



(12) PATENT

(19) NO

(11) 337574

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20050894	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2003.07.18 PCT/EP2003/07864
(22)	Inng.dag	2005.02.18	(85)	Videreføringsdag	2005.02.18
(24)	Løpedag	2003.07.18	(30)	Prioritet	2002.07.19, US, 396639 2003.05.15, US, 470432
(41)	Alm.tilgj	2005.04.12			
(45)	Meddelt	2016.05.09			
(73)	Innehaver	Cytos Biotechnology AG, Wagistrasse 21, CH-8952 SCHLIEREN, Sveits			
		Novartis Pharma AG, Lichtstrasse 35, CH-4002 BASEL, Sveits			
(72)	Oppfinner	Rainer Martin Lüönd, Felsplattenstrasse 33, CH-4106 THERWIL, Sveits			
		Peter Frey, Sulgenauweg 45, CH-3007 BERN, Sveits			
		Martin Bachmann, Goldackerweg 8, CH-8472 SEUZACH, Sveits			
		Alain Tissot, Segantinistrasse 35, CH-8049 ZÜRICH, Sveits			
		Rainer Ortmann, 3, Rue de l'amitié, FR-68600 SAINT LOUIS, Frankrike			
		Matthias Staufenberg, Müllerweg 7, DE-79541 LÖRRACH, Tyskland			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Vaksinesammensetninger inneholdende amyloide beta-1-6-antigenoppstillinger			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 2000032227 A2			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse angår fagområdet molekylær biologi, virologi, immunologi og medisin. Oppfinnelsen tilveiebringer en sammensetning omfattende en ordnet og repetitiv antigen- eller antigen-determinant-oppstilling, og nærmere bestemt en A(1-6-peptid-VLP-sammensetning. Mer spesifikt tilveiebringer oppfinnelsen en sammensetning omfattende en virusliknende partikkel, og minst ett A(1-6-peptid peptid bundet til denne. Oppfinnelsen tilveiebringer også en fremgangsmåte for produksjon av henholdsvis konjugater og de ordnete og repetitive oppstillingene. Oppfinnelsens sammensetninger er nyttige i produksjon av vaksiner for behandling av Alzheimers sykdom, og som farmasøytisk middel for å hindre eller kurere Alzheimers sykdom, og for effektiv indusering av immunresponser, nærmere bestemt antistoffresponser. Videre er oppfinnelsens sammensetninger spesielt nyttige for effektiv indusering av selvspesifikke immunresponser innenfor den angitte kontekst.

OPPFINNELSENS BAKGRUNN

Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse angår områdene av molekylærbiologi, virologi, immunologi og medisin. Oppfinnelsen tilveiebringer en sammensetning omfattende en ordnet og repetitiv antigen eller antigenbestemmende oppstilling, nærmere bestemt en A β 1-6 peptid-VLP-sammensetning. Mer spesifikt tilveiebringer oppfinnelsen en sammensetning omfattende en virusliknende partikkel fra en RNA bakteriofag og minst ett A β 1-6 peptid bundet dertil. Oppfinnelsen tilveiebringer også en fremgangsmåte for å produsere konjugatene og de respektive ordnete og repetitive oppstillingene. Sammensetningene ifølge oppfinnelsen er nyttige i produksjonen av vaksiner for behandling av Alzheimers sykdom og som farmasøytika for å hindre eller kurere Alzheimers sykdom og for effektiv indusering av immunresponser, nærmere antistoffresponser. Sammensetningene ifølge oppfinnelsen er videre spesielt nyttige for effektiv indusering av selvspesifikke immunresponser innenfor den angitte sammenheng.

Relatert kunnskap

Alzheimers sykdom (AD) er den mest alminnelige demensårsak blant eldre (65 år og eldre), og en alvorlig byrde for offentlig helse. Fire millioner mennesker er for eksempel rapportert å lide av sykdommen i USA. Forekomsten av sykdommen forventes å øke ettersom befolkningen eldes.

De viktigste patologiske tegn på Alzheimers sykdom er aldersrelaterte endringer i atferd, avleiring av β -amyloid til uløselig plakk, betegnet neurittplakk eller AD-plakk, neurofibrilleer sammenfiltring bestående av tau-protein i neuroner, og tap av neuroner i forhjernen. I tillegg til den sene starten av AD, som opptrer i eldre år (65 år og eldre), er det en tidlig begynnende AD, familiær AD (FAD) som forekommer mellom 35 og 60 års alderen. De patologiske abnormaliteter av AD er mer utbredt, kraftigere og opptrer tidligere i FAD enn i sent begynnende eller sporadisk AD. Mutasjoner i APP-genet, presenil-1- og presenil-2-genene har blitt korrelert med FAD.

Som angitt er en av nøkkelbegivenhetene i Alzheimers sykdom (AD) deponeringen av amyloid som uløselig fibros masse (amyloidogenese) som resulterer i ekstracellulære neurittplakkavleiringer på cerebrale blodårevegger (for gjennomgang se Selkoe, D. J. (1999) Nature, 399, A23-31). Den viktigste bestanddelen av neurittplakk og kongofil angiopati er amyloid β (A β), selv om disse avleiringene også inneholder andre proteiner som glykosaminoglykaner og apolipoproteiner. A13 er proteolytisk kløvet fra et mye storm glykoprotein kjent som amyloid forløperprotein (APP), som omfatter isoformer av 695-770 aminosyrer med en enkel hydrofob transmembranregion. A β danner en gruppe peptider opptil 43 aminosyrer i lengde som viser betydelige amino- og karboksyterminal

heterogenitet (avkortning) så vel som modifikasjoner (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., & Greeberg, B. D. (1993) *J. Neurochem.* 61, 1916-1926). Fremtredende isoformer er A β 1-40 og 1-42. Det har en stor tilbøyelighet til å danne β -flater som aggregerer til fibriller som tilslutt leder til amyloid.

A β -peptid har en sentral rolle i neuropatologi av Alzheimers sykdom.

Regionspesifikk ekstracellulær akkumulering av A β -peptid er ledsaget av mikrogliose, cytoskeletale endringer, dystrof neuritt og synaptisk tap. Disse patologiske endringer er antatt å være forbundet med den kognitive reduksjon som definerer sykdommen.

Tilførsel av amyloid β -protein eller spesielt A β 1-28 i mengder opptil 10^{-2} mg/dose i fravær av enhver adjuvans og uten noen forbindelse av amyloid β -protein eller A β 1-28 til en bærer, for behandling av Alzheimers sykdom, er beskrevet i EP 526 511.

Andre har benyttet tilførsel av A-peptider i kombinasjon med adjuvanser for å indusere en immunrespons, cellulær eller humoral, mot A β 1-42. I en transgen musemodell for Alzheimers sykdom overuttrykker dyr humant amyloidforløperprotein inneholdende mutasjonen APP(717)V-F (PDAPP-mus; Johnson-Wood, K. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 94:1550-1555, Games D. *et al.*, *Nature* 373:523-527 (1995a)), som fører til overproduksjon av A β 1-42, utvikling av plakker, dystrof neuritt, tap av presynaptiske terminaler, astrocytose og mikrogliose. I en nylig studie rapporterer Schenk, D. *et al.*, (*Nature* 400:173-177 (1999) og WO 99/27944) at tilførsel av aggregert A β 1-42 blandet med en sterk adjuvans (CFA/IFA), som ikke kan benyttes i mennesker, i de første fire immuniseringene, fulgt av tilførsel av aggregert A β 1-42 i PBS i de påfølgende immuniseringer til 6 uker gamle PDAPP-mus, vesentlig hindret plakkdannelse og assosiert dystrof neuritt. De samme forfatterne rapporterte at immunisering av eldre mus (11 måneder gamle), ved anvendelse av den samme strategien, markert reduserte omfanget og utviklingen av Alzheimers sykdom (AD)- liknende neuropatologier. Prolifisering av splenocytter fra mus immunisert ved anvendelse av den ovennevnte strategien ble rapportert i eksempel III (Screen for terapeutisk effektivitet mot etablert AD) av WO 99/27944, som viser at A β 1-42 spesifikk T-celler ble induert ved vaksineringsprosedyren. Kobling av A β -fragmenter til sau anti-muse-IgG, og immunisering av nevnte koblede fragment i nærvær av CFA/IFA-adjuvans er rapportert i WO 99/27944. Anvendelse av sammensetninger omfattende A β -fragmenter koblet til polypeptider som difteritoksin for å fremme en immunrespons mot A β er også beskrevet i WO 99/27944. Ingen immuniseringsdata er imidlertid oppgitt.

Et monoklonalt antistoff som gjenkjenner en epitop ved den N-terminale ende (1-16) av A β (antistoff 6C6) har vist å beskytte PC-12-celler fra neurotoksisitet av fibrillært β -amyloid, og å oppløse β -amyloid *in vitro* (Solomon B. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA

(1997)). Et monoklonalt antistoff reist mot A β 1-28, viste også undertrykkelse av β -amyloid aggregering *in vitro* (Solomon B. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1996)). Frenkel *et al.*, (J. Neuroimmunol. 88:85-90 (1998)) har senere identifisert epitopen med to anti-aggregerende antistoffer, 10D5 og 6C6, som er epitopen betegnet "EFRH", dvs. A β 3-6. Som kontrast var et antistoff spesifikt for A β 1-7 ikke i stand til å hindre β -amyloid aggregering (Frenkel D. *et al.*, J. Neuroimmunol. 95:136-142 (1999)).

A β 1-42 er fibrillogent og selvfølgelig anvendte vaksinesammensetningen beskrevet i WO 99/27944, A β 1-42 behandlet på en slik måte at det kan danne aggregater. Det er vist at disse fibrillene er toksiske for neuronale cellekulturer (Yanker *et al.*, *Science* 245:417-420 (1989)), og at toksisk effekt også observeres når den injiseres i dyrehjerner (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)) rapporterer at naturlige oligomerer av A β dannes innen intracellulære vesikler. Disse oligomerer inhiberer langtidsvirkning i rotter *in vivo* og ødelegger synaptisk plastisitet i konsentrasjoner funnet i human hjerne og cerebrospinalvæske.

I en annen studie rapporterte Bard F. *et al.*, (*Nature Medicine* 6:916-19 (2000)) at perifer administrasjon av antistoffer reist mot A β 1-42 var i stand til å redusere amyloid byrde, til tross for relativt moderate serumnivåer. Denne studie benyttet enten polyklonale antistoffer reist mot A β 1-42 eller monoklonale antistoffer reist mot syntetiske fragmenter avledet fra ulike regioner av A β . Induksjon av antistoffer mot A β -peptider vitner således om en lovende potensiell terapeutisk behandling av Alzheimers sykdom.

Mukosal administrering av et antigen assosiert med β -amyloid plakk, som β -amyloid peptid og A β 1-40, beskrives i WO 99/27949. Mukosal administrering er sagt å undertrykke enkelte cytokinresponser assosiert med Alzheimers sykdom, og til å forsterke enkelte andre cytokinresponser assosiert med undertrykkelse av inflammasjonsresponser forbundet med sykdommen. Det er antatt at undertrykkelse av de inflammatoriske responsene er iverksatt av "utløsning av T-celler, karakterisert ved en anti-inflammatorisk cytokin profil". Egnete antigener som er beskrevet i WO 99/27949 inkluderer antigener som er spesifikke for AD, og som gjenkjennes av immune T-celler i en human vert eller dyrevert.

Epitopfusjon av et monoklonalt antistoff som gjenkjenner A β til kappeproteiner av filamentøse fag beskrives i WO 01/18169. Immunisering av mus med de filamentøse fagene som fremviser 15-mer epitopen VHEPHEFRHVALNPV (SEQ ID NO: 89) på kappeproteinet VIII, resulterte i antistoffer som gjenkjenner A β 1-16 og A β 1-40. Dette ble demonstrert i en inhibisjons-ELISA ved anvendelse av A β peptider, og en IC⁵⁰ på 1 μ M ble funnet for inhibering av bindingen av sera til A β 1-16 med A β 1-40. Solomon (WO 01/18169) gir

imidlertid ingen indikasjon på at sera utløst mot de filamentøse fagene bærer VHEPHEFRHVALNPV-epitopen (SEQ ID NO: 89), binder til amyloid plakk eller til neurittplakk fra AD.

Det er mange ulemper ved å anvende avvikende sekvenser fra antigenet som en immunrespons skal utløses mot. Først induseres antistoffer mot del av sekvensen som er fremmed for antigenet eller den antigeniske determinanten. For det andre kan antigenet i konformasjonskonteksten i det flankerende fremmede sekvenselementet være ulikt det i konteksten til fullengdeantigenet. Selv om antigener som kryssreagerer med antigenet således kan utløses, kan deres binding til antigenet være suboptimal. Den fine spesifisiteten av disse utløste antistoffene behøver ikke korrespondere med de utløste antistoffenes spesifisitet mot antigenet i seg selv, da ytterligere sidekjeder som er ulike residuene til stede på fullengde A β , er til stede i epitopen. Til slutt kan en 15-mer aminosyresekvens inneholde T-celleepitoper. Fremvisning av epitopen YYEFRH (SEQ ID NO: 90) på protein III av filamentøs fagkappe, hvor 3-5 kopier vanligvis bare er til stede på hver fag, er også beskrevet i WO 01/18169. Flere problemer oppstår når infeksiose fag som bærer for immunisering anvendes. For det første er produksjon av infeksiose midler i stor skala og i tilstrekkelig mengde for immuniseringskampanje problematisk. For det andre er tilstedeværelsen av DNA i faginnholdende antibiotikaresistente gener i vaksine ikke uproblematisk og er et spørsmål om sikkerhet. Og så er muligheten og effektiviteten av stråling av store mengder fag i tilfeller der ikke-infeksiose fag anvendes som vaksine uløst.

A β -analoger hvor A β er modifisert til å inkludere T-hjelperepitoper beskrives i WO 01/62284. Immunisering av TgRND8+mus, transgene for humant APP med A β -analogen resulterte i 4 til 7,5 ganger høyere antistofftiter over immunisering med A β 1-42 i fravær av adjuvans.

Nyere studier har demonstrert at en vaksinasjonsindusert reduksjon i hjerneamyloide avsetninger har potensiale til å forbedre kognitiv funksjon (Schenk, D. *et al. Nature* 400:173-177 (1999); Janus, C. *et al. Nature* 408:979-982 (2000); Morgan, 35 D. *et al. Nature* 408:982-985 (2000)).

Autopsi av pasient immunisert med aggregert A β 1-42 i adjuvans QS21 har vist nærvær av en T-lymfocytt meningoencefalitt og infiltrering av cerebral, hvit materie av makrofager (Nicoll, J. A. *et al. Nature Med.* 9:448-452 (2003)).

Nylig har en publikasjon rapportert 18 tilfeller av meningoencefalitt hos pasienter immunisert med AN1792, en vaksine sammensatt av aggregert A β 1-42 og QS21 som adjuvans (Orgogozo, J. M. *et al. Neurology* 61:46-54 (2003)). Tcelleaktivering er rapportert som en potensiell mekanisme som er ansvarlig for sykdommen, mens det ikke var noe relasjon mellom sykdom og anti-A β 1-42 titre i serumet.

Det er veletablert at tilførsel av rensede proteiner alene vanligvis ikke er

tilstrekkelig for å utløse en sterk immunrespons; generelt må isolert antigen gis sammen med hjelpesubstanser kalt adjuvanser. Innenfor disse adjuvansene er det tilførte antigen beskyttet mot rask degradering og adjuvansen gir en forlenget frigjøring av et lavt antigennivå. I følge foreliggende oppfinnelse er A β -peptider konstruert immunogene gjennom binding til en VLP og krever ikke en adjuvans.

En måte for å bedre effektiviteten av vaksinasjon er derfor å øke graden av det anvendte gens repeterbarhet. I motsetning til isolerte proteiner induserer virus hurtig og effektivt immunresponsen i fravær av enhver adjuvans, både med og uten T-celle hjelp (Bachmann og Zinkernagel, *Ann. Rev. Immunol.* 15:235-270 (1991)). Selv om virus ofte består av færre proteiner, er de i stand til å utløse mye sterkere immunrespons enn deres isolerte komponenter. For B-celleresponser er det kjent at en kritisk faktor for immunogenisiteten av virus er evnen til å repetere og rekken av overflate epitoper. Mange virus fremviser en kvasikrystallinsk overflate og en regelmessig oppstilling av epitoper som effektivt kryssbinder epitopspesifikke immunglobuliner på B-celler (Bachmann og Zinkernagel, *Immunol. Today* 17:553-558 (1996)). Denne kryssbindingen av overflateimmunglobuliner på B-celler er et sterkt aktiveringssignal som direkte induserer cellesyklusprogresjon og produksjon av IgM-antistoffer. Slike utløste B-celler er videre i stand til å aktivere T-hjelperceller, som i sin tur induserer en endring fra IgM- til IgG-antistoffproduksjon i B-celler, og generering av lengelevende B-cellehukommelse - som er målet for en hver vaksinasjon (Bachmann og Zinkernagel, *Ann. Rev. Immunol.* 15:235-270 (1997)). Viral struktur er også forbundet til genereringen av anti-antistoffer i autoimmun sykdom, og som en del av den naturlige respons til patogener (se Fehr, T., *et al. J. Exp. Med.* 185:1785-1792 (1997)). Antistoffer som er til stede ved en sterk organisert, viral overflate er således i stand til å indusere sterke anti-stoff responser.

Som angitt svikter imidlertid immunsystemet vanligvis å produsere antistoffer mot selvavledete strukturer. For løselige antigener som er til stede ved lave konsentrasjoner er dette pga. toleranse på Th-cellenivå. Under disse forhold kan kobling av selv-antigenet til en bærer som kan levere T-hjelp, bryte toleransen. For løselige proteiner til stede ved høye konsentrasjoner eller ved membranproteiner ved lave konsentrasjoner, kan B- og Th-celler være tolerante. B-celletoleranse kan være reversibel (anergi) og kan brytes ved tilførsel av antigenet på en sterkt organisert måte tilkoblet en fremmed bærer (Bachmann og Zinkernagel, *Ann. Rev. Immunol.* 15:235-270 (1997)). Som vist i US2003/0175290 innlevert 18. januar 2002, kan sterke immunresponser induseres ved sammensetninger omfattende A β - peptider (A β 1-15, A β 1-27 og A β 33-42, som er et selv-antigen i mus) bundet til en VLP. De ovennevnte humane A β -peptidene bundet til VLP av RNA-fag Q β induserte spesielt høye A β -spesifikke titere i humant APP transgene mus (beskrevet i eksempel), som demonstrerer at toleranse til selv-antigenet A β kan overvinnes ved immunisering med A β -peptider

bundet til et VLP.

Sammensetninger omfattende en kjernepartikkel, slik som et virus eller en virusliknende partikkel, hvortil minst ett antigen eller én antigenisk determinant er assosiert med minst én ikke-peptidbinding som fører til en repetitiv antigenoppstilling er beskrevet i WO 00/32227. Disse sammensetningene er nyttige ved fremstilling av vaksiner for å forebygge infeksjøs sykdommer, behandling av allergier og behandling av kreft.

Det er således et behov for henholdsvis sammensetninger og vaksiner av høy immunogen sikkerhet for behandling av Alzheimers sykdom, spesielt ved anvendelse av immunogener fri for T-celleepitoper og adjuvanter, som kan utløse bieffekter og fortsatt være i stand til å indusere høye antistoff-titers, hvor antistoffene videre er i stand til å binde til amyloid plakk.

KORT OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Vi har nå funnet at A β 1-6-peptid som er bundet til en kjernepartikkel og som har en struktur med en naturlig repetitiv organisering, og herved spesielt til virusliknende partikler (VLP) og undergrupper av VLP, fører til høyt ordnede og repetitive konjugater som representerer et potent immunogen for induksjon av antistoffer som er spesifikke for A β 1-6. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer derfor et profylaktisk og terapeutisk middel for behandling av Alzheimers sykdom, som er basert på en ordnet og repetitiv A β 1-6-kjernepartikkeloppstilling, og spesielt på henholdsvis et VLP-A β 1-6-peptidkonjugat og -oppstilling. Dette profylaktiske og terapeutiske middel er i stand til å indusere høye titers av anti-A β -6-peptid antistoffer, som er kryssreaktive til løselig A β , og er i stand til å binde til humant amyloid plakk fra human APP transgen musmodell og til AD-amyloid plakk. De utløste antistoffer binder ikke til APP på hjernesnitt.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre nye sammensetninger, vaksiner og fremgangsmåter for behandling av AD. Sammensetningene og vaksinene som omfatter A β 1-6-peptider er fri for T-celleepitoper og induserer antistoffer som binder AD-plakk og løselig A β . A β 1-6-peptidene presenteres for pasientens immunsystem på en sterkt repetitiv og ordnet måte gjennom binding av A β -peptidene eller til en kjernepartikkel, fortrinnsvis til en VLP, og enda mer foretrukket til en VLP fra en RNA-fag.

I en foretrukket utførelsesform er antigenet eller den antigeniske determinant det humane amyloide P-peptid A β 1-6 (DAEFRH; SEQ ID NO: 75), som er et fragment av A β (DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 91), hvori det humane amyloide β -peptidet A β 1-6 er bundet til henholdsvis kjernepartikkelen og VLP. Det amyloide β -protein tilveiebringes i SEQ ID NO: 92. Det amyloide β -forløperprotein er gitt i SEQ ID NO: 93.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer på denne måten en sammensetning omfattende: (a) en kjernepartikkel med minst ett første tilkoblingssete der nevnte kjernepartikkel er en virusliknende partikkel fra en RNA-bakteriofag; og (b) minst ett antigen eller antigenisk determinant med minst ett andre tilkoblingssete, der nevnte antigen eller antigeniske determinant er et A β 1-6-peptid, og hvori nevnte andre tilkoblingssete er valgt fra gruppen bestående av (i) et tilkoblingssete som ikke er naturlig forekommende i nevnte antigen eller antigeniske determinant; og (ii) et tilkoblingssete som er naturlig forekommende i nevnte antigen eller antigeniske determinant, hvori nevnte andre tilkoblingssete er i stand til å assosiere til nevnte første tilkoblingssete gjennom minst én ikke-peptidbinding; og hvori nevnte antigen eller antigeniske determinant og nevnte kjernepartikkel interagerer gjennom nevnte assosiasjon for å danne en ordnet og repetitiv antigenoppstilling.

A β -fragmentene ifølge foreliggende oppfinnelse er løselige og danner generelt ikke aggregater. Videre er de bundet, og fortrinnsvis kovalent bundet til henholdsvis en kjernepartikkel og VLP. Sammensetningene ifølge oppfinnelsen gir derfor ingen risiko for å indusere toksiske effekter slik som å så amyloid avsetning.

Det er et uventet funn i denne oppfinnelsen at et høy titer av antistoffer som er kryssreaktive med løselige A β - og amyloid plakk, kan oppnås med en sammensetning omfattende A β 1-6-peptidet bundet til henholdsvis en kjernepartikkel og VLP. Spesielt har VLP vist å formidle induksjon av antistoffer mot selv-antigener, som således bryter selv-toleranse (WO 02/056905). Den lille størrelsen av denne epitopen utelukker videre nærvær av T-cellepitoper, som således gir nye sammensetninger som ikke induserer A β spesifikke T-celleresponser. I tillegg binder ikke de utløste antistoffer til APP på hjernesnitt. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer således en sikker vaksinesammensetning for forebygging og behandling av AD.

Mer spesifikt tilveiebringer oppfinnelsen en sammensetning omfattende en ordnet og repetitiv antigen eller antigenisk determinant oppstilling, og herved nærmere bestemt A β 1-6-peptid-VLP-konjugater. Mer spesifikt tilveiebringer oppfinnelsen en sammensetning omfattende en virusliknende partikkel fra en RNA-bakteriofag og minst et A β 1-6-peptid bundet dertil. Oppfinnelsen tilveiebringer også en fremgangsmåte for produksjon av konjugatene og de ordnete og repetitive oppstillingene. Sammensetningene av oppfinnelsen er nyttige i vaksineproduksjon for behandlingen av Alzheimers sykdom, og som en farmasøytisk sammensetning for å hindre eller kurere Alzheimers sykdom og for effektivt å indusere immunresponser, spesielt antistoffresponser. Sammensetningene ifølge oppfinnelsen er spesielt nyttige for effektivt å indusere selv-spesifikke immunresponser i den angitte sammenhengen.

Ifølge foreliggende oppfinnelse er et A β 1-6 peptid bundet til henholdsvis en kjernepartikkel og VLP, vanligvis på en orientert måte som gir en ordnet og repetitiv A β 1-6-peptid antigenoppstilling. Den sterkt repetitive og organiserte struktur av

kjernepartiklene og VLP'ene formidler fremvisningen av A β -peptidet på en meget ordnet og repetitiv måte som fører til en meget organisert og repetitiv antigenoppstilling.

Binding av A β 1-6-peptidet til henholdsvis kjernepartikkelen og VLP, tilveiebringer videre T-hjelpercelleepitoper da kjernepartikkelen og VLP er fremmed for verten som er immunisert med henholdsvis kjernepartikkel-A β 1-6- peptidoppstillingen og VLP-A β 1-6-peptidoppstillingen. Disse oppstillingene er forskjellige fra tidligere konjugater i fagfeltet, nærmere bestemt i deres meget organiserte struktur, dimensjoner og antigenets repeterbarhet på oppstillingens overflate.

I et aspekt ifølge oppfinnelsen er A β 1-6-peptidet kjemisk syntetisert, mens henholdsvis kjernepartikkelen og VLP er uttrykket og rensset fra en ekspresjonsvert som er egnet for folding og samling av henholdsvis kjernepartikkelen og VLP'en. A β 1-6-peptidoppstillingen samles så ved binding A β 1-6-peptidet til henholdsvis kjernepartikkelen og VLP'en.

I et annet aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en sammensetning omfattende (a) en virusliknende partikkel fra en RNA-bakteriofag, og (b) minst ett antigen eller en antigendeterminant, hvor nevnte antigen eller antigendeterminant er et A β 1-6-peptid, og hvor nevnte minst ene antigen eller antigendeterminant er bundet til nevnte virusliknende partikkel.

I et videre aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en farmasøytisk sammensetning omfattende (a) den foreliggende sammensetning, og (b) en farmasøytisk akseptabel bærer.

I enda et ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en vaksinesammensetning omfattende en sammensetning omfattende (a) en virusliknende partikkel fra en RNA-bakteriofag; og (b) minst ett antigen eller en antigendeterminant, hvor nevnte antigen eller antigendeterminant er et A β 1-6-peptid; og hvor nevnte minst ene antigen eller antigendeterminant er bundet til nevnte virusliknende partikkel.

I et annet aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for immunisering, omfattende tilførsel av den oppfunnete sammensetning, den oppfunnete farmasøyfiske sammensetning eller den oppfunnete vaksine til et dyr.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende beskrivelse en fremgangsmåte for produksjon av en oppfunnet sammensetning omfattende (a) å tilveiebringe en virusliknende partikkel fra en RNA-bakteriofag; og (b) å tilveiebringe minst ett antigen eller antigendeterminant der nevnte antigen eller antigendeterminant er A β 1-6-peptid; (c) å kombinere nevnte virusliknende partikkel og nevnte minst ene antigen eller antigendeterminant slik at nevnte minst ene antigen eller antigendeterminant er bundet til nevnte virusliknende partikkel.

Analogt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for produksjon

av en sammensetning ifølge krav 1, omfattende: (a) å tilveiebringe en kjernepartikkel med minst ett første tilkoblingssete der nevnte kjernepartikkel er en virusliknende partikkel fra en RNA-bakteriofag; (b) å tilveiebringe minst ett antigen eller antigeneterminant med minst ett andre tilkoblingssete, der nevnte antigen eller antigeneterminant er et A β 1-6-peptid, og hvor nevnte andre tilkoblingssete er valgt fra gruppen bestående av (i) et tilkoblingssete som ikke er naturlig forekommende med nevnte antigen eller antigeneterminant; og (ii) et tilkoblingssete som er naturlig forekommende med nevnte antigen eller antigeneterminant; og hvor nevnte andre tilkoblingssete er i stand til å assosiere til nevnte første tilkoblingssete gjennom minst én ikke-peptidbinding; og (c) å kombinere nevnte kjernepartikkel og nevnte minst ene antigen eller antigeneterminant, hvor nevnte antigen eller antigeneterminant og nevnte kjernepartikkel interagerer gjennom nevnte assosiasjon til å danne en ordnet og repetitiv antigenoppstilling.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en anvendelse av en sammensetning ifølge krav 1 for fremstilling av et medikament for behandling av Alzheimers sykdom.

I et videre aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en anvendelse av en sammensetning ifølge krav 1 for fremstilling av et medikament for den profylaktiske eller terapeutiske behandlingen av Alzheimers sykdom. Videre i et ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en anvendelse av en sammensetning ifølge krav 1, enten alene eller i kombinasjon med andre midler, eller med eksplisitt fravær av spesifikke substanser, slik som adjuvanter, for fremstilling av en sammensetning, farmasøytisk sammensetning, vaksine, legemiddel eller medikament for terapi eller profylakse av Alzheimers sykdom og/eller for stimulering av det mammalske immunsystemet.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer derfor nærmere bestemt vaksinesammensetninger egnede for å forebygge og/eller svekke Alzheimers sykdom eller tilstander relatert dertil. Oppfinnelsen tilveiebringer videre fremgangsmåter for henholdsvis immunisering og vaksinasjon, for å forebygge og/eller svekke Alzheimers sykdom eller tilstander relatert dertil hos mennesker. Sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan benyttes profylaktisk eller terapeutisk. I spesifikke utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for å forebygge og/eller svekke Alzheimers sykdom eller tilstander relatert dertil, som er forårsaket eller forverret ved "selv" genprodukter, dvs. "selv antigener" som anvendt heri. I relaterte utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for å inducere immunologiske responser hos henholdsvis dyr og individer, som fører til produksjon av antistoffer som hindrer og/eller svekker Alzheimers sykdom eller tilstander relatert dertil, som er forårsaket av eller forverret ved "selv" genprodukter.

Som det vil forstås av en med ordinær dyktighet i fagfeltet, når sammensetninger ifølge oppfinnelsen administreres til dyr eller menneske, kan de være i en sammensetning

inneholdende salter, buffere, adjuvanser eller andre substanser som er ønskelige for å bedre sammensetningenes effektivitet. Eksempler på materialer egnet for anvendelse i fremstilling av farmasøytiske sammensetninger tilveiebringes i mange kilder, inkludert *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Osol, A. red., Mack Publishing Co. (1990)).

5 Sammensetninger ifølge oppfinnelsen er sagt å Være "farmakologisk akseptable" dersom deres administrasjon tolereres av et mottakende individ. Videre administreres oppfinnelsens sammensetninger i en "terapeutisk effektiv mengde" (dvs. en mengde som produserer en ønsket fysiologisk effekt).

10 Sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse kan administreres ved ulike fremgangsmåter kjent i fagfeltet, men administreres normalt ved injeksjon, infusjon, inhalering, oral administrering eller andre egnede fysiske fremgangsmåter. Sammensetningene kan alternativt administreres intramuskulært, intravenøst eller subkutant. Komponenter for sammensetninger for administrasjon inkluderer sterile vandige (for eksempel fysiologisk saltoppløsning) eller ikke-vandige løsninger og suspensjoner.

15 Eksempler på ikke-vandige løsningsmidler er propylenglykol, polyetylen glykol, vegetabiliske oljer som olivenolje, og injiserbare organiske estere som etyloleat. Bærere eller tilsluttende påkledninger kan benyttes for å øke hudpermeabilitet og forsterke antigenabsorpsjon.

20 Andre utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse vil være tydelige for en med ordinær dyktighet i lys av hva som er kjent innen fagfeltet, de påfølgende figurene og beskrivelsen av oppfinnelsen og kravene.

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

25 **Figur 1** avbilder SDS-PAGE gel, kjørt under reduserende forhold, som viser resultatet av koblingen av A β 1-6-peptidet (NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂) (SEQ ID NO: 77) til VLP av Q β -kappeproteinet.

Figur 2 viser ELISA-analysen av de spesifikke antistoffene for A β 1-6 i serum fra mus immunisert med A β -6-peptid koblet til VLP fra Q β -kappeproteinet.

30 **Figur 3** viser ELISA-analysen av de spesifikke antistoffene for A β 1-40 i serum fra mus immunisert med A β 1-6-peptid koblet til VLP fra Q β -kappeproteinet.

Figur 4 A-B viser et hjernesnitt fra en APP23-mus (A) og et entorhinalt cortexsnitt fra en AD-pasient (B) farget med serum fra mus immunisert med A β 1-6-peptid koblet til VLP av Q β -kappeproteinet.

35 **Figur 5 A-E** viser hjernesnitt fra en APP23-mus farget med serum fra mus immunisert med A β 1-6-peptid koblet til VLP fra Q β -kappeproteinet, eller med et polyklonalt kanin antiserum spesifikt for den C-terminale ende av human- eller muse-APP.

Figur 6 viser resultatet av immuniseringen av rhesus-aper med humant A β 1-6 koblet til Q β -VLP som målt i en ELISA-analyse.

Figur 7 viser resultat av bindingen til plakkk fra serum fra aper immunisert med human A β 1-6 koblet til Q β -VLP, som målt ved histologi på plakkk fra human AD og transgene mus.

Figur 8 avbilder SDS-PAGE-analysen av koblingen av murint A β 1-6 til AP205.

Figur 9 viser resultatet av immuniseringen av mus med murint A β 1-6 koblet til AP205 som målt i en ELISA-analyse.

Figur 10 viser analysen ved ELISA av anti-A β 40-titere og anti-A β 42 titere i serum fra "Swedish/London" transgene mus mellom 9,5 og 19 måneder gamle, immunisert med Q β hA β 1-6.

Figur 11 viser den immunhistokjemiske farging av hjernesnitt av "Swedish/London" transgene mus immunisert med Q β hA β 1-6 eller PBS.

Figur 12 viser kvantifiseringen av plakkkavsetning i "Swedish/London" transgene mus mellom 9,5 og 19 måneder gamle, immunisert med Q β hA β 1-6, Q β eller PBS.

Figur 13 viser kvantifiseringen av plakkkavsetning i "Swedish/London" transgene mus mellom 13,5 og 19 måneder gamle, immunisert med Q β hA β 1-6 eller PBS.

Figur 14 viser analysen ved ELISA av anti-A β 40-titere og A β 42-titere i serum fra "Swedish" transgene mus immunisert med Q β hA β 1-6.

Figur 15 viser den immunhistokjemiske fargingen av hjernesnitt fra "Swedish" transgene mus immunisert med Q β hA β 1-6 eller PBS.

Figur 16 viser kvantifiseringen av plakkkavsetning i "Swedish" transgene mus immunisert med QP1A131-6 eller PBS.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Uten å være definert på annen måte har alle tekniske og forskningsmessige betegnelser som benyttes heri de samme betydningene som er alminnelig forstått av en person med ordinær dyktighet i fagfeltet, som denne oppfinnelsen tilhører. Selv om mange fremgangsmåter og materialer som er liknende eller ekvivalente til de som er beskrevet heri kan benyttes i praktiseringen eller testingen av foreliggende oppfinnelse, er de foretrukne fremgangsmåtene og materialene beskrevet her nedenfor.

1. Definisjoner

A β 1-6-peptid: Et A β 1-6-peptid slik det anvendes heri, refererer til peptider som har en sekvens som korresponderer til den humane A β 1-6 sekvensen, eller homologer til den

humane A β 1-6-sekvensen. Sekvenser homologe til den humane A β 1-6-sekvensen inkluderer, men er ikke begrenset til A β 1-6-sekvensene fra andre arter som herved inkluderer, men er ikke begrenset til sekvensen fra primater, kanin, marsvin, *Xenopus Laevis*, frosk, mus og rotte A β 1-6. A β 1-6-sekvensene fra *Xenopus Laevis* eller frosk, selv om de er forskjellige fra human A β 1-6 på to posisjoner, har konservative mutasjoner (Ala-Ser, Phe-Tyr), og er fortsatt antatt å være homologer til A β 1-6 i samsvar med denne definisjonen. I samsvar med foreliggende oppfinnelse er imidlertid vanligvis A β 1-6-peptidet modifisert slik at et andre tilkoblingssete er festet til dette. Fortrinnsvis er det andre tilkoblingssetet modifisert med en linker eller en aminosyrelinker som omfatter et andre tilkoblingssete for binding til henholdsvis en kjernepartikkel og VLP. Mens det her refereres til A β 1-6-peptider, vil et modifisert A β 1-6-peptid, som angitt ovenfor, dvs. A β 1-6-peptider med et andre tilkoblingssete tilkoblet dertil, omslutes. Vanligvis er imidlertid modifikasjonene uttrykkelig angitt i spesifikasjonen. Ytterligere foretrukne utførelsesformer av et A β 1-6-peptid som er et antigen eller antigeneterminant i samsvar med foreliggende oppfinnelse, vil klargjøres videre i denne spesifikasjonen.

Adjuvans: Betegnelsen "adjuvans" som den anvendes heri, refererer til ikke-spesifikke stimulatorer av immunresponsen eller substanser som tillater generering av et depot i verten som så kombinert med henholdsvis vaksine og den farmasøytiske sammensetning ifølge foreliggende oppfinnelse, kan tilveiebringe en ytterligere forsterket immunrespons. En rekke adjuvanser kan anvendes. Eksempler inkluderer fullstendig og ufullstendig Freund's adjuvans, aluminiumhydroksid og modifisert muramyl-dipeptid. Ytterligere adjuvanser er mineralgeler som aluminiumhydroksid, overflateaktive substanser som lysolestin, pluroniske polyoler, polyanioner, peptider, oljeemulsjoner, albueskjell-hemocyaniner, dinitrofenol og potensielt nyttige humane adjuvanser som BCG (*bacille Calmette-Guerin*) og *Corynebacterium parvum*. Slike adjuvanser er også velkjente i faget. Ytterligere adjuvanser som kan administreres med sammensetningene ifølge oppfinnelsen inkluderer, men er ikke begrenset til monofosforyl lipid immunmodulator, AdjuVax 100a, QS-21, QS-18, CRL1005, aluminiumsalter (Alum), MF-59, OM-174, OM-197, OM-294 og virosomal adjuvansteknologi. Adjuvansene kan også omfatte en blanding av disse substansene. Immunologisk aktive saponinfraksjoner som har adjuvansaktivitet utledet fra barken til det sydamerikanske treet *Quillaja Saponaria Molina* er kjent i faget. For eksempel QS21, også kjent som QA21, er en HPLC-renset fraksjon fra *Quillaja Saponaria Molina* treet og dens fremgangsmåte for produksjon er beskrevet (som QA21) i U.S. patent nr. 5 057 540. *Quillaja* saponin er også beskrevet som en adjuvans av Scott *et al.*, Int. Archs. Allergy Appl. Immun., 1985, 77, 409. Monofosforyllipid A og derivater derav er kjent i faget. Et foretrukket derivat er 3 de-o-acylert monofosforyl lipid A, og er kjent fra britisk patent nr. 2220211. Ytterligere foretrukne adjuvanser er beskrevet i WO 00/00462.

Et fordelaktig kjennetegn ifølge foreliggende oppfinnelse er imidlertid den høye immunogenisiteten av sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse. Som det allerede er skissert her, eller vil bli klargjort gjennom denne beskrivelsen av den foreliggende oppfinnelse, tilveiebringer foreliggende oppfinnelse vaksiner og farmasøytiske sammensetninger fri for adjuvanter, i ytterligere alternative eller foretrukne utførelsesformer, som fører til vaksiner og farmasøytiske sammensetninger for behandling av AD, som er fri for adjuvanter, og som derfor har en overlegen sikkerhetsprofil, da adjuvanter kan forårsake bieffekter. Betegnelsen "fri for" som den anvendes her i konteksten for vaksiner og farmasøytiske sammensetninger for behandling av AD, refererer til vaksiner og farmasøytiske sammensetninger som anvendes uten adjuvanter.

Aminosyre linker: En "aminosyrelinker" eller også betegnet "linker" innenfor denne spesifikasjonen, slik den anvendes heri, assosierer enten antigenet eller antigendeterminanten med det andre tilkoblingssettet, eller mer foretrukket omfatter allerede eller inneholder det andre tilkoblingssettet, vanligvis - men ikke nødvendigvis som en aminosyrerest, fortrinnsvis som en cysteinrest. Betegnelsen "aminosyrelinker" som den anvendes heri, har ikke til hensikt å antyde at en slik aminosyrelinker eksklusivt består av rester, selv om en aminosyrelinker bestående av aminosyrerester er en foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen. Aminosyrerestene av aminosyrelinker er fortrinnsvis sammensatt av naturlig forekommende aminosyrer, eller ikke-naturlige aminosyrer som er kjent i faget, alle-L eller alle-D eller blandinger derav. En aminosyrelinker som imidlertid omfatter et molekyl med en sulfhydrylgruppe eller cysteinrest er også omfattet i oppfinnelsen. Et slikt molekyl omfatter fortrinnsvis en C1-C6 alkyl-, sykloalkyl (C5,C6), aryl eller heteroaryl. I tillegg til en aminosyrelinker skal imidlertid også en linker, som fortrinnsvis omfatter en C1-C6 alkyl-, sykloalkyl- (C5,C6), aryl- eller heteroaryl og fri for aminosyre (aminosyrer), omslutes innefor oppfinnelsens rekkevidde. Assosiasjon mellom antigenet eller antigendeterminanten eller eventuelt det andre tilkoblingssettet og aminosyrelinker er fortrinnsvis ved minst en kovalent binding, mer foretrukket ved minst en peptidbinding.

Dyr: Betegnelsen "dyr" som den anvendes her inkluderer for eksempel mennesker, sau, elg, hjort, muldyr, mink, pattedyr, ape, hest, kveg, svin, geit, hund, katt, rotter, mus, fugler, kylling, reptiler, fisk, insekter og edderkopper.

Antistoff: Betegnelsen "antistoff" som den anvendes her refererer til molekyler som er i stand til å binde en epitop eller en antigendeterminant. Betegnelsen inkluderer hele antistoffer og antigenbindende fragmenter derav, som inkluderer enkelkjede antistoffer. Mest foretrukket er antistoffene humant antigenbindende antistofffragmenter og inkluderer, men er ikke begrenset til Fab, Fab' og F(Aβ')₂, Fd, enkelkjede Fvs (scFv), enkelkjede antistoffer, disulfidkoblede Fvs (sdFv) og fragmenter omfattende enten et V_L- eller V_H-doméne. Antistoffene kan være fra enhver dyreopprinnelse, inkludert fugler og pattedyr.

Fortrinnsvis er antistoffene humane, murine, kanin, geit, marsvin, kamel, hest eller kylling. Slik "humant/humane" antistoffer anvendes heri inkluderer også antistoffer som har aminosyresekvensen fra et humant immunglobulin og inkluderer antistoffer isolert fra humane immunglobulinbibliotek eller fra dyr som er transgene for ett eller flere humane immunglobuliner, og som ikke uttrykker endogene immunglobuliner, som beskrevet for eksempel i U.S. patent nr. 5 939 598 av Kucherlapati *et al.*

Antigen: Betegnelsen "antigen" som den anvendes her refererer til et molekyl i stand til å bindes til et antistoff eller en T-cellereseptor (TCR) hvis det er til stede ved MHC-molekyler. Betegnelsen "antigen" slik den anvendes her, omslutter også T-celleepitoper. Et antigen er også i stand til å gjenkjennes av immunsystemet og/eller i stand til å indusere en humoral immunrespons og/eller cellulær immunrespons som medfører aktivering av B- og/eller T-lymfocytter. Dette kan imidlertid kreve, i alle fall i spesielle tilfeller, at antigenet inneholder eller er forbundet til en Th-celleepitop, og er gitt i adjuvans. Et antigen kan ha en eller flere epitoper (B- og T-epitoper). Den spesifikke reaksjonen referert til ovenfor, er ment å indikere at antigenet fortrinnsvis vil reagere, vanligvis på sterkt selektiv måte, med dets korresponderende antistoff eller TCR, og ikke med mangfoldet av andre antistoffer eller TCR som kan utløses ved andre antigener. Antigener som de benyttes heri, kan også være blandinger av flere individuelle antigener.

Antigenisk determinant: Betegnelsen "antigenisk determinant" som den anvendes heri, refererer til den delen av et antigen som spesifikt gjenkjennes ved enten B- eller T-lymfocytter. B-lymfocytter som responderer til antigeniske determinanter produserer antistoffer, mens T-lymfocytter responderer til antigeniske determinanter ved proliferasjon og etablering av effektorfunksjoner som er kritiske for mediering av cellulær og/eller humoral immunitet.

Assosiasjon: Betegnelsen "assosiasjon" slik den benyttes heri for de første og andre tilkoblingssetene, refererer til bindingen av de første og andre tilkoblingssetene som fortrinnsvis er med minst en ikke-peptidbinding. Assosiasjonen kan være kovalent, ionisk, hydrofobisk, polar eller enhver kombinasjon derav, fortrinnsvis er assosiasjonen kovalent.

Tilkoblingssete, første: Frasen "første tilkoblingssete" slik den anvendes heri, refererer til et element av ikke-naturlig eller naturlig opprinnelse, som det andre tilkoblingssetet som er lokalisert på antigenet eller antigenet determinanten kan assosiere til. Det første tilkoblingssetet kan være et protein, polypeptid, aminosyre, peptid, sukker, polynukleotid, naturlig eller syntetisk polymer, sekundær metabolitt eller forbindelse (biotin, fluorescein, retinol, digoksigenin, metallioner, fenylmetylsulfonylfluorid), eller en kombinasjon eller en kjemisk reaktiv gruppe derav. Det første tilkoblingssetet er vanligvis og fortrinnsvis lokalisert på overflaten av kjernepartikkelen, som fortrinnsvis den virusliknende partikkelen. Flere første tilkoblingsseter er til stede på overflaten av

henholdsvis kjernen og den virusliknende partikkelen, vanligvis i en repetitiv konfigurasjon.

Tilkoblingssete, andre: Frasen "andre tilkoblingssete" slik den anvendes heri, refererer til et element assosiert med antigenet eller antigendeterminanten, som det første tilkoblingssetet, som er lokalisert på overflaten av henholdsvis kjernepartikkelen og den virusliknende partikkelen, kan assosiere til. Det andre tilkoblingssetet av antigenet eller antigendeterminanten kan være et protein, polypeptid, peptid, sukker, polynukleotid, naturlig eller syntetisk polymer, sekundær metabolitt eller forbindelse (biotin, fluorescein, retinol, digoksigenin, metallioner, fenylmetylsulfonylfluorid), eller en kombinasjon eller en kjemisk reaktiv gruppe derav. Minst ett andre tilkoblingssete er til stede på antigenet eller antigendeterminanten. Betegnelsen "antigen eller antigendeterminant med minst ett andre tilkoblingssete" refererer derfor til et antigen eller antigenisk konstruksjon omfattende minst antigenet eller antigendeterminanten og det andre tilkoblingssetet. Spesielt for et andre tilkoblingssete, som er av ikke-naturlige opprinnelse, dvs. ikke naturlig forekommende i antigenet eller antigendeterminanten, omfatter imidlertid disse antigen- eller antigeniske konstruksjonene en "aminosyrelinker".

Binding: Betegnelsen "binding" som den anvendes heri, refererer til binding eller tilkobling som kan være kovalent, for eksempel ved kjemisk kobling eller ikkekovalent, for eksempel ioniske interaksjoner, hydrofobiske interaksjoner, hydrogenbindinger osv. Kovalente bindinger kan for eksempel være ester, eter, fosfoester, amid, peptid, imid, karbon-svovel, karbon-fosfor, og liknende. Betegnelsen "binding" er bredere enn, og inkluderer betegnelser som "koblet", "fusjonert" og "tilkoblet".

Kappeprotein(er): Betegnelsen "kappeprotein(er)" refererer til protein(er) fra en RNA-bakteriofag som er i stand til å bli inkorporert i kapsidsamlingen til RNA-bakteriofagen. Når det refereres til kappeproteingenets spesifikke genprodukt fra RNA-bakteriofag benyttes imidlertid betegnelsen "CP". For eksempel er kappeproteingenets spesifikke genproduktet fra RNA-bakteriofag-Q β referert til som "Q β CP", mens "kappeproteinene" fra bakteriofag Q β omfatter "Q β CP" så vel som A1-proteinet. Kapsidet fra bakteriofag Q β består hovedsakelig av Q β CP, med et mindre innhold av A1-proteinet. På liknende måte inneholder VLP-Q β -kappeproteinene hovedsakelig Q β CP, med et mindre innhold av A1-protein.

Kjernepartikkel: Betegnelsen "kjernepartikkel" slik den anvendes heri, refererer til en rigid struktur med en naturlig repetitiv organisasjon. En kjernepartikkel som den anvendes heri, kan være produkt av en syntetisk eller biologisk prosess.

Koblet: betegnelsen "koblet" slik den anvendes heri, refererer til kobling ved kovalente bindinger eller ved sterke ikke-kovalente interaksjoner, vanligvis og fortrinnsvis til kobling ved kovalente bindinger. Enhver fremgangsmåte som normalt anvendes av de som er øvet i faget med kobling av biologisk aktive materialer kan

anvendes ifølge foreliggende oppfinnelse.

Effektiv mengde: Betegnelsen "effektiv mengde" slik den anvendes heri refererer til en mengde nødvendig eller tilstrekkelig til å realisere en ønsket biologisk effekt. En effektiv mengde av sammensetningen vil være mengden som oppnår dette ønskete resultat, og en slik mengde bestemmes ved rutine av faglært person. En effektiv mengde for å behandle en immunsystemsvikt kan for eksempel den mengden som er nødvendig for å forårsake aktivering av immunsystemet, som resulterer i utvikling av en antigenspesifikk immunrespons ved eksponering for antigen. Betegnelsen er også synonym med "tilstrekkelig mengde". Den effektive mengde for enhver spesiell anvendelse kan variere avhengig av slike faktorer som sykdommen eller tilstanden som skal behandles, den bestemte sammensetning som skal tilføres, individets størrelse og/eller alvorligheten av sykdommen eller tilstanden. En person med ordinær dyktighet i faget kan erfaringsmessig bestemme den effektive mengden av en bestemt sammensetning av foreliggende oppfinnelse uten å gjøre unødvendig eksperimenteting.

Epitop: Betegnelsen "epitop" slik den anvendes heri, refererer til kontinuerlige eller avbrutte deler av et polypeptid som har antigen eller immunogenisk aktivitet i et dyr, fortrinnsvis et pattedyr, og mest foretrukket i et menneske. En epitop gjenkjennes ved et antistoff eller en T-celle gjennom dens T-cellereseptor i et MHC-molekyls kontekst. En "immunogen epitop" som anvendt heri, defineres som en del av et polypeptid som utløser en antistoffrespons eller som induserer en T-cellerespons i et dyr, som bestemt ved enhver fremgangsmåte kjent i faget. (Se for eksempel Geysen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 81:3998-4002 (1983)). Betegnelsen "antigenepitop" slik den anvendes heri, defineres som en del av et protein, som et antistoff immunspesifikt kan binde sitt antigen, som bestemt ved enhver fremgangsmåte som er godt kjent i faget. Immunspesifikk binding ekskluderer ikke-spesifikk binding, men ekskluderer nødvendigvis ikke kryssreaktivitet med andre antigener. Antigenepitoper trenger nødvendigvis ikke å være immunogene. Antigenepitoper kan også være T-cellepitoper, i dette tilfellet kan de immunspesifikt bindes ved en T-cellereseptor i et MHC-molekyls kontekst.

En epitop kan omfatte tre aminosyrer i en romlig konformasjon som er unik for epitopen. Generelt omfatter en epitop minst omkring fem slike aminosyrer, og mer vanlig består den av minst omkring 8-10 ulike aminosyrer. Dersom epitopen er et organisk molekyl, kan det være så lite som nitrofenyl.

Fusjon: Betegnelsen "fusjon" slik den anvendes heri, refererer til kombinasjonen av aminosyresekvenser av ulik opprinnelse i en polypeptidkjede ved kombinasjon av deres kodende nukleotidsekvenser i leseramme. Betegnelsen "fusjon" omslutter uttrykkelig interne fusjoner, dvs. innsetting av sekvenser av ulik opprinnelse i en polypeptidkjede i tillegg til fusjon til én av dets terminaler.

Immunrespons: Betegnelsen "immunrespons" slik den anvendes heri, refererer til en humoral immunrespons og/eller cellulær immunrespons som fører til aktivering eller proliferasjon av B- og/eller T-lymfocytter og/eller antigenstildedeværende celler. I noen tilfeller kan imidlertid immunresponsene være av lav intensitet og bare påvises når det
 5 minst benyttes en substans i samsvar med oppfinnelsen. "Immunogenisk" refererer til et middel som anvendes for å stimulere immunsystemet til en levende organisme, slik at én eller flere funksjoner av immunsystemet forsterkes og rettes mot det immunogene middelet. Et "immunogenisk polypeptid" er et polypeptid som utløser en cellulær og/eller humoral immunrespons, enten alene eller forbundet til en bærer i nærvær eller
 10 fravær av en adjuvans. Fortrinnsvis aktiveres tilstedeværende antigenceller.

En substans som "forsterker" en immunrespons refererer til en substans der en immunrespons er observert som er større eller intensivert, eller på noen måte avvikende med tilsetning av substansen sammenliknet med den samme immunresponsen målt uten tilsetning av substansen. Den lytiske aktiveringen av cytotoksiske T-teller kan måles for
 15 eksempel ved anvendelse av en ^{51}Cr frigjøringsstest i prøver oppnådd med eller uten anvendelse av substansen under immunisering. Mengden av substans som den CTLlytiske aktivitet er forsterket, sammenliknet med CTL-lytisk aktivitet uten substansen, er antatt å være en mengde tilstrekkelig til å forsterke immunresponsen hos dyret til antigenet. I en foretrukket utførelsesform er immunresponsen forsterket med en faktor på minst omkring
 20 2, mer foretrukket med en faktor på omkring 3 eller mer. Mengden eller typen av cytokiner utskilt, kan også endres. Alternativt kan mengden antistoff induisert eller deres underklasser endres.

Immunisering: Betegnelsene "immunisere" eller "immunisering", eller relaterte betegnelser slik de anvendes heri, refererer til overdragelse av evnen til å måle en
 25 vesentlig immunrespons (omfattende antistoffer og/eller cellulær immunitet, som effektor CTL) mot et målantigen eller en målepitop. Disse betegnelsene krever ikke at fullstendig immunitet skapes, men heller at det produseres en immunrespons som er vesentlig større enn basalnivået. Et pattedyr kan for eksempel betraktes å være immunisert mot et målantigen om den cellulære og/eller målanfigenets humorale
 30 immunrespons forekommer etter anvendelse av fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen.

Naturlig opprinnelse: Betegnelsen "naturlig opprinnelse" slik den anvendes heri, betyr at hele eller deler derav ikke er syntetisk eller eksisterer, eller produseres i naturen.

Ikke-naturlig: Betegnelsen, slik den anvendes heri, betyr generelt ikke fra
 35 naturen, mer spesifikt betyr betegnelsen av menneskehånd.

Ikke-naturlig opprinnelse: Betegnelsen "ikke-naturlig opprinnelse" slik den anvendes heri betyr generelt syntetisk eller ikke fra naturen; mer spesifikt betyr betegnelsen av menneskehånd.

Ordnet og repetitiv antigen- eller antigendeterminantoppstilling: Betegnelsen "ordnet og repetitiv antigen- eller antigendeterminantoppstilling" slik den anvendes heri, refererer generelt til et repetitivt mønster av antigen eller antigendeterminant, vanligvis karakterisert ved og fortrinnsvis ved en lik, romlig arrangement av antigenene eller antigendeterminantene med hensyn til henholdsvis kjernepartikkelen og den virusliknende partikkelen. I en utførelsesform ifølge oppfinnelsen er det repeterte mønsteret et geometrisk mønster. Vanlige og foretrukne eksempler av egnete, ordnete og repetitive antigen- eller antigendeterminantoppstillinger er de som innehar strengt repetitive parakrystallinske systemer av antigener eller antigendeterminanter, fortrinnsvis med mellomrom på 0,5 til 30 nanometer, mer foretrukket 5 til 15 nanometer.

Polypeptid: Betegnelsen "polypeptid", slik den anvendes heri, refererer til et molekyl som er komponert av monomerer (aminosyrer) lineært forbundet av amidbindinger (også kjent som peptidbindinger). Det indikerer en molekylkjede av aminosyrer og refererer ikke til en spesifikk produktlengde. Peptider, dipeptider, tripeptider, oligopeptider og proteiner er derfor inkludert i definisjonen av polypeptid. Denne betegnelsen er også ment å referere til postekspresjonsmodifikasjoner av polypeptidet, for eksempel glykosyleringer, acetyleringer, fosforyleringer og liknende. Et rekombinant eller derivert polypeptid er ikke nødvendigvis translatert fra en angitt nukleinsyresekvens. Det kan også genereres på andre mater, inkludert kjemisk syntese.

Rest: Betegnelsen "rest" slik den anvendes heri, er ment å bety en spesifikk aminosyre i en polypeptidryggrad eller sidekjede.

Selv-antigen: Betegnelsen "selv-antigen", slik den anvendes heri, refererer til proteiner som kodes av vertens DNA og produkter generert ved proteiner eller RNA kodet ved vertens DNA, er definert som selv. Proteiner som resulterer fra en kombinasjon av to eller flere selv-molekyler eller som representerer en fraksjon av et selv-molekyl og proteiner med høy homologi til selv-molekyler som definert ovenfor (> 95 %, fortrinnsvis >97 %, mer foretrukket >99 %) kan i tillegg også betraktes som selv.

Behandling: Betegnelsene "behandling", "behandle" eller "behandlet", slik de anvendes heri, refererer til profylakse og/eller terapi. Når benyttet med hensyn til en infeksjøs sykdom refererer for eksempel betegnelsen til en profylaktisk behandling som øker resistensen hos et individ mot infeksjon med et patogen, eller med andre ord, reduserer sannsynligheten for at individet infiseres med patogenet eller viser tegn på sykdom som kan tilskrives infeksjonen, så vel som en behandling etter at individet er infisert for å bekjempe infeksjonen, for eksempel redusere eller eliminere infeksjonen eller hindre den i videre utvikling.

Vaksine: Betegnelsen "vaksine", slik den anvendes heri, refererer til en formulering inneholdende sammensetningen av foreliggende oppfinnelse, og som er i en form som er i stand til å tilføres et dyr. Vanligvis omfatter vaksinen en konvensjonell saltoppløsning eller bufret vandig løsningsmedium, som sammensetningen av den foreliggende oppfinnelse er suspendert eller oppløst i. I denne formen kan sammensetningen av foreliggende oppfinnelse benyttes passende for å hindre, lindre eller på annen måte behandle en tilstand. Ved introduksjon i en vert, er vaksinen i stand til å fremkalle en immunrespons som inkluderer, men er ikke begrenset til produksjon av antistoffer og/eller cytokiner og/eller aktivering av cytotoksiske T-celler, antigenpresenterende celler, helper-T-teller, dendrittceller og/eller andre cellulære responser.

Vaksinen ifølge foreliggende oppfinnelse kan ytterligere eventuelt inkludere en adjuvans som kan være til stede i enten en mindre eller større andel relativt til forbindelsen av foreliggende oppfinnelse.

Virusliknende partikkel (VLP): Betegnelsen "virusliknende partikkel", slik den anvendes heri, refererer til en struktur som likner en viruspartikkel. En virusliknende partikkel er videre i samsvar med foreliggende oppfinnelse ikke-replikerende og ikke-infeksiøs da den mangler hele eller deler av det virale genom, spesielt de replikerende og infeksiose komponentene av viralgenomet. En virusliknende partikkel som er i samsvar med den foreliggende oppfinnelse kan inneholde nukleinsyre atskilt fra deres genom. En typisk og foretrukket utførelsesform av en virusliknende partikkel i samsvar med den foreliggende oppfinnelse er et viralt kapsid slik som det virale kapsidet fra den korresponderende RNA-bakteriofag. Betegnelsene "viralt kapsid" eller "kapsid", som anvendes om hverandre heri, refererer til en makromolekylar samling bestående av virale proteinsubenheter. Vanligvis og fortrinnsvis samles de virale proteinsubenheterne til et viralt kapsid og kapsid, med en struktur med iboende repetitiv organisering, der nevnte struktur vanligvis er sfærisk eller tubular. For eksempel har kapsidene eller RNA-bakteriofagene eller HBcAg'ene en sfærisk form av ikosahedral symmetri. Betegnelsen "kapsidliknende struktur", slik den anvendes heri, refererer til en makromolekylær samling bestående av virale proteinsubenheter som likner kapsidmorfologien i den ovenfor definerte betydning, men som avviker fra den typisk symmetriske samling, mens den opprettholder en tilstrekkelig grad av orden og repeterbarhet.

Virusliknende fra en bakteriofag: Betegnelsen "virusliknende fra en bakteriofag", slik den anvendes heri, refererer til virusliknende partikkel som likner strukturen til en bakteriofag som er ikke-replikerende og ikke-infeksiøs, og som mangler minst genet eller genene som koder for replikasjonsmaskineriet hos bakteriofagen, og vanligvis mangler også genet eller genene som koder for proteinet eller proteinene som er ansvarlige for viral forbindelse til eller inngang i verten. Denne definisjonen skal imidlertid også omfatte virusliknende partikler fra bakteriofager, der

det ovenfor nevnte genet eller genene fortsatt er til stede, men er inaktive, og som derfor også fører til ikke-replikerende og ikke-infeksiøse, virusliknende partikler fra en bakteriofag.

VLP fra RNA-bakteriofag kappeprotein: Kapsidstrukturen dannet fra selv-samlingen av 180 subenheter av RNA-bakteriofag kappeprotein og som eventuelt inneholder verts-RNA refereres til som et "VLP fra RNA-bakteriofag kappeprotein". Et spesifikt eksempel er VLP fra Q β -kappeprotein. I dette bestemte tilfellet kan VLP fra Q β -kappeprotein enten samles eksklusivt fra Q β -CP-subenheter (generert ved ekspresjon av et Q β -CP-gen inneholdende for eksempel et TAA stoppkodon som utelukker enhver ekspresjon av det lengre A1-proteinet gjennom suppressjon, se Kozlovskaja, T. M., *et al.*, *Intervirology* 39:9-15 (1996)), eller ytterligere inneholder A1 -proteinsubenheter i kapsidsamlingen.

Viruspartikkel: Betegnelsen "viruspartikkel", slik den anvendes heri, refererer til den morfologiske formen av et virus. I noen virustyper omfatter det et genom omgitt av et proteinkapsid; andre har ytterligere strukturer (for eksempel konvolutter, haler, osv.).

Én eller ett: Når betegnelsene "én" eller "ett" benyttes i denne beskrivelsen, betyr de "minst én" eller "én eller flere", med mindre annet er angitt.

Som det vil være klart for de med dyktighet i faget, involverer enkelte utførelsesformer av oppfinnelsen anvendelse av rekombinante nukleinsyroteknologier, slik som kloning, polymerasekjedereaksjon, rensing av DNA og RNA, ekspresjon av rekombinante proteiner i prokaryote og eukaryote celler, osv. Slike metodologier er velkjent for de med dyktighet i faget, og finnes i publiserte laboratoriemanualer (se for eksempel Sambrook, J. *et al.*, red. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. utg., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel, F. *et al.*, red., *Current Protocols in Molecular Biology*, John H. Wiley & Sons, Inc. (1997)). Fundamentale laboratorieteknikker for å arbeide med dyrking av cellelinjer (Celis, J., red., *Cell Biology*, Academic Press, 2. utg., (1998)) og antistoffbaserte teknologier (Harlow, E. og Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988); Deutscher, M. P., "Guide to Protein Purification", *Meth. Enzymol.* 128, Academic Press, San Diego (1990); Scopes, R. K., *Protein Purification Principles and Practice*, 3. utg., Springer-Verlag, New York (1994)) er også dekkende beskrevet i litteraturen.

2. Sammensetninger og fremgangsmåter for å forsterke en immunrespons

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer sammensetninger og fremgangsmåter for å indusere en immunrespons mot A β 1-6-peptid i et dyr som inkluderer antistoffer stand til å binde A β -amyloid plakk og løselig A β . Sammensetninger ifølge oppfinnelsen omfatter eller består alternativt av (a) en kjernepartikkel med minst ett første tilkoblingssete der nevnte

kjernepartikkel er en VLP fra en RNA-bakteriofag; og (b) minst ett antigen eller antigenisk determinant med minst ett andre tilkoblingssete, der nevnte antigen eller antigeniske determinant er et A β 1-6-peptid, og hvori nevnte andre tilkoblingssete er valgt fra gruppen bestående av (i) et tilkoblingssete som ikke er naturlig forekommende i nevnte antigen eller antigeniske determinant; og (ii) et tilkoblingssete som er naturlig forekommende i nevnte antigen eller antigeniske determinant, hvori nevnte andre tilkoblingssete er i stand til å assosiere til nevnte første tilkoblingssete gjennom minst én ikke-peptidbinding; og hvori nevnte antigen eller antigeniske determinant og nevnte kjernepartikkel interagerer gjennom nevnte assosiasjon for å danne en ordnet og repetitiv antigenoppstilling. Mer spesifikt omfatter sammensetningene ifølge oppfinnelsen, eller alternativt består de av en virusliknende partikkel og minst ett antigen eller antigendeterminant, hvor antigenet eller antigendeterminanten er et A β 1-6-peptid, og hvor det minst ene antigenet eller antigendeterminanten er bundet til den virusliknende partikkelen for å danne en ordnet og repetitiv antigen-VLP-oppstilling. Videre muliggjør oppfinnelsen for utøveren å konstruere en slik sammensetning, inter alia, for behandling og/eller profylaktisk å forebygge Alzheimers sykdom. Virusliknende partikler i konteksten av den foreliggende anvendelsen refererer til strukturer som likner en viruspartikkel, men som ikke er patogen. Generelt mangler virusliknende partikler det virale genomet og er derfor ikke infeksiose. Virusliknende partikler kan også produseres i større mengder ved heterolog ekspresjon og kan enkelt renses.

I en utførelsesform omfatter kjernepartikkelen, eller er en virusliknende partikkel fra en RNA-bakteriofag, en viral kapsidpartikkel eller en rekombinant form av disse. En hvert RNA-bakteriofag kjent i faget som har en ordnet og repetitiv kappe og/eller kjerneproteinstruktur kan velges som en kjernepartikkel ifølge oppfinnelsen; eksempler på egnete bakteriofager inkluderer bakteriofag Q β , bakteriofag R17, bakteriofag M11, bakteriofag MX1, bakteriofag NL95, bakteriofag fr, bakteriofag GA, bakteriofag SP, bakteriofag MS2, bakteriofag f2, bakteriofag PP7 (for eksempel se tabell 1 i Bachmann, M. F. og Zinkernagel, R. M., *Immunol. Today* 17:553-558 (1996)).

I en ytterligere utførelsesform anvender oppfinnelsen genetisk konstruksjon av et virus for å lage en fusjon mellom et ordnet og repetitivt, viralt konvoluttprotein og et første tilkoblingssete omfattet av, eller alternativt, eller fortrinnsvis, et heterologt protein, peptid, antigendeterminant eller en reaktiv aminosyrerest etter valg. Andre genetiske manipulasjoner kjent i faget, kan inkluderes i konstruksjonen av sammensetningene ifølge oppfinnelsen; for eksempel kan det være ønskelig å begrense replikasjonsevnen til det rekombinante viruset gjennom genetisk mutasjon. Videre er viruset som benyttes i den foreliggende oppfinnelse replikasjonsinkompetent pga. kjemisk eller fysisk inaktivering, eller som angitt,

pga. mangel av et replikasjonskompetent genom. Det virale protein som er valgt for fusjon til det første tilkoblingssettet skal ha en organisert og repetitiv struktur. En slik organisert og repetitiv struktur inkluderer parakrystallinske organiseringer med et mellomrom på 5-30 nm, fortrinnsvis 5-15 nm på virusoverflaten. Konstruksjon av denne type fusjonsprotein vil resultere i flere ordnete og repetitive første tilkoblingssetter på virusoverflaten, og reflekterer den normale organiseringen av det naturlige virale proteinet. Som det vil forstås av folk i faget, kan det første tilkoblingssettet være eller være en del av et hvert passende protein, polypeptid, sukker, polynukleotid, peptid (aminosyre), naturlig eller syntetisk polymer, en sekundær metabolitt eller en kombinasjon derav, som spesifikt kan tjene til å feste antigenet eller antigen determinanten, som fører til en ordnet og repetitiv antigenoppstilling.

Et utvalg av forskjellige rekombinante vertsceller kan anvendes for produksjon av en viralbasert kjernepartikkel for antigen eller antigen determinant forbindelse. En rekke forskjellige rekombinante vertsceller kan således anvendes i praktiseringen av oppfinnelsen. BHK-, COS-, Vero-, HeLa- og CHO-celler er spesielt egnet for produksjon av heterologe proteiner fordi de har potensiale til å glykosylere heterologe proteiner på en måte liknende humane celler (Watson, E. *et al.*, *Glycobiology* 4:227, (1994)), og kan velges (Zang, M. *et al.*, *Bio/technology* 13:389 (1995)) eller konstrueres genetisk (Renner, W. *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 4:476 (1995); Lee, K. *et al.* *Biotech. Bioeng.* 50:336 (1996)) for å gro i serumfritt medium, så vel som i suspensjon.

Introduksjon av polynukleotidvektorer i vertsceller kan utføres ved fremgangsmåter beskrevet i standard laboratoriemanualer (se for eksempel Sambrook, J. *et al.*, red. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. utg., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), kap. 9; Ausubel, F. *et al.*, red., *Current Protocols in Molecular Biology*, John H. Wiley & Sons, Inc. (1997), kap. 16), som inkluderer fremgangsmåter som elektroporering, DEAE-dekstranmediert transfeksjon, transfeksjon, mikroinjeksjon, kationisk lipidmediert transfeksjon, transduksjon, "scrape loading", ballistisk introduksjon og infeksjon. Fremgangsmåter for introduksjon av eksogene DNA-sekvenser i vertsceller er diskutert i Feigner, P. *et al.*, U.S. patent nr. 5 580 859.

Pakkete RNA-sekvenser kan også anvendes for infeksjon av vertsceller. Disse pakkete RNA-sekvensene kan introduseres til vertsceller ved å tilsette dem til dyrkingsmediet.

Når pattedyrceller benyttes som rekombinante vertsceller for produksjon av viralbaserte kjernepartikler, dyrkes disse cellene generelt i cellekultur. Fremgangsmåter for dyrking av celler i kultur er velkjent i faget (se for eksempel Celis, J., red., *Cell Biology*, Academic Press, 2. utg., (1998); Sambrook, J. *et al.*, red. *Molecular Cloning, A*

Laboratory Manual, 2. utg., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel, F. *et al.*, red., *Current Protocols in Molecular Biology*, John H. Wiley & Sons, Inc. (1997); Freshney, R., *Culture of Animal Cells*, Alan R. Liss, Inc. (1983)).

I en foretrukket utførelsesform er kjernepartikkelen en virusliknende partikkel, der den virusliknende partikkelen er en rekombinant virusliknende partikkel. Den dyktige forskeren kan produsere virusliknende partikler (VLP) ved anvendelse av rekombinant DNA-teknologi og viruskodende sekvenser, som enkelt er kommersielt tilgjengelig. Den kodende sekvens av en viruskonvolutt eller et kjerneprotein, kan konstrueres for ekspresjon i en bakulovirusekspresjonsvektor ved anvendelse av en kommersielt tilgjengelig bakulovirusvektor, under den regulatoriske kontroll av en viruspromoter med hensiktsmessige modifikasjoner av sekvensen, for å tillate funksjonell forbindelse av den kodende sekvensen til den regulatoriske sekvens. Den kodende sekvensen til en viruskonvolutt eller et kjerneprotein kan også konstrueres for ekspresjon i for eksempel en bakteriell ekspresjonsvektor.

Eksempler på VLP inkluderer RNA-fag, Ty, fr-fag, GA-fag, AP205-fag og Q β -fag.

Som det vil være tydelig for de med dyktighet i faget, er VLP ifølge oppfinnelsen ikke begrenset til noen spesifikk form. Partikkelen kan kjemisk syntetiseres eller via en biologisk prosess, som kan være naturlig eller ikke-naturlig. Ved eksempler inkluderer denne type av utførelsesform en virusliknende partikkel eller en rekombinant form av denne.

I en mer spesifikk utførelsesform omfatter den virusliknende partikkel eller alternativt hovedsakelig består av eller alternativt består av rekombinante polypeptider, eller fragmenter derav, som er valgt fra rekombinante polypeptider fra RNA-bakteriofag, rekombinante polypeptider fra Ty, rekombinante polypeptider fra rekombinante polypeptider fra GA-fag og rekombinante polypeptider fra Q β -fag. Den virusliknende partikkelen kan ytterligere omfatte, eller alternativt hovedsakelig bestå av, eller alternativt bestå av ett eller flere fragmenter av slike polypeptider, så vel som varianter av slike polypeptider. Varianter av polypeptider kan dele for eksempel minst 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % eller 99 % identitet på aminosyrenivået med deres villtypemotstykke.

I en foretrukket utførelsesform omfatter den virusliknende partikkelen, består hovedsakelig av, eller alternativt består av rekombinante proteiner eller fragmenter derav, fra en RNA-bakteriofag. Fortrinnsvis er RNA-bakteriofag valgt fra gruppen bestående av a) bakteriofag Q β ; b) bakteriofag R17; c) bakteriofag fr; d) bakteriofag GA; e) bakteriofag SP; f) bakteriofag MS2; g) bakteriofag M11; h) bakteriofag MX1; i) bakteriofag NL95; k) bakteriofag f2; l) bakteriofag PP7; og m) bakteriofag AP205.

I en annen foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter

den virusliknende partikkelen, består hovedsakelig av, eller alternativt består av rekombinante proteiner eller fragmenter derav, fra RNA-bakteriofag Q β eller fra RNA-bakteriofag fr, eller fra RNA-bakteriofag AP205.

I en ytterligere foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter de rekombinante proteinene, eller alternativt består hovedsakelig av, eller alternativt består av kappeproteiner fra RNA-bakteriofager.

RNA-bakteriofag kappeproteiner som danner kapsider eller VLP eller fragmenter av bakteriofag kappeproteinene og som er kompatible med selv-samling til et kapsid eller VLP, er derfor ytterligere foretrukne utførelsesformer av oppfinnelsen. Bakteriofag Q β -kappeproteiner kan for eksempel uttrykkes rekombinant i *E. coli*. Videre, ved slik ekspresjon danner disse proteinene kapsider spontant. I tillegg danner disse kapsidene en struktur med en iboende repetitiv organisasjon.

Spesifikke foretrukne eksempler av bakteriofage kappeproteiner som kan anvendes i fremstillingen av sammensetninger ifølge oppfinnelsen, inkluderer kappeproteinene fra RNA-bakteriofager, slik som bakteriofag Q β (SEQ ID NO: 4; PIR database, adgangsnr. VCBPQ β , som refererer til Q β -CP og SEQ ID NO: 5; adgangsnr. AAA16663, som refererer til Q β -A1 protein), bakteriofag R17 (SEQ ID NO: 6; FIR adgangsnr. VCBPR7), bakteriofag fr (SEQ ID NO: 7; PIR adgangsnr. VCBPFR), bakteriofag GA (SEQ ID NO: 8; GenBank adgangsnr. NP-040754), bakteriofag SP (SEQ ID NO: 9; GenBank adgangsnr. CAA30374 som refererer til SP CP og SEQ ID NO: 10; adgangsnr. NP 695026 som refererer til SP A1 protein), bakteriofag MS2 (SEQ ID NO: 11; PIR adgangsnr. VCBPM2), bakteriofag M11 (SEQ ID NO: 12; GenBank adgangsnr. AAC06250), bakteriofag MX1 (SEQ ID NO: 13; GenBank adgangsnr. AAC14699), bakteriofag NL95 (SEQ ID NO: 14; GenBank adgangsnr. AAC14704), bakteriofag f2 (SEQ ID NO: 15; GenBank adgangsnr. P03611), bakteriofag PP7 (SEQ ID NO: 16), og bakteriofag AP205 (SEQ ID NO: 28). A1-proteinet av bakteriofag Q β (SEQ ID NO: 5) eller C-terminale avkortete former som mangler så mye som 100, 150 eller 180 aminosyrer fra dens C-terminate ende, kan inkorporeres i en kapsidsamling av Q β -kappeproteiner. Generelt vil den prosentvise andel av Q β A1-protein relativt til Q β CP i kapsidsamlingen være begrenset for å sikre dannelse av kapsid.

Q β -kappeprotein er også funnet å selv-sammensette til kapsider når det uttrykkes i *E. coli* (Kozlovskaja T. M. *et al.*, *Gene* 137:133-137 (1993)). De oppnådde kapsider eller virusliknende partiklene viste en ikosahedral fag-liknende kapsidstruktur med en diameter på 25 nm og T = 3 kvasisymmetri. Videre har krystallstrukturen til fag-Q β blitt løst. Kapsidet inneholder 180 kopier av kappeproteinet, som er forbundet i kovalente pentamerer og heksamerer ved disulfidbroer (Golmohammadi, R. *et al.*, *Structure* 4:543-554 (1996)), som fører til en bemerkelsesverdig stabilitet av Q β -kappeproteinkapsidet. Kapsider eller virusliknende partikler konstruert fra rekombinant Q β -kappeprotein kan

imidlertid inneholde subenheter som ikke er forbundet via disulfidbindinger til andre subenheter i kapsidet, eller være ufullstendig forbundet. Vanligvis er imidlertid mer enn 80 % av subenhetene forbundet via disulfidbroer til hverandre i den virusliknende partikkelen. Ved å laste rekombinant Q β -kapsid på ikke-reduserende SDS-PAGE, er således bånd som korresponderer til monomerisk Q β -kappeprotein, så vel som bånd som korresponderer til heksameren eller pentameren av Q β -kappeprotein synlig. Ufullstendige disulfidforbundne subenheter kan vise seg som dimer-, trimer- eller til og med tetramer-bånd i ikke-reduserende SDS-PAGE. Q β -kapsidprotein viser også uvanlig motstand mot organiske løsningsmidler og denaturerende midler. Overraskende er det observert at DMSO- og acetonitrilkonsentrasjoner så høye som 30 % og guanidinkonsentrasjoner så høye som 1M ikke påvirker kapsidstabiliteten. Q β -kappeproteinkapsidets høye stabilitet er en fordelaktig egenskap, spesielt for dets anvendelse i immunisering og vaksinasjon av pattedyr og mennesker, i samsvar med foreliggende oppfinnelse.

Ved ekspresjon i *E.coli* er det N-terminale metionin fra Q β -kappeprotein vanligvis fjernet, som ble observert ved N-terminal Edman-sekvensering, som beskrevet av Stoll, E. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 252:990-993 (1977). VLP komponert fra Q β -kappeproteiner, hvor metioninet ved N-terminalen ikke er fjernet, eller virusliknende partikler som omfatter en blanding av Q β -kappeproteiner der det N-terminale metionin enten er kløvet eller til stede, er også innenfor rekkevidden av den foreliggende oppfinnelse.

Ytterligere foretrukne virusliknende partikler fra RNA-bakteriofager, særlig fra Q β , i samsvar med foreliggende oppfinnelse, er beskrevet i WO 02/056905.

Ytterligere RNA-bakteriofag kappeproteiner er også vist å selv-sammensette ved ekspresjon i en bakteriell vert (Kastelein, R. A., *et al.*, *Gene* 23:245-254 (1983), Kozlovskaya, T. M., *et al.*, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 287:452-455 (1986), Adhin, M. R., *et al.*, *Virology* 170:238-242 (1989), Ni, C. Z. *et al.* *Protein Sci.* 5:2485-2493 (1996), Priano, C. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 249:283-297 (1995)). Q β -bakteriofagkapsidet inneholder i tillegg til kappeprotein det såkalte lese-gjennom-protein-A1 og modningsprotein A2. A1 er generert ved undertrykkelse av UGA-stoppkodonet, og har en lengde på 329 aa. Kapsidet av bakteriofag-Q β -rekombinant kappeprotein anvendt i oppfinnelsen er fri for A2 lysisprotein og inneholder RNA fra verten. Kappeprotein fra RNA-bakteriofag er et RNA-bindende protein og interagerer med stam-løkken til det ribosomale bindingssete til replikasegenet, som fungerer som en translasjonal undertrykker under virusets livssyklus. Sekvensen og strukturelle elementer fra interaksjonen er kjent (Witherell, G.W. & Uhlenbeek, O. C. *Biochemistry* 28:71-76 (1989); Lim, F. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:31839-31845 (1996)). Stam-løkken og RNA er generelt kjent for å være involvert i virussamling (Golmohammadi, R. *et al.*, *Structure* 4:543-554 (1996)).

I en ytterligere foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den virusliknende partikkelen eller alternativt består hovedsakelig av, eller alternativt

består av rekombinante proteiner eller fragmenter derav, fra en RNA-bakteriofag, der de rekombinante proteinene omfatter, alternativt består hovedsakelig av, eller alternativt består av mutante kappeproteiner fra en RNA-bakteriofag, fortrinnsvis av mutante kappeproteiner fra RNA-bakteriofagene nevnt ovenfor. I en annen foretrukket utførelsesform er de mutante kappeproteinene fra RNA-bakteriofag modifisert ved fjerning av minst én, eller alternativt minst to lysinrester ved substitusjon eller ved addisjon av minst én lysinrest ved substitusjon, alternativt er de mutante kappeproteinene fra RNA-bakteriofag modifiserte ved delesjon av minst én, eller alternativt minst to lysinrester, eller ved addisjon av minst én lysinrest ved innsetting. Delesjonen, substitusjonen eller addisjonen av minst én lysinrest tillater å variere av graden av kobling, dvs. mengden av A β 1-6-peptider pr. subenhet av VLP fra RNA-bakteriofag, spesielt for å tilpasse og skreddersy vaksinekravene.

I en annen foretrukket utførelsesform omfatter den virusliknende partikkelen, eller alternativt består hovedsakelig av, eller alternativt består av rekombinante proteiner eller fragmenter derav, fra RNA-bakteriofag Q β , hvori de rekombinante proteinene omfatter, eller alternativt består hovedsakelig av, eller alternativt består av kappeproteiner med en aminosyresekvens fra SEQ ID NO: 4, eller en blanding av kappeproteiner som har aminosyresekvenser fra SEQ ID NO: 4 og SEQ ID NO: 5 eller mutanter av SEQ ID NO: 5, og hvori metionin fra N-terminalen fortrinnsvis er kløvet. I en ytterligere foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse, omfatter den virusliknende partikkelen, som består hovedsakelig av eller alternativt består av rekombinante proteiner av Q β eller fragmenter derav, hvori de rekombinante proteinene omfatter, eller alternativt består hovedsakelig av, eller alternativt består av mutante Q β -kappeproteiner. I en annen foretrukket utførelsesform er disse mutante kappeproteinene modifiserte ved å fjerne minst én lysinrest ved substitusjon eller ved addisjon av minst én lysinrest ved substitusjon. Alternativt er disse mutante kappeproteinene modifiserte ved delesjon av minst én lysinrest, eller ved addisjon av minst én lysinrest ved innsetting.

Fire lysinrester eksponeres på kapsidets overflate av Q β -kappeprotein. Q β -mutanter hvor eksponerte lysinrester er erstattet av arginin, kan også anvendes ifølge foreliggende oppfinnelse. De følgende Q β -kappeproteinmutanter og mutante Q β - virusliknende partikler kan således anvendes i praktiseringen av den foreliggende oppfinnelse; "Q β -240" (Lys 13-Arg; SEQ ID NO: 17), "Q β -243" (Asn 10-Lys; SEQ ID NO: 18), "Q β -250" (Lys 2-Arg, Lys 13-Arg; SEQ ID NO: 19), "Q β -251" (SEQ ID NO: 20) og Q β -259 (Lys 2-Arg, Lys 16-Arg; SEQ ID NO: 21). I en ytterligere foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelsen, omfatter således den virusliknende partikkelen, som består hovedsakelig av, eller alternativt består av rekombinante proteiner av mutant Q β -kappeproteiner, som omfatter proteiner med en aminosyresekvens valgt fra gruppen av a) aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 17; b) aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 18; c) aminosyresekvensen av

SEQ ID NO: 19; d) aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 20; og e) aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 21. Konstruksjonen, ekspresjonen og rensingen av de ovenfor angitte Q β -kappeproteinene, mutante Q β -kappeprotein virusliknende partikler og kapsider er beskrevet i WO 02/056905. Det er herved referert til eksempel 18 av den ovenfor nevnte søknad.

I en ytterligere foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen omfatter den virusliknende partikkelen, eller som alternativt består hovedsakelig av, eller alternativt består av rekombinante proteiner av Q β eller fragment derav, hvori de rekombinante proteinene omfatter, som består hovedsakelig av, eller alternativt består av en blanding av enten en av de foregående Q β -mutantene og det korresponderende A1-proteinet.

I en ytterligere foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen omfatter den virusliknende partikkel, eller alternativt består hovedsakelig av, eller alternativt består av rekombinante proteiner eller fragmenter derav av RNA-fag AP205.

AP205-genomet består av et modningsprotein, et kappeprotein, en replikase og to åpne leserammer som ikke er til stede i relaterte fag; et lysis-gen og en åpen leseramme som spiller en rolle i translasjonen av modningsgenet (Klovins, J. *et al.*, *J. Gen. Viral.* 83:1523-33 (2002)). AP205 kappeprotein kan uttrykkes fra plasmid pAP283-58 (SEQ ID NO: 27), som er et derivat av pQb10 (Kozlovskaja, T. M. *et al.*, *Gene* 137:133-37 (1993)), og inneholder et AP205 ribosomalt bindingssete. Alternativt kan AP205-kappeprotein klones inn i pQb185, nedstrøms for det ribosomale bindingssetet som er til stede i vektoren. Begge fremgangsmåtene fører til ekspresjon av proteinet og dannelse av kapsider som beskrevet i den samtidige U.S. «provisional» patentsøknad med tittelen "Molecular Antigen Arrays" (Atty. Docket nr. 1700.0310000), innlevert 17. juli 2002. Vektorene pQb10 og pQb185 er derivert fra pGEM-vektor, og ekspresjon av de klonete gener i disse vektorene kontrolleres ved *trp*-promoteren (Kozlovskaja, T. M. *et al.*, *Gene* 137:133-37 (1993)). Plasmid pAP283-58 (SEQ ID NO: 27) omfatter et antatt AP205 ribosomalt bindingssete i den følgende sekvensen, som er nedstrøms for *Xba*I setet, og umiddelbart oppstrøms for ATG-startkodonet av AP205-kappeproteinet:

tctagaATTFTVTTGGCGCACCCATCCCGGGTGGCGCCCAAAGTGAGGAAAATCACatg (SEQ ID NO: 57).

Vektoren pQb185 omfatter en Shine Delagarno sekvens nedstrøms for *Xba*I-setet, og oppstrøms for startkodonet

(tctagaTTAACCCAACGCGTAGGAGTCAGGCCatg (SEQ ID NO: 58), Shine Delagarno sekvensen er understreket).

I en ytterligere foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den virusliknende partikkelen eller alternativt består hovedsakelig av, eller alternativt består av rekombinante kappeproteiner eller fragment derav fra RNA-fag AP205.

Denne foretrukne utførelsesformen ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter

således AP205 kappeproteiner som danner kapsider. Slike proteiner uttrykkes rekombinant, eller fremstilles fra naturlige kilder. AP205 kappeproteiner som produseres i bakterier danner spontant kapsider, som påvises med elektronmikroskopi (EM) og immundiffusjon. De strukturelle egenskaper til kapsidet som dannes ved AP205 kappeprotein (SEQ ID NO: 28) og de som dannes ved kappeproteinet fra AP205-RNA-fag, kan nesten ikke skjelles når de undersøkes i EM. AP205 virusliknende partikler er meget immunogene, og kan forbindes med antigener og/eller antigendeterminanter for å generere vaksinekonstruksjoner som fremviser antigenene og/eller antigendeterminantene orientert på en repetitiv måte. Høye titere utløses mot de fremviste antigener som viser at bundne antigener og/eller antigendeterminanter er tilgjengelige for å interagere med antistoffmolekyler, og er immunogene.

I en ytterligere foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den virusliknende partikkelen, eller som alternativt består hovedsakelig av, eller alternativt består av rekombinante, mutante kappeproteiner, eller fragment derav fra RNA-fag AP205.

Mutante former av samlingskompetente AP205 virusliknende partikler inkluderer AP205-kappeproteiner med substitusjon av prolin ved aminosyre 5 til treonin (SEQ ID NO: 29), kan også anvendes i praktiseringen av foreliggende oppfinnelse, og fører til en ytterligere foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen. Disse VLP'ene, AP205-VLP'ene avledet fra naturlige kilder, eller AP205 virale partikler, kan bindes til antigener for å produsere ordnete, repetitive oppstillinger av antigene, i samsvar med den foreliggende oppfinnelse.

AP205 P5-T-mutant kappeprotein kan uttrykkes fra plasmid pAP281-32 (SEQ ID NO: 30), som er avledet direkte fra pQb185 og inneholder det mutante AP205 kappeproteingenet i stedet for Q β -kappeproteingenet. Vektorer for ekspresjon av AP205 kappeproteinet transfekteres inn i *E.coli* for ekspresjon av AP205 kappeproteinet.

Fremgangsmåter for ekspresjon av henholdsvis kappeproteinet og det mutante kappeproteinet fører til selv-samlingen til VLP'er beskrives i eksempel 1. Egnete *E.coli*-stammer inkluderer, men er ikke begrenset til *E.coli* K802, JM 109, RR1. Egnete vektorer og stammer og kombinasjoner derav kan identifiseres ved å teste ekspresjon av henholdsvis kappeproteinet og det mutante kappeproteinet med SDS-PAGE og kapsiddannelse og sammensetting ved eventuelt først å rense kapsidene med gelfiltrering og så teste dem i en immundiffusjonstest (Ouchterlony-test) eller elektronmikroskopi (Kozlovskaja, T. M. *et al.*, *Gene* 137:133-37 (1993)).

AP205 kappeproteiner uttrykt fra vektorene pAP283-58 og pAP281-32 kan være fri for den initiate metioninaminosyren pga. prosessering i cytoplasma i *E.coli*. Kløvete og ukløvete former av AP205 VLP eller blandinger av disse er ytterligere foretrukne utførelsesformer ifølge oppfinnelsen.

I en ytterligere foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den virusliknende partikkelen eller som alternativt består hovedsakelig av, eller alternativt består av en blanding av rekombinante kappeproteiner eller fragment derav, fra RNA-fagen AP205 og av rekombinante, mutante kappeproteiner, eller fragment derav, fra RNA-fagen AP205.

I en ytterligere foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen omfatter den virusliknende partikkelen, eller som alternativt består hovedsakelig av, eller alternativt består av fragmenter av rekombinante kappeproteiner eller rekombinante, mutante kappeproteiner fra RNA-fag AP205.

Rekombinante AP205 kappeproteinfragmenter i stand til å samles til henholdsvis en virusliknende partikkel og et kapsid, er også nyttig i praktiseringen av den foreliggende oppfinnelse. Disse fragmentene kan genereres ved delesjon, enten innvendig eller ved endene av henholdsvis kappeproteinet og det mutante kappeproteinet. Innsetninger i kappeproteinet og mutant kappeproteinsekvens, eller fusjoner av antigensekvenser til kappeprotein og mutant kappeproteinsekvens, og kompatible med samling til en VLP, er ytterligere utførelsesformer av oppfinnelsen, og fører til henholdsvis kimære AP205 kappeproteiner og -partikler. Resultatet av innsetninger, delesjoner og fusjoner på kappeproteinsekvensen, og hvorvidt det er kompatibelt med samling til en VLP, bestemmes ved elektronmikroskopi.

Partiklene som dannes ved AP205 kappeproteinet, kappeproteinfragmentene og de kimære kappeproteinene beskrevet ovenfor, isoleres i en form ved en kombinasjon av fraksjoneringstrinn ved presipitering og av rensetrinn ved gelfiltrering ved anvendelse av for eksempel sefaroze CL-4B-, sefaroze CL-2B- og sefaroze CL-6Bkolonner og kombinasjoner derav. Andre fremgangsmåter for å isolere virusliknende partikler er kjente i faget, og kan anvendes for isolering av de virusliknende partiklene (VLP) fra bakteriofag AP205. Anvendelse av ultrasentrifugering for isolering av VLP fra gjæren retrotransposon Ty beskrives i U.S. patent nr. 4 918 166.

Krystallstrukturen til flere RNA-bakteriofager er bestemt (Golmohammadi, R. *et al.*, *Structure* 4:543-554 (1996)). Ved anvendelse av slik informasjon kan overflateeksponerte rester identifiseres, og således kan RNA-fag kappeproteiner modifiseres slik at en eller flere reaktive aminosyrerester kan innsettes ved innsetting eller substitusjon. Som en konsekvens kan disse modifiserte formene av bakteriofage kappeproteiner også anvendes i den foreliggende oppfinnelse. Varianter av proteiner som danner kapsider eller kapsidliknende strukturer (for eksempel kappeproteiner fra bakteriofag Q β , bakteriofag R17, bakteriofag fr, bakteriofag GA, bakteriofag SP, bakteriofag AP205 og bakteriofag MS2), kan også anvendes for fremstilling av sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse.

Selv om sekvensen for de ulike proteinene diskutert ovenfor vil variere fra deres villtypemotparter, vil disse forskjellige proteinene generelt beholde sine evner til å danne kapsider eller kapsidliknende strukturer. Oppfinnelsen inkluderer således henholdsvis sammensetninger og vaksinesammensetninger som videre inkluderer proteinvarianter som danner kapsider eller kapsidliknende strukturer, så vel som fremgangsmåter for fremstilling av slike sammensetninger og vaksinesammensetninger, individuelle proteinsubenheter som benyttes for fremstilling av slike sammensetninger, og nukleinsyremolekyler som koder for disse proteinsubenheterne. Inkludert innefor oppfinnelsens rekkevidde er således ulike former av villtypeproteiner som danner kapsider eller kapsidliknende strukturer og som beholder evnen til å assosiere og danne kapsider eller kapsidliknende strukturer.

Som et resultat inkluderer oppfinnelsen ytterligere henholdsvis sammensetninger og vaksinesammensetninger, omfattende proteiner, omfattende eller som alternativt består hovedsakelig av, eller alternativt består av aminosyresekvenser som er minst 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % eller 99 % identiske til villtypeproteiner som henholdsvis danner ordnete oppstillinger, og som har en iboende repetitiv struktur.

Ytterligere inkludert innenfor oppfinnelsens rekkevidde er nukleinsyremolekyler som koder for proteiner som benyttes i fremstillingen av sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse.

I en annen utførelsesform inkluderer oppfinnelsen ytterligere sammensetninger, omfattende proteiner som omfatter eller som alternativt består hovedsakelig av, eller alternativt består av aminosyresekvenser som er minst 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % eller 99 % identiske til noen av aminosyresekvensene vist i SEQ ID NO: 4-21.

Proteiner egnet for anvendelse ifølge foreliggende oppfinnelse inkluderer også C-terminale avkortete mutanter av proteiner som danner kapsider eller kapsidliknende strukturer, eller VLP'er. Spesifikke eksempler på slike avkortete mutanter inkluderer proteiner med en aminosyresekvens vist i en hvilken som helst av SEQ ID NO: 4-21, hvor 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15 eller 17 aminosyrer er fjernet fra den C-terminale enden. Vanligvis beholder disse avkortete C-terminale mutantene evnen til å danne kapsider eller kapsidliknende strukturer.

Ytterligere proteiner egnet for anvendelse i den foreliggende oppfinnelse inkluderer også N-terminale avkortete proteinmutanter som danner kapsider eller kapsidliknende strukturer. Spesifikke eksempler på slike avkortete mutanter inkluderer proteiner med aminosyresekvens vist i en hvilken som helst av SEQ ID NO: 4-21, hvor 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15 eller 17 aminosyrer er fjernet fra den N-terminale enden. Vanligvis beholder disse avkortete N-terminate mutantene evnen til å danne kapsider eller kapsidliknende strukturer.

Ytterligere proteiner egnet for anvendelse i den foreliggende oppfinnelse

inkluderer N- og C-terminale avkortete mutanter som danner kapsider eller kapsidliknende strukturer. Egnete avkortete mutanter inkluderer proteiner med aminosyresekvens vist i en hvilken som helst av SEQ ID NO: 4-21, hvor 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15 eller 17 aminosyrer er fjernet fra den N-terminale enden, og 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15 eller 17 aminosyrer er fjernet fra den C-terminale enden. Vanligvis beholder disse avkortete N- og C-terminale avkortete mutantene evnen til å danne kapsider eller kapsidliknende strukturer.

Oppfinnelsen inkluderer ytterligere sammensetninger omfattende proteiner, omfattende eller som alternativt bestir hovedsakelig av, eller alternativt bestir av aminosyresekvenser som er minst 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % eller 99 % identiske til de ovennevnte avkortete mutantene.

Oppfinnelsen inkluderer således sammensetninger og vaksinesammensetninger fremstilt fra proteiner som danner kapsider eller virusliknende partikler, fremgangsmåter for fremstillingen av disse sammensetningene fra individuelle proteinsubenheter og virusliknende partikler eller kapsider, fremgangsmåter for fremstillingen av disse individuelle proteinsubenheter, nukleinsyreinolekyler som koder for disse subenheterne, og fremgangsmåter for vaksinasjon og/eller å fremkalle immunologiske responser i individer ved anvendelse av disse sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse.

Som tidligere nevnt inkluderer oppfinnelsen virusliknende partikler eller rekombinante former av disse.

I en ytterligere foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er minst ett A β 1-6-peptid bundet til nevnte VLP og kjernepartikkel ved minst én kovalent binding. Fortrinnsvis er minst ett A β 1-6-peptid bundet til henholdsvis VLP og kjernepartikkelen, ved minst én kovalent binding, nevnte kovalente binding er en ikke-peptidbinding som fører til henholdsvis en A β 1-6-peptidoppstilling og A β 1-6-peptid-VLP-konjugat. Denne A β 1-6-peptidoppstillingen og konjugatet har vanligvis og fortrinnsvis en repetitiv og ordnet struktur da minst ett A β 1-6-peptid er bundet til henholdsvis VLP og kjernepartikkelen, på en orientert måte. Dannelse av henholdsvis en repetitiv og ordnet A β 1-6-peptid-VLP-oppstilling og et konjugat er sikret ved henholdsvis en orientert og retningsbestemt, så vel som definert binding og forbindelse, av det minst ene av A β 1-6-peptidet til henholdsvis VLP og kjernepartikkelen, som vil bli tydelig i det påfølgende. Den typisk iboende, sterkt repetitive og organiserte strukturen til henholdsvis VLP'ene og kjernepartiklene, bidrar fordelaktig til fremvisningen av A β 1-6-peptidet på en betydelig ordnet og repetitiv måte, som fører til henholdsvis en betydelig organisert og repetitiv A β 1-6-peptid-VLP-oppstilling og konjugat.

De foretrukne konjugater og oppstillinger ifølge foreliggende oppfinnelse

avviker derfor fra tidligere konjugater i fagfeltet i deres betydelig organiserte struktur, dimensjoner og i antigenets repeterbarhet på oppstillingens overflate. Den foretrukne utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse tillater videre ekspresjon av partikkelen i en uttrykkende vert som garanterer riktig folding og samling av den virusliknende partikkelen, som A β 1-6-peptidantigenet da videre tilkobles.

Foreliggende oppfinnelse beskriver fremgangsmåter for å binde A β 1-6-peptid til virusliknende partikler. Som angitt i et aspekt ifølge oppfinnelsen, er A β 1-6-peptidet bundet til VLP ved kjemisk kryssbinding, vanligvis og fortrinnsvis ved anvendelse av en heterobifunksjonell krysskobler. Flere heterobifunksjonelle krysskoblere er kjente i litteraturen. I foretrukne utførelsesformer inneholder den heterobifunksjonelle krysskobleren en funksjonell gruppe som reagerer med foretrukne første tilkoblingssteder, dvs. med sidekjedeaminogruppen til lysinrester hos VLP, eller minst en VLP subenhet, og en ytterligere funksjonell gruppe som reagerer med et foretrukket andre tilkoblingssete, dvs. en cysteinrest fusjonert til A β 1-6-peptidet og evt. gjort tilgjengelig for reaksjon ved reduksjon. Prosedyrens første trinn som vanligvis kalles derivatiseringen, er VLP'ens reaksjon med krysskobleren. Reaksjonsproduktet er en aktivert VLP, også kalt aktivert bærer. I det andre trinnet fjernes ikke-reagerte krysskoblere ved anvendelse av vanlige fremgangsmåter, som gelfiltrering eller dialyse. I det tredje trinnet, som kalles koblingstrinnet, omsettes A β 1-6-peptid med den aktiverte VLP. Ikke-reagert A β 1-6-peptid kan eventuelt fjernes ved et fjerde trinn, for eksempel ved dialyse. Flere heterobifunksjonelle krysskoblere er kjente i litteraturen. Disse inkluderer de foretrukne krysskoblerne SMPH (Pierce), Sulfo-MBS, Sulfo-EMCS, Sulfo-GMBS, Sulfa-SLAB, Sulfo-SMPB, Sulfo-SMCC, SVSB, STA og andre krysskoblere tilgjengelige for eksempel fra Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA, og som har en funksjonell gruppe reaktiv mot aminogrupeer og en funksjonell gruppe reaktiv mot cysteinrester. De ovennevnte krysskoblerne fører alle til dannelsen av en tioeterbinding. En annen klasse av krysskoblere egnet i praktiseringen av den foreliggende oppfinnelse er karakterisert ved introduksjon av en disulfidbinding mellom A β 1-6-peptidet og VLP'en ved kobling. Foretrukne krysskoblere som tilhører denne klassen inkluderer for eksempel SPDP og Sulfo-LC-SPDP (Pierce). Graden av derivatisering av VLP med krysskoblere kan påvirkes ved variasjon av eksperimentelle forhold, slik som konsentrasjonen av hver av reaksjonspartnerne, overskuddet av en reagens i forhold til den andre, pH, temperaturer og den ioniske styrken. Graden av kobling, dvs. mengden A β 1-6-peptider pr. subenhet av VLP, kan justeres ved variasjon av de eksperimentelle forholdene beskrevet ovenfor for å tilpasse kravene til vaksinen.

En spesielt favorisert fremgangsmåte for å binde A β 1-6-peptider til VLP er koblingen av en lysinrest på VLP-overflaten med en cysteinrest på A β 1-6-peptidet. I noen utførelsesformer kan fusjon av en aminosyrelinker som inneholder en cysteinrest,

som et andre tilkoblingssete eller som en del av dette, til A β 1-6 for kobling til VLP, være nødvendig.

Generelt er fleksible aminosyrelinkere foretrukket. Eksempler på aminosyrelinkere er valgt fra gruppen bestående av: (a) CGG; (b) N-terminal γ -1-linker; (c) N-terminal γ -3-linker; (d) Ig hengselregioner; (e) N-terminale glysinlinkere; (f) $(G)_kC(G)_n$, med $n = 0-12$ og $k = 0-5$ (SEQ ID NO: 34); (g) N-terminale glysin-serinlinkere; (h) $(G)_kC(G)_m(S)_l(GGGGS)_n$ med $n = 0-3$, $k = 0-5$, $m = 0-10$, $l = 0-2$ (SEQ ID NO: 35); (i) GGC; (k) GGC-NH₂; (l) C-terminal γ -1-linker; (m) C-terminal γ -3-linker; (n) C-terminale glysinlinkere; (o) $(G)_nC(G)_k$ med $n = 0-12$ og $k = 0-5$ (SEQ ID NO: 36); (p) C-terminale glysin-serin-linkere; (q) $(G)_m(S)_l(GGGGS)_n(G)_oC(G)_k$ med $n = 0-3$; $k = 0-5$, $m = 0-10$, $l = 0-2$ og $o = 0-8$ (SEQ ID NO: 37).

Ytterligere eksempler på aminosyrelinkere er hengselregionen av immunglobuliner, glysin-serin-linkere $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 38), og glysinlinkere $(G)_n$ der alle ytterligere inneholder en cysteinrest som det andre tilkoblingssete, og eventuelt ytterligere glysinrester. Typisk foretrukne eksempler på nevnte aminosyrelinkere er N-terminal γ 1; CGDKTHTSPP (SEQ ID NO: 39); C-terminal γ l: DKTHTSPPCG (SEQ ID NO: 40); N-terminal γ 3: CGGPKPSTPPGSSGGAP (SEQ ID NO: 41); C-terminal γ 3: PKPSTPPGSSGGAPGGCG (SEQ ID NO: 42); N-terminal glysinlinker: GCGGGG (SEQ ID NO: 43) og C-terminal glysinlinker: GGGGCG (SEQ ID NO: 44).

Andre aminosyrelinkere spesielt egnet i praktiseringen av foreliggende oppfinnelse, når et hydrofobisk A β -peptid er bundet til en VLP, er CGKKGG (SEQ ID NO: 46), eller CGDEGG (SEQ ID NO: 31) for N-terminale linkere, eller GGKKGC (SEQ ID NO: 45), og GGEDGC (SEQ ID NO: 32), for de C-terminale linkere. For de C-terminale linkere er det terminale cysteinet eventuelt C-terminalt amidert.

I foretrukne utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse er GGCG (SEQ ID NO: 47), GGC eller GGC-NH₂ ("NH₂" står for amidering) linkere ved den C-terminale ende av peptidet eller CGG ved dens N-terminale ende foretrukket som aminosyrelinkere. Generelt innsettes glysinrester mellom store aminosyrer og cysteinet som skal benyttes som det andre tilkoblingssetet for å unngå potensiell sterisk hindring av den store aminosyren i koblingsreaksjonen. I oppfinnelsens mest foretrukne utførelsesform er aminosyrelinkeren GGC-NH₂ fusjonert til den C-terminale ende av A β 1-6.

Cysteinresten som er til stede på A β 1-6-peptidet må være i sin reduserte tilstand for å reagere med den heterobifunksjonelle krysskobleren på den aktiverte VLP, det betyr at en fri cystein eller cysteinrest med en fri sulfhydrylgruppe må være tilgjengelig. I tilfeller der cysteinresten som skal fungere som tilkoblingssete er i en oksidert form, for eksempel om det danner en disulfidbro, er reduksjon av denne disulfidbroen med for eksempel DTT, TCEP eller β -merkaptetanetanol nødvendig. Lave konsentrasjoner av reduserende midler er

kompatible med kobling som beskrevet i WO 02/056905, høyere konsentrasjoner inhiberer koblingsreaksjonen, som en fagperson vil vite, i hvilket tilfelle reduktanten må fjernes eller dens konsentrasjon reduseres for kobling, for eksempel ved dialyse, gelfiltrering eller reversfase ITPLC.

5 Binding av A β 1-6-peptidet til VLP ved anvendelse av en heterobifunksjonell krysskobler i henhold til de foretrukne fremgangsmåtene beskrevet ovenfor, tillater kobling av A β 1-6-peptid til VLP på en orientert måte. Andre fremgangsmåter for å binde A β 1-6-peptidet til VLP inkluderer fremgangsmåter hvor A β 1-6-peptidet er kryssforbundet til VLP'en ved anvendelse av karbodiimid-EDC og NHS. I ytterligere fremgangsmåter er A β 1-6-peptidet festet til VLP ved anvendelse av en

10 homobifunksjonell krysskobler, som glutaraldehyd, DSG, BM[PEO]₄, BS³, (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA), eller andre kjente homobifunksjonelle krysskoblere med funksjonelle grupper reaktive mot aminer eller karboksylgrupper hos VLP'en.

15 Andre fremgangsmåter for å binde VLP'en til et A β 1-6-peptid inkluderer fremgangsmåter hvor VLP'en er biotinyllert, og A β 1-6-peptidet uttrykkes som et streptavidininfusjonsprotein, eller fremgangsmåter hvor både A β 1-6-peptidet og VLP'en er biotinyllert, for eksempel som beskrevet i WO 00/23955. I dette tilfellet kan A β 1-6-peptidet først bindes til streptavidin eller avidin ved justering av forholdet A β 1-6-peptid mot streptavidin slik at frie tilkoblingssteder fortsatt er tilgjengelige for binding av VLP, som

20 tilsettes i det neste trinnet. Alternativt kan alle konponentene blandes samtidig. Andre ligandreseptorpar hvor en løselig form av reseptoren og liganden er tilgjengelig, og er i stand til å kryssbindes til VLP eller A β -6-peptid, kan anvendes som bindingsmidler for å binde A β 1-6-peptid til VLP. Alternativt kan enten liganden eller reseptoren fusjoneres til

25 A β 1-6-peptidet og så mediere binding til VLP'en kjemisk bindes eller fusjoneres respektivt til enten reseptoren eller liganden. Fusjon kan også utføres ved innsetting eller substitusjon.

I en favorisert utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse, som allerede angitt, er VLP av en RNA-bakteriofag, og i en mer foretrukket utførelsesform er VLP av RNA-bakteriofag Q β -kappeprotein.

30

Én av flere antigenmolekyler, dvs. et A β 1-6-peptid, kan tilkobles til en subenhet av VLP-kapsidet fra RNA-bakteriofag-kappeproteiner, fortrinnsvis gjennom de eksponerte lysinrestene av VLP'en av RNA-bakteriofager, dersom sterisk mulig. En spesifikk egenskap av VLP'en fra RNA-bakteriofagkappeprotein og i særdeleshet for Q β -kappeprotein-VLP er

35 således muligheten til å koble flere antigener pr. subenhet. Dette tillater generering av en tett antigenoppstilling.

I en foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen er henholdsvis binding og tilkobling av minst ett A β 1-6-peptid til den virusliknende partikkelen ved henholdsvis

interaksjon og assosiasjon mellom minst ett første tilkoblingssete på den virusliknende partikkelen og minst ett andre tilkoblingssete på antigenet eller antigen determinanten.

VLP'er eller kapsider av Q β -kappeprotein fremviser et definert antall lysinrester på overflaten med en definert topologi med tre lysinrester som peker mot det innvendige av kapsidet, og som interagerer med RNA og fire andre lysinrester som eksponeres mot kapsidets utside. Disse definerte egenskaper favoriserer tilkoblingen av antigener til utsiden av partikkelen fremfor innvendig i partikkelen hvor lysinrester interagerer med RNA. VLP fra andre RNA-fagkappeproteiner har også et definert antall lysinrester på sin overflate og en definert topologi av disse lysinrestene.

I ytterligere foretrukne utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse er det første tilkoblingssetet en lysinrest, og/eller det andre tilkoblingssetet omfatter sulfhydrylgruppe eller en cysteinrest. I en spesielt foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er det første tilkoblingssetet en lysinrest og det andre tilkoblingssetet en cysteinrest.

I spesielt foretrukne utførelsesformer ifølge oppfinnelsen er A β 1-6-peptidet bundet via en cysteinrest til lysinrester hos VLP'en fra RNA-fagkappeprotein, og spesielt til VLP fra Q β -kappeprotein.

En annen fordel av VLP'er derivert fra RNA-fag er deres høye ekspresjonsutbytte i bakterier som tillater produksjon av større materialmengder til overkommelig kostnad.

Som angitt er henholdsvis konjugatene og oppstillingene ifølge foreliggende oppfinnelse forskjellige fra tidligere konjugater i fagfeltet i deres sterkt organiserte struktur, dimensjoner og deres repeterbarhet av antigenet på oppstillingsoverflaten.

Anvendelsen av VLP'ene som bærere tillater dannelse av henholdsvis robuste antigenoppstillinger og konjugater, med variabel antigen tetthet. Anvendelsen av VLP fra RNA-fag, og heved spesielt anvendelsen av VLP fra RNA-fag Q β -kappeprotein, tillater oppnåelse av meget høy epitoptetthet. Nærmere bestemt kan en tetthet på mer enn 1,5 epitoper pr. subenhet nås ved tilkobling av det humane A β 1-6-peptid til VLP fra Q β -kappeprotein. Fremstillingen av sammensetninger av VLP fra RNA-fagkappeproteiner med høy epitoptetthet utføres ved å anvende lærdommen fra denne søknaden. I foretrukne utførelsesformer ifølge oppfinnelsen, når et A β 1-6-peptid er tilkoblet VLP'en fra Q β -kappeprotein, er et gjennomsnittlig antall av A β 1-6-peptid pr. subenhet foretrukket på 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 eller høyere.

Det andre tilkoblingssetet som definert heri, kan enten være naturlig eller ikke-naturlig nærværende til antigenet eller antigen determinanten. I tilfellet av fravær av et egnet, naturlig forekommende, andre tilkoblingssete på antigenet eller antigen determinanten, må et slikt ikke-naturlig andre tilkoblingssete konstrueres til

antigenet.

Som ovenfor beskrevet eksponeres fire lysinrester på VLP'ens overflate fra Q β -kappeprotein. Vanligvis er disse restene derivatiserte ved reaksjon med et krysskoblende molekyl. I tilfeller der ikke alle de eksponerte lysinrestene kan tilkobles et antigen, etterlates lysinrestene som reagerer med krysskobleren med et krysskoblende molekyl festet til ϵ -aminogruppen etter derivatiseringstrinnet. Dette fører til at en eller flere positive ladninger forsvinner, som kan være skadelig for VLP'ens løselighet og stabilitet. Ved å erstatte noen av lysinrestene med argininrester, som i de angitte Q β -kappeproteinmutantene beskrevet nedenfor, hindres den overdrevne forsvinning av positive ladninger, da argininrestene ikke reagerer med krysskobleren. Erstatning av lysinrester med argininrester, kan videre føre til flere definerte antigenoppstillinger, ettersom færre seter er tilgjengelige for reaksjon til antigenet.

Eksponerte lysinrester ble følgelig erstattet med argininer i de etterfølgende Q β --kappeproteinmutantene og mutante Q β -VLP'er angitt i denne søknaden: Q β -240 (Lys13-Arg; SEQ ID NO: 17), Q β -250 (Lys2-Arg, Lys13-Arg; SEQ ID NO: 19) og Q β -259 (Lys2-Arg, Lys16-Arg; SEQ ID NO: 21). Konstruksjonene ble klonet, proteinene uttrykt, VLP'ene renset og benyttet for kobling til peptid- og proteinantigener. Q β -251; (SEQ ID NO: 20) ble også konstruert og beskrivelse av hvordan uttrykke, rense og koble VLP fra Q β -251 kappeprotein kan finnes i søknaden.

I en ytterligere utførelsesform angis en Q β mutant kappeprotein med en ytterligere lysinrest egnet for oppnåelse av antigenoppstillinger med enda større tetthet. Dette mutante Q β -kappeprotein, Q β -243 (Asn10-Lys; SEQ ID NO: 18), ble klonet, proteinet uttrykt, og kapsidet eller VLP'en isolert og renset, som viser at introduksjon av en ytterligere lysinrest er kompatibel med selv-samling av subenhetene til et kapsid eller en VLP. Henholdsvis A β 1-6-peptidoppstillinger og konjugater kan således fremstilles ved anvendelse av VLP fra Q β -kappeproteinmutanter. En spesielt foretrukket fremgangsmåte for å koble antigenet til VLP'er, og nærmere bestemt til VLP'er fra RNA-fagkappeproteiner, er bindingen av en lysinrest til stede på VLP'ens overflate fra RNA-fagkappeproteiner med en cysteinrest tilføyd antigenet, dvs. A β 1-6-peptidet. For at en cysteinrest skal være effektiv som et andre tilkoblingssete, må en sulfhydrylgruppe være tilgjengelig for kobling. En cysteinrest må derfor være i sin reduserte tilstand, det betyr at et fritt cystein eller en cysteinrest med en fri sulfhydrylgruppe må være tilgjengelig. I tilfellet hvor cysteinresten som skal fungere som et andre tilkoblingssete er i en oksidert form, for eksempel om den danner en disulfidbro, er reduksjon av denne disulfidbroen med for eksempel DTT, TCEP eller P-merkapttoetanol nødvendig. Konsentrasjonen av reduktant og det molare overskuddet av reduktant over antigen, må justeres for hvert antigen. Titreringsområdet starter fra konsentrasjoner så lave som 10 μ M eller lavere, opp til 10 til 20 mM eller høyere reduktant testes om nødvendighet, og kobling av antigenet til

bæreren fastsettes. Selv om lave konsentrasjoner av reduktant er kompatible med koblingsreaksjonen, som beskrevet i WO 02/056905, inhiberer høyere konsentrasjoner koblingsreaksjonen, som en fagperson vil vite i hvilket tilfelle reduktanten må fjernes eller dens konsentrasjon reduseres, for eksempel ved dialyse, gelfiltrering eller reversfase HPLC. Fordelaktig er pH på dialyse- eller ekvillibreringsbufferen lavere enn 7, fortrinnsvis 6. Kompatibiliteten til bufferen med lav pH med antigenaktivitet eller -stabilitet må testes.

Epitoptetthet på VLP'en fra RNA-fag kappeproteiner kan moduleres ved valg av krysskobler og andre reaksjonsforhold. Krysskoblerne sulfo-GMBS og sulfo-SMPH tillater for eksempel vanligvis oppnåelse av høy epitoptetthet. Derivatisering påvirkes positivt ved høye reaktantkonsentrasjoner, og manipulering av reaksjonsforholdene kan benyttes for kontroll av antall antigener tilkoblet VLP'er fra RNA-fag kappeproteiner, og spesielt til VLP'er fra Q β -kappeprotein.

Før design av et ikke-naturlig andre tilkoblingssete må posisjonen velges som det skal fusjoneres til, innsettes i eller generelt konstrueres. Posisjonsvalg av det andre tilkoblingssete kan eksempelvis baseres på en krystallstruktur av antigenet. En slik antigenkrystallstruktur kan gi informasjon om tilgjengeligheten av den C- eller N-terminale molekyllende (bestemt for eksempel fra deres mottakelighet for løsemiddel), eller om eksponeringen for løsemiddel av rester egnet for anvendelse som andre tilkoblingssete, slik som cysteinrester. Eksponerte disulfidbroer som i tilfellet får Fab-fragmenter, kan også være kilde for et andre tilkoblingssete, da de generelt kan omdannes til enkle cysteinrester gjennom mild reduksjon med for eksempel 2-merkaptoetylamin, TCEP, P-merkaptoetanol eller DTT. Milde reduksjonsforhold som ikke påvirker immunogenisiteten av antigenet velges. I tilfellet hvor immunisering med et selv-antigen er tilsiktet å inhibere interaksjonen av dette selv-antigen med dens naturlige ligander, vil det andre tilkoblingssetet tilføyes slik at det tillater generering av antistoffer mot setet av interaksjon med de naturlige ligandene. Lokaliseringen av det andre tilkoblingssetet vil således velges slik at sterisk hindring unngås fra det andre tilkoblingssetet eller enhver aminosyrelinker som inneholder den samme. I ytterligere utførelsesformer er en antistoffrespons ønskelig som rettes mot et sete forskjellig fra interaksjonssetet av selv-antigenet med sin naturlige ligand. I slike utførelsesformer kan det andre tilkoblingssetet velges, slik at det hindrer generering av antistoffer mot interaksjonssetet til selv-antigenet med sine naturlige ligander.

Andre kriterier for å velge posisjonen av det andre tilkoblingssetet inkluderer oligomeriseringstrinnet av antigenet, stedet for oligomerisering, nærvær av en kofaktor og tilgjengeligheten av eksperimentelt bevis som angir seter i antigenstrukturen og -sekvensen hvor modifikasjon av antigenet er kompatibelt med selv-antigenets funksjon, eller med genereringen av antistoffer som gjenkjenner selv-antigenet.

I de mest foretrukne utførelsesformene omfatter A β 1-6-peptidet et enkelt andre tilkoblingssete eller et enkelt reaktivt tilkoblingssete i stand til å assosiere med de første tilkoblingssetene på henholdsvis kjernepartikkelen og VLP'ene eller VLP-subenhetene. Dette sikrer henholdsvis en definert og enhetlig binding og assosiasjon av det minst ene,

men vanligvis mer enn et, fortrinnsvis mer enn 10, 20, 40, 80, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 360, 400, 450 antigener til henholdsvis kjernepartikkelen og VLP'en. Anskaffelsen av et enkelt andre tilkoblingssete eller et enkelt reaktivt tilkoblingssete på antigenet sikrer således henholdsvis en enkel og enhetlig type av binding og assosiasjon, som medfører en meget sterk ordnet og repetitiv oppstilling. Om henholdsvis bindingen og assosiasjonen for eksempel er forårsaket av en lysin- (som det første tilkoblingssetet) og cystein- (som et andre tilkoblingssete) interaksjon er det sikret, i samsvar med denne foretrukne utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse, at bare en cysteinrest pr. antigen, uavhengig hvor vidt denne cysteinrest er naturlig eller ikke-naturlig til stede på antigenet er i stand til henholdsvis å binde og assosiere med henholdsvis VLP'en og det tilkoblingssete på kjernepartikkelen.

I noen utførelsesformer krever konstruksjonen av et andre tilkoblingssete på antigenet fusjon av en aminosyrelinker som inneholder en aminosyre egnet som det andre tilkoblingssetet i henhold til angivelsene ifølge oppfinnelsen. I en foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er derfor en aminosyrelinker bundet til antigenet eller antigendeterminanten ved minst en kovalent binding. Fortrinnsvis omfatter aminosyrelinker eller den alternativt består av det andre tilkoblingssetet. I en ytterligere foretrukket utførelsesform omfatter aminosyrelinker en sulfhydrylgruppe eller cysteinrest. I en annen foretrukket utførelsesform er aminosyrelinker cystein. Noen kriterier for valg av aminosyrelinker så vel som ytterligere foretrukne utførelsesformer aminosyrelinker i henhold til oppfinnelsen er allerede nevnt ovenfor.

I en ytterligere foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen er det minst ene antigenet eller antigendeterminanten, dvs. A β 1-6-peptidet, fusjonert til den virusliknende partikkelen. Som beskrevet ovenfor er en virusliknende partikkel vanligvis komponert av minst én subenhet som samles til en virusliknende partikkel. I en videre foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen er således antigenet eller antigendeterminanten fortrinnsvis det minst ene A β 1-6-peptidet fusjonert til minst én subenhet hos den virusliknende partikkelen, eller hos et protein som er i stand til å innlemmes i en virusliknende partikkel som genererer en kimær VLP-subenhet-A β 1-6-peptidproteinfusjon.

Fusjon av A β 1-6-peptidene kan utføres ved innsetting av disse i VLP-subenhetssekvensen-, eller ved fusjon til enten den N- eller C-terminale ende av VLP-subenheten, eller proteinet som er i stand til å innlemmes i en VLP. Når det heretter

refereres til fusjonsproteiner av et peptid til en VLP-subenhet, er fusjonen til begge ender av subenhetssekvensen eller indre innsetting av peptidet i subenhetssekvensen omsluttet.

Fusjon kan også utføres ved innsetting av A β 1-6-peptidsekvensene i en variant av en VLP-subenhet hvor del av subenhetssekvensen er fjernet, som ytterligere er referert til som avkortede mutanter. Avkortede mutanter kan ha N- eller C-terminale, eller indre delesjoner av del av sekvensen av VLP-subenheden. Den spesifikke VLP-HBcAg, med for eksempel fjerning av aminosyrerester 79 til 81 er en avkortet mutant med en indre delesjon. Fusjon av A β 1-6-peptider til enten den N- eller C-terminale ende av de avkortede mutante VLP-subenheterne, fører også til utførelsesformer ifølge oppfinnelsen. På liknende måte kan fusjon av en epitop i sekvensen fra VLP-subenheden også utføres ved substitusjon der for eksempel for den spesifikke VLP-HBcAg'en, aminosyrer 79-81 er erstattet med en fremmed epitop. Som heretter refereres til kan således utføres ved innsetting av A β 1-6-peptidsekvensen i sekvensen til en VLP-subenhet ved substitusjon av del av sekvensen fra VLP-subenheden med A β 1-6-peptidet, eller ved en kombinasjon av delesjon, substitusjon eller innsetting.

Den kimære A β 1-6-peptid-VLP-subenheden vil generelt være i stand til å selvsamles til en VLP. VLP som fremviser epitoper som er fusjonert til deres subenheter er også her referert til som kimære VLP'er. Som angitt omfatter den virusliknende partikkelen, eller den alternativt består av minst en VLP-subenhet. I en ytterligere foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen omfatter den virusliknende partikkelen, eller som den alternativt består av, en blanding av kimære VLP-subenheter og ikke-kimære VLP-subenheter, dvs. VLP-subenheter som ikke har et antigen fusjonert, som fører til såkalte mosaikkpartikler. Dette kan være fordelaktig for å sikre dannelse og samling av en VLP. I disse utførelsesformene kan andelen av kimære VLP-subenheter være 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 prosent eller høyere.

Flankerende aminosyrerester kan tilføyes begge sekvensender fra peptidet eller epitopen som skal fusjoneres til en av VLP-sekvensendene fra subenheden, eller for indre innsetting av slik peptidsekvens inn i VLP-sekvensen fra subenheden. Glysin- og serinrester er spesielt foretrukne aminosyrer for anvendelse i de flankerende sekvensene tilføyd peptidet som skal fusjoneres. Glysinrester konfererer ytterligere fleksibilitet som kan redusere den potensielle destabiliserende effekt ved fusjonering av en fremmed sekvens inn i sekvensen til en VLP-subenhet.

I en ytterligere foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen er VLP'en en VLP fra RNA-bakteriofag. De viktigste kappeproteinene fra RNA-bakteriofag samles spontant til VLP'er ved ekspresjon i bakterier, og nærmere bestemt i *E.coli*. Spesifikke eksempler på bakteriofage kappeproteiner som kan anvendes for fremstilling av sammensetninger ifølge oppfinnelsen, inkluderer kappeproteinene fra RNA-

bakteriofager, slik som bakteriofag Q β (SEQ ID NO: 4; PIR database, adgangsnr. VCBPQ β , som refererer til Q β -CP og SEQ ID NO: 5; adgangsnr. AAA16663 som refererer til Q β -A1-protein) og bakteriofag fr (SEQ ID NO: 7; PIR adgangsnr. VCBPFR).

I en mer foretrukket utførelsesform er det minst ene A β 1-6-peptidet fusjonert til et Q β -kappeprotein. Fusjonsproteinkonstruksjoner hvor epitoper er fusjonerte til den C-terminale ende av en avkortet form av A1-proteinet fra Q β , eller innsatt i A1-proteinet, er beskrevet (Kozlovskaja, T. M. *et al.*, *Intervirology*, 39:9-15 (1996)). A1-proteinet genereres ved stansing ved UGA-stoppekodonet og har en lengde på 329 aa, eller 328 aa, dersom kløvingen ved det N-terminale metioninet er tatt i betraktning. Kløving ved det N-terminale metioninet for en alanin (den andre aminosyren kodet ved Q β -CP-genet) foregår vanligvis i *E.coli*, og sådan er tilfellet for N-terminale ender av Q β -kappeproteinet. Delen av A1-genet, 3' for UGA amberkodon koder for CP-utvidelsen, som har en lengde på 195 aminosyrer. Innsetting av det minst ene A β 1-6-peptidet mellom posisjon 72 og 73 av CP-utvidelsen fører til ytterligere utførelsesformer ifølge oppfinnelsen (Kozlovskaja, T. M. *et al.*, *Intervirology*, 39:9-15 (1996)). Fusjon av et A β 1-6-peptid ved den C-terminale ende hos et C-terminalt avkortet Q β -A1-protein fører til ytterligere foretrukne utførelsesformer ifølge oppfinnelsen. Kozlovskaja, T. M. *et al.*, (*Intervirology*, 39:9-15 (1996) beskriver Q β -A1-proteinfusjoner hvor epitopen er fusjonert ved den C-terminale ende hos Q β -CP-utvidelsen, avkortet ved posisjon 19.

Som beskrevet av Kozlovskaja, T. M. *et al.*, (*Intervirology*, 39:9-15 (1996)) krever samling av partiklene som fremviser de fusjonerte epitopene vanligvis tilstedeværelse av både A1-protein-A β 1-6-peptidfusjonen og villtype-CP for å danne en mosaikkpartikkel. Utførelsesformer som omfatter virusliknende partikler, og herved spesielt VLP'ene fra RNA-bakteriofag-Q β -kappeproteinet, som er eksklusivt komponert av VLP-subenheter med minst ett A β 1-6-peptid fusjonert til seg, er også innenfor rekkevidden av den foreliggende oppfinnelse.

Produksjon av mosaikkpartikler kan utføres ved en rekke måter. Kozlovskaja, T. M. *et al.*, *Intervirology*, 39:9-15 (1996), beskriver tre fremgangsmåter der alle kan anvendes i praktiseringen av oppfinnelsen. I den første tilnærmingen er effektiv fremvisning av den fusjonerte epitopen på VLP'ene mediert på ekspresjonen av plasmidet som koder for Q β -A1-proteinfusjonen som har et UGA-stoppekodon mellom CP og CP-utvidelse i en *E. coli*-stamme som innehar et plasmid som koder for en klonet UGA-undertrykker tRNA, som fører til translasjon av UGA-kodonet til Trp (pISM3001 plasmid (Smiley B. K., *et al.*, *Gene* 134:33-40 (1993))). I en annen tilnærming er CPgen stoppekodonet modifisert til UAA, og et andre plasmid som uttrykker A1-protein-A β 1-6-peptidfusjonen kotransformert. Det andre plasmidet koder for en annen antibiotikaresistens og startstedet for replikasjon er kompatibelt med det første plasmidet (Kozlovskaja, T. M. *et al.*, (*Intervirology*, 39:9-15 (1996)). I en tredje tilnærming er CP

og Al -protein-A β 1-6-peptidfusjonen kodet på en bicistronisk måte, og er operativt forbundet til en promoter, slik som Trp-promoter, som beskrevet i figur 1 av Kozlovskaja, T. M. *et al.*, (*Intervirology*, 39:9-15 (1996)).

I en ytterligere utførelsesform er A β 1-6-peptidet innsatt mellom aminosyre 2 og 3 (nummerert fra det kløvde CP, som betyr hvor det N-terminale metionin er kløvet) fra fr CP, som således fører til et A β 1-6-peptid-fr-CP fusjonsprotein. Vektorer og ekspresjonssystemer for konstruksjon og ekspresjon av fr-CP-fusjonsproteiner som selv-samles til VLP, nyttig i praktiseringen av oppfinnelsen er beskrevet (Pushko P., *et al.*, *Prot. Eng.* 6:883-891 (1993)). I en spesifikk utførelsesform er A β 1-6-peptidsekvensen innsatt i en delesjonsvariant av fr-CP etter aminosyre 2, hvori restene 3 og 4 fra fr-CP er fjernet (Pushko P., *et al.*, *Prot. Eng.* 6:883-891 (1993)).

Fusjon av epitoper i den N-terminale fremstående β -hårnål av RNA-bakteriofag MS-2 kappeprotein, og følgende presentasjon av de fusjonerte epitopene på den selv-samlende VLP fra RNA-bakteriofag MS-2 er også beskrevet (WO 92/13081), og fusjon av A β 1-6-peptidet ved innsetting eller substitusjon i kappeprotein fra MS-2-RNA-bakteriofag faller også innenfor oppfinnelsens rekkevidde.

I foretrukne utførelsesformer ifølge oppfinnelsen er A β 1-6-peptider egnet for generering av vaksiner ifølge oppfinnelsen, modifisert med en aminosyrelinker for binding til en VLP. Disse A β 1-6-peptidene inkluderer, men er ikke begrenset til: A β 1-6 fusjonert C-terminalt til linkeren GGC. Aminosyrelinkere egnet for fusjon til den N-terminale ende av A β 1-6-fragmenter inkluderer, men er ikke begrenset til sekvensen CGG og CGHGKNS. Linkere egnet for fusjon til den C-terminale ende av A β 1-6 inkluderer, men er ikke begrenset til sekvensen GGC. I en foretrukket utførelsesform, når en linker er fusjonert til den C-terminale ende av A β eller A β -fragmenter, er det C-terminale cystein amidert. I en foretrukket utførelsesform er A β 1-6 fusjonert til en aminosyrelinker, og har sekvensen: "NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂", hvor det C-terminale cystein er amidert, som er angitt ved det C-terminale "-CONH₂", og den N-terminale ende av peptidet er fri, som er ytterligere angitt ved "NH₂-". Aminosyrelinkere er fortrinnsvis korte for å unngå induksjon av immunresponser mot aminosyrer fra nevnte linker, men burde tillate induksjon av antistoffer som er kryssreaktive med løselig A β og AD-plakk, og kan fremme interaksjonen av antistoffer med A β 1-6-peptidet. Andre egnede egenskaper av aminosyrelinkeren er fleksibilitet, og fortrinnsvis mangel på store aminosyrer som kan interferere med kobling og/eller generere en immunrespons mot linkeren selv. I mer foretrukne utførelsesformer er aminosyrelinkeren som inneholder en cysteinrest som andre tilkoblingssete fusjonert til den C-terminale ende av A β 1-6-peptidet.

Ytterligere A β -fragmenter egnet i praktiseringen ifølge oppfinnelsen, inkluderer A β -fragmenter som korresponderer til de tidligere nevnte fragmentene, også modifisert som beskrevet ovenfor, fra andre dyrearter og som utløser antistoffer kryssreaktive med

humant amyloid plakk og løselig humant A β . Eksempler på slike fragmenter er A β 1-6 fra primater (DAEFRH; SEQ ID NO: 84), kanin (DAEFRH; SEQ ID NO: 85), marsvin (DAEFRH; SEQ ID NO: 88), mus (DAEFGH; SEQ ID NO: 76), rotte (DAEFGH; SEQ ID NO: 87), og *xaenopus laevis* (DSEYRH; 86).

En rekke dyremodeller for AD, basert på transgene mus som overuttrykker mutante former av humant APP er rapportert (Games, D., *et al.*, *Nature* 373:523-527 (1995a); Sturchier-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)). Disse musemodellene er forskjellige fra hverandre i nivået av overekspressjon av transgenet, AD-mutasjonene som er til stede på transgenet og på promoteren som overekspressjon av transgenet er styrt av. Disse dyremodellene sviker i å fremvise alle de patologiske tegnene på AD, som nærmere bestemt er aldersrelaterte endringer i atferd, avsetning av β -amyloid i uløselige plakk, neurofibrillære sammenfiltringer innen neuroner, og tap av neuroner i forhjernen (Chapman, P. F., *Nature* 408:915-916 (2000)). Hukommelsestap og fremgangsmåter for å identifisere dette, kan imidlertid identifiseres i disse modellene, og kan anvendes for å teste effekten av foreliggende oppfinnelses sammensetning i dyremodeller (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)). Aldersrelatert AP-avsetning til amyloid plakk kan videre studeres i disse modellene, som også utvikler astrocytose og mikrogliose.

EKSEMPLER

EKSEMPEL 1

Henholdsvis kloning og konstruksjon, ekspresjon og rensing av henholdsvis foretrukne kjernepartikler og VLP fra RNA-fag

A. Konstruksjon og ekspresjon av mutante Q β -kappeproteiner, og rensing av mutante Q β -kappeprotein-VLP'er eller kapsider.

Plasmidkonstruksjon og kloning av mutante kappeproteiner

Konstruksjon av pQ β -240:

Plasmid pQ β 10 (Kozlovskaja, T. M., *et al.*, *Gene* 137:133-137) ble anvendt som et utgangsplasmid for konstruksjon av pQ β -240. Mutasjonen Lys13—>Arg ble dannet ved invers PCR. De inverse primerne ble konstruert i inverterte hale-til-hale retninger:

5'-GGTAACATCGGTTCGAGATGGAAAACAACTCTGGTCC-3'

(SEQ ID NO: 48)

og

5'-GGACCAGCGTTTGTGTTTCCATCTCGACCGATGTTACC-3'

(SEQ ID NO: 49).

5 Produktene fra den første PCR ble anvendt som templat for den andre PCR-reaksjonen, hvor en oppstrømsprimer

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

og en nedstrømsprimer

5'-CGATGCATTTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGTCAG-3'

10 (SEQ ID NO: 51)

ble anvendt. Det andre PCR-produktet ble fordøyd med *Xba*I og *Mph*I1031 og klonet inn i pQ β 10 ekspresjonsvektoren, som ble kløvet med de samme restriksjonsenzymene. PCR-reaksjonene ble utført med PCR-sett reagenser og i henhold til produsentens protokoll (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen).

15 Sekvensering ved anvendelse av fremgangsmåten for direkte merkingsinkorporering verifiserte de ønskete mutasjonene. *E.coli*-celler inneholdende pQ β -240 støttet effektiv syntese av 14-kD-protein som migrerte samtidig ved SDS-PAGE med kontroll Q β -kappeprotein isolert fra Q β -fag-partikler.

Resulterende aminosyresekvens: (SEQ ID NO: 17)

20 AKLETVTGLGNIGRDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP
ALEKRVTVSVSQPSRNRKNYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ
KYADVTFSTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY

Konstruksjon av pQ β -243:

25 Plasmid pQ β 10 hale-til-hale retninger:

5'-GGCAAATTAGAGACTGTACTTTAGGTAAGATCGG-3'

(SEQ ID NO: 52)

og

5'-CCGATCTTACCTAAAGTAACAGTCTCTAATTTGCC -3'

30 (SEQ ID NO: 53).

Produktene fra den første PCR ble anvendt som templat for den andre PCR-reaksjonen, hvor en oppstrømsprimer

5'-AGCTCGCCCGGGGATCCTCTAG-3'

(SEQ ID NO: 50) og en nedstrømsprimer

35 5'-GATGCATTTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGTTTCAG-3'

(SEQ ID NO: 51)

ble anvendt. Produktet av den andre PCR ble fordøyet med *Xba*I og *Mph*I1031 og klonet inn i pQ β 10-ekspresjonsvektoren, som ble kløvet med

de samme restriksjonsenzymene. PCR-reaksjonene ble utført med PCR-sett reagenser, og i henhold til produsentens protokoll (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen).

Sekvensering som anvendte direkte merkingsinkorporeringsfremgangsmåte verifiserte de ønskete mutasjoner. *E.coli*-celler som innehar pQ β -243 støttet effektivt syntese av 14-kD-protein som migrerte samtidig med kontroll Q β -kappeprotein isolert fra Q β -fag-partikler for SDS-PAGE.

Resulterende aminosyresekvens: (SEQ ID NO: 18)

AKLETVTLGKIGKDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP

ALEKRVTVSVSQPSNRKNYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ

KYADVTFSTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY

Konstruksjon av pQ β -250:

Plasmid pQ β -240 ble anvendt som utgangsplasmid for konstruksjon av pQ β -250.

Mutasjonen Lys2 $\rightarrow$ Arg ble dannet ved setestyrte mutagenese. En oppstrømsprimer

5'-GGCCATGGCACGACTCGAGACTGTTACTTTAGG-3'

(SEQ ID NO: 54)

og en nedstrømsprimer

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

ble anvendt for syntese av det mutante PCR-fragmentet, som ble introdusert inn i pQ β -185 ekspresjonsvektoren ved de unike restriksjonssetene *Nco*I og *Hind*III. PCR-reaksjonene ble utført med PCR-sett reagenser og i henhold til produsentens protokoll (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen).

Sekvensering som anvendte direkte merkingsinkorporeringsfremgangsmåte verifiserte de ønskete mutasjoner. *E.coli*-celler som innehar pQ β -250 støttet effektivt syntese av 14-kD-protein som migrerte samtidig med kontroll Q β -kappeprotein isolert fra Q β -fag-partikler før PAGE.

Resulterende aminosyresekvens: (SEQ ID NO: 19)

ARLETVTLGNIGRDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP

ALEKRVTVSVSQPSNRKNYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ

KYADVTFSTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY

Konstruksjon av pQ β -251:

Plasmid pQ β 10 ble anvendt som et utgangsplasmid for konstruksjonen av pQ β -251. Mutasjonen Lys16 $\rightarrow$ Arg ble laget ved invers PCR. De inverse primene ble konstruert i inverterte hale-til-hale retninger:

5'-GATGGACGTCAAACCTCTGGTCCTCAATCCGCGTGGGG-3'

(SEQ ID NO: 56)

og

5'-CCCCACGCGGATTGAGGACCAGAGTTTGACGTCCATC-3'

(SEQ ID NO: 57).

Produktene av den første PCR ble anvendt som templat for den andre PCR-reaksjon, hvor en oppstrøms primer

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

og en nedstrøms primer

5'-CGATGCATTTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGTTCA-3'

(SEQ ID NO: 51)

ble anvendt. Produktet av den andre PCR ble fordøyet med *XbaI* og *MphI* og klonet inn i pQ β 10-ekspresjonsvektoren, som ble kløvet med de samme restriksjonsenzymene. PCR-reaksjonene ble utført med PCR-sett reagenser, og i henhold til produsentens protokoll (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen).

Sekvensering som anvendte direkte merkingsinkorporeringsfremgangsmåte verifiserte de ønskete mutasjoner. *E.coli*-celler som innehar pQ β -251 støttet effektivt syntese av 14-kD-protein som migrerte samtidig med kontroll Q β -kappeprotein isolert fra QV-fag-partikler for SDS-PAGE. Den resulterende aminosyresekvensen kodet ved denne konstruksjonen er vist i (SEQ ID NO: 20).

Konstruksjon av pQ β -259:

Plasmidet pQ β -251 ble anvendt som utgangsplasmid for konstruksjonen av pQ β -259. Mutasjonen Lys2→Arg ble laget ved seterettet mutagenese. En oppstrømsprimer

5'-GGCCATGGCACGACTCGAGACTGTTACTTTAGG-3'

(SEQ ID NO: 54)

og en nedstrømsprimer

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

ble anvendt til syntesen av det mutante PCR-fragment, som ble introdusert inn i pQ β -185 ekspresjonsvektoren ved de unike restriksjonssetene *NcoI* og *HindIII*. PCR-reaksjonene ble utført med PCR-sett reagenser og i henhold til produsentens protokoll (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen).

Sekvensering som anvendte direkte merkingsinkorporeringsfremgangsmåte verifiserte de ønskete mutasjoner. *E.coli*-celler som innehar pQ β -259 støttet effektivt syntese av 14-kD-protein som migrerte samtidig med kontroll Q β -kappeprotein isolert fra Q β -fag-partikler for SDS-PAGE.

Resulterende aminosyresekvens: (SEQ ID NO: 21)

AKLETVTLGNIKDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP

ALEKRVTVSQPSRNRKNYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ

KYADVTFSTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAILNPAY

Generelle prosedyrer for ekspresjon og rensing av Q13 og Qii-mutanter

Ekspresjon

E.coli JM109 ble transformert med Q β -kappeprotein ekspresjonsplasmider. 5 ml LB-væskemedium inneholdende 20 μ g/ml ampicillin ble inokulert med kloner transformert med Q β -kappeprotein ekspresjonsplasmider. Den inokulerte kulturen ble inkubert ved 37 °C i 16-24 timer uten risting. Det preparerte inokulatet ble deretter fortynnet 1:100 i 100-300 ml frisk LB-medium, inneholdende 20 μ g/ml ampicillin, og inkubert ved 37 °C over natten uten risting. Det resulterende andre inokulat ble fortynnet 1:50 i M9-medium inneholdende 1 % casaminosyrer og 0,2 % glukose kolber, og inkubert ved 37 °C over natten med risting.

Rensing

Løsninger og buffere for renseprosedyren:

1. Lysisbuffer LB

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

Triton X100 og nylig fremstilt PMSF ved en konsentrasjon på 5 μ g/ml.

Uten lysozym og DNase.

2. SAS

Mettet ammoniumsulfat i vann

3. Buffer NET

20 mM Tris-HCl, pH 7,8 med 5 mM EDTA og

150 NaCl.

4. PEG

40 % (vekt/volum) polyetylglykol 6000 i NET

Ødeleggelse og lysering

Frosne celler ble resuspendert i LB ved 2 ml/g celler. Blandingen ble sonikert med 22 kHz fem ganger i 15 sekunder, med intervaller på ett minutt for å kjøle løsningen på is. Lysatet ble så sentrifugert ved 14 000 rpm i én time ved anvendelse av en Janeei K-60 rotor. Sentrifugeringstrinnene beskrevet ovenfor ble alle utført ved anvendelse av den samme rotoren, med mindre uttrykt på annen måte. Supernatanten ble lagret ved 4 °C, mens cellerester ble vasket to ganger med LB. Etter sentrifugering ble supernatantene fra lysatet og vaskefraksjonene samlet.

Fraksjonering

En mettet ammoniumsulfatløsning ble dråpevis tilsatt under omrøring til det ovenfor samlede lysat. Volumet av SAS ble justert til å være en femdel av totalvolum, for å oppnå 20 % metning. Løsningen ble så hensatt over natten, og ble neste dag sentrifugert

ved 14 000 rpm i 20 minutter. Pelletten ble vasket med en liten mengde 20 % ammoniumsulfat og på nytt sentrifugert. De oppnådde supernatantene ble samlet og SAS ble dråpevis tilsatt for å oppnå 40 % metning. Løsningen ble så hensatt over natten, og neste dag sentrifugert ved 14 000 rpm i 20 minutter. Den oppnådde pelletten ble oppløst i NET-buffer.

Kromatografi

Det gjenoppløste kapsidet eller VLP-proteinet ble lastet på en sefarose CL-4B-kolonne. Tre topper ble eluert under kromatografi. Den første inneholdt hovedsakelig membraner og membranfragmenter, og ble ikke innsamlet. Kapsider ble oppnådd i den andre toppen, mens den tredje inneholdt andre *E.coli*-proteiner.

Toppfraksjonene ble samlet og NaCl-konsentrasjonen ble justert til en sluttkonsentrasjon på 0,65 M. Et volum av PEG-løsning som korresponderte til halvparten av den samlede toppfraksjonen ble dråpevis tilsatt under røring. Løsningen ble så hensatt over natten uten røring. Kapsidproteinet ble sedimentert ved sentrifugering under 14 000 rpm i 20 minutter, og ble så oppløst i et minimalt NETvolum, og igjen lastet på sefarose CL-4B-kolonnen. Toppfraksjonene ble samlet, og utskilt med ammoniumsulfat ved 60 % metning (vekt/volum). Etter sentrifugering og gjenoppløsning i NET-buffer, ble kapsidprotein lastet på sefarose CL-6B-kolonne for rekromatografering.

Dialyse og tørking

Toppfraksjonene som ble oppnådd ovenfor ble samlet og omfattende dialysert mot sterilt vann, og lyofilisert for lagring.

Ekspresjon og rensing av Q β -240

E.coli JM 109-teller som var transformerte med plasmid pQ β -240, ble resuspendert i LB, ultralydbehandlet 5 ganger i 15 sekunder (isvannkappe), og sentrifugert ved 13 000 rpm i én time. Supernatanten ble lagret ved 4 °C inntil ytterligere prosessering, mens restene ble vasket 2 ganger med 9 ml LB, og tilslutt med 9 ml 0,7M urea i LB. Alle supernatanter ble samlet og lastet på sefarose CL-4Bkolonnen. De samlede toppfraksjonene ble utskilt med ammoniumsulfat og sentrifugert. Det gjenoppløste protein ble så ytterligere rensert på en sefarose 2B-kolonne, og tilslutt på en sefarose 6B-kolonne. Kapsidtoppen ble tilslutt omfattende dialysert mot vann og lyofilisert som beskrevet ovenfor. Samlingen av kappeproteinet i et kapsid ble bekreftet ved elektronmikroskopi.

Ekspresjon og rensing av Q β -243

E.coli RR1-celler ble resuspendert i LB og prosessert som beskrevet i den generelle prosedyren. Proteinene ble rensset ved to påfølgende gelfiltreringstrinn på sefarose CL-4B-kolonnen, og tilslutt på en sefarose CL-2B-kolonne. Toppfraksjoner ble samlet og lyofilisert som beskrevet ovenfor. Samlingen av kappeproteinet til et kapsid ble bekreftet ved elektronmikroskopi.

Ekspresjon og rensing av Q β -250

E.coli JM 109-celler, transformert med pQ β -250, ble resuspendert i LB og prosessert som beskrevet ovenfor. Proteinene ble rensset ved gelfiltrering på en sefarose CL-4B-kolonne, og tilslutt på en sefarose CL-2B-kolonne, og lyofilisert som beskrevet ovenfor. Samlingen av kappeproteinet til et kapsid ble bekreftet ved elektronmikroskopi.

Ekspresjon og rensing av Q β -259

E.coli JM 109-celler, transformert med pQ β -259, ble resuspendert i LB og ultralydbehandlet. Restene ble vasket én gang med 10 ml LB og en andre gang med 10 ml 0,7 M urea i LB. Proteinene ble rensset ved to gelfiltreringskromatografitrinn på en sefarose CL-4B-kolonne. Proteinene ble dialysert og lyofilisert som beskrevet ovenfor. Samlingen av kappeproteinet til et kapsid ble bekreftet ved elektronmikroskopi.

B. Kloning, ekspresjon og rensing av rekombinant AP205 VLP

Kloning av AP205-kappeproteingenet

CDNA'et av AP205-kappeprotein (CP) (SEQ ID NO: 28) ble samlet fra to cDNA-fragmenter generert fra fag-AP205-RNA ved anvendelse av en revers transkripsjon-PCR-teknikk og kloning i det konunersielle plasmidet PCR 4-TOPO for sekvensering. Revers transkripsjonsteknikker er velkjent for de med ordinær dyktighet i det relevante faget. Det første fragmentet fra plasmid p205-246 inneholdt 269 nukleotider oppstrøms for CP-sekvensen og 74 nukleotider som koder for de første 24 N-terminale aminosyrer fra CP. Det andre fragmentet i plasmid p205-262 inneholdt 364 nukleotider som koder for aminosyrer 12-131 fra CP, og ytterligere 162 nukleotider nedstrøms for CP-sekvensen. Både p205-246 og p205-262 var en sjenerøs gave fra J. Klovins.

Plasmid 283.-58 ble konstruert i en tottrinns PCR, for å sammenføre begge CP-fragmenter fra plasmidene p205-246 og p205-262 i en fullengde CP-sekvens.

En oppstrømsprimer p1.44 inneholdende *Nco*I-setet for kloning inn i plasmid pQ β 185, eller p1.45 inneholdende *Xba*I-setet for kloning inn i plasmid pQ β 10, og en nedstrømsprimer p1.46 inneholdende *Hind*III-restriksjonssetet, ble anvendt

(restriksjonsenzymets gjenkjenningsssekvens understreket):

p1.44 5'-AACCATGGCAAATAAGCCAATGCAACCG-3' (SEQ ID NO: 79)

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

p1.46 5'-AAAAAGCTTAAGCAGTCGTCTCCGCCGATACG-3' (SEQ ID NO: 81)

5 Ytterligere to primere, p1.47, som sammensmelter ved fragmentets 5' ende i p205-262, og p1.48 som sammensmelter med fragmentets 3' ende i plasmid 205-246, ble anvendt for å amplifisere fragmentene i den første PCR. Primerne p1.47 og p1.48 er komplementære til hverandre.

10 p1.47 5'-GAGTGATCCAACCTCGTTTCTCAACTACATTTTCAGCAAGTCTG-3'
(SEQ ID NO: 82)

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

15 I de to første PCR-reaksjonene ble to fragmenter generert. Det første fragmentet ble generert med primerne p1.45 og p1.48 og templat p205-246. Det andre fragmentet ble generert med primerne p1.47 og p1.46 og templat p205-262. Begge fragmenter ble anvendt som templat for den andre PCR-reaksjonen, en spleise-overlappende utvidelse med primerkombinasjonen p1.45 og p1.46 eller p1.44 og p1.46. Produktet fra de to andretrinns PCR-reaksjonene ble fordøyd med henholdsvis *Xba*I eller *Nco*I, og *Hind*III, og klonet med de samme restriksjonssetene inn i henholdsvis pQβ10 eller pQβ185, to pGEM-deriverte ekspresjonsvektorer under kontroll av *E.coli* tryptofan operon promoter.

20 To plasmider ble oppnådd, pAP283-58 (SEQ ID NO: 27), inneholdende genet som koder for villtype AP205 CP (SEQ ID NO: 28) i pQβ10, og pAP281-32 (SEQ ID NO: 30) med mutasjon Pro5→Thr (SEQ ID NO: 29), i pQβ185. Kappeproteinsekvensene ble verifisert ved DNA-sekvensering. pAP283-58 inneholder 49 nukleotider oppstrøms for ATG-kodonet fra CP, nedstrøms for *Xba*I-setet, og inneholder det antatt opprinnelige ribosomale bindingssetet fra kappeprotein-mRNA.

Ekspresjon og rensing av rekombinant AP205 VLP

A. Ekspresjon av rekombinant AP205 VLP

30 *E.coli* JM109 ble transformert med plasmid pAP283-58. 5 ml LB-væskemedium med 20 µg/ml ampicillin ble inokulert med en enkelt koloni, og inkubert ved 37 °C i 16-24 timer uten risting.

35 Det fremstilte inokulat ble fortynnet 1:100 i 100-300 ml LB-medium inneholdende 20 µg/ml ampicillin og inkubert ved 37 °C over natten uten risting. Det resulterende andre inokulat ble fortynnet 1:50 i 2TY-medium, inneholdende 0,2 % glukose og fosfat for bufring, og inkubert ved 37 °C over natten på en raster. Celler ble høstet ved sentrifugering, og frosset ved -80 °C.

B. Rensing av rekombinant AP205 VLP

Løsninger og buffere:

Lyseringsbuffer

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

5 tritonX100 og PMSF ved 5 µg/ml

SAS

Mettet ammoniumsulfat i vann

Buffer NET

20 mM Tris-HCl, pH 7,8 med 5 mM EDTA, og

10 PEG

40 % (vekt/volum) polyetylglykol 6000 i NET

Lysering:

Frosne celler ble resuspendert i lyseringsbuffer ved 2 ml/g celler. Blandingen ble sonikert med 22kHz fem ganger i 15 sekunder med 1 minutts intervaller for å kjøle
15 løsningen på is. Lysatet ble så sentrifugert i 20 minutter ved 12 000 rpm, ved anvendelse av en F34-6-38 rotor (Eppendorf). Sentrifugeringstrinnene beskrevet nedenfor ble alle utført ved anvendelse av den samme rotoren, med mindre annet er beskrevet. Supernatanten ble lagret ved 4 °C, mens cellerester ble vasket to ganger med lyseringsbuffer. Etter sentrifugering ble supernatantene fra lysatet og vaskefraksjonene
20 samlet.

Ammoniumsulfat bunnfelling kan ytterligere anvendes for rensing av AP205 VLP. I et første trinn er en konsentrasjon av ammoniumsulfat valgt, hvor AP205 VLP ikke bunnfeller. Den resulterende pelletten kastes. I det neste trinnet velges en ammoniumsulfatkonsentrasjon hvor AP205 VLP kvantitativt utskilles, og AP205 VLP
25 isoleres fra pelletten fra dette utskillingstrinnet ved sentrifugering (14 000 rpm i 20 minutter). Den oppnådde pelletten oppløses i NET-buffer.

Kromatografi:

Kapsidproteinet fra de samlede supernatantene ble lastet på en sefarose 4Bkolonne
30 (2,8 x 70 cm), og eluert med NET-buffer ved 4 ml/time/fraksjon. Fraksjoner 28-40 ble samlet og bunnfelt med ammoniumsulfat på 60 % metning. Fraksjonene ble analysert ved SDS-PAGE og western blot med et antiserum spesifikt for AP205 for bunnfelling. Pelletten som ble isolert ved sentrifugering ble gjenoppløst i NET-buffer og lastet på en sefarose 2B-kolonne (2,3 x 65 cm), eluert ved 3 ml/time/fraksjon. Fraksjonene ble
35 analysert ved SDS-PAGE og fraksjonene 44-50 ble innsamlet, samlet og presipitert med

ammoniumsulfat med 60 % metning. Pelletten som ble isolert ved sentrifugering ble gjenoppløst i NET-buffer, rensset på en sefarose 6B-kolonne (2,5 x 47 cm), eluert ved 3 ml/time/fraksjon. Fraksjonene ble analysert ved SDS-PAGE. Fraksjonene 23-27 ble samlet, saltkonsentrasjonen justert til 0,5 M og bunnfelt med PEG 6000, tilsatt fra en 40 % lagerløsning i vann, og til en sluttkonsentrasjon på 13,3 %. Pelletten isolert ved sentrifugering ble gjenoppløst i NET-buffer, og lastet på den samme sefarose 2B-kolonne som ovenfor, og eluert på den samme måten. Fraksjonene 43-53 ble innsamlet og utfelt med ammoniumsulfat med metningsgrad på 60 %. Pelletten som ble isolert ved sentrifugering ble gjenoppløst i vann, og den oppnådde proteinløsning ble grundig dialysert mot vann. Omkring 10 mg av rensset protein/gram av celler kunne isoleres.

Undersøkelse av de virusliknende partiklene i elektronmikroskopi viste at de var identiske til fag-partiklene.

EKSEMPEL 2

Innsetting av et peptid inneholdende en lysinrest i epitopen c/e1 av HBcAg (1-149)

c/e1-epitopen (restene 72 til 88) av HBcAg er lokalisert i enderegionen på overflaten av hepatitt B-viruskapsidet (HBcAg). En del av denne regionen (prolin 79 og alanin 80) ble genetisk erstattet av peptidet Gly-Gly-Lys-Gly-Gly (SEQ ID NO: 33), som resulterte i HBcAg-Lys konstruksjonen (SEQ ID NO: 26). Den introduserte lysinresten inneholder en reaktiv aminogruppe i sin sidekjede som kan anvendes for intermolekylær, kjemisk krysskobling av HBcAg-partikler med ethvert antigen inneholdende en fri cysteingrouppe.

HBcAg-Lys DNA som har aminosyresekvensen vist i SEQ ID NO: 78, ble generert ved PCR: De to fragmentene som koder HBeAg-fragmenter (aminosyrerestene 1 til 78 og 81 til 149) ble amplifisert separat ved PCR. Primerne som ble benyttet for disse PCR introduserte også en DNA-sekvens som koder Gly-Gly-Lys-Gly-Gly-peptidet (SEQ ID NO: 33). HBcAg (1 til 78)-fragmentet ble amplifisert fra pEco63 ved anvendelse av primerne EcoRIHBcAg(s) og Lys-HbcAg(as). HBcAg (81 til 149)- fragmentet ble amplifisert fra pEco63 ved anvendelse av primerne Lys-HBcAg(s) og HbcAg(1-149)Hind(as). Primerne Lys-HBcAg(as) og Lys-HBcAg(s) introduserte komplementre DNA-sekvenser ved endene av de to PCR-produktene, som tillot fusjon av de to PCR-produktene i en påfølgende samlende PCR. De samlede fragmentene ble amplifiserte ved PCR ved anvendelse av primerne EcoRIHBeAg(s) og HBcAg(1- 149)Hind(as).

For PCR ble 100 pmol av hver oligo og 50 ng av templat-DNA anvendt i den 50 ml reaksjonsblandingen med to enheter av Pwo polymerase, 0,1 mM dNTP og 2 mM MgSO₄. For begge reaksjonene ble temperatursykluser utført som følger: 94 °C i 2 minutter; 30 sykluser på 94 °C (1 minutt), 50 °C (1 minutt), 72 °C (2 minutter).

Primersekvenser:

EcoRIHBcAg(s):

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

Lys-HBcAg(as):

(5'-CTAGAGCCACCTTTGCCACCATCTTCTAAATTAG-
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).

For fusjon av de to PCR-fragmentene ved PCR 100 pmol av primere
EcoRIHBcAg(s) og HBcAg(1-149)Hind(as) ble anvendt med 100 ng av de to rensede
PCR-fragmenter i en 50 ml reaksjonsblanding inneholdende 2 enheter av Pwo
polymerase, 0,1 mM dNTP og 2 mM MgSO₄. PCR sykliseringsbetingelser var: 94 °C 2
minutter; 30 sykluser på 94 °C (1 minutt), 50 °C (1 minutt), 72 °C (2 minutter). Det
samlete PCR-produkt ble analysert ved agarosegel elektroforese, rensing og fordøyd i 19
timer i en passende buffer med *EcoRI*- og *HindIII*-restriksjonsenzymmer. Det fordøyde
DNA-fragment ble ligert inn i *EcoRI/HindIII*-fordøyd pKK-vektor for å generere pKK-
HBcAg-Lys-ekspresjonsvektor. Innsetting av PCR-produktet i vektoren ble analysert
ved *EcoRI/HindIII*-restriksjonsanalyse og DNA-sekvensering av innskuddet.

EKSEMPEL 3

Ekspressjon og rensing av HBcAg-Lys

E.coli-stammer K802 eller JM109 ble transformert med pKK-HBcAg-Lys. 1 ml
av en over natten bakteriekultur ble anvendt for å inokulere 100 ml LB-medium
inneholdende 100 µg/ml ampicillin. Denne kulturen ble dyrket i 4 timer ved 37 °C inntil
en OD⁶⁰⁰ på omtrentlig 0,8 var oppnådd. Induksjon av syntesen av HBcAg-Lys ble utført
ved tilsetting av IPTG til en sluttkonsentrasjon på 1 mM. Etter induksjon ble bakterier
ytterligere ristet ved 37 °C i 4 timer. Bakterier ble høstet ved sentrifugering på 5000 x g i
15 minutter. Pelletten ble nedfrosset ved -80 °C. Pelletten ble tint og resuspendert i
bakterielysisbuffer (10 mM Na₂HPO₄, pH 7,0, 30 mM NaCl, 0,25 % Tween-20, 10 mM
EDTA) supplert med 200 µg/ml lysozym og 10 µl Benzonase (Merck). Celler ble
inkubert i 30 minutter ved romtemperatur og ødelagt ved sonikering. *E.coli*-celler
inneholdende pKK-HBcAg-Lys ekspresjonsplasmid eller et kontrollplasmid ble anvendt

for induksjon av HBcAg-Lys ekspresjon med IPTG. For tilsetning av IPTG ble en prøve fjernet fra bakteriekulturen, som bærer pKK-HBcAgLys-plasmidet og fra en kultur som bærer kontrollplasmidet. 4 timer etter tilsetning av IPTG ble prøver igjen fjernet fra kulturen inneholdende pKK-HBcAg-Lys og fra kontrollkulturen. Proteinekspresjon ble kontrollert ved SDS-PAGE, etterfulgt av Coomassie-farging.

Lysatet ble deretter sentrifugert i 30 minutter ved 12000 x g for å fjerne uløselige cellerester. Supernatanten og pelletten ble analysert ved western blotting ved anvendelse av et monoklonalt antistoff mot HBcAg (YVS1841, innkjøpt fra Accurate Chemical and Scientific Corp., Westbury, NY, USA), som anga at en betydelig mengde HBcAg-Lys-protein var løselig. I korthet ble lysater fra *E.coli*-celler som uttrykker HBcAg-Lys og fra kontrollceller sentrifugert ved 14000 x g i 30 minutter. Supernatant (= løsefig fraksjon) og pellett (= uløselig fraksjon) ble separert og fortynnet med SDS prøvebuffer til like volum. Prøver ble analysert ved SDS-PAGE etterfulgt av western blotting med anti-HBcAg monoklonalt antistoff YVS1841.

Det klarete cellelysate ble anvendt for trinngradient sentrifugering ved anvendelse av en sukrose trinngradient bestående av 4 ml 65 % sukrosløsning overlatt med 3 ml 15 % sukrosløsning etterfulgt av 4 ml bakterielt lysat. Prøven ble sentrifugert i 3 timer med 100 000 x g ved 4 °C. Etter sentrifugering ble 1 ml av fraksjoner fra toppen av gradienten samlet og analysert ved SDS-PAGE etterfulgt av Coomassie-farging. HBcAg-Lys proteinet ble påvist ved Coomassie-farging.

HBcAg-Lys proteinet ble anrikt ved grenseflaten mellom 15 og 65 % sukrose som indikerte at det var dannet en kapsidpartikkel. Det meste av de bakterielle proteinene forble i den sukrorefrie, øvre delen av gradienten, derfor førte trinngradientsentrifugering av HBcAg-Lys partiklene til anriking og delvis rensing av partiklene.

Ekspresjon og rensing av HBcAg-Lys i storskala ble utført som følger. En overnatten-kultur ble fremstilt ved inokulering av en enkelt koloni i 100 ml LB, 100 µg/ml ampicillin og dyrking av kulturen over flatten ved 37 °C. 25 ml av forkulturen ble fortynnet i 800 ml LB ampicillinmedium den påfølgende dagen, og kulturen ble dyrket til en optisk tetthet på OD⁶⁰⁰ på 0,6-0,8. Kulturen ble så indusert med 1 mM IPTG, og fikk gro i ytterligere 4 timer. Cellene ble høstet og lysert hovedsakelig som beskrevet ovenfor.

HBcAg-Lys ble så rensert ved først å utskille proteinet med ammoniumsulfat (30 % metning) fra det klarete cellelysate, så ble den gjenoppløste pelletten lastet på en gelfiltreringskolonne (Sephacryl 5-400, Pharmacia). De samlede fraksjonene ble igjen utskilt med ammoniumsulfat, pellettene gjenoppløst og lastet en andre gang på den samme gelfiltreringskolonnen. Fraksjonene ble tilslutt samlet og konsentrert, og konsentrasjonen ble fastsatt ved anvendelse av en Bradford test (BioRad).

EKSEMPEL 4**Konstruksjon av et HBcAg fritt for frie cysteinrester, og inneholdende en innsatt lysinrest**

Et hepatitt kjerneantigen (HBcAg), referert til heri som HBcAg-lys-2cys-Mut, fritt
 5 for cysteinrester ved posisjonene som samsvarer med 48 og 107 i SEQ ID NO: 25, og
 inneholdende en innsatt lysinrest, ble konstruert ved anvendelse av følgende
 fremgangsmåter.

De to mutasjonene ble introdusert ved først separat å amplifisere tre fragmenter av
 HBcAg-Lys genet fremstilt som ovenfor i eksempel 2 med de følgende PCR-
 10 primerkombinasjonene. PCR-fremgangsmåter og konvensjonelle kloningsteknikker ble
 anvendt for å fremstille HBcAg-lys-2cys-Mut genet.

I korthet ble de følgende primerne benyttet for fremstilling av fragment 1:

Primer 1. *EcoRI*HBcAg(s)

CCGGAATTCATGGACATTGACCCTTATAAAG (SEQ ID NO: 58)

Primer 2: 48as

GTGCAGTATGGTGAGGTGAGGAATGCTCAGGAGACTC (SEQ ID NO: 62)

De følgende primere ble anvendt for fremstilling av fragment 2:

Primer 3: 48s

GSGTCTCCTGAGCATTCTCACCTCACCATACTGCAC (SEQ ID NO: 63)

Primer 4: 107as

CTTCCAAAAGTGAGGGAAGAAATGTGAAACCAC (SEQ ID NO: 64)

De følgende primere ble anvendt for fremstilling av fragment 3:

Primer 5: HbcAg149hind-as

CGCGTCCCAAGCTTCTAAACAACAGTAGTCTCCGGAAGCGTTGATAG
 25 (SEQ ID NO: 65)

Primer 6:107s

GTGGTTTCACATTTCTTCCTCACTTTTGGAAG (SEQ ID NO: 66)

Fragmentene 1 og 2 ble deretter kombinert med PCR primerne *EcoRI*HBcAg(s) og
 107as som ga fragment 4. Fragment 4 og 3 ble så kombinert med primerne
 30 *EcoRI*HBcAg(s) og HbcAg149hind-as som produserte fullengde-genet. Fullengde-
 genet ble så fordøyd med *EcoRI* (GAATTC)- og *HindIII* (AAGCTT)-enzymene og
 klonet inn i pKK-vektoren (Pharmacia) kuttet ved de samme restriksjonssetene.
 Ekspresjon og rensing av HBcAg-lys-2cys-Mut ble utført som beskrevet i eksempel 3.

EKSEMPEL 5**Konstruksjon av HBcAg1-185-Lys**

Hepatitt kjerneantigen (HBcAg) 1-185 ble modifisert som beskrevet i eksempel 2. En del av c/el-epitop (restene 72 til 88) regionen (prolin 79 og alanin 80) ble genetisk erstattet ved peptidet Gly-Gly-Lys-Gly-Gly (SEQ ID NO: 33), som resulterte i HBcAgLys konstruksjonen (SEQ ID NO: 26). Den introduserte lysinresten inneholder en reaktiv aminogruppe i sin sidekjede og kan anvendes for intermolekylær, kjemisk kryssbinding av HBcAg-partikler med ethvert antigen inneholdende en fri cysteingrouppe. PCR-fremgangsmåter og konvensjonelle kloningsteknikker ble anvendt for fremstilling av HBcAg1-185-Lys-genet.

Gly-Gly-Lys-Gly-Gly (SEQ ID NO: 33), ble innsatt ved amplifisering av to separate fragmenter av HBcAg-genet fra pEco63, som beskrevet ovenfor i eksempel 2 og ved deretter å sammenføre de to fragmentene ved PCR for å samle fullengde-genet. De følgende PCR-primerkombinasjonene ble anvendt:

Fragment 1:

Primer 1: EcoRIHBcAg(s) (SEQ ID NO: 58) (se eksempel 2)

Primer 2: Lys-HBcAg(as) (SEQ ID NO: 59) (se eksempel 2)

Fragment 2:

Primer 3: Lys-HBcAg(as) (SEQ ID NO: 60) (se eksempel 2)

Primer 4: HBcAgwtHindIII

CGCTCCCAAGCTTCTAACATTGAGATTCCCGAGATTG (SEQ ID NO: 67)

Samling:

Primer 1: EcoRIHBcAg(s) (SEQ ID NO: 58) (se eksempel 2)

Primer 2: HBcAgwtHindIII (SEQ ID NO: 67)

Det samlede fullengde-genet ble så fordøyd med *EcoRI* (GAATTC)- og *HindIII* (AAGCTT)-enzymene og klonet inn i pKK-vektoren (Pharmacia) kuttet ved de samme restriksjonssetene.

EKSEMPEL 6**Fusjon av en peptidepitop i MIR-regionen til HBcAg.**

HBcAg1-185 restene 79 og 80 ble substituert med epitopen CεH3 av sekvensen VNLTWSRASG (SEQ ID NO: 68). CεH3-sekvensen stammer fra sekvensen fra det tredje konstante domenet av den tunge kjeden fra humant IgE. Epitopen ble innsatt i HBcAg1-185

sekvensen ved anvendelse av en samlende PCR-fremgangsmåte. I det første PCR-trinnet ble HBcAg1-185 genet, med opprinnelse fra ATCC-klonen pEco63 og amplifisert med primerne HBcAg-wt *EcoRI* fwd, og HBcAg-wt *HindIII* rev, anvendt som templat i to separate reaksjoner for å amplifisere to fragmenter som inneholdt sekvenser som koder for CεH3-sekvensen. Disse to fragmentene ble så samlet i et andre PCR-trinn i en samlende PCR-reaksjon.

Primerkombinasjoner i det første trinnet: CεH3fwd med HBcAg-wt *HindIII*rev og HBcAg-wt *EcoRI* fwd med CεH3rev. I den samlende PCR-reaksjonen ble de to fragmentene som ble isolert i det første PCR-trinnet, først samlet under tre PCR-sykluser uten ytre primere, som ble tilsatt reaksjonsblandingen etterpå under de neste 25 syklusene. Ytre primere: HBcAg-wt *EcoRI* fwd og HBcAg-wt *HindIII* rev.

PCR-produktet ble klonet inn i pKK223.3 ved anvendelse av *EcoRI*- og *HindIII*-setene for ekspresjon i *E.coli* (se eksempel 2). Den kimære VLP ble uttrykt i *E.coli* og renses som beskrevet i eksempel 2. Elueringsvolumet som HBcAg1-185-CεH3 eluerte fra i gelfiltreringen, viste samling av fusjonsproteinene til en kimær VLP.

Primersekvenser:

CεH3fwd:

5' GTTAACTTGACCTGGTCTCGTGCTTCTGGTGCATCCAGGGATCTAGTAGTC 3'
(SEQ ID NO: 69)

V N L T W S R A S G A 80 S R D L V V 86 (SEQ ID NO: 70)

CεH3rev:

5' ACCAGAAGCACGAGACCAGGTCAAGTTAACATCTTCCAAATTATTACCCAC 3'
(SEQ ID NO: 71)

D 78 E L N N G V 72 (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)

EKSEMPEL 7**Fusjon av A β 1-6-peptid i MIR-regionen til HBcAg**

Restene 79 og 80 til HBcAg1-185 er substituerte med A β 1-6-peptidet til sekvensen: DAEFRH (SEQ ID NO: 75) eller DAEFGH (SEQ ID NO: 76). To overlappende primere ble konstruert ved anvendelse av den samme strategi som beskrevet i eksempel 6, og fusjonsproteinet ble konstruert ved samlende PCR. PCRproduktet klones inn i pKK223.3 vektoren og uttrykkes i *E.coli* K802. De kimære VLP'ene uttrykkes og renses som beskrevet i eksempel 3.

EKSEMPEL 8**Fusjon av et A β 1-6-peptid til den C-terminale ende av Q β A1-proteinet avkortet i posisjon 19 av CP-utvidelsen**

En primer som smelter sammen med den 5' ende av Q β A1-genet og en primer som smelter sammen med den 3' ende av A1-genet og som omfatter ytterligere et sekvenselement som koder A β 1-6-peptidet av sekvens DAEFRH (SEQ ID NO: 85) eller DAEFGH (SEQ ID NO: 76), anvendes i en PCR-reaksjon med pQ β 10 som templat. PCR-produktet klones inn i p β 10 (Kozlovskaja, T. M. *et al.*, *Gene* 137:133-37 (1993)), og den kimære VLP uttrykkes og renses som beskrevet i eksempel 1.

EKSEMPEL 9**Innsetting av et A β 1-6-peptid mellom posisjonene 2 og 3 hos fr kappeprotein**

Komplementære primere som koder sekvensen av A β 1-6-peptidet fra sekvens DAEFRH (SEQ ID NO: 75) eller DAEFGH (SEQ ID NO: 76), inneholdende *Bsp119I* kompatible ender og nukleotider i tillegg, som muliggjør innsetting i leseramme innsettes i *Bsp119I*-setet hos pFrd8-vektoren (Pushko P., *et al.*, *Prot. Eng.* 6:883-891 (1993)) ved standard molekylærbiologiske teknikker. Alternativt er overhengene hos pFrd8-vektoren fylt med Klenow etter fordøyning med *Bsp119I*, og oligonukleotider som koder sekvensen av A β 1-6-peptidet og ytterligere nukleotider for kloning i leseramme liges inn i pFrd8 etter Klenow-behandlingen. Kloner med innskuddet i den riktige orienteringen analyseres ved sekvensering. Ekspresjon og rensing av det kimære fusjonsproteinet i *E.coli* JM109 eller *E.coli* K802 utføres som beskrevet av Pushko P., *et al.*, *Prot. Eng.* 6:883-891 (1993), men de kromatografiske trinnene utføres ved anvendelse av en sefarose CL-4B eller Sephacryl S-400 (Pharmacia) kolonne. Cellelysats utskilles med ammoniumsulfat, og renses ved to påfølgende gelfiltreringsrensetrinn, liknende fremgangsmåten beskrevet for Q β i eksempel 1.

EKSEMPEL 10**Innsetting av et A β 1-6-peptid mellom posisjonene 67 og 68 hos Ty1-protein p1 i vektoren pOGS8111**

To komplementære oligonukleotider som koder A β 1-6-peptidet av sekvens DAEFRH (SEQ ID NO: 75) eller DAEFGH (SEQ ID NO: 76) med kompatible ender til *NheI*-setet hos pOGS8111 syntetiseres. Ytterligere nukleotider tilføres for å tillate innsetting i leseramme av en sekvens som koder A β 1-6-peptidet i henhold til beskrivelsen av EP677111. Aminosyrene AS og SS som flankerer den innsatte epitopen kodes ved de endrete *NheI*-setene som resulterer fra innsettingen av oligonukleotidet i Tya(d)-genet av pOGS8111.

pOGS8111 transformeres inn i *S.cerevisiae*-stamme MC2 for ekspresjon av den kimære Ty VLP, som er beskrevet i EP0677111 og referansene deri. Den kimære Ty VLP renses ved sukrosegradient ultrasentrifugering, som er beskrevet i EP677111.

EKSEMPEL 11**Innsetting av et A β 1-6-peptid inn i det viktigste kapsidproteinet L1 fra papillomavirus type 1 (BPV-1)**

En sekvens som koder A β 1-6-peptidet med sekvensen DAEFRH (SEQ ID NO: 75) eller DAEFGH (SEQ ID NO: 76) substitueres til sekvensen som koder aminosyrene 130-136 fra BPV-L1-genet som kloneres inn i pFastBac1 (Gibco/BRL) vektoren som beskrevet (Chackerian, B. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. USA* 96:2373-2378 (1999)). Konstruksjonssekvensen verifiseres ved nukleotidsekvensanalyse. Rekombinant baculovirus system genereres ved anvendelse av Gibco/BRL baculovirus system som beskrevet av produsenten. De kimære VLP'ene renses fra baculovirusinfekterte Sf9-celler, som beskrevet av Kinibauer, R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:12180-84 (1992) og Greenstone, H. L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:1800-05 (1998).

EKSEMPEL 12**Immunisering av mus med A β 1-6-peptid fusjonert til VLPer**

Kimære VLP'er som fremviser A β 1-6-peptidet av sekvens DAEFRH (SEQ ID NO: 75) eller DAEFGH (SEQ ID NO: 76) generert i eksemplene 7-11 benyttes for immunisering av humane transgeniske APP-mus eller C57/BL6-mus, som beskrevet i eksemplene 13 og 14. Serum oppnådd fra de immuniserte musene analyseres ved en A β 1-6-peptid eller A β 1-40 eller A β 1-42 spesifikk ELISA, som beskrevet i eksempel 13.

Den beskyttende vaksineeffekten eksamineres ved immunisering av en stor

gruppe humane APP-transgeniske mus, som beskrevet i eksempel 14.

EKSEMPEL 13

Kobling av A β 1-6-peptid til Q β VLP (Q β A β 1-6), og immunisering av mus med Q β A β 1-6

A. Kobling av A β 1-6-peptid Q β VLP.

A β 1-6-peptidet (sekvens: NH₂-DAEFREGGC-CONH₂) (SEQ ID NO: 77) ble kjemisk syntetisert; utgangsgruppen NH₂ indikerte at peptidet har en fri N-terminal og den terminale NH₂-gruppen indikerer at peptidet har en amidert karboksy terminalende. Q β VLP ble uttrykt og renset som beskrevet i eksempel 1. Q β VLP i 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 8,2 (HBS, pH 8,2) ble omsatt ved en konsentrasjon på 2 mg/ml (bestemt i en Bradford test), med 1,43 mM SMPH (Pierce, Rockford, IL), fortynnet fra en lagerløsning i DMSO i 30 minutter ved romtemperatur (RT). Reaksjonsblandingen ble så dialysert mot HBS, pH 8,2 buffer ved 4 °C, og omsatt med 0,36 mM A β 1-6-peptid, fortynnet i reaksjonsblandingen fra en 50 mM lagerløsning i DMSO. Koblingsreaksjonen fortsatte i 2 timer ved 15 °C, og reaksjonsblandingen ble dialysert 2 x 2 timer mot et 1000 gangers volum HBS, pH 8,2, og hurtig frosset i flytende nitrogen i alikvoter for lagring ved -80 °C inntil videre anvendelse.

En alikvot ble tint, og kobling av A β 1-6-peptidet til Q β VLP subenheter fastsatt ved SDS-PAGE og proteinkonsentrasjonen målt i en Bradford test. Resultatet av koblingsreaksjonene er vist i figur 1.

Figur 1 viser SDS-PAGE analysen av koblingsreaksjonen av A β 1-6-peptid og Q β VLP. Prøvene ble kjørt under reduserende forhold på 16 % Tris-glysin gel, farget med Coomassie Brilliant Blue. Spor 1 er proteinmarkøren med korresponderende molekulære masser angitt på venstre kant av gelen; spor 2, derivatisert Q β VLP-protein; spor 3, supernatanten av koblingsreaksjonen av Q β VLP protein til A β 1-6-peptidet; spor 4, pelletten av koblingsreaksjonen av Q β VLP protein til A β 1-6-peptidet. Koblingsprodukter som korresponderer til koblingen av 1, 2 og 3 peptider pr. monomer er angitt ved piler i figuren. Mer enn 1,5 peptider pr. subenhet var gjennomsnittlig koblet; nesten ingen subenheter var etterlatt ukoblet.

B. Immunisering av mus med A β 1-6-peptid koblet til Q β VLP og analyse av immunrespons.

Q β VLP koblet til A β 1-6-peptid (her betegnet som Q β -A β -1-6) ble injisert subkutan i 3 mus ved dag 0 og 14. A β 1-6-peptid ble tilkoblet Q β VLP protein som beskrevet ovenfor. Hver mus (C57BL/6) ble immunisert med 10 mg vaksine fortynnet i PBS til 200 μ l. Mus ble retroorbitalt tappet for blod på dag 21, og titeren av antistoffer

spesifikke for A β 1-6-peptidet ble målt i en ELISA mot A β 1-6. A β 1-6-peptidet ble tilkoblet bovint RNase A ved anvendelse av den kjemiske krysskobleren sulfo-SPDP. ELISA-plater ble belagt med koblete RNase preparater ved en konsentrasjon på 10 μ g/ml. Platene ble blokkert og deretter inkubert med seriefortynnet museserum. Bundne antistoffer ble påvist med enzymatisk merkete anti-mus IgG-antistoffer. Som kontroll ble preimmunt serum fra de samme musene også testet. Resultatene er vist i figur 2.

Figur 2 viser en ELISA-analyse av IgG-antistoffene spesifikke for A β 1-6-peptid i serum fra mus immunisert mot A β 1-6-peptidet tilkoblet Q β VLP. Resultatene er vist for de tre musene immunisert (A1-A3), det preimmune serum er indikert som "pre" i figuren; resultatene for ett preimmunt serum er vist. Sammenlikning av preimmunt serum med serum fra mus immunisert med "Qb-A β -1-6" viser at en sterk spesifikk antistoffrespons mot A β 1-6-peptid kunne oppnås i fravær av adjuvans.

C. ELISA mot A β 1-40-peptid.

Humant A β 1-40-peptid- eller A β 1-42-peptid-lagerløsning ble laget i DMSO og fortynnet i coating buffer for anvendelse. ELISA-plater ble belagt med 0,1 μ g/brønn A β 1-40-peptid. Platene ble blokkert og så inkubert med seriefortynnet museserum oppnådd ovenfor. Bundne antistoffer ble påvist med enzymatisk merket anti-mus-IgG- antistoff. Som kontroll ble også serum inkludert som ble oppnådd for vaksinasjon. Serumfortynningen som viste en middelvei som var tre standardavvik over grunnlinjen, ble beregnet og definert som "ELISA-titer". Ingen spesifikke antistoffer ble påvist i preimmunt serum. Titeren oppnådd for de tre musene var på 1:100 000, som viser en sterk spesifikk immunrespons mot A β 1-40. Immunisering med A β 1-6 tilkoblet Q β VLP frembringer således sterke antistofflittere som er kryssreaktive med A β 1-40.

Figur 3 viser resultatet av ELISA. ELISA-signalet som den optiske tettheten ved 405 nm oppnådd fra serum fra tre mus (A1-A3) immunisert med A β 1-6-peptid tilkoblet Q β VLP, som beskrevet ovenfor, er avmerket for hver fortynning, angitt på x-aksen. Resultatet for de tre-musene som ble tappet for blod på dag 21 er vist. Også inkludert er et pre-immunt serum. Titeren av antistoffene i serum ble bestemt, som angitt ovenfor, og var på 1:100 000 for alle tre musene.

EKSEMPEL 14

Immunisering av humant APP transgeniske mus

8 måneder gamle APP23 hunnmus som bærer et humant APP transgen (Sturehler-Pierrat *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 94:13287-13292 (1997)) anvendes for vaksinasjon. Musene injiseres subkutan med 25 μ g vaksine fortynnet i sterilt PBS, og 14 dager senere forsterket med den samme mengde vaksine. Musene ble blodtappet fra

halevenen for immuniseringsstart, og syv dager etter forsterkes injeksjonen. Serum analyseres for tilstedeværelse av antistoffer spesifikke til et A β 1-6, til A β 1-40 og A β 1-42 ved ELISA, som beskrevet i eksempel 13.

EKSEMPEL 15

5 Kobling av murint A β 1-6 til Q β VLP, injeksjon av vaksine i mus, og analyse av immunresponsen

Murint A β 1-6-peptid (sekvens: NH₂-DAEFGHG₂-CONH₂) (SEQ ID NO: 78) er kjemisk syntetisert, og anvendt for kobling til Q β VLP, som beskrevet i eksempel 13. Vaksinen injiseres i C57BL/6-mus, og titeren av de utløste antistoffene mot murint A β 1-6, murint A β 1-40 og murint A β 1-42 bestemmes. Immuniseringen og ELISA-bestemmelsen utføres som
10 beskrevet i eksempel 13.

EKSEMPEL 16

Binding av serum utløst mot A β 1-6 til humant APP transgenisk museplakk og AD-plakk

15 Immunhistokjemi i hjernesnitt.

Etterfølgende parafin hjernesnitt fra en 18 måneder gammel heterozygot APP23-mus og entorhinale cortexsnitt fra en AD pasient Braak trinn III (Institutt for patologi, Basel universitet), ble anvendt for farging. Antigenisitet ble forsterket ved å behandle humane hjernesnitt med konsentrert maursyre i fem minutter og hjernesnitt fra mus ved
20 mikrobølgeopvarming ved 90 °C i 3 minutter. Serum fra mus utløst mot humant A β 1-6 (oppnådd som beskrevet i eksempel 13) ble fortynnet 1:1000 i PBS med 3 % geiteserum og inkubert over natten. Etter rensing ble snitt inkubert i 1 time med biotinyllert anti-mus sekundært antistoff fortynnet 1:200 i PBS. Etter rensing ble snitt ytterligere prosessert med
25 avidin-biotin-peroksidaseteknikken (ABC-Elite Kit PK6100; Vector Laboratories). Tilslutt ble snitt reagert med diaminobenzidin (DAB) metallforsterket substrat (Boehringer, kode 1718096), kontrafarget med Hemalum, dehydrert, klaret i xylen og overlatt dekkglass.

Resultatet av de histologiske farginger er vist i figurene 4A og 4B. Snittene ble farget med sera fra de tre musene som var immunisert mot humant A β 1-6 koblet til Q β VLP. Amyloide plakk fra transgeniske mus og AD ble positivt farget av hvert serum. Resultater fra
30 ett av de tre sera er vist. Sera utløst mot humant A β 1-6 farget amyloide plakk tydelig fra den transgene human APP-musen, så vel som amyloide plakk fra ADpasienter. Preimmune sera var negative. Ekstracellulære amyloide plakk og isolerte blodårer farges ved antistoffene.

EKSEMPEL 17**Spesifisitet av sera utløst mot humant A β 1-6, bestemt ved histologi av museplakk**

Immunhistokjemi i hjernesnitt.

Etterfølgende parafin hjernesnitt fra en 3 måneder og en 18 måneder gammel heterozygot APP23-mus som overuttrykte humant APP ble farget som beskrevet i eksempel 16 med et representativt museserum utløst mot humant A β 1-6, som beskrevet i eksempel 13, eller med et kaninpolyklonalt antistoff spesifikt for de siste 20 aminosyrene fra murint eller humant APP, og som derfor ikke gjenkjenner A β . Snittene inkubert med kanin polyklonalt antistoff ble behandlet som beskrevet i eksempel 16, med unntak av anvendelse av et biotinyleret anti-kanin sekundært antistoff (BA1000, Vector Laboratories).

Resultatet av de histologiske fargingene er vist i figurene 5A, 5B, 5C, 5D og 5E. A β 1-6 som er markert på nedre venstre side for snittene angir at sera utløst mot A β 1-6 er benyttet for fargingen, men "Pab" indikerer at snittene har blitt farget med det polyklonale antistoffet spesifikt for de siste 20 aminosyrene av murint eller humant APP, som samsvarer med posisjonene 676-695 i APP₆₉₅.

Sammenlikning av fargingen av snitt fra 18 måneder gamle mus (figurene 5A og 5C) viser at sera utløst mot A β -6 ikke kryssreagerer med APP uttrykt i hjernen, som imidlertid er farget av kontrollpolyklonalt antistoff. Figur 5B viser et hjernesnitt fra en 3 måneder gammel mus, et tidspunkt hvor amyloide avsetninger enda ikke er synlige, farget med det polyklonale antistoffet spesifikt for APP. Figurene 5D og 5E viser en forstørrelse av CA1-pyramidalt lag av hippocampus fra henholdsvis figur 5A og 5B.

EKSEMPEL 18**A. Kobling av A β 1-6-peptid til fr-kapsidprotein**

En løsning av 120 μ M fr-kapsidprotein i 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,2 omsettes i 30 minutter med et 10 gangers molart overskudd av SMPH (Pierce), fortynnet fra en lagerløsning i DMSO ved 25 °C på en vugge. Reaksjonsløsningen dialyseres deretter 2 ganger i 2 timer mot 1 liter 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,2 ved 4 °C. Den dialyserte fr reaksjonsblandingen omsettes så med et 5 gangers molart overskudd av A β 1-6-peptid (sekvens: NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂) (SEQ ID NO: 77) i 2 timer ved 16 °C på en vugge. Koblingsprodukter analyseres ved SDS-PAGE.

B. Kobling av A β 1-6-peptid til HBcAg-lys-2cys-Mut

En løsning av 1 ml 120 μ M HBcAg-lys-2cys-Mut i 20 mM Hepes, 150 mM

NaCl, pH 7,2 omsettes i 30 minutter med et 10 gangers molart overskudd av SMPH (Pierce), fortynnet fra en lagerløsning i DMSO ved 25 °C å en vugge.

Reaksjonsløsningen dialyseres deretter 2 ganger i 2 timer mot 1 liter 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,2 ved 4 °C. Den dialyserte HBcAg-lys-2cys-Mut

reaksjonsblandingen omsettes så med et 5 gangers molart overskudd av A β 1-6-peptid (sekvens: NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂) (SEQ ID NO: 77) i 2 timer ved 16 °C på en vugge. Koblingsprodukter analyseres ved SDS-PAGE.

C. Kobling av A β 1-6-peptid til Pili

En limning av 125 μ M Type-1-pili fra *E.coli* i 20 mM Hepes, pH 7,4 omsettes i 60 minutter med et 50 gangers molart overskudd av krysskobler SMPH (Pierce), fortynnet fra en lagerløsning i DMSO ved romtemperatur på en vugge.

Reaksjonsblandingen avsaltes på en PD-10-kolonne (Amersham-Phannacia Biotech).

De proteininnholdende fraksjonene som elueres fra kolonnen samles, og det avsaltete,

derivatiserte piliproteinet omsettes med et 5 gangers molart overskudd av A β 1-6-peptid (sekvens: NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂) (SEQ ID NO: 77) i 2 timer ved 16 °C på en vugge. Koblingsprodukter analyseres ved SDS-PAGE.

D. Immunisering av mus med A β 1-6-peptid tilkoblet fr-kapsidprotein, HBcAg-lys-2cys-Mut eller pili

A β 1-6-peptid tilkoblet fr-kapsidprotein, HBcAg-lys-2cys-Mut eller pili, som beskrevet ovenfor injiseres subkutan i 3 mus på dag 0 og dag 14. Hver mus (C57BL/6) immuniseres med 10 μ g vaksine fortynnet i PBS til 200 μ l. Musene blodtappes retroorbitalt på dag 21, og antistofftiteren spesifikk for A β 1-6-peptidet eller A β 1-40 eller A β 1-42 måles ved ELISA, som beskrevet i eksempel 13.

EKSEMPEL 19

Immunisering av rhesus-aper med Q β hA β 1-6

For å teste induksjon av antistoffer mot humant A β ved anvendelse av en human A β 1-6-peptidbasert vaksine i tilfellet der A β 1-6-peptid er et selv-antigen, ble rhesusaper immunisert med Q β hA β 1-6, ettersom A β -sekvensen er identisk mellom mennesker og rhesus-aper. Q β hA β 1-6 vaksine ble fremstilt som beskrevet i eksempel 13. Fire rhesus-aper mellom 10 og 15 år gamle, ble immunisert på dag 0 med 50 μ g vaksine, og forsterket to ganger ved dag 28 og dag 56 med 25 μ g vaksine. Apene ble immunisert subkutan i baken. Dyrene ble blodtappet på dag 0 (pre-blødning) 42 og 70,4 ml blod ble samlet fra V. cephalica antebrachii. Antistofftiteren spesifikk for A β 1-40 ble målt ved ELISA hovedsakelig som beskrevet i eksempel 13 ved anvendelse av et sekundært antistoff,

spesifikt for ape-IgG.

Siden mennesker og rhesus-aper deler den samme A β -sekvensen, viser genereringen av høye titerantistoffer i rhesus-aper spesifikke for A β 1-40 at immunisering med hA β 1-6-peptid tilkoblet Q β bryter toleranse mot selv-antigenet A β . Videre er antistoffer som gjenkjenner fullengde A β generert med det koblete A β 1-6- fragmentet i primater.

Resultatene fra ELISA er vist figur 6. Avmerket i diagrammet er titrene av A β 1-40 spesifikke antistoffer målt i sera fra de 4 apene (1-4) immunisert med Q β hA β 1-6 og den gjennomsnittlige titeren av de fire apene. Titrene er representert som OD⁵⁰-titere. OD⁵⁰ er den fortynningen av antistoffene der signalet når halvparten av sin maksimale verdi. Den maksimale verdi (OD^{max}) ble oppnådd fra et referansesete, opprinnelig fra en ape immunisert med Q β hA β 1-27 og som også gjenkjenner A β 1-40, og målt på den samme ELISA-platen.

To aper (beskrevet ovenfor) ble blodtappet på dag 97, 110, 117, 124, 138, 143, 152, 159 og 166 og mottok en tredje forsterkning med 25 μ g vaksine på dag 110. Sera ble samlet (99 ml) og anvendt for affinitetsrensing av A β 1-6-spesifikke antistoffer. Disse antistoffene ble anvendt for immunhistokjemisk farging ved en konsentrasjon på 1,5 μ g/ml og et biotinyllert sekundært anti-ape-antistoff ble anvendt for påvisning. Parafinhjernesnitt fra 18 måneder gammel heterozygot APP23-mus, og en AD-pasient - Braak trinn III - ble anvendt for farging. Plakkspesifikk farging ble observert både i APP23-musehjernesnitt og i AD-pasienthjernesnitt (figur 7). Resultatet av den histologiske analysen er vist i figurene 7A og 7B. Fargingen av humant APP-transgene museplakk (APP23-stamme) med det ovenfor beskrevne affinitetsrensete antiserum spesifikt for A β 1-6 er avbildet i figur 7A. Figur 7B viser fargingen av humant AD-plakk med det samme, rensete antiserum. Det rensete antiserum ble anvendt ved en konsentrasjon på 1,5 μ g/ml i begge tilfeller. Typiske plakk er angitt ved en pil på begge figurer.

EKSEMPEL 20

Kobling av murint A β 1-6 til AP205 VLP, immunisering av mus og analyse av immunrespons

A. Kobling av murint A β 1-6-peptid til AP205 VLP

Det murine A β 1-6-peptidet (mA β 1-6, sekvens: NH₂-DAEFGHGHC-CONH₂) (SEQ ID NO: 78) ble kjemisk syntetisert; den første NH₂-gruppen angir at peptidet har en fri N-terminal ende, og den terminale NH₂-gruppen angir at peptidet har en amidert karboksyterminal ende. AP205 VLP (uttrykt og renset som beskrevet i eksempel 1), i 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 8,0 (HBS, pH 8,0), ble omsatt ved en konsentrasjon på 2mg/ml (besternt i en Bradford-test) med 2,86 mM SMPH (Pierce, Rockford, IL),

fortynnet fra en 100 mM lagerløsning i DMSO, i 30 minutter ved romtemperatur (RT). Reaksjonsblandingen ble så dialysert to ganger mot et 1000 gangers volum av HBS, pH 7,4, ved 4 °C i 2 timer; den resulterende, dialyserte og derivatiserte AP205 VLP ble øyeblikkelig frosset i flytende nitrogen og lagret ved -20 °C over natten. Derivatisert AP205 VLP ble fortynnet med et volum av 20 mM HBS, pH 7,4, og omsatt i 2 timer med 719 µM mAβ1-6-peptid fortynnet i reaksjonsblandingen fra en 50 mM lagerløsning i DMSO ved 15 °C under risting. Koblingsreaksjonen ble dialysert to ganger mot et 1000 gangers volum av HBS, pH 7,4, i 2 timer og over natten. Den dialyserte reaksjonsblandingen ble øyeblikkelig frosset i flytende nitrogen i aliquoter for lagring ved -80 °C, inntil ytterligere anvendelse.

En aliquot ble tint og kobling av mAβ1-6-peptidet til AP205 VLP subenheterne ble bestemt ved SDS-PAGE og proteinkonsentrasjonen målt i en Bradford-test. Resultatet av koblingsreaksjonen er vist i figur 8.

Figur 8 viser SDS-PAGE analysen av koblingsreaksjonen av mAβ1-6-peptidet til AP205 VLP. Prøven ble kjørt under reduserende forhold på en 16 % Tris-glysin gel og farget med coomassie briljant blå. Spor 1 er proteinmarkøren med korresponderende molekulære masser angitt på den venstre kanten av gelen; spor 2, AP205 VLP-protein; spor 3, derivatisert AP205 VLP; spor 4, supernatanten fra koblingsreaksjonen av AP205 VLP til mAβ1-6-peptid; spor 5, pelletten av koblingsreaksjonen av AP205 VLP til mAβ1-6-peptid. Ingen AP205 VLP-subenheter etterlatt ukoblet kunne påvises på gelen, mens bånd som korresponderer til flere peptider pr. subenhet, var synlige, som demonstrerer en veldig høy koblingseffektivitet. Nærmere bestemt er det mye mer enn ett Aβ1-6-peptid pr. AP205 VLP-subenhet.

B. Immunisering av mus med mAβ1-6-peptid tilkoblet AP205 VLP og analyse av immunrespons.

AP205 VLP tilkoblet mAβ1-6-peptid ble injisert subkutan i 3 mus på dag 0 og dag 14. mAβ1-6-peptid ble tilkoblet AP205 VLP som beskrevet ovenfor. Hver mus (C57BL/6) ble immunisert med 25 µg vaksine fortynnet i PBS til 200 µl. Musene ble retroorbitalt blodtappet på dag 21, og antistofftiteren spesifikk for mAβ1-6-peptidet ble målt i en ELISA mot mAβ1-6. mAβ1-6-peptidet ble tilkoblet bovint RNase A ved anvendelse av den kjemiske krysskobleren sulfo-SPDP. ELISA-plater ble belagt med preparater av RNase-mAβ1-6 med en konsentrasjon på 10 µg/ml. Platene ble blokkert og så inkubert med seriefortynnet museserum. Bundne antistoffer ble påvist med enzymatisk merket anti-muse-IgG-antistoffer. Som kontroll ble preimmunt serum fra de samme musene også testet. Resultatene er vist i figur 9.

Figur 9 viser en ELISA-analyse av IgG-antistoffene spesifikke for mAβ1-6-peptid i sera fra mus immunisert med mAβ1-6-peptidet tilkoblet AP205 VLP.

Resultatene er vist for sera fra de tre immuniserte mus samlet ved dag 21 (Al d21-A3 d21), det preimmune serum er angitt som "pre imm" i figuren; resultatet for ett preimmunt serum er vist. Sammenlikning av det preimmune serum med serum fra mus immunisert med mA β 1-6 tilkoblet AP205 VLP viser at en sterk spesifikk antistoffrespons mot mA β 1-6-peptidet, som er et selv-antigen, kunne oppnås i fravær av adjuvans. Videre fører kobling av et selv-peptid til AP205 VLP til toleransebrudd mot dette peptidet, og til en veldig høy spesifikk immunrespons. Derfor er AP205 VLP egnet for generering av høye antistofftitere mot A β -peptider i fravær av adjuvans.

EKSEMPEL 21

Immunisering med Q β hA β 1-6 reduserer amyloide plakk i transgene mus som overuttrykker det "Swedish/London"-mutante, amyloide forløperproteinet.

Dette eksemplet demonstrerer at immunisering med Q β hA β 1-6 i en musemodell som utvikler Alzheimers sykdomsliknende diffuse (Kongo-rode negative) amyloide plakk resulterer i en massiv reduksjon av plakktetthet i neocorticale og subcorticale hjerneområder. Histologisk forekomst av diffuse amyloide plakk er et fremtredende moment av AD-hjernepatologi (Selkoe, 1994, Annu. Rev. Neurosci. 17:489-517) og derfor demonstrerer eksemplet at immunisering med Q β hA β 1-6 tilveiebringer en effektiv metode for behandlingen av Alzheimers sykdom.

For å evaluere den terapeutiske effektiviteten av immunisering med Q β -A β 1-6, ble transgeniske mus benyttet som overuttrykker det "Swedish/London" mutante, amyloide forløperproteinet under kontroll av muse-Thy-1-promoteren (APP24; K670N/M671L; V7171, patent nr. W0980-36-4423). Denne musestammen er karakterisert ved et stort antall av amyloide plakk i neocortex, hippocampus, caudat putamen og thalamus ved en alder på 18 måneder. Plakk kan først observeres ved en alder på 9 måneder. Histologisk er amyloidplakkene i APP24-mus hovedsakelig av en diffus type, dvs. at de er negative i Kongo-rød farging. I en mindre grad kan også kompakte amyloide plakk (Kongo-rød positive) bli funnet.

Humant A β 1-6-peptid tilkoblet Q β VLP (Q β hA β 1-6) ble konstruert som beskrevet i eksempel 13. På betingelser av den eksperimentelle fremgangsmåten som ble fulgt, som ikke er nødvendig for å beskrive eller muliggjøre oppfinnelsen, ble APP24-transgeniske mus 9,5 måneder gamle, injisert subkutant på dag 0 med 25 μ g Q β hA β 1-6 i fosfatbufret saltoppløsning (PBS) (tilført som 2 x 100 μ l/mus) (n = 16) eller som negative kontroller med PBS (tilført som 2 x 100 μ l/mus) (n = 9) eller med Q β -VLP fri for koblet antigen (n = 11). Mus ble deretter injisert 25 μ g av Q β hA β 1-6-vaksine, Q β eller PBS på dag 15, 49, 76, 106, 140, 169, 200, 230, 259 og 291. Dyrene ble blodtappet 1-2 dager for den første immuniseringen (dag 0) og på dag 56, 90, 118,

188, 214, 246 og 272 via halevenen. Blodserum ble også samlet på dag 305, ved hvilket tidspunkt også hjerner ble samlet for histopatologi (musenes alder ved dette tidspunkt var 19,5 måneder).

Antistofflitteren spesifikk for A β 1-40 ble målt ved ELISA hovedsakelig som beskrevet i eksempel 13. Resultatene av ELISA er vist i figur 10. Titrene av A β 1-40 eller A β 1-42 spesifikke antistoffer målt i serum fra mus immunisert med Q β hA β 1-6 er markert i diagrammet. Titrene er presentert som OD50% titere. OD50% er fortynningen av antistoffene hvor signalet når halvparten av sin maksimale verdi. Den maksimale verdien (OD max) ble oppnådd fra et referanseantistoff som gjenkjenner A β 1-40 og A β 1-42, og målt på den samme ELISA-platen. Alle Q β hA β 1-6 immuniserte mus utviklet OD50% titere over 1:8000 (preimmune serumtitere var under 1:100) som viser en forenlig antistoffrespons til Q β hA β 1-6, til og med hos gamle APP24-mus (figur 10). Middelverdi for OD50% titere i den immuniserte gruppen var i området av 1:20000 til 1:50000 gjennom den immuniserte perioden.

For kvantifisering av amyloide plakk ble hjerner fiksert ved nedsenkning i 4 % formaldehyd i 0,1 M PBS ved 4 °C. Etter dehydrering med etanol ble hjernene innkapslet i parafin og kuttet sagittalt med et mikrotom på 4 μ m tykkelse. Snittene ble montert på superfrost slides og tørket ved 37 °C. Snittene ble vasket i PBS og antigenisitet ble forsterket ved mikrobølgeoppvarming ved 90 °C i 3 minutter i 0,1 M sitronsyrebuffer. NT11-antiserum (anti A β 1-40, Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 13287-13292) ble fortynnet 1:1000 i PBS med 3 % geiteserum og inkubert over natten ved 4 °C. Etter rensing ble snitt inkubert i en time med biotinyllert antikanin-IgG sekundært antistoff (BA1000, Vector Laboratories) fortynnet 1:200 i PBS. Etter rensing ble snitt ytterligere bearbeidet med avidin-biotin-peroksidaseteknikken (ABC-Elite kit PK6100; Vector Laboratories). Tilslutt ble snittene omsatt med diaminobenzidin (DAB) metallforsterket substrat (Boehringer, kode 1718096), kontrafarget med Hemalum, dehydrert, klaret i xylene og belagt med dekkglass. Systematisk, tilfeldige serier av hjernesnitt ved tre ulike anatomiske plan pr. dyr ble anvendt til analysen. Amyloide plakk ble kvantifiserte ved anvendelse av en MOD bildeanalysator (Imaging Research, Brock University, Ontario, Canada, programversjon M5 elite). Det mikroskopiske bildet ble digitalisert ved anvendelse av et Xillix sort/hvitt CCD TV-kamera, og lagret med 640 x 480 piksel oppløsning ved 256 gråtoner. Pikselstørrelsen ble kalibrert ved anvendelse av et objektmikrometer med 5 x forstørrelse (Leica Neoplan objektiv). Ved anvendelse av en motordrevet mikroskopplattform for nøyaktig plassering av nærliggende objektfelt, ble hele neocortex og olfaktorisk kjerne av hvert snitt analysert. For hvert objektfelt ble det anatomiske område definert ved manuell markering. For hvert individuelle snitt ble prøvearealet definert ved manuell terskelsetting (gråtone) mellom

immunpositive amyloide plakk og vevsbakgrunn. Isolerte vevsartifakter ble ekskludert ved manuell markering. Rådata måles som individuelle tellinger (amyloide avsetninger) og proporsjonale områdeverdier (immunpositiv amyloid/cortex eller olfaktorisk kjerne). Data fra hver mus ble normalisert til antall avsetninger (plakk) pr. mm² og totalt plakkområde i prosent av total neocortex. QβhAβ1-6 immuniserte mus viste en dramatisk reduksjon av amyloide avsetninger i cortex og subcortikale områder sammenliknet med enten PBS eller Qβ-injiserte kontrollgrupper (figur 11). Både middelveiden av antall avsetninger og det totale plakkområde var betydelig redusert mellom 80-98 %, sammenliknet med PBS-gruppen i cortex, caudat putamen, hippocampus og thalamus ($p < 0,001$ vs. PBS-gruppe, Mann-Whitney test; figur 12).

I en andre studie ble APP24 transgeniske mus, 13 måneder gamle, injisert subkutan på dag 0 med 25 µg QβhAβ1-6 i fosfatbufret saltoppløsning (PBS) (Effort som 2×100 µl/mus) ($n = 15$) eller som negative kontroller med PBS (tilført som 2×100 µl/mus) ($n = 15$). Mus ble deretter injisert 25 µg av QβhAβ1-6-vaksine, eller PBS på dag 16, 46, 76, 109, 140 og 170. Dyrene ble blodtappet 1-2 dager for den første immuniseringen (dag 0) og på dag 31, 59, 128 og 154 via halevenen. Blodserum ble også samlet på dag 184, ved hvilket tidspunkt også hjernesnitt ble samlet for histopatologi (musenes alder ved dette tidspunkt var 19,5 måneder). Antistofftiteren spesifikk for Aβ1-40 ble bestemt og uttrykt som beskrevet ovenfor, og igjen ble alle immuniserte mus funnet å respondere til QβhAβ1-6 immunisering med serum OD50% titere på minst over 1:2000 (ikke vist). Middelveiden for OD50% titere var i området av 1:10000 til 1:50000 gjennom den immuniserte perioden. Kvantifisering av amyloide avsetninger ble utført som beskrevet ovenfor. Sammenliknet med eksperimentet hvor immunisering ble startet tidligere (dvs. ved alder på 9,5 måneder) var reduksjonen av plakkavsetningsantall (-55 %) og område (-32 %) mindre dramatisk i neokorteks, men fortsatt veldig uttalt (figur 13), og betydelig høyt ($p > 0,001$ vs. PBS, Mann-Whitney test). I subcortikale områder var plakkavsetningsantall og område redusert med 60-90 % i den QβhAβ1-6 immuniserte gruppe. Den mer uttalte effekten i disse områdene sammenliknet med cortex er antatt relatert til det mer forlengete tidsforløpet av plakkdannelse i disse områdene.

Sett i sammenheng viser begge eksperimentene at QβhAβ1-6 immunisering i transgeniske mus som overuttrykker det "Swedish/London" mutante, amyloide forløperproteinet dramatisk reduserer forekomsten av amyloide avsetninger i disse musene.

Figur 10: Serum anti-Aβ40/42 antistofflitere (OD50%) i transgeniske mus som overuttrykker det "Swedish/London" mutante, amyloide forløperproteinet. Mus ble immunisert med QβhAβ1-6 mellom 9,5 og 19 måneder gamle. Det er vist individuelle verdier (sorte prikker) og avmerkete bokser hvor endene av boksene

definerer den 25. og 75. percentilen med en linje ved middelverdien og stolper for feil som definerer den 10. og 90. percentilen (fjerntliggende er vist som prikker).

Figur 11: Immunhistokjemisk farging av amyloide plakk i sagittale hjernesnitt. Det sagittale hjernesnittet fra en transgenisk mus som overuttrykker det "Swedish/London" mutante, amyloide forløperproteinet immunisert med Q β (A) eller Q β hA β 1-6 (B) vaksine er vist i figuren.

Figur 12: Kvantifisering av plakkavsetting i transgeniske mus som overuttrykker det "Swedish/London" mutante, amyloide forløperproteinet etter immunisering mellom 9,5 og 19 måneders alder. (A) Kortikal plakktetthet. (13) Kortikalt plakkområde. (C) Plakktetthet i caudat putamen. (D) Plakkområde i caudat putamen. (E) Plakktetthet i hippocampus. (F) Plakkområde i hippocampus. (G) Plakktetthet i thalamus. (H) Plakkområde i thalamus. Plakktetthet er uttrykt i plakk/mm², plakkområdet i prosent av vevsområdet dekket av amyloid- β . Data er vist som individuelle verdier (sorte prikker) og bokser. Endene av boksene definerer den 25. og 75. percentilen med en linje ved middelverdien og stolper for feil, som definerer den 10. og 90. percentilen. **p < 0,001 (Mann Whitney Rank Sum Test). PBS, n = 9, Q β , n = 11, Q β hA β 1-6, n = 16.

EKSEMPEL 22

Immunisering med Q β hA β 1-6 reduserer amyloide plakk i transgene mus som overuttrykker det "Swedish"-mutante, amyloide forløperproteinet.

Dette eksempel demonstrerer at immunisering med Q β hA β 1-6 tilveiebringer en effektiv fremgangsmåte for behandling av Alzheimers sykdom, til og med når immuniseringen starter på et meget fremskredet trinn av amyloid plakk patologi. Den amyloide plakkavsettingsprosessen i AD musemodellen anvendt i dette eksemplet starter allerede omkring 6 måneders alder (Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 13287-13292). I studien beskrevet heri, ble immunisering med Q β hA β 1-6 startet ved en alder på 19 måneder, hvor allerede et stort antall kompakte plakk var dannet i korteks. Dette eksemplet demonstrerer også Q β hA β 1-6 sin evne til å indusere A β 40/42 antistoffer i meget gamle dyr (ingen ikke-responderende av 19 immuniserte mus).

For å evaluere den terapeutiske effekten av immunisering med Q β hA β 1-6 ble transgene mus anvendt, som overuttrykte "Swedish" mutant, amyloid forløperprotein (APP23; K670N/M671L, Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 13287-13292). Den Alzheimer-liknende patologien i disse musene er grundig karakterisert (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).

Humant A β 1-6-peptid tilkoblet Q β VLP (Q β hA β 1-6) ble konstruert som beskrevet i eksempel 13. På betingelser av den eksperimentelle fremgangsmåten som ble

fulgt, som ikke er nødvendig for å beskrive eller muliggjøre oppfinnelsen, ble APP23-transgeniske mus 18 måneder gamle, injisert subkutan på dag 0 med 25 µg QβhAβ1-6 oppløst i fosfatbufret saltoppløsning (tilført som 2 x 100 µl/mus) (n = 19) eller fosfatbufret saltoppløsning som negativ kontroll (n = 17) og forsterket på dag 13, 27-34, 61-63, 90-96 og 123-130 med 25 µg vaksine. Dyrene ble blodtappet 1-2 dager for den første immuniseringen (dag 0) og på dag 41-45 og dag 68 via halevenen. Blodserum ble også samlet på dag 152-154, ved hvilket tidspunkt også hjerner ble samlet for histopatologi (musenes alder ved dette tidspunkt var 23 måneder).

Antistofftiteren spesifikk for Aβ1-40 ble målt ved ELISA hovedsakelig som beskrevet i eksempel 13, og resultatene uttrykt som beskrevet i eksempel 21. Resultatene av ELISA er vist i figur 14. Alle QβhAβ1-6 immuniserte mus utviklet OD50% titere over 1:2000 (preimmune serumtitere var under 1:100) som viser en forenlig antistoffrespons til Qβ-Aβ1-6, til og med i meget gamle mus (figur 14). Middelverdi for OD50% titere var i området av 1:9000 til 1:20000 gjennom den immuniserte perioden.

Kvantifisering av amyloide plakk utført som i eksempel 21. Data fra hver mus ble normalisert til antall avsetninger (plakk) pr. mm² og totalt plakkområde i prosent av total neokorteks. QβhAβ1-6 immuniserte mus viste en dramatisk reduksjon av amyloide avsetninger i korteks (figur 15 og 16), for det meste pga. reduksjon av plakk av liten størrelse. Sammenliknet med den ikke-immuniserte gruppen var middelverdien av plakkantall redusert med 33 % i den QβhAβ1-6-immuniserte gruppen (p < 0,001 vs. PBS-gruppe, Mann-Whitney test). Da de fleste plakk av liten størrelse var påvirket, var reduksjonen av det totale plakkområdet moderat og utgjorde 10 % (p < 0,01 vs. PBS-gruppe, Mann-Whitney test).

Figur 14: Serum anti-Aβ40/42 antistofftitere (OD50%) i transgeniske mus som overuttrykker det "Swedish" mutante, amyloide forløperproteinet. Mus ble immunisert med QβhAβ1-6 mellom 18 og 23 måneder gamle. Det er vist individuelle verdier (sorte prikker) og avmerkete bokser hvor endene av boksene definerer den 25. og 75. percentilen med en linje av middelverdien og stolper for feil som definerer den 10. og 90. percentilen (utenforliggende er vist som prikker).

Figur 15: Immunhistokjemisk farging av amyloide plakk i sagittale hjernesnitt. Piler peker på små avsetninger. Et sagittalt hjernesnitt fra en transgenisk mus som overuttrykker det "Swedish" mutante, amyloide forløperproteinet immunisert med PBS (A) eller Qβ-Aβ1-6 (B) er vist i figuren.

Figur 16: Kvantifisering av plakkavsetning i transgeniske mus som overuttrykker det "Swedish" mutante, amyloide forløperproteinet etter immunisering mellom 18 og 23 måneders alder. (A) Kortikal plakktetthet. (B) Kortikalt plakkområde. Plakktetthet er uttrykt i plakk/mm², plakkområdet i prosent av vevsområdet dekket av amyloid-β. Data er

vist som individuelle verdier (sorte prikker) og bokser. Endene av boksene definerer den 25. og 75. percentilen med en linje ved middelverdien og stolper for feil, som definerer den 10. og 90. percentilen. $**p < 0,001$ (Mann Whitney Rank Sum Test). PBS, $n = 17$, Q β hA β 1-6, $n = 19$.

P a t e n t k r a v

1.

Sammensetning som omfatter:

5

(a) en kjernepartikkel med minst ett første tilkoblingssete, hvori nevnte kjernepartikkel er en virusliknende partikkel av en RNA-bakteriofag; og

(b) minst ett antigen eller en antigendeterminant med minst ett andre tilkoblingssete, hvori nevnte antigen eller antigendeterminant er et A β 1-6-peptid, og
10 hvori nevnte andre tilkoblingssete er valgt fra gruppen bestående av:

(i) et ikke-naturlig forekommende tilkoblingssete med nevnte antigen eller antigendeterminant; og

15

(ii) et naturlig forekommende tilkoblingssete med nevnte antigen eller antigendeterminant, hvori nevnte andre tilkoblingssete assosierer med nevnte første tilkoblingssete gjennom minst en ikke-peptidbinding;

og hvori nevnte A β 1-6-peptid og nevnte kjernepartikkel interagerer gjennom nevnte assosiasjon for å danne en ordnet og repetitiv antigenoppstilling.

20

2.

Sammensetning ifølge krav 1, hvori nevnte virusliknende partikkel av en RNA-bakteriofag omfatter, eller alternativt består av, rekombinante proteiner eller fragmenter derav, av en RNA-bakteriofag.

25

3.

Sammensetning ifølge krav 1 eller 2, hvori nevnte RNA-bakteriofag er valgt fra gruppen bestående av:

30

(a) bakteriofag Q β ;

(b) bakteriofag R17;

(c) bakteriofag fr;

(d) bakteriofag GA;

(e) bakteriofag SP;

35

(f) bakteriofag MS2;

(g) bakteriofag M11;

(h) bakteriofag MX1;

(i) bakteriofag NL95;

- (k) bakteriofag f2;
- (l) bakteriofag PP7; og
- (m) bakteriofag AP205.

- 5 4.
Sammensetning ifølge krav 1, hvori nevnte virusliknende partikkel av en RNA-bakteriofag omfatter, eller alternativt består av, rekombinante proteiner eller fragmenter derav, fra RNA-bakteriofag Q β .
- 10 5.
Sammensetning ifølge krav 1, hvori nevnte virusliknende partikkel av en RNA-bakteriofag omfatter, eller alternativt består av, rekombinante proteiner eller fragmenter derav, fra RNA-bakteriofag fr.
- 15 6.
Sammensetning ifølge krav 1, hvori nevnte virusliknende partikkel av en RNA-bakteriofag omfatter, eller alternativt består av, rekombinante proteiner eller fragmenter derav, fra RNA-bakteriofag AP205.
- 20 7.
Sammensetning ifølge krav 2, hvori de rekombinante proteinene omfatter, eller alternativt består hovedsakelig av, eller alternativt består av kappeproteiner av RNA-bakteriofager.
- 25 8.
Sammensetning ifølge krav 7, hvori nevnte kappeproteiner fra RNA-bakteriofager har en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av:
- 30 (a) SEQ ID NO: 4;
(b) en blanding av SEQ ID NO: 4 og SEQ ID NO: 5;
(c) SEQ ID NO: 6;
(d) SEQ ID NO: 7;
(e) SEQ ID NO: 8;
(f) SEQ ID NO: 9;
- 35 (g) en blanding av SEQ ID NO: 9 og 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; og
- (o) SEQ ID NO: 28.

5

9.

Sammensetning ifølge krav 2, hvori de rekombinante proteinene omfatter, eller alternativt består hovedsakelig av, eller alternativt består av mutante kappeproteiner fra RNA-bakteriofager.

10

10.

Sammensetning ifølge krav 9, hvori nevnte RNA-bakteriofag er valgt fra gruppen bestående av:

15

- (a) bakteriofag Q β ;
- (b) bakteriofag R17;
- (c) bakteriofag fr;
- (d) bakteriofag GA;
- (e) bakteriofag SP;
- (f) bakteriofag MS2;
- (g) bakteriofag M11;
- (h) bakteriofag MX 1;
- (i) bakteriofag NL95;
- (k) bakteriofag f2;
- (l) bakteriofag PP7; og
- (m) bakteriofag AP205.

20

25

11.

Sammensetning ifølge krav 9 eller 10, hvori nevnte mutante kappeproteiner fra nevnte RNA-bakteriofag er modifisert ved fjerning av minst en lysinrest ved substitusjon.

30

12.

Sammensetning ifølge krav 9 eller 10, hvori nevnte mutante kappeproteiner fra nevnte RNA-bakteriofag er modifisert ved addisjon av minst en lysinrest ved substitusjon.

35

13.

Sammensetning ifølge krav 9 eller 10, hvori nevnte mutante kappeproteiner fra nevnte RNA-bakteriofag er modifisert ved delesjon av minst en lysinrest.

14.

Sammensetning ifølge krav 9 eller 10, hvori nevnte mutante kappeproteiner fra nevnte RNA-bakteriofag er modifisert ved addisjon av minst en lysinrest ved innsetting.

5

15.

Sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori nevnte andre tilkoblingssete er i stand til å assosiere til nevnte første tilkoblingssete gjennom minst en kovalent binding.

10

16.

Sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori nevnte A β 1-6-peptid er valgt fra gruppen bestående av:

15

- (a) humant A β 1-6-peptid med en aminosyresekvens fra SEQ ID NO: 75;
- (b) murint A β 1-6-peptid med en aminosyresekvens fra SEQ ID NO: 76;
- (c) primat A β 1-6-peptid med en aminosyresekvens fra SEQ ID NO: 84;
- (d) kanin A β 1-6-peptid med en aminosyresekvens fra SEQ ID NO: 85;
- (e) xenopus laevis A β 1-6-peptid med en aminosyresekvens fra SEQ ID NO: 86;
- (f) rotte A β 1-6-peptid med en aminosyresekvens fra SEQ ID NO: 87; og
- (g) marsvin A β 1-6-peptid med en aminosyresekvens fra SEQ ID NO: 88.

20

17.

Sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori nevnte A β 1-6-peptid har en aminosyresekvens fra SEQ ID NO: 75.

25

18.

Sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, som ytterligere omfatter en aminosyrelinker, hvor nevnte aminosyrelinker omfatter, eller alternativt består av, nevnte andre tilkoblingssete.

30

19.

Sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori nevnte andre tilkoblingssete eller nevnte aminosyrelinker med nevnte andre tilkoblingssete er bundet til nevnte A β 1-6-peptid ved dets C-terminale ende.

35

20.

Sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori nevnte andre

tilkoblingssete eller nevnte aminosyrelinker med nevnte andre tilkoblingssete er valgt fra gruppen bestående av:

- (a) GGC;
- (b) GGC-CONH₂;
- (c) GC;
- (d) GC-CONH₂;
- (e) C; og
- (f) C-CONH₂.

21.

Sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori nevnte Aβ1-6-peptid med nevnte minst andre tilkoblingssete er NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂ (SEQ ID NO: 77).

22.

Sammensetning ifølge krav 21, hvori nevnte virusliknende partikkel er en virusliknende partikkel fra RNA-bakteriofag Qβ-kappeprotein.

23.

Farmasøytisk sammensetning som omfatter:

- (a) sammensetningen ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene; og
- (b) en akseptabel farmasøytisk bærer.

24.

Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 23, som ytterligere omfatter en adjuvans.

25.

Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 23 eller krav 24, hvori nevnte vaksinesammensetning er fri for en adjuvans.

26.

Vaksinesammensetning, som omfatter sammensetningen ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene.

27.

Vaksinesammensetning ifølge krav 26, som ytterligere omfatter en adjuvans.

28.

Vaksinesammensetning ifølge krav 26, hvori nevnte vaksinesammensetning er fri for en adjuvans.

5

29.

Vaksinesammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 26 til 28, hvori nevnte virusliknende partikkel omfatter rekombinante proteiner eller fragmenter derav, fra en RNA-bakteriofag.

10

30.

Vaksinesammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 26 til 29, hvori nevnte virusliknende partikkel omfatter rekombinante proteiner eller fragmenter derav, fra RNA-bakteriofag Q β .

15

31.

Vaksinesammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 26 til 29, hvori nevnte virusliknende partikkel omfatter rekombinante proteiner eller fragmenter derav, fra RNA-bakteriofag fr.

20

32.

Vaksinesammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 26 til 29, hvori nevnte virusliknende partikkel omfatter rekombinante proteiner eller fragmenter derav, fra RNA-bakteriofag AP205.

25

33.

Vaksinesammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 26 til 32, hvori nevnte A β 1-6-peptid er valgt fra gruppen bestående av:

30

- (a) humant A β 1-6-peptid med en aminosyresekvens fra SEQ ID NO: 75;
- (b) murint A β 1-6-peptid med en aminosyresekvens fra SEQ ID NO: 76;
- (c) primat A β 1-6-peptid med en aminosyresekvens fra SEQ ID NO: 84;
- (d) kanin A β 1-6-peptid med en aminosyresekvens fra SEQ ID NO: 85;
- (e) xenopus laevis A β 1-6-peptid med en aminosyresekvens fra SEQ ID NO: 86;
- (f) rotte A β 1-6-peptid med en aminosyresekvens fra SEQ ID NO: 87; og
- (g) marsvin A β 1-6-peptid med en aminosyresekvens fra SEQ ID NO: 88.

35

34.

Vaksinesammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 26 til 33, som ytterligere omfatter en aminosyrelinker, hvor nevnte aminosyrelinker omfatter, eller alternativt består av, nevnte andre tilkoblingssete.

5

35.

Vaksinesammensetning ifølge krav 34, hvori nevnte aminosyrelinker med nevnte andre tilkoblingssete er bundet til nevnte A β 1-6-peptid ved dets C-terminale ende.

10

36.

Vaksinesammensetning ifølge krav 34 eller 35, hvori nevnte aminosyrelinker med nevnte andre tilkoblingssete er valgt fra gruppen bestående av:

(a) GGC;

15

(b) GGC-CONH₂;

(c) GC;

(d) GC-CONH₂;

(e) C; og

(f) C-CONH₂.

20

37.

Vaksinesammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 26 til 36, hvori nevnte antigen eller antigendeterminant med nevnte minst andre tilkoblingssete er NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂ (SEQ ID NO: 77).

25

38.

Vaksinesammensetning ifølge krav 37, hvori nevnte virusliknende partikkel er en virusliknende partikkel fra RNA-bakteriofag Q β -kappeprotein.

30

39.

Fremgangsmåte for fremstilling av en sammensetning ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, som omfatter:

(a) å tilveiebringe en kjernepartikkel med minst ett første tilkoblingssete, hvori kjernepartikkelen er en virusliknende partikkel av en RNA-bakteriofag;

35

(b) å tilveiebringe minst ett antigen eller en antigendeterminant med minst ett andre tilkoblingssete,

hvor nevnte antigen eller antigendeterminant er et A β 1-6-peptid, og

hvor i nevnte andre tilkoblingssete er valgt fra gruppen bestående av:

- (i) et ikke-naturlig forekommende tilkoblingssete med nevnte antigen eller antigendeterminant; og
- 5 (ii) et naturlig forekommende tilkoblingssete med nevnte antigen eller antigendeterminant;
- og hvor i nevnte andre tilkoblingssete assosierer med nevnte første tilkoblingssete gjennom minst en ikke-peptidbinding; og
- 10 (c) å kombinere nevnte kjernepartikkel med nevnte minst ett antigen eller antigendeterminant, hvor i nevnte antigen eller antigendeterminant og nevnte kjernepartikkel interagerer gjennom nevnte assosiasjon for å danne en ordnet og repetitiv antigenoppstilling.
- 15 40.
Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 38 for anvendelse som et medikament.
- 41.
- 20 Anvendelse av en sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 38 for fremstilling av et medikament for behandling av Alzheimers sykdom og relaterte sykdommer.
- 42.
Sammensetning ifølge krav 1, hvor i nevnte sammensetning ytterligere omfatter en
- 25 heterobifunksjonell kryssbinder som inneholder en funksjonell gruppe som kan reagere med nevnte første tilkoblingssete og en ytterligere funksjonell gruppe som kan reagere med nevnte andre tilkoblingssete.
- 43.
- 30 Sammensetning ifølge krav 42, hvor i nevnte heterobifunksjonelle kryssbinder inneholder en funksjonell gruppe som kan reagere med sidekjede-aminogruppen i lysinresten i den virusliknende partikkelen eller i det minste en virusliknende partikkel-underenhet.
- 44.
- 35 Sammensetning ifølge krav 42, hvor i nevnte ytterligere funksjonelle gruppe i nevnte heterobifunksjonelle kryssbinder reagerer med en cysteinrest kondensert til A β 1-6-peptidet.

45.

Sammensetning ifølge krav 42, hvori nevnte heterobifunksjonelle kryssbinder er valgt fra SMPH, Sulfo-MBS, Sulfo-EMCS, Sulfo-GMBS, Sulfo-SIAB, Sulfo-SMPB, Sulfo-SMCC, SVSB, SIA og andre kryssbindere med en funksjonell gruppe som er reaktiv mot

5 aminogrunder og en funksjonell gruppe som er reaktiv mot cystein-rester.

46.

Sammensetning ifølge krav 42, hvori nevnte heterobifunksjonelle kryssbinder er SPDP eller Sulfo-LC-SPDP.

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Cytos Biotechnology AG
Novartis Pharma AG
Bachmann, Martin F
Tissot, Alain
Ortmann, Rainer
Lüönd, Rainer
Staufenbiel, Matthias
Frey, Peter

<120> Amyloid Beta 1-6 Antigen Arrays

<130> PA041WO

<150> US 60/396,639

<151> 2002-07-19

<150> US 60/470,432

<151> 2003-05-15

<160> 93

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 172

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 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

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

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 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> DNA
 <213> Escherichia coli

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

```

<400> 3
acgtttctgt ggctcgacgc atcttcctca ttcttctctc caaaaaccac ctcattgcaat 60
ataaacatct ataaataaag ataacaaata gaatattaag ccaacaaata aactgaaaaa 120
gtttgtccgc gatgctttac ctctatgagt caaaatggcc ccaatgtttc atcttttggg 180
ggaaactgtg cagtgttggc agtcaaactc gttgacaaac aaagtgtaca gaacgactgc 240
ccatgtcgat ttagaaatag ttttttgaaa ggaaagcagc atgaaaatta aaactctggc 300
aatcgttgtt ctgtcggctc tgtccctcag ttctacgacg gctctggccg ctgccacgac 360
ggtaaatggt gggaccgttc actttaaagg ggaagtgtt aacgccgctt gcgcagttga 420
tgcaggctct gttgatcaaa ccgttcagtt aggacaggtt cgtaccgcat cgctggcaca 480
ggaaggagca accagttctg ctgtcggttt taacattcag ctgaatgatt gcgataccaa 540
tgttgcatct aaagccgctg ttgccttttt aggtacggcg attgatgcgg gtcataccaa 600
cgttctggct ctgcagagtt cagctgcggg tagcgcaaca aacgttggtg tgcagatcct 660
ggacagaacg ggtgctgcgc tgacgctgga tggcgcgaca ttagttcag aaacaaccct 720
gaataacgga accaatacca ttccgttcca ggcgcgttat tttgcaaccg gggccgcaac 780
cccgggtgct gctaatgcgg atgcgacctt caaggttcag tatcaataac ctacctaggt 840
tcaggacgt tca 853

```

```

<210> 4
<211> 132
<212> PRT
<213> Bacteriophage Q-beta

```

```

<400> 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

```

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

115

120

125

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 5

<211> 329

<212> PRT

<213> Bacteriophage Q-beta

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Pro Phe Ala Ile Trp Ser Leu Glu Glu
165 170 175

Val Tyr Glu Pro Pro Thr Lys Asn Arg Pro Trp Pro Ile Tyr Asn Ala
180 185 190

Val Glu Leu Gln Pro Arg Glu Phe Asp Val Ala Leu Lys Asp Leu Leu
195 200 205

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

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

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> Bacteriophage 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

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

Tyr

<210> 7
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Bacteriophage fr
 <400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Tyr
 130

<210> 8
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Bacteriophage GA
 <400> 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
 Page 6

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

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> Bacteriophage 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

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

<212> PRT

<213> Bacteriophage 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

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

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> Bacteriophage 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> Bacteriophage M11

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Asn Pro Ala Tyr
 130

<210> 13

<211> 133

<212> PRT

<213> Bacteriophage MX1

<400> 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

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

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> Bacteriophage 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

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

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> Bacteriophage 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

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

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> Bacteriophage 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> Artificial Sequence

<220>
 <223> Bacteriophage Qbeta 240 mutant

<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

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

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> Artificial Sequence

<220>
 <223> Bacteriophage Q-beta 243 mutant

<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

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

115

120

125

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 19
<211> 132
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Bacteriophage Q-beta 250 mutant

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 20
<211> 132
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Bacteriophage Q-beta 251 mutant

<400> 20

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

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

PA041W0_sequence_listing.ST25.txt

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> 21

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Bacteriophage Q-beta 259 mutant

<400> 21

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

PA041W0_sequence_listing.ST25.txt

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> Hepatitis B virus

<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> Hepatitis B virus

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ser Gln Cys
 210

<210> 24

<211> 188

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 24

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

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

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> Hepatitis B virus

<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

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

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> Hepatitis B virus

<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

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

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> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> plasmid PAP283-58

<400> 27
 cgagctcgcc cctggcttat cgaaattaat acgactcact atagggagac cggaattcga 60
 gctcgcccg ggatcctcta gaattttctg cgacccatc ccgggtggcg cccaaagtga 120
 ggaaaatcac atggcaaata agccaatgca accgatcaca tctacagcaa ataaaattgt 180
 gtggtcggat ccaactcgtt tatcaactac attttcagca agtctgttac gccaacgtgt 240
 taaagtgtgt atagccgaac tgaataatgt ttcagggtcaa tatgtatctg tttataagcg 300
 tcctgcacct aaaccggaag gttgtgcaga tgcctgtgtc attatgccga atgaaaacca 360
 atccattcgc acagtgattt cagggtcagc cgaaaacttg gctaccttaa aagcagaatg 420
 ggaaactcac aaacgtaacg ttgacacact ctcgcgagc ggcaacgccg gtttgggttt 480
 ccttgacctt actgcggcta tcgtatcgtc tgatactact gcttaagctt gtattctata 540
 gtgtcaccta aatcgtatgt gtatgataca taaggttatg tattaattgt agccgcgttc 600
 taacgacaat atgtacaagc ctaattgtgt agcatctggc ttactgaagc agaccctatc 660
 atctctctcg taaactgccg tcagagtcgg tttggttga cgaaccttct gagtttctgg 720
 taacgccgtt cgcaccccg gaaatgggtca ccgaaccaat cagcagggtc atcgctagcc 780
 agatcctcta cgccggacgc atcgtggccg gcatcaccgg cgcacacagt gcggttgctg 840
 gcgcctatat cgccgacatc accgatgggg aagatcgggc tcgccacttc gggctcatga 900
 gcgcttgttt cggcgtgggt atggtggcag gccccgtggc cgggggactg ttgggcgcca 960
 tctccttgca tgcaccattc cttgcggcgg cgggtgcttca acggcctcaa cctactactg 1020
 ggctgcttcc taatgcagga gtcgcataag ggagagcgtc gatatggtgc actctcagta 1080
 caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc aactccgcta tcgctacgtg actgggtcat 1140
 ggctgcgccc cgacaccgc caacaccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc 1200
 ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc agaggttttc 1260
 accgtcatca ccgaaacgcg cgaggcagct tgaagacgaa agggcctcgt gatacgctta 1320
 tttttatagg ttaatgtcat gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg 1380
 ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg 1440

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt	1500
attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgcgg cattttgcct tcctgttttt	1560
gctcaccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg	1620
ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa	1680
cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagt ctgctatgtg gcgcgggtatt atcccgtatt	1740
gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctccagaatga cttggttgag	1800
tactcaccag tcacagaaaa gcattcttac gatggcatga cagtaagaga attatgcagt	1860
gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaactac ttctgacaac gatcggagga	1920
ccgaaggagc taaccgcttt ttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt	1980
tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta	2040
gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg	2100
caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc	2160
cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt	2220
atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgtc tcgtagttat ctaacacgacg	2280
gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg	2340
attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa	2400
cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaa	2460
atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga	2520
tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg	2580
ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctacca ctctttttcc gaaggtaact	2640
ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac	2700
cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgtc tgctaactct gttaccagt	2760
gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttg actcaagacg atagttaccg	2820
gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg gggtcgtgca cacagcccag cttggagcga	2880
acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgcgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc	2940
gaaggagagaa aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg	3000
agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc	3060
tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc	3120
agcaacgcgg cttttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgtca catgttcttt	3180
cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg ctttgagtg agctgatacc	3240
gctcgcgcga gccgaacgac gagcgcagcg agtcagttag cgaggaagcg gaagagcgcc	3300
caatacgcaa accgcctctc ccgcgcggtt ggccgattca ttaatgcagc tgtggtgtca	3360
tggtcgggtga tcgccagggg gccgacgcgc atctcgactg catggtgcac caatgcttct	3420
ggcgtcaggc agccatcga agctgtggta tggccgtgca ggtcgtaa at cactgcataa	3480

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

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

<210> 28
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Bacteriophage 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> Artificial Sequence

<220>
 <223> AP205 coat protein

<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

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

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> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> plasmid pAP281-32

<400> 30
cgagctcgcc cctggcttat cgaaattaat acgactcact atagggagac cggaattcga 60
gctcgcccgg ggatcctcta gattaaccca acgcgtagga gtcaggccat ggcaaataag 120
acaatgcaac cgatcacatc tacagcaaataaaaattgtgt ggtcggatcc aactcgttta 180
tcaactacat tttagcaag tctgttacgc caacgtgta aagttggtat agccgaactg 240
aataatgttt cagggtcaata tgtatctgtt tataagcgtc ctgcacctaa accgaaggtc 300
agatgcctgt gtcattatgc cgaatgaaaa ccaatccatt cgcacagtga tttagggtc 360
agccgaaaac ttggctacct taaaagcaga atgggaaact cacaacgta acgttgacac 420
actcttcgcy agcggcaacg ccggtttggg ttctcttgac cctactgcyg ctatcgtatc 480
gtctgatact actgcttaag cttgtattct atagtgtcac ctaaatcgta tgtgtatgat 540
acataagggt atgtattaat ggtagccgcy ttctaacgac aatatgtaca agcctaattg 600
tgtagcatct ggcttactga agcagaccct atcatctctc tcgtaaactg ccgtcagagt 660
cggttggggt ggacagacct ctgagtttct ggtaacgcyg ttccgcaccc cggaatggt 720
caccgaacca tttagcaggg tcatcgctag ccagatcctc tacgccggac gcatcgtggc 780
ccgcatcacc ggcgccacag gtgcggtgct ggcgcctata tcgccgacat caccgatggg 840
gaagatcggg ctgcgcactt cgggctcatg atcgttggtt tccgcctggg tatggtggca 900

PA041wo_sequence_listing.ST25.txt

ggccccgtgg cccgggggac tggtgggagc catctccttg catgcacat tccttgcggc	960
ggcgggtgctc aacggcctca acctactact gggctgcttc ctaatgcagg agtcgcataa	1020
gggagagcgt cgatatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc	1080
caactccgct atcgctacgt gactgggtca tggctgcgcc ccgacacccg ccaacacccg	1140
ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgcttc cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg	1200
tctccgggag ctgcatgtgt cagagggttt caccgtcatc accgaaacgc gcgaggcagc	1260
ttgaagacga aagggcctcg tgatacgcct atttttatag gttaatgtca tgataataat	1320
ggtttcttag acgtcagggt gcacttttcg gggaaatgtg cgcggacccc ctattgggtt	1380
atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct	1440
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc	1500
cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa	1560
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg	1620
taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgtttttca atgatgagca cttttaaggt	1680
tctgctatgt gtcgcggtat tatcccgtat 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 cttgatcgtt gggaaaccga gctgaatgaa gccataccaa	1980
acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtac gaacggcaac aacgttgccg aaactattaa	2040
ctggcgaaact acttactcta gttccccgc aacaattaat agactggatg gaggcggata	2100
aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat	2160
ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggtt tcattgcagc actggggcca gatggtaagc	2220
cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata	2280
gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt	2340
actcatatat acttttagatt gatttaaaac ttcattttta atttaaaagg atctaggtga	2400
agatcctttt tgataatctc atgacaaaaa tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag	2460
cggtcagacc ccgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tcctttttt ctgcgcgtaa	2520
tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttggttg ccggatcaag	2580
agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaataactg	2640
tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat	2700
acctcgtctt gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta	2760
ccgggttgga ctcaagacga taggtaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg	2820
gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc	2880
gcgagcattg agaaagcgcc acgcttcccg aaggggagaaa ggcggacagg tatccggtaa	2940

PA041W0_sequence_listing.ST25.txt

```

gcggcaggggt cggaacaaga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc 3000
tttatagtc tgcggggtt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt 3060
cagggggggcg gagcctatgg aaaaacgcc gcaacgcggc ctttttacgg ttcttgacct 3120
ttggctggcc ttttgctcac atgttctttc ctgcggtatc ccctgattct gtggataacc 3180
gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctgcgcgag ccgaacgacc gacggcgag 3240
cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgctc tccccgcgcg 3300
ttggccgatt cattaatgca gctgtggtgt catggtcggg gatcgccagg gtgccgacgc 3360
gcatctcgac tgcattggtgc accaatgctt ctggcgctcag gcagccatcg gaagctgtgg 3420
tatggccgtg caggtcgtaa atcactgcat aattcgtgtc gctcaaggcg cactcccgtt 3480
ctggataatg tttttgctg cgacatcata acggttctgg caaatattct gaaatgagct 3540
ggtgacaatt aatcatcgaa ctagttaact agtacgcaag ttcacgtaaa aagggtatcg 3600
cggaatt 3607

```

```

<210> 31
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial sequence

```

```

<220>
<223> N-terminal linker

```

```

<400> 31

```

```

Cys Gly Asp Glu Gly Gly
1          5

```

```

<210> 32
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial sequence

```

```

<220>
<223> C-terminal linker

```

```

<400> 32

```

```

Gly Gly Glu Asp Gly Cys
1          5

```

```

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

```

```

<220>
<223> Linker

```

```

<400> 33

```

```

Gly Gly Lys Gly Gly
1          5

```

```

<210> 34

```

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

<211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> N-terminal glycine linker

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (1)..(1)
 <223> Glycine can be repeated from zero to five times

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (3)..(3)
 <223> Glycine can be repeated from zero to twelve times

<400> 34

Gly Cys Gly
 1

<210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> N terminal glycine serine linkers

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (1)..(1)
 <223> Glycine can be repeated from zero to five times

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (3)..(3)
 <223> Glycine can be repeated from zero to ten times

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (4)..(4)
 <223> Serine can be repeated from zero to two times

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (5)..(9)
 <223> These residues can be repeated from zero to three times as a group

<400> 35

Gly Cys Gly ser Gly Gly Gly Gly ser
 1 5

<210> 36
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> C-terminal glycine linker

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (1)..(1)
 <223> Glycine can be repeated from zero to twelve times

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (3)..(3)
 <223> Glycine can be repeated from zero to five times

<400> 36

Gly Cys Gly

1

<210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> C terminal glycine serine linkers

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (1)..(1)
 <223> Glycine can be repeated from zero to ten times

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (2)..(2)
 <223> Serine can be repeated from zero to two times

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (3)..(7)
 <223> These residues can be repeated from zero to three times as a group

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (8)..(8)
 <223> Glycine can be repeated from zero to eight times

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (10)..(10)
 <223> Glycine can be repeated from zero to five times

<400> 37

Gly ser Gly Gly Gly Gly ser Gly Cys Gly

1

5

10

<210> 38
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Glycine serine linker

<220>

PA041wo_sequence_listing.ST25.txt

<221> REPEAT
 <222> (1)..(5)
 <223> These residues can be repeated any times as a group

<400> 38

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> N-terminal gamma1

<400> 39

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

<210> 40
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> C-terminal gamma 1

<400> 40

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

<210> 41
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> N-terminal gamma 3

<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> Artificial Sequence

<220>
 <223> C-terminal gamma 3

<400> 42

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

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

Cys Gly

<210> 43
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> N-terminal glycine linker
 <400> 43

Gly Cys Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 44
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> C-terminal glycine linker
 <400> 44

Gly Gly Gly Gly Cys Gly
 1 5

<210> 45
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> C-terminal glycine-lysine linker
 <400> 45

Gly Gly Lys Lys Gly Cys
 1 5

<210> 46
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> N-terminal glycine-lysine linker
 <400> 46

Cys Gly Lys Lys Gly Gly
 1 5

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

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

<223> C-terminal linker

<400> 47

Gly Gly Cys Gly

1

<210> 48

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer

<400> 48

ggtaacatcg gtcgagatgg aaaacaaact ctggtcc

37

<210> 49

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer

<400> 49

ggaccagagt ttgttttcca tctcgaccga tggtacc

37

<210> 50

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer

<400> 50

agctcgcccg gggatcctct ag

22

<210> 51

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer

<400> 51

cgatgcattt catccttagt tatcaatagc ctgggttcag

40

<210> 52

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer

<400> 52

ggcaaaatta gagactgtta ctttaggtaa gatcgg

36

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

<210> 53
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide primer
 <400> 53
 ccgatcttac ctaaagtaac agtctctaatt ttgccc

36

<210> 54
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide primer
 <400> 54
 ggccatggca cgactcgaga ctgttacttt agg

33

<210> 55
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide primer
 <400> 55
 gatttaggtg acactatag

19

<210> 56
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide primer
 <400> 56
 gatggacgtc aaactctggt cctcaatccg cgtggggg

37

<210> 57
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide primer
 <400> 57
 cccacgcgg attgaggacc agagtttgac gtccatc

37

<210> 58
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> EcoRIHBCAg(s) primer

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

<400> 58
ccggaattca tggacattga cccttataaa g 31

<210> 59
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Lys-HBcAg(as) primer

<400> 59
cctagagcca cctttgccac catcttctaa attagtaccc acccaggtag c 51

<210> 60
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Lys-HBcAg(s) primer

<400> 60
gaagatggtg gcaaagggtg ctctagggac ctagtagtca gttatgtc 48

<210> 61
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HBcAg(1-149)Hind(as) primer

<400> 61
cgcggtccaa gcttctaaac aacagtagtc tccggaag 38

<210> 62
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 48as primer

<400> 62
gtgcagtatg gtgaggtgag gaatgctcag gagactc 37

<210> 63
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 48s primer

<400> 63
gagtctctg agcattcctc acctcaccat actgcac 37

<210> 64
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

PA041W0_sequence_listing.ST25.txt

<220>

<223> 107as primer

<400> 64

cttccaaaag tgagggaaga aatgtgaaac cac

33

<210> 65

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HBcAg149hind-as

<400> 65

cgcgtcccaa gcttctaaac aacagtagtc tccggaagcg ttgatag

47

<210> 66

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 107s primer

<400> 66

gtggtttcac atttcttccc tcacttttgg aag

33

<210> 67

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HBcAgwtHindIII primer

<400> 67

cgcgtcccaa gcttctaaca ttgagattcc cgagattg

38

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> epitope CeH3

<400> 68

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

<210> 69

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CeH3fwd primer

<220>

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

<221> CDS

<222> (1)..(51)

<400> 69

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

gtc

Val

51

<210> 70

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CeH3fwd primer

<400> 70

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

Val

<210> 71

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CeH3rev primer

<400> 71

accagaagca cgagaccagg tcaagttaac atcttccaaa ttattacca c 51

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CeH3rev primer peptide

<400> 72

Asp Glu Leu Asn Asn Gly Val
 1 5

<210> 73

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HBCAg-wt EcoRI fwd primer

<400> 73

ccggaattca tggacattga cccttataaa g

31

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

<210> 74
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> HBCAg-wt Hind III rev primer

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220>
 <223> murine Abeta 1-6 GGC

<400> 78

Asp Ala Glu Phe Gly His Gly Gly Cys
 1 5

<210> 79
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

PA041W0_sequence_listing.ST25.txt

<220>

<223> primer p1.44

<400> 79

aaccatggca aataagccaa tgcaaccg

28

<210> 80

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer p1.45

<400> 80

aatctagaat tttctgca cccatcccgg

30

<210> 81

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer p1.46

<400> 81

aaaagcttaa gcagtagtat cagacgatac

30

<210> 82

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer p1.47

<400> 82

gagtgatcca actcgtttat caactacatt ttcagcaagt ctg

43

<210> 83

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 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

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

<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*

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

<400> 91

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

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

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

<210> 92

<211> 770

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
 1 5 10 15

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
 20 25 30

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
 35 40 45

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
 50 55 60

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
 65 70 75 80

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
 85 90 95

Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
 100 105 110

Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
 115 120 125

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
 130 135 140

Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
 145 150 155 160

Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
 165 170 175

Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
 180 185 190

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

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

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

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

PA041WO_sequence_listing.ST25.txt

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

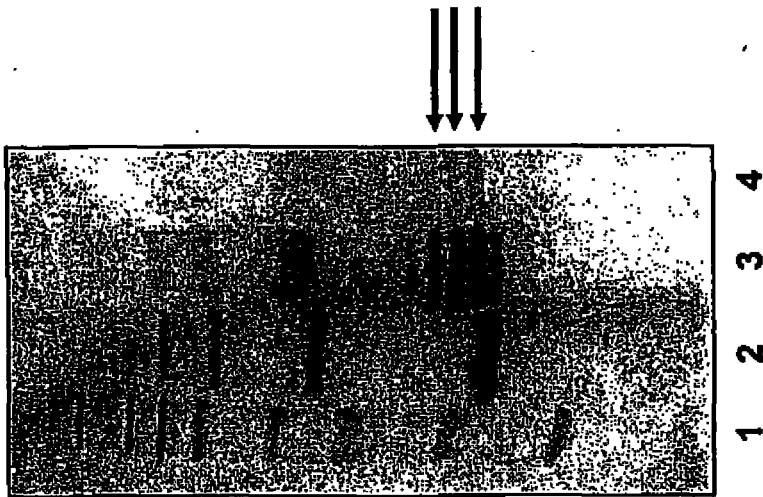
Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile
 35 40 45

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

1/23

**FIG. 1**

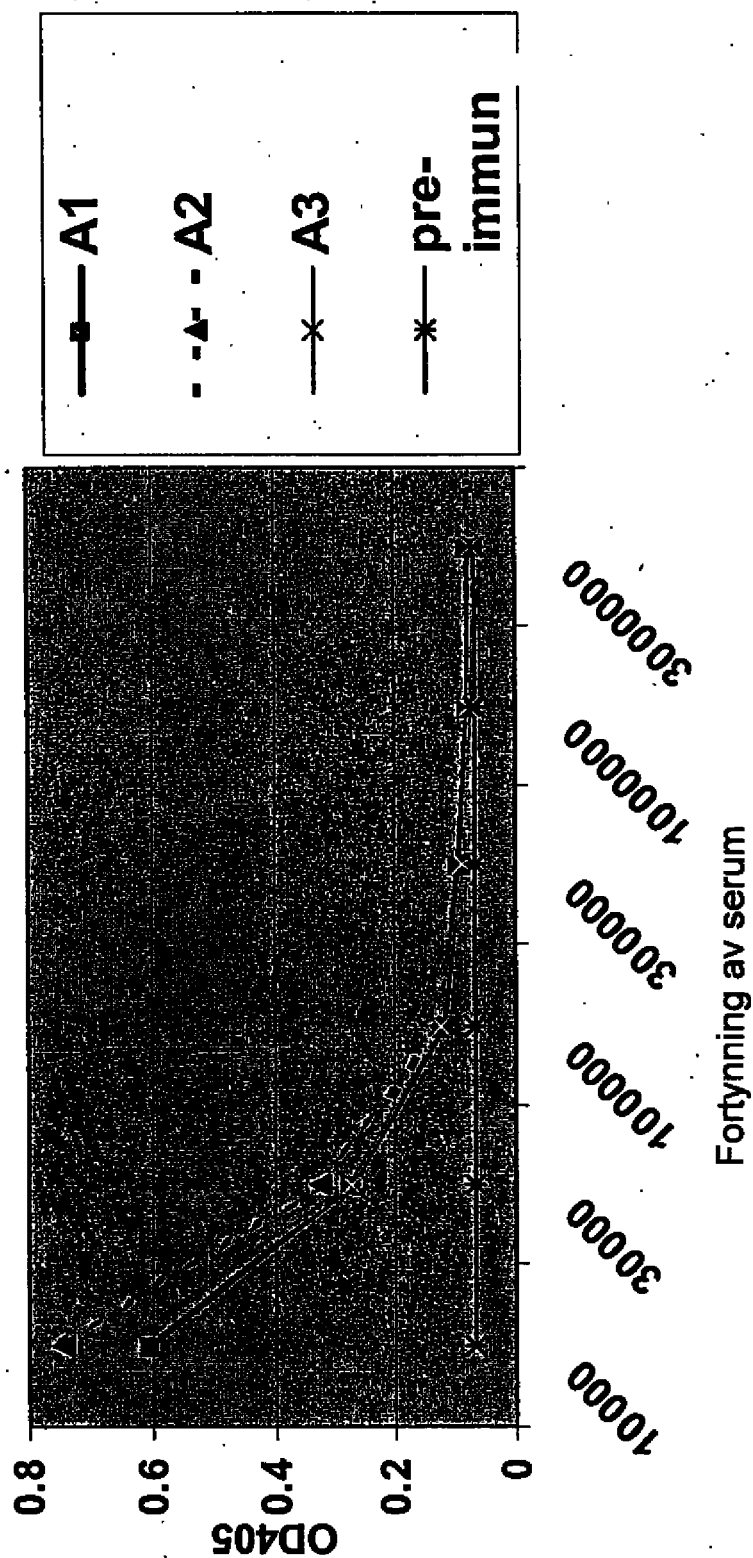
2/23



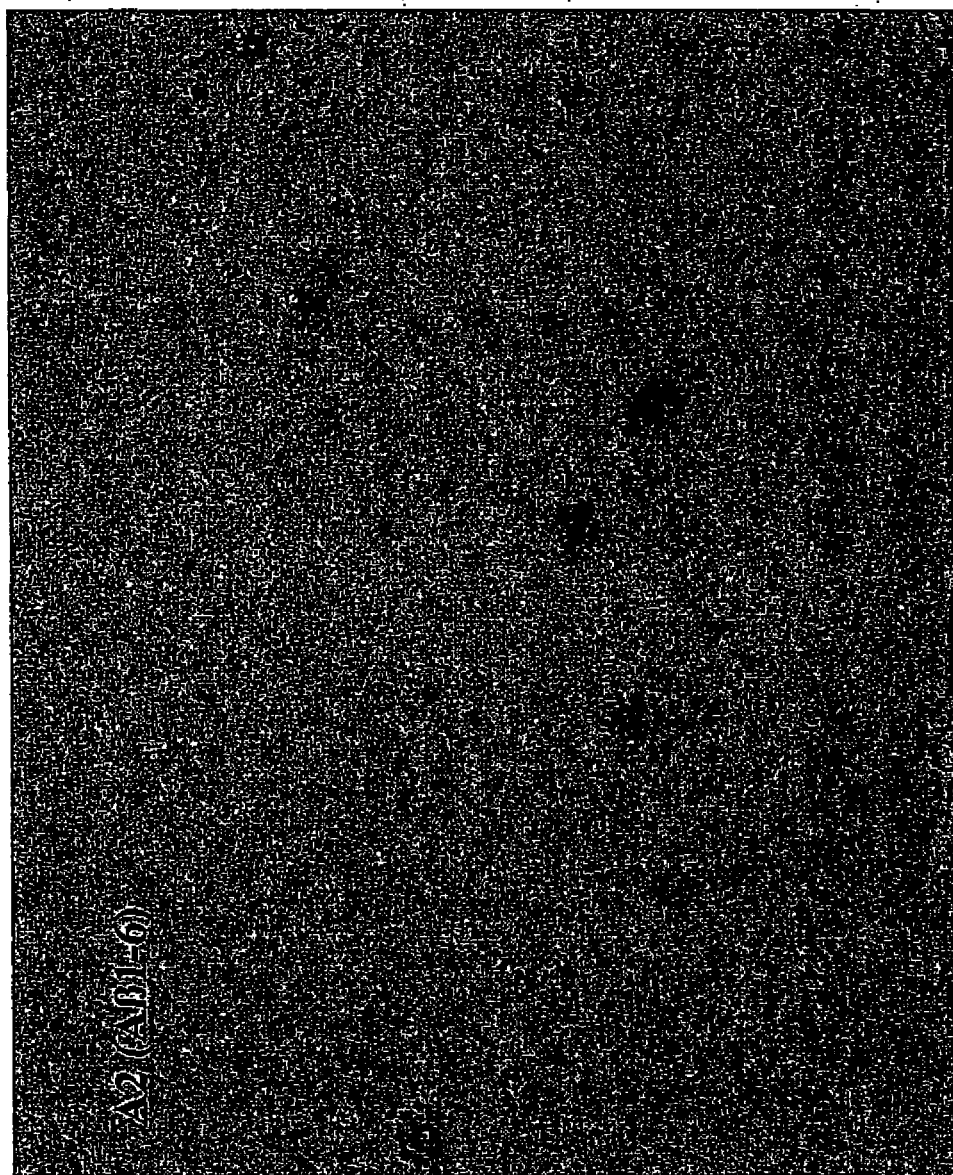
FIG. 2

3/23

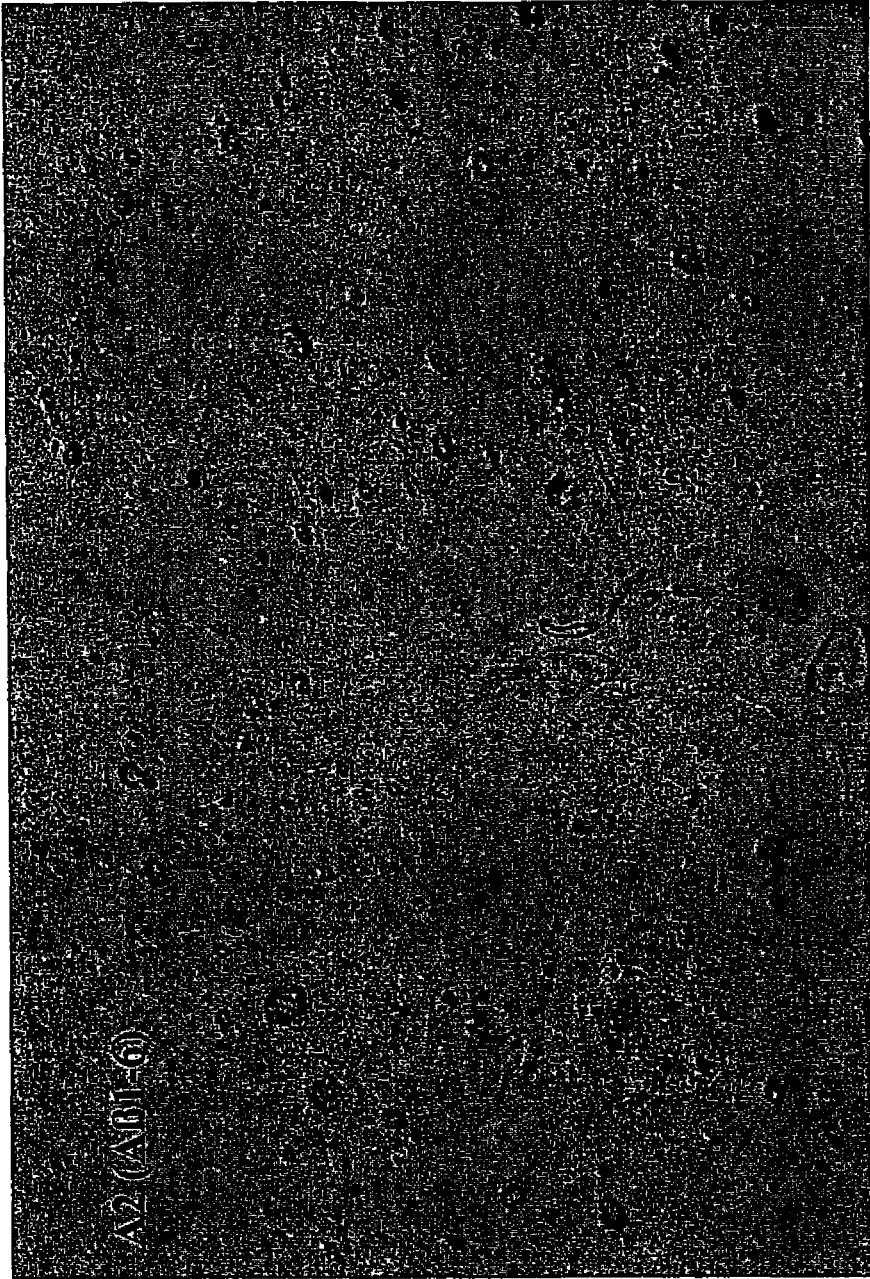
Immunisering med Q β -A β 1-6 anti-A β 1-40 ELISA på dag 21

**FIG. 3**

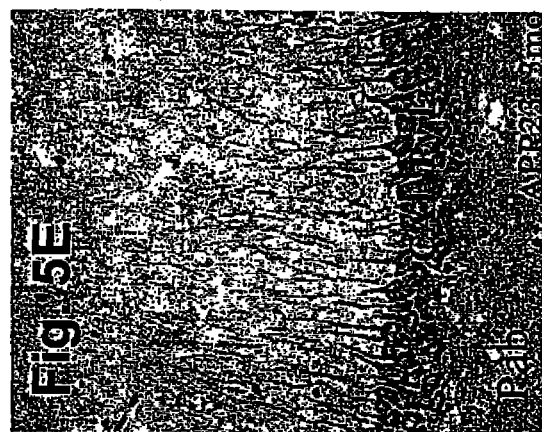
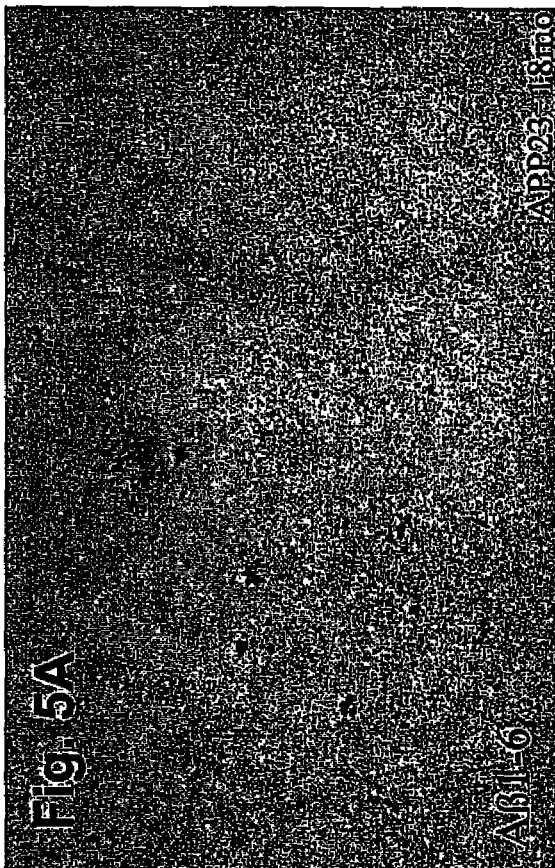
4/23

**FIG. 4A**

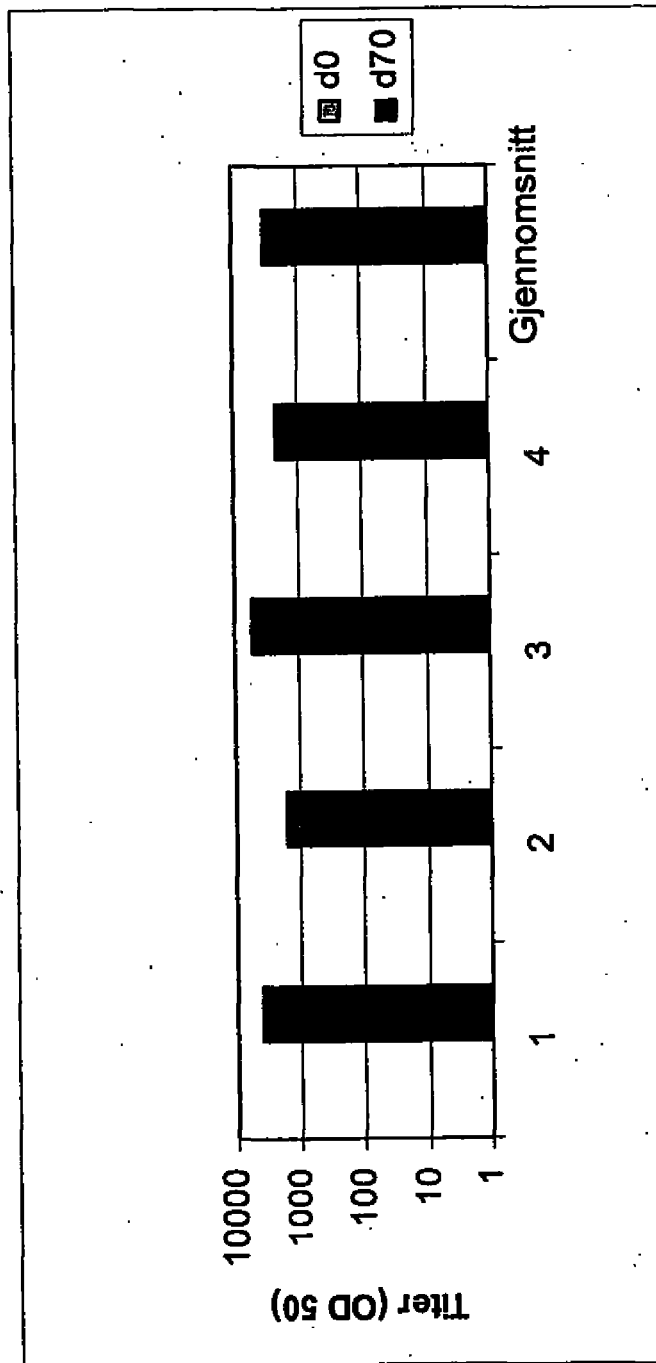
5/23

**FIG. 4B**

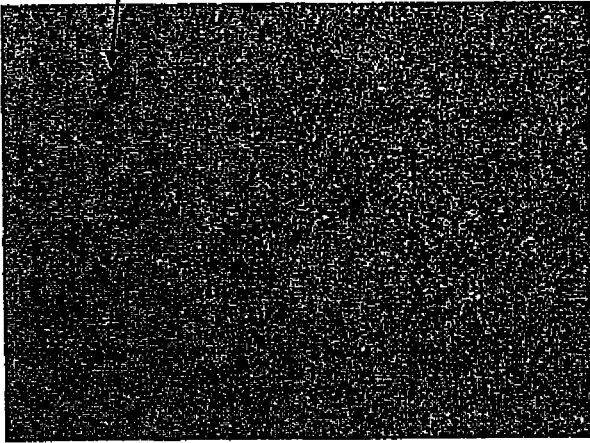
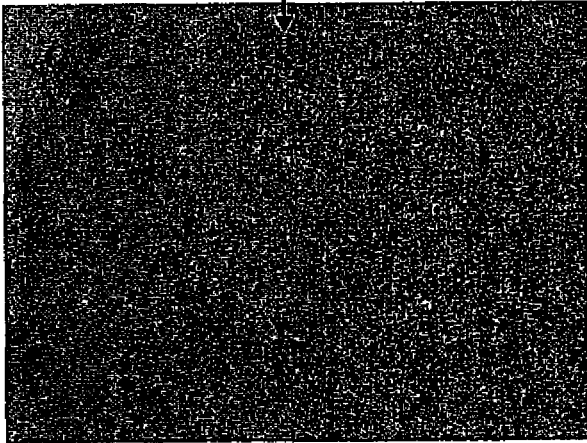
6/23

**Fig. 5**

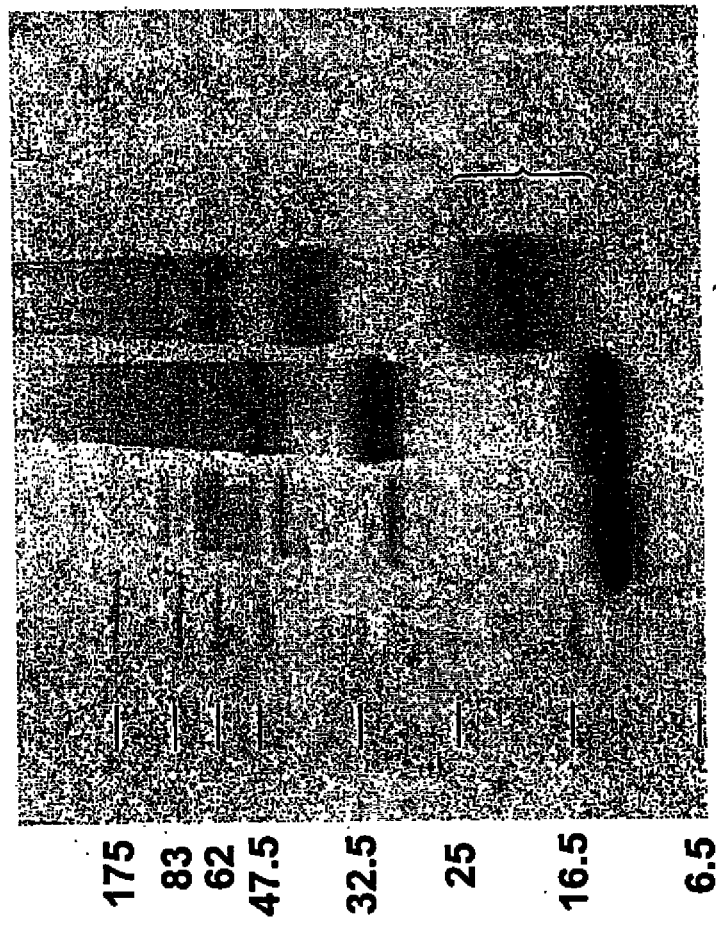
7/23

**Fig. 6**

8/23

**Fig. 7B****Fig. 7A**

9/23

**Fig. 8**

10/23

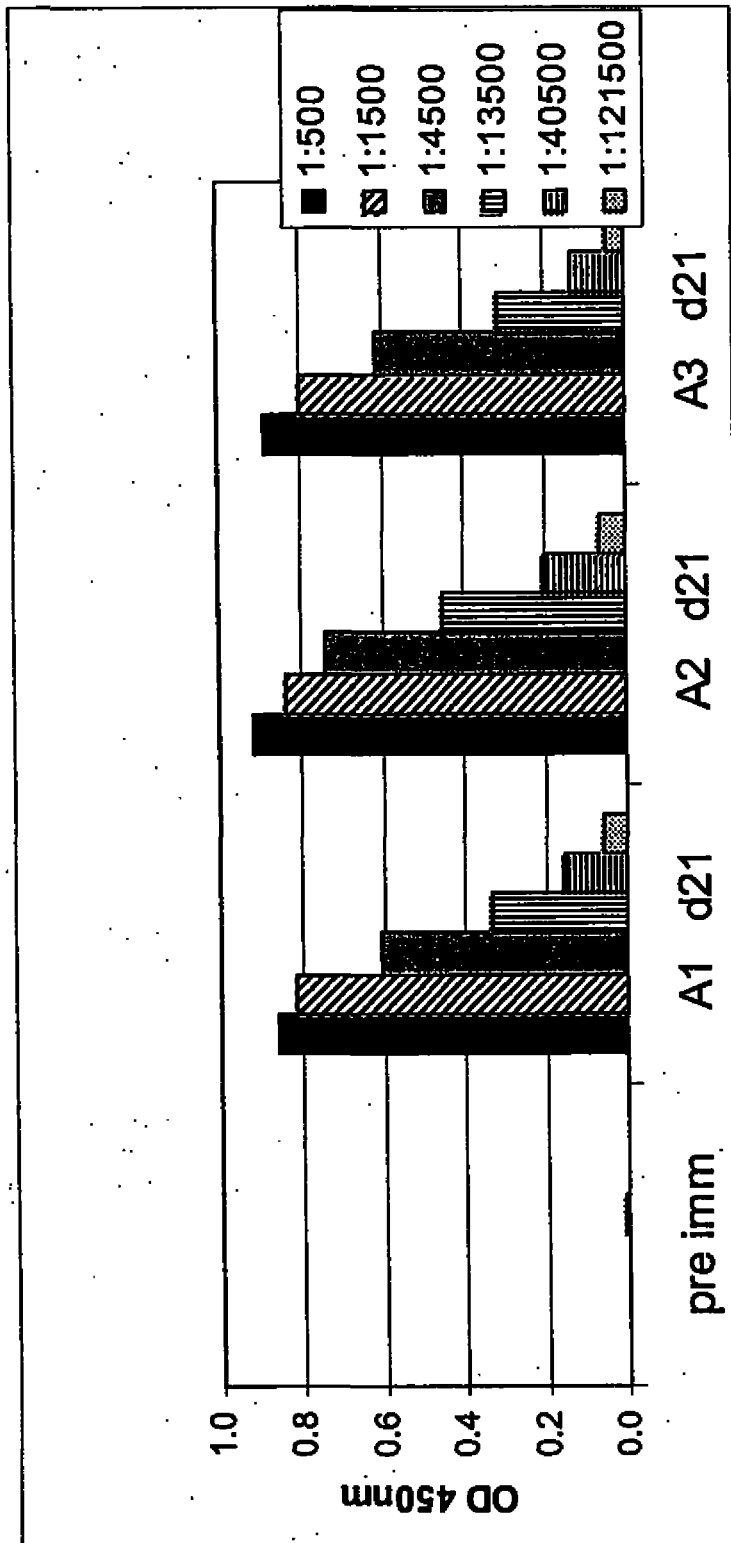


Fig. 9

11/23

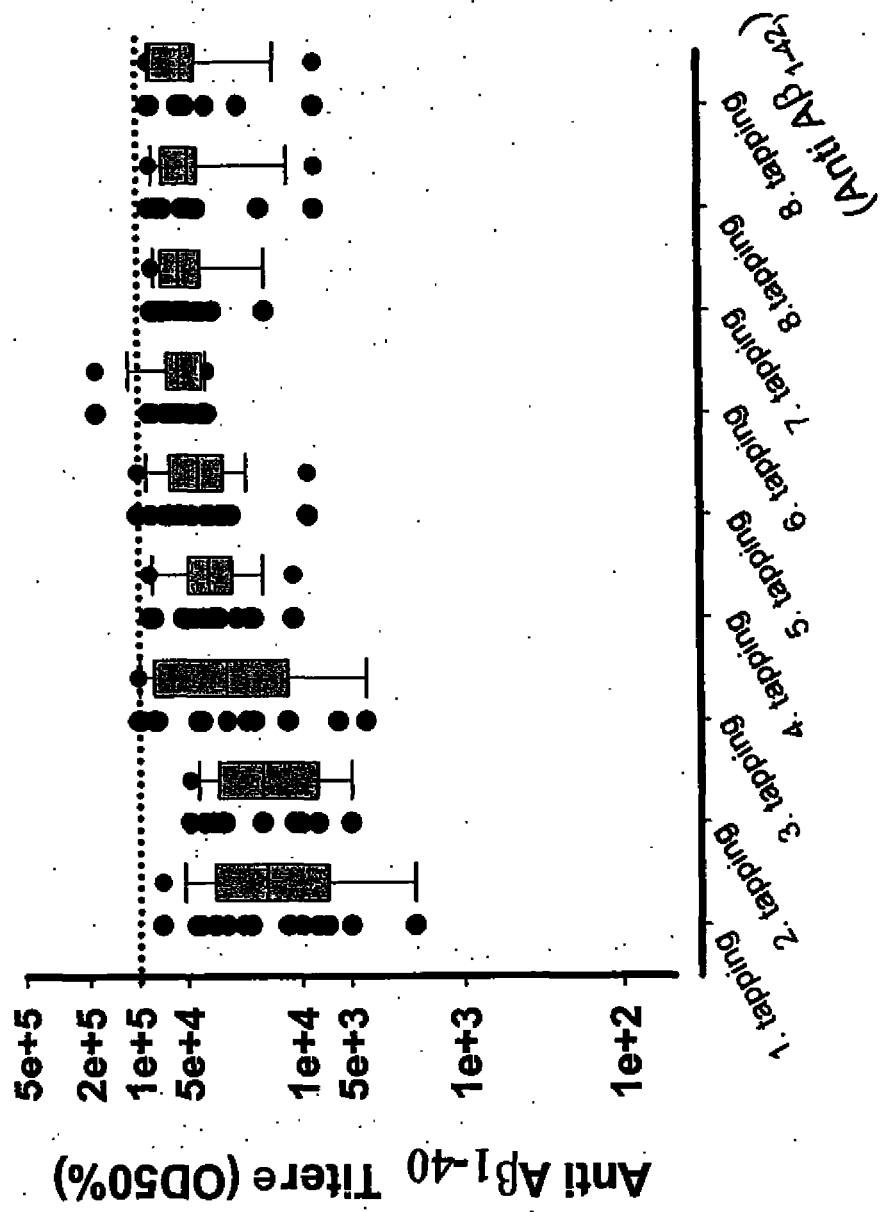
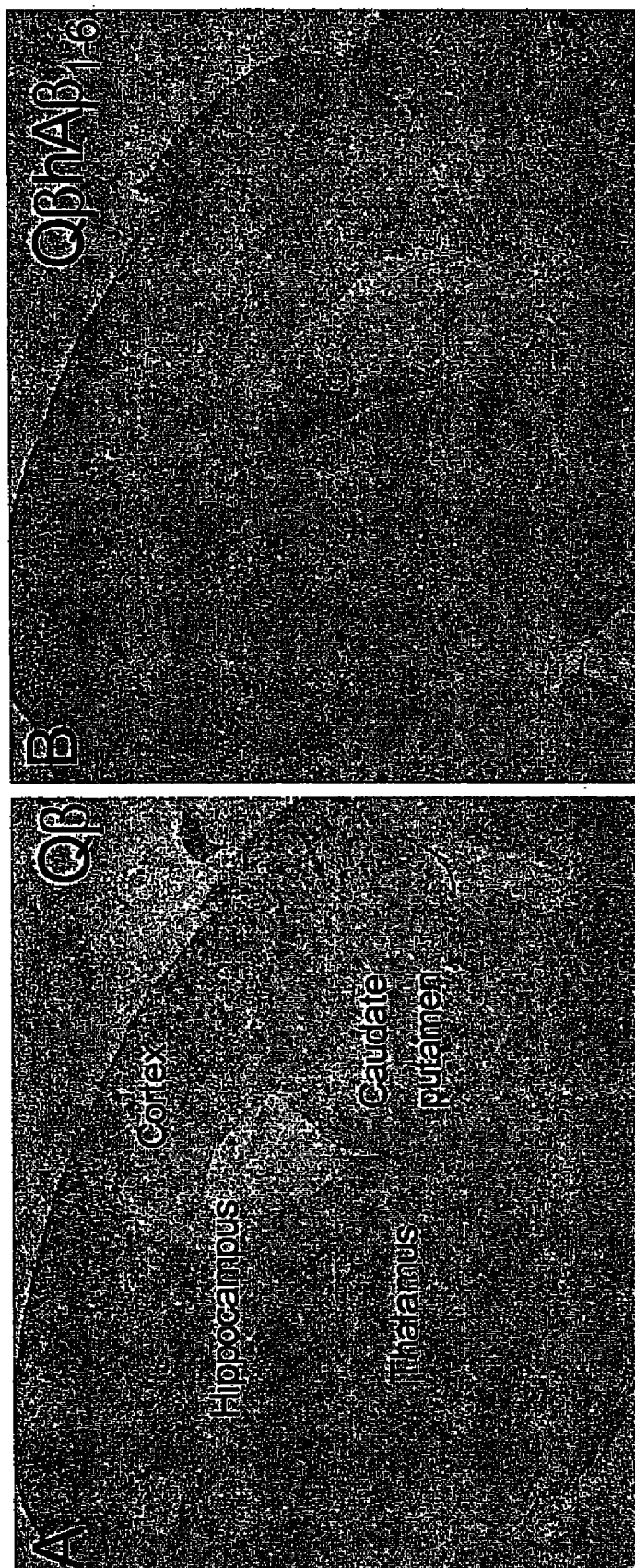


Fig. 10

12/23

**Fig. 11B****Fig. 11A**

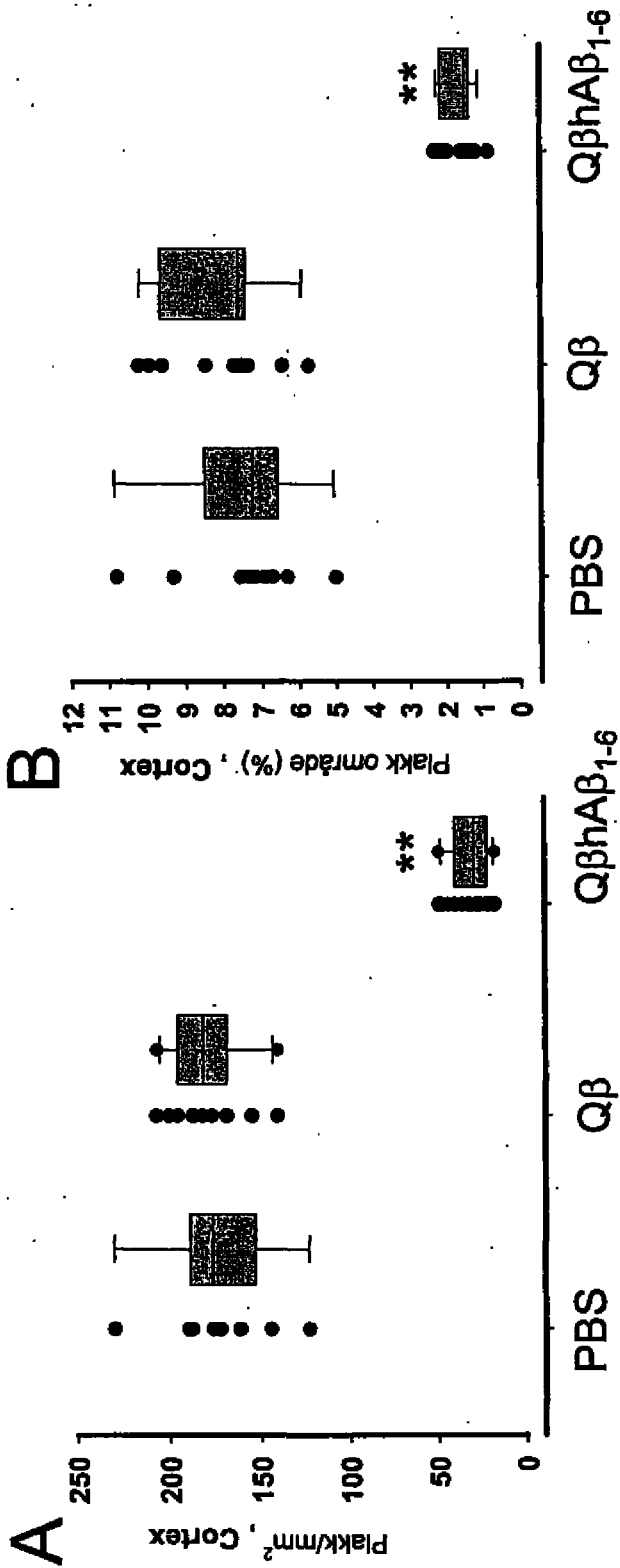


Fig. 12B

Fig. 12A

14/23

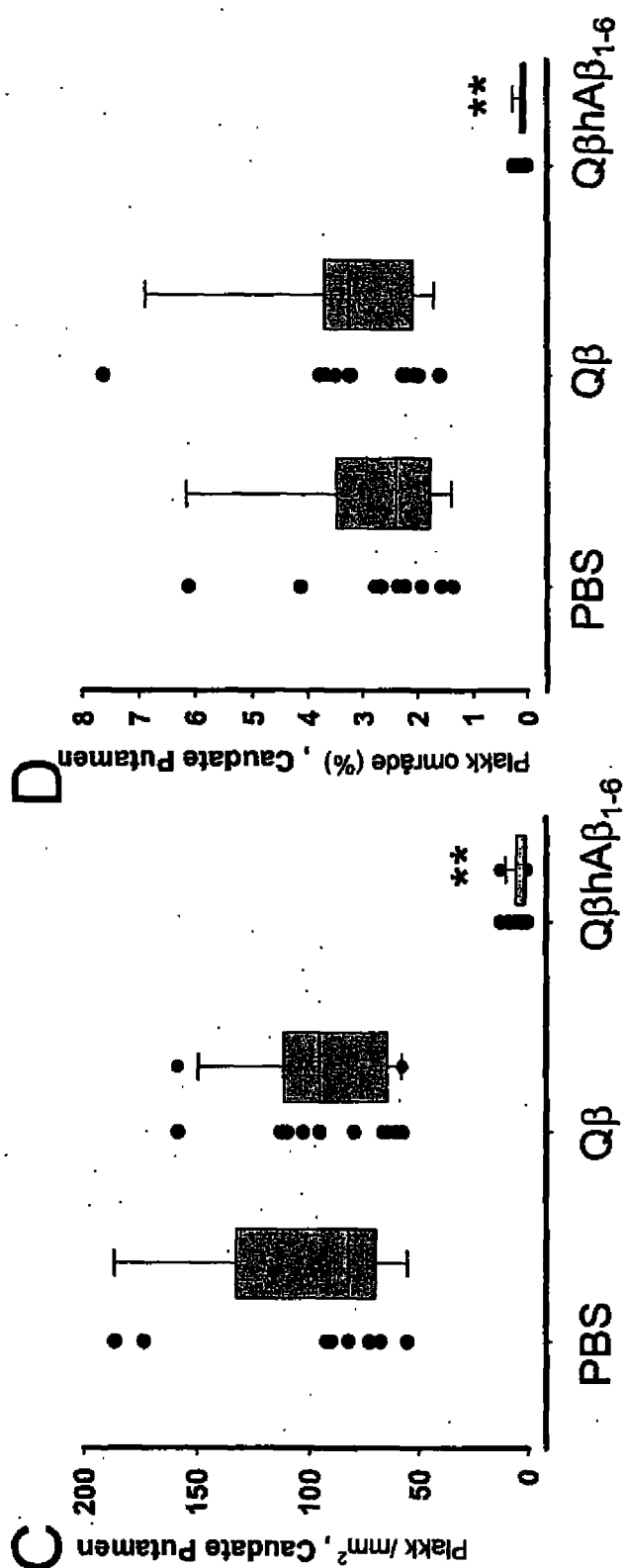


Fig. 12C

Fig. 12D

15/23

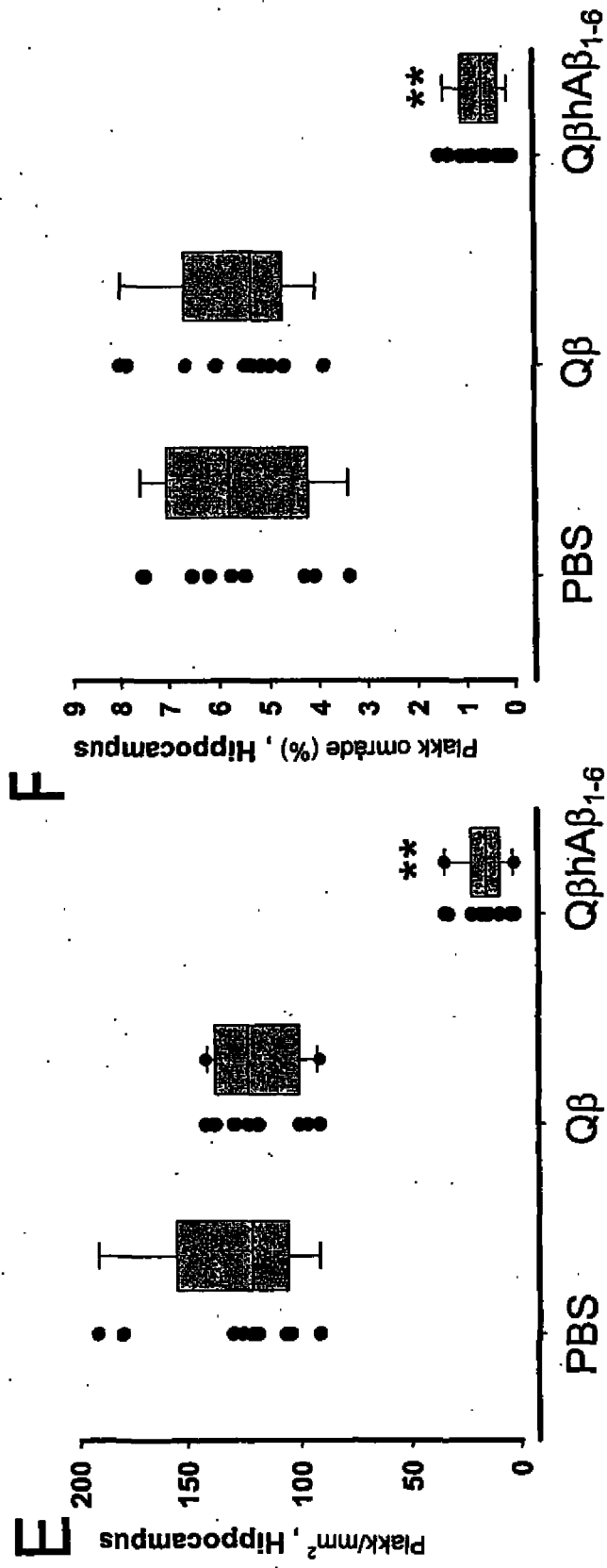


Fig. 12E

Fig. 12F

16/23



Fig. 12G

Fig. 12H

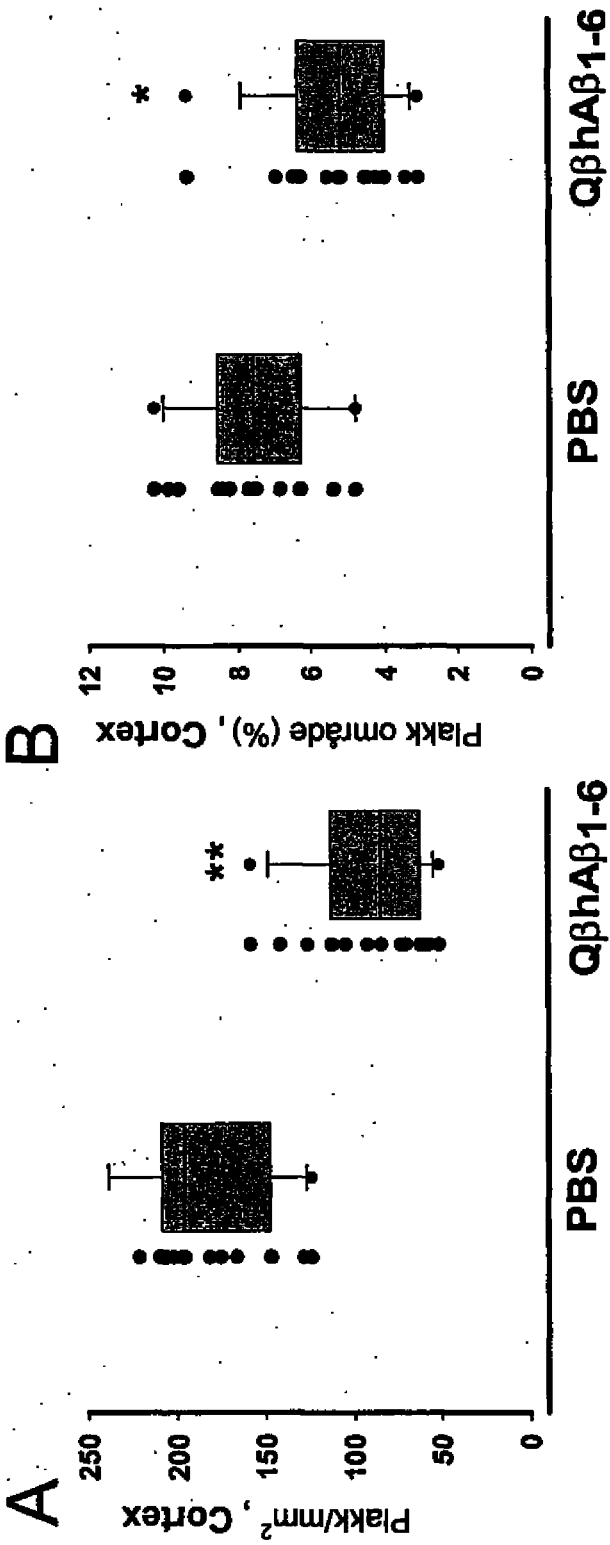


Fig. 13A

Fig. 13B

18/23

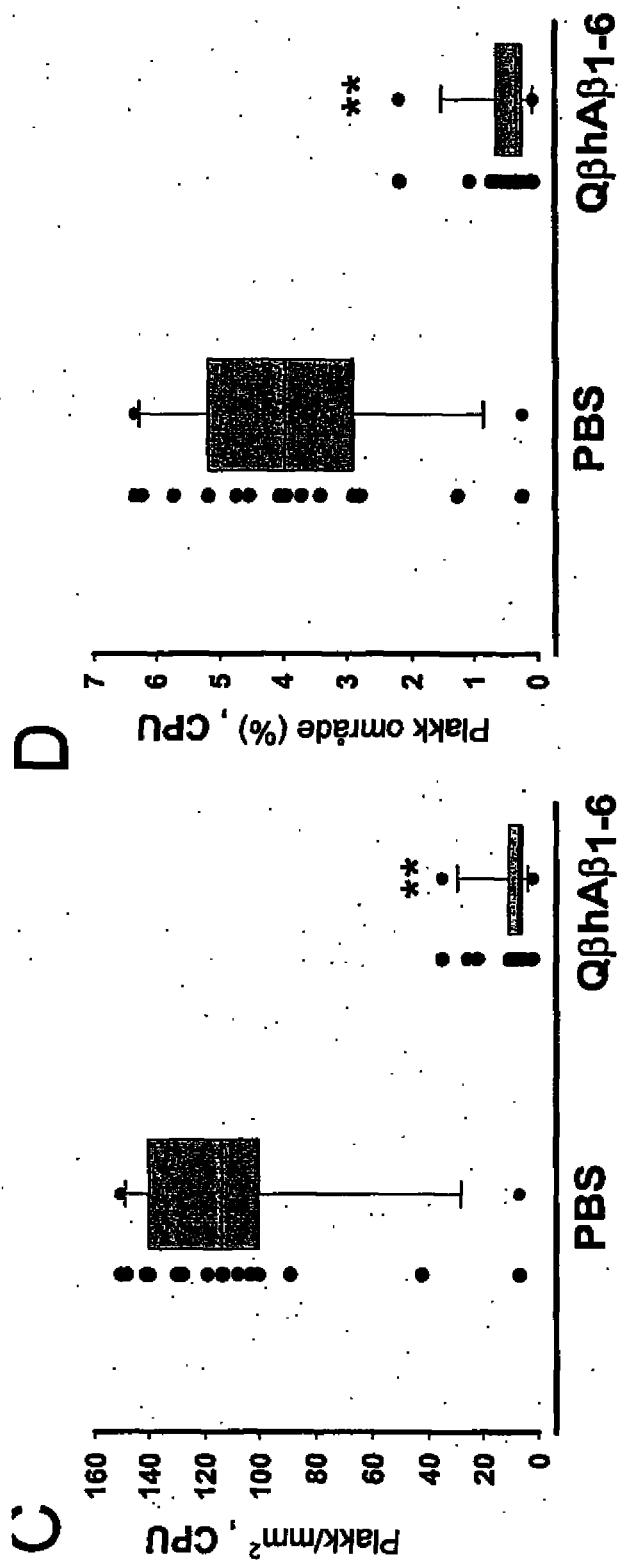


Fig. 13D

Fig. 13C

19/23

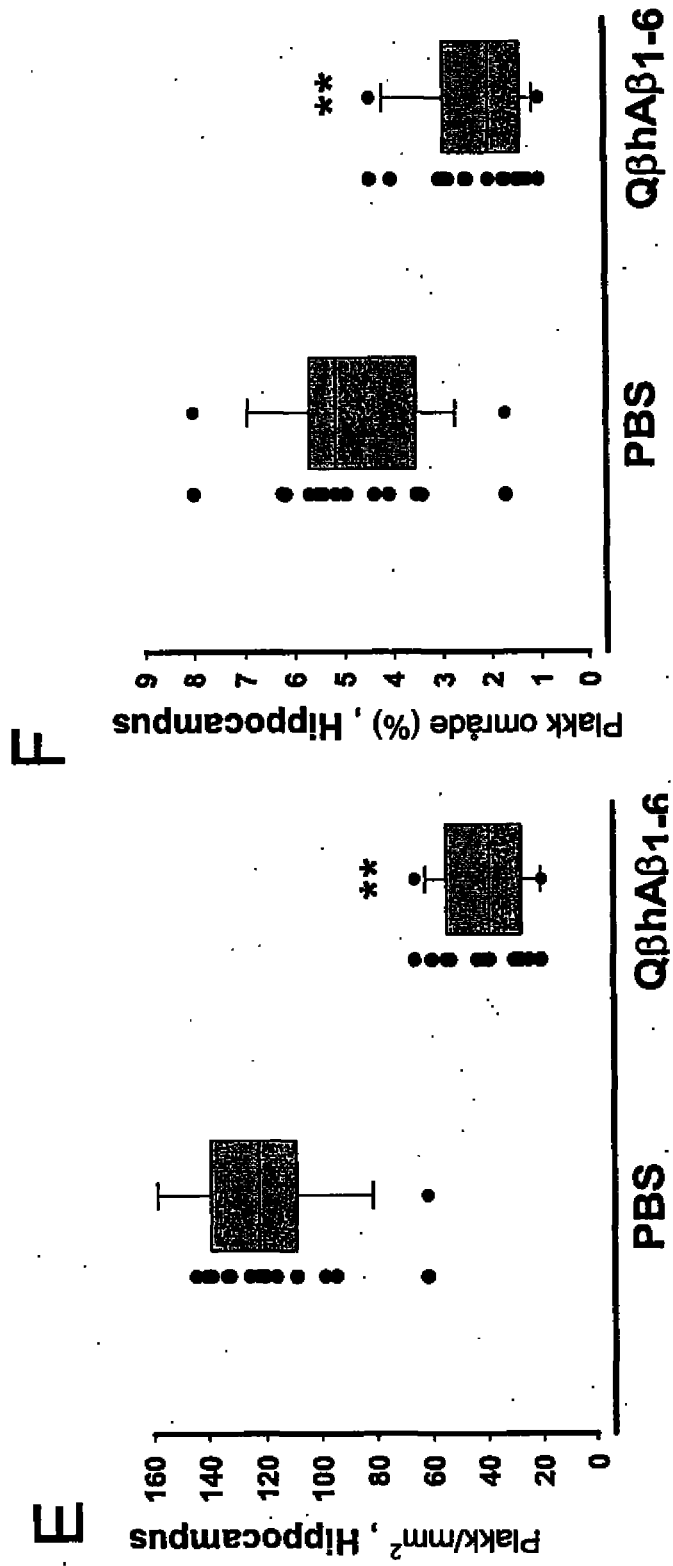


Fig. 13E

Fig. 13F

20/23

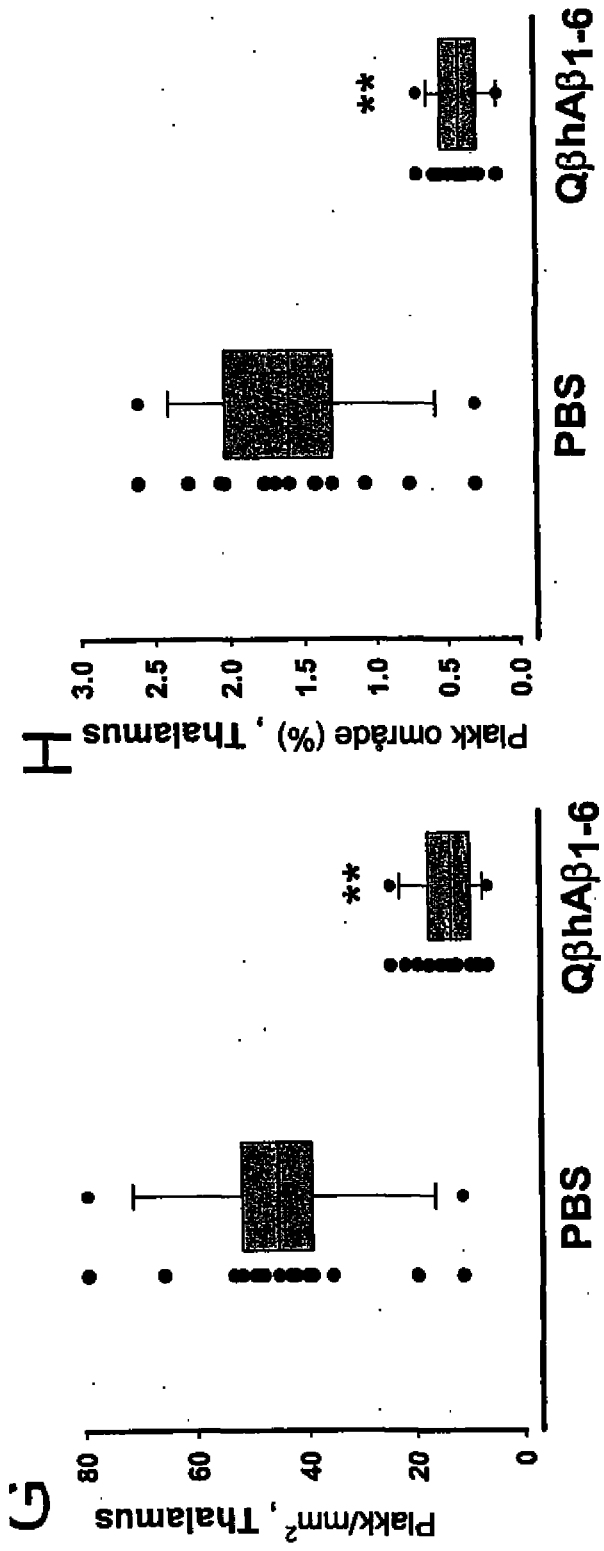


Fig. 13H

Fig. 13G

21/23

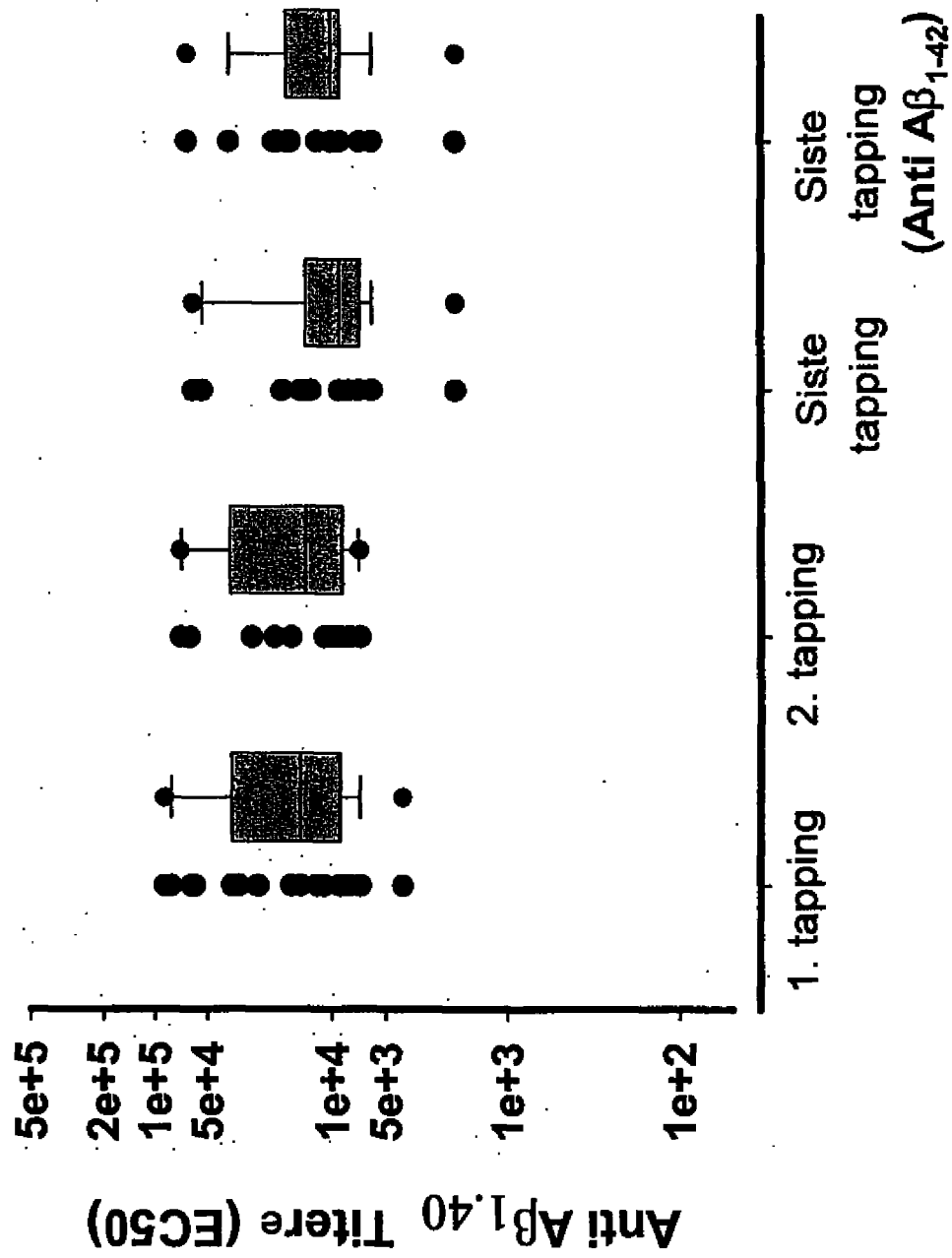
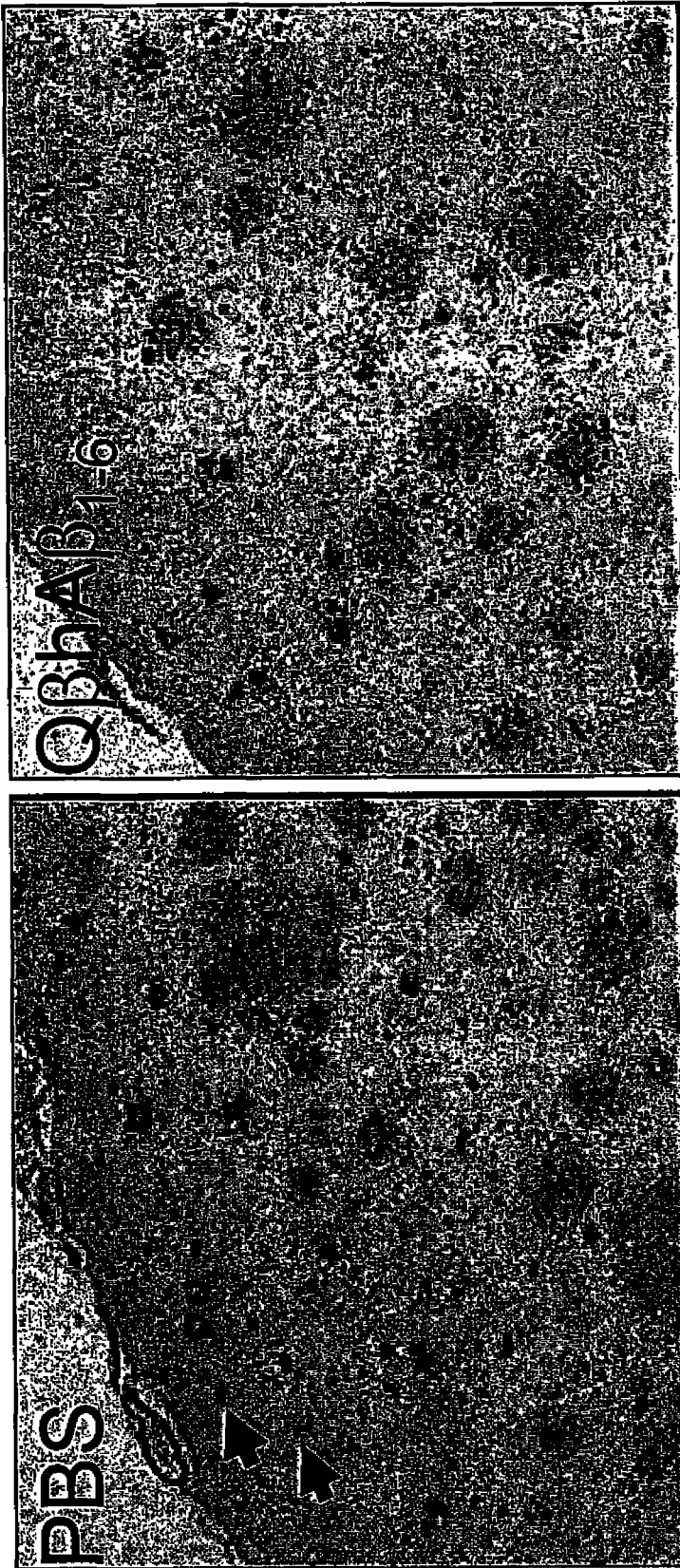


Fig. 14

22/23

**Fig. 15A****Fig. 15B**

23/23

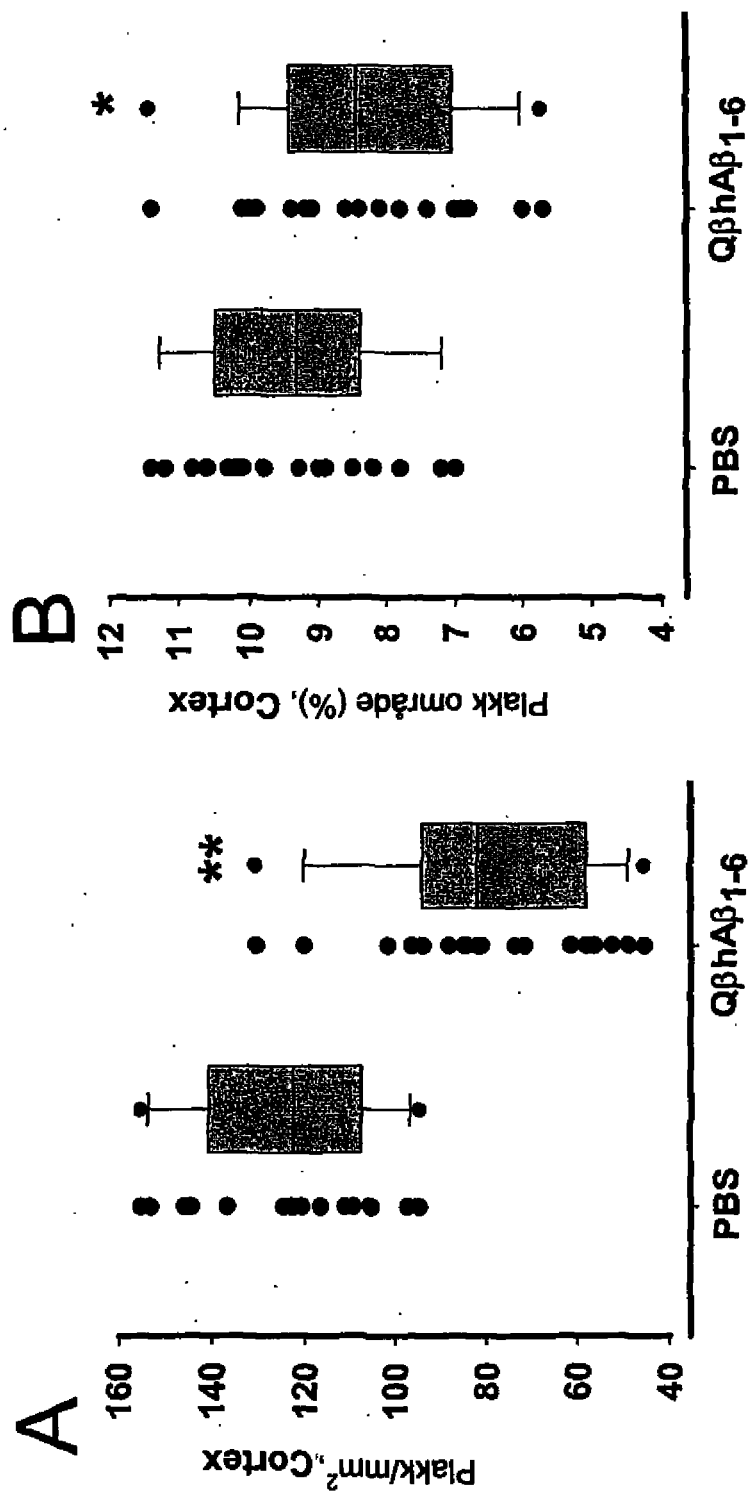


Fig. 16B

Fig. 16A