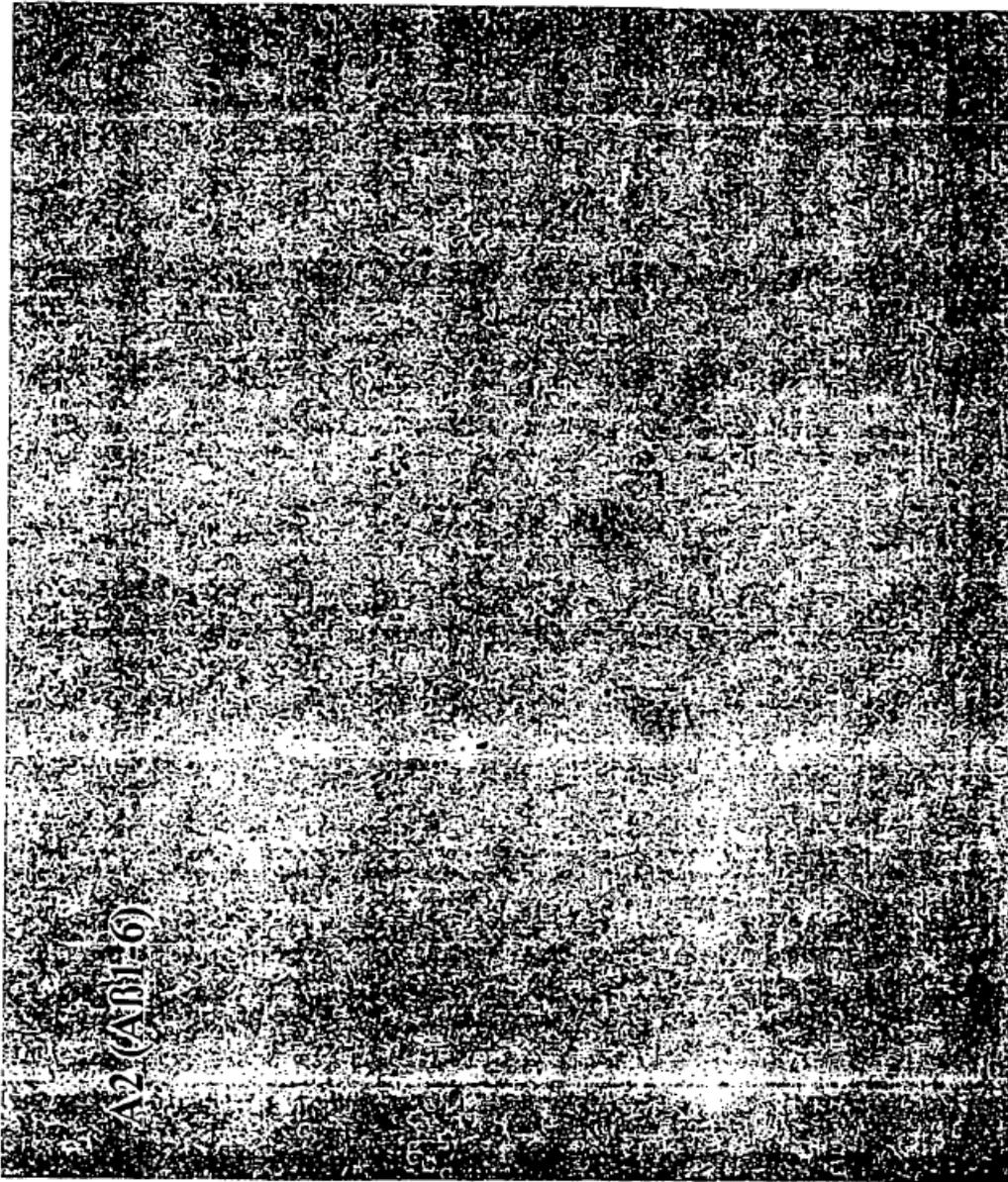


FIG. 4A

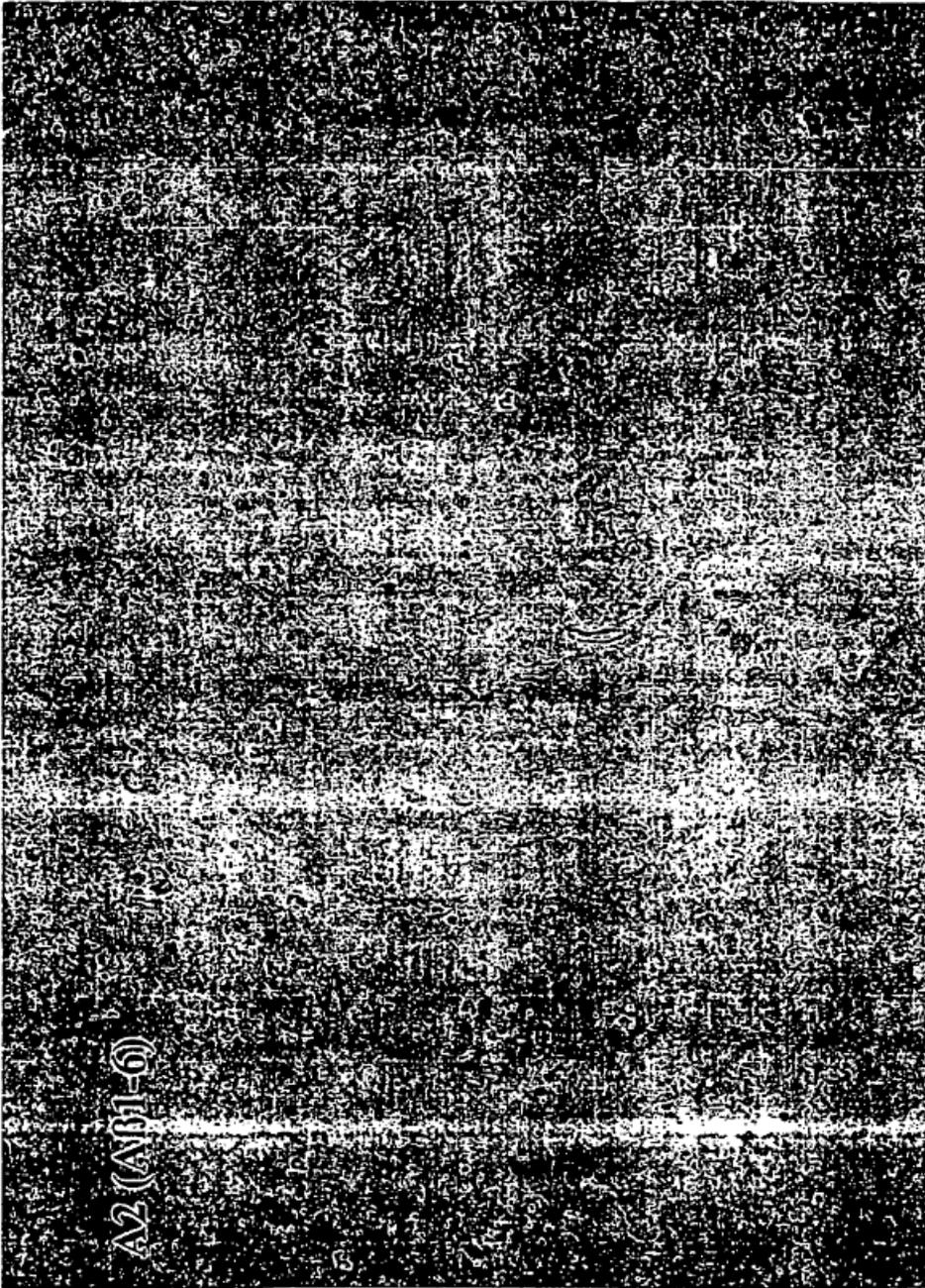


FIG. 4B

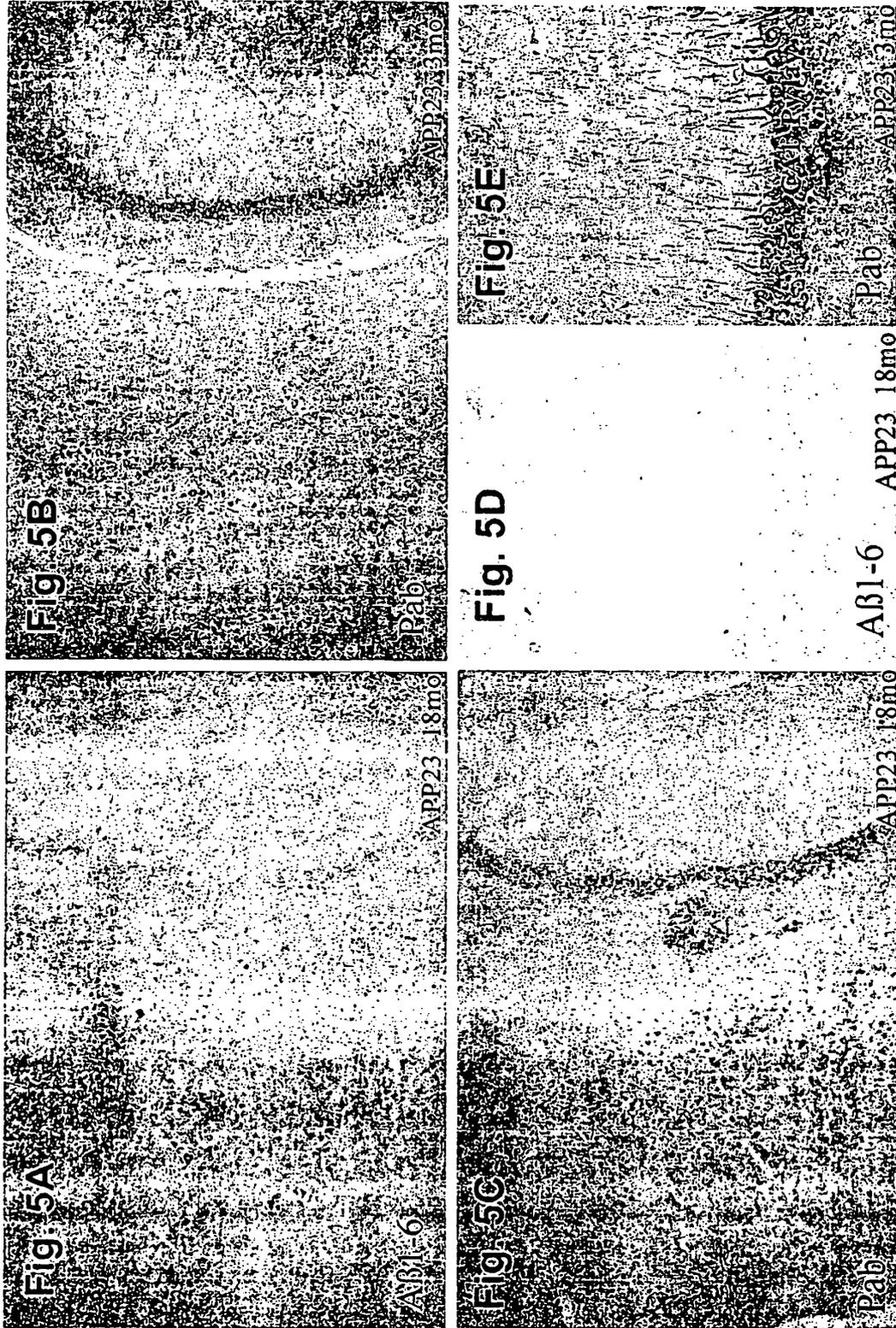


Fig. 5

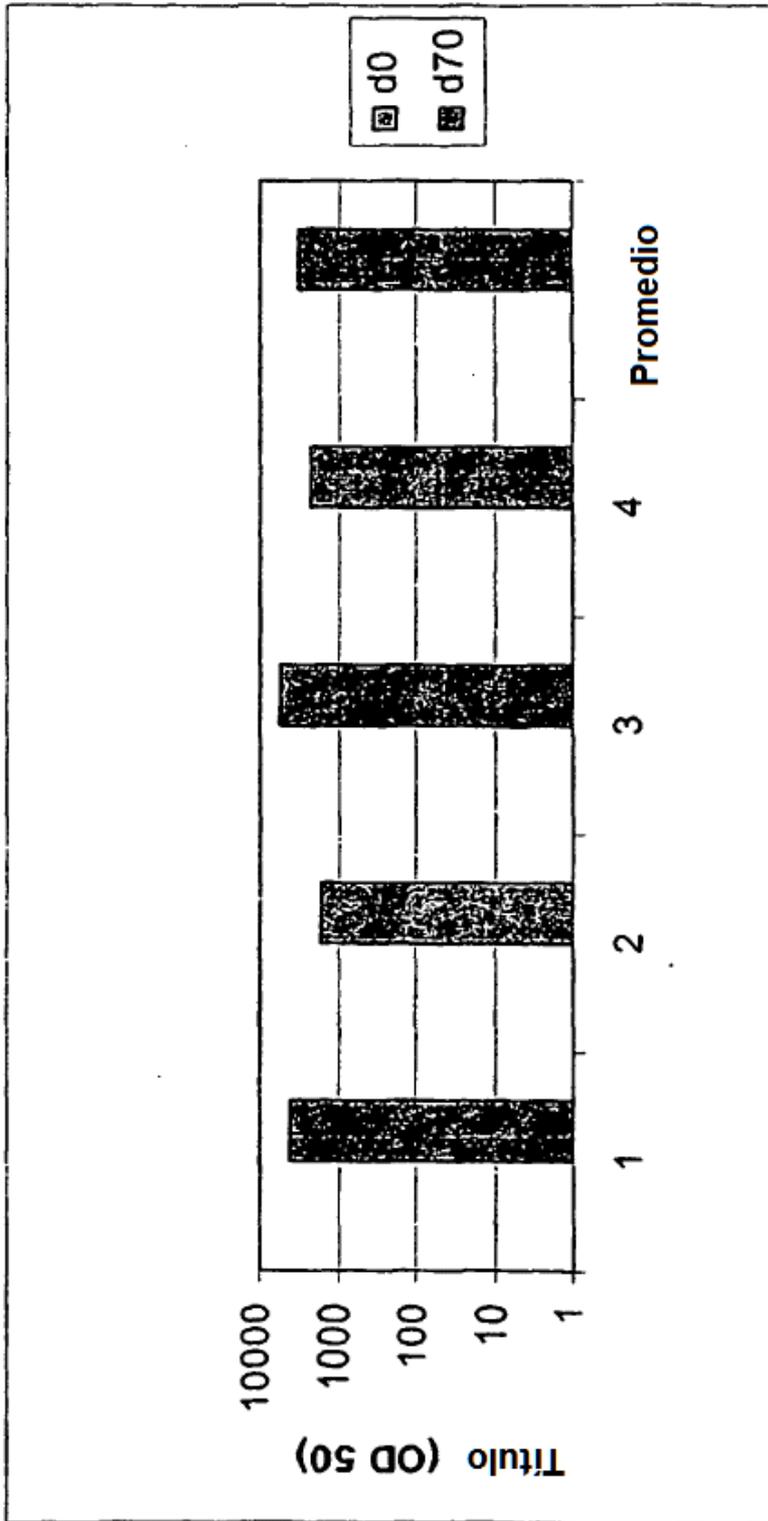


Fig. 6

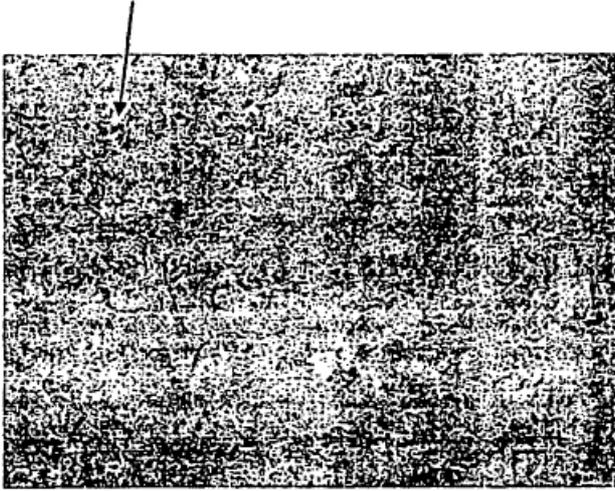


Fig. 7B

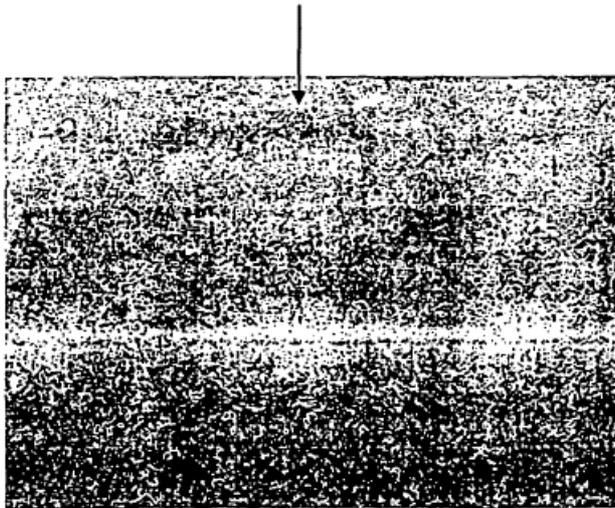


Fig. 7A

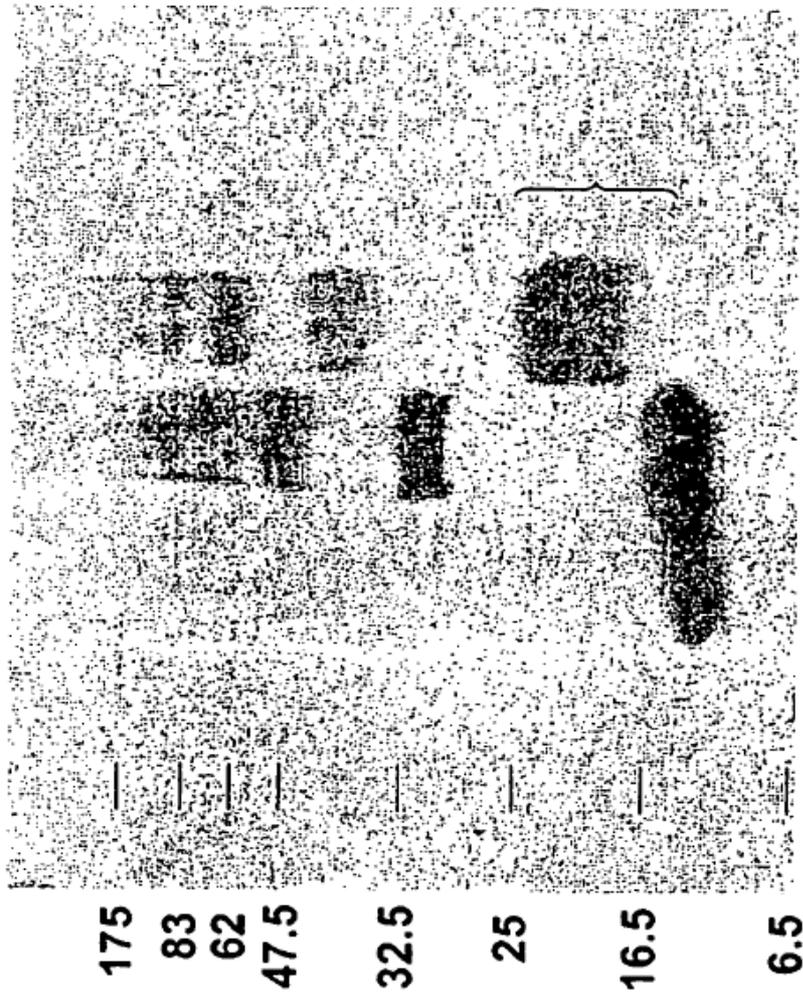


Fig. 8

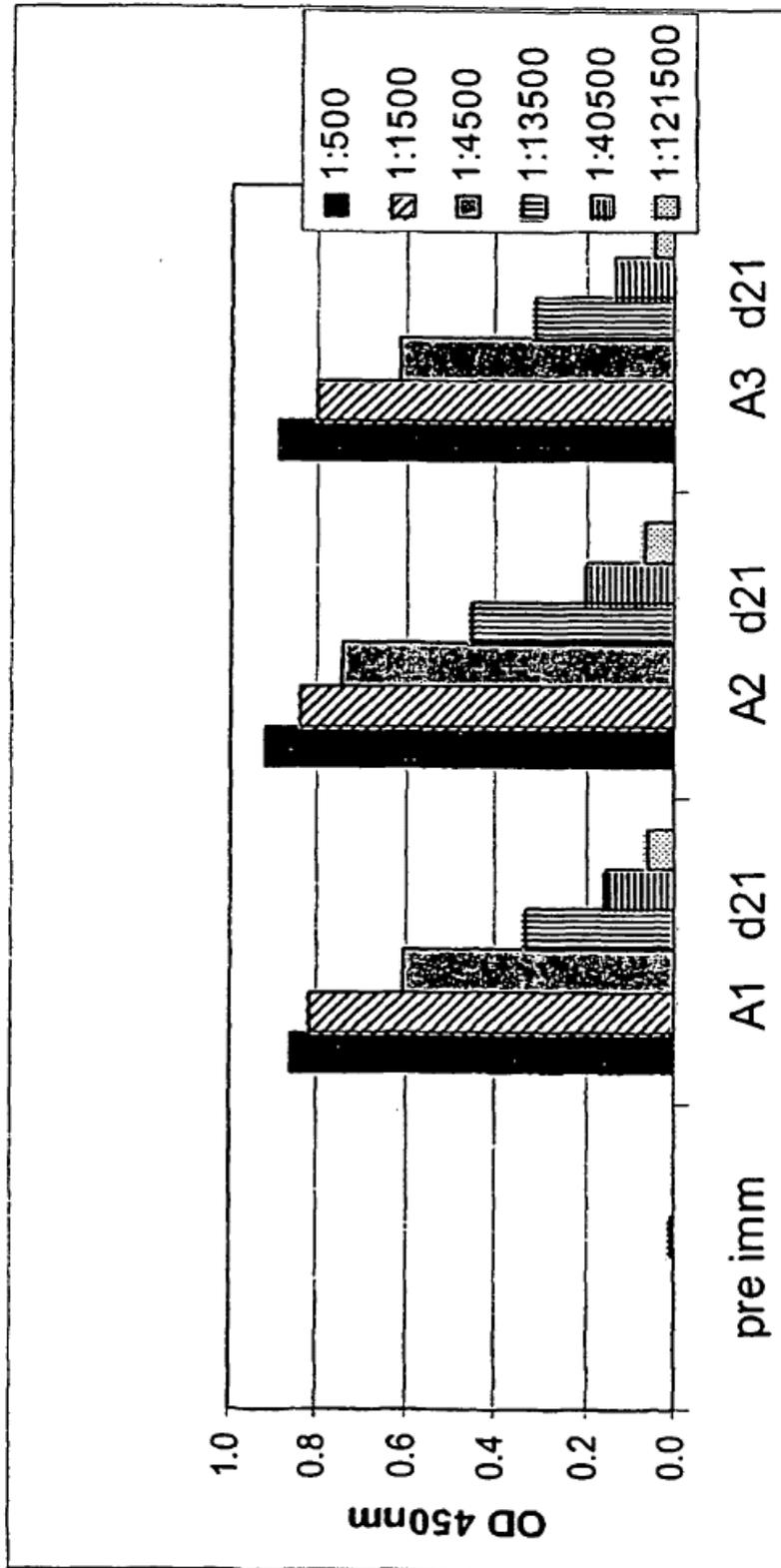


Fig. 9

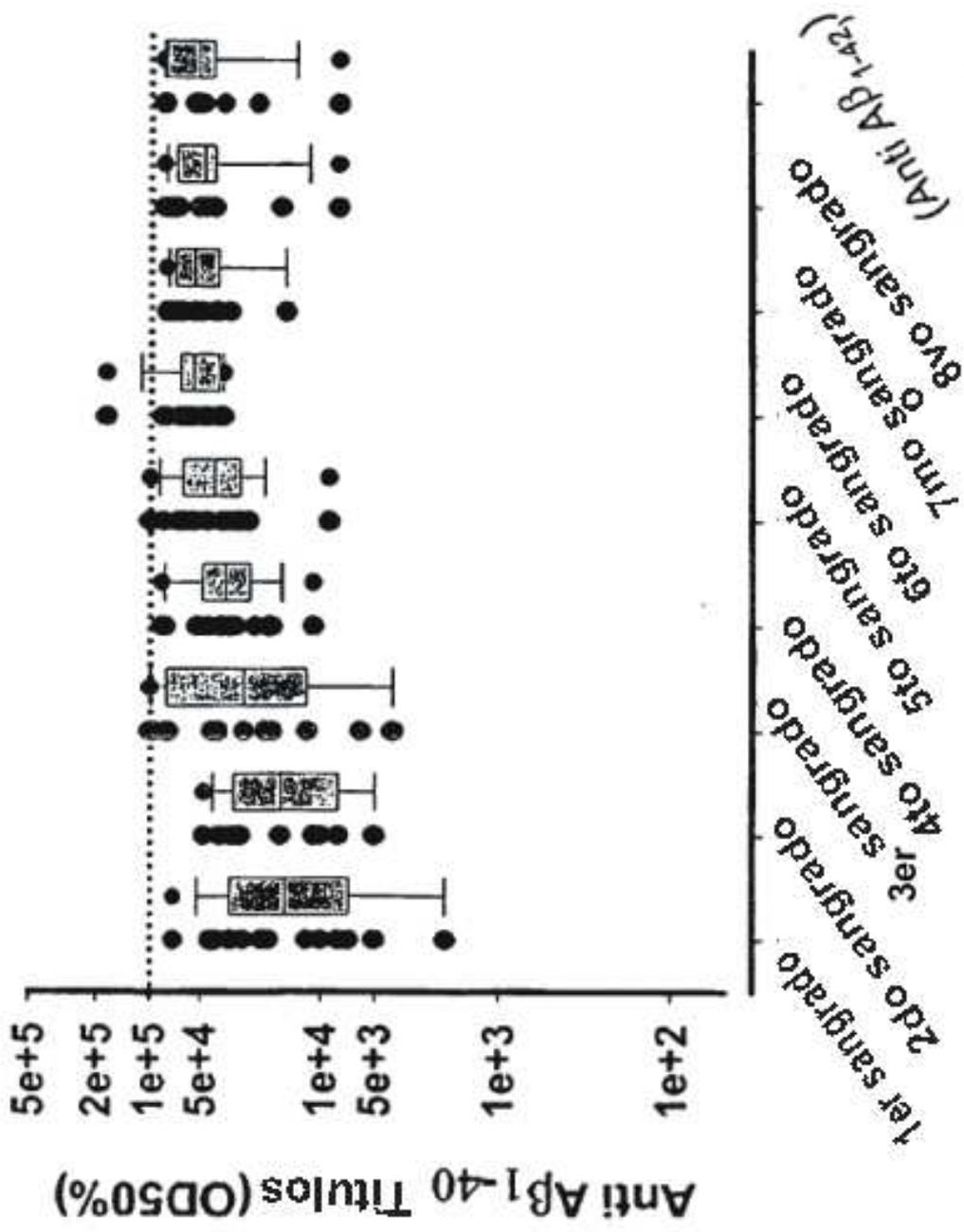


Fig. 10

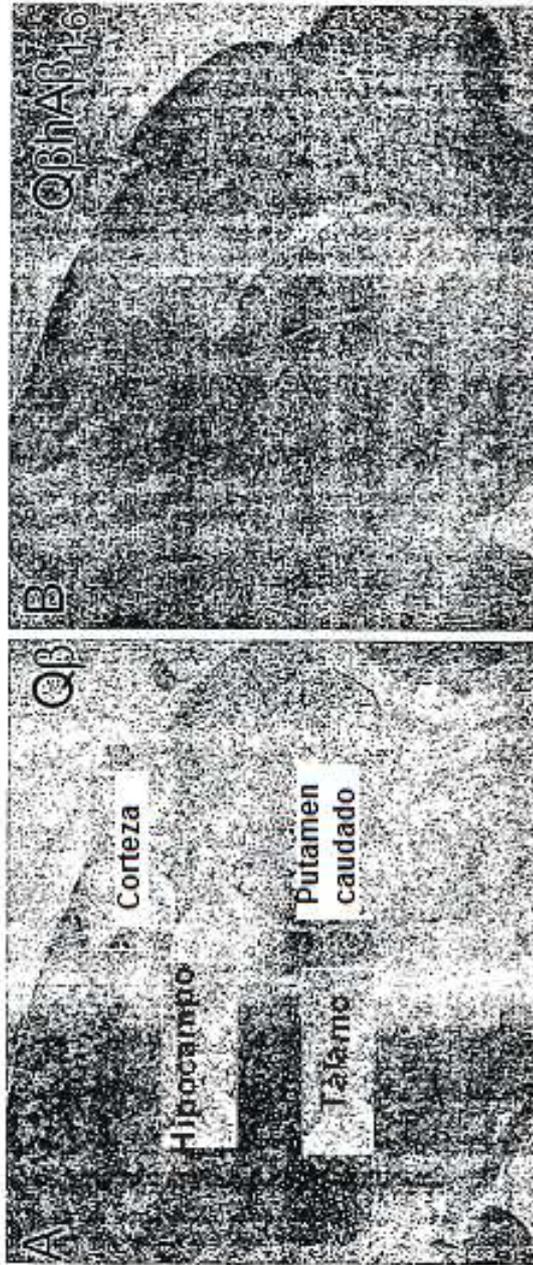


Fig. 11B

Fig. 11A

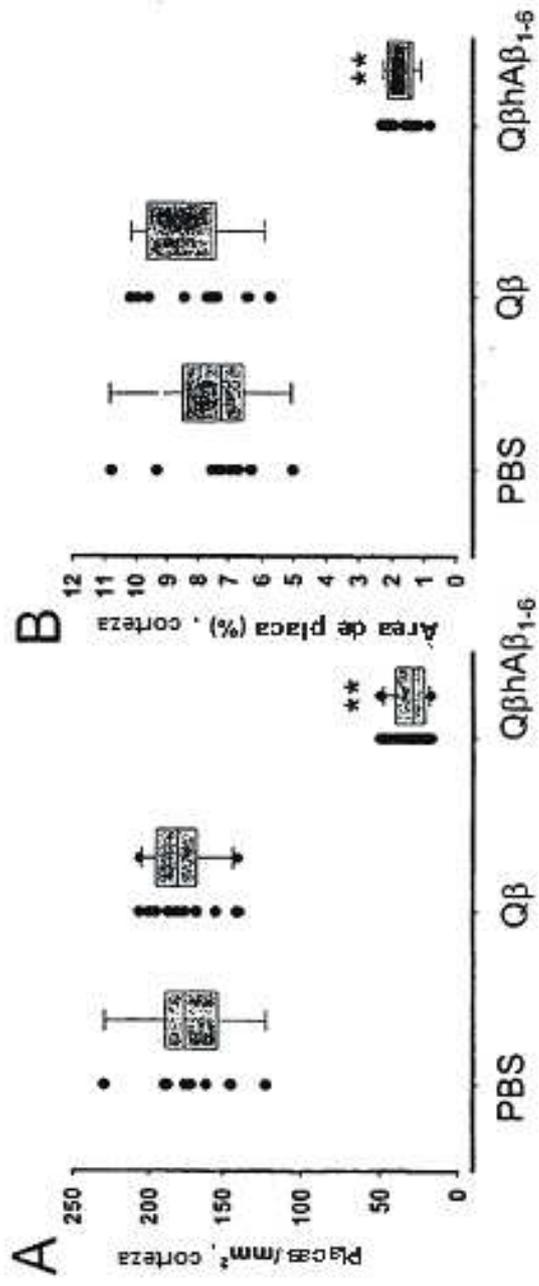


Fig. 12A

Fig. 12B

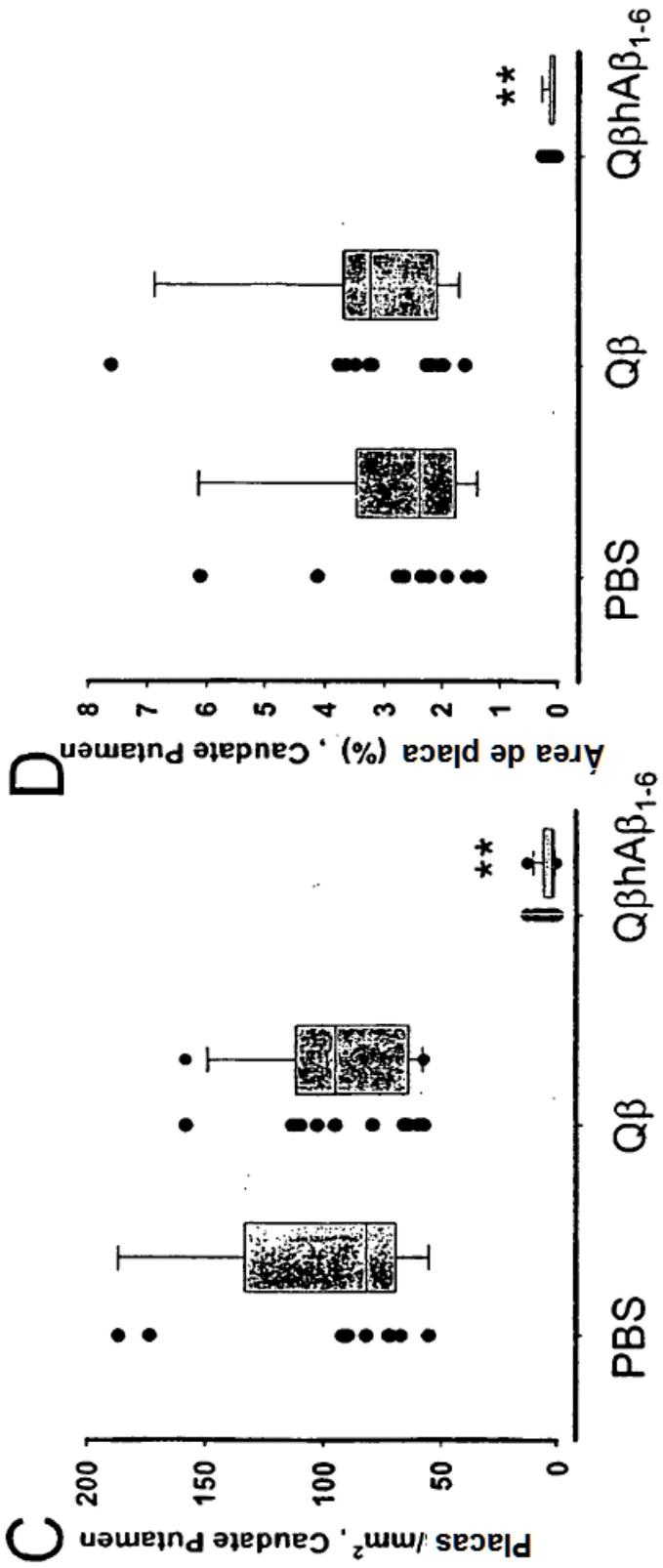


Fig. 12C

Fig. 12D

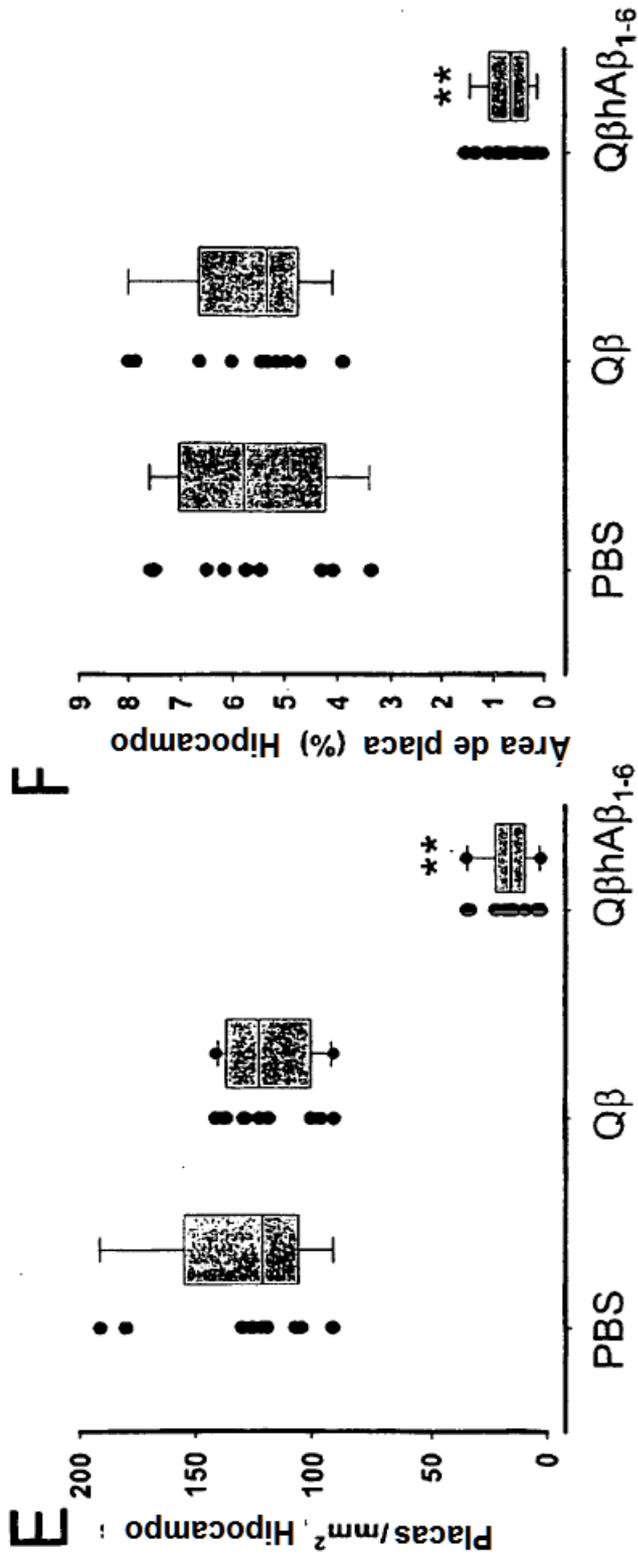


Fig. 12F

Fig. 12E

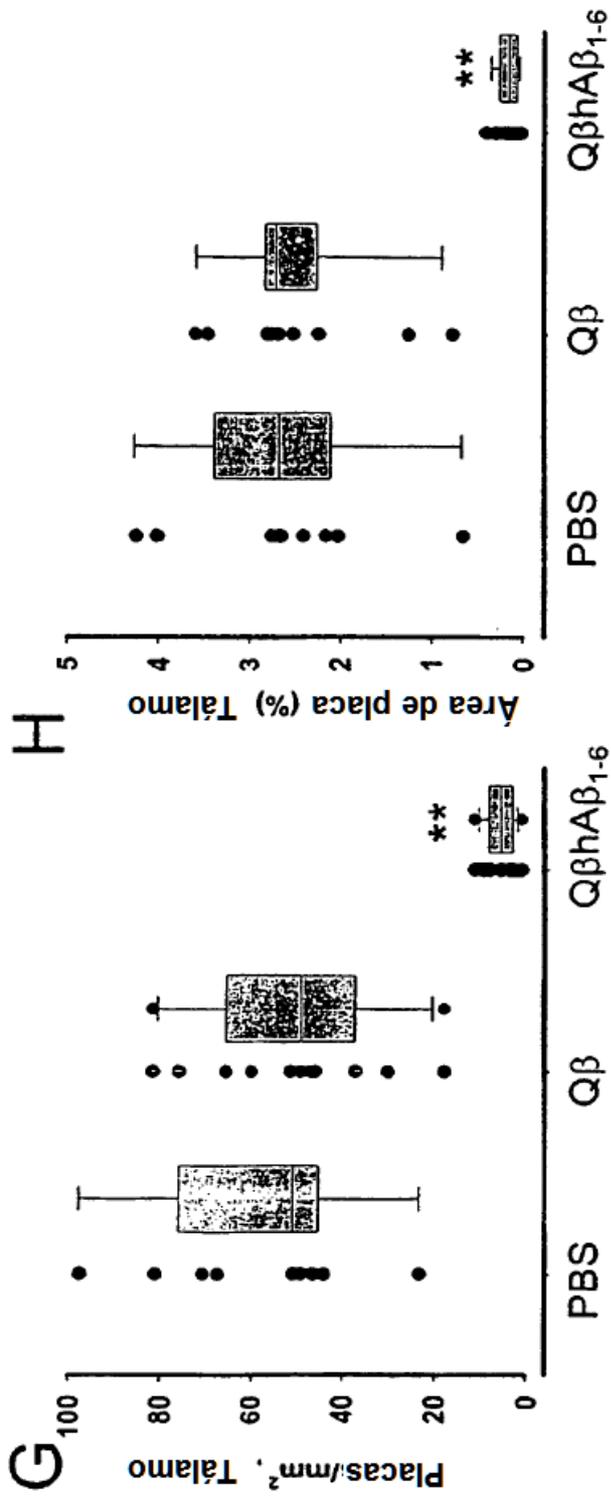


Fig. 12G

Fig. 12H

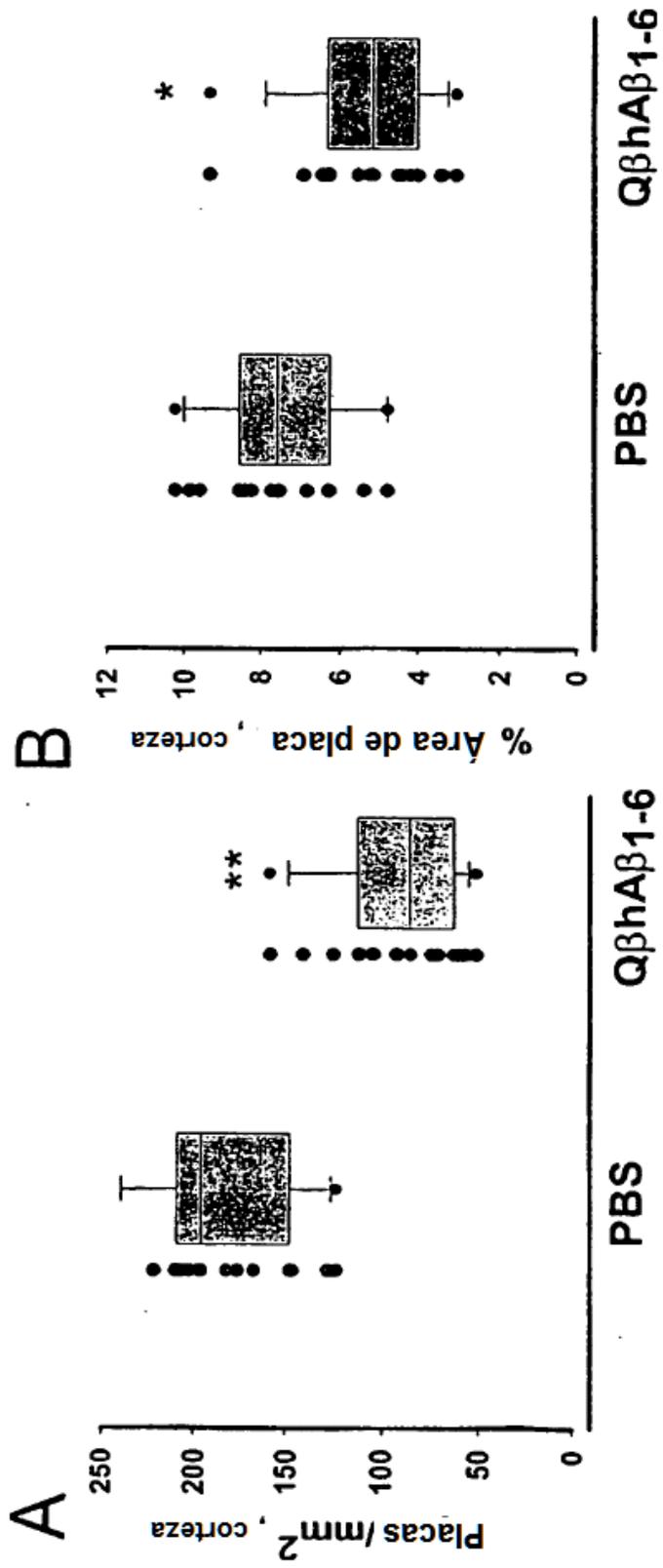


Fig. 13A

Fig. 13B

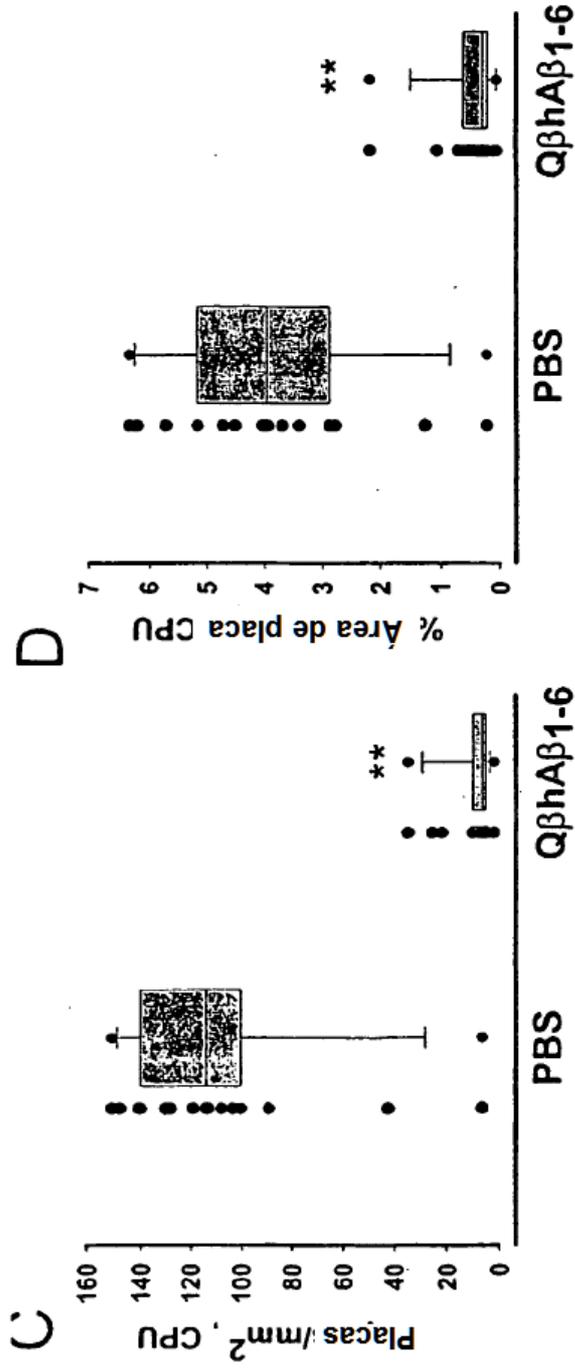


Fig. 13D

Fig. 13C

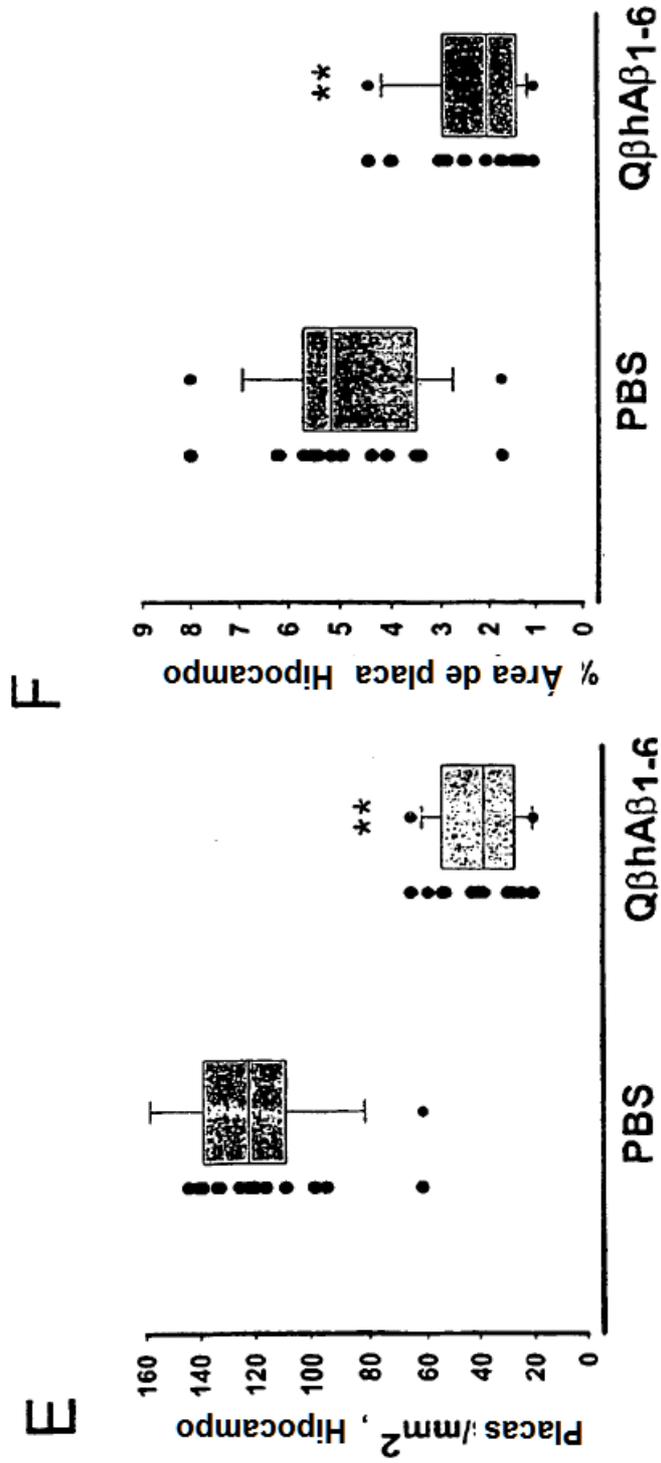


Fig. 13F

Fig. 13E

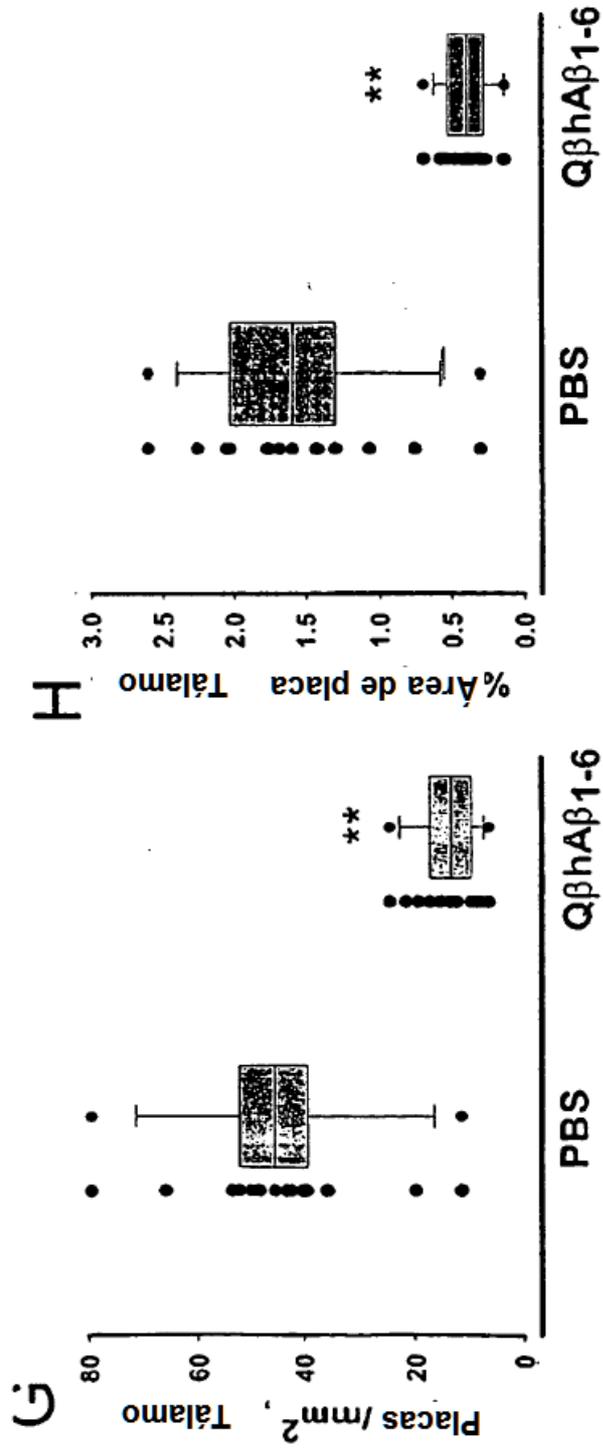


Fig. 13H

Fig. 13G

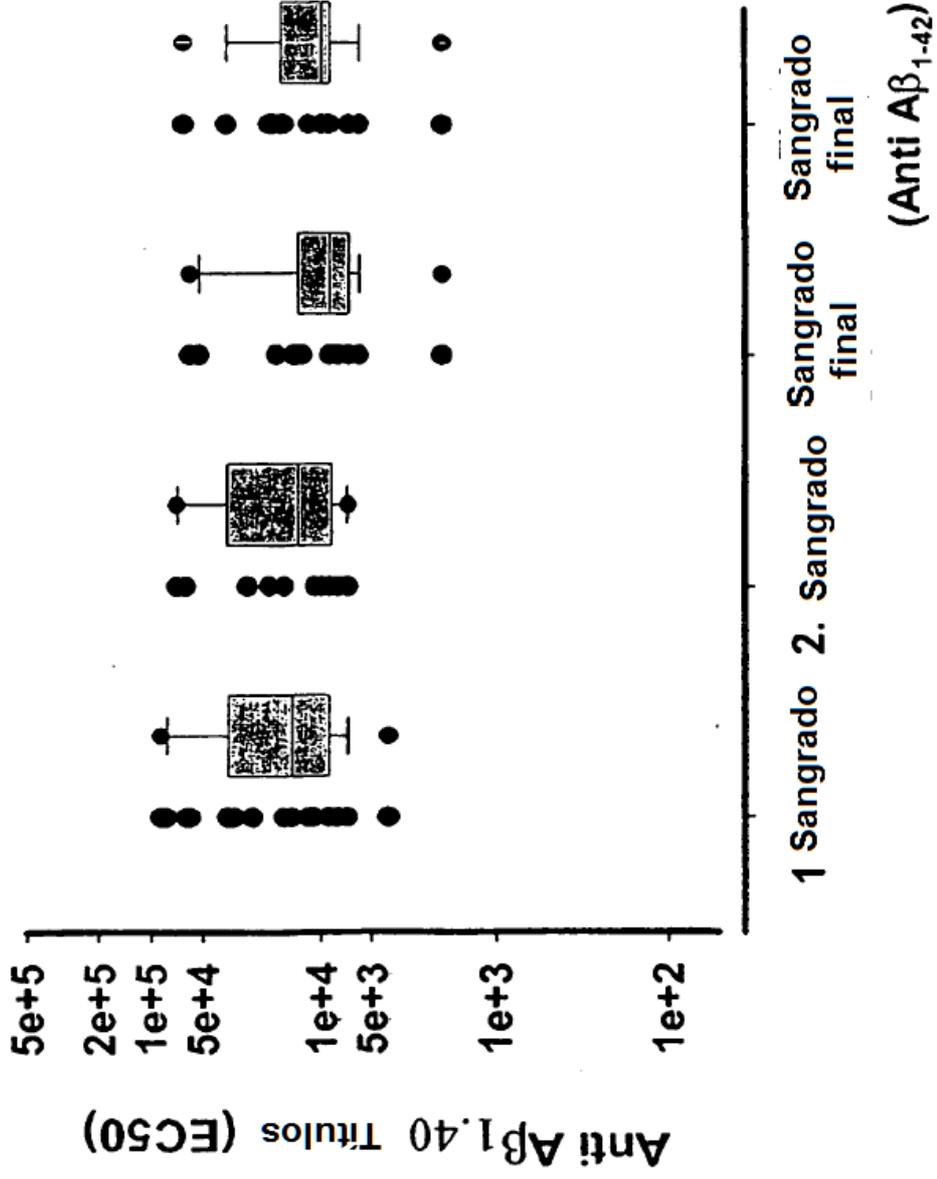


Fig. 14

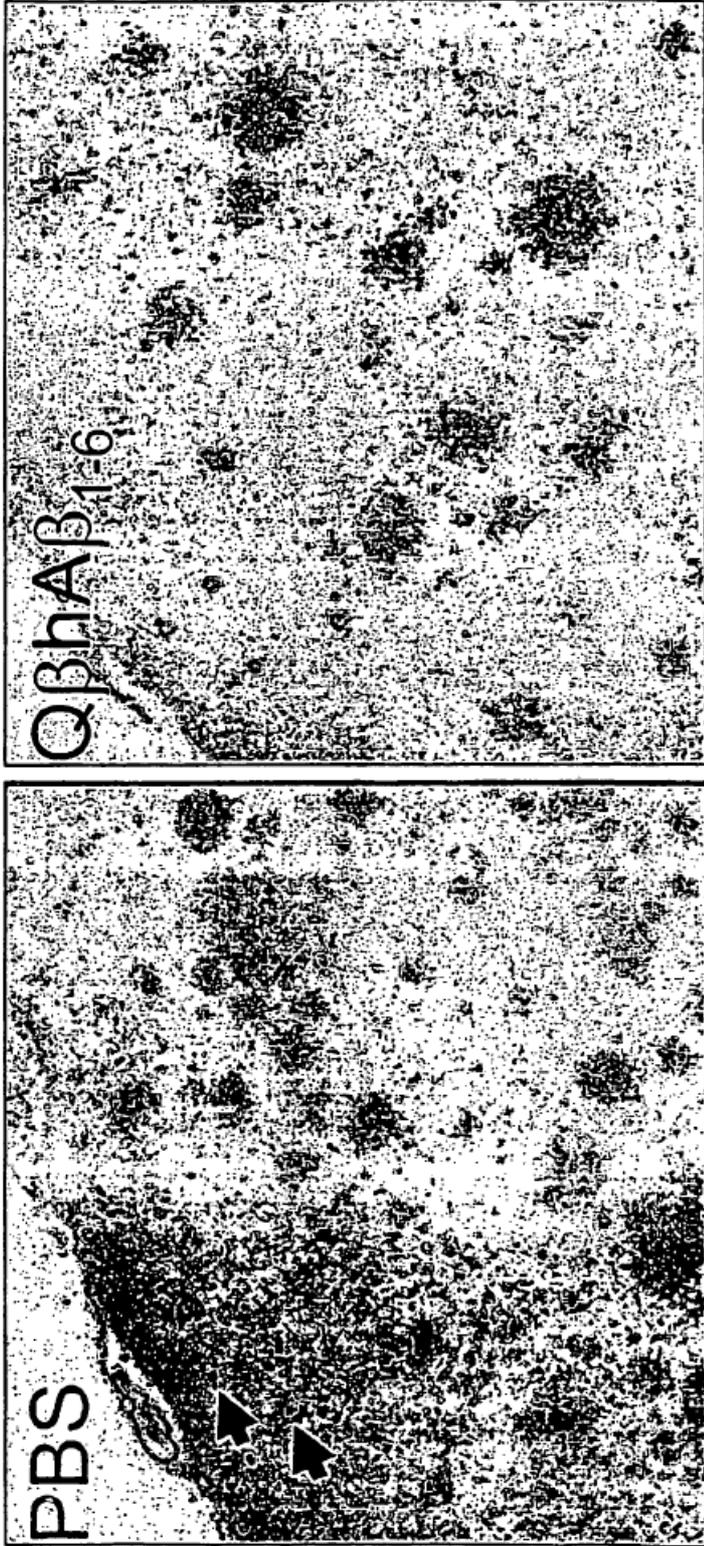


Fig. 15A

Fig. 15B

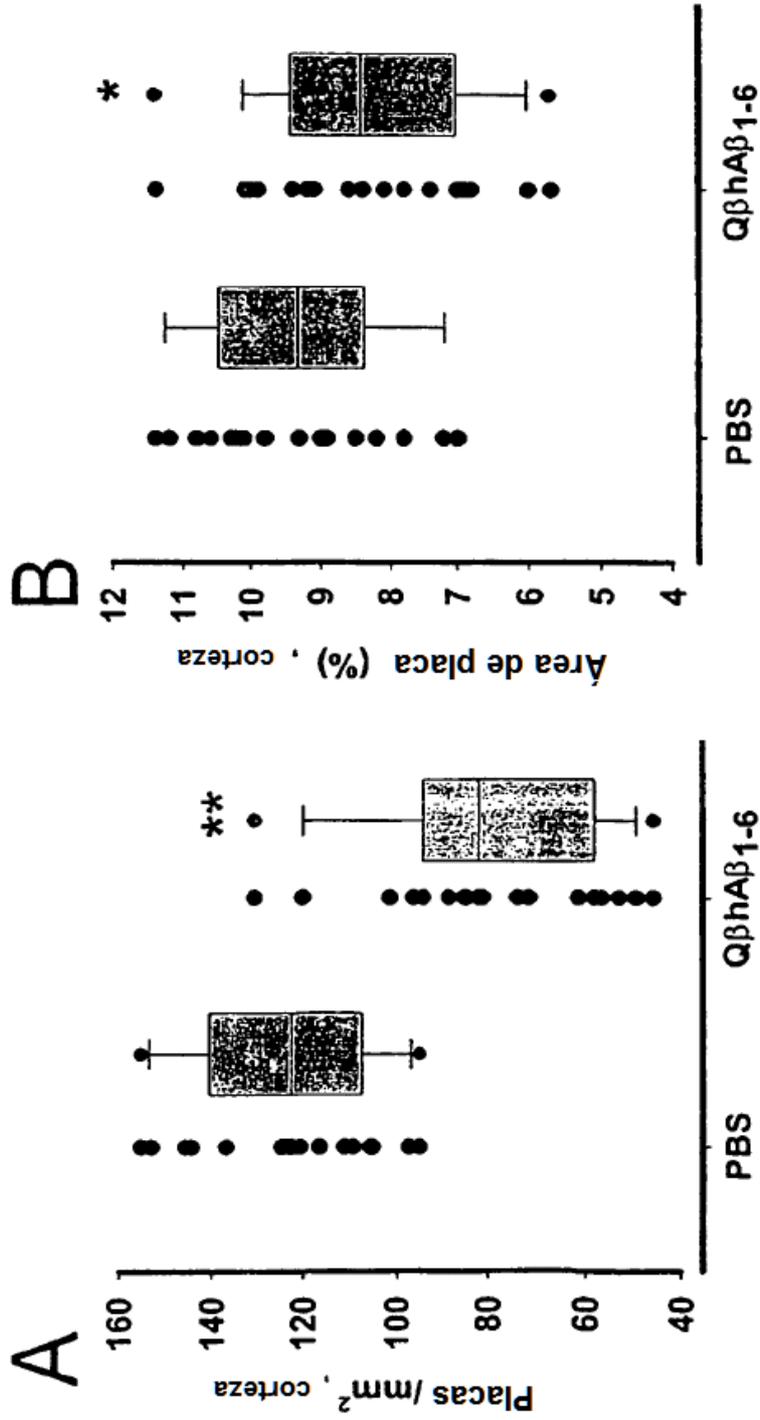


Fig. 16B

Fig. 16A