

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2003.07.18</b>	(73) Titular(es): <b>CYTOS BIOTECHNOLOGY AG</b> <b>WAGISTRASSE 25 8952 ZÜRICH-SCHLIERENCH</b> <b>NOVARTIS PHARMA AG</b> <b>CH</b>
(30) Prioridade(s): <b>2002.07.19 US 396639 P</b> <b>2003.05.15 US 470432 P</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2005.04.27</b>	(72) Inventor(es): <b>MATTHIAS STAUFENBIEL</b> <b>DE</b> <b>MARTIN F. BACHMANN</b> <b>CH</b> <b>ALAIN TISSOT</b> <b>CH</b> <b>RAINER ORTMANN</b> <b>FR</b> <b>RAINER LÜÖND</b> <b>CH</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2011.04.27</b> <b>145/2011</b>	(74) Mandatário: <b>LUÍS MANUEL DE ALMADA DA SILVA CARVALHO</b> <b>RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES DE VACINA CONTENDO FILEIRAS DE ANTIGÉNIO AMILÓIDE BETA 1-6**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE AOS CAMPOS DA BIOLOGIA MOLECULAR, VIROLOGIA, IMUNOLOGIA E MEDICINA. A INVENÇÃO PROPORCIONA UMA COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO UMA FILEIRA DE ANTIGÉNIO OU DE UM DETERMINANTE ANTIGÉNICO ORDENADO E REPETITIVO, E EM PARTICULAR UMA COMPOSIÇÃO VLPPÉPTIDO- A&#61538;1-6. MAIS ESPECIFICAMENTE, A INVENÇÃO PROPORCIONA UMA COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO UMA PARTÍCULA SEMELHANTE A VÍRUS E PELO MENOS UM PÉPTIDO A&#61538; 1-6 A ELA LIGADO. A INVENÇÃO PROPORCIONA TAMBÉM UM PROCESSO PARA A PRODUÇÃO, RESPECTIVAMENTE, DOS CONJUGADOS E DAS FILEIRAS ORDENADOS E REPETITIVOS. AS COMPOSIÇÕES DA INVENÇÃO SÃO ÚTEIS PARA A PRODUÇÃO DE VACINAS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER E COMO UMA VACINA TERAPÊUTICA PARA PREVENIR OU CURAR A DOENÇA DE ALZHEIMER E PARA INDUZIR DE FORMA EFICIENTE RESPOSTAS IMUNITÁRIAS, EM PARTICULAR RESPOSTAS POR ANTICORPOS. ALÉM DISSO, AS COMPOSIÇÕES DA INVENÇÃO SÃO PARTICULARMENTE ÚTEIS PARA INDUZIR DE FORMA EFICIENTE RESPOSTAS IMUNITÁRIAS AUTO-ESPECÍFICAS NO CONTEXTO INDICADO.

**RESUMO****"COMPOSIÇÕES DE VACINA CONTENDO FILEIRAS DE ANTIGÉNIO  
AMILÓIDE BETA 1-6"**

A presente invenção refere-se aos campos da biologia molecular, virologia, imunologia e medicina. A invenção proporciona uma composição compreendendo uma fileira de antigénio ou de um determinante antigénico ordenado e repetitivo, e em particular uma composição VLP-péptido-A $\beta$ 1-6. Mais especificamente, a invenção proporciona uma composição compreendendo uma partícula semelhante a vírus e pelo menos um péptido A $\beta$  1-6 a ela ligado. A invenção proporciona também um processo para a produção, respectivamente, dos conjugados e das fileiras ordenados e repetitivos. As composições da invenção são úteis para a produção de vacinas para o tratamento da doença de Alzheimer e como uma vacina terapêutica para prevenir ou curar a doença de Alzheimer e para induzir de forma eficiente respostas imunitárias, em particular respostas por anticorpos. Além disso, as composições da invenção são particularmente úteis para induzir de forma eficiente respostas imunitárias auto-específicas no contexto indicado.

**DESCRIÇÃO****"COMPOSIÇÕES DE VACINA CONTENDO FILEIRAS DE ANTIGÊNIO  
AMILÓIDE BETA 1-6"**

## ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

## Campo da Invenção

A presente invenção refere-se aos campos da biologia molecular, virologia, imunologia e medicina. A invenção proporciona uma composição compreendendo uma fileira de antigénios ou determinantes antigénicos ordenado e repetitivo, e em particular uma composição péptico A $\beta$ 1-6-VLP. Mais especificamente, a invenção proporciona uma composição compreendendo uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e pelo menos um péptido A $\beta$  1-6 a ela ligado. A invenção também proporciona um processo para a produção, respectivamente, dos conjugados e das fileiras ordenados e repetitivos. As composições da invenção são úteis para a produção de vacinas para o tratamento da doença de Alzheimer e como uma vacina terapêutica para prevenir ou curar a doença de Alzheimer e para induzir de forma eficiente respostas imunitárias, em particular respostas por anticorpos. Além disso, as composições da invenção são particularmente úteis para induzir de forma eficiente respostas imunitárias auto-específicas no contexto indicado.

## Técnica Relacionada

A doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência em idosos (idades de 65 anos ou superior) e um fardo sério para a saúde pública. Por exemplo, registou-se que 4 milhões de pessoas sofriam da doença nos Estados Unidos da América. Espera-se que a incidência da doença aumente à medida que a população envelhece.

Os sinais patológicos principais da doença de Alzheimer são alterações de comportamento relacionadas com a idade, deposição de  $\beta$ -amilóide em placas insolúveis, denominadas placas neuríticas ou placas DA, tranças neurofibrilares compostas pela proteína tau nos neurónios, e perda de neurónios ao longo do cérebro anterior. Além da DA de início tardio (65 anos de idade e superior), também existe uma DA de início precoce, DA familiar (DAF) que ocorre entre as idades de 35 e 60 anos. As anomalias patológicas da DA são mais disseminadas, graves e ocorrem mais cedo em DAF do que na DA de início tardio ou esporádica. Foram correlacionadas com DAF mutações no gene PPA, nos genes presenilina 1 e presenilina 2.

Tal como indicado, um dos acontecimentos chave na doença de Alzheimer (DA) é a deposição de amilóide na forma de massas fibrosas insolúveis (amioloidogénese) resultando em placas neuríticas extracelulares e depósitos à volta das paredes dos vasos sanguíneos cerebrais (para uma revisão ver



Selkoe, D. J. (1999) *Nature*. 399, A23-31). O constituinte principal das placas neuríticas e da angiopatia congofílica é a amilóide  $\beta$  ( $A\beta$ ), apesar destes depósitos também conterem outras proteínas tais como glicosaminoglicanos e apolipoproteínas. A  $A\beta$  é clivada proteoliticamente de uma glicoproteína muito maior conhecida como a Proteína Precursora Amilóide (PPA), que compreende isoformas de 695-770 aminoácidos com uma única região transmembranar hidrofóbica.  $A\beta$  forma um grupo de péptidos com um comprimento de até 43 aminoácidos que apresentam uma heterogeneidade amino- e carboxi-terminal (truncagem) consideráveis assim como modificações (Roher, A. E., Palmer, K. C., Chau, V., & Ball, M. J. (1988) *J. Cell Biol.* 107, 2703-2716. Roher, A. E., Palmer, K. C., Yurewicz, E. C., Ball, M. J., & Greenberg, B. D. (1993) *J. Neurochem.* 61, 1916-1926). Isoformas importantes são  $A\beta$ 1-40 e 1-42. É bastante propensa à formação de folhas  $\beta$  que se agregam em fibrilas, o que acaba por conduzir a amilóide.

O péptido  $A\beta$  tem um papel central na neuropatologia da doença de Alzheimer. A acumulação extracelular, específica de uma região do péptido  $A\beta$  é acompanhada por microgliose, alterações no citoesqueleto, neurite distrófica e perda sináptica. Pensa-se que estas alterações patológicas estão associadas ao declínio cognitivo que define a doença.

A administração da proteína beta amilóide ou, em particular,  $A\beta$  1-28 em quantidades de até  $10^{-2}$  mg/dose na

ausência de quaisquer adjuvantes e sem qualquer ligação da proteína beta amilóide ou A $\beta$  1-28 a um veículo, para o tratamento da doença de Alzheimer, está descrita em EP 526'511.

Outros utilizaram a administração de péptidos A $\beta$  em combinação com adjuvantes para induzir uma resposta imunitária, celular ou humoral, contra A $\beta$  1-42. Num modelo em ratinho transgénico da doença de Alzheimer, os animais sobre-expressam a proteína precursora amilóide contendo a mutação APP(717)V-F (ratinhos PDAPP; Johnson-Wood, K. et al., Proc. Natl. Acad. USA 94: 1550-1555, Games, D. et al., Nature 373: 523-527 (1995a)), conduzindo à superprodução de A $\beta$ <sub>1-42</sub>, desenvolvem placas, neurite distrófica, perda de terminais pré-sinápticos, astrocitose e microgliose. Num estudo recente, Schenk, D. et al., (Nature 400:173-77 (1999) e WO 99/27944) reportam que a administração de A $\beta$ <sub>1-42</sub> agregados misturados com um adjuvante forte (CFA/IFA), que não pode ser utilizado em humanos, nas primeiras 4 imunizações, seguindo-se pela administração de A $\beta$ <sub>1-42</sub> agregados em PBS nas imunizações subsequentes, a ratinhos PDAPP com 6 semanas de idade, essencialmente preveniu a formação de placa e a neurite distrófica associada. Os mesmos autores reportam que a imunização de ratinhos de mais idade (11 meses de idade) utilizando a mesma estratégia reduziu de forma significativa a extensão e a progressão de neuropatologias do tipo da doença de Alzheimer (DA). A proliferação de esplenócitos dos ratinhos imunizados utilizando a estratégia acima mencionada foi

reportada no Exemplo III (Rastreo para a eficácia terapêutica contra DA estabelecida) de WO 99/27944, mostrando que células-T específicas para A $\beta$ 1-42 foram induzidas pelo procedimento de vacinação. Em WO 99/27994, reporta-se o acoplamento de fragmentos A $\beta$  a IgG de carneiro anti-rato e a imunização do referido fragmento acoplado na presença do adjuvante CFA/IFA. A utilização de composições compreendendo fragmentos A $\beta$  ligados a polipéptidos tais como a toxina da difteria para a promoção de uma resposta imunitária contra A $\beta$  é também apresentada em WO 99/27944. No entanto, não são fornecidos dados de imunização.

Verificou-se que um anticorpo monoclonal que reconhece um epítipo no interior da extremidade N (1-16) de A $\beta$  (anticorpo 6C6) protege células PC 12 da neurotoxicidade da  $\beta$ -amilóide fibrilar, e desagrega a  $\beta$ -amilóide in vitro (Solomon B. et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA (1997)). A monoclonal antibody raised against A $\beta$ 1-28, was also shown to suppress  $\beta$ -amyloid aggregation in vitro (Solomon B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996)). Frenkel et al., (J. Neuroimmunol. 88: 85-90 (1998)) identificaram mais tarde o epítipo dos dois anticorpos anti-agregação, 10D5 e 6C6, como sendo epítipo "EFRH", ou seja A $\beta$ 3-6. Pelo contrário, um anticorpo específico para A $\beta$ 1-7 não foi capaz de prevenir a agregação da  $\beta$ -amilóide (Frenkel D. et al., J. Neuroimmunol. 95: 136-142 (1999)).

A $\beta$ 1-42 é fibrilogénico, e de facto, a composição de vacina descrita em WO 99/27944 utilizou A $\beta$ 1-42 tratada de tal modo

que pode formar agregados. Mostrou-se que aquelas fibrilas são tóxicas para culturas de células neuronais (Yankner et al., Science 245: 417-420 (1989)), e que é também observado um efeito tóxico quando se injectam em cérebros animais (Sigurdson et al., Neurobiol. Aging 17: 893-901 (1996); Sigurdson et al., Neurobiol. Aging 18: 591-608 (1997)). Walsh et al., (Nature 416:535-539 (2002)) reportam que se forma oligómeros naturais de A $\beta$  no interior de vesículas intracelulares. Aqueles oligómeros inibiram a potenciação de longo prazo em ratos in vivo e quebrou a plasticidade sináptica a concentrações encontradas no cérebro humano e no fluido cerebroespinal.

Noutro estudo, Bard, F. et al. (Nature Medicine 6:916-19 (2000)) reportaram que a administração periférica de anticorpos contra A $\beta$ <sub>1-42</sub> foi capaz de reduzir a carga amilóide, apesar de níveis no soro relativamente modestos. Este estudo utilizou um anticorpos policlonais contra A $\beta$ <sub>1-42</sub>, ou anticorpos monoclonais contra fragmentos sintéticos derivados de regiões diferentes de A $\beta$ . Assim, a indução de anticorpos contra péptidos A $\beta$  apresenta promessas como um tratamento terapêutico potencial para a doença de Alzheimer.

Descreveu-se em WO99/27949 a administração através de mucosas de um antigénio associado com as placas  $\beta$ -amilóides, tais como o péptido  $\beta$ -amilóide e A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Diz-se que a administração através de mucosas suprime certas respostas de citocinas associadas com a doença de Alzheimer

e aumentam certas outras respostas de citocinas associadas com a supressão de respostas inflamatórias associadas à doença. Pensa-se que a supressão das respostas inflamatórias é efectuada pela "estimulação de células T caracterizadas por um perfil de citocinas anti-inflamatório". Antígenos adequados, tal como descritos em WO9927949, inclui antígenos específicos para DA, que são reconhecidos por células T imunitárias de origem animal ou humana.

A fusão de epitopos de um anticorpo monoclonal que reconhece A $\beta$  para revestir proteínas de fagos filamentosos é descrita em WO 01/018169. A imunização de ratinhos com os fagos filamentosos apresentando o epitopo 15-ómero VHEPHEFRHVALNPV (SEQ ID NO: 89) na proteína da cápside VIII resultou em anticorpos que reconhecem A $\beta$  1-16 e A $\beta$ -40. Isto foi demonstrado com um teste ELISA de inibição utilizando péptidos A $\beta$ , e obteve-se um IC50 de 1  $\mu$ M para a inibição da ligação do soro a A $\beta$ -16 com A $\beta$ 1-40. Solomon (WO 01/18169) não proporciona no entanto qualquer indicação que o soro estimulado contra os fagos filamentosos contendo o epitopo VHEPHEFRHVALNPV epitopo (SEQ ID NO: 89), se liga a placas amilóides ou a placas neuríticas de AD.

Existem diversas desvantagens na utilização de sequências que diferem do antígeno contra o qual se deve obter uma resposta imunitária para imunização. Primeiro, podem ser induzidos os anticorpos contra parte da sequência estranha ao antígeno ou ao determinante antigénico.

Segundo, a confirmação do antígeno no contexto do elemento flanqueador de sequência estranho pode ser diferente no contexto do antígeno completo. Assim, apesar de poder ser provocada resposta dos anticorpos com reação cruzada com o antígeno, a sua ligação ao antígeno pode ser sub-ótima. A especificidade fina da resposta daqueles anticorpos pode também não corresponder à especificidade dos anticorpos com resposta contra o próprio antígeno, uma vez que estão presentes no anticorpo cadeias laterais adicionais diferentes dos resíduos presentes no A $\beta$  completo. Finalmente, a sequência de aminoácidos do 15-ômero pode conter epitopos de células T. A apresentação do epitopo YYEFRH (SEQ ID NO: 90) na proteína III da cápside de fago filamentoso, da qual estão apenas normalmente presentes 3-5 cópias em cada fago, é também apresentada em WO 01/18169. Vários problemas surgem quando se utilizam fagos infecciosos como veículos para imunização. Primeiro, a produção de agentes infecciosos em larga escala e em quantidade suficiente para grandes campanhas de imunização é problemática. Segundo, a presença de ADN de fago contendo genes de resistência a antibióticos na vacina não está isenta de problemas e é um problema de segurança. Finalmente, a exequibilidade e eficácia da irradiação de grandes quantidades de fagos, no caso em que se utilizam como vacina fagos não infecciosos, está por resolver.

Foram descritos análogos de A $\beta$ , em que A $\beta$  é modificado para incluir epitopo T auxiliar (WO 01/62284). A imunização de ratinhos TgRND8+, transgênico para PPA

humano, com o análogo A $\beta$  resultou num teor de anticorpos 4- a 7,5 vezes superior em relação à imunização com A $\beta$ 1-42 na ausência de adjuvante.

Estudos recentes demonstraram que a redução nos depósitos amilóides no cérebro induzidos pela vacinação têm o potencial de melhorar as funções cognitivas (Schenk, D., et al. Nature 400: 173-177 (1999); Janus, C. et al., Nature 408: 979-982 (2000); Morgan, D. et al., Nature 408: 982-985 (2000)).

A autópsia de um paciente imunizado com A $\beta$ 1-42 no Adjuvante QS21 revelou a presença de uma meningoencefalite de linfócito T e infiltração da matéria branca cerebral por macrófagos (Nicoll, J.A. et al., Nature Med. 9: 448-452 (2003)).

Recentemente, uma publicação apresentou 18 casos de meningoencefalite em pacientes imunizados pelo AN1792, uma vacina composta de A $\beta$ 1-42 e QS-21 como adjuvante (Orgogozo J.-M. et al., Neurology 61: 46-54 (2003)). Reporta-se que a activação de células T é um potencial mecanismo responsável pela doença, apesar de não se observar nenhuma relação clara entre a doença e os teores anti-A $\beta$ 1-42 no soro.

Está bem estabelecido que a administração isolada de proteínas purificadas não é suficiente para provocar uma resposta imunitária forte; geralmente antigénios isolados

devem ser administrados em conjunto com substâncias auxiliares denominadas adjuvantes. Nestes adjuvantes, o antígeno administrado é protegido contra uma degradação rápida, e o adjuvante proporciona uma libertação prolongada de um baixo teor de antígeno. Na presente invenção, os péptidos A $\beta$  são tornados imunogénicos através da ligação a uma VLP e não requerem um adjuvante.

Um modo para melhorar a eficiência de vacinação é assim aumentar o grau de repetição do antígeno aplicado. Ao invés das proteínas isoladas, os vírus induzem respostas imunitárias rápidas e eficientes na ausência de quaisquer adjuvantes tanto com ou sem a ajuda de células T (Bachmann e Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol: 15:235-270 (1991)). Apesar destes vírus consistirem frequentemente de poucas proteínas, são capazes de desencadear respostas imunitárias muito mais fortes do que os seus componentes isolados. Para respostas de células B, sabe-se que um factor crucial para a imunogenicidade dos vírus é a repetição e ordem dos epitopos de superfície. Muitos vírus apresentam uma superfície quase cristalina que apresenta uma fileira regular de epitopos que estabelece de forma eficiente ligações cruzadas com imunoglobulinas específicas para os epitopos nas células B (Bachmann e Zinkernagel, Immunol. Today 17: 553-558 (1996)). Esta reticulação das imunoglobulinas de superfície nas células B é um forte sinal de activação que induz directamente a progressão do ciclo celular e a produção de anticorpos IgM. Além disso, tais células B activadas são capazes de activar células T



auxiliares, as quais por seu turno induzem uma alteração da produção de anticorpos IgM para IgG nas células B e a geração de memória de células B de longa duração, o objectivo de qualquer vacinação (Bachmann e Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol. 15:235-270 (1997)). A estrutura viral está mesmo associada à geração de anticorpos em doenças auto-imunes e é uma parte da resposta natural aos patogénios (ver Fehr, T., et al., J Exp. Med. 185:1785-1792 (1997)). Assim, os anticorpos apresentados por uma superfície viral altamente organizada são capazes de induzir fortes respostas anti-anticorpo.

No entanto, como indicado o sistema imunitário não é capaz de produzir anticorpos contra estruturas derivadas dele próprio. Para antigénios solúveis apresentados a baixas concentrações, tal deve-se à tolerância ao nível da célula Th. Nestas condições, a ligação do antigénio próprio a um veículo que é capaz de administrar T auxiliar pode quebrar a tolerância. Para proteínas solúveis presentes em elevadas concentrações ou proteínas de membrana a baixa concentração, as células B e Th podem ser tolerantes. No entanto, a tolerância das células B pode ser reversível (anergia) e pode ser quebrada pela administração do antigénio de um modo altamente organizado através de ligação a um veículo estranho (Bachmann e Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol. 15:235-270 (1997)). Tal como ilustrado em US2003/0175290 submetida a 18 de Janeiro de 2002, podem ser induzidas respostas imunitárias fortes com composições

compreendendo péptidos A $\beta$  (A $\beta$ 1-15, A $\beta$ 1-27 e A $\beta$ 33-42, que é um antigénio próprio em ratinhos) ligados a VLP. Em particular, os péptidos A $\beta$  humanos acima mencionados ligados à VLP do fago de ARN Q $\beta$  induziram títulos específicos Ap elevados em ratinhos PPA transgénicos (descrito nos Exemplos) mostrando que a tolerância ao antigénio próprio A $\beta$  poderia ser ultrapassada através da imunização com péptidos A $\beta$  ligados a uma VLP.

Composições compreendendo uma partícula central, tais como um vírus ou uma partícula semelhante a vírus, à qual pelo menos um antigénio ou determinante antigénico está associado por intermédio de pelo menos uma ligação não-peptídica conduzindo a uma fileira repetitiva de antigénio foram descritas em WO00/32227. Estas composições são úteis para a produção de vacinas para a prevenção de doenças infecciosas, o tratamento de alergias e o tratamento de cancro.

Existe deste modo a necessidade de composições e vacinas seguras, altamente imunogénicas, respectivamente, para tratar doenças de Alzheimer, em particular, utilizando imunogénios desprovidos de epitopos de células T e adjuvantes, respectivamente, que pudessem provocar efeitos secundários, e sendo ainda capazes de induzir elevados teores de anticorpos, anticorpos esses sendo ainda capazes de se ligarem a placas amilóides.

## BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Descobrimos agora que o péptido A $\beta$ 1-6, que está ligado a uma partícula central com uma estrutura que com uma organização repetitiva inerente, e em particular a partículas semelhantes a vírus (VLPs) e subunidades de VLPs, respectivamente, conduzindo a conjugados repetitivos e altamente ordenados, representa um imunogénio potente para a indução de metabolitos específicos para A $\beta$ 1-6. Deste modo, a presente invenção proporciona um modo profilático e terapêutico para o tratamento da doença de Alzheimer, que se baseia numa fileira ordenada e repetitiva de A $\beta$ 1-6-partícula central, e em particular num conjugado VLP-péptido A $\beta$ 1-6 e fileira, respectivamente. Esta profilaxia e terapêutica é capaz de induzir elevados teores de anticorpos anti-péptido A $\beta$ 1-6, os quais estabelecem reacção cruzada com A $\beta$  solúvel e são capazes de se ligar a placas amilóides humanas de um modelo de rato transgénico PPA humano e a placas amilóides DA. Além disso, os anticorpos cuja resposta foi estimulada não se ligam a PPA em secções de cérebro.

Além disso, a presente invenção proporciona novas composições, vacinas e métodos para o tratamento de DA. As composições e vacinas compreendendo péptidos A $\beta$  1-6 são desprovidas de epitopos de células T e induzem anticorpos ligando-se a placas DA e A $\beta$  solúvel. Os péptidos A $\beta$  1-6 são apresentados ao sistema imunitário do paciente através de um modo altamente repetitivo e ordenado através da ligação

aos péptidos A $\beta$  ou a uma partícula central, preferentemente a uma VLP, e ainda mais preferentemente a uma VLP de um fago de ARN.

Numa realização preferida, o antigénio ou determinante antigénico é o péptido amilóide beta humano A $\beta$ 1-6 (DAEFRH; SEQ ID NO: 75) sendo um fragmento de A $\beta$  (DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 91), em que o péptido amilóide beta humano A $\beta$ 1-6 está ligado à partícula central e VLP, respectivamente. A proteína beta amilóide é proporcionada na SEQ ID NO: 92. A proteína beta precursora é proporcionada na SEQ ID NO: 93.

A presente invenção proporciona assim uma composição compreendendo: (a) uma partícula central com pelo menos um primeiro local de ligação em que a referida partícula central é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN; e (b) pelo menos um antigénio ou determinante antigénico com pelo menos um segundo local de ligação, em que o referido antigénio ou determinante antigénico é um péptido A $\beta$ -6, e em que o referido segundo local de ligação é seleccionado do grupo que consiste em (i) um local de ligação que não ocorre naturalmente com o referido antigénio ou determinante antigénico; e (ii) um local de ligação que ocorre naturalmente com o referido antigénio ou determinante antigénico, em que o referido segundo local de ligação é capaz de se associar ao referido primeiro local de ligação através de pelo menos uma ligação não peptídica; e em que o referido antigénio ou deter-

minante antigénico e referida partícula central interagem através da referida associação para formar uma fileira de antígeno ordenada e repetitiva.

Os fragmentos A $\beta$  da presente invenção são solúveis e geralmente não formam agregados. Além disso, estão ligados, e preferentemente ligados de forma covalente, a uma partícula central e VLP, respectivamente. Assim, as composições da invenção não têm o risco de induzir efeitos tóxicos tais como formar núcleos de deposição amilóide.

Uma descoberta inesperada desta invenção é que um teor elevado de anticorpos com ligação cruzada com A $\beta$  solúvel e placas amilóides DA poderia ser obtido com uma composição compreendendo o péptido A $\beta$ 1-6 ligado a uma partícula central e VLP, respectivamente. Em particular, mostrou-se que as VLP medeiam a indução de anticorpos contra antígenos próprios, quebrando deste modo a auto-tolerância (WO 02/056905). Além disso, a pequena dimensão deste epitopo evita a presença de epitopos da célula T, proporcionando deste modo novas composições que não induzem respostas de células T específicas para A $\beta$ . Além disso, os anticorpos cuja resposta foi estimulada não se ligam a PPA em secções de cérebro. Assim, a presente invenção proporciona uma composição de vacina segura para a prevenção e para o tratamento da DA.

Mais especificamente, a invenção proporciona uma composição que compreende uma fileira de antígenos ou

determinantes antigénicos ordenados e repetitivos, e por este meio em particular conjugados péptido A $\beta$  1-6 VLP. Mais especificamente, a invenção proporciona uma composição compreendendo uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN e pelo menos um péptido A $\beta$ 1-6 a ela ligado. A invenção proporciona também um processo para a produção, respectivamente, dos conjugados e das fileiras ordenadas e repetitivas. As composições da invenção são úteis na produção de vacinas para o tratamento da doença de Alzheimer e como vacina terapêutica para prevenir ou evitar a doença de Alzheimer e induzir respostas imunitárias de forma eficiente, em particular respostas de anticorpos. Além disso, as composições da invenção são particularmente úteis para induzir de forma eficiente respostas imunitárias auto-específicas no contexto indicado.

Na presente invenção, o péptido A $\beta$ 1-6 está ligado, respectivamente, a uma partícula central e VLP tipicamente de um modo orientado, resultando numa fileira de antígeno peptídico A $\beta$ 1-6 ordenado e repetitivo. Além disso, a estrutura altamente repetitiva e organizada, respectivamente, das partículas centrais e VLPs medeia a apresentação do péptido A $\beta$  de um modo altamente ordenado e repetitivo, conduzindo a uma fileira de antígeno altamente organizada e repetitiva. Além disso, a ligação do péptido A $\beta$ 1-6, respectivamente, à partícula central e VLP, proporciona epitopos de células T auxiliares, uma vez que a partícula central e VLP é estranha ao hospedeiro imunizado, respectivamente, com a fileira partícula central-péptido

A $\beta$ 1-6 e fileira CLP-péptido A $\beta$ 1-6. Estas fileiras diferem de conjugados da técnica anterior, em particular, pela sua estrutura altamente organizada, pelas dimensões, e pela repetição do antígeno na superfície da fileira.

Num aspecto da invenção, o péptido A $\beta$ 1-6 é sintetizado quimicamente, enquanto que, respectivamente, a partícula do núcleo e a VLP são expressas e purificadas de um hospedeiro de expressão adequado para o enrolamento e a formação, respectivamente, da partícula central e da VLP. A fileira do péptido A $\beta$ 1-6 é depois montada através da ligação do péptido A $\beta$ 1-6, respectivamente, à partícula central e ao VLP.

Noutro aspecto, a presente invenção proporciona uma composição compreendendo (a) uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN, e (b) pelo menos um antígeno ou determinante antigénico, em que o referido antígeno ou determinante antigénico é um péptido A $\beta$ 1-6, e em que o referido pelo menos um antígeno ou determinante antigénico está ligado à referida partícula semelhante a vírus.

Ainda noutro aspecto, a presente invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo (a) a composição da invenção, e (b) um veículo farmacêuticamente aceitável.

Ainda noutro aspecto, a presente invenção

proporciona uma composição de vacina compreendendo uma composição, em que a referida composição compreende (a) uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN; e (b) pelo menos um antígeno ou determinante antigénico, em que o referido antígeno ou determinante antigénico é um péptido A $\beta$ 1-6; e em que o referido pelo menos um antígeno ou determinante antigénico está ligado à referida partícula semelhante a vírus.

Noutro aspecto, a presente invenção proporciona um método de imunização compreendendo a administração da composição da invenção, a composição farmacêutica da invenção ou a vacina da invenção a um animal.

Ainda noutro aspecto, a presente revelação proporciona um processo para a produção de uma composição da invenção compreendendo (a) proporcionar uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN, e (b) proporcionar pelo menos um antígeno ou determinante antigénico, em que o referido antígeno ou determinante antigénico é um péptido A $\beta$ 1-6; (c) combinar a referida partícula semelhante a vírus e o referido antígeno ou determinante antigénico de modo a que o pelo menos um antígeno ou determinante antigénico está ligado à referida partícula semelhante a vírus.

De modo análogo, a presente invenção proporciona um processo para a produção de uma composição da reivindicação 1 compreendendo: (a) proporcionar uma partícula



central com pelo menos um primeiro local de ligação em que a referida partícula central é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN; (b) proporcionar pelo menos um antígeno ou determinante antigénico com pelo menos um segundo local de ligação, em que o referido antígeno ou determinante antigénico é um péptido A $\beta$ 1-6, e em que o referido pelo menos um segundo local de ligação é seleccionado do grupo que consiste em (i) um local de ligação que não ocorre naturalmente com o referido antígeno ou determinante antigénico; e (ii) um local de ligação que ocorre naturalmente com o referido antígeno ou determinante antigénico; e em que o referido segundo local de ligação é capaz de se associar ao primeiro local de ligação através de pelo menos uma ligação não peptídica; e (c) combinar a referida partícula central e o referido pelo menos um antígeno ou determinante antigénico, em que o referido antígeno ou determinante antigénico e a referida partícula central interagem através da referida associação para formar uma fileira de antígeno ordenada e repetitiva.

Ainda noutro aspecto, a presente invenção proporciona a utilização de uma composição da reivindicação 1 para o fabrico de um medicamento para o tratamento da doença de Alzheimer.

Ainda noutro aspecto, a presente invenção proporciona a utilização de uma composição da reivindicação 1 para a preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico ou profilático da doença de Alzheimer. Além

disso, ainda noutro aspecto, a presente invenção proporciona para uma utilização de uma composição da reivindicação 1, seja isoladamente ou em combinação com outros agentes, ou com ausência explícita de substâncias específicas tais como adjuvantes, para o fabrico de uma composição, composição farmacêutica, vacina, fármaco ou medicamento para a terapia ou a profilaxia da doença de Alzheimer, e/ou para estimular o sistema imunitário de mamíferos.

Deste modo, a invenção proporciona, em particular, composições de vacina que são adequadas para a prevenção e/ou atenuar a doença de Alzheimer ou doenças a ela relacionadas. A invenção proporciona ainda, respectivamente, métodos de imunização e vacinação, para prevenir e/ou atenuar a doença de Alzheimer ou condições com ela relacionadas em humanos. As composições da invenção podem ser usadas profilaticamente ou terapêuticamente.

Em realizações específicas, a invenção proporciona métodos para a prevenção e/ou o atenuar da doença de Alzheimer ou de condições a ela relacionadas que são causadas ou exacerbadas pelos produtos genéticos "próprios", ou seja, "antígenos próprios" tal como aqui utilizado. Em realizações relacionadas, a invenção proporciona métodos para a indução de respostas imunológicas, respectivamente, em animais e indivíduos, que conduzem à produção de anticorpos que previnem e/ou atenuam a doença de Alzheimer ou condições com ela relacionadas, que são causadas ou exacerbadas por produtos genéticos "próprios".

Como será entendido por alguém competente na técnica, quando composições da invenção são administradas a um animal ou a um humano, podem estar numa composição que contém sais, tampões, adjuvantes, ou outras substâncias que são desejáveis para melhorar a eficácia da composição. Exemplos de materiais adequados para utilização na preparação de composições farmacêuticas são proporcionadas em numerosas fontes incluindo Remington's Pharmaceutical Sciences (Osol, A, ed., Mack Publishing Co. (1990)).

Composições da invenção são consideradas "farmacologicamente aceitáveis" se a sua administração puder ser tolerada por um receptor individual. Além disso, as composições da invenção serão administradas numa "quantidade terapeuticamente eficaz" (ou seja, numa quantidade que produz um efeito fisiológico desejado).

As composições da presente invenção podem ser administradas por vários métodos conhecidos na técnica, mas serão normalmente administrados por injeção, infusão, inalação, administração oral, ou outros métodos físicos adequados. As composições podem alternativamente ser administradas de forma intramuscular, intravenosa, ou subcutânea. Componentes de composições para administração incluem soluções e suspensões aquosas (por exemplo, solução salina fisiológica) ou não aquosas estéreis. Exemplos de solventes não aquosos são propileno glicol, polietileno glicol, óleos vegetais tais como azeite, e ésteres

orgânicos injectáveis tais como oleato de etilo. Podem ser utilizados veículos ou pensos oclusivos para aumentar a permeabilidade da pele e potenciar a absorção do antigénio.

Outras realizações da presente invenção serão evidentes a alguém competente na técnica à luz daquilo que é conhecido na técnica, dos seguintes desenhos e descrição da invenção, e das reivindicações.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIG. 1 apresenta o gel de SDS-PAGE, corrido em condições redutoras, que apresenta o resultado da ligação do péptido A $\beta$ 1-6 (NH<sub>2</sub>-DAEFRHGGC-CONH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 77) à VLP da proteína da cápside Q $\beta$ .

FIG. 2 apresenta a análise por ELISA dos anticorpos específicos para A $\beta$ 1-6 em soro de ratinhos imunizados com o péptido A $\beta$ 1-6 ligado à VLP da proteína da cápside Q $\beta$ .

FIG. 3 apresenta a análise por ELISA dos anticorpos específicos para A $\beta$ 1-40 em soro de ratinhos imunizados com o péptido A $\beta$ 1-6 ligado à VLP da proteína da cápside Q $\beta$ .

FIG. 4 A-B apresenta uma secção do cérebro de um ratinho APP23 (A) e uma secção do córtex entorrinal de um paciente DA (B) corado com soro de ratinhos imunizados com o péptido A $\beta$ 1-6 ligado à VLP da proteína da cápside Q $\beta$ .

FIG. 5 A-E apresenta secções do cérebro de um ratinho APP23 corado com soro de ratinhos imunizados com o péptido A $\beta$ 1-6 ligado à VLP da proteína da cápside Q $\beta$ , ou com um antissoro de coelho policlonal específico para a extremidade C de PPA humana ou de ratinho.

FIG. 6 apresenta o resultado da imunização de macacos Rhesus com A $\beta$ 1-6 humano ligado à VLP da proteína da cápside Q $\beta$ , tal como medido num teste ELISA.

FIG. 7 apresenta o resultado da ligação a placas de soro de macacos imunizados com A $\beta$ 1-6 humano ligado à VLP da proteína da cápside Q $\beta$ , tal como medido por histologia em placas humanas DA e de ratinho transgénico.

FIG. 8 apresenta a análise por SDS-PAGE da ligação A $\beta$ 1-6 murino a AP205 VLP.

FIG. 9 apresenta o resultado da imunização de ratinhos com A $\beta$ 1-6 murino ligado a AP205 tal como medido num teste ELISA.

FIG. 10 apresenta a análise por ELISA dos teores anti-A $\beta$ 40 e anti-A $\beta$ 42 no soro de ratinhos transgénicos "Swedish/London" imunizados com QphA $\beta$ 1-6 entre os 9,5 e os 19 meses de idade.

FIG. 11 apresenta coloração imuno-histoquímica de secções de cérebro de ratinhos transgénicos "Swedish/London" imunizados com QphA $\beta$ 1-6 ou PBS.

FIG. 12 apresenta a quantificação da deposição de placa em ratinhos transgénicos "Swedish/London" imunizados com QphA $\beta$ 1-6, Q $\beta$  ou PBS entre os 9,5 e os 19 meses de idade.

FIG. 13 apresenta a quantificação da deposição de placa em ratinhos transgénicos "Swedish/London" imunizados com QphA $\beta$ 1-6, ou PBS entre os 13,5 e os 19 meses de idade.

FIG. 14 apresenta a análise por ELISA dos teores de anti-A $\beta$ 40 e anti-A $\beta$ 42 no soro de ratinhos transgénicos "Swedish" imunizados com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6.

FIG. 15 apresenta a coloração imuno-histoquímica de secções

do cérebro de ratinhos transgênicos "Swedish" imunizados com Q $\beta$ hA $\beta$ -6 ou PBS.

FIG. 16 apresenta a quantificação da deposição de placa em ratinhos transgênicos "Swedish" imunizados com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 ou PBS.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Excepto se definido de outro modo, todos os termos científicos e técnicos aqui utilizados têm os mesmos significados que aqueles convencionalmente entendidos por alguém competente na técnica à qual esta invenção pertence. Apesar de todos os métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos poderem ser utilizados na prática ou no teste da presente invenção, são aqui de seguida descritos os métodos e materiais preferidos.

##### 1. Definições:

Péptido A $\beta$ 1-6: Um péptido A $\beta$ 1-6 tal como aqui utilizado refere-se a péptidos com uma sequência que corresponde à sequência A $\beta$ 1-6 humana, ou homóloga à sequência A $\beta$ 1-6 humana. As sequências homólogas à sequência A $\beta$ 1-6 humana, incluem, mas não se limitam às sequências A $\beta$ 1-6 de outras espécies, incluindo deste modo, mas sem limitação, a sequência de A $\beta$ 1-6 de primata, coelho, porquinho-da-índia, *Xenopus Laevis*, sapo, ratinho e rato. As sequências A $\beta$ 1-6 de *Xenopus Laevis* ou sapo, apesar de diferentes de A $\beta$ 1-6 humano em duas posições, têm mutações

conservadas (Ala-Ser, Phe-Tyr), e são ainda considerados homólogos a A $\beta$ 1-6 de acordo com esta definição. De acordo com a presente invenção, no entanto, o péptido A $\beta$ 1-6 é tipicamente modificado, de tal modo que um segundo local de ligação esteja a ele ligado. Preferentemente, o segundo local de ligação é modificado com um agente de ligação ou um aminoácido de ligação compreendendo um segundo local de ligação para a ligação a, respectivamente, uma partícula central e VLP. Quando aqui se refere a péptidos A $\beta$ 1-6, são abrangidos um péptido A $\beta$ 1-6 modificado, tal como indicado acima, ou seja, péptidos A $\beta$ 1-6 com um segundo local de ligação a eles ligados. No entanto, tipicamente as modificações são explicitamente indicadas nesta especificação. Realizações mais preferidas de um péptido A $\beta$ 1-6 em que é um antigénio ou determinante antigénico de acordo com a presente invenção tornam-se evidentes à medida que esta especificação prossegue.

Adjuvante: O termo "adjuvante" tal como aqui utilizado refere-se a estimuladores não específicos da resposta imunitária ou substâncias que permitem a geração de um depósito no hospedeiro que quando combinado, respectivamente, com a vacina e a composição farmacêutica, da presente invenção pode proporcionar uma resposta imunitária ainda mais aumentada. Pode ser utilizada uma variedade de adjuvantes. Exemplos incluem o adjuvante de Freund completo e incompleto, hidróxido de alumínio e muramildipéptido modificado. Outros adjuvantes são geles minerais tais como hidróxido de alumínio, substâncias

tensioactivas tais como lisolecitina, polióis pluronic, polianióes, péptidos, emulsões de óleos, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol e adjuvantes humanos potencialmente úteis tais como BCG (bacilo Clamette-Guerin) e *Corynebacterium parvum*. Tais adjuvantes são também bem conhecidos na técnica. Outros adjuvantes que podem ser administrados com as composições da invenção incluem, mas não se limitam a, imunomodulador monofosforil lípido, AdjuVax 100a, QS-21, QS-18, CRL1005, sais de alumínio (Alum), MF-59, OM-174, OM-197, OM-294, e tecnologia adjuvante Virossomal. Os adjuvantes podem também compreender uma mistura destas substâncias.

Fracções de saponina imunologicamente activas com actividade adjuvante derivadas da casca da árvore Sul Americana Quillaja Saponaria Molina são conhecidas na técnica. Por exemplo QS21, é uma fracção purificada por HPLC da árvore Quillaja Saponaria Molina e o método para a sua purificação é revelado (como QA21) em U.S. Pat. No. 5,057,540. A saponina de Quillaja foi também revelada como um adjuvante por Scott et al., Int. Archs. Allergy Appl. Immun., 1985, 77, 409. São conhecidos na técnica o monofosforil lípido A e seus derivados. Um derivado preferido é o monofosforil lípido A 3 de-o-acilado, e é conhecido da Patente do Reino Unido No. 2220211. Outros adjuvantes preferidos são descritos em WO00/00462.

No entanto, uma característica vantajosa da presente invenção é a elevada imunogenicidade das



composições da invenção. Tal como já aqui referido ou como se tornará evidente à medida que decorre a especificação, são proporcionadas composições farmacêuticas e vacinas desprovidas de adjuvantes, como alternativa suplementar ou realizações preferidas, conduzindo a vacinas e composições farmacêuticas para o tratamento de DA desprovidas de adjuvantes e, deste modo, com um perfil de segurança superior uma vez que os adjuvantes podem causar efeitos secundários. O termo "desprovido" tal como aqui utilizado no contexto de vacinas e composições farmacêuticas para o tratamento de DA refere-se a vacinas e composições farmacêuticas que são utilizadas sem adjuvantes.

Aminoácido de ligação: Um "aminoácido de ligação", ou apenas denominado "agente de ligação" nesta especificação, tal como aqui utilizado, ou associa o antigénio ou determinante antigénico com o segundo local de ligação, ou mais preferentemente, compreende já ou contém o segundo local de ligação, tipicamente, mas não necessariamente, na forma de um resíduo de aminoácido, preferentemente na forma de um resíduo cisteína. O termo "aminoácido de ligação" tal como aqui utilizado, no entanto, não pretende implicar que tal aminoácido de ligação consiste exclusivamente de resíduos de aminoácidos, mesmo se um aminoácido de ligação consistindo em resíduos de aminoácidos seja uma realização preferida da presente invenção. Os resíduos de aminoácido do aminoácido de ligação são preferentemente compostos por aminoácidos que ocorrem naturalmente ou aminoácidos não naturais conhecidos na

técnica, todos isómeros L ou todos isómeros D ou misturas destes. No entanto, um aminoácido de ligação compreendendo uma molécula com um grupo sulfidrilo ou um resíduo cisteína está também abrangido no âmbito da invenção. Tal molécula compreende preferentemente uma unidade alquilo C1-C6, cicloalquilo (C5,C6), arilo ou heteroarilo. No entanto, para além de um aminoácido de ligação, um agente de ligação compreendendo preferentemente uma unidade alquilo C1-C6, cicloalquilo (C5,C6), arilo ou heteroarilo e desprovida de quaisquer aminoácidos também será abrangido no âmbito da invenção. A associação entre o antigénio ou o determinante antigénico ou opcionalmente o segundo local de ligação e o aminoácido de ligação é preferentemente por intermédio de pelo menos uma ligação covalente, mais preferentemente por intermédio de pelo menos uma ligação peptídica.

Animal: Tal como aqui utilizado, o termo "animal" pretende incluir, por exemplo, humanos, carneiros, alces, veados, veados-mula, visons, mamíferos, macacos, cavalos, gado, porcos, cabras, cães, gatos, ratos, ratinhos, pássaros, galinhas, répteis, peixes, insectos e aracnídeos.

Anticorpo: Tal como aqui utilizado, o termo "anticorpo" refere-se a moléculas que são capazes de se ligar a um epitopo ou determinante antigénico. O termo pretende incluir anticorpos completos e seus fragmentos de ligação a antigénio, incluindo anticorpos de cadeia simples. Mais preferentemente os anticorpos são fragmentos de anticorpos que se ligam a antigénios humanos e incluem,

mas não se limitam a, Fab, Fab' e F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fvs de cadeia simples (scFv), anticorpos de cadeia simples, Fvs com ligações dissulfureto (sdFv) e fragmentos compreendendo um domínio V<sub>L</sub> ou V<sub>H</sub>. Os anticorpos podem ser de qualquer origem animal, incluindo pássaros e mamíferos. Preferentemente, os anticorpos são humanos, murinos, de coelho, de cabra, de porquinho-da-índia, de camelo, de cavalo ou de galinha. Tal como aqui utilizado, anticorpos "humanos" incluem anticorpos com a sequência de aminoácidos de uma imunoglobulina humana e incluem anticorpos isolados de bibliotecas de imunoglobulinas humanas ou de animais transgênicos para uma ou mais imunoglobulinas humanas e que não expressam imunoglobulinas endógenas, tal como descrito, por exemplo, na Patente U.S. No. 5,393,598 de Kucherlapati et al.

Antigénio: Tal como aqui utilizado, o termo "antigénio" refere-se a uma molécula capaz de ser ligada por um anticorpo ou um receptor de célula T (TCR) se apresentada por moléculas MHC. O termo "antigénio", tal como aqui utilizado, também abrange epitopos de células T. Um antigénio é adicionalmente capaz de ser reconhecido pelo sistema imunitário e/ou capaz de induzir uma resposta imunitária humoral e/ou uma resposta imunitária celular que conduza à activação de linfócitos B e/ou T. Isto pode, no entanto, exigir que, pelo menos em certos casos, o antigénio contenha ou esteja ligado a um epitopo de uma célula Th e seja proporcionado no adjuvante. Um antigénio pode ter um ou mais epitopos (epitopos B e T). A reacção

específica a que se refere acima pretende indicar que o antígeno irá reagir preferencialmente, tipicamente de um modo altamente selectivo, com o seu anticorpo correspondente ou TCR e não com a multitude de outros anticorpos ou TCRs que podem ser evocados por outros antígenos. Antígenos tal como aqui utilizado também pode referir-se a misturas de vários antígenos individuais.

Determinante antigénico: tal como aqui utilizado, "determinante antigénico" pretende referir-se àquela porção de um antígeno que é especificamente reconhecido por linfócitos B ou T. Os linfócitos B que respondem a determinantes antigénicos produzem anticorpos, enquanto que os linfócitos T respondem a determinantes antigénicos por proliferação e estabelecimento de funções efectoras críticas para a mediação da imunidade celular e/ou humoral.

Associação: Tal como aqui utilizado, o termo "associação" quando aplicado ao primeiro e ao segundo local de ligação, refere-se à ligação do primeiro e do segundo local de ligação que é preferentemente por intermédio de pelo menos uma ligação não peptídica. A natureza da associação pode ser covalente, iónica, hidrofóbica, polar ou qualquer uma destas combinações, preferentemente a natureza da associação é covalente.

Local de ligação, Primeiro: Tal como aqui utilizada, a frase "primeiro local de ligação" refere-se a um elemento de origem não natural ou natural, ao qual o

segundo local de ligação localizado no antigénio ou no determinante antigénico pode associar-se. O primeiro local de ligação pode ser uma proteína, um polipéptido, um aminoácido, um péptido, um açúcar, um polinucleótido, um polímero natural ou sintético, um metabolito secundário ou composto (biotina, fluoresceína, retinol, digoxigenina, iões metálicos, fenilmetilsulfonilfluoreto), ou uma combinação destes, ou um seu grupo quimicamente reactivo. O primeiro local de ligação está localizado tipicamente e preferentemente à superfície, da partícula central tal como, preferentemente, a partícula semelhante a vírus. Estão presentes na superfície da partícula central e semelhante a vírus, respectivamente, múltiplos primeiros locais de ligação, tipicamente numa configuração repetitiva.

Local de ligação, Segundo: Tal como aqui utilizada, a frase "segundo local de ligação" refere-se a um elemento associado com o antigénio ou o determinante antigénico ao qual o primeiro local de ligação localizado, respectivamente, na superfície da partícula central e da partícula semelhante a vírus se pode associar. O segundo local de ligação do antigénio ou determinante antigénico pode ser uma proteína, um polipéptido, um péptido, um açúcar, um polinucleótido, um polímero natural ou sintético, um metabolito secundário ou composto (biotina, fluoresceína, retinol, digoxigenina, iões metálicos, fenilmetilsulfonilfluoreto), ou uma combinação destes, ou um seu grupo quimicamente reactivo. Pelo menos um segundo

local de ligação está presente no antígeno ou determinante antigénico. O termo "antígeno ou determinante antigénico com pelo menos um segundo local de ligação" refere-se, deste modo, a um antígeno ou a uma construção antigénica compreendendo pelo menos o antígeno ou determinante antigénico e o segundo local de ligação. No entanto, em particular para um segundo local de ligação, que é de origem não natural, ou seja, não ocorre naturalmente no interior do antígeno ou do determinante antigénico, estes antígenos ou construções antigénicas compreendem um "aminoácido de ligação".

Ligado: Tal como aqui utilizado, o termo "ligado" refere-se à ligação que pode ser covalente, por exemplo, através de um acoplamento químico, ou não covalente, por exemplo, interacções iónicas, interacções hidrofóbicas, ligações de hidrogénio, etc. As ligações covalentes podem ser, por exemplo ligações éster, éter, fosfoéster, amida, peptídica, imida, ligações carbono-enxofre, ligações carbono-fósforo e semelhantes. O termo "ligado" é mais amplo do que e inclui termos tais como "acoplado" w "fundido".

Proteína(s) de cápside: Tal como aqui utilizado, o termo "proteína(s) de cápside" refere-se a proteína(s) de um bacteriófago de ARN capaz de ser incorporado no interior do conjunto da cápside do bacteriófago de ARN. No entanto, quando se refere ao produto genético específico do gene da proteína de cápside dos bacteriófagos de ARN, é utilizado o termo "CP". Por exemplo, o produto genético específico do

gene da proteína de cápside do bacteriófago de ARN Q $\beta$  é referido como "Q $\beta$  CP", enquanto que as "proteínas de cápside" do bacteriófago Q $\beta$  compreendem a "Q $\beta$  CP" assim como a proteína A1. A cápside do bacteriófago Q $\beta$  é composta principalmente por Q $\beta$  CP, com um pequeno teor da proteína A1. Do mesmo modo, a proteína de cápside de VLP Q $\beta$  contém principalmente Q $\beta$  CP, com um pequeno teor de proteína A1.

Partícula central: Tal como aqui utilizado, o termo "partícula central" refere-se a uma estrutura rígida com uma organização repetitiva inerente. Uma partícula central tal como aqui utilizada pode ser o produto de um processo sintético ou o produto de um processo biológico.

Acoplado: O termo "acoplado", tal como aqui utilizado, refere-se à ligação através de ligações covalentes ou por interações não covalentes fortes, tipicamente e preferentemente á ligação por ligações covalentes. Qualquer método normalmente utilizado pelos peritos na técnica para o acoplamento de materiais biologicamente activos pode ser usado na presente invenção.

Quantidade Eficaz: Como aqui utilizado, o termo "quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade necessária ou suficiente para realizar um efeito biológico desejado. Uma quantidade eficaz da composição seria a quantidade que consegue este resultado seleccionado, e tal quantidade poderia ser determinada de forma rotineira por um perito na técnica. Por exemplo, uma quantidade eficaz para tratar uma

deficiência do sistema imunitário poderia ser aquela quantidade necessária para causar a activação do sistema imunitário, resultando no desenvolvimento de uma resposta imunitária específica para o antigénio aquando da exposição ao antigénio. O termo é também sinónimo de "quantidade suficiente".

A quantidade eficaz para qualquer aplicação particular pode variar dependendo de factores como a doença ou condição a ser tratada, a composição particular a ser administrada, o tamanho do indivíduo, e/ou a gravidade da doença ou condição. Alguém competente na técnica pode determinar empiricamente a quantidade eficaz de uma composição particular da presente invenção sem necessitar de experimentação indevida.

Epitopo: Tal como aqui utilizado, o termo "epitopo" refere-se a porções contínuas ou descontínuas de um polipéptido com actividade antigénica ou imunogénica num animal, preferentemente num mamífero, e preferencialmente num humano. Um epitopo é reconhecido por um anticorpo ou uma célula T através do seu receptor de célula T no contexto de uma molécula MHC. Um "epitopo imunogénico", tal como aqui utilizado, é definido como uma porção de um polipéptido que desencadeia uma resposta de anticorpo ou induz uma resposta de célula T num animal, tal como determinada por qualquer método conhecido na técnica (Ver, por exemplo, Geysen et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA 81:3998-4002 (1983)). O termo "epitopo antigénico", tal



como aqui utilizado, é definido como uma porção de uma proteína à qual um anticorpo pode ligar o seu antígeno de forma imuno específica tal como determinado por qualquer método bem conhecido na técnica. A ligação imuno específica exclui a ligação não específica mas não exclui necessariamente a reactividade cruzada com outros antígenos. Os epitopos antigénicos não necessitam necessariamente de ser imunogénicos. Os epitopos antigénicos podem também ser epitopos de células T, em cujo caso podem ser ligados imuno especificamente por um receptor de célula T no contexto de uma molécula MHC.

Um epitopo pode compreender 3 aminoácidos numa conformação espacial que é única ao epitopo. Geralmente, um epitopo consiste em pelo menos 5 de tais aminoácidos, e mais usualmente, consiste em pelo menos 8-10 de tais aminoácidos. Se o epitopo for uma molécula orgânica, pode ser tão pequeno quanto nitrofenilo.

Fusão: Tal como aqui utilizado, o termo "fusão" refere-se à combinação de sequências de aminoácidos de diferentes origens numa cadeia polipeptídica por combinação em grelha das suas sequências nucleotídicas codificantes. O termo "fusão" abrange explicitamente fusões internas, ou seja, inserção de sequências de origem diferente numa cadeia polipeptídica, além da fusão com uma das suas terminações.

Resposta imunitária: Tal como aqui utilizado, o

termo "resposta imunitária" refere-se a uma resposta imunitária humoral e/ou resposta imunitária celular que conduz à activação ou proliferação de linfócitos B e/ou T e/ou células apresentadoras de antigénios. No entanto, nalguns casos, as respostas imunitárias podem ser de baixa intensidade e tornam-se apenas detectáveis quando se utiliza pelo menos uma substância de acordo com a invenção. "Imunogénico" refere-se a um agente utilizado para estimular o sistema imunitário de um organismo vivo, de modo que uma ou mais funções do sistema imunitário são aumentadas e direccionadas para o agente imunogénico. Um "polipéptido imunogénico" é um polipéptido que provoca uma resposta imunitária celular e/ou humoral, seja isoladamente ou ligado a um veículo na presença ou ausência de um adjuvante. Preferentemente, a célula apresentadora de antigénio pode ser activada.

Uma substância que "aumenta" uma resposta imunitária refere-se a uma substância em que uma resposta imunitária observada é superior ou intensificada ou desviada de qualquer modo com a adição da substância em comparação com a mesma resposta imunitária medida sem a adição da substância. Por exemplo, a actividade lítica das células T citotóxicas pode ser medida, por exemplo, utilizando um ensaio de libertação de  $^{51}\text{Cr}$ , em amostras obtidas com e sem a utilização da substância durante a imunização. A quantidade de substância à qual a actividade lítica CTL é aumentada em comparação com actividade lítica CTL sem a substância é dita ser uma quantidade suficiente

para aumentar a resposta imunitária do animal em relação ao antigénio. Numa realização preferida, a resposta imunitária é aumentada por um factor de pelo menos cerca de 2, mais preferentemente por um factor de cerca de 3 ou mais. Uma quantidade ou tipo de citocinas secretadas pode também ser alterado. Alternativamente, a quantidade de anticorpos induzidos ou as suas subclasses podem ser alteradas.

Imunização: Tal como aqui utilizado, os termos "imunizar" e "imunização" ou relacionados referem-se a conferir a capacidade de estabelecer uma resposta imunitária substancial (compreendendo anticorpos e/ou imunidade celular tal como efector CTL) contra um antigénio ou epitopo alvo. Estes termos não requerem que seja criada uma imunidade completa, mas que seja produzida uma resposta imunitária que é substancialmente superior à linha de base. Por exemplo, um mamífero pode ser considerado estar imunizado contra um antigénio alvo se a resposta imunitária celular e/ou humoral ao antigénio alvo ocorre seguindo a aplicação dos métodos da invenção.

Origem natural: Tal como aqui utilizado, o termo "origem natural" significa que a totalidade ou as suas partes não são sintéticas e existem ou são produzidas na natureza.

Não natural: Tal como aqui utilizado, o termo geralmente significa não da natureza, mais especificamente o termo significa da acção humana.

Origem não natural: Tal como aqui utilizado, o termo "origem não natural" geralmente significa sintético ou não da natureza, mais especificamente, o termo significa da acção humana.

Fileira de antigénio ou determinante antigénico ordenado e repetitivo: Tal como aqui utilizado, o termo "fileira de antigénio ou determinante antigénico ordenado e repetitivo" geralmente refere-se a um padrão repetido de antigénio ou determinante antigénico, caracterizado por um arranjo espacial típico e preferentemente uniforme dos antigénios ou determinantes antigénicos em relação, respectivamente, à partícula central e partícula semelhante a vírus. Numa realização da invenção, o padrão repetido pode ser um padrão geométrico. Exemplos típicos e preferidos de fileiras de antigénios ou determinantes antigénicos ordenados e repetitivos adequados são aqueles que possuem estritamente ordens para-cristalinas repetitivas de antigénios ou determinantes antigénicos, preferentemente com espaçamentos de 0,5 a 30 nanómetros, mais preferentemente 5 a 15 nanómetros.

Polipéptido: Tal como aqui utilizado, o termo "polipéptido" refere-se a uma molécula composta por monómeros (aminoácidos) ligados linearmente por ligações amida (também conhecidas como ligações peptídicas). Indica uma cadeia molecular de aminoácidos e não se refere a um comprimento específico do produto. Assim, péptidos, dipé-

ptidos, tripéptidos, oligopéptidos e proteínas estão incluídos na definição de polipéptido. O termo também pretende referir-se a modificações pós-expressão do polipéptido, por exemplo, glicosilações, acetilações, fosforilações, e semelhantes. Um polipéptido recombinante ou derivado não é necessariamente traduzido de uma sequência de ácido nucleico designada. Pode também ser gerado de qualquer modo, incluindo síntese química.

Resíduo: Tal como aqui utilizado, o termo "resíduo" pretende significar um aminoácido específico num esqueleto polipeptídico ou cadeia lateral.

Antigénio próprio: Tal como aqui utilizado, o termo "antigénio próprio" refere-se a proteínas codificadas pelo ADN do hospedeiro e produtos gerados por proteínas ou ARN codificados pelo ADN do hospedeiro são definidos como próprios. Além disso, proteínas que resultam de uma combinação de duas ou várias moléculas próprias ou que representam uma fracção de uma molécula própria e proteínas que têm uma homologia elevada a moléculas próprias tais como definidas acima (>95%, preferentemente >97%, preferivelmente >99%) podem também ser consideradas próprias.

Tratamento: Tal como aqui utilizados, os termos "tratamento", "tratar" ou "tratado" referem-se a profilaxia e/ou terapia. Quando utilizado em relação a uma doença infecciosa, por exemplo, o termo refere-se a um tratamento profilático que aumenta a resistência de um indivíduo á

infecção com um patogénio ou, noutras palavras, diminui a probabilidade de que o indivíduo se torne infectado pelo patogénio ou apresente sinais de doença que possam ser atribuídos à infecção, assim como um tratamento após o indivíduo ter sido infectado de modo a combater a infecção, por exemplo, reduzir ou eliminar a infecção ou evitar que se torne pior.

Vacina: Tal como aqui utilizado, o termo "vacina" refere-se a uma formulação que contém a composição da presente invenção e que está numa forma que é capaz de ser administrada a um animal. Tipicamente, a vacina compreende um meio em solução aquosa tamponizado ou salino convencional, no qual a composição da presente invenção é suspensa ou dissolvida. Nesta forma, a composição da presente invenção pode ser usada convenientemente para prevenir, melhorar ou de outro modo tratar uma condição. Aquando da introdução num hospedeiro, a vacina é capaz de provocar uma resposta imunitária incluindo, mas sem limitação, a produção de anticorpos e/ou citocinas e/ou a activação de células T citotóxicas, células apresentadoras de antígenos, células T auxiliares, células dendríticas e/ou outras respostas celulares.

Opcionalmente, a vacina da presente invenção inclui adicionalmente um adjuvante que pode estar presente numa maior ou menor proporção em relação ao composto da presente invenção.

Partícula semelhante a vírus (VLP): Tal como aqui utilizado, o termo "partícula semelhante a vírus" refere-se a uma estrutura que se assemelha a uma partícula viral. Além disso, uma partícula semelhante a vírus de acordo com a invenção é não replicativa e não infecciosa dado que carece da totalidade ou de parte do genoma viral, em particular os componentes replicativos e infecciosos do genoma viral. Uma partícula semelhante a vírus de acordo com a invenção pode conter ácido nucleico distinto do seu genoma. Uma realização típica e preferida de uma partícula semelhante a vírus de acordo com a presente invenção é uma cápside viral, tal como a cápside viral do bacteriófago de ARN correspondente. Os termos "cápside viral" ou "cápside", tal como aqui utilizados de forma intermutável, referem-se à construção macromolecular composta por subunidades de proteína viral. Tipicamente e preferivelmente, as subunidades de proteína viral juntam-se, respectivamente, numa cápside viral e cápside, tendo uma estrutura com uma organização repetitiva inerente, em que a referida estrutura é, tipicamente, esférica ou tubular. Por exemplo, as cápsides de bacteriófagos de ARN ou HBcAg's têm uma forma esférica e uma simetria icosaédrica. O termo "estrutura do tipo cápside" tal como aqui utilizado, refere-se a um conjunto macromolecular composto por subunidades de proteína viral que se assemelham à morfologia da cápside no sentido acima definido, mas que se desviam da construção simétrica típica enquanto mantêm um grau suficiente de ordem e repetibilidade.

Partícula semelhante a vírus de um bacteriófago: Tal como aqui utilizado, o termo "partícula semelhante a vírus de um bacteriófago" refere-se a uma partícula semelhante a vírus que se assemelha à estrutura de um bacteriófago, sendo não replicativa e não infecciosa, e não tendo pelo menos o gene ou os genes que codificam para a maquinaria de replicação do bacteriófago, e que tipicamente também não têm o gene ou os genes que codificam para a proteína ou para as proteínas responsáveis pela ligação viral ou entrada no hospedeiro. Esta definição deverá, no entanto, também abranger partículas semelhantes a vírus de bacteriófagos, nos quais o gene ou os genes acima mencionados continuam presentes mas inactivos e, como tal, também conduzem a partículas semelhantes a vírus não replicativas e não infecciosas de um bacteriófago.

VLP de proteína de cápside de bacteriófago de ARN: A estrutura de cápside formada pela auto-organização de 180 unidades de proteína de cápside de bacteriófago de ARN e opcionalmente contendo ARN hospedeiro é referida como uma "VLP de proteína de cápside de bacteriófago de ARN". Um exemplo específico é a VLP da proteína de cápside Q $\beta$ . Neste caso particular, a VLP da proteína de cápside Q $\beta$  pode ser construída exclusivamente a partir de subunidades Q $\beta$  CP (geradas pela expressão de um gene Q $\beta$  CP contendo, por exemplo, um codão de terminação TAA evitando qualquer expressão da proteína mais comprida A1 através de supressão, ver Kozlovska, T.M., et al., Intervirology 39: 9-15 (1996)), ou adicionalmente conter subunidades de proteína A1 na estrutura da cápside.



Partícula viral: O termo "partícula viral" tal como aqui utilizado refere-se à forma morfológica de um vírus. Nalguns tipos de vírus, compreende um genoma rodeado por uma cápside de proteína; outros têm estruturas adicionais (por exemplo, envelopes, caudas, etc).

Um: Quando se utiliza o termo "um" nesta apresentação, significa "pelo menos um" ou "um ou mais" excepto se indicado de outro modo.

Como será evidente aos peritos na técnica, certas realizações da invenção envolvem a utilização de tecnologias de ácidos nucleicos recombinantes, tais como clonagem, reacção em cadeia da polimerase, a purificação de ADN e de ARN, a expressão de proteínas recombinantes em células procarióticas e eucarióticas, etc. Tais metodologias são bem conhecidas pelos peritos na técnica e podem ser convenientemente encontradas em manuais de métodos laboratoriais publicados (por exemplo, Sambrook, J. et al., eds., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2a. edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.I. (1989); Ausubel, F. et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John H. Wiley & Sons, Inc. (1997)). São também descritas de modo adequado técnicas laboratoriais fundamentais para trabalhar com linhas celulares de culturas de tecidos (Celis, J., ed., Cell Biology, Academic Press, 2a edição, (1998)) e tecnologias baseadas em anticorpos (Harlow, E. e Lane, D., Antibodies: A Laboratory

Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.I. (1988); Deutscher, M.P., "Guide to Protein Purification," Meth. Enzymol. 128, Academic Press San Diego (1990); Scopes, R.K., Protein Purification Principles and Practice, 3a ed., Springer-Verlag, Nova Iorque (1994)).

## 2. Composições e Métodos para Aumentar uma Resposta Imunitária

A invenção apresentada proporciona composições e métodos para induzir uma resposta imunitária contra o péptido A $\beta$ 1-6 num animal, induzindo anticorpos capazes de se ligarem a placas amilóides A $\beta$  e A $\beta$  solúvel. As composições da invenção compreendem, ou alternativamente consistem em (a) uma partícula central com pelo menos um primeiro local de ligação em que a referida partícula central é uma VLP de um bacteriófago de ARN; e (b) pelo menos um antígeno ou determinante antigénico com pelo menos um segundo local de ligação, em que o referido antígeno ou determinante antigénico é um péptido A $\beta$ 1-6, e em que o referido segundo local de ligação é seleccionado do grupo que consiste em (i) um local de ligação que não ocorre naturalmente com o referido antígeno ou determinante antigénico; e (ii) um local de ligação que ocorre naturalmente com o referido antígeno ou determinante antigénico, em que o referido segundo local de ligação é capaz de se associar ao referido primeiro local de ligação através de pelo menos uma ligação não peptídica; e em que o referido antígeno ou determinante antigénico e

referida partícula central interagem através da referida associação para formar uma fileira de antígeno ordenada e repetitiva. Mais especificamente, composições da invenção compreendem, ou alternativamente consistem em, uma partícula semelhante a vírus e pelo menos um antígeno ou determinante antigénico, em que o referido antígeno ou determinante antigénico é um péptido A $\beta$ 1-6, e em que pelo menos um antígeno ou determinante antigénico está ligado á partícula semelhante a vírus de modo a formar uma fileira antígeno-VLP ordenada e repetitiva. Além disso, a invenção permite convenientemente ao profissional construir uma tal composição, entre outros, para o tratamento e/ou a prevenção profilática da doença de Alzheimer. Partículas semelhantes a vírus no contexto do presente pedido referem-se a estruturas que se assemelham a uma partícula viral mas que não são patogénicas. Em geral, as partículas semelhantes a vírus não possuem o genoma viral e, como tal, não são infecciosas. Ainda, as partículas semelhantes a vírus podem ser produzidas em elevadas quantidades por expressão heteróloga e podem ser facilmente purificadas.

Numa realização, a partícula central compreende, ou é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN, uma partícula de cápside viral ou uma sua forma recombinante. Qualquer bacteriófago de ARN conhecido na técnica com um revestimento e/ou estrutura proteína central ordenado e repetitivo pode ser seleccionado como partícula central da invenção; exemplos de bacteriófagos adequados incluem bacteriófago Q $\beta$ , bacteriófago R17, bacteriófago

M11, bacteriófago MX1, bacteriófago NL95, bacteriófago fr, bacteriófago GA, bacteriófago SP, bacteriófago MS2, bacteriófago f2, bacteriófago PP7 (por exemplo, ver Tabela 1 em Bachmann, M.F. e Zinkernagel, R.M., Immunol. Today 17:553-558 (1996)).

Ainda noutra realização, a invenção utiliza engenharia genética de um vírus para criar uma fusão entre uma proteína de envelope viral ordenado e repetitivo e um primeiro local de ligação sendo compreendido por, ou alternativamente ou preferentemente sendo um determinante antigénico, péptido, proteína heteróloga ou um resíduo de aminoácido reactivo à escolha. Outras manipulações genéticas conhecidas pelos peritos na técnica podem ser incluídas na construção das composições da invenção; por exemplo, pode ser desejável restringir a capacidade de replicação do vírus recombinante através de mutação genética. Além disso, o vírus usado para a presente invenção não consegue replicar devido a inactivação química ou física ou, como indicado, devido à falta de um genoma competente para a replicação. A proteína viral seleccionada para fusão ao primeiro local de ligação deverá ter uma estrutura organizada e repetitiva. A proteína viral seleccionada para fusão ao primeiro local de ligação deverá ter uma estrutura organizada e repetitiva. Tal estrutura organizada e repetitiva inclui organizações para-cristalinas com um espaçamento de 5-30 nm, preferentemente 5-15 nm, na superfície do vírus. A criação deste tipo de proteína de fusão resultará em múltiplos locais primeiros

de ligação ordenados e repetitivos na superfície do vírus e reflectirá a organização normal da proteína viral nativa. Tal como será entendido pelos peritos na técnica, o primeiro local de ligação pode ser ou ser uma parte de qualquer proteína, polipéptido, açúcar, polinucleótido, péptido (aminoácido), polímero natural ou sintético adequado, um metabolito secundário ou combinação destes que pode servir para se ligar especificamente ao antigénio ou determinante antigénico conduzindo a uma fileira ordenada e repetitiva.

Pode-se utilizar uma variedade de células hospedeiras recombinantes para produzir a partícula central baseada em vírus para ligação do antigénio ou do determinante antigénico. Assim, podem ser utilizadas numerosas células hospedeiras recombinantes na prática da invenção. São particularmente adequadas células BHK, COS, Vero, HeLa e CHO para a produção de proteínas heterólogas dado que têm o potencial de glicosilar proteínas heterólogas de um modo similar às células humanas (Watson, E. et al., *Glycobiology* 4:227, (1994)) e podem ser seleccionadas (Zang, M. et al., *Bio/Technology* 13:389 (1995)) ou geneticamente modificadas (Renner W. et al., *Biotech. Bioeng.* 4:476 (1995); Lee K. et al. *Biotech. Bioeng.* 50:336 (1996)) para crescer em meio sem soro, e também em suspensão.

A introdução dos vectores polinucleotídicos nas células hospedeiras pode ser efectuada através de métodos

descritos em manuais laboratoriais convencionais (ver, por exemplo, Sambrook, J. et al., eds., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2a. edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.I. (1989), Capítulo 9; Ausubel, F. et al., eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John H. Wiley & Sons, Inc. (1997), Capítulo 16), incluindo métodos tais como electroporação, transfecção mediada por DEAE-dextrano, transfecção, micro-injecção, transfecção mediada por lípido catiónico, transdução, "scrape loading", introdução balística e infecção. Os métodos para a introdução de sequências de ADN exógenas para células hospedeiras são discutidos em Felgner, P. et al., Patente U.S. No. 5,580,859.

Podem também ser utilizadas sequências de ARN empacotadas para infectar células hospedeiras. Estas sequências de ARN empacotadas podem ser introduzidas nas células hospedeiras adicionando-as ao meio de cultura. Quando se utilizam células de mamíferos como células hospedeiras recombinantes para a produção de partículas centrais baseadas em vírus, estas células serão geralmente crescidas em cultura de tecidos. São bem conhecidos na técnica métodos para o crescimento de células em cultura (ver, por exemplo, Celis, J., ed., CELL BIOLOGY, Academic Press, 2a edição, (1998); Sambrook, J. et al., eds., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2a. edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.I. (1989); Ausubel, F. et al., eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John H. Wiley & Sons, Inc. (1997);

Freshney, R., CULTURE OF ANIMAL CELLS, Alan R. Liss, Inc. (1983)).

Numa realização preferida, a partícula central é uma partícula semelhante a vírus, em que a partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus recombinante. O perito na técnica pode produzir VLPs utilizando tecnologia de ADN recombinante e sequências codificantes virais que estão publicamente disponíveis. Por exemplo, a sequência que codifica para um envelope viral ou para a proteína central pode ser modificada para expressão num vector de expressão de baculovírus utilizando um vector de baculovírus comercialmente disponível, sob o controlo de regulação de um promotor viral, com modificações apropriadas da sequência para permitir a ligação funcional da sequência codificante à sequência de regulação. A sequência que codifica para uma envelope viral ou proteína central pode também ser modificada para expressão, por exemplo, num vector de expressão bacteriano.

Exemplos de VLPs incluem fagos de ARN, Ty, fago fr, fago GA, fago AP205 e fago Q $\beta$ .

Tal como será facilmente evidente ao perito na técnica, a VLP da invenção não está limitada a qualquer forma específica. A partícula pode ser sintetizada quimicamente ou através de processos biológicos, que podem ser naturais ou não naturais. Por exemplo, este tipo de realização inclui uma partícula semelhante a vírus ou uma sua forma recombinante.

Numa realização mais específica, a VLP pode compreender, ou alternativamente essencialmente consistir em, ou alternativamente consistir em polipéptidos recombinantes, ou seus fragmentos, sendo seleccionados de polipéptidos recombinantes de bacteriófagos de ARN, polipéptidos recombinantes de Ty, polipéptidos recombinantes do fago fr, polipéptidos recombinantes do fago GA e polipéptidos recombinantes do fago Q $\beta$ . A partícula semelhante a vírus pode ainda compreender, ou alternativamente essencialmente consistir em, ou alternativamente consistir em, um ou mais fragmentos tais como polipéptidos, assim como variantes de tais polipéptidos. Variantes de polipéptidos podem partilhar, por exemplo, pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, ou 99% de identidade ao nível dos aminoácidos com os seus equivalentes nativos.

Numa realização preferida, a partícula semelhante a vírus compreende, consiste essencialmente em, ou alternativamente consiste em proteínas recombinantes, ou seus fragmentos, de um bacteriófago de ARN. Preferentemente, o bacteriófago de ARN é seleccionado do grupo que consiste em a) bacteriófago Q $\beta$ ; b) bacteriófago R17; c) bacteriófago fr; d) bacteriófago GA; e) bacteriófago SP; f) bacteriófago MS2; g) bacteriófago M11; h) bacteriófago MX1; i) bacteriófago NL95; k) bacteriófago f2; l) bacteriófago PP7, e m) bacteriófago AP205.

Noutra realização preferida da presente invenção,



a partícula semelhante a vírus compreende, ou alternativamente consiste essencialmente em, ou alternativamente consiste em proteínas recombinantes, ou seus fragmentos, de um bacteriófago de ARN Q $\beta$  ou do bacteriófago de ARN fr, ou do bacteriófago de ARN AP205.

Ainda noutra realização preferida da presente invenção, as proteínas recombinantes compreendem, ou alternativamente consistem essencialmente em, ou alternativamente consistem em proteínas de cápside de bacteriófagos de ARN.

As proteínas de bacteriófagos de ARN que formam cápsides ou VLPs, ou fragmentos das proteínas de cápside do bacteriófago compatíveis com auto-organização numa cápside ou numa VLP são, deste modo, realizações mais preferidas da presente invenção. Por exemplo, as proteínas de cápside do bacteriófago Q $\beta$  podem ser expressas por via recombinante em *E. coli*. Além disso, aquando dessa expressão estas proteínas formam cápsides de forma espontânea. Adicionalmente, estas cápsides formam uma estrutura com uma organização repetitiva inerente.

Exemplos preferidos específicos de proteínas de cápside de bacteriófagos que podem ser utilizadas para preparar composições da invenção incluem proteínas de cápside de bacteriófagos de ARN tais como bacteriófago Q $\beta$  (SEQ ID NO:4; Base de Dados PIR, No. de Acesso VCBPQ $\beta$  referindo-se a Q $\beta$  CP e SEQ ID NO: 5; No. de Acesso AAA16663

referindo-se à proteína Q $\beta$  A1), bacteriófago R17 (SEQ ID NO:6; No. de Acesso PIR VCBPR7), bacteriófago fr (SEQ ID NO:7; No. de Acesso PIR VCBPFR), bacteriófago GA (SEQ ID NO:8; No. de Acesso GenBank NP-040754), bacteriófago SP (SEQ ID NO:9; No. de Acesso GenBank CAA30374 referindo-se a SP CP e SEQ ID NO: 10; No. de Acesso NP 695026 referindo-se à proteína SP A1), bacteriófago MS2 (SEQ ID NO:11; No. de Acesso PIR VCBPM2), bacteriófago M11 (SEQ ID NO:12; No. de Acesso GenBank AAC06250), bacteriófago MX1 (SEQ ID NO:13; No. de Acesso GenBank AAC 14699), bacteriófago NL95 (SEQ ID NO:14; No. de Acesso GenBank AAC14704), bacteriófago f2 (SEQ ID NO: 15; No. de Acesso GenBank P03611), bacteriófago PP7 (SEQ ID NO: 16), e bacteriófago AP205 (SEQ ID NO: 28). Além disso, a proteína A1 do bacteriófago Q $\beta$  (SEQ ID NO: 5) ou as formas C-terminais truncadas em 100, 150 ou 180 aminoácidos da sua extremidade C pode ser incorporada num conjunto de cápside de proteínas de cápside Q $\beta$ . Geralmente, a percentagem de proteína Q $\beta$  A1 em relação a Q $\beta$  CP na estrutura da cápside será limitada, de modo a assegurar a formação da cápside.

Também se verificou que a proteína de cápside Q $\beta$  se auto-organiza em cápsides quando expressa em *E. coli* (Kozlovskaya TM et al., GENE 137: 133-137 (1993)). As cápsides ou partículas semelhantes a vírus obtidas apresentaram uma estrutura de cápside semelhante a um fago icosaédrico com um diâmetro de 25 nm e T=3. Além disso, a estrutura cristalina do fago Q $\beta$  foi resolvida. A cápside contém 180 cópias da proteína de cápside, que estão ligadas

em pentâmeros e hexâmeros covalentes através de pontes dissulfureto (Golmohammadi, R. et al., Structure 4: 543-5554 (1996)) conduzindo a uma estabilidade notável da cápside da proteína de cápside Q $\beta$ . As cápsides ou VLPs formadas pela proteína de cápside Q $\beta$  recombinante podem no entanto conter subunidades não ligadas através de ligações dissulfureto a outras subunidades no interior da cápside, ou ligadas de forma incompleta. No entanto, tipicamente mais do que cerca de 80% das subunidades estão ligadas através de pontes dissulfureto umas às outras no interior da VLP. Assim, quando se carregam cápsides Q $\beta$  recombinantes em SDS-PAGE não redutor, são visíveis bandas correspondentes à proteína de cápside Q $\beta$  monomérica assim como bandas correspondente ao hexâmero ou ao pentâmero da proteína de cápside Q $\beta$ . Podiam aparecer subunidades ligadas de forma incompleta por ligações dissulfureto na forma de bandas de dímeros, trímeros ou mesmo tetrâmeros em SDS-PAGE não redutor. A proteína de cápside Q $\beta$  também apresenta uma resistência rara a solventes orgânicos e agentes desnaturantes. Surpreendentemente, observou-se que concentrações de DMSO e acetonitrilo tão elevadas como 30% e concentrações de guanidínio tão elevadas quanto 1 M não afectam a estabilidade da cápside. A elevada estabilidade da cápside da proteína de cápside Q $\beta$  é uma característica vantajosa, em particular, para sua utilização na imunização e vacinação de mamíferos e humanos de acordo com a presente invenção.

Aquando da expressão em *E. coli*, a metionina N-

terminal da proteína de cápside Q $\beta$  é geralmente removida, tal como se observou através de sequenciação de Edman N-terminal tal como descrito em Stoll, E. et al. J. Biol. Chem. 252:990-993 (1977). VLPs compostas por proteínas de cápside Q $\beta$  nas quais a metionina N-terminal não foi removida, ou VLPs compreendendo uma mistura de proteínas de cápside em que a metionina N-terminal foi ou clivada ou estava presente estão também no âmbito da presente invenção.

São apresentadas em WO 02/056905 partículas semelhantes a vírus de bacteriófagos de ARN mais preferidas, em particular Q $\beta$ , de acordo com esta invenção.

Também se mostrou que outras proteínas de cápside de bacteriófago de ARN se auto-organizam quando expressas num hospedeiro bacteriano (Kastelein, RA. et al., Gene 23: 245-254 (1983), Kozlovskaya, TM. et al., Dokl. Akad. Nauk SSSR 287: 452-455 (1986), Adhin, MR. et al., Virology 170: 238-242 (1989), Ni, CZ., et al., Protein Sci. 5: 2485-2493 (1996), Priano, C. et al., J. Mol. Biol. 249: 283-297 (1995)). A cápside do bacteriófago Q $\beta$  contém, além da proteína de cápside, a denominada proteína de leitura A1 e a proteína de maturação A2. A1 é gerada pela supressão do codão de paragem UGA e tem um comprimento de 329 aa. A cápside da proteína de cápside recombinante do bacteriófago Q $\beta$  utilizada na invenção não tem a proteína lítica A2 e contém ARN do hospedeiro. A proteína de cápside dos bacteriófagos de ARN é uma proteína que se liga ao ARN, e

interactua com a estrutura semicircular do local de ligação ao ribossoma do gene replicase que actua como um repressor de tradução durante o ciclo de vida do vírus. A sequência e os elementos estruturais da interacção são conhecidos (Witherell, GW. e Uhlenbeck, OC. Biochemistry 28: 71-76 (1989); Lim F. et al., J. Biol. Chem. 271: 31839-31845 (1996)). Sabe-se que a estrutura semicircular e o ARN em geral estão envolvidos na montagem viral (Golmohammadi, R. et al., Structure 4: 543-5554 (1996)).

Numa realização mais preferida da presente invenção, a partícula semelhante a vírus compreende, ou alternativamente consiste essencialmente em, ou alternativamente consiste em proteínas recombinantes, ou seus fragmentos, ou um bacteriófago de ARN, em que as proteínas recombinantes compreendem, alternativamente consistem essencialmente em ou alternativamente consiste em proteínas de cápsides mutantes de um bacteriófago de ARN, preferentemente em proteínas de cápsides mutantes dos bacteriófago de ARN mencionados acima. Noutra realização preferida, as proteínas de cápside mutantes do bacteriófago de ARN foram modificadas através da remoção de pelo menos um, ou alternativamente pelo menos dois, resíduos de lisina por intermédio de substituição, ou através da adição de pelo menos um resíduo de lisina por intermédio de substituição; alternativamente, as proteínas de cápsides mutantes de um bacteriófago de ARN foram modificadas por deleção de pelo menos um, ou alternativamente de pelo menos dois resíduos de lisina, ou pela adição de pelo menos um resíduo de

lisina por intermédio de inserção. A deleção, substituição ou adição de pelo menos um resíduo de lisina permite variar o grau de acoplamento, isto é, a quantidade de péptidos A $\beta$ 1-6 por subunidades da VLP de bacteriófagos de ARN, em particular, para ir de encontro e satisfazer os requisitos da vacina.

Noutra realização preferida, a partícula semelhante a vírus compreende, ou alternativamente consiste essencialmente em, ou alternativamente consiste em proteínas recombinantes, ou seus fragmentos, do bacteriófago de ARN Q $\beta$ , em que as proteínas recombinantes compreendem, ou alternativamente consistem essencialmente em, ou alternativamente consistem em proteínas de cápside com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:4, ou uma mistura de proteínas de cápside com sequências de aminoácidos de SEQ ID NO:4 e de SEQ ID NO: 5 ou mutantes de SEQ ID NO: 5 e em que a metionina N-terminal é preferentemente clivada.

Numa realização ainda preferida da presente invenção, a partícula semelhante a vírus compreende, consiste essencialmente em ou alternativamente consiste em proteínas recombinantes de Q $\beta$ , ou seus fragmentos, em que as proteínas recombinantes compreendem, ou alternativamente consistem essencialmente em, ou alternativamente consistem em proteínas de cápside Q $\beta$  mutantes. Noutra realização preferida, estas proteínas de cápside mutantes fora modificadas pela remoção de pelo menos um resíduo de lisina por intermédio de substituição, ou através da adição de

pelo menos um resíduo de lisina por intermédio de substituição. Alternativamente, estas proteínas de cápsides mutantes foram modificadas por deleção de pelo menos um, ou pela adição de pelo menos um resíduo de lisina por intermédio de inserção.

São expostos quatro resíduos de lisina à superfície da cápside da proteína de cápside Q $\beta$ . Mutantes Q $\beta$ , para os quais os resíduos de lisina expostos são substituídos por argininas, podem também ser utilizados para a presente invenção. Os seguintes mutantes de proteína de cápside Q $\beta$  e VLPs Q $\beta$  mutantes podem, assim, se usadas na prática da invenção: "Q $\beta$ -240" (Lys13-Arg; SEQ ID NO:17), "Q $\beta$ -243" (Asn 10-Lys; SEQ ID NO:18), "Q $\beta$ -250" (Lys 2-Arg, Lys13-Arg; SEQ ID NO:19), "Q $\beta$ -251" (SEQ ID NO:20) e "Q $\beta$ -259" (Lys 2-Arg, Lys16-Arg; SEQ ID NO:21). Assim, numa realização ainda mais preferida da presente invenção, a partícula semelhante a vírus compreende, consiste essencialmente em ou alternativamente consiste em proteínas recombinantes das proteínas de cápside Q $\beta$  mutantes, que compreendem proteínas com uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo de a) a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; b) a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; c) a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; d) a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; e e) a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21. A construção, expressão e purificação das VLPs e cápsides de, respectivamente, proteínas de cápside Q $\beta$  acima indicadas, de proteínas de cápside Q $\beta$  mutante, são descritas em WO 02/056905. Em particular, refere-se aqui ao Exemplo 18 do pedido acima mencionado.

Noutra realização ainda preferida da presente invenção, a partícula semelhante a vírus compreende, ou alternativamente consiste essencialmente em ou alternativamente consiste em proteínas recombinantes de Q $\beta$ , ou seus fragmentos, em que as proteínas recombinantes compreendem, consistem essencialmente em, ou alternativamente consistem numa mistura de qualquer um dos mutantes Q $\beta$  mutantes e da proteína A1 correspondente.

Numa realização ainda mais preferida da presente invenção, a partícula semelhante a vírus compreende, ou alternativamente consiste essencialmente em, ou alternativamente consiste em proteínas recombinantes, ou seus fragmentos, de um fago de ARN AP205.

O genoma de AP205 consiste numa proteína de maturação, uma proteína de cápside, uma replicase e duas grelhas de leitura aberta não presentes em fagos relacionados; um gene de lise e uma grelha de leitura aberta que desempenha um papel na tradução do gene de maturação (Klovins, J., et al., J. Gen. Virol. 83: 1523-33 (2002)). A proteína de cápside AP205 pode ser expressa pelo plasmídeo pAP283-58 (SEQ ID NO: 27), que é um derivado de pQb10 (Kozlovska, T. M., et al., Gene 137:133-37 (1993)), e que contém um local de ligação ao ribossoma AP205. Alternativamente, a proteína de cápside AP205 pode ser clonada em pQb185, a jusante do local de ligação ao ribossoma presente no vector. Ambas as abordagens conduzem



à expressão da proteína e formação de cápsides tal como descrito no pedido de patente provisório US co-pendente, com o título "Molecular Antigen Arrays" (Ref. Pedido No. 1700.0310000) e que foi submetido a 17 de Julho de 2002, que é incorporado por referência na sua totalidade. Vectores pQb10 e pQb185 são vectores derivados do vector pGEM, e a expressão dos genes clonados nestes vectores é controlada pelo promotor *trp* (Kozlovskaya, T. M. et al., Gene 137:133-37 (1993)). O plasmídeo pAP283-58 (SEQ ID NO:27) compreende um local de ligação ao ribossoma AP205 putativo na sequência seguinte, que se localiza a jusante do local XbaI, e imediatamente a montante do codão de iniciação ATG da proteína de cápside AP205: *tctaga*ATTTTCTGCGCACCCAT CCCGGGTGGCGCCCAAAGTGAGGAAAATCACatg (SEQ ID NO:57). O vector pQb1885 compreende uma sequência de Shine Delagarno a jusante do local XbaI e a montante do codão de iniciação (*tctaga*TTAACCCAACGCGTAGGAG TCAGGCCatg (SEQ ID NO:58), sequência de Shine Delagarno sublinhada).

Numa realização ainda mais preferida da presente invenção, a partícula semelhante a vírus compreende, ou alternativamente consiste essencialmente em, ou alternativamente consiste em proteínas de cápside recombinantes, ou seus fragmentos, do fago de ARN Asp205.

Esta realização preferida da presente invenção, compreende assim proteínas de cápside Ap205 que formam cápsides. Tais proteínas são expressas de forma recombinante, ou preparadas a partir de fontes naturais. As

proteínas de cápside AP205 produzidas em bactérias formam cápsides de forma espontânea, tal como evidenciado por Microscopia Electrónica (ME) e imunodifusão. As propriedades estruturais da cápside formada pela proteína de cápside AP205 (SEQ ID NO: 28) e aquelas formadas pela proteína de cápside do fago de ARN AP205 são praticamente indistinguíveis quando observadas em ME. As VLPs AP205 são altamente imunogénicas e podem ser ligadas com antigénios e/ou determinantes antigénicos para gerar construções de vacina que apresentam os antigénios e/ou os determinantes antigénicos orientados de um modo repetitivo. São gerados elevados teores contra os antigénios assim apresentados mostrando que os antigénios e/ou determinantes antigénicos ligados são acessíveis para interacção com moléculas de anticorpos que são imunogénicas.

Numa realização ainda mais preferida da presente invenção, a partícula semelhante a vírus compreende, ou alternativamente consiste essencialmente, ou alternativamente consiste num mutante recombinante de proteínas de cápside recombinantes, ou seus fragmentos, do fago de ARN AP205.

Formas mutantes de VLPs AP205 competentes para organização da cápside, incluindo a proteína de cápside AP205 com a substituição da prolina no aminoácido 5 para treonina (SEQ ID NO: 29), podem também ser utilizadas na prática da invenção e conduzem a uma realização da invenção ainda mais preferida. Estas VLPs, VLPs AP205 derivadas de

fontes naturais, ou partículas virais AP205, podem ser ligadas a antigénios para produzir fileiras repetitivas ordenadas dos antigénios de acordo com a presente invenção.

Uma proteína de cápside mutante P5-T AP205 pode ser expressa a partir do plasmídeo pAP281-32 (SEQ ID No. 30), que é derivado directamente de pQb185, que eu contém o gene da proteína de cápside AP205 em vez do gene da proteína Q $\beta$ . Os vectores para a expressão da proteína de cápside AP205 mutante são transfectados em *E. coli* para expressão da proteína de cápside Ap205.

Métodos para a expressão da proteína de cápside e a proteína de cápside mutante, respectivamente, conduzindo à auto-organização em VLPs tal como descrito no Exemplo 1. Estirpes de *E. coli* adequadas incluem, mas não se limitam a, *E. coli* K802, JM 109, RR1. Vectores e estirpes adequados e suas combinações podem ser identificados para testar a expressão, respectivamente, da proteína de cápside e a proteína de cápside mutante, por SDS-PAGE e a formação e construção da cápside fazendo opcionalmente primeiramente a purificação das cápsides por filtração em gel e subsequentemente testá-las num ensaio de imunodifusão (teste de Ouchterlony) ou Microscopia Electrónica (Kozlovskaya, T. M. et al., Gene 137:133-37 (1993)).

As proteínas de cápside AP205 expressas dos vectores pAP283-58 e pAP281-32 podem ser desprovidas do aminoácido Metionina inicial, devido ao processamento no

citoplasma de *E. coli*. Formas clivadas, não clivadas de VLP AP205 ou suas misturas são realizações mais preferidas da invenção.

Numa realização mais preferida da presente invenção, a partícula semelhante a vírus compreende, ou alternativamente consiste essencialmente, ou alternativamente consiste numa mistura de proteínas de cápside recombinantes, ou seus fragmentos, do fago de ARN AP205 e das proteínas de cápside recombinantes, ou seus fragmentos, do fago de ARN AP205.

Ainda noutra realização preferida da presente invenção, a partícula semelhante a vírus compreende, ou alternativamente consiste essencialmente em, ou alternativamente consiste em fragmentos de proteínas de cápside recombinantes ou proteínas de cápside mutantes recombinantes do fago de ARN AP205.

Fragmentos de proteína de cápside AP205 capazes de se organizar, respectivamente, numa VLP e numa cápside são também úteis na prática da invenção. Estes fragmentos podem ser gerados por deleção, seja internamente ou na terminação, respectivamente, da proteína de cápside e da proteína de cápside mutante. Inserções na sequência da proteína de cápside e da proteína de cápside mutante ou fusões de sequências antigénicas com a sequência da proteína de cápside e da proteína de cápside mutante, e compatíveis com integração numa VLP, são outras realizações

da invenção e conduzem, respectivamente, a proteínas de cápside AP205 quiméricas, e partículas. O resultado das inserções, deleções e fusões na sequência de proteína de cápside e se é ou não compatível com a integração numa VLP pode ser determinada por microscopia electrónica.

As partículas formadas pela proteína de cápside AP205, fragmentos de proteína de cápside e proteínas de cápside quiméricas descritas acima, podem ser isolados na sua forma pura através de uma combinação de passos de fraccionamento por precipitação e de passos de purificação por filtração em gel utilizando, por exemplo, colunas Sepharose CL-4B, Sepharose CL-2B, Sepharose CL-6B e suas combinações. Outros métodos para isolar partículas semelhantes a vírus são conhecidos na técnica, e podem ser utilizados para isolar as partículas semelhantes a vírus (VLPs) do bacteriófago AP205. Por exemplo, a utilização de ultracentrifugação para isolar VLPs do retrotransposão de levedura Ty é descrita na Patente U.S. No. 4,918,166.

A estrutura cristalina de vários bacteriófagos de ARN foi determinada (Golmohammadi, R. et al., Structure 4:543-554 (1996)). Utilizando tal informação, podem ser identificados resíduos expostos à superfície e, assim, podem ser modificadas proteínas de cápside de fago de ARN de tal modo que um ou mais resíduos de aminoácidos reactivos possam ser inseridos por intermédio de inserção ou substituição. Como consequência, estas formas modificadas de proteínas de cápside de bacteriófago podem também

ser usadas para a presente invenção. Assim, variantes de proteínas que formam cápsides ou estruturas semelhantes a cápsides (por exemplo, proteínas de cápside do bacteriófago Q $\beta$ , bacteriófago R17, bacteriófago fr, bacteriófago GA, bacteriófago SP, bacteriófago AP205, e bacteriófago MS2) podem também ser usadas para preparar composições da presente invenção.

Apesar da sequência das proteínas variantes discutidas acima ir diferir daquela das suas equivalentes nativas, estas proteínas variantes irão geralmente reter a capacidade de formar cápsides ou estruturas semelhantes a cápsides. Assim, a invenção inclui ainda, respectivamente, composições e composições de vacina que incluem ainda variantes de proteínas que formam cápsides ou estruturas semelhantes a cápsides, assim como métodos para a preparação de, respectivamente, tais composições e composições de vacina, subunidades de proteínas individuais utilizadas para preparar tais composições e moléculas de ácidos nucleicos que codificam para estas subunidades de proteína. Assim, estão incluídas no âmbito da invenção formas variantes das proteínas nativas que formam cápsides e estruturas semelhantes a cápsides e que retêm a capacidade de se associarem e formar cápsides e estruturas semelhantes a cápsides.

Como resultado, a invenção inclui ainda, respectivamente, composições e composições de vacina, compreendendo proteínas, que compreendem, ou alternativamente

consistem essencialmente em, ou alternativamente consistem em sequências de aminoácidos que são pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, ou 99% idênticas às proteínas nativas que, respectivamente, formam fileiras ordenadas e têm uma estrutura repetitiva inerente.

Ainda incluídas no âmbito da invenção estão moléculas de ácidos nucleicos que codificam para proteínas utilizadas para preparar composições da presente invenção.

Noutras realizações, a invenção inclui ainda composições compreendendo proteínas, que compreendem, ou alternativamente consistem essencialmente em, ou alternativamente consistem em sequências de aminoácidos que são pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, ou 99% idênticas a qualquer uma das sequências de aminoácidos ilustradas em SEQ ID NOs:4-21.

Proteínas adequadas para utilização na presente invenção incluem ainda mutantes por truncagem da extremidade C de proteínas que formam cápsides ou estruturas semelhantes a cápsides, ou VLPs. Exemplos específicos de tais mutantes de truncagem incluem proteínas com uma sequência de aminoácidos apresentada em qualquer uma de SEQ ID NOs:4-21, em que foram removidos 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, ou 17 aminoácidos da extremidade C. Tipicamente, estes mutantes de truncagem da extremidade C irão reter a capacidade de formar cápsides ou estruturas semelhantes a cápsides.

Outras proteínas adequadas para utilização na presente invenção incluem ainda mutantes por truncagem da extremidade N de proteínas que formam cápsides ou estruturas semelhantes a cápsides. Exemplos específicos de tais mutantes de truncagem incluem proteínas com uma sequência de aminoácidos apresentada em qualquer uma de SEQ ID NOs:4-21, em que foram removidos 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, ou 17 aminoácidos da extremidade N. Tipicamente, estes mutantes de truncagem da extremidade N irão reter a capacidade de formar cápsides ou estruturas semelhantes a cápsides.

Proteínas adicionais adequadas para utilização na presente invenção incluem ainda mutantes por truncagem da extremidade N e C que formam cápsides ou estruturas semelhantes a cápsides. Mutantes por truncagem adequados incluem proteínas com uma sequência de aminoácidos apresentada em qualquer uma de SEQ ID NOs:4-21, em que foram removidos 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, ou 17 aminoácidos da extremidade N e em que foram removidos 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, ou 17 aminoácidos da extremidade C. Tipicamente, estes mutantes de truncagem da extremidade N e da extremidade C irão reter a capacidade de formar cápsides ou estruturas semelhantes a cápsides.

A invenção inclui ainda composições compreendendo proteínas que compreendem, ou alternativamente consistem essencialmente em, ou alternativamente consistem em sequên-



cias de aminoácidos que são pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, ou 99% idênticas aos mutantes de truncagem acima descritos.

A invenção inclui assim composições e composições de vacina preparadas a partir de proteínas que formam cápsides ou VLPs, métodos para a preparação destas composições de subunidades de proteínas individuais e VLPs ou cápsides, métodos para a preparação destas subunidades de proteínas individuais, moléculas de ácidos nucleicos que codificam para estas subunidades e métodos para a vacinação e/ou desencadear respostas imunológicas em indivíduos utilizando estas composições da presente invenção.

Como afirmado anteriormente, a invenção inclui partículas semelhantes a vírus ou suas formas recombinantes.

Numa realização ainda mais preferida da presente invenção, pelo menos um péptido A $\beta$ 1-6 é ligado à referida, respectivamente, partícula semelhante a vírus e partícula central, por pelo menos uma ligação covalente. Preferentemente, pelo menos um péptido A $\beta$ 1-6 é ligado à referida, respectivamente, partícula semelhante a vírus e partícula central, por pelo menos uma ligação covalente, sendo a referida ligação covalente uma ligação não peptídica conduzindo, respectivamente a uma fileira de péptidos A $\beta$ 1-6 e conjugado péptido A $\beta$ 1-6-VLP. Respectivamente, esta fileira de péptido A $\beta$ 1-6 e conjugado têm tipicamente e preferente-

mente uma estrutura repetitiva e ordenada uma vez que o pelo menos um péptido A $\beta$ 1-6 está ligado, respectivamente, à VLP e partícula central de um modo orientado. A formação de, respectivamente, uma fileira de péptido A $\beta$ 1-6-VLP e conjugado repetitiva e ordenada é assegurada, respectivamente, por uma junção e ligação orientada e dirigida assim como definida, de pelo menos um péptido A $\beta$ 1-6, respectivamente, à VLP e partícula central, como se tornará evidente no seguinte. Além disso, a estrutura típica inerente altamente repetitiva e organizada das, respectivamente, VLPs e partículas centrais contribui com vantagem para a apresentação do péptido A $\beta$ 1-6 de um modo altamente ordenado e repetitivo conduzindo, respectivamente, a uma fileira péptido A $\beta$ 1-6-VLP e conjugado altamente organizada e repetitiva.

Deste modo, os conjugados e as fileiras preferidos da invenção, respectivamente, diferem dos conjugados da técnica anterior pela sua estrutura altamente organizada, dimensões, e na repetição do antigénio na superfície da fileira. A realização preferida desta invenção permite, além disso, a expressão da partícula num hospedeiro de expressão garantindo o enrolamento e a organização apropriados da VLP, à qual o antigénio, ou seja o péptido A $\beta$ 1-6 é então ainda acoplado.

A presente invenção apresenta métodos para a ligação do péptido A $\beta$ 1-6 a VLPs. Como indicado, num aspecto da invenção, o péptido A $\beta$ 1-6 é ligado à VLP por intermédio

de reticulação química, tipicamente e preferivelmente utilizando um agente reticulante hetero-bifuncional. São conhecidos na técnica vários agentes reticulantes hetero-bifuncionais. Em realizações preferidas, o agente reticulante hetero-bifuncional contém um grupo funcional que pode reagir com primeiros locais de ligação preferidos, isto é, com o grupo amino da cadeia lateral de resíduos lisina da VLP ou de pelo menos uma subunidade da VLP, e ainda outro grupo funcional que pode reagir com um segundo local de ligação preferido, isto é, um resíduo cisteína fundido ao péptido A $\beta$ 1-6 e opcionalmente também tornado disponível para reacção por redução. O primeiro passo do procedimento, tipicamente denominado derivatização, é a reacção da VLP com o agente reticulante. O produto desta reacção é uma VLP activada, também denominado veículo activado. Num segundo passo, remove-se o agente reticulante que não reagiu utilizando métodos usuais tais como filtração em gel ou diálise. Num terceiro passo, o péptido A $\beta$ 1-6 reage com a VLP activada, e este passo é tipicamente denominado o passo de acoplamento. O péptido A $\beta$ 1-6 que não reagiu pode ser opcionalmente removido num quarto passo, por exemplo por diálise. São conhecidos na técnica vários agentes reticulantes hetero-bifuncionais. Estes incluem os reticulantes preferidos SMPH (Pierce), Sulfo-MBS, Sulfo-EMCS, Sulfo-GMBS, Sulfo-SIAB, Sulfo-SMPB, Sulfo-SMCC, SVSB, SIA e outros reticulantes disponíveis, por exemplo, da Pierce Chemical Company (Rockford, IL, USA), e tendo um grupo funcional reactivo em relação a grupos amino e um grupo funcional reactivo em relação a resíduos cisteína. Os

agentes reticulantes acima mencionados conduzem todos à formação de uma ligação tioéter. Outra classe de agentes reticulantes adequados na prática da invenção é caracterizada pela introdução de uma ligação dissulfureto entre o péptido A $\beta$ 1-6 e a VLP aquando do acoplamento. Agentes reticulantes preferidos que pertencem a esta classe incluem por exemplo SPDP e Sulfo-LC-SPDP (Pierce). A extensão da derivatização do VLP com o agente reticulante pode ser influenciada por várias condições experimentais tais como a concentração de cada um dos parceiros de reacção, o excesso de um reagente relativamente ao outro, o pH, a temperatura e a força iónica. O grau de acoplamento, ou seja, a quantidade de péptidos A $\beta$ 1-6 por subunidades da VLP pode ser ajustada através da variação das condições experimentais descritas acima para cumprir com os requisitos da vacina.

Um método particularmente favorecido de ligação dos péptidos A $\beta$ 1-6 à VLP, é a ligação de um resíduo lisina à superfície da VLP com um resíduo cisteína no péptido A $\beta$ 1-6. Nalgumas realizações, pode ser necessária a fusão de um aminoácido de ligação contendo um resíduo cisteína, como segundo local de ligação ou como uma sua parte, a A $\beta$ 1-6 para acoplamento à VLP.

Em geral, são favorecidos aminoácidos de ligação flexíveis. Exemplos do aminoácido de ligação são seleccionados do grupo que consiste em: (a) CGG; (b) 1-agente de ligação gama N-terminal; (c) 3-agente de ligação

N-terminal; (d) regiões flexíveis de Ig; (e) agentes de ligação de glicina N-terminais; (f)  $(G)_kC(G)_n$  com  $n=0-12$  e  $k=0-5$  (SEQ ID NO: 34); (g) agentes de ligação glicina-serina N-terminais; (h)  $(G)_kC(G)_m(S)_1(GGGGS)_n$  com  $n=0-3$ ,  $k=0-5$ ,  $m=0-10$ ,  $1=0-2$  (SEQ ID NO: 35); (i) GGC; (k) GGC-NH<sub>2</sub>; (l) 1-agente de ligação gama C-terminal; (m) 3-agente de ligação gama C-terminal; (n) agentes de ligação de glicina C-terminais; (o)  $(G)_nC(G)_k$  com  $n=0-12$  e  $k=0-5$  (SEQ ID NO: 36); (p) agentes de ligação glicina-serina C-terminais; (q)  $(G)_m(S)_1(GGGGS)_n(G)_oC(G)_k$  com  $n=0-3$ ,  $k=0-5$ ,  $m=0-10$ ,  $1=0-2$ , e  $o=0-8$  (SEQ ID NO: 37).

Outros exemplos de aminoácidos de ligação são a região flexível das imunoglobulinas, agentes de ligação glicina serina  $(GGGGS)_n$  (SEQ ID NO: 38), e agentes de ligação glicina  $(G)_n$  todos contendo ainda um resíduo cisteína como segundo local de ligação e opcionalmente mais resíduos glicina. Exemplos tipicamente preferidos dos referidos aminoácidos de ligação são 1 gama N-terminal: CGDKTHTSPP (SEQ ID NO: 39); 1 gama C-terminal: DKTHTSPPCG (SEQ ID NO: 40); 3 gama N-terminal: CGGPKPSTPPGSSGGAP (SEQ ID NO: 41); 3 gama C-terminal: PKPSTPPGSSGGAPGGCG (SEQ ID NO: 42); agente de ligação de glicina N-terminal: GCGGGG (SEQ ID NO: 43) e agente de ligação de glicina C-terminal: GGGGCG (SEQ ID NO: 44).

Outros aminoácidos de ligação particularmente adequados na prática da invenção, quando se liga um péptido A $\beta$  hidrofóbico a uma VLP, são CGKKGG (SEQ ID NO: 46), ou

CGDEGG (SEQ ID NO: 31) para agentes de ligação N-terminais, ou GGKKGC (SEQ ID NO: 45) e GGEDGC (SEQ ID NO: 32) para agentes de ligação C-terminais. Para os agentes de ligação C-terminais, a cisteína terminal é opcionalmente amidada na extremidade C.

Em realizações preferidas da invenção aminoácidos de ligação GGCG (SEQ ID NO: 47), GGC ou GGC-NH<sub>2</sub> ("NH<sub>2</sub>" significa amidação) na extremidade C do péptido ou CGG na sua extremidade N. Em geral, os resíduos de glicina serão inseridos entre aminoácidos volumosos e a cisteína usada como segundo local de ligação, para evitar potencial impedimento estérico do aminoácido mais volumoso na reacção de acoplamento. Na realização mais preferida da invenção, o aminoácido de ligação GGC-NH<sub>2</sub> é fundido com a extremidade C de A $\beta$ 1-6.

O resíduo cisteína presente no péptido A $\beta$ 1-6 tem de estar no seu estado reduzido para reagir com o agente reticulante hetero-bifuncional na VLP activada, que é um resíduo cisteína livre ou um resíduo cisteína com um grupo sulfidril livre que tem de estar disponível. No caso em que o resíduo cisteína que irá funcionar como local de ligação está numa forma oxidada, por exemplo se forma uma ponte dissulfureto, é necessária a redução desta ponte dissulfureto com, por exemplo, DTT, TCEP ou  $\beta$ -mercapto-etanol. Baixas concentrações de agente redutor são compatíveis com o acoplamento, tal como descrito em WO 02/056905, concentrações mais elevadas inibem a reacção de

acoplamento, tal como um perito na técnica saberá, caso em que tem de ser removido o redutor ou a sua concentração diminuída antes do acoplamento, por exemplo, por diálise, filtração em gel ou HPLC de fase reversa.

A ligação do péptido A $\beta$ 1-6 à VLP utilizando um agente de ligação hetero-bifuncional de acordo com os métodos preferidos descritos acima, permite acoplar o péptido A $\beta$ 1-6 à VLP de um modo orientado. Outros métodos para a ligação do péptido A $\beta$ 1-6 à VLP incluem métodos nos quais o péptido A $\beta$ 1-6 é reticulado com a VLP utilizando carbodi-imida EDC, e NHS. Noutros métodos, o péptido A $\beta$ 1-6 é ligado à VLP utilizando um agente reticulante homo-bifuncional tal como o glutaraldeído, DSG, BM[PEO]<sub>4</sub>, BS<sup>3</sup>, (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA) ou outros agentes reticulantes homo-bifuncionais com grupos funcionais reactivos em relação aos grupos amina ou grupos carboxilo da VLP.

Outros métodos para a ligação da VLP a um péptido A $\beta$ 1-6 incluem métodos em que a VLP é biotinilada, e o péptido A $\beta$ 1-6 expresso na forma de uma proteína de fusão com estreptavidina, ou métodos em que ambos o péptido A $\beta$ 1-6 e a VLP são biotiniliados, por exemplo tal como descrito em WO 00/23955. Neste caso, o péptido A $\beta$ 1-6 pode ser primeiramente ligado à estreptavidina ou à avidina ajustando a razão do péptido A $\beta$ 1-6 em relação à estreptavidina de modo que estejam ainda disponíveis locais de ligação livres para ligação à VLP, a qual é adicionada

no passo seguinte. Alternativamente, todos os componentes podem ser misturados numa reacção num vaso reaccional único. Outros pares ligando-receptor, para os quais está disponível uma forma solúvel do receptor e do ligando, e que sejam capazes de se reticularem à VLP ou ao péptido A $\beta$ 1-6, podem ser usados como agentes de ligação para a ligação do péptido A $\beta$ 1-6 à VLP. Alternativamente, ou o ligando ou o receptor podem ser fundidos com o péptido A $\beta$ 1-6, e assim mediar a ligação à VLP ligada quimicamente ou fundida, respectivamente, ou ao receptor ou ao ligando. A fusão pode também ser efectuada por inserção ou substituição.

Como já indicado, numa realização favorecida da presente invenção, a VLP é uma VLP de um bacteriófago de ARN, e numa realização mais preferida, a VLP é a VLP de uma proteína de cápside do bacteriófago de ARN Q $\beta$ .

Podem ser ligadas uma ou várias moléculas antigénicas, por exemplo um péptido A $\beta$ 1-6, a uma subunidade da cápside ou VLP de proteínas de cápside de bacteriófagos de ARN, preferentemente através dos resíduos expostos de lisina da VLP de bacteriófagos de ARN se estericamente permitido. Uma característica especial da VLP da proteína de cápside de bacteriófagos de ARN e em particular da VLP de proteína de cápside de Q $\beta$  é assim a possibilidade de acoplar vários antigénios por subunidade. Isto permite gerar um fileira de antigénios densa.



Numa realização preferida da invenção, a união e ligação, respectivamente, do pelo menos um péptido A $\beta$ 1-6 à partícula semelhante a vírus é realizada através de, respectivamente, interacção e associação, entre pelo menos um primeiro local de ligação da partícula semelhante a vírus e pelo menos um segundo local de ligação do antigénio ou determinante antigénico.

As VLPs ou cápsides da proteína de cápside Q $\beta$  apresentam um número definido de resíduos lisina na sua superfície, com uma topologia definida com três resíduos de lisina que apontam para o interior da cápside e interactivam com o ARN, e outros quatro resíduos de lisina expostos para o exterior da cápside. Estas propriedades definidas favorecem a ligação de antigénios no exterior da partícula, em vez de no interior da partícula onde os resíduos de lisina interagem com o ARN. As VLPs de outras proteínas de cápside de fago da ARN também têm um número definido de resíduos lisina na sua superfície e uma topologia definida destes resíduos de lisina.

Em realizações mais preferidas da presente invenção, o primeiro local de ligação é um resíduo de lisina e/ou a segunda ligação compreende um grupo sulfidrílo ou um resíduo cisteína. Numa realização muito preferida da presente invenção, o primeiro local de ligação é um resíduo lisina e o segundo local de ligação é um resíduo de cisteína.

Em realizações muito preferidas da invenção, o péptido A $\beta$ 1-6 está ligado por intermédio de um resíduo cisteína a resíduos de lisina da VLP ou proteína de cápside de fago de ARN, e em particular à VLP da proteína de cápside Q $\beta$ .

Outra vantagem das VLPs derivadas de fagos de ARN é o seu elevado rendimento de expressão em bactérias que permite a produção de grandes quantidades de material a um custo suportável.

Como indicado, os conjugados e as fileiras da invenção, respectivamente, diferem dos conjugados da técnica anterior pela sua estrutura altamente organizada, dimensões e na repetição do antigénio à superfície da fileira. Além disso, a utilização de VLPs como veículos permite a formação de, respectivamente, fileiras e conjugados de antigénios robustos com densidade de antigénio variável. Em particular, a utilização dos VLPs dos fagos de ARN e por este meio em particular a utilização de VLP da proteína de cápside do fago de ARN Q $\beta$  permite conseguir-se uma densidade de epitopos muito elevada. Em particular, pôde chegar-se a uma densidade de mais de 1,5 epitopos por subunidade através do acoplamento do péptido A $\beta$ 1-6 humano à VLP da proteína de cápside Q $\beta$ . A preparação de composições de VLPs de proteínas de cápside de fagos de ARN com uma elevada densidade de epitopos pode ser conseguida utilizando os ensinamentos deste pedido. Numa realização preferida da invenção, quando se acopla um péptido A $\beta$ 1-6 à

VLP da proteína de cápside Q $\beta$ , prefere-se um número médio de péptido A $\beta$ 1-6 por subunidade de 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, ou superior.

O segundo local de ligação, tal como aqui definido, pode estar presente de forma natural ou não natural com o antígeno ou o determinante antigénico. No caso da ausência de um segundo local de ligação adequado que ocorra naturalmente no antígeno ou determinante antigénico, então o antígeno tem de ser modificado para conter um segundo local de ligação não natural.

Tal como descrito acima, quatro resíduos de lisina são expostos à superfície da VLP da proteína de cápside Q $\beta$ . Tipicamente, estes resíduos são derivatizados através da reacção com uma molécula reticulante. No caso em que nem todos os resíduos de lisina podem ser acoplados a um antígeno, os resíduos de lisina que reagiram com o agente reticulante são deixados com uma molécula de reticulante ligada ao grupo  $\epsilon$ -amino após o passo de derivatização. Isto conduz ao desaparecimento de uma ou várias cargas positivas, o que pode ser prejudicial para a solubilidade e a estabilidade da VLP. Através da substituição de alguns dos resíduos de lisina com argininas, tal como nos mutantes da proteína de cápside Q $\beta$  revelada descrita abaixo, evita-se o desaparecimento excessivo de cargas positivas uma vez que os resíduos de arginina não reagem com o agente reticulante. Além disso, a substituição de

resíduos de lisina por argininas pode conduzir a fileiras de antigénios mais definidas, uma vez que são disponíveis menos locais para reacção com o antigénio.

Deste modo, os resíduos de lisina expostos foram substituídos por argininas nos seguintes mutantes da proteína de cápside Q $\beta$  e mutantes de VLPs de Q $\beta$  apresentados neste pedido. Q $\beta$ -240 (Lys13-Arg; SEQ ID NO: 17), Q $\beta$ -250 (Lys 2-Arg, Lys13-Arg; SEQ ID NO: 19) e Q $\beta$ -259 (Lys 2-Arg, Lys16-Arg; SEQ ID NO:21). As construções foram clonadas, as proteínas expressas, as VLPs purificadas e utilizadas para acoplar aos antigénios peptídicos e proteicos. Q $\beta$ -251; (SEQ ID NO: 20 foi também construído, e instruções em como expressar, purificar e acoplar a VLP da proteína de cápside de Q $\beta$ -251 podem ser encontradas ao longo do pedido.

Ainda noutra realização, apresenta-se uma proteína de cápside mutante Q $\beta$  com um resíduo de lisina adicional, adequado para a obtenção de fileiras de antigénios com uma densidade ainda maior. Esta proteína de cápside mutante Q $\beta$ , Q $\beta$ -243 (Asn 10-Lys; SEQ ID NO: 18), foi clonada, a proteína expressa, e a cápside ou VLP isolada e purificada, mostrando que a introdução do resíduo de lisina adicional é compatível com a auto-organização das subunidades numa cápside ou VLP. Assim, as fileiras de péptidos A $\beta$ 1-6 e conjugados, respectivamente, podem ser preparados utilizando VLP de mutantes da proteína de cápside Q $\beta$ . Um método particularmente favorecido de ligação de antigénios às VLPs, e em particular a VLPs de proteínas de cápside de

fagos de ARN é a ligação de um resíduo de lisina presente na superfície da VLP de proteínas de cápside de fagos de ARN com um resíduo de cisteína adicionado ao antigénio, isto é, o péptido A $\beta$ 1-6. De modo a que o resíduo de cisteína seja eficaz como segundo local de ligação, deve estar disponível para ligação um grupo sulfidrílo. Assim, um resíduo cisteína tem de estar no seu estado reduzido, ou seja, uma cisteína livre ou um resíduo de cisteína com um grupo sulfidrílo livre tem de estar disponível. No caso em que o resíduo cisteína que irá funcionar como segundo local de ligação está numa forma oxidada, por exemplo se forma uma ponte dissulfureto, é necessária a redução desta ponte dissulfureto com, por exemplo, DTT, TCEP ou  $\beta$ -mercapto-etanol. A concentração do agente redutor e o excesso molar do agente redutor em relação ao antigénio devem ser ajustados para cada antigénio. Uma gama de titulação, começando em concentrações tão baixas como 10  $\mu$ M ou menos, até 10 ou 20 mM ou mais elevadas de agente redutor se necessário são testadas, e o acoplamento do antigénio ao veículo é avaliado. Apesar de baixas concentrações de agente redutor serem compatíveis com a reacção de acoplamento, tal como descrito em WO 02/056905, concentrações mais elevadas inibem a reacção de acoplamento, tal como um perito na técnica saberá, caso em que tem de ser removido o redutor ou a sua concentração diminuída, por exemplo, por diálise, filtração em gel ou HPLC de fase reversa. Com vantagem, o pH do tampão de diálise ou de equilíbrio é inferior a 7, preferentemente 6. A compatibilidade do tampão de baixo pH com a actividade ou estabilidade do antigénio tem de ser testada.

A densidade de epitopos nas VLPs de proteínas de cápside de fago de ARN pode ser modulada pela escolha de reticulante e outras condições de reacção. Por exemplo, os reticulantes Sulfo-GMBS e SMPH permitem tipicamente atingir uma elevada densidade de epitopo. A derivatização é influenciada positivamente pela elevada concentração de reagentes, e a manipulação das condições de reacção pode ser usada para controlar o número de antigénios acoplados às VLPs das proteínas de cápside do fago de ARN, e em particular a VLPs de proteínas de cápside Q $\beta$ .

Antes do desenho de um segundo local de ligação não natural a posição na qual deverá ser fundido, inserido ou geralmente modificado tem de ser escolhida. A selecção da posição do segundo local de ligação pode, por exemplo, ser baseado numa estrutura cristalina do antigénio. Tal estrutura cristalina do antigénio pode proporcionar informação sobre a disponibilidade das extremidades C- ou N- da molécula (determinadas por exemplo a partir da sua acessibilidade a solvente), ou sobre a exposição ao solvente de resíduos adequados para utilização como segundos locais de ligação, tais como resíduos de cisteína. Pontes de dissulfureto, como é o caso para fragmentos Fab, podem também ser uma fonte de um segundo local de ligação, uma vez que podem ser geralmente convertidas em resíduos cisteína únicos através de uma redução suave, por exemplo, com 2-mercaptoetilamina, TCEP,  $\beta$ -mercaptoetanol ou DTT. Serão escolhidas condições de redução suaves que não

afectam a imunogenicidade do antigénio. Em geral, no caso em que a imunização com um antigénio próprio tem como objectivo a inibição da interacção deste antigénio próprio com os seus ligandos naturais, o segundo local de ligação será adicionado de tal modo que permite gerar anticorpos contra o local de interacção com os ligandos naturais. Assim, a localização do segundo local de ligação será seleccionada de tal modo que se evita o impedimento estérico do segundo local de ligação ou de qualquer aminoácido de ligação que o contenha. Noutras realizações, deseja-se uma resposta de anticorpo direccionada para um local distinto do local de interacção do antigénio próprio com o seu ligando natural. Em tais realizações, o segundo local de ligação pode ser seleccionado de modo a evitar a geração de anticorpos contra o local de interacção do antigénio próprio com os seus ligandos naturais.

Outro critério para a selecção da posição do segundo local de ligação inclui o estado de oligomerização do antigénio, o local de oligomerização, a presença de um cofactor, e a disponibilidade de evidência experimental que revele locais na estrutura e sequência do antigénio em que a modificação do antigénio seja compatível com a função do antigénio próprio, ou com a geração de anticorpos que reconhecem o antigénio próprio.

Nas realizações mais preferidas, o péptido A $\beta$ 1-6 compreende um único segundo local de ligação ou um único local de ligação reactivo capaz de associação com os

primeiros locais de ligação na partícula central e, respectivamente, as VLPs ou as subunidades de VLP. Isto assegura uma junção e ligação, respectivamente, definida e uniforme de pelo menos um, mas tipicamente mais do que um, preferentemente mais do que 10, 20, 40, 80, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 360, 400, 450 antigénios, respectivamente, à partícula central e à VLP. O fornecimento de um único segundo local de ligação ou um único local de ligação reactivo no antigénio assegura, assim, um tipo único e uniforme de, respectivamente, junção e associação, respectivamente conduzindo a uma fileira altamente ordenada e repetitiva. Por exemplo, se a junção e associação, respectivamente, for efectuada por intermédio de uma interacção lisina- (como primeiro local de ligação) e cisteína. (como segundo local de ligação), está assegurado, de acordo com a realização preferida da invenção, que apenas um resíduo cisteína por antigénio, independentemente deste resíduo cisteína estar naturalmente presente no antigénio ou não, é capaz de se unir e associar, respectivamente, com a VLP e o primeiro local de ligação da partícula central, respectivamente.

Nalgumas realizações, a modificação de um segundo local de ligação no antigénio requer a fusão de um aminoácido de ligação contendo um aminoácido adequado como segundo local de ligação de acordo com as apresentações desta invenção. Assim, numa realização preferida da presente invenção, um aminoácido de ligação é ligado ao antigénio ou ao determinante antigénico por intermédio de



pelo menos uma ligação covalente. Preferentemente, o aminoácido de ligação compreende, ou alternativamente consiste em, o segundo local de ligação. Numa realização ainda mais preferida, o aminoácido de ligação compreende um grupo sulfidrilo ou um resíduo cisteína. Noutra realização preferida, o aminoácido de ligação é cisteína. Alguns critérios de selecção do aminoácido de ligação assim como realizações mais preferidas do aminoácido de ligação de acordo com a invenção foram já mencionados acima.

Numa realização ainda mais preferida da invenção, o pelo menos um antigénio ou determinante antigénico, ou seja, o péptido A $\beta$ 1-6 é fundido com a partícula semelhante a vírus. Como apresentado acima, uma partícula semelhante a vírus é tipicamente composta por pelo menos uma subunidade que se organiza numa partícula semelhante a vírus. Assim, de novo numa realização ainda mais preferida da invenção, o antigénio ou determinante antigénico, preferentemente o pelo menos um péptido A $\beta$ 1-6 é fundido com pelo menos uma subunidade da partícula semelhante a vírus ou de uma proteína capaz de ser incorporada numa VLP gerando uma proteína de fusão péptido A $\beta$ 1-6-subunidade de VLP quimérica.

A fusão dos péptidos A $\beta$ 1-6 pode ser efectuada através da inserção na sequência da subunidade de VLP, ou por fusão a qualquer das extremidades N ou C da subunidade de VLP ou proteína capaz de ser incorporada numa VLP. Aqui de seguida, quando se faz referência a proteínas de fusão

de um péptido a uma subunidade VLP, estão abrangidas a fusão a qualquer das extremidades da sequência da subunidade ou a inserção interna do péptido no interior da sequência da subunidade.

A fusão pode também ser efectuada através da inserção de sequências do péptido A $\beta$ 1-6 numa variante de uma subunidade VLP em que parte da sequência da subunidade foi deletada, e são ainda referidos como mutantes de truncagem. Os mutantes de truncagem podem ter deleções internas ou nas extremidades N ou C de parte da sequência da subunidade de VLP. Por exemplo, a VLP HBcAg específica com, por exemplo, deleção dos resíduos de aminoácidos 79 a 81 é um mutante de truncagem com uma deleção interna. A fusão de péptidos A $\beta$ 1-6 a qualquer das extremidades N ou C das subunidades de VLP mutantes por truncagem também conduzem a realizações da invenção. Do mesmo modo, a fusão de um epitopo numa sequência da subunidade de VLP pode também ser efectuada por substituição, em que por exemplo para a específica VLP HBcAg, os aminoácidos 79-81 são substituídos por um epitopo estranho. Assim, fusão, como daqui adiante referido, pode ser realizada por inserção da sequência do péptido A $\beta$ 1-6 na sequência de uma subunidade VLP, por substituição de parte da sequência da subunidade VLP com o péptido A $\beta$ 1-6, ou por uma combinação de deleção, substituição ou inserções.

A subunidade quimérica péptido A $\beta$ 1-6-VLP será em geral capaz de auto-organização numa VLP. VLP apresentando

epitopos fundidos à suas subunidades são também aqui referidas como VLPs quiméricas. Tal como indicado, a partícula semelhante a vírus compreende ou alternativamente é composta por pelo menos uma subunidade VLP. Noutra realização da invenção, a partícula semelhante a vírus compreende ou alternativamente é composta por uma mistura de subunidades de VLP quiméricas e subunidades de VLP não quiméricas, ou seja, subunidades que não têm um antigénio a elas fundido, conduzindo às denominadas partículas mosaico. Isto pode ser vantajoso para assegurar a formação de, e organização numa VLP. Nestas realizações, a proporção de subunidades de VLP quiméricas pode ser 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% ou superior.

Podem ser adicionados resíduos de aminoácidos flanqueadores a qualquer extremidade da sequência do péptido ou do epitopo a ser fundido a qualquer extremidade da sequência da subunidade de uma VLP, ou para inserção interna de tal sequência peptídica na sequência da subunidade de uma VLP. Resíduos glicina e serina são aminoácidos particularmente favorecidos para utilização nas sequências flanqueadores adicionadas ao péptido a ser fundido. Os resíduos glicina conferem flexibilidade adicional, o que pode diminuir o efeito potencialmente desestabilizador da fundir uma sequência estranha na sequência de uma subunidade de VLP.

Numa realização mais preferida da invenção, a VLP é uma VLP de um bacteriófago de ARN. As proteínas de

cápside principais dos bacteriófagos de ARN organizam-se espontaneamente em VLPs após expressão em bactérias, e em particular em *E. coli*. Exemplos específicos de proteínas de cápside de bacteriófagos que podem ser usadas para preparar composições da invenção incluem as proteínas de cápside de bacteriófagos de ARN tais como o bacteriófago Q $\beta$  (SEQ ID NO:4; Base de Dados PIR, No. de Acesso VCBPQ $\beta$  referindo-se a Q $\beta$  CP e SEQ ID NO: 5; No. de Acesso AAA16663 referindo-se à proteína Q $\beta$  A1), e bacteriófago fr (SEQ ID NO:7; No. de Acesso PIR VCBPFR).

Numa realização mais preferida, o pelo menos um péptido A $\beta$ 1-6 é fundido a uma proteína de cápside Q $\beta$ . Foram descritas construções de proteínas de fusão em que os epitopos foram fundidos com a extremidade C de uma forma truncada da proteína A1 de Q $\beta$ , ou inseridos na proteína A1. (Kozlovskaya, T. M., et al., Intervirology, 39:9-15 (1996)). A proteína A1 é gerada por supressão no codão de paragem UGA e tem um comprimento de 329 aa, ou de 328 aa, caso a clivagem da metionina N-terminal for tomada em conta. A clivagem da metionina N-terminal antes de uma alanina (o segundo aminoácido codificado pelo gene Q $\beta$  CP) geralmente ocorre em *E. coli*, e tal é o caso para as extremidades N das proteínas de cápside Q $\beta$ . A parte do gene A1, 3' do codão UGA "amber" codifica para a extensão CP, que tem um comprimento de 195 aminoácidos. A inserção do pelo menos um péptido A $\beta$ 1-6 entre as posições 72 e 73 da extensão CP conduz a mais realizações da invenção (Kozlovskaya, T. M., et al., Intervirology 39:9-15 (1996)). A fusão de um péptido

A $\beta$ 1-6 na extremidade C de uma proteína Q $\beta$  A1 truncada na extremidade C conduz a realizações mais preferidas da invenção. Por exemplo Kozlovskaja et al., (Intervirology, 39: 9-15 (1996)) descrevem que fusões da proteína Q $\beta$  A1 em que o epitopo é fundido na extremidade C da extensão Q $\beta$  CP truncada na posição 19.

Tal como descrito por Kozlovskaja et al. (Intervirology, 39: 9-15 (1996)), a organização das partículas que apresentam os epitopos fundidos requer tipicamente a presença tanto da fusão proteína A1-péptido A $\beta$ 1-6 como da CP nativa para formar uma partícula mosaico. No entanto, realizações compreendendo partículas semelhantes a vírus, e deste modo em particular as VLPs da proteína de cápside Q $\beta$  de ARN de bacteriófago, que são exclusivamente compostas por subunidades de VLP com pelo menos um péptido A $\beta$ 1-6 a elas fundido, estão também no âmbito da presente invenção.

A produção de partículas mosaico podem ser efectuadas de diversas maneiras. Kozlovskaja et al., Intervirology, 39: 9-15 (1996), descreve três métodos, todos os quais podem ser utilizados na prática da invenção. Na primeira abordagem, a apresentação eficiente do epitopo fundido nas VLPs é mediada pela expressão do plasmídeo que codifica para a proteína de fusão Q $\beta$  A1 com um codão de paragem UGA entre CP e a extensão CP numa estirpe de *E. coli* com um plasmídeo que codifica para um tARN supressor de UGA clonado que conduz à tradução do codão UGA em Trp (plasmídeo PISM3001 (Smiley B.K., et al., Gene 134:33-40

(1993))). Noutra abordagem, o codão de paragem do gene CP é modificado em UAA, e é co-transformado um segundo plasmídeo que expressa a fusão proteína A1-péptido A $\beta$ 1-6. O segundo plasmídeo codifica para uma resistência a antibiótico diferente e a origem de replicação é compatível com o primeiro plasmídeo (Kozlovskaya, T. M., et al., Intervirology 39:9-15 (1996)). Numa terceira abordagem, CP e fusão proteína A1-péptido A $\beta$ 1-6 são codificados de um modo bicistrónico, ligados de forma operacional a um promotor tal como o promotor Trp, tal como descrito em FIG. 1 de Kozlovskaya et al., Intervirology, 39:9-15 (1996).

Noutra realização, o péptido A $\beta$ 1-6 é inserido entre o aminoácido 2 e 3 (numeração da CP clivada, ou seja, no qual a metionina N-terminal é clivada) da fr CP, conduzindo assim a uma proteína de fusão péptido A $\beta$ 1-6-fr CP. Foram descritos vectores e sistemas de expressão para a construção e a expressão de proteínas de fusão fr CP que se auto-organizam em VLP e úteis na prática da invenção (Pushko P. et al., Prot. Eng. 6:883-891 (1993)). Numa realização específica, a sequência do péptido A $\beta$ 1-6 é inserida numa variante de deleção da fr CP após o aminoácido 2, em que os resíduos 3 e 4 da fr CP foram deletados (Pushko P. et al., Prot. Eng. 6:883-891 (1993)).

Foi também descrita a fusão de epitopos no gancho  $\beta$  N-terminal protuberante da proteína de cápside do bacteriófago de ARN MS-2 e a subsequente apresentação do epitopo fundido na VLP auto-organizada do bacteriófago de

ARN MS-2 (WO 92/13081), e a fusão do péptido A $\beta$ 1-6 por inserção ou substituição na proteína de cápside do bacteriófago de ARN MS-2 também se situa no âmbito da invenção.

Em realizações preferidas da invenção, péptidos A $\beta$ 1-6 adequados para gerar vacinas da invenção são modificados com um aminoácido de ligação para ligar a um VLP. Aqueles péptidos A $\beta$ 1-6 incluem, mas não se limitam a: A $\beta$ 1-6 fundido na extremidade C ao agente de ligação GGC. Aminoácidos de ligação adequados para a fusão à extremidade N dos fragmentos A $\beta$ 1-6 incluem mas não se limitam à sequência CGG e CGHGKNS. Agentes de ligação adequados para fusão na extremidade C de A $\beta$ 1-6 incluem mas não se limitam à sequência GGC. Numa realização preferida, quando um agente de ligação é fundido à extremidade C de A $\beta$  ou de fragmentos A $\beta$ , a cisteína C-terminal é amidada. Numa realização preferida, A $\beta$ 1-6 é fundido a um aminoácido de ligação e tem a sequência "NH<sub>2</sub>-DAEFRHGGC-CONH<sub>2</sub>", em que a cisteína C-terminal é amidada, que é indicado pelo "-CONH<sub>2</sub>" C-terminal, e a extremidade N do péptido está livre, o que é ainda indicado por "NH<sub>2</sub>-". Os aminoácidos de ligação são preferentemente curtos, para evitar a indução de respostas imunitárias contra os aminoácidos do referido agente de ligação, mas deverão permitir a indução de anticorpos com reacção cruzada com A $\beta$  solúvel e as placas DA e pode facilitar a interacção dos anticorpos com o péptido A $\beta$ 1-6. Outras propriedades adequadas do aminoácido de ligação são flexibilidade, e preferentemente a ausência de aminoácidos

volumosos que possam interferir com o acoplamento, e/ou gerar uma resposta imunitária contra o próprio agente de ligação. Em realizações mais preferidas, o aminoácido de ligação contendo um resíduo de cisteína como segundo local de ligação é fundido com a extremidade C do péptido A $\beta$ 1-6.

Fragmentos A $\beta$  adicionais adequados na prática da invenção incluem fragmentos A $\beta$  correspondendo aos fragmentos acima mencionados, também modificados tal como descrito acima, de outras espécies animais e causando a resposta de anticorpos com reacção cruzada com placas amilóides humanas e A $\beta$  humano solúvel. Exemplos de tais fragmentos são A $\beta$ 1-6 de primatas (DAEFRH; SEQ ID NO: 84), coelho (DAEFRH; SEQ ID NO: 85), porquinho da índia (DAEFRH: SEQ ID NO: 88), ratinho (DAEFGH; SEQ ID NO: 76), rato (DAEFGH SEQ ID NO: 87), e *xaenopus laevis* (DSEYRH; 86).

Foram apresentados diversos modelos animais da DA com base em ratinhos transgénicos que sobre-expressam formas mutadas da PPA humana (Games, D. et al., Nature 373: 523-527 (1995a); Sturchler-Pierrat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13287-13292 (1997); Hsiao, K., et al., Science 274: 99-102 (1996); Chen, G. et al., Nature 408 : 975- 979 (2000) ; Janus, C. et al., Nature 408 : 979-982 (2000) ; Morgan, D. et al., Nature 408 : 982-985 (2000)). Aqueles modelos de ratinho diferem uns dos outros no nível de sobre-expressão do transgene, as mutações DA presentes no transgene e no promotor sob o qual a sobre-expressão do transgene é dirigida. Estes modelos animais não permitem



reproduzir a totalidade dos sinais patológicos da DA, que são em particular alterações de comportamento relacionadas com a idade, deposição de  $\beta$ -amilóide em placas insolúveis, tranças neurofibrilares nos neurónios, e perda de neurónios ao longo do cérebro anterior (Chapman, P.F. Nature 408: 915-916 (2000)). Os défices de memória e os métodos para os identificar pôde no entanto ser identificado naqueles modelos, e podem ser usados para testar o efeito das composições da invenção em modelos animais (Chen, G. et al., Nature 408 : 975- 979 (2000) ; Janus, C. et al., Nature 408 : 979-982 (2000); Morgan, D. et al., Nature 408 : 982-985 (2000)). Além disso, a deposição relacionada com a idade de A $\beta$  em placas amilóides pode ser estudada naqueles modelos, que também desenvolvem astrocitose e microgliose.

Tendo agra descrito a presente invenção em detalhe, o mesmo será mais claramente percebido por referência aos seguintes exemplos, que são aqui incluídos apenas para efeitos de ilustração e não se pretendem ser uma limitação da invenção.

#### EXEMPLOS

##### EXEMPLO 1

**Clonagem e construção, respectivamente, expressão e purificação de partículas centrais e VLP preferidas, respectivamente, de fagos de ARN**

A. Construção e expressão de proteínas de cápside Q $\beta$  mutantes, e purificação de VLPs ou cápsides de proteínas de cápside Q $\beta$  mutantes.

Construção de plasmídeos e clonagem de proteínas de cápside mutantes

Construção de pQ $\beta$ -240:

O plasmídeo pQ $\beta$ 10 (Kozlovska, TM, et al., Gene 137:133-137) foi utilizado como um plasmídeo inicial para a construção de pQ $\beta$ -240. A mutação Lys13→Arg foi criada por PCR inversa. Os iniciadores inversos foram desenhados nas direcções ponta-a-ponta invertidas:

5'-GGTAACATCGGTCGAGATGGAAAACAACTCTGGTCC-3' (SEQ ID NO: 48)

e

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

Os produtos da primeira reacção de PCR foram usadas como moldes para a segunda reacção de PCR, na qual se utilizaram um iniciador a montante

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

e um iniciador a jusante

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

O produto da segunda reacção de PCR foi digerido com *XbaI* e *Mph1103I* e clonado no vector de expressão pQ $\beta$ 10, o qual foi clivado pelos mesmos enzimas de restrição. As reacções de PCR foram realizadas com reagentes de um kit de PCR e de acordo com o protocolo do fabricante (MBI Fermentas, Vilnius, Lituânia).

A sequenciação utilizando o método de incorporação de marcador directo verificou as mutações desejadas. Células de *E. coli* albergando pQ $\beta$ -240 suportaram uma síntese eficaz de uma proteína de 14 kD que co-migra em SDS-PAGE com a proteína de cápside Q $\beta$  controlo isolada de partículas de fago Q $\beta$ .

Sequência de aminoácidos resultante: (SEQ ID NO: 17)

**AKLETVTGLGNIGRDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP  
ALEKRVTVSVSQPSRNRKNYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ  
KYADVTFSTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY**

Construção de pQ $\beta$ -243:

O plasmídeo pQ $\beta$ 10 foi utilizado como plasmídeo inicial para a construção de pQ $\beta$ -243. A mutação Asn10→Lys foi criada por PCR inversa. Os iniciadores inversos foram desenhados nas direcções ponta-a-ponta invertidas:

5'-GGCAAAATTAGAGACTGTTACTTTAGGTAAGATCGG -3' (SEQ ID NO: 52)

e

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

Os produtos da primeira reacção de PCR foram usadas como moldes para a segunda reacção de PCR, na qual se utilizaram um iniciador a montante

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

e um iniciador a jusante

5'-CGATGCATTTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGTTTCAG-3' (SEQ ID NO: 51). O produto da segunda reacção de PCR foi digerido com *XbaI* e *Mph1103I* e clonado no vector de expressão pQ $\beta$ 10, o qual foi clivado pelos mesmos enzimas de restrição. As reacções de PCR foram realizadas com reagentes de um kit de PCR e de acordo com o protocolo do fabricante (MBI Fermentas, Vilnius, Lituânia).

A sequenciação utilizando o método de incorporação de marcador directo verificou as mutações desejadas. Células de *E. coli* albergando pQ $\beta$ -243 suportaram uma síntese eficaz de uma proteína de 14 kD que co-migra em SDS-PAGE com a proteína de cápside Q $\beta$  controlo isolada de partículas de fago Q $\beta$ .

Sequência de aminoácidos resultante: (SEQ ID NO: 18)

**AKLETVTLGKIGKDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP  
ALEKRVTVSVSQPSNRKNYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ  
KYADVTFSTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY**

Construção de pQ $\beta$ -250:

O plasmídeo pQ $\beta$ -240 foi utilizado como plasmídeo inicial para a construção de pQ $\beta$ -250. A mutação Lys2→Arg foi criada por mutagénesse dirigida. Utilizaram-se um iniciador a montante

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

e um iniciador a jusante

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

para a síntese do fragmento de PCR mutante, que foi introduzido no vector de expressão pQ $\beta$ -185 nos locais de restrição únicos **NcoI** e **HindIII**. As reacções de PCR foram realizadas com reagentes de um kit de PCR e de acordo com o protocolo do fabricante (MBI Fermentas, Vilnius, Lituânia).

A sequenciação utilizando o método de incorporação de marcador directo verificou as mutações desejadas. Células de *E. coli* albergando pQ $\beta$ -250 suportaram uma síntese eficaz de uma proteína de 14 kD que co-migra em PAGE com a proteína de cápside Q $\beta$  controlo isolada de partículas de fago Q $\beta$ .

Sequência de aminoácidos resultante: (SEQ ID NO: 19)

ARLETVTTLGNIGRDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP  
ALEKRVTVSVSQPSRNRKNYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ  
KYADVTFSTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIQDQNPAY

Construção de pQ $\beta$ -251:

O plasmídeo pQ $\beta$ 10 foi utilizado como plasmídeo inicial para a construção de pQ $\beta$ -251. A mutação Lys16 $\rightarrow$ arg foi criada por PCR inversa. Os iniciadores inversos foram desenhados nas direcções ponta-a-ponta invertidas:

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

e

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

Os produtos da primeira reacção de PCR foram usadas como moldes para a segunda reacção de PCR, na qual se utilizaram um iniciador a montante

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

e um iniciador a jusante

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

O produto da segunda reacção de PCR foi digerido com *XbaI* e *Mph1103I* e clonado no vector de expressão pQ $\beta$ 10, o qual foi clivado pelos mesmos enzimas de restrição. As reacções de PCR foram realizadas com reagentes de um kit de PCR e de acordo com o protocolo do fabricante (MBI Fermentas, Vilnius, Lituânia).

A sequenciação utilizando o método de incorporação de marcador directo verificou as mutações desejadas. Células de *E. coli* albergando pQ $\beta$ -251 suportaram uma síntese eficaz de uma proteína de 14 kD que co-migra em SDS-PAGE com a proteína de cápside Q $\beta$  controlo isolada de partículas de fago Q $\beta$ . A sequência de aminoácidos resultante codificada por esta construção é apresentada em (SEQ ID NO: 20).

Construção de pQ $\beta$ -259:

O plasmídeo pQ $\beta$ -251 foi utilizado como plasmídeo inicial para a construção de pQ $\beta$ -259. A mutação Lys2→Arg foi criada por mutagénese dirigida. Utilizaram-se um iniciador a montante

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

e um iniciador a jusante

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

para a síntese do fragmento de PCR mutante, que foi introduzido no vector de expressão pQ $\beta$ -185 nos locais de restrição únicos *NcoI* e *HindIII*. As reacções de PCR foram realizadas com reagentes de um kit de PCR e de acordo com o protocolo do fabricante (MBI Fermentas, Vilnius, Lituânia).

A sequenciação utilizando o método de incorporação de marcador directo verificou as mutações desejadas. Células de *E. coli* albergando pQ $\beta$ -259 suportaram uma síntese eficaz de uma proteína de 14 kD que co-migra em SDS-PAGE com a proteína de cápside Q $\beta$  controlo isolada de partículas de fago Q $\beta$ .

Sequência de aminoácidos resultante: (SEQ ID NO: 21)

AKLETVTGLGNIGKD GKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP  
ALEKRVTVSVSQPSRNRKNYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ  
KYADVTFSTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY

Procedimentos gerais para Expressão e purificação de Q $\beta$  e mutantes Q $\beta$

Expressão

Transformou-se *E. coli* com plasmídeos de expressão da proteína de cápside Q $\beta$ . Inoculou-se 5 mL de meio líquido LB contendo 20  $\mu$ g/mL de ampicilina com clones

transformados com plasmídeos de expressão da proteína de cápside Q $\beta$ . A cultura inoculada foi incubada a 37°C durante 16-24 h sem agitação. O inóculo preparado foi subseqüentemente diluído 1:100 em 100-300 mL de meio LB fresco, contendo 20  $\mu$ g/mL de ampicilina e incubado a 37°C durante a noite sem agitação. O segundo inóculo resultante foi diluído 1:50 em meio M9 contendo 1% de casaminoácidos e 0,2% de glucose em balões, e incubou-se a 37°C durante a noite com agitação.

#### Purificação

Soluções e tampões para o procedimento de purificação:

1. Tampão de lise LB

50 mM de Tris-HCl pH 8,0 com 5 mM de EDTA, 0,1% tritonX100 e PMSF preparado de fresco a uma concentração de 5 microgramas por mL. Sem lisozima e DNase.

2. SAS

Sulfato de amônio saturado em água

3. Tampão NET

20 mM Tris-HCl, pH 7,8 com 5 mM EDTA e 150 mM NaCl.

4. PEG 40% (p/v) polietilenoglicol 6000 em NET

#### Ruptura e lise

Ressuspenderam-se células congeladas em LB a 2 mL/g células. A mistura foi sonicada com 22 kHz cinco vezes durante 15 segundos, com intervalos de 1 min para arrefecer



a solução em gelo. O lisado foi então centrifugado a 14000 rpm, durante 1h usando um rotor Janekki K 60. Os passos de centrifugação descritos abaixo foram todos realizados utilizando o mesmo rotor, excepto se indicado de outro modo. O sobrenadante foi armazenado a 4°C, enquanto se lavaram os detritos celulares duas vezes com LB. Após centrifugação, os sobrenadantes do lisado e as fracções de lavagem foram reunidas.

#### Fraccionamento

Uma solução saturada de sulfato de amónio foi adicionada gota a gota sob agitação ao lisado reunido acima. O volume da SAS foi ajustado para corresponder a um quinto do volume total, para obter 20% de saturação. A solução foi deixada repousar durante a noite, e foi centrifugada no dia seguinte a 14000 rpm, durante 20 min. O sedimento foi lavado com uma pequena quantidade de sulfato de amónio a 20%, e de novo centrifugado. Os sobrenadantes obtidos foram reunidos, e adicionou-se SAS gota a gota para obter 40% de saturação. A solução foi deixada a repousar durante a noite, e foi centrifugada no dia seguinte a 14000 rpm, durante 20 min. O sedimento obtido foi solubilizado em tampão NET.

#### Cromatografia

A proteína de cápside ou VLP de novo solubilizada em tampão NET foi carregada numa coluna Sepharose CL-4B.

Eluíram três picos durante a cromatografia. O primeiro continha principalmente membranas e fragmentos de membranas, e não foi recolhido. As cápsides foram contidas no segundo pico, enquanto que o terceiro pico continha outras proteínas de *E. coli*.

As fracções do pico foram reunidas e a concentração de NaCl foi ajustada a uma concentração final de 0,65M. O volume de solução PEG correspondente a metade da fracção de pico recolhida foi adicionado gota a gota com agitação. Deixou-se a solução repousar durante a noite sem agitação. A proteína da cápside foi sedimentada por centrifugação a 14000 rpm durante 20 min. Foi então solubilizada num volume mínimo de NET e carregada de novo numa coluna Sepharose CL-4B. As fracções do pico foram reunidas, e precipitadas com sulfato de amónio a 60% da saturação (p/v). Após centrifugação e ressolubilização em tampão NET, a proteína da cápside foi carregada numa coluna Sepharose CL-6B para nova cromatografia.

#### Diálise e secagem

As fracções do pico obtidas acima foram reunidas e dialisadas extensivamente contra água estéril, e liofilizadas para armazenamento.

#### Expressão e purificação de Q $\beta$ -240

Ressuspenderam-se em LB células (*E. coli* JM 109,

transformadas com o plasmídeo pQ $\beta$ -240), sonicaram-se cinco vezes durante 15 segundos (camisa de água e gelo) e centrifugaram-se a 13000 rpm durante uma hora. O sobrenadante foi armazenado a 4°C até ser processado de novo, enquanto os detritos foram lavados 2 vezes com 9 mL de LB, e finalmente com 9 mL de ureia a 0,7 M em LB. Todos os sobrenadantes foram reunidos, e carregados na coluna Sepharose CL-4B. As fracções do pico reunidas foram precipitadas com sulfato de amónio e centrifugadas. A proteína de novo solubilizada foi então ainda mais purificada numa coluna Sepharose 2B e finalmente numa coluna Sepharose 6B. O pico da cápside foi finalmente dialisado extensivamente contra água e liofilizado tal como descrito acima. A organização da proteína de cápside numa cápside foi confirmada por microscopia electrónica.

#### Expressão e purificação de Q $\beta$ -243

Ressuspenderam-se em LB células (*E. coli* RR1) e processaram-se como descrito no procedimento geral. A proteína foi purificada por dois passos sucessivos de filtração em gel na coluna Sepharose CL-4B e finalmente numa coluna Sepharose CL-2B. As fracções do pico foram reunidas e liofilizadas como descrito acima. A organização da proteína de cápside numa cápside foi confirmada por microscopia electrónica.

#### Expressão e purificação de Q $\beta$ -250

Ressuspenderam-se em LB células (*E. coli* JM 109,

transformadas com pQ $\beta$ -250) e processaram-se como descrito acima. A proteína foi purificada por filtração em gel numa coluna Sepharose CL-4B e finalmente numa coluna Sepharose CL-2B e liofilizada como descrito acima. A organização da proteína de cápside numa cápside foi confirmada por microscopia electrónica.

#### Expressão e purificação de Q $\beta$ -259

Ressuspenderam-se em LB células (*E. coli* JM 109, transformadas com pQ $\beta$ -259) e sonicaram-se. Os detritos foram lavados uma vez com 10 mL de LB e uma segunda vez com 10 mL de 0,7 M de ureia em LB. A proteína foi purificada por dois passos de cromatografia de filtração em gel, numa coluna Sepharose CL-4B. A proteína foi dialisada e liofi\_lizada, como descrito acima. A organização da proteína de cápside numa cápside foi confirmada por microscopia electrónica.

### **B. Clonagem, Expressão e Purificação da VLP de AP205 Recombinante**

#### Clonagem do gene da Proteína de Cápside AP205

O cADN da proteína de cápside AP205 (CP) (SEQ ID NO: 28) foi construído a partir de dois fragmentos de cADN gerados a partir do fago AP205 de ARN utilizando uma técnica de PCR de transcrição inversa e clonagem no plasmídeo comercial pCR4-TOPO para sequenciação. As

técnicas de transcrição inversa são bem conhecidas por aqueles competentes na técnica relevante. O primeiro fragmento, contido no plasmídeo p205-246, continha 269 nucleótidos a montante da sequência CP e 74 nucleótidos que codificam para os primeiros 24 aminoácidos da extremidade N da CP. O segundo fragmento, contido no plasmídeo p205-262, continha 364 nucleótidos que codificam para os aminoácidos 12-131 da CP e 162 nucleótidos adicionais a jusante da sequência CP. Tanto p205-246 e p205-262 foram uma oferta generosa de J. Klovins.

O plasmídeo 283.-58 foi desenhado por PCR em dois passos, de modo a fundir ambos os fragmentos CP dos plasmídeos p205-246 e p205-262 numa sequência CP de comprimento total.

Utilizaram-se um iniciador a montante p1.44 contendo o local *NcoI* para clonagem no plasmídeo pQb195, ou p1.45 contendo o local *XbaI* para clonagem no plasmídeo pQb10, e um iniciador a jusante p1.46 contendo o local de restrição *HindIII* (sequência de reconhecimento da enzima de restrição sublinhada):

p1.44 5'-AACC ATG GCA AAT AAG CCA ATG CAA CCG-3' (SEQ ID NO: 79)

p1.45 5'-AATCTAGAATTTTCTGCGCACCCATCCCGG-3' (SEQ ID NO: 80)

p1.46 5'-AAAAGC TTA AGC AGT AGT ATC AGA CGA TAC G-3' (SEQ ID NO: 81)

Utilizaram-se dois iniciadores adicionais, p1-47, emparelhamento na extremidade 5' do fragmento contido em p205-262, e p1.48, emparelhamento na extremidade 3' do fragmento contido no plasmídeo p205-246 para amplificar os fragmentos no primeiro PCR. Os primeiros p1.47 e p1.48 são complementares uns em relação ao outro.

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

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

Nas primeiras duas reacções de PCR, foram gerados dois fragmentos. O primeiro fragmento foi gerado com iniciadores p1.45 e p1.48 e o molde p205-246. O segundo fragmento foi gerado com iniciadores p1.47 e p1.46, e o molde p205-262. Ambos os fragmentos foram usados como molde para a segunda reacção de PCR, uma extensão com interligação-sobreposição, com a combinação de iniciadores p1-46 e p-146 ou p1.44 e p1.46. O produto das duas reacções de PCR do segundo passo foram digeridas com, respectivamente, *XbaI* ou *NcoI* e *HindIII*, e clonadas com os mesmos locais de restrição em, respectivamente, pQb10 ou pQb185, dois vectores de expressão derivados de pGEM sob o controlo do promotor do operão triptofano *E. coli*.

Obtiveram-se dois plasmídeos, pAP283-58 (SEQ ID NO: 27), contendo o gene que codifica para CP AP205 nativo (SEQ ID NO: 28) em pQb10, e pAP281-32 (SEQ ID NO: 30) com

mutação Pro5→Thr (SEQ ID NO: 29), em pQb185. As sequências das proteínas de cápside foram verificadas por sequenciação de ADN. PAP283-58 contém 49 nucleótidos a montante do codão ATG de CP, a jusante do local XbaI, e contém o local de ligação do ribossoma putativo original do mARN da proteína de cápside.

#### Expressão e Purificação da VLP de AP205 Recombinante

##### A. Expressão de VLP de AP205 recombinante

Transformou-se *E. coli* JM109 com o plasmídeo pAP283-58. Inoculou-se 5 mL de meio LB líquido com 20 µg/mL de ampicilina com uma única colónia e incubou-se a 37°C durante 16-24 h sem agitação.

O inóculo preparado foi diluído 1:100 em 100-300 mL de meio LB, contendo 20 µg/mL de ampicilina e incubou-se a 37°C durante a noite sem agitação. A segundo inóculo resultante foi diluído 1:50 em meio 2TY, contendo 0,2% de glucose e fosfato para tamponização, e incubou-se a 37°C durante a noite num incubador agitado. As células foram recolhidas por centrifugação e congeladas a -80°C.

##### Soluções e tampões:

Tampão de lise

50 mM de Tris-HCl pH 8,0 com 5 mM de EDTA, 0,1%

tritonX100 e PMSF a 5 microgramas por mL

SAS

Sulfato de amónio saturado em água

Tampão NET

20 mM Tris-HCl, pH 7,8 com 5 mM EDTA e 150 mM NaCl.

PEG

40% (p/v) polietilenoglicol 6000 em NET

Lise:

Ressuspenderam-se células congeladas em tampão de lise a 2 mL/g células. A mistura foi sonicada com 22 kHz cinco vezes durante 15 segundos, com intervalos de 1 min para arrefecer a solução em gelo. O lisado foi então centrifugado durante 20 minutos a 12000 rpm, usando um rotor F34-6-38 (Eppendorf). Os passos de centrifugação descritos abaixo foram todos realizados utilizando o mesmo rotor, excepto se indicado de outro modo. O sobrenadante foi armazenado a 4°C, enquanto se lavaram os detritos celulares duas vezes com tampão de lise. Após centrifugação, os sobrenadantes do lisado e as fracções de lavagem foram reunidas.

Pode-se utilizar precipitação com sulfato de amónio para uma purificação suplementar de VLP de AP205. Num primeiro passo, escolhe-se uma concentração do sulfato de amónio à qual a VLP de AP205 não precipita. O sedimento resultante foi descartado. No passo seguinte, selecciona-se uma concentração de sulfato de amónio à qual a VLP de AP205 precipita quantitativamente, e isola-se VLP de AP205 do sedimento deste passo de precipitação por centrifugação



(14000 rpm, durante 20 min). O sedimento obtido é solubilizado em tampão NET.

#### Cromatografia:

A proteína de cápside dos sobrenadantes reunidos foi carregada numa coluna Sepharose 4B (2,8 x 70 cm), e eluída com tampão NET, a 4 mL/hora/fracção. Recolheram-se as fracções 28-40, e precipitaram-se com sulfato de amónio a uma saturação de 60%. As fracções foram analisadas por SDS-PAGE e Western Blot com um anti-soro específico para AP205 antes da precipitação. O sedimento isolado por centrifugação foi de novo solubilizado em tampão NET e carregado numa coluna Sepharose 2B (2,3 x 65 cm), eluído a 3 mL/h/fracção. As fracções foram analisadas por SDS-PAGE, e as fracções 44-50 foram de novo solubilizadas em tampão NET e purificadas numa coluna Sepharose 6B (2,5 x 47 cm), eluída a 3 mL/hora/fracção. As fracções foram analisadas por SDS-PAGE. As fracções 23-27 foram recolhidas, a concentração de sal foi ajustada a 0,5 M e precipitada com PEG 6000, adicionada de uma solução mãe a 40% em água e até uma concentração final de 13,3%. O sedimento isolado por centrifugação foi de novo solubilizado em tampão NET, e carregado na mesma coluna Sepharose 2B que acima, eluído do mesmo modo. Recolheram-se as fracções 43-53, e precipitaram-se com sulfato de amónio a uma saturação de 60%. O sedimento isolado por centrifugação foi de novo solubilizado em água, e a solução de proteína obtida foi dialisada extensivamente contra água. Conseguiu-se isolar cerca de 10 mg de proteína purificada por grama de células.

O exame das partículas semelhantes a vírus por microscopia electrónica mostrou que eram idênticas às partículas de fagos.

#### EXEMPLO 2

Inserção de um péptido contendo um resíduo de Lisina no epitopo c/e 1 de HBcAg(1-149).

O epitopo c/e 1 (resíduos 72 a 88) de HBcAg está localizado na região da ponta à superfície da cápside do vírus da Hepatite B (HBcAg). Uma parte desta região (Prolina 79 e Alanina 80) foi geneticamente substituída pelo péptido Gly-Gly-Lys-Gly-Gly (SEQ ID NO: 33) resultando na construção HBcAg-Lys (SEQ ID NO: 26). O resíduo Lisina introduzido contém um grupo amino reactivo na sua cadeia lateral que pode ser utilizado para reticulação química intermolecular de partículas de HBcAg com qualquer antigénio contendo um grupo cisteína livre.

ADN de HBcAg-Lys com a sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ ID NO: 78, foi gerado por PCRs: Os dois fragmentos que codificam para os fragmentos HBcAg (resíduos de aminoácidos 1 a 78 e 81 a 149) foram amplificados separadamente por PCR. Os iniciadores utilizados para estes PCRs também introduziram uma sequência de ADN que codifica para o péptido Gly-Gly-Lys-Gly-Gly (SEQ ID NO: 33). O fragmento HBcAg (1 a 78) foi amplificado de pEco63 utilizando iniciadores EcoRIHBcAG(s) e Lys-HBcAg(as). O

fragmento HBcAg (81 a 149) foi amplificado de pEco63 utilizando iniciadores Lys-HBcAg(s) e HBcAg(1-149)Hind(as). Os iniciadores Lys-HBcAg(as) e Lys-HBcAg(s) introduziram sequências de ADN complementares nas extremidades dos dois produtos de PCR permitindo a fusão dos dois produtos de PCR numa construção de PCR subsequente. Os fragmentos reunidos foram amplificados por PCR utilizando iniciadores EcoRIHBcAG(s) e HbcAg(1-149)Hind(as).

Para os PCRs, utilizou-se 100 pmol de cada oligonucleótido e 50 ng dos ADNs moldes nas misturas reacionais de 50 mL com 2 unidades de polimerase Pwo, 0,1 mM de dNTPs e 2 mM de MgSO<sub>4</sub>. Para ambas as reacções, os ciclos de temperatura foram levados a cabo como se segue: 94°C durante 2 minutos; 30 ciclos de 94°C (1 minuto), 50°C (1 minuto), 72°C (2 minutos).

Sequências dos iniciadores:

EcoRIHBcAg(s) :

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

Lys-HBcAg(as) :

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

Lys-HBcAG(s) :

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

HBcAg(1-149)Hind(as):

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

Para fusão dos dois fragmentos de PCR por PCR utilizaram-se 100 pmol de iniciadores EcoRIHBcAg(s) e HBcAg(1-149)Hind(as) com 100 ng dos dois fragmentos de PCR purificados numa mistura reaccional de 50 mL com 2 unidades de polimerase Pwo, 0,1 mM de dNTPs e 2 mM de MgSO<sub>4</sub>. As condições de ciclos de PCR foram: 94°C durante 2 minutos; 30 ciclos de 94°C (1 minuto), 50°C (1 minuto), 72°C (2 minutos). O produto de PCR construído foi analisado por electroforese em gel de agarose, purificado e digerido durante 19 horas num tampão apropriado com os enzimas de restrição EcoRI e HindIII. O fragmento de ADN digerido foi ligado num vector pKK digerido por EcoRI/HindIII para gerar o vector de expressão pKK-HBcAg-Lys. A inserção do produto de PCR no vector foi analisada por análise de restrição com EcoRI/HindIII e sequenciação de ADN da inserção.

### EXEMPLO 3

Expressão e purificação de HBcAg-Lys.

Transformaram-se estirpes de *E. coli* K802 ou JM109 com pKK-HBcAg-Lys. Utilizou-se 1 mL de uma cultura bacteriana crescida durante uma noite para inocular 100 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. Esta cultura foi crescida durante 4 horas a 37°C até se atingir uma DO a

600 nm de aproximadamente 0,8. A indução da síntese de HBcAg-Lys foi realizada através da adição de IPTG a uma concentração final de 1 mM. Após indução, as bactérias foram ainda agitadas a 37°C durante 4 horas. As bactérias foram recolhidas por centrifugação a 5000 x g durante 15 minutos. O sedimento foi congelado a -80°C. O sedimento foi descongelado e ressuspendido em tampão de lise bacteriana (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,0, 30 mM NaCl, 0,25% Tween-20, 10 mM EDTA) suplementado com 200 µg/mL de lisozima e 10 µL de Benzonase (Merck). As células foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente e provocou-se a ruptura por sonicação. As células de *E. coli* com o plasmídeo de expressão pKK-HBcAg-Lys ou um plasmídeo de controlo foram usadas para indução de uma expressão HBcAg-Lys com IPTG. Antes da adição do IPTG uma amostra foi removida da cultura bacteriana com o plasmídeo pKK-HBcAg-Lys e de uma cultura com o plasmídeo de controlo. Quatro horas após a adição de IPTG foram de novo removidas amostras da cultura contendo pKK-HBcAg-Lys e da cultura controlo. A expressão proteica foi monitorizada por SDS-PAGE seguida por coloração de Coomassie.

O lisado foi então centrifugado durante 30 minutos a 12000 x g de modo a remover detritos celulares insolúveis. O sobrenadante e o sedimento foram analisados por "Western blotting" utilizando um anticorpo monoclonal contra HBcAG (YVS1841, adquirido da Accurate Chemical and Scientific Corp., Westbury, NI, EUA), indicando que uma quantidade significativa de HBcAg-Lys era solúvel.

Brevemente, centrifugaram-se lisados de células de *E. coli* que expressam HBcAg-Lys e de células controlo a 14000 x g durante 30 minutos. Separaram-se o sobrenadante (= fracção solúvel) e o sedimento (= fracção insolúvel) e diluíram-se com tampão de amostra SDS em volumes iguais. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE seguindo por "Western blotting" com anticorpo monoclonal anti-HBcAG YVS 1841.

O lisado celular clarificado foi utilizado para uma centrifugação sob gradiente utilizando um gradiente de sacarose consistindo numa em 4 mL de uma solução de sacarose a 65% coberta com 3 mL de uma solução de sacarose a 15% seguida por 4 mL de lisado bacteriano. A amostra foi centrifugada durante 3 horas com 100000 x g a 4°C. Após centrifugação, recolheram-se fracções de 1 mL do topo do gradiente e analisaram-se por SDS-PAGE seguindo-se por coloração de Coomassie. A proteína HBcAg-Lys foi detectada por coloração de Coomassie.

A proteína HBcAg-Lys foi enriquecida na interface entre 15 e 65% de sacarose indicando que formou uma partícula de cápside. A maioria das proteínas bacterianas permaneceu na camada superior do gradiente sem sacarose, pelo que a centrifugação em gradiente das partículas de HBcAg-Lys conduziu tanto a um enriquecimento como também a uma purificação parcial das partículas.

A expressão e purificação de HBcAg-Lys em grande escala foi levada a cabo como se segue. Uma cultura levada

a cabo durante a noite foi preparada através da inoculação de uma única colónia em 100 mL de LB, 100 µg/mL de Ampicilina e crescendo a cultura durante a noite a 37°C. Diluiu-se 25 mL da pré-cultura em 800 mL de meio LB Ampicilina no dia seguinte, e a cultura cresceu até uma densidade óptica de  $DO^{600}$  de 0,6-0,8. A cultura foi então induzida com 1 mM de PITG, e deixada a crescer durante mais 4 horas. As células foram recolhidas e lisadas essencialmente como descrito acima.

Purificou-se então HBcAg-Lys por primeiramente precipitar-se a proteína com sulfato de amónio (30% de saturação) do lisado celular clarificado, depois carregou-se o sedimento de novo solubilizado numa coluna de filtração em gel (Sephacryl S-400, Pharmacia). As fracções reunidas foram precipitadas de novo com sulfato de amónio, o sedimento foi de novo solubilizado e carregado uma segunda vez na mesma coluna de filtração em gel. As fracções foram finalmente reunidas e concentradas e a concentração foi determinada utilizando um teste de Bradford (BioRad).

#### EXEMPLO 4

Construção de HBcAg sem resíduos de cisteína livres e contendo um resíduo de lisina inserido.

Um antigénio "core" da hepatite (HBcAg), aqui referido como HBcAg-lys-2cys-Mut, desprovido de resíduos

cisteína nas posições correspondentes a 48 e 107 em SEQ ID NO:25 e contendo um resíduo de lisina inserido foi construído utilizando os seguintes métodos.

As duas mutações foram introduzidas por primeiro se amplificar separadamente três fragmentos do gene HBcAg-Lys preparado como descrito acima no exemplo 2 com as seguintes combinações de iniciadores de PCR. Utilizaram-se métodos de PCR e técnicas de clonagem convencionais para preparar o gene HBcAg-lys-2cys-Mut.

Resumidamente, utilizaram-se os seguintes iniciadores para preparar o fragmento 1:

Iniciador 1: EcoRIHBcAg(s)

CCGGAATTCATGGACATTGACCCTTATAAAG (SEQ ID NO: 58)

Iniciador 2: 48as

GTGCAGTATGGTGAGGTGAGGAATGCTCAGGAGACTC (SEQ ID NO: 62)

Foram utilizados os seguintes iniciadores para preparar o fragmento 2:

Iniciador 3: 48s

GSGTCTCCTGAGCATTCCTCACCTCACCATACTGCAC (SEQ ID NO: 63)

Iniciador 4: 107as

CTTCCAAAAGTGAGGGAAGAAATGTGAAACCAC (SEQ ID NO: 64)

Foram utilizados os seguintes iniciadores para preparar o fragmento 3:



Iniciador 5: HBcAg149hind-as

**CGCGTCCCAAGCTTCTAAACAACAGTAGTCTCCGGAAGC-  
GTTGATAG (SEQ ID NO: 65)**

Iniciador 6: 107s

GTGGTTTCACATTTCTTCCCTCACTTTTGAAG (SEQ ID NO: 66)

Os fragmentos 1 e 2 foram combinados com iniciadores de PCR EcoRIHBcAg(s) e 107 as para originar o fragmento 4. O fragmento 4 e o fragmento 3 foram então combinados com os iniciadores EcoRIHBcAg(s) e HBcAg149hind-as para produzir o gene completo. O gene completo foi então digerido com os enzimas EcoRI (GAATTC) e HindIII (AAGCTT) e clonado no vector pKK (Pharmacia) cortado nos mesmos locais de restrição. A expressão e purificação de HBcAg-lys-2cys-Mut foi realizada como referido no Exemplo 3.

#### EXEMPLO 5

##### Construção de HBcAg1-185-Lys

O antigénio "core" da hepatite (HBcAg) 1-185 foi modificado tal como descrito no Exemplo 2. Uma parte da região (Prolina 79 e Alanina 80) do epitopo c/e1 (resíduos 72 a 88) foi geneticamente substituída pelo péptido Gly-Gly-Lys-Gly-Gly (SEQ ID NO: 33), resultando na construção HBcAg-Lys (SEQ ID NO: 26). O resíduo Lisina introduzido contém um grupo amino reactivo na sua cadeia lateral que pode ser utilizado para reticulação química intermolecular

de partículas HBcAg com qualquer antígeno contendo um grupo cisteína livre. Utilizaram-se métodos de PCR e técnicas de clonagem convencionais para preparar o gene HBcAg1-185-Lys.

A sequência Gly-Gly-Lys-Gly-Gly (SEQ ID NO: 33) foi inserida através da amplificação de dois fragmentos separados do gene HBcAg de pEco63, tal como descrito acima no Exemplo 2 e subsequentemente fundindo os dois fragmentos por PCR para formar o gene completo. Foram utilizadas as seguintes combinações de iniciadores de PCR:

fragmento 1:

Iniciador 1: EcoRIHBcAg(s) (SEQ ID NO: 58) (ver Exemplo 2)

Iniciador 2: Lys-HBcAg(as) (SEQ ID NO: 59) (ver Exemplo 2)

fragmento 2:

Iniciador 3: Lys-HBcAg(s) (SEQ ID NO: 60) (ver Exemplo 2)

Iniciador 4: HBcAgwtHindIIII

CGCGTCCCAAGCTTCTAACATTGAGATTCCCGAGATTG (SEQ ID NO: 67)

Construção:

Iniciador 1: EcoRIHBcAg(s) (SEQ ID NO: 58) (ver Exemplo 2)

Iniciador 2: HBcAgwtHindIIII (SEQ ID NO: 67)

O gene completo construído foi então digerido com

as enzimas EcoRI (GAATTC) e HindIII (AAGCTT) e clonado no vector pKK (Pharmacia) cortado nos mesmos locais de restrição.

#### EXEMPLO 6

Fusão de um péptido epitopo na região MIR de HbcAg.

Os resíduos 79 e 80 de HBcAg 1-185 foram substituídos com o epitopo CεH3 de sequência VNLTWSRASG (SEQ ID NO: 68). A sequência CεH3 deriva da sequência do terceiro domínio constante da cadeia pesada do IgE humano. O epitopo foi inserido na sequência de HBcAg1-185 utilizando um método de construção por PCR. No primeiro passo de PCR, o gene HBcAg1-185 proveniente do clone ATCC pEco63 e amplificado com iniciadores HBcAg-wt EcoR1 fwd e HBcAg-wt HindIII rev foi utilizado como molde em duas reacções separadas para amplificar dois fragmentos contendo elementos de sequência que codificam para a sequência CεH3. Estes dois fragmentos foram então reunidos num segundo passo de PCR, numa reacção de PCR de construção.

Combinações de iniciadores no primeiro passo de PCR: CεH3fwd com HBcAg-wt HindIII rev, e HBcAg-wt EcoRI fwd com CεH3rev. Na reacção de PCR de construção, os dois fragmentos isolados no primeiro passo de PCR foram primeiro reunidos durante 3 ciclos de PCR sem iniciadores externos, os quais foram posteriormente adicionados à mistura

reaccional durante os 25 ciclos seguintes. Iniciadores externos: HBcAg-wt EcoRI fwd e HBcAg-wt Hind III rev.

O produto de PCR foi clonado no pKK223.3 utilizando os locais EcoRI e HindIII, para expressão em *E. coli* (ver Exemplo 2). A VLP quimérica foi expressa em *E. coli* e purificada tal como descrito no Exemplo 2. O volume de eluição ao qual o HBcAg1-185- CεH3 eluiu da filtração em gel mostrou a junção das proteínas de fusão numa VLP quimérica.

#### Sequências dos iniciadores:

CεH3fwd:

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

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

CεH3rev:

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

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

HBcAg-wt EcoRI fwd:

5' CCGgaattcATGGACATTGACCCTTATAAAG (SEQ ID NO: 73)

HBcAg-wt Hind III rev:

5' CGCGTCCCaaagcttCTAACATTGAGATTCCCGAGATTG (SEQ ID NO: 74)

## EXEMPLO 7

Fusão do péptido A $\beta$ 1-6 na região MIR de HBcAg.

Os resíduos 79 e 80 de HBcAg1-185 são substituídos pelo péptido A $\beta$ 1-6 de sequência: DAEFRH (SEQ ID NO: 75) ou DAEFGH (SEQ ID NO: 76). São desenhados dois iniciadores que se sobrepõem utilizando a mesma estratégia que aquela descrita no Exemplo 6, e a proteína de fusão construída por PCR de construção. O produto de PCR é clonado no vector pKK223.3, e expresso em E. coli K802. As VLPs quiméricas são expressas e purificadas como descrito no Exemplo 3.

## EXEMPLO 8

Fusão de um péptido A $\beta$ 1-6 com a extremidade C da proteína A1 de Q $\beta$  truncada na posição 19 da extensão CP.

Utilizam-se um iniciador que emparelha na extremidade 5' do gene A1 de Q $\beta$  e um iniciador que emparelha na extremidade 3' do gene A1 e compreendendo adicionalmente um elemento de sequência que codifica para o péptido A $\beta$ 1-6, de sequência DAEFRH (SEQ ID NO: 75) ou DAEFGH (SEQ ID NO: 76), numa reacção de PCR com pQ $\beta$ 10 como molde. O produto de PCR é clonado em pQ $\beta$ 10 (Kozlovskaya T.M. et al., Gene 137: 133-37 (1993)), e a VLP quimérica expressa e purificada tal como descrito no Exemplo 1.

## EXEMPLO 9

Inserção de um péptido A $\beta$ 1-6 entre as posições 2 e 3 da proteína de cápside fr

Inserem-se iniciadores complementares que codificam para a sequência do péptido A $\beta$ 1-6 de sequência DAEFRH (SEQ ID NO: 75) ou DAEFGH (SEQ ID NO: 76), e contendo extremidades compatíveis com *Bsp119I* e nucleótidos adicionais que permitam a inserção em grelha, no local *Bsp119I* do vector pFrd8 (Pushko, P. et al., Prot. Eng. 6: 883-91 (1993)) por intermédio de técnicas convencionais de biologia molecular. Alternativamente, as extremidades desemparelhadas do vector pFrd8 são preenchidas com Klenow após digestão com *Bsp119I*, e ligam-se oligonucleótidos que codificam para a sequência do péptido A $\beta$ 1-6 e nucleótidos adicionais para clonagem em grelha no pFrd8 após o tratamento de Klenow. Os clones com a inserção na orientação correcta são analisados por sequenciação. A expressão e a purificação da proteína de fusão quimérica em *E. coli* JM109 ou *E. coli* K802 é realizada tal como descrito em Pushko, P. et al., Prot. Eng. 6: 883-91 (1993), excepto os passos de cromatografia que são realizados utilizando uma coluna Sepharose CL-4B ou Sephacryl S-400 (Pharmacia). O lisado celular é precipitado com sulfato de amónio, e purificado por dois passos sucessivos de purificação, de forma similar ao procedimento descrito para Q $\beta$  no Exemplo 1.

## EXEMPLO 10

Inserção de um péptido A $\beta$ 1-6 entre as posições 67 e 78 da proteína p1 de TyI no vector pOGS8111.

São sintetizados dois oligonucleótidos complementares que codificam para o péptido A $\beta$ 1-6, de sequência DAEFRH (SEQ ID NO: 75) ou DAEFGH (SEQ ID NO: 76), com extremidades compatíveis com o local NheI de pOGS8111. Adicionam-se oligonucleótidos adicionais para permitir a inserção em grelha de uma sequência que codifica para o péptido A $\beta$ 1-6 de acordo com a descrição de EP 677'111. Os aminoácidos AS e SS que flanqueiam o epitopo inserido são codificados pelos locais NheI alterados resultantes da inserção do oligonucleótido no gene TyA(d) de pOGS8111.

POGS8111 é transformado na estirpe *S. cerevisiae* MC2, para expressão da VLP de Ty quimérica tal como descrito em EP0677111 e nas suas referências. A VLP de Ty quimérica é purificada por ultracentrifugação em gradiente de sacarose tal como descrito em EP 677'111.

## EXEMPLO 11

Inserção de um péptido A $\beta$ 1-6 na proteína de cápside principal L1 de papilomavírus do tipo I (BPV-1).

Uma sequência que codifica para o péptido A $\beta$ 1-6 com a sequência DAEFRH (SEQ ID NO: 75) ou DAEFGH (SEQ ID

NO: 76) é substituída pela sequência que codifica para os aminoácidos 130-136 do gene L1 de BPV-1 clonado no vector pFastBac1 (GIBCO/BRL) tal como descrito (Chackerian, B. et al., Proc. Natl. Acad. USA 96: 2373-2378 (1999)). A sequência da construção é verificada por análise da sequência nucleotídica. O baculovírus recombinante é gerado utilizando o sistema de baculovírus GIBCO/BRL tal como descrito pelo fabricante. As VLPs quiméricas são purificadas a partir de células Sf9 infectadas com baculovírus tal como descrito por Kirnbauer, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89:12180-84 (1992) e Greenstone, H.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 95:1800-05 (1998).

#### EXEMPLO 12

Imunização de ratinhos com péptido A $\beta$ 1-6 fundido a VLPs.

Utilizam-se VLPs quiméricas apresentando o péptido N $\beta$ 1-6 de sequência DAEFRH (SEQ ID NO: 75) ou DAEFGH (SEQ ID NO: 76) gerado nos Exemplos 7-11 para imunização de um ratinho transgênico PPA humano ou ratinho C57/BL6 como descrito no Exemplo 13 e 14. Os soros obtidos dos ratinhos imunizados são analisados num ELISA específico para o péptido A $\beta$ 1-6 ou A $\beta$ 1-40 ou  $\beta$ -42, tal como descrito no Exemplo 13.

O efeito protector da vacina é examinado através da imunização de um grande grupo de ratinhos transgênicos PPA humano tal como descrito no Exemplo 14.



## EXEMPLO 13

Acoplamento do péptido A $\beta$ 1-6 a VLP de Q $\beta$  (Q $\beta$ A $\beta$ 1-6), e imunização de ratinhos com Q $\beta$ A $\beta$ 1-6

A. Acoplamento do péptido A $\beta$ 1-6 VLP de Q

O péptido A $\beta$ 1-6 (sequência: NH<sub>2</sub>-DAEFRHGGC-CONH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 77) foi sintetizado quimicamente; o grupo NH<sub>2</sub> inicial indica que o péptido tem uma extremidade N livre, e o grupo NH<sub>2</sub> terminal indica que o péptido tem uma extremidade carboxilo amidada. Expressou-se e purificou-se VLP de Q $\beta$  tal como descrito no exemplo 1. Reagiu-se VLP de Q $\beta$  em 20 mM de Hepes, 150 mM de NaCl, pH 8,2 (HBS, pH 8,2) a uma concentração de 2 mg/mL (determinada num teste de Bradford), com 1,43 mM de SMPH (Pierce, Rockford IL), diluído de uma solução mãe em DMSO, durante 30 minutos à temperatura ambiente (TA). A mistura reaccional foi então dialisada contra HBS, tampão pH 8,2 a 4°C, e reagida com 0,36 mM de péptido A $\beta$ 1-6, diluído na mistura reaccional de uma solução mãe a 50 mM em DMSO. Deixou-se a reacção de acoplamento prosseguir durante 2 horas a 15°C, e a mistura reaccional foi dialisada 2 x 2 horas contra um volume 1000 vezes superior de HBS, pH 8,2 e submetido a congelação rápida em azoto líquido em alíquotas para armazenamento a -80°C até ser utilizada.

Uma alíquota foi descongelada, e o acoplamento do péptido A1-6 às subunidades de VLP de Q foi avaliado por SDS-PAGE e a concentração da proteína foi medida num teste de Bradford. O resultado das reacções de acoplamento é apresentado na FIG. 1.

A FIG. 1 apresenta a análise por SDS-PAGE da reacção de acoplamento do péptido A $\beta$ 1-6 e a VLP de Q. As amostras foram corridas sob condições redutoras num gel a 16% de Tris-glicina, corado com azul brilhante de Coomassie. A coluna 1 é o marcador de proteína, com os pesos moleculares correspondentes indicados na margem esquerda do gel; coluna 2, proteína VLP de Q $\beta$  derivatizada; coluna 3, o sobrenadante da reacção de acoplamento da proteína de VLP de QP ao péptido A $\beta$ 1-6; coluna 4, o sedimento da reacção de acoplamento da proteína VLP de Q ao péptido A $\beta$ 1-6; Produtos de acoplamento correspondendo ao acoplamento de 1, 2 e 3 péptidos por monómero são indicados por setas na Figura. Em média, foram acoplados mais do que 1,5 péptidos por subunidade; não sobraram praticamente nenhuma subunidades não acopladas.

B. Imunização de ratinhos com o péptido A $\beta$ 1-6 acoplado a VLP de Q e análise da resposta imunitária

Injectou-se VLP de Q $\beta$  acoplado ao péptido A $\beta$ 1-6

(aqui denominado Qb-Ab-1-6) s.c. em ratinhos (3 ratinhos) aos dias 0 e 14. O péptido A $\beta$ 1-6 foi acoplado à proteína VLP de Q tal como descrito acima. Cada ratinho foi (C57BL/6) foi imunizado com 10  $\mu$ g de vacina diluída em PBS até 200  $\mu$ L. Os ratinhos foram sangrados por via retro-orbital ao dia 21, e o teor dos anticorpos específicos para o péptido A $\beta$ 1-6 foi medido num teste ELISA contra A $\beta$ 1-6. O péptido A $\beta$ 1-6 foi acoplado a RNase A bovina utilizando o agente reticulante químico sulfo-SPDP. As placas de ELISA foram revestidas com preparação de RNase acopladas a uma concentração de 10  $\mu$ g/mL. As placas foram bloqueadas e depois incubadas com diluições em série de soro de ratinho. Detectaram-se anticorpos ligados com anticorpos IgG anti-rato marcados enzimaticamente. Como controlo, testaram-se também soros pré-imunes dos mesmos ratinhos. Os resultados são apresentados na FIG. 2.

A FIG. 2 apresenta uma análise por ELISA dos anticorpos IgG específicos para o péptido A $\beta$ 1-6 no soro de ratinhos imunizados contra o péptido A $\beta$ 1-6 acoplado à VLP de Q $\beta$ . Os resultados são apresentados para os três ratinhos imunizados (A 1-A3), o soro pré-imune é indicado como "pre" na figura; é apresentado o resultado para um soro pré-imune. A comparação dos soros pré-imunes com os soros de ratinhos imunizados com "Qb-Ab-16" mostra que pôde ser obtida uma forte resposta específica do anticorpo contra o péptido A $\beta$ 1-6 na presença de adjuvante.

C. ELISA contra péptido A $\beta$ 1-40

Preparou-se uma solução mãe de péptido A $\beta$ 1-40 ou A $\beta$ 1-42 humano em DMSO e diluiu-se em tampão de revestimento antes da utilização. As placas de ELISA foram revestidas com 0,1  $\mu$ g/poço de péptido A $\beta$ 1-40. As placas foram bloqueadas e depois incubadas com soro de ratinho obtido acima diluído em série. Detectaram-se os anticorpos ligados com anticorpo IgG anti-rato marcado enzimaticamente. Como controlo, foram também incluídos soros obtidos antes da vacinação. A diluição de soro apresentando uma média de três desvios padrões acima da linha de base foi calculada e definida como "teor ELISA". Não foram detectados anticorpos específicos no soro pré-imune. O teor obtido para os três ratinhos foi de 1:100000, mostrando uma resposta imunitária específica forte contra A $\beta$ 1-40. Assim, a imunização com A $\beta$ 1-6 acoplado a VLP de Q $\beta$  provoca uma fortes teores de anticorpo em reacção cruzada com A $\beta$ 1-40.

A FIG. 3 mostra o resultado do ELISA. O sinal de ELISA como a densidade óptica a 405 nm, obtido para o sor de três ratinhos (A1-A3) imunizados com o péptido A $\beta$ 1-6 acoplado à VLP de Q $\beta$  tal como descrito acima, é representado graficamente para cada uma das diluições, indicada no eixo x. É apresentado o resultado para os três ratinhos sangrados ao dia 21. Também é incluído um soro pré-imune. O título dos anticorpos nos soros foi determinado tal como descrito acima, e foi de 1:100000 para todos os três ratinhos.

## EXEMPLO 14

## Imunização de ratinho transgênico PPA humano

Utilizaram-se para vacinação ratinhos fêmea de 8 meses de idade que têm um transgene PPA humano (Sturchler-Pierrat et al., Proc.Natl. Acad.Sci. USA 94: 13287-13292 (1997)). Os ratinhos são injectados subcutaneamente com 25  $\mu$ g de vacina diluída em PBS estéril e 14 dias depois reforçados com a mesma quantidade de vacina. Os ratinhos são sangrados pela veia caudal antes do início da imunização e 7 dias após a injeccção de reforço. Os soros são analisados para a presença de anticorpos específicos para A $\beta$ 1-6, para A $\beta$ 1-40 e A $\beta$ 1-42 por ELISA tal como descrito no Exemplo 13.

## EXEMPLO 15

Acoplamento de A $\beta$ 1-6 murino a VLP de P $\beta$ , injeccção da vacina em ratinhos e análise da resposta imunitária

Sintetiza-se quimicamente o péptido murino A $\beta$ 1-6 (sequência: NH<sub>2</sub>-DAEFGHGHC-CONH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 78) e utiliza-se para acoplamento à VLP de Q $\beta$  tal como descrito no Exemplo 13. A vacina é injectada em ratinhos C57BL/6, e o teor dos anticorpos estimulados com A $\beta$ 1-6 murino, A $\beta$ 1-40 murino e A $\beta$ 1-42 murino é determinado. A imunização e a determinação por ELISA são realizados como descrito no Exemplo 13.

## EXEMPLO 16

Ligação dos soros após estimulação com A $\beta$ 1-6 a placas de ratinhos transgênicos PPA humano e placas DA

Imuno-histoquímica em secções de cérebro

Utilizaram-se para coloração secções de cérebro consecutivas em parafina de um ratinho APP23 heterozigótico com 18 meses de idade e secções do córtex entorrinal de um paciente DA na Fase III de Braak (Instituto de Patologia, Universidade de Basileia). A antigenicidade foi aumentada através do tratamento das secções de cérebro humano com ácido fórmico concentrado durante cinco minutos e as secções do cérebro de ratinho através do aquecimento em microondas a 90°C durante 3 minutos. Os soros de ratinho estimulados com A $\beta$ 1-6 humano (obtidos como descrito no Exemplo 13) foram diluídos 1:1000 em PBS com 3% de soro de cabra e incubados durante a noite. Após se enxaguar, as secções foram incubadas durante 1 hora com anticorpo secundário anti rato biotinilado diluído 1:200 em PBS. Após se enxaguar, as secções foram ainda processadas com a técnica avidina-biotina-peroxidase (ABS-Elite Kit PK6100; Vector Laboratories). Finalmente, fez-se reagir as secções com substrato de diaminobenzidina (DAB) potenciado com metais (Boehringer, Código 1718096), contrastado com Hemalum, desidratado, lavado em xileno e cobriu-se com uma lamela.

O resultado das colorações histológicas são apresentados na FIG. 4A e B. As secções foram coradas com os soros dos três ratinhos imunizados contra A $\beta$ 1-6 acoplados à VLP de Q $\beta$ . Cada soro corou positivamente as placas amilóides de ratinhos transgênicos e DA. São apresentados resultados para um dos três soros. Os soros estimulados com A $\beta$ 1-6 claramente resultam na coloração das placas amilóides do ratinho transgênico APP23 humano, assim como as placas amilóides de pacientes AD. Os soros pré-  
imunes foram negativos. As placas amilóides extracelulares e vasos sanguíneos isolados são corados pelos anticorpos.

#### EXEMPLO 17

Especificidade dos soros estimulados com A $\beta$ 1-6 humano, avaliada por histologia das placas em ratinhos

Imuno-histoquímica em secções de cérebro

Secções de cérebro consecutivas em parafina de um ratinho APP23 heterozigótico com 3 meses de idade e outro com 18 meses de idade que sobre-expressam PPA humana, foram corados como no Exemplo 16 com um soro de ratinho representativo estimulado com A $\beta$ 1-6 humano, tal como obtido no Exemplo 13, ou com um anticorpo policlonal de coelho específico para os 20 últimos aminoácidos de APP murino ou humano e que como tal não reconhece A $\beta$ . As secções incubadas com o anticorpo policlonal de coelho foram tratadas

como descrito no Exemplo 16, excepto pela utilização de um anticorpo secundário anti coelho biotinilado (BA 1000, Vector Laboratories).

O resultado das colorações histológicas é apresentado na FIG. 5A, B, C, D e E. A $\beta$ 1-6, marcado no canto inferior esquerdo das secções indica que se utilizou para a coloração soro que foi estimulado com A $\beta$ 1-6, enquanto que "Pab" indica que as secções foram coradas com o anticorpo policlonal específico para os últimos 20 aminoácidos de PPA murino ou humano, correspondendo às posições 676-695 em PPA<sub>695</sub>.

A comparação da coloração das secções dos ratinhos de 18 meses de idade (FIG. 5A e C) mostra que os soros estimulados com A $\beta$ 1-6 não apresentam reacção cruzada com PPA expressa no cérebro, o qual é no entanto corado pelo anticorpo policlonal de controlo. A FIG. B apresenta uma secção de cérebro de um ratinho de 3 meses de idade, uma altura em que os depósitos de amilóide não são ainda visíveis, corado com o anticorpo policlonal específico para PPA. FIG. 5D e 5E mostram uma ampliação da camada piramidal CA1 do hipocampo, respectivamente, da FIG. 5A e FIG. 5B.

#### EXEMPLO 18

##### A. Acoplamento do péptido A $\beta$ 1-6 à proteína de cápside fr

Faz-se reagir uma solução de 120  $\mu$ M de proteína de cápside fr em 20 mM de hepes, 150 mM de NaCl pH 7,2



durante 30 minutos com um excesso molar de 10 vezes de SMPH (Pierce), diluído de uma solução mãe em DMSO, a 25°C num agitador basculante. A solução reaccional é subsequentemente dialisada duas vezes durante 2 horas contra 1 L de 20 mM de hepes, 150 mM de NaCl pH 7,2 a 4°C. A mistura reaccional fr dialisada é então reagida com um excesso molar de cinco vezes do péptido A $\beta$ 1-6 (sequência: NH<sub>2</sub>-DAEFRHGGC-CONH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 77) durante 2 horas a 16°C num agitador basculante. Os produtos de acoplamento são analisados por SDS-PAGE.

#### B. Acoplamento do péptido A $\beta$ 1-6 a HBcAg-Lys-2cys-Mut

Uma solução de 1 mL de 120  $\mu$ M de HBcAg-Lys-2cys-Mut em 20 mM de hepes, 150 mM de NaCl pH 7,2 é reagida durante 30 minutos com um excesso molar de 10 vezes de SMPH (Pierce), diluído de uma solução mãe em DMSO, a 25°C num agitador basculante. A solução reaccional é subsequentemente dialisada duas vezes durante 2 horas contra 1 L de 20 mM de hepes, 150 mM de NaCl pH 7,2 a 4°C. A mistura reaccional HBcAg-Lys-2cys-Mut dialisada é então reagida com um excesso molar de cinco vezes do péptido A $\beta$ 1-6 (sequência: NH<sub>2</sub>-DAEFRHGGC-CONH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 77) durante 2 horas a 16°C num agitador basculante. Os produtos de acoplamento são analisados por SDS-PAGE.

#### C. Acoplamento do péptido AV1-6 a Pili

Uma solução de 125  $\mu$ M de pili do Tipo-1 de *E. coli* em 20 mM de hepes, pH 7,4 é reagida durante 60 minutos

com um excesso molar de 50 vezes de SMPH (Pierce), diluído de uma solução mãe em DMSO, à TA num agitador basculante. A mistura reaccional é dessalinizada numa coluna PD-10 (Amersham-Pharmacia Biotech). As fracções contendo proteína que eluem da coluna são reunidas, e a proteína pili derivatizada dessalinizada é reagida com um excesso molar de cinco vezes do péptido A $\beta$ 1-6 (sequência: NH<sub>2</sub>-DAEFRHGGC-CONH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 77) durante 2 horas a 16°C num agitador basculante. Os produtos de acoplamento são analisados por SDS-PAGE.

D. Imunização de ratinhos com o péptido A $\beta$ 1-6 acoplado à proteína de cápside fr, HBcAg-Lys-2cys-Mut ou pili

O péptido A $\beta$ 1-6 acoplado à proteína de cápside fr, HBcAg-Lys-2cys-Mut ou pili tal como descrito acima é injectado s.c. em ratinhos (3 ratinhos) ao dia 0 e 14. Cada ratinho (C57BL/6) é imunizado com 10  $\mu$ g de vacina diluídos em PBS até 200  $\mu$ L. Os ratinhos são sangrados por via retro-orbital ao dia 21, e o teor dos anticorpos específicos para o péptido A $\beta$ 1-6 ou A $\beta$ 1-40 ou A $\beta$ 1-42 é medido por ELISA tal como descrito no Exemplo 13.

#### EXEMPLO 19

Imunização de macacos Rhesus com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6

De modo a testar a indução dos anticorpos contra A $\beta$  humano utilizando uma vacina baseada no péptido A $\beta$ 1-6 no

caso em que A $\beta$ 1-6 é um antigénio próprio, foram imunizados macacos Rhesus com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6, uma vez que a sequência A $\beta$  é idêntica entre humanos e macacos Rhesus. A vacina Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 foi preparada tal como descrito no Exemplo 13. Quatro macacos Rhesus, com idades entre os 10 e os 15 anos de idade, foram imunizados ao dia 0 com 50  $\mu$ g de vacina, e receberam um reforço duas vezes aos dias 28 e 56 com 25  $\mu$ g de vacina. Os macacos foram imunizados por via subcutânea nas costas. Os animais foram sangrados aos dias 0 (pré-sangria), 42 e 70. Recolheu-se 4 mL de sangue da V. cephalica antebrachii. O teor de anticorpos específicos para A $\beta$ 1-10 foi medido por ELISA essencialmente como descrito no Exemplo 13, utilizando um anticorpo secundário específico para IgG de macaco.

Uma vez que humanos e macacos Rhesus partilham da mesma sequência A $\beta$ , a geração de um teor mais elevado de anticorpos em macacos Rhesus específicos para A $\beta$ 1-40 mostra que a imunização com hA $\beta$ 1-6 acoplado a Q $\beta$  quebra a tolerância contra o antigénio próprio A $\beta$ . Além disso, são gerados anticorpos que reconhecem o A $\beta$  completo com o fragmento A $\beta$ 1-6 em primatas.

Os resultados do ELISA são apresentados na Fig. 6. No diagrama são representados os teores de anticorpos específicos para A $\beta$ 1-40 medidos nos soros dos 4 macacos (1-4) imunizados com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 e a média dos teores dos 4 macacos. Os teores são representados como teores DO50. DO50 é a diluição dos anticorpos à qual o sinal atinge metade do

seu valor máximo. O valor máximo (OD max) foi obtido a partir de um soro de referência originado de um macaco imunizado com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-27 e que também reconhece A $\beta$ 1-40, e medido na mesma placa ELISA.

Dois macacos (descrito acima) são sangrados ao dia 97, 110, 117, 124, 138, 143, 152, 159, 166 e receberam um terceiro reforço com 25  $\mu$ g de vacina ao dia 110. Os soros foram reunidos (99 mL) e utilizados para purificação por afinidade de anticorpos específicos para A $\beta$ 1-6. Estes anticorpos foram usados para coloração imuno-histoquímica a uma concentração de 1,5  $\mu$ g/mL e utilizou-se para detecção um anticorpo anti-macaco biotinilado. Utilizaram-se para coloração secções de cérebro em parafina de um ratinho APP23 heterozigótico com 18 meses de idade e de um paciente DA na Fase III de Braak. A coloração específica para placas foi observada tanto nas secções de cérebro de ratinho APP23 como nas secções de cérebro de paciente DA (Fig. 7).

O resultado das análises histológicas é apresentado na Fig. 7A e B. Na Fig. 7A apresenta-se a coloração das placas de ratinho transgênico PPA humano (estripe APP23) com o antissoro purificado por afinidade acima descrito específico para A $\beta$ 1-6. A Fig. 7B apresenta a coloração de placas DA humanas com o mesmo antissoro purificado. O antissoro purificado foi utilizado a uma concentração de 1,5  $\mu$ g/mL em ambos os casos. São indicadas placas típicas por uma seta em ambas as figuras.

## EXEMPLO 20

Acoplamento de A $\beta$ 1-6 murino a VLP de AP205, imunização de ratinhos e análise da resposta imunitária

A. Acoplamento do péptido A $\beta$ 1-6 murino a VLP de AP205

O péptido murino A $\beta$ 1-6 (mA $\beta$ 1-6, sequência NH<sub>2</sub>-DAEFGHGHC-CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 78) foi sintetizado quimicamente; o grupo NH<sub>2</sub> inicial indica que o péptido tem uma extremidade N livre, e o grupo NH<sub>2</sub> terminal indica que o péptido tem uma extremidade carboxilo amidada). Reagiu-se VLP de AP205 (expressado e purificado tal como descrito no exemplo 1) em 20 mM de Hepes, 150 mM de NaCl, pH 8,0 (HBS, pH 8,0) a uma concentração de 2 mg/mL (determinada num teste de Bradford), com 2,86 mM de SMPH (Pierce, Rockford IL), diluído de uma solução mãe a 100 mM em DMSO, durante 30 minutos à temperatura ambiente (TA). A mistura reaccional foi então dialisada duas vezes contra um volume 1000 vezes superior de HBS, pH 7,4 a 4°C durante duas horas; o dialisado resultante foi submetido a congelação rápida em azoto líquido e a -20°C durante a noite. A VLP AP205 foi diluída com um volume de 20 mM de HBS, pH 7,4, e reagida durante 2 horas a 15°C com agitação com 719  $\mu$ M de péptido mA $\beta$ 1-6 diluído com na mistura reaccional a partir de uma solução mãe a 50 mM em DMSO. A reacção de acoplamento foi dialisada duas vezes contra um volume 1000 vezes superior de HBS, pH 7,4, durante 2 horas e durante a

noite. A mistura reaccional dialisada foi submetida a congelação rápida em azoto líquido em alíquotas para armazenamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  até utilização posterior.

Uma alíquota foi descongelada, e o acoplamento do péptido m $\text{A}\beta$ 1-6 às subunidades de VLP de AP205 foi avaliado por SDS-PAGE e a concentração da proteína foi medida num teste de Bradford. O resultado das reacções de acoplamento é apresentado na FIG. 8.

A FIG. 8 apresenta a análise por SDS-PAGE da reacção de acoplamento do péptido  $\text{A}\beta$ 1-6 e a VLP de AP205. As amostras foram corridas sob condições redutoras num gel a 16% de Tris-glicina e corados com azul brilhante de Coomassie. A coluna 1 é o marcador de proteína, com os pesos moleculares correspondentes indicados na margem esquerda do gel; coluna 2, proteína VLP de AP205; coluna 3, VLP de AP205 derivatizada; coluna 4, o sobrenadante da reacção de acoplamento da proteína de VLP de AP205 ao péptido  $\text{A}\beta$ 1-6; coluna 5, o sedimento da reacção de acoplamento da proteína VLP de AP205 ao péptido  $\text{A}\beta$ 1-6. Não se detectaram no gel quaisquer subunidades de VLP de AP205 por acoplar, enquanto foram visíveis bandas correspondentes a vários péptidos por subunidades, demonstrando uma eficiência de acoplamento muito elevada. Em particular, existe muito mais do que um péptido  $\text{A}\beta$ 1-6 por subunidade de VLP de AP205.

B. Imunização de ratinhos com o péptido mA $\beta$ 1-6 acoplado a VLP de AP205 e análise da resposta imunitária

Injectou-se VLP de AP205 acoplado ao péptido mA $\beta$ 1-6 s.c. em ratinhos (3 ratinhos) aos dias 0 e 14. O péptido mA $\beta$ 1-6 foi acoplado à proteína VLP de AP205 tal como descrito acima. Cada ratinho foi (C57BL/6) foi imunizado com 25  $\mu$ g de vacina diluída em PBS até 200  $\mu$ L. Os ratinhos foram sangrados por via retro-orbital ao dia 21, e o teor dos anticorpos específicos para o péptido mA $\beta$ 1-6 foi medido num teste ELISA contra mA $\beta$ 1-6. O péptido mA $\beta$ 1-6 foi acoplado a RNase A bovina utilizando o agente reticulante químico sulfo-SPDP. As placas de ELISA foram revestidas com preparação de RNase-mA $\beta$ 1-6 a uma concentração de 10  $\mu$ g/mL. As placas foram bloqueadas e depois incubadas com diluições em série de soro de ratinho. Detectaram-se anticorpos ligados com anticorpos IgG anti-rato marcados enzimaticamente. Como controlo, testaram-se também soros pré-ímenes dos mesmos ratinhos. Os resultados são apresentados na FIG. 9.

A FIG. 9 apresenta uma análise por ELISA dos anticorpos IgG específicos para o péptido mA $\beta$ 1-6 no soro de ratinhos imunizados contra o péptido mA $\beta$ 1-6 acoplado à VLP de AP205. Os resultados são apresentados para os soros dos três ratinhos imunizados recolhidos ao dia 21 (A1 d21 -A3 d21), o soro pré-imune é indicado como "pre imm" na figura; é apresentado o resultado para um soro pré-imune. A comparação do soro pré-imune com os soros de ratinhos imunizados com mA $\beta$ 1-6 acoplado à VLP de AP205 mostra que pôde ser

obtida uma forte resposta específica do anticorpo contra o péptido mA $\beta$ 1-6, que é um antigénio próprio, na presença de adjuvante. Além disso, o acoplamento de um péptido próprio à VLP de AP205 conduz à quebra da tolerância contra este péptido, e a uma resposta imunitária específica muito elevada. Assim, a VLP de AP205 é muito adequada para gerar elevados teores de anticorpo contra péptidos A $\beta$  na ausência de adjuvante.

#### EXEMPLO 21

A imunização com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 reduz as placas amilóides em ratinhos transgénicos que sobre-expressam a proteína precursora amilóide mutante "Swedish/London"

Este exemplo demonstra que a imunização com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 num modelo de ratinho que desenvolve placas amilóides difusas (negativas para Vermelho-Congo) semelhantes à doença de Alzheimer, resultou numa redução maciça da densidade da placa nas áreas neocortical e subcortical do cérebro. A ocorrência histológica de placas amilóides difusas é uma característica proeminente da patologia do cérebro DA (Selkoe, 1994, Annu. Rev. Neurosci. 17:489-517) e, como tal, o exemplo demonstra que a imunização com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 proporciona uma abordagem eficaz para o tratamento da doença de Alzheimer.

Para avaliar a eficácia terapêutica da imunização com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 usaram-se ratinhos transgénicos que sobre-expressam a proteína precursora amilóide mutante



"Swedish/London" sob o controlo do promotor de ratinho Thy-1 (APP24; K670N/M671L; V717I, patente No. WO980-36-4423). Esta estirpe de ratinho caracteriza-se por um elevado número de placas amilóides no neocórtex, hipocampo, caudado putâmene, e tálamo a uma idade de 18 meses. As placas podem ser primeiramente observadas a uma idade de 9 meses. Histologicamente, as placas amilóides em ratinhos APP24 são predominantemente de um tipo difuso, isto é, são negativas na coloração de Vermelho-Congo. Num menor grau, também podem ser observadas placas amilóides compactas (positivas para Vermelho-Congo).

O péptido humano A $\beta$ 1-6 acoplado à VLP de Q $\beta$  (Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6) foi preparado como descrito no Exemplo 13. Em termos do procedimento experimental seguido, o qual não é necessário para descrever ou permitir a invenção, ratinhos transgénicos APP24 de 9,5 meses de idade foram injectados por via subcutânea ao dia 0 com 25  $\mu$ g de Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 em tampão fosfato salino (PBS) (administrado como 2x100  $\mu$ L por ratinho) (n=16) ou como controlos negativos com PBS (administrados como 2x100  $\mu$ L por ratinho) (n=9) ou com partícula semelhante a vírus Q $\beta$  desprovida de antigénio acoplado (n=11). Os ratinhos foram subsequentemente injectados com 25  $\mu$ g de vacina Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6, Q $\beta$ , ou PBS no dia 15, 49, 76, 106, 140, 169, 200, 230, 259, e 291. Os animais foram sangrados 1-2 dias antes da primeira imunização (dia 0) e no dia 56, 90, 118, 188, 214, 246, e 272 através da veia caudal. Recolheu-se também soro do sangue ao dia 305, altura na qual foram também recolhidos cérebros para histopatologia (idade dos ratinhos nesta altura: 19,5 meses).

O teor dos anticorpos específicos para A $\beta$ 1-40 foi medido por ELISA essencialmente tal como descrito no Exemplo 13. Os resultados do ELISA são apresentados na Fig. 10. No diagrama são representados os teores de anticorpos específicos para A $\beta$ 1-40 ou A $\beta$ 1-42 medidos nos soros dos ratinhos imunizados com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6. Os teores são representados como teores DO50%. DO50% é a diluição dos anticorpos à qual o sinal atinge metade do seu valor máximo. O valor máximo (OD max) foi obtido a partir de um soro de referência que reconhece A $\beta$ 1-40 e Ab42, e medido na mesma placa ELISA. Todos os ratinhos imunizados com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 desenvolvem teores de DO50% acima de 1:8000 (os teores no soro pré-imune foram inferiores a 1:100) demonstrando uma resposta de anticorpos consistente a Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 mesmo em ratinhos APP24 de idade (Fig. 10). A mediana dos teores DO50% no grupo imunizado situou-se na gama de 1:20000 a 1:50000 ao longo do período de imunização.

Para a quantificação das placas amilóides, fixaram-se cérebros por imersão em formaldeído a 4% em 0,1 M de PBS a 4°C. Após desidratação com etanol, os cérebros foram embebidos em parafina e cortados no plano sagital com um micrótomo com uma espessura de 4 $\mu$ m. As secções foram montadas em lâminas "super frost" e secas a 37°C. As secções foram lavadas em PBS e a antigenicidade foi aumentada através do aquecimento em microondas a 90°C durante 3 minutos em tampão de ácido cítrico a 0,1 M. Diluíram-se anti-soros NT11 (anti A $\beta$ 1-40, Sturchler-Pierrat et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 13287-

13292) a 1:1000 em PBS com 3% de soro de cabra e foram incubados durante a noite a 4°C. Após se enxaguar, as secções foram incubadas durante 1 hora com anticorpo secundário anti coelho biotinilado diluído 1:200 em PBS. Após se enxaguar, as secções foram ainda processadas com a técnica avidina-biotina-peroxidase (ABS-Elite Kit PK6100; Vector Laboratories). Finalmente, fez-se reagir as secções com substrato de diaminobenzidina (DAB) potenciado com metais (Boehringer, Código 1718096), contrastado com Hema-lum, desidratado, lavado em xileno e cobriu-se com uma lamela. Utilizaram-se para a análise séries sistemáticas aleatórias de secções de cérebros a três planos anatómicos diferentes por animal. As placas amilóides foram quantificadas utilizando um analisador de imagem MCID (Imaging Research, Brock University, Ontário-Canada, Programa Versão M5 elite). A imagem microscópica foi digitalizada através da utilização de uma câmara CCD TV a preto e branco Xillix e guardada com uma resolução de 640x480 pixel a 256 níveis de cinzento. O tamanho de pixel foi calibrado utilizando um micrómetro de objectos a uma ampliação de 5x (Objectiva Leica Neoplan). Utilizando um microscópio com motor passo a passo para posicionar de forma exacta campos adjacentes, analisou-se a totalidade do neocórtex e do núcleo olfactivo de cada secção. Para cada campo, a área anatómica foi definida por um contorno manual. Para cada secção individual, a área de amostragem foi definida pela definição de um limite manual (nível cinzento) entre placas amilóides imunopositivas e o fundo do tecido. Artefactos isolados do tecido foram isolados com um contorno manual. Os dados em bruto são medidos como contagens individuais (depósitos de

amilóide) e valores de área proporcionais (núcleo olfativo ou córtex/amilóide imunopositivo).

Os dados de cada ratinho foram normalizados em números de depósitos (placas) por mm<sup>2</sup> e área total de placa em % da totalidade do neocórtex. Os ratinhos imunizados com QβhAβ1-6 revelaram uma redução acentuada dos depósitos de amilóide no córtex e nas áreas subcorticais em comparação quer com os grupos de controlo injectados com PBS ou Qβ (Fig. 11). Tanto a mediana do número de depósitos e a área de placa total foram altamente significativamente reduzidos entre 80-98% em comparação com o grupo de PBS no córtex, caudato putâmene, hipocampo, e tálamo (p< 0,001 vs. grupo PBS, teste Mann-Whitney; Fig. 12).

Num segundo estudo, ratinhos transgénicos APP24 de 13,5 meses de idade foram injectados por via subcutânea ao dia 0 com 25 µg de QβhAβ1-6 em tampão fosfato salino (PBS) (administrado como 2x100 µL por ratinho) (n=15) ou como controlos negativos com PBS (administrados como 2x100 µL por ratinho) (n=15). Os ratinhos foram subsequentemente injectados com 25 µg de vacina QβhAβ1-6, ou PBS no dia 16, 46, 76, 109, 140, e 170. Os animais foram sangrados 1-2 dias antes da primeira imunização (dia 0) e no dia 31, 59, 128, e 154 através da veia caudal. Recolheu-se também soro do sangue ao dia 184, altura na qual foram também recolhidos cérebros para histopatologia (idade dos ratinhos nesta altura: 19,5 meses). O teor dos anticorpos específicos para Aβ1-40 foi medido por ELISA e expresso tal como descrito acima e verificou-se de novo que todos os ratinhos

imunizados respondem à imunização com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 com teores de OD50% de soro pelo menos superiores a 1:2000 (não apresentado). A mediana dos teores OD50% no grupo imunizado situou-se na gama de 1:10000 a 1:50000 ao longo do período de imunização. A quantificação dos depósitos amilóides foi levada a cabo tal como descrito acima. Em comparação com a experiência na qual a imunização foi iniciada mais cedo (ou seja a uma idade de 9,5 meses) a redução do número de depósitos de placa (-55 %) e na área (-32 %) foi menos substancial no neocórtex, mas ainda bastante pronunciada (Fig. 13) e altamente significativa ( $p > 0,001$  vs. PBS, teste de Mann-Whitney). Nas áreas subcorticais, o número de depósitos de placa e a área foram reduzidas em 60-90% no grupo imunizado com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6. O efeito mais pronunciado nestas áreas em comparação com o córtex está provavelmente relacionado com o desenvolvimento mais demorado da formação de placas nestas áreas.

Tomadas em conjunto, ambas as experiências mostram que a imunização com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 em ratinhos transgénicos que sobre-expressam a proteína precursora amilóide mutante "Swedish/London" reduz substancialmente a ocorrência dos depósitos amilóides nestes ratinhos.

Figura 10: Teores de anticorpos anti A $\beta$ 40/42 no soro (OD50%) em ratinhos transgénicos que sobre-expressam a proteína precursora amilóide mutante "Swedish/London". Os ratinhos foram imunizados com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 entre os 9,5 e os 19 meses de idade. Apresentam-se valores individuais (pontos pretos) e gráficos "box-plot" em que as extremidades das

caixas definem os 25° e 75° percentil, com uma linha na mediana e as barras de erro definem os 10° e 90° percentil (os resultados inconsistentes são apresentados como pontos).

Figura 11: Coloração imuno-histoquímica de placas amilóides em secções sagitais do cérebro. A secção sagital do cérebro de um ratinho transgénico que sobre-expressa a proteína precursora amilóide mutante "Swedish/London" imunizado com vacina  $\text{Q}\beta$  (A) ou  $\text{Q}\beta\text{hA}\beta\text{1-6}$  (B) é apresentada na Figura.

Figura 12: Quantificação da deposição de placa em ratinhos transgénicos que sobre-expressam a proteína precursora amilóide mutante "Swedish/London" após imunização entre 9,5 e 19 meses de idade. (A) Densidade de placa cortical. (B) Área de placa cortical. (C) Densidade de placa no caudato putâmene. (D) Área de placa no caudato putâmene. (E) Densidade de placa no hipocampo. (F) Área de placa no hipocampo. (G) Densidade de placa no tálamo. (F) Área de placa no tálamo. A densidade de placa é expressa em placas/mm<sup>2</sup>, a área de placa em percentagem da área do tecido coberta pela amilóide beta. Os dados são apresentados como valores individuais (pontos pretos) e gráficos "box-plot". As extremidades das caixas definem os 25° e 75° percentil, com uma linha na mediana e as barras de erro definem os 10° e 90° percentil. \*\*  $p < 0,001$  (Teste de Soma das Ordenações de Mann Whitney). PBS,  $n=9$ ,  $\text{Q}\beta$ ,  $n=11$ ,  $\text{Q}\beta\text{hA}\beta\text{1-6}$ ,  $n=16$ .

## EXEMPLO 22

Imunização com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 reduz as placas amilóides em ratinhos transgênicos que sobre-expressam a proteína precursora amilóide mutante "Swedish".

Este exemplo demonstram que a imunização com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 proporciona uma abordagem eficaz para o tratamento da doença de Alzheimer mesmo quando a imunização é iniciada numa fase muito avançada da patologia de placa amilóide. O processo de deposição de placa amilóide no modelo de rato DA utilizado neste exemplo inicia-se logo numa idade de cerca de 6 meses (Sturchler-Pierrat et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 13287-13292). No estudo aqui descrito, a imunização com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 foi iniciada a uma idade de 18 meses, na qual já se tinha formado um número elevado de placas compactas no córtex. O exemplo também demonstra a capacidade de Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 em induzir anticorpos A $\beta$ 40/42 em animais muito idosos (todos os 19 ratinhos imunizados apresentaram resposta).

Para avaliar os efeitos da imunização com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 utilizaram-se ratinhos transgênicos que sobre-expressam a proteína precursora amilóide mutante "Swedish" (APP23; K670N/M671L, Sturchler-Pierrat et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 13287-13292). A patologia do tilo Alzheimer nestes ratinhos foi exaustivamente caracterizada (Calhoun et al., 1998, Nature 395: 755-756; Phinney et al., 1999, J.

Neurosci. 19: 8552-8559; Bondolfi et al., 2002, J. Neurosci. 22: 515-522).

O péptido A $\beta$ 31-6 humano acoplado à VLP de Q $\beta$  (Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6) foi preparado como descrito no Exemplo 13. Nos termos do procedimento experimental seguido, que não é necessário para descrever ou permitir a invenção, ratinhos transgénicos APP23 de 18 meses de idade foram injectados por via subcutânea ao dia 0 com 25  $\mu$ g de Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 dissolvido em tampão fosfato salino (PBS) (administrado como 2x100  $\mu$ L por ratinho) (n=19) ou como controlos negativos com PBS (n=17) e com reforços aos dias 13, 27-34, 61-63, 90-96, e 123-130 com 25 pg de vacina. Os animais foram sangrados 1-2 dias antes da primeira imunização (dia 0) e no dia 41-45 e no dia 68 através da veia caudal. Recolheu-se também soro do sangue ao dia 152-154, altura na qual foram também recolhidos cérebros para histopatologia (idade dos ratinhos nesta altura: 23 meses).

O teor dos anticorpos específicos para A $\beta$ 1-40 foi medido por ELISA essencialmente tal como descrito no Exemplo 13 e os resultados expressos tal como descrito no Exemplo 21. Os resultados do ELISA são apresentados na Fig. 14. Todos os ratinhos imunizados com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 desenvolveram teores de DO50% acima de 1:2000 (os teores no soro pré-imune foram inferiores a 1:100) demonstrando uma resposta de anticorpos consistente a Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 mesmo em ratinhos de idade muito avançada (Fig. 14). A mediana dos teores DO50% situou-se na gama de 1:9000 a 1:20000 ao longo do período de imunização.



A quantificação das placas amilóides foi realizada como descrito no Exemplo 21. Os dados para cada ratinho foram normalizados para números de depósitos (placas) por  $\text{mm}^2$  e área total de placa em % da totalidade do neocórtex. Os ratinhos imunizados com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 revelaram um número de depósitos no córtex mais baixo (Figura 15, Fig. 16), principalmente devido a uma redução de placas de pequenas dimensões. Em comparação com o grupo de controlo não imunizado a mediana do número de placas foi reduzida em 33 % no grupo imunizado com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 ( $p < 0,001$  vs. grupo PBS, teste Mann-Whitney). Uma vez que as placas afectadas foram sobretudo placas de pequenas dimensões, a redução da área total de placas foi moderada e chegou a 10% ( $p < 0,01$  vs. grupo PBS, teste Mann-Whitney).

Figura 14: Teores de anticorpos anti A $\beta$ 40/42 no soro (OD50%) em ratinhos transgénicos que sobre-expressam a proteína precursora amilóide mutante "Swedish". Os ratinhos foram imunizados com Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 entre os 18 e os 23 meses de idade. Apresentam-se valores individuais (pontos pretos) e gráficos "box-plot" em que as extremidades das caixas definem os 25º e 75º percentil, com uma linha na mediana e as barras de erro definem os 10º e 90º percentil (os resultados inconsistentes são apresentados como pontos).

Figura 15: Coloração imuno-histoquímica de placas amilóides em secções sagitais do cérebro. As setas apontam

para depósitos de pequena dimensão. Apresenta-se na Figura uma secção sagital do cérebro de um ratinho transgénico que sobre-expressa a proteína precursora amilóide mutante "Swedish" imunizado com PBS (A) ou Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6 (B).

Figura 16: Quantificação da deposição de placa em ratinhos transgénicos que sobre-expressam a proteína precursora amilóide mutante "Swedish" após imunização entre 18 e 23 meses de idade. (A) Densidade de placa cortical. (B) Área de placa cortical. A densidade de placa é expressa em placas/mm<sup>2</sup>, a área de placa em percentagem da área do tecido coberta pela amilóide beta. Os dados são apresentados como valores individuais (pontos pretos) e gráficos "box-plot". As extremidades das caixas definem os 25º e 75º percentil, com uma linha na mediana e as barras de erro definem os 10º e 90º percentil. \*\*  $p < 0,001$  (Teste de Soma das Ordenações de Mann Whitney). PBS,  $n=17$ , Q $\beta$ hA $\beta$ 1-6,  $n=19$ .

Tendo-se agora descrito completamente a presente invenção nalgum detalhe, por meio de ilustração e exemplificação para efeitos de claridade de compreensão, será óbvio para qualquer pessoa competente na técnica que o mesmo pode ser realizado modificando ou alterando a invenção no interior de uma gama de condições, formulações e outros parâmetros larga e equivalente, sem afectar o âmbito da invenção ou qualquer sua realização específica, e que se pretende que tais modificações ou alterações sejam abrangidas no âmbito das reivindicações anexas.

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

&lt;110&gt; Cytos Biotechnology AG

Novartis Pharma AG

Bachmann, Martin F

Tissot, Alain

Ortmann, Rainer

Lüönd, Rainer

staufenbiel, Matthias

Frey, Peter

&lt;120&gt; Fileiras de Antígeno Beta Amilóide 1-6

&lt;130&gt; PA041wo

&lt;150&gt; us 60/396,639

&lt;151&gt; 2002-07-19

&lt;150&gt; US 60/470,432

&lt;151&gt; 2003-05-15

&lt;160&gt; 93

&lt;170&gt; PatentIn versão 3.2

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 172

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 182

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 2

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

Ser Ser Thr Ala Ala Leu Ala Ala Ala Thr Thr Val Asn Gly Gly Thr  
20 25 30

Val His Phe Lys Gly Glu Val Val Asn Ala Ala Cys Ala Val Asp Ala  
35 40 45

Gly Ser Val Asp Gln Thr Val Gln Leu Gly Gln Val Arg Thr Ala Ser  
50 55 60

Leu Ala Gln Glu Gly Ala Thr Ser Ser Ala Val Gly Phe Asn Ile Gln  
65 70 75 80

Leu Asn Asp Cys Asp Thr Asn Val Ala Ser Lys Ala Ala Val Ala Phe  
85 90 95

Leu Gly Thr Ala Ile Asp Ala Gly His Thr Asn Val Leu Ala Leu Gln  
100 105 110

Ser Ser Ala Ala Gly Ser Ala Thr Asn Val Gly Val Gln Ile Leu Asp  
115 120 125

Arg Thr Gly Ala Ala Leu Thr Leu Asp Gly Ala Thr Phe Ser Ser Glu  
130 135 140

Thr Thr Leu Asn Asn Gly Thr Asn Thr Ile Pro Phe Gln Ala Arg Tyr  
145 150 155 160

Phe Ala Thr Gly Ala Ala Thr Pro Gly Ala Ala Asn Ala Asp Ala Thr  
165 170 175

Phe Lys Val Gln Tyr Gln  
180

<210> 3

<211> 853

<212> ADN

<213> Escherichia coli

&lt;400&gt; 3

```

acgtttctgt ggctcgacgc atcttctca ttcttctctc caaaaaccac ctcatgcaat      60
ataaacatct ataaataaag ataacaaata gaatattaag ccaacaaata aactgaaaaa     120
gtttgtccgc gatgctttac ctctatgagt caaaatggcc ccaatgtttc atcttttggg     180
ggaaactgtg cagtgtttggc agtcaaactc gttgacaaac aaagtgtaca gaacgactgc     240
ccatgtcgat ttagaaatag ttttttgaaa ggaaagcagc atgaaaatta aaactctggc     300
aatcgttgtt ctgtcggctc tgtccctcag ttctacgacg gctctggccg ctgccacgac     360
ggttaatggg gggaccgttc actttaaaagg ggaagtgtgt aacgccgctt gcgcagtga     420
tgcaggctct gttgatcaaa ccgttcagtt aggacagggt cgtaccgcat cgctggcaca     480
ggaaggagca accagttctg ctgtcgggtt taacattcag ctgaatgatt gcgataccaa     540
tgttgcctct aaagccgctg ttgccttttt aggtacggcg attgatgcgg gtcataccaa     600
cgttctggct ctgcagagtt cagctgcggg tagcgcaaca aacgttggtg tgcagatcct     660
ggacagaacg ggtgctgctc tgacgctgga tgggtgcgaca tttagttcag aaacaaccct     720
gaataacgga accaatacca ttccgttcca ggcgcgttat tttgcaaccg gggccgcaac     780
cccgggtgct gctaatgcgg atgcgacctt caaggttcag tatcaataac ctacctaggt     840
tcaggggacgt tca                                                    853

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 132

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacteriófago Q-beta

&lt;400&gt; 4

```

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu

```

115	120	125
Asn Pro Ala Tyr		
130		
<210> 5		
<211> 329		
<212> PRT		
<213> Bacteriófago Q-beta		
<400> 5		
Met	Ala	Lys
1	5	10
Thr	Val	Thr
Leu	Gly	Asn
Ile	Gly	Lys
Asp	Gly	15
Lys	Gln	Thr
20	25	30
Leu	Asn	Pro
Arg	Gly	Val
Asn	Pro	Thr
Asn	Gly	35
Val	Ala	Ser
35	40	45
Leu	Ser	Gln
Ala	Gly	Ala
Val	Pro	Ala
Leu	Glu	Lys
Arg		
Val	Thr	Val
50	55	60
Ser	Gln	Pro
Ser	Arg	Asn
Arg	Asn	Lys
Asn	Tyr	Lys
Val	Gln	Val
65	70	75
Lys	Ile	Gln
Asn	Pro	Thr
Ala	Cys	Thr
Ala	Asn	Gly
Ser		80
Cys	Asp	Pro
Ser	Val	Thr
85	90	95
Thr	Arg	Gln
Ala	Tyr	Ala
Asp	Val	Thr
Phe	Ser	
Phe	Thr	Gln
100	105	110
Tyr	Ser	Thr
Asp	Glu	Glu
Arg	Ala	Phe
Val	Arg	Thr
Glu		
Leu	Ala	Ala
115	120	125
Leu	Leu	Ile
Asp	Ala	Ile
Asp	Gln	
Leu	Asn	Pro
Ala	Tyr	Trp
130	135	140
Thr	Leu	Leu
Ile	Ala	Gly
Gly	Gly	Gly
Ser	Gly	
Ser	Lys	Pro
145	150	155
Asp	Pro	Val
Ile	Pro	Asp
Pro	Pro	Ile
Asp	Pro	Pro
Pro		160
Gly	Thr	Gly
165	170	175
Lys	Tyr	Thr
Cys	Pro	Phe
Ala	Ile	Trp
Ser	Leu	Glu
Glu		
Val	Tyr	Glu
180	185	190
Pro	Pro	Thr
Lys	Asn	Arg
Pro	Trp	Pro
Ile	Tyr	Asn
Ala		
Val	Glu	Leu
195	200	205
Gln	Pro	Arg
Glu	Phe	Asp
Val	Ala	Leu
Lys	Asp	Leu
Leu		
Gly	Asn	Thr
210	215	220
Lys	Trp	Arg
Asp	Trp	Asp
Ser	Arg	Leu
Ser	Tyr	Thr
Thr		

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

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

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

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

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

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

Gln Ala Val Ile Val Val Pro Arg Ala  
325

<210> 6

<211> 129

<212> PRT

<213> Bacteriófago R17

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

## Tyr

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 130

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacteriófago fr

&lt;400&gt; 7

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

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

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

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

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

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

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

Phe Lys Thr Gly Asn Pro Ile Ala Thr Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly  
 115 120 125

Ile Tyr  
 130

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 130

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacteriófago UGA

&lt;400&gt; 8

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

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

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

Arg Ala Ser Gly Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Ala Ile Lys Leu Glu Val



```

      50              55              60
Pro Lys Ile Val Thr Gln Val Val Asn Gly Val Glu Leu Pro Gly Ser
65              70              75              80
Ala Trp Lys Ala Tyr Ala Ser Ile Asp Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala
      85              90              95
Ala Thr Asp Asp Val Thr Val Ile Ser Lys Ser Leu Ala Gly Leu Phe
      100             105             110
Lys Val Gly Asn Pro Ile Ala Glu Ala Ile Ser Ser Gln Ser Gly Phe
      115             120             125

```

Tyr Ala  
130

<210> 9

<211> 132

<212> PRT

<213> Bacteriófago Sp

<400> 9

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

Asn Pro Ala Tyr  
130

<210> 10

<211> 329

<212> PRT

<213> Bacteriófago SP

<400> 10

Ala Lys Leu Asn Gln Val Thr Leu Ser Lys Ile Gly Lys Asn Gly Asp  
 1 5 10 15  
 Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
 20 25 30  
 Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
 35 40 45  
 Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Phe Lys Val  
 50 55 60  
 Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Arg Asp Ala Cys Asp  
 65 70 75 80  
 Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Phe Ala Asp Val Thr Leu Ser Phe Thr  
 85 90 95  
 Ser Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu Ala  
 100 105 110  
 Ala Leu Leu Ala Asp Pro Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu Asn  
 115 120 125  
 Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Val Ala Ser Ser Gly Gly Gly Asp  
 130 135 140  
 Asn Pro Ser Asp Pro Asp Val Pro Val Val Pro Asp Val Lys Pro Pro  
 145 150 155 160  
 Asp Gly Thr Gly Arg Tyr Lys Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Leu Gly  
 165 170 175  
 Ser Ile Tyr Glu Val Gly Lys Glu Gly Ser Pro Asp Ile Tyr Glu Arg  
 180 185 190  
 Gly Asp Glu Val Ser Val Thr Phe Asp Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu  
 195 200 205  
 Gly Asn Thr Asn Trp Arg Asn Trp Asp Gln Arg Leu Ser Asp Tyr Asp  
 210 215 220  
 Ile Ala Asn Arg Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp  
 225 230 235 240  
 Ala Thr Ala Met Gln Ser Asp Asp Phe Val Leu Ser Gly Arg Tyr Gly  
 245 250 255

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

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

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

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

Val Gln Thr Val Ile Ile Ile Pro Ser  
325

<210> 11

<211> 130

<212> PRT

<213> Bacteriófago MS2

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Tyr  
130

<210> 12

<211> 133

<212> PRT

<213> Bacteriófago m11

&lt;400&gt; 12

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Asn Pro Ala Tyr  
130

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 133

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacteriófago Mx1

&lt;400&gt; 13

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Asn Pro Ala Tyr  
 130

<210> 14

<211> 330

<212> PRT

<213> Bacteriófago NL95

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Ala Ala Ser Pro Gly Gly Gly  
 130 135 140

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

Gly Gly Thr Gly Thr Tyr Arg Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Arg Gly  
 165 170 175

Glu Leu Ile Thr Glu Ala Lys Asp Gly Ala Cys Ala Leu Tyr Ala Cys  
 180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 15

<211> 129

<212> PRT

<213> Bacteriófago f2

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr

<210> 16

<211> 128

<212> PRT

<213> Bacteriófago PP7

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17

<211> 132

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Mutante do bacteriófago Qbeta 240

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Pro Ala Tyr  
130

<210> 18

<211> 132

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Mutante do bacteriófago Q-beta 243

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu



115

120

125

Asn Pro Ala Tyr  
130

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 132

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Mutante do bacteriófago Q-beta 250

&lt;400&gt; 19

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Pro Ala Tyr  
130

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 132

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Mutante do bacteriófago Q-beta 251

&lt;400&gt; 20

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

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

Asn Pro Ala Tyr  
130

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Pro Ala Tyr  
 130

<210> 22

<211> 185

<212> PRT

<213> Virus da hepatite B

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys  
 180 185

<210> 23

<211> 212

<212> PRT

<213> Virus da Hepatite B

&lt;400&gt; 23

```

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr
 1          5          10          15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile
          20          25          30

Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu
          35          40          45

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser
          50          55          60

Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His
 65          70          75          80

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp Leu Met Asn
          85          90          95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Glu Asp Pro Val Ser Arg Asp
          100          105          110

Leu Val Val Gly Tyr Val Asn Thr Thr Val Gly Leu Lys Phe Arg Gln
          115          120          125

Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val
          130          135          140

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala
          145          150          155          160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr
          165          170          175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro
          180          185          190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg
          195          200          205

Glu Ser Gln Cys
          210

```

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 188

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Virus da hepatite B

&lt;400&gt; 24

```

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25

<211> 185

<212> PRT

<213> Virus da hepatite B

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys  
180 185

<210> 26

<211> 152

<212> PRT

<213> Virus da hepatite B

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val  
 145 150

<210> 27

<211> 3635

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> plasmídeo pAP283-58

<400> 27

```

cgagctcgcc cctggcttat cgaaattaat acgactcact atagggagac cggaattcga      60
gctcgccccg ggatcctcta gaattttctg cgcatccatc ccgggtggcg cccaaagtga      120
ggaaaatcac atggcaaata agccaatgca accgattaca tctacagcaa ataaaattgt      180
gtggctcggat ccaactcgtt tatcaactac attttcagca agtctgttac gccaacgtgt      240
taaagttggt atagccgaac tgaataatgt ttcagggtcaa tatgtatctg tttataagcg      300
tcctgcacct aaaccggaag gttgtgcaga tgcctgtgtc attatgccga atgaaaacca      360
atccattcgc acagtgattt cagggtcagc cgaaaacttg gctaccitaa aagcagaatg      420
ggaaactcac aaacgtaacg ttgacacact cttcgcgagc ggcaacgccg gtttgggttt      480
ccttgacctt actgcggcta tcgtatcgtc tgatactact gcttaagctt gtattctata      540
gtgtcaccta aatcgtatgt gtatgataca taaggttatg tattaattgt agccgcgttc      600
taacgacaat atgtacaagc ctaatttgtt agcatctggc ttactgaagc agaccctatc      660
atctctctcg taaactgccg tcagagtcgg tttggttgga cgaaccttct gagtttctgg      720
taacgccggt ccgcaccccg gaaatggcca ccgaaccaat cagcagggtc atcgctagcc      780
agatcctcta cgccggacgc atcgtggccg gcatcacccg cgcacacagt gcggttgctg      840
gcgcctatat cgccgacatc accgatgggg aagatcgggc tcgccacttc gggctcatga      900
gcgcttggtt cggcgtgggt atggtyggcag gccccgtggc cgggggactg ttgggcgcca      960
tctccttgca tgcaccattc cttgcggcgg cgggtgttca acggcctcaa cctactactg     1020
ggctgcttcc taatgcagga gtcgcataag ggagagcgtc gatatggtgc actctcagta     1080
caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc aactccgcta tcgctacgtg actgggtcat     1140
ggctgcgccc cgacacccgc caacacccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtcgtctccc     1200
ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcattgtgt agaggttttc     1260
accgtcatca ccgaaacgcg cgaggcagct tgaagacgaa agggcctcgt gatacgctta     1320
tttttatagg ttaatgtcat gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacitttcgg     1380
ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg     1440

```

ctcatgagac	aataaccctg	ataaatgctt	caataatatt	gaaaaaggaa	gagtatgagt	1500
attcaacatt	tccgtgtcgc	ccttattccc	ttttttgcgg	cattttgcct	tcctgttttt	1560
gctcaccag	aaacgctggg	gaaagtaaaa	gatgctgaag	atcagttggg	tgcacgagt	1620
ggttacatcg	aactggatct	caacagcggg	aagatccttg	agagttttcg	ccccgaagaa	1680
cgttttccaa	tgatgagcac	ttttaagtt	ctgctatgtg	gcgcgggtatt	atcccgtatt	1740
gacgcggggc	aagagcaact	cggtcgccgc	atacactatt	ctcagaatga	cttggttgag	1800
tactcaccag	tcacagaaaa	gcattttacg	gatggcatga	cagtaagaga	attatgcagt	1860
gctgccataa	ccatgagtga	taacactgcg	gccaaacttac	ttctgacaac	gatcggaggga	1920
ccgaaggagc	taaccgcttt	tttgcacaa	atgggggatc	atgtaactcg	ccttgatcgt	1980
tgggaaccgg	agctgaatga	agccatacca	aacgacgagc	gtgacaccac	gatgcctgta	2040
gcaatggcaa	caacggttgcg	caaactatta	actggcgaa	taettactct	agcttcccg	2100
caacaattaa	tagactggat	ggaggcggat	aaagttgcag	gaccacttct	gcgctcggcc	2160
cttcgggctg	gctgggtttat	tgctgataaa	tctggagccg	gtgagcgtgg	gtctcggggt	2220
atcattgcag	cactggggcc	agatggtaag	ccctcccgta	tcgtagttat	ctacacgacg	2280
gggagtcagg	caactatgga	tgaacgaaat	agacagatcg	ctgagatagg	tgccctcactg	2340
attaagcatt	ggtaactgtc	agaccaagtt	tactcatata	tacttttagat	tgatttaaaa	2400
cttcattttt	aatttaaaaag	gatctagggtg	aagatccttt	ttgataatct	catgacccaa	2460
atcccttaac	gtgagttttc	gttccactga	gcgtcagacc	ccgtagaaaa	gatcaaagga	2520
tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	atctgctgct	tgcaaacaaa	aaaaccaccg	2580
ctaccagcgg	tggtttggtt	gccggatcaa	gagctacca	ctctttttcc	gaaggtaact	2640
ggcttcagca	gagcgcagat	accaaatact	gtccttctag	tgtagccgta	gttagggcac	2700
cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	tacctcgtc	tgctaatact	gttaccagtg	2760
gctgctgcca	gtggcgataa	gtcgtgtctt	accgggttgg	actcaagacg	atagttaccg	2820
gataaggcgc	agcggtcggg	ctgaacgggg	ggttcgtgca	cacagcccag	cttggagcga	2880
acgacctaca	ccgaactgag	atacctacag	cgcgagcatt	gagaaagcgc	cacgcttccc	2940
gaaggagagaa	aggcggacag	gtatccggta	agcggcaggg	tcggaacagg	agagcgcacg	3000
agggagcttc	cagggggaaa	cgccctggat	ctttatagtc	ctgtcggggt	tcgccacctc	3060
tgacttgagc	gtcgattttt	gtgatgctcg	tcaggggggc	ggagcctatg	gaaaaacgcc	3120
agcaacgcgg	ctttttttacg	gttcctggcc	ttttgctggc	cttttgctca	catgttcttt	3180
cctgcgttat	cccctgattc	tgtggataac	cgtattaccg	cttttgagt	agctgatacc	3240
gctcgcgcga	gccgaacgac	gagcgcagcg	agtcagtga	cgagggaagcg	gaagagcgc	3300
caatacgcaa	accgcctctc	cccgcgcgtt	ggccgattca	ttaatgcagc	tgtggtgtca	3360
tggtcgggtga	tcgccagggg	gccgacgcgc	atctcgactg	catggtgcac	caatgcttct	3420
ggcgtcaggc	agccatcgga	agctgtggta	tggccgtgca	ggtcgtaaat	cactgcataa	3480



```

ttcgtgtcgc tcaaggcgca ctcccgttct ggataatggt ttttgcgccg acatcataac 3540
ggttctggca aatattctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcgaact agttaactag 3600
tacgcaagtt cacgtaaaaa gggatcgcg gaatt 3635

```

<210> 28  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 <213> Bacteriófago AP205  
 <400> 28

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Thr Thr Ala
130

```

<210> 29  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> Proteína de cápside AP205  
 <400> 29

```

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

```

```

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

```

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Ala  
130

<210> 30  
<211> 3607  
<212> ADN  
<213> Sequência artificial  
<220>  
<223> plasmídeo pAP281-32  
<400> 30

```

cgagctcgcc cctggcttat cgaaattaat acgactcact atagggagac cggaattcga      60
gctcgccccg ggatcctcta gattaaccca acgcgtagga gtcaggccat ggcaaataag      120
acaatgcaac cgatcacatc tacagcaaat aaaattgtgt ggtcggatcc aactcgttta      180
tcaactacat tticagcaag tctgttacgc caacgtgtta aagttggtat agccgaactg      240
aataatgttt caggtcaata tgtatctgtt tataagcgtc ctgcacctaa accgaaggtc      300
agatgcctgt gtcattatgc cgaatgaaaa ccaatccatt cgcacagtga tticagggtc      360
agccgaaaac ttggctacct taaaagcaga atgggaaact cacaaacgta acgttgacac      420
actcttcgcg agcggcaacg ccggtttggg tticcttgac cctactgcgg ctatcgtatc      480
gtctgatact actgettaag cttgtattct atagtgtcac ctaaatcgta tgtgtatgat      540
acataagggt atgtattaat ggtagccgcg ttctaacgac aatatgtaca agcctaattg      600
tgragcatct ggcttactga agcagaccct atcatctctc tcgtaaactg ccgtcagagt      660
cggttggggt ggacagacct ctgagtttct ggtaacgccg ttccgcaccc cggaaatgg      720
caccgaacca ttcagcaggg tcatcgctag ccagatcctc tacgccggac gcatcgtggc      780
ccgcatacc ggccccacag gtgcggtgct ggccctata tcgccgacat caccgatggg      840
gaagatcggg ctgccactt cgggctcatg atcgttggtt tccgcctggg tatggtggca      900

```

ggccccgtgg	ccccgggggac	tgttgggagc	catctccttg	catgcacccat	tccttgccgc	960
ggcgggtgctc	aacggccctca	acctactact	gggctgcttc	ctaatagcagg	agtcgcataa	1020
gggagagcgt	cgatatgggtg	cactctcagt	acaatctgct	ctgatgccgc	atagttaagc	1080
caactccgct	atcgctacgt	gactgggtca	tggctgcgcc	ccgacacccg	ccaacacccg	1140
ctgacgcgcc	ctgacgggct	tgtctgcttc	cggcatccgc	ttacagacaa	gctgtgaccg	1200
tctccgggag	ctgcatgtgt	cagaggtttt	caccgtcatc	accgaaacgc	gcgaggcagc	1260
ttgaagacga	aagggcctcg	tgatacgcc	atcttttatag	gttaatgtca	tgataataat	1320
ggtttcttag	acgtcagggtg	gcacttttgc	gggaaatgtg	cgcggacccc	ctattgggttt	1380
atctttctaa	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccc	gataaatgct	1440
tcaataatat	tgaaaaagga	agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	cccttattcc	1500
cttttttgcg	gcattttgcc	ttcctgtttt	tgctcaccca	gaaacgctgg	tgaaagtaaa	1560
agatgctgaa	gatcagttgg	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	1620
taagatccct	gagagttttc	gccccgaaga	acgtttttca	atgatgagca	cttttaaagt	1680
tctgctatgt	gtcgcggtat	tatcccgat	tgacgccggg	caagagcaac	tcggtcgccg	1740
catacactat	tctcagaatg	acttggtggt	acctaccagt	cacagaaaag	catcttacgg	1800
atggcatgac	agtaagagaa	ttatgcagtg	ctgccataac	catgagtgat	aacactgcgg	1860
ccaacttact	tctgacaacg	atcggaggac	cgaaggagct	aaccgctttt	ttgcacaaca	1920
tgggggatca	tgtaactcgc	cttgatcggt	gggaaccgga	gctgaatgaa	gccataccaa	1980
acgacgagcg	tgacaccacg	atgcctgtac	gaacggcaac	aacgttgccg	aaactattaa	2040
ctggcgaaact	acttactcta	gcttcccggc	aacaattaat	agactggatg	gaggccgata	2100
aagttgcagg	accacttctg	cgctcggccc	ttccggctgg	ctgggtttatt	gctgataaat	2160
ctggagccgg	tgagcgtggg	tctcgcggt	tcattgcagc	actggggcca	gatggtaagc	2220
cctcccgtat	cgtagtatac	tacacgacgg	ggagtcaggc	aactatggat	gaacgaaata	2280
gacagatcgc	tgagataggt	gcctcactga	ttaagcattg	gtaactgtca	gaccaagttt	2340
actcatatat	actttagatt	gattttaaac	ttcattttta	attttaaagg	atctagggtga	2400
agatcccttt	tgataatctc	atgaccaaaa	tcctttaacg	tgagttttcg	ttccactgag	2460
cggctcagacc	ccgtagaaaag	atcaaaggat	cttcttgaga	tccttttttt	ctgcgcgtaa	2520
tctgctgctt	gcaaacaaaa	aaaccaccgc	taccagcgg	ggtttggttg	ccggatcaag	2580
agctaccaac	tctttttccg	aaggtaactg	gcttcagcag	agcgcagata	ccaataactg	2640
tccttctagt	gtagccgtag	ttaggccacc	acttcaagaa	ctctgtagca	ccgcctacat	2700
acctcgctct	gctaactctg	ttaccagtgg	ctgctgccag	tggcgataag	tcgtgtctta	2760
ccgggttggg	ctcaagacga	taggtaccgg	ataaggcgca	gcggtcgggc	tgaacggggg	2820
gttcgtgcac	acagcccagc	ttggagcgaa	cgacctacac	cgaactgaga	tacctacagc	2880
gcgagcattg	agaaagcgcc	acgcttcccc	aaggggagaaa	ggcggacagg	tatccggtaa	2940

```

gcggcaggggt cggaacaaga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctgggtatc 3000
tttatagtcc tgcggggttt cggcacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt 3060
cagggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc etttttacgg ttcttgacct 3120
ttggctggcc ttttgctcac atgttctttc ctgcgttata ccctgattct gtggataacc 3180
gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctgcgcgcag ccgaacgacc gacggcgagc 3240
cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg 3300
ttggccgatt cattaatgca gctgtggtgt catggtcggg gatcgccagg gtgccgacgc 3360
gcctctcgac tgcattggtgc accaatgctt ctggcgctag gcagccatcg gaagctgtgg 3420
tatggccgtg caggtcgtaa atcactgcat aattcgtgtc gctcaaggcg cactcccgtt 3480
ctggataatg tttttgctg cgacatcata acggttcttg caaatattct gaaatgagct 3540
ggtgacaatt aatcatcgaa ctagttaact agtacgcaag ttcacgtaaa aagggtatcg 3600
cggaatt 3607

```

```

<210> 31
<211> 6
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> agente de ligação N-terminal
<400> 31

```

Cys Gly Asp Glu Gly Gly  
1 5

```

<210> 32
<211> 6
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> agente de ligação C-terminal
<400> 32

```

Gly Gly Glu Asp Gly Cys  
1 5

```

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> Agente de ligação
<400> 33

```

Gly Gly Lys Gly Gly  
1 5

```

<210> 34

```

<211> 3  
<212> PRT  
<213> Sequência artificial  
<220>  
<223> agente de ligação glicina N-terminal  
<220>  
<221> REPETIÇÃO  
<222> (1)..(1)  
<223> A glicina pode ser repetida de zero a cinco vezes  
<220>  
<221> REPETIÇÃO  
<222> (3)..(3)  
<223> A glicina pode ser repetida de zero a doze vezes  
<400> 34

**Gly Cys Gly**  
**1**

<210> 35  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Sequência artificial  
<220>  
<223> Agentes de ligação glicina serina N terminais  
<220>  
<221> REPETIÇÃO  
<222> (1)..(1)  
<223> A glicina pode ser repetida de zero a cinco vezes  
<220>  
<221> REPETIÇÃO  
<222> (3)..(3)  
<223> A glicina pode ser repetida de zero a dez vezes  
<220>  
<221> REPETIÇÃO  
<222> (4)..(4)  
<223> A serina pode ser repetida de zero a duas vezes  
<220>  
<221> REPETIÇÃO  
<222> (5)..(9)  
<223> Estes resíduos podem ser repetidos de zero a três vezes como um grupo  
<400> 35

**Gly Cys Gly Ser Gly Gly Gly Ser**  
**1 5**

<210> 36  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Sequência artificial  
<220>  
<223> Agente de ligação glicina c-terminal

<220>  
 <221> REPETIÇÃO  
 <222> (1)..(1)  
 <223> A glicina pode ser repetida de zero a doze vezes  
 <220>  
 <221> REPETIÇÃO  
 <222> (3)..(3)  
 <223> A glicina pode ser repetida de zero a cinco vezes  
 <400> 36

Gly cys Gly  
 1

<210> 37  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Agentes de ligação glicina serina C terminais  
 <220>  
 <221> REPETIÇÃO  
 <222> (1)..(1)  
 <223> A glicina pode ser repetida de zero a dez vezes  
 <220>  
 <221> REPETIÇÃO  
 <222> (2)..(2)  
 <223> A serina pode ser repetida de zero a duas vezes  
 <220>  
 <221> REPETIÇÃO  
 <222> (3)..(7)  
 <223> Estes resíduos podem ser repetidos de zero a três vezes como um grupo  
 <220>  
 <221> REPETIÇÃO  
 <222> (8)..(8)  
 <223> A glicina pode ser repetida de zero a oito vezes  
 <220>  
 <221> REPETIÇÃO  
 <222> (10)..(10)  
 <223> A glicina pode ser repetida de zero a cinco vezes  
 <400> 37

Gly ser Gly Gly Gly Gly ser Gly cys Gly  
 1 5 10

<210> 38  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Agente de ligação glicina serina  
 <220>

<221> REPETIÇÃO

<222> (1)..(5)

<223> Estes resíduos podem ser repetidos qualquer número de vezes como grupo

<400> 38

Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> gama 1 N-terminal

<400> 39

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

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> gama 1 C-terminal

<400> 40

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

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> gama 3 N-terminal

<400> 41

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

Pro

<210> 42

<211> 18

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> gama 3 C-terminal

<400> 42

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

**cys Gly**

<210> 43  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Sequência artificial  
<220>  
<223> Agente de ligação glicina N-terminal  
<400> 43

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

<210> 44  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Sequência artificial  
<220>  
<223> Agente de ligação glicina C-terminal  
<400> 44

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

<210> 45  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> Agente de ligação glicina-lisina C-terminal  
<400> 45

**Gly Gly Lys Lys Gly Cys**  
**1 5**

<210> 46  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> Agente de ligação glicina-lisina N-terminal  
<400> 46

**Cys Gly Lys Lys Gly Gly**  
**1 5**

<210> 47  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>



<223> Agente de ligação C-terminal  
<400> 47

Gly Gly Cys Gly  
1

<210> 48  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> iniciador oligonucleotídico  
<400> 48  
ggtaacatcg gtcgagatgg aaaacaaact ctggtcc 37  
<210> 49  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> iniciador oligonucleotídico  
<400> 49  
ggaccagagt ttgttttcca tctcgaccga tgttacc 37  
<210> 50  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> iniciador oligonucleotídico  
<400> 50  
agctcgcccg gggatcctct ag 22  
<210> 51  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> iniciador oligonucleotídico  
<400> 51  
cgatgcattt catccttagt tatcaatacg ctgggttcag 40  
<210> 52  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> iniciador oligonucleotídico  
<400> 52  
ggcaaaatta gagactgtta ctttaggtaa gatcgg 36

<210> 53  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> iniciador oligonucleotídico  
<400> 53  
ccgatcttac ctaaagtaac agtctctaataa tttgcc 36  
<210> 54  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Sequência artificial  
<220>  
<223> Iniciador oligonucleotídico  
<400> 54  
ggccatggca cgactcgaga ctgttacttt agg 33  
<210> 55  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> iniciador oligonucleotídico  
<400> 55  
gatttaggtg acactatag 19  
<210> 56  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> iniciador oligonucleotídico  
<400> 56  
gatggacgac aaactctggt cctcaatccg cgtgggg 37  
<210> 57  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> iniciador oligonucleotídico  
<400> 57  
ccccacgcgg attgaggacc agagtttgac gtccatc 37  
<210> 58  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> iniciador ECORIHBCAf(s)

<400> 58  
ccggaattca tggacattga cccttataaa g 31  
<210> 59  
<211> 51  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> iniciador LyS-HBcAg(as)  
<400> 59  
cctagagcca cctttgccac catcttctaa attagtagcc acccaggtag c 51  
<210> 60  
<211> 48  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> iniciador Lys-HBCAg(s)  
<400> 60  
gaagatggtg gcaaaggtgg ctctagggac ctagtagtca gttatgtc 48  
<210> 61  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> iniciador HBCAg(1-149)Hind(as)  
<400> 61  
cgcggtcccaa gcttctaaac aacagtagtc tccggaag 38  
<210> 62  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> iniciador 48as  
<400> 62  
gtgcagtatg gtgaggtgag gaatgctcag gagactc 37  
<210> 63  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> iniciador 48s  
<400> 63  
gagtctcctg agcattcctc acctcaccat actgcac 37  
<210> 64  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> iniciador 107as  
 <400> 64  
 cttccaaaag tgagggaaga aatgtgaaac cac 33  
 <210> 65  
 <211> 47  
 <212> ADN  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> HBCAg149hind-as  
 <400> 65  
 cgcgtcccaa gcttctaaac aacagtagtc tccggaagcg ttgatag 47  
 <210> 66  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> iniciador 107s  
 <400> 66  
 gtggtttcac atttcttccc tcacttttgg aag 33  
 <210> 67  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> iniciador HBCAgwtHindIIII  
 <400> 67  
 cgcgtcccaa gcttctaaca ttgagattcc cgagattg 38  
 <210> 68  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> epitopo ceH3  
 <400> 68

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

<210> 69  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Sequência Artificial  
 <220>  
 <223> iniciador CeH3fwd  
 <220>

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(51)

&lt;400&gt; 69

```

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

gtc
Val                                         51

```

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; iniciador CeH3fwd

&lt;400&gt; 70

```

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

```

Val

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 51

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; iniciador ceH3rev

&lt;400&gt; 71

accagaagca cgagaccagg tcaagttaac atcttccaaa ttattacca c 51

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; péptido iniciador CeH3rev

&lt;400&gt; 72

```

Asp Glu Leu Asn Asn Gly Val
1          5

```

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Sequência Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; iniciador HBcAg-wt ECORI fwd

&lt;400&gt; 73

ccggaattca tggacattga cccttataaa g 31

<210> 74  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> iniciador HBCAg-wt Hind III rev  
<400> 74  
cgcggtcccaa gcttctaaca ttgagattcc cgagattg 38  
<210> 75  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 75

Asp Ala Glu Phe Arg His  
1 5

<210> 76  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 76

Asp Ala Glu Phe Gly His  
1 5

<210> 77  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> Abeta 1-6 GGC  
<400> 77

Asp Ala Glu Phe Arg His Gly Gly Cys  
1 5

<210> 78  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> Abeta 1-6 GGC murino  
<400> 78

Asp Ala Glu Phe Gly His Gly Gly Cys  
1 5

<210> 79  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> iniciador p1.44  
<400> 79  
aaccatggca aataagccaa tgcaaccg 28  
<210> 80  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> iniciador p1.45  
<400> 80  
aatctagaat tttctgcgca cccatcccgg 30  
<210> 81  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> iniciador p1.46  
<400> 81  
aaaagcttaa gcagtagtat cagacgatac 30  
<210> 82  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial <220>  
<223> iniciador p1.47  
<400> 82  
gagtgatcca actcgtttat caactacatt ttcagcaagt ctg 43  
<210> 83  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial  
<220>  
<223> iniciador p1.48  
<400> 83  
cagacttgct gaaaatgtag ttgataaacg agttggatca ctc 43  
<210> 84  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> homo sapiens  
<400> 84

Asp Ala Glu Phe Arg His  
1 5

<210> 85  
<211> 6

<212> PRT  
<213> Oryctolagus cuniculus  
<400> 85

Asp Ala Glu Phe Arg His  
1 5

<210> 86  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Xenopus laevis  
<400> 86

Asp Ser Glu Tyr Arg His  
1 5

<210> 87  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Rattus norvegicus  
<400> 87

Asp Ala Glu Phe Gly His  
1 5

<210> 88  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> cavia porcellus  
<400> 88

Asp Ala Glu Phe Arg His  
1 5

<210> 89  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 89

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

<210> 90  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 90

Tyr Tyr Glu Phe Arg His  
1 5

<210> 91  
<211> 42  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens



&lt;400&gt; 91

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

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

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

&lt;210&gt; 92

&lt;211&gt; 770

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 92

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg  
 1 5 10 15

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro  
 20 25 30

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln  
 35 40 45

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp  
 50 55 60

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu  
 65 70 75 80

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn  
 85 90 95

Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val  
 100 105 110

Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu  
 115 120 125

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys  
 130 135 140

Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu  
 145 150 155 160

Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile  
 165 170 175

Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu  
 180 185 190

Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val  
 195 200 205  
 Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys  
 210 215 220  
 Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu  
 245 250 255  
 Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile  
 260 265 270  
 Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg  
 275 280 285  
 Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile  
 290 295 300  
 Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe  
 305 310 315 320  
 Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr  
 325 330 335  
 Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr  
 340 345 350  
 Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala  
 355 360 365  
 Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp  
 370 375 380  
 Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala  
 385 390 395 400  
 Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala  
 405 410 415  
 Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile  
 420 425 430  
 Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn  
 435 440 445  
 Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met  
 450 455 460

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

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

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

Gln Asn  
       770

<210> 93  
 <211> 82  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 93

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

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

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

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

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

Val Glu

Lisboa, 22 de Julho de 2011

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Uma composição compreendendo:

(a) uma partícula central com pelo menos um primeiro local de ligação em que a referida partícula central é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN; e  
(b) pelo menos um antígeno ou determinante antigénico com pelo menos um segundo local de ligação, em que o referido antígeno ou determinante antigénico é um péptido A $\beta$ 1-6, e em que o referido segundo local de ligação é seleccionado do grupo que consiste em:

(i) um local de ligação que não ocorre naturalmente com o referido antígeno ou determinante antigénico; e

(ii) um local de ligação que ocorre naturalmente com o referido antígeno ou determinante antigénico, em que o referido segundo local de ligação é capaz de se associar ao referido primeiro local de ligação através de pelo menos uma ligação não peptídica;

e em que o referido péptido A $\beta$ 1-6 e referida partícula central interagem através da referida associação para formar uma fileira de antígeno ordenada e repetitiva.

2. A composição da reivindicação 1, caracterizada pela referida partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN compreender, ou alternativamente consistir em, proteínas recombinantes, ou seus fragmentos, de um bacteriófago de ARN.

3. A composição da reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo referido bacteriófago de ARN ser seleccionado do grupo que consiste em:

- (a) bacteriófago Q $\beta$ ;
- (b) bacteriófago R 17;
- (c) bacteriófago fr;
- (d) bacteriófago GA;
- (e) bacteriófago SP;
- (f) bacteriófago MS2;
- (g) bacteriófago M 11;
- (h) bacteriófago MX 1;
- (i) bacteriófago NL95;
- (k) bacteriófago f2;
- (l) bacteriófago PP7; e
- (m) bacteriófago AP205.

4. A composição da reivindicação 1, caracterizada pela referida partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN compreender, ou alternativamente, consistir em, proteínas recombinantes, ou seus fragmentos, do bacteriófago de ARN Q $\beta$ .

5. A composição da reivindicação 1, caracterizada pela referida partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN compreender, ou alternativamente, consistir em, proteínas recombinantes, ou seus fragmentos, do bacteriófago de ARN fr.

6. A composição da reivindicação 1, caracterizada pela referida partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN compreender, ou alternativamente, consistir em, proteínas recombinantes, ou seus fragmentos, do bacteriófago de ARN AP205.

7. A composição da reivindicação 2, caracterizada pelas proteínas recombinantes compreenderem, ou alternativamente consistirem essencialmente em, ou alternativamente consistirem em proteínas de cápside de bacteriófagos de ARN.

8. A composição da reivindicação 7, caracterizada pelas referidas proteínas de cápside de bacteriófagos de ARN terem uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo que consiste em:

- (a) SEQ ID NO : 4;
- (b) uma mistura de SEQ ID NO : 4 e SEQ ID NO : 5 ;
- (c) SEQ ID NO : 6;
- (d) SEQ ID NO : 7;
- (e) SEQ ID NO : 8;
- (f) SEQ ID NO : 9;
- (g) uma mistura de SEQ ID NO : 9 e SEQ ID NO : 10;
- (h) SEQ ID NO: 11;
- (i) SEQ ID NO : 12;
- (k) SEQ ID NO : 13;
- (l) SEQ ID NO : 14;

- (m) SEQ ID NO: 15;
- (n) SEQ ID NO: 16; e
- (o) SEQ ID NO : 28.

9. A composição da reivindicação 2, caracterizada pelas proteínas recombinantes compreenderem, ou alternativamente consistirem essencialmente em, ou alternativamente consistirem em proteínas de cápside mutantes de bacteriófagos de ARN.

10. A composição da reivindicação 9, caracterizada pelo referido bacteriófago de ARN ser seleccionado do grupo que consiste em:

- (a) bacteriófago Q $\beta$ ;
- (b) bacteriófago R 17;
- (c) bacteriófago fr;
- (d) bacteriófago GA;
- (e) bacteriófago SP;
- (f) bacteriófago MS2;
- (g) bacteriófago M 11;
- (h) bacteriófago MX 1;
- (i) bacteriófago NL95;
- (k) bacteriófago f2;
- (l) bacteriófago PP7; e
- (m) bacteriófago AP205.

11. A composição da reivindicação 9 ou 10, caracterizada pelas referidas proteínas de cápside mutantes do referido bacteriófago de ARN terem sido modificadas pela



remoção de pelo menos um resíduo de lisina por intermédio de substituição.

12. A composição da reivindicação 9 ou 10, caracterizada pelas referidas proteínas de cápside mutantes do referido bacteriófago de ARN terem sido modificadas pela adição de pelo menos um resíduo de lisina por intermédio de substituição.

13. A composição da reivindicação 9 ou 10, caracterizada pelas referidas proteínas de cápside mutantes do referido bacteriófago de ARN terem sido modificadas pela deleção de pelo menos um resíduo de lisina.

14. A composição da reivindicação 9 ou 10, caracterizada pelas referidas proteínas de cápside mutantes do referido bacteriófago de ARN terem sido modificadas pela adição de pelo menos um resíduo de lisina por intermédio de inserção.

15. A composição de qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo segundo local de ligação ser capaz de associação ao primeiro local de ligação através de pelo menos uma ligação covalente.

16. A composição de qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo referido péptido A $\beta$ 1-6 ser seleccionado do grupo que consiste em:

- (a) um péptido A $\beta$ 1-6 humano com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO : 75;
- (b) um péptido A $\beta$ 1-6 murino com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO : 76;
- (c) um péptido A $\beta$ 1-6 de primata com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO : 84;
- (d) um péptido A $\beta$ 1-6 de coelho com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO : 85;
- (e) um péptido A $\beta$ 1-6 de xenopus laevis com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO : 86;
- (f) um péptido A $\beta$ 1-6 de rato com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO : 87; e
- (g) um péptido A $\beta$ 1-6 de porquinho-da-índia com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO : 88.

17. A composição de qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo referido péptido A $\beta$ 1-6 tem uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO : 75.

18. A composição de qualquer uma das reivindicações anteriores compreendendo ainda um aminoácido de ligação, caracterizada pelo referido aminoácido de ligação compreender, ou alternativamente consistir em, o referido segundo local de ligação.

19. A composição de qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo referido segundo local de ligação ou referido aminoácido de ligação com o

referido segundo local de ligação estar ligado ao referido péptido A $\beta$ 1-6 na sua extremidade C.

20. A composição de qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo referido segundo local de ligação ou referido aminoácido de ligação com o referido segundo local de ligação ser seleccionado do grupo que consiste em:

- (a) CGC;
- (b) GGC-CONH<sub>2</sub>;
- (c) GC;
- (d) GC-CONH<sub>2</sub>;
- (e) C; e
- (f) C-CONH<sub>2</sub>.

21. A composição de qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo referido péptido A $\beta$ 1-6 com o referido segundo local de ligação ser NH<sub>2</sub>-DAEFRHGGC-CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 77).

22. A composição da reivindicação 21, caracterizada pela referida partícula semelhante a vírus ser uma partícula semelhante a vírus de uma proteína de cápside do bacteriófago de ARN  $\phi$ .

23. Uma composição farmacêutica compreendendo:

- (a) a composição de qualquer reivindicação anterior; e
- (b) um veículo farmacêutico aceitável.

24. A composição farmacêutica da reivindicação 23 compreendendo ainda um adjuvante.

25. A composição farmacêutica da reivindicação 23 ou da reivindicação 24 caracterizada pela referida composição de vacina ser desprovida de um adjuvante.

26. Uma composição de vacina compreendendo a composição de qualquer uma das reivindicações anteriores.

27. A composição de vacina da reivindicação 26, caracterizada por compreender ainda um adjuvante.

28. A composição de vacina da reivindicação 26, caracterizada pela referida composição de vacina ser desprovida de um adjuvante.

29. A composição de vacina de qualquer uma das reivindicações 26 a 28, caracterizada pela referida partícula semelhante a vírus compreender proteínas recombinantes, ou seus fragmentos, de um bacteriófago de ARN.

30. A composição de vacina de qualquer uma das reivindicações 26 a 29, caracterizada pela referida partícula semelhante a vírus compreender proteínas recombinantes, ou seus fragmentos, de um bacteriófago de ARN Q $\beta$ .

31. A composição de vacina de qualquer uma das reivindicações 26 a 29, caracterizada pela referida par-

tícula semelhante a vírus compreender proteínas recombinantes, ou seus fragmentos, de um bacteriófago de ARN fr.

32. A composição de vacina de qualquer uma das reivindicações 26 a 29, caracterizada pela referida partícula semelhante a vírus compreender proteínas recombinantes, ou seus fragmentos, de um bacteriófago de ARN AP205.

33. A composição de vacina de qualquer uma das reivindicações 26 a 32, caracterizada pelo referido péptido A $\beta$  1-6 ser seleccionado do grupo que consiste em:

- (a) um péptido A $\beta$ 1-6 humano com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO : 75;
- (b) um péptido A $\beta$ 1-6 murino com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO : 76;
- (c) um péptido A $\beta$ 1-6 de primata com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO : 84;
- (d) um péptido A $\beta$ 1-6 de coelho com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO : 85;
- (e) um péptido A $\beta$ 1-6 de xenopus laevis com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO : 86;
- (f) um péptido A $\beta$ 1-6 de rato com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO : 87; e
- (g) um péptido A $\beta$ 1-6 de porquinho-da-índia com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO : 88.

34. A composição de vacina de qualquer uma das reivindicações 26 a 33 compreendendo ainda um aminoácido de

ligação, caracterizada pelo referido aminoácido de ligação compreender, ou alternativamente consistir em, o referido segundo local de ligação.

énio ou determinante antigénico com o referido pelo menos segundo local de ligação ser NH<sub>2</sub>-DAEFRHGGC-CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 77).

38. A composição de vacina da reivindicação 37, caracterizada pela referida partícula semelhante a vírus ser uma partícula semelhante a vírus de proteína de cápside do bacteriófago de ARN Q $\beta$ .

39. Um processo para a produção de uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores compreendendo:

(a) proporcionar uma partícula central com pelo menos um primeiro local de ligação, em que a referida partícula central é uma partícula semelhante a vírus de um bacteriófago de ARN;

(b) proporcionar pelo menos um antigénio ou determinante antigénico com pelo menos um segundo local de ligação, em que o referido antigénio ou determinante antigénico é um péptido A $\beta$ 1-6; e

em que o referido segundo local de ligação é seleccionado do grupo que consiste em:

(i) um local de ligação que não ocorre com o referido antigénio ou determinante antigénico; e

(ii) um local de ligação que ocorre naturalmente com o

referido antigénio ou determinante antigénico;

e em que o referido segundo local de ligação se associa com o referido primeiro local de ligação através de pelo menos uma ligação não peptídica; e

(c) combinar a referida partícula central e o referido antigénio ou determinante antigénico, em que o referido pelo menos um antigénio ou determinante antigénico e a referida partícula central interagem através da referida associação para formar uma fileira de antigénios ordenada e repetitiva.

40. Composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 38 para utilização como um medicamento.

41. Utilização de uma composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 38 para o fabrico de um medicamento para o tratamento da doença de Alzheimer e relacionadas.

42. A composição da reivindicação 1 caracterizada pela referida composição compreender ainda um agente reticulante hetero-bifuncional que contém um grupo funcional que pode reagir com o referido primeiro local de ligação e outro grupo funcional que pode reagir com o referido segundo local de ligação.

43. A composição da reivindicação 42 caracterizada pelo referido agente reticulante hetero-bifuncional conter um grupo funcional que pode reagir com o grupo amino da cadeia lateral do resíduo de lisina da partícula seme-

lhante a vírus ou de pelo menos uma subunidade da partícula semelhante a vírus.

44. A composição da reivindicação 42, caracterizada pelo referido grupo funcional adicional do referido agente reticulante hetero-bifuncional reagir com um resíduo cisteína fundido com o péptido A $\beta$ 1-6.

45. A composição de acordo com as reivindicações 42, caracterizada pelo referido agente reticulante hetero-bifuncional ser seleccionado de SMPH, Sulfo- MBS, Sulfo-EMCS, Sulfo-GMBS, Sulfo-SIAB, Sulfo-SMPB, Sulfo-SMCC, SVSB, SIA e outros agentes reticulantes com um grupo funcional reactivo relativamente ao grupo amino e um grupo funcional reactivo relativamente aos resíduos cisteína.

46. A composição de acordo com a reivindicação 42, caracterizada pelo referido agente reticulante hetero-bifuncional ser SPDP ou Sulfo-LC-SPDP.

Lisboa, 22 de Julho de 2011



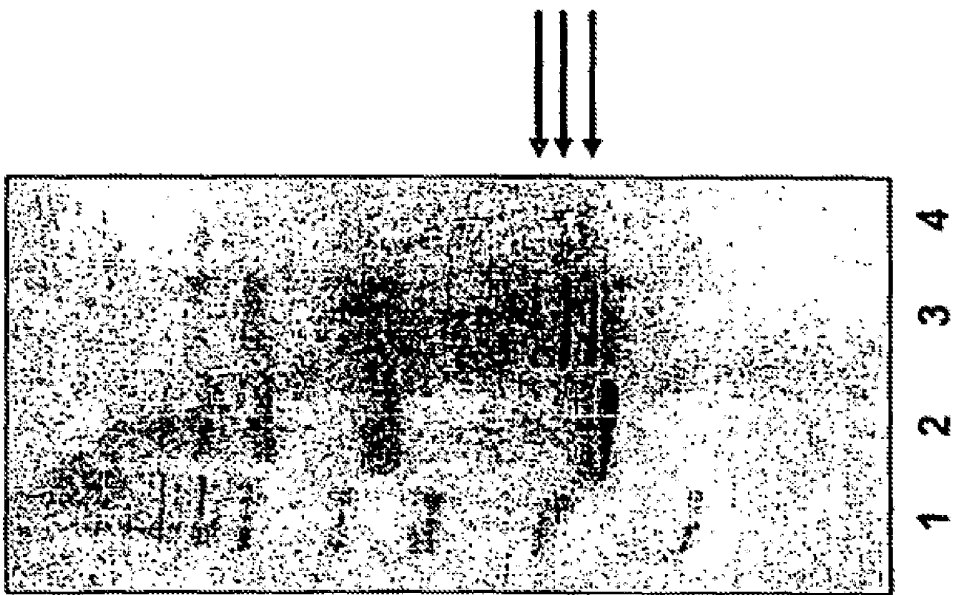


FIG. 1

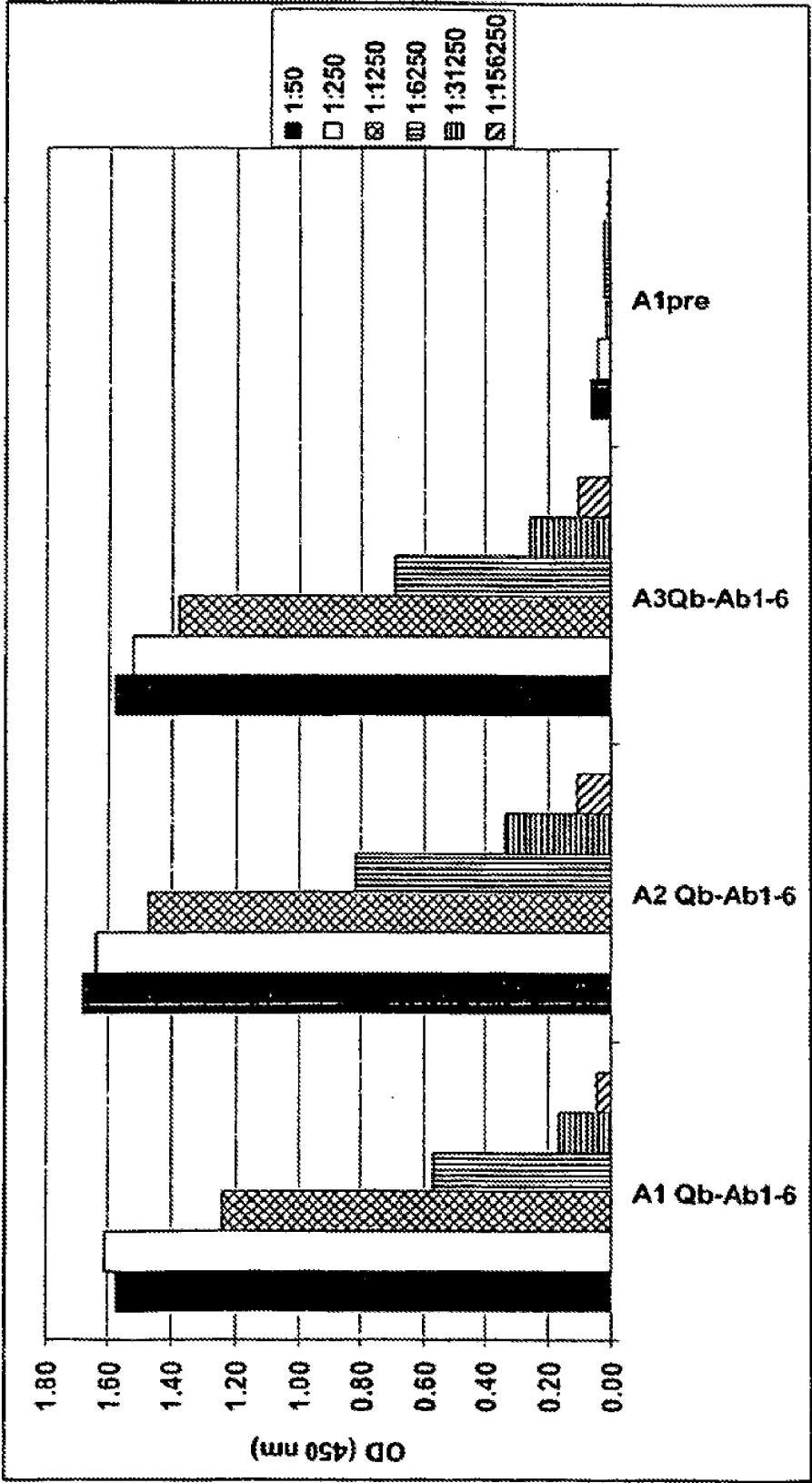
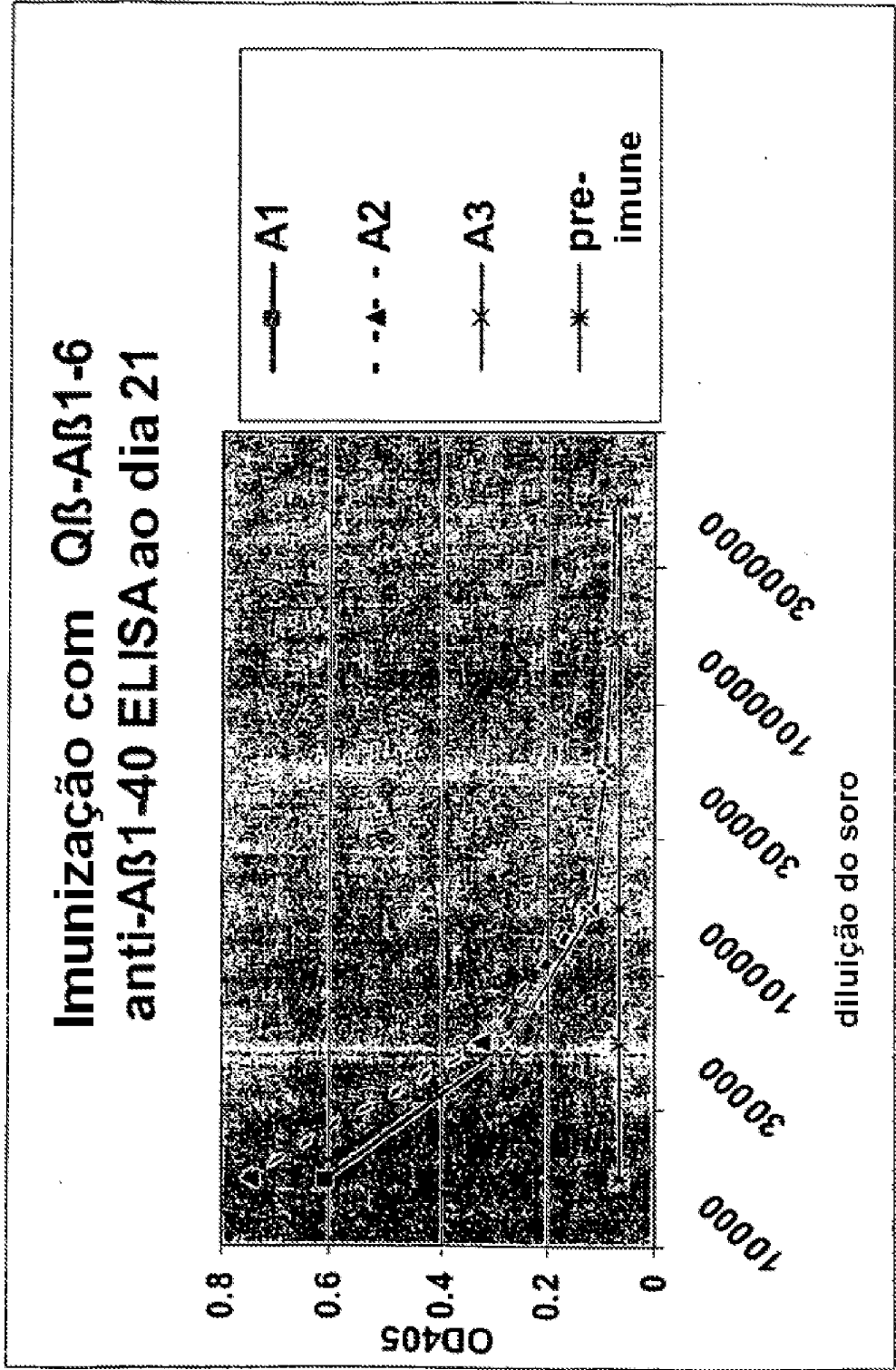


FIG. 2



**FIG. 3**

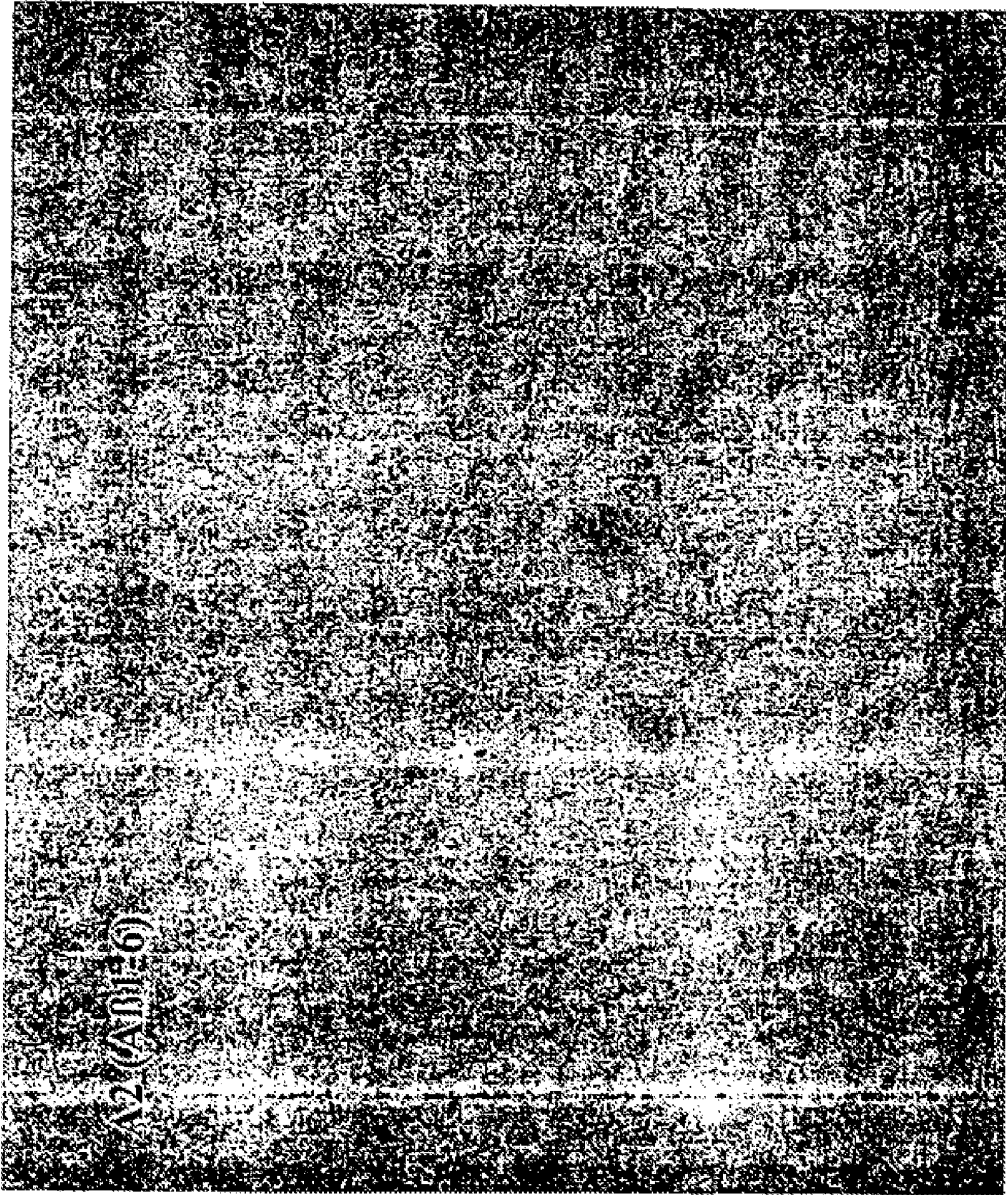
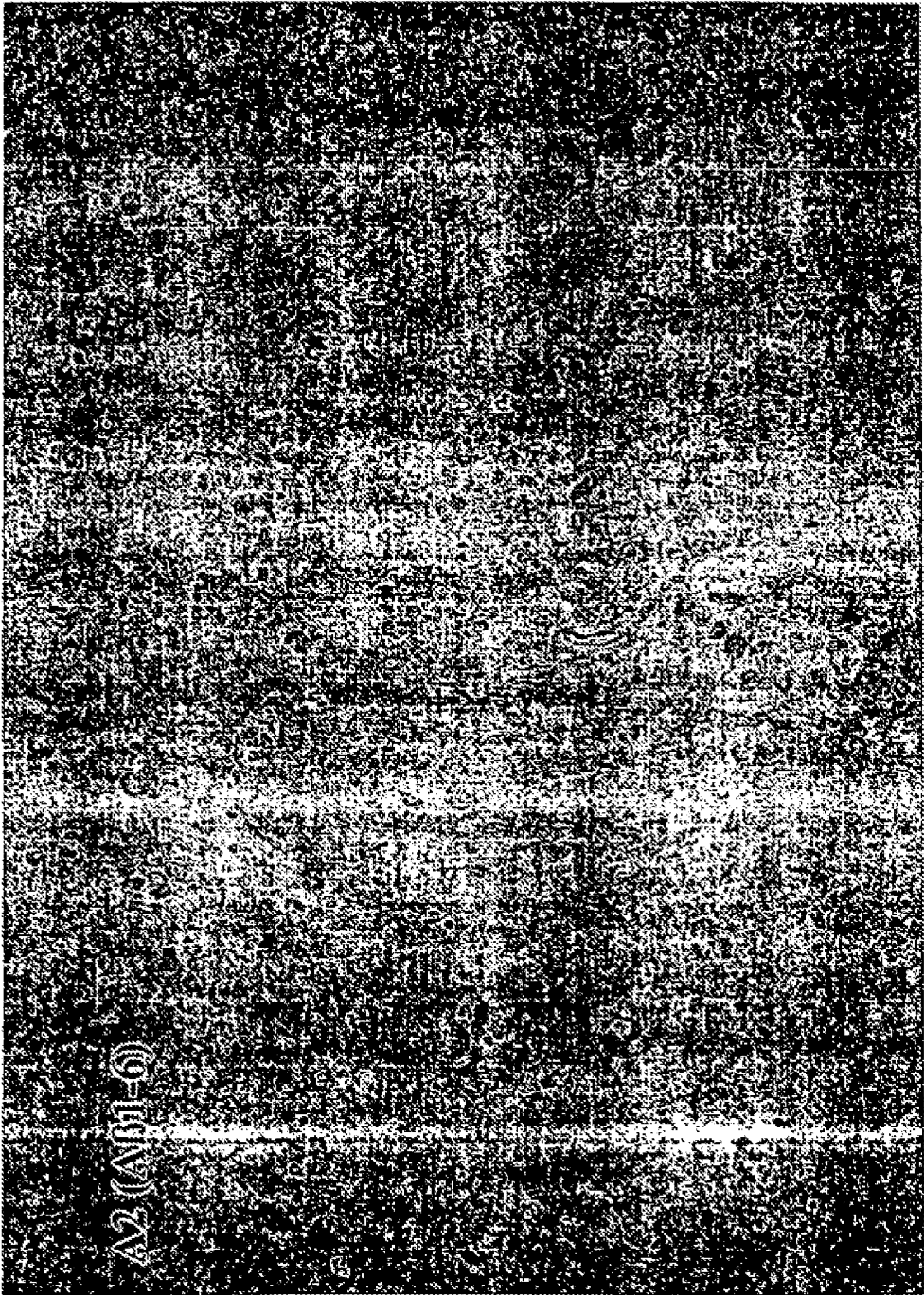
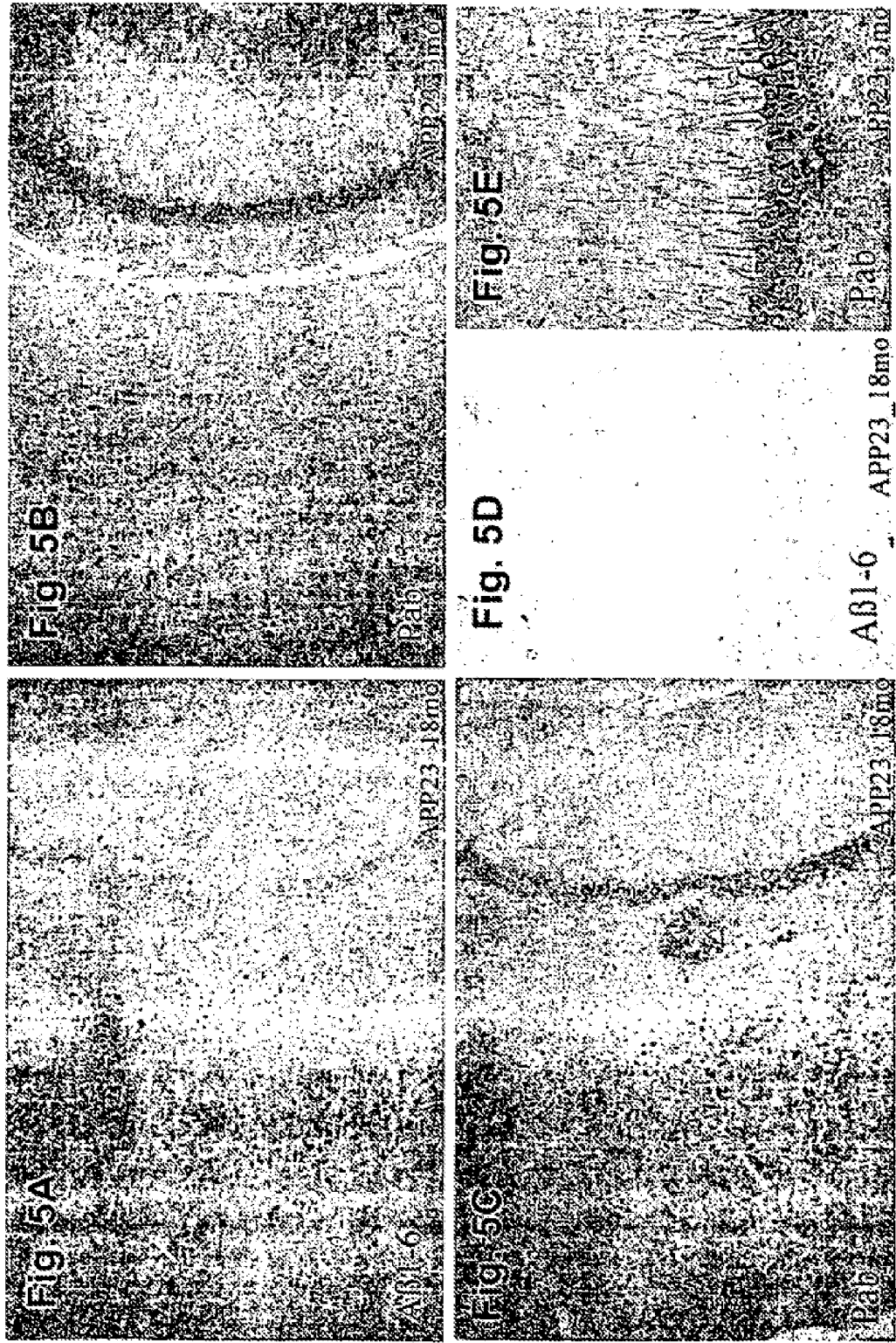


FIG. 4A



**FIG. 4B**



**Fig. 5**

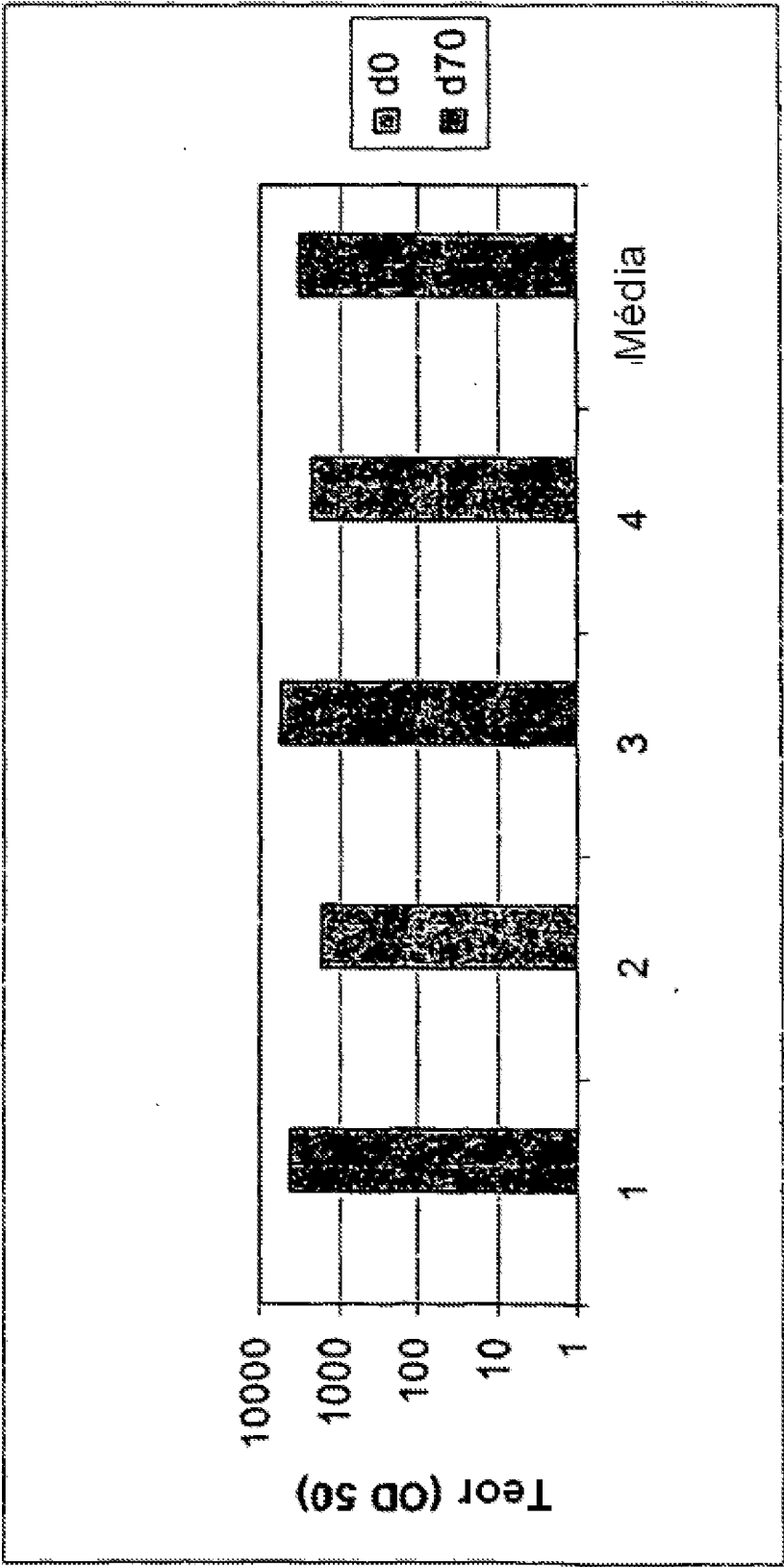
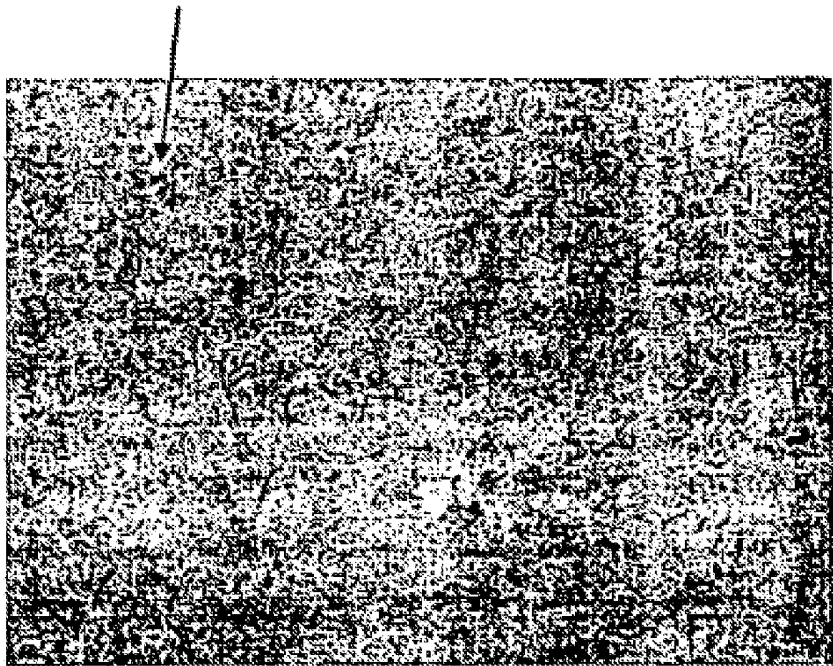
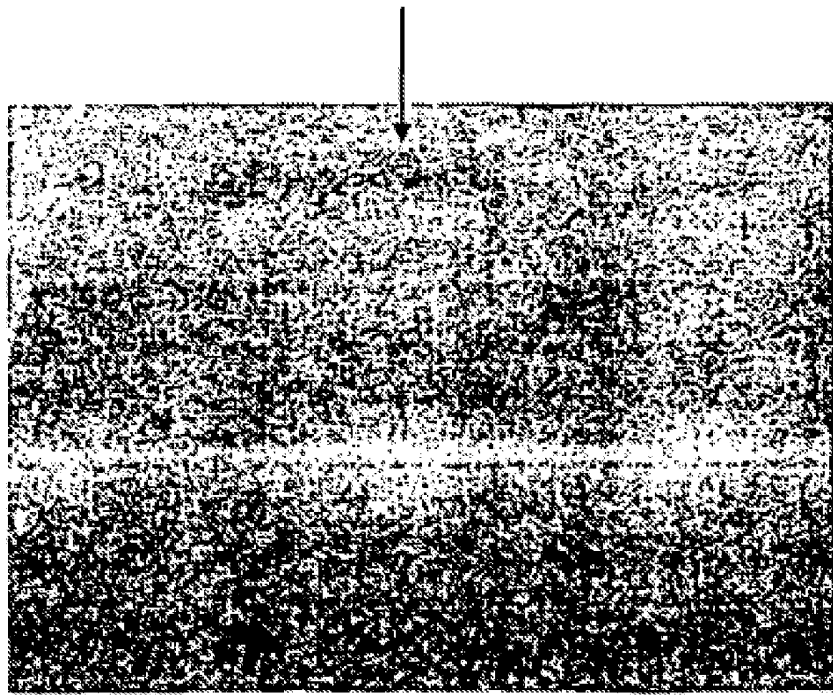


Fig. 6



**Fig. 7B**



**Fig. 7A**



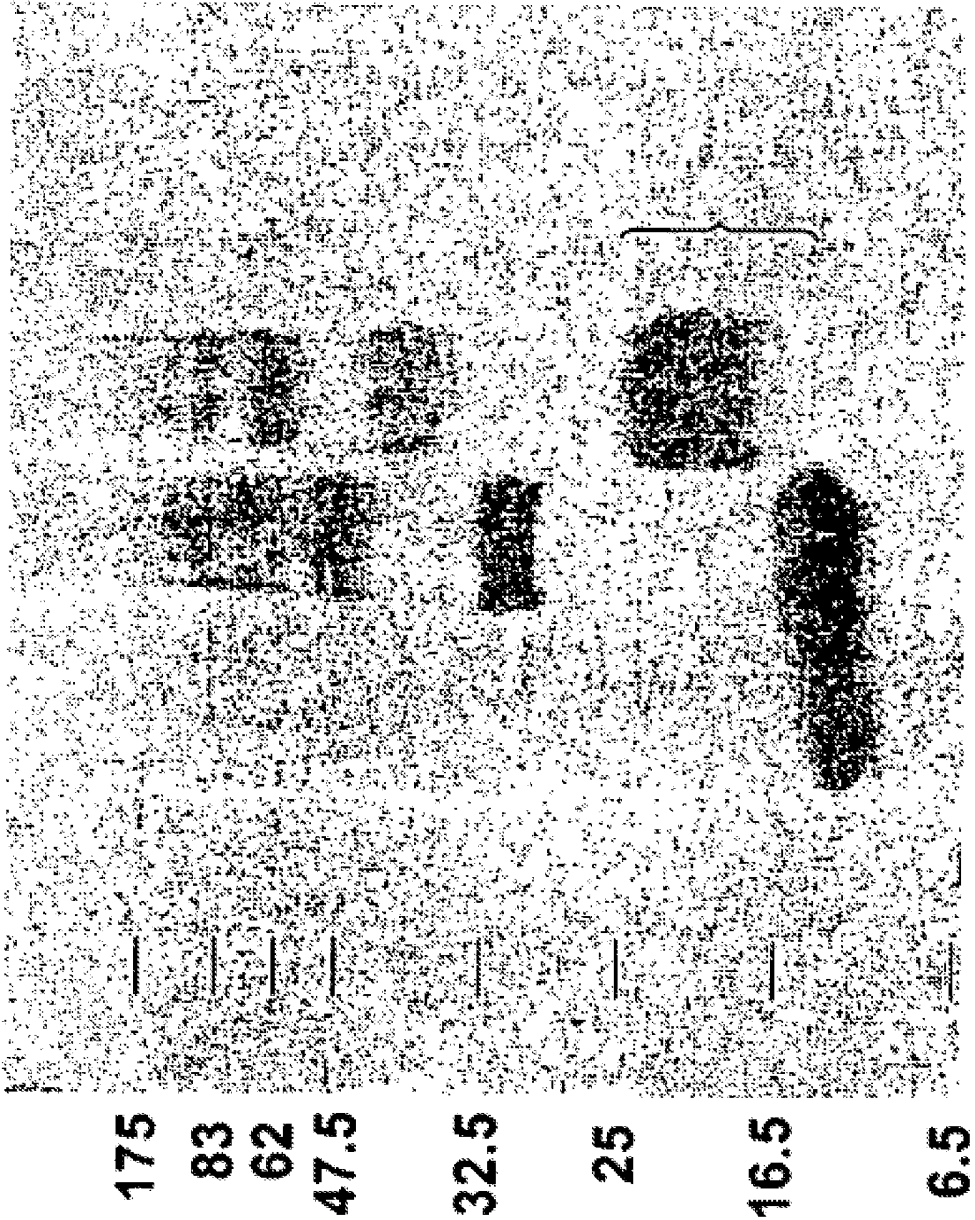


Fig. 8

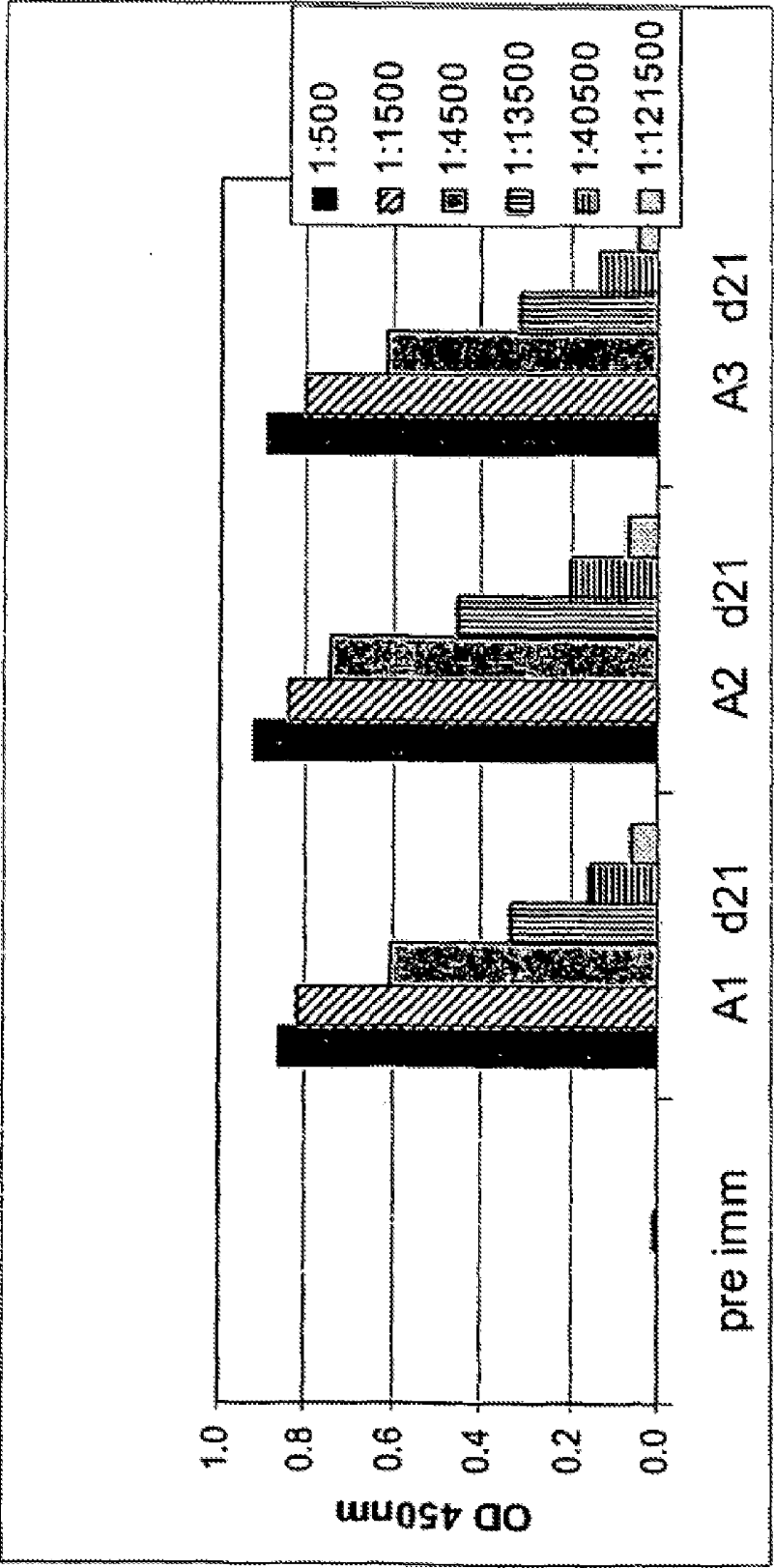


Fig. 9

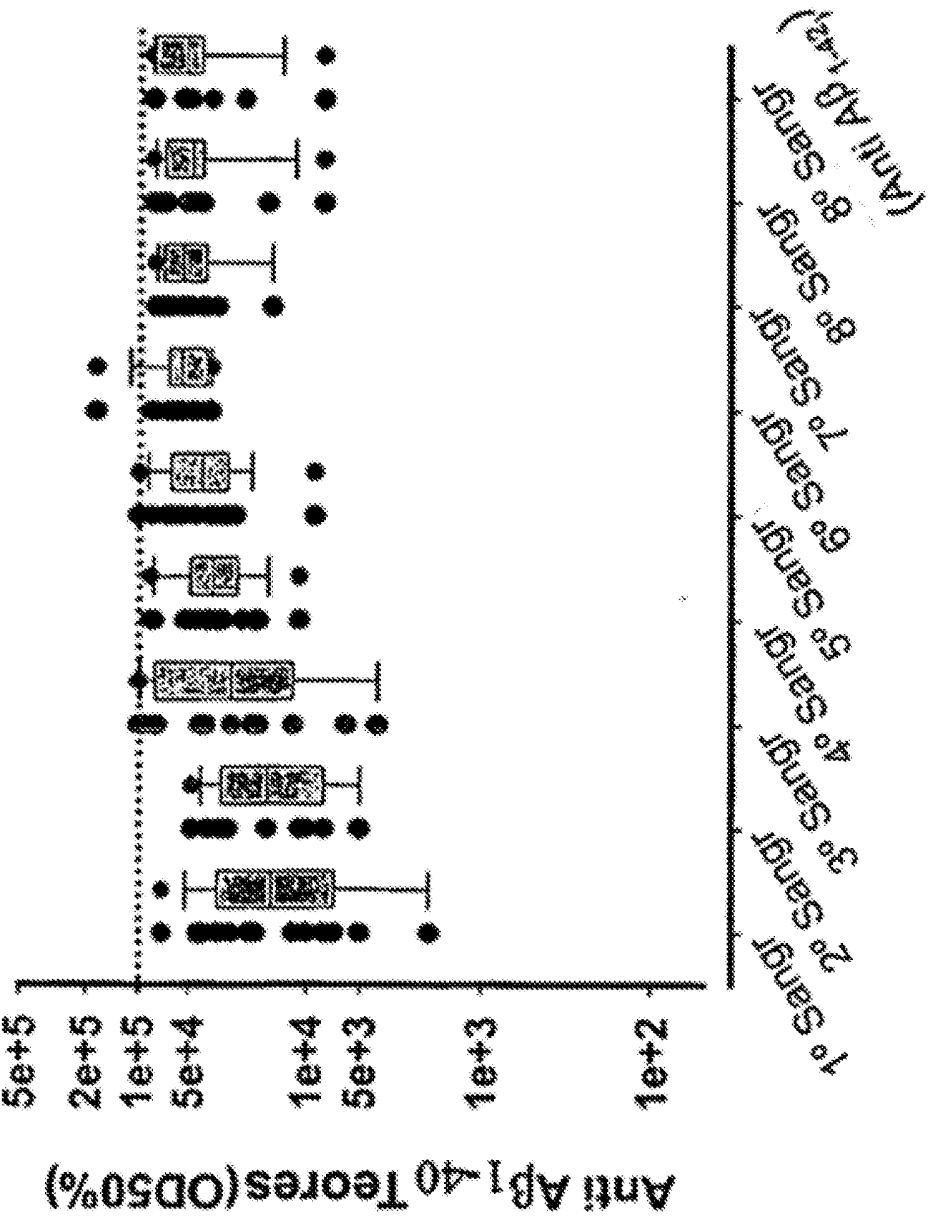


Fig. 10

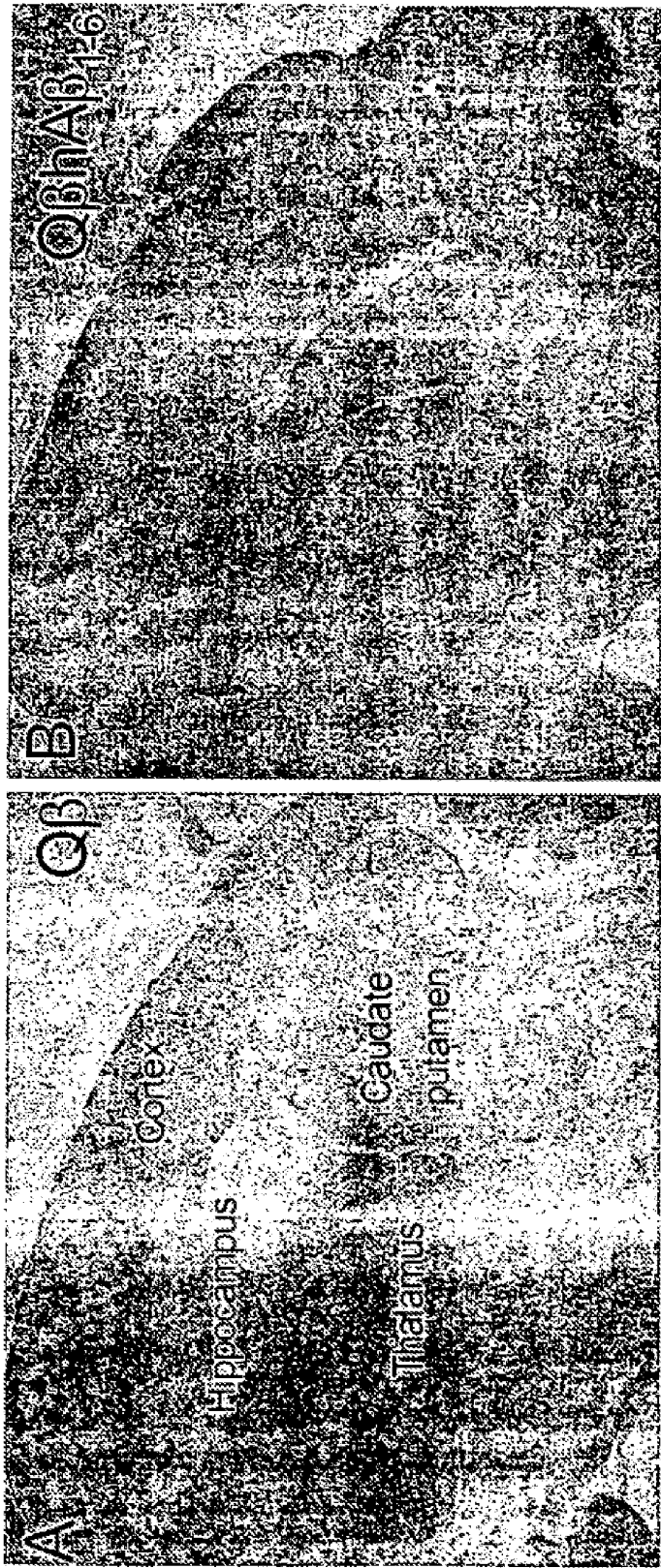


Fig. 11A

Fig. 11B

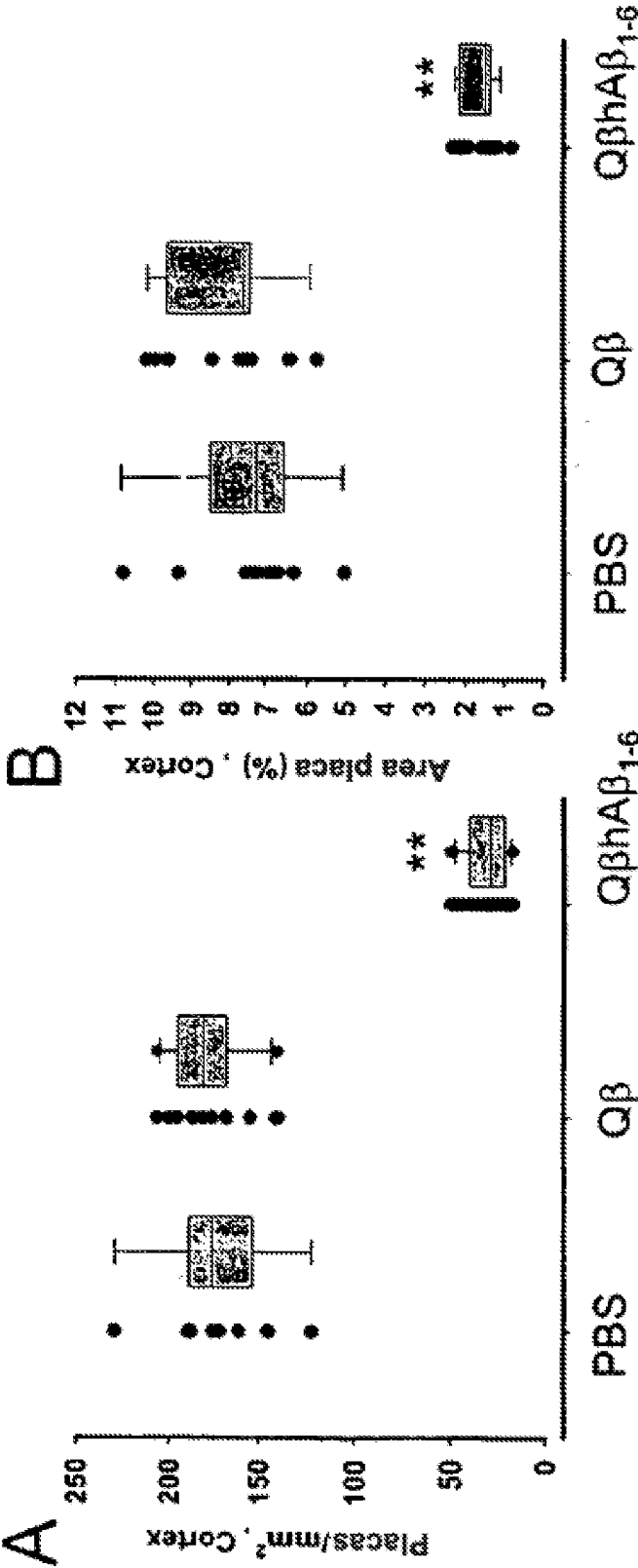


Fig. 12A

Fig. 12B

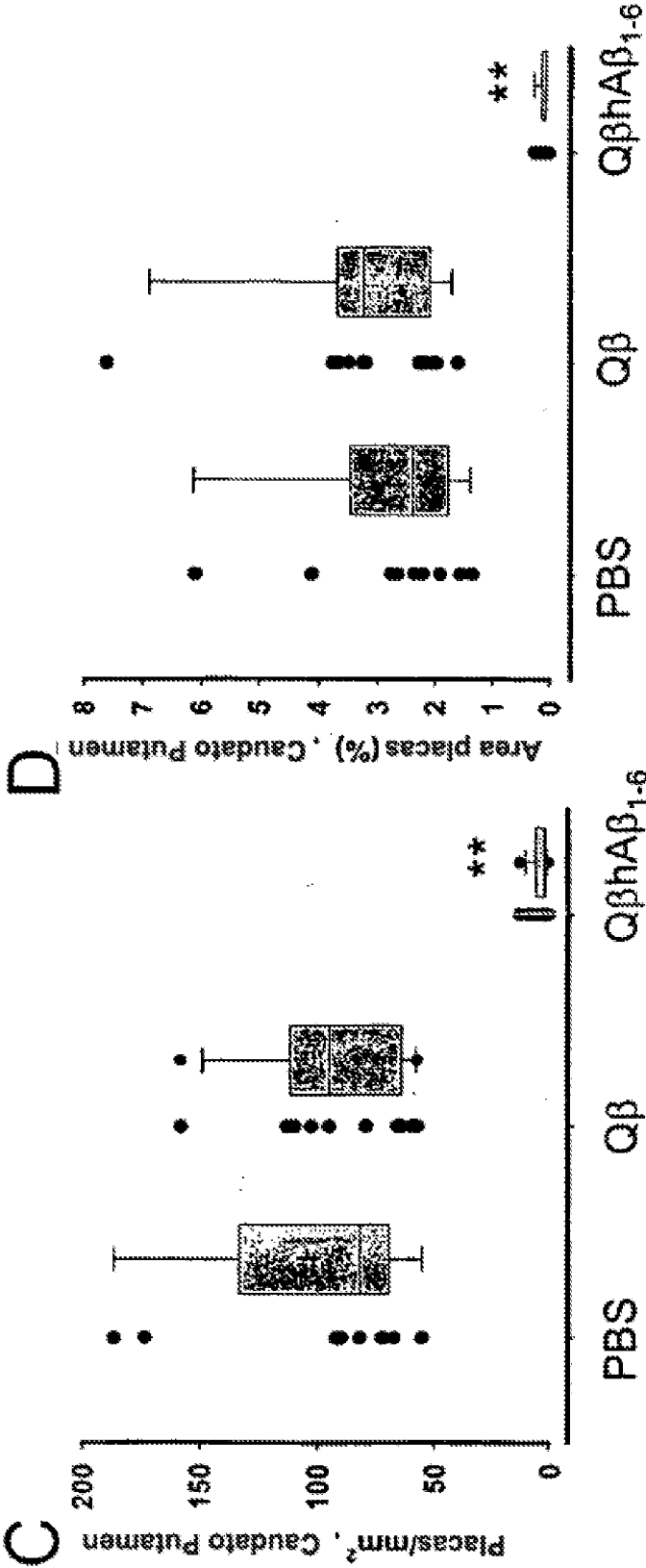


Fig. 12C

Fig. 12D

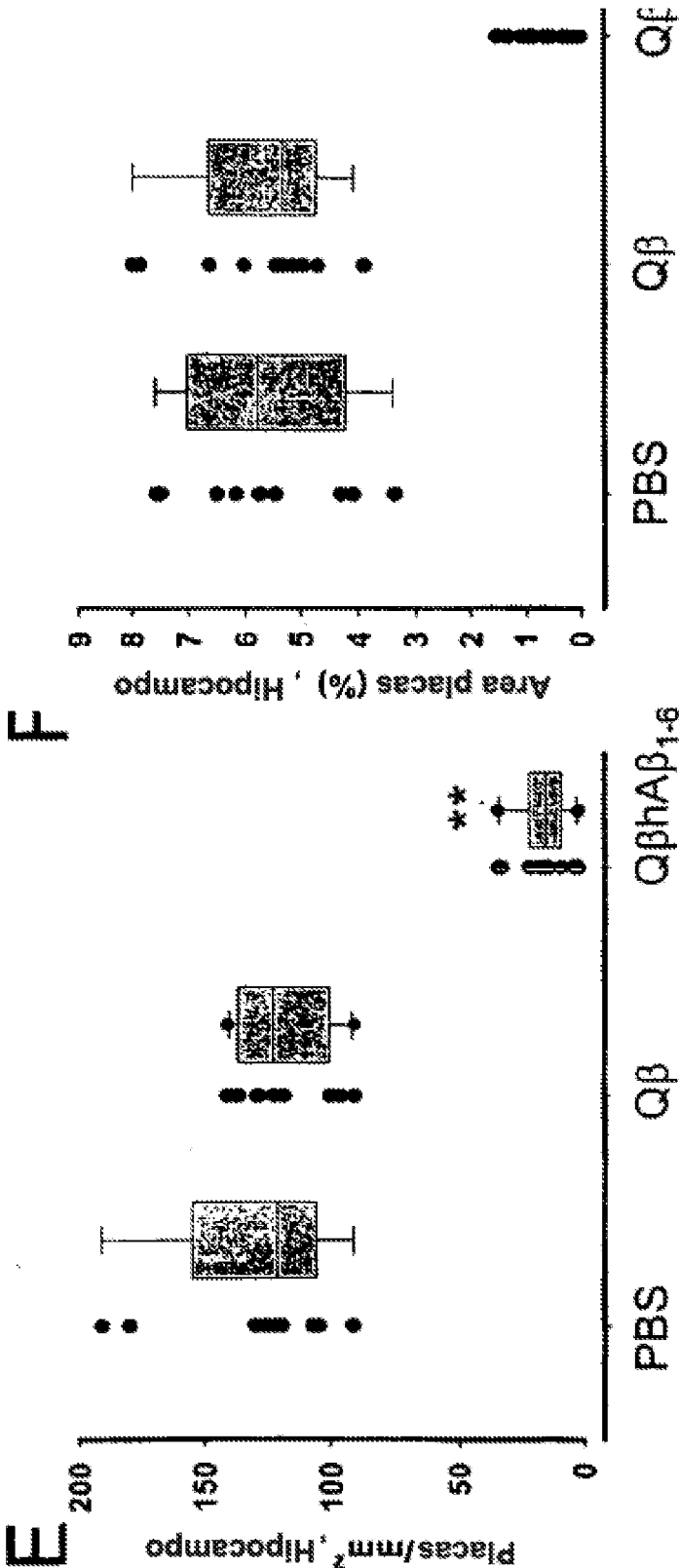


Fig. 12F

Fig. 12E

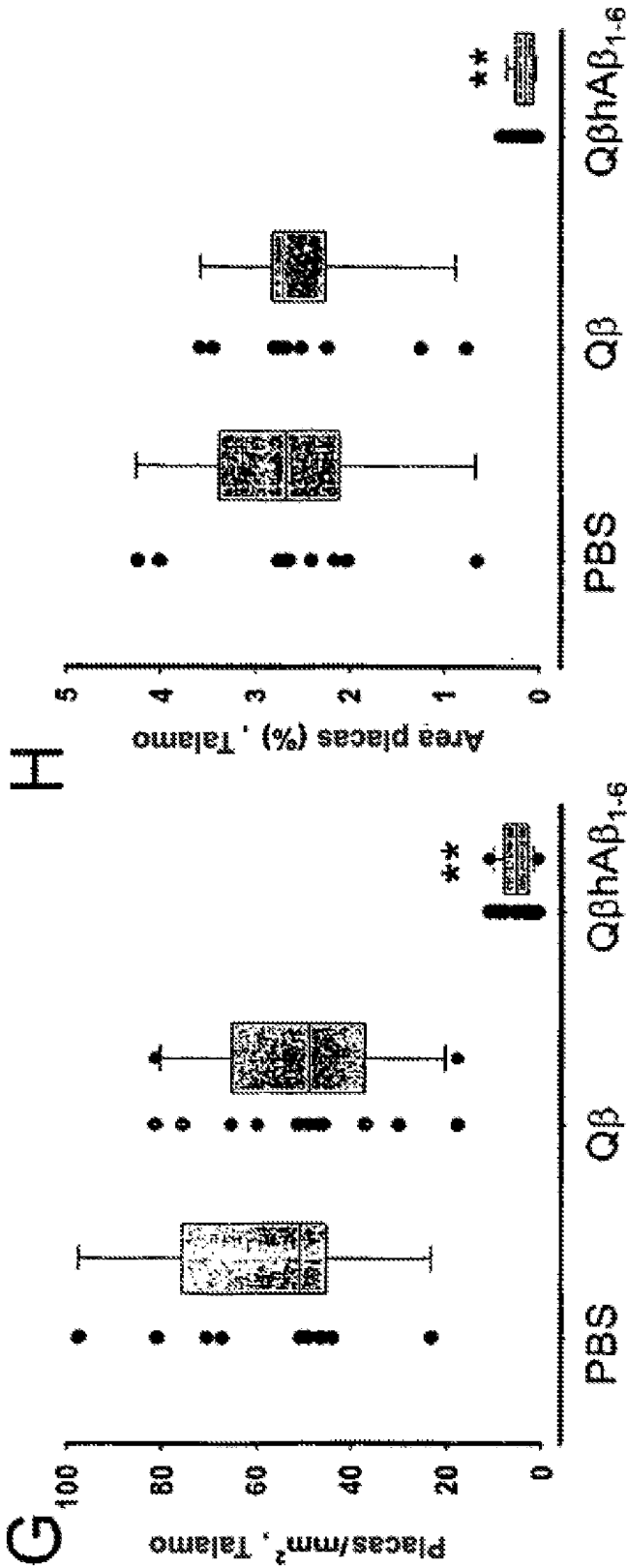


Fig. 12G

Fig. 12H



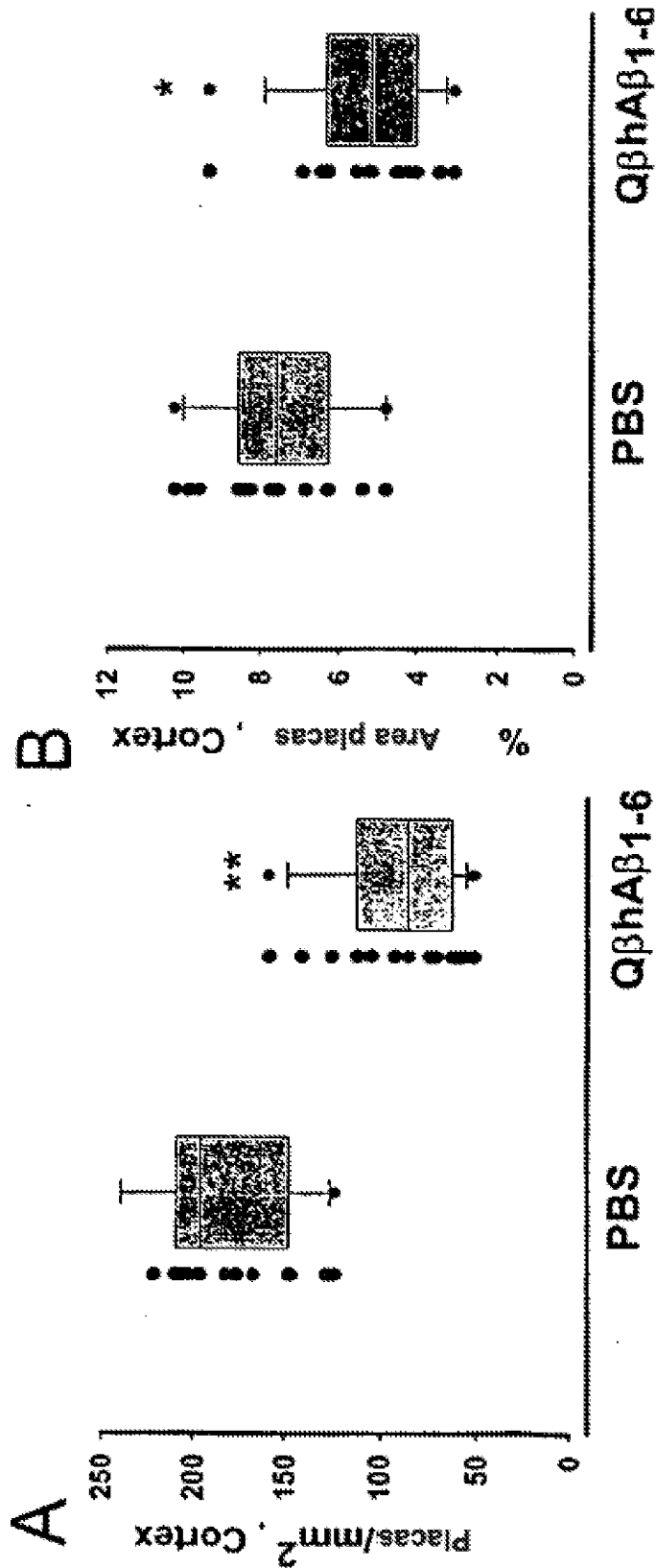


Fig. 13A

Fig. 13B

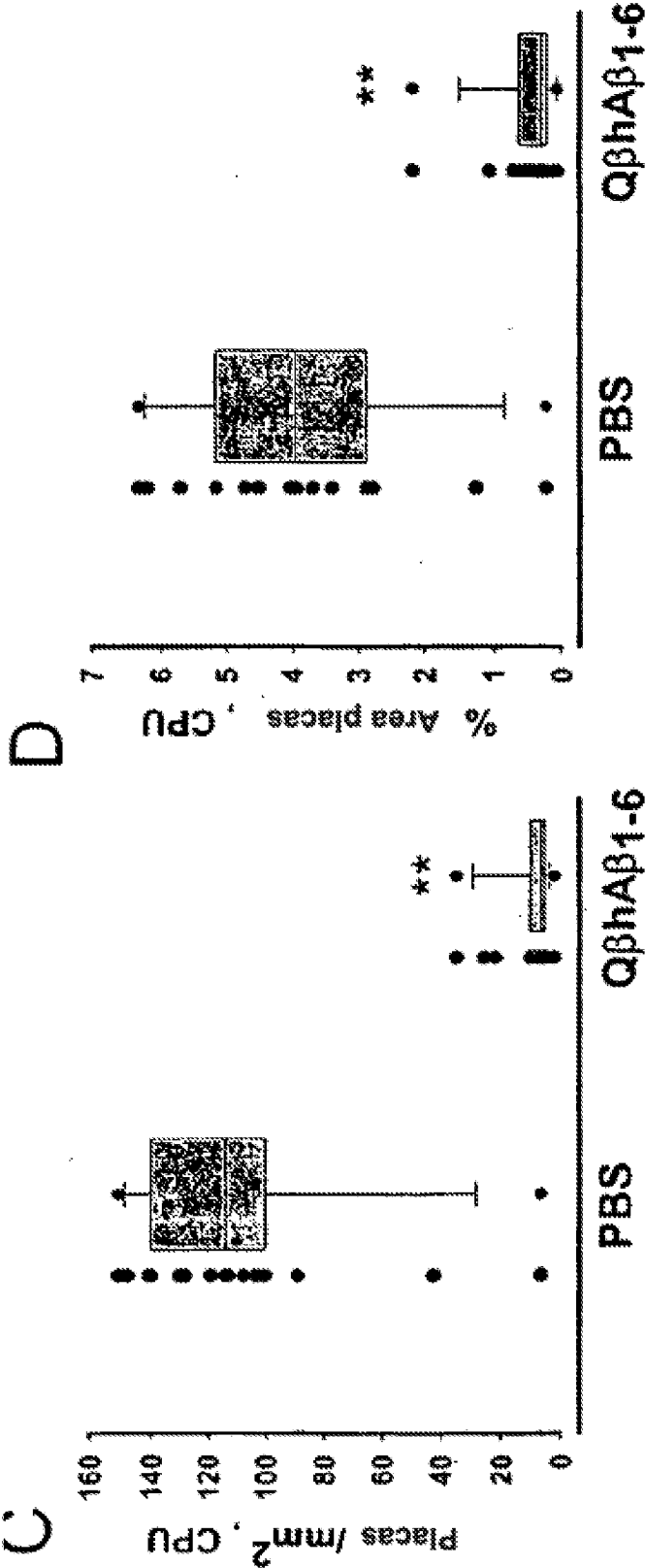


Fig. 13C

Fig. 13D

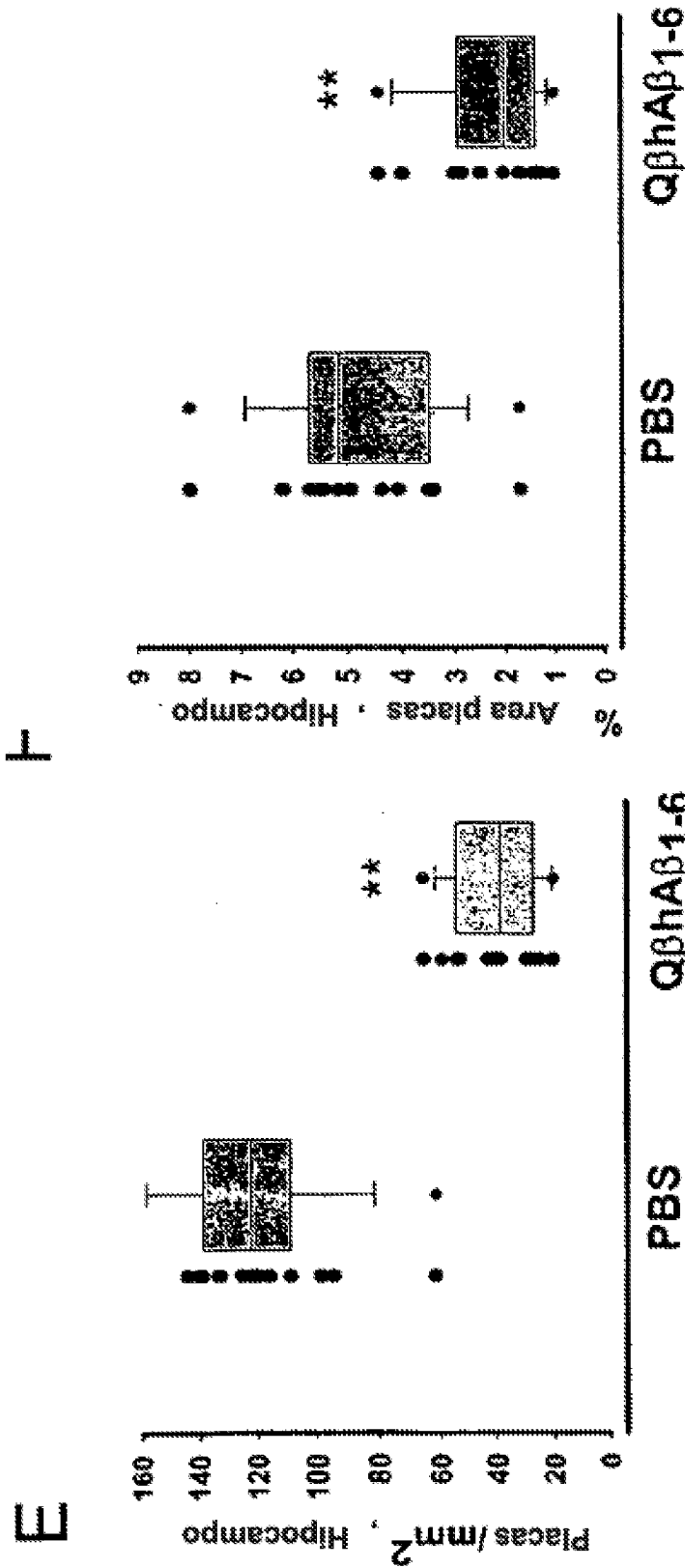


Fig. 13E

Fig. 13F

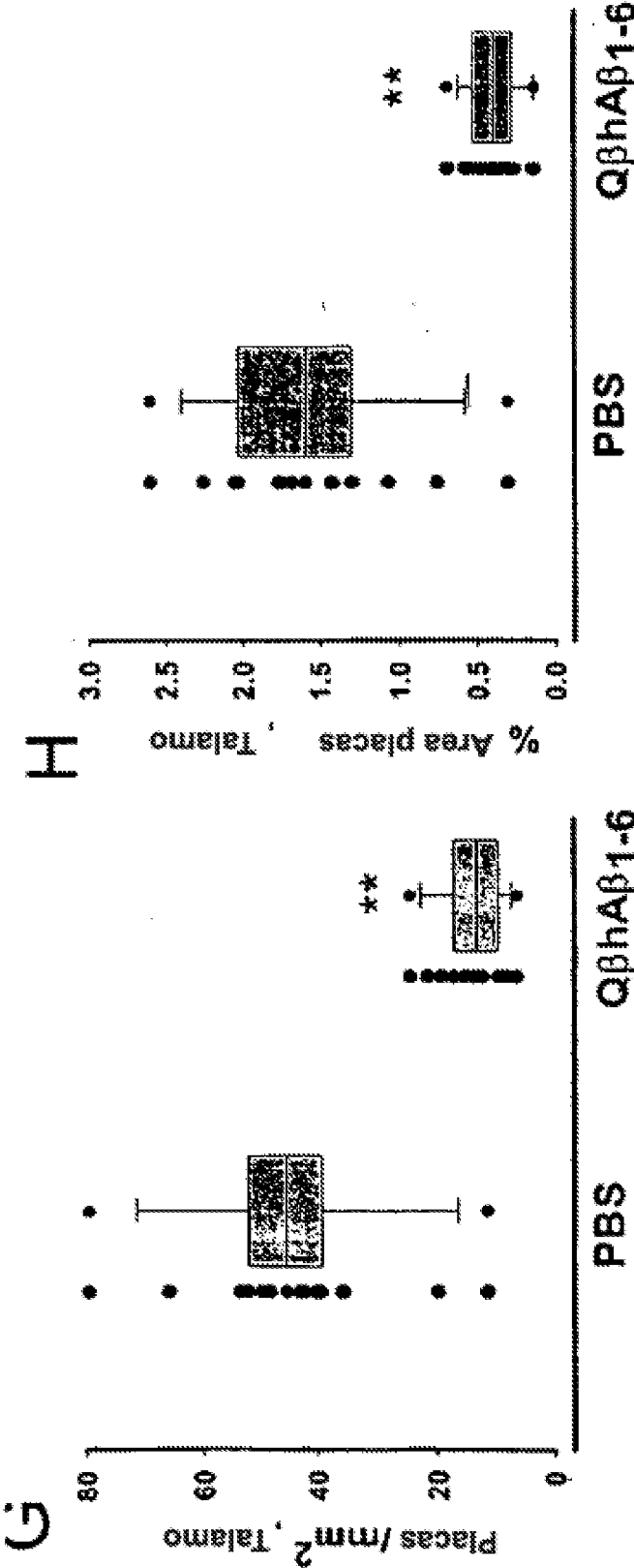


Fig. 13G

Fig. 13H

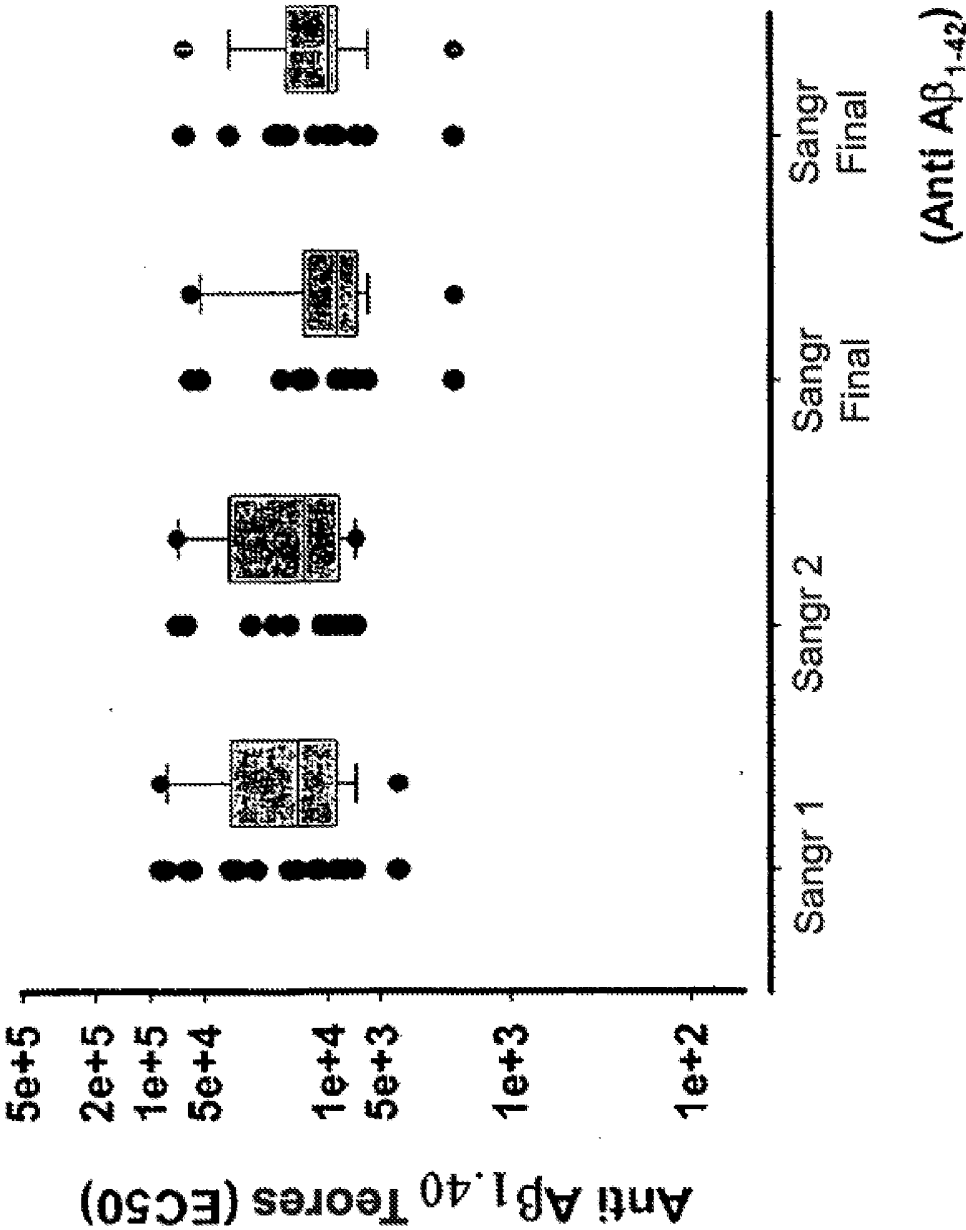


Fig. 14



Fig. 15A

Fig. 15B

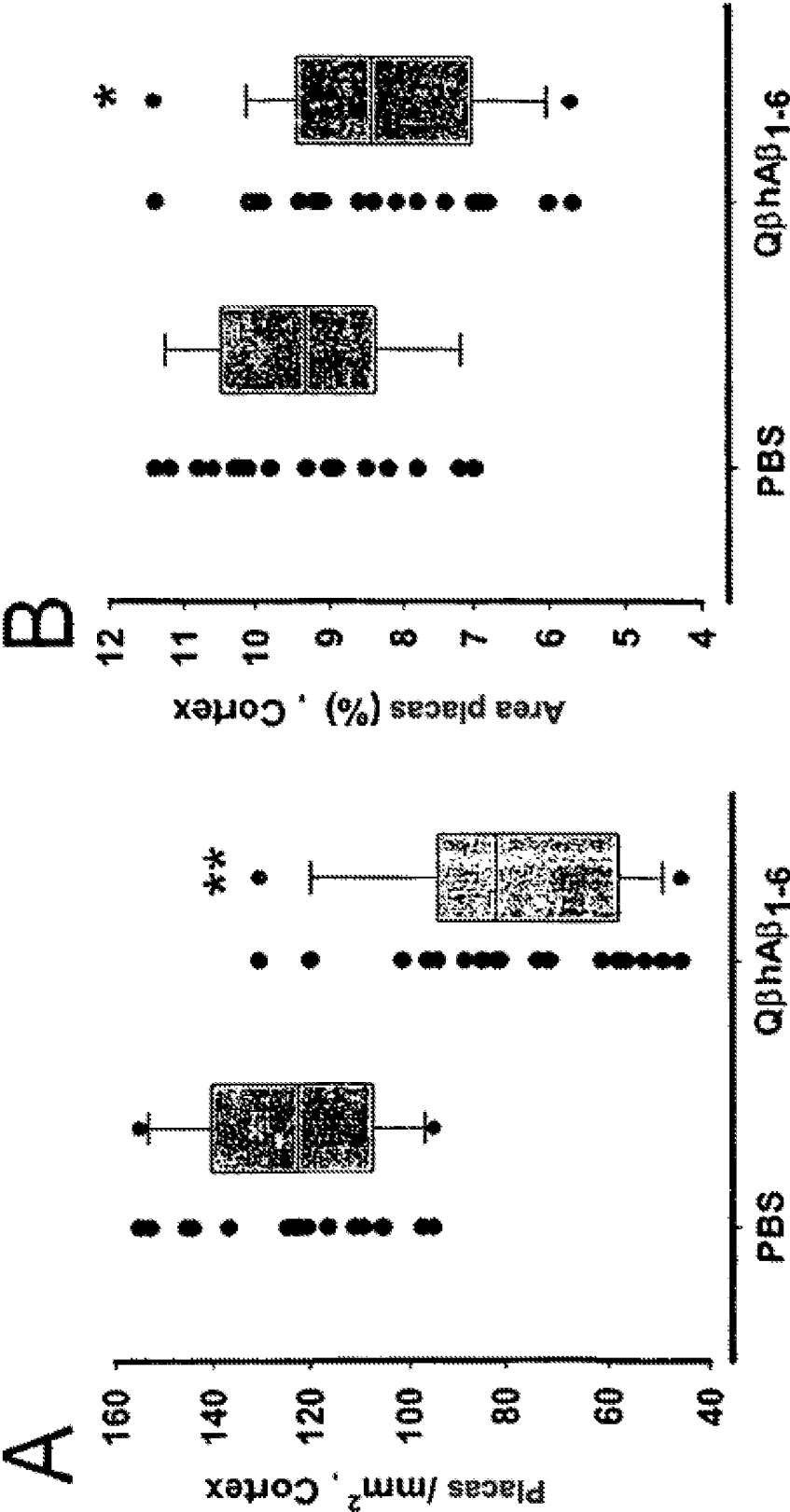


Fig. 16A

Fig. 16B

## REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

*Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.*

### Documentos de patentes citadas na Descrição

- EP 526511 A
- WO 9927344 A
- WO 9927949 A
- WO 0118189 A
- WO 0182284 A
- US 20030175290 A
- WO 0032227 A
- WO 02056905 A
- US 5057540 A
- GB 2220211 A
- WO 0003462 A
- US 5939598 A, Kuchertapati
- US 5580858 A, Feigner, P.
- US 4918166 A
- WO 0023955 A
- WO 9213081 A
- EP 677111 A
- EP 0677111 A
- WO 980364423 A
- US 60396639 B
- US 60470432 B

### Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- Selkoe, D. J. *Nature*, 1999, vol. 399, A23-31
- Rohrer, A. E. ; Palmer, K. C. ; Chau, V. ; Ball, M. J. *J. Cell Biol.*, 1988, vol. 107, 2703-2716
- Rohrer, A. E. ; Palmer, K. C. ; Yurewicz, E. C. ; Ball, M. J. ; Greenberg, B. D. *J. Neurochem.*, 1993, vol. 61, 1918-1928
- Johnson-Wood, K. et al. *Proc. Natl. Acad. USA*, vol. 94, 1550-1555
- Games, D. et al. *Nature*, 1995, vol. 373, 523-527
- Schenk, D. et al. *Nature*, 1999, vol. 400, 173-77
- Solomon B. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997
- Solomon B. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996
- Frenkel et al. *J. Neuroimmunol.*, 1998, vol. 88, 85-90
- Frenkel D. et al. *J. Neuroimmunol.*, 1999, vol. 95, 136-142
- Yankner et al. *Science*, 1989, vol. 245, 417-420
- Sigurdson et al. *Neurobiol. Aging*, 1996, vol. 17, 893-901
- Sigurdson et al. *Neurobiol. Aging*, 1997, vol. 18, 591-606
- Walsh et al. *Nature*, 2002, vol. 416, 535-539
- Bard, F. et al. *Nature Medicine*, 2000, vol. 6, 916-19
- Schenk, D. et al. *Nature*, 1999, vol. 400, 173-177
- Janus, C. et al. *Nature*, 2000, vol. 408, 979-982
- Morgan, D. et al. *Nature*, 2000, vol. 408, 982-985
- Nicoll, J.A. et al. *Nature Med.*, 2003, vol. 9, 448-452
- Orgogozo J.-M. et al. *Neurology*, 2003, vol. 61, 46-54
- Bachmann ; Zinkernagel. *Ann. Rev. Immunol.*, 1991, vol. 15, 235-270
- Bachmann ; Zinkernagel. *Immunol. Today*, 1996, vol. 17, 553-558
- Bachmann ; Zinkernagel. *Ann. Rev. Immunol.*, 1997, vol. 15, 235-270
- Fehr, T. et al. *J. Exp. Med.*, 1997, vol. 185, 1765-1792
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co, 1990
- Scott et al. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.*, 1985, vol. 77, 409
- Geysen et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 81, 3998-4002
- Kozlovskaya, T.M. et al. *Intervirology*, 1996, vol. 39, 9-15
- Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- Current Protocols in Molecular Biology. John H. Wiley & Sons, Inc, 1997
- Cell Biology. Academic Press, 1986
- Harlow, E. ; Lane, D. Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988
- Guide to Protein Purification. Deutscher, M.P. Meth. Enzymol. Academic Press, 1990, vol. 128
- Scopes, R.K. Protein Purification Principles and Practice. Springer-Verlag, 1994



- Bachmann, M.F. ; Zinkernagel, R.M. *Immunol. Today*, 1996, vol. 17, 553-558
- Watson, E. et al. *Glycobiology*, 1994, vol. 4, 227
- Zang, M. et al. *Bio/Technology*, 1995, vol. 13, 389
- Renner W. et al. *Biotech. Bioeng.*, 1995, vol. 4, 476
- Lee K. et al. *Biotech. Bioeng.*, 1995, vol. 50, 336
- MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY. John H. Wiley & Sons, Inc, 1997
- CELL BIOLOGY. Academic Press, 1998
- Freshney, R. CULTURE OF ANIMAL CELLS. Alan R. Liss, Inc.
- Kozlovskaya T.M. et al. *GENE*, 1993, vol. 137, 133-137
- Golmohammadi, R. et al. *Structure*, 1996, vol. 4, 543-554
- Stoll, E. et al. *J. Biol. Chem.*, 1977, vol. 252, 980-983 [0184]
- Kastelein, R.A. et al. *Gene*, 1983, vol. 23, 245-254
- Kozlovskaya, T.M. et al. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 1986, vol. 287, 452-455
- Adhin, M.R. et al. *Virology*, 1989, vol. 170, 238-242
- Ni, C.Z. et al. *Protein Sci.*, 1996, vol. 5, 2485-2493
- Priano, C. et al. *J. Mol. Biol.*, 1995, vol. 249, 283-297
- Witherell, G.W. ; Uhlenbeck, O.C. *Biochemistry*, 1989, vol. 28, 71-76
- Lim F. et al. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 31839-31845
- Klovins, J. et al. *J. Gen. Virol.*, 2002, vol. 83, 1523-33
- Kozlovskaya, T. M. et al. *Gene*, 1993, vol. 137, 133-37
- Golmohammadi, R. et al. *Structure*, 1996, vol. 4, 543-554
- Kozlovskaya, T. M. et al. *Intervirology*, 1996, vol. 39, 9-15
- Kozlovskaya et al. *Intervirology*, 1998, vol. 39, 9-15
- Smiley B.K. et al. *Gene*, 1993, vol. 134, 33-40
- Pushko P. et al. *Prot. Eng.*, 1993, vol. 6, 883-891
- Sturchler-Pierrat et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 13287-13292
- Hsiao, K. et al. *Science*, 1996, vol. 274, 99-102
- Chen, G. et al. *Nature*, 2000, vol. 408, 975-979
- Chapman, P.F. *Nature*, 2000, vol. 408, 915-918
- Kozlovskaya, T.M. et al. *Gene*, vol. 137, 133-137
- Kozlovskaya T.M. et al. *Gene*, 1993, vol. 137, 133-37
- Pushko, P. et al. *Prot. Eng.*, 1993, vol. 6, 883-91
- Chackerian, B. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, 2373-2378
- Kimbaurer, R. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, vol. 89, 12180-84
- Greenstone, H.L. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, vol. 95, 1800-05
- Sturchler-Pierrat et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 13287-13292
- Selkoe. *Annu. Rev. Neurosci.*, 1994, vol. 17, 489-517
- Sturchler-Pierrat et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, vol. 94, 13287-13292
- Calhoun et al. *Nature*, 1998, vol. 395, 755-758
- Phinney et al. *J. Neurosci.*, 1999, vol. 19, 8552-8559
- Bondolfi et al. *J. Neurosci.*, 2002, vol. 22, 515-522