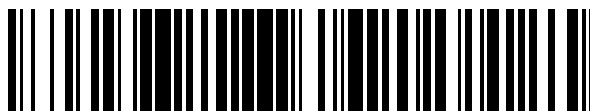


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 742**

51 Int. Cl.:
C07K 14/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07786022 .9**
96 Fecha de presentación: **12.07.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2059525**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.05.2009**

54 Título: **Partículas de centro escindido para la presentación de moléculas extrañas, particularmente para aplicaciones de vacunas y procedimiento para su preparación**

30 Prioridad:
08.09.2006 EP 06018847

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.03.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG
HUGSTETTER STRASSE 49
79106 FREIBURG, DE**

72 Inventor/es:
**NASSAL, Michael;
SKAMEL, Claudia y
WALKER, Andreas**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 377 742 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

Partículas de centro escindido para la presentación de moléculas extrañas, particularmente para aplicaciones de vacunas y procedimiento para su preparación

5 Son objeto de la presente invención nuevos vehículos para vacunas, pero también para otras moléculas, basados en el antígeno central del virus de la hepatitis B. En el antígeno central del virus de la hepatitis se incluyen secuencias extrañas de aminoácidos, que pueden proceder de patógenos. Frente a estas secuencias proteicas deben formarse anticuerpos mediante la vacuna, prefiriéndose anticuerpos protectores o neutralizantes. Mediante las partículas de acuerdo con la invención se puede estimular también la respuesta inmune celular (linfocitos T). La proteína del centro de la hepatitis B tiene la propiedad de que varias copias se pueden ensamblar hasta dar las denominadas
10 partículas de tipo cápside (capsid-like particles). Estas partículas de tipo cápside (CLP) son particularmente adecuadas para la preparación de vacunas, ya que estimulan el sistema inmune y conducen de este modo a una producción aumentada de anticuerpos. El término "vacuna" se tiene que entender en la presente solicitud preferentemente como sistema de vehículo que puede producir respuestas inmunes tanto humorales como celulares.

15 Las cápsides de los virus de la hepatitis B son nanopartículas simétricas icosaédricas (diámetro aproximadamente 30 nm), que están compuestas de 180 o 240 copias de la proteína de centro vírico. La proteína de centro se denomina HBcAg. Pueden servir como vehículos particulados para moléculas extrañas; la aplicación preferente es como vehículos de antígenos de refuerzo inmunitario para vacunas. Mediante modificación adecuada de la proteína de centro se pueden presentar las moléculas extrañas sobre la superficie de la partícula (si es necesario también en el interior). Para la exposición en la superficie es óptima la asociación de la molécula extraña con restos de aa que se encuentran de forma central en la secuencia de aa de la proteína de centro (zona de los aa aproximadamente 73-94), que contienen el epítipo de linfocito B inmunodominante "c/e1" y que están más intensamente expuestos en la estructura 3D sobre la superficie de las partículas (aa significa aminoácido).

25 El documento WO 01/77158 describe proteínas de fusión de antígeno central de la hepatitis B, introduciéndose epítipos heterólogos preferentemente en la zona entre las posiciones 61 y 90. El documento US 2003/0198649 describe partículas de antígeno central del virus de la hepatitis B, en las que los inmunógenos están unidos mediante estructura de ligando con la proteína de centro del virus de la hepatitis B (VHB). Kratz y col. [PNAS (1999), 1915-1920] describen la presentación de GFP (Proteína Verde Fluorescente) sobre la superficie de la proteína de centro del VHB. A este respecto, los aminoácidos 79 y 80 de la proteína de centro se sustituyeron por la secuencia de 238 aminoácidos de longitud de GFP.
30

Nassal y col. [Eur. J. Immunol. (2005), pág. 655-665] describen un producto de fusión de toda la proteína OspA de *Borrelia burgdorferi* y de la proteína de la cápside del virus de la hepatitis B. También en este caso se sustituyeron los aminoácidos 79 y 80 por los aminoácidos 18 a 273 de OspA, incluyéndose, sin embargo, entre la proteína de centro y OspA secuencias de engarce. Skamel y col. (Journal of Biological Chemistry, 2006, páginas 17474-17481)
35 describen la presentación de toda la proteína OspC de *Borrelia burgdorferi* con ayuda de partículas de tipo cápside del virus de la hepatitis B. Sin embargo, se ha observado en soluciones conocidas por el estado de la técnica que las proteínas de centro modificadas ya no tienden del modo deseado a la formación de partículas de tipo cápside (CLP) y que, por lo tanto, la respuesta inmune ya no se estimula de forma satisfactoria.

40 En una inserción genética de moléculas extrañas de base peptídica o proteica en la proteína de centro, esto significa que la secuencia extraña está unida con la proteína de centro tanto por su extremo N como por el C. Ahora se ha hallado que la asociación bilateral limita espectacularmente el tipo y la selección de secuencias extrañas adecuadas.

El "sistema de centro escindido" descrito en el presente documento elimina estas limitaciones, generándose la proteína de centro en dos partes independientes, que se encuentran sorprendentemente de forma espontánea y que forman partículas de cápside de forma comparable a la cadena proteica continua.

45 Las moléculas extrañas se pueden fusionar al fragmento N-terminal ("centroN") o al C-terminal ("centroC") y de este modo ya solamente están asociadas mediante *un* extremo con la proteína transportadora. De este modo se eliminan en lo esencial las limitaciones estructurales de la asociación bilateral durante la inserción de secuencias extrañas en la cadena peptídica continua de la proteína de centro.

Por tanto, el sistema de centro escindido de acuerdo con la invención permite:

- 50 (i) la presentación de moléculas extrañas, que debido a su tamaño y/o estructura no se pueden presentar o se pueden presentar solo muy mal en el contexto convencional de proteína de centro continua;
- (ii) la presentación de proteínas extrañas heterodiméricas;
- (iii) la presentación de moléculas extrañas con capacidad de interacción en una forma flexible, bien accesible, que simplifica considerablemente la interacción con las moléculas compañeras deseadas;
- 55 (iv) la presentación de moléculas extrañas adicionales mediante los extremos N y C expuestos en superficie

adicionales presentes en el centro escindido, sin embargo, no en el sistema de centro continuo convencional.

5 Los virus de la hepatitis B (VHB) son virus envueltos. La nucleocápside interna se denomina también partícula de centro ("centro"); serológicamente está definida como antígeno central de la hepatitis B (HBcAg). Los centros están compuestos de 180 o 240 copias de la proteína de centro de 183-185 aa de longitud (dependiendo del subtipo de VHB). La proteína de centro puede expresarse de forma heteróloga (en bacterias, levadura, células eucariotas); a este respecto se forman espontáneamente "partículas de tipo cápside" (=CLP). Ya que no contienen ni el genoma del virus ni la envuelta externa, no son infecciosas. Tales CLP se pueden obtener también de los VHB de mamífero más emparentados (por ejemplo, marmota canadiense = woodchuck; ardilla = grounds squirrel; y otros) así como de los VHB de ave menos emparentados (por ejemplo, pato = duck; garza = heron; y otros). Básicamente se pueden usar de acuerdo con la invención todas las secuencias de VHB, sin embargo, son preferentes las secuencias de VHB que pueden infectar al ser humano.

15 La secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de la proteína de centro de VHB es conocida [Galibert y col., Nature (1979), pág. 646-650; Nassal, Gene (1988), páginas 279-294 o documento WO 01/77158], a estas publicaciones se hace referencia. Se usa preferentemente la secuencia de la proteína de centro del subtipo ayw, sin embargo, se pueden usar asimismo variantes, modificaciones de la secuencia de VHB, tales como la secuencia de otros VHB de mamífero o VHB de ave. Las secuencias están almacenadas en las genotecas de acceso público.

20 Además del virus de la hepatitis B patógeno para el ser humano (VHB en el sentido más riguroso) existe una serie de virus de la hepatitis B emparentados, específicos de animales, por ejemplo, el VHB de la marmota norteamericana (inglés: woodchuck; zool. *Marmota monax*; virus de la hepatitis B de marmota (woodchuck hepatitis B virus) = WHV), el VHB de la ardilla terrestre californiana (inglés: california ground squirrel; zool. *Spermophilus beecheyi*; virus de la hepatitis B de ardilla (ground squirrel hepatitis B virus) = GSHV) así como otros.

Estos virus poseen una estructura genética similar al VHB humano, sin embargo, presentan distintas diferencias en su secuencia de nucleótidos y, por tanto, de aminoácidos de sus proteínas.

El uso del centro de VHB humano como vehículo de vacuna está sometido a dos posibles limitaciones:

25 1. Las personas con una infección por VHB crónica son parcialmente tolerantes frente a antígenos del VHB (esta respuesta inmune ausente es corresponsable de la persistencia de la infección). El centro también actúa como antígeno dependiente de linfocitos T. Por tanto, los epítopos de linfocitos T en la secuencia de la proteína de centro participan en la fuerte inmunogenicidad de las vacunas basadas en CLP de centro de VHB. En infectados de forma crónica por VHB, esto posiblemente no se manifestaría debido a su tolerancia de linfocitos T frente al centro de VHB. Sin embargo, una tolerancia de este tipo no existe frente al centro de WHV y otros VHB de animal (compárese con Billaud JN, y col. Advantages to the use of rodent hepadnavirus core proteins as vaccine platforms. Vaccine. 2007 Feb 19; 25(9): 1593-606). Para este círculo especial de potenciales personas a vacunar, por tanto, podría ser ventajoso el uso de una proteína de centro de VHB de animal como vehículo.

35 2. Debido a su inmunogenicidad extraordinariamente fuerte, el centro da origen en todos los infectados por VHB, ya sea de forma aguda o crónica, a una intensa respuesta de linfocitos B anti-centro (anti-HBcAg); las infecciones curadas están caracterizadas adicionalmente por la aparición de anticuerpos frente a las proteínas de envuelta del VHB (anti-HBsAg). Las actuales vacunas profilácticas frente a las infecciones por VHB están basadas exclusivamente en la proteína de envuelta del VHB (HBsAg). Por tanto, la vacunación exitosa da lugar –al igual que la infección superada– a la aparición de anti-HBsAg. En algunos casos es de interés para el diagnóstico si una persona con anti-HBsAg ha obtenido esto mediante infección o mediante vacunación con HBsAg –esto se puede diferenciar mediante la comprobación de anti-HBcAg, que aparece solamente después de la infección.

45 Una vacuna basada en el centro del VHB humano, además de la respuesta deseada frente a la proteína extraña interesada, también daría origen a una cierta respuesta anti-centro (anti-HBcAg). Esto dificultaría con presencia simultánea de anti-HBsAg la diferenciación de infección por VHB frente a la vacunación con HBsAg.

50 En el sistema de centro escindido ya está minimizada la generación de anti-HBcAg, ya que el epítipo principal, concretamente c/e1, está presente separado físicamente y, por tanto, ya no se puede reconocer por la cantidad mayoritaria de anticuerpos anti-HBcAg. Sin embargo, existe una respuesta anti-HBcAg residual frente a otras zonas de secuencia de la proteína de centro. Esto se puede evitar o disminuir adicionalmente mediante el uso de una proteína de centro de VHB no humano, preferentemente de la proteína de centro de WHV como base del vehículo.

El constituyente esencial del sistema de vehículo de centro escindido de acuerdo con la invención es, por un lado, la proteína de centro de un virus de la hepatitis B y, por otro lado, la molécula extraña frente a la que se debe generar una respuesta inmune.

55 La proteína de centro se obtiene en la forma de realización más general de cualquier virus de la hepatitis B. Se conocen distintos virus de la hepatitis B. Se usan preferentemente de acuerdo con la invención las secuencias que están obtenidas de virus de la hepatitis B que se han aislado de mamíferos y que son específicos para los mismos.

De forma particularmente preferente se usa VHB humano. Sin embargo, además de esto también los virus de la hepatitis B que proceden de otros animales, por ejemplo, aves, tales como patos o garzas, pueden suministrar la secuencia de la proteína de centro.

5 El otro componente, concretamente la molécula extraña frente a la que se debe generar una respuesta inmune, en principio puede ser cualquier molécula. Preferentemente se trata en este caso de secuencias proteicas y de forma particularmente preferente de las secuencias proteicas que se encuentran sobre las superficies de patógenos y que se ponen en contacto con el sistema inmune. Cuando el sistema inmune puede generar anticuerpos frente a tales estructuras de superficie de patógenos, los patógenos se inactivan después de la puesta en contacto con los componentes individuales del sistema inmune del paciente vacunado, destruyéndose por normal general el patógeno invasor.

10 Cuando se comparan las secuencias disponibles en las bases de datos del virus de la hepatitis B de la marmota (WHV) con el aminoácido de la proteína de centro del VHB (subtipo ayw), se comprueba que existe una identidad de aproximadamente el 60 %. Las diferencias de secuencia están particularmente marcadas en la zona de las posiciones de aminoácidos entre 66 y 94, conteniendo esta secuencia el epítipo c/e1 y en el sistema de centro escindido de VHB de acuerdo con la invención, el punto de división entre la zona N-terminal y la zona C-terminal de la proteína de centro. Este punto de división se encuentra en una forma de realización particularmente preferente entre el aminoácido 79 y 81.

20 Para la preparación de sistemas de vehículo de centro escindido de WHV de acuerdo con la invención se separó la secuencia de proteína de centro de la proteína de centro de WHV entre la posición 79 (codifica el aminoácido Glu) y la posición 80 (codifica el aminoácido glutamina) en el plano de ácido nucleico. En el plano de nucleótidos se unió al extremo carboxi del segmento de la proteína de centro N-terminal de WHV (denominada de forma abreviada WcentroN) un sitio de escisión con BamHI que codifica una secuencia. A esto se unió un segundo sitio de unión a ribosomas así como un sitio de escisión para la endonucleasa de restricción Nde1, que se solapa a su vez con el codón de inicio del segmento de centroC de WHV (WcentroC). Esta disposición es idéntica a la disposición preferente en las correspondientes construcciones de centro escindido de VHB. De este modo se pueden transferir las inserciones directamente con ayuda de una digestión con BamHI-Nde1 de un sistema al otro. En el caso descrito en el presente documento, WcentroN contiene debido al sitio de escisión con BamHI introducido una sustitución conservativa, concretamente E79D, y adicionalmente una P como aminoácido C-terminal. Esto es inofensivo para la capacidad de formación de partículas y la prolina C-terminal aumenta, debido a su resistencia a proteasa, la estabilidad de la proteína escindida. De forma análoga al centro escindido de VHB, WcentroC contiene una metionina de inicio adicional, en este caso, delante de Q80, en VHB, delante de S81. Esta construcción de centro escindido de WHV formó partículas igual de bien que la construcción de centro escindido de VHB correspondiente.

35 En una forma de realización adicional de la presente invención, también la zona C-terminal y la zona N-terminal de la proteína de centro pueden proceder de diferentes virus de la hepatitis B. El sistema de vehículo de centro escindido híbrido de acuerdo con la invención presenta en este caso esencialmente tres componentes, la zona N-terminal de la proteína de centro de un virus de la hepatitis B, por ejemplo, un virus de la hepatitis B humano, la molécula extraña frente a la que se puede generar una respuesta inmune y la zona C-terminal de la proteína de centro, que procede de otro virus de la hepatitis B, por ejemplo, del WHV. También se formaron partículas sin problemas por una construcción de centro escindido híbrido de este tipo. Ya que las secuencias de aminoácidos de las proteínas de centro de diferentes virus de la hepatitis B se diferencian, también se diferencian los epítipos de linfocitos B y T. De este modo, mediante el sistema de centro escindido híbrido se puede influir de forma muy selectiva sobre la respuesta inmune frente al vehículo particulado.

45 Para la preparación de los sistemas de vehículo de centro escindido híbrido de acuerdo con la invención preferentes se separó la secuencia de proteína de centro de la proteína de centro de WHV entre la posición 79 (codifica el aminoácido Glu) y la posición 80 (codifica el aminoácido glutamina) en el plano de ácido nucleico. En el plano de los nucleótidos se unió al extremo carboxi de la proteína de centro N-terminal de WHV (denominado de forma abreviada W-centro-N) un sitio de escisión con BamHI que codifica una secuencia. A esto se unió un segundo sitio de unión a ribosomas así como un sitio de escisión para la endonucleasa de restricción Nde1, que a su vez se solapa con el codón de inicio del segmento de centroC del WHB (WcentroC). Esta disposición es idéntica a la disposición preferente en las correspondientes construcciones de centro escindido de VHB. De este modo se pueden transferir las inserciones directamente con ayuda de una digestión con BamHI-Nde1 de un sistema al otro. En el caso descrito en el presente documento, WcentroN contiene, debido al sitio de escisión con BamHI introducido, una sustitución conservativa, concretamente en E79D, y adicionalmente una P como aminoácido C-terminal. Esto es inofensivo para la capacidad de formación de partículas y la prolina C-terminal aumenta, debido a su resistencia a proteasa, la estabilidad de la proteína escindida. De forma análoga al centro escindido de VHB, WcentroC contiene una metionina de inicio adicional, en este caso delante de Q80, en VHB, delante de S81. En esta construcción se pudieron formar partículas sin problemas.

60 El HBcAg natural al igual que las CLP de VHB recombinantes son altamente inmunógenos (antígeno independiente de linfocitos T y dependiente de linfocitos T). Para esto es esencial la estructura particulada multimérica simétrica de la partícula de centro. Ésta puede representarse con microscopia electrónica convencional de "tinción negativa" y también mediante microscopia crioeléctronica. Se puede comprobar la naturaleza particulada bioquímicamente

mediante sedimentación en gradiente de sacarosa (coeficiente de sedimentación dependiendo de la variante 60 - 80 S; para la comparación: proteínas monoméricas solubles aproximadamente 1-5 S; subunidades ribosómicas eucariotas 40S + 60S). Además, las partículas tienen un comportamiento de avance distinto en la electroforesis en gel nativo en geles de agarosa que se diferencia de las formas no particuladas. De este modo se puede comprobar si se pueden formar CLP o si las proteínas están presentes sin la estructura de CLP.

La proteína de centro de VHB presenta 183 o 185 aminoácidos (la de WHV, 187 aminoácidos) y está compuesta de dos dominios: los primeros aproximadamente 140 aa son necesarios y suficientes para el ensamblaje hasta dar CLP ("dominios de ensamblaje"); la región C-terminal es rica en aa básico y se une a ácidos nucleicos. Una variante de proteína de centro acortada en el extremo C (aa1-149) se expresó considerablemente mejor en los sistemas de expresión en *E. coli* originales que la proteína de longitud completa. Por tanto, se usaron CLP de la proteína de centro 1-149, es decir, sin dominio de unión a ácido nucleico, para exámenes de estructuras por ME de resolución media y alta. De este modo se pudo determinar la estructura cristalina de las CLP y de la proteína. Como se predijo bioquímicamente, la proteína de centro forma dímeros simétricos muy estables que se agrupan hasta dar CLP de 90 o 120 dímeros.

Las partículas de centro poseen "picos" marcados; cada dímero forma un pico que está compuesto estructuralmente de un haz de 4 hélices, al que cada monómero aporta 2 hélices α que se encuentran centrales en la secuencia de aa. Las puntas de pico comprenden los aminoácidos (aa) en la región de los aa 74-85. Esta región lleva también el epítipo de linfocitos B inmunodominante del HBcAg (epítipo c/e1), su inmunogenicidad particularmente alta se explica a partir de la exposición en superficie de estos restos.

La Figura 1 muestra esquemáticamente la estructura de proteína de centro. En el lado izquierdo de la Figura 1 está representada la secuencia primaria de la proteína de centro de VHB. Toda la proteína está compuesta de 183 aa (en algunos subtipos de VHB, 185 aa); solamente los aproximadamente 140 aa N-terminales se necesitan para la formación de CLP (dominio de ensamblaje); una posición de aa C-terminal preferente es 149; a este y cualquier aa posterior, hasta el aa 183, puede fusionarse una etiqueta His sin alterar las CLP. El epítipo c/e1 se encuentra en la zona de los aa 78-83 y forma una parte del bucle entre la hélice α central (izquierda abajo). Las propias hélices se pueden acortar; como mínimo se necesitan probablemente en el centroN los restos de aa hasta la posición Gly73, en el centroC, los restos a partir del aa Gly94. El lado derecho de la Figura 1 muestra una representación esquemática de un dímero de proteína de centro. Solamente están mostradas las dos hélices centrales por monómero. El epítipo c/e1 está sobre la superficie de la partícula.

Para una formación de partículas exitosa, la secuencia de aa de centro tiene que contener al menos la posición 140, preferentemente al menos la posición 149, sin embargo, también se puede extender más allá hasta el aa C-terminal 183 o 185, dependiendo del subtipo de VHB. La secuencia de aa después de la posición 140, mejor la 149, se puede sustituir por secuencias extrañas, estas secuencias extrañas se encuentran entonces habitualmente en el interior de las CLP. Frente a tales aminoácidos extraños no se forman en primera línea anticuerpos, sin embargo, pueden cumplir otras funciones.

Debido a la inmunogenicidad extraordinariamente alta del HBcAg, las CLP de VHB recombinantes son atractivas para el uso como vehículos ("carrier") que aumentan la inmunogenicidad para antígenos extraños.

Un modo de solución alternativo es el acoplamiento *químico* de moléculas extrañas a CLP preformadas. En la presente invención existe una *fusión genética* de secuencias de aa extraños a la proteína de centro. En este sentido se comprobó, incluso antes de aclarar la estructura mediante cristalografía de rayos x, mediante experimentos empíricos que la región del epítipo c/e1 es la más adecuada para la inducción de respuestas potentes de linfocitos B. Mediante la estructura actualmente está claro que tales fusiones representan inserciones en el bucle ("loop") entre las hélices centrales. Ya que este *bucle* por sí mismo no tiene ninguna función de formación de estructura, al menos se puede básicamente mantener la estructura 3D de la proteína de centro con la inserción de secuencias extrañas. Dependiendo de la secuencia extraña insertada, algunas de tales proteínas de fusión pueden formar adicionalmente CLP regulares, sin embargo, esto no siempre está garantizado, ya que la secuencia de aminoácidos extraños puede influir negativamente en la formación de la estructura de la proteína de fusión. A su vez, la estructura particulada es esencial para la alta inmunogenicidad.

Ya se han insertado múltiples secuencias extrañas en la proteína de centro, en parte también se ha comprobado experimentalmente la inmunogenicidad elevada [Ulrich y col., Adv. Virus Res. (1998), págs. 141-182]. Ya que, sin embargo, muchos intentos de inserción de secuencias extrañas más largas con más de aproximadamente 40 aa fracasaron (ya ninguna formación de partículas), se supuso que existe una capacidad de captación limitada de forma natural de secuencias extrañas de hasta 40 aa o en un caso especial hasta 120 aa.

Se halló que las secuencias de aminoácidos extraños que están fusionadas en el extremo C y N con la proteína de centro configuran partículas solamente cuando se cumplen al menos dos criterios esenciales:

- (i) la estructura 3D de la proteína extraña tiene que estar configurada de tal forma que su extremo N y C se ajustan a la ubicación en el espacio de los puntos de asociación en la proteína de centro (extremo C de la parte de centro N-terminal, es decir, aa de centro de aproximadamente 1 a aproximadamente 78 [centroN]; extremo

N de la parte de centro C-terminal, es decir, aa de centro aproximadamente 80 a 149 o 183 [centroC])

(ii) en caso de que la propia proteína extraña forme interacciones homoméricas (dímeros, trímeros, etc.), la estructura de estos homo-oligómeros tiene que ajustarse asimismo a la estructura de las dos partes de proteína de centro

5 Por tanto, son muy adecuadas para la presentación en proteínas de fusión conocidas de antemano las proteínas extrañas cuyos extremos N y C se encuentran próximos entre sí en la estructura 3D nativa. La GFP cumple estas dos condiciones, sin embargo, muchas otras proteínas no; un ejemplo de esto es la proteína de superficie externa A (outer surface protein A) (OspA) del patógeno de la borreliosis de Lyme *Borrelia burgdorferi*, cuyos extremos N y C se encuentran en lados opuestos de la estructura 3D extendida longitudinalmente.

10 La inserción de OspA u otras proteínas estructuradas de forma similar de manera inadecuada conduce a tensiones en la proteína de fusión. La proteína extraña permanece plegada de forma correcta e impide la aproximación de las dos partes de proteína de centro, de tal forma que se impide su plegamiento y dimerización y formación de partículas posterior; o el plegamiento de la parte de proteína de centro perjudica el plegamiento de la proteína extraña de tal manera, que la misma ya no está presente de forma nativa (> antigenicidad modificada) o –en caso de
15 que se pliegue masivamente de forma errónea– conduce a agregación.

En el caso de OspA, este problema se pudo eludir solamente de forma parcial mediante el uso de secuencias de unión muy largas ("engarce"). Precisamente para aplicaciones de vacunas, estas secuencias de engarce representan un potencial problema, ya que podrían poseer una antigenicidad propia indeseada que puede conducir a reacciones cruzadas perjudiciales, por ejemplo, con antígenos propios. Además, las correspondientes
20 preparaciones de proteína solamente fueron capaces de forma muy limitada de formar CLP regulares.

Debido a la estructura dimérica del vehículo de proteína de centro y la superficie limitada geoméricamente de las partículas transportadoras, en proteínas extrañas muy grandes o que se desvían mucho de una estructura globular adicionalmente el impedimento estérico *general* podría representar un problema (el espacio disponible de las CLP en la "superficie de la esfera" está limitado). El tamaño máximo de la proteína extraña depende de varios factores.
25 Con el procedimiento de acuerdo con la invención se ha conseguido la presentación de una proteína extraña (CSP) que comprende aproximadamente 320 aa.

Por tanto, es objeto de la presente invención una vacuna de centro escindido que presenta como polipéptidos separados los dominios de centroN y centroC de la proteína de centro de un virus de la hepatitis B y al menos una
30 secuencia de aminoácidos extraños, frente a la que se debe generar una respuesta inmune tanto humoral como eventualmente celular, estando fusionada la secuencia de aminoácidos extraños al extremo C del dominio de centro N o al extremo N del dominio de centro C y pudiendo unirse la proteína de centro a partículas de tipo cápside. Preferentemente se generan anticuerpos neutralizantes mediante el sistema de vehículo.

En la vacuna de centro escindido de acuerdo con la invención es esencial que la proteína de centro esté interrumpida, es decir, separada, en el epitopo c/e1, es decir, aproximadamente entre los aminoácidos 73 y 94. La
35 secuencia de aminoácidos extraños puede estar fusionada ahora al extremo C-terminal de la zona de centro N. En este caso comienza el extremo N-terminal de la parte de centro C con el aminoácido en el que se separó la proteína de centro N. Sin embargo, también es posible que esté delecionada una parte del epitopo c/e1, es decir, que se hayan retirado uno o varios aminoácidos de la zona entre el aminoácido 73 y 94. Como alternativa a esto es posible que la secuencia de aminoácidos extraños frente a la que se deben formar anticuerpos esté fusionada al extremo N-
40 terminal de la zona de centro C. En este caso termina la zona C-terminal de centro N en el aminoácido en el que se interrumpió la proteína de centro. Un efecto esencial que tiene que mantener la vacuna de centro escindido es que las partículas de vacuna de centro escindido que llevan las secuencias de aminoácidos extraños fusionadas puedan formar a pesar de esto partículas similares a cápside de centro. Esto se comprueba en el gradiente de sacarosa o en la electroforesis en gel de agarosa nativo. También es posible una comprobación con ayuda del microscopio
45 electrónico.

En el caso de la secuencia de aminoácidos extraños frente a la que se deben formar anticuerpos se trata preferentemente de secuencias que proceden de estructuras de superficie de microorganismos. Tales microorganismos generan habitualmente enfermedades en el ser humano. Cuando se pueden formar anticuerpos
50 neutralizantes frente a estas estructuras, esto conduce a que la defensa inmunológica puede eliminar muy rápidamente los microorganismos invasores. Una bacteria en la que ya está relativamente avanzada el desarrollo de vacunas es *Borrelia burgdorferi*, el patógeno de la Enfermedad de Lyme. En el marco de la invención se usan preferentemente como secuencias de aminoácidos extraños las proteínas de superficie OspA y OspC de *Borrelia burgdorferi*. Sin embargo, en el caso de las secuencias de aminoácidos extraños puede tratarse también de otras secuencias que proceden de organismos patógenos. Un ejemplo de este tipo es el patógeno de la malaria
55 *Plasmodium falciparum*.

En el caso de otras secuencias de aminoácidos extraños frente a las que se pueden formar anticuerpos se trata de secuencias que proceden de virus. Se usan preferentemente las secuencias de aminoácidos que proceden de proteínas de virus que se ponen en contacto con el sistema inmune del organismos huésped. En primera línea se trata en este caso de proteínas de superficie, ya que las mismas se ponen en contacto por norma general en primer

lugar con el sistema inmune del organismo huésped. Como alternativa a esto, sin embargo, también puede tratarse de proteínas que se liberan a lo largo del ciclo vital vírico. A este respecto puede tratarse, dependiendo del tipo de virus, por ejemplo, de proteínas de centro o de proteínas de nucleocápside de un virus.

5 Con la presente vacuna de centro escindido pueden generarse, sin embargo, no solamente anticuerpos frente a secuencias de aminoácidos extrañas, sino también anticuerpos frente a estructuras propias indeseadas, tales como, por ejemplo, marcadores tumorales. Las células tumorales expresan con frecuencia otros marcadores de superficie que las células sanas. Cuando se presentan por tanto tales secuencias de aminoácidos propias en la vacuna de centro escindido, se estimula la formación de una respuesta inmune, de tal manera que el cuerpo forma en mayor medida anticuerpos frente a las células tumorales. Mediante estos anticuerpos pueden reconocerse las células tumorales de forma sencilla por la defensa inmunológica y finalmente eliminarse. Mediante el sistema de vehículo de acuerdo con la invención, sin embargo, puede estimularse también la respuesta inmune celular, lo que puede conducir a una eficacia mejorada.

15 También es objeto de la presente solicitud un procedimiento para la preparación de una vacuna contra una secuencia proteica heteróloga. La vacuna de centro escindido está compuesta de dos partes del antígeno central de un virus de la hepatitis B, estando fusionada a la región de centro N la secuencia proteica heteróloga o estando fusionada al extremo C-terminal de la secuencia proteica heteróloga la proteína de centro C. La posición en la cadena de aminoácidos en la que los dos dominios están separados entre sí se encuentra entre la posición 73 y la posición 94. De esta región de aminoácidos pueden estar seleccionados aminoácidos individuales que representan el epítipo c/e1.

20 El procedimiento de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo básicamente de dos maneras distintas. Cuando las dos partes del antígeno central escindido se expresan solamente como una cadena polipeptídica, se incluye de acuerdo con la invención una secuencia de reconocimiento para una proteasa en la posición prevista. De este modo, el polipéptido se puede escindir después de la expresión en dos partes definidas mediante la proteasa. En esta forma de realización también es posible co-expresar la proteasa que corta en el sitio de escisión previsto. La secuencia génica que codifica esto se puede encontrar en el mismo vector o en un vector independiente.

25 En otra forma de realización preferente, sin embargo, se expresan los dos polipéptidos que se han mencionado anteriormente con un vector especial. Se usa preferentemente un denominado vector bicistrónico. Esto significa que una de las partes de la vacuna de centro escindido se expresa como cadena polipeptídica y que se encuentra un codón de terminación en el extremo C. Sin embargo, justo después se pueden colocar de nuevo los ribosomas y expresar el segundo polipéptido. De este modo se garantiza que las dos partes de la vacuna de centro escindido se formen aproximadamente en la misma cantidad y no se tienen que adoptar medidas de precaución para que el organismo huésped no pierda uno de los vectores, lo que conduciría a que ya solamente se proporcionaría una parte de la vacuna de centro escindido.

30 La expresión "proteína de fusión" o "fusionado" significa que dos proteínas o polipéptidos diferentes están unidos entre sí mediante un enlace peptídico. Tales proteínas de fusión se generan mediante la expresión de las secuencias de ácido nucleico sucesivas que codifican las mismas.

35 En el marco de la invención se observó que la asociación bilateral de la proteína extraña insertada por el extremo N y C representa el problema principal en cuanto a la química de proteínas para una aplicabilidad más amplia del sistema de vehículo de CLP de VHB (específicamente como vehículo de vacuna, generalmente para la presentación de moléculas extrañas). Si se puede deshacer uno de los dos enlaces covalentes (en el lado N- o C-terminal del inserto) y a pesar de esto se produce una formación de partículas, ya que las partes de proteína de centro separadas ("centro escindido") se encuentran y se pliegan correctamente, aumenta de forma drástica la cantidad y el tipo de las proteínas extrañas que se pueden insertar. Esto es un aspecto esencial de la presente invención.

40 La Figura 2 muestra esquemáticamente que la inserción de una proteína extraña con una estructura 3D inadecuada (por ejemplo, OspA) puede impedir la formación de la estructura con competencia de formación de partículas del vehículo de proteína de centro (vía superior); como alternativa, la configuración de la estructura 3D correcta del vehículo de proteína de centro puede impedir la formación de la estructura 3D nativa de la proteína extraña (vía inferior). Esto influiría de forma inadecuada en la unión de los anticuerpos deseados. Esta problemática estérica se elimina cuando una de las dos asociaciones covalentes entre el inserto de proteína extraña y el vehículo (en el lado del inserto C-terminal o N-terminal) se disuelve (flecha). Una posibilidad de la realización es la escisión posterior de una proteína de fusión continua; esto requiere la inclusión adicional de un sitio de escisión para una proteasa específica. Por tanto, se expresan preferentemente los dos fragmentos de antemano como entidades independientes.

Mediante la solución de acuerdo con la invención se producen otras consecuencias adicionales:

55 (i) ya que el epítipo c/e1 se encuentra sobre la superficie de la partícula, se producen sobre esta misma superficie nuevos extremos N y C que se pueden continuar derivatizando. Por ejemplo, al fragmento de centroN se puede fusionar una molécula extraña X y al fragmento centroC, una molécula extraña Y. Una aplicación posible es la presentación de moléculas extrañas heterodiméricas. En este caso, sin embargo, se

tiene que tener en cuenta que no debe aparecer ningún impedimento estérico de las dos partes fusionadas.

(ii) subregiones específicas de una secuencia extraña insertada, por ejemplo, un epítipo particularmente importante, se pueden orientar dependiendo de la asociación mediante el extremo N o C hacia la superficie de la partícula o alejándose de la misma. Un ejemplo es el denominado epítipo LA2 de OspA de *B. burgdorferi*, que se encuentra, según lo comprobado, en la zona C-terminal. Los anticuerpos que reconocen este epítipo son neutralizantes.

Esto también es importante para la inserción de secuencias extrañas, que a su vez ofrecen otras superficies de interacción (para la adhesión de terceras moléculas; véase los ejemplos). Ya que está asociada solamente en un lado, a la secuencia extraña con capacidad de interacción no se le impone ninguna estructura 3D artificial; en lugar de esto, dependiendo del tipo, es flexible o puede adoptar sin problemas su estructura 3D correcta. De este modo se simplifican considerablemente las interacciones con el compañero de interacción.

Son objeto de la presente invención también fármacos, particularmente vacunas, que contienen partículas de tipo cápside, que se basan en el sistema de centro escindido.

Los fármacos de acuerdo con la invención contienen las partículas de tipo cápside de acuerdo con la invención, presentando los fármacos preferentemente una influencia positiva sobre el sistema inmune. Habitualmente se ofrece mediante el sistema de vehículo de centro escindido de acuerdo con la invención al sistema inmune una secuencia de aminoácidos extraños frente a la que el sistema inmune produce anticuerpos, preferentemente anticuerpos neutralizantes. Estos anticuerpos colaboran entonces de forma adecuada combatiendo el microorganismo o el virus que ha invadido el cuerpo o ayudan a la destrucción específica de células tumorales indeseadas.

En una forma de realización adicional se puede usar el sistema de vehículo de centro escindido de acuerdo con la invención como medio de diagnóstico y/o analítico. En los Ejemplos 12 y 13 están explicadas con más detalle tales aplicaciones. Con tales medios pueden hacerse accesibles, por ejemplo, partículas de unión a anticuerpos, autofluorescentes, que a su vez se unen a antígeno y hacen visible al mismo mediante fluorescencia. En una forma de realización adicional, los sistemas de vehículo de centro escindido de acuerdo con la invención pueden contener secuencias peptídicas que se unen específicamente a determinados iones metálicos/lantánidos. Cuando se incorporan tales péptidos en el sistema de centro escindido, se proporcionan partículas que por partícula individual contienen muchos de tales átomos/iones indicadores y se pueden comprobar mejor.

Ejemplo 1

Proteína de centro de tipo silvestre con secuencia de reconocimiento de proteasa de TEV insertada

En el epítipo c/e1 de la proteína de centro de tipo silvestre 1-149 se introdujo una secuencia de reconocimiento para la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV) (sustitución de los aa P79+A80 por GGGGT-ENLYFQGT-GGGG; restos de G como engarce para garantizar la accesibilidad de la secuencia de reconocimiento para la proteasa). La proteína expresada de modo recombinante formó partículas. Estas se incubaron con proteasa de TEV, se comprobó el éxito de la reacción de escisión mediante SDS-PAGE. El producto de digestión con proteasa se sedimentó a continuación mediante un gradiente de sacarosa. Se produjo la escisión prácticamente completa en la posición esperada, ya que se produjeron 2 fragmentos prácticamente igual de grandes. A pesar de la escisión, la proteína sedimentó en el gradiente aproximadamente en la misma posición que la proteína de centro de tipo silvestre no escindida 1-149. Se obtuvieron resultados comparables con una proteína de fusión basada en la proteína de centro de longitud completa 1-183.

Ejemplo 2

Variantes de proteína de centro con secuencias extrañas insertadas de mayor tamaño

Como un ejemplo de una proteína de fusión con inserción moderadamente grande se insertó en el epítipo c/e1 la secuencia para un péptido artificial "ACID" (flanqueado por engarces ricos en Gly; en total 65 aa), que puede interactuar con un péptido complementario "BASE" [O'Shea y col., Curr. Biol. (1993), 658-667]; después de esto, la secuencia de reconocimiento de proteasa de TEV GGGGSGGGVEDGGGGSGGGGT-AQLEKELQALE-KENAQLEWELQALEKELAQTG-ENLYFQGTGGGG.

La proteína de fusión formó CLP. Estas se aislaron y se incubaron al igual que antes con proteasa de TEV. También en este caso se produjo una escisión específica, sin embargo, las partículas quedaron intactas. En este caso, los fragmentos de escisión de TEV son de diferente tamaño y, por tanto, se pueden diferenciar directamente en el gel de SDS. A pesar de la escisión, los fragmentos co-sedimentaron en las fracciones de gradiente específicas de CLP.

Este ejemplo muestra que también se pueden escindir específicamente las CLP de la proteína de centro con un péptido de 65 aa insertado (engarce + ACID + sitio de escisión de TEV), a pesar de esto permanece la estructura particulada.

Ejemplo 3

Como un ejemplo adicional se muestra un ensayo correspondiente con una proteína de centro, que contiene la secuencia de aa 18-273 de la proteína OspA de *Borrelia burgdorferi*. La proteína correspondiente sin sitio de escisión de TEV está descrita en Nassal y col., 2005; solamente una fracción de la misma formó partículas regulares, lo que ya se había mostrado en una amplia distribución en el gradiente de sacarosa. Por tanto, la vacuna no cortada se puede usar como tal solamente de forma condicionada. Ya que además fueron necesarias secuencias de engarce adicionales muy largas con un potencial antigénico propio indeseado para obtener al menos una pequeña proporción de la preparación en forma de CLP, esta vacuna no cortada no se podría aplicar en el ser humano/médicamente.

Después de la introducción de un sitio de escisión de TEV se trató la proteína de fusión al igual que en el Ejemplo 2 con proteasa de TEV, después se sedimentó en el gradiente de sacarosa. También en este caso se produjo una escisión específica, sin embargo, no completamente (probablemente debido a impedimento estérico debido a OspA, una peor accesibilidad del punto de corte de TEV); la asignación de los fragmentos mediante anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente la parte de centro N-terminal o C-terminal; el anticuerpo a-centroN reacciona por consiguiente con la proteína de fusión no escindida al igual que con el fragmento de escisión N-terminal. A pesar de esto, el material parcialmente escindido mostró un comportamiento de avance típico de partículas. Estos datos indicaron que mediante la apertura de uno de los dos compuestos entre la proteína extraña insertada y el vehículo de centro se pudo mejorar claramente la formación de partículas.

El ejemplo demuestra que se puede escindir específicamente incluso una proteína de fusión de centro con una *gran* inserción de proteína extraña (255 aa OspA + engarce + sitio de escisión de TEV) (aunque de forma menos eficaz). Mientras que la proteína de fusión de centroOspA continua que se ha descrito anteriormente se distribuye ampliamente a lo largo del gradiente (Nassal y col., 2005), la proteína de fusión escindida (parcialmente) se acumula de forma distinta en fracciones de gradiente típicas de partículas. Esto es un indicio de eficacia de formación de partículas mejorada mediante la escisión.

En un ensayo adicional se pudo mostrar que la proteasa de TEV co-expresada (por un plásmido compatible) conduce a la escisión de proteínas de fusión de centro que llevan sitios de escisión de TEV, es posible de forma parcialmente más eficaz que mediante la escisión *in vitro* posterior. También para las proteínas de fusión ya escindidas en las bacterias pudo comprobarse formación de partículas mediante sedimentación en gradiente de sacarosa.

Los Ejemplos 1 a 3 mostraron que las CLP *preformadas* permanecen intactas después de la escisión en la zona del epítipo c/e1. Esto se puede explicar estructuralmente porque el bucle de unión entre las hélices formadoras de picos no tiene por sí mismo ningún papel formador de estructura, sin embargo, no era de esperar. Esto condujo a la forma de realización más preferente, en la que, en lugar de la escisión posterior de la cadena proteica continua, las partes de centroN y centroC se expresan directamente como fragmentos proteicos independientes, encontrándose al parecer de forma espontánea y formando partículas. Un enfoque de este tipo tiene al menos tres ventajas esenciales:

- (i) simplificación: la etapa de escisión adicional con proteasa de TEV (u otra) ya no es necesaria
- (ii) no es necesaria ninguna secuencia peptídica adicional en la proteína de fusión para el reconocimiento específico de proteasa
- (iii) una formación de partículas –aunque solo parcial– con proteína extraña estéricamente inadecuada tal como OspA requería secuencias de engarce muy largas; estas se pueden omitir si se evitasen impedimentos estéricos mediante la asociación ya no necesaria a ambos lados con la proteína de vehículo de centro.

Los puntos (ii) y (iii) son particularmente significativos para aplicaciones de vacuna, ya que cualquier secuencia adicional puede conducir a consecuencias inmunológicas imprevisibles (nuevos epítipos debido a las secuencias adicionales, posiblemente reacciones cruzadas con epítipos propios)

Ejemplo 4**Construcciones de expresión para la expresión prácticamente equimolar de fragmentos de centroN y centroC**

En la cadena peptídica continua, los productos de escisión posteriores están presentes de forma forzosa en cantidades equimolares. Con la expresión independiente, por tanto, las dos partes deben producirse para un agrupamiento eficaz asimismo en cantidades aproximadamente equimolares. En los primeros ensayos se usaron dos plásmidos compatibles independientes para la expresión de las dos partes de proteína transportadora, sin embargo, con un éxito moderado.

En una forma de realización preferente se usan vectores bicistrónicos que, además, ofrecen la ventaja de que se puede omitir la selección con un antibiótico adicional (para la obtención del segundo plásmido de lo contrario necesario).

Las **construcciones de tipo 1** contienen detrás de un promotor común (en el presente documento, promotor de ARN polimerasa de fago T7) dos casetes de expresión con respectivamente un sitio de unión a ribosomas (ribosome binding site, RBS; "secuencia de Shine-Dalgarno") preconectada. En los vectores realizados en el presente documento se finaliza la traducción del fragmento de centroN mediante un codón de terminación artificial después del aa prolina 79 (P79), se posibilita el inicio de la traducción del 2º fragmento mediante un codón de inicio artificial delante del aa serina81 (S81). Una estructura de operón de este tipo se puede encontrar con frecuencia en bacterias ("ARNm policistrónicos"; los ribosomas pueden unirse de forma relativamente independiente a cualquier RBS del ARNm e iniciar la traducción del gen situado en 3'). En las construcciones realizadas, el segundo RBS es una copia exacta del primer RBS que procede del vector pET original; con seguridad son posibles asimismo otras secuencias de RBS. El codón de inicio ATG del 2º cistrón es parte de un sitio de escisión con Nde (CATATG) para la introducción mediante clonación sencilla de secuencias extrañas.

Las **construcciones de tipo 2** ("terminación/inicio") no contienen ningún segundo RBS independiente; en lugar de esto se solapa con el codón de terminación de gen *cadena arriba* (NNN TGA) un codón de inicio para el gen *cadena abajo* (NNA TGA) en una fase de lectura desplazada en 1. En este caso, los ribosomas después de la lectura del primer gen pueden re-iniciar directamente en el ATG el segundo gen; una disposición de este tipo permite la co-expresión de dos genes; se encuentran disposiciones similares de terminación-inicio en algunos bacteriófagos. Está realizada también en algunos retrotransposones no-LTR eucariotas (unión ORF1/ORF2). Mediante las secuencias conocidas, por ejemplo, en el operón Trp de *E. coli* deben ser adecuadas de forma similar otras combinaciones de codones de terminación/inicio muy adyacentes o solapantes (por ejemplo, TAA TG, TGA TG, etc.).

En la Figura 3 están representados esquemáticamente vectores de expresión preferentes.

Arriba: construcciones de tipo 1. Un promotor, por ejemplo, para ARN polimerasa de T7, conduce a la transcripción de un ARNm bicistrónico (para la terminación eficaz puede estar incluida en el lado 3' una secuencia de terminación). El primer cistrón codifica la secuencia de aa de proteína de centro de VHB 1-79. Un sitio de unión a ribosomas (RBS1) preconectado posibilita el inicio de la traducción (subunidad pequeña y grande de ribosomas representadas como óvalos). En el extremo 3' del codón para P79 sigue un codón de terminación. En el extremo 5' del segundo cistrón se encuentra un RBS (RBS2) adicional para el inicio de la traducción del fragmento de centroC. Este dispone para esto de un codón de inicio (ATG) propio. En el ejemplo mostrado, la secuencia de centroC comienza con Ala80; puede extenderse hasta la posición de aa 140, mejor 149 o hasta el extremo real en la posición 183. La secuencia de aa a partir de la posición 140, mejor 149, puede sustituirse también por secuencias extrañas.

Abajo: construcciones de tipo 2. Estas contienen solamente un RBS delante del primer cistrón. La traducción del fragmento de centroC se realiza mediante re-inicio, solapándose el codón de inicio artificial de centroC (ATG) con el codón de terminación de centroN (TGA) tal como se muestra. En el ejemplo, la secuencia de centroC comienza con Ser81.

Los aa 77, 78 y 79 de la proteína de centro son glutamato (E; codones: GAA, GAG), aspartato (D; codones: GAC o GAT), aa 79 prolina (P; codones: CCN). En las construcciones de tipo 1 realizadas se seleccionó para la secuencia de aa EDP la secuencia de nucleótidos GAG GAT CCN, por lo que se produce un sitio de escisión para BamHI (GGATCC); mediante esta escisión con BamHI singular es posible una introducción mediante clonación simple de diferentes fragmentos de ADN que codifican centroN y centroC. El nucleótido N en el codón CCN de prolina no está fijado; el codón de terminación puede ser TAA, TAG o TGA.

En las construcciones de tipo 2, la secuencia hasta el final del primer gen es G GAT CCa TGA. También en este caso está presente un sitio de escisión con BamHI (subrayado) para la introducción mediante clonación de diferentes fragmentos de ADN que codifican centroN o centroC. Para P79 tiene que estar en las construcciones de tipo 2 realizadas el codón CCa, el codón de terminación tiene que ser TGA (> CCa TGA), para permitir la generación de un codón de inicio ATG solapante para el segundo gen. El codón para el primer aa del segundo gen después del codón de inicio ATG tiene que comenzar con A. Serían secuencias de nucleótidos de terminación/inicio alternativas TGA TG o TAA TG tal como en el operón Trp de *E. coli* entre TrpE y TrpD o incluso TrpB y TrpA [Das y Yanofsky (1989), Nucl. Acids Res., págs. 9333-9340; Oppenheim y Yanofsky (1980), Genetics, págs. 785-795].

En los vectores realizados (pET28a2-xxx), el armazón básico se basa en el vector comercial pET-28, en el que, sin embargo, el gen de resistencia a kanamicina se sustituyó por el de la resistencia a ampicilina. Sin embargo, con seguridad se pueden aplicar asimismo otros armazones básicos de vector (diferentes oris de replicación, diferentes genes de resistencia, diferentes promotores, diferentes RBS). Es esencial la disposición bicistrónica de los genes para centroN y centroC, mediante 2 RBS independientes o mediante disposición de terminación/inicio. En algunos ensayos se pudieron expresar varias proteínas de centro escindido por construcciones de tipo 1 así como del tipo 2. Para construcciones de tipo 2 (terminación/inicio), sin embargo, esto era el caso en una menor cantidad de construcciones. Además, la posible variabilidad de secuencia en construcciones de tipo 2 es menor (véase anteriormente). Por tanto, las construcciones de tipo 1 se pueden aplicar de forma más amplia.

Como aa C-terminal de la parte de centroN se seleccionó P79, ya que la prolina es particularmente resistente a proteasa y, por tanto, se minimiza una degradación del fragmento. Debido a la estructura 3D conocida así como variantes de delección descritas en esta región central, sin embargo, se puede suponer que

- (i) el extremo del fragmento de centroN se podría encontrar en la zona de los aa aproximadamente a partir de la posición 72-74, particularmente Gly73
 (ii) el comienzo del fragmento de centroC, en la zona de los aa aproximadamente a partir de la posición 78-86, posiblemente hasta Gly94, sin que se obtuviesen esencialmente otros resultados que con los límites seleccionados en el presente documento (fin de centroN en P79, inicio de centroC en S81, con inicio de ATG preconectado).

Para la expresión en células eucariotas no se pueden aplicar de este modo las construcciones que se han descrito debido al diferente mecanismo de transcripción y traducción; en lugar del promotor procarionta tiene que usarse un promotor eucariota (por ejemplo, IE de CMV y muchos otros), así como una señal de poliadenilación (por ejemplo, del virus SV40 o muchos otros), y se tiene que introducir después del fin de la fase o las fases de lectura abierta.

Una expresión aproximadamente igual de centroN y centroC en eucariotas se puede conseguir mediante:

- (i) co-transfección de dos plásmidos (respectivamente uno para centroN, uno para centroC);
 (ii) transfección de un plásmido con 2 casetes de expresión independientes;
 (iii) transfección de un plásmido con ARNm bicistrónico de forma funcional; por ejemplo, el segundo gen se podría expresar mediante un "sitio de entrada en ribosomas interno" (IRES) preconectado;
 (iv) posiblemente también una disposición de terminación/inicio de tipo vector de tipo 2 es funcional en eucariotas.

Ejemplo 5

La expresión independiente de fragmentos de centroN y centroC de tipo silvestre conduce a la formación de CLP intactas

Mediante vectores de expresión basados en el tipo 1 (Figura 3) se expresó una proteína de centro de tipo silvestre en dos partes en células *E. coli* BL21, una vez basándose en los aa 1-149, una vez en los aa 1-183. Ambos fragmentos esperados se formaron y se agruparon hasta dar CLP intactas. Esto se comprobó con gradiente de sacarosa y electroforesis en gel de agarosa nativo. Como una demostración directa de la formación de CLP se llevó a cabo una comparación con microscopio electrónico (tinción negativa) de partículas de la cadena de aa 1-183 continua con marcador His6 C-terminal frente a partículas del sistema de centro escindido correspondiente. A esta resolución no se pudieron detectar diferencias.

Las CLP de VHB de tipo silvestre son muy robustas y resistentes frente a urea en concentraciones molares; las CLP de la proteína de centro 1-149 truncada en el extremo C se pueden disociar mediante urea 3-5 M en dímeros y volver a reasociar hasta dar CLP *in vitro* mediante modificación de las condiciones de tampón (retirada de la urea, pH neutro, concentración salina aumentada). Un ensayo comparable para la estabilidad de las CLP a partir de centro escindido mostró una estabilidad similarmente alta de las CLP de centro escindido. Esto muestra la alta afinidad de las partes de centroN y centroC entre sí y es importante para el uso como sistema de vehículo para moléculas extrañas.

Ejemplo 6

La expresión independiente de fragmentos de centroN fusionados con proteína extraña y de centroC de tipo silvestre así como viceversa conduce a la formación de CLP intactas

Para la comprobación de la adecuación básica del sistema de centro escindido para la formación de CLP y presentación de proteínas extrañas se fusionó como modelo GFP a centroN o a centroC; para la construcción de centroN se usó un vector de tipo 1 (segundo RBS) o de tipo 2 (terminación/inicio). Todas las construcciones condujeron a la expresión de proteínas verde fluorescente que, según la sedimentación en gradiente de sacarosa, formaron partículas.

Para la comprobación adicional de la asociación física de los respectivos fragmentos de centroN y centroC se sometieron alícuotas de las fracciones de gradiente a la electroforesis en geles de agarosa nativos. A este respecto se mantuvieron las partículas, al igual que el cromóforo GFP. En las fracciones se encontró tanto en GFP en centroN como en GFP en centroC una banda verde fluorescente distinta; la proteína de fusión de GFP no ensamblada permaneció en las fracciones de gradiente superiores y mostró un comportamiento de avance diferente así como una distribución más difusa (difusión más rápida en el gel debido a la estructura considerablemente menor en comparación con partículas de las subunidades 180 o 240). Tanto para GFP en centroN como en centroC se pudo comprobar con el anticuerpo α -centroC en la banda verde fluorescente (es decir, que contiene GFP) también centroC.

Este ejemplo muestra dos cosas, concretamente

- (i) en el sistema de centro escindido puede fusionarse una proteína extraña de aproximadamente 240 aa, en el presente documento GFP, tanto a centroN como a centroC sin alterar la formación de CLP.

(ii) tanto los vectores de centro escindido de tipo 1 como de tipo 2 son adecuados para la co-expresión de centroN y centroC con secuencia extraña fusionada.

Ejemplo 7

5 **Presentación de CLP de proteínas extrañas médicamente relevantes en el sistema de centro escindido que de forma convencional no es posible o solamente de forma muy limitada**

OspA de *Borrelia burgdorferi*

10 Como se ha expuesto al principio, la asociación bilateral necesaria en el sistema anterior de la proteína extraña insertada con la proteína transportadora conduce a intensas limitaciones topológicas. Mientras que GFP tiene una "forma de ajuste" natural, esto no se aplica a OspA. Como caso precedente de una proteína extraña estructurada de forma inadecuada se usó por tanto OspA en el sistema de centro escindido y se fusionó a centroN o centroC. A diferencia de la construcción continua anterior [descrita en Nassal y col., 2005] con una amplia distribución en el gradiente se acumularon las dos proteínas de fusión de forma distinta en las fracciones típicas de partículas. Un análisis con microscopía electrónica mostró una eficacia de formación de CLP drásticamente mejorada en comparación con la construcción antigua continua, tanto en la fusión de OspA a centroN como a centroC.

15 Este ejemplo demuestra que

- (i) el sistema de centro escindido permite la presentación de CLP de proteínas extrañas, cuya estructura interfiere en el sistema de centro continuo convencional con la formación de CLP,
- (ii) en el sistema de centro escindido es posible la formación de CLP eficaz mediante fusión de la proteína extraña tanto a centroN como a centroC.

20 De forma análoga se pudo presentar también OspC de *Borrelia burgdorferi* en el sistema de centro escindido de acuerdo con la invención.

Ejemplo 8

Proteína circumsporozoito del patógeno de la malaria *Plasmodium falciparum*

25 Una proteína patógena de alta relevancia adicional desde puntos de vista de la vacuna es la proteína circumsporozoito (CSP) del patógeno de la malaria *Plasmodium falciparum*. La CSP (forma usada en el presente documento: 319 aa de longitud total) contiene una secuencia de repetición de aproximadamente 110 aa de longitud de los motivos tetrapeptídicos NANP/NVDP. La estructura de CSP no es conocida; el dominio de aproximadamente 50 aa C-terminal con 4 restos de Cys tiene probablemente (debido a homología de secuencia) un plegamiento similar a las repeticiones de trombospondina de tipo 1. La secuencia de repetición es inmunógena, sin embargo, posiblemente también las otras regiones de CSP contienen importantes epítomos. En el sistema de centro continuo convencional no se pudo preparar la CSP de longitud completa en forma de CLP. Por el contrario, esto fue muy posible con el sistema de centro escindido. Actualmente existen datos claros para la fusión de CSP a centroN; con la co-expresión con centroC (construcción tanto de 149 como de 183) se forman de forma eficaz estructuras particuladas.

35 Se preparó una serie de construcciones (basadas tanto en centro 1-149 como en 1-183) que contenían solamente la secuencia de repetición o CSP truncada sin dominio rico en Cys respectivamente en el sistema de centro continuo o escindido; para esto CSP completa fusionada a centroN. Las preparaciones de CLP se usaron en un estudio de inmunogenicidad comparativo en ratones que, sin embargo, todavía no se ha podido concluir. Los datos hasta la fecha muestran que la vacuna preparada en el sistema de centro escindido presenta propiedades superiores. Esto se debe a que la CSP completa presenta exclusivamente durante la aplicación del sistema de vehículo de acuerdo con la invención la capacidad de formación de CLP. Por el contrario, en otros sistemas no se produce CLP. Por tanto, las vacunas de CSP preparadas con ayuda del sistema de vehículo de acuerdo con la invención deben presentar una inmunogenicidad superior e inducir particularmente anticuerpos neutralizantes.

Ejemplo 9

45 **Las CLP de centro escindido como vehículo para proteínas extrañas refuerzan la respuesta de linfocitos B frente a la proteína extraña**

50 En un estudio de inmunogenicidad en ratones se ensayan para la comparación 5 construcciones de centro-OspA del sistema de centro escindido con OspA lipídada (LipOspA) no fusionada a centro; esto es la base de la vacuna comercial Lymerix, por tanto, el "procedimiento de referencia" actual para una vacuna contra la enfermedad de Lyme. La fracción lipídica en LipOspA (tris-palmitoil-cisteína-(pam3-Cys)) es esencial para su inmunogenicidad relativamente alta, la OspA no lipídada solamente es débilmente inmunógena (compárese con Nassal y col, 2005). Tres de las construcciones de centro-OspA contienen OspA de longitud completa (aa 18-273), dos otras, OspA acortada (comenzando en el aa 185 hasta el aa 273).

Para esto se inmunizaron 6 grupos de 5 ratones BALB/c cada uno con 10 µg de antígeno cada uno 4 veces (día 0, 14, 29, 49):

- Grupo 1: LipOspA
- Grupo 2: OspA de longitud completa (aa 18-273) en centroN, centroC de aa de centro 81 a 183
- 5 Grupo 3: OspA de longitud completa (aa 18-273) en centroN, centroC de aa de centro 81 a 149
- Grupo 4: OspA acortada (aa 185-273) en centroN, centroC de aa de centro 81 a 183
- Grupo 5: OspA acortada (aa 185-273) en centroN, centroC de aa de centro 81 a 149
- Grupo 6: OspA de longitud completa (aa 18-273) en centroC hasta aa de centro 183, centroN de aa 1-79

10 Para la determinación de los anticuerpos inducidos se extrajo sangre el día -1 (= 1 día antes de la primera inmunización; = suero preinmune) así como en los días 8, 26, 36 y 57. Mediante ELISA se determinaron: la cinética de la formación de anticuerpos específicos para OspA; la respectiva parte de anticuerpos equivalentes de LA2, siendo LA2 un anticuerpo monoclonal, neutralizante de forma conocida, que reconoce un epítipo conformacional complejo de secuencias de aa discontinuas *cadena abajo* del aa 185 de OspA.

Los resultados de este ensayo están representados de forma detallada en la Figura 4.

15 La Figura 4A muestra la cinética de la inducción de anticuerpos totales anti-OspA (en µg de anticuerpos específicos por ml de suero). Incluso después de la segunda inmunización, los sueros de ratones inmunizados con las construcciones de centro escindido de OspA de longitud completa contienen títulos anti-OspA comprobables y comparables a los producidos con LipOspA. Después de la 3ª y 4ª inmunización, los títulos anti-OspA en los ratones
20 inmunizados con OspA de longitud completa de centro escindido superan claramente los de los ratones inmunizados con LipOspA; los títulos después de la inmunización con OspA18-273 en centroC (Grupo 6) son particularmente altos. La OspA185-273 acortada produce en el contexto de centro149 (Grupo 5) y centro183 (Grupo 4) solo una respuesta específica de OspA considerablemente menor.

25 La Figura 4B compara directamente los títulos de anticuerpos anti-OspA totales con los que están dirigidos contra el epítipo LA2 neutralizante de forma conocida en la zona C-terminal de OspA. Las OspA de longitud completa en centroN, tanto el en contexto de centro149 como de centro183 (Grupo 2 o 3), inducen mayores títulos de anticuerpos anti-equivalentes de LA2 que LipOspA, la OspA de longitud completa en centroC, claramente menores. Se continua realizando un ensayo con respecto al respectivo contenido de anticuerpo *neutralizante* (protección contra exposición al patógeno *B. burgdorferi*).

30 El ejemplo muestra que las CLP de centro escindido inducen anticuerpos específicos contra la proteína extraña OspA de longitud completa presentada, siendo los títulos superiores que con la LipOspA lipídica establecida, en la que la fracción lipídica es esencial para la inmunogenicidad. La diferente proporción de anticuerpos equivalentes de LA2 después de la inmunización con OspA en centroN (aproximadamente el 30 %) frente a OspA en centroC (< 5 %) muestra que el tipo de la asociación influye en el tipo de los anticuerpos que se producen; véase para esto el Ejemplo 10.

35 Ejemplo 10

Inducción selectiva de anticuerpos específicos de región frente a una proteína extraña mediante fusión alternativa en centroN o centroC

40 En las proteínas cuyos extremos N y C no son directamente adyacentes, tal como en GFP, la fusión en centroN conduce a una orientación diferente con respecto a la superficie de la partícula que la fusión en centroC (centroN: extremo C de la proteína extraña "fuera"; centroC: extremo N de la proteína extraña "fuera"). Es de esperar que con el uso como vacuna de linfocitos B las partes proteicas que se más sobresalgan respectivamente al disolvente produzcan la mayor respuesta de anticuerpos. De este modo se pueden inducir diferentes anticuerpos específicos de región, fusionándose la proteína extraña a centroN (lado C-terminal de la proteína extraña "fuera") o a centroC (lado N-terminal de la proteína extraña "fuera").

45 La Figura 5 muestra esquemáticamente cómo se puede determinar en una proteína extraña con estructura extendida, tal como, en el presente documento, OspA, mediante la fusión a centroN o centroC, qué parte de la molécula se aleja más de la superficie de CLP. Un epítipo bien cartografiado en OspA es LA2 en la zona C-terminal, que se reconoce por un anticuerpo monoclonal neutralizante, LA2. Tal como se esperaba, las CLP de OspA en centro escindido inducen con OspA en centroN (por tanto, expuesto el extremo C de OspA) una mayor respuesta
50 equivalente a LA2, las CLP con OspA en centroC, solamente una débil respuesta equivalente a LA2. Por el contrario está reforzada la respuesta contra otras zonas de OspA.

55 Para OspA como proteína extraña era de esperar que una fusión en centroN hiciese bien accesible el epítipo LA2 en la zona de OspA C-terminal, por el contrario, una fusión en centroC, la región de OspA N-terminal hasta ahora no bien caracterizada inmunológicamente. Los datos que se han mostrado anteriormente confirman expresamente este concepto (con OspA en centroC, títulos anti-OspA total muy elevados, sin embargo, títulos de anticuerpos equivalentes de LA2 solamente bajos).

Por tanto, el sistema de centro escindido posee una alta actividad de refuerzo inmune tanto con la fusión de la proteína extraña a centroN como a centroC.

5 Mediante la selección del lugar de asociación (centroN frente a centroC) se puede controlar el tipo/especificidad de región de los anticuerpos inducidos. Para resultados de vacunación óptimos se pueden usar mezclas de vacunas de centro escindido, en las que la secuencia de aminoácidos extraños heteróloga está fusionada una vez a centroN y una vez a centroC, de tal manera que se presentan de forma óptima distintos epítopos.

Ejemplo 11

Fusiones con importancia más allá de las aplicaciones de vacuna

10 Además de la importancia directa como vehículo particulado de refuerzo inmune para vacunas de antígenos de péptido y en el presente documento particularmente de proteína se pueden concebir múltiples aplicaciones adicionales para una plataforma de vehículo de este tipo. Se lleva siempre una gran cantidad (180 o 240) de moléculas presentadas a una vecindad simétrica próxima: si se trata de moléculas extrañas con capacidad de interacción (las vacunas representan un caso especial: interacción con anticuerpos), entonces la partícula con muchas copias de la molécula extraña tiene una avidéz espectacularmente aumentada en comparación con la molécula extraña monomérica (compárese con pentámeros de IgM naturales; también tetrámeros de CMH en el inmunodiagnóstico). Para que tales moléculas extrañas con capacidad de interacción puedan reaccionar con sus compañeros de interacción tienen que ser accesibles sobre la superficie de CLP. Esto está considerablemente simplificado en el sistema de centro escindido frente al sistema continuo convencional.

20 Se expresó una serie de secuencias extrañas modelo en el sistema de centro escindido, todas las inserciones ensayadas formaron CLP. Para algunas se comprobó directamente la capacidad de interacción.

25 La disposición escindida hace accesibles sobre la superficie de las CLP nuevos extremos para una derivatización adicional. La Figura 5 muestra un dímero de centro escindido con péptido ACID fusionado a centroN, que puede interactuar con el péptido BASE complementario. Si se fusionó el péptido BASE a una molécula X, X se une a las CLP de ACID. Mediante la disposición escindida, ACID es flexible; ACID insertado en el sistema de centro continuo interacciona con el péptido BASE, ya que, sin embargo, se configura una doble hélice rígida superenrollada entre el péptido ACID y BASE [O'Shea y col., 1993], la estructura del vehículo de centro se inestabiliza, las CLP se descomponen. En la disposición escindida, por el contrario, las CLP deben mantenerse estables. Este acoplamiento se puede generalizar: en lugar del péptido ACID puede estar fusionada otra molécula con capacidad de interacción A a centroN o a centroC. Entonces pueden interactuar las CLP correspondientes con B, un compañero de interacción específico de A. Tales parejas de compañeros de interacción son His6-Ni-NTA, péptido aceptor de biotina - estreptavidina; Z33 - inmunoglobulina.

A continuación se explican con más detalle otras posibilidades de acoplamiento:

a) marcador His6:

35 Fusionado a centroN mediante engarce Gly2; forma partículas que se unen a Ni²⁺NTA agarosa. El marcador His a diferencia del sistema continuo está libremente accesible. El inserto comparable (His7) en c/e1 del sistema de centro continuo no produjo cantidades significativas de proteína, debido a que en ese lugar el resto de marcador His6 estéricamente no está accesible.

b) péptido aceptor de biotina (BA):

40 el aceptor de biotina (BA23) es un péptido artificial de 13 aa de longitud (GLNDIFEAQKIEWH), que se biotinila mediante la ligasa de biotina BirA de *E. coli*. La biotinilación eficaz requiere una libre accesibilidad; esta se da en el sistema de centro escindido, en el sistema de centro continuo no o solamente de forma limitada. La proteína de fusión de centro escindido-BA forma CLP y se biotinila en *E. coli*. A la biotina presentada en CLP puede unirse avidina/estreptavidina o sus conjugados.

c) dominio Z 33 de la proteína A

45 La proteína A de *S. aureus* se une a inmunoglobulinas con una alta afinidad ("Protein-A-Sepharose" para inmunoprecipitación). La proteína A está compuesta de 5 dominios de unión a Ig estructuralmente similares. Z33 es el único de tales dominios con una secuencia de aa modificada; longitud total 33 aa). Z33 tiene todavía una alta afinidad por Ig (Kd 40 nM). La unión a diferentes Ig presupone una flexibilidad estructural, además accesibilidad. La secuencia de Z33 se fusionó mediante una larga secuencia de engarce a centroN:

50 GGGGSGGGVEDGGGGSGGGGT-FNMQQRR-FYEALHDPNLNEEQRNAKIKSIREDP.

En el sistema de centro escindido se formaron CLP. Después de la adición de una inmunoglobulina marcada con FITC y nueva sedimentación pudo comprobarse una parte de la fluorescencia en las fracciones de gradiente típicas de partículas. Esto no era el caso cuando se usaron CLP de proteína de centro de tipo silvestre en lugar de la fusión de Z33.

d) Inserto de péptido ACID

El péptido ACID insertado en el sistema de centro continuo interacciona con el péptido BASE complementario ("peptid-velcro"= velcro de péptido) mediante formación superenrollada de los péptidos; [O'Shea y col., 1993] con modificaciones masivas de la estructura del centro hasta la descomposición; la causa es que el péptido ACID adopta en solitario una estructura flexible que no ejerce ningún "esfuerzo" sobre la estructura de centro. La adición del péptido BASE conduce a la interacción con la secuencia de ACID, por lo que las dos secuencias peptídicas adoptan una conformación helicoidal rígida superenrollada. Debido a la asociación a ambos lados se produce tensión. Un péptido ACID fijado solamente en un lado debe poder interaccionar sin tensión con péptido BASE añadido o péptido BASE fusionado con otros compañeros. En cualquier caso se mantiene la estructura de partícula de la proteína de fusión de ACID en el sistema de centro continuo convencional después de la escisión del compuesto C-terminal hasta el vehículo de centro mediante proteasa de TEV.

Se pueden cargar centros escindidos con secuencia de ACID expuesta con proteínas extrañas a las que está acoplado el péptido BASE complementario. Esta es una de varias posibilidades de cargar las CLP de centro escindido posteriormente con moléculas extrañas de elección.

Mediante los mecanismos de acoplamiento que se han explicado anteriormente con más detalle es posible proporcionar CLP con una parte del acoplamiento. La proteína fusionada a la otra parte del acoplamiento puede acoplarse de forma simple a las CLP. De este modo pueden presentarse, por ejemplo, estructuras no de tipo peptídico al sistema inmune.

e) Fusión simultánea de diferentes moléculas extrañas a centroN y centroC

En los anteriores ejemplos se fusionó respectivamente *una* secuencia extraña a centroN o centroC. Básicamente se pueden fusionar también *dos diferentes* moléculas extrañas simultáneamente a centroN y centroC; esto puede ser, por ejemplo, las dos subunidades de una proteína extraña heterodimérica. Como modelo se usó una GFP escindida en dos, de la cual un segmento que contiene los primeros 10 de las 11 cadenas β de GFP se fusionó a centroN y el segundo segmento que contiene la 11ª cadena β de GFP, a centroC. La co-expresión de un vector de tipo 1 condujo a la generación de CLP verde fluorescente. De este modo se habían agrupado los dominios tanto de centroN como de centroC hasta dar una estructura de CLP con capacidad de ensamblaje y las dos partes de GFP se habían complementado hasta dar una estructura 3D correcta con configuración del cromóforo GFP.

El ejemplo muestra que es posible la fusión simultánea de diferentes secuencias extrañas a centroN y centroC con configuración de estructuras funcionales tanto del vehículo de centro escindido como de las dos diferentes secuencias extrañas fusionadas a centroN y centroC.

Ejemplo 12**CLP de centro escindido que presentan el dominio GB1 de la proteína G sobre la superficie**

Como otro ejemplo concreto se introdujo el denominado dominio GB1 de la proteína de unión a inmunoglobulina "proteína G" de *Streptococcus spp.* emparentada funcionalmente con la proteína A en el sistema de centro escindido de VHB. La proteína G está compuesta asimismo de varios dominios similares. La proteína G se une al igual que la proteína A a inmunoglobulinas, sin embargo, tiene otras especificidades u origen de especie y subtipos de las IgG. Debido a esta complementariedad entre la proteína G y la proteína A se ofrecieron ambas como reactivos comerciales para comprobaciones inmunológicas que se basan en la unión a diferentes inmunoglobulinas. Tal como la proteína A, también la proteína G y el dominio GB1 obtenido de la misma se unen a la parte constante (Fc) del anticuerpo, la parte variable del anticuerpo que reconoce el antígeno queda accesible para la unión al antígeno. De este modo pueden unirse múltiples anticuerpos diferentes.

En este ejemplo se introdujo el dominio GB1 en el sistema de centro escindido y se mostró que (i) se forman CLP y (ii) que estas CLP –sin embargo, no CLP de control sin GB1– son capaces de unirse a diferentes anticuerpos.

De forma análoga a los ejemplos que se han mencionado anteriormente se fusionó el dominio GB1 genéticamente con centroN o con centroC y se co-expresó con los fragmentos de centroC o centroN respectivamente ausentes.

La secuencia de aa específica se corresponde con los aa 229 a 284 de la proteína precursora de proteína G (Referencia de Swiss Prot: P06654); la estructura 3D es conocida (Referencia de PDB: 1 PGA; Ref: Gallagher T, Alexander P, Bryan P, Gilliland GL (1994) Two crystal structures of the B1 immunoglobulin-binding domain of streptococcal protein G and comparison with NMR Biochemistry 33: 4721-4729)

centroD78-GGGGSGGGGTQ-YKLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQY-ANDNGVDGEWTYDDATKTFTVTEdP

La asociación a centroN se realizó mediante un engarce *G4SG4TQ*; el penúltimo aa K se sustituyó por D (en minúsculas en la secuencia); el resto de E anterior es el último aa visible en la estructura de rayos X; mediante la sustitución K>D se puede introducir en el plano de nucleótidos un sitio de escisión con BamHI (GAg gat cct TAG); este se encuentra por tanto en posición homóloga con respecto a las construcciones que se han descrito

anteriormente.

Al igual que en los otros ejemplos se produjo la formación eficaz de partículas, comprobada mediante sedimentación en gradiente de sacarosa, comportamiento de avance en gel de agarosa nativo y mediante microscopía electrónica.

5 Para la comprobación de la capacidad de interacción de los dominios GB1 portados por CLP se incubaron las partículas con inmunoglobulinas, a continuación se sedimentaron de nuevo en el gradiente de sacarosa; a este respecto se produjo una co-sedimentación clara de los anticuerpos con las partículas. Adicionalmente se pudo comprobar la unión a IgG debido a que el fragmento de centroN-GB1 en transferencias de Western después de la electroforesis en gel SDS reaccionó directamente con conjugados de anticuerpos secundarios. También en el contexto de la fusión a centroN, por tanto, el GB1 modificado fue capaz de renaturalizarse de forma eficaz y de unirse a su ligando, IgG.

10 Para la comprobación de que realmente el GB1 unido a partículas se une a inmunoglobulina se incubó una alícuota de la correspondiente fracción de gradiente de sacarosa con un anticuerpo marcado con oro 5 nM, el anticuerpo no unido se separó mediante una nueva sedimentación en el gradiente de sacarosa y la fracción de partículas se analizó mediante microscopía electrónica. Las partículas de oro electrodensas mostraron la unión del anticuerpo a CLP intactas.

Ejemplo 13

CLP de centro escindido que contienen GFP y variantes de GFP autofluorescentes que presentan moléculas extrañas con capacidad de interacción

20 El Ejemplo 11 e) explica fusiones con importancia más allá de las aplicaciones de vacunas, asociándose una molécula de GFP presente en dos partes (GFP β 1-10 y GFP β 11) con configuración de la estructura de GFP nativa (fluorescencia verde) y con formación de CLP cuando GFP β 1-10 está fusionada a centroN y GFP β 11 a centroC.

25 En el presente ejemplo se fusionaron secuencias extrañas adicionales a GFP β 11, concretamente el dominio GB1 de la proteína G o los dominios preS de las proteínas de superficie del VHB humano, del VHB de pato y del VHB de garza. Esto solamente es posible debido a que mediante la disposición escindida se produce un nuevo extremo N en GFP β 11 que, además, debido a la orientación específica sobre las CLP de centro escindido está dirigido hacia el exterior desde la superficie de las CLP. La construcción de los respectivos plásmidos de expresión se realizó de forma análoga a los procedimientos que se han descrito anteriormente en vectores de centro escindido que codifican fragmentos independientes de centroN y centroC, en este caso ya asociados con GFP β 1-10 a centroN y GFP β 11 a centroC.

30 Basándose en los datos anteriores se esperaba que el extremo N del segmento GFP β 11 se dirigiese hacia el exterior desde la superficie de CLP y, por tanto, la presencia de un dominio extraño adicional básicamente no interferiría con la capacidad de las partes de centroN y centroC de formar una estructura de partículas ni con la capacidad de las partes de GFP β 1-10 y GFP β 11 de formar la estructura de GFP nativa. El resultado de este ejemplo está representado esquemáticamente en la Figura 7. En esta figura, las figuras parciales A-D muestran lo siguiente:

35 A. Estructura básica de las dos partes de la proteína de fusión. GFP β 1-10 está fusionada a centroN, GFP β 11, a centroC. Ya que GFP β 11 proporciona un nuevo extremo N, al mismo puede fusionarse un dominio adicional, en el presente documento GB1. B. Se producen CLP autofluorescentes mediante interacción de centroN con centroC (formación de CLP) y de GFP β 1-10 con GFP β 11 (formación del cromóforo GFP), tal como ya se ha mostrado anteriormente. Adicionalmente, sin embargo, estas presentan GB1 de forma accesible sobre su superficie. C. A los dominios GB1 pueden unirse diferentes anticuerpos por su parte Fc. D. Mediante sus diferentes partes variables, los anticuerpos pueden interaccionar a su vez con su antígeno específico. Las CLP de GFP-GB1 de centro escindido pueden, por tanto, sustituir el habitual anticuerpo secundario marcado con fluorescencia en la inmunofluorescencia indirecta. Una aplicación para el marcaje con fluorescencia de tubulina en dos células diferentes está mostrada en la Figura 7. De forma análoga son posibles otras aplicaciones que se basan en la unión de anticuerpo a antígeno.

40 En realidad, los fragmentos modificados adicionalmente se pudieron co-expresar de forma eficaz en *E. coli* y formaron según la sedimentación en el gradiente de sacarosa así como el comportamiento de avance en el gel de agarosa nativo CLP. Adicionalmente, estas CLP mostraron la fluorescencia típica de GFP, por tanto, también las partes de GFP se habían encontrado de forma correcta. El ejemplo muestra que también las partes de GB1 estaban plegadas correctamente y estaban accesibles sobre la superficie de CLP.

50 Para la comprobación de la capacidad de unión de las CLP presentadoras de GB1 autofluorescentes a anticuerpo unido a antígeno se permeabilizaron células HeLa (de ser humano) o LMH (de gallina), después se incubaron con un anticuerpo primario de ratón contra tubulina. En un caso, las células se incubaron de forma convencional con un anticuerpo secundario marcado químicamente con fluorescencia (Cy2) (de cabra anti-ratón) o como alternativa con las CLP de centro escindido presentadoras de GB1 autofluorescentes, después se lavaron; finalmente se observaron las células con microscopio de fluorescencia.

En ambos casos se obtuvieron imágenes de fluorescencia comparables (como se esperaba, tinción citoplasmática evitando el núcleo celular). Por tanto, los dominios GB1 tenían que haber sido capaces de unirse al anticuerpo primario anti-tubulina unido a tubulina.

5 Las CLP de centro escindido autofluorescentes que presentan GB1, por tanto, pueden usarse como alternativa a conjugados de anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia convencionales para la comprobación de un anticuerpo primario unido a antígeno.

10 Esto demuestra que los dominios GB1 son capaces al igual que antes de interactuar con IgG, por tanto, tienen que estar presentes plegados de forma correcta. Además demuestra que las CLP presentadoras de GB1 autofluorescentes pueden usarse como reactivo de detección general (comparable a un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia).

15 Se obtuvieron construcciones análogas con variantes de color de GFP, en las que se introdujeron mutaciones conocidas que modifican el espectro de absorción y emisión mediante mutagénesis dirigida en la construcción de GFP existente. Específicamente se prepararon variantes fluorescentes amarillas (proteína fluorescente amarilla; YFP) y fluorescentes cian (proteína fluorescente cian; CFP). Ambas formaron CLP que mostraron respectivamente los espectros de absorción típicos. Por tanto, se pueden generar CLP de GFP de centro escindido presentadoras de GB1 con diferentes propiedades de cromóforo que son adecuadas para múltiples aplicaciones de inmunofluorescencia.

20 El sistema de centro escindido permite la preparación de CLP autofluorescentes que presentan sobre su superficie una molécula extraña adicional con capacidad de interacción. Si esta molécula extraña es GB1, entonces es además capaz de interactuar específicamente con inmunoglobulina, incluso cuando estas están unidas a su antígeno diana. De esto se obtiene una posibilidad de aplicación nueva que más allá de las aplicaciones de vacuna, concretamente la comprobación directa mediante fluorescencia de diferentes antígenos mediante las CLP autofluorescentes. Tales CLP de centro escindido con capacidad de interacción autofluorescentes son particularmente adecuadas para aplicaciones de diagnóstico y analíticas.

25 **CLP de centro escindido autofluorescentes, que presentan dominios extraños diferentes del GB1 de la proteína G**

30 Los resultados que se han mencionado anteriormente muestran que sobre CLP de centro escindido que contienen adicionalmente una GFP escindida en dos puede presentarse un dominio extraño adicional, GB1, en forma funcional, es decir, con capacidad de interacción con el ligando específico IgG. Sin embargo, GB1 es un dominio relativamente pequeño con menos de 60 aa. Para poder comprobar la capacidad de generalización se prepararon construcciones homólogas en las que se sustituyó GB1 por los dominios preS de las grandes proteínas de envuelta de los VHB del ser humano (VHB), pato (DHBV) y garza (HHBV). Estos dominios median en la unión específica de los respectivos virus a sus células diana naturales, es decir, hepatocitos de las correspondientes especies huésped. Con 108 aa para VHB y aproximadamente 160 aa para preS de DHBV y HHBV son claramente mayores que GB1 y, además, son diferentes en su secuencia de GB1, sin embargo, también entre sí.

40 Los tres dominios se insertaron de forma análoga a GB1 en proteínas de fusión de GFP en centro escindido (compárese con la Figura 7; en lugar de GB1, los correspondientes dominios de preS). Los 3 formaron CLP de forma eficaz, tal como se comprobó mediante sedimentación en gradiente de sacarosa, comportamiento de avance en la electroforesis en gel de agarosa nativo así como mediante microscopía electrónica; las CLP mostraron la típica fluorescencia de GFP (es decir, las partes de GFP estaban asociadas hasta dar la estructura 3D correcta de GFP); además, las CLP de preS de VHB y preS de DHBV reaccionaron con anticuerpos monoclonales frente a preS de VHB y preS de DHBV; actualmente no hay disponible ningún anticuerpo correspondiente frente al preS de virus de garza.

45 Una aplicación adicional es el hallazgo de los receptores celulares para los respectivos virus. Se puede suponer que debido a la gran cantidad (240) de dominios preS por partícula, las CLP poseen una avidéz enormemente aumentada por los receptores, de tal manera que estos se pueden unir de forma estable y también identificar de este modo. Las células portadoras de receptor se identificarían mediante fluorescencia de GFP de las CLP mediante microscopía de fluorescencia o FACS; las moléculas receptoras solubilizadas de tales células se incubarían con las CLP y durante la posterior sedimentación en gradiente de sacarosa se acumularían en las fracciones de gradiente típicas de partículas.

50 **Ejemplo 14**

Las CLP de OspA en centro escindido con OspA en centroN generan mayores títulos de anticuerpos anti-OspA protectores que LipOspA, con OspA en centroC, menores

55 Tal como se muestra en la Figura 5, mediante la asociación con centroN o centroC se puede influir de forma selectiva en la orientación de una proteína extraña presentada. En el caso de OspA, por tanto, el epítipo que se encuentra C-terminal del anticuerpo monoclonal de forma conocida neutralizante LA-2 se deja particularmente bien expuesto (fusión a centroN) o en lugar de esto, la zona de OspA N-terminal, en la que no se encuentran epítopos

conocidos neutralizantes (fusión a centroC). Tal como se muestra en la Figura 4, las CLP de OspA en centro escindido (en ese lugar, grupo 2 para fusión de centroN y grupo 6 para la de centroC) producen altos títulos de anticuerpos anti-OspA totales, sin embargo, la proporción de anticuerpos equivalentes de LA-2 es considerablemente mayor en la fusión a centroN –tal como se esperaba por la estructura.

5 Sin embargo, en este caso se trataba de datos *in vitro*. Para determinar directamente el potencial protector de los anticuerpos inducidos *in vivo* se registró la capacidad de los respectivos sueros inmunes para la neutralización de una infección creada de modo artificial por *B. burgdorferi* en un modelo de ratón establecido (compárese con Nassal y col., Eur. J. Immunol. 2005; págs. 655-665). Se inoculó por vía i.p. a ratones SCID el correspondiente suero inmune, 2 horas después se realizó por vía s.c. la exposición a respectivamente 10^3 /ratón de espiroquetas. En
10 ratones no protegidos, esto conduce regularmente a la infección que se manifiesta en sintomática de tipo artritis que se puede detectar semicuantitativamente en la articulación tibiotarsal izquierda y derecha. Como control negativo sirvió un grupo de 3 ratones que obtuvieron solamente suero de ratón normal. Como control positivo sirvieron grupos de respectivamente 6 ratones que obtuvieron el anticuerpo monoclonal neutralizante de forma conocida purificado LA2 o anticuerpos inducidos con LipOspA. Los grupos de ensayo (asimismo respectivamente 6 animales) obtuvieron
15 sueros inmunes que se habían obtenido mediante OspA en centro escindido con OspA en centroN o, de igual modo, en centroC. Para detectar diferencias cuantitativas se realizó la inmunización pasiva una vez con 5 μ g y una vez con 1 μ g de LA2 o los volúmenes equivalentes a estas cantidades de LA2 de sueros inmunes de animales vacunados con LipOspA u OspA en centro escindido con OspA en centroN. Los resultados están representados en la Figura 8.

Debido a la baja proporción de anticuerpos equivalentes a LA2 en los sueros inmunes obtenidos mediante OspA en
20 centro escindido con OspA en centroC se usaron volúmenes equivalentes a esto tal como de OspA en centro escindido con OspA en centroN sin tener en cuenta el título equivalente de LA2. Se determinaron las puntuaciones de artritis el día 13, 17, 21, 28, 35, 45 y 52. Los resultados para el día 52 están resumidos en la Figura 8.

Todos los animales a los que se había inoculado suero de ratón normal desarrollaron artritis, tal como se esperaba. La protección mediante el anticuerpo monoclonal LA-2 disminuyó con la reducción de dosis de 5 a 1 μ g de 4/6 a 1/6
25 animales, mediante los sueros inmunes de LipOspA se protegieron 5/6 animales. La inmunización pasiva con sueros inmunes obtenidos mediante OspA en centro escindido con OspA en centroN protegió todos los animales (6/6), incluso a la baja dosificación, frente a infección. OspA en centroC tenía una actividad protectora claramente menor (4/6 animales a la dosificación alta, 1/6 animales a la baja).

Las CLP de OspA en centro escindido con OspA en centroN conducen a títulos altos de anticuerpos equivalentes a
30 LA2 y estos son protectores *in vivo*. El potencial protector supera al de los anticuerpos inducidos con LipOspA. Las CLP de OspA en centro escindido con OspA en centroC inducen títulos totales altos de anticuerpos anti-OspA, sin embargo, estos son equivalentes solamente en una pequeña proporción a LA-2 y poseen solamente un menor potencial neutralizante. Por tanto, la fusión de un antígeno extraño a centroN da lugar a una respuesta inmune cualitativamente distinta de la fusión a centroC.

35 Ejemplo 15

Proteína circumsporozoito (CSP) del patógeno de la malaria *Plasmodium falciparum*

La CSP de longitud completa en el sistema de centro escindido induce una respuesta inmune más intensa y más amplia que la secuencia de repetición de CSP inmunodominante en el sistema de centro continuo convencional.

Hasta ahora se ha mostrado que la CSP completa con una longitud de 319 aa se puede expresar exclusivamente en
40 el sistema de centro escindido con formación de CLP; en el sistema continuo convencional esto no era posible. Una versión acortada sin el dominio C-terminal rico en cisteína (a continuación CSPcorta) también se pudo representar en el sistema continuo convencional, sin embargo, la proteína después de pocos días mostró una marcada tendencia a la precipitación –en el sistema de centro escindido esta no apareció, lo que demuestra propiedades superiores de química de proteínas.

45 Una particularidad de la CSP es la presencia de una repetición múltiple de los motivos tetrapeptídicos NANP y NVDP (en la versión de longitud completa usada en el presente documento 24 motivos de NANP y 3 de NVDP); estos son de forma conocida inmunógenos y se describe una vacuna experimental basada en el sistema de centro continuo convencional. Por tanto, para un estudio de inmunogenicidad comparativo se preparó una construcción convencional correspondiente con la secuencia de repetición NANPNVDP(NANP)₃NVDP entre los aa de centro D78
50 y S81 que –tal como se esperaba, ya que la inserción es pequeña– formó CLP. Esta sirvió en un estudio de inmunogenicidad como comparación para CSP de longitud completa y la CSPcorta acortada en el extremo C. Los ratones se inmunizaron con cantidades respectivamente iguales de las respectivas CLP (20 μ g/ratón); después de 2, 4, 6 y 8 semanas se determinaron las cantidades de anticuerpos formados mediante ELISA; después se realizó una inmunización de refuerzo (análoga a la primera) y se determinaron de nuevo los títulos 2, 4 y 6 semanas después
55 del refuerzo. Como antígenos de ensayo sirvieron CSP recombinante (como proteína de fusión de *E. coli*), péptidos NANP y NVDP así como HBcAg recombinante para determinar la respuesta de linfocitos B frente al vehículo. Los antígenos se inmovilizaron en placas de ELISA, después se ensayaron con series de dilución de factor 2 de los sueros inmunes. La mayor dilución posible que produjo una señal que se encontraba sobre el fondo está indicada en

la Figura 9.

De esto se obtienen las siguientes conclusiones:

a) respuesta de linfocitos B frente a CSP recombinante

5 Los tres inmunógenos producen una respuesta extremadamente fuerte frente a CSP; sin embargo, para CSP de longitud completa ésta se encuentra todavía 4 veces por encima (título: $1 : 12 \times 10^6$ frente a $1 : 3 \times 10^6$ para CSP de repetición o acortada); esto significa que una dilución de factor 12 millones (!) del suero inmune todavía es capaz de reconocer proteína CSP.

b) respuestas de linfocitos B frente a péptidos de repetición NANP y NVDP

10 Las respuestas frente al péptido NANP son, de acuerdo con lo esperado, similares para todas las construcciones; las respuestas frente al péptido NVDP presente con menor frecuencia en la repetición son similares, sin embargo, en la construcción de CSP de longitud completa son claramente mayores incluso después de la primera inmunización (sin refuerzo) (título $1 : 2,5 \times 10^4$ frente a $1 : 5 \times 10^3$).

c) respuestas de linfocitos B frente a secuencias de CSP no contenidas en la repetición

15 Exclusivamente CSPcorta y CSP de longitud completa inducen una respuesta frente a los péptidos CSP12 (EPPSDKHIEQYLKKIQNSLS; posición 246-264 en la construcción de centro escindido de longitud completa) y CSP8 (GNGIQVRIKPGSANKPKDELD; posición 274-294 en la construcción de centro escindido de longitud completa). Se espera la ausencia de respuestas correspondientes después de la inmunización con el péptido de repetición en el sistema de centro continuo, ya que en ese lugar no están contenidas las secuencias de CSP8 y CSP12. El significado del resultado radica en que particularmente la CSP de longitud completa se puede preparar
20 exclusivamente en el sistema de centro escindido; por tanto, con el sistema de centro escindido se pueden abordar epítomos adicionales que pueden contribuir al efecto protector de una vacunación.

d) respuestas de linfocitos B frente al vehículo de centro

25 Tanto CSPcorta como CSP de longitud completa en el sistema de centro escindido conducen a una respuesta aproximadamente 25 veces menor frente al vehículo de centro que el péptido de repetición en el sistema continuo (título $1 : 1,25 \times 10^5$ frente a 3×10^6). Ya que la respuesta deseada frente a la proteína extraña es al menos igual de elevada (CSPcorta) o incluso mayor (CSP de longitud completa) que con el uso del péptido de repetición en el sistema de centro continuo, la inmunogenicidad específica con respecto a la secuencia extraña insertada con el uso de CSP acortada y particularmente de longitud completa en el sistema de centro escindido está considerablemente
30 mejorada. A esto se añade que una fuerte respuesta frente al vehículo de centro dificulta el diagnóstico diferencial de personas positivas a anti-HBsAg (infección frente a anti-HBsAg por vacunación); por tanto, se desea una baja respuesta anti-vehículo de centro.

e) la CSP de longitud completa en el sistema de centro escindido activa los linfocitos T

35 Para la comprobación de la inducción de una respuesta de linfocitos T se estimularon células de bazo de los ratones respectivamente inmunizados con HBcAg recombinante o un péptido de linfocitos T conocido (HBc 120-140) o con CSP recombinante o los péptidos de CSP NANP y CSP8, después se midió la producción de IL-2. Todas las construcciones condujeron a la aparición de linfocitos T que se podían activar por HBcAg, HBc120-140, CSP recombinante y NANP. Exclusivamente las células de bazo de ratones inmunizados con CSP de longitud completa en el sistema de centro escindido, sin embargo, se pudieron estimular para la producción de IL-2 mediante el péptido CSP8.

40 Por tanto, también a nivel de los linfocitos T la construcción de CSP de longitud completa conduce a una respuesta más amplia que la construcción de péptidos solamente de repetición continua.

REIVINDICACIONES

1. Sistema de vehículo de centro escindido, que presenta como polipéptidos separados el dominio de centro N y de centro C de la proteína de centro de un virus de la hepatitis B y al menos una molécula extraña con base peptídica frente a la que se debe generar una respuesta inmune, estando fusionada la molécula extraña al extremo C del dominio de centro N o al extremo N del dominio de centro C y pudiendo formar la proteína de centro partículas de tipo cápside y estando fusionada la molécula extraña a un aminoácido de la proteína de centro que se encuentra entre las posiciones 73 y 94 de la proteína de centro.
2. Sistema de vehículo de centro escindido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el virus de la hepatitis B es específico de mamíferos.
3. Sistema de vehículo de centro escindido de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** la proteína de centro presenta la secuencia de un virus de la hepatitis B humano.
4. Sistema de vehículo de centro escindido de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** la proteína de centro presenta la secuencia de aminoácidos del VHB de la marmota norteamericana.
5. Sistema de vehículo de centro escindido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** la molécula extraña es una secuencia de aminoácidos de una proteína de una bacteria patógena.
6. Sistema de vehículo de centro escindido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** la molécula extraña es una secuencia de aminoácidos de una proteína de un eucariota patógeno, particularmente del patógeno de la malaria *Plasmodium falciparum*.
7. Sistema de vehículo de centro escindido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** la molécula extraña es una secuencia de aminoácidos de una proteína de un virus.
8. Sistema de vehículo de centro escindido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** la molécula extraña es una secuencia de aminoácidos de una proteína con potencial respecto a la patogenicidad propia, particularmente una proteína de marcador tumoral.
9. Procedimiento para la preparación de un vehículo para proteínas extrañas frente a las que se debe inducir una respuesta inmune que presenta, por un lado, una secuencia proteica del antígeno central de un virus de la hepatitis B y, por otro lado, una secuencia proteica heteróloga como molécula extraña, fusionándose la secuencia proteica heteróloga detrás de la posición 73 y delante de la posición 94 de la región de centro de hepatitis B al dominio de centro N o de centro C e interrumpiéndose la cadena polipeptídica del vehículo detrás del dominio de centro N o delante del dominio de centro C, **caracterizado porque** el dominio de centro N y la secuencia proteica heteróloga o el dominio de centro C y la secuencia proteica heteróloga se expresan independientemente como proteínas de fusión o porque entre el centro N y la secuencia proteica heteróloga o entre la secuencia proteica heteróloga y el centro C se incluye una secuencia de reconocimiento para una proteasa y la vacuna de centro escindido se escinde después de la expresión, pero antes del uso con la proteasa, en dos polipéptidos y porque se forman partículas de tipo cápside.
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado porque** la secuencia proteica heteróloga se fusiona detrás del aminoácido 74 y delante del aminoácido 85 del antígeno central de la hepatitis B.
11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 9-10, **caracterizado porque** la secuencia de proteína extraña heteróloga tiene al menos 40 aminoácidos de longitud.
12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado porque** la secuencia de proteína extraña heteróloga tiene al menos 120 aminoácidos de longitud.
13. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 9-11, **caracterizado porque** se expresan dos polipéptidos independientes con ayuda de un vector bicistrónico, conteniendo uno de los polipéptidos el dominio de centro N y el otro polipéptido el dominio de centro C y fusionándose la secuencia proteica heteróloga con el extremo C del dominio de centro N o con el extremo N del dominio de centro C.
14. Fármaco que presenta partículas de tipo cápside, **caracterizado porque** estas partículas presentan un sistema de vehículo de centro escindido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8.
15. Fármaco de acuerdo con la reivindicación 14, **caracterizado porque** se trata de una vacuna.
16. Medio de diagnóstico que presenta partículas de tipo cápside, **caracterizado porque** estas partículas presentan un sistema de vehículo de centro escindido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8.

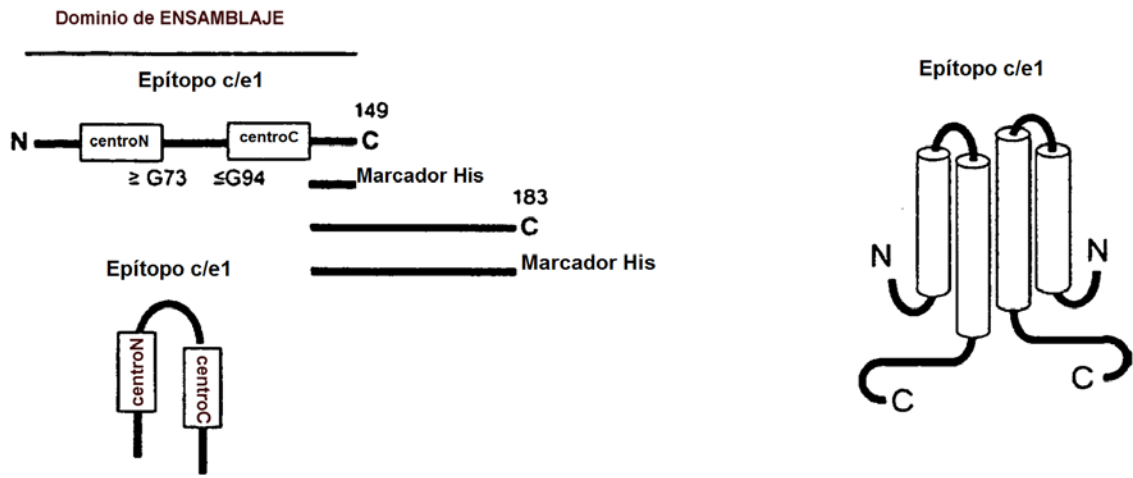


Fig. 1: Representación esquemática de la estructura de proteína de centro

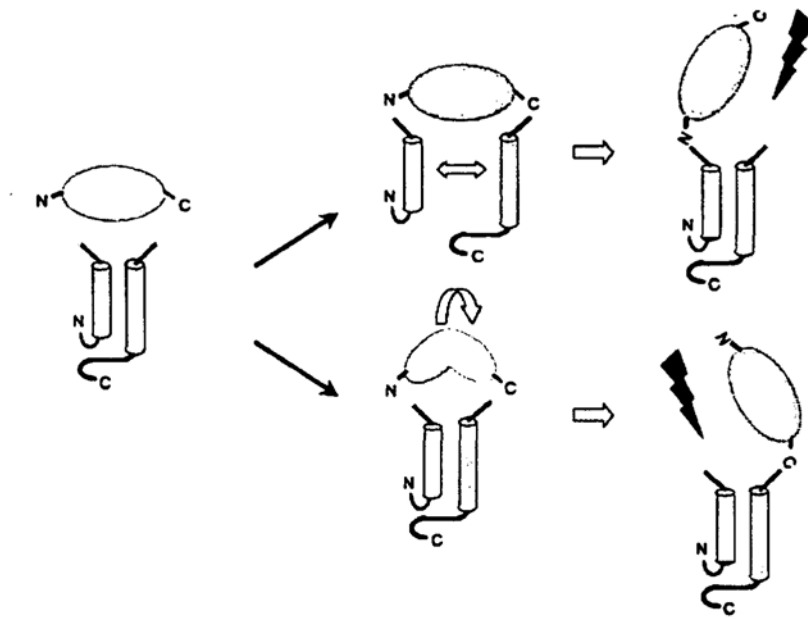


Fig. 2: Principio del sistema de centro escindido

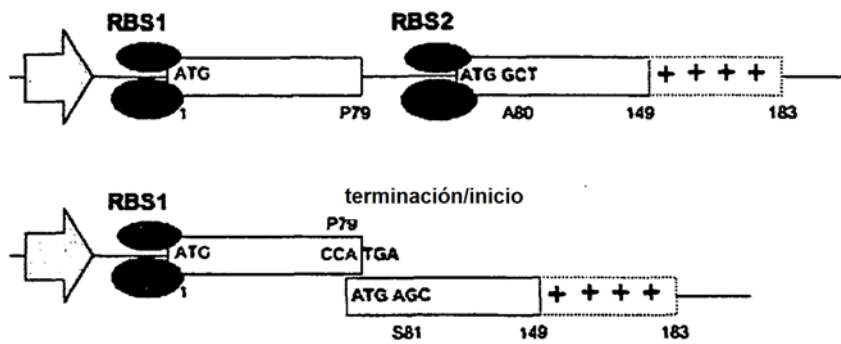
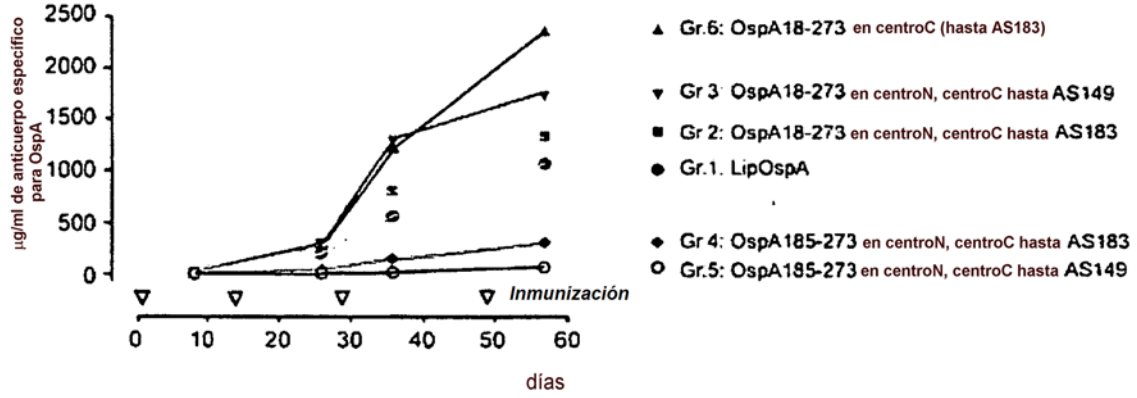


Fig. 3 Representación esquemática de dos realizaciones de vectores de expresión bacterianos para una producción aproximadamente equimolar de los dos fragmentos de centro N y centroC

Cinética de la inducción de anticuerpos específicos para OspA



Anticuerpos totales anti-OspA frente a equivalentes de LA2
(Muestras de suero de extracción de sangre 4)

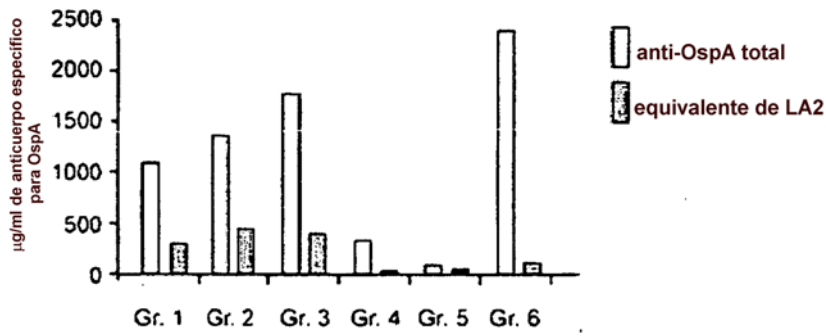


Figura 4

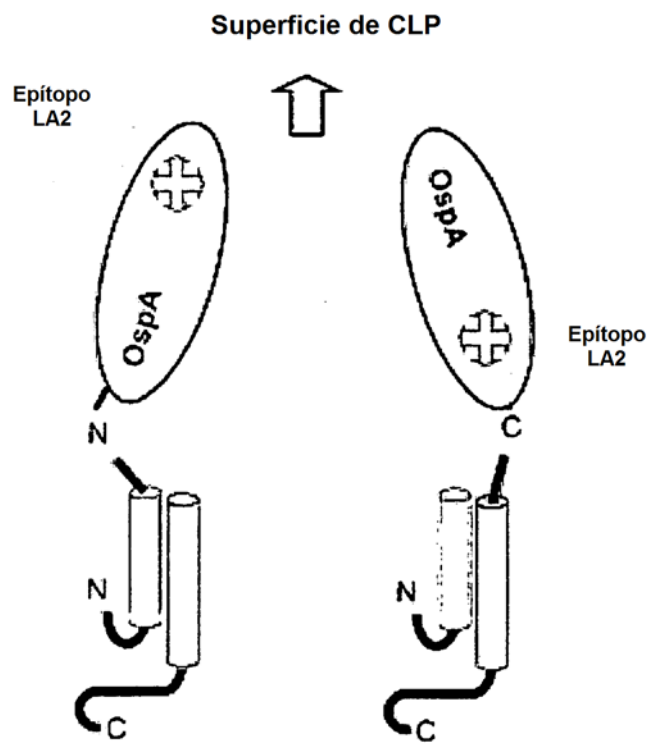


Fig. 5: Principio de la inducción selectiva específicamente a región de anticuerpos frente a una proteína extraña en el sistema de centro escindido

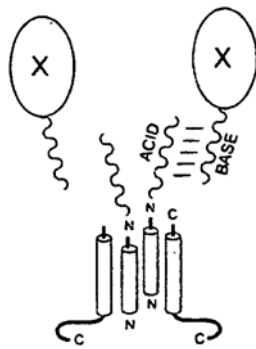


Fig. 6: Fusión de centro escindido con molécula extraña con capacidad de interacción expuesta de forma flexible

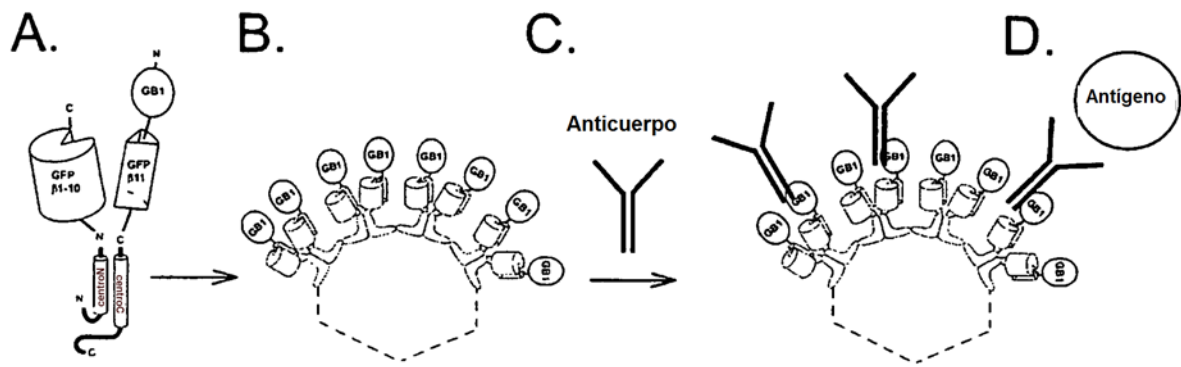


Fig. 7: Principio de las CLP de centro escindido autofluorescentes que presentan sobre su superficie una molécula extraña con capacidad de interacción, en el presente documento, GB1

Grupo de ratones inmunizados pasivamente con	Artritis, día 52		Protegido contra infección
	marcada	débil	
LA-2, 5 µg	1/6	1/6	4/6
LA-2, 1 µg	2/6	3/6	1/6
LipOspA, 5 µg	0/6	1/6	5/6
LipOspA, 1 µg	1/6	0/6	5/6
OspA-centro escindido en centroN, 5 µg de anticuerpos equivalentes de LA-2	0/6	0/6	6/6
OspA-centro escindido en centroN, 1 µg de anticuerpos equivalentes de LA-2	0/6	0/6	6/6
OspA-centro escindido en centroC, vol. equiv. a 5 µg de equiv. de LA-2 con Ospa en centroN	2/6	0/6	4/6
OspA-centro escindido en centroC, vol. equiv. a 1 µg de equiv. de LA-2 con Ospa en centroN	3/6	2/6	1/6
Suero de ratón normal	3/3	0/3	0/3

Figura 8: potencial protector de diferentes sueros inmunes anti-OspA con respecto a la exposición de ratones SCID a *B. burgdorferi*

Inmunógeno	Semana (pr = post-refuerzo)	CSP rec	NANP	NVDP	HBc rec.	Péptido CSP12	Péptido CSP8
HBc149 CSP-repetición cont.	s 8	No det.	$1,25 \times 10^5$	5×10^3	$6,25 \times 10^5$	No det.	No det.
	s 6 pr	3×10^6	3×10^6	$6,25 \times 10^5$	3×10^5	0	0
Centro escindido 149- CSP corta	s 8	No det.	$1,25 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$	$1,25 \times 10^5$	No det.	No det.
	s 6 pr	3×10^6	3×10^6	$6,25 \times 10^5$	$1,25 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	0
Centro escindido 149- CSP de longitud completa	s 8	No det.	$1,25 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	No det.	No det.
	s 6 pr	12×10^6	3×10^6	$6,25 \times 10^5$	$1,25 \times 10^5$	2×10^2	$2,5 \times 10^4$

Fig. 9: respuestas de linfocitos B frente a CSP y vehículo de centro después de una o dos inmunizaciones de ratones B10 con los inmunógenos indicados