Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 06059310

54. **TÍTULO** Conjugados de portador de peptido Inmunogenicos y metodos para producir los mismos

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** A61K 38/00

71. **SOLICITANTE** Wyeth

DOMICILIO New Jersey 07940. Estados Unidos de America.

74. **APODERADO** Emilio Ferrero
C.C. 438, 019. de Usaquen.

22. **BOGOTÁ, D. C.,**

Cesion
Fh 17-07-2006

(FORMA P-10)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-059310- -00000-0000
Fec: 2006-06-15 17:51:15 Dep: 2020 NUEVCREACIONES
Tra: 11 PATENTEIYII
Fre: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 382

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)

Nombre: **WYETH**
sociedad constituida y existente bajo las leyes del estado de Delaware, Estados Unidos de América

Dirección: Five Giralda Farms
Madison
New Jersey 07940
Estados Unidos de América

Domicilio: Madison
New Jersey 07940
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual ____
Número ____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: EMILIO FERRERO
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camvp.com.
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual ____
Número 438.019 T.P 31.929

4 INVENTOR (ES) (72)

1. **Rasappa G. ARUMUGHAM**
102 Barton Lane
Chapel Hill
Carolina Del Norte 27516
Estados Unidos de América

2. **Krishna PRASAD A.**
105 Worsham Drive
Chapel Hill
Carolina Del Norte 27516
Estados Unidos de América

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2004/042701 Fecha: 17 de diciembre de 2004
Publicación Internacional No. WO 2005/058940 A2 Fecha: 30 de junio de 2005

6 TÍTULO (54)

CONJUGADOS DE PORTADOR DE PEPTIDO INMUNOGENICOS Y METODOS PARA PRODUCIR LOS MISMOS

7 Clasificación Internacional (51) C07K

8 Prioridad SI☒ NO☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	17 de diciembre de 2003	60/530,480

9 Comprobante de pago N .: 06-44,161 **Fecha:** 12 de Junio de 2006

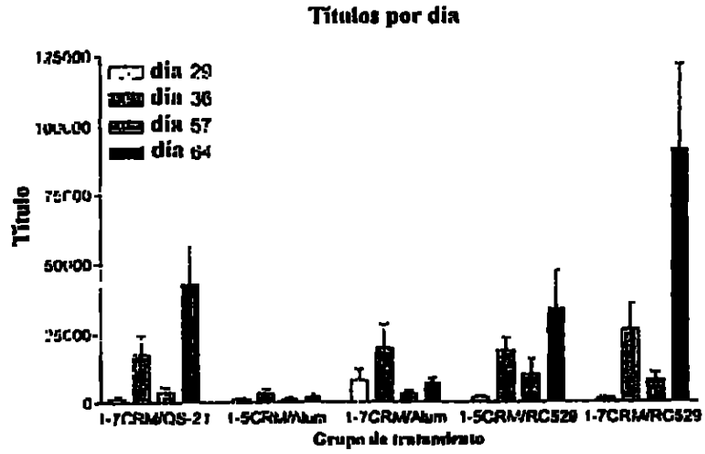
10

Anex s:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $ 463.000.oo.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : _____

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

JDF

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2005/058940 A2
2. ☒Extracto de publicación.

NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN FASE INTERNACIONAL

1/2

13665
8070

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA

2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MARILYN L MITCHELL

3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY

4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MARILYN L MITCHELL, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY

6. THE 26TH DAY OF JUNE 2003

7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER

8. NO. A175618

9. SEAL/STAMP: [redacted] 10. SIGNATURE

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

12 JUN 2006

JUAN MANUEL SANTERO MEDINA
NOTARIO

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SIBIC
CARRERA 4a Nº 72-35
BOGOTA, S - COLOMBIA

181

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostilla para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

Wyeth

domiciliado (s) en/of Five Giralda Farms

Madison, NJ 07940, United States of America

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tps. 31929; GONZALO PERDOMO, tps. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tps. 23555 y GERMAN CAVELIER, tps. 832, domiciliados en la Carrera 4a Nº 72-35, Bogotá, Colombia, en obedecimiento a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad de recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorico (mos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso- administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contenciosos administrativos relacionados con

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tps. 31929; GONZALO PERDOMO, tps. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tps. 23555 and GERMAN CAVELIER, tps. 832, domiciled at Carrera 4a Nº 72 35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, [illegible] granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of [illegible] and in general the civil, penal, and administrative [illegible] actions and suits

© CAVELIER ABOGADOS
WFPODE01-181 (MINUTA Nº12.1.1.2.6 USA)

[illegible] COPIA FIEL [illegible] QUE HA TENIDO A LA VISTA
12 JUN 2006
JUAN MANUEL BOTERO LEDINA
NOTARIO

estos derechos; acciones y procesos que promovemos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, convenir, recibir, reasumir, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Wyeth

Dado y firmado hoy/Given and signed this 16th JUNE 2003

en/in Madison, New Jersey 07940; USA

por/by William H. Calnan

Assistant Secretary

Firma _____ Signature

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CONCUERDA CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

12 JUN 2006

JUAN MANUEL [illegible] MEDINA
NOTARIO

© CAVELIER ABOGADOS
WPPODE01-161 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)

7

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

a los _____ días del mes de _____
200___ ante mí, Notario Público o Funcionario Autorizado

_____

apareció(eron) personalmente: _____

_____

nica(os) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s) sona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es) ne(n) capacidad legal para otorgarlo

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this _____ day of _____
200___ before me, a Notary Public or Attesting Official of ___

_____

personally appeared _____

_____

to me known, and known to me to be the person(s) who executed that foregoing document, and who has(have) legal capacity to execute it.

_____ Notario Público o Funcionario Autorizado — Notary Public or Attesting Official _____

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

el 16 de Junio de 2003

aparecio(eron) ante mí
William H. Calnan

les(se) conozco personalmente y que firma(n) este cumento en representación de la Sociedad/compañía nominada
Wyeth

rtifico:

Que he visto los siguientes documentos:
Certificado de Constitución Replanteado presentado el 22 de Abril 1988 ante el Secretario del Estado de Delaware

Que dichos documentos prueban lo siguiente:

1. Que Wyeth

una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente acuerdo con las leyes de Delaware

2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940, Estados Unidos de America

3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente oder están comprendidos dentro del objeto social de la cionada Sociedad/Compañía.

4. Que el(los) Sr.(Sres.) William H. Calnan

a(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

ludad Morristown

tado New Jersey

oy 16 de Junio de 2003

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 16th day of June 2003
appeared before me
William H. Calnan

who(m) I know personally and who(m) signed this document as representative(s) of the Corporation/Company named
WYETH

I certify:

1. That I have seen the following documents:*
Restated Certificate of Incorporation filed April 22, 1988 with Secretary of State of Delaware
2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Wyeth

is a Corporation/Company legally constituted and in existence in accordance with the laws Delaware

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is
Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940, United States of America

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

2.4. That Mr.(Messrs.) William H. Calnan

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

City Morristown

State New Jersey

This 16th day of June 2003

_____ Notario Público o Funcionario Autorizado — Notary Public or Attesting Official _____

Los documentos deben identificarse con fecha y origen

* Documents must be identified with date and origin

CAVELIER ABOGADOS
PODER-181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)

CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
CONSUL HONORARIO SEXTO DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
12 JUN 2006
MEDINA

MARILYN L. MITCHELL
NOTARY PUBLIC, STATE OF NEW JERSEY
My Commission Expires February 8, 2005

TRADUCCIÓN OFICIAL 101/2003 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL, REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL APROBADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA Y MEDIANTE EL CUAL **WYETH**, EMPRESA DOMICILIADA EN FIVE GIRALDA FARMS, MADISON, NJ 07940 ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA OTORGA PODER A EMILIO FERRERO, TPA 31929, GONZALO PERDOMO, TPA 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ TPA 23555 Y A GERMÁN CAVELIER, TPA 832. EXPEDIDO Y FIRMADO EL 16 DE JUNIO DE 2003 EN MADISON, NEW JERSEY 07940, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. FIRMADO: WILLIAM H. CALNAN, SUBSECRETARIO.

CERTIFICADO NOTARIAL EN INGLES Y EN ESPAÑOL DE FECHA 16 DE JUNIO DE 2003 POR EL CUAL SE CERTIFICA LA COMPARECENCIA DE WILLIAM H. CALNAN PARA FIRMAR EL PODER ARRIBA CITADO A NOMBRE DE WYETH Y PARA CERTIFICAR LA EXISTENCIA LEGAL, EL DOMICILIO DE DICHA EMPRESA Y LA CAPACIDAD DE WILLIAM H. CALNAN PARA COMPROMETER A DICHA FIRMA. FIRMADO: MARILYN L. MITCHELL. SELLO: MARILYN L. MITCHELL, NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE NUEVA JERSEY, MI CARGO VENCE EL 6 DE FEBRERO DE 2005.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTÁ, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CONCIDE CON EL ORIGINAL QUE ME FUE DADO A LA VISTA
12 JUN 2006
JUAN [illegible] MEDINA
NOTARIO

APOSTILLA:

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por MARILYN L. MITCHELL

3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY

4. lleva el sello de MARILYN L. MITCHELL, NOTARIO CERTIFICADO

5. en TRENTON, NUEVA JERSEY

6. el 26 DE JUNIO DE 2003

7. por JOHN E. MCCORMAC, CONTADOR PÚBLICO AUTORIZADO, TESORERO DE NUEVA JERSEY

8. Número A175618

9. Sello:

El sello del estado de Nueva Jersey

10. Firma: (ilegible)

COLO-13798-841-001-5

WPCL002G. ID. 4628

Bogotá, 12 de julio de 2003.

Eduardo Calad...

Eduardo Calad...
TRADUCTOR OFICIAL
INGLÉS - ESPAÑOL
Res. 541 Febrero de 1994

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

12 JUN 2006

JUAN ... NOTARIA

COLEGIO ... DEL CIRCULO DE SANTAFE
BOGOTA, ... QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIR...
MANIFIESTA ...
Eduardo Calado
Nogueira
... ANTERIOR ... CON C.C. No. ...
... AUTENTICADO.
SANTAFE DE BOGOTA 11 JUL 2003

NOTARIA SEXTA
PABLO MENDEZ
BARAJAS

RE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
(100) 11 JUL 2003 12:56
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
Cancillería
- 44654
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO ...
LA ... S

COPIA
COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
12 JUN 2006
JUAN MANUEL ... MEDINA
NOTARIO

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
30 June 2005 (30.06.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/058940 A2

(51) International Patent Classification⁷: C07K

(21) International Application Number:
PCT/US2004/042701

(22) International Filing Date:
17 December 2004 (17.12.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/530,480 17 December 2003 (17.12.2003) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): WYETH [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): ARUMUGHAM, Rasappa, G. [US/US]; 102 Burton Lane, Chapel Hill, NC 27516 (US). PRASAD, A. Krishna [IN/US]; 105 Wenham Drive, Chapel Hill, NC 27516 (US).

(74) Agents: CELLI, Rossmarie, L. et al.; Townsend & Townsend & Crew, LLP, Two Embarcadero Center, 8th Floor, San Francisco, CA 94111-3834 (US).

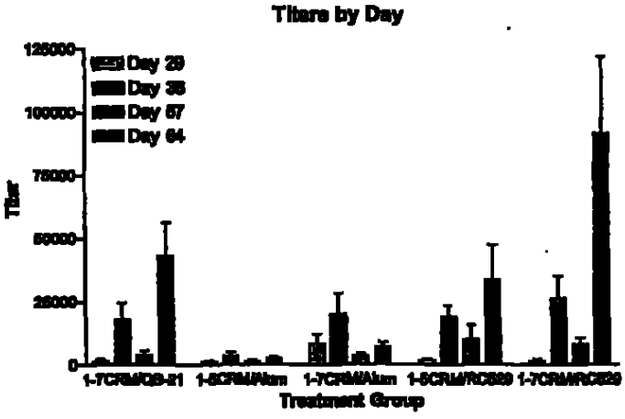
(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

[Continued on next page]

(54) Title: IMMUNOGENIC PEPTIDE CARRIER CONJUGATES AND METHODS OF PRODUCING SAME



(57) Abstract: The present invention is directed to methods of producing conjugates of peptide immunogens with protein/polypeptide carrier molecules, which are useful as immunogens, wherein peptide immunogens are conjugated to protein carriers via activated functional groups on amino acid residues of the carrier or of the optionally attached linker molecule, and wherein any unconjugated reactive functional groups on amino acid residues are inactivated via capping, thus retaining the immunological functionality of the carrier molecule, but reducing the propensity for undesirable reactions that could render the conjugate less safe or effective. Furthermore, the invention also relates to such immunogenic products and immunogenic compositions containing such immunogenic products made by such methods.

WO 2005/058940 A2

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

WO 2005/058940 A2

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

IMMUNOGENIC PEPTIDE CARRIER CONJUGATES AND METHODS OF PRODUCING SAME

CROSS-REFERENCES TO RELATED APPLICATIONS

[0001] This application claims the benefit under 35 U.S.C. § 119(e) of U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/530,480, filed December 17, 2003, which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] The essence of adaptive immunity is the ability of an organism to react to the presence of foreign substances and produce components (antibodies and cells) capable of specifically interacting with and protecting the host from their invasion. An "*antigen*" or "*immunogen*" is a substance that is able to elicit this type of immune response and also is capable of interacting with the sensitized cells and antibodies that are manufactured against it.

[0003] Antigens or immunogens are usually macromolecules that contain distinct antigenic sites or "*epitopes*" that are recognized and interact with the various components of the immune system. They can exist as individual molecules composed of synthetic organic chemicals, proteins, lipoproteins, glycoproteins, RNA, DNA, or polysaccharides, or they may be parts of cellular structures (bacteria or fungi) or viruses (Harlow and Lane 1988a,b, c; Male *et al.*, 1987).

[0004] Small molecules like short peptides, although normally able to interact with the products of an immune response, often cannot cause a response on their own. These peptide immunogens or "*haptens*" as they are also called, are actually incomplete antigens, and, although not able by themselves to cause immunogenicity or to elicit antibody production, can be made immunogenic by coupling them to a suitable carrier. Carriers typically are protein antigens of higher molecular weight that are able to cause an immunological response when administered *in vivo*.

[0005] In an immune response, antibodies are produced and secreted by the B-lymphocytes in conjunction with the T-helper (T_H) cells. In the majority of hapten-carrier systems, the B cells produce antibodies that are specific for both the hapten and the carrier. In these cases, the T lymphocytes will have specific binding domains on the carrier, but will not recognize

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

the hapten alone. In a kind of synergism, the B and T cells cooperate to induce a hapten-specific antibody response. After such an immune response has taken place, if the host is subsequently challenged with only the hapten, usually it will respond by producing hapten-specific antibodies from memory cells formed after the initial immunization.

[0006] Synthetic haptens mimicking some critical epitopic structures on larger macromolecules are often conjugated to carriers to create an immune response to the larger "parent" molecule. For instance, short peptide segments can be synthesized from the known sequence of a protein and coupled to a carrier to induce immunogenicity toward the native protein. This type of synthetic approach to the immunogen production has become the basis of much of the current research into the creation of vaccines. However, in many instances, merely creating a B-cell response by using synthetic peptide-carrier conjugates, however well designed, will not always guarantee complete protective immunity toward an intact antigen. The immune response generated by a short peptide epitope from a larger viral particle or bacterial cell may only be sufficient to generate memory at the B cell level. In these cases it is generally now accepted that a cytotoxic T-cell response is a more important indicator of protective immunity. Designing peptide immunogens with the proper epitopic binding sites for both B-cell and T-cell recognition is one of the most challenging research areas in immunology today.

[0007] The approach to increasing immunogenicity of small or poorly immunogenic molecules by conjugating these molecules to large "carrier" molecules has been utilized successfully for decades (see, *e.g.*, Goebel *et al.* (1939) *J. Exp. Med.* 69: 53). For example, many immunogenic compositions have been described in which purified capsular polymers have been conjugated to carrier proteins to create more effective immunogenic compositions by exploiting this "carrier effect." Schneerson *et al.* (1984) *Infect. Immun.* 45: 582-591). Conjugation has also been shown to bypass the poor antibody response usually observed in infants when immunized with a free polysaccharide (Anderson *et al.* (1985) *J. Pediatr.* 107: 346; Insel *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 158: 294).

[0008] Hapten-carrier conjugates have been successfully generated using various cross-linking/coupling reagents such as homobifunctional, heterobifunctional, or zero-length cross linkers. Many such methods are currently available for coupling of saccharides, proteins, and peptides to peptide carriers. Most methods create amine, amide, urethane, isothiourea, or disulfide bonds, or in some cases thioethers. A disadvantage to the use of coupling reagents, which introduce reactive sites in to the side chains of reactive amino acid molecules on

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

carrier and/or hapten molecules, is that the reactive sites if not neutralized are free to react with any unwanted molecule either *in vitro* (thus adversely affecting the functionality or stability of the conjugate(s)) or *in vivo* (thus posing a potential risk of adverse events in persons or animals immunized with the preparations). Such excess reactive sites can be reacted or "capped", so as to inactivate these sites, utilizing various known chemical reactions, but these reactions may be otherwise disruptive to the functionality of the conjugates. This may be particularly problematic when attempting to create a conjugate by introducing the reactive sites into the carrier molecule, as its larger size and more complex structure (relative to the hapten) may render it more vulnerable to the disruptive effects of chemical treatment. In fact, no examples are known of methods whereby a conjugate is made by first activating the carrier, then reacting with the hapten in a conjugation reaction, and finally "capping" the remaining reactive sites, while preserving the ability of the resulting conjugate to function as an immunogenic composition having the desired properties of the "carrier effect".

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0009] The present invention is directed to methods of producing an immunogenic conjugate of a peptide immunogen with a protein/polypeptide carrier, wherein the peptide immunogen is conjugated to the carrier via derivatized functional groups of amino acid residues of the carrier such as lysine residues, and wherein any unconjugated, derivatized functional groups of the amino acid residues are inactivated via capping to block them from reacting with other molecules, including proteins/polypeptides thereby preserving the functionality of the carrier, such that it retains its ability to elicit the desired immune responses against the peptide immunogen that would otherwise not occur without a carrier. Furthermore, the invention also relates to conjugates produced by the above methods, and to immunogenic compositions containing such conjugates.

[0010] In one embodiment, the invention is directed to a first method for conjugating a peptide immunogen via a reactive group of an amino acid residue of the peptide immunogen to a protein/polypeptide carrier having one or more functional groups, the method comprising the steps of: (a) derivatizing one or more of the functional groups of the protein/polypeptide carrier to generate a derivatized molecule with reactive sites; (b) reacting the derivatized protein/polypeptide carrier of step (a) with a reactive group of an amino acid residue of the peptide immunogen under reaction conditions such that the peptide immunogen is conjugated

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

to the derivatized protein/polypeptide carrier via the functional groups; and (c) further reacting the conjugate with a capping reagent to inactivate free, reactive functional groups on the activated protein/polypeptide carrier, thereby preserving the functionality of the carrier against the peptide immunogen that would otherwise not occur without a carrier.

[0011] In one embodiment, the protein/polypeptide carrier is selected from the group consisting of human serum albumin, keyhole limpet hemocyanin, immunoglobulin molecules, thyroglobulin, ovalbumin, influenza hemagglutinin, PAN-DR binding peptide (PADRE polypeptide), malaria circumsporozite (CS) protein, hepatitis B surface antigen (HB_sAg_{19-28}), Heat Shock Protein (HSP) 65, Bacillus Calmette-Guerin (BCG), cholera toxin, cholera toxin mutants with reduced toxicity, diphtheria toxin, CRM_{197} protein that is cross-reactive with diphtheria toxin, recombinant Streptococcal C5a peptidase, *Streptococcus pyogenes* ORF1224, *Streptococcus pyogenes* ORF1664, *Streptococcus pyogenes* ORF 2452, *Chlamydia pneumoniae* ORF T367, *Chlamydia pneumoniae* ORF T858, Tetanus toxoid, HIV gp120 T1, microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMS), growth factor / hormone, cytokines and chemokines.

[0012] In another embodiment, the protein/polypeptide carrier contains a T-cell epitope.

[0013] In yet another embodiment, the protein/polypeptide carrier is a bacterial toxoid such as a tetanus toxoid, cholera toxin or cholera toxin mutant as described above. In a preferred embodiment, the protein/polypeptide carrier is CRM_{197}.

[0014] In still yet another embodiment, the protein/polypeptide carrier may be an influenza hemagglutinin, a PADRE polypeptide, a malaria CS protein, a Hepatitis B surface antigen ($HSBAg_{19-28}$), a heat shock protein 65 (HSP 65), or a polypeptide from *Mycobacterium tuberculosis* (BCG).

[0015] In a preferred embodiment, the protein/polypeptide carrier is selected from Streptococcal rC5a peptidase, *Streptococcus pyogenes* ORF1224, *Streptococcus pyogenes* ORF1664 or *Streptococcus pyogenes* ORF2452, *Chlamydia pneumoniae* ORF T367, and *Chlamydia pneumoniae* ORF T858.

[0016] In one embodiment, protein/polypeptide carrier is a growth factor or hormone, which stimulates or enhances immune response and is selected from the group consisting of IL-1, IL-2, γ-interferon, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, and RANTES.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0017] In one embodiment, the peptide immunogen is selected from a bacterial protein, a viral protein, and a eukaryotic protein.

[0018] In another embodiment, the peptide immunogen is derived from a bacterial protein antigen from *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrheae*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella enterobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio choleras*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, Pseudomonas species, *Salmonella typhimurium*, *Borrelia burgdorferi*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Shigella dysentriae*, *Alloiococcus otitidis* and Group B streptococci.

[0019] In another embodiment, the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a virus selected from the group consisting of human immunodeficiency virus (HIV), herpes simplex virus (HSV), human papilloma virus (HPV), parainfluenza virus (PIV), vesicular stomatitis virus (VSV), respiratory syncytial virus (RSV), Epstein-Barr virus (EBV), coronavirus, vaccinia virus, rotavirus, rabies virus, hepatitis C virus (HCV) and hepatitis B virus (HBV).

[0020] In yet another embodiment, the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a fungus selected from a Candida species, a Cryptococcus species, a Coccidioides species, a Histoplasma species, and an Aspergillus species.

[0021] In another embodiment, the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a parasite selected from a Plasmodium, a Trypanosome, a Schistosome, and a Leishmania.

[0022] In another embodiment, the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a eukaryote. In a preferred embodiment, the eukaryote is a human.

[0023] In yet another preferred embodiment, the peptide immunogen from the human is derived from a malignant tumor. In a more preferred embodiment, the peptide immunogen is from a tumor antigen from a renal cell carcinoma, a breast carcinoma, a melanoma and a prostate carcinoma. In another preferred embodiment, the peptide antigen is derived from the tumor antigen, carcinoembryonic antigen (CEA).

[0024] In one aspect, the invention provides a peptide immunogen comprising Aβ peptide or fragments of Aβ or analogs thereof eliciting an immunogenic response against certain epitopes within Aβ. Immunogenic peptides of the invention include immunogenic

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

heterologous peptides. In some immunogenic peptides, an Aβ fragment is linked to a carrier to form an immunogenic heterologous peptide, and then this heterologous peptide is linked to a carrier using a method of the present invention to form a conjugate.

[0025] In another aspect of the invention, the peptide immunogen is a polypeptide comprising an N-terminal segment of at least residues 1-5 of Aβ, the first residue of Aβ being the N-terminal residue of the polypeptide, wherein the polypeptide is free of a C-terminal segment of Aβ. In yet another aspect of the invention, the peptide immunogen is a polypeptide comprising an N-terminal segment of Aβ, the segment beginning at residue 1-3 of Aβ and ending at residues 7-11 of Aβ. In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an agent that induces an immunogenic response against an N-terminal segment of Aβ, the segment beginning at residue 1-3 of Aβ and ending at residues 7-11 of Aβ without inducing an immunogenic response against an epitope within residues 12-43 of Aβ43. In another aspect of the invention, the peptide immunogen is a heterologous polypeptide comprising a segment of Aβ linked to a heterologous amino acid sequence that induces a helper T-cell response against the heterologous amino acid sequence and thereby a B-cell response against the N-terminal segment.

[0026] In some peptide immunogens, the N-terminal segment of Aβ is linked at its C-terminus to a heterologous polypeptide. In some peptide immunogens, the N-terminal segment of Aβ is linked at its N-terminus to a heterologous polypeptide. In some peptide immunogens, the N-terminal segment of Aβ is linked at its N and C termini to first and second heterologous polypeptides. In some peptide immunogens, the N-terminal segment of Aβ is linked at its N terminus to a heterologous polypeptide, and at its C-terminus to at least one additional copy of the N-terminal segment. In some peptide immunogens, the polypeptide comprises from N-terminus to C-terminus, the N-terminal segment of Aβ, a plurality of additional copies of the N-terminal segment, and the heterologous amino acid segment.

[0027] In some of the above peptide immunogens, the polypeptide further comprises at least one additional copy of the N-terminal segment. In some of the above peptide immunogens, the fragment is free of at least the 5 C-terminal amino acids in Aβ43.

[0028] In some aspects of the above peptide immunogens, the fragment comprises up to 10 contiguous amino acids from Aβ.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0029] In another aspect, the invention provides a peptide immunogen comprising Aβ peptide or fragments of Aβ or analogs thereof eliciting an immunogenic response against certain epitopes within Aβ may be in a configuration referred to as a multiple antigenic peptide (MAP) configuration.

[0030] In some of the above aspects of the invention, the peptide immunogen from the N-terminal half of Aβ. In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 3-6, and 3-7. In some of the above aspects of the invention, the peptide immunogen is from the internal region of Aβ. In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ13-28, 15-24, 17-28, and 25-35. In some of the above aspects of the invention, the peptide immunogen from the C-terminal end of Aβ. In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ33-42, 35-40, and 35-42. In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28, 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, and 35-42. In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ1-5, Aβ1-7, Aβ1-9, and Aβ1-12. In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ1-5-L, Aβ1-7-L, Aβ1-9-L, and Aβ1-12-L, where L is a linker. In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ1-5-L-C, Aβ1-7-L-C, Aβ1-9-L-C, and Aβ1-12-L-C, where C is a cysteine amino acid residue.

[0031] In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ16-22, Aβ16-23, Aβ17-23, Aβ17-24, Aβ18-24, and Aβ18-25. In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ16-22-C, Aβ16-23-C, Aβ17-23-C, Aβ17-24-C, Aβ18-24-C, and Aβ18-25-C, where C is a cysteine amino acid residue. In other aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of C-Aβ16-22, C-Aβ16-23, C-Aβ17-23, C-Aβ17-24, C-Aβ18-24, and C-Aβ18-25, where C is a cysteine amino acid residue.

[0032] In some of the above peptide immunogens, the heterologous polypeptide is selected from the group consisting of peptides having a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0033] In one embodiment, the functional group of one or more amino acid molecules of the protein/polypeptide carrier or of the optionally attached polypeptide linker is derivatized using a cross-linking reagent. In another embodiment, the derivatizing reagent is a zero-length cross-linking reagent. In another embodiment, the derivatizing reagent is a homobifunctional cross-linking reagent. In yet another embodiment, the derivatizing reagent is a heterobifunctional cross-linking reagent.

[0034] In a preferred embodiment, the heterobifunctional reagent is a reagent that reacts with a primary or a ϵ-amine functional group of one or more amino acid molecules of the protein/polypeptide carrier and a pendant thiol group of one or more amino acid molecules of the peptide immunogen. In one embodiment, the heterobifunctional reagent is N-succinimidyl bromoacetate.

[0035] In another embodiment, the primary or ϵ-amine functional group is lysine. In yet another embodiment, the derivatization of the primary or ϵ-amine functional group of the lysine of the protein/polypeptide carrier with N-succinimidyl bromoacetate results in the bromoacetylation of the primary or ϵ-amine residues on lysine molecules on the protein/polypeptide carrier. In a more preferred embodiment, the pendant thiol group is a cysteine residue of the peptide immunogen, which may be localized at the amino-terminus of the peptide immunogen, at the carboxy-terminus of the peptide immunogen or internally in the peptide immunogen.

[0036] In another embodiment, the pendant thiol group is generated by a thiolating reagent such as N-acetyl homocysteinethio lactone, Traut's reagent (2-iminothilane) SATA (N-Succinimidyl S-acetylthioacetate), SMPT (4-Succinimidyloxycarbonyl-methyl2-pyridyldithio toluene), Sulfo LC SPDP (Sulfo Succinimidyl pyridyl dithio propionamido hexanoate), SPDP (Succinimidyl pyridyl dithio propionate). In a preferred embodiment, the capping reagent that is used to inactivate free reactive, functional groups on the activated protein/polypeptide carrier is selected from the reagent group consisting of cysteamine, *N*-acetylcysteamine, and ethanolamine.

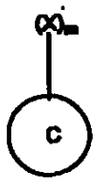
[0037] In a particularly preferred embodiment, the capping reagent that is used to inactivate free reactive functional groups on the activated protein/polypeptide carrier is selected from the reagent group consisting of sodium hydroxide, sodium carbonate, ammonium bicarbonate and ammonia.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0038] In one embodiment, the reactive group of the amino acid residue of the peptide immunogen is a free sulfhydryl group.

[0039] In another embodiment, one or more of the functional groups are on a linker, which is optionally attached to the protein/polypeptide carrier. In a preferred embodiment, the linker is a peptide linker. In a more preferred embodiment, the peptide linker is polylysine.

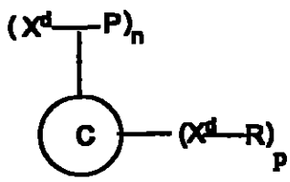
[0040] In another embodiment, the invention is directed to a second method for conjugating a peptide immunogen of a protein/polypeptide with a protein/polypeptide carrier having the structure:



wherein,

[0041] C is a protein/polypeptide carrier and X is a derivatizable functional group of an amino acid residue on the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and wherein m is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, the method comprising the steps of: (a) derivatizing one or more of the functional groups of the protein/polypeptide carrier or of the optionally attached linker molecule to generate a derivatized molecule with reactive sites; (b) reacting the derivatized protein/polypeptide carrier of step (a) with a reactive group of an amino acid residue of the peptide immunogen to form a covalently coupled peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugate; and (c) further reacting the said conjugate with a capping reagent to inactive the free reactive functional groups on the activated protein/polypeptide carrier, such that the capped groups are not free to react with other molecules, including proteins/polypeptides thereby preserving the functionality of the carrier, such that it retains its ability to elicit the desired immune responses against the peptide immunogen that would otherwise not occur without a carrier so as to generate a capped peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugate having the formula:

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com



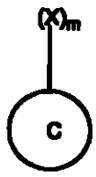
wherein,

[0042] C is the protein/polypeptide carrier and X^d is a derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and, wherein,

[0043] P is the peptide immunogen molecule covalently attached to the derivatized functional group on the amino acid residue on the protein carrier or optionally on an amino acid residue on a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier, R is a capping molecule covalently attached to the derivatized functional group on an amino acid residue on the protein/polypeptide carrier or optionally on an amino acid residue on a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier, n is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, and p is an integer greater than 0, but less than 85.

[0044] The detailed embodiments for the first method described above are also applicable to the conjugates just described prepared by the second method.

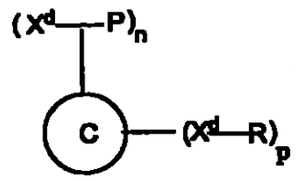
[0045] In one embodiment, the invention is directed to peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugates wherein the protein/polypeptide carrier has the formula:



wherein,

[0046] C is a protein/polypeptide carrier and X is a derivatizable functional group of an amino acid residue on the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and, wherein, m is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, and wherein the capped peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugate has the formula:

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

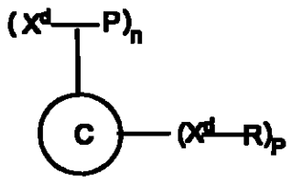


wherein,

[0047] C is the protein/polypeptide carrier and X^d is a derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and, wherein, P is the peptide immunogen molecule covalently attached to the derivatized functional group of the amino acid residue of the protein carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier, R is a capping molecule covalently attached to the derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier, thereby preserving the functionality of the carrier, such that it retains its ability to elicit the desired immune responses against the peptide immunogen that would otherwise not occur without a carrier., n is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, and p is an integer greater than 0, but less than 85.

[0048] The detailed embodiments for the first and second methods described above are also applicable to the conjugates just described.

[0049] In another embodiment, the invention is directed to peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugates generated according to the second method of the invention and having the formula:



wherein,

[0050] C is the protein/polypeptide carrier and X^d is a derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and, wherein, P is the peptide immunogen molecule covalently attached to the derivatized functional group of the

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

amino acid residue of the protein carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier, R is a capping molecule covalently attached to the derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier thereby preserving the functionality of the carrier, such that it retains its ability to elicit the desired immune responses against the peptide immunogen that would otherwise not occur without a carrier., n is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, and p is an integer greater than 0, but less than 85.

[0051] The detailed embodiments for the second method described above are also applicable to the conjugates generated by the second method, as just described.

[0052] In another embodiment, the invention is directed to immunogenic compositions comprising a conjugate of a peptide immunogen with a protein/polypeptide carrier generated by the second method of the invention, together with one or more pharmaceutically acceptable excipients, diluents, and adjuvants.

[0053] The detailed embodiments for the second method and the conjugates generated thereby described above are also applicable to immunogenic compositions containing those conjugates as just described.

[0054] In another embodiment, the invention is directed to a method for inducing an immune response in a mammalian subject, which comprises administering an effective amount of an immunogenic composition of the present invention to the subject.

[0055] The detailed embodiments applicable to the immunogenic composition containing the conjugates of the present invention are also applicable to the embodiment of the invention directed to the method of use of these immunogenic compositions.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0056] Figure 1: Flow chart depicting the process chemistry used for conjugation of Aβ peptide fragments to protein/polypeptide carrier CRM_{197} to form the $A\beta/CRM_{197}$ conjugate.

[0057] Figure 2: Flow chart depicting acid hydrolysis chemistry used for quantitative determination of S-carboxymethylcysteine and S-carboxymethylcysteamine as evaluation of the degree of conjugation of peptide immunogen-protein/polypeptide conjugates such as the $A\beta/CRM_{197}$ conjugate.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0058] Figure 3: This figure depicts the pH dependence of the Aβ peptide/CRM conjugation reaction.

[0059] Figure 4: This figure depicts the dependence of Aβ-peptide/CRM conjugation on peptide: CRM ratio.

[0060] Figure 5: Verification of capping process for Aβ1-7/CRM conjugation. The pH of the reaction was 9.15. Reaction time with peptide was 16 hrs, capping with *N*-acetylcysteamine was 8 hrs.

[0061] Figure 6: Conjugation and capping with various peptide: CRM ratios with peptide. The pH of the reaction was 9.0. Reaction time with peptide was 16 hrs, capping with *N*-acetylcysteamine was 8 hrs.

[0062] Figure 7: Day 36 titers of primate sera following immunization of primates with Aβ peptide conjugates with various adjuvants.

[0063] Figure 8: Day 64 titers of primate sera following immunization of primates with Aβ-peptide conjugates with various adjuvants.

[0064] Figure 9: Primate titers by day and treatment group. Primates were immunized with Aβ 1-7 or Aβ 1-5 CRM_{197} conjugates with alum or 529 as adjuvants and titers of anti-Aβ antibodies were measured at day 29, 36, 57 and 54.

[0065] Figure 10: Peptide-protein conjugates were characterized using SDS-PAGE Western blot analysis with a tris-tricine precast gel. The lanes are: marker (lane 1); L-28375 24/01 (lane 2); L-28375 24/02 (lane 3); L-28375 24/03 (lane 4); L-28375 24/04 (lane 5); L-28375 24/05 (lane 6); L-28375 24/06 (lane 7) L-28375 24/07 (lane 8); L-28375 24/08 (lane 9); L-28375 24/09 (Mock) (lane 10); and, $BrAcCRM_{197}$ (lane 11).

BRIEF DESCRIPTION OF SEQUENCES

SEQ ID NO:	Sequence	Description
1	DAEFR-C	Aβ1-5-C
2	DAEFRHD-C	Aβ 1-7-C
3	DAEFRHDSG-C	Aβ 1-9-C
4	DAEFRHDSGYEV-C	Aβ1-12-C
5	DAEFR-GAGA-C	Aβ1-5-L-C

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

SEQ ID NO:	Sequence	Description
6	DAEFRHD-GAGA-C	Aβ1-7-L-C
7	DAEFRHDSG-GAGA-C	Aβ1-9-L-C
8	DAEFRHDSGYEV-GAGA-C	Aβ1-12-L-C
9	VEYGSDHRFEAD-C	Aβ12-1-C
10	GAGA	Linker peptide
11	PKYVKQNTLKLAT	Influenza Hemagglutinin: $HA_{307-319}$
12	AKXVAAWTLKAAA	PAN-DR Peptide (PADRE peptide)
13	EKKIAKMEKASSVFNV	Malaria CS: T3 epitope
14	FHLLTRILTI	Hepatitis B surface antigen: HB_sAg_{19-28}
15	DQSIGDLIAAMDKVGNEG	Heat Shock Protein 65: $hsp65_{153-171}$
16	QVHFQPLPPAVVKL	Bacillus Calmette-Guerin (BCG)
17	QYIKANSKFIGITEL	Tetanus toxoid: $TT_{830-844}$
18	FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	Tetanus toxoid: $TT_{947-967}$
19	KQIINMWQEVGKAMY	HIV gp120 T1
20	DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD	$Aβ_{1-7}/TT_{830-844}/C/TT_{947-967}/Aβ_{1-7}$
21	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	$Aβ_{1-42}$
22	DAEFRHDQYIKANSKFIGITEL	AN90549: $Aβ_{1-7}/TT_{830-844}$ (used in a MAP4 configuration)
23	DAEFRHDFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	AN90550: $Aβ_{1-7}/TT_{947-967}$ (used in a MAP4 configuration)
24	DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	AN90542: $Aβ_{1-7}/TT_{830-844} + TT_{947-967}$ (used in a linear configuration)
25	EFRHDSG-QYIKANSKFIGITEL	AN90576: $Aβ_{3-9}/TT_{830-844}$ (used in a MAP4 configuration)
26	AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD	AN90562: $Aβ_{1-7}$/PADRE

Patent provided by Saghrue Mion, PLLC - http://www.saghrue.com

SEQ ID NO:	Sequence	Description
27	DAEFRHD-DAEFRHDD-AEFRHDAKXVAAWTLKAAA	AN90543: $A\beta_{1-7}$ x 3/PADRE
28	AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD	PADRE/$A\beta_{1-7}$ x 3
29	DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA	$A\beta_{1-7}$ x 3/PADRE
30	DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR	$A\beta_{1-7}$/albumin fragment
31	FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR	$A\beta_{4-10}$/ albumin fragment
32	EFRHDSG-ISQAVHAAHAEINEAGR	$A\beta_{3-9}$/ albumin fragment
33	PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD	$HA_{307-319}$/$A\beta_{1-7}$ x 3
34	DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD	$A\beta_{1-7}$/$HA_{307-319}$/$A\beta_{1-7}$
35	DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT	$A\beta_{1-7}$ x 3/ $HA_{307-319}$
36	DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT	$A\beta_{1-7}$ x 2/ $HA_{307-319}$
37	DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD	$A\beta_{1-7}$/$HA_{307-319}$/Malaria CS/ $TT_{830-844}$/$TT_{947-967}$/$A\beta_{1-7}$
38	DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	$A\beta_{1-7}$ x 3/$TT_{830-844}$/C/$TT_{947-967}$
39	DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	$A\beta_{1-7}$/$TT_{830-844}$/C/$TT_{947-967}$

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

SEQ ID NO:	Sequence	Description
40	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGY VDSIQKGIQKPKSGTQGNYDDDWKEFY STDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVV KVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLS LTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLS LPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEIN FETRGKRGQDAMYEYMAQACAGNRVR RSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLK EHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEE FHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGAN YAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAAL SILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSI ALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFV ESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFL HDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDI KITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSK THISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSP VYVGNGVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEI SSDSIGVLGYQKTVDHTKVNSKLSLFFEI KS	CRMβ197
41	ISQAVHAAHAEINEAGR	Albumin fragment
42	DAEFGHDSGFEVRHQKLVFFAEDVGSN KGAIIGLMVGGVVIA	Murine $A\beta_{1-42}$
43	VFFAEDVG-C	$A\beta_{18-25}$-C
44	LVFFAEDV-C	$A\beta_{17-24}$-C
45	KLVFFAED-C	$A\beta_{16-23}$-C
46	C-VFFAEDVG	C-$A\beta_{18-25}$
47	C-LVFFAEDV	C-$A\beta_{17-24}$
48	C-KLVFFAED	C-$A\beta_{16-23}$
49	VFFAEDV-C	$A\beta_{18-24}$-C
50	LVFFAED-C	$A\beta_{17-23}$-C
51	KLVFFAE-C	$A\beta_{16-22}$-C
52	C-VFFAEDV	C-$A\beta_{18-24}$
53	C-LVFFAED	C-$A\beta_{17-23}$
54	C-KLVFFAE	C-$A\beta_{16-22}$

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0066] The present invention is directed to methods of generating peptide immunogen-carrier conjugates wherein the unreacted active functional groups on the carrier which are generated during activation are inactivated by using capping reagents such as *N*-Acetylcysteamine in order to prevent them from reacting further. The present invention is also directed to capped carrier-peptide immunogen conjugates generated by those methods and to immunogenic compositions comprising said conjugates.

[0067] The approach of increasing immunogenicity of small or poorly immunogenic molecules, such as saccharides, through conjugation has been utilized successfully for decades (see, *e.g.*, Goebel *et al.* (1939) *J. Exp. Med.* 69: 53), and many immunogenic compositions have been described in which purified capsular polymers have been conjugated to carrier proteins to create more effective immunogenic compositions by exploiting this "carrier effect". For example, Schneerson *et al.* (*J. Exp. Med.* 152: 361-376, 1980), describe *Haemophilus influenzae* b polysaccharide protein conjugates that confer immunity to invasive diseases caused by that microorganism. Conjugates of PRP (polyribosylribitol phosphate, a capsular polymer of *H. influenzae* b) have been shown to be more effective than immunogenic compositions based on the polysaccharide alone (Chu *et al.*, (1983) *Infect. Immun.* 40: 245; Schneerson *et al.* (1984), *Infect. Immun.* 45: 582-591). Conjugation has also been shown to bypass the poor antibody response usually observed in infants when immunized with a free polysaccharide (Anderson *et al.* (1985) *J. Pediatr.* 107: 346; Insel *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 158: 294).

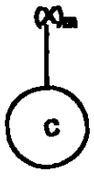
[0068] A further advantage of using as the protein carrier a bacterial toxin or toxoid against which routine immunization of humans (*e.g.*, tetanus or diphtheria) is a standard practice is that a desired immunity to the toxin or toxoid is induced along with immunity against the pathogens associated with the capsular polymer.

[0069] Antigenic determinant/hapten-carrier conjugates also are being used to produce highly specific monoclonal antibodies that can recognize discrete chemical epitopes on the coupled hapten. The resulting monoclonals often are used to investigate the epitopic structure and interactions between native proteins. In many cases, the antigenic determinants/haptens used to generate these monoclonals are small peptide segments representing crucial antigenic sites on the surface of larger proteins. The criteria for a successful carrier to be used in generating an antigenic determinant/hapten-carrier conjugate

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

are the potential for immunogenicity, the presence of suitable functional groups for conjugation with an antigenic determinant/hapten, reasonable solubility properties even after derivatization and lack of toxicity *in vivo*.

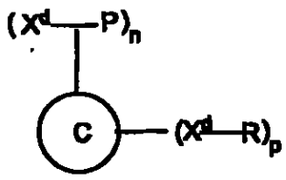
[0070] These criteria are met by the conjugates generated by the methods of the instant invention. The conjugates may be any stable peptide immunogen-carrier conjugates generated using the conjugation process described herein. The conjugates are generated using a process of the instant invention wherein a protein/polypeptide carrier having the following structure:



is covalently attached to a protein/polypeptide carrier,

wherein,

[0071] C is a protein/polypeptide carrier and X is a derivatizable functional group on an amino acid residue on the protein/polypeptide carrier or optionally on an amino acid residue on a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and wherein m is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, is covalently attached to a peptide immunogen and wherein the peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugate has the following formula, is represented by the following formula:



wherein,

[0072] C is the protein/polypeptide carrier and X^d is a derivatized functional group on an amino acid residue on the protein/polypeptide carrier or optionally on an amino acid residue on a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, P is a peptide immunogen covalently attached to the derivatized functional group on the amino acid residue on the protein/polypeptide carrier or optionally on an amino acid residue on a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier, R is a capping molecule covalently

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

attached to the derivatized functional group on an amino acid residue on the protein/polypeptide carrier or optionally on an amino acid residue on a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier thereby preserving the functionality of the carrier, such that it retains its ability to elicit the desired immune responses against the peptide immunogen that would otherwise not occur without a carrier., n is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, and p is an integer greater than 0, but less than 85.

Selection Of Carriers

[0073] Some peptide immunogens contain the appropriate epitope for inducing an immune response, but are too small to be immunogenic. In this situation, the peptide immunogens are linked to a suitable carrier to help elicit an immune response. In the above schematic representation of the peptide immunogens-carrier conjugate generated by a process of the present invention, C is a protein/polypeptide carrier to which peptide immunogens are conjugated directly via derivatized functional groups on amino acid residues on the carrier themselves or indirectly via derivatized functional groups on peptide linkers covalently attached to the carriers. Suitable protein/polypeptide carriers include, but are not limited to, albumin (including human serum albumin), keyhole limpet hemocyanin, immunoglobulin molecules, thyroglobulin, ovalbumin, tetanus toxoid, or a toxoid from other pathogenic bacteria having reduced toxicity, including mutants, such as diphtheria, *E. coli*, cholera, or *H. pylori*, or an attenuated toxin derivative. One such carrier is the CRM_{197} protein (SEQ ID NO.:40) that is cross-reactive with diphtheria toxin.

[0074] Other carriers include T-cell epitopes that bind to multiple MHC alleles, *e.g.*, at least 75% of all human MHC alleles. Such carriers are sometimes known in the art as "universal T-cell epitopes." Exemplary carriers with universal T-cell epitopes include:

Influenza Hemagglutinin: $HA_{307-319}$	PKYVKQNTLKLAT (SEQ. ID NO. 11)
PAN-DR Peptide (PADRE peptide)	AKXVAAWTLKAAA (SEQ. ID NO. 12)
Malaria CS: T3 epitope	EKKIAKMEKASSVFNV (SEQ. ID NO. 13)
Hepatitis B surface antigen: HB_sAg_{19-28}	FELLTRILTI (SEQ. ID NO. 14)
Heat Shock Protein 65: $hsp65_{153-171}$	QSIGDLIAEAMDKVGNEG (SEQ. ID NO. 15)

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Bacillus Calmette-Guerin (BCG)	QVHFQPLPPAVVKL (SEQ. ID NO. 16)
Tetanus toxoid: $TT_{830-844}$	QYIKANSKFIGITEL (SEQ. ID NO. 17)
Tetanus toxoid: $TT_{947-967}$	NNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ. ID NO. 18)
HIV gp120 T1:	KQIINMWQEVGKAMY (SEQ. ID NO. 19)
CRM_{197}	*See* the Brief Description of the Sequences (SEQ ID NO.:40)
Albumin fragment	ISQAVHAAHAHNEAGR (SEQ ID NO: 41)

[0075] Other carriers for stimulating or enhancing an immune response and to which a peptide immunogen or a hapten can be conjugated include cytokines such as IL-1, IL-1 α and β peptides, IL-2, γINF, IL-10, GM-CSF, and chemokines, such as MIP 1α and β and RANTES. Immunogenic peptides can also be linked to proteins/peptide carriers that enhance transport across tissues, as described in O'Mahony, WO 97/17163 and WO 97/17614, which are hereby incorporated by reference in their entirety for all purposes.

[0076] Still further carriers include recombinant Streptococcal C5a peptidase, *Streptococcus pyogenes* ORFs 1224, 1664 and 2452, *Chlamydia pneumoniae* ORFs T367 and T858, growth factors, and hormones.

[0077] In one preferred embodiment of the present invention, the carrier protein is CRM_{197}, a non-toxic mutant of diphtheria toxin with one amino acid change in its primary sequence. The glycine present at the amino acid position 52 of the molecule is replaced with a glutamic acid due to a single nucleic acid codon change. Due to this change, the protein lacks ADP-ribosyl transferase activity and becomes non-toxic. It has a molecular weight of 58,408 Da. CRM_{197} is produced in large quantities by recombinant expression in accordance with U.S. Patent 5,614,382, which is hereby incorporated by reference. Conjugations of saccharides as well as peptides to CRM_{197} are carried out by linking through the ε-amino groups of lysine residues. It has been well established through several commercial products that CRM_{197} is an excellent and safe carrier for B-cell epitopes.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Immunogenic Peptides

[0078] As used herein, the term *"peptide immunogen" or "hapten"* is any protein or subunit structure/fragment/analog derived therefrom that can elicit, facilitate, or be induced to produce an immune response on administration to a mammal. In particular, the term is used to refer to a polypeptide antigenic determinant from any source (bacteria, virus or eukaryote), which may be coupled to a carrier using a method disclosed herein. Such polypeptide immunogen/antigenic determinants may be of viral, bacterial or eukaryotic cell origin.

[0079] Peptide immunogens from a bacterial cell include those derived from bacterial cell surface or secreted proteins, which can be used in protein-based immunogenic compositions. Exemplary bacterial strains include *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae*, Klebsiella spp., Pseudomonas spp., Salmonella spp., Shigella spp., *Alloiococcus otiditis*, and Group B *streptococci.*

[0080] Exemplary peptide immunogens from viruses include those derived from human immunodeficiency virus (HIV), herpes simplex virus (HSV), human papilloma virus (HPV), parainfluenza virus (PIV), vesicular stomatitis virus (VSV), respiratory syncytial virus (RSV), Epstein-Barr virus (EBV), coronavirus, vaccinia virus, rotavirus, rabies virus, hepatitis C virus (HCV) and hepatitis B virus (HBV) to name a few.

[0081] Exemplary fungal peptide immunogens include those derived from *Candida albicans, Cryptococcus neoformans*, Coccidoides spp., Histoplasma spp., and Aspergillus spp. Parasitic antigens include those derived from Plasmodium spp., Trypanosoma spp., Schistosoma spp., Leishmania spp. and the like.

[0082] Exemplary eukaryotic peptide immunogens that can be conjugated to a carrier for use as an immunotherapeutic in the prevention, treatment, prophylaxis or amelioration of various human diseases include those associated with tumor cells, those derived from Aβ, a peptide of 39-43 amino acids, preferably 42 amino acids, which is the principal component of characteristic plaques of Alzheimer's disease (AD) (*see* US 4,666,829; Glenner & Wong (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 1131, Hardy (1984) *TINS* 20: 1131; Hardy (1977) *TINS* 20: 154), those derived from amyloid peptides of amylin, a polypeptide material produced by pancreatic islet cells that has been implicated in type II diabetes, peptides derived from low density lipoprotein gene products, which have been implicated in atherosclerosis and antigenic peptides derived from inflammatory cytokines and growth factors such as interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF-α) and GDF-8. Such eukaryotic peptide immunogens may include either T-cell (CTL) or B-cell epitope.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0083] A "*CTL epitope*" is one derived from selected epitopic regions of potential target antigens, such as tumor associated antigens, including, but not limited to, renal cell carcinoma, breast cancer, carcinoembryonic antigens, melanoma (MAGE) antigens, and prostate cancer specific antigens such as prostate specific membrane antigen (PSMA) and prostate stem cell antigen (PSCA), hepatitis C antigens,

[0084] Aβ, also known as β-amyloid peptide, or A4 peptide (*see* US 4,666,829; Glenner & Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120, 1131 (1984)), is a peptide of 39-43 amino acids, which is the principal component of characteristic plaques of Alzheimer's disease. Aβ is generated by processing of a larger protein APP by two enzymes, termed β and γ secretases (*see* Hardy, TINS 20, 154 (1997)). Known mutations in APP associated with Alzheimer's disease occur proximate to the site of β or γ secretase, or within Aβ. For example, position 717 is proximate to the site of γ-secretase cleavage of APP in its processing to Aβ, and positions 670/671 are proximate to the site of β-secretase cleavage. It is believed that the mutations cause AD by interacting with the cleavage reactions by which Aβ is formed so as to increase the amount of the 42/43 amino acid form of Aβ generated.

[0085] Aβ has the unusual property that it can fix and activate both classical and alternate complement cascades. In particular, it binds to Clq and ultimately to C3bi. This association facilitates binding to macrophages leading to activation of B cells. In addition, C3bi breaks down further and then binds to CR2 on B cells in a T cell dependent manner leading to a 10,000-fold increase in activation of these cells. This mechanism causes Aβ to generate an immune response in excess of that of other antigens.

[0086] Aβ has several natural occurring forms. The human forms of Aβ are referred to as Aβ39, Aβ40, Aβ41, Aβ42 and Aβ43. The sequences of these peptides and their relationship to the APP precursor are illustrated by Figure 1 of Hardy et al., TINS 20, 155-158 (1997). For example, Aβ42 has the sequence:

H_2N-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH (SEQ ID NO. 21).

Aβ41, Aβ40 and Aβ39 differ from Aβ42 by the omission of Ala, Ala-Ile, and Ala-Ile-Val respectively from the C-terminal end. Aβ43 differs from Aβ42 by the presence of a threonine residue at the C-terminus.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0087] Peptide immunogens which are fragments of Aβ are advantageous relative to the intact molecule for use in the present methods for several reasons. First, because only certain epitopes within Aβ induce a useful immunogenic response for treatment of Alzheimer's disease, an equal dosage of mass of a fragment containing such epitopes provides a greater molar concentration of the useful immunogenic epitopes than a dosage of intact Aβ. Second, certain peptide immunogens of Aβ generate an immunogenic response against amyloid deposits without generating a significant immunogenic response against APP protein from which Aβ derives. Third, peptide immunogens of Aβ are simpler to manufacture than intact Aβ due to their shorter size. Fourth, peptide immunogens of Aβ do not aggregate in the same manner as intact Aβ, simplifying preparation of conjugates with carriers.

[0088] Some peptide immunogens of Aβ have a sequence of at least 2, 3, 5, 6, 10, or 20 contiguous amino acids from a natural peptide. Some peptide immunogens have no more than 10, 9, 8, 7, 5 or 3 contiguous residues from Aβ. In a preferred embodiment, peptide immunogens from the N-terminal half of Aβ are used for preparing conjugates. Preferred peptide immunogens include Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 3-7, 1-3, and 1-4. The designation Aβ1-5 for example, indicates an N-terminal fragment including residues 1-5 of Aβ. Aβ fragments beginning at the N-terminus and ending at a residue within residues 7-11 of Aβ are particularly preferred. The fragment Aβ1-12 can also be used but is less preferred. In some methods, the fragment is an N-terminal fragment other than Aβ1-10. Other preferred fragments include Aβ13-28, 15-24, 1-28, 25-35, 35-40, 35-42 and other internal fragments and C-terminus fragments.

[0089] Some Aβ peptides of the invention are immunogenic peptides that on administration to a human patient or animal generate antibodies that specifically bind to one or more epitopes between residues 16 and 25 of Aβ. Preferred fragments include Aβ16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, and 18-25. Antibodies specifically binding to epitopes between residues 16 and 25 specifically bind to soluble Aβ without binding to plaques of Aβ. These types of antibody can specifically bind to soluble Aβ in the circulation of a patient or animal model without specifically binding to plaques of Aβ deposits in the brain of the patient or model. The specific binding of antibodies to soluble Aβ inhibits the Aβ from being incorporated into plaques thus either inhibiting development of the plaques in a patient or inhibiting a further increase in the size or frequency of plaques if such plaques have already developed before treatment is administered.

Patent provided by Saghroo Mion, PLLC - http://www.saghroo.com

[0090] Preferably, the fragment of Aβ administered lacks an epitope that would generate a T-cell response to the fragment. Generally, T-cell epitopes are greater than 10 contiguous amino acids. Therefore, preferred fragments of Aβ are of size 5-10 or preferably 7-10 contiguous amino acids or most preferably 7 contiguous amino acids; *i.e.*, sufficient length to generate an antibody response without generating a T-cell response. Absence of T-cell epitopes is preferred because these epitopes are not needed for immunogenic activity of fragments, and may cause an undesired inflammatory response in a subset of patients (Anderson et al., (2002) *J. Immunol.* 168, 3697-3701; Senior (2002) Lancet *Neurol.* 1, 3).

[0091] Fragment Aβ15-25 and subfragments of 7-8 contiguous amino acids thereof are preferred because these peptides consistently generate a high immunogenic response to Aβ peptide. These fragments include Aβ16-22, Aβ16-23, Aβ16-24, Aβ17-23, Aβ17-24, Aβ18-24, and Aβ18-25. Particularly preferred Aβ15-25 subfragments are 7 contiguous amino acids in length. The designation Aβ15-21 for example, indicates a fragment including residues 15-21 of Aβ and lacking other residues of Aβ. and preferably 7-10 contiguous amino acids. These fragments can generate an antibody response that includes end-specific antibodies.

[0092] Peptide immunogens of Aβs require screening for activity in clearing or preventing amyloid deposits (*see* WO 00/72880, which is incorporated herein in its entirety for all purposes). Administration of N-terminal fragments of Aβ induces the production of antibodies that recognize Aβ deposits *in vivo* and *in vitro*. Fragments lacking at least one, and sometimes at least 5 or 10 C-terminal amino acids present in naturally occurring forms of Aβ are used in some methods. For example, a fragment lacking 5 amino acids from the C-terminal end of Aβ43 includes the first 38 amino acids from the N-terminal end of Aβ.

[0093] Unless otherwise indicated, reference to Aβ includes the natural human amino acid sequences indicated above as well as analogs including allelic, species and induced variants. Analogs typically differ from naturally occurring peptides at one, two or a few positions, often by virtue of conservative substitutions. Analogs typically exhibit at least 80 or 90% sequence identity with natural peptides. Some analogs also include unnatural amino acids or modifications of N- or C-terminal amino acids at one, two, or a few positions. For example, the natural aspartic acid residue at position 1 and/or 7 of Aβ can be replaced with iso-aspartic acid.

[0094] Examples of unnatural amino acids are D, alpha, alpha-disubstituted amino acids, N-alkyl amino acids, lactic acid, 4-hydroxyproline, gamma-carboxyglutamate, epsilon-

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

N,N,N-trimethyllysine, epsilon-N-acetyllysine, O-phosphoserine, N-acetylserine, N-formylmethionine, 3-methylhistidine, 5-hydroxylysine, omega-N-methylarginine, β-alanine, ornithine, norleucine, norvaline, hydroxproline, thyroxine, gamma-amino butyric acid, homoserine, citrulline, and isoaspartic acid. Immunogenic peptides also include analogs of Aβ and fragments thereof. Some therapeutic agents of the invention are all-D peptides, e.g., all-D Aβ, all-D Aβ fragment, or analogs of all-D Aβ or all-D Aβ fragment. Fragments and analogs can be screened for prophylactic or therapeutic efficacy in transgenic animal models in comparison with untreated or placebo controls as described in WO 00/72880.

[0095] Peptide immunogens also include longer polypeptides that include, for example, an immunogenic of Aβ peptide, together with other amino acids. For example, preferred immunogenic peptides include fusion proteins comprising a segment of Aβ linked to a heterologous amino acid sequence that induces a helper T-cell response against the heterologous amino acid sequence and thereby a B-cell response against the Aβ segment. Such polypeptides can be screened for prophylactic or therapeutic efficacy in animal models in comparison with untreated or placebo controls as described in WO 00/72880.

[0096] The Aβ peptide, analog, immunogenic fragment or other polypeptide can be administered in disaggregated or aggregated form. Disaggregated Aβ or fragments thereof means monomeric peptide units. Disaggregated Aβ or fragments thereof are generally soluble, and are capable of self-aggregating to form soluble oligomers, protofibrils and ADDLs. Oligomers of Aβ and fragments thereof are usually soluble and exist predominantly as alpha-helices or random coils. Aggregated Aβ or fragments thereof means oligomers of Aβ or fragments thereof that have associate into insoluble beta-sheet assemblies. Aggregated Aβ or fragments thereof also means fibrillar polymers. Fibrils are usually insoluble. Some antibodies bind either soluble Aβ or fragments thereof or aggregated Aβ or fragments thereof. Some antibodies bind both soluble Aβ or fragments thereof and aggregated Aβ or fragments thereof.

[0097] Immunogenic peptides also include multimers of monomeric immunogenic peptides. Immunogenic peptides other than Aβ peptides should induce an immunogenic response against one or more of the preferred fragments of Aβ listed above (e.g., Aβ1-3, 1-7, 1-10, and 3-7).

[0098] Immunogenic peptides of the present invention are linked to a carrier using a method of the present invention to form a conjugate. The immunogenic peptide can be linked

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

at its amino terminus, its carboxyl terminus, or both to a carrier to form a conjugate. Optionally, multiple repeats of the immunogenic peptide can be present in the conjugate.

[0099] An N-terminal fragment of Aβ can be linked at its C-terminus to a carrier peptide to form a conjugate. In such conjugates, the N-terminal residue of the fragment of Aβ constitutes the N-terminal residue of the conjugate. Accordingly, such conjugates are effective in inducing antibodies that bind to an epitope that requires the N-terminal residue of Aβ to be in free form. Some immunogenic peptides of the invention comprise a plurality of repeats of an N-terminal segment of Aβ linked at the C-terminus to one or more copy of a carrier peptide to form a conjugate. The N-terminal fragment of Aβ incorporated into such conjugates sometimes begins at Aβ1-3 and ends at Aβ7-11. Aβ1-7, 1-3, 1-4, 1-5, and 3-7 are preferred N-terminal fragment of Aβ. Some conjugates comprise different N-terminal segments of Aβ in tandem. For example, a conjugate can comprise Aβ1-7 followed by Aβ1-3 linked to a carrier.

[0100] In some conjugates, an N-terminal segment of Aβ is linked at its N-terminal end to a carrier peptide. The same variety of N-terminal segments of Aβ can be used as with C-terminal linkage. Some conjugates comprise a carrier peptide linked to the N-terminus of an N-terminal segment of Aβ, which is in turn linked to one or more additional N-terminal segments of Aβ in tandem. Preferably, such immunogenic Aβ fragments, once conjugated to an appropriate carrier, induce an immunogenic response that is specifically directed to the Aβ fragment without being directed to other fragments of Aβ.

[0101] Immunogenic peptides of the invention include immunogenic heterologous peptides. In some immunogenic peptides, an Aβ fragment is linked to a carrier to form an immunogenic heterologous peptide. This heterologous peptide is linked to a carrier using a method of the present invention to form a conjugate. Some of these immunogenic heterologous peptides comprise fragments of Aβ linked to tetanus toxoid epitopes such as described in US 5,196,512, EP 378,881 and EP 427,347. Optionally, an immunogenic peptide can be linked to one or multiple copies of a carrier, for example, at both the N and C termini of the carrier to form an immunogenic heterologous peptide. Other of these immunogenic heterologous peptides comprise fragments of Aβ linked to carrier peptides described in US 5,736,142. For example, an immunogenic heterologous peptide can comprise Aβ1-7 followed by Aβ1-3 followed by a carrier. Examples of such immunogenic heterologous peptides include:

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Aβ 1-7/Tetanus toxoid 830-844 + 947-967 in a linear configuration

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE
(SEQ ID NO.:24)

[0102] Peptides described in US 5,736,142 (all in linear configurations):

PADRE/Aβ 1-7:

AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD (SEQ ID NO.:26)

Aβ1-7 x 3/PADRE:

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO.:27)

PADRE/Aβ1-7 x 3:

AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD (SEQ ID NO.:28)

Aβ1-7/PADRE:

DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO.:29)

Aβ1-7/albumin fragment:

DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO.:30)

Aβ4-10/albumin fragment:

FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO.:31)

Aβ3-9/albumin fragment:

EFRHDSG-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO.:32)

$HA_{307-319}/A\beta_{1-7}$ x 3:

PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD (SEQ ID NO.:33)

$A\beta_{1-7}/HA_{307-319}/A\beta_{1-7}$:

DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD (SEQ ID NO.:34)

$A\beta_{1-7}$x 3/$HA_{307-319}$:

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO.:35)

$A\beta_{1-7}$x 2/$HA_{307-319}$:

DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO.:36)

$A\beta_{1-7}/HA_{307-319}$/Malaria CS/$TT_{830-844}/TT_{947-967}/A\beta_{1-7}$

Patent provided by Saghrue Mion, PLLC - http://www.saghrue.com

DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD (SEQ ID NO.:37)

$A\beta_{1-7}$ x 3/$TT_{830-844}$/C/$TT_{947-967}$

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO.:38)

$A\beta_{1-7}$/$TT_{830-844}$/C/$TT_{947-967}$

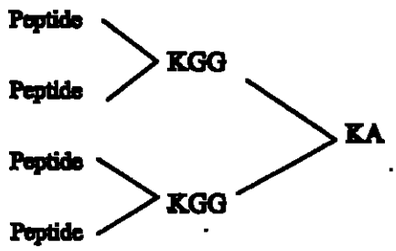
DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO.:39)

$A\beta_{1-7}$/$TT_{830-844}$/C/$TT_{947-967}$/$A\beta_{1-7}$

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD (SEQ ID NO.:20)

[0103] Some immunogenic heterologous peptides comprise a multimer of immunogenic peptides represented by the formula 2^x, in which x is an integer from 1-5. Preferably x is 1, 2 or 3, with 2 being most preferred. When x is two, such a multimer has four immunogenic peptides linked in a preferred configuration referred to as MAP4 (*see* US 5,229,490). Such immunogenic peptides are then linked to a carrier using a method of the present invention to form a conjugate.

[0104] The MAP4 configuration is shown below, where branched structures are produced by initiating peptide synthesis at both the N-terminal and side chain amines of lysine. Depending upon the number of times lysine is incorporated into the sequence and allowed to branch, the resulting structure will present multiple N-termini. In this example, four identical N-termini have been produced on the branched lysine-containing core. Such multiplicity greatly enhances the responsiveness of cognate B cells.



[0105] Examples of such immunogenic heterologous peptides include:

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Aβ 1-7/Tetanus toxoid 830-844 in a MAP4 configuration:

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO.:22)

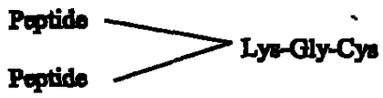
Aβ 1-7/Tetanus toxoid 947-967 in a MAP4 configuration:

DAEFRHD-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO.:23)

Aβ 3-9/Tetanus toxoid 830-844 in a MAP4 configuration:

EFRHDSG-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO.:25)

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL on a 2 branched resin



[0106] The Aβ peptide, analog, active fragment or other polypeptide can be administered in associated or multimeric form or in dissociated form. Therapeutic agents also include multimers of monomeric immunogenic agents. Agents other than Aβ peptides should induce an immunogenic response against one or more of the preferred fragments of Aβ listed above (e.g., 1-10, 1-7, 1-3, and 3-7), and can also be conjugated to a carrier using a method of the present invention. Preferably, such agents, once conjugated to an appropriate carrier, induce an immunogenic response that is specifically directed to one of these fragments without being directed to other fragments of Aβ. To facilitate the conjugation of an peptide immunogen with a carrier, additional amino acids can be added to the termini of the antigenic determinants. The additional residues can also be used for modifying the physical or chemical properties of the peptide immunogen. Amino acids such as tyrosine, cysteine, lysine, glutamic or aspartic acid, or the like, can be introduced at the C- or N- terminus of the peptide immunogen. Additionally, peptide linkers containing amino acids such as glycine and alanine can also be introduced. In addition, the antigenic determinants can differ from the natural sequence by being modified by terminal NH_2-group acylation, e.g., by alkanoyl (C1-C20) or thioglycolyl acetylation, terminal-carboxy amidation, e.g., ammonia, methylamine, etc. In some instances these modifications may provide sites for linking to a support or other molecule.

[0107] The peptide immunogens used to generate conjugates of the present invention using a process disclosed herein can be combined via linkage to form polymers (multimers), or can be formulated in a composition without linkage, as an admixture. Where a peptide is linked to an identical peptide, thereby forming a homopolymer, a plurality of repeating epitopic units are presented. For example, multiple antigen peptide (MAP) technology is used to

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

construct polymers containing both CTL and/or antibody peptides and peptides. When the peptides differ, *e.g.*, a cocktail representing different viral subtypes, different epitopes within a subtype, different HLA restriction specificities, or peptides which contain T-helper epitopes, heteropolymers with repeating units are provided. In addition to covalent linkages, noncovalent linkages capable of forming intermolecular and intrastructural bonds are also contemplated.

[0108] Such peptide immunogens and their analogs are synthesized by solid phase peptide synthesis or recombinant expression, or are obtained from natural sources. Automatic peptide synthesizers are commercially available from numerous suppliers, such as Applied Biosystems, Foster City, California.

[0109] Recombinant expression can be in bacteria (such as *E. coli*), yeast, insect cells or mammalian cells. Procedures for recombinant expression are described by Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, NY, 2nd ed., 1989). Some immunogenic peptides are also available commercially (*e.g.*, American Peptides Company, Inc., Sunnyvale, CA, and California Peptide Research, Inc., Napa, CA).

[0110] Random libraries of peptides or other compounds can also be screened for suitability as a peptide immunogen. Combinatorial libraries can be produced for many types of compounds that can be synthesized in a step-by-step fashion. Such compounds include polypeptides, beta-turn mimetics, hormones, oligomeric *N*-substituted glycines, and oligocarbamates and the like. Large combinatorial libraries of the compounds can be constructed by the encoded synthetic libraries (ESL) method described in WO 95/12608, WO 93/06121, WO 94/08051, WO 95/35503 and WO 95/30642 (each of which is incorporated by reference for all purposes). Peptide libraries can also be generated by phage display methods (*see, e.g.*, Devlin, WO 91/18980).

Derivatization and Conjugation of an Immunogenic Peptide to a Protein Carrier

[0111] The site of attachment of a peptide immunogen to a protein/polypeptide carrier, and the nature of the cross-linking agent that is used to attach a peptide immunogen to the carrier are both important to the specificity of the resultant antibody generated against it. For proper recognition, the peptide immunogen must be coupled to the carrier with the appropriate orientation. For an antibody to recognize subsequently the free peptide immunogens without carrier, the peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugate must present the peptide immunogens in an exposed and accessible form. Optimal orientation is often achieved by directing the cross-linking reaction to specific sites on the peptide immunogens.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

One way to achieve this with a peptide immunogen is by attaching a terminal cysteine residue during peptide synthesis. This provides a sulfhydryl group on one end of the peptide for conjugation to the carrier. Cross-linking through this group provides attachment of the peptide immunogen only at one end, thereby ensuring consistent orientation.

[0112] In peptide immunogen-carrier conjugation, the goal is not to maintain the native state or stability of the carrier, but to present the hapten in the best possible way to the immune system. In reaching this goal, the choice of conjugation chemistry may control the resultant titer, affinity, and specificity of the antibodies generated against the hapten. It may be important in some cases to choose a cross-linking agent containing a spacer arm long enough to present the antigen in an unrestricted fashion. It also may be important to control the density of the peptide immunogen on the surface of the carrier. Too little peptide immunogen substitution may result in little or no response. A peptide immunogen density too high actually may cause immunological suppression and decrease the response. In addition, the cross-linker itself may generate an undesired immune response. These issues need to be taken into consideration in selecting not only the appropriate cross-linking reagents, but also the appropriate ratios of protein/polypeptide carrier and peptide immunogen.

[0113] A variety of means of attaching the protein/peptide carriers to the peptide immunogens are possible. Ionic interactions are possible through the termini or through the ε-amino group of lysine. Hydrogen bonding between the side groups of the residues and the peptide immunogen are also possible. Finally, conformation interactions between the protein/peptide carriers and the immunogenic peptide may give rise to a stable attachment.

[0114] Peptide immunogens-carrier conjugates have been successfully generated using various cross-linking reagents such as zero-length, homobifunctional or heterobifunctional cross linkers. The smallest available reagent systems for bioconjugation are the so-called zero-length cross-linkers. These compounds mediate the conjugation of two molecules by forming a bond containing no additional atoms. Thus, one atom of a molecule is spacer. In many conjugation schemes, the final complex is bound together by virtue of chemical components that add foreign structures to the substances being cross-linked. In some applications, the presence of these intervening linkers may be detrimental to the intended use. For instance, in the preparation of peptide immunogen-carrier conjugates the complex is formed with the intention of generating an immune response to the attached hapten. Occasionally, a portion of the antibodies produced by this response will have specificity for

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

the cross-linking agent used in the conjugation procedure. Zero-length cross-linking agents eliminate the potential for this type of cross-reactivity by mediating a direct linkage between two substances.

[0115] Homobifunctional reagents, which were the first cross-linking reagents used for modification and conjugation of macromolecules, consisted of bireactive compounds containing the same functional group at both ends (Hartman and Wold, 1966). These reagents could tie one protein to another by covalently reacting with the same common groups on both molecules. Thus, the lysine ε-amines or N-terminal amines of one protein could be cross-linked to the same functional groups on a second protein simply by mixing the two together in the presence of the homobifunctional reagent.

[0116] Heterobifunctional conjugation reagents contain two different reactive groups that can couple to two different functional targets on proteins and other macromolecules. For example, one part of a cross-linker may contain an amine-reactive group, while another portion may consist of a sulfhydryl-reactive group. The result is the ability to direct the cross-linking reaction to selected parts of target molecules, thus garnering better control over the conjugation process.

[0117] Heterobifuntional reagents are used to cross-link proteins and other molecules in a two-or three-step process that limits the degree of polymerization often obtained using homobifunctional cross-linkers.

[0118] Many methods are currently available for coupling of peptide immunogens to protein/polypeptide carriers using zero-length, homobifunctional or heterobifunctional crosslinkers. Most methods create amine, amide, urethane, isothiourea, or disulfide bonds, or in some cases thioethers. The more general method of coupling proteins or peptides to peptides utilizes bifunctional crosslinking reagents. These are small spacer molecules having active groups at each end. The spacer molecules can have identical or different active groups at each end. The most common active functionalities, coupling groups, and bonds formed are:

1. Aldehyde - amino → secondary amine
2. Maleimido - sulfhydryl → thioether
3. Succinimido - amino → amide
4. Imidate esters - amino → amide
5. Phenyl azides - amino → phenyl amine

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

6. Acyl halide - sulfhydryl → thioether

7. Pyridyldisulfides - sulfhydryl → disulfide

8. Isothiocyanate - amino → isothiourea.

[0119] The reactivity of a given carrier protein, in terms of its ability to be modified by a cross-linking agent such that it can be conjugated to an peptide immunogen, is determined by its amino acid composition and the sequence location of the individual amino acids in the three dimensional structure of the molecule, as well as by the amino acid composition of the peptide immunogen.

[0120] In the case of linkers ("L") between protein/peptide carriers and other peptides (e.g., a protein/peptide carriers and an peptide immunogen), the spacers are typically selected from Ala, Gly, or other neutral spacers of nonpolar amino acids or neutral polar amino acids. In certain embodiments the neutral spacer is Ala. It will be understood that the optionally present spacer need not be comprised of the same residues and thus may be a hetero- or homo-oligomer. Exemplary spacers include homo-oligomers of Ala. When present, the spacer will usually be at least one or two residues, more usually three to six residues. In other embodiments the protein/polypeptide carrier is conjugated to an peptide immunogen, preferably with the protein/peptide carrier positioned at the amino terminus. The peptide may be joined by a neutral linker, such as Ala-Ala-Ala or the like, and preferably further contain a lipid residue such palmitic acid or the like which is attached to alpha and epsilon amino groups of a Lys residue ($(PAM)_2$Lys), which is attached to the amino terminus of the peptide conjugate, typically via Ser-Ser linkage or the like.

[0121] In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ1-5-L, Aβ1-7-L, Aβ1-9-L, and Aβ1-12-L. In some aspects of the invention the linker is GAGA (SEQ ID NO:10).

[0122] To facilitate the conjugation of a peptide immunogen with a carrier, additional amino acids can be added to the termini of the antigenic determinants. The additional residues can also be used for modifying the physical or chemical properties of the peptide immunogen. Amino acids such as tyrosine, cysteine, lysine, glutamic or aspartic acid, or the like, can be introduced at the C- or N- terminus of the peptide immunogen. Additionally, peptide linkers containing amino acids such as glycine and alanine can also be introduced. In addition, the antigenic determinants can differ from the natural sequence by being modified by terminal NH_2-group acylation, e.g., by alkanoyl (C1-C20) or thioglycolyl acetylation,

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

terminal-carboxy amidation, *e.g.*, ammonia, methylamine, etc. In some instances these modifications may provide sites for linking to a support or other molecule.

[0123] In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ1-5-C, Aβ1-7-C, Aβ1-9-C, and Aβ1-12-C, where C is a cysteine amino acid residue. In some aspects of the invention, the peptide immunogen is an Aβ fragment selected from the group consisting of Aβ1-5-L-C, Aβ1-7-L-C, Aβ1-9-L-C, and Aβ1-12-L-C.

[0124] The peptide immunogen is linked to the protein/peptide carrier either directly or via a linker either at the amino or carboxy terminus of the peptide immunogen. The amino terminus of either the peptide immunogen or the protein/peptide carrier may be acylated. In addition, the peptide immunogen -protein/peptide carrier conjugate may be linked to certain alkanyol (C_1-C_{20}) lipids via one or more linking residues such as Gly, Gly-Gly, Ser, Ser-Ser as described below. Other useful lipid moieties include cholesterol, fatty acids, and the like.

[0125] Peptide immunogens can be linked to a carrier by chemical crosslinking. Techniques for linking an immunogen to a carrier include the formation of disulfide linkages using *N*-succinimidyl-3-(2-pyridyl-thio) propionate (SPDP) (Carlsson, J *et al.* (1978) *Biochem J*, 173: 723,) and succinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) (if the peptide lacks a sulfhydryl group, this can be provided by addition of a cysteine residue to the hapten). These reagents create a disulfide linkage between themselves and peptide cysteine resides on one protein and an amide linkage through the ε-amino on a lysine, or other free amino group in other amino acids. A variety of such disulfide/amide-forming agents are described in *Immun. Rev.* 62: 85 (1982). Other bifunctional coupling agents form a thioether rather than a disulfide linkage. The thioether forming agents include reactive ester of 6-maleimidocaproic acid, 2-bromoacetic acid, and 2-iodoacetic acid, 4-(*N*-maleimido-methyl) cyclohexane-1-carboxylic acid. The carboxyl groups can be activated by combining them with succinimide or 1-hydroxyl-2-nitro-4-sulfonic acid, sodium salt.

[0126] Most frequently, lysine residues are the most abundant amino acid residues found on carrier proteins, and these residues are modified using cross-linking reagents to generate neucleophilic sites that are then coupled to a hapten. This coupling is achieved via any of the hydrophilic side chains on the hapten molecules that are chemically active. These include the guanidyl group of arginine, the (-carboxyl groups of glutamate and aspartic acid, the sulfhydryl group of cysteine, and the ε-amino group of lysine, to name a few. Modification

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

of proteins such that they can now be coupled to other moieties is achieved using crosslinking reagents, which react with any of the side chains on the protein carrier or hapten molecules.

[0127] In one aspect of the present invention, the carrier protein with or without a linker molecule is functionalized (derivatized) with a reagent that introduces reactive sites into the carrier protein molecule that are amenable to further modification to introduce nucleophilic groups. In one embodiment, the carrier is reacted with a haloacetylating reagent, which preferentially reacts with a number of functional groups on amino acid residues of proteins such as the sulfhydryl group of cysteine, the primary ε-amine group of lysine residue, the α terminal of α-amines, the thioether of methionine and both imidazoyl side chain nitrogens of histidine (Gurd, 1967). In a prefered embodiment, the primary ε-amine groups on lysine residues of the carrier protein are derivatized with b N-hydroxysuccinimidyl bromoacetate to generate a bromoacetylated carrier. Conjugation of peptide immmunogen and the activated protein carrier was carried out by slowly adding the activated carrier to the solution containing the peptide immunogen.

[0128] By using the process of this invention, the peptide immunogens discussed in section B, above, may be conjugated to any of the carriers discussed in section A, above. The conjugates resulting from the process of this invention are used as immunogens for the generation of antibodies against Aβ for use in passive/active immunotherapy. Furthermore, Aβ or an Aβ fragment linked to a carrier can be administered to a laboratory animal in the production of monoclonal antibodies to Aβ.

[0129] In one aspect of the invention, the conjugate is a conjugate selected from the group consisting of Aβ1-7-CRM_{197}, (Aβ1-7 x 3)-CRM_{197}, and (Aβ1-7 x 5)-CRM_{197}. In one aspect of the invention, the conjugate is a conjugate selected from the group consisting of CRM_{197}-Aβ1-5, CRM_{197}-Aβ1-7, CRM_{197}-Aβ1-9, and CRM_{197}-Aβ1-12. In another aspect of the invention, the conjugate is a conjugate selected from the group consisting of Aβ1-5-C-CRM_{197}, Aβ1-7-C-CRM_{197}, Aβ1-9-C-CRM_{197}, and Aβ1-12-C-CRM_{197}, Aβ16-23-C-CRM_{197}, Aβ17-24-C-CRM_{197}, Aβ18-25-C-CRM_{197}, CRM_{197}-C-Aβ16-23, CRM_{197}-C-Aβ17-24, CRM_{197}-C-Aβ18-25, Aβ16-22-C-CRM_{197}, Aβ17-23-C-CRM_{197}, Aβ18-24-C-CRM_{197}, CRM_{197}-C-Aβ16-22, CRM_{197}-C-Aβ17-23, and CRM_{197}-C-Aβ18-24. In yet another aspect of the invention, the conjugate is a conjugate selected from the group consisting of selected from the group consisting of Aβ1-5-L-C-CRM_{197}, Aβ1-7-L-C-CRM_{197}, Aβ1-9-L-C-CRM_{197}, and Aβ1-12-L-C-CRM_{197}.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Capping

[0130] A disadvantage to the use of coupling reagents, which introduce reactive sites into the side chains of reactive amino acid molecules on carrier and /or hapten molecules, is that the reactive sites if not neutralized are free to react with any unwanted molecule either *in vitro* or *in vivo*. In the process of the present invention, capping of the unreacted functional groups is accomplished by reaction of the conjugates with pendant reactive groups with reagents which inactivate/cap the reactive groups. Exemplary inactivating/capping reagents for use with the conjugation process of the present invention include cysteamine, *N*-acetylcysteamine, and ethanolamine. Alternatively, capping is accomplished by reaction with ammonia or ammonium bicarbonate, either of which converts the haloacetyl groups to aminoacetyl groups. Capping is also accomplished at alkaline pH (9.0–9.8) using sodium hydroxide or sodium carbonate, which converts the haloacetyl groups to hydroxyacetyl groups. One potential advantage of converting the haloacetyl groups to aminoacetyl or hydroxyacetyl groups, as opposed to the reaction with cysteamine derivatives, ethanolamine etc., is the introduction of relatively smaller size chemical functionalities, by reaction with ammonia or hydroxide/carbonate. The resulting capped functional groups, e.g. aminoacetyl or hydroxyacetyl, provide relatively less perturbance in the carrier protein portion of the conjugate. The capped peptide immunogen-carrier protein is purified as necessary using known methods, such as chromatography (gel filtration, ion exchange, hydrophobic interaction or affinity), dialysis, ultrafiltration-diafiltration, selective precipitation using ammonium sulfate or alcohol, and the like.

Immunogenic Conjugates and Compositions

[0131] The capped peptide immunogen-carrier protein conjugates are administered in an immunogenic composition to mammals, particularly humans, for prophylactic and/or therapeutic purposes. The conjugates of the present invention are used to elicit and/or enhance immune responses against immunogens. For instance, CTL-carrier conjugates are used to treat and/or prevent viral infection, amyloidogenic diseases, cancer etc. Alternatively, polypeptide immunogen-carrier conjugates, which induce antibody responses, are also used. Examples of diseases, which can be treated using the conjugates of the present invention, include various bacterial infections, viral infections, fungal infections, parasitic infections and cancer.

[0132] In therapeutic applications, a conjugate of the present invention is administered to an individual already suffering from an amyloidogenic disease such as Alzheimer's disease,

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

cancer, or infected with a pathogenic microorganism. Those in the incubation phase or the acute phase of the disease may be treated with the conjugate of the present invention separately or in conjunction with other treatments, as appropriate.

[0133] In therapeutic applications, an immunogenic composition of the present invention is administered to a patient in an amount sufficient to elicit an effective CTL response or humoral response to the microorganism, amyloid plaque or to a tumor antigen expressed on a cancer cell, and to cure, or at least partially arrest disease progression, symptoms and/or complications. An amount adequate to accomplish this is defined as "therapeutically effective dose." Amounts effective for this use will depend in part on the peptide composition, the manner of administration, the stage and severity of the disease being treated, the weight and general state of health of the patient, and the judgment of the prescribing physician.

[0134] Therapeutically effective amounts of the immunogenic compositions of the present invention generally range for the initial immunization for therapeutic or prophylactic administration, from about 0.1 μg to about 10,000 μg of peptide for a 70 kg patient, usually from about 0.1 to about 8000 μg, preferably between about 0.1 to about 5000 μg, and most preferably between 0.1 to about 1,000 μg. These doses are followed by boosting dosages of from about 0.1 μg to about 1000 μg of peptide pursuant to a boosting regimen over weeks to months depending upon the patient's response and condition by measuring specific immune responses.

[0135] Further, the present invention is used prophylactically to prevent and/or ameliorate bacterial infections, viral infections, fungal infections, parasitic infections, amyloidogenic disease, or cancer. Effective amounts are as described above. Additionally, one of ordinary skill in the art would also know how to adjust or modify prophylactic treatments, as appropriate, for example by boosting and adjusting dosages and dosing regimes.

[0136] Therapeutic administration may begin at the first sign of the disease or the detection or surgical removal of tumors or shortly after diagnosis in the case of acute infection. This is followed by boosting doses until the disease progression is halted or reversed or the symptoms are substantially abated and for a period thereafter. In chronic infection, initial high doses followed by boosting doses may be required.

[0137] Treatment of an infected individual with the compositions of the invention may hasten resolution of the infection in acutely infected individuals. For those individuals susceptible (or predisposed) to developing chronic infection the compositions are particularly

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

useful in methods for preventing the evolution from acute to chronic infection. Where the susceptible individuals are identified prior to or during infection, for instance, as described herein, the composition can be targeted to them, minimizing need for administration to a larger population.

[0138] The conjugates of the present invention are also used for the treatment of chronic infection and to stimulate the immune system to eliminate virus-infected cells in individuals with latent infections. It is important to provide an amount of the immunogenic composition of the present invention in a formulation and mode of administration sufficient to effectively elicit and/or enhance an immune response. Thus, for treatment of chronic infection, a representative dose is in the range from about 0.1 μg to about 10,000 μg of peptide, usually from about 0.1 to about 8000 μg, preferably between about 0.1 to about 5000 μg, and most preferably between 0.1 to about 1,000 μg for a 70kg patient per dose. Immunizing doses followed by boosting doses at established intervals, e.g., from one to four weeks, may be required, possibly for a prolonged period of time to effectively immunize an individual. In the case of chronic infection, administration should continue until at least clinical symptoms or laboratory tests indicate that the viral infection has been eliminated or substantially abated and for a period thereafter.

[0139] Immunogenic compositions of the present invention for therapeutic or prophylactic treatment can be administered by parenteral, topical, intravenous, oral, subcutaneous, intra-arterial, intra-cranial, intra-peritoneal, intra-nasal or intra-muscular means for prophylactic and/or therapeutic treatment. One typical route of administration of an immunogenic agent is subcutaneous, although other routes can be equally effective. Another common route is intra-muscular injection. This type of injection is most typically performed in the arm or leg muscles. In some methods, agents are injected directly into a particular tissue where deposits have accumulated, for example intra-cranial injection. Intra-muscular injection or intravenous infusion is prefered for administration of antibody. In some methods, particular therapeutic antibodies are injected directly into the cranium. Because of the ease of administration, the immunogenic compositions of the invention are particularly suitable for oral administration. The invention further provides immunogenic compositions for parenteral administration, which comprise a solution of the peptides or conjugates, dissolved or suspended in an acceptable carrier, preferably an aqueous carrier.

[0140] A variety of diluents, excipients and buffers may be used, e.g., water, buffered water, phosphate buffered saline, 0.3% glycine, hyaluronic acid and the like. These

Patent provided by Saghrus Mion, PLLC - http://www.saghrus.com

compositions may be sterilized by conventional, well-known sterilization techniques, or may be sterile filtered. The resulting aqueous solutions may be packaged for use as is, or lyophilized, the lyophilized preparation being combined with a sterile solution prior to administration. The compositions may contain pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological conditions, such as buffering agents, tonicity adjusting agents, wetting agents and the like, for example, sodium acetate, sodium lactate, sodium chloride, potassium chloride, calcium chloride, sorbitan monolaurate, triethanolamine oleate, etc.

[0141] For solid compositions, conventional nontoxic solid carriers may be used. These may include, for example, pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharin, talcum, cellulose, glucose, sucrose, magnesium carbonate, and the like. For oral administration, a pharmaceutically acceptable nontoxic composition is formed by incorporating any of the normally employed excipients, such as those carriers previously listed, and generally 10-95% of active ingredient, that is, one or more conjugates of the invention, and more preferably at a concentration of 25-75%.

[0142] The concentration of immunogenic compositions of the present invention in the pharmaceutical formulations can vary widely, i.e., from less than about 0. 1%, usually at or at least about 2% to as much as 20% to 50% or more by weight, and will be selected primarily by fluid volumes, viscosities, etc. , in accordance with the particular mode of administration selected.

[0143] The conjugates of the present invention may also be administered via liposomes, which serve to target the conjugates to a particular tissue, such as lymphoid tissue, or targeted selectively to infected cells, as well as increase the half-life of the peptide composition. Liposomes include emulsions, foams, micelles, insoluble monolayers, liquid crystals, phospholipid dispersions, lamellar layers and the like. In these preparations the composition to be delivered is incorporated as part of a liposome, alone or in conjunction with a molecule, which binds to, for example, a receptor prevalent among lymphoid cells. These molecules would include monoclonal antibodies, which bind to the CD45 antigen, or with other therapeutic or immunogenic compositions. Thus, liposomes filled with a desired composition of the present invention can be directed to the site of lymphoid cells, where the liposomes then deliver the selected therapeutic/immunogenic peptide compositions. Liposomes for use in the invention are formed from standard vesicle-forming lipids, which generally include neutral and negatively charged phospholipids and a sterol, such as cholesterol. The selection

Patent provided by Seghrue Mion, PLLC - http://www.seghrue.com

of lipids is generally guided by consideration of liposome size, acid lability and stability of the liposomes in the blood stream. A variety of methods are available for preparing liposomes, as described in, e.g., Szoka, et al., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng* . 9:467 (1980), U.S. Pat. Nos. 4,235,871, 4,501,728, 4,837,028, and 5,019,369, incorporated herein by reference.

[0144] For targeting to the immune cells, a ligand to be incorporated into the liposome can include antibodies or fragments thereof specific for cell surface determinants of the desired immune system cells. A liposome suspension containing a composition of the present invention may be administered intravenously, locally, topically, etc. in a dose which varies according to, inter alia, the manner of administration, the composition being delivered, and the stage of the disease being treated.

[0145] For aerosol administration, the compositions of the present invention are preferably supplied in finely divided form along with a surfactant and propellant. Typical percentages of the composition are 0.01-20% by weight, preferably 1-10%. The surfactant must, of course, be nontoxic, and preferably soluble in the propellant. Representative of such agents are the esters or partial esters of fatty acids containing from 6 to 22 carbon atoms, such as caproic, octanoic, lauric, palmitic, stearic, linoleic, linolenic, olesteric and oleic acids with an aliphatic polyhydric alcohol or its cyclic anhydride. Mixed esters, such as mixed or natural glycerides may be employed. The surfactant may constitute 0.1- 20% by weight of the composition, preferably 0.25-5%. The balance of the composition is ordinarily propellant. A carrier can also be included, if desired, as with lecithin for intranasal delivery.

[0146] The compositions of this invention may also be used to make monoclonal antibodies. Such antibodies may be useful as potential diagnostic or therapeutic agents.

[0147] The compositions of the present invention may also find use as diagnostic reagents. For example, a composition of the invention may be used to determine the susceptibility of a particular individual to a treatment regimen, which employs the polypeptide immunogens, and thus may be helpful in modifying an existing treatment protocol or in determining a prognosis for an affected individual. In addition, the compositions of the present invention may also be used to predict which individuals will be at substantial risk for developing chronic infection.

[0148] Conjugates of the present invention can optionally be administered in combination with other agents that are at least partly effective in treatment and/or amelioration of a disease and/or its symptoms. In the case of Alzheimer's and Down's syndrome, in which amyloid

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

deposits occur in the brain, the conjugates of the invention can be administered in conjunction with other agents that increase passage of the agents of the invention across the blood-brain barrier.

[0149] The immunogenic composition typically contains an adjuvant. An adjuvant is a substance that enhances the immune response when administered together with an immunogen or antigen. A number of cytokines or lymphokines have been shown to have immune modulating activity, and thus may be used as adjuvants, including, but not limited to, the interleukins 1-α, 1-β, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (see, e.g., U.S. Patent No. 5,723,127), 13, 14, 15, 16, 17 and 18 (and its mutant forms), the interferons-α, β and γ, granulocyte-macrophage colony stimulating factor (see, e.g., U.S. Patent No. 5,078,996) macrophage colony stimulating factor, granulocyte colony stimulating factor, GSF, and the tumor necrosis factor α and β. Still other adjuvants useful in this invention include a chemokine, including without limitation, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, and RANTES. Adhesion molecules, such as a selectin, e.g., L-selectin, P-selectin and E-selectin may also be useful as adjuvants. Still other useful adjuvants include, without limitation, a mucin-like molecule, e.g., CD34, GlyCAM-1 and MadCAM-1, a member of the integrin family such as LFA-1, VLA-1, Mac-1 and p150.95, a member of the immunoglobulin super family such as PECAM, ICAMs, e.g., ICAM-1, ICAM-2 and ICAM-3, CD2 and LFA-3, co-stimulatory molecules such as CD40 and CD40L, growth factors including vascular growth factor, nerve growth factor, fibroblast growth factor, epidermal growth factor, B7.2, PDGF, BL-1, and vascular endothelial growth factor, receptor molecules including Fas, TNF receptor, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, and DR6. Still another adjuvant molecule includes Caspase (ICE). See, also International Patent Publication Nos. WO98/17799 and WO99/43839, which are incorporated herein by reference in their entirety for all purposes.

[0150] Suitable adjuvants used to enhance an immune response include, without limitation, MPL™ (3-O-deacylated monophosphoryl lipid A; Corixa, Hamilton, MT), which is described in U.S. Patent No. 4,912,094, which is hereby incorporated by reference for all purposes. Also suitable for use as adjuvants are synthetic lipid A analogs or aminoalkyl glucosamine phosphate compounds (AGP), or derivatives or analogs thereof, which are available from Corixa (Hamilton, MT), and which are described in U.S. Patent No. 6,113,918, which is hereby incorporated by reference. One such AGP is 2-[(R)-3-Tetradecanoyloxytetradecanoylamino] ethyl 2-Deoxy-4-O-phosphono-3-O-[(S)-3-

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

tetradecanoyoxytetradecanoyl]-2-[(R)-3-tetradecanoyloxy-tetradecanoyl-amino]-b-D-glycopyranoside, which is known as 529 (also known as RC529; Corixa). This 529 adjuvant is formulated as an aqueous form (529 AF) or as a stable emulsion (529 SE).

[0151] Still other adjuvants include mineral oil and water emulsions, calcium salts such as calcium phosphate, aluminum salts (alum), such as aluminum hydroxide, aluminum phosphate, etc., Amphigen, Avridine, L121/squalene, D-lactide-polylactide/glycoside, pluronic acids, polyols, muramyl dipeptide, killed *Bordetella*, saponins, such as Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA), described in U.S. Patent No. 5,057,540, which is hereby incorporated by reference3, and particles generated therefrom such as ISCOMS (immunostimulating complexes), *Mycobacterium tuberculosis*, bacterial lipopolysaccharides, synthetic polynucleotides such as oligonucleotides containing a CpG motif (U.S. Patent No. 6,207,646, which is hereby incorporated by reference), a pertussis toxin (PT), or an *E. coli* heat-labile toxin (LT), particularly LT-K63, LT-R72, PT-K9/G129; see, e.g., International Patent Publication Nos. WO 93/13302 and WO 92/19265, which are/ incorporated herein by reference for all purposes.

[0152] Also useful as adjuvants are cholera toxins and mutants thereof, including those described in published International Patent Application number WO 00/18434 (wherein the glutamic acid at amino acid position 29 is replaced by another amino acid (other than aspartic acid, preferably a histidine). Similar CT toxins or mutants are described in published International Patent Application number WO 02/098368 (wherein the isoleucine at amino acid position 16 is replaced by another amino acid, either alone or in combination with the replacement of the serine at amino acid position 68 by another amino acid; and/or wherein the valine at amino acid position 72 is replaced by another amino acid). Other CT toxins are described in published International Patent Application number WO 02/098369 (wherein the arginine at amino acid position 25 is replaced by another amino acid; and/or an amino acid is inserted at amino acid position 49; and/or two amino acids are inserted at amino acid position 35 and 36).

[0153] It is to be understood that reference throughout this specification to any theory to explain the results described is not to limit the scope of the invention. Independent of the method by which the invention functions, the results and advantages described herein may be achieved by reference to the following examples of the invention.

[0154] It will be apparent to one of ordinary skill in the art that many changes and modifications can be made thereto without departing from the spirit or scope of the appended

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

claims. All publications, patents and patent applications mentioned in this specification are incorporated by reference in their entirety for all purposes to the same extent as if each individual publication, patent or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

EXAMPLE 1

Conjugation Of CRM_{197} To Aβ Peptide

[0155] Conjugation of haptens/antigenic peptides was carried out by reacting activated carrier CRM_{197}, which has thirty-nine lysine residues, to a hapten/antigenic peptide having a pendant thiol-group using the method described below (Figure 1). All the Aβ peptides contained a cysteine residue at the carboxy terminus to facilitate the conjugation of these peptides through the cysteinyl sulfhydryl group to the carrier protein. These peptides were produced by solid phase synthesis.

I. Activation

[0156] Free amino groups of CRM_{197} were bromoacetylated by reaction with an excess of bromoacetic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (Bernatowicz and Matsueda, 1986). To an ice-cold solution of CRM_{197} (~15 mg), 10% (v/v) 1.0 M $NaHCO_3$ (pH 8.4) was added. Bromoacetic acid *N*-hydroxysuccinimide ester, equal in weight to that of CRM_{197} used, was dissolved in 200 μL dimethylformamide (DMF), added slowly to the CRM_{197}, and gently mixed at room temperature in the dark for 1 hour. The resulting bromoacetylated (activated) protein was purified by passage through a desalting (P6-DG) column using PBS / 1 mM EDTA (pH 7.0) as the eluent. Following purification, the fractions corresponding to activated CRM_{197} were pooled and the protein concentration was estimated by BCA protein assay. The protein amino groups, both before and after treatment with bromoacetic acid *N*-hydroxysuccinimide ester, were reacted with 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBSA), which served as an indicator of bromoacetylation (Means *et al.*, 1972).

II. Conjugation

[0157] Prior to conjugation, the peptides were reacted with 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) [Ellman's reagent] to verify the content of free-SH groups (between 62-88% reduced). For the first four Aβ peptides (amino acids 1-7 without linker, amino acids 1-12 with GAGAC linker, amino acids 1-9 with GAGAC linker, and amino acids 1-7 with GAGAC linker), approximately 8.0 – 10.0 mg of peptide was dissolved in sterile distilled water to an

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

approximate concentration of 20 mg/ml. The peptide was slowly added to cold activated CRM_{197} in a 1:1 ratio (w/w) and the pH was adjusted to approximately 7.0-7.2 with the addition of 20-36 µl of 1 N NaOH. The resulting material was gently mixed overnight at 4°C in the dark followed by dialysis in the dark against two 1L changes of PBS, pH 7.2. For the next four Aβ peptides (amino acids 1-5 without linker, amino acids 1-9 without linker, amino acids 1-12 without linker, and amino acids 1-5 with linker), reaction with Ellman's reagent was used to verify the free -SH groups. CRM_{197} was bromoacetylated, purified, and reacted with TNBSA as previously described. The pH of each peptide was adjusted to 7.0 with the addition of 0.1 M $NaPO_4$ (pH 8.5) at 2.2x the volume of the dissolved peptide. The peptide was slowly added to cold activated CRM_{197} in a 1:1 ratio and allowed to react overnight at 4°C in the dark. The resulting material was dialyzed. A final control peptide (1-12mer in reverse orientation) was conjugated to CRM_{197} as described above with the following modification. Rather than adjusting the pH of the peptide to 7.0, the pH of the activated CRM_{197} was adjusted to approximately 7.5 with the addition of 20% (v/v) 0.5 M $NaPO_4$ (pH 8.0). Each conjugate, after dialysis, was transferred into a sterile 15mL polypropylene tube, wrapped in aluminum foil, and stored at 4°C. Activation of the reactive amino residues on the carrier was then subsequently verified using mass spectrometry.

Conjugate	Immunogenic Peptide
Aβ1-5-C-CRM_{197}	DAEFR-C (SEQ. ID. NO.:1)
Aβ1-7-C-CRM_{197}	DAEFRHD-C (SEQ. ID NO.:2)
Aβ1-9-C-CRM_{197}	DAEFRHDSG-C (SEQ ID NO:3)
Aβ1-12-C-CRM_{197}	DAEFRHDSGYEV-C (SEQ ID NO:4)
Aβ1-5-L-C-CRM_{197}	DAEFR-GAGA-C (SEQ ID NO.:5)
Aβ 1-7-L-C-CRM_{197}	DAEFRHD-GAGA-C (SEQ ID NO.:6)
Aβ1-9-L-C-CRM_{197}	DAEFRHDSG-GAGA-C (SEQ ID NO.:7)
Aβ1-12-L-C-CRM_{197}	DAEFRHDSGYEV-GAGA-C (SEQ ID NO.:8)
Aβ12-1-C-CRM_{197} (-VE CONTROL)	VEYGSDHRFEAD-C (SEQ ID NO.: 9)

L= linker (GAGA) (SEQ ID NO.:10)

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

EXAMPLE 2

Preparation of Aβ Peptide-CRM_{197} Conjugate and Purification By Ultrafiltration

Bromoacetylation of CRM_{197}

[0158] CRM_{197} (100 mg) in 0.01 M sodium phosphate buffer, 0.9% NaCl, pH 7.0, was reacted with bromoacetic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (dissolved to 20 mg/mL in DMSO) at a 1:1 weight ratio under an argon atmosphere. The reaction was titrated as needed to maintain the pH at 7.0. The mixture was stirred in dark for 1.5 hours at room temperature. The reaction mixture was 1.2μm filtered into the retentate reservoir of a UF/DF system (Millipore Labscale TFF, Billerica, MA). Purification was done using a 10K or 30K UF membrane by diafiltration (30-fold) against 0.01 M sodium phosphate buffer / 0.9% NaCl, pH 7.0. The bromoacetylated CRM_{197} was filtered by passing through a 0.2μm filter. The degree of bromoacetylation was determined by reacting the activated CRM_{197} with cysteine, followed by amino acid analysis and quantitation of the resulting carboxymethylcysteine (CMC).

Conjugation of Aβ Peptide and Bromoacetylated CRM_{197} and Capping with N-Acetylcysteamine

[0159] Bromoacetylated CRM_{197} (50 mg) was transferred to a reaction vessel. To the stirred solution, maintained at 2-8°C, was added 1 M sodium carbonate/bicarbonate. Titration was performed to achieve a target pH of 9.0, under argon atmosphere. Separately, 50 mg of Aβ peptide was weighed out and dissolved in water for injection (WFI) to 20 mg/mL. To this solution was added 1 M sodium carbonate/bicarbonate until pH 9.0 was attained. The peptide solution was added to the bromoacetylated CRM_{197} solution, and the mixture was stirred at 2-8°C for 14-18 hours. The remaining bromoacetyl groups were capped with a 20-fold molar excess of *N*-acetylcysteamine for 3-6 hours at 2-8°C.

[0160] The reaction mixture was filtered through 1.2μm filter into the retentate reservoir of a UF/DF system (Millipore XL), and the conjugate was purified at room temperature by 30-fold diafiltration on a 10K or 30K MWCO membrane (Millipore) by diafiltering against 0.01 M sodium phosphate buffer / 0.9% NaCl, pH 7.0. The retentate was collected and 0.2μm filtered and analyzed for protein content (Lowry or Micro-BCA colorimetric assay), by SDS-PAGE, by amino acid analysis, and for immunogenicity in mice.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

EXAMPLE 3

Conversion by Capping of the Unreacted Bromoacetyl Groups to Aminoacetyl Groups

[0161] Bromoacetylated CRM_{197} (50 mg), prepared as described above in Example 2, was transferred to a reaction vessel. To the stirred solution, maintained at 2-8°C, was added 1M sodium carbonate/bicarbonate. Titration was performed to achieve a target pH of 9.0, under argon atmosphere. Separately, 50 mg of Aβ peptide was weighed out and dissolved in WFI to 20 mg/mL. To this solution was added 1 M sodium carbonate/bicarbonate until pH 9.0 was attained. The peptide solution was added to the bromoacetylated CRM_{197} solution, and the mixture was stirred at 2-8°C for 14-18 hours. The remaining bromoacetyl groups were capped using 8% ammonium bicarbonate solution for 4 hours at 2-8°C.

[0162] The reaction mixture was 1.2μm filtered into the retentate reservoir of a UF/DF system (Millipore XL), and the conjugate was purified at room temperature by 30-fold diafiltration on a 10K or 30K MWCO membrane by diafiltering vs 0.01 M sodium phosphate buffer / 0.9% NaCl, pH 7.0. The retentate was collected and 0.2μm filtered and analyzed for protein content (Lowry or Micro-BCA colorimetric assay), by SDS-PAGE, by amino acid analysis, and for immunogenicity in mice.

EXAMPLE 4

Quantitative Determination of *S*-Carboxymethylcysteine and *S*-Carboxymethylcysteamine as Evaluation of Degree of Conjugation and Capping of Peptide Immunogen-Protein/Polypeptide Conjugates

[0163] Acid hydrolysis of protein-peptide conjugates generated using bromoacetyl activation chemistry resulted in the formation of acid stable S-carboxymethylcysteine (CMC) from the cysteines at the conjugated sites and the formation of acid stable S-carboxymethylcysteamine (CMCA) from the cysteamine at the capped sites (Figure 2). All of the conjugated and capped lysines were converted back to lysine and detected as such. All other amino acids were hydrolyzed back to free amino acids except for tryptophan and cysteine, which were destroyed by the hydrolysis conditions. Asparagine and glutamine were converted to aspartic acid and glutamic acid respectively.

[0164] Conjugate samples were diluted with deionized water to a total protein concentration of less then 1 mg/mL. Two 10 microgram aliquots of each conjugate were dried and resuspended in 100 μL of 6N HCl [Pierce], 5 μL of melted phenol [Sigma-Aldrich], and 1 μL of 2-mercaptoethanol [Sigma-Aldrich]. The samples were then incubated under

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

vacuum (100 mT) at 110 °C for 22 hours. The resulting hydrolysates were dried, resuspended in 250 µL of Beckman Na-S sodium citrate sample dilution buffer (pH 2.2) [Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA], and filtered using Whatman 0.2 µm nylon syringe tip filters and 1mL syringes.

[0165] Each sample was then loaded into a Beckman 6300 amino acid analyzer sample loop and placed in the analyzer. The amino acids of each hydrolyzed sample and control were separated using ion exchange chromatography followed by reaction with Beckman Ninhydrin NinRX solution at 135 °C. The derivatized amino acids were then detected in the visible range at 570 nm and 440 nm (*see* Table 1). A standard set of amino acids [Pierce Amino Acid Standard H] containing 500 picomoles of each amino acid was run along with the samples and controls for each set of analysis. S-carboxymethylcysteine [Sigma-Aldrich] was added to the standard.

Table 1
Retention Times for Amino Acids
Using Gradient Program 1 on the Beckman 6300 Amino Acid Analyzer

Retention Time (min.)	Amino Acid		Wavelength used for Detection
8.3	Carboxymethylcysteine	CMC	570
9.6	Aspartic Acid & Asparagine	Asx	570
11.3	Threonine	Thr	570
12.2	Serine	Ser	570
15.8	Glutamic Acid & Glutamine	Glx	570 & 440
18.5	Proline	Pro	440
21.8	Glycine	Gly	570
23.3	Alanine	Ala	570
29.0	Valine	Val	570
32.8	Methionine	Met	570
35.5	Isoleucine	Ile	570
36.8	Leucine	Leu	570
40.5	Tyrosine	Tyr	570
42.3	Phenylalanine	Phe	570

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Retention Time (min.)	Amino Acid		Wavelength used for Detection
45.4	Carboxymethylcysteamine	CMCA	570
48.8	Histidine	His	570
53.6	Lysine	Lys	570
70.8	Arginine	Arg	570

[0166] The areas of each standard peak were used as a quantitative equivalence for proportional evaluation of each sample. Proline was determined from 440 nm and was converted to an equivalence in 570 nm using Glutamic acid, the closest amino acid.

[0167] Each of these picomole values was converted to a molar ratio of amino acid residues using a comparison of picomoles of lysine to the theoretical lysine value present in the protein. Lysine was chosen for this evaluation based on its covalent attachment to Cysteine and Cysteamine and the expected similar hydrolysis. The resulting numbers of moles of amino acids were then compared to the amino acid composition of the protein and reported along with the values for CMC and CMCA. The CMC value was used directly for evaluation of the degree of conjugation and the CMCA value was used directly for evaluation of the degree of capping.

EXAMPLE 5

Characterization and Optimization of Aβ-CRM_{197} Peptide Conjugates

[0168] To verify conjugation, all peptide-CRM_{197} conjugates were analyzed by amino acid analysis and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF)mass spectrometry. For each conjugate, the moles of peptide conjugated to each mole CRM_{197} was determined by amino acid analysis (number of S-carboxymethylcysteine residues) and MALDI-TOF mass spectrometry. The values determined by each method were generally in agreement.

I. Size exclusion chromatography:

[0169] Batch concentrate samples were removed from storage and allowed to warm to room temperature. The Aβ peptide conjugate sample was gently mixed to insure a homogeneous preparation. The Aβ peptide conjugate sample was spun in an Eppendorf micro-centrifuge to remove any particulates. The supernatant was withdrawn for TosoHaas

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

TSK-Gel G3000SW chromatography (TosoHaas, Stuttgart, Germany). A TosoHaas TSK-Gel G3000SW column was connected to a HPLC system and the pressure limit was set to 1.4 MPa. The column was equilibrated with at least 30 mL of PBS (10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.2 ± 0.1) at a flow rate of 0.75 mL/min. The Aβ peptide conjugate sample was loaded onto the TosoHaas TSK-Gel G3000SW column using the following parameters:

Concentration of Aβ peptide conjugate sample: 1.5 ± 1.0 mg/mL
Flow rate: 0.75 mL/min
Sample Volume: 0.1 mL
Run Time: 30 minutes

[0170] The absorbance was monitored at both 280nm and 210nm. For long term storage, the TosoHaas TSK-Gel G3000SW column was equilibrated with at least 50 mL of 20% ethanol at a flow rate of 0.5 – 1.0 mL/min.

II. PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis):

[0171] The activated (bromoacetylated) CRM_{197} and the Aβ peptide-CRM_{197} conjugates were examined by SDS-Gels using a NuPAGE Bis-Tris Electrophoresis (Novex, Frankfurt, Germany) with a neutral pH, pre-cast polyacrylamide mini-gel system and NuPAGE MES SDS Running Buffer. An 8ug aliquot of each activated CRM or conjugate was mixed with reducing sample buffer and heated at 100°C for 5 minutes. The conjugates and molecular weight (MW) standards (Invitrogen, Carlsbad, CA) were loaded on a 10% (w/v, acrylamide) NuPage gel (Novex) based upon a Bis-Tris-HCl buffered system and run on MES SDS Running Buffer-PAGE (Laemmli). Following SDS-PAGE, the gel was stained with Pierce Gel Code Blue (Pierce, Rockford, IL). Aβ peptide-CRM_{197} conjugate was represented by a major band around 66 kDa, above the band of native CRM and a dimer band around 120 kDa, along with minor multimer bands (data not shown).

III. MALDI-TOF Mass Spectrometry Analysis of Peptide-CRM_{197} Conjugates:

[0172] Mass spectrometry was used for immediate approximation of the degree of conjugation. Suitable aliquots of activated CRM_{197} and conjugate samples were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry using 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-cinnamic acid (sinapinic acid) as the matrix. The molecular weight of activated CRM_{197} determined by MALDI-TOF mass spectrometry (Finnigan MAT Lasermat 2000 Mass Spectrometer, Ringoes, NY) was found to be centered around 60.5kDa and for conjugates varied from 65kDa to 74kDa

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

depending on the degree of conjugation (data not shown). Up to 22 of the lysines (~50%) in CRM_{197} were found to be modified at 1:1 ratio.

IV. Optimization Experiments:

[0173] The degree of activation and conjugation are a function of reagent:protein ratio, temperature of the reaction and pH of the reaction buffer. Some examples are given below to illustrate the optimal conjugation conditions carried out to identify the optimal pH conditions in order to have reproducible process control parameters for conjugation reactions. Results (Figure 3) showed that the conjugation reaction to Aβ 5mer (DAEFRC)(SEQ ID NO:1) as well as Aβ 7mer (DAEFRHDC)(SEQ ID NO:2) is pH dependent and yields a higher degree of modification/conjugation when the pH of the reaction condition is increased. Using the TFA salt of 5mer and 7mer peptides, the degree of conjugation was evaluated at pH 9.0 with varying amounts of peptide load (Figure 4). It is evident from these results that peptide conjugates with a defined number of peptide copies per CRM molecule can be generated by varying the peptide /activated CRM ratio during the conjugation process. Similar experiments were done using acetate salt of Aβ 7mer peptide.

[0174] For the Aβ1-7/CRM conjugation, the capping process was evaluated by comparing the moles of CMCA per CRM to the moles of CMC per CRM. Since the total of the CMC and CMCA was constant for each peptide:CRM ratio tested, the capping process was presumed to be complete (Figure 5). The total modification in the conjugate stayed between 19 and 21, comparable to the number of lysines bromoacetylated (Figure 5). These experiments were done with TFA as the counterion for the peptide. The Aβ1-7/CRM conjugation was repeated using the acetate salt of the peptide rather than the TFA salt, and these data are shown in Figure 5 and 6. The capping process appeared to go to completion, with the total of the CMC and CMCA for each point staying between 20 and 22. The conditions for the Aβ-CRM conjugation reaction have been optimized at pH 9.0, with the degree of conjugation controlled by the peptide to CRM ratio in the reaction. By varying the ratio from 0.1 to 1.5, the degree of conjugation can be varied (Figure 6).

[0175] The degree of activation and conjugation are a function of reagent:protein ratio, temperature of the reaction and pH of the reaction buffer. The degree of modification (conjugation) for each conjugate was calculated by subtracting the mass value of activated CRM_{197} from the mass value of each conjugate and dividing by the mass of the peptide used to prepare the conjugate. The degree of modification (conjugation) for all of the conjugates is described in the Table 2.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0176] The degree of conjugation was also compared to the values determined by the estimated amount of S-carboxymethylcysteine residues formed per mole of CRM_{197} (also shown in Table 2).

Table 2
Degree of Modification: Comparison of MALDI-TOF and AAA Data

Sample	Da (From Mass Spectrometry)	Degree of conjugation (From Mass Spectrometry)	Degree of conjugation (From CMC-Amino Acid Analysis)
CRM_{197}	58,408	—	—
BrAc-CRM	60,752	19	—
Aβ1-7/CRM	74,463	14	15
Aβ1-7/CRM	72,375	12	14
Aβ1-5/CRM	75,425	20	21
Aβ1-5/CRM	71,690	15	18

EXAMPLE 6

Immunogenicity Studies of Aβ Peptide Conjugates

[0177] Peptides spanning N-terminal residues 1-5, 1-7, 1-9, and 1-12 of Aβ (with and without the linker sequence GAGAC) and a peptide corresponding to the N-terminus of Aβ in reverse sequence from amino acid twelve to amino acid one (1-12mer in reverse sequence), each conjugated to CRM_{197}, were used to immunize mice along with an unconjugated Aβ 1-12 mer peptide in a formulation with STIMULON™ QS-21. Each group of mice was immunized subcutaneously with a dose of either 30 μg or 5 μg of one of the samples formulated with 20 μg of the adjuvant STIMULON™ QS-21, at the beginning of the study (week 0) and subsequently at weeks 3 and 6. The study protocol is illustrated in Table 3.

[0178] As shown in Table 3, peptides spanning N-terminal residues 1-5, 1-7, 1-9, and 1-12 of Aβ (with and without the linker sequence GAGAC) and a peptide corresponding to the N-terminus of Aβ in reverse sequence from amino acid twelve to amino acid one (1-12mer in reverse) conjugated to CRM_{197} were used to immunize mice along with unconjugated Aβ 1-12 mer peptide in a formulation with QS-21. Each group of mice was vaccinated subcutaneously with a dose of either 30 μg or 5 μg of one of the samples formulated with 20 μg of the adjuvant QS-21, at the beginning of the study (week 0) and subsequently at weeks 3 and 6. Swiss Webster mice were used for the entire study with 5 mice in each group. Injection volume = 100 μl; B = Bleed; V = vaccinate; E = exsanguinate.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

[0179] Anti-Aβ titers were measured by ELISA against Aβ and CRM_{197} as described below. Briefly, Costar 96 well plates (#3591) were coated overnight at room temperature with 2 μg/mL Aβ1-42 in sterile carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6. Plates were emptied and blocked for two hours at room temperature with 200 μl/well of 0.05% BSA in 1X PBS/0.05% Tween 20. Blocked plates were emptied and washed with a plate washer containing TBS, 0.1% Brij-35 (without azide) wash buffer. All primary antisera were serially diluted with 0.05% BSA in 1X PBS containing 0.05% Tween 20/0.02% Azide and 100 μL of each dilution was then transferred to the appropriate plate wells and incubated at room temperature for 2 hours. Plates were then emptied/washed as described above. Alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody from Southern Biotech (city, state) was diluted 1:1000 with 0.05% BSA in PBS containing 0.05% Tween 20/0.02% Azide and 100 μL was added to each well and incubated at room temperature for 1 hour. Plates were then emptied/washed as described above and finally incubated at room temperature for 1 hour with 100 μL/well of a 1 mg/mL solution of p-nitrophenyl phosphate substrate prepared in diethanolamine/$MgCl_2$, pH 9.8. The color development was stopped with the addition of 50 μL/well of 3 N NaOH. Plates were read at 405 nM with a 690 nM reference. Endpoint titers were calculated at an O.D. of 0.1 AU.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Table 3
Mouse Immunization Study Protocol

Group Code	Description	Dose (μg)	Wk 0	Wk 3	Wk 6	Wk 8	Wk 13	Wk 16
AE488	CRM/1-7 w/o linker	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE489	CRM/1-12 with linker	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE490	CRM/1-9 with linker	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE491	CRM/1-7 with linker	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE492	CRM/1-5 w/o linker	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE493	CRM/1-9 w/o linker	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE494	CRM/1-12 w/o linker	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE495	CRM/1-5 with linker	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE496	CRM/1-7 w/o linker	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE497	CRM/1-12 with linker	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE498	CRM/1-9 with linker	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE499	CRM/1-7 with linker	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE500	CRM/1-5 w/o linker	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE501	CRM/1-9 w/o linker	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Table 3
Mouse Immunization Study Protocol - Continued

Group Code	Description	Dose (μg)	Wk 0	Wk 3	Wk 6	Wk 8	Wk 13	Wk 16
AE502	CRM/1-12 w/o linker	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE503	CRM/1-5 with linker	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE504	CRM_{197} C1-6151	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE505	CRM_{197} C1-6151	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE506	CRM/12-1mer	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE507	CRM/12-1mer	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE508	1-12mer peptide	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE509	1-12mer peptide	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE510	Ab	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE511	Ab	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E

Printed provided by Dugdrive Mark, PLLC - http://www.dugdrive.com

CRM_{197} ELISA

[0180] Greiner 96 well plates (#650011) were coated at 37°C for 90 minutes with 5.0 μg/mL (100 μl/well) of CRM_{197} in sterile carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6. Plates were emptied and washed with a plate washer containing 1X TBS, 0.1% Brij-35 wash buffer. All primary antisera were serially diluted with 1X PBS containing 0.3% Tween 20/EDTA and 100 μL of each dilution was then transferred to the appropriate plate wells and incubated at 37°C for 1 hour. The plates were then emptied/washed as described above. Alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody from Southern Biotech was diluted 1:1000 with 1X PBS containing 0.05% Tween 20/0.02% Azide and 100 μL was added to each well and incubated at 37°C for 1 hour. Plates were then emptied/washed as described above and finally incubated at room temperature for 1 hour with 100 μL/well of a 1 mg/mL solution of p-nitrophenyl phosphate substrate prepared in diethanolamine/$MgCl_2$, pH 9.8. The development was stopped with the addition of 50 μL/well of 3 N NaOH. Plates were read at 405 nM with a 690 nM reference. Endpoint titers were calculated at an O.D. of 0.1 AU.

[0181] Tables 4-6 illustrate end point ELISA titers against Aβ. Following primary immunization, all eight conjugates (excluding the negative control) induced measurable anti-Aβ IgG immune responses. However, the 30μg dose, but not the 5μg dose, of Aβ gave a positive response at week 3 following primary immunization. Among all the conjugates, it appears that Aβ 1-7 peptide conjugated without linker elicited as good as or better response than other conjugates studied. At 5μg dose, Aβ 1-5C did better at weeks 8-16. Aβ 1-7C was best at 30μg dose. Analysis of antibody titers after second and third immunization with either 5 or 30μg dose indicate that the maximal immune response to Aβ for most of the conjugates was seen after the second immunization. At least in mice, the third immunization did not appear to enhance the immune response. Aβ peptide however, needed three immunizations with the 30μg dose to reach maximal immune response against the peptide (Table 5). In terms of antibody decay over an extended period of time, the antibody level from the groups immunized with conjugates was reduced by 2 to 3 fold as compared to the highest level within that group. Individual samples from weeks 6 and 8 were analyzed to calculate GMTs against Aβ for each of the group (Table 6) to see if any conjugate group was substantially better than the others. Statistical analysis of week 6 titers from Aβ1-5C, Aβ 1-7C and Aβ 1-9C conjugates indicated that the Aβ 1-7 conjugate induced a significantly higher titer. It is also evident from this experiment that the linker sequence GAGAC did not contribute to enhancing the immune response to the peptide.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Table 4

Group		Week 3	Week 6	Week 8	Week 13	Week 16
1-5C	<100	14,960	687,691	882,012	625,208	771,828
1-7C	<100	51,253	1,280,181	860,463	520,060	571,043
1-9C	<100	18,615	1,008,872	622,325	348,967	380,755
1-12C	<100	615	132,009	390,624	166,162	184,170
1-5LC	<100	4,999	458,075	454,631	237,573	220,091
1-7LC	<100	17,693	849,170	842,402	446,089	400,536
1-9LC	<100	18,544	1,465,115	1,180,347	571,127	579,477
1-12LC	<100	12,664	908,360	598,867	368,101	316,075
CRM_{197}	<100	<100	<100	<100	<100	<100
1-42	<100	<100	<100	<100	<100	<100
1-12	<100	<100	<100	<100	<100	<100
12-1C	<100	<100	<100	<100	<100	<100

Table 4. Weeks 0, 3, 6, 8, 13, and 16 ELISA endpoint titers against Aβ using antiserum from 5 μg dose of peptide conjugates spanning varying lengths of the N-terminus of Amyloid Aβ peptide, Ref: Elan hyperimmune polyclonal #592 = 3,073,307. Endpoint at O.D. 0.1 AU. Swiss Webster mice were immunized SC-N with 5 μg of above antigens formulated with 20 μg STIMULON™ QS-21 at weeks 0, 3, and 6.

Table 5

Group	Week 0	Week 3	Week 6	Week 8	Week 13	Week 16
1-5C	<100	18,150	590,355	332,832	204,645	176,159
1-7C	<100	100,672	1,840,741	647,470	592,638	779,072
1-9C	<100	18,520	1,184,696	713,494	363,459	327,065
1-12C	<100	7,837	1,325,725	1,126,389	681,268	577,604
1-5LC	<100	16,347	469,191	184,077	177,358	164,680
1-7LC	<100	47,866	971,229	462,200	463,466	529,726
1-9LC	<100	59,002	921,544	787,273	405,023	500,468
1-12LC	<100	27,348	697,150	483,320	284,800	397,816
CRM_{197}	<100	<100	<100	<100	<100	<100
1-42	<100	160	3,327	109,718	48,646	27,901
1-12	<100	<100	<100	<100	<100	<100
12-1C	<100	<100	<100	<100	<100	<100

Table 5. Weeks 0, 3, 6, 8, 13, and 16 ELISA endpoint titers against Aβ using antiserum from 30 μg dose of peptide conjugates spanning varying lengths of the N-terminus of Amyloid Aβ peptide. Ref: Elan hyperimmune polyclonal #592 = 3,073,307. Endpoint at O.D. 0.1 AU. Swiss Webster mice were immunized SC-N with 30 μg of above antigens formulated with 20 μg STIMULON™ QS-21 at weeks 0, 3, and 6.

Patent provided by Registrar Blue, PLLC - http://www.registrarblue.com

Table 6

Group	Week 6	Week 8
1-5C	237,668 [a]	161,671 [b]
1-7C	1,866,702 [a]	881,146 [b]
1-9C	963,323 [a]	595,414 [b]
1-12C	940,260	955,470
1-5LC	395,553	141,084
1-7LC	516,921	394,521
1-9LC	826,773	562,458
1-12LC	544,768	376,952
1-42	365	4,565

Table 6. Weeks 6 and 8 ELISA endpoint GMTs against Aβ using antisera from 30 μg dose of peptide conjugates spanning varying lengths of the N-terminus of Amyloid-Aβ. Ref: Elan Hyperimmune Polyclonal #592 = 3,073,307. Endpoint at O.D. 0.1 AU. Swiss Webster mice were immunized SC-N with 30 μg of above antigens formulated with 20 μg STIMULON™ QS-21 at weeks 0, 3, and 6

a. Statistical analysis of week 6 titers from 1-5C, 1-7C, and 1-9C using Tukey-Kramer show a statistical difference between 1-5C vs 1-7C only, whereas, analysis using Student's T-test shows a statistical difference between 1-5C vs 1-7C and 1-5C vs 1-9C.

b. Statistical analysis of week 8 titers from 1-5C, 1-7C, and 1-9C does not show a statistical difference among the three groups. However, there appears to be a trend that may indicate a difference between 1-5C vs 1-7C.

PDAPP Mouse Brain Tissue Staining

[0182] The PDAPP brain tissue staining assay provides an indication of the functionality of the Aβ peptide conjugates and/or Aβ 1-42 antiserum. Serum samples from individual mouse groups were separately analyzed for their ability to recognize PDAPP mouse brain tissue plaques containing amyloid peptide. The results are shown in Table 7A and 7B. With the exception of the Aβ 5mer conjugate antisera, there was a dose-related response in recognizing the plaques. Independent of the linker, 30μg conjugate-induced antisera had better reactivity patterns as compared to that of 5μg conjugate antisera. However, with the Aβ 5mer conjugate antisera, there seems be similar or better reactivity for the 5μg group. Comparing all these results, it is concluded that conjugates made from Aβ 1-5 mer through Aβ 1-9 mer are sufficient in eliciting plaques recognizing immune response in mice and the presence of linker is not essential. The following conclusions can be drawn from this study: (a) All of

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

the peptide conjugates induced high titered antiserum against the carrier protein CRM_{197} to equal or slightly higher levels as compared to the unconjugated CRM_{197} control (not shown). (b) The conjugates with the GAGAC linker did not enhance immunogenicity or functionality compared to conjugates without the linker. (c) The immunogenicity data and PDAPP brain tissue staining (an initial indication of functional antibody) show that the Aβ 1-5mer and Aβ 1-7mer conjugates appeared to be the preferred immunogens for further development.

Table 7A. PDAPP mouse brain tissue staining.

5 µg Dose					
Without Linker			With Linker		
Vaccine	Animal #	PDAPP Staining	Vaccine	Animal #	PDAPP Staining
CRM/ Aβ 1-5	1	+(no diffuse)	CRM/ Aβ 1-5	1	-
	2	++/+++		2	-
	3	++/+++		3	±
	4	++		4	±
	5	++		5	±
CRM/ Aβ 1-7	1	++	CRM/ Aβ 1-7	1	+
	2	++		2	++
	3	++		3	++
	4	++		4	+
	5	++		5	++
CRM/ Aβ 1-9	1	+	CRM/ Aβ 1-9	1	++
	2	+/++		2	++
	3.	±		3	+
	4	±		4	+
	5	±		5	+
CRM/ Aβ 1-12	1	-	CRM/ Aβ 1-12	1	+
	2	?		2	+
	3	±		3	++
	4	-		4	-
	5	±		5	±
CRM/ Aβ 12-1mer	1	-	Aβ42	1	-
	2	-		2	-
	3	±		3	-
	4	-		4	-
	5	±		5	-

All antiserum diluted 1:1000 for staining procedure.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Table 7B. PDAPP mouse brain tissue staining.

30 µg Dose					
Without Linker			With Linker		
Vaccine	Animal #	PDAPP Staining	Vaccine	Animal #	PDAPP Staining
CRM/ Aβ 1-5	1	-	CRM/ Aβ 1-5	1	+
	2	+/++		2	-
	3	-		3	-
	4	±		4	±
	5	++		5	-
CRM/ Aβ 1-7	1	+/++	CRM/ Aβ 1-7	1	+
	2	++		2	±/+
	3	++		3	+/++
	4	++		4	±/+
	5	++/+++		5	+/++
CRM/ Aβ 1-9	1	++/+++	CRM/ Aβ 1-9	1	+/++
	2	++		2	++
	3	++		3	++
	4	+		4	±
	5	+		5	+/++
CRM/ Aβ 1-12	1	-	CRM/ Aβ 1-12	1	+/++
	2	+/++		2	+
	3	+/++		3	-
	4	±		4	+/++
	5	±		5	+
CRM/ Aβ 12-1mer	1	-	Aβ 42	1	±
	2	-		2	-
	3	-		3	-
	4	-		4	-
	5	-		5	-

All antiserum diluted 1:1000 for staining procedure.

EXAMPLE 7

Immunogenicity Studies in Monkeys

[0183] Groups of 6 monkeys received 30 ug of 7mer conjugate (total conjugate) adjuvanted with either STIMULON™ QS-21, alum or RC529 SE formulation at days 0, 29 and 58. Additional groups included were 30 ug 5mer conjugate with either alum ($Al(OH)_3$) or RC529 SE, 75 and 300µg of Aβ with STIMULON™ QS-21 as positive controls. Positive controls were immunized every two weeks. At day 36 and 64 the anti-Aβ antibody titers were determined (Figures 7 - 9). On day 36, 7mer/CRM conjugates with STIMULON™ QS-21,

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Alum and RC529 SE elicited GMT titers of 10110, 13330 and 17090 respectively (Figure 7). In contrast, Aβ 1-42 plus STIMULON™ QS-21 elicited GMTs of 223 and 1734 at 75 and 300μg dose levels, respectively. The Aβ 5mer conjugate elicited a titer of 2134 with alum and 15980 with RC529 SE. On day 64, i.e. after 3 doses of conjugates with either STIMULON™ QS21 or RC-529 SE induced substantially higher titers than post second dose (GMTs 69910 for 7 mer/RC-529 SE; 21640 for Aβ 5mer/RC-529 SE and 30310 for Aβ 7mer/STIMULON™ QS-21) (Figure 8). Conjugates with alum elicited reduced titers at post third immunization compared to post second immunization. It appears that the Aβ 7mer conjugate elicited a better response as compared to the Aβ 5mer conjugate. In monkeys, adjuvanting Aβ 7mer conjugate with RC-529 SE or STIMULON™ QS-21 elicited the highest response (Figure 9). The response to the Aβ 7mer conjugate with alum was moderate and similar to that of 300ng Aβ 1-42 with STIMULON™ QS-21.

[0184] Several conclusions can be drawn from the current example. First, both conjugates are very immunogenic in primate species. Second, the presence of adjuvants in the immunization formulation significantly influences the immune response. Third, except for the aluminum adjuvant, RC-529 SE and STIMULON™ QS-21 enhance the immune response after each dose of immunization at least up to three doses (Figures 9). Overall, Aβ 7mer conjugate induced higher antibody response in the presence of 529, followed by STIMULON™ QS-21 (see Figure 9).

EXAMPLE 8

Preparation of Multiple Antigenic Peptide (MAP) Conjugates and their Immunogenicity Study

[0185] Several methods are available for generating multiple antigenic sites on the carriers. In the previous examples, each antigenic site is separately conjugated to the carrier by defined conjugation and capping chemistries. In this example, multiple antigenic sites are constructed by solid phase synthesis of tandem repeats of Aβ1-7 mer. Alternatively these tandem repeats can be coupled with T-cell epitopes with or without linking through a lysine core as described elsewhere. These multiple antigenic peptides were synthesized with an additional cysteinyl residue for conjugation to the carrier protein. Peptides containing one repeat unit (1-7), three repeat units $(1\text{-}7)_3$ and five repeat units $(1\text{-}7)_5$ with an additional cysteinyl residue at the carboxyl end were synthesized. These peptides were covalently attached to bromoacetylated CRM overnight through their C-terminal cysteine residues. The reaction was carried out at pH 9.0-9.2 with peptide:CRM ratios added as outlined in Table 8.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Bromoacetyl groups, which did not react with peptide, were capped with N-acetylcysteamine. These lots represent conjugates containing one single copy, three tandem copies, and five tandem copies of the Aβ1-7 peptide conjugated to CRM, respectively. Table 8 briefly outlines the properties of the samples.

Table 8
Multiple Antigenic Peptide (MAP) Conjugate Samples

Conjugate	Peptide: CRM (w/w)	pH of reaction
$Ab(1-7)_1$/CRM	0.37	8.99
$Ab(1-7)_3$/CRM	1.02	8.95
$Ab(1-7)_5$/CRM	1.67	9.17

[0186] Peptide load (the average number of Aβ 1-7 peptides per carrier) and capping numbers (Table 9) are the numbers of unique amino acids (CMC or CMCA) per carrier as determined by amino acid analysis. The CMC and CMCA values were referenced to lysine.

Table 9
Degree of Conjugation and Capping of Each Conjugate

CONJUGATE	Peptide Load (CMC)	Capping (CMCA)
$A\beta(1-7)_1$/CRM	12.5	11.7
$A\beta(1-7)_3$/CRM	10.4	15.2
$A\beta(1-7)_5$/CRM	9.8	15.9

[0187] Swiss-Webster mice (10 per group) were immunized subcutaneously with 1 or 0.1 μg Aβ/CRM conjugated peptide. Half of the mice were immunized with the composition formulated with 100 μg of the adjuvant $Al(OH)_3$, and half were immunized without adjuvant. Immunizations were scheduled at weeks 0 and 3. Bleeds were scheduled for weeks 0, 3, and 6. Serum samples were analyzed for antibody response against Aβ1-42 mer peptide. The results are shown in Table 10:

Patent provided by Saghrue Mion, PLLC - http://www.saghrue.com

Table 10

Anti-Aβ Endpoint Titers for Multiple Antigenic Peptide (MAP) Conjugates

Group Code	Sample Description	Adjuvant	Wk 0 Pool	Wk 3 GMT	Wk 6 GMT
AG332	1 μg Aβ $(1\text{-}7)_1$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	18,096	100,279
AG333	1 μg Aβ $(1\text{-}7)_3$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	44,911	420,235
AG334	1 μg Aβ $(1\text{-}7)_5$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	27,032	394,488
AG335	0.1 μg Aβ $(1\text{-}7)_1$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	19,350	66,834
AG336	0.1 μbg Aβ $(1\text{-}7)_3$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	13,307	208,272
AG337	0.1 μg Aβ $(1\text{-}7)_5$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	1,196	22,665
AG338	1 μg Aβ $(1\text{-}7)_1$/CRM	None	<100	5,273	370,980
AG339	1 μg Aβ $(1\text{-}7)_3$/CRM	None	<100	9,299	541,093
AG340	1 μg Aβ $(1\text{-}7)_5$/CRM	None	<100	3,100	185,272
AG341	0.1 μg Aβ $(1\text{-}7)_1$/CRM	None	<100	340	25,839
AG342	0.1 μg Aβ $(1\text{-}7)_3$/CRM	None	<100	128	5,553
AG343	0.1 μg Aβ $(1\text{-}7)_5$/CRM	None	<100	668	2,098

[0188] All conjugates induced anti-Aβ 1-42 antibody titer after primary immunization and the levels were substantially increased after the booster dose. In the absence of aluminum adjuvant, the differences in dose response were evident both at week 3 and week 6 bleeds. The higher dose elicited high-titered antibody response. Aluminum adjuvant elicited substantially higher antibody response at week 3 at both dose levels (0.1 and 1 μg) as compared to the unadjuvanted groups. After secondary immunization, conjugates given at 1 μg dose elicited 5 to 10 fold increase in antibody levels. At this dose level peptide conjugates with 3 and 5 repeats induced higher antibody response than a single repeat containing conjugate. The titers against the CRM carrier were also determined, and these are listed in Table 11.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Table 11
Anti-CRM Endpoint Titers for Multiple Antigenic Peptide (MAP) Conjugates

Group Code	Sample Description	Adjuvant	Wk 0 Pool	Wk 3 GMT	Wk 6 GMT
AG332	1 μg $A\beta(1\text{-}7)_1$/CRM	$Al(OH)_3$	<50	10,531	114,602
AG333	1 μg $A\beta(1\text{-}7)_3$/CRM	$Al(OH)_3$	<50	4,274	83,065
AG334	1 μg $A\beta(1\text{-}7)_5$/CRM	$Al(OH)_3$	<50	1,680	49,320
AG335	0.1 μg $A\beta(1\text{-}7)_1$/CRM	$Al(OH)_3$	<50	1,114	13,231
AG336	0.1 μg $A\beta(1\text{-}7)_3$/CRM	$Al(OH)_3$	<50	197	1,484
AG337	0.1 μg $A\beta(1\text{-}7)_5$/CRM	$Al(OH)_3$	<50	65	222
AG338	1 μg $A\beta(1\text{-}7)_1$/CRM	None	<50	35	309
AG339	1 μg $A\beta(1\text{-}7)_3$/CRM	None	<50	29	1,085
AG340	1 μg $A\beta(1\text{-}7)_5$/CRM	None	<50	29	542
AG341	0.1 μg $A\beta(1\text{-}7)_1$/CRM	None	<50	25	55
AG342	0.1 μg $A\beta(1\text{-}7)_3$/CRM	None	<50	25	34
AG343	0.1 μg $A\beta(1\text{-}7)_5$/CRM	None	<50	29	ND

Animals were immunized at weeks 0 and 3 and bled at weeks 0, 3, and 6. Adjuvant: 100 μg $Al(OH)_3$ or none. ND=Not Determined.

[0189] Data in Table 11 indicates that the unadjuvanted groups induced very low levels of anti-CRM antibody response at both 1μg as well as 0.1μg dose levels even after two immunizations. However conjugates with aluminum hydroxide adjuvant induced substantial levels of anti-CRM antibody response at 1μg dose and much lower response at 0.1μg dose. In the presence of the adjuvant, CRM titers were highest for the single repeat conjugate, intermediate for the triple repeat conjugate, and lowest for the quintuple repeat conjugate. This is as expected, since the CRM dose per peptide dose is lowest for $A\beta(1\text{-}7)_5$/CRM, and highest for $A\beta(1\text{-}7)_1$/CRM. The differences were only statistically significant at week 6 for the 0.1μ μg dose.

[0190] The objective of the current invention is to elicit high titered immunogenic response against the antigenic hapten and not necessarily against the carrier protein. Under certain

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

circumstances it is desirable to elicit optimal immune response against the hapten antigenic determinant with least or no immune response against the carrier protein. For such applications, conjugates with tandem repeats of multiple antigenic determinants with unadjuvanted formulation will serve the need.

EXAMPLE 9

Preparation of Aβ-Peptide Conjugates with Various Carrier Proteins and their Immunogenicity

[0191] This example compares the immunogenicity of conjugates using six different carrier proteins. The acetate salt of Aβ1-7 was added to bromoacetylated carriers in a 1:1 ratio by weight at pH 9. All conjugates except Aβ1-7/rC5ap were capped with N-acetylcysteamine. All of the alternative carriers are recombinant bacterial proteins, including CRM (diphtheria toxoid), recombinant C5a peptidase (rC5ap; cloned from *Streptococcus agalactiae*, includes D130A and S512A mutations), ORFs 1224, 1664, 2452 (all cloned from *Streptococcus pyogenes*), and T367, T858 (each cloned from *Chlamydia pneumoniae*). A summary of the carriers used is found in Table 12. The degree of conjugation and capping of each Aβ 1-7 conjugate to these carriers are presented in Table 13.

[0192] This study showed that the recombinant C5a peptidase conjugate induced higher titers against Aβ than most of the other carriers tested, including CRM. This difference was statistically significant for week 6 titers of groups that received aluminum hydroxide. In addition, the Aβ1-7/T858 conjugate was significantly more immunogenic than most other conjugates in the absence of adjuvant. The only conjugate that performed poorly relative to the CRM control conjugate was Aβ1-7/T367, a conjugate that also did not react with an Aβ specific monoclonal antibody by Western blot. This study confirms that numerous other carriers can be successfully used to immunize against the Aβ peptide.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Table 12

List of Carriers and Conjugate Properties

CARRIER PROTEIN	MW of carrier (Da)	# of lysines
CRM	58, 408	39
rC5ap	108, 560	85
ORF1224	30, 950	18
ORF1664	31, 270	38
ORF2452	31, 790	29
T367	49, 700	29
T858	37, 190	23

Table 13

Degree Of Conjugation and Capping of Each Conjugate

CONJUGATE	Peptide load (CMC).	Capping (CMCA)
Aβ1-7/rC5ap	25.9	-
Aβ1-7/ORF1224	12.8	5.7
Aβ1-7/ORF1664	13.4	10.8
Aβ1-7/ORF2452	12.03	10.5
Aβ1-7/T367	13.2	8.2
Aβ1-7/T858	5.2	1.7

Conjugation results: Peptide load (the average number of Aβ1-7 peptides per carrier) and capping number are the numbers of unique amino acids (CMC or CMCA) per carrier as determined by amino acid analysis. The CMC and CMCA values were referenced to lysine.

Immunization Results

[0193] The geometric mean titer for each group in this study is listed in Table 14. At week 3, regardless of the presence of adjuvant, Aβ1-7/rC5ap induced significantly higher anti-Aβ titers than the corresponding conjugates prepared with *Streptococcus pyogenes* ORFs 1224, 1664, 2452, or *Chlamydia pneumoniae* ORFs T367 and T858. At week 3 in the absence of

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

adjuvant, Aβ1-7/rC5ap was also more immunogenic than all other conjugates except Aβ1-7/T858. The T858 conjugate without $Al(OH)_3$ induced higher titers than the ORF1224, ORF1664, ORF2452, and CRM conjugates without adjuvant. The only conjugate that was significantly less immunogenic than Aβ1-7/CRM was Aβ1-7/T367 ($p < 0.00002$). The T367 carrier performed poorly with or without adjuvant at both weeks 3 and 6. At week 6, the rC5ap conjugate with aluminum hydroxide was more immunogenic ($p<0.04$) than all the other conjugates except Aβ 1-7/ORF2452. In the absence of adjuvant, both Aβ1-7/rC5ap and Aβ1-7/T858 induced significantly higher titers than the ORF1224, ORF1664, or T367 conjugates. Aβ1-7/CRM without aluminum hydroxide induced higher titers than either Aβ1-7/ORF1664 or Aβ1-7/T367.

TABLE 14

Anti-Aβ1-42 Endpoint Titers.

GROUP CODE	SAMPLE DESCRIPTION	ADJUVANT	WK 0 POOL	WK 3 GMT	WK 6 GMT
AG344	5 μg Aβ1-7/CRM	$Al(OH)_3$	<100	21,404	54,157
AG345	5 μg Aβ1-7/rC5ap	$Al(OH)_3$	<100	61,967	402,972
AG346	5 μg Aβ1-7/ORF1224	$Al(OH)_3$	<100	10,711	30,084
AG347	5 μg Aβ1-7/ORF1664	$Al(OH)_3$	<100	7,188	43,226
AG348	5 μg Aβ1-7/ORF2452	$Al(OH)_3$	<100	11,437	109,091
AG349	5 μg Aβ1-7/T367	$Al(OH)_3$	<100	321	5,139
AG350	5 μg Aβ1-7/T858	$Al(OH)_3$	<100	16,656	33,328
AG351	5 μg Aβ1-7/CRM	None	<100	2,615	119,488
AG352	5 μg Aβ1-7/rC5ap	None	<100	11,858	279,113
AG353	5 μg Aβ1-7/ORF1224	None	<100	1,674	18,719
AG354	5 μg Aβ1-7/ORF1664	None	<100	119	9,832
AG355	5 μg Aβ1-7/ORF2452	None	<100	2,493	76,038
AG356	5 μg Aβ1-7/T367	None	<100	50	620
AG357	5 μg Aβ1-7/T858	None	<100	28,820	275,202

Animals were immunized at weeks 0 and 3 and bled at weeks 0, 3, and 6. Dose is based on the total amount of conjugate. Adjuvant: 100 μg $Al(OH)_3$ or none.

EXAMPLE 10

Preparation of Additional Aβ Peptide-Protein Conjugates

I. Activation

[0194] Thawed CRM_{197} (8 mL, 59.84 mg, at 7.48mg/mL) was dissolved in 0.1 M borate buffer (pH 9, 3.968 mL) to bring the concentration to 5 mg/mL. The solution was cooled in

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

an ice bath to 0-5°C. Bromoacetic acid N-hydroxysuccinimide (59.9mg) (Aldrich-Sigma) was dissolved in DMF (100 µL) (Aldrich-Sigma) and added dropwise, to the solution of CRM_{197}. Upon addition of the bromoacetic acid N-hydroxysuccinimide, a precipitate was observed. When the pH was checked, it decreased to pH 6. The pH of the reaction mixture was brought back to pH 9 by adding more 0.1 M borate buffer. Reaction mixture was then stirred at 4°C for 1 hr, with gentle swirling. The mixture was purified and concentrated using YM-10 centriprep centrifugal concentration and repurified on Sephadex G-25 using 10 mM borate as the eluent. Fractions positive to Bradford Reagent were pooled and concentrated using centriprep YM-10. The degree of bromoacetylation was determined by Bradford assay (linear). The concentration was found to be 5.36 mg/mL (Yielded 30mg). The final concentration was then adjusted to be 5 mg/mL and was stored in the freezer in 5% sucrose until further use.

II. Conjugation

[0195] For each conjugation, thawed bromoacetylated CRM_{197} was used. Peptides were dissolved in borate buffer (2.5mg in 125 ml of 0.1 M borate buffer). Slight insolubility was observed with Aβ peptides KLVFFAEDC (SEQ ID NO:45), CLVFFAEDV (SEQ ID NO:47), CKLVFFAED (SEQ ID NO:48), and LVFFAEDC (SEQ ID NO:50). Bromoacetylated CRM_{197} (5mg/mL) was treated with the peptide solutions/suspensions. The ratio of the peptide and protein in the mixture was 1:2. Turbidity was observed in the conjugate mixtures with peptides KLVFFAEDC (SEQ ID NO:45), CLVFFAEDV (SEQ ID NO:47), CKLVFFAED (SEQ ID NO:48), and KLVFFAEDC (SEQ ID NO:45). The mixtures were then checked for pH (pH 9) and incubated at 4°C overnight with slow swirling. Final concentrations of the mixtures were made to 3 mg/mL before incubation. The turbidity of the conjugate mixtures with peptides CLVFFAEDV (SEQ ID NO:47) and LVFFAEDC (SEQ ID NO:50) disappeared after incubation. However, KLVFFAEDC (SEQ ID NO:45) and CKLVFFAED (SEQ ID NO:48) were still slightly turbid. Soluble mock protein conjugate was also prepared with cysteamine at a ratio of 1: 1 (w/w). Synthesized peptides were obtained from BIOSOURCE with about 95% purity.

Octamers:

LVFFAEDVC (SEQ ID NO:44)

KLVFFAEDC (SEQ ID NO:45)

VFFAEDVGC (SEQ ID NO:43)

CLVFFAEDV (SEQ ID NO:47)

CKLVFFAED (SEQ ID NO:48)

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

CVFFAEDVG (SEQ ID NO:46)

Heptamers:

VFFAEDVC (SEQ ID NO:49)

LVFFAEDC (SEQ ID NO:50)

III. Capping Unreacted Lysine Groups on Protein:

[0196] The unreacted lysines were capped with N-acetylcysteamine (CMCA; Aldrich-Sigma) at a ratio of 1/1 (w/w) for 4 hr at 4°C while swirling in the dark. The unreacted peptides and capping reagents were removed from the conjugates by dialysis using Slide-A-Lyzer cassette (M_w cut off 10,000) (Pierce) against PBS buffer (2 L) overnight (13 hr). Buffer exchange and dialysis was done twice (2 x 14 hr). Slight insolubility was observed in the conjugates with peptides KLVFFAEDC (SEQ ID NO:45) and CKLVFFAED (SEQ ID NO:48). All conjugates were then stored in the refrigerator at 4°C in a perservative.

IV. Characterization of the Protein Carrier:

[0197] MALDI-TOF MS was used to determine the mass of bromoacetylated CRM_{197} and the mass of the mock conjugate N-acetylcysteamine-CRM_{197}.

Based on the masses of the CRM_{197} and bromoacetylated CRM_{197}, 11 lysine residues were modified.

(59941.46- 58590.29)/122 = 11

Where; Mw of CRM_{197} is 58624.29

Mw of bromoacetylated CRM_{197} is 59941.46

Mw of bromoacetate is 122

[0198] The degree of bromoacetylation was more than 28%. (The total number of lysines in CRM_{197} was 39). From these 11 modified lysine residues, 10 were coupled with cysteamine. The coupling efficiency was 90%.

(61143- 59941)/119 = 10

Where; Mw of bromoacetylated CRM_{197} is 59941.46

Mw of mock conjugate is 61143

Mw of the N-acetylcysteamine is 119

(10/11) x 100 = 90

V. Characterization of the Peptide-Protein Conjugates by SDS-PAGE Western Blot Analysis with Tris-Tricine Precast Gel:

[0199] The protein-peptide conjugates were analyzed by Western blot. The lanes are: marker (lane 1); L-28375 24/01 (lane 2); L-28375 24/02 (lane 3); L-28375 24/03 (lane 4); L-28375 24/04 (lane 5); L-28375 24/05 (lane 6); L-28375 24/06 (lane 7) L-28375 24/07 (lane 8); L-

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

28375 24/08 (lane 9); L-28375 24/09 (Mock) (lane 10); and, BrAcCRM$_{197}$ (lane 11). A peptide specific monoclonal antibody from mice (248 – 6H9 – 806 Aβ 17-28) was used as the primary antibody (antisera) (1:3000 dilution was found to be the best). Goat-Anti mouse IgG (H+L)-HPR was the secondary antibody (1:1000 dilution). It was observed that all the conjugates were recognized by the primary antibody, except for the mock conjugate and the activated CRM$_{197}$. (*See* Figure 10.)

Protein Concentration

[0200] Protein concentrations of the conjugate samples were determined by the Pierce BCA assay. (*See* Table 15.)

Amino Acid Analysis

[0201] Amino acid analysis was carried out to determine the degree of conjugation. T degree of conjugation was calculated based on the CMCA (carboxymethylcysteamine) residues found in the conjugates. CMCA was used to cap the unreacted activated sites after conjugation with the peptides. (*See* Table 15.)

Table 15

Degree of Conjugation of Peptides with BrAcCRM$_{197}$

Conjugate Code	Peptide Sequence (SEQ ID NO:)	Final Concentration (mg/mL)	Degree of Conjugation (Based on CMCA)
L-28375 24/01	LVFFAEDV-C (SEQ ID NO:44)	1.67	8/10
L-28375 24/02	KLVFFAED-C (SEQ ID NO:45)	0.82	5/10
L-28375 24/03	VFFAEDVG-C (SEQ ID NO:43)	1.43	8/10
L-28375 24/04	C-LVFFAEDV (SEQ ID NO:47)	1.04	9/10
L-28375 24/05	C-KLVFFAED (SEQ ID NO:48)	0.78	1/10
L-28375 24/06	C-VFFAEDVG (SEQ ID NO:46)	0.97	9/10
L-28375 24/07	VFFAEDV-C (SEQ ID NO:49)	1.00	7/10

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Conjugate Code	Peptide Sequence (SEQ ID NO:)	Final Concentration (mg/mL)	Degree of Conjugation (Based on CMCA)
L-28375 24/08	LVFFAED-C (SEQ ID NO:50)	0.99	8/10
L-28375 24/09 (Mock)		1.89	10/11

[0202] All colorimetric assays were performed using microplate spectrophotometer and SOFTmax Pro.

EXAMPLE 11

Immunogenic Studies of Aβ Peptide Conjugates in Swiss Webster Mice

[0203] Outbred Swiss Webster mice were immunized with VFFAEDVG-C (SEQ ID NO:43), LVFFAEDV-C (SEQ ID NO:44), KLVFFAED-C (SEQ ID NO:45), C-VFFAEDVG (SEQ ID NO:46), C-LVFFAEDV (SEQ ID NO:47), C-KLVFFAED (SEQ ID NO:48), VFFAEDV-C (SEQ ID NO:49), LVFFAED-C (SEQ ID NO:50) each conjugated to CRM_{197}, or with Aβ1–7CRM_{197}, all formulated with the adjuvant RC 529 SE. Nine groups of 10 animals per group were immunized subcutaneously with one of the Aβ peptide conjugates at the beginning of the study (week 0) and subsequently at week 4. Serum was collected prior to, but on the same days as immunization.

Immunogenic Studies of Aβ Peptide Conjugates in Inbred Balb/c Mice

[0204] Inbred Balb/c mice were immunized as in the preceding paragraph, but were also boosted with conjugate and adjuvant at week 12.

Results

[0205] Sera from both studies are being collected for analysis of $Aβ_{13-28}$ peptide-specific IgG antibody titer. Sera from Balb/c mice are also collected for analysis one day prior to the week 12 boost, and one week thereafter. Spleen cells from animals used in Example 11 are evaluated for their potential to respond *in-vitro* to stimulation with an overlapping pool of peptides spanning $Aβ_{1-42}$, full length $Aβ_{1-42}$, CRM_{197}, or polyclonal activators. Analysis is comprised of Elispot readout for interleukins 4 and 5, and interferon-gamma. Upon completion, the Aβ peptide conjugates are be evaluated as described above and as described in Example 6.

EXAMPLE 12

Immunogenic Studies of Aβ Peptide Conjugates in PSAPP Mice

Patent provided by Seghrue Mins, PLLC - http://www.seghrue.com

[0206] PSAPP mice are immunized with VFFAEDVG-C (SEQ ID NO:43), LVFFAEDV-C (SEQ ID NO:44), KLVFFAED-C (SEQ ID NO:45), C-VFFAEDVG (SEQ ID NO:46), C-LVFFAEDV (SEQ ID NO:47), C-KLVFFAED (SEQ ID NO:48), VFFAEDV-C (SEQ ID NO:49), LVFFAED-C (SEQ ID NO:50). The PSAPP mouse, a doubly transgenic mouse (PSAPP) overexpressing mutant APP and PS1 transgenes, is described in Holcomb, *et al.* (1998) *Nature Medicine* 4:97-11.

Immunogenic Studies of Aβ Peptide Conjugates in PDAPP Mice

[0207] PDAPP mice are immunized with VFFAEDVG-C (SEQ ID NO:43), LVFFAEDV-C (SEQ ID NO:44), KLVFFAED-C (SEQ ID NO:45), C-VFFAEDVG (SEQ ID NO:46), C-LVFFAEDV (SEQ ID NO:47), C-KLVFFAED (SEQ ID NO:48), VFFAEDV-C (SEQ ID NO:49), LVFFAED-C (SEQ ID NO:50) The PDAPP mouse expresses a mutant form of human APP (APP^{V717F}) and develops Alzheimer's disease at a young age (Bard, *et al.* (2000) *Nature Medicine* 6:916-919; Masliah E, *et al.* (1996) *J Neurosci.* 15;16(18):5795-811).

Results

[0208] Sera from both studies are collected for analysis of $A\beta_{13-28}$ peptide-specific IgG antibody titer. Upon completion, the Aβ peptide conjugates will be evaluated as described above and as described in Examples 6 and 11, as well as in the contextual fear conditioning (CFC) assay.

[0209] Contextual fear conditioning is a common form of learning that is exceptionally reliable and rapidly acquired in most animals, for example, mammals. Test animals learn to fear a previously neutral stimulus and/or environment because of its association with an aversive experience. (*see, e.g.*, Fanselow, *Anim. Learn. Behav.* 18:264-270 (1990); Wehner *et al.*, *Nature Genet.* 17:331-334. (1997); Caldarone *et al.*, *Nature Genet.* 17:335-337 (1997)).

[0210] Contextual fear conditioning is especially useful for determining cognitive function or dysfunction, e.g., as a result of disease or a disorder, such as a neurodegenerative disease or disorder, an Aβ-related disease or disorder, an amyloidogenic disease or disorder, the presence of an unfavorable genetic alteration effecting cognitive function (e.g., genetic mutation, gene disruption, or undesired genotype), and/or the efficacy of an agent, e.g., an Aβ conjugate agent, on cognitive ability. Accordingly, the CFC assay provides a method for independently testing and/or validating the therapeutic effect of agents for preventing or treating a cognitive disease or disorder, and in particular, a disease or disorder affecting one or more regions of the brains, e.g., the hippocampus, subiculum, cingulated cortex, prefrontal cortex, peririhinal cortex, sensory cortex, and medial temporal lobe.

Patent provided by Seghrue Mike, PLLC - http://www.seghrue.com

[0211] Typically, the CFC assay is performed using standard animal chambers and the employment of conditioning training comprising a mild shock (*e.g.*, 0.35mA foot shock) paired with an auditory (*e.g.*, a period of 85 db white noise), olfactory (*e.g.*, almond or lemon extract), touch (*e.g.*, floor cage texture), and/or visual cue (light flash). The response to the aversive experience (shock) is typically one of freezing (absence of movement except for respiration) but may also include eye blink, or change in the nictitating membrane reflex, depending on the test animal selected. The aversive response is usually characterized on the first day of training to determine a baseline for unconditioned fear, with aversive response results on subsequent test days, *e.g.*, freezing in presence of the context and/or cue but in the absence of the aversive experience, being characterized as context and cue conditioned fear, respectively. For improved reliability, test animals are typically tested separately by independent technicians and scored over time. Additional experimental design details can be found in the art, for example, in Crawley, JN, *What's Wrong with my Mouse; Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice*, Wiley-Liss, NY (2000).

[0212] Exemplary test animals (*e.g.*, model animals) include mammals (*e.g.* rodents or non-human primates) that exhibit prominent symptoms or pathology that is characteristic of an amyloidogenic disorder such as Alzheimer's. Model animals may be created by selective inbreeding for a desired or they may genetically engineered using transgenic techniques that are well-known in the art, such that a targeted genetic alteration (*e.g.* a genetic mutation, gene disruption) in a gene that is associated with the dementia disorder, leading to aberrant expression or function of the targeted gene. For example, several transgenic mouse strains are available that overexpress APP and develop amyloid plaque pathology and/or develop cognitive deficits that are characteristic of Alzheimer's disease (see for example, Games *et al.*, *supra*, Johnson-Wood *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1550 (1997); Masliah E and Rockenstein E. (2000) *J Neural Transm Suppl.*;59:175-83).

[0213] Alternatively, the model animal can be created using chemical compounds (*e.g.* neurotoxins, anesthetics) or surgical techniques (*e.g.* stereotactic ablation, axotomization, transection, aspiration) that ablate or otherwise interfere with the normal function of an anatomical brain region (*e.g.* hippocampus, amygdala, perirhinal cortex, medial septal nucleus, locus coeruleus, mammalary bodies) or specific neurons (*e.g.* serotonergic, cholinergic, or dopaminergic neurons) that are associated with characteristic symptoms or pathology of the amyloidogenic disorder. In certain preferred embodiments, the animal model exhibits a prominent cognitive deficit associated with learning or memory in addition

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

to the neurodegenerative pathology that associated with a amyloidogenic disorder. More preferably, the cognitive deficit progressively worsens with increasing age, such that the disease progression in the model animal parallels the disease progression in a subject suffering from the amyloidogenic disorder.

[0214] Contextual fear conditioning and other *in vivo* assays to test the functionality of the conjugates described herein may be performed using wild-type mice or mice having a certain genetic alteration leading to impaired memory or mouse models of neurodegenerative disease, *e.g.*, Alzheimer's disease, including mouse models which display elevated levels of soluble Aβ in the cerebrospinal fluid (CSF) or plasma. For example, animal models for Alzheimer's disease include transgenic mice that overexpress the "Swedish" mutation of human amyloid precursor protein (*hAPPswe;* Tg2576) which show age-dependent memory deficits and plaques (Hsiao *et al.* (1996) *Science* 274:99-102). The *in vivo* functionality of the conjugates described herein can also be tested using the PS-1 mutant mouse, described in Duff, *et al.* (1996) *Nature* 383, 710-713. Other genetically altered transgenic models of Alzheimer's disease are described in Maslish E and Rockenstein E. (2000) *J Neural Transm Suppl.* 59:175-83.

[0215] In various aspects, the methods of the invention comprise the administration of an Aβ conjugate that is capable of improving cognition in a subject wherein the Aβ conjugate has been identified in using an assay which is suitably predictive of immunotherapeutic efficacy in the subject. In exemplary embodiments, the assay is a model animal assay that is based, at least in part, on comparing cognition, as determined from a contextual fear conditioning study, of an animal after administration of a test immunological reagent to the animal, as compared to a suitable control. The CFC assay evaluates changes in cognition of an animal (typically a mouse or rat) upon treatment with a potential therapeutic compound. In certain embodiments, the change in cognition evaluated is an improvement in memory impairment status or a reversal of memory deficit. Accordingly, the CFC assay provides a direct method for determining the therapeutic effect of agents for preventing or treating cognitive disease, and in particular, a disease or disorder affecting one or more regions of the brains, e.g., the hippocampus, subiculum, cingulated cortex, prefrontal cortex, perirhinal cortex, sensory cortex, and medial temporal lobe. Such CFC assays are discussed in copending U.S. Patent Application Serial No. 60/XXX,XXX entitled "Contextual Fear Conditioning for Predicting Immunotherapeutic Efficacy" (bearing Attorney Docket No. ELN-058-1), filed on December 15, 2004, and U.S. Patent Application Serial No. 60/XXX,XXX entitled "Contextual Fear

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Conditioning for Predicting Immunotherapeutic Efficacy" (bearing Attorney Docket No. HLN-058-2) the entire contents of which are hereby incorporated by reference.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

BIBLIOGRAPHY

Bernatowicz, M.S., and Matsueda, G.R. (1986) *Analytical Biochemistry* 155: 95-102.

Kniskern, P.J., and Marburg, S. (1994) *Development and Clinical Uses of Haemophilus b Conjugate Vaccines: Conjugation: Design, Chemistry, and Analysis* Ellis, R.W., and Granoff, D.M., Eds; Marcel Dekker, Inc: New York, NY, 37-70

Arrizon, V., Biechler, R., Cummings, J., and Harbaugh, J. (1991) *High-Performance Liquid Chromatography of Peptide and Proteins: Separation, Analysis, and Conformation* Mant, C.T. and Hodges, R.S., Eds; CRC Press: Boca Raton, FL, 859-863.

Carlsson, J. *et al.* (1978) *Biochem J*, 173: 723.

Means, G.E., Cangdon, W.L., and Bender, M.I. (1972) *Biochemistry* 11: 3564-3574.

Glenner & Wong (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 1131

Hardy (1984) *Trends in Neurosciences* 20: 1131.

Hardy (1977) *Trends in Neurosciences* 20: 154.

Stoute *et al.* (1997) *N. Engl. J. Med.* 336: 86-91.

Goebel *et al.*, (1939) *J. Exp. Med.* 69: 5 3.

Schneerson *et al.* (1980) *J. Exp. Med.* 152: 361-376.

Chu *et al.* (1983) *Infect. Immun.* 40: 245.

Schneerson *et al.* (1984) *Infect. Immun.* 45: 582-591.

Anderson *et al.* (1985) *J. Pediatr.* 107: 346.

Insel *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 158: 294.

U.S. Patent No. 4,673,574 Jun., 1987 Anderson

U.S. Patent No. 4,902,506 Feb., 1990 Anderson et al

U.S. Patent No. 5,192,540 Mar., 1993 Kuo et al.

U.S. Patent No. 5,306,492 Apr., 1994 Porro

U.S. Patent No. 5,360,897 Nov., 1994 Anderson et al.

U.S. Patent No. 5,785,973 Jul., 1998 Bixler et al

U.S. Patent No. 6,361,777 Mar., 2002 Hoogerhout

Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (C.S.H. P. Pres, NY 2d ed., 1989)

Bernatowicz, M. S., and Matsueda, G. R. (1986) *Analytical Biochemistry* 155, 95-102.

Kniskern, P.J., and Marburg, S. (1994) *Development and Clinical Uses of Haemophilus b Conjugate Vaccines: Conjugation: Design, Chemistry, and Analysis* Ellis, R.W., and Granoff, D.M., Eds; Marcel Dekker, Inc: New York, NY, 37-70

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Arrizon, V., Biechler, R., Cummings, J., and Harbaugh, J. (1991) *High-Performance Liquid Chromatography of Peptide and Proteins: Separation, Analysis, and Conformation* Mant, C.T. and Hodges, R.S., Eds; CRC Press: Boca Raton, FL, 859-863.

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for conjugating a peptide immunogen via a reactive group of an amino acid residue of the peptide immunogen to a protein/polypeptide carrier having one or more functional groups, the method comprising the steps of:

(a) derivatizing one or more of the functional groups of the protein/polypeptide carrier or optionally to a polypeptide linker attached to the protein/polypeptide carrier to generate a derivatized carrier with reactive sites;

(b) reacting the derivatized protein/polypeptide carrier of step (a) with a reactive group of an amino acid of the peptide immunogen under reaction conditions such that the peptide immunogen is conjugated to the derivatized protein/polypeptide carrier via the functional groups; and

(c) further reacting the conjugate with a capping reagent to inactive free, reactive unreacted functional groups on the derivatized protein/polypeptide carrier, thereby preserving the functionality of the carrier, such that it retains its ability to elicit the desired immune responses against the peptide immunogen that would otherwise not occur without a carrier.

2. The method of claim 1, wherein the carrier is selected from the group consisting of human serum albumin, keyhole limpet hemocyanin (KLH), immunoglobulin molecules, thyroglobulin, ovalbumin, influenza hemagglutinin, PADRE polypeptide, malaria circumsporozite (CS) protein, hepatitis B surface antigen ($HBSAg_{19-28}$), Heat Shock Protein (HSP) 65, *Mycobacterium tuberculosis*, cholera toxin, cholera toxin mutants with reduced toxicity, diphtheria toxin, CRM_{197} protein that is cross-reactive with diphtheria toxin, recombinant Streptococcal C5a peptidase, *Streptococcus pyogenes* ORF1224, *Streptococcus pyogenes* ORF1664, *Streptococcus pyogenes* ORF2452, *Chlamydia pneumoniae* ORF T367, *Chlamydia pneumoniae* ORF T858, Tetanus toxoid, HIV gp120 T1, components recognizing microbial surface adhesive matrix molecules (MSCRAMMS), growth factors, hormones, cytokines and chemokines.

3. The method according to claim 1, wherein the carrier contains a T-cell epitope.

4. The method according to claim 3, wherein the carrier is a bacterial toxoid.

5. The method according to claim 3, wherein the carrier is influenza hemagglutinin.

6. The method according to claim 3, wherein the carrier is the PADRE polypeptide.

7. The method according to claim 3, wherein the carrier is malaria circumsporozite (CS) protein.

8. The method according to claim 3, wherein the carrier is Hepatitis B surface antigen ($HBSAg_{19-28}$).

9. The method according to claim 3, wherein the carrier is heat shock protein 65 (HSP 65).

10. The method according to claim 3, wherein the carrier is a polypeptide from *Mycobacterium tuberculosis* (BCG).

11. The method according to claim 4, wherein the carrier is tetanus toxoid.

12. The method according to claim 4, wherein the bacterial toxoid is CRM 197.

13. The method according to claim 3, wherein the carrier is recombinant Streptococcal C5a peptidase.

14. The method according to claim 3, wherein the carrier is *Streptococcus pyogenes* ORF 1224.

15. The method according to claim 3, wherein the carrier is *Streptococcus pyogenes* ORF 1664.

16. The method according to claim 3, wherein the carrier is *Streptococcus pyogenes* ORF 2452.

17. The method according to claim 3, wherein the carrier is *Chlamydia pneumoniae* ORF T367.

--

18. The method according to claim 3, wherein the carrier is *Chlamydia pneumoniae* ORF T858.

19. The method according to claim 1, wherein the carrier is a growth factor or hormone, which stimulates or enhances immune response.

20. The method according to claim 19, wherein the growth factor or hormone is selected from the group consisting of IL-1, IL-2, γ-interferon, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, and RANTES.

21. The method according to claim 1, wherein the peptide immunogen is selected from the group consisting of a bacterial protein, a viral protein, and a eukaryotic protein.

22. The method according to claim 21, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a bacterium.

23. The method according to claim 22, wherein the bacterium is selected from the group consisting of Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Staphlylococcus epidermidis, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrheae, Haemophilus influenzae, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Listeria monocytogenes, Vibrio cholerae, Clostridium perfringens, Clostridium botulinum, Pseudomonas aerations, Salmonella typhimurium, Borrelia burgdorferi, Shigella flexneri, Shigella boydii, Shigella dysentriae, Alloiococcus otitidis and Group B streptococci.

24. The method according to claim 21, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a virus.

25. The method according to claim 24, wherein the virus is selected from the group consisting of human immunodeficiency virus (HIV), herpes simplex virus (HSV), human papilloma virus (HPV), parainfluenza virus (PIV), vesicular stomatitis virus (VSV), respiratory syncytial virus (RSV), Epstein-Barr virus (EBV), coronavirus, vaccinia virus, rotavirus, rabies virus, hepatitis C virus (HCV) and hepatitis B virus (HBV).

26. The method according to claim 21, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a fungus.

27. The method according to claim 26 wherein the fungus is selected from the group consisting of *Candida albicans, Cryptococcus neoformans*, Coccidioides species, Histoplasma species, and Aspergillus species.

28. The method according to claim 21, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a parasite.

29. The method according to claim 28, wherein the parasite is selected from the group consisting of a Plasmodium, a Trypanosome, a Schistosome, and a Leishmania.

30. The method according to claim 21, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a eukaryote.

31. The method according to claim 30, wherein the eukaryote is a human.

32. The method according to claim 31, wherein the peptide immunogen from the human is derived from a malignant tumor.

33. The method according to claim 32, wherein the tumor antigen is selected from the group consisting of a renal cell carcinoma antigen, a breast carcinoma antigen, a carcinoembryonic antigen, a melanoma (MAGE) antigen, and a prostate cancer specific antigen.

34. The method according to claim 31, wherein the peptide immunogen is from a human Aβ polypeptide.

35. The method according to claim 34, wherein the peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide.

36. The method according to claim 34, wherein the peptide immunogen is derived from the C-terminal region of Aβ polypeptide.

37. The method according to claim 34, wherein the peptide immunogen is derived from the internal region of Aβ polypeptide.

38. The method according to claim 35, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

39. The method according to claim 34, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

40. The method according to claim 34, wherein one or more fragments of Aβ peptide immunogen are fused to another peptide immunogen.

41. The method according to claim 40, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its C-terminus to the N-terminus of a molecule of the same Aβ peptide immunogen.

42. The method according to claim 40, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its C-terminus to the C-terminus of another molecule of the same Aβ peptide immunogen.

43. The method according to claim 40, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its C-terminus to the C-terminus of a different molecule of an Aβ peptide immunogen.

44. The method according to claim 40, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen, is fused at its N-terminus to the C-terminus of a molecule of a different Aβ peptide immunogen.

45. The method according to claim 41, 42, 43 or 44, wherein the Aβ peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide, and is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

46. The method according to claim 41, 42, 43 or 44, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

47. The method according to claim 40, wherein one or more molecules of an Aβ peptide immunogen are linked to one or more molecules of a heterologous peptide.

48. The method according to claim 47, wherein the Aβ peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide, and is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

49. The method according to claim 47, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

50. The method according to claim 47, wherein the heterologous peptide is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

51. The method according to claim 40, wherein one or more molecules of an Aβ peptide immunogen are linked together in a multiple antigenic peptide (MAP) configuration.

52. The method according to claim 40, wherein one or more molecules of an Aβ peptide immunogen are linked together with one or more molecules of a different Aβ peptide immunogen in a multiple antigenic peptide (MAP) configuration.

53. The method according to claim 51 or 52, wherein the Aβ peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide, and is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

54. The method according to claim 51 or 52, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

55. The method according to claim 1, wherein the functional group of one or more amino acid molecules of the protein/polypeptide carrier or of the optionally attached polypeptide linker is derivatized using a cross-linking reagent.

56. The method of claim 55, wherein the derivatizing reagent is a zero-length cross-linking reagent.

57. The method of claim 55, wherein the derivatizing reagent is a homobifunctional cross-linking reagent.

58. The method of claim 55, wherein the derivatizing reagent is a heterobifunctional cross-linking reagent.

59. The method of claim 55, wherein the protein/polypeptide carrier is reacted with a haloacetylating agent.

60. The method of claim 58, wherein the heterobifunctional reagent is a reagent which reacts with a primary or an ϵ-amine functional group of one or more amino acid residues of the protein/polypeptide carrier and a pendant thiol group of one or more amino acid residues of the peptide immunogen.

61. The method of claim 60, wherein the heterobifunctional reagent is selected from the group consisting of N-succinimdyl bromoacetate, N-succinimidyl-3-(2-pyridyl-thio) propionate (SPDP), and succinimidyl 4-(N-maleimidomehyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC).

62. The method of claim 61, wherein the primary or ϵ-amine functional group is lysine.

63. The method according to claim 60, wherein the pendant thiol group is a cysteine residue of the peptide immunogen.

64. The method according to claim 63, wherein the cysteine residue is localized at the amino-terminus of the peptide immunogen.

65. The method according to claim 63, wherein the cysteine residue is localized at carboxy-terminus of the peptide immunogen.

66. The method according to claim 63, wherein the cysteine residue is localized internally in the peptide immunogen.

67. The method according to claim 63, wherein the pendant thiol group is generated by a thiolating reagent.

68. The method according to claim 67, wherein the thiolating reagent is N-acetyl homocysteinethio lactone.

69. The method according to claim 1, wherein the capping reagent that is used to inactivate free reactive, functional groups on the activated protein/polypeptide carrier is selected from the reagent group consisting of cysteamine, *N*-acetylcysteamine, and ethanolamine.

70. The method according to claim 1, wherein the capping reagent that is used to inactivate free reactive, functional groups on the activated protein/polypeptide carrier is selected from the reagent group consisting of sodium hydroxide, sodium carbonate, ammonium bicarbonate and ammonia.

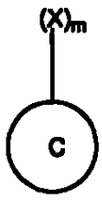
71. The method of claim 1, wherein the reactive group of the amino acid residue of the peptide immunogen is a free sulfhydryl group.

72. The method of claim 1, wherein one or more of the functional groups are on a linker, which is optionally attached to the protein/polypeptide carrier.

73. The method of claim 72, wherein the linker is a peptide linker.

74. The method of claim 73, wherein the peptide linker is polylysine.

75. A method for conjugating a peptide immunogen to a protein/polypeptide carrier having the structure:



wherein,

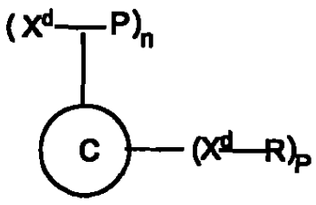
C is a protein/polypeptide carrier and X is a derivatizable functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino

acid residue of a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and wherein m is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, the method comprising the steps of:

(a) derivatizing one or more of the functional groups of the protein/polypeptide carrier or of the optionally attached linker molecule to generate a derivatized molecule with reactive sites;

(b) reacting the derivatized protein/polypeptide carrier of step (a) with a reactive group of an amino acid residue of the peptide immunogen to form a covalently coupled peptide immunogen- protein/polypeptide carrier conjugate; and

(c) further reacting the said conjugate with a capping reagent to inactivate the free reactive functional groups on the activated protein/polypeptide carrier, such that the capped groups are not free to react with other molecules, thereby preserving the functionality of the carrier, such that it retains its ability to elicit the desired immune responses against the peptide immunogen that would otherwise not occur without a carrier., so as to generate a capped peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugate having the formula:



wherein,

C is the protein/polypeptide carrier and X^d is a derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and, wherein,

P is a peptide immunogen molecule covalently attached to the derivatized functional group of the amino acid residue of the protein carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier,

R is a capping molecule covalently attached to the derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier,

n is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, and

p is an integer greater than 0, but less than 85.

76. The method of claim 75 , wherein the carrier is selected from a group consisting of serum albumin, keyhole limpet hemocyanin (KLH), immunoglobulin molecules, thyroglobulin, ovalbumin, influenza hemagglutinin, PADRE polypeptide, malaria circumsporozite (CS) protein, hepatitis B surface antigen ($HBSAg_{19-28}$), Heat Shock Protein (HSP) 65, *Mycobacterium tuberculosis*, cholera toxin, cholera toxin mutants with reduced toxicity, diphtheria toxin, CRM_{197} protein that is cross-reactive with diphtheria toxin, recombinant Streptococcal C5a peptidase, *Streptococcus pyogenes* ORF1224, *Streptococcus pyogenes* ORF1664, *Streptococcus pyogenes* ORF2452, *Chlamydia pneumoniae* ORF T367, *Chlamydia pneumoniae* ORF T858, Tetanus toxoid, HIV gp120 T1, components recognizing microbial surface adhesive matrix molecules (MSCRAMMS), growth factors, hormones, cytokines and chemokines.

77. The method according to claim 76, wherein the carrier contains a T-cell epitope.

78. The method according to claim 77, wherein the carrier is a bacterial toxoid.

79. The method according to claim 77, wherein the carrier is influenza hemagglutinin.

80. The method according to claim 77, wherein the carrier is PADRE polypeptide.

81. The method according to claim 77, wherein the carrier is malaria circumsporozite (CS) protein.

82. The method according to claim 77, wherein the carrier is Hepatitis B surface antigen ($HSBAg_{19-28}$).

83. The method according to claim 77, wherein the carrier is heat shock protein 65 (HSP 65).

84. The method according to claim 77, wherein the carrier is a polypeptide from *Mycobacterium tuberculosis* (BCG).

85. The method according to claim 78, wherein the carrier is tetanus toxoid.

86. The method according to claim 78, wherein the bacterial toxoid is CRM 197.

87. The method according to claim 77, wherein the carrier is Streptococcal rC5a peptidase.

88. The method according to claim 77, wherein the carrier is *Streptococcus pyogenes* ORF1224.

89. The method according to claim 77, wherein the carrier is *Streptococcus pyogenes* ORF1664.

90. The method according to claim 77, wherein the carrier is *Streptococcus pyogenes* ORF2452.

91. The method according to claim 77, wherein the carrier is *Chlamydia pneumoniae* ORF T367.

92. The method according to claim 77, wherein the carrier is *Chlamydia pneumoniae* ORF T858.

93. The method according to claim 75, wherein the carrier is a growth factor or hormone, which stimulates or enhances immune response.

94. The method according to claim 93, wherein the growth factor or hormone is selected from a group consisting of IL-1, IL-2, γ-interferon, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, and RANTES.

95. The method according to claim 75, wherein the peptide immunogen is selected from a bacterial protein, a viral protein, and a eukaryotic protein.

96. The method according to claim 95, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a bacterium.

97. The method according to claim 96, wherein the bacterium is selected from the group consisting of Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Staphlylococcus epidermidis, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrheae, Haemophilus influenzae, Escherichia coli, Klebsiella enterobacter, Listeria monocytogenes, Vibrio cholerae, Clostridium perfringens, Clostridium botulinum, Pseudomonas species, Salmonella typhimurium, Borrelia burgdorferi, Shigella flexneri, Shigella boydii, Shigella dysentriae, Alloiococcus otitidis and Group B streptococci.

98. The method according to claim 96, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a virus.

99. The method according to claim 98, wherein the virus is selected from the group consisting of human immunodeficiency virus (HIV), herpes simplex virus (HSV), human papilloma virus (HPV), parainfluenza virus (PIV), vesicular stomatitis virus (VSV), respiratory syncytial virus (RSV), Epstein-Barr virus (EBV), coronavirus, vaccinia virus, rotavirus, rabies virus, hepatitis C virus (HCV) and hepatitis B virus (HBV).

100. The method according to claim 96, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a fungus.

101. The method according to claim 100 wherein the fungus is selected from the group consisting of *Candida albicans, Cryptococcus neoformans,* Coccidoides, Histoplasma, and Aspergillus.

102. The method according to claim 96, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a parasite.

103. The method according to claim 102, wherein the parasite is selected from the group consisting of Plasmodium, a Trypanosome, a Schistosome, and a Leishmania.

104. The method according to claim 96, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a eukaryote.

105. The method according to claim 104, wherein the eukaryote is a human.

106. The method according to claim 105, wherein peptide immunogen from a human is derived from a malignant tumor.

107. The method according to claim 106, wherein the tumor antigen is a renal cell carcinoma antigen, a breast carcinoma antigen, a carcinoembryonic antigen, a melanoma (MAGE) antigen, and a prostate cancer specific antigen.

108. The method according to claim 105, wherein the peptide immunogen is from a human Aβ polypeptide.

109. The method according to claim 108, wherein the peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide.

110. The method according to claim 108, wherein the peptide immunogen is derived from the C-terminal region of Aβ polypeptide.

111. The method according to claim 108, wherein the peptide immunogen is derived from the internal region of Aβ polypeptide.

112. The method according to claim 108, wherein the peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

113. The method according to claim 108, wherein the peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

114. The method according to claim 108, wherein one or more molecules of an Aβ peptide immunogen are fused to another peptide immunogen.

115. The method according to claim 114, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its C-terminus to the N-terminus of a another molecule of the same Aβ peptide immunogen.

116. The method according to claim 114, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its C-terminus to the C-terminus of another molecule of the same Aβ peptide immunogen.

117. The method according to claim 114, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its C-terminus to the C-terminus of a molecule of a different Aβ peptide immunogen.

118. The method according to claim 114, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its N-terminus to the C-terminus of a molecule of a different Aβ peptide immunogen.

119. The method according to claim 115, 116, 117 or 118, wherein the Aβ fragment is derived from the N-terminal region of the Aβ polypeptide, and is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

120. The method according to claim 115, 116, 117 or 118, wherein the Aβ fragment is a fragment of Aβ selected from Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

121. The method according to claim 114, wherein one or more molecules of an Aβ peptide immunogen are fused to one or more molecules of a heterologous peptide.

122. The method according to claim 121, wherein the Aβ peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide, and is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

123. The method according to claim 121, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

124. The method according to claim 121, wherein the heterologous peptide is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

125. The method according to claim 114, wherein one or more molecules of an Aβ peptide immunogen are linked together in a multiple antigenic peptide (MAP) configuration.

126. The method according to claim 114, wherein one or more molecules of an Aβ peptide immunogen are linked together with one or more molecules of a different Aβ peptide immunogen in a multiple antigenic peptide (MAP) configuration.

127. The method according to claim 125 or 126, wherein the Aβ peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide, and is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

128. The method according to claim 125 or 126, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

129. The method according to claim 75, wherein the functional group of one or more amino acid molecules of the protein/polypeptide carrier or of the optionally attached polypeptide linker is derivatized using a cross-linking reagent.

130. The method of claim 129, wherein the derivatizing reagent is a zero-length cross-linking reagent.

131. The method of claim 129, wherein the derivatizing reagent is a homobifunctional cross-linking reagent.

132. The method of claim 129, wherein the derivatizing reagent is a heterobifunctional cross-linking reagent.

133. The method of claim 129, wherein the protein/polypeptide carrier is reacted with a haloacetylating agent.

134. The method of claim 133, wherein the heterobifunctional reagent is a reagent which reacts with a primary or an ϵ-amine functional group of one or more amino acid residues of the protein/polypeptide carrier and a pendant thiol group of one or more amino acid residues of the peptide immunogen.

135. The method of claim 134, wherein the heterobifunctional reagent is N-succinimdyl bromoacetate, N-succinimidyl-3-(2-pyridyl-thio) propionate (SPDP), and succinimidyl 4-(N-maleimidomehyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC).

136. The method of claim 134, wherein the primary or ϵ-amine functional group is lysine.

137. The method according to claim 136, wherein derivatization of the primary or ϵ-amine functional group of the amino acid residue lysine of the protein/polypeptide carrier with N-succinimidyl bromo acetate results in the bromoacetylation of the primary or ϵ-amine residues on lysine residues on the protein/polypeptide carrier.

138. The method according to claim 134, wherein the pendant thiol group is a cysteine residue of the peptide immunogen.

139. The method according to claim 138, wherein the cysteine residue is localized at the amino-terminus of the peptide immunogen.

140. The method according to claim 138, wherein the cysteine residue is localized at carboxy-terminus of the peptide immunogen.

141. The method according to claim 138, wherein the cysteine residue is localized internally in the peptide immunogen.

142. The method according to claim 138, wherein the pendant thiol group is generated by a thiolating reagent.

143. The method according to claim 142, wherein the thiolating reagent is N-acetyl homocysteinethio lactone.

144. The method according to claim 75, wherein the capping reagent that is used to inactivate free reactive, functional groups of the activated protein/polypeptide carrier is selected from the reagent group consisting of cysteamine, *N*-acetylcysteamine, and ethanolamine.

145. The method according to claim 75, wherein the capping reagent that is used to inactivate free reactive, functional groups on the activated protein/polypeptide carrier is selected from the reagent group consisting of sodium hydroxide, sodium carbonate, ammonium bicarbonate and ammonia.

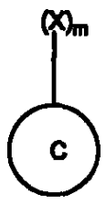
146. The method of claim 75, wherein the reactive group of the amino acid residue of the peptide immunogen is a free sulfhydryl group.

147. The method of claim 75, wherein one or more of the functional groups are on a linker optionally attached to the protein/polypeptide carrier.

148. The method of claim 147, wherein the linker is a peptide linker.

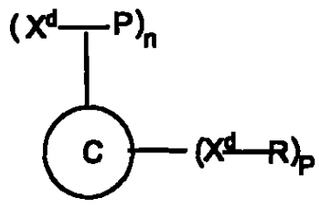
149. The method of claim 148, wherein the peptide linker is polylysine.

150. A peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugate wherein the protein/polypeptide carrier has the formula:



wherein,

C is a protein/polypeptide carrier and X is a derivatizable functional group of an amino acid residue on the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and, wherein m is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, and wherein the peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugate has the formula:



wherein,

C is the protein/polypeptide carrier and X^d is a derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and, wherein, P is a peptide immunogen molecule covalently attached to the derivatized functional group of the amino acid residue of the protein carrier or optionally of an amino acid residue

of a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier, R is a capping molecule covalently attached to the derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier, thereby preserving the functionality of the carrier such that it retains its ability to elicit the desired immune responses against the peptide immunogen that would otherwise not occur without a carrier., n is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, and p is an integer greater than 0, but less than 85.

151. The conjugate according to claim 150, wherein the carrier is selected from a group consisting of serum albumin, keyhole limpet hemocyanin (KLH), immunoglobulin molecules, thyroglobulin, ovalbumin, influenza hemagglutinin, PADRE polypeptide, malaria circumsporozite (CS) protein, hepatitis B surface antigen ($HBSAg_{19-28}$), Heat Shock Protein (HSP) 65, *Mycobacterium tuberculosis*, cholera toxin, cholera toxin mutants with reduced toxicity, diphtheria toxin, CRM_{197} protein that is cross-reactive with diphtheria toxin, recombinant Streptococcal C5a peptidase, *Streptococcus pyogenes* ORF1224, *Streptococcus pyogenes* ORF1664, *Streptococcus pyogenes* ORF2452, *Chlamydia pneumoniae* ORF T367, *Chlamydia pneumoniae* ORF T858, Tetanus toxoid, HIV gp120 T1, components recognizing microbial surface adhesive matrix molecules (MSCRAMMS), growth factors, hormones, cytokines and chemokines.

152. The conjugate according to claim 150, wherein the carrier contains a T-cell epitope.

153. The conjugate according to claim 152, wherein the carrier is a bacterial toxoid.

154. The conjugate according to claim 152, wherein the carrier is influenza hemagglutinin.

155. The conjugate according to claim 152, wherein the carrier is PADRE polypeptide.

156. The conjugate according to claim 152, wherein the carrier is malaria circumsporozite (CS) protein.

157. The conjugate according to claim 152, wherein the carrier is Hepatitis B surface antigen ($HBSAg_{19-28}$).

158. The conjugate according to claim 152, wherein the carrier is heat shock protein 65 (HSP 65).

159. The conjugate according to claim 152, wherein the carrier is a polypeptide from *Mycobacterium tuberculosis* (BCG).

160. The conjugate according to claim 153, wherein the carrier is tetanus toxoid.

161. The conjugate according to claim 153, wherein the bacterial toxoid is CRM_{197}.

162. The conjugate according to claim 152, wherein the carrier is Streptococcal rC5a peptidase.

163. The conjugate according to claim 152, wherein the carrier is *Streptococcus pyogenes* ORF1224.

164. The conjugate according to claim 152, wherein the carrier is *Streptococcus pyogenes* ORF1664.

165. The conjugate according to claim 152, wherein the carrier is *Streptococcus pyogenes* ORF2452.

166. The conjugate according to claim 152, wherein the carrier is *Chlamydia pneumoniae* ORF T367.

167. The conjugate according to claim 152, wherein the carrier is *Chlamydia pneumoniae* ORF T858.

168. The conjugate according to claim 150, wherein the carrier is a growth factor or hormone, which stimulates or enhances immune response.

169. The conjugate according to claim 168, wherein the growth factor or hormone is selected from a group consisting of IL-1, IL-2, γ-interferon, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, and RANTES.

170. The conjugate according to claim 150, wherein the peptide immunogen is selected from the group consisting of a bacterial protein, a viral protein, and a eukaryotic protein.

171. The conjugate according to claim 170, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a bacterium.

172. The conjugate according to claim 171, wherein the bacterium is selected from the group consisting of *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Staphlylococcus epidermidis, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrheae, Haemophilus influenzae, Escherichia coli, Klebsiella enterobacter, Listeria monocytogenes, Vibrio cholerae, Clostridium perfringens, Clostridium botulinum,* Pseudomonas species, *Salmonella typhimurium, Borrelia burgdorferi, Shigella flexneri, Shigella boydii, Shigella dysentriae, Alloiococcus otitidis* and Group B *streptococci.*

173. The conjugate according to claim 170, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a virus.

174. The conjugate according to claim 173, wherein the virus is selected from the group consisting of a human immunodeficiency virus (HIV), a herpes simplex virus (HSV), a human papilloma virus (HPV), a parainfluenza virus (PIV), a vesicular stomatitis virus (VSV), a respiratory syncytial virus (RSV), an Epstein-Barr virus (EBV), a coronavirus, a vaccinia virus, a rotavirus, a rabies virus, a hepatitis C virus (HCV) and a hepatitis B virus (HBV).

175. The conjugate according to claim 170, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a fungus.

176. The conjugate according to claim 175, wherein the fungus is selected from the group consisting of *Candida albicans, Cryptococcus neoformans,* Coccidioides, Histoplasma, and Aspergillus.

177. The conjugate according to claim 170, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a parasite.

178. The conjugate according to claim 177, wherein the parasite is selected from the group consisting of a Plasmodium, a Trypanosome, a Schistosome, and a Leishmania.

179. The conjugate according to claim 170, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from an eukaryote.

180. The conjugate according to claim 179, wherein the eukaryote is a human.

181. The conjugate according to claim 180, wherein peptide immunogen from the human is derived from a malignant tumor.

182. The conjugate according to claim 181, wherein the tumor antigen is selected from the group consisting of a renal cell carcinoma antigen, a breast carcinoma antigen, a carcinoembryonic antigen, a melanoma (MAGE) antigens, and prostate specific membrane antigen (PSMA).

183. The conjugate according to claim 180, wherein the peptide immunogen is from a human Aβ polypeptide.

184. The conjugate according to claim 183, wherein the peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide.

185. The conjugate according to claim 183, wherein the peptide immunogen is derived from the C-terminal region of Aβ polypeptide.

186. The conjugate according to claim 183, wherein the peptide immunogen is derived from the internal region of Aβ polypeptide.

187. The conjugate according to claim 183, wherein the peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

188. The conjugate according to claim 183, wherein the peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

189. The conjugate according to claim 183, wherein one or more molecules of Aβ are fused to one or more molecules of another peptide immunogen.

190. The conjugate according to claim 189, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its C-terminus to the N-terminus of another molecule of the same Aβ peptide immunogen.

191. The conjugate according to claim 189, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its C-terminus to the C-terminus of another molecule of the same Aβ peptide immunogen.

192. The conjugate according to claim 189, wherein a molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its C-terminus to the C-terminus of a molecule of a different Aβ peptide immunogen.

193. The conjugate according to claim 189 wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its N-terminus to the C-terminus of a molecule of a different Aβ peptide immunogen.

194. The conjugate according to claim 190, 191, 192 or 193, wherein the Aβ peptide immunogen is derived from the N-terminal region of the Aβ polypeptide, and is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

195. The conjugate according to claim 190, 191, 192 or 193, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

196. The conjugate according to claim 189, wherein one or more molecules of an Aβ peptide immunogen are linked to one or more molecules of a heterologous peptide.

197. The conjugate according to claim 196, wherein the Aβ peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide, and is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

198. The conjugate according to claim 196, wherein the Aβ fragment is a fragment of *Aβ* selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

199. The conjugate according to claim 196, wherein the heterologous peptide is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

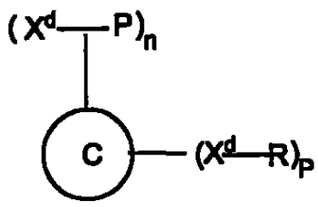
200. The conjugate according to claim 189, wherein one or more molecules of an Aβ peptide immunogen are linked together in a multiple antigenic peptide (MAP) configuration.

201. The conjugate according to claim 189, wherein one or more molecules of an Aβ peptide immunogen are linked with one or more copies of a different Aβ peptide immunogen in a multiple antigenic peptide (MAP) configuration.

202. The conjugate according to claim 200 or 201, wherein the Aβ peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide, and is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

203. The conjugate according to claim 200 or 201, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of *Aβ* selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

204. A peptide immunogen-protein/polypeptide carrier conjugate generated according to the method of claim 75 and having the formula:



wherein,

C is the protein/polypeptide carrier and X^d is a derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to the protein/polypeptide carrier, and, wherein, P is a peptide immunogen molecule covalently attached to the derivatized functional group of the amino acid residue of the protein carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier, R is a capping molecule covalently attached to the derivatized functional group of an amino acid residue of the protein/polypeptide carrier or optionally of an amino acid residue of a peptide linker covalently attached to a protein/polypeptide carrier, which preserves the functionality of the carrier, such that it retains its ability to elicit the desired immune responses against the peptide immunogen that would otherwise not occur without a carrier, n is an integer greater than 0, but less than or equal to 85, and p is an integer greater than 0, but less than 85.

205. The conjugate according to claim 204 wherein the carrier is selected from the group consisting of human serum albumin, keyhole limpet hemocyanin (KLH), immunoglobulin molecules, thyroglobulin, ovalbumin, influenza hemagglutinin, PADRE polypeptide, malaria circumsporozite (CS) protein, hepatitis B surface antigen ($HBSAg_{19\text{-}28}$), Heat Shock Protein (HSP) 65, *Mycobacterium tuberculosis*, cholera toxin, cholera toxin mutants with reduced toxicity, diphtheria toxin, CRM_{197} protein that is cross-reactive with diphtheria toxin, recombinant Streptococcal C5a peptidase, *Streptococcus pyogenes* ORF1224, *Streptococcus pyogenes* ORF1664, *Streptococcus pyogenes* ORF2452, *Chlamydia pneumoniae* ORF T367, *Chlamydia pneumoniae* ORF T858, Tetanus toxoid, HIV gp120 T1, components recognizing microbial surface adhesive matrix molecules (MSCRAMMS), growth factors, hormones, cytokines and chemokines.

206. The conjugate according to claim 204 wherein the carrier contains a T-cell epitope.

207. The conjugate according to claim 206, wherein the carrier is a bacterial toxoid.

208. The conjugate according to claim 206, wherein the carrier is influenza hemagglutinin.

209. The conjugate according to claim 206, wherein the carrier is PADRE polypeptide.

210. The conjugate according to claim 206, wherein the carrier is malaria circumsporozite (CS) protein.

211. The conjugate according to claim 206, wherein the carrier is Hepatitis B surface antigen ($HSBAg_{19-28}$).

212. The conjugate according to claim 206, wherein the carrier is heat shock protein 65 (HSP 65).

213. The conjugate according to claim 206, wherein the carrier is a polypeptide from *Mycobacterium tuberculosis* (BCG).

214. The conjugate according to claim 207, wherein the carrier is tetanus toxoid.

215. The conjugate according to claim 207, wherein the bacterial toxoid is CRM_{197}.

216. The conjugate according to claim 206, wherein the carrier is Streptococcal rC5a peptidase.

217. The conjugate according to claim 206, wherein the carrier is *Streptococcus pyogenes* ORF1224.

218. The conjugate according to claim 206, wherein the carrier is *Streptococcus pyogenes* ORF1664.

219. The conjugate according to claim 206, wherein the carrier is *Streptococcus pyogenes* ORF2452.

220. The conjugate according to claim 206, wherein the carrier is *Chlamydia pneumoniae* ORF T367.

221. The conjugate according to claim 206, wherein the carrier is *Chlamydia pneumoniae* ORF T858.

222. The conjugate according to claim 206, wherein the carrier is a growth factor or hormone, which stimulates or enhances immune response.

223. The conjugate according to claim 222, wherein the growth factor or hormone is selected from a group consisting of IL-1, IL-2, γ-interferon, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, and RANTES.

224. The conjugate according to claim 206, wherein the peptide immunogen is selected from the group consisting of a bacterial protein, a viral protein, a fungal protein, a parasite protein and a eukaryotic protein.

225. The conjugate according to claim 224, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a bacterium.

226. The conjugate according to claim 225, wherein the bacterium is selected from the group consisting of *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrheae, Haemophilus influenzae, Escherichia coli, Klebsiella enterobacter, Listeria monocytogenes, Vibrio cholerae, Clostridium perfringens, Clostridium botulinum,* Pseudomonas species, *Salmonella typhimurium, Borrelia burgdorferi, Shigella flexneri, Shigella boydii, Shigella dysentriae, Alloiococcus otitidis* and Group B streptococci.

227. The conjugate according to claim 224, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a virus.

228. The conjugate according to claim 227, wherein the virus is selected from the group consisting of a human immunodeficiency virus (HIV), a herpes simplex virus (HSV), a human papilloma virus (HPV), a parainfluenza virus (PIV), a vesicular stomatitis virus (VSV), a respiratory syncytial virus (RSV), Epstein-Barr virus (EBV), a coronavirus, a vaccinia virus, rotavirus, a rabies virus, a hepatitis C virus (HCV) and a hepatitis B virus (HBV).

229. The conjugate according to claim 224, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a fungus.

230. The conjugate according to claim 229, wherein the fungus is selected from the group consisting of *Candida albicans, Cryptococcus neoformans*, Coccidioides, Histoplasma, and Aspergillus.

231. The conjugate according to claim 224, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a parasite.

232. The conjugate according to claim 231, wherein the parasite is selected from the group consisting of a Plasmodium, a Trypanosome, a Schistosome, and a Leishmania.

233. The conjugate according to claim 224, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from an eukaryote.

234. The conjugate according to claim 233, wherein the eukaryote is a human.

235. The conjugate according to claim 234, wherein peptide immunogen from the human is derived from a malignant tumor.

236. The conjugate according to claim 235, wherein the tumor antigen is selected from a renal cell carcinoma antigen, a breast carcinoma antigen, a carcinoembryonic antigen, a melanoma antigen, and a prostate cancer specific antigen.

237. The conjugate according to claim 234, wherein the peptide immunogen is from a human Aβ polypeptide.

238. The conjugate according to claim 237, wherein the peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide.

239. The conjugate according to claim 237, wherein the peptide immunogen is derived from the C-terminal region of Aβ polypeptide.

240. The conjugate according to claim 237, wherein the peptide immunogen is derived from the internal region of Aβ polypeptide.

241. The conjugate according to claim 237, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

242. The conjugate according to claim 237, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

243. The conjugate according to claim 237, wherein one or more molecules of an Aβ peptide immunogen are fused to another peptide immunogen.

244. The conjugate according to claim 243, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its C-terminus to the N-terminus of another molecule of the same Aβ peptide immunogen.

245. The conjugate according to claim 243, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its C-terminus to the C-terminus of another molecule of the same Aβ peptide immunogen.

246. The conjugate according to claim 243, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its C-terminus to the C-terminus of a molecule of a different Aβ peptide immunogen.

247. The conjugate according to claim 243 wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its N-terminus to the C-terminus of a molecule of a different Aβ peptide immunogen.

248. The conjugate according to claim 244, 245, 246 or 247, wherein the Aβ peptide immunogen is derived from the N-terminal region of the Aβ polypeptide, and is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

249. The conjugate according to claim 244, 245, 246 or 247, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

250. The conjugate according to claim 243, wherein one or more fragments of Aβ are linked to one or more molecules of a heterologous peptide.

251. The conjugate according to claim 250, wherein the Aβ peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide, and is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

252. The conjugate according to claim 250, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

253. The conjugate according to claim 250, wherein the heterologous peptide is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

254. The conjugate according to claim 243, wherein one or more molecules of an Aβ peptide immunogen are linked together in a multiple antigenic peptide (MAP) configuration.

255. The conjugate according to claim 243, wherein one or more molecules of an Aβ peptide immunogen are linked with one or more copies of a different Aβ peptide immunogen in a multiple antigenic peptide (MAP) configuration.

256. The conjugate according to claim 254 or 255, wherein the Aβ peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide, and is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

257. The conjugate according to claim 254 or 255, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

258. The conjugate according to claim 243, wherein one or more molecules of an Aβ peptide immunogen are linked with one or more molecules of a heterologous peptide.

259. The conjugate according to claim 258, wherein the heterologous peptide is selected from the group consisting of a T-cell epitope, a B-cell epitope and combinations thereof.

260. The conjugate according to claim 258, wherein the Aβ peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide, and is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

261. The conjugate according to claim 258, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

262. An immunogenic composition, comprising a conjugate of a peptide immunogen with a protein/polypeptide carrier generated by the method of claim 75, together with one or more pharmaceutically acceptable excipients, diluents, and /or adjuvants.

263. The immunogenic composition according to claim 262, wherein the carrier is selected from the group consisting of human serum albumin, keyhole limpet hemocyanin (KLH), immunoglobulin molecules, thyroglobulin, ovalbumin, influenza hemagglutinin, PADRE polypeptide, malaria circumsporozite (CS) protein, hepatitis B surface antigen ($HBSAg_{19-28}$), Heat Shock Protein (HSP) 65, *Mycobacterium tuberculosis*, cholera toxin, cholera toxin mutants with reduced toxicity, diphtheria toxin, CRM_{197} protein that is cross-reactive with diphtheria toxin, recombinant Streptococcal C5a peptidase, *Streptococcus pyogenes* ORF1224, *Streptococcus pyogenes* ORF1664, *Streptococcus pyogenes* ORF2452, *Chlamydia pneumoniae* ORF T367, *Chlamydia pneumoniae* ORF T858, Tetanus toxoid, HIV gp120 T1, components recognizing microbial surface adhesive matrix molecules (MSCRAMMS), growth factors, hormones, cytokines and chemokines.

264. The immunogenic composition according to claim 262, wherein the carrier contains a T-cell epitope.

265. The method according to claim 264 wherein the carrier is a bacterial toxoid.

266. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is influenza hemagglutinin.

267. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is PADRE polypeptide.

268. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is malaria circumsporozite (CS) protein.

269. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is Hepatitis B surface antigen ($HSBAg_{19-28}$).

270. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is heat shock protein 65 (HSP 65).

271. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is a polypeptide from *Mycobacterium tuberculosis* (BCG).

272. The immunogenic composition according to claim 265, wherein the bacterial toxoid is tetanus toxoid.

273. The immunogenic composition according to claim 265, wherein the bacterial toxoid is CRM_{197}.

274. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is Streptococcal rC5a peptidase.

275. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is *Streptococcus pyogenes* ORF1224.

276. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is *Streptococcus pyogenes* ORF1664.

277. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is *Streptococcus pyogenes* ORF2452.

278. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is *Chlamydia pneumoniae* ORF T367.

279. The immunogenic composition according to claim 264, wherein the carrier is *Chlamydia pneumoniae* ORF T858.

280. The immunogenic composition according to claim 262, wherein the carrier is a growth factor or a hormone, which stimulates or enhances immune response.

281. The immunogenic composition according to claim 280, wherein the growth factor or hormone is selected from a group consisting of IL-1, IL-2, γ-interferon, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, and RANTES.

282. The immunogenic composition according to claim 262, wherein the peptide immunogen is selected from the group consisting of a bacterial protein, a viral protein, a fungal protein, a parasite protein, and a eukaryotic protein.

283. The immunogenic composition according to claim 282, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a bacterium.

284. The immunogenic composition according to claim 283, wherein the bacterium is selected from the group consisting of *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Staphlylococcus epidermidis, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrheae, Haemophilus influenzae, Escherichia coli, Klebsiella enterobacter, Listeria monocytogenes, Vibrio cholerae, Clostridium perfringens, Clostridium botulinum,* Pseudomonas species, *Salmonella typhimurium, Borrelia burgdorferi, Shigella flexneri, Shigella boydii, Shigella dysentriae, Alloiococcus otitidis* and Group B *streptococci.*

285. The immunogenic composition according to claim 282, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a virus.

286. The immunogenic composition according to claim 285, wherein the virus is selected from the group consisting of a human immunodeficiency virus (HIV), a herpes simplex virus (HSV), a human papilloma virus (HPV), a parainfluenza virus (PIV), a vesicular stomatitis virus (VSV), a respiratory syncytial virus (RSV), an Epstein-Barr virus (EBV), a coronavirus, a vaccinia virus, a rotavirus, a rabies virus, a hepatitis C virus (HCV) and a hepatitis B virus (HBV).

287. The immunogenic composition according to claim 282, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a fungus.

288. The immunogenic composition according to claim 287, wherein the fungus is selected from the group consisting of *Candida albicans, Cryptococcus neoformans*, Coccidoides, Histoplasma, and Aspergillus.

289. The immunogenic composition according to claim 282, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a parasite.

290. The immunogenic composition according to claim 289, wherein the parasite is selected from the group consisting of a Plasmodium, a Trypanosome, a Schistosome, and a Leishmania.

291. The immunogenic composition according to claim 282, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a eukaryote.

292. The immunogenic composition according to claim 291, wherein the eukaryote is a human.

293. The immunogenic composition according to claim 292, wherein peptide immunogen from a human is derived from a malignant tumor.

294. The immunogenic composition according to claim 293, wherein the peptide immunogen is selected from the group consisting of a renal cell carcinoma antigen, a breast carcinoma antigen, a carcinoembryonic antigen, a melanoma antigen, and a prostate cancer specific antigen.

295. The immunogenic composition according to claim 292, wherein the peptide immunogen is from a human Aβ polypeptide.

296. The immunogenic composition according to claim 295, wherein the peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide.

297. The immunogenic composition according to claim 295, wherein the peptide immunogen is derived from the C-terminal region of Aβ polypeptide.

298. The immunogenic composition according to claim 295, wherein the peptide immunogen is derived from the internal region of Aβ polypeptide.

299. The immunogenic composition according to claim 295, wherein the Aβ peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide, and is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

300. The immunogenic composition according to claim 295, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

301. The immunogenic composition according to claim 295, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its C-terminus to the N-terminus of another molecule of the same Aβ peptide immunogen.

302. The immunogenic composition according to claim 295, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its C-terminus to the C-terminus of another molecule of the same Aβ peptide immunogen.

303. The immunogenic composition according to claim 295, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its C-terminus to the C-terminus of a molecule of a different Aβ peptide immunogen.

304. The immunogenic composition according to claim 295, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its N-terminus to the C-terminus of a molecule of a different Aβ peptide immunogen.

305. The immunogenic composition according to claim 301, 302, 303, or 304, wherein the Aβ fragment is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide and is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

306. The immunogenic composition according to claim 301, 302, 303, or 304, wherein the Aβ fragment is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

123

307. The immunogenic composition according to claim 295, wherein one or more molecules of an Aβ peptide immunogen are linked to one or more molecules of a heterologous peptide.

308. The immunogenic composition according to claim 307, wherein the Aβ peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide, and is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

309. The immunogenic composition according to claim 307, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

310. The immunogenic composition according to claim 295, wherein one or more molecules of an Aβ peptide immunogen are linked together in a multiple antigenic peptide (MAP) configuration.

311. The immunogenic composition according to claim 295, wherein one or more molecules of an Aβ peptide immunogen are linked with one or more molecules of a different Aβ peptide immunogen in a multiple antigenic peptide (MAP) configuration.

312. The immunogenic composition according to claim 310 or 311, wherein the Aβ peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide, and is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

313. The immunogenic composition according to claim 310 or 311, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

314. The immunogenic composition according to claim 262, wherein one or more adjuvants are selected from the group consisting of GM-CSF, 529 SE, IL-12, aluminum phosphate, aluminum hydroxide, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bordetella pertussis*, bacterial lipopolysaccharides, aminoalkyl glucosamine phosphate compounds, MPL™ (3-O-deacylated monophosphoryl lipid A), a polypeptide, Quil A, STIMULON™ QS-21, a pertussis toxin (PT), an *E.coli* heat-labile toxin (LT), IL-1 α, IL-1 β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6,

IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, interferon-α, interferon-β, interferon-γ, G-CSF, TNF-α and TNF-β.

315. The immunogenic composition of claim 314, wherein the peptide immunogen is Aβ, the carrier is CRM_{197}, and the adjuvant is 529 SE.

316. A method for inducing an immune response in a mammalian subject, which comprises administering an effective amount of the immunogenic composition of claim 262 to the subject.

317. The method according to claim 316, wherein the carrier is selected from the group consisting of human serum albumin, keyhole limpet hemocyanin (KLH), immunoglobulin molecules, thyroglobulin, ovalbumin, influenza hemagglutinin, PADRE polypeptide, malaria circumsporozite (CS) protein, hepatitis B surface antigen ($HBSAg_{19-28}$), Heat Shock Protein (HSP) 65, *Mycobacterium tuberculosis*, cholera toxin, cholera toxin mutants with reduced toxicity, diphtheria toxin, CRM_{197} protein that is cross-reactive with diphtheria toxin, recombinant Streptococcal C5a peptidase, *Streptococcus pyogenes* ORF1224, *Streptococcus pyogenes* ORF1664, *Streptococcus pyogenes* ORF2452, *Chlamydia pneumoniae* ORF T367, *Chlamydia pneumoniae* ORF T858, Tetanus toxoid, HIV gp120 T1, components recognizing microbial surface adhesive matrix molecules (MSCRAMMS), growth factors, hormones, cytokines and chemokines.

318. The method according to claim 316, wherein the carrier contains a T-cell epitope.

319. The method according to claim 318, wherein the carrier is a bacterial toxoid.

320. The method according to claim 318, wherein the carrier is influenza hemagglutinin.

321. The method according to claim 318, wherein the carrier is PADRE polypeptide.

322. The method according to claim 318, wherein the carrier is malaria circumsporozite (CS) protein.

323. The method according to claim 318, wherein the carrier is Hepatitis B surface antigen.

324. The method according to claim 318, wherein the carrier is heat shock protein 65 (HSP 65).

325. The method according to claim 318, wherein the carrier is a polypeptide from *Mycobacterium tuberculosis* (BCG).

326. The method according to claim 319, wherein the bacterial toxoid is tetanus toxoid.

327. The method according to claim 319, wherein the bacterial toxoid is CRM_{197}.

328. The method according to claim 318, wherein the carrier is Streptococcal rC5a peptidase.

329. The method according to claim 318, wherein the carrier is *Streptococcus pyogenes* ORF1224.

330. The method according to claim 318, wherein the carrier is *Streptococcus pyogenes* ORF1664.

331. The method according to claim 318, wherein the carrier is *Streptococcus pyogenes* ORF2452.

332. The method according to claim 318, wherein the carrier is *Chlamydia pneumoniae* ORF T367.

333. The method according to claim 318, wherein the carrier is *Chlamydia pneumoniae* ORF T858.

334. The method according to claim 316, wherein the carrier is a growth factor or hormone, which stimulates or enhances immune response.

335. The method according to claim 334, wherein the growth factor or hormone is selected from a group consisting of IL-1, IL-2, γ-interferon, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, and RANTES.

336. The method according to claim 316, wherein the peptide immunogen is selected from the group consisting of a bacterial protein, a viral protein, and a eukaryotic protein.

337. The method according to claim 336, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a bacterium.

338. The method according to claim 337, wherein the bacterium is selected from Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Staphlylococcus epidermidis, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrheae, Haemophilus influenzae, Escherichia coli, Klebsiella enterobacter, Listeria monocytogenes, Vibrio cholerae, Clostridium perfringens, Clostridium botulinum, Pseudomonas species, Salmonella typhimurium, Borrelia burgdorferi, Shigella flexneri, Shigella boydii, Shigella dysentriae, Alloiococcus otitidis and Group B streptococci.

339. The method according to claim 336, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a virus.

340. The method according to claim 339, wherein the virus is selected from the group consisting of a human immunodeficiency virus (HIV), a herpes simplex virus (HSV), a human papilloma virus (HPV), a parainfluenza virus (PIV), a vesicular stomatitis virus (VSV), a respiratory syncytial virus (RSV), a Epstein-Barr virus (EBV), a coronavirus, a vaccinia virus, a rotavirus, a rabies virus, a hepatitis C virus (HCV) and a hepatitis B virus (HBV).

341. The method according to claim 336, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a fungus.

342. The method according to claim 341, wherein the fungus is selected from the group consisting of a Candida species, a Cryptococcus species, a Coccidioides species, a Histoplasma species, and an Aspergillus species.

343. The method according to claim 336, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a parasite.

344. The method according to claim 343, wherein the parasite is selected from the group consisting of a Plasmodium, a Trypanosome, a Schistosome, and a Leishmania.

345. The method according to claim 336, wherein the peptide immunogen is derived from a protein antigen from a eukaryote.

346. The method according to claim 345, wherein the eukaryote is a human.

347. The method according to claim 347, wherein peptide immunogen from a human is derived from a malignant tumor.

348. The method according to claim 347, wherein the peptide immunogen is derived from a renal cell carcinoma antigen, a breast carcinoma antigen, a carcinoembryonic antigen, a melanoma (MAGE-1) antigen, and a prostate cancer specific antigen.

349. The method according to claim 346, wherein the peptide immunogen is from a human Aβ polypeptide.

350. The method according to claim 349, wherein the peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide.

351. The method according to claim 349, wherein the peptide immunogen is derived from the C-terminal region of Aβ polypeptide.

352. The method according to claim 349, wherein the peptide immunogen is derived from the internal region of Aβ polypeptide.

353. The method according to claim 350, wherein the Aβ peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide, and is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

354. The method according to claim 349, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

355. The method according to claim 349, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its C-terminus to the N-terminus of another molecule of the same Aβ peptide immunogen.

356. The method according to claim 349, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its C-terminus to the C-terminus of another molecule of the same Aβ peptide immunogen.

357. The method according to claim 349, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its C-terminus to the C-terminus of a molecule of a different Aβ peptide immunogen.

358. The method according to claim 349, wherein one molecule of an Aβ peptide immunogen is fused at its N-terminus to the C-terminus of a molecule of a different Aβ peptide immunogen.

359. The method according to claim 355, 356, 357,or 358, wherein the Aβ peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide, and is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

360. The method according to claim 355, 356, 357,or 358, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

361. The method according to claim 349, wherein one or more molecules of an Aβ peptide immunogen are linked to one or more copies of a heterologous peptide.

362. The method according to claim 361, wherein the Aβ peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide, and is selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

363. The method according to claim 361, wherein the Aβ peptide immunogen is selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

364. The method according to claim 349, wherein one or more molecules of an Aβ peptide immunogen are linked together in a multiple antigenic peptide (MAP) configuration.

365. The method according to claim 349, wherein one or more molecules of an Aβ peptide immunogen are linked with one or more molecules of a different Aβ peptide immunogen in a multiple antigenic peptide (MAP) configuration.

366. The method according to claim 364 or 365, wherein the Aβ peptide immunogen is derived from the N-terminal region of Aβ polypeptide, and is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, and 1-4.

367. The method according to claim 364 or 365, wherein the Aβ peptide immunogen is a fragment of Aβ selected from the group consisting of Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 and 35-42.

368. The method according to claim 262, wherein one or more adjuvants are selected from the group consisting of GM-CSF, 529 SE, IL-12, aluminum phosphate, aluminum hydroxide, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bordetella pertussis*, bacterial lipopolysaccharides, aminoalkyl glucosamine phosphate compounds, MPL™ (3-O-deacylated monophosphoryl lipid A), a polypeptide, Quil A, STIMULON™ QS-21, a pertussis toxin (PT), an *E. coli* heat-labile toxin (LT), IL-1 α, IL-1 β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, interferon-α, interferon-β, interferon-γ, G-CSF, TNF-α and TNF-β.

369. The method according to claim 368, wherein the peptide immunogen is Aβ, the carrier is CRM_{197}, and the adjuvant is 529 SE.

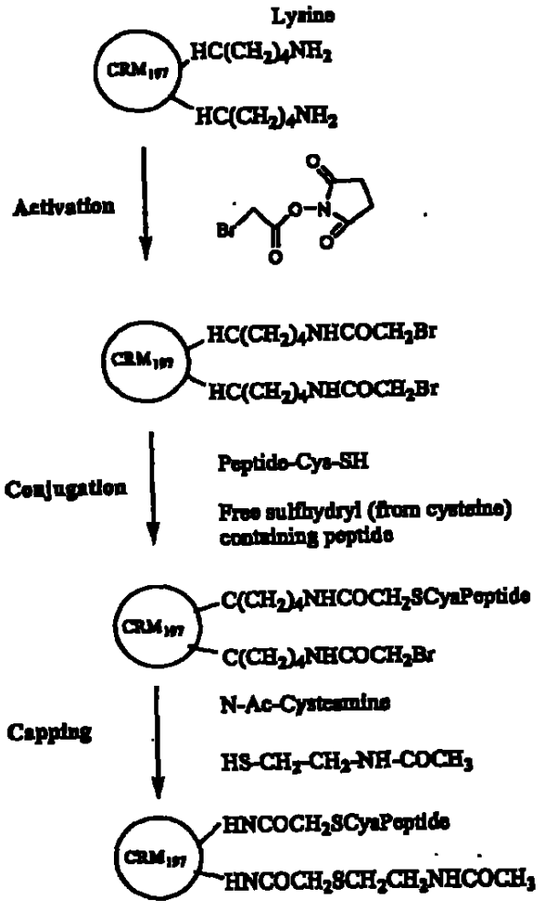


Figure 1

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

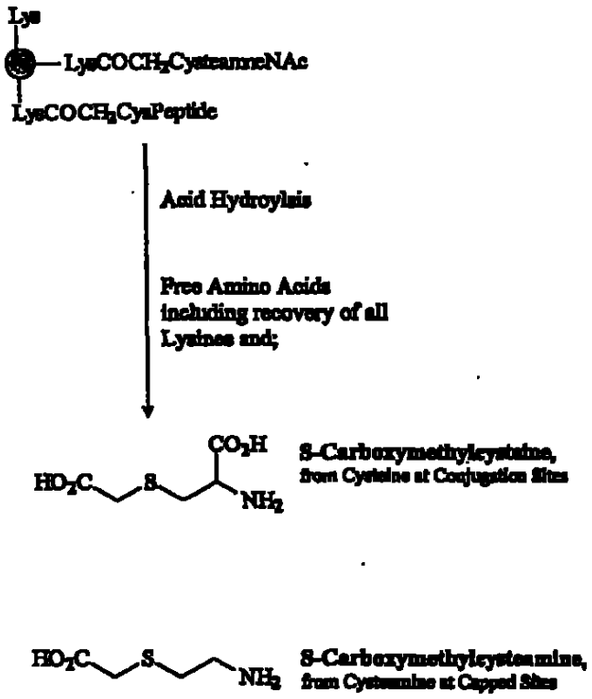


Figure 2

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

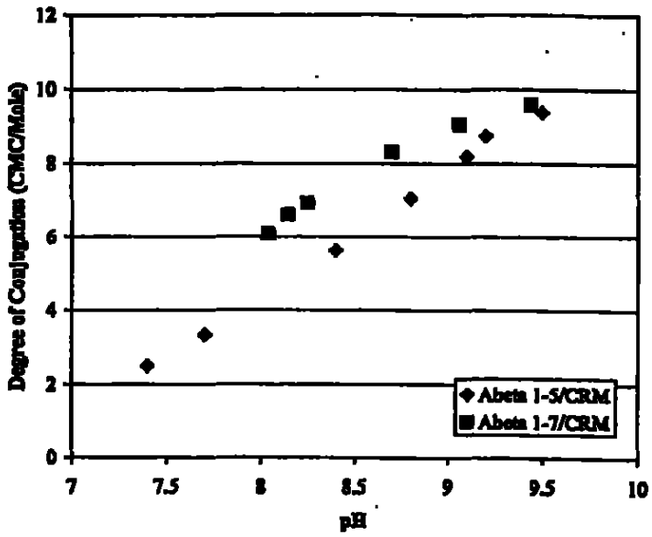


Figure 3

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

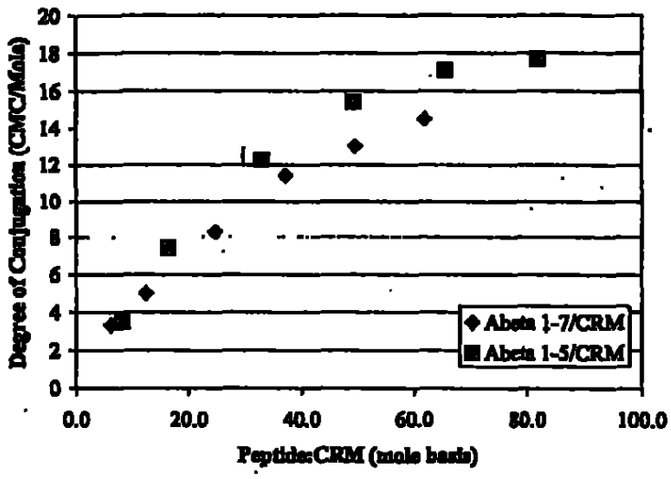


Figure 4

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

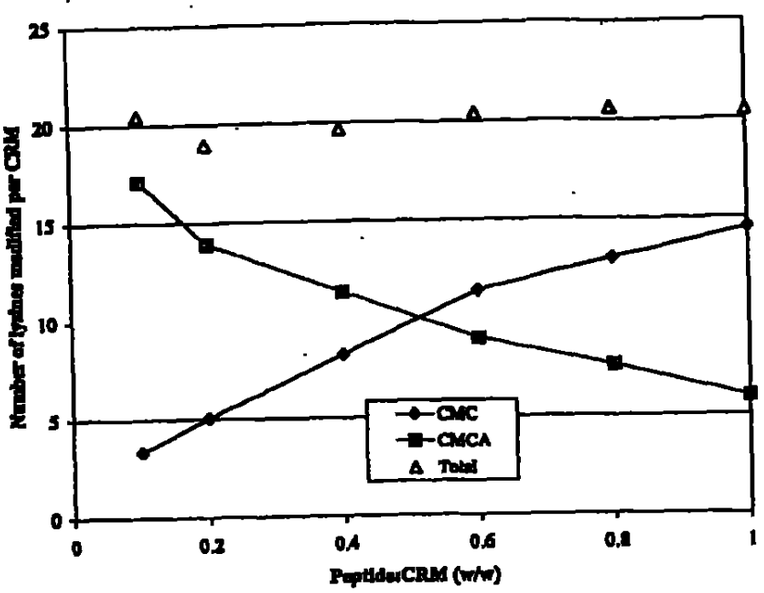


Figure 5

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

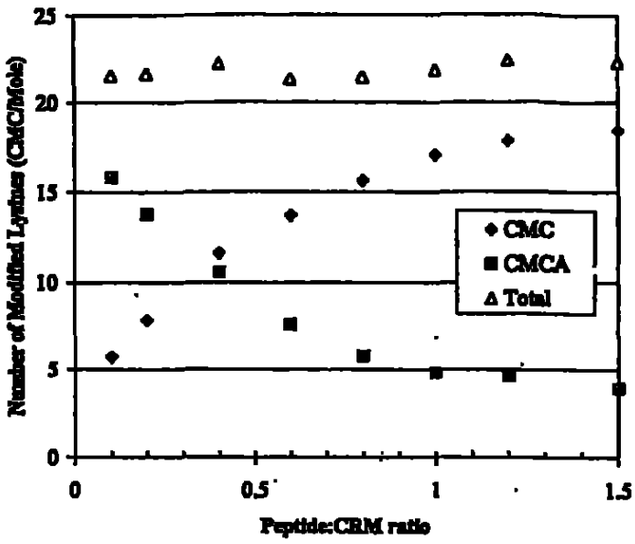


Figure 6

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

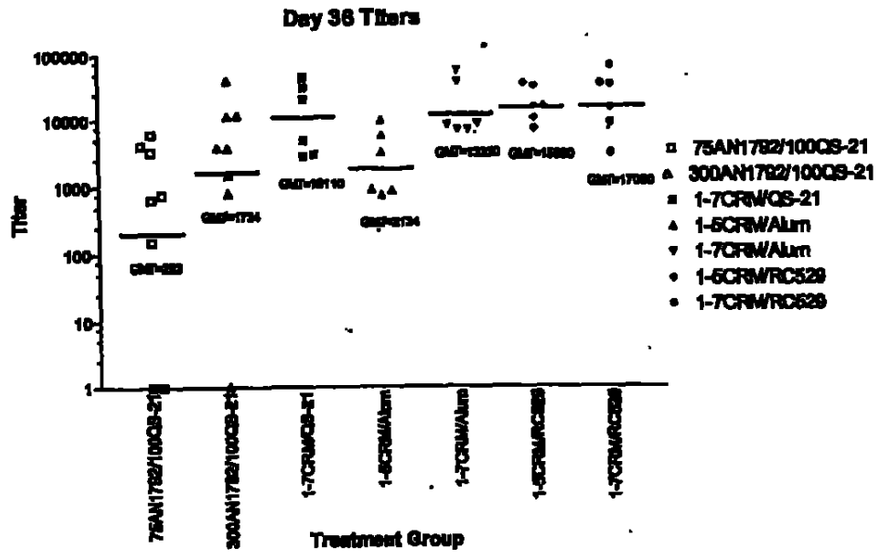


Figure 7

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

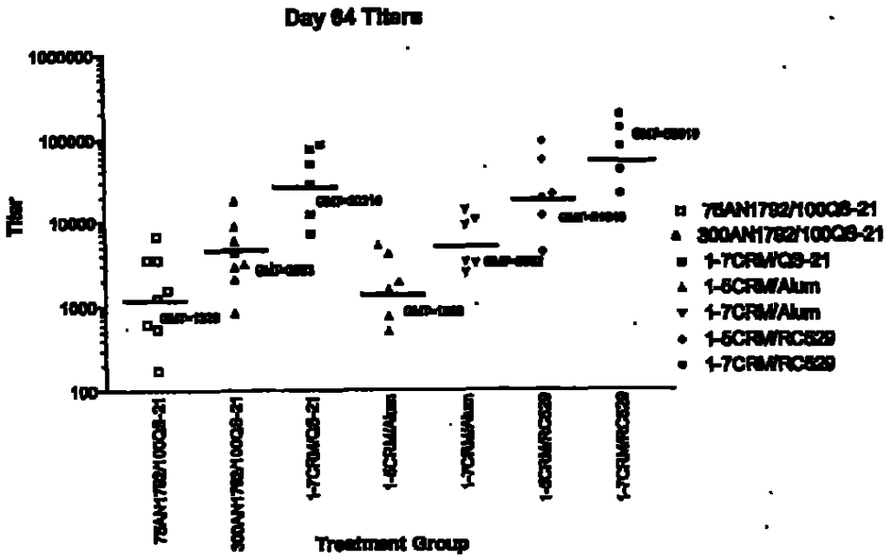


Figure 8

Patent provided by Seghrue Mion, PLLC - http://www.seghrue.com

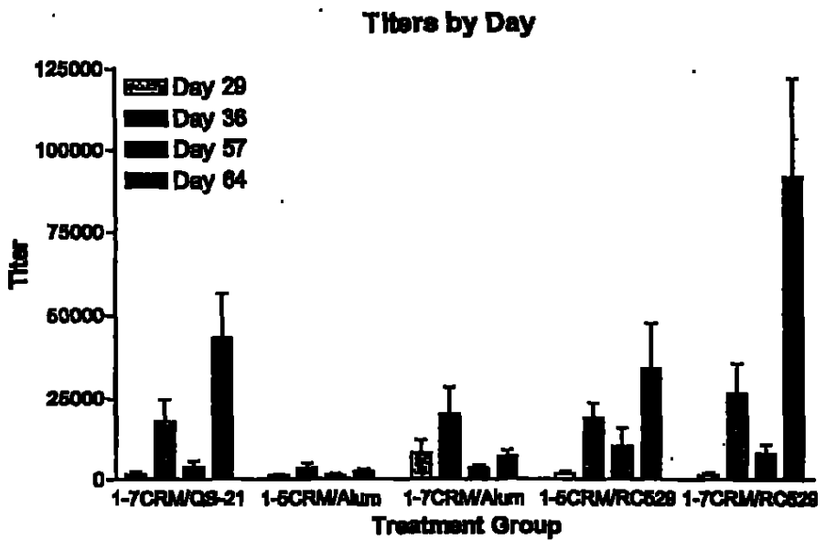


Figure 9

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

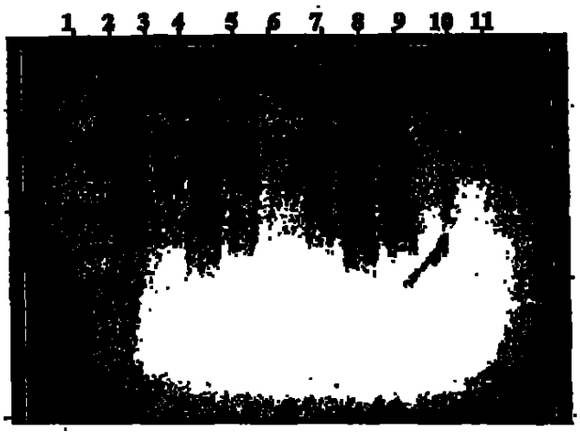


Figure 10

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

SEQUENCE LISTING

<110> Arumugham, Rasappa
Prasad, A. Krishna

<120> Methods of Producing Immunogenic Peptide Carrier Conjugates

<130> 025721-000110US

<140>
<141>

<150> US 60/530,480
<151> 2003-12-17

<160> 54

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg Cys
1 5

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Cys
1 5

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Cys
1 5 10

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val Cys
1 5 10

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ala Glu Phe Arg Gly Ala Gly Ala Cys
1 5 10

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gly Ala Gly Ala Cys

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

1 5 10

<210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Gly Ala Gly Ala Cys
1 5 10

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Cys

<210> 9
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Val Glu Tyr Gly Ser Asp His Arg Phe Glu Ala Asp Cys
1 5 10

<210> 10

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Gly Ala Gly Ala
1

<210> 11
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 12

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 13
<211> 16
<212> PRT

Patent provided by Sughrue-Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<213> Homo sapiens

<400> 13

Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val
1 5 10 15

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Phe Glu Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile
1 5 10

<210> 15
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Asp Gln Ser Ile Gly Asp Leu Ile Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly
1 5 10 15

Asn Glu Gly

<210> 16
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Gln Val His Phe Gln Pro Leu Pro Pro Ala Val Val Lys Leu
1 5 10

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
1 5 10 15

<210> 18
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu
20

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr
1 5 10 15

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<210> 20
<211> 51
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
20 25 30

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Asp Ala Glu Phe
35 40 45

Arg His Asp
50

<210> 21
<211> 42
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

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

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<210> 22
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu
20

<210> 23
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
1 5 10 15

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
20 25

<210> 24
<211> 43
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
1 5 10 15

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu
20 25 30

Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
35 40

<210> 25
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Glu Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu
20

<210> 26
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 26

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Asp Ala Glu
1 5 10 15

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Phe Arg His Asp
20

<210> 27
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 27

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala
1 5 10 15

Glu Phe Arg His Asp Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala
20 25 30

Ala Ala

<210> 28
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 28

Patent provided by Dugliness Sikes, PLLC - http://www.dugliness.com

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Asp Ala Glu
1 5 10 15

Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg
20 25 30

His Asp

<210> 29
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 29

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu
1 5 10 15

Lys Ala Ala Ala
20

<210> 30
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His
1 5 10 15

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 31
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

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

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 32
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

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

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 33
<211> 34
<212> PRT

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<213> Homo sapiens

<400> 33

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Asp Ala Glu
1 5 10 15

Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg
20 25 30

His Asp

<210> 34
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu
1 5 10 15

Lys Leu Ala Thr Asp Ala Glu Phe Arg His Asp
20 25

<210> 35
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala
1 5 10 15

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Glu Phe Arg His Asp Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu
20 25 30

Ala Thr

<210> 36
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Pro Lys
1 5 10 15

Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
20 25

<210> 37
<211> 79
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu
1 5 10 15

Lys Leu Ala Thr Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser
20 25 30

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

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro
50 55 60

Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Asp Ala Glu Phe Arg His Asp
65 70 75

<210> 38
<211> 58
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala
1 5 10 15

Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly
20 25 30

Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg
35 40 45

Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
50 55

<210> 39
<211> 44
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
20 25 30

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
35 40

<210> 40
<211> 535
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

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

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
85 90 95

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
180 185 190

Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
195 200 205

Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
210 215 220

Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
225 230 235 240

Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
245 250 255

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
260 265 270

Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
275 280 285

Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
290 295 300

Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
305 310 315 320

Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
325 330 335

Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
340 345 350

Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
355 360 365

Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
370 375 380

Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr
385 390 395 400

Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His
405 410 415

Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

420 425 430

Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
435 440 445

His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
450 455 460

Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
465 470 475 480

Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
485 490 495

Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
500 505 510

Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
515 520 525

Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
530 535

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

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

Patent provided by Sughrue Mion PLLC - http://www.sughrue.com

Arg

<210> 42
<211> 42
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 42

Asp Ala Glu Phe Gly His Asp Ser Gly Phe Glu Val Arg 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> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> A-beta 18-25 + C

<400> 43

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Cys
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<213> Artificial

<220>
<223> A-beta 17-24 + C

<400> 44

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Cys
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> A-beta 16-23 + C

<400> 45

Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Cys
1 5

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> A-beta 18-25 + C

<400> 46

Cys Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly
1 5

<210> 47
<211> 9

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> C + A-beta 18-25

<400> 47

Cys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> C + A-beta 16-23

<400> 48

Cys Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5

<210> 49
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> A-beta 18-24 + C

<400> 49

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Cys
1 5

<210> 50

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> A-beta 17-23 + C

<400> 50

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Cys
1 5

<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> A-beta 16-22 + C

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> CRM 197 added via terminal cysteine

<400> 51

Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Cys
1 5

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> C + A-beta 18-24

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> CRM 197 added via N-terminal cysteine

<400> 52

Cys Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> C + A-beta 17-23

<400> 53

Cys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5

<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> C + A-beta 16-22 + C

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> CRM 197 added via N-terminal cysteine

<400> 54

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Cys Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu
1 5

Patent provided by Sughrue-Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

CONJUGADOS DE PORTADOR DE PÉPTIDO INMUNOGÉNICOS Y MÉTODOS PARA PRODUCIR LOS MISMOS

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La esencia de la inmunidad adaptable es la capacidad de un organismo para reaccionar a la presencia de sustancias extrañas y producir componentes (anticuerpos y células) aptos de interactuar específicamente con y proteger el huésped de su invasión. Un "antígeno" o "inmunógeno" es una sustancia que es apta para producir este tipo de respuesta inmune y también es apta de interactuar con las células y anticuerpos sensibilizados que son fabricados contra el mismo.

Los antígenos o inmunógenos son usualmente macromoléculas que contienen sitios antigénicos distintos o "epítopos" que son reconocidos e interactúan con los varios componentes del sistema inmune. Pueden existir como moléculas individuales compuestas de químicos orgánicos sintéticos, proteínas, lipoproteínas, glicoproteínas, ARN, ADN, o polisacáridos o pueden ser partes de estructuras celulares (bacterias u hongos) o virus (Harlow y Land 1988 a,b,c; Male et al., 1987).

Las moléculas pequeñas como péptidos, aunque normalmente son aptos de interactuar con los productos de una respuesta inmune, frecuentemente no pueden provocar una respuesta por sí mismos. Estos inmunógenos de péptido o "haptenos" como también son llamados, son realmente antígenos incompletos y aunque no son aptos de provocar por sí mismos inmunogenicidad o producir producción de anticuerpos, se pueden hacer inmunógenos al acoplarlos a un portador apropiado. Los portadores son comúnmente antígenos de proteína de peso molecular más alto que son aptos de provocar una respuesta

inmunológica cuando son administrados *in vivo*.

En una respuesta inmune, los anticuerpos son producidos y secretados por B-linfocitos en conjunción con las células T-auxiliar (T_H). En la mayoría de los sistemas de hapteno-portador, las células B producen anticuerpos que son específicos tanto para el hapteno como para el portador. En estos casos, los linfocitos T tendrán dominios de enlace específicos sobre el portador, pero no reconocerán el haptenos solo. En una clase de sinergismo, las células B y T cooperan para inducir una respuesta de anticuerpo hapteno-específica. Después que tal respuesta inmune ha tomado lugar, y el huésped es tratado subsecuente solo con el hapteno, usualmente responderá a producir anticuerpos hapteno-específicos de células de memoria formadas después de la inmunización inicial.

Los haptenos sintéticos que imitan algunas estructuras epitópicas críticas en macromoléculas más grandes son frecuentemente conjugados a portadores para crear una respuesta inmune a la molécula "original" más grande. Por ejemplo, segmentos de péptido corto pueden ser sintetizados a partir de la secuencia conocida de una proteína y acoplados para un portador para inducir inmunogenicidad hacia la proteína natural. Este tipo de procedimiento sintético a la producción de inmunógeno se ha convertido en la base de mucha de la investigación actual en la creación de vacunas. Sin embargo, en muchas instancias, el solamente crear una respuesta de célula B al utilizar conjugados de péptido-portador sintéticos, sin embargo, bien diseñados, no siempre garantizará inmunidad protectora completa hacia un antígeno intacto. La respuesta inmune generada por un epítopo de péptido corto a partir de una partícula viral más grande o célula bacteriana puede solamente

ser suficiente para generar memoria al nivel de la célula B. En estos casos, es en general ahora aceptado que una respuesta de célula T citotóxica es un indicador más importante de inmunidad protectora. El diseño de inmunógenos de péptido con los sitios de enlace epitópicos apropiados tanto para el reconocimiento de células B como de células T es una de las áreas de investigación más desafiantes en la inmunología hoy en día.

El procedimiento para incrementar la inmunogenicidad de moléculas pequeñas o moléculas deficientemente inmunógenas al conjugar estas moléculas a moléculas "portadoras" grandes se ha utilizado exitosamente por décadas (véase, por ejemplo, Goebel et *al.* (1939) *J. Exp. Med.* 69:53). Por ejemplo, muchas composiciones inmunogénicas han sido descritas en las cuales polímeros capsulares purificados han sido conjugados a proteínas portadoras para crear composiciones inmunogénicas más efectivas al aprovechar su "efecto portador". Schneerson et *al.* (1984) Infect. Immun. 45:582-591). La conjugación también se ha demostrado que desvía la respuesta de anticuerpo deficiente usualmente observada en infantes cuando son inmunizados con un polisacárido libre (Anderson et *al.* (1985) J. Pediatr. 107:346, Insel et *al.* (1986) J. Exp. Med. 158:294).

Conjugados de hapteno-portador han sido generados exitosamente utilizando varios reactivos de reticulación/acoplamiento tales como enlazadores homobifuncionales, heterobifuncionales o enlazadores de cruce de longitud cero. Muchos de tales métodos están disponibles actualmente para el acoplamiento de sacáridos, proteínas, péptidos a portadores de péptidos. La mayoría de los métodos crean enlaces de amina, amida, uretano, isotiourea o disulfuro o en algunos casos tioéteres. Una desventaja al uso de

reactivos de acoplamiento, que introducen sitios reactivos a las cadenas laterales de moléculas de aminoácido reactivas sobre moléculas portadoras y/o haptenos es que lo sitios reactivos si no son neutralizados están libres para reaccionar con cualquier molécula indeseable ya sea in vitro (afectando así adversamente la funcionalidad o estabilidad del (los) conjugado(s)) o in vivo (planteando así un riesgo potencial de efectos adversos en personas o animales inmunizados con las preparaciones). Tales sitios reactivos en exceso se pueden hacer reaccionar o "coronar" para inactivar estos sitios, utilizando varias reacciones químicas conocidas, pero estas reacciones pueden ser de otra manera disruptivas a la funcionalidad de los conjugados. Esto puede se particularmente problemático cuando se intenta crear un conjugado al introducir los sitios reactivos a la molécula portadora, ya que su tamaño más grande y estructura más compleja (en relación con el hapteno) la pueden volver vulnerable a los efectos disruptivos del tratamiento químico. En efecto, no se conocen ejemplos de métodos mediante los cuales un conjugado sea elaborado al activar primero el portador, luego hacer reaccionar el hapteno en una reacción de conjugación y finalmente "coronación" de los sitios reactivos restantes, en tanto que se conserva la habilidad del conjugado resultante para funcionar como composición inmunógena que tiene las propiedades deseadas del "efecto portador".

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención es concerniente con métodos para producir un conjugado inmunógeno de un inmunógeno de péptido con un portador de proteína/polipéptido, en donde el

inmunógeno de péptido es conjugado al portador vía grupos funcionales derivados de residuos de aminoácido del portador tales como residuos de lisina y en donde cualesquier grupos funcionales derivados sin conjugar de los residuos de aminoácido son inactivados mediante coronación para bloquearlos de reaccionar con otras moléculas, en los que se incluyen proteínas/polipéptidos, conservando mediante esto la funcionalidad del portador, de tal manera que retiene su habilidad para producir las respuestas inmunes deseadas contra el inmunógeno de péptido que de otra manera no ocurrirían sin un portador. Además, la invención también es concerniente con conjugados producidos mediante los métodos anteriores y con composiciones inmunogénicas que contienen tales conjugados.

En una modalidad, la invención es concerniente con un primer método para conjugar un inmunógeno de péptido vía un grupo reactivo de un residuo de aminoácido del inmunógeno de péptido a un portador de proteína/polipéptido que tiene uno o más grupos funcionales, el método comprende las etapas de: (a) derivar uno o más de los grupos funcionales del portador de proteína/polipéptido para generar una molécula derivada con sitios reactivos; (b) hacer reaccionar el portador de proteína/polipéptido derivado de la etapa (a) con un grupo reactivo de un residuo de aminoácido del inmunógeno de péptido bajo condiciones de reacción de tal manera que el inmunógeno de péptido es conjugado al portador de proteína/polipéptido derivado vía los grupos funcionales; y (c) hacer reaccionar adicionalmente el conjugado con un reactivo de coronación para inactivar los grupos funcionales reactivos libres sobre el portador de proteína/polipéptido activado, conservando mediante esto la funcionalidad del portador contra el inmunógeno de

péptido que de otra manera no ocurriría sin un portador.

En una modalidad, el portador de proteína/polipéptido es seleccionado del grupo que consiste de albúmina de suero humano, hemocianina de lapa de bocallave, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina, hemaglutinina de influenza, péptido de enlace de PAN-DR (polipéptido PADRE), proteína de circumsporozito de malaria (CS), antígeno de superficie B de hepatitis (HB_sAg_{19-18}), proteína de choque térmico (HSP) 65, bacilo Calmette-Guerin (BCT), toxina de cólera, mutante de toxina de cólera con toxicidad reducida, toxina de difteria, proteína CRM_{197} que es de reactividad cruzada con toxina difteria, peptidasa estreptococal C5a recombinante, Streptococcus pyrogenes ORF1224, Streptococcus pyrogenes ORF1664, Streptococcus pyrogenes ORF 2452, Chlamydia pneumoniae ORF T367, Chlamydia pneumoniae ORF T858, toxoide de tétanos, gp120 T1 de HVI, componentes superficiales microbianos que reconocen moléculas de matriz adhesiva (MSCRAMMS), citocinas de factor de crecimiento/hormona y quimiocinas.

En otra modalidad, el portador de proteína/polipéptido contiene un epítopo de célula T.

En todavía otra modalidad, el portador de proteína/polipéptido es un toxoide antibacteriano tal como un toxoide de tétano, toxina de cólera o mutante de toxina de cólera como se describe anteriormente. En una modalidad preferida el portador de proteína/polipéptido es CRM_{197}.

En todavía otra modalidad, el portador de proteína/polipéptido puede ser una hemaglutinina de influenza, un polipéptido PADRE, una proteína CS de malaria, un antígeno de superficie B de Hepatitis ($HSBAg_{19-18}$), una proteína de choque térmico 65 (HSP 65), o un polipéptido de *Mycobacterium*

tuberculosis (BCG).

En una modalidad preferida, el portador de proteína/polipéptido es seleccionado de peptidasa rC5a Streptococcal, *Streptococcus pyrogenes* ORF1224, *Streptococcus pyrogenes* ORF1664 ó *Streptococcus pyrogenes* ORF2452, *Chlamydia pneumoniae* ORF T367, y *Chlamydia pneumoniae* ORF T858.

En una modalidad, portador de proteína/polipéptido es un factor de crecimiento u hormona que estimula o mejora la respuesta inmune y es seleccionado del grupo que consiste de IL-1, IL-2, γ-interferón, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β y RANTES.

En una modalidad, el inmunógeno de péptido es seleccionado de una proteína bacteriana, una proteína viral y una proteína eucarióntica.

En otra modalidad, el inmunógeno de péptido es derivado de un antígeno de proteína bacteriana de *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrheae, Haemophilus influenzae, Escherichia coli, Klebsiella enterobacter, Listeria monocytogenes, Vibrio cholerae, Clostridium perfringens, Clostridium botulinum*, especies de Pseudomonas, *Salmonella typhimurium, Borrelia burgdorferi, Shigella flexneri, Shigella boydii, Shigella dysentriae, Alliococcus otitidis* y estreptococos del Grupo B.

En otra modalidad, el inmunógeno de péptido es derivado de un antígeno de proteína de un virus seleccionado del grupo que consiste de virus de inmunodeficiencia humana (HIV), virus de herpes simplex (HSV), virus de papiloma humano (HPV), virus de parainfluenza (PIV), virus de estomatitis vesicular (VSV), virus escincitial respiratorio (RSV), virus de

Epstein-Barr (EBV), coronavirus, virus de vacuna, rotavirus, virus de rabia, virus de hepatitis C (HCV) y virus de hepatitis B (HBV).

En todavía otra modalidad, el inmunógeno de péptido es derivado de un antígeno de proteína de un hongo seleccionado de una especie Candida, una especie de Cryptococcus, una especie de Cocidioides, una especie de histoplasma y una especie de Aspergillus.

En otra modalidad, el inmunógeno de péptido es derivado de un antígeno de proteína de un parásito seleccionado de un plasmodio, una trypanosoma, una esquistosoma y una leishmania.

En otra modalidad, el inmunógeno de péptido es derivado de un antígeno de proteína de un eucarionte. En una modalidad preferida, el eucarionte es un humano.

En todavía otra modalidad preferida, el inmunógeno de péptido de humano es derivado de un tumor maligno. En una modalidad preferida, el inmunógeno de péptido es de un antígeno de tumor de un carcinoma de célula renal, un carcinoma de pecho, un melanoma y un carcinoma de próstata. En otra modalidad preferida, el antígeno de péptido es derivado del antígeno de tumor, antígeno carcinoembriónico (CEA).

En un aspecto, la invención proporciona un inmunógeno de péptido que comprende péptido Aβ o fragmentos de Aβ o análogos de los mismos, que producen una respuesta inmunogénica contra ciertos epítopos dentro de Aβ. Péptidos inmunogénicos de la invención incluyen péptidos heterólogos inmunogénicos. En algunos péptidos inmunogénicos, un fragmento Aβ es enlazado a un portador para formar un péptido heterólogo inmunogénico y luego este péptido heterólogo es enlazado a un portador

utilizando un método de la presente invención para formar un conjugado.

En otro aspecto de la invención, el inmunógeno de péptido es un polipéptido que comprende un segmento N-terminal de por lo menos residuos 1-5 de Aβ, el primer residuo de Aβ es el residuo N-terminal del polipéptido, en donde el polipéptido está libre de un segmento C-terminal de Aβ. El todavía otro aspecto de la invención, el inmunógeno de péptido es un polipéptido que comprende un segmento N-terminal de Aβ, el segmento comienza en el residuo 1-3 de Aβ y termina en los residuos 7-11 de Aβ. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un agente que induce una respuesta inmunogénica contra un segmento N-terminal de Aβ, el segmento comienza en el residuo 1-3 de Aβ y termina en los residuos 7-11 de Aβ sin inducir una respuesta inmunogénica contra un epítopo dentro de los residuos 12-43 de Aβ43. En otro aspecto de la invención, el inmunógeno de péptido es un polipéptido heterólogo que comprende un segmento de Aβ enlazado a una secuencia de aminoácido heteróloga que induce una respuesta de célula T auxiliar contra la secuencia de aminoácidos heteróloga y mediante esto una respuesta de célula B contra el segmento N-terminal.

En algunos inmunógenos de péptido, el segmento N-terminal de Aβ está enlazado en su término C a un polipéptido heterólogo. En algunos inmunógenos de péptido, el segmento N-terminal de Aβ está enlazado a su término N a un polipéptido heterólogo. En algunos inmunógenos de polipéptido, el segmento N-terminal de Aβ está enlazado a sus términos N y C a primeros y segundos polipéptidos heterólogos. En algunos inmunógenos de péptido, el segmento N-terminal de Aβ está enlazado a su

término N a un polipéptido heterólogo y en su término C a por lo menos una copia adicional del segmento N-terminal. En algunos inmunógenos de péptido, el polipéptido comprende del término C al término C, el segmento N-terminal de Aβ una pluralidad de copias adicionales del segmento N-terminal y el segmento de aminoácido heterólogo.

En algunos de los inmunógenos de péptido anteriores, el polipéptido comprende además por lo menos una copia adicional del segmento N-terminal. En algunos de los inmunógenos de péptido anteriores, el fragmento está libre de por lo menos los 5 aminoácidos C-terminales en Aβ43.

En algunos aspectos de los inmunógenos de péptido anteriores, el fragmento comprende hasta 10 aminoácidos contiguos de Aβ.

En otro aspecto, la invención proporciona un inmunógeno de péptido que comprende el péptido Aβ o fragmentos de Aβ o análogos de los mismos que producen una respuesta inmunogénica contra ciertos epítopos dentro de Aβ pueden estar en una configuración denominada configuración de péptido antígeno múltiple (MAP).

En algunos de los aspectos anteriores de la invención, el inmunógeno de péptido de la mitad N-terminal de Aβ. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 3-6 y 3-7. En algunos aspectos anteriores de la invención, el inmunógeno de péptido es de la región interna de Aβ. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ13-28, 15-24, 17-28 y 25-35. En algunos de los aspectos anteriores de la invención,

el inmunógeno de péptido del extremo C-terminal de Aβ. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ33-42, 35-40 y 35-42. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 1-12, 1-16, 1-28, 3-6, 3-7, 13-28, 15-24, 17-28, 25-35, 33-42, 35-40, y 35-42. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ1-5, Aβ1-7, Aβ1-9 y Aβ1-12. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ1-5-L, Aβ-1-7-L, Aβ1-9-L, y Aβ1-12-L, en donde L es un enlazador. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ1-5-L-C, Aβ1-7-1-C, Aβ1-9-L-C, y Aβ1-12-L-C, en donde C es un residuo de aminoácidos de cisteína.

En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ16-22, Aβ16-23, Aβ17-23, Aβ17-24, Aβ18-24 y Aβ18-25. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ16-22-C, Aβ16-23-C, Aβ17-23-C, Aβ17-24-C, Aβ18-24-C y Aβ18-25-C, en donde C es un residuo de aminoácido de cisteína. En otros aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento Aβ seleccionado del grupo que consiste de C-Aβ16-22, C-Aβ16-23, C-Aβ17-23, C-Aβ17-24, C-Aβ18-24 y C-Aβ18-25, en donde C es un residuo de aminoácido de cisteína.

En algunos de los inmunógenos de péptido anteriores, el polipéptido heterólogo es seleccionado del grupo que

consiste de péptidos que tienen un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de los mismos.

En una modalidad, el grupo funcional de una o más moléculas de aminoácido del portador de proteína/polipéptido o del enlazador de polipéptido anexado opcionalmente es derivado utilizando un reactivo de reticulación. En otra modalidad, el reactivo de derivación es un reactivo de reticulación de longitud cero. En otra modalidad, el reactivo de derivación es un reactivo de reticulación homobifuncional. En todavía otra modalidad, el reactivo de derivación es un reactivo de reticulación heterobifuncional.

En una modalidad preferida, el reactivo heterobifuncional es un reactivo que reacciona con un grupo funcional de amina primaria o grupo funcional ε-amina de una o más moléculas de aminoácido del portador de proteína/polipéptido y un grupo tiol pendiente de una o más moléculas de aminoácido del inmunógeno de péptido. En una modalidad, el reactivo heterobifuncional es bromoacetato de N-succinimidilo.

En otra modalidad, el grupo funcional de amina primaria o ε-amina es lisina. En todavía otra modalidad, la derivación del grupo funcional de amina primaria o ε-amina de la lisina del portador de proteína/polipéptido con bromoacetato de N-succinimidilo da como resultado la bromoacetilación de los residuos de amina primaria o ε-amina sobre moléculas de lisina sobre el portador de proteína/polipéptido. En una modalidad más preferida, el grupo tiol pendiente es un residuo de cisteína del inmunógeno de péptido que puede estar localizado en el término amino del inmunógeno péptido, en el término carboxi del inmunógeno de péptido o internamente en el inmunógeno de

péptido.

En otra modalidad, el grupo tiol pendiente es generado mediante un reactivo de tiolación tal como N-acetil homocisteintio lactona, reactivo de Traut (2-iminotilano), SATA (S-acetiltioacetato de N-succinimidilo), SMPT (4-succinimidiloxicarbonil-metil-2-piridilditio tolueno), Sulfo LC SPDP (hexanoato de sulfo succinimidil piridil ditio propionamido), SPDP (Ditio propionato de succinimidil piridilo). En una modalidad preferida, el reactivo de coronación que es usado para inactivar los grupos funcionales reactivos libres sobre el portador de proteína/polipéptido activado es seleccionado del grupo de reactivos que consiste de cisteamina, N-acetilcisteamina y etanolamina.

En una modalidad particularmente preferida, el reactivo de coronación que es usado para inactivar los grupos funcionales reactivos libres, sobre el portador de proteína/polipéptido activado es seleccionado del grupo de reactivos que consisten de hidróxido de sodio, carbonato de sodio, bicarbonato de amonio y amoníaco.

En una modalidad, el grupo reactivo del residuo de aminoácido del inmunógeno de péptido es un grupo sulfhidrilo libre.

En otra modalidad, uno o más de los grupos funcionales están sobre un enlazador, el cual está anexado opcionalmente al portador de proteína/polipéptido. En una modalidad preferida, el enlazador es un enlazador de péptidos. En una modalidad preferida, el enlazador de péptidos es polilisina.

En otra modalidad, la invención es concerniente con un segundo método para conjugar un inmunógeno de péptido de una

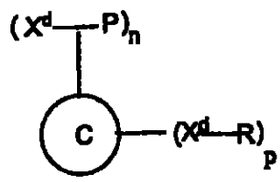
proteína/polipéptido con un portador de proteína/péptido que tiene la estructura:



en donde,

C es un portador de proteína/polipéptido y X es un grupo funcional derivable de un residuo de aminoácido sobre el portador de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido anexado covalentemente al portador de proteína/polipéptido y en donde m es un número entero mayor de 0, pero menor o igual a 85, el método comprende las etapas de: (a) derivar uno o más de los grupos funcionales del portador de proteína/polipéptido o de la molécula enlazadora anexada opcionalmente para generar una molécula derivada con sitios reactivos; (b) hacer reaccionar el portador de proteína/polipéptido derivado de la etapa (a) con un grupo reactivo de un residuo de aminoácido del inmunógeno de péptido para formar un conjugado de portador de inmunógeno-proteína/polipéptido de péptido acoplado covalentemente y (c) hacer reaccionar adicionalmente el conjugado con un reactivo de coronación para inactivar los grupos funcionales reactivos libres sobre el portador de proteína/polipéptido activado, de tal manera que los grupos coronados no están libres para reaccionar con otras moléculas, en los que se incluyen proteínas/polipéptidos, conservando mediante esto la funcionalidad del portador, de tal manera que retiene su capacidad para producir las respuestas inmune deseadas contra

el inmunógeno de péptido que de otra manera no ocurrirían sin un portador para generar un conjugado de inmunógeno de péptido-portador de proteína/polipéptido coronado que tiene la fórmula:



en donde,

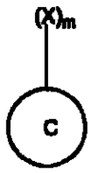
C es el portador de proteína/polipéptido y X^d es un grupo funcional derivado de un residuo de aminoácido de portador de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido anexado covalentemente al portador de proteína/polipéptido y en donde,

P es la molécula de inmunógeno de péptido anexada covalentemente al grupo funcional derivado sobre el residuo de aminoácido sobre el portador de proteína u opcionalmente sobre un residuo de aminoácido sobre un enlazador de péptido anexado covalentemente a un portador de proteína/polipéptido, R es una molécula de coronación anexada covalentemente al grupo funcional derivado sobre un residuo de aminoácidos sobre el portador de proteína/polipéptido u opcionalmente sobre un residuo de aminoácido sobre un enlazador de péptido anexado covalentemente a un portador de proteína/polipéptido, n es un número entero mayor de 0, pero menor o igual a 85, y p es un número entero mayor de 0 pero menor de 85.

Las modalidades detalladas del primer método descrito

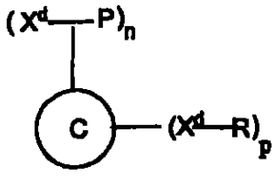
anteriormente también son aplicables a los conjugados recién descritos preparados por el segundo método.

En una modalidad, la invención es concerniente con conjugados de inmunógeno de péptido-portador de proteína/polipéptido en donde el portador de proteína/polipéptido tiene la fórmula:



en donde,

C es un portador de proteína/polipéptido y X es un grupo funcional derivable de un residuo de aminoácido sobre el portador de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido anexado covalentemente al portador de proteína/polipéptido y en donde m es un número entero mayor de 0, pero menor o igual a 85 y en donde el conjugado de inmunógeno de péptido-portador de proteína/polipéptido coronado tiene la fórmula:



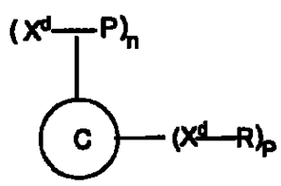
en donde,

C es un portador de proteína/polipéptido y X^d es un grupo opcional derivado de un residuo de aminoácido del portador de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo

de aminoácido de un enlazador de péptido anexado covalentemente al portador de proteína/polipéptido y en donde P es la molécula de inmunógeno de péptido anexada covalentemente al grupo opcional derivado del residuo de aminoácido portador de proteína u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido anexado covalentemente a un portador de proteína/polipéptido, R es una molécula de coronación anexada covalentemente al grupo funcional derivado de un residuo de aminoácido de portador de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptido anexado covalentemente a un portador de proteína/polipéptido, conservando mediante esto la funcionalidad del portador, de tal manera que retiene su capacidad para producir las respuestas inmunes deseadas contra el inmunógeno de péptido que de otra manera no ocurrían sin un portador, n es un número entero mayor de 0, pero menor o igual a 85, y p es un número entero mayor de 0 pero menor de 85.

Las modalidades detallas de los primeros y segundos métodos descritos anteriormente también son aplicables a los conjugados recién descritos.

En otra modalidad, la invención es concerniente con conjugados de inmunógeno de péptido-portador de proteína/polipéptido generados de acuerdo con el segundo método de la invención y que tienen la fórmula:



en donde,

C es un portador de proteína/polipéptido y X^d es un grupo funcional derivado de un residuo de aminoácido del portador de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácidos de un enlazador de péptidos anexado covalentemente al portador de proteína/polipéptido y en donde P es la molécula de inmunógeno de polipéptido anexada covalentemente al grupo funcional derivado del residuo de aminoácido del portador de proteína u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptidos anexado covalentemente a un portador de proteína/polipéptido, R es una molécula de coronación anexada covalentemente al grupo funcional derivado de un residuo de aminoácido del portador de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un enlazador de péptidos anexado covalentemente a un portador de proteína/polipéptido, conservando mediante esto la funcionalidad del portador, de tal manera que retiene su capacidad para producir las respuestas inmunes deseadas contra el inmunógeno de péptido que de otra manera no ocurriría sin un portador, n es un número entero mayor de 0 pero menor o igual a 85, y p es un número entero mayor de 0 pero menor de 85.

Las modalidades detalladas para el segundo método descrito anteriormente también son aplicables a los conjugados generados mediante el segundo método, como se describe.

En otra modalidad, la invención es concerniente con composición inmunógenas que comprenden un conjugado de un inmunógeno de péptido con un portador de proteína/polipéptido generado mediante el segundo método de la invención, junto con uno o más excipientes, diluyentes y adyuvantes aceptables farmacéuticamente.

Las modalidades detalladas del segundo método y los

conjugados generados mediante el mismo descrito anteriormente son también aplicables a composiciones inmunogénicas que contienen aquellos conjugados como se describe.

En otra modalidad, la invención es concerniente con un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto mamífero, que comprende administrar una cantidad efectiva de una composición inmunógena de la presente invención al sujeto.

Las modalidades detalladas aplicables a la composición inmunógena que contiene los conjugados de la presente invención son también aplicables a la modalidad de la invención concerniente con un método de uso de estas composiciones inmunogénicas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Diagrama de flujo que ilustra la química de proceso utilizada para la conjugación de fragmento de péptido de Aβ al portador de proteína/polipéptido CRM_{197} para formar un conjugado $A\beta/CRM_{197}$.

Figura 2: Diagrama de flujo que ilustra la química de hidrólisis ácida usada para la determinación cuantitativa de S-carboximetilcisteína y S-carboximetilcisteamina como evaluación el grado de conjugación de conjugados de inmunógeno de péptido-proteína/polipéptido tal como el conjugado $A\beta/CRM_{197}$.

Figura 3: Esta figura ilustra la dependencia del pH de la reacción de conjugación de péptido Aβ/CRM.

Figura 4: Esta figura ilustra la dependencia de la conjugación del péptido Aβ/CRM sobre el péptido: proporción CRM.

Figura 5: Verificación del proceso de coronación para la conjugación de Aβ-7/CRM. El pH de la reacción fue de 9.15.

El tiempo de reacción con el péptido fue de 16 horas, la coronación con N-acetilcisteamina fue de 8 horas.

Figura 6: Conjugación y coronación con varias proporciones de péptido: CRM con péptido. El pH de la reacción fue de 9.0. El tiempo de reacción con el péptido fue de 16 horas, la coronación con N-acetilcisteamina fue de 8 horas.

Figura 7: Títulos al día 36 de suero de primate enseguida de la inmunización de primates con conjugados de polipéptido Aβ con varios adyuvantes.

Figura 8: Títulos al día 64 de sueros de primate enseguida de la inmunización de los primates con conjugados de Aβ-péptido con varios adyuvantes.

Figura 9: Títulos de primates por día y grupo de tratamiento. Los primates fueron inmunizados con Aβ1-7 ó conjugados de Aβ1-5 CRM_{197} con alumbre o 529 como adyuvantes o títulos de anticuerpos anti-Aβ fueron medidos al día 29, 36, 57 y 64.

Figura 10: Conjugados de péptido-proteína fueron caracterizados utilizando SDS-PAGE análisis de Bandas de Proteínas con un gel de pre-moldeo de tris-tricina. Los carriles son: marcador (carril 1); L-28375 24/01 (carril 2); L-28375 24/02 (carril 3); L-28375 24/03 (carril 4); L-28375 24/04 (carril 5); L-28375 24/05 (carril 6); L-28375 24/06 (carril 7) L-28375 24/07 (carril 8); L-28375 24/08 (carril 9); L-28375 24/09 (Mock) (carril 10); y, $BrAcCRM_{197}$ (carril 11):

BREVE DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:	Secuencia	Descripción
1	DAEFR-C	Aβ1-5-C
2	DAEFRHD-C	Aβ1-7-C
3	DAEFRHDSG-C	Aβ1-9-C
4	DAEFRHDSGYEV-C	Aβ1-12-C
5	DAEFR-GAGA-C	Aβ1-5-L-C
6	DAEFRHD-GAGA-C	Aβ1-7-L-C
7	DAEFRHDSG-GAGA-C	Aβ1-9-L-C
8	DAEFRHDSGYEV-GAGA-C	Aβ1-12-L-C
9	VEYGSDHRFEAD-C	Aβ12-1-C
10	GAGA	Péptido enlazador
11	PKYVKQNTLKLAT	Hemaglutitina de influenza: $HA_{307-319}$
12	AKXVAAWTLKAAA	Péptido PAN-DR (péptido PADRE)

SEQ ID NO:	Secuencia	Descripción
13	EKKIAKMEKASSVFNV	Malaria CS: epítopo T3
14	FELLTRILTI	Antígeno superficial de hepatitis: HB_5Ag_{19-28}
15	DQSIGDLIAEAMDKVGNEG	Proteína de choque térmico 65: $hsp65_{153-171}$
16	QFHFQPLPPAVVKL	Bacilo de Calmette-Guerin

24	DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	AN90542:$A\beta_{1-7}$/$TT_{830-844}$ (usado en configuración MAP4)
25	EFRHDSG-QYIKANSKFIGITEL	AN90576:$A\beta_{3-9}$/$TT_{830-844}$ (usado en configuración MAP4)
26	AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD	AN90562: $A\beta_{1-7}$/PADRE
27	DAEFRHD-DAEFRHDD-AEFRHDAKXVAAWTLKAAA	AN90543: $A\beta_{1-7}$ x 3/PADRE
28	AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD	PADRE/$A\beta_{1-7}$x 3
29	DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA	$A\beta_{1-7}$ x 3/PADRE
30	DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR	$A\beta_{1-7}$/fragmento de albúmina

SEQ ID NO:	Secuencia	Descripción
36	DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT	$A\beta_{1-7}$ x 2/$HA_{307-319}$
37	DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD	$A\beta_{1-7}$/$HA_{307-319}$/CS Malaria/$TT_{830-844}$/$TT_{947-967}$/$A\beta_{1-7}$
38	DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	$A\beta_{1-7}$ x 3/$TT_{830-844}$/C/$TT_{947-967}$
39	DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	$A\beta_{1-7}$/$TT_{830-844}$/C/$TT_{947-967}$

SEQ ID NO:	Secuencia	Descripción
41	ISQAVHAAHAEINEAGR	Fragmento de albúmina
42	DAEFGHDSGFEVRHQKLVFFAEDVGSN KGAIIGLMVGGVVIA	$A\beta_{1-42}$ Murino
43	VFFAEDVG-C	$A\beta_{18-25}$-C
44	LVFFAEDV-C	$A\beta_{17-24}$-C
45	KLVFFAED-C	$A\beta_{16-23}$-C
46	C-VFFAEDVG	C- $A\beta_{18-25}$
47	C-LVFFAEDV	C- $A\beta_{17-24}$
48	C-KLVFFAED	C- $A\beta_{16-23}$
49	VFFAEDV-C	$A\beta_{18-24}$-C
50	LVFFAED-C	$A\beta_{17-23}$-C
51	KLVFFAE-C	$A\beta_{16-22}$-C
52	C-VFFAEDV	C- $A\beta_{18-24}$
53	C-LVFFAED	C- $A\beta_{17-23}$
54	C-KLVFFAE	C- $A\beta_{16-22}$

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención es concerniente con métodos para generar conjugados de inmunógeno de péptido-portador en donde los grupos funcionales activos sin reaccionar sobre el portador que son generados durante la activación son inactivados al utilizar reactivos de coronación tales como N-acetilcisteamina con el fin de impedir que reaccionen adicionalmente. La presente invención también es concerniente con conjugados de portador-inmunógeno de péptido coronados generados mediante aquellos métodos y con composiciones inmunógenas que comprenden tales conjugados.

El procedimiento de inmunogenicidad incrementada de moléculas pequeñas o moléculas deficientemente inmunógenas, tales como sacáridos, por medio de conjugación se ha utilizado exitosamente por décadas (véase, por ejemplo, Goebel *et al.* (1939) J. Exp. Med. 69:53), y muchas composición inmunógenas han sido descritas en las cuales polímeros capsulares purificados han sido conjugados a proteínas portadoras para crear composiciones inmunogénicas más efectivas al aprovechar este "efecto portador". Por ejemplo, Schneerson *et al.* (J. Exp. Med. 152:361-376, 1980), describe conjugados de proteínas de polisacáridos de *Haemophilus influenzae* b que confieren inmunidad a enfermedades invasivas provocadas por aquel microorganismo.. Los conjugados de PRP (fosfato de

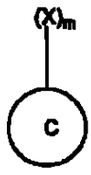
poliribosilribitol, un polímero capsular de *H. influenzae* b) han demostrado ser más efectivo que las composiciones inmunogénicas a base del polisacárido solo (Chu *et al.* (1983) Infect. Immun. 40:245, Shneerson *et al.* (1984), Infect. Immun. 45:582-591). La conjugación también ha demostrado desviar la respuesta de anticuerpo deficiente usualmente observada en infantes cuando son inmunizados con un polisacárido libre (Anderson *et al.* (1985) J. Pediatr. 107:346; Insel *et al.* (1986) J. Exp. Med. 158:294).

Una ventaja adicional de utilizar como el portador de proteína una toxina bacteriana o toxoide contra la cual la inmunización de rutina de humanos (por ejemplo, tétanos o difteria) es una práctica estándar es que una inmunidad deseada a la toxina o toxoide es inducida junto con inmunidad contra los patógenos asociados con el polímero capsular.

Los conjugados de determinante antígeno/hapteno-portador también son usados para producir anticuerpos monoclonales altamente específicos que pueden reconocer epítopos químicos discretos sobre el hapteno acoplado. Los anticuerpos monoclonales resultantes frecuentemente son usados para investigar la estructura epitópica e interacciones entre proteínas naturales. En muchos casos, los determinantes/haptenos antígenos usados para generar estos monoclonales son segmentos de péptido pequeños que representan sitios antigénicos cruciales sobre la superficie de proteínas más grandes. Los criterios para que un portador exitoso sea usado para generar un conjugado de determinante/portador de hapteno antígeno son el potencial por inmunogenicidad, la presencia de grupos funcionales apropiados para conjugación con el determinante/hapteno antigénico, propiedades de solubilidad

razonables aún después de derivación y carencia de toxicidad in vivo.

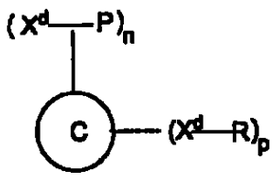
Estos criterios son satisfechos por los conjugados generados mediante los métodos de la presente invención. Los conjugados pueden ser cualesquier conjugado de inmunógeno de péptido-portador estables generados utilizando el proceso de conjugación descrito en la presente. Los conjugados son generados utilizando un proceso de la presente invención en donde un portador de proteína/polipéptido que tiene la siguiente estructura:



es enlazado covalentemente a un portador de proteína/polipéptido,

en donde,

C es un portador de proteína/polipéptido y X es un grupo funcional derivable sobre un residuo de aminoácido del portador de proteína/polipéptido u opcionalmente sobre un residuo de aminoácido sobre un enlazador de péptido anexado covalentemente al portador de proteína/polipéptido y en donde m es un número entero mayor de 0, pero menor o igual a 85, es anexado covalentemente a un inmunógeno de péptido y en donde el conjugado de inmunógeno de péptido-portador de proteína/polipéptido tiene la siguiente fórmula, es representado por la siguiente fórmula:



en donde,

C es el portador de proteína/polipéptido y X^d es un grupo funcional derivado sobre un residuo de aminoácido del portador de proteína/polipéptido u opcionalmente sobre un residuo de aminoácido sobre un enlazador de péptido anexado covalentemente al portador de proteína/polipéptido, P es un inmunógeno de polipéptido anexado covalentemente al grupo funcional derivado sobre el residuo de aminoácido del portador de proteína/polipéptido u opcionalmente sobre un residuo de aminoácido sobre un enlazador de polipéptido anexado covalentemente a un portador de proteína/polipéptido, R es una molécula de coronación anexada covalentemente al grupo funcional derivado sobre un residuo de aminoácido sobre el portador de proteína/polipéptido u opcionalmente sobre un residuo de aminoácidos sobre un enlazador de polipéptido anexado covalentemente a un portador de proteína/polipéptido, conservando mediante esto la funcionalidad del portador, de tal manera que retiene su capacidad para producir las respuestas inmune deseadas contra el inmunógeno de péptido que de otra manera no ocurría sin un portador, n es un número entero mayor de 0, pero menor o igual a 85, y p es un número entero mayor de 0 pero menor de 85.

Selección de Portadores

Algunos inmunógenos de péptido contienen el epítopo apropiado para inducir una respuesta inmune, pero son demasiado pequeños para ser inmunógenos. En esta situación, los

inmunógenos de péptido son enlazados a un portador apropiado para ayudar a producir una respuesta inmune. En la representación esquemática anterior del conjugado de inmunógenos de péptido-portador generados mediante un proceso de la presente invención, C es un portador de proteína/polipéptido al cual inmunógenos de péptido son conjugados directamente vía grupos funcionales derivados sobre residuos de aminoácidos sobre el portador mismo o indirectamente vía grupos funcionales derivados sobre enlazadores de polipéptido anexados covalentemente a los portadores. Portadores de proteína/polipéptidos apropiados incluyen, pero están limitados a, albúmina (en los que se incluyen albúmina de suero humano), hemocianina de lapa de bocallave, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina, toxoide de tétanos o un toxoide de otras bacterias patógenas que tienen toxicidad reducida, en los que se incluyen mutante, tales como difteria, *E. coli*, cólera, ó *H. pylori* o un derivado de toxina atenuado. Uno de tales portadores es la proteína CRM_{197} (SEQ ID NO: 40) que es de reactividad cruzada con la toxina de difteria.

Otros portadores incluyen epítopos de células T que se enlazan a múltiples alelos MHC, por ejemplo por lo menos 75% de todos los alelos de MHC humanos. Tales portadores son algunas veces conocidos en el arte como "epítopos de célula T universales". Portadores ejemplares con epítopos de células T universales incluyen:

Hemaglutinina de Influenza: $HA_{307-319}$	PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 11)
Péptido de PAN-DR (péptido PADRE)	AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 12)

CS malaria:epítopo T3	EKKIAKMEKASSVFNV (SEQ ID NO: 13)
Antígeno de superficie de Hepatitis B: HB_sAg_{19-28}	FELLTRILTI (SEQ ID NO: 14)
Proteína de choque térmico 65: $hsp65_{153-171}$	QSIGDLIAEAMDKVGNEG (SEQ ID NO: 15)
Bacilo Calmette-Guerin (BCG)	QVHFQPLPPAVVKL (SEQ ID NO: 16)
Toxoide de tétanos: $TT_{830-844}$	QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 17)
toxoide de tétanos: $TT_{947-967}$	NNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 19)
CRM_{197}	Véase la Breve Descripción de las Secuencias (SEQ ID NO: 40)
Fragmento de albúmina	ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 41)

Otros portadores para estimular o mejorar una respuesta inmune y a los cuales un inmunógeno de péptido o un hapteno puede ser conjugado incluyen citocinas tales como IL-1, IL-1 α y β, IL-2, γINF, IL-10, GM-CSF, y quimiocinas tales como MIP 1 α y β y RANTES. Péptidos inmunogénicos pueden también ser enlazados a portadores de proteína/péptido que mejoran el transporte a través de tejidos, como se describe en O'Mahony, WO 97/17163 y WO 97/17614, que son incorporados en la presente por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

Todavía portadores adicionales incluyen peptidasa estreptococal C5a recombinante, *Streptococcus pyrogenes* ORF

1224, 1664 y 2452, *Chlamydia pneumoniae* ORF T367 y T858, factores de crecimiento y hormonas.

En una modalidad preferida de la presente invención, la proteína portadora es CRM_{197}, un mutante no tóxico de toxina de difteria con un cambio de aminoácido en su secuencia primaria. La glicina presente en la posición de aminoácido 52 de la molécula es reemplazada con un ácido glutámico debido a un solo cambio de codón de ácido nucleico. Debido a este cambio, la proteína carece de actividad ADP-ribosiltransferasa y se vuelve no tóxica. Tiene un peso molecular de 58,408 Da. CRM_{197} es producido en grandes cantidades mediante expresión recombinante de acuerdo con la patente estadounidense 5,614,382, que es incorporada en la presente por referencia. Conjugaciones de sacáridos también como péptidos a CRM_{197} se llevan a cabo mediante enlace por medio de grupos ε-amino de residuos de lisina. Se ha establecido bien por medio de varios productos comerciales que CRM_{197} es un portador excelente y seguro para epítopos de célula B.

Péptidos inmunogénicos

Como se usa en la presente, el término "inmunógeno de péptido" o "hapteno" es cualquier proteína o estructura subunitaria/fragmento/análogo derivado del mismo que puede producir, facilitar o ser inducido para producir una respuesta inmune en la administración a un mamífero. En particular, el término es usado para referirse a un polipéptido poligénico determinante de cualquier fuente (bacteria, virus o eucarionte), el cual puede ser acoplado a un portador utilizando un método revelado en la presente. Tales

determinantes de inmunógeno de polipéptido/antigénico pueden ser de origen viral, bacteriano o de célula eucarióntica.

Los inmunógenos de péptido de una célula bacteriana incluyen aquellos derivados de la superficie celular bacteriana o proteínas secretadas, las cuales pueden ser usadas en composiciones inmunogénicas a base de proteína. Cepas bacterianas ejemplares incluyen *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, Neisseria spp., Pseudomonas spp., Salmonella spp., Shigella spp., *Alloiococcus otiditis* y Grupo de *B streptococci*.

Inmunógenos de péptido ejemplares de virus incluyen aquellos derivados de virus de inmunodeficiencia humana (HIV), virus de herpes simplex (HSV), virus de papiloma humano (HPV), virus de parainfluenza (PIV), virus de estomatitis vesicular (VSV), virus sincitial respiratorio (RSV), virus de Epstein-Barr (EBV), coronavirus, virus de vacuna, rotavirus, virus de rabia, virus de hepatitis C (HCV) y virus de hepatitis B (HBV) para nombrar unos pocos.

Inmunógenos de péptido fungales ejemplares incluyen aquellos derivados de *Candida albicans*, Coccidoides spp., Histoplasma spp. y Aspergillus spp. Antígenos parásitos incluyen aquellos derivados de Plasmodium spp., Trypanosoma spp., Schistosoma spp., Leishmania spp. y los semejantes.

Inmunógenos de péptido eucarióticos ejemplares que pueden ser conjugados a un portador para uso como un inmunoterapéutico en la prevención, tratamiento, profilaxis de alivio de varias enfermedades humanas incluyen aquellos asociados con células de tumor, aquellos derivados de Aβ, un péptido de 39-43 aminoácidos, preferiblemente 42 aminoácidos, que es el componente principal de placas características de

enfermedad de Alzheimer (AD) (véase patente estadounidense 4,666, 829; Glenner y Wong (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 1131, Hardy (1984) *TINS 20*: 1131 ; Hardy (1977) *TINS 20*: 154), aquellos derivados de péptidos amiloides de amilina, un material de polipéptido producido mediante células de isleta pancreáticas que ha estado implicado en diabetes tipo II, péptidos derivados de productos genéticos de lipoproteína de baja densidad, que han estado implicados en aterosclerosis y péptidos antigénicos derivados de citocinas inflamatorias y factores de crecimiento tales como interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis de tumor α (TNFα) y GDF-8. Tales inmunógenos de péptido eucariónticos pueden incluir ya sea epítopos de célula T (CTL) o epítopos de célula B.

Un epítopo de "CTL" es uno derivado de regiones epitópicas seleccionadas de antígenos objetivo potenciales, tales como antígenos asociados al tumor en los que se incluyen pero no limitados a carcinoma de célula renal, cáncer de pecho, antígenos carcinoembriónicos, antígenos de melanoma (MAGE) y antígenos específicos de cáncer de próstata tales como antígenos de membrana específico de próstata (PMSA) y antígenos de célula de tallo de próstata (TSCA), antígenos de hepatitis C.

El Aβ, también conocido como péptido β-amiloide o péptido A4 (véase patente estadounidense 4,666,829, Glenner y Wong, *Biochem. Biophys, Res. Commun.* 120: 1131 (1984)), es un péptido de 39-43 aminoácidos, que es el componente principal de placas características de enfermedad de Alzheimer. Aβ es generado mediante el procesamiento de una proteína más grande APP mediante dos enzimas, denominadas β y γ secretasas (véase Hardy, *TINS 20*, 154 (1997)). Las mutaciones conocidas en APP

asociadas con enfermedad de Alzheimer ocurren próximas al sitio de β ó γ secretasa o dentro de Aβ. Por ejemplo, la posición 717 está próxima al sitio de escisión de γ-secretasa de APP en su procesamiento a Aβ y las porciones 670/671 están próximas al sitio de escisión de β-secretasa. Se cree que las mutaciones provocan AD mediante interacción con las reacciones de escisión mediante las cuales Aβ es formado para incrementar la cantidad de la forma de aminoácido 42/43 de Aβ generado.

Aβ tiene la propiedad inusual que se puede fijar y activar tanto cascadas de complemento clásicas como alternativas. En particular, se enlaza a C1q y finalmente a C3bi. Esta asociación facilita el enlace a macrófagos que conducen a la activación de células B.

Además, C3bi se rompe adicionalmente y luego se enlaza a CR2 sobre células B de manera dependiente de la célula T conduciendo a un incremento de 10,000 veces en la activación de estas células. Este mecanismo provoca que Aβ genere una respuesta inmune en exceso de aquella de otros antígenos.

Aβ tiene varias formas que se expresan de manera estable en la naturaleza. Las formas humanas de Aβ son denominadas como Aβ39, Aβ40, Aβ41, Aβ42 y Aβ43. Las secuencias de estos péptidos y su relación con el precursor de APP son ilustradas por la Figura 1 de Hardy et al., TINS 20, 155-158 (1997). Por ejemplo, Aβ42 tiene la secuencia:

H_2N-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH (SEQ ID NO. 21).

Aβ41, Aβ40 y Aβ39 difieren de Aβ42 por la omisión de Ala, Ala-Ile y Ala-Ile-Val respectivamente del extremo C-terminal. Aβ43 difiere de Aβ42 por la presencia de un residuo de treonina en el término C.

Los inmunógenos de péptido que son fragmentos de Aβ son ventajosos en relación con la molécula intacta para el uso en los métodos presentes por varias razones. En primer lugar, debido a que solamente ciertos epítopos dentro de Aβ inducen una respuesta inmunogénica útil para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, una dosificación igual de masa de un fragmento que contiene tales epítopos proporciona mayor concentración molar de los epítopos inmunogénicos útiles que una dosificación d Aβ intacto. En segundo lugar, ciertos inmunógenos péptidos de Aβ generan una respuesta inmunogénica contra depósitos amiloides sin generación de una respuesta inmunogénica significativa contra proteína APP de la cual Aβ se deriva. En tercer lugar, los inmunógenos de péptidos de Aβ son más simples de manufacturar que Aβ intacto debido a su tamaño más corto. En cuarto lugar, los inmunógenos de péptidos de Aβ no se agregan de la misma manera como Aβ intacto, simplificando la separación de conjugados con portadores.

Algunos inmunógenos de péptido de Aβ tienen una secuencia de por lo menos 2, 3, 5, 6, 10 ó 20 aminoácidos contiguos de un péptido natural. Algunos inmunógenos de péptido no tienen más de 10, 9, 8, 7, 5 ó 3 residuos contiguos de Aβ. En una modalidad preferida, inmunógenos de péptido de la mitad N-terminal de Aβ son usados para preparar conjugados. Inmunógenos de péptido preferido incluyen Aβ 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-11, 3-7, 1-3 y 1-4. La designación Aβ 1-5 por ejemplo,

indica un fragmento N-terminal que incluye residuos 1-5 de Aβ. Los fragmentos de Aβ que comienzan en el término N que terminan en un residuo dentro de los residuos 7-11 de Aβ son particularmente preferidos. El fragmento Aβ 1-12 puede también ser usado pero es menos preferido. En algunos métodos, el fragmento es un fragmento N-terminal diferente a Aβ 1-10. Otros fragmentos preferidos incluyen Aβ 15-24, 1-28, 25-35, 35-40, 35-42 y otros fragmentos internos y fragmentos C-terminales.

Algunos péptidos Aβ de la infección son péptidos inmunogénicos que en la administración a un paciente humano o animal generan anticuerpos que se enlazan específicamente a uno o más epítopos entre los residuos 16 y 25 de Aβ. Los fragmentos preferidos incluyen Aβ 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24 y 18-25. Los anticuerpos que se enlazan específicamente a epítopos entre los residuos 16 y 25 se enlazan específicamente a Aβ soluble sin enlazarse a las placas de Aβ. Estos tipos de anticuerpo pueden enlazarse específicamente a Aβ soluble en la circulación de un modelo de paciente o modelo de animal sin enlazarse específicamente a placas de depósitos de Aβ en el cerebro del paciente o modelo. El enlace específico de anticuerpos a Aβ soluble inhibe que el Aβ sea incorporado a placas, inhibiendo así ya sea el desarrollo de las placas en un paciente o inhibiendo un incremento adicional en el tamaño o frecuencia de placas si tales placas ya se han desarrollado antes de que el tratamiento sea administrado.

Preferiblemente, el fragmento de Aβ administrado carece de un epítopo que generaría una respuesta de célula T al fragmento. En general, los epítopos de célula T son mayores de 10 aminoácidos contiguos. Por consiguiente, los fragmentos

preferidos de Aβ son de tamaño 5-10 o preferiblemente 7-10 aminoácidos contiguos o más preferiblemente 7 aminoácidos contiguos; esto es, longitud suficiente para generar una respuesta de anticuerpo sin generar una respuesta de célula T. La ausencia de epítopos de célula T es preferida debido a que estos epítopos no son necesarios para la actividad inmunógena de fragmentos y puede provocar una respuesta inflamatoria indeseable en un subconjunto de pacientes (Anderson et al., (2002), *J. Immunol.* 168, 3697-3701; Senior (2002) *Lancet Neurol.*, 1,3).

El fragmento Aβ 15-25 y los subfragmentos de 7-8 aminoácidos contiguos de los mismos son preferidos debido a que éstos péptidos generan consistentemente una alta respuesta inmunogénica al péptido Aβ. Estos fragmentos incluyen Aβ16-22, Aβ16-23, Aβ16-24, Aβ17-23, Aβ17-24, Aβ18-24 y Aβ18-25. Los subfragmentos Aβ15-25 particularmente preferidos son 7 aminoácidos contiguos de longitud. La designación Aβ15-21 por ejemplo, indica un fragmento que incluye residuos 15-21 de Aβ y carecen de otros residuos de Aβ y preferiblemente 7-10 aminoácidos contiguos. Estos fragmentos pueden generar una respuesta de anticuerpo que incluye anticuerpos específicos del extremo.

Los inmunógenos de péptido de Aβ requieren selección en cuanto a claridad para despejar o impedir depósitos de amiloide (véase documento WO 00/72880, que es incorporado en la presente en su totalidad para todos los propósitos). La administración de fragmentos N-terminales de Aβ induce la producción de anticuerpos que reconocen depósitos de Aβ *in vivo* e *in vitro*. Los fragmentos que carecen de por lo menos uno y

por lo menos 5 ó 10 aminoácidos C-terminales presentes en las formas que se presentan de manera estable en la naturaleza de Aβ son usados en algunos métodos. Por ejemplo, un fragmento que carece de 5 aminoácidos del extremo C-terminal de Aβ43 incluye los primeros 38 aminoácidos del extremo N-terminal de Aβ.

A no ser que se indique de otra manera, la referencia a Aβ incluye tanto las secuencias de aminoácidos humanas naturales indicadas anteriormente también como análogos en los que se incluyen alélicos, especies y variantes inducidas. Los análogos difieren comúnmente de los péptidos que se presentan de manera estable en la naturaleza en 1, 2 o pocas posiciones, frecuentemente en virtud de sustituciones conservadoras. Los análogos exhiben comúnmente por lo menos 80 ó 90% de identidad de secuencia con los péptidos naturales. Algunos análogos también incluyen aminoácidos no naturales o modificaciones de aminoácidos N- ó C-terminales en 1, 2 o pocas posiciones. Por ejemplo, el residuo de ácido aspártico natural en posición 1 y/o 7 de Aβ puede ser reemplazado con ácido iso-aspártico.

Ejemplos de aminoácidos no naturales son aminoácidos D, alfa, alfa-disustituidos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico, 4-hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, epsilon-N,N,N-trimetillisina, epsilon-N-acetillisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, omega-N-metilarginina, β-alanina, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, tiroxina, ácido gamma-aminobutírico, homoserina, citrulina y ácido isoaspártico. Péptidos inmunogénicos también incluyen análogos de Aβ y fragmentos de los mismos. Algunos agentes terapéuticos de la invención son completamente péptidos D, por ejemplo, completamente D Aβ, completamente D fragmento Aβ o análogo de

completamente D Aβ o completamente D fragmento Aβ. Los fragmentos y análogos pueden ser seleccionados en cuanto a eficacia profiláctica o terapéutica en modelos de animales transgénicos en comparación con controles sin tratar o placebos como se describe en el documento WO 00/72880.

Los inmunógenos de péptido también incluyen péptidos más largos que incluyen por ejemplo un inmunógeno de péptido Aβ, junto con otros aminoácidos. Por ejemplo, péptidos inmunogénicos preferidos incluyen proteínas de fusión que comprenden un segmento de Aβ enlazado a una secuencia de aminoácidos heteróloga que induce una respuesta de célula T auxiliar contra la secuencia de aminoácidos heteróloga y mediante esto una respuesta de célula B contra el fragmento Aβ. Algunos polipéptidos pueden ser seleccionados en cuanto a eficacia profiláctica o terapéutica en modelos de animales en comparación con controles sin tratar o placebo como se describe en el documento WO 00/72880.

El péptido de Aβ, análogo, fragmento inmunogénico u otro polipéptido puede ser administrado en forma desagregada o agregada. Aβ desagregado o fragmentos del mismo significa unidades de péptido monoméricas. Aβ desagregado o fragmentos del mismo son en general solubles y son aptos de autoagregación para formar oligómeros solubles, protofibrilos y ADDL. Oligómeros de Aβ y fragmentos de los mismos son usualmente solubles y existen predominantemente como α-hélices o bobinas aleatorias. Aβ agregado o fragmentos de los mismos significa oligómeros de Aβ o fragmentos de los mismos que se han asociado en conjuntos β-hoja insolubles. Aβ agregados o fragmentos de los mismos también significa polímeros fibrilares. Los fibrilos

son usualmente insolubles. Algunos anticuerpos se enlazan ya sea a Aβ soluble o fragmentos del mismo o Aβ agregado o fragmentos del mismo. Algunos anticuerpos se enlazan tanto a Aβ soluble o fragmentos del mismo y Aβ agregado o fragmentos del mismo.

Los péptidos inmunogénicos también incluyen multímeros de péptidos inmunogénicos monoméricos. Los péptidos inmunogénicos diferentes a los péptidos Aβ deben inducir una respuesta inmunogénica contra uno o más de los fragmentos preferidos de Aβ enlistados anteriormente (por ejemplo, Aβ1-3, 1-7, 1-10 y 3-7).

Los péptidos inmunogénicos de la presente invención son enlazados a un portador utilizando un método de la presente invención para formar un conjugado. El péptido inmunogénico puede ser enlazado en su término amino, su término carboxilo o ambos a un portador para formar un conjugado. Opcionalmente, múltiples repeticiones del péptido inmunogénico pueden estar presentes en el conjugado.

Un fragmento N-terminal de Aβ puede ser enlazado en su término C a un péptido portador para formar un conjugado. En tales conjugados, el residuo N-terminal del fragmento de Aβ constituye el residuo N-terminal del conjugado. Así, tales conjugados son efectivos para inducir anticuerpos que se enlazan a un epítopo que requiere que el residuo N-terminal de Aβ esté en forma libre. Algunos péptidos inmunogénicos de la invención comprenden una pluralidad de repeticiones de un segmento N-terminal de Aβ enlazado al término C a una o más copias de un péptido portador para formar un conjugado. El fragmento N-terminal de Aβ incorporado a tales conjugados

algunas veces comienza en Aβ1-3 y termina en Aβ7-11. Aβ1-7, 1-3, 1-4, 1-5 y 3-7 son el fragmento N-terminal preferido de Aβ. Algunos conjugados comprenden diferentes segmentos N-terminal de Aβ en tándem. Por ejemplo, un conjugado puede comprender Aβ1-7 seguido por Aβ1-3 enlazado a un portador.

En algunos conjugados, un segmento N-terminal de Aβ enlazado en su extremo N-terminal a un péptido portador. La misma variedad de segmentos N-terminales de Aβ pueden ser usados como con enlace C-terminal. Algunos conjugados comprenden un péptido portador enlazado al término N de un segmento N-terminal de Aβ, el cual está a su vez enlazado a uno o más segmentos N-terminal adicionales de Aβ en tándem. Preferiblemente, tales fragmentos Aβ inmunogenicos, una vez conjugados a un portador apropiado, inducen una respuesta inmunogénica que está dirigida específicamente al fragmento Aβ sin estar dirigido a otros fragmentos de Aβ.

Los péptidos inmunogénicos de la invención incluyen péptidos heterólogos inmunogénicos. En algunos péptidos inmunogénicos; un fragmento Aβ está enlazado a un portador para formar un péptido heterólogo inmunogénico. Este péptido heterólogo es enlazado a un portador utilizando un método de la presente invención para formar un conjugado. Algunos de estos péptidos heterólogos inmunogénicos comprenden fragmentos de Aβ enlazados a epítopos de toxoide tetánico tal como se describen en las patentes estadounidenses 5,196,512, EP 378,881 y EP 427,347. Opcionalmente, un péptido inmunogénico puede ser enlazado a una o múltiples copias de un portador, por ejemplo, tanto en ambos términos N y C del portador para formar un péptido heterólogo inmunogénico. Otros de estos péptidos

heterólogos inmunogénicos comprenden fragmentos de Aβ enlazados a péptidos portadores descritos en la patente estadounidense 5,736,142. Por ejemplo, un péptido heterólogo inmunogénico puede comprender Aβ1-7 seguido por Aβ1-3 seguido por un portador. Ejemplos de tales péptidos heterólogos inmunogénicos incluyen:

Aβ1-7/toxoide tetánico 830-844 + 947-967 en una configuración lineal DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO.: 24)

Los péptidos descritos en la patente estadounidense 5,736,142 (todos en configuraciones lineales):

PADRE/Aβ 1-7:

AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD (SEQ IS NO.: 26)

Aβ1-7x3/PADRE:

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO.; 27)

PADRE/ Aβ1-7x3:

AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD (SEQ ID NO.: 28)

Aβ1-7/PADRE:

DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO.: 29)

Aβ1-7/fragmento de albúmina:

DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO.: 30)

Aβ4-10/ fragmento de albúmina:

FHRDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO.: 31)

Aβ3-9/fragmento de albúmina:

EFRHDSG-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO.: 32)

$HA_{307-319}$/ $A\beta_{1-7}$x3:

PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD (SEQ ID NO.: 33)

$A\beta_{1-7}/HA_{307-319}/A\beta_{1-7}$:

DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD (SEQ ID NO.: 34)

$A\beta_{1-7}x3/HA_{307-319}$:

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO.: 35)

$A\beta_{1-7}x2/HA_{307-319}$:

DAEFHRD-DAEFRHD-PKYVQNTLKLAT (SEQ ID NO.: 36)

$A\beta_{1-7}/HA_{307-319}$/Malaria CS/$TT_{830-844}$/$TT_{947-967}$/ $A\beta_{1-7}$

DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-QYIKANSKFIGITEL-

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD (SEQ ID NO.: 37)

$A\beta_{1-7}x3/TT_{830-844}/C/TT_{947-967}$

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSJFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

(SEQ ID NO.: 38)

$A\beta_{1-7}/TT_{830-844}/C/TT_{947-967}$

DAEFRHD-QYIKANSJFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO.: 39)

$A\beta_{1-7}/TT_{830-844}/C/TT_{947-967}/A\beta_{1-7}$

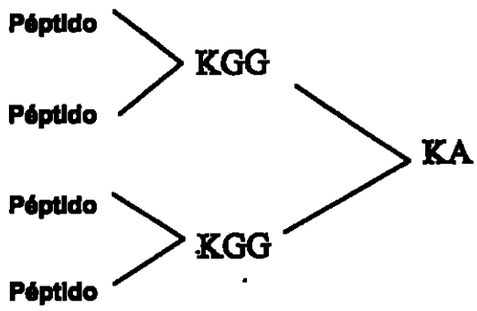
DAEFRHD-QYIKANSJFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD (SEQ ID

NO.: 20)

Algunos péptidos heterólogos inmunogénicos comprenden un multímero de péptidos inmunogénicos representados por la fórmula 2^x, en la cual x es un número entero de 1-5. Preferiblemente, x es 1, 2 ó 3, 2 es más preferido. Cuando x es 2, tal multímero tiene 4 péptidos inmunogénicos enlazados en una configuración preferida denominada como MAP4 (véase patente estadounidense 5,229,490). Tales péptidos inmunogénicos son luego enlazados a un portador utilizando un método de la presente invención para formar un conjugado.

La configuración MAP4 es mostrada a continuación, en donde estructuras ramificadas son producidas al iniciar la síntesis del péptido tanto en las cadenas laterales de aminas N-terminales de lisina. Dependiendo del número de veces que lisina es incorporada a la secuencia y se le permite ramificar, la estructura resultante presentará múltiples términos N. En

este ejemplo, cuatro términos N idénticos han sido producidos en el núcleo que contiene lisina ramificado. Tal multiplicidad mejora extensamente la sensibilidad de células B cognadas.



Ejemplos de tales péptidos heterólogos inmunogénicos incluyen:

Aβ1-7/toxoide tetánico 830-844 en una configuración MAP4:

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO.: 22)

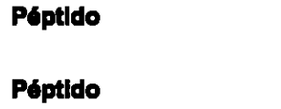
Aβ1-7/toxoide tetánico 947-967 en una configuración MAP4:

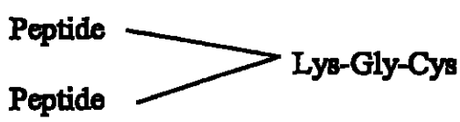
DAEFRHD-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO.: 23)

Aβ3-9/toxoide tetánico 830-844 en una configuración MAP4:

EFTHDSG-QIYANSKFIGITEL (SEQ ID NO.: 25)

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL sobre una resina de 2 ramificaciones





El péptido de Aβ, análogo, fragmento activo u otro polipéptido puede ser administrado en forma asociada o multimérica o en forma disasociada. Los agentes terapéuticos también incluyen multímeros de agentes inmunógenos monoméricos. Agentes diferentes a los péptidos Aβ deben inducir una respuesta inmunogénica contra uno o más de los fragmentos preferidos de Aβ enlistados anteriormente (por ejemplo, 1-10, 1-7, 1-3 y 3-7) y pueden también ser conjugados a un portador utilizando un método de la presente invención. Preferiblemente, tales agentes, una vez conjugados a un portador apropiado, inducen una respuesta inmunogénica que está dirigida específicamente a uno de estos fragmentos sin estar dirigido a otros fragmentos de Aβ. Para facilitar la conjugación de un inmunógeno péptido con un portador, aminoácidos adicionales pueden ser agregados a los términos de los determinantes antigénicos. Los residuos adicionales pueden también ser usados para modificar las propiedades físicas o químicas del inmunógeno de péptido. Aminoácidos tales como tirosina, cisteina, lisina, ácido glutámico o aspártico o lo semejante, pueden ser introducidos al término C- o N- del inmunógeno de péptido. Adicionalmente, enlazadores de péptido que contienen aminoácidos tales como glicina y alanina pueden también ser introducidos. Además, los determinantes antigénicos pueden diferir de la secuencia natural al ser modificados mediante la acilación del grupo NH_2 terminal, por ejemplo mediante alcanoilo (C1-C20) o acetilación de tioglicolilo, amidación terminal-carboxi, por ejemplo, amoníaco, metilamina, etc. En

algunas instancias, estas modificaciones pueden proporcionar sitios para el enlace a un soporte a otra molécula.

Los inmunógenos de péptido usados para generar conjugados de la presente invención utilizando un proceso revelado en la presente pueden ser combinados vía enlace para formar polímeros (multímeros) o pueden ser formulados en una composición sin enlace, como una mezcla. En donde un péptido está enlazado a un péptido idéntico, formando mediante esto un homopolímero, una pluralidad de unidades epitópicas repetitivas son presentadas. Por ejemplo, se usa la tecnología de péptido de antígeno múltiple (MAP) para construir polímeros que contienen tanto CTL y/o péptidos de anticuerpo y péptidos. Cuando los péptidos difieren, por ejemplo un coctel que representa diferentes subtipos virales, diferente epítopos dentro de un subtipo, especificidades de restricción de HLA diferentes o péptidos que contienen epítopos T-auxiliares, heteropolímeros con unidades repetitivas son provistos. Además de los enlaces covalentes, los enlaces no covalentes aptos de formar enlaces intermoleculares e intraestructurales también son contemplados.

Tales inmunógenos de péptido y sus análogos son sintetizados mediante síntesis de péptidos en fase sólida o expresión recombinante o son obtenidos a partir de fuentes naturales. Sintetizadores de péptido automáticos están disponibles comercialmente de numerosos proveedores tales como Applied Biosystems, Foster City, California.

La expresión recombinante puede estar en bacterias (tales como *E. coli*), levaduras, células de insectos o células de mamíferos. Procedimientos para expresión recombinante son descritos por Sambrook et *al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory*

Manual (Cold Spring Harbor Press, N Y 2ª edición, 1989). Algunos péptidos inmunogénicos también están disponibles comercialmente (por ejemplo, American Peptides Company, Inc., Sunnyvale. CA y California Peptide Research, Inc., Napa, CA).

Bibliotecas aleatorias de péptidos u otros compuestos pueden también ser seleccionados en cuanto a conveniencia como inmunógeno de péptido. Bibliotecas combinacionales pueden ser producidas para muchos tipos de compuestos que pueden estar sintetizados de manera paso a paso. Tales compuestos incluyen polipéptidos, miméticos de beta-vuelta, hormonas, glicinas oligoméricas N-sustituidas, oligocarbonatos y los semejantes. Bibliotecas combinacionales grandes de los compuestos pueden ser construidas mediante el método de bibliotecas sintéticas codificadas (ESL) descrito en WO 95/12608, WO 93/06121, WO 94/08051, WO 95/35503 y WO 95/30642 (cada uno de los cuales es incorporado por referencia para todos los propósitos). Bibliotecas de péptidos pueden también ser generadas mediante métodos de exhibición de fago (véase, por ejemplo, WO 91/18980).

Derivación y conjugación de un péptido inmunogénico a un portador de proteína

El sitio de anexión de un inmunógeno de péptido a una proteína/portador de polipéptido y la naturaleza del agente de reticulación que es usado para anexar un inmunógeno de péptido al portador son ambos importantes para la especificidad del anticuerpo resultante generado contra el mismo. Para un reconocimiento apropiado, el inmunógeno de péptido debe ser acoplado al portador con la orientación apropiada. Para que un anticuerpo reconozca subsecuentemente los inmunógenos de

péptido libres sin portador, el conjugado de inmunógeno de péptido-portador de proteína/polipéptido debe presentar los inmunógenos de péptido en forma expuesta y accesible. La orientación óptima s subsecuentemente obtenida al dirigir la reacción de reticulación a sitios específicos sobre los inmunógenos de péptido. Una manera de obtener esto con un inmunógeno de péptido es mediante anexión de un residuo de cisteina terminal durante la síntesis del péptido. Esto proporciona un grupo sulfhidrilo sobre un extremo del péptido para conjugación al portador. La reticulación a través de este grupo proporciona la anexión del inmunógeno de péptido solamente en un extremo, asegurando mediante esto una orientación consistente.

En la configuración de inmunógeno de péptido-portador, el objetivo no es mantener el estado natural o estabilidad del portador, sino presentar al hapteno la mejor manera posible al sistema inmune. Para llegar a este objetivo, la elección de la química de conjugación puede controlar el título resultante, afinidad y especificidad de los anticuerpos generados contra el hapteno. Puede ser importante en algunos casos escoger un agente de reticulación que contiene un brazo separador suficientemente largos para presentar al antígeno de una manera sin restricción. También puede ser importante controlar la densidad del inmunógeno de péptido sobre la superficie del portador. Demasiado poca sustitución del inmunógeno de péptido puede dar como resultado poca o ninguna respuesta. Una densidad de inmunógeno de péptido demasiado alta puede provocar realmente supresión inmunológica y disminuir la respuesta. Además, el agente de reticulación mismo puede generar una respuesta inmune indeseable. Estas cuestiones

necesitan ser tomadas en consideración en la selección no solamente de los reactivos de reticulación apropiados, sino también las proporciones apropiadas del portador de proteína/polipéptido e inmunógeno de péptido.

Una variedad de medios para anexar los portadores de proteína/péptido a los inmunógenos de péptido son posibles. Las interacciones iónicas son posibles a través de los términos o por medio del grupo epsilon-amino de lisina. El enlace de hidrógeno entre los grupos laterales de los residuos y el inmunógeno de péptido son también posibles. Finalmente, las interacciones de conformación entre los portadores de proteína/péptido y el péptido inmunogénico pueden dar surgimiento a una anexión estable.

Los conjugados de inmunógenos de péptidos-portador han sido generados exitosamente utilizando varios reactivos de reticulación tales como agentes de reticulación como bifuncionales o heterobifuncionales de longitud cero. Los sistemas de reactivos disponibles más pequeños para bioconjugación son los llamados agentes de reticulación de longitud cero. Estos compuestos moderan la conjugación de dos moléculas al formar un enlace que no contiene átomos adicionales. Así, un átomo de una molécula es un separador. En muchos sistemas de conjugación, el complejo final es enlazado conjuntamente en virtud de componentes químicos que agregan estructuras extrañas a las sustancias que son reticuladas. En algunas aplicaciones, la presencia de estos enlazadores intermedios pueden ser perjudiciales al uso propuesto. Por ejemplo, en la comparación de conjugados de inmunógeno de péptido-portador, el complejo es formado con la intención de generar una respuesta inmune al hapteno anexado.

Ocasionalmente, una porción de los anticuerpos producidos por esta respuesta tendrán especificidad para el agente de reticulación usado en el procedimiento de conjugación. Los agentes de reticulación de longitud cero eliminan el potencial para este tipo de reactividad cruzada al moderar un enlace directo entre dos sustancias.

Reactivos homobifuncionales, los cuales eran los primeros reactivos de reticulación usados para modificación y conjugación de macromoléculas, consistían de compuestos de reactivos que contienen el mismo cuerpo funcional en ambos extremos (Hartman y Wold, 1966). Estos reactivos podrían atar una proteína a otra y reaccionar covalentemente con los mismos grupos comunes sobre ambas moléculas. Así, las epsilon-aminas de lisina o aminas N-terminales de una proteína podrían ser reticuladas a los mismos grupos funcionales sobre una segunda proteína simplemente al mezclar las dos conjuntamente en presencia del reactivo homobifuncional.

Los reactivos de conjugación heterobifuncionales contienen dos grupos reactivos diferentes que se pueden acoplar a dos objetivos funcionales diferentes sobre proteínas y otras macromoléculas. Por ejemplo, una parte de un agente de reticulación puede contener un grupo amina-reactivo, en tanto que otra porción puede consistir de un grupo sulfhidril-reactivo. El resultado es la capacidad para dirigir la reacción de reticulación a partes seleccionadas de moléculas objetivo, acumulando así mejor control sobre el proceso de conjugación.

Los reactivos heterobifuncionales son usados para reticular proteínas y otras moléculas en un proceso de dos o tres etapas que limitan el grado de polimerización

frecuentemente obtenido utilizando agentes de reticulación homobifuncionales.

Muchos métodos están disponibles actualmente para el acoplamiento de inmunógenos de péptido a portadores de proteína/polipéptido utilizando agentes de reticulación homobifuncionales o heterobifuncionales de longitud cero. La mayoría de los métodos crean enlaces de amina, amida, uretano, isotiourea o disulfuro o en algunos casos tioéteres. El método más general de acoplamiento de proteínas o péptidos a péptidos utiliza reactivos de reticulación bifuncionales. Estas son moléculas separadoras pequeñas que tienen grupos activos en cada extremo. Las moléculas separadoras pueden tener grupos activos idénticos o diferentes en cada extremo. Las moléculas separadoras pueden tener grupos activos idénticos o diferentes en cada extremo. Las funcionalidades activas más comunes, grupos de acoplamiento y enlaces formados son:

1. Aldehído-amino → amina secundaria
2. Maleimido-sulfhidrilo → tioéter
3. Succinimido-amino → amida
4. Ésteres de imidato-amino →amida
5. Fenil azidas-amino → fenilamina
6. Haluro de acilo-sulfhidrilo → tioéter
7. Piridilsulfuros-sulfhidrilo → disulfuro
8. Isotiocianato-amino → isotiourea.

La reactividad de una proteína portadora dada, en términos de su capacidad para ser modificada por un agente de reticulación de tal manera que pueda ser conjugada a un inmunógeno de péptido, es determinada por su composición de aminoácidos y la ubicación de secuencias de los aminoácidos individuales en la estructura tridimensional de la molécula,

también como la composición de aminoácido del inmunógeno del péptido.

En el caso de enlazadores ("L") entre portadores de proteína/péptido y otros péptidos (por ejemplo, portadores de proteínas/péptidos y un inmunógeno de péptido), los separadores son seleccionados comúnmente de Ala, Gly, u otros separadores neutros de aminoácidos no polares o aminoácidos polares neutros. En ciertas modalidades, el separador neutro es Ala. Se comprenderá que el separador opcionalmente presente no necesita estar comprendido de los mismos residuos y así puede ser un hetero- u homo- oligómero. Separadores ejemplares incluyen homo-oligómeros de Ala. Cuando está presente, el separador usualmente será de por lo menos uno o dos residuos, más usualmente tres a seis residuos. En otras modalidades, el portador de proteína/polipéptido es conjugado a un inmunógeno de péptido, preferiblemente con el portador de proteína/péptido colocado en el término amino, el péptido puede estar unido por un enlazador neutro, tal como Ala-Ala-Ala o los semejantes y contiene además preferiblemente un residuo lípido tal como ácido palmítico o los similares que es anexado a los grupos alfa y epsilon amino de un residuo de Lys ($(PAM)_2Lys$), que es anexado al término amino del conjugado de péptido, comúnmente vía un enlace Ser-Ser o los semejantes.

En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ1-5L, Aβ1-7L, Aβ1-9L y Aβ1-12L. En algunos aspectos de la invención el enlazador es GAGA (SEQ ID NO.: 10).

Para facilitar la conjugación de un inmunógeno de péptido con un portador, aminoácidos adicionales pueden ser agregados a los términos de los determinantes antigénicos. Los

residuos adicionales pueden también ser usados para modificar las propiedades físicas o químicas del inmunógeno de péptido. Aminoácidos tales como tirosina, cisteina, lisina, ácido glutámico o aspártico o lo semejante, pueden ser introducidos al término C- o N- del inmunógeno de péptido. Adicionalmente, enlazadores de péptido que contienen aminoácidos tales como glicina y alanina pueden también ser introducidos. Además, los determinantes antigénicos pueden diferir de la secuencia natural al ser modificados mediante acilación del grupo NH_2 terminal, por ejemplo, mediante alcanoil (C1C20) o acetilación de tioglicolilo, amidación terminal-carboxi, por ejemplo, amoníaco, metilamina, etc. En algunas instancias, estas modificaciones pueden proporcionar sitios para el enlace a un soporte u otra molécula.

En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ1-5-C, Aβ1-7-C, Aβ1-9-C y Aβ1-12-C, donde C es un residuo de aminoácido de cisteina. En algunos aspectos de la invención, el inmunógeno de péptido es un fragmento Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ1-5-L-C, Aβ1-7-L-C, Aβ1-9-L-C y Aβ1-12-L-C.

El inmunógeno de péptido es enlazado a un portador de proteína/péptido ya sea directamente o vía un enlace ya sea en el término amino o carboxi del inmunógeno de péptido. El término amino ya sea del inmunógeno de péptido o el portador de proteína/péptido puede ser acilado. Además, el conjugado de inmunógeno de péptido-portador de proteína/péptido puede estar enlazado a ciertos lípidos de alcanoilo (C_1-C_{20}) vía uno o más residuos de enlace tales como Gly, Gly-Gly, Ser, Ser-Ser como

se describe a continuación. Otras porciones de lípido útiles incluyen colesterol, ácidos grasos y los semejantes.

Los inmunógenos de péptido pueden ser enlazados a un portador mediante reticulación química. Las técnicas para el enlace de un inmunógeno a un portador incluyen la formación de enlaces de disulfuro utilizando N-succinimidil-3-(2-piridiltio)propionato (SPDP) (Carlsson, J et al., (1978) *Biochem J.*, 173: 723), y succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato (SMCC) (si el péptido carece de un grupo sulfhidrilo, éste puede ser proporcionado mediante adición de un residuo de cisteina al hapteno). Estos reactivos crean un enlace de disulfuro entre sí mismos y residuos de cisteina de péptidos sobre una proteína y un enlace de amida por medio del epsilon-amido sobre una lisina u otro grupo amino libre en otros aminoácidos. Una variedad de tales agentes formadores de disulfuro/amida son descritos en *Immune. Rev.*, 62: 85 (1982). Otros agentes de acoplamiento bifuncionales forman un tioéter en lugar de un enlace de disulfuro. Los agentes que forman tioéter incluyen el éster reactivo de ácido6-maleimidocaproico, ácido 2-bromoacético y ácido 2-yodoacético, ácido 4-(N-maleimido-metil)ciclohexan-1-carboxílico. Los grupos carboxilo pueden ser activados al combinarlos con succinimida o ácido 1-hidroxil-2-nitro-4-sulfónico, sal de sodio.

Más frecuentemente, los residuos de lisina son los residuos de aminoácidos más abundantes encontrados en proteínas portadoras y estos residuos son modificados utilizando reactivos de reticulación para generar sitios nucleofílicos que son luego acoplados a un hapteno. Este acoplamiento es obtenido vía cualquiera de las cadenas laterales hidrofílicas sobre las moléculas de hapteno que son químicamente activas. Estas

incluyen el grupo guanidilo de arginina, el (grupos carboxilo de glutamato y ácido aspártico, el grupo sulfhidrilo de cisteina y el grupo epsilon-amino de lisina para nombrar unos pocos). La modificación de proteínas de tal manera que no puedan ser acopladas a otras porciones se obtiene utilizando reactivos de reticulación, los cuales reaccionan con cualquiera de las cadenas laterales del portador de proteína o moléculas de hapteno.

En un aspecto de la presente invención, la proteína portadora con o sin molécula enlazadora es funcionalizada (derivada) con un reactivo que introduce sitios reactivos a la molécula de proteína portadora que son propensos a modificación adicional para introducir grupos nucleofílicos. En una modalidad, el portador se hace reaccionar con un reactivo de haloacetilación, que preferiblemente reacciona con un número de grupos funcionales sobre residuos de aminoácidos de proteínas tales como el grupo sulfhidrilo de cisteina, el grupo epsilon-amina primario de residuo de lisina, el α terminal de α-aminas, el tioéter de metionina y tanto los nitrógenos de cadena lateral de imidazoilo de histidina (Gurd, 1967). En una modalidad preferida, los grupos ε-amina primaria sobre los residuos de lisina de la proteína portadora son derivados con bromoacetato de b N-hidroxisuccinimidilo para generar un portador bromoacetilado. La conjugación del inmunógeno de péptido y el portador de proteína activado se llevó a cabo al agregar lentamente el portador activado a la solución que contiene el inmunógeno de péptido.

Al utilizar el proceso de esta invención, los inmunógenos de péptido discutidos en la Sección B anterior pueden ser conjugados a cualquiera de los portadores discutidos

en la Sección A anterior. Los conjugados resultantes del proceso de esta invención son usados como inmunógenos para la generación de anticuerpos contra Aβ para uso en inmunoterapia pasiva/activa. Además, Aβ o un fragmento de Aβ enlazado a un portador puede ser administrado a un animal de laboratorio en la producción de anticuerpos monoclonales a Aβ.

En un aspecto de la invención, el conjugado es un conjugado seleccionado del grupo que consiste de Aβ1-7-CRM_{197}, (Aβ1-7x3)-CRM_{197} y (Aβ1-7x5)-CRM_{197}. En un aspecto de la invención, el conjugado es un conjugado seleccionado del grupo que consiste de CRM_{197}-Aβ1-5, CRM_{197}-Aβ1-7, CRM_{197}-Aβ1-9 y CRM_{197}-Aβ1-12. En otro aspecto de la invención, el conjugado es un conjugado seleccionado del grupo que consiste de Aβ1-5-C-CRM_{197}, Aβ1-7-C-CRM_{197}, Aβ1-9-C-CRM_{197} y Aβ1-12-C-CRM_{197}, Aβ16-23-C-CRM_{197}, Aβ17-24-C-CRM_{197}, Aβ18-25-C-CRM_{197}, CRM_{197}-C-Aβ16-23, CRM_{197}-C-Aβ17-24, CRM_{197}-C-Aβ18-25, Aβ16-22-C-CRM_{197}, Aβ17-23-C-CRM_{197}, Aβ18-24-C-CRM_{197}, CRM_{197}-Aβ16-22, CRM_{197}-Aβ17-23 y CRM_{197}-C-Aβ18-24. En todavía otro aspecto de la invención, el conjugado es un conjugado seleccionado del grupo que consiste de Aβ1-5-L-C-CRM_{197}, Aβ1-7-L-C-CRM_{197}, Aβ1-9-L-C-CRM_{197}, Aβ1-12-L-C-CRM_{197}.

Coronación

Una desventaja al uso de reactivos de acoplamiento que introduce sitios reactivos a las cadenas laterales de las moléculas de aminoácidos reactivas sobre moléculas portadoras y/o de hapteno, es que los sitios reactivos si no son neutralizados están libres para reaccionar con cualquier molécula indeseable ya sea *in vitro* o *in vivo*. En el proceso de la presente invención, la coronación de los grupos funcionales

sin reaccionar se efectúa mediante la reacción de los conjugados con grupos reactivos pendientes con reactivos los cuales inactivan/coronan los grupos reactivos. Reactivos de inactivación/coronación ejemplares para uso con el proceso de conjugación incluyen cisteamina, N-acetilcisteamina y etanolamina. Alternativamente, la coronación se lleva a cabo mediante reacción con amoníaco o bicarbonato de amonio, ya sea uno u otro de los cuales convierte los grupos haloacetilo a grupos aminoacetilo. La coronación también se lleva a cabo a pH alcalino (9.0-9.8) utilizando hidróxido de sodio o carbonato de sodio, que convierte los grupos haloacetilo a grupos hidroxiacetilo. Una ventaja potencial de convertir los haloacetilo a aminoacetilo o grupos hidroxiacetilo, en contraposición a la reacción con derivados de cisteamina, etanolamina, etc., es la introducción de funcionalidades químicas de tamaño relativamente más pequeño, mediante reacción como amoníaco o hidróxido/carbonato. Los grupos funcionales coronados resultantes, por ejemplo aminoacetilo o hidroxiacetilo, proporcionan relativamente menos alteración en la porción de proteína portadora del conjugado. El inmunógeno de péptido-portador de proteína coronado es purificado como sea necesario utilizando métodos conocidos, tales como cromatografía (filtración de gel, intercambio iónico, interacción hidrofóbica o afinidad), diálisis, ultrafiltración-diafiltración, precipitación selectiva utilizando sulfato de amonio o alcohol y los semejantes.

Conjugados y composiciones inmunogénicas

Los conjugados de inmunógeno de proteína-portador de proteína coronados son administrados en una composición

inmunogénica a mamíferos, particularmente humanos por propósitos profilácticos y/o terapéuticos. Los conjugados de la presente invención son usados para producir y/o mejorar respuestas inmunes contra inmunógenos. Por ejemplo, conjugados de CTL-portador son usados para tratar y/o impedir infección viral, enfermedades amiloidogénicas, cáncer, etc. Alternativamente, los conjugados de inmunógeno de polipéptido-portador, que inducen respuesta de anticuerpo son también usados. Ejemplos de enfermedades que pueden ser tratadas utilizando los conjugados de la presente invención incluyen varias infecciones bacterianas, infecciones virales, infecciones fungales, infecciones de parásitos y cáncer.

En aplicaciones terapéuticas, un conjugado de la presente invención es administrado a un individuo que ya sufre de una enfermedad amiloidogénica tal como enfermedad de Alzheimer, cáncer o infestado con un microorganismo patogénico. Aquellos en la fase de incubación o la fase aguda de la enfermedad pueden ser tratados con el conjugado de la presente invención separadamente o en conjunción con otros tratamientos, como sea apropiado.

En aplicaciones terapéuticas, una composición inmunogénica de la presente invención es administrada a un paciente en una cantidad suficiente para producir una respuesta CTL efectiva o respuesta humoral al microorganismo, placa amiloide o a un antígeno de tumor expresado sobre una célula de cáncer y para curar o detener por lo menos parcialmente el avance de la enfermedad, síntomas y/o complicaciones. Una cantidad apropiada para llevar a cabo esto es definida como "dosis terapéuticamente efectiva". Cantidades selectivas para esto dependerán en parte de la composición del péptido, la

manera de administración, la etapa y severidad de la enfermedad que es tratada, el peso y estado general de salud del paciente y el juicio del médico que prescribe.

Cantidades terapéuticamente efectivas de las composiciones inmunogénicas de la presente invención fluctúan en general para la inmunización inicial para administración terapéutica o profiláctica, de aproximadamente 0.1 µg a aproximadamente 10,000 µg de péptido para un paciente de 70 Kg, usualmente de alrededor de 0.1 a 8,000 µg, preferiblemente entre alrededor de 0.1 a aproximadamente 5,000 µg y más preferiblemente 0.1 a alrededor de 1,000 µg. Estas dosis son seguidas por dosificaciones de refuerzo de aproximadamente 0.1 µg a alrededor de 1,000 µg de péptido de acuerdo con un régimen de refuerzo durante semana a meses dependiendo la respuesta y condición del paciente al medir las respuestas inmunes específicas.

Además, la presente invención es usada profilácticamente para prevenir y/o aliviar infecciones bacterianas, infecciones virales, infecciones fungales, infecciones parásitas, enfermedad amiloidogénica o cáncer. Las cantidades efectivas son como se describen anteriormente. Adicionalmente, aquel de habilidad ordinaria en la técnica también sabría cómo ajustar o modificar los tratamientos profilácticos, como sea apropiado, por ejemplo al reforzar y ajustar las modificaciones y regímenes de dosificación.

La administración terapéutica puede comenzar al primer signo de la enfermedad o la detección o remoción quirúrgica de tumores o brevemente después de la diagnosis en el caso de infección aguda. Esto es seguido por dosis de refuerzo hasta que se tiene o invierte el avance de la

enfermedad o los síntomas son abatidos sustancialmente y por un período después de esto. En la infección crónica, altas dosis iniciales seguidas por dosis de refuerzo pueden ser requeridas.

El tratamiento de un individuo infectado con las composiciones de la invención pueden detener la resolución de la infección en individuos agudamente infectados. Para aquellos individuos susceptibles (o predispuestos) a desarrollar infección crónica, las composiciones son particularmente útiles en métodos para impedir la evolución de infección aguda a crónica. En donde individuos susceptibles son identificados antes de o durante la infección, por ejemplo, como se describe en la presente, la composición puede ser apuntada a ello, minimizando la necesidad de administración a una población más grande.

Los conjugados de la presente invención son también usados para el tratamiento de infección crónica y para estimular el sistema inmune para eliminar células infectadas con virus en individuos con infecciones latentes. Es importante proporcionar una cantidad de la composición inmunogénica de la presente invención en una formulación y modo de administración suficiente para producir y/o mejorar efectivamente una respuesta inmune. Así, para el tratamiento de infección crónica, una dosis representativa está en el intervalo de aproximadamente 0.1 µg a 10,000 µg del péptido, usualmente de alrededor de 0.1 a alrededor de 8,000 µg, preferiblemente entre alrededor de 0.1 a alrededor de 5,000 µg y más preferiblemente entre 0.1 a alrededor de 1,000 µg para un paciente de 70 Kg/dosis. Dosis de inmunización seguidas por dosis de refuerzo a intervalos establecidos, por ejemplo, de 1 a 4 semanas, pueden ser requeridas, posiblemente por un período de tiempo

prolongado para inmunizar selectivamente un individuo. En el caso de infección crónica, la administración debe continuar hasta que los síntomas clínicos o pruebas de laboratorio indican que la infección viral ha sido eliminada o sustancialmente abatida y por un período después de esto.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención para tratamiento terapéutico o profiláctico pueden ser administradas mediante medios parenterales, tópicos, intravenosos, orales, subcutáneos, intraarteriales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o medios intramusculares para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Una ruta de administración típica de un agente inmunogénico es subcutáneo, aunque otras rutas pueden ser igualmente efectivas. Otra ruta común es inyección intramuscular. Este tipo de inyección se efectúa más comúnmente en los músculos del brazo o pierna. En algunos métodos, los agentes son inyectados directamente a un tejido particular en donde depósitos se han acumulado, por ejemplo, inyección intracraneal. La inyección intramuscular o infusión intravenosa es preferida para administración del anticuerpo. En algunos métodos, anticuerpos terapéuticos particulares son inyectados directamente al cráneo. Debido a la facilidad de administración, las composiciones inmunogénicas de la invención son particularmente apropiadas para administración oral. La invención proporciona además composiciones inmunogénicas para administración parenteral, que comprenden una solución de los péptidos o conjugados, disueltos o suspendidos en un portador aceptable, preferiblemente un portador acuoso.

Una variedad de diluyentes, excipientes y soluciones reguladoras del pH pueden ser usados, por ejemplo, agua, agua

de pH regulado, solución salina de pH regulado con fosfato, glicina al 0.36%, ácido hialurónico y los semejantes. Estas composiciones pueden ser esterilizadas mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas o pueden ser filtradas estériles. Las soluciones acuosas resultantes pueden ser empacadas para uso como tal o liofilizadas, la preparación liofilizada es combinada con una solución estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares aceptables farmacéuticamente como se requiera a condiciones fisiológicas aproximadas, tales como agentes reguladores del pH, agentes que ajustan la tonicidad, agentes de administración y lo semejante, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaureato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc.

Para composiciones sólidas, se pueden usar portadores sólidos no tóxicos convencionales. Estos pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y los semejantes. Para administración oral, una composición no tóxica aceptable farmacéuticamente es formada al incorporar cualquiera de los excipientes empleados normalmente, tales como aquellos portadores enlistados previamente y en general 10-95% de ingrediente activo, esto es, uno o más conjugados de la invención y más preferiblemente a una concentración de 25-75%.

La concentración de composiciones inmunogénicas de la presente invención en las composiciones farmacéutica puede variar ampliamente, esto es, desde menos de aproximadamente 0.1%, usualmente a, o por lo menos aproximadamente 2% a tanto

como 20% a 50% o más en peso y será seleccionada principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado.

Los conjugados de la presente invención pueden también ser administrados vía liposomas, que sirven para apuntar los conjugados a un tejido particular, tal como un tejido linfoide o apuntadas selectivamente a células infectadas, también como incrementar la vida media de la composición del péptido. Los liposomas incluyen emulsiones, espumas, micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, dispersores de fosfolípidos, capas aminares y los semejantes. En estas preparaciones, la composición a ser administrada es incorporada como parte de un liposoma, sola o en conjunción con una molécula, que se enlaza a, por ejemplo, un receptor prevaleciente entre células linfoides. Estas moléculas incluirían anticuerpos monoclonales, que se enlazan al antígeno CD45 o con otras composiciones terapéuticas o inmunogénicas. Así, liposomas llenos con una composición deseada de la presente invención pueden ser dirigidos al sitio de las células linfoides, en donde los liposomas pueden administrar las composiciones de péptidos terapéuticas/inmunogénicas seleccionadas. Los liposomas para uso en la invención son formados a partir de lípidos formadores de vesículos estándar, los cuales en general incluyen fosfolípidos neutros y cargados negativamente y un esterol, tal como colesterol. La selección de lípidos es en general guiada por consideración del tamaño del liposoma, labilidad ácida y estabilidad de los liposomas en la corriente sanguínea. Una variedad de métodos están disponibles para preparar liposomas, como se describe por ejemplo en Szoka, et al., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 467

(1980), patentes estadounidenses Nos. 4,235,871, 4,501,728, 4,837,028 y 5,019,369, incorporadas en la presente por referencia.

Para el apuntamiento a las células inmunes, un ligando a ser incorporado en el liposoma puede incluir anticuerpos o fragmentos del mismo específicos para determinantes de superficie celular de células del sistema inmune deseadas. Una suspensión de liposoma que contiene una composición de la presente invención puede ser administrada intravenosa, local, tópicamente, etc., en una dosis que varía de acuerdo con, inter alia, la manera de administración, la composición que es administrada y la etapa de la enfermedad que es tratada.

Para administración en aerosol, las composiciones de la presente invención son suministradas preferiblemente en forma finamente dividida junto con un surfactante y propelente. Los porcentajes típicos de la composición son 0.01-20% en peso, preferiblemente 1-10%. El surfactante debe ser por supuesto, no tóxico y preferiblemente soluble en el propelente. Representativos de tales agentes son los ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen de 6 a 22 átomos de carbono , tales como ácidos caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linolénico, olestérico y oleico con un alcohol polihídrico alifático o su anhídrido cíclico. Ésteres mezclados tales como glicéridos mezclados o naturales pueden ser usados. El surfactante puede constituir 0.1-20% en peso de la composición, preferiblemente 0.25-5%. El resto de la composición es ordinariamente propelente. Un portador puede también ser incluido, si se desea, como con lecitina para administración intranasal.

Las composiciones de esta invención pueden también ser usadas para marcar anticuerpos monoclonales. Tales anticuerpos pueden ser útiles como agentes de diagnóstico o terapéuticos potenciales.

Las composiciones de la presente invención pueden también encontrar uso como reactivos de diagnóstico. Por ejemplo, una composición de la invención puede ser usada para determinar la susceptibilidad de un individuo particular a un régimen de tratamiento, que emplea los inmunógenos polipéptidos, y así puede ser útil para modificar un protocolo de tratamiento existente o para determinar la prognosis para un individuo afectado. Además, las composiciones de la presente invención pueden también ser usadas para predecir cuales individuos estarán en riesgo sustancial de desarrollar infección crónica.

Los conjugados de la presente invención pueden ser administrados opcionalmente en combinación con otros agentes que son por lo menos parcialmente efectivos en el tratamiento y/o alivio de una enfermedad y/o sus síntomas. En el caso de enfermedad de Alzheimer o Síndrome de Down, en el cual se presentan depósitos amiloides en el cerebro, los conjugados de la presente invención pueden ser administrados en conjunción con otros agentes que incrementan el paso de los agentes de la invención a través de la barrera de sangre-cerebro.

La composición inmunogénica contiene comúnmente un adyuvante. Un adyuvante es una sustancia que mejora la respuesta inmune cuando es administrado junto con un inmunógeno o antígeno. Un número de citocinas o linfocinas han mostrado tener actividad moduladora inmune y así pueden ser usados como adyuvantes, en los que se incluyen pero no se limitan a las

interleucinas 1-α, 1-β, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (véase, por ejemplo, patente estadounidense No. 5,723,127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes), los interferones α, β y γ, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (véase, por ejemplo, patente estadounidense No. 5,078,996), factor estimulante de colonia de macrófagos, factor estimulante de colonia de granulocitos, GSF y factor de necrosis tumoral α y β. Todavía otros adyuvantes útiles en esta invención incluyen una quimiocina, que incluye sin limitación MCP-1, MIP-1α, MIP-1β y RANTES. Moléculas de adhesina, tales como una selectina, por ejemplo L-selectina, P-selectina y E-selectina pueden también ser útiles como adyuvantes. Todavía otros adyuvantes incluyen, sin limitación, una molécula semejante a mucina, por ejemplo, CD34, GlyCAM-1 y MadCAM-1, un miembro de la familia de integrina tal como LFA-1, VLA-1, Mac-1 y p150.95, un miembro de la superfamilia de inmunoglobulina tal como PECAM, ICAMS, por ejemplo, ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, CD2 y LFA-3, moléculas coestimulatorias tales como CD40 y CD40L, factores de crecimiento en los que se incluyen factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento del nervio, factor de crecimiento de fibroblasto, factor de crecimiento epidérmico B7.2, PDGF, BL-1 y factor de crecimiento endotelial vascular, moléculas receptoras en las que se incluyen Fas, receptor TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2 y DR6. Todavía otra molécula adyuvante incluye caspasa (ICE). Véase también Publicaciones Internacionales de Patente Nos. WO 98/17799 y WO 99/43839, que son incorporadas en la presente por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

Adyuvantes apropiados usados para mejorar una respuesta inmune incluyen, sin limitación, MPL™ (monofosforil lípido A 3-O-desacilado; Corixa, Hamilton, MT) que es descrito en la patente estadounidense No. 4,912,094, que es incorporada en la presente por referencia para todos los propósitos. También apropiado para uso como adyuvantes, están los análogos de lípido A sintéticos o compuestos de aminoalquil glucosamina fosfato (AGP) o derivados o análogos derivados de las mismas, que están disponibles de Corixa (Hamilton, MT) y que son descritos en la patente estadounidense No. 6,113,918, que es incorporado en la presente por referencia. Uno de tales AGP es 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoicilamino]etil 2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(S)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxi-tetradecanoil-amino]-b-D-glicopiranosida, que es conocido como 529 (también conocido como RC529; Corixa). Este adyuvante 529 es formulado como una forma acuosa (529 AF) o como una emulsión estable (529 SE).

Todavía otros adyuvantes incluyen emulsiones de aceite mineral y agua, sales de calcio tales como fosfato de calcio, sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, etc., Amphigen, Aviridina, L121/escualeno, D-lacturo-polilacturo/glicósido, ácidos plurónicos, polioles, dipéptido de muramilo, *Bordetella* exterminada, saponinas tales como Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA), descrito en la patente estadounidense No. 5,057,540, que es incorporada en la presente por referencia y partículas generadas de los mismos tales como ISCOMS (complejos inmunoestimulantes), *Mycobacterium tuberculosis*, lipopolisacáridos bacterianos, polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que comprenden una porción CpG (patente

estadounidense No. 6,207,646, que es incorporada en la presente por referencia), una toxina de pertusis (PT) o una toxina de *E. coli* lábil térmicamente (LT), particularmente LT-K63, LT-R72, PT-K9/G129, véase, por ejemplo, Publicaciones Internacionales de Patente Nos. WO 93/13302 y WO 92/19265, que son incorporadas en la presente por referencia para todos los propósitos.

También útiles como adyuvantes son toxinas de cólera y mutantes de las mismas, en las que se incluyen aquellas descritas en la Publicación Internacional de Patente No. WO 00/18434 (en donde el ácido glutámico en posición del ácido 29, está reemplazado por otro aminoácido (diferente a ácido aspártico, preferiblemente una histidina)). Toxinas CT similares o mutantes son descritos en la Publicación Internacional de Patente publicada No. WO 02/098368 (en donde la isoleucina en la posición de aminoácido 16 está reemplazada por otro aminoácido, ya sea solo o en combinación con el reemplazo de la serina en posición de aminoácido 68 mediante otro aminoácido y/o en donde la valina en posición de aminoácido 72 está reemplazada por otro aminoácido. Otras toxinas CT son descritas en la Publicación Internacional de Patente publicada No. WO 02/098369 (en donde la arginina en posición de aminoácido 25 está reemplazada por otro aminoácido y/o un aminoácido es insertado en la posición de aminoácido 49 y/o dos aminoácidos son insertados en la posición de aminoácido 35 y 36).

Se comprenderá que la referencia en toda esta especificación a cualquier teoría para explicar los resultados descritos no es para limitar el alcance de la invención. Independientemente del método mediante el cual la invención funciona, los resultados y ventajas descritos en la presente

pueden ser obtenidos por referencia a los siguientes ejemplos de la invención.

Será evidente para aquel de habilidad ordinaria en la técnica que muchos cambios y modificaciones se pueden efectuar a la misma sin desviarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones, patentes y solicitud de patentes mencionadas en esta especificación son incorporadas por referencia en su totalidad para todos los propósitos a la misma extensión como si cada publicación individual, patente o solicitud de patente fuera indicada específica e individualmente para ser incorporada por referencia.

EJEMPLO 1

Conjugación de CRM_{197} a péptido Aβ

La conjugación de péptidos de haptenos/antigénicos se llevó a cabo al hacer reaccionar el portador activado CRM_{197}, que tiene 39 residuos de lisina, a un péptido de hapteno/antigénico que tiene un grupo tiol pendiente utilizando el método descrito posteriormente en la presente (Figura 1). Todos los péptidos Aβ contenían un residuo de cistina en el término carboxi para facilitar la conjugación de éstos péptidos por medio del grupo cisteinil sulfhidrilo a la proteína portadora. Estos péptidos fueron producidos mediante síntesis en fase sólida.

I. **Activación**

Grupos amino libres de CRM_{197} fueron bromoacetilados mediante reacción con un exceso de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético (Sigma Chemical Co.,

San Louis, MO) (Bernatowics y Matsueda, 1986). Se agrega una solución helada de CRM_{197} (~15 mg), 10% (v/v) $NaHCO_3$ 1.0 M (pH 8.4). éster de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético, igual en peso a aquel CRM_{197} utilizado, fue disuelto en 200 µL de dimetilformamida (DMF), agregado lentamente al CRM_{197} y mezclado moderadamente a temperatura ambiente en la oscuridad durante una hora. La proteína bromoacetilada (activada) resultante fue purificada mediante el paso a través de una columna de deslinación (P6-DG) utilizando PBS/EDTA 1 mM (pH 7.0) como eluyente. En seguida de la purificación, las fracciones correspondientes a CRM_{197} activado fueron acumuladas y la concentración de proteína fue estimada mediante análisis de proteína BCA. Los grupos amino de proteína, tanto antes como después del tratamiento con éster de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético, se hicieron reaccionar con ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico (TNBSA) que se dio como indicador de la bromoacetilación (Means *et al.*, 1972).

II. <u>Conjugación</u>

Antes de la conjugación los péptidos se hicieron reaccionar con 5,5'-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzoico) [reactivo de Ellman] para verificar el contenido de grupos SH libres (entre 62-88% reducido). Para los primeros cuatro péptidos Aβ, (aminoácidos 1-7 sin enlazador, aminoácidos 1-12 con enlazador GAGAC, aminoácidos 1-9 con enlazador GAGAC y aminoácidos 1-7 con enlazador GAGAC), aproximadamente 8.0-10.0 mg del péptido fueron disueltos en agua destilada estéril a una concentración aproximada de 20 mg/ml. El péptido fue agregado lentamente a CRM_{197} activado frío en una proporción 1:1 (peso/peso) y el pH fue ajustado a aproximadamente 7.0-7.2 con la adición de 20-36

µL de la NaOH 1N. el material resultante fue mezclado moderadamente durante toda la noche a 4°C en la oscuridad seguido por diálisis en la oscuridad contra dos cambios de 1L de PBS, pH 7.2. Para los siguientes cuatro péptidos Aβ (aminoácidos 1-5 sin enlazador, aminoácidos 1-9 sin enlazador, aminoácidos 1-12 sin enlazador y aminoácidos 1-5 con enlazador), se usó la reacción con reactivo de Ellman para verificar los grupos SH libres. CRM_{197} fue bromoacetilado, purificado y se hizo reaccionar con TNBSA como se describe previamente. El pH de cada péptido fue ajustado a 7.0 con la adición de $NaPO_4$ 0.1 M (pH 8.5) a 2.2x el volumen del péptido disuelto. El péptido fue agregado lentamente a CRM_{197} activado frío en una proporción 1:1 y se le permite reaccionar durante toda la noche a 4°C en la oscuridad. El material resultante fue dializado. Un péptido de control final (1-12 mero en orientación inversa)fue conjugado a CRM_{197} como se describe anteriormente con la siguiente modificación. En lugar de ajustar el pH del péptido a 7.0, el pH de CRM_{197} activado fue ajustado a aproximadamente 7.5 con la adición de 20% (v/v) de $NaPO_4$ a 0.5M (pH 8.0). Cada conjugado, después de la diálisis, fue transferido a un tubo de polipropileno de 15 ml estéril, envuelto en hojas de aluminio y almacenado a 4°C. La activación de los residuos de amino reactivos en el portador fue luego subsecuentemente verificada utilizando espectrometría de masa.

Conjugado	Péptido inmunogénico
Aβ1-5-C-CRM_{197}	DAEFR-C (SEQ ID NO.: 1)
Aβ1-7-C-CRM_{197}	DAEFRHD-C (SEQ ID NO.: 2)
Aβ1-9-C-CRM_{197}	DAEFRHDSG-C (SEQ ID NO.: 3)
Aβ1-12-C-CRM_{197}	DAEFRHDSGYEV-C (SEQ ID NO.: 4)
Aβ1-5-L-C-CRM_{197}	DAEFR-GAGA-C (SEQ ID NO.: 5)
Aβ1-7-L-C-CRM_{197}	DAEFRHD-GAGA-C (SEQ ID NO.: 6)
Aβ1-9-L-C-CRM_{197}	DAEFRHDSG-GAGA-C (SEQ ID NO.: 7)
Aβ1-12-L-C-CRM_{197}	DAEFRHDSGYEV-GAGA-C (SEQ ID NO.: 8)

Con formatos: Inglés (Reino Unido)

L = unión (GAGA) (SEQ ID NO.: 10)

EJEMPLO 2

Preparación del conjugado de péptido Aβ-CRM_{197} y purificación mediante ultrafiltración

Bromoacetilación de CRM_{197}

CRM_{197} (100 mg) en solución reguladora del pH de fosfato de sodio 0.01M, NaCl, al 0.9% , pH 7.0, se hizo reaccionar con éster de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético (disuelto en 20 mg/ml en DMSO) a una proporción en peso de 1:1 bajo una atmósfera de argón. La reacción fue titulada como sea necesario para mantener el pH a 7.0. La mezcla fue agitada en la obscuridad durante 1.5 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue filtrada a través de un filtro de 1.2 µm al depósito del retenido de un sistema UF/DF (Millipore Labscale TFF, Billerica, MA). la purificación fue realizada utilizando una membrana UF 10K ó 30K mediante vía filtración (30 veces) contra solución reguladora del pH de fosfato de sodio 0.01 M/0.9% NaCl, pH 7.0. El CRM_{197} bromoacetilado fue filtrado al hacerlo pasar a través de un filtro de 0.2 micras. El grado de bromoacetilación fue determinado al hacer reaccionar el CRM_{197} activado con cisteína,

seguido por análisis y cuantificación de aminoácido de la carboximetilcisteína resultante (CMC).

Conjugación de Péptido Aβ y CRM_{197} Bromoacetilado Coronación con N-acetilacisteamina

El CRM_{197} bromoacetilado (50 mg) fue transferido a un recipiente de reacción. A la solución agitada, mantenida a 2-8°C, se agrega carbonato/bicarbonato de sodio 1 M. La titulación se llevó a cabo para obtener un pH objetivo de 9.0, bajo atmósferas de argón. Separadamente, 50 mg de péptido Aβ fueron pesados y disueltos en agua para inyección (WFI) a 20 mg/mL. A esta solución se agrega carbono/bicarbonato de sodio 1 M hasta que se alcanza un pH de 9.0. La solución del péptido fue agregada a la solución de CRM_{197} bromoacetilada y la mezcla fue agitada a 2-8°C durante 14-18 horas. Los grupos bromoacetilo remanentes fueron coronados con un exceso 20 veces-molar de N-acetilcisteamina durante 3-6 horas a 2-8°C.

La mezcla de reacción fue filtrada a través de un filtro de 1.2 micras al depósito del retenido del sistema UF/DF (Millipore XL), y el conjugado fue purificado a temperatura ambiente mediante diafiltración 30 veces sobre una membrana MWCO 10K ó 30K (Millipore) mediante diafiltración contra solución reguladora del pH de fosfato 0.01 M/NaCl al 0.9%, pH 7.0. El retenido fue recolectado y filtrado a través filtro de 0.2 micras y analizado en cuanto a contenido de proteínas (análisis colorimétrico de Lowry o Micro-BCA), mediante SDS-PAGE mediante análisis de aminoácidos o mediante inmunogenicidad en ratones.

Ejemplo 3

Conversión mediante Coronación de los Grupos Bromoacetilo sin

Reaccionar a Grupos Aminoacetilo

CRM_{197} bromoacetilado (50 mg), preparado como se describe anteriormente en el Ejemplo 2, fue transferido a un recipiente de reacción. A la solución agitada, mantenida a 2-8°C, se agrega carbonato/bicarbonato de sodio 1 M. La titulación fue efectuada para obtener un pH objetivo de 9.0, bajo atmósfera de argón. Separadamente, 50 mg de péptido Aβ fueron pesados y disueltos en WFI a 20 mg/mL. A esta solución se agrega carbono/bicarbonato de sodio 1 M hasta que se obtiene un pH de 9.0. La solución de péptido fue agregada a la solución de CRM_{197} bromoacetilada y la mezcla fue agitada a 2-8°C durante 14-18 horas. Los grupos bromoacetilo restantes fueron coronados utilizando solución de bicarbonato de amonio al 8% durante 4 horas a 2-8°C.

La mezcla de reacción fue filtrada en filtro de 1.2 micras al depósito de retenidos de un sistema UF/DF (Millipore XL), y el conjugado fue purificado a temperatura ambiente mediante diafiltración 30 veces sobre una membrana MWCO de 10K o 30K mediante diafiltración contra solución reguladora del pH de fosfato de sodio 0.01 M/NaCl al 0.9%, pH 7.0. El retenido fue recolectado y filtrado en filtro de 0.2 micras y analizado en cuanto a contenido de proteína (análisis colorimétrico de Lowry o Micro-BCA), mediante SDS-PAGE mediante análisis de aminoácido y en cuanto a inmunogenicidad en ratones.

Ejemplo 4

Determinación Cuantitativa de S-carboximetilcisteína y S-carboximetilcisteamina como Evaluación del Grado de Conjugación y Coronación de los Conjugados de Inmunógeno de Péptido-Proteína/Polipéptido

La hidrólisis ácida de conjugados de proteína-péptido generados utilizando química de activación de bromoacetilo dio como resultado la formación de S-carboximetilcisteina estable ácida (CMC) de las cisteínas en los sitios conjugados y la formación de S-carboximetilcisteamina estable ácida (CMCA) de la cisteamina en los sitios coronados (Figura 2). Todas las lisinas conjugadas y coronadas fueron convertidas de regreso a lisina y detectadas como tal. Todos los otros aminoácidos fueron hidrolizados de regreso a los aminoácidos libres excepto por triptófano y cisteína, los cuales fueron destruidos mediante las condiciones de hidrólisis. Asparagina y glutamina fueron convertidos a ácido aspártico y ácido glutámico respectivamente.

Muestras de conjugado fueron diluidas con agua desionizada a una concentración de proteína total de menos de 1 mg/mL. Dos alícuotas de 10 microgramos de cada conjugado fueron secadas y resuspendidas en 100 µL de HCl 6N [Pierce], 5 µL de fenol fundido [Sigma-Aldrich], y 1 µL de 2-mercaptoetanol [Sigma-Aldrich]. Luego las muestras fueron incubadas bajo vacío (100 mT) a 110°C durante 22 horas. Los hidrolisados resultantes fueron secados, resuspendidos en 250 µL de solución reguladora del pH de dilución de muestra de citrato de sodio Na-S de Beckman (pH 2.2) [Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA], y filtrado utilizando filtros de punta de jeringa de nylon de 0.2 µm Whatman y jeringas de 1 mL.

Luego cada muestra fue cargada a un circuito de muestra de analizador de aminoácidos Beckman 6300 y colocado en el analizador. Los aminoácidos de cada muestra hidrolizada y control fueron separados utilizando cromatografía de intercambio iónico seguida por reacción con solución de Beckman

Ninhydrin NinRX a 135°C. Luego los aminoácidos derivados fueron detectados en el intervalo visible de 570 nm y 440 nm (véase Tabla 1). UN conjunto estándar de aminoácidos [Pierce Amino Acid Standard H] que contiene 500 picomoles de cada aminoácido fue corrido junto con las muestras y controles para cada conjunto de análisis. S-carboximetilcisteina [Sigma-Aldrich] fue agregada al estándar.

Tabla 1

Tiempos de Retención para Aminoácido Utilizando Programa de Gradiente 1 en el Analizador de Aminoácidos Beckman 6300

Tiempo de retención (min.)	Aminoácido		Longitud de onda utilizada para la detección
8.3	Carboximetilcisteína	CMC	570
9.6	Ácido aspártico y Asparagina	Asx	570
11.3	Treonina	Thr	570
12.2	Serina	Ser	570
15.8	Ácido glutámico + Glutamina	Glx	570 & 440
18.5	Prolina	Pro	440
21.8	Glicina	Gly	570
23.3	Alanina	Ala	570
29.0	Valina	Val	570
32.8	Metionina	Met	570
35.5	Isoleucina	Ile	570
36.8	Leucina	Leu	570
40.5	Tirosina	Tyr	570
42.3	Fenilalanina	Phe	570
45.4	Carboximetilcisteamina	CMCA	570

Las áreas de cada pico estándar fueron usadas como equivalencia cuantitativa para la evaluación proporcional de cada muestra. La prolina fue determinada de 440 nm y fue convertida a una equivalencia en 570 nm utilizando ácido glutámico, el aminoácido más cercano.

Cada uno de estos valores de picomoles fue convertido a una proporción molar de residuos de aminoácidos utilizando una comparación de picomoles de lisina con el valor de lisina teórico presente en la proteína. La lisina fue escogida para esta evaluación en base a su unión covalente a cisteína y cisteamina y la hidrólisis similar esperada. Los números resultantes de moles de aminoácidos fueron luego comparados con la composición de aminoácidos de la proteína y reportados junto con los valores de CMC y CMCA. El valor de CMC fue usado directamente para evaluación del grado de conjugación y el valor de CMCA fue usado directamente para evaluación el grado de coronación.

Ejemplo 5

Caracterización y Optimización de Conjugados de Péptido Aβ-CRM_{197}

Para verificar la conjugación, todos los conjugados

de péptido-CRM_{197} fueron analizados mediante análisis de aminoácidos y espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización de desorción por láser auxiliada por matriz (MALDI-TOF). Para cada conjugado, los moles de péptido conjugados a cada mol de CRM_{197} fueron determinados mediante análisis de aminoácidos (número de residuos de S-carboximetilcisteína) y espectrometría de masas de MALDI-TOF. Los valores determinados por cada método estuvieron en general en acuerdo.

I. Cromatografía de Exclusión de Tamaño:

Muestras de concentrados por lotes fueron retiradas de almacenamiento y se les permite calentarse a la temperatura ambiente. La muestra de conjugado de péptido de Aβ fue mezclada moderadamente para asegurar una proporción homogénea. Luego la muestra de conjugado de péptido Aβ fue centrifugada en una microcentrifuga de Eppendorf para separar cualesquier partículas. El sobrenadante fue extraído para la cromatografía de TosoHaas TSK-Gel G3000SW (TosoHaas, Stuttgart, Alemania). Una columna de TosoHaas TSK-Gel G3000SW fue conectada al sistema de HPLC y el límite de presión fue ajustado a 1.4 MPa. La columna fue equilibrada con por lo menos 30 mL de PBS (fosfato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.2 ± 0.1) a una velocidad de flujo de 0.75 mL/min. La muestra de conjugado de péptido de Aβ fue cargada a la columna TosoHaas TSK-Gel G3000SW utilizando los siguientes parámetros:

Concentración de muestra conjugado de péptido de Aβ: 1.5 ± 1.0 mg/mL

Velocidad de flujo: 0.75 mL/min

Volumen de muestra: 0.1 mL

Tiempo de corrida: 30 minutos.

La absorbancia fue verificada tanto a 280 nm como a 210 nm. Para el almacenamiento a largo plazo, la columna TosoHaas TSK-Gel G3000SW fue equilibrada con por lo menos 50 mL de etanol al 20% a una velocidad de flujo de 0.5 - 1.0 mL/min.

II. PAGE (Electroforesis de Gel de Poliacrilamida

El CRM_{197} activado (bromoacetilado) y los conjuntos de péptido Aβ CRM_{197} fueron examinados mediante SDS-Gel utilizando electroforesis de NuPAGE Bis-Tris (Novex, Frankfurt, Alemania) con un sistema de minigel de poliacrilamida pre-moldeado de pH neutro y solución reguladora del pH de corrida NuPAGE MES SDS. Una alícuota de 8 µg de cada CRM activado o conjugado fue mezclada con solución reguladora del pH de muestra reductora y calentada a 100°C durante 5 minutos. Los conjugados y estándares de peso molecular (PM) (Invitrogen, Carlsbad, CA) fueron cargados en un gel de NuPage al 10% (peso/volumen, acrilamida) (Novex) a base del sistema de pH regulado de Bis-Tris-HCl y corridos sobre un MES SDS ++++ (Laemmli). Enseguida de SDS-PAGE, el gel fue teñido con azul de Pierce Gel Code ++++ (Pierce, Rockford, IL). Un conjugado de péptido de Aβ CRM_{197} fue representado por una banda mayor alrededor de 66 kDa, por encima de la banda de CRM natural y una banda más tenue alrededor de 120 kDa, junto con bandas de multímero menores (datos no mostrados).

III. Análisis de Espectrometría de Masas de MALDI-TOF de Conjugados de Péptido-CRM_{197}:

Se utilizó espectrometría de masas para la aproximadamente inmediata del grado de conjugación. Alícuotas apropiadas de CRM_{197} activadas y muestras conjugadas fueron

analizadas mediante espectrometría de masas de MALDI-TOF utilizando ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-cinámico (ácido sinapínico) como la matriz. El peso molecular de CRM_{197} activado determinado mediante espectrometría de masas de MALDI-TOF (Finnigan MATERIA Lasermat 2000 Mass Spectrometer, Ringoes, NY) se encontró que estaba centrada alrededor de 60.5 kDa y para conjugados varió de 65 kDa a 74 kDa dependiendo del grado de conjugación (datos no mostrados). Hasta 22 de las lisinas (~50%) en CRM_{197} se encontró que estaban modificadas a una proporción de 1:1.

IV. Experimentos de Optimización:

El grado de activación y conjugación son función de la proporción de reactivo:proteína, temperatura de la reacción y pH de la solución reguladora de pH de reacción. Algunos ejemplos son dados a continuación para ilustrar las condiciones de conjugación óptimas llevadas a cabo para identificar las condiciones de pH óptimas con el fin de tener parámetros de control de proceso reproducibles para las reacciones de conjugación. Los resultados (Figura 3) muestran que la reacción de conjugación al 5mero Aβ (DAEFRC) (SEQ ID NO: 1) también como el 7mero Aβ (DAEFRHDC) (SEQ ID NO: 2) es dependiente del pH y produce un grado superior de modificación/conjugación cuando el pH de la condición de reacción es incrementado. Utilizando la sal de TFA de los péptidos 5mer y 7mer, el grado de conjugación fue evaluado a pH 9.0 con cantidades variables de carga de péptido (Figura 4). Es evidente de estos resultados que los conjugados de péptido con un número definido de copias de péptido por molécula de CRM pueden ser generados al hacer variar la proporción de péptido/CRM activado durante el proceso

de conjugación. Experimentos similares se realizaron utilizando la sal de acetato del péptido 7mer de Aβ.

Para la conjugación $A\beta_{1-7}$/CRM, el proceso de coronación fue evaluado al comparar las moles de CMCA por CRM a las moles de CMC por CRM. Puesto que el total de CMC y CMCA fue constante para cada proporción de péptido: CRM probada, se supone que el proceso de coronación es completo (Figura 5). La modificación total en el conjugado permaneció entre 19 y 21, comparable con el número de lisinas bromoacetiladas (Figura 5). Estos experimentos fueron realizados con TFA como el contra-ion para el péptido. La conjugación $A\beta_{1-7}$/CRM fue repetida utilizando la sal de acetato del péptido en lugar de la sal de TFA y estos datos son mostrados en la Figura 5 y 6. El proceso de coronación pareció ir a la consumación, con el total de CMC y CMCA para cada punto que permanece entre 20 y 22. Las condiciones para la reacción de conjugación Aβ-CRM han sido optimizadas a pH 9.0, con el grado de conjugación controlado por la proporción de péptido a CRM en la reacción. Al hacer variar la proporción de 0.1 a 1.5, el grado de conjugación se puede hacer variar (Figura 6).

El grado de activación y conjugación son función de la proporción de reactivo:proteína, temperatura de la reacción y pH de la solución regulador del pH de reacción. El grado de modificación (conjugación) para cada conjugado fue calculado al restar el valor de la masa de CRM_{197} activado del valor de la masa de cada conjugado y dividir la masa del péptido utilizado para preparar el conjugado. El grado de modificación (conjugación) para todos los conjugados es descrito en la Tabla 2.

El grado de conjugación fue también comparado con los

valores determinados por la cantidad estimada de residuos de S-carboximetilcisteína formados por mol de CRM_{197} (también mostrado en la Tabla 2).

Tabla 2

Grado de Modificación: Comparación de Datos de MALDI-TOF y AAA

Muestra	Da (De Espectrometría de Masa)	Grado de conjugación (De Espectrometría de Masa)	Grado de conjugación (De Análisis de CMC-aminoácido)
CRM_{197}	58,408	–	–
BrAc-CRM	60,752	19	–
$A\beta_{1-7}$/CRM	74,463	14	15
$A\beta_{1-7}$/CRM	72,375	12	14
$A\beta_{1-5}$/CRM	75,425	20	21
$A\beta_{1-5}$/CRM	71,690	15	18

Ejemplo 6

Estudios de Inmunogenicidad de Conjugados de Péptido Aβ

Péptidos que abarcan los residuos N-terminales 1-5, 1-7, 1-9 y 1-12 de Aβ (con y sin la secuencia de enlazador GAGAC) y un péptido correspondiente al término N de Aβ en secuencia inversa de aminoácidos doce a aminoácido uno (1-12mer en secuencia inversa), cada uno conjugado a CRM_{197}, fueron usados para inmunizar ratones junto con un 1-12mer-péptido Aβ sin conjugar en una formulación con STIMULON™ QS-21. Cada grupo de ratones fue inmunizado subcutáneamente con una dosis ya sea

de 30 µg o 5 µg de una de las muestras formuladas con 20 µg del adyuvante STIMULON™ QS-21, al comienzo del estudio (semana 0) y subsecuente a las semanas 3 y 6. El protocolo de estudio es ilustrado en la Tabla 3.

Como se muestra en la Tabla 3, los péptido que abarcan los residuos N-terminales 1-5, 1-7, 1-9 y 1-12 de Aβ (con y sin la secuencia enlazadora GAGAC) y un péptido correspondiente al término N de Aβ en secuencia inversa del aminoácido doce al aminoácido uno (1-2mer en inverso) conjugados a CRM_{197} fueron usados para inmunizar ratones junto con el 1-12 mer péptido Aβ sin conjugar en una formulación con QS-21. Cada grupo de ratones fueron vacunados subcutáneamente con una dosis ya sea de 30 µg o 5 µg de una de las muestras formuladas con 20 µg del adyuvante QS-21, al comienzo del estudio (semana 0) y subsecuentemente a semanas 3 y 6. Ratones Webster suizos fueron usados para todo el estudio con 5 ratones en cada grupo. Volumen de inyección = 100 µl; B = Sangría; V = vacuna; E = exsanguinado.

Títulos anti-Aβ fueron medidos mediante ELISA contra Aβ y CRM_{197} como se describe a continuación. Brevemente, placas de 96 cavidades Costar (#3591) fueron recubiertas durante toda la noche a temperatura ambiente con 2 µg/mL de Aβ1-42 en solución reguladora del pH de carbonato/bicarbonato estéril, pH 9.6. Las placas fueron vaciadas y bloqueadas durante dos horas a temperatura ambiente con 200 µl/cavidad de BSA al 0.05% en PBS 1X/0.05% Tween 20. Las placas bloqueadas fueron vaciadas y lavadas con un lavador de placas que contiene TBS, solución reguladora del pH de lavado Brij-35 al 0.1% (sin azida). Todos los antisueros primarios fueron diluidos serialmente con BSA al 0.05% en PBS 1X que contiene 0.05% de Tween 20/0.02% de azida y

100 µl de cada solución fueron luego transferidos a las cavidades de placas apropiadas e incubadas a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego las placas fueron vaciadas/lavadas como se describe anteriormente. Anticuerpo secundario IgG anti-ratón de cabra conjugado de fosfatasa alcalina de Southern Biotech (ciudad, estado) fue diluido 1:1000 con 0.05% de BSA en PBS que contiene 0.05% de Tween 20/0.02% de azida y 100 µl fueron agregados a cada cavidad e incubados a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego las placas fueron vaciadas/lavadas como se describe anteriormente y finalmente incubadas a temperatura durante 1 hora con 100 µl/cávidad de una solución de 1 mg/mL de sustrato de fosfato de p-nitrofenilo preparado en dietanolamina/$MgCl_2$, pH 9.8. El desarrollo de color fue detenido con la adición de 50 µL/cavidad de NaOH 3 N. Las placas fueron leídas a 405 nM con referencia 690 nM. Los titulos de punto final fueron calculados a un O.D. de 0.1 AU.

Tabla 3

Protocolo de Estudio de Inmunización de Ratón

Código de grupo	Descripción	Dosis (µg)	Semana 0	Semana 3	Semana 6	Semana 8	Semana 13	Semana 16
AE488	CRM/1-7 sin enlazador	30	B,V	B,V	B,V	B	B	E
AE489	CRM/1-12 con enlazador	30	B,V	B,V	B,V	B	B	E
AE490	CRM/1-9 con enlazador	30	B,V	B,V	B,V	B	B	E
AE491	CRM/1-7 con enlazador	30	B,V	B,V	B,V	B	B	E
AE492	CRM/1-5 con enlazador	30	B,V	B,V	B,V	B	B	E
AE493	CRM/1-9 con enlazador	30	B,V	B,V	B,V	B	B	E
AE494	CRM/1-12 sin enlazador	30	B,V	B,V	B,V	B	B	E
AE495	CRM/1-5 con enlazador	30	B,V	B,V	B,V	B	B	E
AE496	CRM/1-7 sin	4	B,V	B,V	B,V	B	B	E

Código de grupo	Descripción	Dosis (µg)	Semana 0	Semana 3	Semana 6	Semana 8	Semana 13	Semana 16
AE502	CRM/1-12 sin enlazador	5	B,V	B,V	B,V	B	B	E
AE503	CRM/1-5 con enlazador	5	B,V	B,V	B,V	B	B	E
AE504	CRM_{197} C1-6151	30	B,V	B,V	B,V	B	B	E
AE505	CRM_{197} C1-6151	5	B,V	B,V	B,V	B	B	E
AE506	CRM/12-1mer	30	B,V	B,V	B,V	B	B	E
AE507	CRM/12-1mer	5	B,V	B,V	B,V	B	B	E
AE508	Péptido 1-12mer	30	B,V	B,V	B,V	B	B	E
AE509	Péptido 1-12mer	5	B,V	B,V	B,V	B	B	E
AE510	Ab	30	B,V	B,V	B,V	B	B	E
AE511	Ab	5	B,V	B,V	B,V	B	B	E

ELISA de CRM_{197}

Placas de 96 cavidades Greiner (#650011) fueron recubiertas a 37°C durante 90 minutos con 5.0 µg/mL (100 µl/cavidad) de CRM_{197} en solución reguladora del pH de carbono/bicarbonato estéril, pH 9.6. Las placas fueron vaciadas y lavadas con un lavador de placas que contiene TBS 1X, solución reguladora del pH de lavado Brij-35 al 0.1%. Todos los antisueros primarios fueron diluidos serialmente con PBS 1X que contiene 0.3% de Tween 20/EDTA y luego 100 µL de cada dilución fueron transferidos a las cavidades de placa apropiadas e incubados a 37°C durante 1 hora. Luego las placas fueron vaciadas/lavadas como se describe anteriormente. Anticuerpo secundario de IgG anti-ratón de cabra conjugado de fosfatasa alcalina de Southern Biotech fue diluido 1:1000 con PBS 1X que contiene 0.05% de Tween 20/0.02% de azida y 100 µL fueron agregados a cada cavidad e incubados a 37°C durante 1 hora. Luego las placas fueron vaciadas/lavadas como se describe anteriormente y finalmente incubadas a temperatura ambiente durante 1 hora con 100 µL/cavidad de una solución de 1 mg/mL de sustrato de fosfato de p-nitrofenilo preparado en dietanolamina/$MgCl_2$, pH 9.8. El desarrollo fue detenido con adición de 50 µL/cavidad de NaOH 3 N. Las placas fueron leídas a 405 nM con referencia de 690 nM. Los títulos de punto final fueron calculados a un O.D. de 0.1 AU.

Las Tablas 4-6 ilustran los títulos de ELISA de punto final contra Aβ. Enseguida de la inmunización primaria, todos los ocho conjugados (excluyendo el control negativo) indujeron respuestas inmunes IgG anti-Aβ mensurable. Sin embargo, la dosis de 30 µg, pero no la dosis de 5 µg de Aβ dio una

respuesta positiva a la semana 3 enseguida de la inmunización primaria. Entre todos los conjugados, parece que el péptido 1-7 de Aβ conjugado sin enlazador produjo una respuesta tan buena como o mejor que otros conjugados estudiados. A la dosis de 5 µg, Aβ 1-5C mejoró a las semanas 8-16. Aβ 1-7C fue mejor a la dosis de 30 µg. El análisis de títulos de anticuerpo después de la segunda y tercera inmunización ya sea con dosis de 5 ó 30 µg indican que la respuesta inmune máxima a Aβ para la mayoría de los conjugados fue vista después de la segunda inmunización. Por lo menos en ratones, la tercera inmunización no pareció mejorar la respuesta inmune. Sin embargo, el péptido Aβ necesitó tres inmunización con la dosis de 30 µg para alcanzar la respuesta inmune máxima contra el péptido (Tabla 5). En términos de decaimiento de anticuerpo en un período de tiempo extenso, el nivel de anticuerpo de los grupos inmunizados con conjugados fue reducido por 2 a 3 veces en comparación con el nivel más alto dentro de aquel grupo. Muestras individuales de las semanas 6 y 8 fueron analizadas para calcular los GMT contra Aβ para cada uno de los grupos (Tabla 6) para ver si algún grupo conjugado era sustancialmente mejor que los otros. El análisis estadístico de los títulos de semana 6 de los conjugados Aβ1-5C, Aβ 1-7C y Aβ 1-9C indica que el conjugado Aβ 1-7 indujo un título significativamente más alto. También es evidente de este experimento que las secuencia de enlazador GAGAC no contribuyó a producir la respuesta inmune al péptido.

252

Tabla 4

Grupo		Semana 3	Semana 6	Semana 8	Semana 13	Semana 16
1-5C	<100	14,960	68,7691	882,012	625,208	771,828
1-7C	<100	51,253	1,280,181	860,463	520,060	571,043
1-9C	<100	18,615	1,008,872	622,325	348,967	380,755
1-12C	<100	615	132,009	390,624	166,162	184,170
1-5C	<100	4,999	458,075	454,631	237,573	220,091
1-7C	<100	17,693	849,170	842,402	446,089	400,536
1-9C	<100	18,544	1,465,115	1,180,347	571,127	579,477
1-12LC	<100	12,664	908,360	598,867	368,101	316,075
CRM_{197}	<100	<100	<100	<100	<100	<100
1-42	<100	<100	<100	<100	<100	<100
1-12	<100	<100	<100	<100	<100	<100
12-1C	<100	<100	<100	<100	<100	<100

Tabla 4. Semanas 0, 3, 6, 8, 13 y títulos de punto final de ELISA 16 contra Aβ utilizando antisuero de la dosis de 5 µg de conjugados de péptido que abarcan longitudes variables del término N del péptido Aβ amiloide, Referencia: Elan Hyperimmune polyclonal #592 = 3,073,307. Punto final a O.D. 0.1 AU. Ratones Webster Suizos fueron inmunizados SC-N con 5 µg de los antígenos anteriores formulados con 20 µg de STIMULON™ QS-21 a la semana 0, 3 y 6.

Tabla 5

Grupo	Semana 0	Semana 3	Semana 6	Semana 8	Semana 13	Semana 16
1-5C	<100	18,150	590,355	332,832	204,645	176,159
1-7C	<100	100,672	1,840,741	647,470	592,638	779,072
1-9C	<100	18,520	1,184,696	713,494	363,459	327,065
1-12C	<100	7,837	1,325,725	1,126,389	681,268	577,604
1-5C	<100	16,347	469,191	184,077	177,358	164,680

Tabla 5. Semanas 0, 3, 6, 8, 13 y títulos de punto final de ELISA 16 contra Aβ utilizando antisuero de la dosis de 30 µg de conjugados de péptido que abarcan longitudes variables del término N del péptido Aβ amiloide, Referencia: Elan Hyperimmune polyclonal #592 = 3,073,307. Punto final a O.D. 0.1 AU. Ratones Webster Suizos fueron inmunizados SC-N con 30 µg de los antígenos anteriores formulados con 20 µg de STIMULON™ QS-21 a la semana 0, 3 y 6.

Tabla 6

Grupo	Semana 6	Semana 8
1-5C	237,668[a]	161,671[b]
1-7C	1866,702[a]	881,146[b]
1-9C	963,323[a]	595,414[b]
1-12C	940,260	955,470
1-5LC	395,553	141,084
1-7LC	516,921	394,521
1-9LC	826,773	562,458
1-12LC	544,768	376,952
1-42	365	4 565

Tabla 6. GMT de punto final de ELISA de las semanas 6 y 8 contra Aβ utilizando antisueros de la dosis de 30 µg de conjugados de péptido que abarcan longitudes variables del término N de amiloide-Aβ. Referencia: Elan Hyperimmune Polyclonal #592 = 3,073,307. Punto final a O.D. 0.1 AU. Ratones Webster Suizos fueron inmunizados SC-N con 30 µg de los antígenos anteriores formulados con 20 µg de STIMULON™ QS-21 a la semanas 0, 3 y 6.

a. Análisis estadístico de los títulos de semana 6 de 1-5C, 1-7C y 1-9C utilizando Turkey-Kramer que muestra una diferencia estadística entre 1-5C vs 1-7C solamente, mientras que el análisis utilizando la prueba T de Student muestra una diferencia estadística entre 1-5C vs 1-7C y 1-5C vs 1-9C.

b. Análisis estadístico de títulos de semana 8 de 1-5C, 1-7C y 1-9C no muestra una diferencia estadística entre los tres grupos. Sin embargo, parece haber una tendencia que puede indicar una diferencia entre 1-5C vs 1-7C.

Teñido de Tejido de Cerebro de Ratón PDAPP

El análisis de tenido de cerebro de PDAPP proporciona una indicación de la funcionalidad de los conjugados de péptido Aβ y/o antisuero Aβ 1-42. Muestras de suero de grupos de ratones individuales fueron analizadas separadamente en cuanto

a su capacidad para reconocer placas de tejido de cerebro de ratón PDAPP que contiene péptido amiloide. Los resultados son mostrados en las Tablas 7A y 7B. Con la excepción del antisuero conjugado Aβ 5mero, hubo una respuesta relacionada con la dosis en el reconocimiento de las placas. Independiente del enlazador, el antisuero inducido por conjugado de 30 μg tuvo mejor patrón de reactividad en comparación con aquel del antisuero de conjugado de 5 μg. Sin embargo, con el antisuero conjugado de Aβ 5mero, parece haber una reactividad similar o mejor para el grupo de 5 μg. al comparar todos estos resultados, se concluyó que los resultados elaborados del Aβ 1-5mero a Aβ 1-9mero son suficientes para producir placas que reconocen respuesta inmune en ratones y la presencia del enlazador no es esencial. Las siguientes conclusiones pueden ser extraída de este estudio: (a) todos los conjugados de péptido indujeron antisuero de alto título contra la proteína portadora CRM_{197} a niveles iguales o ligeramente más altos en comparación con el control de CRM_{197} sin conjugar (no mostrado). (b) Los conjugados con el enlazador de GAGAC no mejoran la inmuinogenicidad o funcionalidad en comparación con conjugados sin el enlazador. (c) Los datos de inmunogenicidad y teñido de tejido de cerebro de PDAPP (una indicación inicial de anticuerpo funcional) muestran que el Aβ 1-5mero y conjugados de Aβ 1-7mero parecen ser los inmunógenos preferidos para desarrollo adicional.

Tabla 7A. Teñido de Tejido de Cerebro de Ratón PDAPP

Dosis de 5 µg					
Sin enlazador			Con enlazador		
Vacuna	Animal #	Teñido de PDAPP	Vacuna	Animal #	Teñido de PDAPP
CRM/Aβ 1-5	1	(no difuso)	CRM/Aβ 1-5	1	-
	2	++/+++		2	-
	3	++/+++		3	±
	4	++		4	±
	5	++		5	±
CRM/Aβ 1-7	1	++	CRM/Aβ 1-7	1	+
	2	++		2	++
	3	++		3	++
	4	++		4	+
	5	++		5	++
CRM/Aβ 1-9	1	+	CRM/Aβ 1-9	1	++
	2	+/++		2	++
	3	±		3	+
	4	±		4	+
	5	±		5	+
CRM/Aβ 1-12	1	-	CRM/Aβ 1-12	1	+
	2	?		2	+
	3	±		3	++
	4	-		4	-
	5	±		5	±
CRM/Aβ 12-1mero	1	-	Aβ42	1	-
	2	-		2	-
	3	±		3	-
	4	-		4	-
	5	±		5	-

Todos los antisueros diluidos 1:1000 para el procedimiento de teñido.

Tabla 7B. Teñido de Tejido de Cerebro de Ratón PDAPP

Dosis de 30 µg					
Sin enlazador			Con enlazador		
Vacuna	Animal #	Teñido de PDAPP	Vacuna	Animal #	Teñido de PDAPP
CRM/Aβ 1-5	1	-	CRM/Aβ 1-5	1	+
	2	+/++		2	-
	3	-		3	-
	4	±		4	±
	5	++		5	-
CRM/Aβ 1-7	1	+/++	CRM/Aβ 1-7	1	+
	2	++		2	±/+
	3	++		3	+/++
	4	++		4	±/+
	5	++/+++		5	+/++
CRM/Aβ 1-9	1	++/+++	CRM/Aβ 1-9	1	+/++
	2	++		2	++
	3	++		3	++
	4	+		4	±
	5	+		5	+/++
CRM/Aβ 1-12	1	-	CRM/Aβ 1-12	1	+/++
	2	+/++		2	+
	3	+/++		3	-
	4	±		4	+/++
	5	±		5	+
CRM/Aβ 12-1mero	1	-	Aβ42	1	±
	2	-		2	-
	3	-		3	-
	4	-		4	-
	5	-		5	-

Todo antisuero diluido 1:1000 para el procedimiento de teñido.

EJEMPLO 7

Estudios de Inmunogenicidad en Changos

Grupos de 6 changos recibieron 30 µg del conjugado 7mero (conjugado total) con adyuvante ya sea de STIMULON™ QS-21, alumbre o formulación de RC529 SE a los días 0, 29 y 58.

Los grupos adicionales incluidos fueron el conjugado 5mero 30 µg ya sea con alumbre ($Al(OH)_3$) o RC529 SE, 75 y 300 µg de Aβ con STIMULON™ como controles positivos. Los controles

positivos fueron inmunizados cada dos semanas. Al día 36 y 64, los títulos de anticuerpo anti-Aβ fueron determinados (Figuras 7-9). En el día 36, los conjugados 7mero/CRM con STIMULON™ QS-21, alumbre y RC529 SE produjeron títulos de GMT de 10110, 13330 y 17090 respectivamente (Figura 7). En contraste Aβ 1-42 más STIMULON™ produjeron GMT de 223 y 1734 a niveles de dosis de 75 y 300 µg, respectivamente. El conjugado Aβ 5mero produjeron un título de 2134 con alumbre y 15980 con RC529 SE. En el día 64, esto es, después de 3 dosis de conjugados ya sea con STIMULON™ QS21 o RC-529 SE indujo títulos sustancialmente más altos que la segunda post-dosis (GMT 69910 para 7mero/RC-529SE; 21640 para Aβ 5mero/RC-529 SE y 30310 para Aβ 7mero/STIMULON™ QS-21) (Figura 8). Los conjugados con alumbre produjeron títulos reducidos a la tercera post-inmunización en comparación con la segunda post-inmunización. Parece que el conjugado Aβ 7mero produjo una respuesta mejor en comparación con el conjugado Aβ 5mero. En changos, con adyuvante de conjugado de Aβ 7mero con RC-529 SE o STIMULON™ QS-21 produjo la respuesta más alta (Figura 9). La respuesta al conjugado Aβ 7mero con alumbre fue moderada y similar a aquella de 300 µg de Aβ 1-42 son STIMULON™ QS-21.

Se pueden extraer varias conclusiones del ejemplo actual. En primer lugar, ambos conjugados son muy inmunogénicos en especies de primates. En segundo lugar, la presencia de adyuvantes en la formulación de inmunización influencía significativamente la respuesta inmune. En tercer lugar, excepto por el adyuvante de aluminio, RC-529 SE y STIMULON™ QS-21 mejoran la respuesta inmune después de cada dosis de inmunización por lo menos hasta tres dosis (Figura 9). Sobre todo, el conjugado Aβ 7mero indujo una respuesta de anticuerpo

259
259

más alta en presencia de 529, seguido por STIMULON™ QS-21 (véase Figura 9).

EJEMPLO 8

Preparación de Múltiples Conjugados de Péptido Antigénico (MAP) y su Estudio de Inmunogenicidad

Varios métodos están disponibles para generar múltiples sitios antigénicos sobre los portadores. En los ejemplos previos, cada sitio antigénico es conjugado separadamente al portador mediante químicas de conjugación y coronación definidas. En este ejemplo, múltiples sitios antigénicos son conocidos mediante síntesis en fase sólida de repeticiones en tándem del Aβ 1-7mer. Alternativamente, estas repeticiones en tándem pueden ser acopladas con epítopos de células T con o sin enlazarse por medio de un núcleo de lisina como se describe en cualquier parte en la presente. Estos péptidos antigénicos múltiples fueron sintetizados con un residuo de cisteinilo adicional para conjugación a la proteína portadora. Péptidos que contienen una unidad de repetición (1-7), tres unidades de repetición $(1-7)_3$ y cinco unidades de repetición $(1-7)_5$ con un residuo de cisteinilo adicional en el extremo carboxilo fueron sintetizados. Estos péptidos fueron anexados covalentemente a CRM bromoacetilado durante toda la noche por medio de sus residuos de cisteína C-terminales. La reacción se llevó a cabo a pH 9.0-9.2 con proporciones de péptido:CRM agregados como se resume en la Tabla 8. Los grupos bromoacetilo, los cuales no reaccionan con el péptido fueron coronados con N-acetilcisteamina. Estos lotes representan conjugados que tienen una sola copia, tres copias en tándem y cinco copias en tándem del péptido Aβ 1-7 conjugado a CRM,

respectivamente. La Tabla 8 resume brevemente las propiedades de las muestras.

Tabla 8

Muestras de Conjugado de Péptido Antigénico Múltiple (MAP)

Conjugado	Péptido: CRM (peso/peso)	pH de reacción
Ab(1-7)$_1$/CRM	0.37	8.99
Ab(1-7)$_3$/CRM	1.02	8.95
Ab(1-7)$_5$/CRM	1.67	9.17

La carga del péptido (el número promedio de Aβ 1-7 péptidos por portador) y números de coronación (Tabla 9) son los números de aminoácidos únicos (CMC o CMCA) por portador como se determina mediante análisis de aminoácidos. Los valores de CMC y CMCA fueron referidos a lisina.

Tabla 9

Grado de Conjugación y Coronación de Cada Conjugado

CONJUGADO	Carga de Péptido (CMC)	Coronación (CMCA)
Aβ(1-7)$_1$/CRM	12.5	11.7
Aβ(1-7)$_3$/CRM	10.4	15.2
Aβ(1-7)$_5$/CRM	9.8	15.9

Ratones Swiss-Webster (10 por grupo) fueron inmunizados subcutáneamente con 1 ó 0.1 µg de péptido conjugado de Aβ/CRM. La mitad de los ratones fueron inmunizados con la composición formulada con 100 µg del adyuvante Al(OH)$_3$, y la mitad fueron inmunizados sin adyuvante. Las inmunizaciones fueron programadas a la semana 0, 3 y 6. Las sangrías fueron programadas para la semana 0, 3 y 6. Las muestras de suero fueron analizadas en cuanto a respuesta de anticuerpo contra el

péptido Aβ1-42mer. Los resultados son mostrados en la Tabla 10.

Tabla 10

Títulos de Punto Final de Anti-Aβ para Conjugados de Péptido de Antigénico Múltiple (MAP)

Código de grupo	Descripción de muestra	Adyuvante	Acumulación a semana 0	GMT de semana 3	GMT de semana 6
AG332	1 μg Aβ $(1\text{-}7)_1$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	18,096	100,279
AG333	1 μg Aβ $(1\text{-}7)_2$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	44,911	420,235
AG334	1 μg Aβ $(1\text{-}7)_3$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	27,032	394,488
AG335	0.1 μg Aβ $(1\text{-}7)_1$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	19,350	66,834
AG336	0.1 μg Aβ $(1\text{-}7)_2$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	13,307	208,272

Código de grupo	Descripción de muestra	Adyuvante	Acumulación a semana 0	GMT de semana 3	GMT de semana 6
AG337	0.1 μg Aβ $(1\text{-}7)_3$/CRM	$Al(OH)_3$	<100	1,196	22,665
AG338	1 μg Aβ $(1\text{-}7)_1$/CRM	Ninguno	<100	5,273	370,980
AG339	1 μg Aβ $(1\text{-}7)_2$/CRM	Ninguno	<100	9,299	541,093
AG340	1 μg Aβ $(1\text{-}7)_3$/CRM	Ninguno	<100	3,100	185,272
AG341	0.1 μg Aβ $(1\text{-}7)_1$/CRM	Ninguno	<100	340	25,839
AG342	0.1 μg Aβ $(1\text{-}7)_2$/CRM	Ninguno	<100	128	5,553
AG343	0.1 μg Aβ $(1\text{-}7)_3$/CRM	Ninguno	<100	668	2,098

Todos los conjugados indujeron un título de

anticuerpo anti-Aβ 1-42 después de la inmunización primaria y los niveles fueron incrementados sustancialmente después de la dosis de refuerzo. En ausencia del adyuvante de aluminio, las diferencias en la respuesta de dosis fueron evidentes tanto en las sangrías de la semana 3 y la semana 6. La dosis más alta produjo la respuesta de anticuerpo de título más alto. El adyuvante de aluminio produjo una respuesta de anticuerpo sustancialmente más alta a la semana 3 a ambos niveles de dosis (0.1 y 1 μg) en comparación con los grupos sin adyuvantes. Después de la inmunización secundaria, los conjugados dados a la dosis de 1 μg produjeron un incremento de 5 a 10 veces en niveles de anticuerpo. A este nivel de dosis, los conjugados de péptido con 3 y 5 repeticiones indujeron respuesta de anticuerpo más alta que un conjugado que tiene una sola repetición. Los títulos contra el portador de CRM fueron también determinados y estos son enlistados en la Tabla 11.

Tabla 11

Títulos de Punto Final de Anti-CRM para Conjugados de Péptido

Código de grupo	Descripción de muestra	Adyuvante	Acumulación a semana 0	GMT de semana 3	GMT de semana 6
AG332	1 μg Aβ (1-7)$_1$/CRM	$Al(OH)_3$	<50	10,531	114,602
AG333	1 μg Aβ (1-7)$_3$/CRM	$Al(OH)_3$	<50	4,274	83,065

Antigénico Múltiple (MAP)

Los animales fueron inmunizados a las semanas 0 y 3 y sangrados a la semana 0, 3 y 6. Adyuvante: 100 μg de $Al(OH)_3$ o ninguno. ND = No determinado.

Los datos en la Tabla 11 indican los grupos sin adyuvante indujeron niveles muy bajos de respuesta de anticuerpo anti-CRM tanto a 1 μg también como a niveles de dosis de 0.1 μg aún después de dos inmunizaciones. Sin embargo, los conjugados con adyuvante de hidróxido de aluminio indujeron niveles sustanciales de respuesta de anticuerpo anti-CRM a la dosis de 1 μg y una respuesta mucho más baja a la dosis de 0.1 μg. En presencia del adyuvante, los títulos de CRM fueron más altos para el conjugado de una sola repetición, intermedios para el conjugado de triple repetición y más bajos para el conjugado de quíntuple repetición. Esto es como se esperaba, puesto que la dosis de CRM por dosis de péptido es más baja

para Aβ $(1-7)_5$/CRM, y más alta para Aβ $(1-7)_1$/CRM. Las diferencias fueron solo estadísticamente significativas a la semana 6 para una dosis de 0.1 μg.

El objetivo de la presente invención es producir una respuesta inmunogénica de título más alto contra el hapteno antígeno y no necesariamente contra la proteína portadora. Bajo ciertas circunstancias, es deseable producir respuesta inmune óptima contra el determinante antigénico de hapteno con mínima o ninguna respuesta inmune contra la proteína portadora. Para tales aplicaciones, los conjugados con repeticiones en tándem de múltiples determinantes antigénicos con formulación sin adyuvante servirían para la necesidad.

EJEMPLO 9

Preparación de Conjugados de Aβ-péptido con Varias Proteínas Portadoras y su Inmunogenicidad

Este ejemplo compara la inmunogenicidad de conjugados utilizando seis proteínas portadoras diferentes. La sal de acetato de Aβ1-7 fue agregada a portadores bromoacetilados en una proporción 1:1 en peso a pH 9. Todos los conjugados excepto Aβ1-7/rC5ap fueron coronados con N-aceticisteamina. Todos los portadores alternativos son proteínas bacterianas recombinantes, que incluyen CRM (toxoide de difteria), C5a peptidasa recombinante (rC5ap; clonado de *Streptococcus agalactiae*, incluye mutaciones D130A y S512A), ORF 1224, 1664, 2452 (todos clonados de *Streptococcus pyrogenes*), y T367, T858 (cada uno clonado de *Chlamydia pneumoniae*). Un resumen de los portadores usados se encuentra en la Tabla 12. El grado de conjugación y coronación de cada conjugado Aβ1-7 a estos portadores es presentado en la Tabla 13.

Este estudio muestra que el conjugado de C5a peptidasa recombinante induce títulos más altos contra Aβ que la mayoría de los otros portadores probados, incluyendo CRM. Esta diferencia fue estadísticamente significativa para los títulos de 6 semanas de grupo que recibieron hidróxido de aluminio. Además, el conjugado Aβ1-7/T858 fue significativamente más inmunogénico que la mayoría de los otros conjugados en ausencia de adyuvante. El único conjugado que se desempeño deficientemente en relación con el conjugado de control de CRM fue Aβ1-7/T367, un conjugado que tampoco reaccionó con un anticuerpo monoclonal específico Aβ mediante bandas de proteínas. Este estudio confirma que numerosos otros portadores pueden ser usados exitosamente para inmunizar contra el péptido Aβ.

Tabla 12

Lista de Portadores y Propiedades de Conjugado

PROTEÍNA PORTADORA	PESO MOLECULAR de Portador (Da)	# de lisinas
CRM	58,408	39
rC5ap	108,560	85
ORF1224	30,950	18
ORF1664	31,270	38
ORF2452	31,790	29
T367	49,700	29
T858	37,190	23

Tabla 13

Grado de Conjugación y Coronación de cada Conjugado

CONJUGADO	Carga de péptido (CMC)	Coronación (CMCA)
Aβ1-7/rC5ap	25.9	-
Aβ1-7/ORF1224	12.8	5.7
Aβ1-7/ORF1664	13.4	10.8
Aβ1-7/ORF2452	12.03	10.5
Aβ1-7/T367	13.2	8.2

Resultados de Conjugación: La carga de péptido (el número promedio de péptidos Aβ1-7 por portador) y número de coronación son los números de aminoácidos únicos (CMC o CMCA) por portador como se determina mediante análisis de aminoácidos. Los valores de CMC y CMCA fueron referidos a lisina.

Resultados de Inmunización

El título promedio geométrico para cada grupo en este estudio es enlistado en la Tabla 14. A la semana 3, sin consideración de la presencia de adyuvante, Aβ1-7/rC5ap indujo títulos anti-Aβ significativamente más altos que los conjugados correspondientes preparados con *Streptococcus pyrogenes* ORF 1224, 1664, 2452, o *Chlamydia pneumoniae* ORF T367 y T858. A la semana 3 en ausencia de adyuvante, Aβ1-7/rC5ap fue también más inmunogénico que todos los otros conjugados excepto Aβ1-7/T858. El conjugado T858 sin $Al(OH)_3$ indujo títulos más altos que ORF1224, ORF1664, ORF2452 y conjugados de CRM sin adyuvante. El único conjugado que fue significativamente menos inmunogénico que Aβ1-7/CRM fue Aβ1-7/T367 ($p<0.0002$). El portador T367 se desempeñó deficientemente con y sin adyuvante tanto a las semanas 3 como 6. En la semana 6, el conjugado rC5ap con hidróxido de aluminio fue más inmunogénico (pz0.04) que todos los otros conjugados excepto Aβ1-7/ORF2452. En ausencia de

adyuvante, tanto Aβ1-7/rC5ap y Aβ1-7/T858 indujeron títulos significativamente más altos que los conjugados de ORF1224, ORF1664 o T367. Aβ1-7/CRM sin hidróxido de aluminio indujo títulos más altos que ya sea Aβ1-7/ORF1664 o Aβ1-7/T367.

Tabla 14

Título de Punto Final de Anti-Aβ-42.

Código de grupo	Descripción de muestra	Adyuvante	Acumulación de semana 0	GMT semana 3	GMT semana 6
AG344	5 µg Aβ 1-7/CRM	$Al(OH)_3$	<100	21,404	54,157
AG345	5 µg Aβ 1-7/rC5ap	$Al(OH)_3$	<100	61,967	402,972
AG346	5 µg Aβ 1-7/ORF1224	$Al(OH)_3$	<100	10,711	30,084
AG347	5 µg Aβ 1-7/ORF1664	$Al(OH)_3$	<100	7,188	43,226
AG348	5 µg Aβ 1-7/ORF2452	$Al(OH)_3$	<100	11,437	109,091
AG349	5 µg Aβ 1-7/T367	$Al(OH)_3$	<100	321	5,139
AG350	5 µg Aβ 1-7/T858	Ninguno	<100	16,656	33,328
AG351	5 µg Aβ 1-7/CRM	Ninguno	<100	2,615	119,488
AG352	5 µg Aβ 1-7/rC5ap	Ninguno	<100	11,858	279,113
AG353	5 µg Aβ 1-7/ORF1224	Ninguno	<100	1,674	18,719
AG354	5 µg Aβ 1-7/ORF1664	Ninguno	<100	119	9,832
AG355	5 µg Aβ 1-7/ORF2452	Ninguno	<100	2,493	76,038
AG356	5 µg Aβ 1-7/T367	Ninguno	<100	50	620
AG357	5 µg Aβ 1-7/T858	Ninguno	<100	28,820	275,202

Los animales fueron inmunizados a la semana 0 y 3 y sangrados a la semana 0, 3 y 6. La dosis está basada en la cantidad total de conjugado. Adyuvante: 100 µg de $Al(OH)_3$ o ninguno.

EJEMPLO 10

Preparación de Conjugados de Péptido-Proteína Aβ Adiciones

I. Activación

CRM_{197} deshelado (8 mL, 59.84 mg, a 7.48 mg/mL) fue disuelto en solución reguladora del pH de borato 0.1 M (pH 9, 3.968 mL) para traer la concentración a 5 mg/mL. La solución fue enfriada en un baño helado a 0-5°C. N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético (59.9 mg) (Aldrich-Sigma) fue disuelto en DMF (100 µL) (Aldrich-Sigma) y agregado gota a gota a la solución de CRM_{197}. Después de la adición de la N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético, se observó un precipitado. Cuando se verificó el pH, disminuyó a pH 6. El pH de la mezcla de reacción fue traído de regreso a pH 9 al agregar más solución reguladora del pH de borato 0.1 M. Luego la mezcla de reacción fue agitada a 4°C durante una hora con agitación moderada. La mezcla fue purificada y concentrada utilizando YM-10 centriprep concentración centrífuga y repurificada sobre Sephadex G-25 utilizando borato 10 mM como eluyente. Las fracciones positivas al reactivo de Bradford fueron acumuladas y concentradas utilizando centriprep YM-10. El grado de bromoacetilación fue determinado mediante análisis de Bradford (lineal). Se encontró que la concentración era de 5.36 mg/mL (Rendimiento 30 mg). Luego la concentración final fue ajustada para ser de 5 mg/mL y fue almacenada en el congelador en sacarosa al 5% hasta el uso adicional.

II. Conjugación

Para cada conjugación, se usó CRM_{197} bromoacetilado deshelado. Los péptidos fueron disueltos en solución reguladora del pH de borato (2.5 mg en 125 ml de solución reguladora del pH de borato). Se observó ligera insolubilidad con los Aβ péptidos KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45), CLVFFAEDV (SEQ ID NO: 50). El CRM_{197} bromoacetilado (5 mg/ml) fue tratado con las

soluciones/suspensiones de péptido. La proporción del péptido y proteína en la mezcla fue de 1:2. Se observó turbidez en las mezclas de conjugado con los péptidos KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45), CLVFFAEDCV (SEQ ID NO: 47), CKLVFFAED (SEQ ID NO: 48) y KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45). Luego las mezclas fueron verificadas en cuanto a pH (pH 9) e incubadas a 4°C durante toda la noche con agitación lenta. Se hicieron concentraciones finales de las mezclas a 3 mg/ml antes de la incubación. La turbidez de las mezclas de conjugados con péptidos CLVFFAEDV (SEQ ID NO: 47) y LVFFAEDC (SEQ ID NO: 50) desaparecieron después de la incubación. Sin embargo, KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45) y CKLVFFAED (SEQ ID NO: 48) fueron todavía ligeramente turbios. También se preparó conjugado de proteína de imitación soluble con cisteamina a una proporción de 1:1 (peso/peso). Péptidos sintetizados fueron obtenidos de BIOSOURCE con aproximadamente 95% de pureza.

Octámeros:

LVFFAEDVC (SEQ ID NO:44)

KLVFFAEDC (SEQ ID NO:45)

VFFAEDVGC (SEQ ID NO:43)

CLVFFAEDV (SEQ ID NO:47)

CKLVFFAED (SEQ ID NO:48)

CVFFAEDVG (SEQ ID NO: 46)

Heptámeros:

VFFAEDVC (SEQ ID NO: 50)

LVFFAEDC (SEQ ID NO: 50)

III: Coronación de grupos de lisina sin reaccionar en proteína:

Las lisinas sin reaccionar fueron coronadas con N-

acetilcisteamina (CMCA; Aldrich-Sigma) a una proporción de 1/1 (peso/peso) durante 4 horas a 4°C en tanto que se agita en la oscuridad. Los péptidos sin reaccionar y reactivos de coronación fueron separados de los conjugados mediante diálisis usando el casete Slide-A-Lyzer (Corte de peso molecular 10,000) (Pierce) contra solución reguladora del pH de PBS (2 litros) durante toda la noche (13 horas). El intercambio de solución reguladora del pH y diálisis se realizó dos veces (2 x 14 horas). Se observó ligera insolubilidad en los conjugados con los péptidos KLVFFAEDC (SEQ ID NO: 45) y CKLVFFAED (SEQ ID NO: 48). Luego todos los conjugados fueron almacenados en el refrigerador a 4°C en un conservador.

IV. Caracterización del portador de proteína:

Se usó MALDI-TOF-MS para determinar la masa del CRM_{197} bromoacetilado y la masa del conjugado N-acetilcisteamina-CRM_{197} de imitación.

En base a las masas de CRM_{197} y CRM_{197} bromoacetilado, 11 residuos de lisina fueron modificados.

(59941.46 - 58590.29)/122 = 11

En donde, PM de CRM_{197} es 58624.29

PM de CRM_{197} bromoacetilado es 5991.46

PM de bromoacetato es 122.

El grado de bromoacetilación fue más de 28%. (El número total de lisinas en CRM_{197} fue de 39). De estos 11 residuos de lisina modificados, 10 fueron acoplados con cisteamina. La eficiencia de acoplamiento fue de 90%.

(61143 - 59941)/119 = 10

En donde, PM de CRM_{197} bromoacetilado es 59941.46

PM de CRM_{197} bromoacetilado es 5991.46

PM de conjugado de imitación es 61143

PM de N-acetilcisteamina es de 119

(10/11) x 100 = 90.

V. Caracterización de los conjugados de péptido - proteína mediante análisis de bandas de proteínas de SDS-PAGE con el gel de premoldeo de Tris-Tricina:

Los conjugados de proteína-péptido fueron analizados mediante bandas de proteínas. Los carriles fueron: marcador (carril 1); L-28375 24/01 (carril 2); L-28375 24/02 (carril 3); L-28375 24/03 (carril 4); L-28375 24/04 (carril 5); L-28375 24/05 (carril 6); L-28375 24/06 (carril 7) L-28375 24107 (carril 8); L 28375 24/08 (carril 9); L-28375 24/09 (imitación) (carril 10) y $BrAcCRM_{197}$ (carril 11). Un anticuerpo monoclonal específico de ratones (248 - 6H9 - 806 Aβ 17-28) fue usado como el anticuerpo primario (antisueros) (se encontró que la dilución 1:3000 era la mejor). (H+L)-HPR de IgG de ratón anti-cabra fue el anticuerpo secundario (dilución 1:1000). Se observó que todos los conjugados eran reconocidos por el anticuerpo primario, excepto por el conjugado de imitación y el CRM_{197} activado. (Véase figura 10).

Concentración de proteína

Las concentraciones de proteína de las muestras de conjugado fueron determinadas mediante el análisis de BCA de Pierce. (Véase tabla 15).

Análisis de aminoácidos

El análisis de aminoácidos se llevó a cabo para determinar el grado de conjugación. El grado T de conjugación

se calculó en base a los residuos de CMCA (carboximetilcisteamina) encontrados en los conjugados. Se usó CMCA para coronar los sitios activados sin reaccionar después de conjugación con los péptidos. (Véase tabla 15).

Tabla 15

Grado de conjugación de péptidos con BrAcCRM197

Código de conjugado	Secuencia de péptido (SEQ ID NO:)	Concentración final (mg/mL)	Grado de conjugación (en base a CMCA)
L-28375 24/01	LVFFAEDV-C (SEQ ID NO:44)	1.67	8/10
L-28375 24/02	KLVFFAED-C (SEQ ID NO:45)	0.82	5/10
L-28375 24/03	VFFAEDVG-C (SEQ ID NO:43)	1.43	8/10
L-28375 24/04	C-LVFFAEDV (SEQ ID NO:47)	1.04	9/10
L-28375 24/05	C-KLVFFAED (SEQ ID NO:48)	0.78	1/10
L-28375 24/06	C-VFFAEDVG (SEQ ID NO:46)	0.97	9/10
L-28375 24/07	VFFAEDV-C (SEQ ID NO:49)	1.00	7/10
L-28375 24/08	LVFFAED-C (SEQ ID NO:50)	0.99	8/10
L-28375 24/09 (Inhibición)		1.89	10/11

Todos los análisis colorimétricos fueron efectuados usando el espectrofotómetro de microplacas y SOFTmax Pro.

Ejemplo 11

Estudios inmunogénicos de conjugados de péptido Aβ en ratones

Swiss Webster

Ratones Swiss Webster exógenos fueron inmunizados con VFFAEDVG-C (SEQ ID NO:43), LVFFABDV-C (SEQ ID NO:44), KLVFFAED-C (SEQ ID NO:45), C-VFFAEDVG (SEQ ID NO:46), C-LVFFABDV (SEQ ID NO:47), C-KLVFFAED (SEQ ID NO:48), VFFAEDV C (SEQ ID NO:49), LVFFAED-C (SEQ ID NO:50) cada uno conjugado a CRM_{197} o con Aβ1-7CRM_{197}, todos formulados con el adyuvante RC 529 SE. Nueve grupos de 10 animales por grupo fueron inmunizados subcutáneamente con uno de los conjugados de péptido Aβ al comienzo del estudio (semana 0) y subsecuentemente a la semana 4. El suero fue recolectado antes de, pero en los mismos días como la inmunización.

Estudios inmunogénicos de conjugados de péptido Aβ en ratones Balb/c endógenos

Ratones Balb/c endógenos fueron inmunizados como en el párrafo precedente, pero fueron también reforzados con conjugado y adyuvante a la semana 12.

Resultados

Los sueros de ambos estudios son recolectados para el análisis del título de anticuerpo IgG específico de anticuerpo $A\beta_{13-28}$. Sueros de ratones Balb/c son también recolectados para el análisis un día antes del refuerzo de la semana 12 y uno después de esto. Células del bazo de animales usados en el ejemplo 11 son evaluadas en cuanto a su potencial para responder *in vitro* a la estimulación con una acumulación traslapante de péptidos que abarcan $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-42}$ de plena longitud, CRM_{197} o activadores policlonales. El análisis consiste de lectura de Elispot para interleucinas 4 y 5 e

interferon gamma. Después de la consumación, los conjugados de péptido Aβ serán evaluados como se describe anteriormente y como se describe en el ejemplo 6.

Ejemplo 12

Estudios inmunogénicos de conjugados de péptido Aβ en ratones PSAPP

Los ratones son inmunizados con VFFAEDVG-C (SEQ ID NO:43), LVFFABDV-C (SEQ ID NO:44), KLVFFABD-C (SEQ ID NO:45), C-VFFABDVG (SEQ ID NO:46), C LVFFAEDV (SEQ ID NO:47), C-KLVFFAED (SEQ ID NO:48), VFFABDV-C (SEQ ID NO:49), LVFFAED-C (SEQ ID NO:50). El ratón PSAPP, un ratón doblemente transgénico (PSAPP) que sobreexpresa los transgenes MP y PS1 transgenes es descrito en in Holcomb, *et al.* (1998) *Nature Medicine* 4:97-11.

Estudios inmunogénicos de conjugados de péptido Aβ en ratones PDAPP

Ratones PDAPP son inmunizados con VFFABDVG-C (SEQ ID NO:43), LVFFAEDV-C (SEQ ID NO:44), KLVFFABD-C (SEQ 1]) NO:45), C-VFFAEDVG (SEQ ID NO:46), C LVFFAEDV (SEQ ID NO:47), C-KLVFFAED (SEQ ID NO:48), VFFAEDV-C (SEQ ID NO:49), LVFFABD-C (SEQ ID NO:50). El ratón PDAPP expresa una forma mutante de APP humano (APP^{V71F}) y desarrolla enfermedad de Alzheimer a edad jóven (Bard, *et al.* (2000) *Nature Medicine* 6:916-919; Masliah E, *et al.* (1996) *J Neurosci.* 15;16(18):5795-811).

Resultados

Los sueros de ambos estudios son recolectados para el análisis del título de anticuerpo IgG específico del péptido

$A\beta_{13-28}$. Después de la consumación, los conjugados de péptido Aβ serán evaluados como se describe anteriormente y como se describe en los ejemplos 6 y 11, también como en el análisis de acondicionamiento de miedo contextual (CFC).

El acondicionamiento de miedo contextual es una forma común de aprendizaje que es excepcionalmente confiable y rápidamente adquirida en la mayoría de los animales, por ejemplo mamíferos. Los animales de prueba aprenden a temer a un estímulo y/o ambiente previamente neutro debido a su asociación con una experiencia aversiva (véase por ejemplo, Fanselow, Ánim. Learn. Behav. 18:264-270 (1990); Wehner et al., Natúre Genet. 17:33 1-334. (1997); Caldarone et al., Nature Genet. 17:335-337(1997)).

El acondicionamiento de miedo contextual es especialmente útil para determinar la función o disfunción cognoscitiva, por ejemplo, como resultado de enfermedad o una alteración, tal como una enfermedad o alteración neurodegenerativa, una enfermedad o alteración relacionada con Aβ, una enfermedad o alteración amiloidogénica, la presencia de una alteración genética desfavorable que efectúa función cognoscitiva (por ejemplo, mutación genética, alteración genética o genotipo indeseable) y/o la eficacia de un agente, por ejemplo un agente conjugado Aβ, en la habilidad cognoscitiva. Así, el análisis de CFC proporciona un método para probar y/o validar independientemente el efecto terapéutico de agentes para impedir o tratar una enfermedad o alteración cognoscitiva y en particular una enfermedad o alteración que afecta una o más regiones de los cerebros, por ejemplo el hipocampo, subiculum, cortex cingulado, cortex prefrontal, cortex perirrinal, cortex sensorial y lóbulo

temporal medio.

Comúnmente, el análisis de CFC se efectúa usando cámaras de animal de prueba estándar y el empleo de entrenamiento de acondicionamiento que comprende un choque moderado (por ejemplo, choque a las patas de 0.35 mA) apareado con una indicación auditiva (por ejemplo, un período de ruido blanco de 85 dB), olfativa (por ejemplo, extracto de almendra o limón), toque (textura de jaula de piso) y/o indicación visual (destello de luz). La respuesta a la experiencia aversiva (choque) es comúnmente una de congelación (ausencia de movimiento excepto por respiración) pero también puede incluir parpadeo de los ojos o cambio en el reflejo de membrana nictitante, dependiendo del animal seleccionado. La respuesta aversiva es caracterizada usualmente en el primer día de entrenamiento para determinar una referencia por miedo incondicionado, con resultados de respuesta aversiva en días de prueba subsecuentes, por ejemplo congelación en presencia del contexto y/o indicación pero en ausencia de la experiencia adversa, siendo caracterizada como miedo acondicionado por el contexto e indicación, respectivamente. Para una confiabilidad mejorada, los animales de prueba son comúnmente probados por separado por técnicos independientes y se obtienen puntuaciones con el paso del tiempo. Detalles de diseño experimentales adicionales se pueden encontrar en el arte, por ejemplo en Crawley, JN, What's Wrong with my Mouse; Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice, Wiley-Lisa, NY (2000).

Los animales de prueba ejemplares (por ejemplo, animales modelo) incluyen mamíferos (por ejemplo roedores o primates no humanos) que exhiben síntomas prominentes o patología que es característica de una enfermedad

amiloidogénica tal como enfermedad de Alzheimer. Los animales modelo pueden ser creados mediante endogamia selectiva por un deseo o pueden ser diseñados genéticamente usando técnicas transgénicas que son bien conocidas en el arte, de tal manera que una alteración genética apuntada (por ejemplo mutación genética, alteración genética) en un gen que está asociado con la alteración de demencia, conduciendo a una expresión o función aberrante del gen apuntado. Por ejemplo, varias cepas de ratón transgénicas están disponibles que sobreexpresan APP y desarrollan patología de placa amiloide y/o desarrollan déficits cognoscitivos que son característicos de la enfermedad de Alzheimer (véase por ejemplo, Games et al., supra, Johnson-Wood et aL, Proc. Nati. Acad. Sci. USA 94:1550(1997); Masliah E and Rockenstein E. (2000) JNeural Transm Suppl.;59:175-83).

Alternativamente, el animal modelo puede ser creado usando compuestos químicos (por ejemplo neurotoxinas, neurotoxinas, anestésicos) o técnicas quirúrgicas (por ejemplo, ablación esterotática, axotomización, transacción, aspiración) que someten a ablación o interfieren de otra manera con la función normal de una región del cerebro anatómica (por ejemplo hipocampo, amígdala, corteza peririnal, núcleo septal medio, locus coeruleus, cuerpos mamarios) o neuronas específicas (por ejemplo neuronas serotonérgicas, colinérgicas o dopaminérgicas) que son asociadas con síntomas característicos o patología de la alteración amiloidogénica. En ciertas modalidades preferidas, el modelo de animal exhibe un déficit cognoscitivo prominente asociado con el aprendizaje o memoria además de la patología neurodegenerativa que está asociada con una alteración amiloidogénica. Más preferiblemente, el déficit cognoscitivo empeora progresivamente con la edad incrementada,

de tal manera que el avance de la enfermedad en el animal modelo es paralelo al avance de la enfermedad en un sujeto qe sufre de la alteración amiloidogénica.

El acondicionamiento de miedo contextual y otros análisis *in vivo* para probar la funcionalidad de los conjugados descritos en la presente se puede efectuar usando ratones tipo silvestre o ratones que tienen una cierta alteración genética que conduce a memoria deteriorada o modelos de ratón de enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo enfermedad de Alzheimer, en los que se incluyen modelos de ratón que exhiben niveles elevados de Aβ soluble en el fluido cerebroespinal (CSF) o plasma. Por ejemplo, modelos de animal de enfermedad de Alzheimer incluyen ratones transgénicos que sobreexpresan la mutación "Sueca" de la proteína precursora de amiloide humana (hAFPswe; Tg2576) que muestra déficits de memoria dependientes de la edad y placas (1996) Science 274:99-102). La funcionalidad in vivo de los conjugados descritos en la presente puede también ser probada usando el ratón mutante PS-1, descrito en Duff, et al; (1996) Nature 383, 710-713. Otros modelos transgénicos alterados genéticamente de enfermedad de Alzheimer son descritos en Masliah E and Rockenstein E. (2000) JNeural Transm Suppl. 59:175-83.

En varios aspectos, los métodos de la invención comprenden la administración de un conjugado de Aβ que es apto de mejorar el conocimiento en un sujeto en donde el conjugado Aβ ha sido identificado al usar un análisis que es usualmente predictivo de eficacia inmunoterapéutica en el sujeto. En modalidades ejemplares, el análisis es un análisis de animal modelo que está basado, por lo menos en parte, en la comparación del conocimiento, tal como se determina de un

estudio de acondicionamiento de miedo contextual, de un animal después de la administración de un reactivo inmunológico de prueba al animal, en comparación con un control apropiado. El análisis de CFC evalúa cambios en el conocimiento de un animal (comúnmente un ratón o rata) en el tratamiento con un compuesto terapéutico potencial. En ciertas modalidades, el cambio en conocimiento evaluado es una mejora en el status de menoscabo de memoria o una inversión del déficit de memoria. Así, el análisis de CFC proporciona un método directo para determinar el efecto terapéutico de agentes para prevenir o tratar la enfermedad cognoscitiva y en particular una enfermedad o alteración que afecta una o más regiones del cerebro, por ejemplo el hipocampo, subiculum, corteza singulada, corteza prefrontal, corteza perirrinal, corteza sensorial y lóbulo temporal medio. Tales análisis de CFC son discutidos en la solicitud de patente estadounidense co-pendiente No. de Serie 60/XXX,XXX intitulada "Contextual Fear Conditioning for Predicting Inimunotherapeutic Efflcacy" (No. de expediente del abogado ELN-058-1), presentada el 15 de diciembre de 2004 y solicitud de patente estadounidense No. de Serie 60/XXX,XXX intitulada "Contextual Fear Conditioning for Predicting Immimotherapeútic Efficacy" (No. de expediente del abogado ELN-058-2) todo el contenido de las cuales es incorporado en la presente por referencia.

BIBLIOGRAFÍA

Bernatowicz, M.S., and Matsueda, G.R. (1986) Analytical Biochemistry 155: 95-102.

Kniskern, P.J., and Marburg, S. (1994) Development and Clinical Uses of Haemophilus b Conjugate Vaccines:

Conjugation: Design, Chemistry, and Analysis Ellis, R and Granoff, D.M., Eds; Marcel Dekker, Inc: New York NY, 37-70.

Arrizon, V., Biechler, R., Cummings, J., and Harbaugh, J. (1991) High-Performance Liquid Chromatography of Peptide and Proteins: Separation, Analysis, and Conformation Mant, C.T. and Hodges, RS., Eds; CRC Press: Boca Raton, FL, 859-863.

Carlsson, J. et al. (1978) Biochem J, 173: 723.

Means, G.E., Cangdon, W.I., and Bender, M.I. (1972) Biochemistry 11: 3564-3574.

Glenner & Wong (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 120: 1131.

Hardy (1984) Trends in Neurosciences 20: 1131.

Hardy (1977) Trends in Neurosciences 20: 154.

Stoute et al. (1997) N. Engl. J. Med. 336: 86-91.

Goebel et al., (1939) J. Exp. Med 69: 5 3.

Schneerson et al. (1980)J. Exp. Med. 152: 361-376.

Chu et al. (1983) Infect. Immun. 40: 245.

Schneerson et al. (1984) Infect. Immun. 45: 582-591.

Anderson et al. (1985) J. Pediatr. 107: 346.

Insel et al. (1986) J. Exp. Med. 158: 294.

patente estadounidense No. 4,673,574 Junio, 1987 Anderson.

patente estadounidense No. 4,902,506 Febrero, 1990 Anderson et al.

patente estadounidense No. 5,192,540 Marzo, 1993 Kuo et al.

patente estadounidense No. 5,306,492 Abril, 1994 Porro.

patente estadounidense No. 5,360,897 Noviembre, 1994

Anderson et al.

patente estadounidense No. 5,785,973 Julio, 1998

Bixler et al.

patente estadounidense No. 6,361,777 Marzo, 2002

Hoogerhout.

Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (C.S.H. P. Pres, NY 2a. ed., 1989).

Bernatowicz, M.S., and Matsueda, G.R. (1986) Analytical Biochemistry 155, 95-102.

Kniskern, P.J., and Marburg, S. (1994) Development and Clinical Uses of Haemophilus b Conjugale Vaccines: Conjugation: Design, Chemistry, and Analysis Ellis, R.W., and Granoff D.M., Eds; Marcel Dekker, Inc: New York, NY, 37-70.

Arrizon, V Biechler, R., Cummings, J., and Harbaugh, J. (1991) High-Performance Liquid Chromatography of Peptide and Proteins: Separation, Analysis, and Conformation Mant, C.T. and Hodges, R.S., Eds; CRC Press: Boca Raton, FL, 859-863.

282

Reivindicaciones

1. Un método para conjugar un péptido inmunógeno por vía de un grupo reactivo de un residuo de aminoácido del péptido inmunógeno a un vehículo de proteína/polipéptido que tiene uno o más grupos funcionales, el método comprende las etapas de :

   a) Derivar uno o más de los grupos funcionales del vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente a un ligador de polipéptido unido al vehículo de proteína/polipéptido para generar un vehículo derivado con sitios reactivos;
   b) Hacer reaccionar el vehículo de proteína/polipéptido derivado de la etapa (a) con un grupo reactivo de un aminoácido del péptido inmunógeno bajo condiciones de reacción de tal forma que el péptido inmunógeno se conjuga con el vehículo de proteína/polipéptido derivado por vía de los grupos funcionales; y
   c) Hacer reaccionar además el conjugado con un reactivo de taponamiento para inactivar grupos funcionales no reaccionados reactivos libres sobre el vehículo de proteína/polipéptido derivado, preservando de esta manera la funcionalidad del vehículo, de tal forma que este retiene su capacidad para elicitar las respuestas inmunes contra el péptido inmunógeno que de otra manera no ocurrirían sin un vehículo.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el vehículo se selecciona del grupo que consiste de sero albúmina humana, hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH), moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina, hemaglutinina de influenza, polipéptido PADRE, proteína de

circumsporozito de malaria (CS), antígeno de superficie de hepatitis B ($HBSAg_{19-28}$), Proteína de Choque Térmico (HSP) 65, *Mycobacterium tuberculosis*, toxina de cólera, mutantes de toxina de cólera con toxicidad reducida, toxina de difteria, proteína CRM_{197} que es de reacción cruzada con toxina de difteria, peptidasa C5a recombinante de estreptococo, *Streptococcus pyognes* ORF1224, *Streptococcus pyogenes* ORG1664, *Streptococcus pyogenes* ORF1664, *Streptococcus pyogenes* ORF2452, *Chlamydia pneumoniae* ORF T367, *Chlamydia pneumoniae* ORF T858, Toxoide de tétano, gp120 T1 de HIV, componentes que reconocen las moléculas de matriz adhesivas de superficie microbiana (MSCRAMMS), factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y quimoquinas.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el vehículo contiene un epítopo de célula T.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es un toxoide bacterial.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es hemaglutinina de influenza.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es el polipéptido PADRE.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es una proteína de circumsporozito de malaria (CS).

8. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es antígeno de superficie de hepatitis B ($HBSAg_{19-28}$).

9. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es una proteína de choque de calor 65 (HSP 65).

10. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es un polipéptido de *Mycobacterium tuberculosis* (BCG).

11. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el vehículo es toxoide de tétano.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el toxoide bacterial es CRM 197.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es peptidasa C5a recombinante de estreptococo.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es *Streptococcus pyogenes* ORF 1224.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es *Streptococcus pyogenes* ORF 1664.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es *Streptococcus pyogenes* ORF 2452.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es *Chlamydia pneumoniae* ORF T367.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el vehículo es *Chlamydia pneumoniae* ORF T858.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el vehículo es un factor de crecimiento u hormona, que estimula o mejora la respuesta inmune.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el factor de crecimiento o la hormona se seleccionan del grupo que consiste de IL-1, IL-2, γ-interferón, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, y RANTES.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido inmunógeno es seleccionado del grupo que consiste de proteína bacterial, una proteína viral y una proteína eucariótica.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína proveniente de una bacteria.

23. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en donde la bacteria se selecciona del grupo que consiste de Streptetococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermis, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrea, Haemophilus influenza, Esherichia coli, Klebsiella pneumonia, Listeria monocytogenes, Vibrio cólera, Clostridium perfringens,

Clostridium botulinum, Pseudomonas aerations, Salmonella typhimurium, Borrelia burgdorferi, Shigella flexneri, Shigella boydii, Shigella dysentriae, Alloiococcus otitidis y estreptococos del grupo B.

24. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína proveniente de un virus.

25. El método de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el virus se selecciona del grupo que consiste de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus herpes simplex (VHS), virus de papiloma humano (VPM), virus de parainfluenza (VPI), virus de estomatitis vesicular (VVS), virus sincitial respiratorio (VSR), virus de Epstein-Barr (VEB), coronavirus, virus vaccinia, rotavirus, virus de rabias, virus de la hepatitis C (VHC) y virus de la hepatitis B (VHB).

26. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína proveniente de un hongo.

27. El método de acuerdo con la reivindicación 26 en donde el hongo se selecciona del grupo que consiste de *Candida albicans, Cryptococcus neoformans,* especies Coccidioides, especies Histoplasma y especies Aspergillus.

28. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína de un parásito.

287

29. El método de acuerdo con la reivindicación 28, en donde el parásito se selecciona del grupo que consiste de un Plasmodio, un Tripanosoma, un Esquistosoma, y una Leishmania.

30. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína proveniente de una eucariota.

31. El método de acuerdo con la reivindicación 30, en donde la eucariota es un humano.

32. El método de acuerdo con la reivindicación 31, en donde el péptido inmunógeno del humano se deriva de un tumor maligno.

33. El método de acuerdo con la reivindicación 32, en donde el antígeno de tumor se selecciona del grupo que consiste de antígeno de carcinoma celular renal, un antígeno de carcinoma de mama, un antígeno carcinoembriónico, un antígeno de melanoma (MAGE), y un antígeno específico de cáncer de próstata.

34. El método de acuerdo con la reivindicación 31, en donde el péptido Inmunógeno es proveniente de un polipéptido Aβ.

35. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el péptido inmunógeno se deriva de la región N-terminal del polipéptido Aβ.

36. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el péptido inmunógeno se deriva de la región C-terminal del Polipéptido Aβ.

37. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el péptido inmunógeno se deriva de la región interna del polipéptido Aβ.

38. El método de acuerdo con la reivindicación 35, en donde el péptido inmunógeno Aβ es un fragmento de Aβ del grupo que consiste de Aβ 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

39. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el péptido inmunógeno de Aβ es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23. 17-23. 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35. 35-40 y 35-42.

40. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en donde uno o más fragmentos del polipéptido inmunógeno de Aβ están fusionados a otro péptido inmunógeno.

41. El método de acuerdo con la reivindicación 40, en donde una molécula de un péptido inmunógeno de Aβ se fusiona en su terminal C al terminal N de una molécula del mismo péptido inmunógeno Aβ.

42. El método de acuerdo con la reivindicación 40, en donde una molécula de un péptido inmunógeno de Aβ se fusiona en su terminal C al terminal C de una molécula de un péptido inmunógeno Aβ.

43. El método de acuerdo con la reivindicación 40, en donde una molécula de un péptido inmunógeno de Aβ se fusiona en su terminal C al terminal C de una molécula diferente de un péptido inmunógeno Aβ.

44. El método de acuerdo con la reivindicación 40, en donde una molécula de un péptido inmunógeno de Aβ se fusiona en su terminal N al terminal C de una molécula de un péptido inmunógeno Aβ.

45. El método de acuerdo con la reivindicación 41, 42, 43 o 44, en donde el péptido inmunógeno de Aβ se deriva de la región N-Terminal del polipéptido Aβ, y se selecciona del grupo que consiste de Aβ 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

46. El método de acuerdo con la reivindicación 41, 42, 43 o 44, en donde el péptido inmunógeno de Aβ es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23. 17-23. 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35. 35-40 y 35-42.

47. El método de acuerdo con la reivindicación 40, en donde una o más moléculas de un péptido inmunógeno de Aβ están ligadas a una o más moléculas de un péptido heterólogo.

48. El método de acuerdo con la reivindicación 47, en donde el péptido inmunógeno de Aβ se deriva de la región N-terminal de un péptido Aβ, y se selecciona del grupo que consiste de Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

290

49. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el péptido inmunógeno de Aβ es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23. 17-23. 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35. 35-40 y 35-42.

50. El método de acuerdo con la reivindicación 47, en donde el péptido heterólogo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

51. El método de acuerdo con la reivindicación 40, en donde una o más moléculas del péptido inmunógeno de Aβ están ligadas juntas en una configuración de péptido antigénico múltiple (MAP).

52. El método de acuerdo con la reivindicación 40, en donde una o más moléculas del péptido inmunógeno de Aβ están ligadas juntas con una o más moléculas de un péptido inmunógeno de Aβ diferente en una configuración de péptido antigénico múltiple (MAP).

53. El método de acuerdo con la reivindicación 51 o 52, en donde el péptido inmunógeno de Aβ se deriva de la región N-terminal del polipéptido Aβ, y se selecciona del grupo que consiste de Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

54. El método de acuerdo con la reivindicación 51 o 52, en donde el péptido inmunógeno de Aβ es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23. 17-23. 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35. 35-40 y 35-42.

55. El método de acuerdo con la reivindicación |, en donde el grupo funcional de una o más moléculas de aminoácido del vehículo de proteínas/polipéptido o del ligador de polipéptido opcionalmente unido se deriva utilizando un reactivo de reticulación.

56. El método de acuerdo con la reivindicación 55, en donde el reactivo derivante es un reactivo reticulado de longitud cero.

57. El método de acuerdo con la reivindicación 55, en donde el reactivo derivante es un reactivo reticulado homobifuncional.

58. El método de acuerdo con la reivindicación 55, en donde el reactivo derivante es un reactivo reticulante heterobifuncional.

59. El método de acuerdo con la reivindicación 55, en donde el vehículo de proteína/polipéptido reacciona con un agente haloacetilante.

60. El método de acuerdo con la reivindicación 58, en donde el reactivo heterobifuncional es un reactivo que reacciona con un grupo funcional primario o ε-amina de uno o más residuos de aminoácido del vehículo de proteína/polipéptido y un grupo tiol pendiente de uno o más residuos de aminoácido del péptido inmunógeno

61. El método de acuerdo con la reivindicación 60, en donde el reactivo heterobifuncional se selecciona del grupo que consiste de N-succinimidil

bromoacetato, N-succinimidil-3-(2-piridil-tio) propionato (SPDP), y succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC).

62. El método de acuerdo con la reivindicación 61, en donde el grupo ε-amino funcional es lisina.

63. El método de acuerdo con la reivindicación 60, en donde el grupo tiol pendiente es un residuo de cisteína del péptido inmunógeno.

64. El método de acuerdo con la reivindicación 63, en donde el residuo de cisteína está localizado en el terminal amino del péptido inmunógeno.

65. El método de acuerdo con la reivindicación 63, en donde el residuo de cisteína está localizado en el terminal carboxi del péptido inmunógeno.

66. El método de acuerdo con la reivindicación 63, en donde el residuo de cisteína está localizado internamente en el péptido inmunógeno.

67. El método de acuerdo con la reivindicación 63, en donde el grupo tiol pendiente se genera por un reactivo tiolante.

68. El método de acuerdo con la reivindicación 67, en donde el reactivo tiolante es acetil homocisteinotio lactona.

69. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el reactivo de taponado que es utilizado para inactivar grupos funcionales reactivos sin combinación sobre el vehículo de proteína/polipéptido activado se

selecciona del grupo reactivo que consiste de cisteamina, N-acetilcisteamina, y etalonamina.

70. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el reactivo de taponamiento que es utilizado para inactivar los grupos funcionales reactivos sin combinación sobre el vehículo de proteína/polipéptido activado se selecciona del grupo reactivo que consiste de hidróxido de sodio, carbonato de sodio, bicarbonato de amonio y amonio.

71. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el grupo reactivo del residuo de aminoácido del péptido inmunógeno es un grupo sulfhidrilo libre.

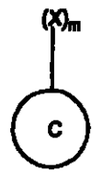
72. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde uno o más de los grupos funcionales están sobre un ligador, que está opcionalmente unido a un vehículo de proteína/polipéptido.

73. El método de acuerdo con la reivindicación 72, en donde el ligador es un péptido ligador.

74. El método de acuerdo con la reivindicación 73, en donde el péptido ligador es polilisina.

75. Un método para conjurar un péptido inmunógeno a un vehículo de proteína/polipéptido que tiene la estructura:

294



En donde,

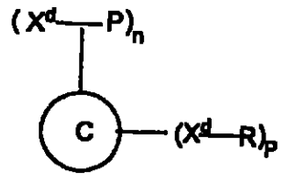
C es un vehículo de proteína/polipéptido y X es un grupo funcional derivable de un residuo de aminoácido del vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de un péptido ligador covalentemente unido al vehículo de proteína/polipéptido, y en donde m es un entero mayor de cero, pero mayor o igual a 85, el método comprende las etapas de:

(a) derivar uno o más de los grupos funcionales del vehículo de proteína/polipéptido o de la molécula ligadora opcionalmente unida para generar una molécula derivada con sitios reactivos;

(b) Hacer reaccionar el vehículo de proteína/polipéptido derivado de la etapa (a) con un grupo reactivo de un residuo de aminoácido del péptido inmunógeno para formar un conjugado de vehículo péptido inmunógeno-proteína/polipéptido covalentemente acoplado; y

(c) Hacer reaccionar además dicho conjugado con un reactivo de taponamiento para inactivar los grupos funcionales reactivos libres sobre el vehículo de proteína/polipéptido activado, de tal forma que los grupos taponados no son libres de reaccionar con otras moléculas, preservando de esta manera la funcionalidad del vehículo, de tal forma que si éste retiene su capacidad para elicitar las respuestas inmunes deseadas contra el péptido inmunógeno que de otra manera no ocurriría

sin un vehículo, con el fin de generar un conjugado de vehículo péptido inmunógeno-proteína/polipéptido taponado que tiene la formula:



En donde,

C es el vehículo de proteína/ polipéptido y X^d es un grupo funcional derivado de residuo de aminoácido del vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un péptido ligador covalentemente unido al vehículo de proteína/polipéptido, y, en donde,

P es una molécula de péptido inmunógeno covalentemente unida al grupo funcional derivado del residuo de aminoácido del vehículo de proteína u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un péptido ligador covalentemente unido a un vehículo de proteína/polipéptido,

R es una molécula de taponamiento covalentemente unida al grupo funcional derivado de un residuo de aminoácido del vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente del residuo de aminoácido de un péptido ligador covalentemente unido al vehículo de proteína/polipéptido,

n es un entero mayor de 0, pero mayor o igual a 85, y

p es un entero mayor de 0, pero menor de 85.

76. El método de la reivindicación 75, en donde el vehículo se selecciona de un grupo que consiste de sero albúmina, hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH), moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina, hemaglutinina de influenza, polipéptido PADRE, proteína de

circumsporozito de malaria (CS), antígeno de superficie de hepatitis B ($HBSAg_{19-28}$), Proteína de Choque Térmico (HST) 65, *Mycobacterium tuberculosis*, toxina de cólera, mutantes de toxina de cólera con toxicidad reducida, toxina de difteria, proteína CRM_{197} que es de reacción cruzada con toxina de difteria, peptidasa C5a recombinante de estreptococo, *Streptococcus pyogenes* ORF1224, *Streptococcus pyogenes* ORG1664, *Streptococcus pyogenes* ORF1664, *Streptococcus pyogenes* ORF2452, *Chlamydia pneumoniae* ORF T367, *Chlamydia pneumoniae* ORF T858, Toxoide de tétano, gp120 T1 de HIV, componentes que reconocen las moléculas de matriz adhesivas de superficie microbiana (MSCRAMMS), factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y quimoquinas.

77. El método de acuerdo con la reivindicación 76, en donde el vehículo contiene un epítopo de célula T.

78. El método de acuerdo con la reivindicación 77, en donde el vehículo es un toxoide bacterial.

79. El método de acuerdo con la reivindicación 77, en donde el vehículo es hemaglutinina de influenza.

80. El método de acuerdo con la reivindicación 77, en donde el vehículo es un polipéptido PADRE.

81. El método de acuerdo con la reivindicación 77, en donde el vehículo es una proteína de circumsporozito de malaria (CS).

297

82. El método de acuerdo con la reivindicación 77, en donde el vehículo es antígeno de superficie de hepatitis B ($HSBAg_{19-28}$).

83. El método de acuerdo con la reivindicación 77, en donde el vehículo es proteína de choque térmico 65 (HSP 65).

84. El método de acuerdo con la reivindicación 77, en donde el vehículo es un polipéptido de *Mycobacterium tuberculosis* (BCG).

85. El método de acuerdo con la reivindicación 78, en donde el vehículo es toxoide de tétano.

86. El método de acuerdo con la reivindicación 78, en donde el toxoide bacterial es CRM 197.

87. El método de acuerdo con la reivindicación 77, en donde el vehículo es rC5a peptidasa de estreptococo.

88. El método de acuerdo con la reivindicación 77, en donde el vehículo es *Streptococcus pyogenes* ORF1224

89. El método de acuerdo con la reivindicación 77, en donde el vehículo es *Streptococcus pyogenes* ORF1664

90. El método de acuerdo con la reivindicación 77, en donde el vehículo es *Streptococcus pyogenes* ORF2452.

91. El método de acuerdo con la reivindicación 77, en donde el vehículo es *Chlamydia pneumoniae* ORF T367

92. El método de acuerdo con la reivindicación 77, en donde el vehículo es *Chlamydia pneumoniae* ORF T858.

93. El método de acuerdo con la reivindicación 75, en donde el vehículo es un factor de crecimiento u hormona, que estimula o mejora la respuesta inmune.

94. El método de acuerdo con la reivindicación 93, en donde el factor de crecimiento o la hormona se selecciona del grupo que consiste de IL-1, IL-2, γ-interferón, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, y RANTES.

95. El método de acuerdo con la reivindicación 75, en donde el péptido inmunógeno se selecciona de una proteína bacterial, una proteína viral, y una proteína eucariótica.

96. El método de acuerdo con la reivindicación 95, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína proveniente de una bacteria.

97. El método de acuerdo con la reivindicación 96, en donde la bacteria se selecciona del grupo que consiste de Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrea, Haemophilus influenza, Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, Listeria monocytogenees, Vivrio cólera, Clostridium

perfingens, Clostridium botulinum, especies de Pseudomonas, Salmonella typhimurium, Borrelia burgforgeri, Shigella flexneri, Shigella boydii, Shigella dysentriae, Alloiococcus otitidis y estreptococos del grupo B.

98. El método de acuerdo con la reivindicación 96, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína de un virus.

99. El método de acuerdo con la reivindicación 98, en donde el virus se selecciona del grupo que consiste de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus herpes simples (VHS), virus de papiloma humano (VPM), virus de parainfluenza (VPI), virus de estomatitis vesicular (VVS), virus sincitial respiratorio (VSR), virus de Epstein Barr (VEB), coronavirus, virus vaccinia, rotavirus, virus de rabias, virus de la hepatitis C (VHC) y virus de la hepatitis B (VHB).

100. El método de acuerdo con la reivindicación 96, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína proveniente de un hongo.

101. El método de acuerdo con la reivindicación 100 en donde el hongo es seleccionado del grupo que consiste de *Candida albicans, Cryptococcus neoformans,* Coccidoides, Histoplasma, y Aspergilus.

102. El método de acuerdo con la reivindicación 96, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína proveniente de un parásito.

300

103. El método de acuerdo con la reivindicación 102, en donde el parásito se selecciona del grupo que consiste de Plasmodium, un Tripnosoma, un Esquistosoma, y una Leishmania.

104. El método de acuerdo con la reivindicación 96, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína proveniente de un eucariota.

105. El método de acuerdo con la reivindicación 104, en donde el eucariota es un humano.

106. El método de acuerdo con la reivindicación 105, en donde el péptido inmunógeno proveniente de un humano se deriva de un tumor maligno.

107. El método de acuerdo con la reivindicación 106, en donde el antígeno de tumor es un antígeno de carcinoma de célula renal, un antígeno de carcinoma de mama, un antígeno carcinoembriónico, un antígeno de melanoma (MAGE), y un antígeno especifico para cáncer de próstata.

108. El método de acuerdo con la reivindicación 105, en donde el péptido inmunógeno proviene de polipéptido de Aβ.

109. El método de acuerdo con la reivindicación 108, en donde el péptido inmunógeno se deriva de la región N-terminal del polipéptido Aβ.

110. El método de acuerdo con la reivindicación 108, en donde el péptido inmunógeno se deriva de la región C-terminal del polipéptido Aβ.

111. El método de acuerdo con la reivindicación 108, en donde el péptido inmunógeno se deriva de la región interna del polipéptido Aβ.

112. El método de acuerdo con la reivindicación 108, en donde el péptido inmunógeno de Aβ es un fragmento de Aβ del grupo que consiste de Aβ 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

113. El método de acuerdo con la reivindicación 108, en donde el péptido inmunógeno de Aβ es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23. 17-23. 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35. 35-40 y 35-42.

114. El método de acuerdo con la reivindicación 108, en donde una o más moléculas del péptido inmunógeno Aβ se fusionan a otro péptido inmunógeno.

115. El método de acuerdo con la reivindicación 114, en donde una molécula de péptido inmunógeno de Aβ se fusiona a su terminal C o al terminal N de otra molécula del mismo péptido inmunógeno de Aβ.

116. El método de acuerdo con la reivindicación 114, en donde una molécula de péptido inmunógeno Aβ se fusiona en su terminal C al terminal C de otra molécula del mismo péptido inmunógeno del Aβ.

302

117. El método de acuerdo con la reivindicación 114, en donde una molécula del péptido inmunógeno de Aβ se fusiona en su terminal C al terminal C de una molécula de un péptido inmunógeno de Aβ diferente.

118. El método de acuerdo con la reivindicación 114, en donde una molécula del péptido inmunógeno de Aβ se fusiona en su terminal N al terminal C de una molécula de un péptido inmunógeno de Aβ diferente.

119. El método de acuerdo con la reivindicación 115, 116, 117 o 118, en donde el fragmento de Aβ se deriva de la región N-terminal del polipéptido de Aβ y se selecciona del grupo que consiste de Aβ 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

120. El método de acuerdo con la reivindicación 115, 116, 117 o 118, en donde el fragmento de Aβ es un fragmento de Aβ seleccionado Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23. 17-23. 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35. 35-40 y 35-42.

121. El método de acuerdo con la reivindicación 114, en donde o a más moléculas del péptido inmunógeno del Aβ se fusionan a una o más moléculas del péptido heterólogo.

122. El método de acuerdo con la reivindicación 121, en donde el péptido inmunógeno de Aβ se deriva de la región N-terminal del polipéptido Aβ y se selecciona del grupo que consiste de Aβ 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

123. El método de acuerdo con la reivindicación 121, en donde el péptido inmunógeno de Aβ es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23. 17-23. 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35. 35-40 y 35-42.

124. El método de acuerdo con la reivindicación 121, en donde el péptido heterólogo es seleccionado del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de éstos.

125. El método de acuerdo con la reivindicación 114, en donde una o más moléculas del péptido inmunógeno de Aβ están ligadas juntas en una configuración de péptido antigénico múltiple (MAP).

126. El método de acuerdo con la reivindicación 114, en donde una o más moléculas del péptido inmunógeno de Aβ están ligadas juntas con una o más moléculas de un péptido inmunógeno de Aβ en una configuración de péptido antigénico múltiple (MAP).

127. El método de acuerdo con la reivindicación 125 o 126, en donde el péptido inmunógeno de Aβ se deriva de la región N-terminal del polipéptido Aβ, y se selecciona del grupo que consiste de Aβ 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

128. El método de acuerdo con la reivindicación 125 o 126, en donde el péptido inmunógeno de Aβ es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23. 17-23. 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35. 35-40 y 35-42.

129. El método de acuerdo con la reivindicación 75, en donde el grupo funcional de una o más moléculas de aminoácido del vehículo de proteína/polipéptido o del ligador de polipéptido opcionalmente unido es derivado utilizando un reactivo reticulante.

130. El método de acuerdo con la reivindicación 159, en donde el reactivo derivante es un reactivo reticulante le longitud cero.

131. El método de acuerdo con la reivindicación 129, en donde el reactivo derivante es un reactivo reticulado o homobifuncional.

132. El método de acuerdo con la reivindicación 129, en donde el reactivo derivante es un reactivo reticulante heterobifuncional.

133. El método de acuerdo con la reivindicación 129, en donde el vehículo de proteína/polipéptido reacciona con un agente haloacetilante.

134. El método de acuerdo con la reivindicación 133, en donde el reactivo heterobifuncional es un reactivo que reacciona con un grupo funcional primario o ε-amina de uno o más residuos de aminoácido del vehículo de proteína/polipéptido y un grupo tiol pendiente de uno o más residuos de aminoácido del péptido inmunógeno.

135. El método de acuerdo con la reivindicación 134, en donde el reactivo heterobifuncional es N-succinimidil bromoacetato, N-succinimidil-3-(2-piridil-

tio) propionato (SPDP), y succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC).

136. El método de la reivindicación 134, en donde el grupo funcional primario o ε-amina es lisina.

137. El método de acuerdo con la reivindicación 136, en donde la derivación del grupo funcional primario o ε-amino del residuo de amino ácido lisina del vehículo de proteína-polipéptido con N-succinimidil bromo acetato da como resultado la bromoacetilación de los residuos primarios o ε-amina sobre los residuos de lisina sobre el vehículo de proteína/polipéptido.

138. El método de acuerdo con la reivindicación 134, en donde el grupo pendiente diol es un residuo de cisteína de del péptido inmunógeno.

139. El método de acuerdo con la reivindicación 138, en donde el residuo de cisteína se localiza en el terminal amino de péptido inmunógeno.

140. El método de acuerdo con la reivindicación 138, en donde el residuo de cisteína se localiza en el terminal carboxi de péptido inmunógeno.

141. El método de acuerdo con la reivindicación 138, en donde el residuo de cisteína se localiza internamente en el péptido inmunógeno.

142. El método de acuerdo con la reivindicación 138, en donde el grupo pendiente diol se genera por un reactivo tiolante.

143. El método de acuerdo con la reivindicación 142 en donde el reactivo tiolante es N-acetil homocisteinotio lactona.

144. El método de acuerdo con la reivindicación 75, en donde el reactivo de taponamiento que se utiliza para inactivar grupos funcionales reactivos libres del vehículo de proteína/polipéptido activado se selecciona de grupo de reactivo que consiste de cisteamina, N-acetilcisteamina, y etanolamina.

145. El método de acuerdo con la reivindicación 75, en donde el reactivo de taponamiento que se utiliza para inactivar grupos funcionales reactivos libres sobre el vehículo de proteína/polipéptido activado se selecciona del grupo reactivo que consiste de hidróxido de sodio, carbonato de sodio, y bicarbonato de amonio y amonia.

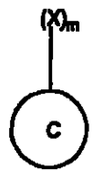
146. El método de la reivindicación 75, en donde el grupo reactivo de residuo de amino ácido del péptido inmunógeno es un grupo sulfhidrilo libre.

147. El método de la reivindicación 75, en donde uno o más de los grupos funcionales están sobre un ligador opcionalmente unidos al vehículo de proteína/polipéptido.

148. El método de la reivindicación 147, en donde el ligador es un péptido ligador.

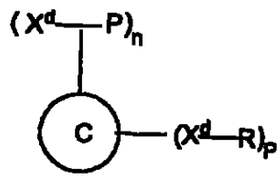
149. El método de la reivindicación 148, en donde el péptido ligador es polilisina.

150. Un conjugado de vehículo de péptido inmunógeno-proteína/polipéptido en donde el vehículo de proteína/polipéptido tiene la fórmula



En donde,

C es un vehículo de proteína/polipéptido y X es un grupo funcional derivable del recibo sobre amino ácido sobre el vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de amino ácido de un ligador de péptido covalentemente unido al vehículo de proteína/polipéptido, y, en donde m es un entero mayor de 0, pero menor e igual a 85, y en donde el conjugado de péptido inmunógeno-vehículo de proteína/polipéptido tiene la fórmula:



En donde,

C es un vehículo de proteína/polipéptido y x^d es un grupo funcional derivado del residuo de amino ácido del vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de amino ácido de un péptido ligador covalentemente unido al vehículo de proteína/polipéptido, y, en donde P es una molécula de péptido inmunógeno covalentemente unida al grupo funcional

derivado del residuo de amino ácido del vehículo de proteína u opcionalmente de un residuo de amino ácido de un péptido ligador covalentemente unido a un vehículo de proteína/polipéptido, R es una molécula de taponamiento covalentemente unida al grupo funcional derivado de un residuo de amino ácido del vehículo de proteína/polipéptido u opcionalmente de un residuo de amino ácido de un péptido ligador covalentemente unido a un vehículo de proteína/polipéptido, que preserva de esta manera la funcionalidad del vehículo de tal forma que éste retiene su capacidad para elicitar las respuestas inmunes deseadas contra el péptido inmunógeno que de otra manera no ocurrirían sin un vehículo., n es un entero mayor de 0, pero menor o igual a 85, y p es un entero mayor de o, pero menor de 85.

151. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 150, en donde el vehículo se selecciona de un grupo que consiste de cero albúmina, hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH), moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina, hemaglutinina de influenza, polipéptido PADRE , proteína de circunsporozito de malaria, (CS), antígeno de superficie de hepatitis B ($HBSAg_{19-28}$), Proteína de Choque Térmico (HSP) 65, *Mycobacterium tuberculosis*, toxina de cólera, mutantes de toxina de cólera con toxicidad reducida, toxina de difteria, proteína CRM_{197} que es de reacción cruzada con la toxina de difteria, peptidasa C5a de Estreptococo recombinante, *Streptococcus pyogenes* ORF1224, *Streptococcus pyogenes* ORF1664, *Streptococcus pyogenes* ORF2452, *Chlamdya pneumoniae* ORF T367, *Chlamydia pneumoniae* ORF T858, toxoide de tétano, gp 120 T1 de HIV, componentes que reconocen las moléculas de matriz adhesivas de superficie microbiana (MSCRAMMS), factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y quimiocoinas.

152. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 150, en donde el vehículo contiene un epítopo de células T.

153. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 152, en donde el vehículo es un toxoide bacterial.

154. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 152, eN donde el vehículo es hemaglutinina de influenza.

155. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 152, en donde el vehículo es un polipéptido PADRE.

156. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 152, en donde el vehículo es una proteína de circumsporozito de malaria (CS).

157. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 152, en donde el vehículo es antígeno de superficie de hepatitis B ($HBSAg_{19-28}$).

158. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 152, en donde el vehículo es una proteína de choque térmico 65 (HSP 65).

159. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 152, en donde el vehículo es un polipéptido de *Mycobacterium tuberculosis* (BCQ).

160. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 153, en donde el vehículo es un toxoide de tétano.

161. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 153, en donde el toxoide bacterial es CRM_{197}.

162. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 152, en donde el vehículo es peptidasa rC5a de Estreptococo.

163. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 152, en donde el vehículo es *Streptococcus pyogenes* ORF 1224.

164. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 152, en donde el vehículo es *Streptococcus pyogenes* ORF1664.

165. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 152, en donde el vehículo es *Streptococcus pyogenes* ORF 2452.

166. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 152, en donde el vehículo es *Chlamydia pneumoniae* ORF T367

167. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 152, en donde el vehículo es *Chlamydia pneumoniae* ORF T858.

168. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 150, en donde el vehículo es factor u hormona de crecimiento, que estimula o mejora la respuesta inmune.

169. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 168, en donde el factor o la hormona de crecimiento se selecciona del grupo que consiste de IL-1, IL-2, γ-interferón, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, y RANTES.

170. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 150, en donde el péptido inmunógeno se selecciona en el grupo que consiste de proteína bacterial, una proteína viral, y una proteína eucariótica.

171. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 170, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína de una bacteria.

172. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 171, en donde la bacteria se selecciona del grupo que consiste de *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrheae, Haemophilus influenzae, Escherichia coli, Klebsiella enterobacter, Listeria monocytogenes, Vibrio cholera, Clostridium perfringens, Clostridium botulinum, especies de Pseudomonas, Salmonella tiphymurium, Borrelia burgdorferi, Shigella flexneri, Shigella boydii, Shigela dysentriae, Alloicoccus otitidis y streptococci* del grupo B.

173. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 170, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína de un virus.

174. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 173, en donde el virus se selecciona del grupo que consiste del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), un virus herpes simples (VHS), virus de papiloma Humano

(VPH), un virus de parainfluenza (VPI), un virus de estomatitis vesicular(VSV), un virus sincitial respiratorio (VSR), un virus de Epstein-Barr (VEB), un coronavirus, un virus vaccinia, rotavirus, un virus de rabia, un virus de hepatitis C (VHC) y un virus de hepatitis B (VHB).

175. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 170 en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína proveniente de un hongo.

176. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 175, en donde el hongo se selecciona del grupo que consiste de *Candida albicans, Cryptococcus neoformans*, Coccidioides, Histoplasma, y Aspergillus.

177. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 170, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína de un parásito.

178. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 177, en donde el parásito se selecciona del grupo que consiste de un Plasmodium, un Tripanosoma, un Esquistosoma, y un Leishmania.

179. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 170, en donde el péptido inmunógeno se deriva de antígeno de proteína de un eucariote.

180. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 179, en donde el eucariote es un humano.

181. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 180, en donde el péptido inmunógeno de un humano se deriva de un tumor maligno.

182. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 181, en donde el antígeno de tumor se selecciona del grupo que consiste de antígeno de carcinoma de célula renal, antígeno de carcinoma de mama, un antígeno carcinoembriónico, un antígeno de melanoma (MAGE), y antígeno de membrana especifico de próstata (PSMA).

183. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 180, en donde el péptido inmunógeno es de un polipéptido Aβ de humano.

184. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 183, en donde el péptido inmunógeno se deriva de una región N-terminal del polipéptido Aβ

185. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 183, en donde el péptido inmunógeno se deriva de la región C-terminal del polipéptido Aβ

186. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 183, en donde el péptido inmunógeno se deriva de la región interna del polipéptido Aβ.

187. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 183, en donde el péptido inmunógeno es un fragmento de Aβ. Seleccionado del grupo que consiste de Aβ. 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

188. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 183, en donde el péptido inmunógeno es un fragmento de Aβ. Seleccionado del grupo que

consiste de Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 y 35-42.

189. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 183, en donde una o más moléculas de Aβ se fusionan a una o más moléculas de otro péptido inmunógeno.

190. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 189, donde una molécula del péptido inmunógeno de Aβ se fusiona en su terminal C al terminal N de otra molécula del mismo péptido inmunógeno de Aβ.

191. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 189, en donde una molécula de péptido inmunógeno de Aβ se fusiona en su terminal C al terminal C de otra molécula del mismo péptido inmunógeno de Aβ.

192. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 189, en donde una molécula de péptido inmunógeno de Aβ se fusiona en su terminal C al terminal C de una molécula de un péptido inmunógeno de Aβ diferente.

193. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 189, en donde una molécula de un péptido inmunógeno de Aβ Se fusiona en su terminal N al terminal C de una molécula de un péptido inmunógeno de Aβ diferente.

194. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 190, 191, 192 o 193, donde el péptido inmunógeno de Aβ se deriva de la región N-terminal del péptido Aβ 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

315

195. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 190, 191, 192 o 193, en donde el péptido inmunógeno de Aβ es un fragmento de Aβ Seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 y 35-42.

196. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 189, en donde una o más moléculas de un péptido inmunógeno de Aβ están ligados a una o más moléculas de un péptido heterólogo.

197. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 196, en donde el péptido inmunógeno de Aβ se deriva de la región N- terminal del polipéptido Aβ, y se selecciona del grupo que consiste de Aβ 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

198. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 196, en donde el fragmento Aβ es un fragmento Aβ seleccionado en el grupo que consiste de Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 y 35-42.

199. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 196 en donde el péptido heterólogo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

200. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 189, en donde una o más moléculas de un péptido inmunógeno de Aβ están ligadas juntas en una configuración de péptido antigénico múltiple (MAP).

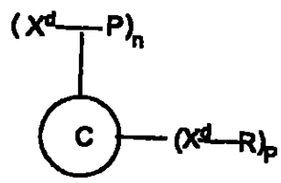
316

201. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 189, en donde una o más moléculas de un péptido inmunógeno Aβ están ligadas con una o más copias de un péptido inmunógeno de Aβ diferente en una configuración de péptido antihigiénico múltiple (MAP).

202. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 200 o 201, en donde el péptido inmunógeno de Aβ se deriva de la región N-terminal del polipéptido Aβ, y se selecciona del grupo que consiste de βA 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

203. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 200 o 201, en donde el péptido inmunógeno de Aβ es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 y 35-42.

204. Un conjugado de péptido inmunógeno-vehículo de proteínas /polipéptido generado de acuerdo al método de la reivindicación 75 y que tiene la formula:



En donde,

C es el vehículo de proteínas/polipéptido y X^d es el grupo funcional derivado de un residuo de aminoácido del vehículo de proteínas/polipéptido u opcionalmente de un residuo de aminoácidos de un péptido ligador

covalentemente unido al vehículo de proteínas/polipéptido, en donde P es una molécula de péptido inmunógeno covalente mente unida al grupo funcional derivado del residuo de aminoácido del vehículo de proteína u opcionalmente de un residuo de aminoácido de un péptido ligador covalentemente unido a un vehículo de proteína/polipéptido, R es una molécula de taponamiento covalentemente unida al grupo funcional derivado de un grupo de un residuo de aminoácido del vehículo de proteína/polipéptido u opcional mente de un residuo de aminoácido o de un de péptido ligador covalentemente unido a un vehículo de proteína/polipéptido que preserva la funcionalidad del vehículo, de tal forma que este retiene su capacidad para elicitar las respuestas inmunes deseadas contra el péptido inmunógeno que de otra manera no ocurriría sin un vehículo, n es un entero mayor de 0, pero menor o igual a 85, y p es un entero mayor de 0, pero menor de 85.

205. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 204 en donde el vehículo se Selecciona en el grupo que consiste de sero albúmina humana, hemocianina de lupa de ojo de cerradura (KLH), moléculas de inmunoglobulina, tiroglubolina, ovalbúmina, hemaglutinina de influenza, polipéptido PADRE, proteína de circumsporozito de malaria (CS), antígeno de superficie de hepatitis ($HBSA_{319-28}$), Proteína de Choque Térmico (HSP) 65, *Mycobacterium tuberculosis*, toxina de cólera, mutantes de toxina de cólera con toxicidad reducida, toxina de difteria, proteína CRM_{197} que tiene reacción cruzada con toxinas de difteria, peptidasa C5a de Streptococcus recombinante, *Streptococcus pyogenes* ORF1224, *Streptococcus pyogenes* ORF11664, *Streptococcus pyogenes* ORF2452, *Chlamydia pneumoniae* ORF T367, *Chlamydia pneumoniae*

ORF T858, toxoide de Tétano, gp120 T1 HIV, componentes que reconocen las moléculas de matriz adhesiva de superficie microbiana (MSCRAMMS), factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y quimiocinas.

206. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 204 en donde el vehículo contiene un epítopo de célula T.

207. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 206, en donde el vehículo es un toxoide bacterial.

208. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 206, en donde el vehículo es hemaglotinina de influenza.

209. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 206, en donde el vehículo es un polipéptido PADRE.

210. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 206, en donde el vehículo es proteína de circumsporozito de malaria (CS).

211. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 206, en donde el vehículo es antígeno de superficie de Hepatitis B ($HSBA_{p19-28}$).

212. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 206, en donde el vehículo es una proteína de choque térmico 65(HSP 65).

213. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 206, en donde el vehículo es un polipéptido de *Mycobacterium tuberculosis* (BCG).

214. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 207, en donde el vehículo es toxoide de tétano.

215. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 207, en donde el toxoide bacterial CRM_{197}.

216. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 206, en donde el vehículo es peptidasa rC5a de Streptococo.

217. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 206, en donde el vehículo es *Streptococcus pyogenes* ORF1224.

218. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 206, en donde el vehículo es *Streptococcus pyogenes* ORF1664.

219. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 206, en donde el vehículo es *Streptococcus pyogenes* ORF2452.

220. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 206, en donde el vehículo es *Chlamydia pneumoniae* ORF T367.

221. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 206, en donde el vehículo es *Chlamydia pneumoniae* ORF T858.

320

222. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 206, en donde el vehículo es un factor u hormona de crecimiento que estimulo o mejora la respuesta inmune.

223. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 222, en donde el factor u hormona de crecimiento se seleccionan del grupo que consiste de IL-1, IL-2, γ-interferón, IL-10, GM-CSF, MIP-1", MIP-1β, y RANTES.

224. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 206, en donde el péptido inmunógeno se selecciona del grupo que consiste de una proteína bacterial, una proteína viral, una proteína de hongo, una proteína de parásito y una proteína eucariótica.

225. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 224, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína de una bacteria.

226. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 225, en donde la bacteria se selecciona del grupo que consiste de *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrheae, Haemophilus influenzae, Escherichia coli, Klebsiella enterobacter, Listeria monocytogenes, Vibrio cholerae, Clostridium perfringens, Clostridium botulinum*, especies de *Pseudomonas, Salmonella typhimurium, Borrelia burgdorferi, Shigella flexneri, Shigella boydii, Shigella dysentriae, Alloicoccus otitidis y streptococus* del grupo B.

227. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 224, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína de un virus.

228. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 227, en donde el virus se selecciona del grupo que consiste de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), un virus herpes simples (VHS), un virus de papiloma humano (VPH), un virus de parainfluenza (VPI), un virus de estomatitis vesicular (VEB), virus sincitial respiratorio (VSR), virus de Epstein- Barr (VEB), un coronavirus, un virus vaccinia, un rotavirus, un virus de rabia, un virus de hepatitis C (VHC), y virus de hepatitis B (VHB).

229. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 224, en donde el péptido inmunógeno se deriva de una proteína de antígeno de un hongo.

230. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 229, en donde el hongo se selecciona del grupo que consiste de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, Coccidiodes, Histoplasma, y Aspergillus.

231. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 224, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína de un parásito.

232. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 231, en donde el parásito se selecciona del grupo que consiste de Plasmodium, Tripanosoma, Esquistosoma, y una Leishmania.

233. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 224, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína de un eucariota.

322

234. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 233, en donde la eucariota es un humano.

235. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 234, en donde el péptido inmunógeno de un humano se deriva de un tumor maligno.

236. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 235, en donde el tumor antígeno se selecciona de un antígeno de carcinoma de célula renal, y un antígeno de carcinoma de mama, un antígeno carcinoembriónico, un antígeno de melanoma, y un antígeno especifico de cáncer de próstata.

237. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 234, en donde el péptido inmunógeno es de un polipéptido Aβ de humano.

238. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 237, en donde el péptido inmunógeno se deriva de la región N-terminal del polipéptido Aβ.

239. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 237, en donde el péptido inmunógeno se deriva de la región C-terminal del polipéptido Aβ.

240. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 237, en donde el péptido inmunógeno se deriva de la región interna del polipéptido Aβ.

241. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 237, en donde el péptido inmunógeno Aβ es un fragmento de Aβ Seleccionado del grupo que consiste de Aβ 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

242. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 237, en donde el péptido inmunógeno Aβ es un fragmento de Aβ Seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23. 17-23. 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35. 35-40 y 35-42.

243. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 237, en donde una o más moléculas del péptido inmunógeno Aβ se fusionan a otro péptido inmunógeno.

244. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 243, en donde una molécula del péptido inmunógeno Aβ Se fusiona en su terminal C al terminal N de otra molécula del mismo péptido inmunógeno de Aβ.

245. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 243, en donde una molécula de un péptido inmunógeno de Aβ Se fusiona en su terminal C al terminal C de otra molécula del mismo péptido inmunógeno de Aβ.

246. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 243, en donde una molécula del péptido inmunógeno de Aβ Se fusiona en su terminal C al terminal C de una molécula de un péptido inmunógeno de Aβ diferente.

247. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 243, en donde una molécula del péptido inmunógeno de Aβ Se fusiona en su terminal N al terminal C de una molécula de un péptido inmunógeno de Aβ diferente.

248. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 244, 245, 246 o 247, en donde el péptido inmunógeno de Aβ se deriva de la región N-terminal del polipéptido de Aβ, y se selecciona del grupo que consiste Aβ 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

249. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 244, 245, 246 o 247, en donde el péptido inmunógeno de Aβ Es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23. 17-23. 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35. 35-40 y 35-42.

250. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 243, en donde uno o más fragmentos de Aβ Están ligados a una o más moléculas de un péptido o mol heterólogo.

251. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 250, en donde el péptido inmunógeno de Aβ Se deriva de la región N-terminal del polipéptido Aβ, y se selecciona del grupo que consiste de Aβ 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

252. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 250, en donde el péptido inmunógeno de Aβ Es un fragmento de Aβ Seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23. 17-23. 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35. 35-40 y 35-42.

253. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 250, en donde el péptido heterólogo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

254. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 243, en donde uno o más moléculas de un péptido inmunógeno de Aβ están ligadas juntas en una configuración de péptido antihigiénico múltiple (MAP).

255. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 243, en donde uno o más moléculas de un péptido inmunógeno de Aβ están ligadas con una o más copias de un de un péptido inmunógeno de Aβ diferente en una configuración de péptido antihigiénico múltiple (MAP).

256. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 254 o 255, en donde el péptido inmunógeno de Aβ Se deriva de la región N-terminal del polipéptido Aβ, y se selecciona del grupo que consiste de Aβ 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

257. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 254 o 255, en donde el péptido inmunógeno de Aβ es un fragmento de Aβ Seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23. 17-23. 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35. 35-40 y 35-42.

258. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 243, en donde una o más moléculas del péptido inmunógeno Aβ Están ligadas con una o más moléculas de un péptido heterólogo.

259. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 258, en donde el péptido heterólogo se selecciona del grupo que consiste de un epítopo de célula T, un epítopo de célula B y combinaciones de estos.

260. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 258, en donde el péptido inmunógeno de Aβ se deriva de la región N-terminal del polipéptido Aβ, y es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

261. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 258, en donde el péptido inmunógeno de Aβ Es un fragmento de Aβ, seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23. 17-23. 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35. 35-40 y 35-42.

262. Una composición inmunogénica que comprende un conjugado de un péptido inmunógeno con un vehículo de proteína/polipéptido generado por el método de la reivindicación 75, junto con una o más excipientes, diluyentes y/o ayudantes farmacéuticamente aceptables.

263. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 262, en donde el vehículo se selecciona del grupo que consiste de sero albúmina humana, hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH), moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina o albúmina, hemaglutinina de influenza, polipéptido PADRE, proteína de circumsporozito de malaria (CS), antígeno de superficie de hepatitis B ($HBSA_{319-28}$), proteína de choque térmico (HSP) 65, Mycobacterium tuberculosis, toxina de cólera, mutantes de toxina de cólera con toxicidad reducida, toxina de difteria, proteínas CRM_{197} que es de reacción cruzada con la toxina de difteria, peptidasa C5a de estreptococo recombinante, *Streptococcus pyogenes* ORF1224, *Streptococcus pyogenes* ORF1664, *Streptococcus pyogenes* ORF2452, *Chlamydia pneumoniae* ORF T367, *Chlamydia pneumoniae*

ORF t858, toxoide de Tétano, gp120 T1 de HIV, componentes que reconocen la moléculas de matriz adhesiva de superficie microbiana (MSCRAMMS), factores de crecimiento, hormonas, citoxinas y quimiocinas.

264. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 262, en donde el vehículo contiene un epítopo de célula T.

265. El método de acuerdo de la reivindicación 264 en donde el vehículo es un toxoide bacterial.

266. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es hemaglutinina de influenza.

267. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es un polipéptido PADRE.

268. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es proteína de circumsporozito de malaria (CS).

269. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es un antígeno de superficie de hepatitis B ($HSBA_{319-28}$).

270. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es una proteína de choque térmico 65 (HSP 65).

271. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es un polipéptido de *Mycobacterium tuberculosis* (BCG).

272. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 265, en donde el toxoide bacterial es toxoide de tétano.

273. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 265, en donde el toxoide bacterial es CRM_{197}.

274. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es peptidasa rC5a de estreptococo.

275. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es *Streptococcus pyogenes* ORF1224.

276. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es *Streptococcus pyogenes* ORF1664.

277. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es *Streptococcus pyogenes* ORF2452.

278. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es *Chlamydia pneumoniae* ORF T367.

279. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 264, en donde el vehículo es *Chlamydia pneumoniae* ORF T858.

280. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 262, en donde el vehículo es un factor u hormona de crecimiento que estimula o mejora la respuesta inmune.

281. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 280, en donde el factor u hormona del crecimiento se selecciona de un grupo que consiste de IL-1, IL-2, γ-interferón, IL-10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, y RANTES.

282. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 262, en donde el péptido inmunógeno se selecciona del grupo que consiste de una proteína bacterial, una proteína viral, una proteína fungosa, una proteína de parásito, y una proteína eucariótica.

283. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 282, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína de una bacteria.

284. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 283, en donde la bacteria se selecciona del grupo que consiste de *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrheae, Haemophilus influenzae, Escherichia coli, Klebsiella enterobacter, listeria monocitogenes, Vibrio cólera, Clostridium perfringens, clostridium botulinum, especies de Pseudomonas, Salmonella, typhimurium, borrelia burdogferi, shigella*

flexneri, *shigella boydii*, *shigella dysentriae*, *Alloicoccus otitidis* y *streptococcus* del grupo B.

285. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 282, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína de un virus.

286. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 285, en donde el virus se selecciona del grupo que consiste de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), un virus herpes simples (VHS), un virus de papiloma humano (VPH), un virus de parainfluenza (VPI), un virus de estomatitis vesicular (VEB), virus sincitial respiratorio (VSR), virus de Epstein- Barr (VEB), un coronavirus, un virus vaccinia, un rotavirus, un virus de rabia, un virus de hepatitis C (VHC), y virus de hepatitis B (VHB).

287. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 282, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína de un hongo.

288. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 287, en donde el hongo se selecciona del grupo que consiste de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, Coccidoides, Histoplasma, y Aspergillus.

289. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 282, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína de un parásito.

290. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 289, en donde el parásito se selecciona del grupo que consiste de un plasmodium, un Tripanosoma, un Esquistosoma, y una Leishmania.

291. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 282, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína de una eucariota.

292. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 291, en donde la eucariota es un humano.

293. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 292, en donde el péptido inmunógeno de un humano se deriva de un tumor maligno.

294. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 293, en donde el péptido inmunógeno se selecciona del grupo que consiste de un antígeno de carcinoma de célula renal, un antígeno de carcinoma de mama, un antígeno carcinoembriónico, un antígeno de melanoma y un antígeno especifico de cáncer de próstata.

295. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 292, en donde el péptido inmunógeno es de un polipéptido Aβ de humano.

296. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 295, en donde el péptido inmunógeno se deriva de la región N-terminal del polipéptido Aβ.

297. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 295, en donde el péptido inmunógeno se deriva de la región C-terminal del polipéptido Aβ.

298. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 295, en donde el péptido inmunógeno se deriva de la región interna del polipéptido Aβ.

299. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 295, en donde el péptido inmunógeno de Aβ se deriva de la región N-terminal del polipéptido Aβ, y es un fragmento Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

300. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 295, en donde el péptido inmunógeno de Aβ es un fragmento de Aβ Seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23. 17-23. 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35. 35-40 y 35-42.

301. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 295, en donde una molécula del péptido inmunógeno Aβ se fusiona en su terminal C al terminal N de otra molécula del mismo péptido inmunógeno de Aβ.

302. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 295, en donde una molécula de péptido inmunógeno Aβ se fusiona en su terminal C al terminal C de otra molécula del mismo péptido inmunógeno de Aβ.

303. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 295, en donde una molécula de péptido inmunógeno Aβ se fusiona en su terminal C al terminal C de una molécula de un péptido inmunógeno de Aβ diferente.

304. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 295, en donde una molécula de péptido inmunógeno Aβ se fusiona en su terminal N al terminal C de una molécula de un péptido inmunógeno de Aβ.

305. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 301, 302, 303 o 304, en donde el fragmento de Aβ se deriva de la región-terminal del polipéptido de Aβ Y se selecciona del grupo que consiste de Aβ 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

306. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 301, 302, 303, o 304, en donde el fragmento de Aβ es un fragmento Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23. 17-23. 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35. 35-40 y 35-42.

307. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 295, en donde una o más moléculas del péptido inmunógeno de Aβ están ligadas a una o más moléculas de un péptido heterólogo.

308. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 307, en donde el péptido inmunogénico de Aβ Se deriva de la región N-terminal del polipéptido Aβ, y se selecciona del grupo que consiste de Aβ 1—5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

309. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 307, en donde el péptido inmunógeno de Aβ es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 y 35-42.

310. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 295, en donde una o más moléculas de un péptido inmunógenico de Aβ Están ligadas juntas en una configuración de péptido antigénico múltiple (MAP).

311. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 295, en donde una o más moléculas de un péptido inmunógeno de Aβ Están ligadas con una o más moléculas de un péptido inmunógeno de Aβ Diferente en una configuración de péptido antigénico múltiple (MAP).

312. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 310 o 311, en donde el péptido inmunógeno de Aβ se deriva de la región N-terminal del polipéptido Aβ Y se selecciona de grupo que consiste de Aβ 1- 5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, 1-4.

313. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 310 o 311, en donde el péptido inmunógeno de Aβ es un fragmento de Aβ

Seleccionado del grupo que consiste de Aβ A7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40, Y 35-42.

314. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 262, en donde uno o más adyuvantes se seleccionan del grupo que consiste de GM-CSF, 529 SE, IL-12, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, *Mycobacterium tuberculosis, Bordetella pertussis,* lipopolisacáridos bacteriales, compuestos de aminoalquil glucosamina fosfato, MPL™ (lípido monofosforilo 3-O-desacetilado A), un polipéptido , Quil A, STIMULON™ QS-21, una toxina de pertusis (PT), una toxina lábil al calor de E. *coli* (LT), IL-1α, IL-lβ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10. 1L-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, 1L-18, interferón-α, interferón- β interferón-γ, G-CSF, TNF-α Y TNF β-.

315. La composición inmunogénica de la reivindicación 314, en donde el péptido inmunógeno es Aβ, el vehículo es CRM197, y el adyuvante es 519 SE.

316. Un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto mamífero, que comprende administrar una cantidad efectiva de la composición inmunogénica de la reivindicación 262 al sujeto.

317. El método de acuerdo con la reivindicación 316, en donde el vehículo se selecciona del grupo que consiste de sero albúmina humana, hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH), moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina, hemaglutinina de influenza, Polipéptido PADRE, proteína de circumsporozito de malaria (CS),

antígeno de superficie de hepatitis B ($HBSAg_{19-28}$), Proteína de Shock Heat,(HSP) 65, *Mycobacterium tuberculosis*, toxina de cólera, mutantes de toxina de cólera, con toxicidad reducida, toxina de difteria, proteína CRM_{197} que es de reacción cruzada con toxina difteria, peptidasa C5a de Estreptococo recombinante, *Streptococcus pyogenes, Streptococcus pyogenes* ORF ORF1224, *Streptococcus pyogenes* ORF162452, *Chlamydia pneumoniae* ORF T367, *Chlamydia pneumoniae* ORF T858, toxoide de Tétano, gp 120 T1, de HIV, componentes que reconocen moléculas de matriz adhesivas de superficie microbial (MSCRAMMS), factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y quimocinas.

318. El método de acuerdo con la reivindicación 316, en donde el vehículo contiene un epítopo de célula T.

319. El método de acuerdo con la reivindicación 318, en donde el vehículo es un toxoide bacteriano.

320. El método de acuerdo con la reivindicación 318, en donde el vehículo es hemaglutinina de influenza.

321. El método de acuerdo con la reivindicación 318, en donde el vehículo es polipéptido PADRE.

322. El método de acuerdo con la reivindicación 318, en donde el vehículo que es proteína de circumsporozito de malaria (CS).

337

323. El método de acuerdo con la reivindicación 318, en donde el vehículo es antígeno de superficie de Hepatitis B.

324. El método de acuerdo con la reivindicación 318, en donde el vehículo es una proteína de choque térmico (65 HSP).

325. El método de acuerdo con la reivindicación 318, en donde el vehículo es un polipéptido de *Mycobacterium tuberculosis* (BCG).

326. El método de acuerdo con la reivindicación 319, en donde el toxoide bacterial es toxoide de tétano.

327. El método de acuerdo con la reivindicación 319, en donde el toxoide bacterial es CRM^{197}.

328. El método de acuerdo con la reivindicación 318, en donde el vehículo es peptidasa rC5a de Estreptococo.

329. El método de acuerdo con la reivindicación 318, en donde el vehículo es *Streptococcus pyogenes* ORF1224.

330. El método de acuerdo con la reivindicación 318, en donde el vehículo es *Streptococcus pyogenes* ORF1664.

331. El método de acuerdo con la reivindicación 318, en donde el vehículo es *Streptococcus pyogenes* ORF2452.

338

332. El método de acuerdo con la reivindicación 318, en donde el vehículo es *Chlamydia pneumoniae* ORF T367.

333. El método de acuerdo con la reivindicación 318, en donde el vehículo es *Chlamydia pneumoniae* ORF T 858.

334. El método de acuerdo con la reivindicación 316, en donde el vehículo es un factor de crecimiento de hormona, que estimula o mejora la respuesta inmune.

335. El método de acuerdo con la reivindicación 334, en donde el factor o la hormona de crecimiento se selecciona del grupo que consiste de IL-1, IL-2, γ-interferón, IL—10, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β, Y RANTES.

336. El método de acuerdo con la reivindicación 316, en donde el péptido de inmunógeno se selecciona del grupo que consiste de proteína bacterial, de una proteína bacterial, una proteína viral, y una proteína eucariótica,

337. El método de acuerdo s la reivindicación 336, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína de una bacteria.

338. El método de acuerdo con la reivindicación 337, en donde la bacteria se selecciona de Streptococcus pneumoniae, Staphilococcus aureus, Staphilococcus epidermidis, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrea Hemofilus Influenza, Escherichia coli, Klebsiella enterobacter, Listeria monocitogenes, Vibrio cholerae, Clostridium perfringens, Clostridium botulinum, Especies de Pseudomonas, Salmonera typhimurium, Borrelia

339

burgdorferi, Shigella flexneri, Shigella Boydii, Shigella disentriaem Aloiococcus otitidis, y Streptococcus del Grupo B.

339. El método de acuerdo con la reivindicación 336, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína virus.

340. El método de acuerdo con la reivindicación 339, en donde el virus se selecciona del grupo que consiste de virus de la inmunodeficiencia (VIH), un virus herpes simples (VHS), virus de papiloma humano (VPH), virus de parainfluenza (VPI), virus de estomatitis vesicular (VSV), virus sincitial respiratorio (VSR), virus de Epstein-Barr (VEB), un coronavirus, un virus de vaccinia, un rotavirus, un virus de rabia, un virus de Hepatitis C (VHC) y un virus de Hepatitis B (VHB).

341. El método de acuerdo con la reivindicación 336, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína de hongo.

342. El método de acuerdo con la reivindicación 341, en donde el hongo se selecciona del grupo que consiste de especies de Candida, una especie de Criptococuus, unas especies de Coccidioides, unas especies de Histoplsma, y unas especies de Aspergilus.

343. El método de acuerdo con la reivindicación 336, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína de un parásito.

344. El método de acuerdo con la reivindicación 343, en donde el parásito se selecciona del grupo que consiste de un Plasmodio, un Tripanosoma, un Esquistosoma, y una Leishmania.

345. El método de acuerdo con la reivindicación 336, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de proteína eucariota.

346. El método de acuerdo con la reivindicación 345, en donde eucariota es un humano.

347. El método de acuerdo con la reivindicación 347, en donde el péptido inmunógeno de un humano se deriva de un tumor maligno.

348. El método de acuerdo con la reivindicación 347, en donde el péptido inmunógeno se deriva de un antígeno de carcinoma de célula renal, un antígeno de carcinoma de mama, un antígeno carcinoembriónico, un antígeno de melanoma (MAGE-1), y un antígeno especifico de cáncer de próstata.

349. El método de acuerdo con la reivindicación 346, en donde el péptido inmunógeno es de polipéptido Aβ de humano.

350. El método de acuerdo con la reivindicación 349, en donde el péptido inmunógeno se deriva de la región N-terminal de polipéptido Aβ de humano.

351. El método de acuerdo con la reivindicación 349, en donde el péptido inmunógeno se deriva de la región C-terminal del polipéptido Aβ.

352. El método de acuerdo con la reivindicación 349, en donde el péptido inmunógeno se deriva de la región interna del polipéptido Aβ.

353. El método de acuerdo con la reivindicación 350, en donde el péptido inmunógeno de Aβ se deriva de la región N-terminal del polipéptido Aβ, y es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ-5,1, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

354. El método de acuerdo con la reivindicación 349, en donde el péptido inmunógeno de Aβ es un fragmento de Aβ, seleccionado del grupo que consiste de Aβ 7-11, 3-28, 15-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 y 35-42.

355. El método de acuerdo con la reivindicación 349, en donde una molécula del péptido inmunógeno de Aβ se fusiona en su Terminal C al Terminal N de otra molécula del mismo péptido inmunógeno de Aβ.

356. El método de acuerdo con la reivindicación 349, en donde una molécula del péptido inmunógeno de Aβ se fusiona en su Terminal C al Terminal C de otra molécula del mismo péptido inmunógeno de Aβ.

357. El método de acuerdo con la reivindicación 349, en donde una molécula del péptido inmunógeno de Aβ se fusiona en su Terminal C al Terminal C de una molécula de un péptido inmunógeno de Aβ diferente.

342

358. El método de acuerdo con la reivindicación 349, en donde una molécula del péptido inmunógeno de Aβ se fusiona en su Terminal N al Terminal C de una molécula de un péptido inmunógeno de Aβ diferente.

359. El método de acuerdo con la reivindicación 355, 356, 357, o 358, en donde el péptido inmunógeno de Aβ se deriva de la región N-terminal del polipéptido Aβ, y se selecciona del grupo que consiste de Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3,y 1-4.

360. El método de acuerdo con la reivindicación 355, 356, 357, o 358, en donde el péptido inmunógeno de Aβ es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40, y 35-42.

361. El método de acuerdo con la reivindicación 349, en donde una o más moléculas del péptido inmunogénico de β están ligadas a una o más copias del péptido heterólogo.

362. El método de acuerdo con la reivindicación 361, en donde el péptido inmunógeno de Aβ se deriva de la región N-terminal del polipéptido Aβ, y se selecciona del grupo que consiste de Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

363. El método de acuerdo con la reivindicación 361, en donde el péptido inmunógeno de Aβ se selecciona del grupo que consiste de Aβ7-11, 3-

28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 y 35-42.

364. El método de acuerdo con la reivindicación 349, en donde una o más moléculas del péptido inmunógeno de Aβ están ligados juntos en una configuración de péptido antigénico múltiple (MAP).

365. El método de acuerdo con la reivindicación 349, en donde una o más moléculas del péptido inmunógeno de Aβ están ligados a una o más moléculas de un péptido inmunógeno de Aβ diferente en una configuración de péptido antigénico múltiple (MAP).

366. El método de acuerdo con la reivindicación 364 o 365, en donde el péptido inmunógeno de Aβ se deriva de la región N-terminal del polipéptido Aβ, y en su fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 1-12, 3-7, 1-3, y 1-4.

367. El método de acuerdo con la reivindicación 364, o 365, en donde el péptido inmunógeno de Aβ es un fragmento de Aβ seleccionado del grupo que consiste de Aβ7-11, 3-28, 16-22, 16-23, 17-23, 17-24, 18-24, 18-25, 17-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 y 35-42.

368. El método de acuerdo con la reivindicación 262, en donde uno o más adyuvantes se seleccionan del grupo que consiste de GM-CSF, 529 SE, IL-12, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, *Mycobacterium tuberculosis, Bordetella pertussis*, lipopolisacáridos bacteriales, compuestos de aminoalquil glucosamina fosfato, MPL™ (monofosforil

lípido A 3-O-desacilado), un polipéptido, un polipéptido , Quil A, STIMULON™ QS-21, una toxina de pertusis (PT), una toxina lábil al calor de E. coli (LT), IL-1α, IL-lβ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10. 1L-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, 1L-18, interferón-α, interferón-β interferón-γ, G-CSF, TNF-α y TNFβ-.

369. El método de acuerdo con la reivindicación 368, en donde el péptido inmunógeno es Aβ, el vehículo es CRM197, y el adyuvante es 529 SE.

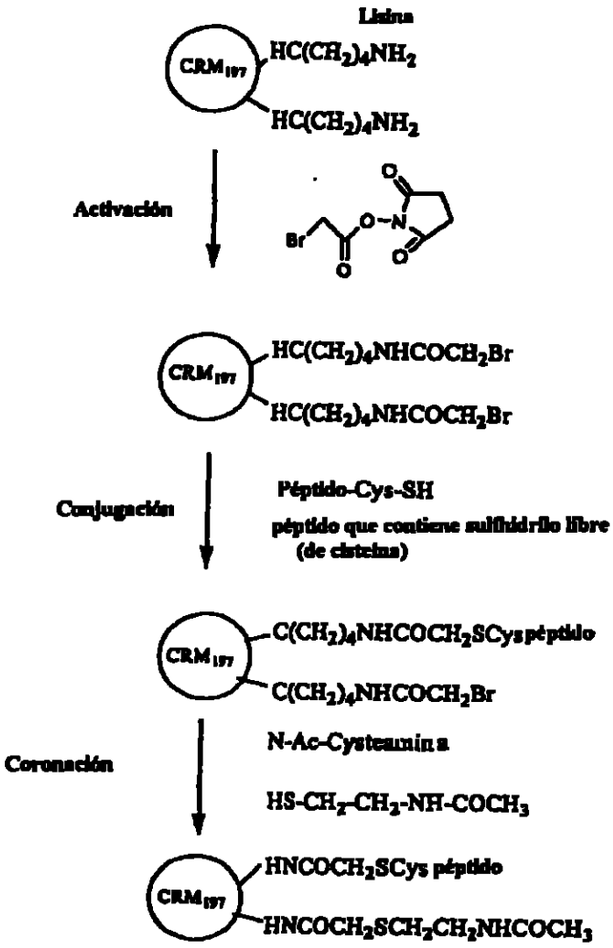

Lisina
CRM197
HC(CH2)4NH2
HC(CH2)4NH2
Activación
Br
O
O
O
O
N
CRM197
HC(CH2)4NHCOCH2Br
HC(CH2)4NHCOCH2Br
Conjugación
Péptido-Cys-SH
péptido que contiene sulfhidrilo libre
(de cisteína)
CRM197
C(CH2)4NHCOCH2SCys péptido
C(CH2)4NHCOCH2Br
Coronación
N-Ac-Cysteamina
HS-CH2-CH2-NH-COCH3
CRM197
HNCOCH2SCys péptido
HNCOCH2SCH2CH2NHCOCH3

Fig 1

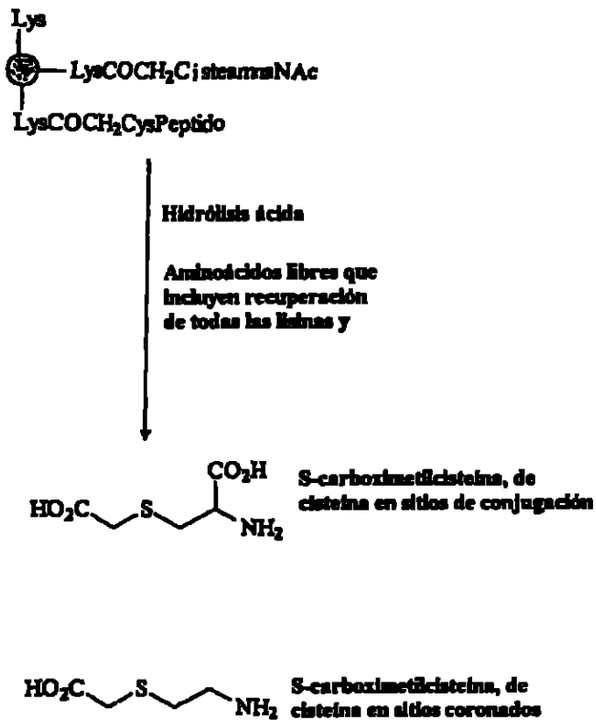

Lys
LysCOCH2CisteamnaNAc
LysCOCH2CysPeptido
Hidrólisis ácida
Aminoácidos libres que incluyen recuperación de todas las lisinas y
CO2H
HO2C
S
NH2
S-carboximetilcisteina, de cisteina en sitios de conjugación
HO2C
S
NH2
S-carboximetilcisteina, de cisteina en sitios coronados

Fig 2

347
347

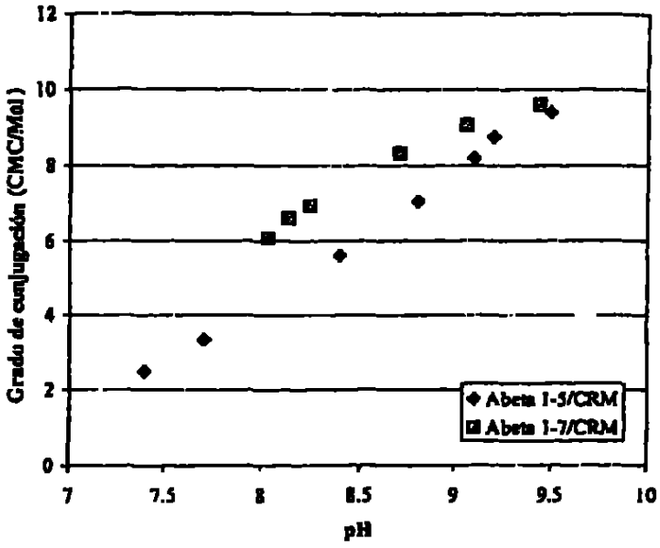

Grado de conjugación (CMC/Mol)
12
10
8
6
4
2
0
7
7.5
8
8.5
9
9.5
10
pH
Abeta 1-5/CRM
Abeta 1-7/CRM

Fig 3

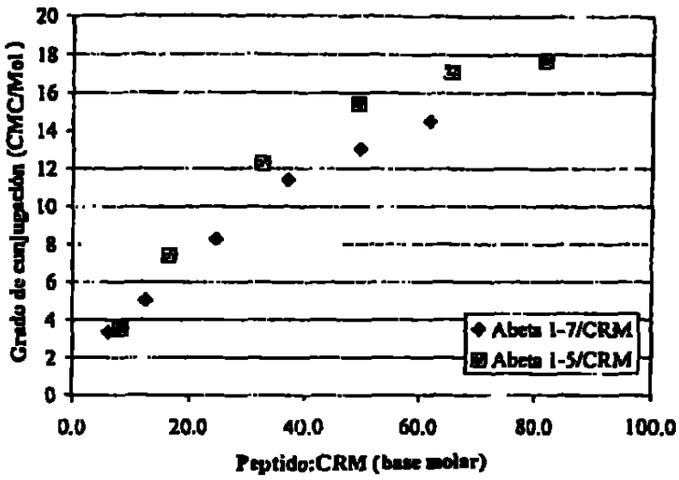

Grado de conjugación (CM/CM el)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0.0
20.0
40.0
60.0
80.0
100.0
Peptido:CRM (base molar)
Abeta 1-7/CRM
Abeta 1-5/CRM

Fig 4

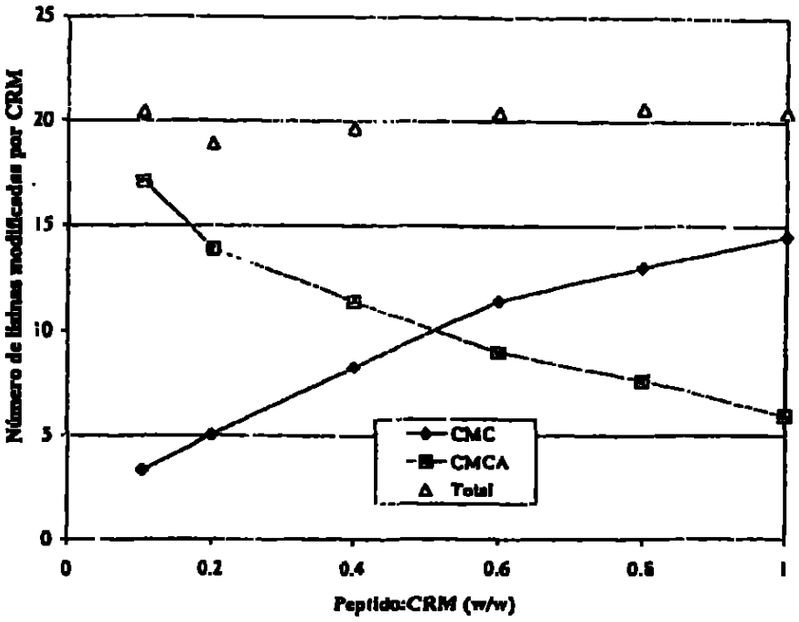

Número de lisinas modificadas por CRM
25
20
15
10
5
0
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
Peptido:CRM (w/w)
CMC
CMCA
Total

Fig 5

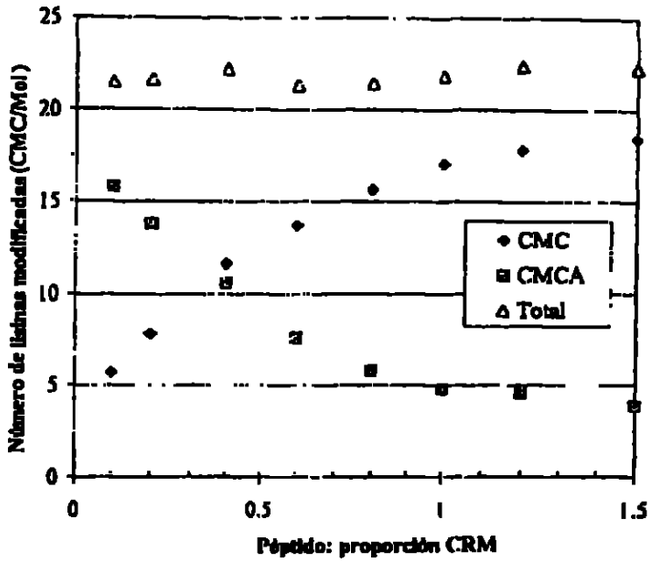

25
20
15
10
5
0
0
0.5
1
1.5
Número de lisinas modificadas (CMC/Mol)
Péptido: proporción CRM
CMC
CMCA
Total

Fig 6

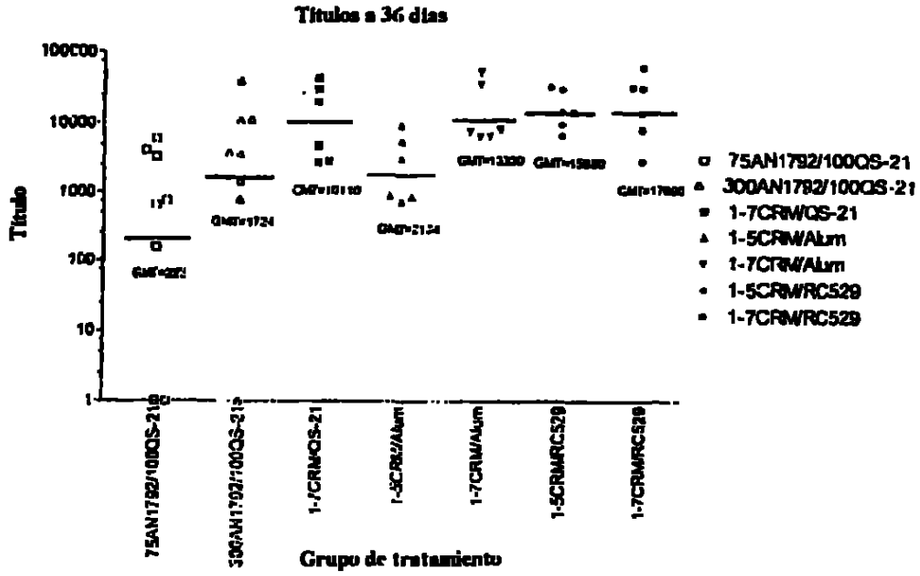

Títulos a 36 días
Título
100000
10000
1000
100
10
1
GMT=227
GMT=1724
GMT=10110
GMT=2124
GMT=13200
GMT=15800
GMT=17600
75AN1792/100QS-21
300AN1792/100QS-21
1-7CRM/QS-21
1-5CRM/Alum
1-7CRM/Alum
1-5CRM/RC529
1-7CRM/RC529
Grupo de tratamiento

Fig 7

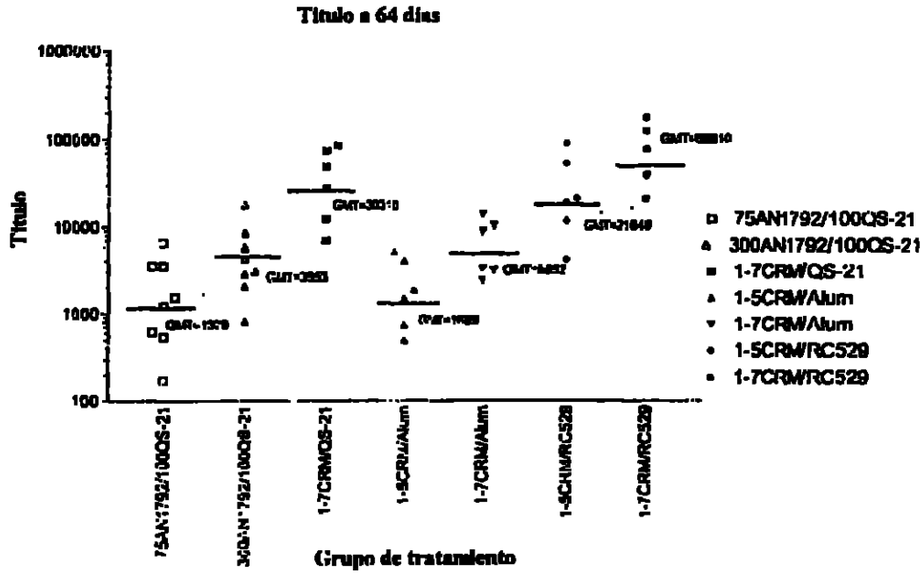

Título a 64 días
Título
1000000
100000
10000
1000
100
GMT=1329
GMT=3953
GMT=21648
75AN1792/100QS-21
300AN1792/100QS-21
1-7CRM/QS-21
1-5CRM/Alum
1-7CRM/Alum
1-5CRM/RC529
1-7CRM/RC529
75AN1792/100QS-21
1-7CRM/QS-21
1-7CRM/Alum
1-5CRM/RC529
1-7CRM/RC529
Grupo de tratamiento

Fig 8

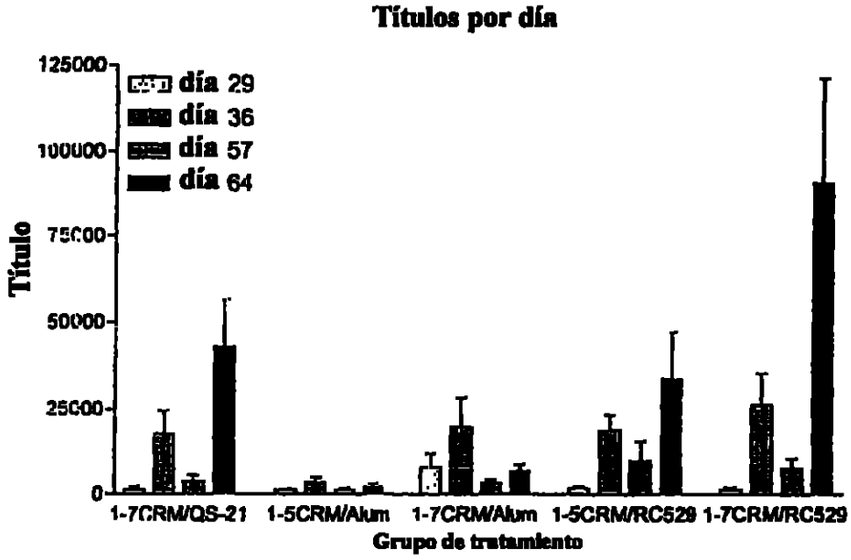


Fig 9

ID = 55

13665

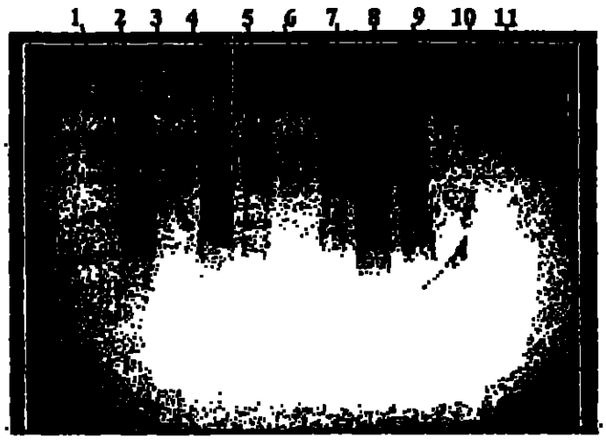


Fig 10

SEQUENCE LISTING

<110> Arumugham, Rasappa
Prasad, A. Krishna

<120> Methods of Producing Immunogenic Peptide Carrier Conjugates

<130> 025721-000110US

<140>
<141>

<150> US 60/530,480
<151> 2003-12-17

<160> 54

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg Cys
1 5

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Cys
1 5

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Cys
1 5 10

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val Cys
1 5 10

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ala Glu Phe Arg Gly Ala Gly Ala Cys
1 5 10

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gly Ala Gly Ala Cys

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

1 5 10

<210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Gly Ala Gly Ala Cys
1 5 10

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Cys

<210> 9
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Val Glu Tyr Gly Ser Asp His Arg Phe Glu Ala Asp Cys
1 5 10

<210> 10

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Gly Ala Gly Ala
1

<210> 11
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 12

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 13
<211> 16
<212> PRT

Patent provided by Sughrue-Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<213> Homo sapiens

<400> 13

Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val
1 5 10 15

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Phe Glu Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile
1 5 10

<210> 15
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Asp Gln Ser Ile Gly Asp Leu Ile Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly
1 5 10 15

Asn Glu Gly

<210> 16
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

260

Gln Val His Phe Gln Pro Leu Pro Pro Ala Val Val Lys Leu
1 5 10

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
1 5 10 15

<210> 18
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu
20

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr
1 5 10 15

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<210> 20
<211> 51
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
20 25 30

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Asp Ala Glu Phe
35 40 45

Arg His Asp
50

<210> 21
<211> 42
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

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

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<210> 22
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu
20

<210> 23
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
1 5 10 15

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
20 25

<210> 24
<211> 43
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
1 5 10 15

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu
20 25 30

Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
35 40

<210> 25
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

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

Ile Gly Ile Thr Glu Leu
20

<210> 26
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 26

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Asp Ala Glu
1 5 10 15

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Phe Arg His Asp
20

<210> 27
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 27

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala
1 5 10 15

Glu Phe Arg His Asp Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala
20 25 30

Ala Ala

<210> 28
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 28

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Asp Ala Glu
1 5 10 15

Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg
20 25 30

His Asp

<210> 29
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 29

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu
1 5 10 15

Lys Ala Ala Ala
20

<210> 30
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His
1 5 10 15

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 31
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

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

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 32
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

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

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 33
<211> 34
<212> PRT

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<213> Homo sapiens

<400> 33

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Asp Ala Glu
1 5 10 15

Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg
20 25 30

His Asp

<210> 34
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu
1 5 10 15

Lys Leu Ala Thr Asp Ala Glu Phe Arg His Asp
20 25

<210> 35
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala
1 5 10 15

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Glu Phe Arg His Asp Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu
20 25 30

Ala Thr

<210> 36
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Pro Lys
1 5 10 15

Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
20 25

<210> 37
<211> 79
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu
1 5 10 15

Lys Leu Ala Thr Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser
20 25 30

Val Phe Asn Val Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile
35 40 45

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro
50 55 60

Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Asp Ala Glu Phe Arg His Asp
65 70 75

<210> 38
<211> 58
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala
1 5 10 15

Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly
20 25 30

Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg
35 40 45

Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
50 55

<210> 39
<211> 44
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe

Patent provided by Seghrue Mion, PLLC - http://www.seghrue.com

1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
20 25 30

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
35 40

<210> 40
<211> 535
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

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

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
85 90 95

Patent provided by Seghrue Mion, PLLC - http://www.seghrue.com

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
180 185 190

Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
195 200 205

Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
210 215 220

Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
225 230 235 240

Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
245 250 255

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
260 265 270

Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
275 280 285

Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
290 295 300

Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
305 310 315 320

Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
325 330 335

Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
340 345 350

Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
355 360 365

Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
370 375 380

Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr
385 390 395 400

Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His
405 410 415

Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

420 425 430

Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
435 440 445

His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
450 455 460

Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
465 470 475 480

Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
485 490 495

Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
500 505 510

Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
515 520 525

Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
530 535

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

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

Patent provided by Sughrue Mion PLLC - http://www.sughrue.com

Arg

<210> 42
<211> 42
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 42

Asp Ala Glu Phe Gly His Asp Ser Gly Phe Glu Val Arg 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> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> A-beta 18-25 + C

<400> 43

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Cys
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<213> Artificial

<220>
<223> A-beta 17-24 + C

<400> 44

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Cys
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> A-beta 16-23 + C

<400> 45

Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Cys
1 5

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> A-beta 18-25 + C

<400> 46

Cys Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly
1 5

<210> 47
<211> 9

Patent provided by Seyfarth Shaw, PLLC - http://www.seyfarth.com

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> C + A-beta 18-25

<400> 47

Cys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> C + A-beta 16-23

<400> 48

Cys Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5

<210> 49
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> A-beta 18-24 + C

<400> 49

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Cys
1 5

<210> 50

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> A-beta 17-23 + C

<400> 50

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Cys
1 5

<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> A-beta 16-22 + C

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> CRM 197 added via terminal cysteine

<400> 51

Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Cys
1 5

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> C + A-beta 18-24

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> CRM 197 added via N-terminal cysteine

<400> 52

Cys Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> C + A-beta 17-23

<400> 53

Cys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5

<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> C + A-beta 16-22 + C

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> CRM 197 added via N-terminal cysteine

<400> 54

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Cys Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu
1 5

Patent provided by Sughrue-Mion, PLLC - http://www.sughrue.com

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCTd3

(21) N° de solicitud:	(51) Int Cl: C07K
22) Fecha de solicitud:	(71)Solicitante(s) WYETH
(30) Prioridad (31) 60/530,480 (32) 17/12/03 (33) US	(72) Inventor(es) RASAPPA G. ARUMUGHAM KRISHNA PRASAD A.
	(74) Apoderado: EMILIO FERRERO
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 17/07/2006 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 17/12/2004 No. de solicitud PCT/US2004/042701	(87) Publicación internacional Fecha: . 30/06/2005 N° publicación: WO 2005/058940 A2

(54) Título: **CONJUGADOS DE PORTADOR DE PEPTIDO INMUNOGENICOS Y METODOS PARA PRODUCIR LOS MISMOS**

REIVINDICACIONES:

1. Un método para la conjugación de un inmunógeno de péptido vía un grupo reactivo de un residuo de aminoácido del inmunógeno de péptido a un portador de proteína/polipéptido que tiene uno o más grupos funcionales, el método está caracterizado porque comprende las etapas de:

(a) derivar uno o más de los grupos funcionales del portador de proteína/polipéptido o de opcionalmente a un enlazador de polipéptido anexado al portador de proteína/polipéptido para generar un portador derivado con sitios reactivos;

(b) hacer reaccionar el portador de proteína/polipéptido derivado de la etapa (a) con un grupo reactivo de un aminoácido del inmunógeno de péptido, bajo condiciones de reacción de tal manera que el inmunógeno de péptido es conjugado al portador de proteína/polipéptido derivado vía los grupos funcionales y

(c) hacer reaccionar adicionalmente el conjugado con un reactivo de coronación para inactivar los grupos funcionales sin reaccionar reactivos libres en el portador de proteína/polipéptido derivado, conservando mediante esto la funcionalidad del portador, de tal manera que retiene su capacidad para producir las respuestas inmune deseadas contra el inmunógeno de péptido que de otra manera no ocurrirían sin un portador.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el portador de proteína/polipéptido es seleccionado del grupo que consiste de albumina de suero humano, hemocianina de lapa de bocallave (KLH), moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina, hemaglutinina de influenza, polipéptido PADRE, proteína de circumesporocito de malaria (CS), antígeno superficial de hepatitis B ($HBSAg_{19-28}$), proteína de choque térmico (HSP) 65, *Mycobacterium tuberculosis*, toxina de cólera, mutantes de toxina de cólera con toxicidad reducida, toxina de difteria, proteína de CRM_{197} que es de reactividad cruzada con toxina de difteria, peptidasa estreptococal ORF1664 recombinante, Streptococcus pyrogenes ORF1224, Streptococcus pyrogenes ORF1664, Streptococcus pyrogenes ORF2452, Chlamydia pneumoniae ORF 367, Chlamyidia pneumoniae ORF T858, toxoide de tétano, HIV gp120 T1, componentes que reconocen moléculas de matriz adhesiva superficial microbiana (MSCRAMMS), factores de crecimiento, hormonas, citocinas y quimiocinas.

3. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el portador de proteína/polipéptido es CRM_{197}.

4. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el inmunógeno de péptido es seleccionado del grupo que consiste de una proteína bacteriana, una proteína viral y una proteína eucariótica.

5. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el grupo funcional de una o más moléculas de aminoácido del portador de proteína/polipéptido o del enlazador de polipéptido anexado opcionalmente es derivado usando un reactivo de reticulación.

6. El método de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque el portador de proteína/polipéptido se hace reaccionar con un reactivo de haloacetilación.

7. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el reactivo de coronación que es usado para desactivar grupos funcionales reactivos libres en el portador de proteína/polipéptido activado es seleccionado del grupo de reactivos que consiste de cisteamina, N-acetilcisteamina, etanolamina, hidróxido de sodio, carbonato de sodio y amoniaco.

381

FORMATO DE DIGITALIZACION
RELACION DE ANEXOS

Royal Technologies S.A.

Item		Expediente No	06059310	No de Folio
			No de Unidades	√
1	CD			
2	DVD			
3	REVISTA			
4	LIBRO			
5	PERIODICO			
6	DISQUETES			
7	SOBRE DE MANILA			
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		1	
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO			
10	OTROS:			

Observaciones: Arte Final.

382

382

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-059310- -00000-0000
Fec: 2006-06-15 17:51:15 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEMII
Ete: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION
Folios 382

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 44,161
FECHA : JUNIO 12 DE 2006

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PBO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55274900	12/06/2006	26,485,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50003-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL : $	463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Clo 13665-841-004-0

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-059310- -00000-0000
Fec: 2006-05-16 17:51:15 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEIYI
Cla: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 382

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

382
383

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [✓] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [✓]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [✓]
- Descripción de la invención [✓]
- Dibujos de ser estos pertinentes [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [✓]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable

Fecha 16 JUN. 2006

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia