

PARTÍCULAS TIPO VIRUS MODIFICADAS DE CMV

La presente invención se refiere a partículas tipo virus (VLPs por sus siglas en inglés) del virus de plantas Virus del Mosaico del Pepino (CMV por sus siglas en inglés), y en particular a VLPs de CMV que comprenden epítomos de células Th, en particular epítomos de células Th universales. Además, estas VLPs modificadas sirven como, preferentemente, plataforma de vacuna, para la generación de respuestas inmunes, en respuestas de anticuerpos particulares, contra los antígenos vinculados con dichas VLPs modificadas. La presencia de los epítomos de células Th, en particular epítomos de células Th universales, condujo a un mayor aumento en la respuesta inmune generada.

15

Técnica Relacionada

En las últimas tres décadas, las partículas tipo virus (VLPs) han evolucionado para convertirse en una tecnología aceptada, en particular en el campo de desarrollo de vacunas (Zeltins A, *Mol Biotechnol* (2013) 53:92-107). El creciente interés por estas VLPs se inspiró particularmente por el desarrollo e introducción del antígeno superficial del virus de la hepatitis B (VHB) y la proteína de cápside del virus del papiloma humano (VPH) L1 como vacunas comerciales contra la hepatitis B y cáncer cervical

25

inducido por VPH, respectivamente. Por otra parte, se han descrito partículas tipo virus como portadores inmunológicos que son capaces de inducir fuertes respuestas inmunes contra los antígenos conjugados (Jennings GT y Bachmann MF, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2009) 49:303-26, Jennings GT y Bachmann MF, *Biol Chem* (2008) 389:521-536, WO2002/056905, WO2003/024481). El último condujo al desarrollo de varios candidatos de vacunas a base de VLP que han ingresado en diferentes etapas de las investigaciones clínicas con el objetivo de desarrollar vacunas a base de VLP para propósitos médicos y veterinarios en un futuro cercano (Liu F, et al., *Research in Veterinary Science* (2012) 93:553-559; Roldao A., et al., *Expert Review of Vaccines* (2010) 9:1149-1176).

Las VLPs desarrolladas hasta ahora se han originado de virus microbianos, de plantas, de insectos o mamíferos. Al lado de los sistemas de VLP anteriores referenciados, las VLPs derivados de virus de plantas han recientemente llamado la atención, principalmente debido al papel de las plantas como una plataforma alternativa rápida y económica para la producción de vacunas de VLP teniendo en cuenta su capacidad de hacer modificaciones postraduccionales distintivas, su rentabilidad, velocidad de producción y escalabilidad (Chen Q y Lai H, *Human Vaccines & Immunotherapeutics* (2013) 9:26-49; Zeltins A, *Mol*

Biotechnol (2013) 53:92-107).

El Viruso del Mosaico del Pepino (Familia *Bromoviridae*, género *Cucumovirus*) es un virus de planta isodiamétrico lineal de sentido positivo con un rango de
5 hospederos muy amplio. El genoma del virus consiste en tres ARNs monocatenarios (ARN1, ARN2 y ARN3), el gen de proteína de recubrimiento (PC) que está presente tanto en el ARN3 genómico (aproximadamente 2200 nt) como en el ARN4 subgenómico (aproximadamente nt). La cápside comprende 180
10 copias de una única especie proteína de aproximadamente 26 kDa. Hay una pluralidad de diferentes cepas de conocidas del CMV asociadas con síntomas variables relacionados con la planta hospedera tales como la cepa CMV-B, las cepas CMV-C, la cepa CMV-D, las cepas CMV-L, la cepa CMV-S, la
15 cepa CMV-T, la cepa CMV-WL, las cepas CMV-V, la cepa CMV-Fny, la cepa CMV-Ix, la cepa CMV-Q, la cepa CMV-R o similares (Carrère I, et al., *Arch Virol* (1999) 144:1846-1857; Edwards MC, et al., *Phytopathology* 81983) 73:1117-1120; www.dpvweb.net).

20 Recientemente, las formas quiméricas de CMV han sido diseñadas para funcionar como un sistema de presentación y para expresar en sus epítopes de la superficie exterior derivados del virus de la hepatitis C (VHC). En detalle, una forma de pseudo-recombinante de CMV CMV-D/S ha sido
25 diseñada para transportar ARN3 genómico de la cepa de CMV-S

y ARN1 y ARN2 de la cepa de CMV-D. Este sistema desarrolló síntomas de virus tales como mosaico suave y aclaramiento de nervaduras en plantas de tabaco *Xanthi* después de la inoculación. El gen de CP fue diseñado entonces en

5 diferentes posiciones, para codificar un epítipo del virus de la Hepatitis C (VHC). El péptido seleccionado fue el llamado mimótope de R9, un péptido sintético derivado de muchas secuencias de región hipervariable 1 (HVR1) de la proteína de envoltura del VHC E2. Muestras de suero de

10 pacientes con hepatitis C crónica muestran una inmunoreactividad importante a extractos de planta cruda infectados con una de las formas quiméricas pseudo-recombinantes diseñadas seleccionadas de CMV. Por lo tanto, se ha sugerido que tales sistemas pueden ser portadores

15 adecuados que permiten el desarrollo de estrategias prometedoras de inmunización oral. Este último estaría en consonancia con el concepto de plantas como posibles biorreactores de los llamados nutraceuticos ya que replican activamente en las plantas y, por lo tanto, son concebibles

20 para usarse como vacunas comestibles debido a que el apio, la lechuga, el pepino, el tomate, la zanahoria, el pimiento y el plátano son anfitriones del CMV. (Natilla A, et al., *Arch Virol* (2004) 149:137-154; Piazzolla G, et al., *J Clin Immunol* (2005) 25:142-152; Nuzzaci M, et al., *Arch Virol*

25 (2007) 152:915-928; Nuzzaci M, et al., *Journal of*

Virological Methods (2009) 155:118-121; Nuzzaci M, et al., *Journal of Virological Methods* (2010) 165:211-215; Piazzolla G, et al., *J Clin Immunol* (2012) 32:866-876).

La inserción de los mimótopes de R9 se ha hecho en
 5 diferentes lugares dentro del gen CP del ARN3 del CMV-S
 (AF063610, www.dpvweb.net). Para la inserción de un solo
 mimótopo de R9 dentro de dicho gen de CP, la secuencia de
 nucleótidos de mimótopo de R9 se insertó en las posiciones
 253, 475, 529 de dicho gen de CP, mientras que para la
 10 inserción de dos mimótopes de R9, la secuencia de
 nucleótidos del mimótopo de R9 se insertó en la posición
 392 y 592. Los productos finales fueron partículas
 quiméricas de CMV transportando en su superficie exterior
 180 o 360 copias del mimótopo de R9 para cada partícula de
 15 virus. (Natilla A, et al., *Arch Virol* (2004) 149:137-154;
 Piazzolla G, et al., *J Clin Immunol* (2005) 25:142-152;
 Nuzzaci M, et al., *Arch Virol* (2007) 152:915-928; Nuzzaci
 M, et al., *Journal of Virological Methods* (2009) 155:118-
 121; Nuzzaci M, et al., *Journal of Virological Methods*
 20 (2010) 165:211-215; Piazzolla G, et al., *J Clin Immunol*
 (2012) 32:866-876).

Se ha dicho que la selección de los puntos de
 inserción del mimótopo de R9 en el ARN3 de CMV-S se basa en
 la consideración de varios factores esenciales: i) la
 25 necesidad de proteger la región N-terminal de la proteína

de recubrimiento de CMV (contiene una alta concentración de aminoácidos básicos, conocida como un dominio R interno, implicado en interacciones proteína-ARN que estabilizab CMV ((Wikoff WR, et al., *Virology* (1997) 232: 91-97))

5 caracterizado por una hélice de N-terminal inusual con un papel estabilizador adicional en la cápsida (Smith TJ, et al., *J Virol* (2000) 74: 7578-7686)); ii) la localización superficial del epítipo extraño para aumentar las posibilidades de su supuesta capacidad inmunogénica; iii)

10 la disponibilidad de vías de mutagénesis capaces de producir los clones modificados. Sobre la base de estas consideraciones se ha enfocado a trabajar en el rango aa 70-192 y las correspondientes regiones de nucleótidos como se indican arriba. El CMVs quimérico así preparado conserva

15 su capacidad de extensión sistémica en la planta huésped, que es una meta insustituible en la construcción de un posible portador del virus de la planta para la expresión de genes extraños en las plantas. Las pruebas de ELISA e IEM demostraron que el mimótope de R9 fue expuesto como

20 estaba previsto en la posición correcta (Natilla A, et al., *Arch Virol* (2004) 149:137-154).

Además, un sistema de expresión a base de virus del mosaico del pepino para la producción de vacunas específicas de circovirus porcino se ha descrito

25 recientemente (Gellert A, et al., *PLoS ONE* (2012) 7(12):

e52688). En detalle, los epítomos de proteína cápside de circovirus porcino tipo 2 (PCV2) se integraron en la proteína de recubrimiento del virus de planta del virus del mosaico del pepino (CMV)-cepa R después de la posición de aminoácido 131. Los recombinantes fueron probados para infectividad y estabilidad en diferentes especies de *Nicotiana* y partículas de virus recombinantes estables se purificaron. Las partículas fueron probadas para su capacidad de unirse a anticuerpos porcinos inducidos por PCV y utilizadas para la inducción de anticuerpos específicos en ratones y cerdos. Los resultados mostraron que los epítomos de PCV expresados en la superficie de CMV fueron reconocidos por los anticuerpos porcinos y también fueron capaces de inducir respuesta de anticuerpos específica de PCV. El experimento de desafío con PCV2 realizado en cerdos inmunizados mostró una protección parcial contra la infección.

Los epítomos de proteínas de cápside de PCV2 se integraron en la proteína de cápside del virus del mosaico del pepino (CMV) en los tres puntos de inserción estables del epítomo de CMV reportados hasta la fecha (Nuzzaci M, et al., Arch Virol (2007) 152:915-928; Vitti A, et al., J Virol Methods (2010) 169:332-340). Los epítomos integrados en estos puntos no bloquean la propagación del CMV y el movimiento a larga distancia en las plantas. Dos de ellos

se muestran en la superficie externa del virión, mientras que el tercero sobresale hacia el interior del virión. Hay una limitación de electrostática para expresar epítomos hacia el interior del virión ya que sólo la expresión de epítomos con carga positiva, que no interfieren con la unión de ARN de la superficie interna de la cápside del CMV puede realizarse con éxito. En detalle, el primer punto de inserción está situado en la posición de aa 83-84 y en el extremo del bucle de la CP de CMV. Los epítomos incorporados se expresan en la superficie de los viriones de CMV. El segundo punto de inserción está situado en la posición de aa 131-132 y en el centro del bucle -F de la CP de CMV. Los epítomos incorporados también se expresan en la superficie de los viriones de CMV. El tercer punto de inserción está situado en la posición de aa 176-177 y en el centro del bucle-. En este último caso los epítomos insertados se expresan en la superficie interna de los viriones de CMV.

Además, la generación de *partículas tipo virus (VLPs)* quiméricas basada en CMV se ha descrito, y su uso como vacuna animal se ha sugerido (Natilla, A, et al., Arch Virol (2006) 151:1373-1386; Natilla, A, et al., *Protein Expression and Purification* (2008) 59:117-121). Sin embargo, la expresión de las proteínas de la cápside viral (CPs) del CMV por el ampliamente utilizado tradicional

sistema de expresión de *E. coli* condujo solamente a los cuerpos de inclusión insolubles o una muy baja cantidad de proteínas solubles (Xu Y, et al., *Chem Commun* (2008) 49-51). Por el contrario, la proteína de recubrimiento (CP) expresada por el virus de la Papa X (PVX) de CMV-Fny formó VLPs, que sirvieron como portadoras para la visualización superficial de diferentes epítopos neutralizantes del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), un patógeno económicamente importante de aves de corral. Para este propósito, los epítopos de fusión (F), la proteína hemaglutinina-neuraminidasa (NH) y el péptido F-NH de tándem fueron genéticamente fusionados en el bucle interno β H- β I (motivo 5) del CP de Fny-CMV (correspondiente a los aminoácidos 194 a 199 de los mismos) y expresados a través de los vectores de PVX en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Las VLPs de CMV quimérico resultantes son morfológicamente indistinguibles de las partículas de CMV silvestre. Por otra parte, los pollos inmunizados con VLPs purificadas de NH-CMV desarrollaron respuestas de anticuerpos específicos del antígeno, sin embargo, los pollos inmunizados así no estaban protegidos contra el desafío experimental con el NDV (Natilla, A, et al., *Arch Virol* (2006) 151:1373-1386; Natilla, A, et al., *Protein Expression and Purification* (2008) 59:117-121; Chen Q y Lai H, *Human Vaccines & Immunotherapeutics* (2013) 9:Immunotherapeutics (2013) 9:

26-49).

Como se indicó, la expresión de las proteínas de la cápside viral (CPs) del CMV en *E. coli* condujo solamente a los cuerpos de inclusión insolubles o una muy baja cantidad de proteínas solubles (Xu Y, et al., *Chem Commun* (2008) 49-51). Por otra parte, Xu et al pudieron ensamblar *in vitro* CPs genéticamente recombinantes de CMV en nanotubos biológicos desencadenados por ADNs bicatenarios de diferentes longitudes (Xu Y, et al., *Chem Commun* (2008) 49-51). Para ello, sin embargo, Xu et al debían producir CPs de CMV puras solubles. Esto se logró mediante un procedimiento de recombinación después de la expresión de las CPs de *E. coli*. El procedimiento comprende la separación y purificación de los cuerpos de inclusión formados después de la expresión del gen de CP de longitud total de 218 residuos de aminoácidos (ID AB008777, www.dpvweb.net), seguido por la solubilización de los cuerpos de inclusión a través de desnaturalización y finalmente aplicando un procedimiento de repliegue a la proteína desnaturalizada.

Aunque se ha avanzado en el curso de desarrollo de VLP a base de vacunas, todavía hay una necesidad de otros sistemas distintos de VLP. En particular, las vacunas inducen respuestas de anticuerpos variables en sujetos y personas inmunizadas y las respuestas del anticuerpo a

menudo abarcan un rango de variación más de 100-veces. Además, algunas vacunas, como la vacuna contra la Hepatitis B, padecen de un cierto número de no respondedores. La no respuesta se sabe que está asociada con ciertas moléculas de MHC clase II y se cree que la falla en la inducción de buenas respuestas de las células T ayudantes (Th) es responsable de las respuestas de anticuerpo deficientes vistas en estas personas (Goncalves L, et al., *Virology* (2004) 326:20-28). Además, las personas mayores y de edad montan malas respuestas de anticuerpo en general y las malas respuestas de células Th otra vez se cree que son la causa de las respuestas ineficaces de anticuerpo. Por lo tanto, las vacunas inducen buena respuesta de células Th en esencialmente todos los sujetos y las personas son un objetivo importante en el campo de desarrollo de una vacuna.

Breve Descripción de la Invención

Sorprendentemente hemos descubierto que las proteínas de recubrimiento del virus del mosaico del pepino (CMV) pueden ser modificadas para incorporar epítomos de células T ayudantes (Th) y preferentemente incorporan epítomos de células TH universales. Estos últimos son particularmente sorprendentes ya que estos epítomos de células Th fuertes causan agregación, por lo tanto, se espera que impidan el

auto-ensamblaje tras la expresión que conduce a VLPs. Por otra parte, la presente invención no sólo proporciona VLPs modificadas de CMV que comprenden epítomos de células Th, preferiblemente epítomos de células Th universales, sino además las VLPs modificadas de CMV así como las VLPs de CMV silvestres han sido obtenidas por la expresión en *E. coli*, que otra vez es sorprendente ya que los intentos previos para producir VLPs de CMV en *E. coli* resultaron en agregados en lugar de VLPs. Además, las VLPs inventivas sirven como una plataforma portadora, en particular, una plataforma de vacuna, en antígenos en los que las respuestas inmunitarias desean generarse están vinculados a las VLPs inventivas. Los epítomos de células Th introducidos incorporados dentro de las VLPs modificadas de CMV inventivas además aumentan la inmunogenicidad de las VLPs y llevan a un aumento de las respuestas inmunes globales generadas por las composiciones innovadoras, en particular a mayores respuestas de anticuerpos.

Así en un primer aspecto, la presente invención proporciona una partícula tipo virus modificada (VLP) del virus del mosaico del pepino (CMV), en donde dicha VLP modificada de CMV comprende, consiste esencialmente en o consiste alternativamente en, por lo menos un polipéptido modificado de CMV, en donde dicho polipéptido modificado de CMV comprende, o preferiblemente consiste en, un

polipéptido de CMV y (b) un epítipo de célula T ayudante; y en donde dicho polipéptido de CMV comprende, o preferiblemente consiste en, (i) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV; o (ii) una secuencia de aminoácidos mutados, en donde la secuencia de aminoácidos a mutar es una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, y en donde dicha secuencia de aminoácidos mutados y dicha proteína de recubrimiento de CMV muestran una identidad de secuencia de al menos 90%, preferentemente de al menos 95%, más preferiblemente de al menos 98% y otra vez más preferentemente de al menos 99%.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una partícula tipo virus modificada (VLP) del virus del mosaico del pepino (CMV), en donde dicha VLP modificada de CMV comprende, esencialmente consiste en o alternativamente consiste en, por lo menos un polipéptido modificado de CMV, en donde dicho polipéptido modificado de CMV comprende, o preferiblemente consiste en, un polipéptido de CMV y (b) un epítipo de célula T ayudante; y en donde dicho polipéptido de CMV comprende, o preferiblemente consiste en, (i) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV; o (ii) una secuencia de aminoácidos mutados, en donde la secuencia de aminoácidos a mutar es una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, y

en donde dicha secuencia de aminoácidos mutados y dicha proteína de recubrimiento de CMV muestran una identidad de secuencia de al menos 90%, preferentemente de al menos 95%, más preferiblemente de al menos 98% y otra vez más preferentemente de al menos 99%; en donde dicho epítipo de célula T ayudante T (i) se fusiona a la N-terminal de dicho polipéptido de CMV; (ii) se fusiona a la C-terminal de dicho polipéptido de CMV; (iii) sustituye una región de aminoácidos consecutivos de dicho polipéptido de CMV, en donde la identidad de secuencia entre dicha región de aminoácidos consecutivos sustituida de dicho polipéptido de CMV y el epítipo de célula T ayudante es por lo menos 15%, preferentemente por lo menos 20%; o (iv) sustituye una región N-terminal de dicho polipéptido de CMV, y en donde dicha región N-terminal sustituida de dicho polipéptido de CMV consiste de 5 a 15 aminoácidos consecutivos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una partícula tipo virus (VLP) del virus del mosaico del pepino (CMV), en donde dicha VLP de CMV comprende, consiste esencialmente en o consiste alternativamente en, por lo menos un polipéptido de CMV que comprende o que preferiblemente consiste en: (i) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV; o (ii) una secuencia de aminoácidos mutados, en donde la secuencia de aminoácidos a mutar es una secuencia de aminoácidos de

una proteína de recubrimiento de CMV, y en donde dicha
secuencia de aminoácidos mutados y dicha proteína de
recubrimiento de CMV muestran una identidad de secuencia de
al menos 90%, preferentemente de al menos 95%, más
5 preferiblemente de al menos el 98% y más preferentemente de
al menos 99%; y en donde dicha VLP de CMV se obtiene por
expresión de dicho polipéptido de CMV en *E. coli.*, y en
donde preferentemente dicha expresión se efectúa a
temperaturas de entre 10°C a 25°C, preferiblemente a una
10 temperatura de 20°C.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una
composición que comprende una partícula tipo virus
modificada. Además, estas VLPs modificadas sirven como,
preferentemente, plataforma de vacuna, para la generación
15 de respuestas inmunes, en respuestas de anticuerpos
particulares, contra los antígenos vinculados con dichas
VLPs modificadas. La presencia de los epítomos de células
Th, en particular epítomos de células Th universales,
condujo a un mayor aumento en la respuesta inmune generada.

20 Otros aspectos y modalidades preferidas de los mismos
se describen en este documento con mayor detalle.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1 Mapa de plásmido de pET-CMVwt. Se
25 indican las posiciones relativas de todos los

genes relevantes y los sitios de enzima de restricción.

Figura 2 Análisis de SDS/PAGE de expresión y purificación de gradiente de sacarosa de la proteína de CMVwt. M - marcador de tamaño de proteína; S - proteínas solubles después de ultrasonificación; P - proteínas insolubles después de ultrasonificación; PS - proteínas solubles en comprimido de sulfato de amonio (muestra de ultracentrifugación de gradiente de sacarosa); Pp - proteínas insolubles en comprimido de sulfato de amonio; 1, 2, 3, 4, 5, 6 - fracciones de gradiente de sacarosa del fondo del tubo de gradiente de 35 ml.

Figura 3A Dispersión de luz dinámica de VLPs de CMVwt purificadas. El tamaño de las partículas fue detectado usando el Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido).

Figura 3B Análisis de microscopia electrónica de VLPs de CMVwt purificadas. Para el análisis morfológico de VLPs se utilizó el microscopio electrónico JEM-1230 (Jeol Ltd., Tokio, Japón).

Figura 4 Análisis espectrométrico de masa de VLPs derivadas de CMV purificadas. El análisis de desorción/ionización de láser asistida por

matriz (MALDI)-TOF MS se llevó a cabo en un Autoflex MS (Bruker Daltonik, Alemania). El estándar II de calibración de masa molecular (MM) proteica (22.3 - 66,5 kDa; Bruker Daltonik) fue utilizado para determinación de masas.

Figura 4A CMV silvestre ("wt"); MM teórica=24069; MM encontrada=24058.

Figura 4B CMV-Npdr; MM teórica=24161 (sin primer Met); MM encontrada=24160.

Figura 4C CMV-Ntt830; MM teórica=24483 (sin primer Met); MM encontrada=24477.

Figura 5A Dispersión de luz dinámica de VLPs de CMV-Ntt830 purificadas. El tamaño de las partículas fue detectado usando el Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido).

Figura 5B Análisis de microscopia electrónica de VLPs de CMV-Ntt830 purificadas. Para el análisis morfológico de VLPs se utilizó el microscopio electrónico JEM-1230 (Jeol Ltd., Tokio, Japón).

Figura 6A Dispersión de luz dinámica de VLPs de CMV-Npdr purificadas. El tamaño de las partículas fue detectado usando el Zetasizer

Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido).

Figura 6B Análisis de microscopia electrónica de VLPs de CMV-Npadr purificadas. Para el análisis morfológico de VLPs se utilizó el microscopio electrónico JEM-1230 (Jeol Ltd., Tokio, Japón).

5

Figura 7A La respuesta de anticuerpos fue medida después de la inmunización de VLP de CMV silvestre. Los grupos de ratones fueron inmunizados con 10 µg, 1 µg o 0.1 µg de VLP de CMV-wt en el día 0 y 7. El título específico de IgG total fue medido en el día 0 (pre-inmune), 7, 14 y 28. Ratones por grupo = 4.

10

Figura 7B La respuesta de anticuerpos fue medida después de la inmunización de VLP de CMV-Npadr. Los grupos de ratones fueron inmunizados con 10 µg, 1 µg o 0.1 µg de VLP de CMV-Npadr en el día 0 y 7. El título específico de IgG total fue medido en el día 0 (pre-inmune), 7, 14 y 28. Ratones por grupo = 4.

15

20

Figura 7C La respuesta de anticuerpos fue medida después de la inmunización de VLP de CMV-Ntt830. Los grupos de ratones fueron inmunizados con 10 µg, 1 µg o 0.1 µg de VLP de CMV-Ntt830 en el día 0 y 7. El título

25

específico de IgG total fue medido en el día 0 (pre-inmune), 7, 14 y 28. Ratones por grupo = 4.

Figura 8A La respuesta humoral contra el alérgeno Fel D1 fue detectada en ratones. El alérgeno de gato principal Fel D1 fue acoplado a CMV Npadr. Los ratones fueron inmunizados con 5 µg de Fel D1-VLP en el día 0 y 7. Se midieron los anticuerpos específicos de Fel D1 en puntos de tiempo indicado. Ratones por grupo = 5.

Figura 8B La respuesta humoral contra el alérgeno Fel D1 fue detectada en ratones. El alérgeno de gato principal Fel D1 fue acoplado a CMV Ntt830. Los ratones fueron inmunizados con 5 µg de Fel D1-VLP en el día 0 y 7. Se midieron los anticuerpos específicos de Fel D1 en puntos de tiempo indicado. Ratones por grupo = 5.

Figura 9 Se muestra la respuesta humoral contra péptidos derivados de α -sinucleína. Los ratones fueron inmunizados en el día 0 y 14 con 20 µg de péptido derivado de α -sinucleína acoplado a CMV Ntt830. Se midió el título de anticuerpo específico de péptido en los puntos de tiempo indicados. Número de ratones = 4.

Figura 8A La respuesta de anticuerpos contra la

proteína propia IL17 fue detectada en ratones. La citocina IL17 fue acoplada a CMV Ntt830. Los ratones fueron inmunizados con 20 µg de IL17-CMV Ntt830 en el día 0 y 14. Se midieron los anticuerpos específicos de IL17 en puntos de tiempo indicados. Número de ratones = 3.

Figura 11A Análisis de SDS/PAGE de expresión y purificación de la proteína F12H6GGC de *E. coli* de las células C2566, utilizando el kit PrepEase (USB). M - marcador de tamaño proteína; S - fracción de proteína soluble; P - restos celulares; F - flujo a través de la columna Ni-IDA (proteínas no unidas); W1, W2 - fracciones de lavado (2x2ml tampón de 1xLEW) W3, W4 fracciones de lavado (2x2ml 1xLEW + 10 mM de imidazol); E1, E2 - fracciones de elución (2x1.5 ml tampón E 250 mM de imidazol).

Figura 11B Análisis espectrométrico de masa de F12H6GGC purificada. La masa promedio calculada de F12H6GGC corresponde a 20089.8 Da. La masa observada de 20105.3 corresponde a F12H6GGC donde un azufre de una metionina es oxidado a un grupo sulfóxido.

Figura 11C Análisis de SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie de la purificación de

F12GGC. (A) amS - precipitado disuelto después de 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Diversas fracciones del procedimiento de la columna de DEAE y posterior purificación por MonoQ: FT - flujo a través, A4-A7 - fracciones eluidas por el gradiente en aumento de NaCl (B) Purificación final por columna de Butil HP (HIC).

5

10

Figura 12A Se muestra un intercalado de ELISA suministrado por Indoor Biotechnologies usando mAbs elevado contra el Fel D1 natural. mABs reconoce F12H6GGC y Fel D1 natural igual de bien.

Figura 13A Prueba de activación de basófilos (BAT) para Fel d1 natural.

15

Figura 13B Prueba de activación de basófilos (BAT) para F12H6GGC. F12H6GGC y Fel d1 natural inducen niveles de activación de basófilos similares en sangre de pacientes alérgicos a gatos indicados por regulación al alza de CD63 en basófilos de CCR3+.

20

Figura 14 Respuesta de anticuerpos de ratones que recibieron 10 μg de VLPs de Fel d1-CMV (Fel d1-CMV-Ntt830-VLP o Fel d1-CMV-Npadr-VLP) o VLPs de CMV (CMV-Ntt830-VLP o CMV-Npadr-VLP) mezclados simplemente con proteína de fusión de

25

Fel d1 F12H6GGC en el día 0 y el día 14. El suero se recolectó en el día 0, 14 y 21 y se analizó por ELISA para anticuerpos IgG específicos de Fel d1 natural. N=3.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen los mismos significados como comúnmente se entendería por un técnico en la materia a la que pertenece esta invención.

Partícula tipo virus (VLP por sus siglas en inglés): El término "partículas similares a virus (VLP)" en este documento, se refiere a una partícula no replicativa o no-infecciosa, preferiblemente una partícula de virus no infecciosa y no replicativa, o se refiere a una estructura no replicativa o no-infecciosas, preferiblemente una estructura no replicativa y no infecciosa que se asemeja a una partícula de virus, preferiblemente una cápside de un virus. El término "no-replicativa", en este documento, se refiere a ser incapaz de replicar el genoma compuesto por la VLP. El término "no infecciosa", en este documento, se refiere a ser incapaz de entrar en la célula huésped. La partícula tipo virus según la invención es no replicativa y no infecciosa debido a que carece de todo o parte del

25

genoma viral o función del genoma. La partícula tipo virus según la invención puede contener ácidos nucleicos de su genoma. Las partículas tipo virus producidas por vía recombinante normalmente contienen ARN derivado de célula huésped. Una modalidad típica y preferida de una partícula tipo virus según la presente invención es una cápside viral compuesta por polipéptidos de la invención. Una partícula tipo virus suele ser un conjunto macromolecular compuesto de proteína de cápside viral que normalmente se compone de 60, 120, 180, 240, 300, 360 o más de 360 subunidades de proteína por partícula tipo virus. Por lo general y, preferiblemente, las interacciones de estas subunidades conducen a la formación de cápside viral o cápside viral como la estructura con una organización repetitiva inherente. Una característica de una partícula tipo virus es su arreglo altamente ordenado y repetitivo de sus subunidades.

Partícula tipo virus de CMV: Los términos "partícula tipo virus de CMV" o VLPs de CMV se refieren a una partícula tipo virus que comprende, o que preferiblemente consiste esencialmente de, o que preferiblemente consiste de por lo menos un polipéptido de CMV. Preferiblemente, una partícula tipo virus de CMV comprende dicho polipéptido de CMV como el principal y más preferiblemente como el único componente de la proteína de la estructura de la cápside.

Por lo general y, preferiblemente, las partículas tipo virus de CMV se asemejan a la estructura de la cápside de CMV. Las partículas tipo virus de CMV son no replicativas y/o no infecciosas y carecen de por lo menos el gen o genes que codifican la maquinaria de replicación del CMV y también normalmente tienen el gen o gen que codifica la proteína o proteínas virales responsables de la unión viral a o la entrada en el anfitrión. Esta definición incluye también partículas tipo virus en las que el ya mencionado gen o genes está todavía presente pero inactivo. Los métodos preferidos para volver una partícula tipo virus de CMV no replicativa y/o no infecciosa es por inactivación física o química, tal como irradiación de UV, tratamiento con formaldehído. Preferiblemente, las VLPs de CMV carecen del gen o genes que codifican la maquinaria de replicación del CMV y también tienen el gen o gen que codifica la proteína o proteínas virales responsables de la unión viral a o la entrada en el anfitrión. Otra vez más preferiblemente, las partículas tipo virus no replicativas y/o no-infecciosas se obtienen por tecnología genética recombinante. Las partículas tipo virus producidas por vía recombinante de CMV según la invención típicamente y preferiblemente no incluyen el genoma viral. Las partículas tipo virus que comprenden más de una especie de polipéptidos, referidas a menudo como VLPs mosaico se

abarcen también por la invención. Así, en una modalidad, la partícula tipo virus según la invención comprende al menos dos especies diferentes de polipéptidos, en donde al menos una de dichas especies de polipéptidos es un polipéptido de CMV. Preferiblemente, la VLP de CMV es un ensamblaje macromolecular compuesto de proteína de cápside de CMV que comprende típicamente 180 subunidades de proteína de recubrimiento por VLP. Normalmente y, preferiblemente, la VLP de CMV en este documento, comprende, consiste esencialmente en o consiste alternativamente en, por lo menos un polipéptido de CMV que comprende o preferiblemente consiste en (i) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV; o (ii) una secuencia de aminoácidos mutados, en donde la secuencia de aminoácidos a mutar es una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, y en donde dicha secuencia de aminoácidos mutados y dicha secuencia de aminoácidos a mutar muestran una identidad de secuencia de al menos 90%, preferentemente de al menos 95%, más preferiblemente de al menos 98% y otra vez más preferentemente de al menos 99%.

Polipéptido: El término "polipéptido" como se utiliza en este documento se refiere a un polímero compuesto de monómeros de aminoácidos que están linealmente vinculados por enlaces peptídicos (también conocidos como enlaces amida). El término polipéptido se refiere a una cadena

consecutiva de aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto. Por lo tanto, los péptidos y las proteínas se incluyen en la definición de polipéptido.

Polipéptido del Virus del Mosaico del Pepino (CMV): El término "polipéptido del virus del mosaico del pepino (CMV)" en este documento se refiere a un polipéptido que comprende o preferiblemente que consiste en: (i) una secuencia de aminoácidos de una proteína de cápside del virus del mosaico del pepino (CMV), o (ii) una secuencia de aminoácidos mutados, en donde la secuencia de aminoácidos a mutar es una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, y en donde dicha secuencia de aminoácidos mutados y dicha secuencia de aminoácidos de a mutar, es decir, dicha proteína de recubrimiento de CMV, muestran una identidad de secuencia de al menos 90%, preferentemente de al menos 95%, más preferiblemente de al menos 98% y más preferentemente de al menos 99%. Normalmente y, preferiblemente, el polipéptido de CMV es capaz de formar una partícula tipo virus de CMV tras la expresión por auto-ensamblaje.

Proteína de recubrimiento (CP) del virus del mosaico del pepino (CMV): El término "proteína de recubrimiento (CP) del virus del mosaico del pepino (CMV)", en este documento, se refiere a una proteína de recubrimiento del virus mosaico del pepino que se produce

en la naturaleza. Debido a la muy amplia gama de huéspedes del virus mosaico del pepino, se conocen muchas diferentes cepas y aislados de CMV y las secuencias de las proteínas de recubrimiento de dichas cepas y aislados han sido

5 determinadas y, por lo tanto, también son conocidas para el experto en la materia. Las secuencias de dichas proteínas de recubrimiento (CPs) de CMV se describen en y se pueden recuperar de las bases de datos conocidas tales como Genbank, www.dpvweb.net, o www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/.

10 Ejemplos de CPs de CMV descritas son CAD92034.1, CDO33961.2, AHZ89404.1, CDO33963.1, ACN60036.1, CAC18660.1, CAC18661.1, CAC18658.1, CAC18657.1, CAC18659.1, AFS64321.1, AFS64320.1, ABG76792.1, CAI68015.1, AAQ22992.1, AEM36051.1, AEM36048.1, ADA77134.1, AIS22690.1, AGT15706.1, AFR44555.1,

15 AHY22574.1, ACM89097.1, AAB07137.1, AAD17927.1, AAM81371.1, AAM81365.1, AAM81374.1, AAM81372.1, AAM81368.1, ABC18318.1, AAX70966.1, AAU14864.1, AHJ11230.1, AHJ11229.1, AHJ11228.1, O40980.1, CAB43510.1, Q66143.1, CAA77065.1, CAB77390.1, CAC18666.1, NP_040777.1, P16489.1, AGV39216.1, AGW51600.1,

20 AGN56074.1, AGN56050.1, AGG16159.1, AGG16145.1, AGG16143.1, AFZ99011.1, 1407131A, CAA71834.1, CAA07411.1, CAC18665.1, Q66135.1, 1F15_A, O40983.1, Q00259.1, AER25350.1, AER25348.1, ADN84922.1, ABU95611.1, BAF93916.1, BAF93914.1, AAY46239.1, AAY46233.1, AAY46235.1, AAY46231.1, AAY46230.1,

25 AAY46237.1, BAF45130.1, ABM46611.1, ABC00925.1, AAY42625.1,

CAH25533.1, CAH25541.1, CAH25539.1, AAV63980.1, AAQ89596.1,
AAQ89571.1, AAQ89570.1, AAQ83697.1, AAQ83689.1, AAK52423.1,
CCN27449.1, CEF39516.1, CAE51926.1, CAC13146.1, BAM15840.1,
AEK33396.1, ABY21417.1, ABM89156.1, CAI84629.1, AGA20617.1,
5 AAO17725.1, CAD42338.1, ABO18585.1, CDF77337.1, CAG25710.1,
CAG25430.1, CAE30336.1, BAF45378.1, AAD17925.1, AGV39211.1,
BAA07858.1, Q66141.1, O40981.1, ACB87210.1, CAI77626.1,
CAH25521.1, ABG89138.1, AGT15712.1, AGT15703.1, AII01134.1,
AIC76579.1, AIC76576.1, AIC76574.1, AIC76573.1, AIB09173.1,
10 AIB09172.1, ADF81043.1, ACQ99349.1, ACQ99348.1, CBF03403.1,
CBF03405.1, CAX45872.1, CAX45871.1, ACH48048.1, AAG01451.1,
AAA46409.1, AAD45249.1, AAG25053.1, AAA46410.1, AAA46411.1,
AAA46412.1, ABB89052.1, AAY19285.1, AAW21981.1, AAW21983.1,
AAA74483.1, AHL30195.1, BAA95601.1, Q00261.1, CAB89799.1,
15 AGZ63887.1, BAN67666.1, AFZ62498.1, AFZ62495.1, AFZ62494.1,
AGN56098.1, AGN56028.1, AGG16155.1, AGG16151.1, ACS83814.1,
ACS83810.1, ACS83800.1, ACS83791.1, CCM80413.1, CCM80411.1,
CCM80409.1, AFX68432.1, AFX68428.1, CAI39235.1, CAJ20021.1,
CAE51924.1, AAS57946.1, Q66154.1, Q00260.1, CAA61802.1,
20 P21368.1, BAB11693.1, AFV99523.1, AFV99515.1, AER25351.1,
AFM56037.1, AFJ92022.1, AFH88687.1, AFC40207.1, BAL63166.1,
AFA53169.1, AFA53167.1, BAL61194.1, AEU12505.1, AER35119.1,
AEK86513.1, AEK69525.1, AEK69524.1, AEK33395.1, AEK33393.1,
AEG79911.1, ADZ54767.1, ADZ54111.1, ADX86746.1, ADN84923.1,
25 ACR14828.1, ACR14827.1, ABU62578.1, ACA13281.1, ABZ80826.1,

ABY47903.1, ABY21424.1, ABY21420.1, ABY21419.1, ABY21418.1,
 ABY21413.1, ABX38992.1, ABV55389.1, ABV49618.1, ABO18588.1,
 ABO18589.1, ABN72590.1, ABN72591.1, ABN12319.1, ABN12316.1,
 BAF44939.1, ABM46612.1, CAJ15158.1, ABC00922.1, ABC00921.1,
 5 ABC00928.1, ABC00923.1, ABI94145.1, ABI94151.1, ABI94129.1,
 ABI94150.1, BAF33384.1, ABI93181.1, ABE68905.1, ABC00927.1,
 AAS48545.1, AAR89470.1, AAR23529.1, AAQ82698.1, AAM95241.1,
 AAM97677.1, AAK52977.1, AAW71967.1, ABJ55780.1, CAH17693.1,
 CAH17700.1, CAH17692.1, Q66140.1, ABM63376.1, AGT15704.1,
 10 CAB41491.1, AAR89478.1, CCJ09634.1, AEK69527.1, ACS83801.1,
 AIC76582.1, AHJ58884.1, AHJ11231.1, AGJ94707.1, ACS83798.1,
 ACS83793.1, ABK81652.1, AAS57945.1, AAN04483.1, ADO66659.1,
 AAN17777.1, ADG26754.1, AFV99520.1, ABD73006.1, ACE07024.1,
 ABD64220.1, ABD72575.1, ABP87978.1, ABN13961.1, AAY85627.1,
 15 AGG16139.1, ACS83811.1, CAH17699.1, CAH17694.1, AFV69240.1,
 ACB56602.1, ADJ10637.1, ABM46614.1, AAY45749.1, AAA74484.1,
 CAH17697.1, ADA63484.1, ADA63482.1, ADA63480.1, Q83251.1,
 AIC76584.1, AIC76583.1, AAK27169.1, ABC00924.1, ACD62520.1,
 ABO18591.1, AAO62575.1, AAL48223.1, AIA99525.1, CAH17698.1,
 20 AAZ38725.1, AAF09246.2, CAH17701.1, ACB58305.1, AGG16158.1,
 CAH17695.1, AHJ58883.1, AEZ03836.1, BAB63959.1, ACD62519.1,
 BAF93912.1, AAZ78354.1, ACN38326.1, AFV99522.1, ADZ54109.1,
 CAA46151.1, AGV39213.1. Otros ejemplos de proteínas de
 recubrimiento de CMV se encuentran en las SEQ ID NOs 1-3.

25 Cabe mencionar que estas cepas y aislados tienen

secuencias muy similares de proteína de recubrimiento similares en dominios diferentes de proteínas, que incluyen el N-terminal de la proteína de recubrimiento. En particular, el 98.1% de los aislados de CMV completamente
5 secuenciados comparten más identidad de secuencia que 85% en los primeros 28 aminoácidos de su secuencia de la proteína de recubrimiento y todavía el 79.5% de aislado de CMV completamente secuenciado comparte más del 90% de identidad de secuencia dentro de los primeros 28
10 aminoácidos de su secuencia de la proteína de recubrimiento.

Por lo general y, preferiblemente, la proteína de recubrimiento de CMV usada para la invención es capaz de presente formar una partícula tipo virus de CMV tras la
15 expresión por auto-ensamblaje. Preferiblemente, la proteína de recubrimiento de CMV usada para la invención es capaz de presente formar una partícula tipo virus de CMV tras la expresión por auto-ensamblaje en *E.coli*.

La SEQ ID NO. 1 corresponde a la secuencia de aminoácidos de la CP aislada y clonada de hojas de lilas infectadas de CMV recolectadas en un jardín privado en Riga, Latvia. Por lo tanto, preferentemente, el término
20 "proteína de recubrimiento del virus del mosaico del pepino (CMV)", en este documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, en
25

donde dicha secuencia de aminoácidos comprende, o preferiblemente consiste en, SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 75%, preferentemente de al menos 80%, más preferiblemente de al menos el 85%, otra vez más preferentemente de al menos 90%, otra vez más preferentemente de al menos 95%, aún más preferiblemente de al menos 98% y todavía otra vez más, más preferentemente de al menos 99% de SEQ ID NO: 1.

En otra modalidad muy preferida, dicha proteína de recubrimiento de CMV es una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende SEQ ID NO: 21, siendo los aminoácidos consecutivos 2-27 de SEQ ID NO: 1, o una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV que comprende una región de secuencia de aminoácidos, en donde dicha región de secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de al menos 75%, preferentemente de al menos 80%, más preferiblemente de al menos el 85%, otra vez más preferentemente de al menos 90%, otra vez más preferentemente de al menos 95%, aún más preferiblemente de al menos 98% y todavía otra vez más, más preferentemente de al menos 99% con la SEQ ID NO: 21. Esto es particularmente preferido ya que el epítipo de células Th sustituye preferentemente una región N-terminal del polipéptido de CMV de la invención. Una alta identidad

de secuencia en el N-terminal de la CPs del CMV con la utilizada preferentemente en los ejemplos, ahora asegura que un ensamblaje correcto tras la expresión de las CPs puede tener lugar además de la sustitución de dicha región N-terminal por el epítipo de célula Th por lo general causantes de agregación.

Otra vez en una modalidad muy preferida, dicha proteína de recubrimiento de CMV es (a) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende, o preferiblemente consiste en, SEQ ID NO: 1 o (b) una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 75%, preferentemente de al menos 80%, más preferiblemente de al menos el 85%, otra vez más preferentemente de al menos 90%, otra vez más preferentemente de al menos 95%, aún más preferiblemente de al menos 98% y todavía otra vez más, más preferentemente de al menos 99% de SEQ ID NO: 1; y en donde dicha secuencia de aminoácidos como se define en (a) o (b) comprende SEQ ID NO:21 siendo los aminoácidos consecutivos 2-27 de SEQ ID NO: 1; o en donde dicha secuencia de aminoácidos como se define en (a) o (b) comprende una región de secuencia de aminoácidos, en donde dicha región de secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de al menos 75%, preferentemente de al menos 80%, más preferiblemente

de al menos el 85%, otra vez más preferentemente de al menos 90%, otra vez más preferentemente de al menos 95%, aún más preferiblemente de al menos 98% y todavía otra vez más, más preferentemente de al menos 99% con SEQ ID NO: 21.

5 Partículas tipo virus (VLP) modificadas del virus del mosaico del pepino (CMV): El término "partículas tipo virus (VLP) modificadas del virus del mosaico del pepino (CMV)" como se utiliza en este documento, se refiere a una VLP de CMV que es una modificada ya que comprende, o
10 preferiblemente consiste esencialmente de, o preferiblement consiste de pro lo menos un polipéptido de CMV modificado, en donde dicho polipéptido de CMV modificado comprende, o preferiblemente consiste de, un polipéptido de CMV y un epítopo de célula T ayudante. Por lo general y,
15 preferiblemente, dicho epítopo de célula T ayudante (i) se fusiona con el N-terminal de dcio polipéptido de CMV, (ii) se fusiona con el C-terminal de dicho polipéptido de CMV, (iii) sustituye una región de aminoácidos consecutivos de dicho polipéptido de CMV, en donde la identidad de
20 secuencia entre dicha región sustituida de aminoácidos consecutivos de dicho polipéptido de CMV y el epítopo de célula T ayudante es por lo menos 15%, preferiblemente por lomenos 20%, o (iv) sustituye una región N-terminal de dicho polipéptido de CMV, y en donde dicha región de N-
25 terminal sustituida de dicho polipéptido de CMV consiste de

5 a 15 aminoácidos consecutivos. Preferiblemente, dicho epítipo de célula T ayudante sustituye una región N-terminal de dicho polipéptido de CMV, y en donde dicha región N-terminal sustituida de dicho polipéptido de CMV
5 consiste de 5 a 15 aminoácidos consecutivos, preferiblemente de 9 a 14 aminoácidos consecutivos, más preferiblemente de 11 a 13 aminoácidos consecutivos, y más preferiblemente de 11, 12 o 13 aminoácidos consecutivos. Preferentemente dicha VLP modificado de CMV de la presente
10 invención es que una VLP modificada recombinante de CMV.

Polipéptido modificado de CMV: El término "polipéptido modificado de CMV" en este documento se refiere a un polipéptido modificado de CMV tal como se define aquí, dicho polipéptido modificado de CMV comprende,
15 o preferiblemente consiste en un polipéptido de CMV y un epítipo de célula T ayudante. Normalmente, el polipéptido modificado de CMV es capaz de formar una partícula tipo virus de CMV tras la expresión por auto-ensamblaje. Preferiblemente, el polipéptido modificado de CMV es un
20 polipéptido modificado de CMV y es capaz de formar una partícula tipo virus de CMV tras la expresión por auto-ensamblaje en *E.coli*.

Región N-terminal del polipéptido de CMV: El término "región N-terminal del polipéptido de CMV" en este
25 documento, se refiere a la N-terminal de dicho polipéptido

de CMV y en particular a la N-terminal de una proteína de recubrimiento de CMV, o a la región de N-terminal de dicho polipéptido de CMV o proteína de recubrimiento de CMV, pero empezando con el segundo aminoácido de la N-terminal de dicho polipéptido de CMV o dicha proteína de recubrimiento de CMV si dicho polipéptido de CMV o dicha proteína de recubrimiento comprende un residuo de metionina de N-terminal. Preferentemente, en el caso en que dicho polipéptido de CMV o dicha proteína de recubrimiento comprenda un residuo de metionina de N-terminal, desde un punto de vista práctico, la metionina que codifica el codón de inicio usualmente será eliminada y añadida al término N del epítipo de célula Th. Más preferiblemente, uno, dos o tres aminoácidos adicionales, preferiblemente un aminoácido, puede opcionalmente insertarse entre la metionina de inicio y el epítipo de célula Th para fines de clonación. El término "región N-terminal de la secuencia de aminoácidos mutados de un polipéptido de CMV o una proteína de recubrimiento de CMV" como se utiliza en este documento, se refiere ya sea al término N de dicha secuencia de aminoácidos mutados de dicho polipéptido de CMV o dicha proteína de recubrimiento de CMV, o a la región del término N de dicha secuencia de aminoácidos mutados de dicho polipéptido de CMV o dicha proteína de recubrimiento de CMV pero empezando con el segundo aminoácido del término N de

dicha secuencia de aminoácidos mutados de dicho polipéptido de CMV o dicha proteína de recubrimiento de CMV si dicha secuencia de aminoácidos mutados comprende un residuo de metionina de N-terminal. Preferentemente, en el caso en que dicho polipéptido de CMV o dicha proteína de recubrimiento comprenda un residuo de metionina de N-terminal, desde un punto de vista práctico, la metionina que codifica el codón de inicio usualmente será eliminada y añadida al término N del epítipo de célula Th. Más preferiblemente, uno, dos o tres aminoácidos adicionales, preferiblemente un aminoácido, puede opcionalmente insertarse entre la metionina de inicio y el epítipo de célula Th para fines de clonación.

Polipéptido recombinante: En el contexto de la invención "polipéptido recombinante" se refiere a un polipéptido que se obtiene por un proceso que comprende al menos un paso de tecnología de ADN recombinante. Por lo general y, preferiblemente, un polipéptido recombinante es producido en un sistema de expresión procariota. Es evidente para el artesano que que los polipéptidos producidos por vía recombinante que se expresan en un sistema de expresión procariota, tal como *E. coli* pueden comprender un residuo de metionina de N-terminal. El residuo de metionina de N-terminal es típicamente escindido del polipéptido recombinante en el huésped de expresión

durante la maduración del polipéptido recombinante. Sin embargo, la escisión de la metionina de N-terminal puede ser incompleta. Por lo tanto, una preparación de un polipéptido recombinante puede comprender una mezcla de polipéptidos idénticos con y sin un residuo de metionina de N-terminal. Por lo general y, preferiblemente, una preparación de un polipéptido recombinante comprende menos del 10%, más preferiblemente menos del 5% y aún más preferiblemente menos del 1% de polipéptido recombinante con un residuo de metionina de N-terminal.

Polipéptido recombinante de CMV: El término "polipéptido recombinante de CMV" se refiere a un polipéptido de CMV como se define anteriormente, el cual se obtiene por un proceso que comprende al menos un paso de tecnología de ADN recombinante. Por lo general y, preferiblemente, una preparación de un polipéptido recombinante de CMV comprende menos del 10%, más preferiblemente menos del 5% y aún más preferiblemente menos del 1% de polipéptido recombinante de CMV con un residuo de metionina de N-terminal. En consecuencia, una partícula tipo virus recombinante de la invención puede comprender polipéptidos recombinantes idénticos con y sin un residuo de metionina de N-terminal.

Polipéptido recombinante modificado de CMV: El término "polipéptido recombinante modificado de CMV" se

refiere a un polipéptido modificado de CMV como se define anteriormente, el cual se obtiene por un proceso que comprende al menos un paso de tecnología de ADN recombinante. Por lo general y, preferiblemente, una
5 preparación de un polipéptido recombinante modificado de CMV comprende menos del 10%, más preferiblemente menos del 5% y aún más preferiblemente menos del 1% de polipéptido recombinante modificado de CMV con un residuo de metionina de N-terminal. En consecuencia, una partícula tipo virus
10 recombinante de la invención puede comprender polipéptidos recombinantes idénticos con y sin un residuo de metionina de N-terminal.

Partícula tipo virus recombinante: En el contexto de la invención "partícula tipo virus recombinante" se refiere
15 a una partícula tipo virus (VLP) que se obtiene por un proceso que comprende al menos un paso de tecnología de ADN recombinante. Por lo general y, preferiblemente, una partícula tipo virus recombinante comprende al menos un polipéptido recombinante, preferiblemente un polipéptido
20 recombinante de CMV o polipéptido recombinante modificado de CMV. Más preferentemente, una partícula tipo virus recombinante se compone de o consiste en por polipéptidos recombinantes de CMV o polipéptidos recombinantes modificados de CMV. Como consecuencia, si en el contexto de
25 la presente invención la definición de las VLPs

recombinantes inventivas se efectúa con referencia a secuencias de aminoácidos específicas que comprenden un residuo de metionina de N-terminal, el alcance de estas VLPs recombinantes inventivas abarca las VLPs formadas por
5 dichas secuencias de aminoácidos específicas sin dicho residuo de metionina de N-terminal, aunque típicamente en una cantidad menor como se indica en este documento, las VLPs formadas por dichas secuencias de aminoácidos específicas con dicha metionina de N-terminal. Además,
10 está dentro del alcance de la invención presente que si la definición de las VLPs recombinantes inventivas es efectuada con referencia a secuencias de aminoácidos específicas que comprenden un residuo de metionina de N-terminal las VLPs se engloban que comprenden ambas
15 secuencias de aminoácidos que comprenden aún dicho residuo de metionina de N-terminal y secuencias de aminoácidos que carecen del residuo de metionina de N-terminal.

Secuencia de aminoácidos mutados: El término "secuencia de aminoácidos mutados" se refiere a una
20 secuencia de aminoácidos que se obtiene mediante la introducción de un conjunto definido de mutaciones en una secuencia de aminoácidos a ser mutada. En el contexto de la invención, dicha secuencia a ser mutada por lo general y, preferiblemente, es una secuencia de aminoácidos de una
25 proteína de recubrimiento de CMV. Así, una secuencia de

aminoácidos mutados difiere de una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV en al menos un residuo de aminoácidos, en donde dicha secuencia de aminoácidos mutados y dicha secuencia de aminoácidos a mutar muestran una identidad de secuencia de al menos 90%. Por lo general y preferiblemente dicha secuencia de aminoácidos mutados y dicha secuencia de aminoácidos a mutar muestran una identidad de secuencia de menos del 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Preferiblemente, dicha secuencia de aminoácidos mutados y dicha secuencia a mutar se diferencian en máximo 11, 10, 9, 8, 7, 6, 4, 3, 2 o 1 residuos de aminoácidos, en donde además preferiblemente dicha diferencia se selecciona de la inserción, eliminación e intercambio de aminoácidos. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos mutados difiere de una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV en por lo menos un aminoácido, en donde preferentemente dicha diferencia es un intercambio de aminoácidos.

Posición correspondiente a los residuos...: La posición en una secuencia de aminoácidos, que es correspondiente a residuos dados de otra secuencia de aminoácidos, puede identificarse por alineamiento de secuencias, por lo general y, preferiblemente, mediante el algoritmo BLASTP, más preferentemente utilizando la

configuración estándar. Los ajustes estándar típicos y preferidos son: umbral esperado: 10; tamaño de palabra: 3; coindicencias máximas en un rango de consulta: 0; matriz: BLOSUM62; costos de brecha: existencia 11, extensión 1; ajustes de composición: ajuste de matriz de puntuación de composición condicional.

Identidad de secuencia: La identidad de secuencia de dos secuencias de aminoácidos dadas se determina con base en la alineación de ambas secuencias. Los algoritmos para la determinación de la identidad de la secuencia están disponibles para el artesano. Preferiblemente, la identidad de secuencia de dos secuencias de aminoácidos se determina mediante programas de homología de cómputo disponibles al público como el programa "BLAST" (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) o el "CLUSTALW" (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>), y en el presente preferiblemente por el programa "BLAST" proporcionado en la página de inicio de NCBI en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, utilizando los ajustes de defecto proporcionados en el mismo. Los ajustes estándar típicos y preferidos son: umbral esperado: 10; tamaño de palabra: 3; coindicencias máximas en un rango de consulta: 0; matriz: BLOSUM62; costos de brecha: existencia 11, extensión 1; ajustes de composición: ajuste de matriz de puntuación de composición condicional.

Intercambio de aminoácidos: El término intercambio de aminoácidos se refiere al intercambio de un residuo de un aminoácido determinado en una secuencia de aminoácidos por cualquier residuo de aminoácidos con una estructura química diferente, preferiblemente por otro residuo de aminoácido proteinogénico. Así, en contraste con la inserción o eliminación de un aminoácido, el intercambio de aminoácidos no cambia el número total de aminoácidos de dicha secuencia de aminoácidos. Muy preferido en el contexto de la invención es el intercambio de un residuo de aminoácidos de dicha secuencia de aminoácidos para ser mutado por un residuo de lisina o por un residuo de cisteína.

Epítipo: El término epítipo se refiere a las porciones continuas o discontinuas de un antígeno, preferiblemente un polipéptido, en donde dichas porciones pueden estar específicamente limitadas por un anticuerpo o un receptor de células T en el contexto de una molécula de MHC. Con respecto a los anticuerpos, la unión específica excluye la unión no específica pero no necesariamente excluye la reactividad cruzada. Un epítipo comprende típicamente 5-20 aminoácidos en una conformación espacial que es única en el sitio antigénico.

Epítipo de célula T ayudante (Th): El término "epítipo de célula T ayudante (Th)" en este documento se

refiere a un método que es capaz del reconocimiento por parte de una célula Th.

Epítipo de célula Th universal: El término "epítipo de célula Th universal" en este documento se refiere a un epítipo de célula Th que es capaz de unirse a por lo menos una, preferiblemente más de una molécula MHC clase II. La forma más sencilla para determinar si una secuencia de péptidos es un epítipo de célula Th universal es medir la capacidad del péptido para unirse a moléculas MHC clase II. Esto se puede medir por la capacidad del péptido para competir con la unión de un péptido conocido de epítipo de célula Th a la molécula de MHC clase II. Una selección representativa de las moléculas HLA-DR se describe en por ejemplo Alexander J, et al., *Immunity* (1994) 1:751-761. Las afinidades de los epítipos de células Th a las moléculas de MHC clase II deben ser de mínimo 10^{-5} M. Una alternativa, más tediosa pero también más relevante para determinar la "universalidad" de un epítipo de célula Th es la demostración de que una fracción más grande de personas (>30%) genera una respuesta mensurable de células T tras la inmunización y se potencia un mes más tarde con una proteína que contiene el epítipo de célula Th formulado en IFA. Una colección representativa de las de moléculas MHC clase II presentes en individuos diferentes se da en Panina-Bordignon P, et al., *Eur J Immunol* (1989) 19:2237-

2242. Como consecuencia, el término "epítipo de célula Th universal" según lo utilizado en el presente preferiblemente se refiere a un epítipo de célula Th que genera una respuesta de la célula T mensurable tras la inmunización y potencia (un mes más tarde con una proteína que contiene el epítipo de célula Th formulado en IFA) en más del 30% de un grupo seleccionado de personas como se describe en Panina-Bordignon P, et al., *Eur J Immunol* (1989) 19:2237-2242. Por otra parte y otra vez más, el término "epítipo de célula Th universal" según lo utilizado en el presente preferiblemente se refiere a un epítipo de célula Th que es capaz de unirse a por lo menos uno, preferiblemente por lo menos dos, aún más preferiblemente al menos tres DR alelos seleccionados de DR1, DR2w2b, DR3, DR4w4, DR4w14, DR5, DR7, DR52a, DRw53, DR2w2a; y seleccionados preferiblemente de DR1, DR2w2b, DR4w4, DR4w14, DR5, DR7, DRw53, DR2w2a, con una afinidad de por lo menos 500nM (como se describe en Alexander J, et al., *Immunity* (1994) 1:751-761 y las referencias aquí citadas); un ensayo de unión preferido para evaluar dichas afinidades es el descrito por Sette A, et al., *J Immunol* (1989) 142:35-40. De una manera aún más preferible, el término "epítipo de célula Th universal" en este documento se refiere a un epítipo de célula Th que es capaz de unirse a por lo menos uno, preferiblemente por lo menos dos y aún

más preferiblemente por lo menos tres DR alelos seleccionados de DR1, DR2w2b, DR4w4, DR4w14, DR5, DR7, DRw53, DR2w2a, con una afinidad de lo menos 500nM (como se describe en Alexander J et al., *Immunity* (1994) 1:751-761 y referencias citadas en este documento); un ensayo de unión preferido para evaluar dichas afinidades es descrito por Sette A, et al., *J Immunol* (1989) 142:35-40.

Los epítomos de células Th universales se describen, y son conocidos por un experto en la materia, tales como por Alexander J, et al., *Immunity* (1994) 1:751-761, Panina-Bordignon P, et al., *Eur J Immunol* (1989) 19:2237-2242, Calvo-Calle JM, et al., *J Immunol* (1997) 159:1362-1373, y Valmori D, et al., *J Immunol* (1992) 149:717-721.

En una modalidad preferida de la presente invención, el epítomo de células Th se selecciona de HA 307-319 (SEQ ID NO:26), HBVnc 50-69 (SEQ ID NO:27), TT 830-843 (SEQ ID NO:4), CS 378-398 (SEQ ID NO:28), MT 17-31 (SEQ ID NO:29), TT 947-967 (SEQ ID NO:30) y PADRE (SEQ ID NO:5). En otra modalidad preferida de la presente invención, el epítomo de célula Th universal se selecciona de HA 307-319 (SEQ ID NO:26), HBVnc 50-69 (SEQ ID NO:27), TT 830-843 (SEQ ID NO:4), CS 378-398 (SEQ ID NO:28), MT 17-31 (SEQ ID NO:29), TT 947-967 (SEQ ID NO:30) y PADRE (SEQ ID NO:5). En una modalidad muy preferida de la presente invención, el epítomo de célula Th es TT 830-843 (SEQ ID NO:4) o PADRE

(SEQ ID NO:5). En otra modalidad muy preferida de la presente invención, el epítopo de célula Th es TT 830-843 (SEQ ID NO:4) o PADRE (SEQ ID NO:5). Por lo tanto, en una modalidad muy preferida, dicho epítopo de célula Th es TT 830-843 (SEQ ID NO: 4). En otra modalidad muy preferida de la presente invención, dicho epítopo de célula Th es o PADRE (SEQ ID NO:5). En otra modalidad muy preferida, dicho epítopo de célula Th universal es TT 830-843 (SEQ ID NO: 4). En otra modalidad muy preferida de la presente invención, dicho epítopo de célula Th universal es o PADRE (SEQ ID NO:5). Los epítopos de SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5 son conocidos e incluso se han descrito aplicaciones de los mismos (Alexander J, et al., *Immunity* (1994) 1:751-761; Panina-Bordignon P, et al., *Eur J Immunol* (1989) 19:2237-2242; Valmori D, et al., *J Immunol* (1992) 149:717-721; Lanzavecchia A, et al. *Eur J Immunol* (1983) 13:733-738; Jemon K, et al., *PLoS ONE* (2013) 8(6): e66866; Jagu S, et al., *PLoS ONE* (2012) 8(1): e55538.

Eficacia de acoplamiento: La eficacia de acoplamiento de una partícula tipo virus con un antígeno específico está determinada por SDS-PAGE de las reacciones de acoplamiento. La intensidad de bandas teñidas con azul de Coomassie correspondientes a los componentes de la reacción de acoplamiento es determinada por densitometría y permite calcular la eficacia de acoplamiento. La eficacia

de acoplamiento se define como la relación de polipéptido de VLP acoplado a dicho antígeno a la cantidad total de polipéptido de VLP.

Adyuvante: El término "adyuvante" como se utiliza aquí se refiere a estimuladores inespecíficos de la respuesta inmune o sustancias que permiten la generación de un depósito en el anfitrión que cuando se combina con la vacuna y la composición farmacéutica, respectivamente, de la presente invención puede proporcionar una respuesta inmune incluso mayor. Los adyuvantes preferidos son adyuvante de Freund completo e incompleto, adyuvante que contiene aluminio, preferiblemente hidróxido de aluminio y muramildipéptido modificado. Adyuvantes más preferidos son geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias de superficie activa tales como liso lecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de keyhole limpet, dinitrofenol y adyuvantes humanos tales como BCG (*bacille Calmette Guérin*) y *Corynebacterium parvum*. Dichos adyuvantes también son bien conocidos en la materia. Otros adyuvantes que pueden administrarse con las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, inmunomodulador lipídico de monofosforilo, AdjuVax 100a, QS-21, QS-18, CRL1005, sales de aluminio (Alum), MF-59, OM- 174, OM- 197, OM-294, y tecnología de adyuvante virosomal. Los adyuvantes pueden

comprender también mezclas de estas sustancias. Las partículas tipo virus han sido generalmente descritas como un adyuvante. Sin embargo, el término "adyuvante", como se utiliza en el contexto de esta solicitud, se refiere a un adyuvante que no es la partícula tipo virus inventiva. Más bien, "adyuvante" se refiere a un componente adicional, distinto de la composiciones, vacunas o composiciones farmacéuticas inventivas.

Antígeno: Como se utiliza en este documento, el término "antígeno" se refiere a una molécula capaz de ser unida por un anticuerpo o un receptor de célula T (TCR) si se presenta por moléculas MHC. El término "antígeno", en este documento, también se refiere a epítomos de células T. Un antígeno además es capaz de ser reconocido por el sistema inmune y/o ser capaz de inducir una respuesta inmune humoral y/o inmunorespuesta celular que conduce a la activación de los linfocitos B y/o T. Esto puede, sin embargo, requerir que, al menos en ciertos casos, el antígeno contenga o esté vinculado a un epítomo de célula Th y se da en adyuvante. Un antígeno puede tener uno o más epítomos (epítomos B y T). La reacción específica mencionada pretende indicar que el antígeno va a reaccionar preferentemente, típicamente de una manera altamente selectiva, con su correspondiente anticuerpo o TCR y no con la multitud de otros anticuerpos o TCRs que pueden ser

evocados por otros antígenos. Los antígenos en este documento también pueden ser mezclas de varios antígenos individuales. El polipéptido de la invención que está formando las partículas tipo virus inventivas, puede comprender el antígeno. En particular, el polipéptido de la invención puede ser un producto de fusión que comprende el antígeno. Sin embargo, el término antígeno no abarca dicha secuencia de aminoácidos mutados que está comprendida por dicho polipéptido. Por lo general y, preferiblemente, el término "antígeno" en este documento no abarca la partícula tipo virus según la invención. Normalmente y, preferiblemente, el término "antígeno" más bien se refiere a un componente adicional de las composiciones, vacunas y composiciones farmacéuticas de la invención que tienen propiedades antigénicas, en donde el antígeno puede ser asociado, atado, mezclado con o vinculado a las partículas tipo virus por todos los medios descritos.

Asociado: Los términos "asociado" o "asociación" en este documento se refieren a todas las formas posibles, preferiblemente interacciones químicas, por las que dos moléculas se unen entre sí. Las interacciones químicas incluyen las interacciones covalentes y no covalentes. Ejemplos típicos de interacciones no-covalentes son interacciones iónicas, interacciones hidrofóbicas o enlaces de hidrógeno, mientras que interacciones covalentes se

basan, a modo de ejemplo, en enlaces covalentes como éster, éter, fosfoéster, enlaces de carbono-fósforo, enlaces de carbono-sulfuros tales como tioéter, o enlaces de imida.

Sitio de Unión, Primer: Como se utiliza en este documento, la frase "primer sitio de unión" se refiere a un elemento que ocurre naturalmente con las partículas tipo virus o que se añade artificialmente a las partículas tipo virus, y ql que puede estar vinculado el segundo sitio de unión. El primer sitio de unión es preferentemente una proteína, un polipéptido, un aminoácido, un péptido, un azúcar, un polinucleótido, un polímero natural o sintético, un metabolito secundario o compuesto (biotina, fluoresceína, retinol, digoxigenina, iones metálicos, fenilmetilsulfonilfluoruro) o un grupo químicamente reactivo tal como un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo sulfidrilo, un grupo hidroxilo, un grupo guanidinilo, un grupo histidinilo o una combinación de los mismos. Una modalidad preferida de un grupo químicamente reactivo, siendo el primer sitio de unión es el grupo amino de un residuo de aminoácido, preferiblemente de un residuo de lisina. El primer sitio de unión está por lo general situado en la superficie y preferentemente en la superficie externa de la VLP. Varios primeros sitios de unión están presentes en la superficie, preferentemente en la superficie externa de la VLP, típicamente en una

configuración repetitiva. En una modalidad preferida, el primer sitio de unión se asocia con la VLP, a través de al menos un enlace covalente, preferentemente a través de al menos un enlace peptídico. En una modalidad más preferida el primer sitio de unión es de ocurrencia natural con la VLP. Alternativamente, en una modalidad preferida, el primer sitio de unión se añade artificialmente a la VLP. En una modalidad muy preferida, dicho primer sitio de unión es el grupo amino de un residuo de lisina de la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido de VLP.

Sitio de Unión, Segundo: Como se utiliza en este documento, la frase "segundo sitio de unión" se refiere a un elemento que ocurre naturalmente con o que se añade artificialmente al antígeno y al que puede estar vinculado el primer sitio de unión. El segundo sitio de unión del antígeno es preferentemente una proteína, un polipéptido, un aminoácido, un péptido, un azúcar, un polinucleótido, un polímero natural o sintético, un metabolito secundario o compuesto (biotina, fluoresceína, retinol, digoxigenina, iones metálicos, fenilmetilsulfonilfluoruro) o un grupo químicamente reactivo tal como un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo sulfidrilo, un grupo hidroxilo, un grupo guanidinilo, un grupo histidinilo o una combinación de los mismos. Una modalidad preferida de un grupo químicamente reactivo, siendo el segundo sitio de unión es

un grupo sulfhidrilo, preferiblemente el grupo sulfhidrilo del aminoácido cisteína más preferiblemente el grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína. El término "antígeno con al menos un segundo sitio de unión" se refiere, por lo tanto, a un constructo que comprende el antígeno y por lo menos un segundo sitio de unión. Sin embargo, en particular para un segundo sitio de unión, que no ocurre naturalmente en el antígeno, dicho constructo típicamente y preferiblemente además comprende un "vinculador". En otra modalidad preferida, el segundo sitio de unión se asocia con el antígeno a través de al menos un enlace covalente, preferentemente a través de al menos un enlace peptídico. En una modalidad más, el segundo sitio de unión es de ocurrencia natural dentro del antígeno. En otra modalidad más preferida, el segundo sitio de unión se añade artificialmente al antígeno a través de un vinculador, en donde dicho vinculador comprende, o alternativamente consiste de, una cisteína. Preferiblemente, el vinculador se fusiona al antígeno por un enlace peptídico.

Vinculado: Los términos "vinculado" o "vínculo" en este documento, se refieren a todas las formas posibles, preferiblemente interacciones químicas, por las que por lo menos un primer sitio de unión y el por lo menos un segundo sitio de unión se unen entre sí. Las interacciones químicas incluyen las interacciones covalentes y no covalentes.

Ejemplos típicos de interacciones no-covalentes son interacciones iónicas, interacciones hidrofóbicas o enlaces de hidrógeno, mientras que interacciones covalentes se basan, a modo de ejemplo, en enlaces covalentes como éster, éter, fosfoéster, enlaces de carbono-fósforo, enlaces de carbono-sulfuros tales como tioéter, o enlaces de imida. En ciertas modalidades preferidas, el primer sitio de unión y el segundo sitio de unión están vinculados a través de por lo menos un enlace covalente, preferiblemente a través de un enlace no peptídico, e incluso más preferiblemente a través de enlace(s) exclusivamente no peptídicos. El término "vinculado" en este documento, sin embargo, no se referirá exclusivamente a un vínculo directo del por lo menos un primer sitio de unión y el por lo menos un segundo sitio de unión sino también, alternativamente y preferiblemente, un vínculo indirecto del por lo menos un primer sitio de unión y el por lo menos un segundo sitio de unión a través de molécula(s) intermedia(s), y en este documento típicamente y preferiblemente usando por lo menos uno, preferiblemente un, reticulador heterobifuncional. En otras modalidades preferidas, el primer sitio de unión y el segundo sitio de unión están vinculados a través de por lo menos un enlace covalente, preferiblemente a través de un enlace peptídico, e incluso más preferiblemente a través de enlace(s) exclusivamente peptídicos.

Vinculador: Un "vinculador", como se utiliza en este documento, asocia el segundo sitio de unión con el antígeno o ya comprende, esencialmente consiste en o consiste en el segundo sitio de unión. Preferiblemente, un "vinculador",
5 en este documento, ya comprende el segundo sitio de unión, por lo general y preferentemente - aunque no necesariamente - como un residuo de aminoácido, preferiblemente como un residuo de cisteína. Los vinculadores preferidos son enlazadores de aminoácido, es decir, vinculadores que
10 contienen por lo menos un residuo de aminoácidos. El término vinculador de aminoácido no implica que tal vinculador consista exclusivamente en residuos de aminoácidos. Sin embargo, un vinculador que consiste exclusivamente de residuos de aminoácidos es una modalidad
15 preferida de la invención. Los residuos de aminoácido del vinculador, preferiblemente, están compuestos de aminoácidos de origen natural o aminoácidos artificiales conocidos en la materia, todo L o todo D o mezclas de los mismos. Las modalidades más preferidas de un vinculador de
20 acuerdo con esta invención son las moléculas que componen un grupo sulfihidrilo o un residuo de cisteína y estas moléculas están, por lo tanto, también englobadas dentro de esta invención. Otros vinculadores útiles para la presente invención son moléculas que comprenden una fracción de C1-
25 C6 alquilo-, un cicloalquilo tal como un ciclopentilo o

ciclohexilo, un cicloalquenilo, fracción de arilo o heteroarilo. Por otra parte, los vinculadores que comprenden preferiblemente una fracción de C1-C6 alquilo, cicloalquilo-(C5,C6), arilo o heteroarilo o aminoácido(s) adicional(es) se pueden usar también como vinculadores para la presente invención y deberán estar comprendidos dentro del alcance de la invención. La asociación del vinculador con el antígeno es preferentemente por medio de al menos un enlace covalente, más preferentemente a través de al menos un enlace peptídico.

Matriz antigénica ordenada y repetitiva: Como se utiliza en este documento, el término "matriz antigénica ordenada y repetitiva" se refiere a un patrón repetitivo de antígeno que normalmente y de preferencia se caracteriza por un alto orden de uniformidad en el arreglo espacial de los antígenos con respecto a la VLP. En una modalidad de la invención, el patrón de repetición puede ser un patrón geométrico. Ciertas modalidades de la invención, tales como antígenos acoplados a la VLP inventiva, son ejemplos típicos y preferidos de las matrices antigénicas ordenadas y repetitivas adecuadas que, además, poseen órdenes paracristalinos estrictamente repetitivos, preferiblemente con espacio de 1 a 30 nanómetros, preferiblemente de 2 a 15 nanómetros, incluso más preferiblemente de 2 a 10 nanómetros, incluso nuevamente más preferiblemente de 2 a 8

nanómetros, y más preferiblemente de 1.6 a 7 nanómetros.

Proteína Fel d1: El término "Proteína Fel d1", en este documento, se refiere a una proteína que comprende o alternativamente consiste de la cadena 1 de Fel d1 y la
5 cadena 2 de Fel d1. Preferiblemente, la cadena 1 de Fel d1 y la cadena 2 de Fel d1 están vinculadas covalentemente. En una modalidad preferida, la cadena 1 de Fel d1 y la cadena 2 de Fel d1 están vinculadas a través de por lo menos un enlace disulfuro. En otra modalidad preferido, la cadena 1
10 y cadena 2 se fusionan directamente o a través de un espaciador, en el cual caso dicha proteína de Fel d1 comprende más o alternativamente consiste en un separador. Preferentemente la proteína de Fel d1 como se define en este documento, consiste en máximo 300, aún más
15 preferiblemente máximo 200 aminoácidos en total. Por lo general y, preferiblemente, la proteína de Fel d1, según la invención, es capaz de inducir *in vivo* la producción de anticuerpos específicamente enlazantes a la Fel d1 natural o la Fel d1 recombinante como se produce según el EJEMPLO 8
20 de la presente invención.

Cadena 1 de Fel d1: El término "cadena 1 de Fel d1", en este documento, se refiere a un polipéptido que comprende o alternativamente que consiste en una secuencia de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 37 o una secuencia
25 homóloga de la misma. El término "secuencia homóloga de SEQ

ID NO: 37", en este documento, se refiere a un polipéptido que tiene una identidad a SEQ ID NO: 37 que es superior al 80%, más preferiblemente mayor del 90% y aún más preferiblemente más del 95%. El término "cadena 1 de Fel d1", en este documento, también debe referirse a un polipéptido que comprende al menos una modificación post-traducciona, incluyendo pero no limitado a por lo menos una glicosilación, de la cadena 1 de Fel d1, tal como se define en el presente. Preferentemente la cadena 1 de Fel d1, tal como se define en este documento, consiste en máximo 130, aún más preferiblemente máximo 100 aminoácidos en total.

Cadena 2 de Fel d1: El término "cadena 2 de Fel d1", en este documento, se refiere a un polipéptido que comprende o alternativamente que consiste en una secuencia de aminoácidos a partir de SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39 o SEQ ID NO:40, o una secuencia homóloga de las mismas. El término "secuencia homóloga de SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39 o SEQ ID NO:40", en este documento, se refiere a un polipéptido que tiene una identidad a SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39 o SEQ ID NO:40 que es superior al 80%, más preferiblemente mayor del 90% y aún más preferiblemente más del 95%. El término "cadena 2 de Fel d1", en este documento, también debe referirse a un polipéptido que comprende al menos una modificación post-TRADUCCIONAL,

incluyendo pero no limitado a por lo menos una glicosilación, de cadena 2 de Fel d1, tal como se define aquí preferentemente la cadena 2 de Fel d1, tal como se define en este documento, consiste en máximo 150, aún más
5 preferiblemente máximo 130 , aún más preferiblemente máximo 100 aminoácidos en total.

Sustancia inmunoestimulante: Como se utiliza en este documento, el término "sustancia inmunoestimulante" se refiere a una sustancia capaz de inducir o mejorar la
10 respuesta inmune. Las sustancias inmunoestimulantes, como se describe en este documento, incluyen, pero no se limitan a, sustancias activadoras del receptor tipo Toll y sustancias que inducen la secreción de citocinas. Las sustancias activadoras del receptor tipo Toll incluyen,
15 pero no están limitadas a, ácidos nucleicos inmunoestimulantes, peptidoglicanos, lipopolisacáridos, ácidos lipoteicónicos, compuestos de imidazoquinolina, flagelinas, lipoproteínas y sustancias inmunoestimulantes orgánicas tales como taxol.

20 Ácido nucleico inmunoestimulante: Como se utiliza en este documento, el término "ácido nucleico inmunoestimulante" se refiere a un ácido nucleico capaz de inducir y/o mejorar la respuesta inmune. Los ácidos nucleicos inmunoestimulantes son ácidos ribonucleicos y en
25 particular ácidos desoxirribonucleico, en donde tanto los

ácidos ribonucleicos como desoxirribonucleicos pueden ser de doble hebra o de una hebra. Los ISS-NA preferidos son ácidos desoxirribonucleicos, en donde más preferiblemente dichos ácidos desoxirribonucleico son de una sola hebra.

5 Los ácidos nucleicos inmunoestimulantes preferiblemente contienen al menos un motivo CpG que comprende un C no metilado. Los ácidos nucleicos inmunoestimulantes muy preferidos comprenden por lo menos un motivo CpG, en donde dicho por lo menos un motivo CpG comprende o

10 preferiblemente consiste de por lo menos un, preferiblemente un dinucleótido DG, en donde el C no está metilado. Preferiblemente, pero no necesariamente, dicho dinucleótido CG es parte de una secuencia palindrómica. El término ácido nucleico inmunoestimulante también se refiere

15 a los ácidos nucleicos que contienen bases modificadas, preferiblemente 4-bromo-citosina. Específicamente preferidos en el contexto de la invención son los ISS-NA que son capaces de estimular la producción de IFN-alfa en células dendríticas. Los ácidos nucleicos

20 inmunoestimulantes útiles con el propósito de la invención se describen, por ejemplo, en WO2007/068747A1.

Oligonucleótido: Como se utiliza en este documento, el término "oligonucleótido" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende 2 o más nucleótidos,

25 preferiblemente cerca de 6 a alrededor de 200 nucleótidos y

más preferiblemente 20 a cerca de 100 nucleótidos y máspreferiblemente de 20 a 40 nucleótidos. Muy preferentemente, los oligonucleótidos comprenden unos 30 nucleótidos, más preferiblemente los oligonucleótidos comprenden exactamente 30 nucleótidos, y más preferiblemente los oligonucleótidos consisten en exactamente 30 nucleótidos. Los oligonucleótidos son poliribonucleótidos o polidexosiribonucleótidos y se seleccionan preferentemente de (a) ADN o ARN no modificado, y (b) ARN o ADN modificado. La modificación puede comprender los análogos troncales o de nucleótido. Los oligonucleótidos preferentemente se seleccionan del grupo que consiste de (a) ADN mono y bi-catenario , (b) ADN que es una mezcla de regiones de cadena simple y doble, (c) ARN mono y bicatenario (d) ARN que es mezcla de regiones de cadena simple y doble y moléculas y (e) híbrido formado por ADN y ARN monocatenario o, más preferiblemente, bicatenario o una mezcla de regiones de cadeba simple y doble. Los análogos/modificaciones de nucléotido preferidos se seleccionan del grupo que consiste en (a) ácido nucleico peptídico, (b) inosina, (c) bases tritiladas, (d) fosforotioatos, (e) alquilfosfortioatos, (f) t-nitroindol desoxiribofliranosilo, (g) 5-metildesoxicitosina, y (h) 5,6-dihidro-5,6-dihidroxidesoxitimidina. Los nucleótidos fosfotioados están protegidos contra la degradación en una

célula o un organismo y son por lo tanto las modificaciones de nucleótidos preferidas. Los oligonucleótidos no modificados que consisten exclusivamente de nucleótidos enlazados a fosfodiéster, por lo general son más activos que los nucleótidos modificados y por lo tanto se prefieren generalmente en el contexto de la invención. Los más preferidos son oligonucleótidos que consisten exclusivamente de desoxinucleo uniones enlazados a fosfodiéster, en donde además preferiblemente dichos oligonucleótidos son de una sola cadena. Los oligonucleótidos más preferidos son capaces de estimular la producción de IFN-alfa en células, preferentemente en las células dendríticas. Los oligonucleótidos más preferidos son capaces de estimular la producción de IFN-alfa en las células que se seleccionan de CpGs tipo a y CpGs tipo C. Las moléculas de ARN sin Cap son más preferidas.

Motivo de CpG: Como se utiliza en este documento, el término "motivo de CpG" se refiere a un patrón de nucleótidos que incluye un CpG central no metilado, es decir, el dinucleótido de CpG no metilado, en donde el C no está metilado, rodeado por al menos una base, preferiblemente uno o dos nucleótidos, flanqueando (en el lado 3' y 5' de) el CpG central. Por lo general y, preferiblemente, el motivo de CpG como se utiliza en este documento, comprende o consiste alternativamente en el

dinucleótido CpG no metilado y dos nucleótidos en sus extremos 5' y 3'. Sin estar limitados por teoría, las bases que flanquean el CpG confieren una parte significativa de la actividad al oligonucleótido de CpG.

5 Oligonucleótido que contiene CpG no metilado: Como se utiliza en este documento, el término "oligonucleótido que contiene CpG no metilado" o "CpG" se refiere a un oligonucleótido, preferiblemente un oligodesoxinucleótido, que contiene al menos un motivo de CpG. Así, un CpG
10 contiene al menos una citosina no metilada, dinucleótido de guanina. Los CpGs preferidos estimulan/activan, por ejemplo, tienen un efecto mitogénico en, o inducen o aumentan la expresión de citocinas por, una célula derivada de troncal de vertebrado. Por ejemplo, el CpGs puede ser
15 útil para activar las células B, las células NK y las células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas, monocitos y macrófagos. Preferiblemente, el CpG se refiere a un oligodesoxinucleótido, preferiblemente a un oligodesoxinucleótido monocatenario, que contiene una
20 citosina no metilada seguida 3' por una guanosina, en donde dicha citosina no metilada y dicha guanosina están vinculadas por un enlace de fosfato, en donde preferiblemente dicho enlace de fosfato es un enlace fosfodiéster o un enlace fosfotioato, y en donde además
25 preferiblemente dicho enlace de fosfato es un enlace

fosfodiéster. El CpGs puede incluir análogos de nucleótidos tales como análogos que contienen enlaces de éster de fosforotio y puede ser bicatenario o monocatenario. Generalmente, las moléculas de doble cadena son más estables *in vivo*, mientras que las de una cadena tienen actividad inmune aumentada. Preferiblemente, como se utiliza en este documento, un CpG es un oligonucleótido que es de por lo menos unos diez nucleótidos de longitud y comprende al menos un motivo CpG, en donde además preferiblemente dicho CPG es 10 a 60, más preferentemente 15 a 50, aún más preferiblemente 20 a 40, aún más preferiblemente aproximadamente 30 y más preferiblemente exactamente 30 nucleótidos de longitud. Un CpG puede consistir en nucleótidos metilados y/o no metilados, en donde dicho al menos un motivo de CpG comprende al menos un dinucleótido de CG en donde la C no está metilada. El CpG también puede comprender estiramientos de secuencia metilados y/o no metilados, en donde dicho al menos un motivo de CpG comprende al menos un dinucleótido de CG en donde la C no está metilada. My preferiblemente, el CpG se refiere a un oligodesoxinucleótido monocatenario que contiene una citosina no metilada seguida 3' por una guanosina, en donde dicha citosina no metilada y dicha guanosina están vinculadas por un enlace fosfodiéster. Los CpGs pueden incluir análogos de nucleótidos tales como

análogos que contienen enlaces de éster de fosforotio y puede ser bicatenario o monocatenario. Generalmente, los CpGs de fosfodiéster son CpGs tipo A como se indica a continuación, mientras que los CpGs de fosfotioéster estabilizado son CpGs tipo B. Los oligonucleótidos de CpG preferidos en el contexto de la invención son los CpGs tipo A.

CpG Tipo A: Como se utiliza en este documento, el término "CpG tipo A" o "CpG tipo D" se refiere a un oligodesoxinucleótido (ODN) que comprende por lo menos un motivo de CpG. Los CpGs tipo A preferiblemente estimulan la activación de las células T y la maduración de células dendríticas y son capaces de estimular la producción de IFN-alfa. En los CpGs tipo A, los nucleótidos del por lo menos un motivo CpG están vinculados por al menos un enlace fosfodiéster. Los CpGs tipo A comprenden por lo menos un motivo de Cpg de enlace fosfodiéster que puede ser flanqueado en su extremo 5', y/o, preferiblemente y, en su extremo 3' por nucleótidos de enlace fosforotioato. Preferiblemente, el motivo de CpG y en el presente preferentemente el dinucleótido de CG y sus regiones flanqueantes inmediatas que comprenden por lo menos uno, preferiblemente dos nucleótidos, están compuestos por nucleótidos de enlaces fosfodiéster. Los CpGs tipo A preferidos exclusivamente consisten de nucleótidos de

enlace fosfodiéster (PO). Típicamente y preferiblemente, el motivo poli G comprende o alternativamente consite de por lo menos un, preferiblemente por lo menos tres, por lo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 Gs (guanosinas), más preferiblemente por lo menos 10 Gs. Preferiblemente, el CpG tipo A de la invención comprende o alternativamente consiste de una secuencia palindrómica.

Partícula tipo virus (VLP por sus siglas en inglés): El término "partículas tipo virus (VLP)" en este documento, se refiere a una partícula no replicativa o no-infecciosa, preferiblemente una partícula de virus no infecciosa y no replicativa, o se refiere a una estructura no replicativa o no-infecciosas, preferiblemente una estructura no replicativa y no infecciosa que se asemeja a una partícula de virus, preferiblemente una cápside de un virus. El término "no-replicativa", en este documento, se refiere a ser incapaz de replicar el genoma compuesto por la VLP. El término "no infecciosa", en este documento, se refiere a ser incapaz de entrar en la célula huésped. La partícula tipo virus según la invención es no replicativa y no infecciosa debido a que carece de todo o parte del genoma viral o función del genoma. La partícula tipo virus según la invención puede contener ácidos nucleicos de su genoma. Las partículas tipo virus producidas por vía recombinante normalmente contienen ARN derivado de célula

huésped. Una modalidad típica y preferida de una partícula tipo virus según la presente invención es una cápside viral compuesta por polipéptidos de la invención. Una partícula tipo virus es yb conjunto macromolecular compuesto de proteína de cápside viral que normalmente se compone de 60, 120, 180, 240, 300, 360 o más de 360 subunidades de proteína por partícula tipo virus. Por lo general y, preferiblemente, las interacciones de estas subunidades conducen a la formación de la cápside viral o cápside viral como la estructura con una organización repetitiva inherente. Una característica de una partícula tipo virus es su arreglo altamente ordenado y repetitivo de sus subunidades. Las partículas tipo virus que comprenden más de una especie de polipéptidos, referidas a menudo como VLPs mosaico se abarcan también por la invención. Así, en una modalidad, la partícula tipo virus según la invención comprende al menos dos especies diferentes de polipéptidos, en donde al menos una de dichas especies de polipéptidos es un polipéptido de VLP que contiene un epítipo de célula Th.

Empaquetado: El término "empaquetado" en este documento se refiere al estado de una macromolécula polianiónica o sustancias inmunoestimulantes en relación con la VLP. El término "empaquetado" como se utiliza en este documento incluye unión que puede ser covalente, por ejemplo, acoplamiento químico, o no covalente, por ejemplo,

interacciones iónicas, interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, etcétera. El término también incluye la contención, o contención parcial, de una macromolécula polianiónica. Por lo tanto, la macromolécula polianiónica o sustancias immunoestimulantes pueden ser contenidas por la VLP sin la existencia de un enlace real, en particular de un enlace covalente. En modalidades preferidas, la por lo menos una molécula polianiónica o sustancias immunoestimulantes está empaquetada dentro de la VLP, más preferiblemente de una manera no covalente. En caso de que dicha sustancia immunoestimulante sea ácido nucleico, preferiblemente un ADN, el término empaquetado implica que dicho ácido nucleico no es accesible para hidrólisis de nucleasas, preferiblemente no es accesible a hidrólisis de DNase (por ejemplo, DNaseI o Benzonasa), en donde preferiblemente dicha accesibilidad es ensayada como se describe en los Ejemplos 11 a 17 de WO2003/024481A2.

La presente invención proporciona partículas tipo virus (VLPs por sus siglas en inglés) del virus de plantas Virus del Mosaico del Pepino (CMV por sus siglas en inglés), y en particular a VLPs de CMV que comprenden epítomos de células Th, en particular epítomos de células Th universales.

Así en un primer aspecto, la presente invención proporciona una partícula tipo virus modificada (VLP) del

virus del mosaico del pepino (CMV), en donde dicha VLP modificada de CMV comprende, consiste esencialmente en o consiste alternativamente en, por lo menos un polipéptido modificado de CMV, en donde dicho polipéptido modificado de CMV comprende, o preferiblemente consiste en, un polipéptido de CMV y (b) un epítipo de célula T ayudante; y en donde dicho polipéptido de CMV comprende, o preferiblemente consiste en, (i) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV; o (ii) una secuencia de aminoácidos mutados, en donde la secuencia de aminoácidos a mutar es una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, y en donde dicha secuencia de aminoácidos mutados y dicha proteína de recubrimiento de CMV muestran una identidad de secuencia de al menos 90%, preferentemente de al menos 95%, más preferiblemente de al menos 98% y otra vez más preferentemente de al menos 99%.

En una modalidad preferida, dicho polipéptido de CMV comprende, preferiblemente consiste de, una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV. En una modalidad alternativa, dicho polipéptido de CMV comprende, preferentemente consiste en una secuencia de aminoácidos mutados, en donde la secuencia de aminoácidos a mutar es una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, y en donde dicha secuencia de

aminoácidos mutados y dicha proteína de recubrimiento de CMV muestran una identidad de secuencia de al menos 90%, preferentemente de al menos el 95% , más preferentemente de al menos el 98% y más preferentemente de al menos 99%;

5 donde preferentemente dicha secuencia de aminoácidos mutados y dicha secuencia de aminoácidos a mutar difieren en por lo menos uno y a más de 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, o 2 residuos de aminoácidos y en donde además preferentemente estas diferencias se seleccionan de (i)

10 inserción, (ii) eliminación, (iii) intercambio de aminoácidos y (iv) cualquier combinación de (i) a (iii). Las mutaciones pueden introducirse en una secuencia de aminoácidos a mutar para modificar ciertas características de las partículas tipo virus como estabilidad o eficiencia

15 de acoplamiento. La introducción de residuos de cisteína puede mejorar la estabilidad de la cisteína que forman puentes entre las subunidades y la introducción de lisinas en la superficie de VLPs puede mejorar la eficiencia de acoplamiento.

20 En otra modalidad preferida, dicho polipéptido de CMV comprende, o preferiblemente consiste, (i) (a) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende, o preferiblemente consiste, de SEQ ID NO: 1 o (b) una

25 secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de

al menos 75%, preferentemente de al menos 80%, más preferiblemente de al menos el 85% , otra vez más preferentemente de al menos 90%, otra vez más preferentemente de al menos 95%, aún más preferiblemente de al menos el 98% y todavía otra vez más, más preferentemente de al menos el 99% de SEQ ID NO: 1; o (ii) una secuencia de aminoácidos mutados, en donde dicha secuencia de aminoácidos a mutar es la secuencia de aminoácidos definidos en (i) de esta reclamación, y en donde dicha secuencia de aminoácidos mutados y dicha secuencia de aminoácidos a mutar muestran una identidad de secuencia de por lo menos el 95%, preferentemente de al menos el 98% y más preferentemente de al menos 99%.

En una modalidad muy preferida, dicho polipéptido de CMV comprende, o preferiblemente consiste de (a) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende, o preferiblemente consiste en, SEQ ID NO: 1 o (b) una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 75%, preferentemente de al menos 80%, más preferiblemente de al menos el 85%, otra vez más preferentemente de al menos 90%, otra vez más preferentemente de al menos 95%, aún más preferiblemente de al menos 98% y todavía otra vez más, más preferentemente de al menos 99% de SEQ ID NO: 1.

En otra modalidad preferida, dicho polipéptido de CMV comprende, o preferiblemente consiste, (i) (a) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende
5 SEQ ID NO: 21 o (b) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV que comprende una región de secuencia de aminoácidos, en donde dicha región de secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de al menos 75%, preferentemente de al menos 80%, más
10 preferiblemente de al menos el 85% , otra vez más preferentemente de al menos 90%, otra vez más preferentemente de al menos 95%, aún más preferiblemente de al menos el 98% y todavía otra vez más, más preferentemente de al menos el 99% de SEQ ID NO: 21; o (ii) una secuencia
15 de aminoácidos mutados, en donde dicha secuencia de aminoácidos a mutar es la secuencia de aminoácidos definidos en (i) de esta reclamación, y en donde dicha secuencia de aminoácidos mutados y dicha secuencia de aminoácidos a mutar muestran una identidad de secuencia de
20 por lo menos el 95%, preferentemente de al menos el 98% y más preferentemente de al menos 99%.

En otra modalidad muy preferida, dicho polipéptido de CMV comprende, o preferiblemente consiste de, (a) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento
25 de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende

SEQ ID NO: 21 o (b) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV que comprende una región de secuencia de aminoácidos, en donde dicha región de secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de al menos 75%, preferentemente de al menos 80%, más preferiblemente de al menos el 85%, otra vez más preferentemente de al menos 90%, otra vez más preferentemente de al menos 95%, aún más preferiblemente de al menos 98% y todavía otra vez más, más preferentemente de al menos 99% con la SEQ ID NO: 21.

En otra modalidad preferida, dicho polipéptido de CMV comprende, o preferiblemente consiste, (i) (a) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende, o preferiblemente consiste en, SEQ ID NO: 1 o (b) una secuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia de por lo menos 75%, preferiblemente de por lo menos 80%, más preferiblemente de por lo menos 85%, otra vez además preferiblemente de por lo menos 90%, otra vez más preferiblemente de por lo menos 95%, aún más preferiblemente de por lo menos 98% de la SEQ ID NO: 1; y en donde dicha secuencia de aminoácidos como se define en (a) o (b) de esta reclamación comprende SEQ ID NO:21; o en donde dicha secuencia de aminoácidos como se define en (a) o (b) de esta reclamación comprende una región de secuencia

de aminoácidos, en donde dicha región de secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de al menos 75%, preferentemente de al menos 80%, más preferiblemente de al menos el 85% , otra vez más preferentemente de al menos 90%, otra vez más preferentemente de al menos 95%, aún más preferiblemente de al menos el 98% y todavía otra vez más, más preferentemente de al menos el 99% de SEQ ID NO: 21; o (ii) una secuencia de aminoácidos mutados, en donde dicha secuencia de aminoácidos a mutar es la secuencia de aminoácidos definidos en (i) de esta reclamación, y en donde dicha secuencia de aminoácidos mutados y dicha secuencia de aminoácidos a mutar muestran una identidad de secuencia de por lo menos el 98% y más preferentemente de al menos 99%.

En otra vez otra modalidad muy preferida, dicho polipéptido de CMV comprende, o preferiblemente consiste de, (a) una secuencia de aminoácidos de proteína de recubrimiento de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende, o preferiblemente consiste de, SEQ ID NO:1 o (b) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% de la SEQ ID NO:1; y en donde dicha secuencia de aminoácidos como se define en (a) o (b) en esta reclamación comprende SEQ ID NO:21; o en donde dicha secuencia de aminoácidos como se define en (a) o (b) en esta reclamación comprende una

región de secuencia de aminoácidos, en donde dicha región de secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% con SEQ ID NO:21.

Por lo general y, preferiblemente, dicho epítipo de
5 célula T ayudante (i) se fusiona con el N-terminal de dicho polipéptido de CMV, (ii) se fusiona con el C-terminal de dicho polipéptido de CMV, (iii) sustituye una región de aminoácidos consecutivos de dicho polipéptido de CMV, en donde la identidad de secuencia entre dicha región
10 sustituida de aminoácidos consecutivos de dicho polipéptido de CMV y el epítipo de célula T ayudante es por lo menos 15%, preferiblemente por lo menos 20%, o (iv) sustituye una región N-terminal de dicho polipéptido de CMV, y en donde dicha región de N-terminal sustituida de dicho polipéptido
15 de CMV consiste de 5 a 15 aminoácidos consecutivos.

En una modalidad preferida, dicho epítipo de células T ayudantes sustituye una región N-terminal de dicho polipéptido de CMV; en donde preferiblemente el número de aminoácidos de dicha región N-terminal sustituida es igual
20 a o menor que el número de aminoácidos del que consiste dicho epítipo de células T ayudantes. En otras palabras, dicha región N-terminal de dicho polipéptido de CMV consiste de un primer número de aminoácidos y el epítipo de célula Th consiste de un segundo número de aminoácidos, y
25 en una modalidad preferida, dicho primer número de

aminoácidos es igual a o menor que el segundo número de aminoácidos.

En una modalidad más preferida, dicha región N-terminal sustituida de dicho polipéptido de CMV consiste en 5 a 15 amino ácidos consecutivos, preferiblemente de 9 a 14 aminoácidos consecutivos, más preferentemente de 11 a 13 aminoácidos consecutivos. En una modalidad muy preferida, dicha región N-terminal de dicho polipéptido de CMV corresponde a los aminoácidos 2-12 de SEQ ID NO: 1.

Así, en una modalidad muy preferida, dicho polipéptido de CMV comprende, o preferiblemente consiste, (i) (a) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende, o preferiblemente consiste, de SEQ ID NO: 1 o (b) una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 75%, preferentemente de al menos 80%, más preferiblemente de al menos el 85% , otra vez más preferentemente de al menos 90%, otra vez más preferentemente de al menos 95%, aún más preferiblemente de al menos el 98% y todavía otra vez más, más preferentemente de al menos el 99% de SEQ ID NO: 1; o (ii) una secuencia de aminoácidos mutados, en donde dicha secuencia de aminoácidos a mutar es la secuencia de aminoácidos definidos en (i) de esta reclamación, y en donde dicha secuencia de aminoácidos mutados y dicha secuencia de

aminoácidos a mutar muestran una identidad de secuencia de por lo menos el 95%, preferentemente de al menos el 98% y más preferentemente de al menos 99%, y en donde dicho epítipo de célula T ayudante sustituye una región N-terminal de dicho polipéptido de CMV, en donde preferiblemente el número de aminoácidos de dicha región N-terminal sustituida es igual que o menor a el número de aminoácidos del que consiste el epítipo de células T ayudantes.

Así, en una modalidad muy preferida, dicho polipéptido de CMV comprende, o preferiblemente consiste, (i) (a) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende, o preferiblemente consiste, de SEQ ID NO: 1 o (b) una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 75%, preferentemente de al menos 80%, más preferiblemente de al menos el 85% , otra vez más preferentemente de al menos 90%, otra vez más preferentemente de al menos 95%, aún más preferiblemente de al menos el 98% y todavía otra vez más, más preferentemente de al menos el 99% de SEQ ID NO: 1; o (ii) una secuencia de aminoácidos mutados, en donde dicha secuencia de aminoácidos a mutar es la secuencia de aminoácidos definidos en (i) de esta reclamación, y en donde dicha secuencia de aminoácidos mutados y dicha secuencia de

aminoácidos a mutar muestran una identidad de secuencia de por lo menos el 95%, preferentemente de al menos el 98% y más preferentemente de al menos 99%, y en donde dicho epítipo de célula T ayudante sustituye una región N-terminal de dicho polipéptido de CMV, y en donde dicha región de N-terminal sustituida de dicho polipéptido de CMV consiste de 5 a 15 aminoácidos consecutivos, preferiblemente de 9 a 14 aminoácidos consecutivos, más preferiblemente de 11 a 13 aminoácidos consecutivos.

Así, en una modalidad muy preferida, dicho polipéptido de CMV comprende, o preferiblemente consiste, (i) (a) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende, o preferiblemente consiste, de SEQ ID NO: 1 o (b) una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 75%, preferentemente de al menos 80%, más preferiblemente de al menos el 85% , otra vez más preferentemente de al menos 90%, otra vez más preferentemente de al menos 95%, aún más preferiblemente de al menos el 98% y todavía otra vez más, más preferentemente de al menos el 99% de SEQ ID NO: 1; o (ii) una secuencia de aminoácidos mutados, en donde dicha secuencia de aminoácidos a mutar es la secuencia de aminoácidos definidos en (i) de esta reclamación, y en donde dicha secuencia de aminoácidos mutados y dicha secuencia de

aminoácidos a mutar muestran una identidad de secuencia de por lo menos el 95%, preferentemente de al menos el 98% y más preferentemente de al menos 99%, y en donde dicho epítipo de célula T ayudante sustituye una región N-terminal de dicho polipéptido de CMV, y en donde dicha región de N-terminal de dicho polipéptido de CMV corresponde a los aminoácidos 2-12 de la SEQ ID NO: 1.

Así, en una modalidad muy preferida, dicho polipéptido de CMV comprende, o preferiblemente consiste, (a) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende, o preferiblemente consiste, de SEQ ID NO: 1 o (b) una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 75%, preferentemente de al menos 80%, más preferiblemente de al menos el 85% , otra vez más preferentemente de al menos 90%, otra vez más preferentemente de al menos 95%, aún más preferiblemente de al menos el 98% y todavía otra vez más, más preferentemente de al menos el 99% de SEQ ID NO: 1; y en donde dicho epítipo de célula T ayudante sustituye una región N-terminal de dicho polipéptido de CMV, en donde preferiblemente el número de aminoácidos de dicha región N-terminal sustituida es igual que o menor a el número de aminoácidos del que consiste el epítipo de células T ayudantes.

Así, en una modalidad muy preferida, dicho polipéptido de CMV comprende, o preferiblemente consiste, (a) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende, o preferiblemente consiste, de SEQ ID NO: 1 o (b) una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 75%, preferentemente de al menos 80%, más preferiblemente de al menos el 85% , otra vez más preferentemente de al menos 90%, otra vez más preferentemente de al menos 95%, aún más preferiblemente de al menos el 98% y todavía otra vez más, más preferentemente de al menos el 99% de SEQ ID NO: 1; y en donde dicho epítipo de célula T ayudante sustituye una región N-terminal de dicho polipéptido de CMV, y en donde dicha región de N-terminal sustituida de dicho polipéptido de CMV consiste de 5 a 15 aminoácidos consecutivos, preferiblemente de 9 a 14 aminoácidos consecutivos, más preferiblemente de 11 a 13 aminoácidos consecutivos.

Así, en una modalidad muy preferida, dicho polipéptido de CMV comprende, o preferiblemente consiste, (a) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende, o preferiblemente consiste, de SEQ ID NO: 1 o (b) una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 75%, preferentemente de al menos 80%, más

preferiblemente de al menos el 85% , otra vez más preferentemente de al menos 90%, otra vez más preferentemente de al menos 95%, aún más preferiblemente de al menos el 98% y todavía otra vez más, más preferentemente de al menos el 99% de SEQ ID NO: 1; y en donde dicho epítipo de célula T ayudante sustituye una región N-terminal de dicho polipéptido de CMV, y en donde dicha región de N-terminal de dicho polipéptido de CMV corresponde a los aminoácidos 2-12 de la SEQ ID NO:1.

10 Así, en una modalidad muy preferida, dicho polipéptido de CMV comprende, o preferiblemente consiste, (a) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende SEQ ID NO: 21, o (b) una secuencia de aminoácidos de una
15 proteína de recubrimiento de CMV que comprende una región de secuencia de aminoácidos, en donde dicha región de secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de al menos 75%, preferentemente de al menos 80%, más preferiblemente de al menos el 85% , otra vez más
20 preferentemente de al menos 90%, otra vez más preferentemente de al menos 95%, aún más preferiblemente de al menos el 98% y todavía otra vez más, más preferentemente de al menos el 99% de SEQ ID NO: 21; y en donde dicho epítipo de célula T ayudante sustituye una región N-
25 terminal de dicho polipéptido de CMV, en donde

preferiblemente el número de aminoácidos de dicha región N-terminal sustituida es igual que o menor a el número de aminoácidos del que consiste el epítipo de células T ayudantes.

5 Así, en una modalidad muy preferida, dicho polipéptido de CMV comprende, o preferiblemente consiste, (a) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende SEQ ID NO: 21 o (b) una secuencia de aminoácidos de una
10 proteína de recubrimiento de CMV que comprende una región de secuencia de aminoácidos, en donde dicha región de secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de al menos 75%, preferentemente de al menos 80%, más preferiblemente de al menos el 85% , otra vez más
15 preferentemente de al menos 90%, otra vez más preferentemente de al menos 95%, aún más preferiblemente de al menos el 98% y todavía otra vez más, más preferentemente de al menos el 99% de SEQ ID NO: 21; y en donde dicho epítipo de célula T ayudante sustituye una región N-
20 terminal de dicho polipéptido de CMV, y en donde dicha región de N-terminal sustituida de dicho polipéptido de CMV consiste de 5 a 15 aminoácidos consecutivos, preferiblemente de 9 a 14 aminoácidos consecutivos, más preferiblemente de 11 a 13 aminoácidos consecutivos.

25 Así, en una modalidad muy preferida, dicho polipéptido

de CMV comprende, o preferiblemente consiste, (a) una
secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento
de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende
SEQ ID NO: 21 o (b) una secuencia de aminoácidos de una
5 proteína de recubrimiento de CMV que comprende una región
de secuencia de aminoácidos, en donde dicha región de
secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia
de al menos 75%, preferentemente de al menos 80%, más
preferiblemente de al menos el 85% , otra vez más
10 preferentemente de al menos 90%, otra vez más
preferentemente de al menos 95%, aún más preferiblemente de
al menos el 98% y todavía otra vez más, más preferentemente
de al menos el 99% de SEQ ID NO: 21; y en donde dicho
epítipo de célula T ayudante sustituye una región N-
15 terminal de dicho polipéptido de CMV, y en donde dicha
región de N-terminal de dicho polipéptido de CMV
corresponde a los aminoácidos 2-12 de SEQ ID NO:1.

Así, en una modalidad muy preferida, dicho polipéptido
de CMV comprende, o preferiblemente consiste de, (a) una
20 secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento
de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende,
o preferiblemente consiste, de SEQ ID NO: 1 o (b) una
secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de
al menos 90 % de SEQ ID NO:1; y en donde dicha secuencia de
25 aminoácidos como se define en (a) o (b) en esta reclamación

comprende SEQ ID NO:21; o en donde dicha secuencia de aminoácidos como se define en (a) o (b) en esta reclamación comprende una región de secuencia de aminoácidos, en donde dicha región de secuencia de aminoácidos tiene una
5 identidad de secuencia de por lo menos el 90% con la SEQ ID NO:21, y en donde dicho epítipo de célula T ayudante sustituye una región N-terminal de dicho polipéptido de CMV, en donde preferiblemente el número de aminoácidos de dicha región N-terminal sustituida es igual que o menor a
10 el número de aminoácidos del que consiste el epítipo de células T ayudantes.

Así, en una modalidad muy preferida, dicho polipéptido de CMV comprende, o preferiblemente consiste de, (a) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento
15 de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende, o preferiblemente consiste, de SEQ ID NO: 1 o (b) una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 90 % de SEQ ID NO:1; y en donde dicha secuencia de aminoácidos como se define en (a) o (b) en esta reclamación
20 comprende SEQ ID NO:21; o en donde dicha secuencia de aminoácidos como se define en (a) o (b) en esta reclamación comprende una región de secuencia de aminoácidos, en donde dicha región de secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 90% con la SEQ ID
25 NO:21, en donde dicho epítipo de célula T ayudante

sustituye una región N-terminal de dicho polipéptido de CMV, y en donde dicha región N-terminal sustituida de dicho polipéptido de CMV consiste de 5 a 15 aminoácidos consecutivos, preferiblemente de 9 a 14 aminoácidos consecutivos, más preferiblemente de 11 a 13 aminoácidos consecutivos.

Así, en una modalidad muy preferida, dicho polipéptido de CMV comprende, o preferiblemente consiste de, (a) una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende, o preferiblemente consiste, de SEQ ID NO: 1 o (b) una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 90 % de SEQ ID NO:1; y en donde dicha secuencia de aminoácidos como se define en (a) o (b) en esta reclamación comprende SEQ ID NO:21; o en donde dicha secuencia de aminoácidos como se define en (a) o (b) en esta reclamación comprende una región de secuencia de aminoácidos, en donde dicha región de secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 90% con la SEQ ID NO:21, en donde dicho epítipo de célula T ayudante sustituye una región N-terminal de dicho polipéptido de CMV, y en donde dicha región N-terminal de dicho polipéptido de CMV corresponde a los aminoácidos 2-12 de la SEQ ID NO:1.

Muy preferentemente, dicho epítipo de célula T ayudante

es un epítopo de célula T ayudante universal, preferiblemente dicho epítopo de célula T ayudante consiste en máximo 20 aminoácidos.

En otra modalidad más preferida, dicho epítopo de célula Th es una secuencia PADRE. Nuevamente en una modalidad preferida, dicho epítopo de célula Th comprende, preferiblemente consiste de, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5.

En otra modalidad preferida, dicho epítopo de célula T ayudante se deriva de una vacuna humana. Preferiblemente, dicho epítopo de célula Th se deriva de la toxina del tétano. Nuevamente preferiblemente, dicho epítopo de célula Th tiene, preferiblemente consiste de, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.

En una modalidad muy preferida de la presente invención, dicho polipéptido de CMV comprende, o preferiblemente consiste de, una secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende, o preferiblemente consiste, de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 95 % de SEQ ID NO:1; y en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende SEQ ID NO:21, y en donde dicho epítopo de célula T ayudante sustituye la región N-terminal de dicho polipéptido de CMV, y en donde dicha región de N-terminal sustituida de idchyo

polipéptido de CMV consiste de 11 a 13 aminoácidos consecutivos, preferiblemente de 11 aminoácidos consecutivos, y en donde además preferiblemente dicha región N-terminal de dicho polipéptido de CMV corresponde a los aminoácidos 2-12 de la SEQ ID NO:1.

En otra modalidad muy preferida, dicho polipéptido modificado de CMV comprende, preferiblemente consiste de, una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6. En otra modalidad muy preferida, dicho polipéptido modificado de CMV comprende, preferiblemente consiste de, una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7.

Las VLPs de la invención pueden expresarse en sistemas de expresión procariotas o eucariotas. Los sistemas son *E. coli*, levaduras, células de insectos así como líneas de células de mamífero. Dichas VLP modificadas de CMV o dichas VLP de CMV muy preferidas se obtienen por la expresión de dicho polipéptido de CMV modificado o dicho polipéptido de CMV en *E.coli.*, y en donde preferiblemente dicha expresión se efectúa a temperatura de entre 10°C a 25°C, preferiblemente a una temperatura de 20°C. Como se indica anteriormente, los polipéptidos producidos de manera recombinante pueden comprender un residuo de metionina de N-terminal. En una modalidad, dicho polipéptido de CMV o polipéptido modificado de CMV por lo tanto comprende un residuo de metionina de N-terminal. Sin embargo,

típicamente y preferentemente dicho residuo de metionina de N-terminal es escidido de dicho polipéptido de CMV o dicho polipéptido modificado de CMV.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención
5 proporciona una partícula tipo virus (VLP) del virus del
mosaico del pepino (CMV), en donde dicha VLP de CMV
comprende, consiste esencialmente en o consiste
alternativamente en, por lo menos un polipéptido de CMV que
comprende o que preferiblemente consiste en: (i) una
10 secuencia de aminoácidos de una proteína de recubrimiento
de CMV; o (ii) una secuencia de aminoácidos mutados, en
donde la secuencia de aminoácidos a mutar es una secuencia
de aminoácidos de una proteína de recubrimiento de CMV, y
en donde dicha secuencia de aminoácidos mutados y dicha
15 proteína de recubrimiento de CMV muestran una identidad de
secuencia de al menos 90%, preferentemente de al menos 95%,
más preferiblemente de al menos el 98% y más
preferentemente de al menos 99%; y en donde dicha VLP de
CMV se obtiene por expresión de dicho polipéptido de CMV en
20 *E. coli.*, y en donde preferentemente dicha expresión se
efectúa a temperaturas de entre 10°C a 25°C,
preferiblemente a una temperatura de 20°C.

La invención abarca composiciones en donde dichas VLPs
de la invención conforman una de las características
25 técnicas como se describe en este documento, ya sea sola o

en cualquier combinación posible.

En otro aspecto, la invención presente proporciona una composición que comprende una partícula tipo virus modificada. Además, estas VLPs modificadas sirven como, preferentemente, plataforma de vacuna, para la generación de respuestas inmunes, en respuestas de anticuerpos particulares, contra los antígenos vinculados con dichas VLPs modificadas. La presencia de los epítopos de células Th, en particular epítopos de células Th universales, condujo a un mayor aumento en la respuesta inmune generada.

Por lo tanto, en una modalidad más preferida dicha composición comprende (a) al menos una partícula tipo virus modificada de la invención, en donde dicha partícula tipo virus modificada comprende por lo menos un primer sitio de unión; y (b) por lo menos un antígeno, en donde dicho antígeno comprende por lo menos un segundo sitio de unión; en donde (a) y (b) están vinculados a través de dicho por lo menos un primer y dicho por lo menos un segundo sitio de unión. Los métodos para vincular dichas partículas tipo virus y dicho antígeno a través de dichos primer y segundo sitios de unión se describen, por ejemplo, en WO2002/056905A2 y WO2004/084940A1.

En una modalidad más preferida, dicho primer sitio de unión está vinculado a dicho segundo sitio de unión a través de por lo menos un enlace covalente. En una

modalidad más preferida, dicho primer sitio de unión y dicho segundo sitio de unión están vinculados a través de por lo menos un enlace peptídico covalente. En una modalidad más preferida, dicho enlace covalente es un
5 enlace no peptídico. Así, en nuevamente otra modalidad preferida, dicho primer sitio de unión y dicho segundo sitio de unión están vinculados a través de por lo menos un enlace no peptídico covalente. En una modalidad preferida más de dicho primer sitio de unión está un grupo amino,
10 preferiblemente un grupo amino de una lisina.

La unión entre partículas tipo virus modificadas y antígenos por medio de enlaces de disulfuro son lábiles, en particular, a las moléculas que contienen fracción de sulfhidrilo y son, además, menos estables en el suero que,
15 por ejemplo, uniones de tioéter (Martin FJ. y Papahadjopoulos D. (1982) *J. Biol.Chem.* 257: 286-288). Por lo tanto, en otra modalidad muy preferida de la presente invención, la asociación o vinculación de la VLP modificada y por lo menos un antígeno no incluye un enlace de
20 disulfuro. Más preferido por este medio, por lo menos una segunda unión comprende, o preferiblemente es, un grupo sulfidrilo. Por otra parte, la asociación o vinculación de la VLP modificada y por lo menos un antígeno preferiblemente no incluye un enlace de azufre-azufre. Más
25 preferido por este medio, por lo menos una segunda unión

comprende, o preferiblemente es, un grupo sulfidrilo. En una modalidad muy preferida, dicho al menos un primer sitio de unión no es o no comprende un grupo sulfidrilo. En nuevamente una modalidad muy preferida, dicho al menos un primer sitio de unión no es o no comprende un grupo sulfidrilo de una cisteína. En una modalidad preferida más de dicho segundo sitio de unión es un grupo sulfhidrilo, preferiblemente un grupo sulfhidrilo de una cisteína.

En una modalidad muy preferida, el por lo menos un primer sitio de unión es un grupo amino, un grupo amino de un residuo de lisina y el por lo menos un segundo sitio de unión es un grupo sulfidrilo, preferiblemente un grupo sulfidrilo de un residuo de cisteína o preferentemente un grupo de sulfhidrilo que ha sido químicamente unido al antígeno. En otra modalidad preferida sólo uno de dichos segundos sitios de unión asociados con dicho primer sitio de unión a través de al menos un vínculo peptídico no covalente conduce a un tipo único y uniforme de unión de dicho antígeno a dicha partícula tipo virus modificada, en donde dicho solamente un segundo sitio de unión que asocia dicha primera unión es un grupo sulfhidrilo, y en donde dicho antígeno y dichas partículas tipo virus modificados interactúan a través de dicha asociación para formar una matriz antigénica ordenada y repetitiva.

En una modalidad preferida de la invención, el

antígeno está vinculado a la VLP modificada por reticulación química, normalmente y de preferencia utilizando un reticulador heterobifuncional. En modalidades preferidas, el reticulador hetero-bifuncional contiene un

5 grupo funcional que puede reaccionar con los primeros sitios de unión preferidos, preferiblemente con el grupo amino, más preferiblemente con los grupos amino de residuo(s) de lisina de la VLP modificada, y otro grupo funcional que puede reaccionar con el segundo sitio de

10 unión preferido, es decir, un grupo sulfhidrilo, preferiblemente de residuo de cisteína(s) inherente de, o artificialmente añadido al antígeno, y opcionalmente también disponible para reacción por reducción. Varios reticuladores hetero-bifuncionales son conocidos en la

15 materia. Estos incluyen los reticuladores preferidos SMPH (Pierce), Sulfo-MBS, Sulfo-EMCS, Sulfo-GMBS, Sulfo-SIAB, Sulfo-SMPB, Sulfo-SMCC, Sulfo-KMUS SVSB, SIA, y otros reticuladores disponibles por ejemplo de Pierce Chemical Company, y que tienen un grupo funcional reactivo hacia

20 grupos amino y un grupo funcional reactivo hacia grupos sulfhidrilo. Los reticuladores mencionados llevan a la formación de un enlace amida después de la reacción con el grupo amino y un vínculo tioéter con los grupos sulfidrilo. Otra clase de reticuladores convenientes en la práctica de

25 la invención se caracteriza por la introducción de un

enlace disulfuro entre el antígeno y la VLP modificada al acoplamiento. Los reticuladores preferidos pertenecientes a esta clase incluyen, por ejemplo, SPDP y Sulfo-LC-SPDP (Pierce).

5 Vincular el antígeno a la VLP modificada utilizando un
vinculante hetero-bifuncional según los métodos preferidos
descritas, permite acoplamiento del antígeno a la VLP
modificada de una manera orientada. Otros métodos de
vinculación del antígeno a la VLP modificada incluyen
10 métodos en donde el antígeno está reticulado a la VLP
modificada, utilizando la carbodiimida EDC y NHS. El
antígeno también puede tiolarse primero a través de la
reacción, por ejemplo con SATA, SATP o iminotiolano. El
antígeno, después de desprotección si es necesario, puede
15 entonces ser acoplado a la VLP modificada como sigue.
Después de la separación del reactivo de tiolación en
exceso, el antígeno es reaccionado con la VLP modificada
previamente activada con un vinculante compuesto hetero-
bifuncional por una molécula de cisteína reactiva y
20 mostrando, por tanto, al menos uno o varios grupos
funcionales reactivos hacia residuos de cisteína, que el
antígeno tiolado puede reaccionar, como se describió
anteriormente. Opcionalmente, en la mezcla de reacción se
incluyen cantidades bajas de un agente de reducción. En
25 otros métodos, el antígeno se une a la VLP modificada,

utilizando una homo-bifuncional vinculante como glutaraldehído, DSG, BM [PEO] 4, BS3, (Pierce) u otros conocidos reticuladores homo-bifuncional con grupos funcionales reactivos hacia grupos amino o grupos carboxilos de la VLP modificado.

En modalidades muy preferidas de la invención, el antígeno es vinculado a través de un residuo de cisteína, que ha agregado el N-terminal o C-terminal de o un residuo de cisteína natural dentro del antígeno, a los residuos de lisina de la partícula tipo virus modificada. En una modalidad preferida, la composición de la invención además comprende un vinculador, en donde dicho vinculador asocia dicho antígeno con dicho segundo sitio de unión, y en donde preferentemente dicho vinculador comprende o de forma alternativa consiste en dicho segundo sitio de unión.

El diseño de un segundo sitio de unión sobre el antígeno se obtiene por la asociación de un vinculador, preferiblemente que contenga al menos un aminoácido conveniente como segundo sitio de unión según las revelaciones de esta invención. Por lo tanto, en una modalidad preferida de la invención presente, un vinculador se asocia al antígeno a través de al menos un enlace covalente, preferentemente, por al menos uno, preferiblemente un enlace peptídico. Preferiblemente, el vinculador comprende, o como alternativa consiste en, el

segundo sitio de unión. En una modalidad más preferida, el vinculador comprende un grupo sulfidrilo, preferiblemente de un residuo de cisteína. En otra modalidad preferida, el vinculador de aminoácido es un residuo de cisteína.

5 La selección de un vinculador dependerá de la naturaleza del antígeno, en sus propiedades bioquímicas, tales como p_i , distribución de carga y glicosilación. En general, los vinculadores flexibles de aminoácido son favorecidos. En una modalidad más preferida la invención
10 presente, el vinculador consiste en aminoácidos, en donde más preferentemente el vinculador consiste en al menos uno y máximo 25, preferiblemente máximo 20, más preferiblemente como máximo 15 aminoácidos. En una modalidad preferida de la invención, el vinculador de aminoácido contiene de 1 a
15 10 aminoácidos. En una modalidad más preferida dicho vinculador comprende o alternativamente consiste en dicho segundo sitio de unión.

En una modalidad más preferida dicho vinculador es un vinculador del aminoácido, y en donde preferiblemente dicho
20 vinculador de aminoácido es seleccionado del grupo consistente en: (a) CGG; (b) N-terminal gamma 1 - vinculador; (c) N-terminal gamma 3 -livinculador nker; (d) Ig regiones de bisagra; (e) N-terminal glicina vinculadores; (f) (G)kC(G)n con $n=0-12$ y $k=0-5$; (g) N-
25 terminal glicina-serina vinculadores (h)

(G)_kC(G)_m(S)_l(GGGGS)_n con n=0-3, k=0-5, m=0-10, l=0-2; (i) GGC; (j) GGC-NH₂; (k) C-terminal gamma 1 -vinculador; (l) C-terminal gamma 3-vinculador; (m) C-terminal glicina vinculadores; (n) (G)_nC(G)_k con n=0-12 y k=0-5; (o) C-terminal glicina-serina vinculadores; y (p) (G)_m(S)_l(GGGGS)_n(G)_oC(G)_k with n=0-3, k=0-5, m=0-10, l=0-2, y o=0-8. En general, los residuos de glicina se insertarán entre los aminoácidos voluminosos y la cisteína para ser utilizado como segundo sitio de unión, para evitar potencial impedimento estérico del aminoácido más voluminoso en la reacción de acoplamiento.

En una modalidad más preferida el vinculador se agrega a la N-terminal del antígeno. En otra modalidad preferida de la invención, el vinculador se agrega a la terminal C del antígeno.

En otras modalidades de la invención presente, la composición comprende o alternativamente consiste esencialmente de una partícula similar a virus relacionada con el antígeno por medio de interacciones químicas, en donde al menos una de estas interacciones no es un enlace covalente. La vinculación de la VLP modificada al antígeno puede ser efectuada por biotinilación de la VLP modificada y expresando el antígeno como una proteína de fusión con estreptavidina. En otras modalidades de la invención presente, los grupos de sulfhidrilo utilizados para el

acoplamiento químico a lisinas se unen a las VLPs modificadas o el antígeno por medio de la modificación química.

En una modalidad más preferida dicha composición
5 comprende además al menos un inmuno - estimulante
sustancia. En una modalidad muy preferida, dicha sustancia
inmunoestimulantes se empaqueta en las VLPs modificados de
la invención. En otra modalidad preferida, la sustancia de
inmunoestimulantes se mezcla con las VLPs modificadas de la
10 invención. Las sustancias inmunoestimulantes útiles para la
invención generalmente son conocidas en el arte y se
revelan, entre otras cosas, en WO2003/024481A2.

En otra modalidad de la invención presente, dicha
sustancia inmunoestimulantes consiste en DNA o RNA de
15 origen no eucariota. En una modalidad preferida más dicha
sustancia inmunoestimulante es seleccionada del grupo
consistente en: (a) inmunoestimulantes de ácido nucleico;
(b) peptidoglicano; (c) lipopolisacáridos; (d) ácido
lipoteicónico; (e) compuesto de imidazoquinolina; (f)
20 flagelina; (g) lipoproteína; y (h) cualquier mezclas de al
menos una sustancia de (a) a (g). En una modalidad más
preferida dicha sustancia inmunoestimulantes es un ácido
nucleico de inmunoestimulantes, en donde dicho
inmunoestimulantes de ácido nucleico es seleccionado del
25 grupo consistente en: (a) ácidos ribonucleicos; (b) ácidos

desoxirribonucleicos; (c) los ácidos nucleicos quiméricos; y (d) cualquier mezcla de (a) y (b) o (c). En una modalidad más preferida dicho inmunoestimulantes de ácido nucleico es un ácido ribonucleico, y en donde dicho ácido ribonucleico es bacteria derivada de RNA. En una modalidad más preferida más dicho ácido nucleico inmunoestimulante es poli-(LC) o un derivado del mismo. En una modalidad más preferida dicho inmunoestimulante de ácido nucleico es un ácido desoxirribonucleico, en donde dicho ácido desoxirribonucleico es un CpG no metilado que contienen oligonucleótidos.

En una modalidad muy preferida dicha sustancia inmunoestimulantes es un oligonucleótido de CpG no metilado. En una modalidad preferida más dicho oligonucleótido no metilado que contiene CpG es un CpG tipo A. En otra modalidad preferida dicho CpG tipo A comprende la secuencia GACGATCGTC (SEQ ID NO: 31). En otra modalidad más preferida, dicha secuencia palindrómica es flanqueada en su 5'-terminal y a sus 3'-terminal por entidades de guanosina. En otra modalidad más preferida, dicha secuencia palindrómica es flanqueada en sus 5 '-terminal por al menos 3 y a más de 15 entidades de guanosina, y en donde dicha secuencia palindrómica es flanqueada en su 3 '-terminal por al menos 3 y a más de 15 entidades de guanosina.

En otra modalidad preferida, dichas sustancias

inmunoestimulantes es un oligonucleótido no metilado CpG-
que contienen, y en donde preferentemente dicho
oligonucleótidos no metilado que contienen CpG compone de
una secuencia palindrómica, y en donde además
5 preferentemente el motivo CpG de dicho unmethylated
oligonucleótidos que contienen CpG es parte de una
secuencia palindrómico, y en donde otra vez más
preferentemente dicha secuencia palindrómico es GACGATCGTC
(SEQ ID NO: 31).

10 En una modalidad preferida más, dicho
inmunoestimulantes de ácido nucleico es un CpG no metilado
que contienen oligonucleótidos que consiste en la secuencia
GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 36), en donde
dicho oligonucleótidos no metilados que contienen CpG
15 consisten exclusivamente en enlaces fosfodiéster
nucleótidos.

Antígenos que son útiles a los efectos de la invención
se revelan por ejemplo en WO2002/056905A2, WO2004/007538A2,
WO2006/037787A2, WO2004/084940A1 y WO2006/032674A1. En una
20 modalidad, dicho antígeno se deriva de una fuente
seleccionada del grupo que consiste en: (a) virus; (b)
bacterias; (c) parásitos; (d) tumores; (e) moléculas
propias; (f) alérgenos de las moléculas (g) hapteno no-
peptídico; (h) hormonas; (i) citoquinas; (k) quimiocinas;
25 (l) péptidos biológicamente activas. En otra modalidad

preferida, dicho antígeno es un antígeno de tumor, un antígeno propio, un polipéptido de un patógeno, un alérgeno o un hapteno. En una modalidad aún más preferida, dicho antígeno es péptido gene-relacionado de la calcitonina (CGRP).

En una modalidad preferida más dicho antígeno es un antígeno de tumor, en donde antígeno preferentemente dicho antígeno de tumor es seleccionado del grupo consistente en: (a) un polipéptido de células de cáncer de mama; (b) un polipéptido de células de cáncer de riñón; (c) un polipéptido de células de cáncer de próstata; (d) un polipéptido de células de cáncer de piel; (e) un polipéptido de células cancerosas del cerebro; y (f) un polipéptido de células de leucemia.

En una modalidad preferida más dicho antígeno es un antígeno de tumor seleccionado del grupo consistente en: (a) Her2; (b) gangliósido GD2; (c) EGF-R; (d) antígeno carcino embrionario (CEA); (e) CD52; (f) CD21; (g) gp100 de melanoma humano; (h) melanoma humano melanA/MART-1; (i) análogo de melanA/MART-1 melanoma humano; (j) tirosinasa; (k) NA17-A nt; (l) MAGE3; (m) proteína p53; y (n) fragmentos antigénicos de cualquiera de los antígenos de tumor de (a) a (m).

En una modalidad preferida, dicho antígeno es un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: (a)

IgE, (b) IL-6 (c) receptor activador del ligando de factor
 nuclear kB (RANKL); (d) factor de crecimiento endotelial
 (VEGF); (e) receptor de factor de crecimiento endotelial
 (VEGF-R); factor de crecimiento de hepatocito (HGF) (f)
 5 interleuquina-1 α ; (g) interleuquina-1 β ; (h)
 interleuquina-5; (i) interleuquina-8; (j) inter leuquina-
 13; (k) interleuquina-15; (l) interleuquina-17 (IL - 17);
 (m) IL-23; (n) grelina; (o) angiotensina; (p) quimiocina
 (motivo de C-C) (CCL21); (q) quimiocina (motivo de C-x)
 10 (CXCL 12); (r) células estromales derivadas de factor 1
 (SDF-I); (s) factor estimulante de colonias de macrófagos
 (M-CSF); (t) proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-I);
 (u) endoglina; (v) resistina; (w) hormona liberadora de
 gonadotropina (GnRH); (x) hormona liberadora de crecimiento
 15 (GHRH); (y) hormona liberadora de hormona luteinizante
 (LHRH); (z) hormona liberadora de la tireopina (TRH);
 factor inhibitorio de la migración (aa) de macrófagos
 (MIF); péptido insulínotropo dependiente de glucosa de
 (bb) (GIP); (cc) eotaxina; bradicinina (dd); (ee) Des-Arg
 20 bradicinina; (ff) Linfocito b quimioatractivo (BLC);
 estimulantes de colonias de macrófagos (gg) factor de M-
 CSF; (hh) factor de necrosis tumoral α (TNF α); b péptido
 amiloide beta (A β 1-42); péptido beta amiloide de (jj) (A β 1-
 6); (kk) IgE humano; (ii) dominio extracelular de CCR5;
 25 dominio extracelular (mm) CXCR4; (nn) Gastrina; (oo) CETP;

(pp) C5a; (qq) receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); (rr) CGRP; (ss) sinucleína; péptido relacionado con el gen (tt) calcitonina (CGRP) (uu) Amylin o (vv) un fragmento de uno de los polipéptidos (a) a (uu);

5 En una modalidad más preferida dicho antígeno es un antígeno propio, en donde dicho antígeno propio es un polipéptido seleccionado del grupo consistente en: (a) IgE, (b) IL-6 (c) receptor activador del ligando de factor nuclear kB (RANKL); (d) factor de crecimiento endotelial
10 (VEGF); (e) receptor de factor de crecimiento endotelial (VEGF-R); factor de crecimiento de hepatocito (HGF) (f) interleuquina-1 α ; (g) interleuquina-1 β ; (h) interleuquina-5; (i) interleuquina-8; (j) interleuquina-13; (k) interleuquina-15; (l) interleuquina-17 (IL - 17);
15 (m) IL-23; (n) grelina; (o) angiotensina; (p) quimiocina (motivo de C-C) (CCL21); (q) quimiocina (motivo de C-x) (CXCL 12); (r) células estromales derivadas de factor 1 (SDF-I); (s) factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF); (t) proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-I);
20 (u) endoglina; (v) resistina; (w) hormona liberadora de gonadotropina (GnRH); (x) hormona liberadora de crecimiento (GHRH); (y) hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH); (z) hormona liberadora de la tireopina (TRH); factor inhibitorio de la migración (aa) de macrófagos
25 (MIF); péptido insulínico dependiente de glucosa de

(bb) (GIP); (cc) eotaxina; bradixinina (dd); (ee) Des-Arg bradixinina; (ff) Linfocito b quimioatrayente (BLC); estimulantes de colonias de macrófagos (gg) factor de M-CSF; (hh) factor de necrosis tumoral α (TNF α); b péptido amiloide beta (A β 1-42); péptido beta amiloide de (jj) (A β 1-6); (kk) IgE humano; (ii) dominio extracelular de CCR5; dominio extracelular (mm) CXCR4; (nn) Gastrina; (oo) CETP; (pp) C5a; (qq) receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); (rr) CGRP; (ss) sinucleína; péptido relacionado con el gen (tt) calcitonina (CGRP) (uu) Amylin o (vv) un fragmento de uno de los polipéptidos (a) a (uu).

En una modalidad muy preferida, dicho antígeno es interleucina 17 (IL-17). Interleucina 17 es una citoquina derivada de la célula T que induce la liberación de mediadores pro-inflamatorios en una amplia gama de tipos celulares. Las respuestas aberrantes de Th17 y la sobreexpresión de IL-17 se han implicado en un número de desordenes autoinmunes como artritis reumatoide y esclerosis múltiple. El bloqueo de IL-17 como anticuerpos monoclonales IL-17-específicos de moléculas han demostrado ser eficaces en el mejoramiento de la enfermedad en modelos animales. Por otra parte, la inmunización activa contra IL-17 se ha sugerido recientemente usando virus tipo partículas conjugadas con IL-17 recombinante (Röhn TA, et al., Eur J Immunol (2006) 36: 1-11). La inmunización con

IL-17-VLP inducida por altos niveles de anticuerpos anti-IL-17 tal modo supera la tolerancia natural, incluso en ausencia de adyuvante añadida. Los ratones inmunizados con IL-17-VLP tenían menor incidencia de la enfermedad, más
5 lenta progresión a la enfermedad y menores puntajes de severidad de la enfermedad en artritis inducida por colágeno y encefalomiелitis autoinmune experimental.

Así, en una modalidad aún más preferida, dicho antígeno comprende, o preferiblemente consta de SEQ ID NO:
10 42. Además, las composiciones inventivas que incluyen VLPs modificadas se utilizan en un método de tratar una enfermedad inflamatoria, de preferencia una enfermedad inflamatoria crónica en animales o humanos. Preferiblemente, dicha enfermedad inflamatoria es
15 seleccionada de RA, MS, Psoriasis, asma, Crohn, Colitis, EPOC, diabetes, neurodermatitis (dermatitis alérgica), otra vez preferiblemente donde enfermedad inflamatoria MS. Más preferentemente dicho antígeno de dichas composiciones inventivas comprende, o preferiblemente consta de SEQ ID
20 NO: 42.

En otra modalidad muy preferida, dicho antígeno es IL-5. Así, en una modalidad aún más preferida, dicho antígeno comprende, o preferiblemente consta de SEQ ID NO: 41. Además, las composiciones inventivas que incluyen VLPs
25 modificadas se utilizan en un método de tratar una

enfermedad inflamatoria, de preferencia una enfermedad inflamatoria crónica en animales o humanos. Preferiblemente, dicha enfermedad inflamatoria es seleccionada de RA, MS, Psoriasis, asma, Crohn, Colitis, EPOC, diabetes, neurodermatitis (dermatitis alérgica). Más preferentemente dicho antígeno de dichas composiciones inventivas comprende, o preferiblemente consta de SEQ ID NO: 41.

En otra modalidad muy preferida, dicho antígeno es IL-5 canino. En otra vez una modalidad adicional muy preferida, dicho antígeno comprende o preferentemente consiste en SEQ ID NO: 61 o una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 90%, preferentemente de al menos el 95% con SEQ ID NO: 61. Preferiblemente, dicho antígeno comprende, o preferiblemente consiste en SEQ ID NO: 61. En otra modalidad preferida, dicho antígeno de composición inventiva comprende, o preferiblemente consta de SEQ ID NO: 61. Más preferiblemente, la composición de la invención comprende (i) una partícula tipo virus modificada (VLP) del virus del mosaico del pepino (CMV) con al menos un primer sitio de unión, en donde dicha VLP modificada de CMV comprende, esencialmente consiste en o como alternativa consiste en, al menos un polipéptido modificado de CMV, en donde dicho polipéptido modificado de CMV comprende y

preferentemente consiste en (a) un polipéptido de CMV y (b) un epítipo de célula T ayudante; y en donde dicho polipéptido modificado de CMV comprende, preferiblemente consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o
5 SEQ ID NO: 7; (ii) al menos un antígeno con al menos un segundo sitio de unión, y en donde dicho antígeno de IL-5 canino; y en donde dicho VLP de CMV y dicho IL-5 canino están relacionados a través de dicho por lo menos un primero y dicho por lo menos un segundo sitio de unión, y
10 en donde dicho IL-5 canino comprende, o preferiblemente consiste en SEQ ID NO: 61 o una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 90%, preferentemente de al menos el 95% con SEQ ID NO: 61 , y otra vez en donde dicho IL-5 canino comprende, o
15 preferentemente consta de SEQ ID NO: 61.

En otra modalidad muy preferida, dicho antígeno es IL-4. Así, en una modalidad aún más preferida, dicho antígeno comprende, o preferiblemente consta de SEQ ID NO: 45.

En otra modalidad muy preferida, dicho antígeno es IL-4 canino. En otra vez una modalidad adicional muy
20 preferida, dicho antígeno comprende o preferentemente consiste en SEQ ID NO: 62 o una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 90%, preferentemente de al menos el 95% con SEQ ID NO: 62.
25 Preferiblemente, dicho antígeno comprende, o

preferiblemente consiste en SEQ ID NO: 62. En otra modalidad preferida, dicho antígeno de composición inventiva comprende, o preferiblemente consta de SEQ ID NO: 62. Más preferiblemente, la composición de la invención

5 comprende (i) una partícula tipo virus modificada (VLP) del virus del mosaico del pepino (CMV) con al menos un primer sitio de unión, en donde dicha VLP modificada de CMV comprende, esencialmente consiste en o como alternativa consiste en, al menos un polipéptido modificado de CMV, en

10 donde dicho polipéptido modificado de CMV comprende y preferentemente consiste en (a) un polipéptido de CMV y (b) un epítipo de célula T ayudante; y en donde dicho polipéptido modificado de CMV comprende, preferiblemente consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o

15 SEQ ID NO: 7; (ii) al menos un antígeno con al menos un segundo sitio de unión, y en donde dicho antígeno de IL-4 canino; y en donde dicho VLP de CMV y dicho IL-4 canino están relacionados a través de dicho por lo menos un primero y dicho por lo menos un segundo sitio de unión, y

20 en donde dicho IL-4 canino comprende, o preferiblemente consiste en SEQ ID NO: 62 o una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 90%, preferentemente de al menos el 95% con SEQ ID NO: 62 , y

otra vez en donde dicho IL-4 canino comprende, o

25 preferentemente consta de SEQ ID NO: 62.

En otra modalidad muy preferida, dicho antígeno es IL-13. Así, en una modalidad aún más preferida, dicho antígeno comprende, o preferiblemente consta de SEQ ID NO: 46.

En otra modalidad muy preferida, dicho antígeno es IL-13 canino. En otra vez una modalidad adicional muy preferida, dicho antígeno comprende o preferentemente consiste en SEQ ID NO: 63 o una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 90%, preferentemente de al menos el 95% con SEQ ID NO: 63. Preferiblemente, dicho antígeno comprende, o preferiblemente consiste en SEQ ID NO: 63. En otra modalidad preferida, dicho antígeno de composición inventiva comprende, o preferiblemente consta de SEQ ID NO: 63. Más preferiblemente, la composición de la invención comprende (i) una partícula tipo virus modificada (VLP) del virus del mosaico del pepino (CMV) con al menos un primer sitio de unión, en donde dicha VLP modificada de CMV comprende, esencialmente consiste en o como alternativa consiste en, al menos un polipéptido modificado de CMV, en donde dicho polipéptido modificado de CMV comprende y preferentemente consiste en (a) un polipéptido de CMV y (b) un epítipo de célula T ayudante; y en donde dicho polipéptido modificado de CMV comprende, preferiblemente consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7; (ii) al menos un antígeno con al menos un

segundo sitio de unión, y en donde dicho antígeno de IL-13 canino; y en donde dicho VLP de CMV y dicho IL-13 canino están relacionados a través de dicho por lo menos un primero y dicho por lo menos un segundo sitio de unión, y
5 en donde dicho IL-13 canino comprende, o preferiblemente consiste en SEQ ID NO: 63 o una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 90%, preferentemente de al menos el 95% con SEQ ID NO: 63 , y otra vez en donde dicho IL-13 canino comprende, o
10 preferentemente consta de SEQ ID NO: 63.

En una modalidad muy preferida, dicho antígeno es TNF.
En una modalidad muy preferida, dicho antígeno es IL-1.

En una modalidad muy preferida, dicho antígeno es IL-1. En otra modalidad aún más preferida, dicho antígeno
15 comprende, o preferiblemente consta de SEQ ID NO: 60.

En otra vez una modalidad muy preferida dicho antígeno es un péptido derivado de A1-42. En otra vez una modalidad muy preferida dicho antígeno es IgE o un péptido o dominio comprendido en IgE.

20 En otra modalidad muy preferida, dicho antígeno es IL-31 humano, felino o canino. En otra modalidad aún más preferida, dicho antígeno comprende, o preferiblemente consta de SEQ ID NO:43 o SEQ ID NO: 44. En otra modalidad muy preferida, dicho antígeno es IL-31 canino. En otra vez
25 una modalidad adicional muy preferida, dicho antígeno

comprende o preferentemente consiste en SEQ ID NO: 43 o una
secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de
al menos 90%, preferentemente de al menos el 95% con SEQ ID
NO: 43. Preferiblemente, dicho antígeno comprende, o
5 preferiblemente consiste en SEQ ID NO: 43. En otra
modalidad preferida, dicho antígeno de composición
inventiva comprende, o preferiblemente consta de SEQ ID NO:
43. Más preferiblemente, la composición de la invención
comprende (i) una partícula tipo virus modificada (VLP) del
10 virus del mosaico del pepino (CMV) con al menos un primer
sitio de unión, en donde dicha VLP modificada de CMV
comprende, esencialmente consiste en o como alternativa
consiste en, al menos un polipéptido modificado de CMV, en
donde dicho polipéptido modificado de CMV comprende y
15 preferentemente consiste en (a) un polipéptido de CMV y (b)
un epítipo de célula T ayudante; y en donde dicho
polipéptido modificado de CMV comprende, preferiblemente
consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o
SEQ ID NO: 7; (ii) al menos un antígeno con al menos un
20 segundo sitio de unión, y en donde dicho antígeno de IL-31
canino; y en donde dicho VLP de CMV y dicho IL-31 canino
están relacionados a través de dicho por lo menos un
primero y dicho por lo menos un segundo sitio de unión, y
en donde dicho IL-31 canino comprende, o preferiblemente
25 consiste en SEQ ID NO: 43 o una secuencia de aminoácidos

con una identidad de secuencia de al menos 90%, preferentemente de al menos el 95% con SEQ ID NO: 43 , y otra vez en donde dicho IL-31 canino comprende, o preferentemente consta de SEQ ID NO: 43.

5 En otra modalidad muy preferida, dicho antígeno es sinucleína, o un péptido derivado de sinucleína, y en donde preferiblemente dicho péptido consiste de 6 a 14 aminoácidos, y en donde además preferiblemente dicho antígeno es un péptido derivado de sinucleína seleccionada
10 de cualquiera de SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:34. Preferido otros péptidos derivados de sinucleína se comuniquen en WO 2011/020133, que se incorpora en el presente documento a modo de referencia.

 Alfa-sinucleína (α -Syn), una proteína con múltiples
15 funciones fisiológicas y patológicas, es una de las proteínas dominantes encontrados en los cuerpos de Lewy, una característica patológica de trastornos del cuerpo de Lewy, incluyendo enfermedad de Parkinson (EP). Más recientemente, α -Syn se ha encontrado en los fluidos
20 corporales, incluyendo sangre y líquido cerebroespinal y probablemente es producido por los tejidos periféricos y el sistema nervioso central. Intercambio de α -Syn entre el cerebro y tejidos periféricos podría tener importantes implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas (Gardai SJ et
25 al., PLoS ONE (2013) 8(8): e71634). Las pruebas que

comprometen a alfa-sinucleína (una síntesis) en la patogenicidad de la enfermedad de Parkinson (EP) son abrumadora. Sin embargo, no hay un consenso claro sobre la manera en la cual a-syn lleva a patología en PD y otras sinucleinopatías.

Alfa-sinucleína es un componente importante de cuerpos de Lewy (LBs), y abundan las descripciones de a-syn sobreexpresión conduce a la agregación. Los datos genéticos humanos han demostrado que las mutaciones sin sentido y duplicaciones en el gene de a-syn causan PD familiar. En el caso de la multiplicación del gen, aumento en los niveles de proteína de a-syn se presume en una dominante ganar-de-función que conduce a la patología. Mientras que los niveles elevados de un syn pueden conducir a la agregación y toxicidad, investigación en los últimos años también ha revelado que un syn elevado puede interferir con la creación, localización y mantenimiento de piscinas de vesícula (Gardai SJ et al., PLoS ONE (2013) 8(8): e71634; y referencias citadas en él.

En otra vez un adicional muy preferido embodiment, dicho antígeno es Amylin. En una modalidad muy preferida dicho antígeno es angiotensina I o un péptido derivado de angiotensina I. En otro embodiment muy preferida, dicho antígeno es angiotensina II o un péptido derivado de la angiotensina II. En una modalidad muy preferida Además,

dijo que el antígeno es GnRHn un adicional muy preferido modalidad, dicho antígeno es eotaxin.

En una modalidad preferida más dicho antígeno es un polipéptido de un parásito, en donde preferiblemetne dicho patógeno se selecciona del grupo que consiste en: (a) 5 Toxoplasma spp.; (b) Plasmodium falciparum; (c) Plasmodium vivax; (d) Plasmodium ovale; (e) Plasmodium malariae; (f) Leishmania; (g) Schistosoma y (h) Nematodes. Preferiblemente, dicho antígeno se deriva de Plasmodium 10 falciparum o Plasmodium Vivax.

En una modalidad preferida más dicho antígeno es un polipéptido de una bacteria, en donde preferiblemetne dicha bacteria se selecciona del grupo que consiste en: (a) Chlamydia (b) Streptococcus; (c) Pneumococcus; (d) 15 Staphylococcus; (e) Salmonella; (f) Mycobacteria; (g) Clostridia (h) Vibrio (i) Yersinia (k) Meningococcus (l) Borelia.

En una modalidad más preferida dicho antígeno es un antígeno viral, en donde dicho antígeno viral es un polipéptido seleccionado del grupo consistente en: (a) VIH 20 y otras retrovirus; (b) virus de la influenza, preferiblemente dominio extracelular gripe A M2 o dominio globular HA o HA; (c) un polipéptido de virus de la Hepatitis B, preferiblemente preS1; (d) virus de la 25 Hepatitis C; (e) HPV, preferiblemente HPV16E7 (f) RSV, (g)

SARS y otros coronavirus, (h) Dengue y otros Flavivirus, como el Virus del Nilo Occidental y Virus de la enfermedad de manos pies y boca, (i) Chikungunya y otros alfavirus. (k) CMV y otros Herpesvirus, (l) Rotavirus. En una
5 modalidad aún más preferida, dicho antígeno es el derivado de RSV.

En una modalidad preferida, dicho antígeno es el dominio extracelular de la proteína de M2 del virus de Influenza A, o mismo un fragmento antigénico. En una
10 modalidad muy preferida, dicho antígeno comprende o preferentemente consiste en el dominio extracelular de la proteína M2 del virus de Influenza A, en donde dijo preferiblemente dominio extracelular del proteína M2 del virus de la gripe es SEQ ID NO: 24. En otra modalidad
15 preferida, dicho antígeno es el dominio globular del virus de la gripe.

En una modalidad más preferida dicho antígeno es un alérgeno, en donde preferentemente dicho alérgeno se deriva el grupo formado por: (a) Extracto de polen; (b) polvo
20 Extracto; (c) Extraiga el ácaro del polvo; (d) fungicida Extracto; (e) extracto epidermis de mamíferos; (f) Extracto de la pluma; (g) Extracto de insectos; (h) comida de extracto; (i) Extracto de pelo; (j) Extracto de saliva; y (j) extracto de suero. En una modalidad más preferida dicho
25 antígeno es un alérgeno, en donde preferentemente dicho

alérgeno se selecciona del grupo que consiste de: (a) árboles; (b) gramíneas; (c) polvo; (d) ácaro del polvo de casa; (e) aspergillus; (f) pelo; (g) animal pluma; (h) veneno de la abeja; (i) productos animales; (j) productos vegetales; (k) caspa animal; (l) alérgenos cacahuates.

En una modalidad más preferida dicho antígeno es un alérgeno recombinante, en donde preferentemente dicho alérgeno se selecciona del grupo que consiste de: (a) abeja veneno fosfolipasa A2; (b) polen de ambrosía Amb a 1; (c) polen de abedul apuesta v I; (d) blanca hornet frente veneno 5 DoI m V; (e) ácaro del polvo de casa Der p 1; (f) ácaro del polvo de casa Der f 2; (g) ácaro del polvo casa Der p 2; (h) ácaro del polvo de Lep d; (i) alérgeno hongos Alt a 1; (j) alérgeno hongos Asp f 1; (k) alérgeno hongos Asp f 16; (l) alérgeno de gato de alérgenos maní (m) Fel d1; (n) alérgenos canina Can f1, f2 puede los alérgenos derivados de maní (o); o (p) cedro japonés alérgeno grito J2. En otra modalidad muy preferida de la invención presente, dicho antígeno alérgeno de perro es Can f1 o Can f2.

En una modalidad aún más preferida, dicho antígeno es un alérgeno cacahuete. Preferiblemente, dicho antígeno es un alérgénico cacahuete que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 64 o SEQ ID NO: 65.

En una modalidad aún más preferida, dicho antígeno es un alérgeno derivado del Cedro Japonés Cry J2. Preferiblemente, dicho antígeno derivado de cedro japonés Cry J 2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55.

En una modalidad aún más preferida, dicho antígeno es un alérgeno derivado del polen de ambrosía Amb a 1. Preferiblemente, dicho antígeno derivado de polen de ambrosía Amb a 1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54.

En otra modalidad muy preferida de la invención presente, dicho antígeno alérgeno de gato es Fel d1. El gato doméstico (*Felis domesticus*) es una fuente importante de alérgenos interior (Lau, S., et al. (2000) Lancet 356, 1392-1397). De hecho, los gatos se encuentran en aproximadamente el 25% de los hogares en los países occidentales y la alergia a los gatos se encuentra en una gran parte de la población. La severidad de los síntomas van desde rinitis y conjuntivitis relativamente leve a exacerbación asmática potencialmente mortal. Aunque pacientes ocasionalmente son sensibilizados a varias moléculas diferentes en caspa de gato y las pieles, el alergénico principal es Fel d1. La importancia de este alérgeno ha sido destacada en numerosos estudios. De hecho más del 80% de pacientes alérgicos gato presentan

anticuerpos IgE a este alérgeno potente (van Ree, R., et al. (1999) J. Allergy Clin Immunol 104, 1223-1230).

Fel d1 es una glicoproteína ácida de 35-39 kDa, que contiene hidratos de carbono N-ligados de 10-20% y se encuentra en la piel, saliva y glándulas lacrimales de los gatos. Está formado por dos heterodímeros no covalentemente enlazados. Cada heterodímero consiste en un 70 residuo péptido (conocido como "cadena 1") y un 78, 85, 90 o péptido residuo 92 (conocido como "cadena 2") que están codificadas por genes separados (see Duffort, O. A., et al. (1991) Mol Immunol 28, 301-309; Morgenstern, J. P., et al; (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88, 9690-9694 and Griffith, I. J., et al. (1992) Gene 113, 263-268).

Se han descrito varios constructos recombinantes de Fel d1 (Vailes LD, et al., J Allergy Clin Immunol (2002) 110:757-762; Grönlund H, et al., J Biol Chem (2003) 278:40144-40151; 2003Schmitz N, et al., J Exp Med (2009) 206:1941-1955; WO2006/097530).

En una modalidad aún más preferida, dicho antígeno es rFel d1. En una modalidad muy recomendada, dicho antígeno es una proteína de Fel d1, en donde dicho la Fel d1 es una proteína de fusión que comprende 1 de Fel d1 y cadena 2 cadena de Fel d1, en donde dicha cadena 2 de Fel d1 está fusionada a través de su terminal C a la N-terminal de dicha cadena 1 de Fel d1 directamente a través de un enlace

peptídico, o a través de un espaciador , en donde dicho separador consiste en una secuencia de aminoácidos con residuos de aminoácidos 1-20, en donde preferentemente dicho separador consiste en una secuencia de aminoácidos con 10 a 20 residuos de aminoácidos. Muy preferentemente, dicho separador consiste en una secuencia de aminoácidos de 15 residuos de aminoácidos, y más preferiblemente dicho espaciador tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47. En una modalidad muy recomendada, dicho antígeno es una proteína de Fel d1, en donde la Fel d1 es una proteína de fusión que comprende 1 de Fel d1 y cadena 2 de Fel d1, en donde dicha cadena 1 de Fel d1 está fusionada a través de su terminal C a la N-terminal de dicha cadena 2 de Fel d1 directamente a través de un enlace peptídico, o a través de un espaciador , en donde dicho separador consiste en una secuencia de aminoácidos con residuos de aminoácidos 1-20, en donde preferentemente dicho separador consiste en una secuencia de aminoácidos con 10 a 20 residuos de aminoácidos. Preferiblemente, la cadena 1 de Fel d1 compone de una secuencia de SEQ ID NO: 37 o una secuencia de homólogo mismo, en donde dicho homólogo secuencia tiene una identidad a la SEQ ID NO: 37 de aún más preferiblemente más del 95% o más de 90%. Más preferiblemente, la cadena 2 de Fel d1 compone de una secuencia SEQ ID NO: 38 SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 40, y

una secuencia de homólogo, en donde dicho homólogo secuencia tiene una identidad que SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 40 de más del 90% y más preferiblemente más del 95%.

5 En una modalidad aún más preferida, dicho antígeno comprende, o preferiblemente consta de SEQ ID NO: 17. En otra modalidad aún más preferida, dicho antígeno comprende, o preferiblemente consta de SEQ ID NO: 18. En otra modalidad aún más preferida, dicho antígeno comprende, o
10 preferiblemente consta de SEQ ID NO: 52. En una modalidad muy preferida dicho antígeno es una proteína de Fel d1 que comprende una secuencia de aminoácidos de: (a) SEQ ID NO:17; (b) SEQ ID NO:18; (c) SEQ ID NO:50; (d) SEQ ID NO:56; (e) SEQ ID NO:59; o SEQ ID NO:52.

15 En una modalidad muy preferida dicha proteína de Fel d1 comprende una secuencia de aminoácidos de: (a) SEQ ID NO:50; (b) SEQ ID NO:56 (c) SEQ ID NO:59; o (d) SEQ ID NO:52. En una modalidad muy preferida dicha proteína de Fel d1 comprende una secuencia de aminoácidos de: (a) SEQ ID
20 NO:50; (b) SEQ ID NO:56 o (c) SEQ ID NO:59.

 En otra modalidad muy preferida, dicha proteína Fel d1 comprende, preferiblemente consiste de, una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52. En otra modalidad muy preferida, dicha proteína Fel d1 comprende, preferiblemente
25 consiste de, una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59.

En otra modalidad muy preferida, dicha proteína Fel d1 comprende, preferiblemente consiste de, una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50. En otra modalidad muy preferida, dicha proteína Fel d1 comprende, preferiblemente
5 consiste de, una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56.

Más preferiblemente, la composición de la invención comprende (i) una partícula tipo virus modificada (VLP) del virus del mosaico del pepino (CMV) con al menos un primer sitio de unión, en donde dicha VLP modificada de CMV
10 comprende, esencialmente consiste en o como alternativa consiste en, al menos un polipéptido modificado de CMV, en donde dicho polipéptido modificado de CMV comprende y preferentemente consiste en (a) un polipéptido de CMV y (b) un epítipo de célula T ayudante; y en donde dicho
15 polipéptido modificado de CMV comprende, preferiblemente consiste de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7; (ii) al menos un antígeno con al menos un segundo sitio de unión, y en donde dicho antígeno de IL-5 canino; y en donde dicho VLP de CMV y dicho IL-5 canino
20 están relacionados a través de dicho por lo menos un primero y dicho por lo menos un segundo sitio de unión, y en donde dicho IL-5 canino comprende, o preferiblemente consiste en SEQ ID NO: 61 o una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 90%,
25 preferentemente de al menos el 95% con SEQ ID NO: 52 , y

otra vez en donde dicho IL-5 canino comprende, o preferentemente consta de SEQ ID NO: 61. (a) SEQ ID NO:50; (b) SEQ ID NO:56 o (c) SEQ ID NO:59.

En una modalidad preferida más dicho antígeno es un veneno de animales. En una modalidad preferida, el antígeno es el veneno de serpiente inactivada. En una modalidad preferida más dicho antígeno es un hapteno. En una modalidad preferida más dicho hapteno es una droga, en donde preferentemente dicha droga es seleccionada del grupo consistente en: (a) codeína; (b) fentanilo; (c) heroína; (d) morfina; (e) anfetamina; (f) cocaína; (g) metilendioximetanfetamina; (h) metanfetamina; (i) metilfenidato; (j) nicotina; (k) LSD; (l) mescalina; (m) psilocibina; (n) tetrahidrocannabinol; y (o) la nicotina.

En una modalidad preferida más dicho hapteno es una hormona, en donde preferentemente dicha hormona es seleccionada del grupo consistente en: (a) progesterona; (b) estrógeno; (c) testosterona; (d) hormona folículo estimulante; (e) melanina estimulando la hormona; (f) adrenalina; y (g) noradrenalina. En una modalidad preferida más dicho hapteno es una toxina, en donde preferentemente dicha toxina es seleccionada del grupo consistente en: (a) aflatoxina; (b) toxina ciguetera; (c) tetrodotoxina; y (d) antibióticos. En una modalidad preferida más dicho hapteno es un carbohidrato derivado de patógeno.

En otro aspecto, la invención proporciona una vacuna que incluye o como alternativa que consiste en las partículas de tipo virus modificada de la invención o de la composición de la invención. Se abarcan vacunas en donde
5 las VLPs modificadas, y/o dicha composición comprende cualquiera de las características técnicas divulgadas en este documento, ya sea solas o en cualquier combinación posible. en una modalidad, la vacuna comprende además un adyuvante. en una modalidad más, la vacuna comprende está
10 desprovista de un adyuvante. En una modalidad preferida dicha vacuna comprende una cantidad efectiva de la composición de la invención. Una "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad que debe administrarse a un sujeto para alcanzar un efecto fisiológico detectable.

15 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende: (a) una VLP modificada de la invención, una composición de la invención, o una vacuna de la invención; y (b) portador farmacéuticamente aceptable, diluyente o excipientes. Dicho
20 diluyente incluye solución estéril acuosa (p. ej., suero fisiológico) o soluciones no-acuosas y suspensiones. Ejemplos de excipientes no acuosos incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como
25 etiloleato. Los portadores o vendajes oclusivos pueden

utilizarse para aumentar la permeabilidad de la piel y mejorar la absorción del antígeno. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser en una forma que contiene sales, tampones, coadyuvantes u otras sustancias que son deseables para mejorar la eficacia del conjugado. Ejemplos de materiales adecuados para uso en la preparación de composiciones farmacéuticas se encuentran en numerosas fuentes, incluyendo ciencias farmacéuticas de Remington (Osol, A, ed., Mack Publishing Co., (1990)). En una modalidad dicha composición farmacéutica comprende una cantidad efectiva de la vacuna de la invención. Una "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad que debe administrarse a un sujeto para alcanzar un efecto fisiológico detectable.

Otro aspecto de la invención es un método de vacunación que comprende administrar una VLP modificada de la invención, una composición de la invención, una vacuna de la invención, o una composición farmacéutica de la invención a un animal o un humano. En una modalidad preferida dicho método comprende administrar una composición de la invención, una vacuna de la invención, o una composición farmacéutica de la invención a un animal o un humano.

Otro aspecto de la invención es un método de tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o estado fisiológico de

un animal dicho método que comprende administrar una VLP modificado de la invención, una composición de la invención, una vacuna de la invención, o una composición farmacéutica de la invención para dicho animal, en donde
5 preferentemente dicho animal puede ser un ser humano. En una modalidad preferida más dicho VLP modificada, dicha composición, dicha vacuna o dicha composición farmacéutica es administrar a dicho animal por vía subcutánea, intravenosa, por vía intradérmica, vía intranasal, oral,
10 intranodal o transdérmica.

EJEMPLOS

15

EJEMPLO 1

Aislamiento y Clonación de una Proteína de Recubrimiento (CP) del Virus del Mosaico del Pepino (CMV)

El ARN total total de hojas de lirio infectadas por
20 CMV recolectadas de un jardín privado en Riga, Latvia, se aisló usando reactivo TRI (Sigma, San Luis, EUA) según las recomendaciones del fabricante. Para la síntesis de ADNc, se utilizó el kit OneStep RT-PCR (Qiagen, Venlo, Países Bajos). Para la amplificación del gen CP de CMV, las
25 secuencias de la cartilla fueron elegidas tras análisis de

secuencias de CMV del GenBank: CMcpF (CACCATGGACAAATCTGAA
TCAACCAGTGCTGGT) (SEQ ID NO: 8) y CMcpR
(CAAAGCTTATCAAACTGGGAGCA CCCCAGATGTGGGA) (SEQ ID NO:9);
sitios subrayados de NcoI y HindIII. Los correspondientes
5 productos de PCR fueron clonados en el vector de pTZ57R/T
(Fermentas, Vilnius, Lituania). Se utilizaron células XL1-
Blue de *E. coli* como anfitrión para la amplificación de la
clonación y plásmido. Para evitar errores de RT-PCR, fueron
ordenados varios clones del plásmido de pTZ57 que contiene
10 el gen del CP usando un kit de secuenciación de ciclo
BigDye y un analizador genético de ABI Prism 3100 (Applied
Biosystems, Carlsbad, EUA). Después de ordenar, el ADNc del
gen CP de CMV sin errores de secuencia (SEQ ID NO: 10) que
codifica para la proteína de recubrimiento del CMV de SEQ
15 ID NO: 1 entonces se subclonó en los sitios de
Brochothrix/HindIII del vector de expresión de pET28a(+)
(Novagen, San Diego, EUA), dando por resultado el plásmido
de expresión pET-CMVwt (Fig. 1).

20 EJEMPLO 2

Expresión de CP de SEQ ID NO: 1 en *E. coli* que conduce a VLPs de CMV

Para obtener VLPs de CMV, células C2566 *E. coli* (New
England Biolabs, Ipswich, Estados Unidos) fueron
25 transformadas con la CP de CMV que contiene el gen plásmido

pET-CMVwt. Después de la selección de clones con los más altos niveles de expresión de la proteína diana, cultivos de *E. coli* fueron cultivadas en medio 2xTY con kanamicina (25 mg/l) en un agitador rotatorio (200 rev/min; Infors, Bottmingen, Suiza) a 30° a una OD600 de 0.8 - 1.0. Luego, las células fueron inducidas con IPTG de 0.2 mM, y el medio fue suplementado con 5 mM MgCl₂. La incubación fue continuada en el agitador rotatorio a 20°C por 18 h. La biomasa resultante fue colectada por centrifugación a baja velocidad y se congeló a -20°C. Después de descongelar el hielo, las células fueron suspendidas en el tampón que contiene 50 mM citrato de sodio, borato de sodio 5 mM, 5 mM EDTA, 5 mM mercaptoetanol (pH 9.0, tampón A) y se interrumpen por tratamiento ultrasónico. Se eliminaron los residuos insolubles de proteínas y células por centrifugación (13,000 rpm, 30 min a 5°C). La proteína soluble de la CP de CMV en lisado aclarado fue peleteada con sulfato de amonio saturado (1:1, vol/vol) durante la noche a + 4°C. Las proteínas precipitadas fueron solubilizadas en el mismo tampón A (sin mercaptoetanol) durante 4 h a + 4°C. Las proteínas insolubles fueron quitadas por centrifugación a baja velocidad (13,000 rpm, 15 min a 4°C). La solución de proteína soluble que contiene el CP de CMV fue separada de las proteínas celulares por ultracentrifugación (rotor SW28, Beckman, Palo Alto,

Estados Unidos; a 25,000 rpm, 6 h, 5°C) en un gradiente de sacarosa (20 -60% de sacarosa en solución tampón A, sin mercaptoetanol, suplementado con 0.5% de Tritón X-100). El gradiente fue dividido en seis fracciones, comenzando en la parte inferior del gradiente, y las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE (Fig. 2). Las fracciones No.2 y No.3 con CMV CP recombinante se combinaron y se dializaron contra 200 volúmenes de tampón (5 mM de borato de sodio, EDTA 2 mM, pH 9.0) para extraer la sacarosa y Triton X-100. Después de la diálisis, la solución CP CMV fue esterilizada por filtración a través del filtro de 0.2µ. A continuación, CP CMV se concentró mediante ultracentrifugación de rotor Type70 (Beckman, Palo Alto, EUA) por el 20% de "amortiguador" de sacarosa en condiciones estériles (de 50,000 rpm, 4 h, + 5°C). La concentración de CMVwt purificada se estimó utilizando el fluorómetro QuBit según recomendaciones del fabricante (Invitrogen, Eugene, EUA). Soluciones concentradas de VLP (aprox. 3 mg/ml) se almacenaron a 4°C en tampón de borato de sodio, EDTA 2 mM, 5 mM (pH 9.0). Todos los pasos implicados en la expresión y purificación de VLP se monitorearon por SDS-PAGE utilizando geles de 12.5%.

Como se muestra en la Figura 2, la proteína de recubrimiento de CMV puede expresarse con éxito en células de *E. coli* y la parte significativa obtenida puede ser en

fracción soluble. Además, estas proteínas se encuentran en extractos celulares de *E. coli* en forma de VLPs isométricas, según lo demostrado por análisis de gradiente de sacarosa (Fig. 3A), dispersión de luz dinámica y análisis por microscopía electrónica (Fig. 3B).

EJEMPLO 3

Clonación de una proteína de recubrimiento modificada de CMV que contiene un epítipo de toxoide tetánico (CMV-Ntt830)

Para sustituir los aminoácidos originales en el N-término de CP de CMV de la SEQ ID NO:1 contra las secuencias de epítopos extraños, como una plantilla para la amplificación y mutagénesis de PCR, se utilizó el plásmido de pET-CMVwt. Internamente en CMVwt el gen situado en el sitio SalI (Fig. 1) se usó para clonar los productos de PCR correspondientes.

Para introducir la secuencia de codificación de toxoide tetánico en el gen CMVwt, fue necesaria mutagénesis de PCR de dos pasos. Para la amplificación del primer paso se usaron las siguientes plantillas para PCR: pET-220 (AGCACCGCCGCCGCAAGGAA (SEQ ID NO: 11) -hacia arriba del polireticulador, la región amplificada incluye el sitio BglII) y CMV-tt83-1R (ATTTGGAGTTGGCCTTAATATACT GGCCCATGGTATATCTCCTTCTTAAAGT) (SEQ ID NO:12). Para la

segunda ronda el producto de PCR de la primera ronda se diluyó 1:50 y se re-amplificó con cebadores pET-220 (SEQ ID NO: 11) y CMV-tt83Sal-R2 (GACGTCGACGCTCGGTAATCCCGATAAATTTGGAGTTG GCCTTAATATACTG) (SEQ ID NO:13). El producto resultante de la polimerización en cadena (cDNA de SEQ ID NO: 14 codificación para CMV-Ntt830 de SEQ ID NO: 6) fue subclonado en sitios BglIII/SaLI de pET-CMVwt. El clon correcto fue identificado por la secuencia y señalado como pET-CMV-Ntt830.

10

EJEMPLO 4

Expresión de CMV-Ntt830 en *E coli* que conduce a VLPs de CMV modificadas

Los procedimientos para la expresión y purificación de CMV-Ntt830 fueron esencialmente los mismos que para CMVwt y se describen en el Ejemplo 2. Para demostrar la presencia epitopo de tétanos en VLPs de CMV, se usó el análisis de espectrometría de masa de los VLPs de CMV-Ntt830 purificado. Como se muestra en la figura 4, el pico principal obtenido corresponde a la masa molecular teórica de la proteína si la primera metionina se retira durante la síntesis proteica en células de *e. coli*. Dispersión de luz dinámica y análisis de microscopía electrónica confirman la morfología de partícula isométrica similar a VLPs de CMVwt (FIG. 5).

25

EJEMPLO 5

Clonación de una proteína de recubrimiento modificada de CMV que contiene un epítipo de PADRE5 **(CMV-Npadr)**

Para introducir la secuencia de codificación del epítipo de PADRE en el gen de CMVwt, mutagénesis PCR se llevó a cabo utilizando como plantilla para la amplificación y subclonación el plásmido pET-CMVwt (véase también el

10 ejemplo 3). Para la amplificación se usaron las siguientes plantillas: pET-220 (SEQ ID NO: 11) y CMV-padrSal-R (GACGTCGACGCGCGGCCGCCTTGAGGGTCCACGCGGCCACAAATTT CGCCATGGT) (SEQ ID NO:15). El producto resultante de la PCR (cdNA de SEQ ID NO: 16 codificación para CMV-Npadr de SEQ ID NO: 7)

15 fue otra vez subclonado en sitios BglIII/SaLI de pET-CMVwt. El clon correcto fue identificado por la secuencia y señalado como pET-CMV-Npadr.

EJEMPLO 6

20 **Expresión de CMV-Npadr en *E coli* que conduce a VLPs de CMV modificadas**

Los procedimientos para la expresión y purificación de CMV-Npadr fueron esencialmente los mismos que para CMVwt y se describen en el Ejemplo 2. Para demostrar la presencia

25 epítipo de PADRE en VLPs de CMV, se usó el análisis de

espectrometría de masa de los VLPs de CMV-Npadr purificado. Como se muestra en la figura 4B, el pico principal obtenido corresponde a la masa molecular teórica de la proteína si la primera metionina se retira durante la síntesis proteica en células de *e. coli*. Dispersión de luz dinámica y análisis de microscopía electrónica confirman la morfología de partícula isométrica que es ligeramente diferente de CMVwt y VLPs de CMV-Nt830 (FIG. 6).

10 EJEMPLO 7

Inmunización de ratones con CMVwt,CMV-Ntt830 y CMV-Npadr

Grupos de cuatro ratones Balb/c hembra fueron inmunizados con VLP de CMVwt, CMV-Npadr y VLP de CMV-Ntt830. Las VLPs fueron formuladas en 150 mM de PBS, pH 7.4 y 150 µl fueron inyectados i.v. el día 0 y día 7. CMVwt, VPL de CMV-Npadr y VLP de CMV-Ntt830 se inyectaron en tres cantidades: 10, 1 o 0.1. Los ratones fueron sangrados en días 0 (pre-inmune), día 7, día 14 y día 25, y los sueros se analizaron usando CMVwt VLPs, CMV-Npadr VLP y CMV-Ntt830 VLP - ELISA específica. Todos los sueros inmunes fueron probados contra las VLPs respectivas utilizadas para la inmunización.

ELISA

25 La respuesta de anticuerpos en suero de ratón fueron

analizadas en el tiempo indicado. Para la determinación de títulos específicos de CMVwt, VLP de CMV-Npadr y VLP de CMV-Ntt830, se recubrieron placas de ELISA (Nunc Immuno MaxiSorp, Rochester, NY) durante la noche a 4°C con 100 µl de la VLP correspondiente (1 µg/ml) en tampón de recubrimiento (0.1 M de tampón de carbonato de hidrógeno de sodio, pH 9.6). Con el fin de evitar el enlace no específico las placas ELISA se bloquearon con 200 µL de BSA al 2% en SAFT y se incubaron durante 2 horas a TA. Los sueros se diluyeron en 2% de BSA/SAFT. El suero previamente diluido fue transferido en las placas recubiertas y más serial diluido para obtener títulos de anticuerpos con cálculo de OD50. Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, las placas de ELISA se lavaron 5 x con 200 µL de SAFT. La unión de los anticuerpos del suero fue detectada por IgG anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de caballo-rábano (Jackson ImmunoResearch). El anticuerpo de detección fue diluido 1:1000 en 2% de BSA/Saft y un volumen de 100 µl por cada muestra fue transferido. Las placas se incubaron durante 1 hora a TA. Las placas de ELISA se lavaron como se describe antes. Antes de lavar la solución de sustrato fue preparada. Para ello, 1 tableta (10 mg) de OPD (dihidrocloreuro de 1,2-fenilendiamina) y 9 µl de 30% de H₂O₂ se disolvió en 25 ml de tampón de ácido cítrico (0.066 M de Na₂HPO₄, 0.035 M de

ácido cítrico, pH 5.0). Un volumen de 100 µl de la solución sustrato se pipetea en las placas y se incubó exactamente durante 7 minutos a TA. Para detener la reacción de 50 µl de solución de parada (5% H₂SO₄ en H₂O) se pipetea directamente sobre las placas. Las lecturas de absorbancia a 450 nm de la reacción de color dihidrocloruro de 1,2-fenilendiamina fueron analizados. La Figura 7 demuestra anticuerpos específicos para CMVwt (FIG. 7A), -CMV-Npadr (FIG. 7B) y CMV-Ntt880 (FIG. 7C) de una manera dependiente de la dosis.

EJEMPLO 8

Acoplamiento de constructos recombinantes de Fel d1 a VLP de CMV-Npadr y VLP de CMV-Ntt830 e inducción de respuestas inmunes

Una fusión covalente de rFel d1 (SEQ ID NO: 17 fue generada como se describió anteriormente (Schmitz N, et al., 206:1941 J Exp Med (2009)-1955). En breve, un ADN complementario que codifica un dímero covalente de cadena 2 y cadena 1, ewn donde la cadena 2 de Fel d1 se fusiona vía su C-término al N-término de la cadena 1 de Fel d1 espaciado por un vinculador 15aa GGGGS)₃ se obtuvo por amplificación de PCR usando conjuntos de cebadores traslapantes de ADN (el constructo se llama "constructo

rFel-2-G3-1"). Este ADN complementario fue clonado en marco en una versión modificada de pET-42a(+) (EMD), conduciendo a la adición de la secuencia de codificación para LEHHHHHHGGC (SEQ ID NO: 35) en la terminal C del constructo
5 rFel-2-G3-1. La secuencia añadida contiene una etiqueta para la purificación, seguida de un enlazador de GGC, utilizado para el acoplamiento de esta proteína de fusión de Fel d1 a CMV-Npadr y CMV-Ntt830.

Análogamente, otra fusión covalente de rFel d1 (SEQ ID
10 NO: 18) se genera como se describió anteriormente (WO2006/097530) correspondiente a una proteína de fusión de rFel d1 que comprende la cadena 1 de Fel d1 y la cadena 2 de Fel d1, en donde se fusiona la cadena 1 de Fel d1 a través de su terminal C a la N-terminal de la cadena 2 de
15 Fel d1 por el vinculador 15aa(GGGGS)₃ ("constructo rFel 1-G3-2").

Las partículas tipo virus VLP de CMV-Npadr y VLP CMV-Ntt830 en un volumen de 2.5 ml con una concentración de 2 mg/ml (71 μ m) se reaccionaron con 27 μ l de 50 mM del
20 reticulador químico heterobifuncional succinimidil-6-(b-maleimidorpopinamida) hexanoato (SMPH) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). El vinculador contiene un éster de NHS que reacciona con la lisina en la superficie de la VLP. La cantidad de SMPH se refiere a 7.5 x exceso molar
25 con respecto a una VLP monómera, es decir, un polipéptido

de CMV. el reticulador no reaccionado fue removido por diálisis contra 150 mM de PBS, pH 7.4. Para producir las composiciones de rFel d1-CMV-Npdr y de rFeld1-CMV-Ntt830, una solución de proteína de rFel d1 con una concentración de 2.7 mg/ml a 150 μ m de un volumen de 200 μ l se mezcló con 5 x exceso molar del agente de reducción Tris-2-carboxietil-fosfina (TCEP) y se incubó durante 5 min a TA. El exceso molar se relacionó con la cantidad de la proteína Fel d1. El TCEP reduce los puentes disulfuro entre dos residuos de cisteína de dos moléculas de la proteína con el fin de asegurar su disposición para la reacción de acoplamiento a VLPs derivatizadas. La proteína pretratada de Fel d1 se reaccionó en una proporción molar de 1:1 con 7.5 x SMPH derivatizada de VLP CMV-Npdr y VLP CMV-Ntt830 por 3 horas a temperatura ambiente agitando. La cisteína reducida de la proteína reaccionó con la maleimida del reticulador SMPH enlazado a la VLP. Después de acoplamiento covalente, la rFel d1 no acoplada fue quitada por filtración de gel en 150 mM de PBS, pH 7.4. Las composiciones fueron analizadas por SDS-PAGE e inmunotransferencia para observar y confirmar bandas de acoplamiento. Para este propósito, muestras de SMPH VLP CMV-Npdr y Ntt830 de CMV derivatizadas, las composiciones rFel d1-CMV-Npdr y rFel d1-CMV-Ntt830 y proteína Fel d1 fueron cargados en paralelo en un gel. El acoplamiento se

observó por inmunotransferencia usando un anticuerpos His anti-penta de unión a la etiqueta His de la proteína Fel d1. Las bandas visibles indican proteína de Fel d1 así como la SMPH derivatizada de VLP de CMV-Npadr, VLP de CMV-Ntt830 y las composiciones rFel d1-CMV-Npadr rFel d1-CMV-Ntt830 todos los que se distinguen fácilmente por su tamaño. Además, un gel de SDS-PAGE fue teñido con azul de Coomassie y el acoplamiento fue observado y confirmado.

10 **Inmunización de ratones con rFel d1 acoplado a CMV-Npadr y CMV-Ntt830**

Grupos de cinco ratones Balb/c hembra fueron inmunizados con VLP de CMVwt, CMV-Npadr y VLP de CMV-Ntt830 acoplados vía SMPH a rFel d1. Una cantidad de 5 µg de rFel d1-CMV-Npadr y rFel d1-CMV-Ntt830, respectivamente, se diluyó en 150 mM de PBS, pH 7.4 a 150 µl y fue inyectada por vía intravenosa en el día 0 y día 7. Los ratones fueron sangrados en días 0 (pre-inmune), día 7, día 14 y día 25, y los sueros se analizaron ELISA específica de Fel d1.

20

La reactividad de ELISA

La respuesta de anticuerpos en suero de ratón fueron analizadas en el tiempo indicado. Los anticuerpos específicos para Fel d1 se analizaron mediante el recubrimiento de placas de ELISA con una concentración de 1

25

µg/ml en un volumen de 100 µl de PBS (pH 7.2) a 4°C durante la noche. Las placas ELISA se lavaron 5 x con 200 µL de PBS que contenía 0.05% de Tween20 (pH 7.2, PBST). Con el fin de evitar el enlace no específico las placas ELISA se
5 bloquearon con 200 µL de BSA al 2% en SAFT y se incubaron durante 2 horas a TA. Los sueros se diluyeron en 2% de BSA/SAFT. El suero previamente diluido fue transferido en las placas recubiertas y más serial diluido para obtener títulos de anticuerpos con cálculo de OD50. Después de 2
10 horas de incubación a temperatura ambiente, las placas de ELISA se lavaron 5 x con 200 µL de SAFT. La unión de los anticuerpos del suero fue detectada por IgG anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de caballo-rábano (Jackson ImmunoResearch). El anticuerpo de detección fue diluido
15 1:1000 en 2% de BSA/Saft y un volumen de 100 µl por cada muestra fue transferido. Las placas se incubaron durante 1 hora a TA. Las placas de ELISA se lavaron como se describe antes. Antes de lavar la solución de sustrato fue preparada. Para ello, 1 tableta (10 mg) de OPD
20 (dihidrocloruro de 1,2-fenilendiamina) y 9 µl de 30% de H₂O₂ se disolvió en 25 ml de tampón de ácido cítrico (0.066 M de Na₂HPO₄, 0.035 M de ácido cítrico, pH 5.0). Un volumen de 100 µl de la solución sustrato se pipetea en las placas y se incubó exactamente durante 7 minutos a TA. Para
25 detener la reacción de 50 µl de solución de parada (5%

H₂SO₄ en H₂O) se pipetea directamente sobre las placas. Las lecturas de absorbancia a 450 nm de la reacción de color dihidrocloruro de 1,2-fenilendiamina fueron analizados. La Figura 8 muestra que los anticuerpos específicos para Fel d1 fueron inducidos en ratones con las composiciones inventivas rFel d1-CMV-Npadr (Fig. 8A) y rFel d1-CMV-Ntt830 (Fig. 8B).

EJEMPLO 9

10 **Acoplamiento de péptido de sinucleína a CMV-Ntt830 e inducción de respuesta inmune**

El acoplamiento del péptido de sinucleína de SEQ ID 22 a las VLPs formado por CMV-Ntt830 (SEQ ID NO: 6) se realizó como sigue. Una solución de 1 ml de 1 mg/ml de CMV-Ntt830 en 20 mM de HEPES, 50 mM de NaCl, pH 7.3 se reaccionó durante 60 min a temperatura ambiente con 79.3 µl de una solución de SMPH (10 mM en DMSO). También, una solución de 1 ml de 1 mg/ml de CMV-Ntt830 en 20 mM de HEPES, 50 mM de NaCl, pH 7.3 se reaccionó durante 60 min a temperatura ambiente con 79.3 µl de una solución de Sulfo-KMUs (10 mM en 20 mM de HEPES, pH 7.4). Las reacciones fueron dialisadas a 4°C contra tres veces de 2 L de 20 mM de HEPES, 50 mM de NaCl, pH 7.3, 2 h, 14 h y 2 h en un cassette de diálisis Slide-A-Lyzer con MWCO de 10 kDa. 800 µl de las soluciones de CMV-Ntt830 derivatizadas y dializadas se mezclaron con 21.5 µl de

péptido de sinucleína (22.32 mg/ml) y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente para reticulación química a 500 rpm en una Eppendorf Thermomixer en agitación. Las reacciones de acoplamiento fueron despejadas por 5 centrifugación a 20000 x g por 10 min a 4°C. La proteína de recubrimiento de CMV-Ntt830derivatizada y los productos acoplados fueron analizados por análisis de SDS-PAGE bajo reducción de condiciones en un gel de Bis-Tris NuPAGE® 4-12%. Posteriormente, se realizó un análisis densitométrico 10 del gel teñido de Coomassie. Varias bandas que muestran mayor peso molecular con respecto a la CMV-Ntt830capa monómero eran visibles, claramente demostrando éxito de reticulación de la péptido sinucleína para CMV-Ntt830 (tinción de Coomassie NuPAGE®, no se muestra). La 15 densidad de acoplamiento fue superior a 1.0 y eficiencia de acoplamiento fue alrededor del 60%. La prueba de la integridad de la CMV-Ntt830VLP después de la derivatización y acoplamiento, CMV-Ntt830derivatizada y los productos acoplados fueron analizados por electroforesis del gel de 20 agarosa al 1% en 1 x TAE seguido de tinción de bromuro de etidio y Coomassie. Las bandas de proteína y ácido nucleico de y CMV-Ntt830 derivatizada y acoplada de VLP, respectivamente, migran conjuntamente y muestran un comportamiento de migración similar como Ntt830 de CMV no 25 derivatizada y no-acoplada. La migración conjunta entre

proteínas de recubrimiento y ácidos nucleicos demostraron claramente que las VLPs de CMV-Ntt830 continuaron intactas y que no fue liberado ácido nucleico de CMV-Ntt830VLPs.

5

Inmunización de ratones con péptido derivado de sinucleína acoplada a la proteína de recubrimiento de CMV-Ntt830

Grupos de cuatro ratones C57B/6 hembras fueron
10 inmunizados con VLPs de CMV-Ntt830acoplados vía SMPH a péptido de sinucleína (SEQ ID NO: 22). Una cantidad de 250 µg de proteínas totales se diluyeron en PBS, pH 7.4 a 150 µl de 150 mM e inyectar i.v. el día 0 y día 14. Los ratones fueron sangrados en días 0 (pre-inmune), día 7, día 14, día
15 21, día 28 y y día 34, y los sueros se analizaron usando ELISA específica de sinucleína.

ELISA

Los péptidos de sinucleína fueron acoplados a la Rnasa bovina una utilizando el reticulador químico sulfo-SPDP. Se
20 cubren de placas ELISA sinucleína preparaciones de Rnasa péptido acoplado a una concentración de 5 µg/ml. Las placas fueron bloqueadas y luego se incubaron con suero de ratón en serie diluido. Se detectaron los anticuerpos encuadrados con marcada enzimáticamente anti-ratón IgG.
25 Como control, también se analizaron sueros previamente

inmunes de los ratones de la misma. Todos los ratones hicieron una clara y fuerte respuesta de IgG contra el sinucleína derivados péptido visto en la Figura 9.

5 EJEMPLO 10

Acoplamiento de péptido IL-17A a CMV-Ntt830 e inducción de respuesta inmune

Acoplamiento de la proteína murina de IL17A (SEQ ID NO: 20) a proteína de recubrimiento CMV-Ntt830 (SEQ ID NO: 6) se realizó. La proteína mIL-17 fue conjugada covalentemente a CMV-Ntt830 por un procedimiento de dos pasos. En primer lugar, fueron reaccionados VLPs de CMV-Ntt830 (2 mg/ml en 50 mM NaH₂PO₄, glicerol al 10%, pH 7,4) a temperatura ambiente de 60 minutos con una cantidad equimolar de la Cruz química heterobifuncional-linker, succinimidyl - 6-(β-maleimidopropionamido) hexanoato (SMPH). Vinculante fue quitado por la filtración de gel con una PD-10 columna de desalación con el mismo buffer (50 mM NaH₂PO₄, glicerol al 10%, pH 7,4). Antes de la etapa verbal, proteína purificada de 17 mIL se incubó durante 5 min a temperatura ambiente con un exceso de 10 veces de tri(2-carboxyethyl) clorhidrato de fosfina (TCEP-HCl) para reducir los residuos de cisteína en el vinculador. Entonces mIL-17 proteína era covalente a las VLPs derivatizados por reaccionar cantidades equimolares de 17 mIL proteínas y VLP

durante 3 horas a TA. La vacuna fue analizada por SDS-PAGE seguido de tinción de Coomassie y immunblotting con los anticuerpos anti-sus. Las intensidades de las bandas teñidas de azul Coomassie correspondientes a los distintos componentes de la reacción de acoplamiento son determinadas por densitometría ósea y se utilizan para calcular la eficiencia de acoplamiento. Monoméricas, derivatizados CMV-Ntt830 migra como una banda discreta 28 kDa al CMV-Ntt830-mIL-17 conjugado migra de 45 kDa (28 kDa CMV-Ntt830 monómero + proteína de 17 kDa 17 mIL). El análisis por SDS - PAGE y tinción de Coomassie visualizó varias bandas de mayor peso molecular con respecto a la proteína de la capa de CMV-Ntt830 indicando éxito Cross-linking de la proteína IL - 17 a los VLP de CMV-Ntt830. Eficiencia de acoplamiento se define como la fracción molar de monómeros de CMV-Ntt830 juntada a mIL-17 (45 kDa banda) a los monómeros de CMV-Ntt830 total (suma de las bandas de 28 y 45 kDa). Eficiencia de acoplamiento fue determinada para ser menos 15,3% igualando una molécula mIL-17 por 6,5 moléculas CMV-Ntt830. La eficiencia de acoplamiento calculada de esta manera es una estimación mínima del grado de acoplamiento, porque no toma en cuenta CMV-Ntt830 monómeros juntados a más de una molécula de 17 mIL. Así, las proteínas de interés como IL-17A pueden acoplarse eficazmente a VLPs de CMV-Ntt830.

**Inmunización de ratones con la proteína de IL17A de ratón
acoplada a VLP de CMV-Ntt830**

Un grupo de 3 ratones BALB/c hembras fueron
5 inmunizados con la proteína de recubrimiento de CMV-Ntt830
acoplada a la proteína de ratón IL17A. 20 µg de la proteína
total se diluyeron en PBS, pH 7.4 a 150 µl e inyectados por
vía intravenosa en el día 0, día 14. Los ratones fueron
sangrados en días 0 (pre-inmune), día 7, día 14, día 21,
10 día 28 y y día 34, y los sueros se analizaron usando ELISA
específica de IL17-A de ratón.

ELISA

Las placas de ELISA se recubrieron con IL17A de ratón,
15 a una concentración de 1 µg/ml. Las placas fueron
bloqueadas y luego se incubaron con suero de ratón en serie
diluido desde el día 0, 4, 14, 21 y 34. Se detectaron los
anticuerpos encuadrados con anticuerpo de IgG anti-ratón
enzimáticamente marcado. Los títulos del anticuerpo del
20 suero de ratón se calcularon como el promedio de las
diluciones que condujo a la mitad máxima densidad óptica a
450 nm. Los ratones inmunizados con VLP CMV-Ntt830 junto a
IL17A montan una fuerte respuesta inmune contra la proteína
IL17 (FIG.10).

Detección de anticuerpos neutralizadores

Suero de ratones inmunizados con IL17 de ratón acoplado a CMV-Ntt830 como se describe anteriormente entonces se prueba por su capacidad para inhibir la unión de la proteína IL17A del ratón al receptor de IL-17. Las placas de ELISA son recubiertas por lo tanto con el ratón la proteína A del receptor de IL-17 en una concentración de 1 µg/ml. Las diluciones seriadas de suero de ratón del ratón 35 día fueron incubadas previamente con ratón de biotinilado de 10 ng/ml IL-17A durante una hora y luego al receptor de IL - 17 una placas cubiertas. Enlace de IL 17 al receptor recubierto se detecta con peroxidasa de rábano de caballo conjugado a estreptavidina. Los títulos de anticuerpos neutralizantes se calculan como el promedio de las diluciones de suero que condujo a la mitad máxima densidad óptica a 450 nm.

Eficacia de la CMV-Ntt830-mIL17A por mejoramiento de encefalitis autoinmune experimental en un modelo murino de esclerosis múltiple

Ratones hembra de SJL se vacunan como se describió anteriormente y se inyectan por vía subcutánea con 100 µg PLP péptido mezclado con adyuvante de Freund completo una semana después de la última inmunización. El mismo día todos los ratones se les inyecta por vía intraperitoneal

400 ng de toxina del pertussis. Ratones se calcula sobre una base diaria para el desarrollo de síntomas neurológicos según el siguiente esquema: 0, no hay enfermedad clínica; 0.5, final de la cojera de la cola; 1, cola totalmente limp; 1.5, cola y extremidades debilidad (marcha inestable y pobre agarre de las patas traseras); 2, parálisis de extremidades parcial unilateral; 2.5, parálisis de extremidades parcial bilateral; 3, parálisis de extremidades bilateral completa; 3.5, completa la parálisis bilateral de extremidades y parálisis unilateral del miembro delantero; 4, parálisis total de hind y extremidades delanteras. La puntuación clínica media se evalúa para los ratones que son inmunizados con CMV-Ntt830-mIL17A o CMV-Ntt830 como se describe arriba. CMV-Ntt830-mIL17 A - inmunizar ratones Mostrar redujo significativamente los síntomas clínicos entre 53 y 61 frente a CMV-Ntt830-inmunizar ratones. Esto demuestra que los anticuerpos anti-IL-17 generan por la inmunización con CMV-Ntt830-mIL17A son capaces de mejorar los síntomas clínicos en un modelo murino de esclerosis múltiple.

EJEMPLO 11

Acoplamiento de IL- murino a CMV de Ntt830 de CMV y la inducción de respuesta inmune

IL-5 fue expresado y purificado como se describe (Zou Y, et al., Vaccine 28 (2010) 3192-3200). El acoplamiento de

mIL-5 (SEQ ID NO:23) a la VLP de CMV-Ntt830 con la CP modificada de SEQ ID NO:6 se realizó como sigue. Con el fin de acoplarse a VLPs de CMV-Ntt830 IL-5 primero derivatizada con exceso 30 veces de una cruz química heterobifunctional-
 5 liker, succinimidyl - 6-(□- maleimidopropionamido) hexanoato (SMPH). El SMPH fue removido por diálisis contra PBS. rIL-5 fue reducido por 1 h con una cantidad equimolar de tri(2-carboxyethyl) clorhidrato de fosfina (TCEP) en PBS (pH 8.0). Reducido rIL-5 (80 □ </g>M) fue incubado durante
 10 4 horas a 22° C con 40 □ </g>M de SMPH derivatizada CMV-Ntt830. 12 h contra pH 8.0 de PBS fue diálisis debida a la reacción.

**Inmunización de ratones con péptidos derivados de IL-5
 15 acoplados a VLPs de proteína de recubrimiento modificada de
 CMV-Ntt830**

Grupos de cuatro ratones Balb/c hembra fueron inmunizados con VLPs de CMV-Ntt830 acoplados vía SMPH a IL-5 (SEQ ID NO:23). 50 µg de la proteína total fueron
 20 diluidos en 20 mM de HEPES, 50 mM de NaCl, pH 7.3 a 200 µl e inyectados por vía subcutánea (100 µl en dos lados ventrales) en el día 0 y día 14. Los ratones fueron sangrados en días 0 (pre-inmune), día 14 y día 21, y los sueros se analizaron usando ELISA específica de IL-5 y CMV-
 25 Ntt830.

ELISA

Las placas de ELISA se recubrieron ya sea con IL-5 en una concentración de 10 µg/ml o VLPs de CMV-Ntt830 a una
 5 concentración de 2 µg/ml. Las placas fueron bloqueadas y luego se incubaron con suero de ratón en serie diluido. Se detectaron los anticuerpos encuadrados con marcada enzimáticamente anti-ratón IgG. Como control, también se analizaron sueros previamente inmunes de los mismos ratones
 10 (datos no mostrados). Todos los ratones hicieron una clara y fuerte respuesta de IgG contra los péptidos así como CMV-Ntt830.

**Modelo basado en OVA de inflamación alérgica de las vías
 15 respiratorias**

Para inducir la inflamación alérgica de las vías respiratorias, los ratones BALB/c hembras (5 por grupo) se inyectaron (i.p.) con 10 µg de OVA /Grado V, Sigma-Aldrich) mezclado con 2 mg de lum (Adyuvante de Gel de Hidróxido de
 20 Aluminio, Brenntag Biosector, Dinamarca). 10 días más tarde, los ratones se desafiaron diariamente con 100 µg de OVA por administración intranasal durante 4 días. 24 horas después del último desafío, BAL y pulmones fueron sometidos a histología. Los ratones se inyectaron i.p. con OVA y
 25 alumbre pero no desafiados intranasalmente con OVA y

sirvieron como control negativo para inducción de enfermedad en estos experimentos.

Usando este modelo, los ratones fueron vacunados dos veces (d-0, d-14) con 100 μ g de VLPs de CMV-Ntt830 o VLPs de CMV-Ntt830 acopladas a IL-5. El día 21, los ratones fueron sensibilizados con OVA y el día 31 desafiados intranasalmente con OVA. Los ratones inmunizados con IL-5 redujeron dramáticamente el conteo de eosinófilos en el fluido broncoalveolar.

10

EJEMPLO 12

Acoplamiento de péptido de M2 a partículas tipo virus de CMV-Ntt830

Una solución de 2 ml de 1 mg/ml de CMV-Ntt830 en con la CP modificada de SEQ ID NO:6 en PBS/10% de glicerol pH 7.2 se reaccionó durante 60 min a temperatura ambiente con 42.6 μ l de una solución de SMPH (150 mM en DMSO). La solución de reacción fue dialisada a 4⁰C contra dos cambios de 2 l de 20 mM de HEPES/10% de glicerol pH 7.2 durante 4 y 12 horas. 0.6 ml de la solución de CMV-Ntt830 derivatizada y dializada se mezcló con 21.45 μ l de una solución de DMSO 10 mM del péptido de influenza M2 (SEQ ID NO: 24) y se incubó a 4 h a temperatura ambiente para la reticulación química resultante en CMV-Ntt830-vacuna conjugada M2. Péptido desacoplado fue removida por diálisis contra 20 mM HEPES /

25

10% glicerol pH 7.2 12 h y 4 h. El producto acoplado se analizó en gel de poliacrilamida-Tris-Bis 12% bajo condiciones de reducción. Varias bandas que muestran mayor peso molecular con respecto a la CMV-Ntt830 capa monómero
5 eran visibles, claramente demostrando éxito de reticulación de la péptido sinucleína para CMV-Ntt830.

Inmunización de ratones con péptido M2 acoplado a cápsides de CMV-Ntt830

10 (CMV-Ntt830 -M2)

Cuatro ratones Balb/c hembra por grupo fueron inmunizados con 40 ug de vacuna de CMV-Ntt830-M2 formulada en 200 ul de PBS e inyectada subcutáneamente el día 0 y el día 20. Los ratones fueron sangrados en el día 34, y los
15 sueros se analizaron usando ELISA específica de M2 y de CMV-Ntt830.

Detección de anticuerpos anti-M2 mediante ELISA

Las placas de ELISA se recubrieron con péptido M2 (SEQ
20 ID NO:24) a una concentración de 10 µg/ml con partículas tipo virus de CMV-Ntt830 a una concentración de 10 µg/ml. Las placas fueron bloqueadas y luego se incubaron con suero de ratón en serie diluido. Se detectaron los anticuerpos encuadrados con anticuerpo de IgG anti-ratón
25 enzimáticamente marcado. Los títulos del anticuerpo del

suero de ratón son definidos como los recíprocos de las diluciones a 50% de la OD medida en saturación (OD50). Los títulos de anticuerpos anti-M2 promedio y los títulos anti-CMV-Ntt830 en el día 34 de ratones que eran > 1:10000. Los
5 datos demuestran que de acoplamiento del M2 péptido a CMV-Ntt830 cápsida está fuertemente mejorando la inmunogenicidad del péptido M2 como el péptido M2 solo no es inmunogénico.

La eficacia de la CMV-Ntt830-M2 inmunización fue
10 probado en un modelo murino de infección por influenza. Ratones fueron desafiados con una dosis letal de 4xLD50 de A/PR/8/34 virus de la influenza de ratón adaptado. El virus fue diluido en PBS y había administrado (2 x 50 µl) a través de la nariz bajo ligera anestesia con isofuran.
15 Ratones, que perdió más de 30% de peso o que demostró una temperatura corporal igual o inferior a 30°C, fueron sacrificados. La supervivencia de los ratones de ambos grupos fueron los siguientes: Todos los ratones inmunizados con CMV-Ntt830-M2 sobrevivieron mientras que todos los
20 ratones inmunizados con CMV-Ntt830 solo murió. El resultado demuestra que la inmunización de ratones con péptido M2 juntada a CMV-Ntt830 induce anticuerpos M2 que protegen ratones contra una infección letal con virus de influenza A/PR/8/34.

EJEMPLO 13

Acoplamiento del péptido A-6 a partículas tipo virus CMV-Ntt830

Una solución de 2 ml de 1 mg/ml de CMV-Ntt830 en con
 5 la CP modificada de SEQ ID NO:6 en PBS/10% de glicerol pH
 7.2 se reaccionó durante 60 min a temperatura ambiente con
 42.6 µl de una solución de SMPH (150 mM en DMSO). La
 solución de reacción fue dialisada a 4°C contra dos cambios
 2 1 de 20 mM de HEPES/10% de glicerol pH 7.2 durante 4 y 12
 10 horas. 0.6 ml de la solución de CMV-Ntt830 derivatizada y
 dializada se mezcló con 21.45 µl de una solución de DMSO 10
 mM del péptido de A-6 (SEQ ID NO: 25) y se incubó a 4 h a
 temperatura ambiente para la reticulación química
 resultante en CMV-Ntt830-vacuna conjugada A-6. Péptido
 15 desacoplado fue removida por diálisis contra 20 mM HEPES /
 10% glicerol pH 7.2 12 h y 4 h. El producto acoplado se
 analizó en gel de poliacrilamida-Tris-Bis 12% bajo
 condiciones de reducción. Varias bandas que muestran mayor
 peso molecular con respecto a la CMV-Ntt830 capa monómero
 20 eran visibles, claramente demostrando éxito de reticulación
 del péptido de reticulación de A-6 de CMV-Ntt830.

Inmunización de ratones con péptido A-6 acoplado a cápsides de CMV-Ntt830

25 **(CMV-Ntt830 -A-6)**

Cuatro ratones Balb/c hembra por grupo fueron inmunizados con 40 ug de vacuna de CMV-Ntt830-A-6 **formulada en 200 ul de PBS e inyectada subcutáneamente el día 0 y el día 20**. Los ratones fueron sangrados en el día 34, y los
5 sueros se analizaron usando ELISA específica de A-6 **y de CMV-Ntt830**.

Detección de anticuerpos anti-A-6 mediante ELISA

Las placas de ELISA se recubrieron con péptido A-6
10 **acoplados a RNase a una concentración de 10 µg/ml con partículas tipo virus de CMV-Ntt830 a una concentración de 2 µg/ml**. Las placas fueron bloqueadas y luego se incubaron con suero de ratón en serie diluido. Se detectaron los anticuerpos encuadrados con anticuerpo de IgG anti-ratón
15 **enzimáticamente marcado**. Los títulos del anticuerpo del suero de ratón son definidos como los recíprocos de las diluciones a 50% de la OD medida en saturación (OD50). Los títulos de anticuerpos anti-A-6 **promedio y los títulos anti-CMV-Ntt830 en el día 34 de ratones que eran > 1:10000**.
20 Los datos demuestran que de acoplamiento del A-6 **péptido a CMV-Ntt830 cápsida está fuertemente mejorando la inmunogenicidad del péptido A-6 como el péptido A-6 solo no es inmunogénico**. Sección del cerebro de humano Alzheimer
25 pacientes fueron manchados con placas y suero murino llegó a ser claramente visible.

EJEMPLO 14

Clonación de proteínas de fusión Fel d1

Una proteína de fusión de Fel d1 (llamada F12H6GGC) consisten en cadena 1 de Fel d1 unida a N-terminal de la
 5 cadena 2 de Fel d1 a través de una secuencia de 15 aminoácidos (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 47) y la incorporación de una secuencia HHHHHHGGC (SEQ ID NO: 48) fusionado a la c-terminal de la cadena 2 de Fel d1 fue producida por
 10 síntesis de oligonucleótidos dirigidos gene. La secuencia del oligonucleótido correspondiente tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 49, en donde la secuencia de la proteína de F12H6GGC tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 50:

```
MEICPAVKRDVDLFLTGTPDEYVEQVAQYKALPVLENARILKNCVDAKMTEEDKENAL
15 SVLDKIYTSPLCGGGSGGGSGGGGSVKMAETCPIFYDVFFAVANGNELLLDLSLTKV
NATEPERTAMKKIQDCYVENGLISRVLDGLVMTTISSSKDCMGEAVQNTVEDLKLNTLG
RHHHHHHHGGC
```

Después de la síntesis del gen, fue suprimido de su plásmido helper y subcloned en marco en NdeI/XhoI sitios
 20 del plásmido pET42a(+) (Novagen, USA) dando por resultado la expresión vector pET42-F12H6GGC.

Proteínas de fusión Fel d1 sin una secuencia de hexa-histidina (llamado F12GGC) fueron producidas por mutagénesis PCR utilizando el plásmido pET42-F12H6GGC como
 25 plantilla. Las cartillas del oligonucleótido utilizados en

las PCRs para producir estas proteínas de fusión fueron:

Para F12GGC, el primer avance fue Fel_BglF (SEQ ID NO: 51) y el cebador reverso Feld-dHR (SEQ ID NO: 53).

Todos los productos PCR fueron cortados con enzimas de
 5 restricción BglIII/XhoI y subclonada en vector pET42-
 F126HGGC en los mismos sitios de escisión. Después de
 aislamiento de ADN plásmido, se confirmaron los cambios
 introducidos utilizando un kit de secuenciación BigDye
 ciclo y un analizador genético de ABI Prism 3100 (Applied
 10 Biosystems, Carlsbad, EUA). Los vectores de expresión
 resultante fue nombrado como pET42-F12GGC.
 Correspondientemente codifica la proteína de la fusión de
 Fel d1 F12GGC (SEQ ID NO: 56).

MEICPAVKRDVDLFLTGTPDEYVEQVAQYKALPVVLENARILKNCVDAKMTEEDK
 15 ENALSVLDKIYTSPLCGGGGSGGGGSGGGGSGVKMAETCPIFYDVFFAVANGNELLLDLS
 LTKVNATEPERTAMKKIQDCYVENGLISRVL DGLVMTTISSSKDCMGEAVQNTVEDLKL
 NTLGRGGC (SEQ ID NO:56)

La secuencia de hexa-histidina permite la purificación
 por cromatografía de afinidad quelato metálico y la
 20 secuencia c-terminal que GGC o GGCG (SEQ ID NO: 58) permite
 el acoplamiento de las proteínas de fusión de Fel d1 CMV-
 Ntt830 y CMV-Npadr.

EJEMPLO 15

Expresión y purificación de proteínas de fusión Fel d1.

Expresión de proteínas de fusión Fel d1 en *E. coli*. La Fel d1 expresión vectores pET42-F12H6GGC y pET42-F12GGC se transformaron en las células de C2566 de *e. coli* (New England Biolabs, Ipswich, Estados Unidos). Clones expresando los más altos niveles de proteína diana fueron seleccionados y utilizados en experimentos adicionales.

Expresión de las varios recombinantes Fel d1 proteínas de fusión se realizó de la siguiente manera. Cultivos de *e. coli* que plásmidos de expresión fueron cultivadas en medio de 2xTY que contiene kanamicina (25 mg/l) en un agitador rotatorio (200 rev/min; Infors, Bottmingen, Suiza) a 30 ° C a una OD600 de 0.8 - 1.0. Expresión de los genes de la proteína Fel d1 fusión entonces se indujo mediante la adición de 0,2 mM IPTG. El medio fue suplementado con 5 mM de MgCl₂. Incubación fue continuada en un agitador rotatorio a 20° C por 18 h. La biomasa resultante fue recogida por centrifugación a baja velocidad y congelada a -20°C hasta purificación.

Purificación de proteínas de fusión de Fel d1 etiquetadas con hexa-histidina. Para la purificación de proteínas de fusión F12H6GGC, se utilizó el Kit de PrepEase USB (Affymetrix, High Wycombe, Reino Unido) según las

instrucciones del fabricante. Después de descongelar el hielo, células de *e. coli* de la cultura de 100 ml (aprox. 0,75 g) fueron suspendidas en buffer de x LEW 1 que contiene 5 mM TDT y luego interrumpidas por sonicación. Se
5 eliminaron los residuos insolubles de proteínas y células por centrifugación (13.000 rpm, 30 min a 5° C). El clarificado lisado a una columna Ni IDA, lavó dos veces con el mismo buffer (sin TDT) y eluida con 2 x 1,5 ml de imidazol que contiene 1 x buffer E aplicó. Las fracciones
10 que contienen Fel d1 fueron identificadas por la SDS/PAGE (FIG. 11A) y dos veces se dializaron contra 200 volúmenes de tampón (20 mM de fosfato de sodio, EDTA 2 mM, pH 7.0). Después de la diálisis, la concentración de proteína se estimó usando un fluorómetro QuBit según instrucciones del
15 fabricante (Invitrogen, Eugene, USA) o por medición espectrofotométrica UV a 280 nm. La identidad de las proteínas purificadas fue confirmada por análisis de espectrometría de masa (FIG. 11B) y por Western blot utilizando anticuerpos anti-His-tag (Novagen, CAT. 71840-3;
20 datos no mostrados).

Purificación de proteínas de fusión Fel d1 sin etiquetas de hexa-histidina Para la purificación de proteínas de fusión F12GGC, intercambio de anión y cromatografía de interacción hidrófoba fueron utilizados.
25 Tres gramos de IPTG inducida por *E. coli* fueron

interrumpidas por sonicación en 20 ml de tampón de lisis LB (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM DTT). Después de la sonicación la solución se centrifugó durante 15 min a 15 000 g y el sobrenadante recogido. Se añadió sulfato de amonio con agitación constante hasta 30% saturación fue alcanzada y se incubó durante 5 min a TA. Después de la centrifugación, sulfato de amonio sólido añadido el sobrenadante recuperado hasta saturación de 50%. Después de la centrifugación, gránulos de proteína se colectaron y se disolvieron en 2 ml de LB y exceso de sal eliminado con 5 ml HiTrapTM desalación columna (GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con LB. El efluente de desalado de la proteína fue cargado en una columna de 1 ml HiTrapTMCaptoTM DEAE equilibrada con LB. Límite F12GGC eluyó con un gradiente de aumento de NaCl. Fracciones que contienen proteínas de fusión de Fel d1 fueron recogidos y agrupados. La solución resultante fue diluida con 4 volúmenes de 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 5 mM DTT, cargada en una columna GL 5/50 de MonoQ en LB y eluida con un gradiente de NaCl aumento. Fracciones que contienen proteínas de fusión de Fel d1 fueron recogidos y agrupados. 5 M NaCl fue agregado hasta que se llegó a una concentración de 2,5 M y TDT añadido a la solución, para mantener una concentración de 5 mM. La solución que contiene Fel d1 fue cargada en una columna HiTrapTM butilo HP de 2.5 M NaCl, 5 mM DTT de 1 ml y eluida

con NaCl concentración continuamente decreciente. Fracciones que contienen proteínas de fusión de Fel d1 fueron recogidos y agrupados. Todos los pasos de purificación fueron supervisados por geles de SDS/PAGE con tinción de Coomassie (FIG. 11C). La identidad de las proteínas purificadas fue confirmada por Western blot utilizando anticuerpos policlonales contra recombinante Fel d1 (datos no mostrados).

10 EJEMPLO 16

Autenticidad de las proteínas de fusión recombinantes de Fel d1

Las proteínas de fusión de Fel d1 son reconocidas similarmente por anticuerpos monoclonales específicos de Fel d1 La unión de la proteína de la fusión de Fel d1 F12H6GGC y natural Fel d1 (d1 nFel) a Fel d1-específica de anticuerpos monoclonales (mAb) se comparó con un sandwich ELISA Fel d1 ELISA kit (6F9/3E4) de interior biotecnologías (Cardiff, Reino Unido). Con este fin, Nunc ELISA placas fueron recubiertas con anti-Fel d1 mAb 6F9 (a 1 microg/ml) a 4° C durante la noche. Las placas se lavaron con PBS que contenga 0.05% Tween 20 (SAFT) y bloqueado con superbloque (Invitrogen) por 2 h a temperatura ambiente (RT). Natural Fel d1 así como F12H6GGC (1 µg/ml) eran en serie diluido 1:3 y se incubaba durante 2 h a TA. Las placas se lavaron con

Saft y biotinilado anti-Fel d1 3E4 mAb (en 1 μ g/ml) se
 agrega e incuba durante 1 h a TA. Detección utilizado
 estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano de
 caballo (HRPO). Para ello, las placas se lavaron con SAFT
 5 estreptavidina-peroxidasa (Sigma, dilución 1: 1000) se
 añade a los platos por 30 min a TA. Detección se realizó
 con solución de sustrato OPD y 5% H₂SO₄ como solución. La
 absorbancia se midió usando un lector de ELISA (BioRad) a
 450 nm.

10 Natural de Fel d1 y F12H6GGC dieron títulos similares
 en el ELISA que demuestra que igualmente fueron reconocidas
 por Fel d1 específico mAbs confirmando la autenticidad de
 la recombinante Fel d1 F12H6GGC (FIG. 12).

Las proteínas de fusión recombinantes de Fel d1
 15 **activan los basófilos en toda la sangre de pacientes**
alérgicos a gatos La sangre de pacientes alérgicos gata
 contiene basófilos que llevan anticuerpos IgE de Fel d1-
 específicos en su superficie, que al alergen exposición
 reticulación el Fc ϵ RI y causa degranulación. Para comprobar
 20 la capacidad de recombinante Fel d1 para provocar la
 degranulación, sangre entera de un Fel d1-pacientes
 alérgicas a fue recogido y usado en combinación con Fel d1
 fusión proteína recombinante F12H6GGC en un kit de prueba
 de activación de basófilos de Bühlmann Laboratories (Flow
 25 Cast®, FK CCR). Este ensayo mide para arriba-regulación de

un marcador exclusivo de degranulación CD63 en CCR3 + basófilos. Brevemente, 100 µl de tampón de estimulación se mezcló con 50 µl de sangre entera tratada con EDTA. Además, se agregaron 50 µl de varias diluciones de natural Fel d1 o
5 proteína Fel d1 fusión recombinante F12H6GGC. Soluciones de control positivo incluyendo un mAb contra FcεRI, así como un activador de células inespecíficas (fMLP) también fueron probadas en el ensayo. Coloración tinte (20 µl por muestra), que contiene Ab anti-CCR3 marcado PE y Ab anti-
10 CD63 rotulado al FITC, fue agregado y se incubó a 37° C durante 25 minutos los eritrocitos fueron posteriormente sometidas a lisis añadir tampón de lisis. Después de 10 minutos de incubación, las muestras se se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos y lavar con tampón de lavado (PBS
15 conteniendo 2% FCS). Después de un segundo paso de centrifugación, los pellets de células fueron suspendidos en tampón de lavado de 200 µl y adquirieron utilizando un citómetro de flujo (FACS Calibur). Las muestras se analizaron con el software Cell Quest Pro. Se analizó el
20 porcentaje de la expresión de CD63 en CCR3 + basófilos.

Proteínas de fusión recombinantes de Fel d1 se encontró que para fácilmente desencadenar la degranulación de los basófilos de pacientes alérgicas a la cat. Por otra parte, en comparación con natural Fel d1, niveles similares
25 de degranulación lograron así demostrar la autenticidad de

las proteínas de fusión producidas por vía recombinante de Fel d1. FIG. 13A/FIG. 13B).

EJEMPLO 17

5 **Acoplamiento de las proteínas de fusión Fel d1 a CMV-Ntt830 y VLPs de CMV.**

La proteína de fusión de Fel d1 F12H6GGC covalentemente ligada a CMV-Ntt830 y VLPs de CMV-Npadr usando el hexanoato de succinimidyl-6-[(β -
10 maleimidopropionamido) de heterobifunctional químicos vinculante] (SMPH) de la siguiente manera.

CMV-Ntt830 y Npadr de CMV virus-como partículas almacenadas en 5 mM Na-borato, tampón de EDTA 2 mM, pH 9.0, fueron objeto de cambio de tampón con 20 mM Na-fosfato que
15 contiene 30% de sacarosa y EDTA 2 mM utilizando columnas PD10 (GE Healthcare). Una solución de CMV-Npadr o Ntt830 de CMV VLPs reaccionó durante 60 min a temperatura ambiente con 7.5 x exceso molar de heterobifunctional crosslinker SMPH. SMPH fue quitado con columnas PD10 en 20 mM Na-
20 fosfato que contiene 30% de sacarosa y 2 mM EDTA.

Proteína de la fusión de Fel d1 F12H6GGC trataron con 10 x TCEP exceso molar (Thermo Fisher). Derivatizados CMV-Ntt830 y CMV-Npadr-VLPs fueron reaccionados con 1 x o 2 x exceso molar de Fel d1 fusión proteína recombinante
25 F12H6GGC durante 3 horas a 23° C. La reacción de

acoplamiento se analizó mediante la reducción de SDS-PAGE (gel de Bis-Tris NuPAGE® 4-12%) teñido con azul de Coomassie. Bandas de proteínas con masas de aproximadamente 44,5 kDa y 69 kDa fueron evidentes después de la reacción de conjugación química (datos no mostrados). Estas bandas corresponden a la proteína de la cápsida del CMV (24.5 kDa) covalente con la proteína de la fusión de Fel d1 F12H6GGC (20 kDa) y dos moléculas de proteína capa CMV covalente con (49 kDa) un Fel d1 proteína de fusión F12H6GGC respectivamente, lo que indica la formación de Fel d1-CMV VLPs.

EJEMPLO 18

Respuesta inmune a Fel d1-VLP de CMV en ratones

Grupos de tres ratones Balb/c hembras fueron inmunizados con cualquiera Fel d1-CMV-Ntt830-VLP, preparado como se describe en el ejemplo 10, o CMV-Ntt830-VLP simplemente mezclado con proteína de la fusión de Fel d1 F12H6GGC. Ambas composiciones contienen la misma cantidad de la proteína de la fusión de Fel d1. 10 µg de cada composición se preparó en 150 mM PBS, pH 7,4 e inyectado en un volumen de 150 µl por vía intravenosa en el día 0 y día 14. Ratones fueron sangrados en los días 0 (pre-inmune), día 14 y 21, y los sueros se analizaron por ELISA para Fel d1 específica IgG-anticuerpos naturales.

NUNC ELISA placas fueron recubiertas con natural Fel d1 (interior biotecnologías) en PBS con una concentración de 1 µg/ml durante la noche a 4° C. Las placas fueron bloqueadas con superbloque (Invitrogen). Se realizó una dilución seriada de los sueros para detectar OD50. OD50 describe el recíproco de la dilución, que alcanza a la mitad del valor máximo de OD. Se detectaron anticuerpos IgG específicos para Fel d1 con un anticuerpo de anti-ratón IgG directamente marcado con peroxidasa de rábano picante plato (HRPO) (Jackson). La conversión de diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) de la HRPO se midió como la reacción de color a 450 nm, que se detuvo por adición de ácido sulfúrico al 5% (H₂SO₄) después de la incubación de 7 minutos.

Sólo después de una inmunización individual, anticuerpos de IgG de Fel d1 específicos fueron detectados en ratones (día 14). La respuesta fue impulsada por una segunda inyección. Fel d1-CMV VLPs aumentaron significativamente la inducción de Fel d1 anticuerpos específicos de IgG en comparación con las composiciones mixtas, demostrando el efecto inmunológico mejora de conjugación química de las proteínas de fusión Fel d1 a la VLP (Fig. 14).

EJEMPLO 19

Acoplamiento de CMV-Ntt830 de IL-1 α humano y VLPs de CMV

La proteína madura de IL-1 humana (SEQ ID NO:60) fue ligada a CMV-Ntt830 y VLPs de CMV-Npdr usando el hexanoato de succinimidyl-6-[(β -maleimidopropionamido) de heterobifunctional químicos vinculante] (SMPH) de la siguiente manera.

CMV-Ntt830 y Npdr de CMV virus-como partículas almacenadas en 5 mM Na-borato, tampón de EDTA 2 mM, pH 9.0, fueron objeto de cambio de tampón con 20 mM Na-fosfato que contiene 30% de sacarosa y EDTA 2 mM usando PD10 columnas (GE Healthcare) una solución de CMV-Npdr o Ntt830 de CMV VLPs reaccionaron durante 60 min a temperatura ambiente con 7.5 x exceso molar de heterobifunctional crosslinker SMPH. SMPH fue quitado con columnas PD10 en 20 mM Na-fosfato que contiene 30% de sacarosa y 2 mM EDTA.

La proteína IL-1 β fue tratada con 5 x TCEP exceso molar (Thermo Fisher). Derivatizados CMV-Ntt830 y CMV-Npdr-VLPs fueron reaccionados con 1 x o 2 x exceso molar de IL1 β humano durante 3 horas a 23° C. La reacción de acoplamiento se analizó mediante la reducción de SDS-PAGE (gel de Bis-Tris NuPAGE® 4-12%) teñido con azul de Coomassie. Bandas de proteínas con masas de aproximadamente 41,5 kDa y 66 kDa fueron evidentes después de la reacción de conjugación química (datos no mostrados). Estas bandas corresponden a

la proteína de la cápsida del CMV (24.5 kDa) covalente con la proteína de IL1 β (17 kDa) y dos CMV capa moléculas de la proteína (49 kDa) covalente con una proteína de IL1 β respectivamente, lo que indica la formación de VLPs IL1 β -
 5 CMV.

EJEMPLO 20

Acoplamiento de IL- canino a CMV-Ntt830 e inducción de respuesta inmune

10 IL-5 canino (cIL-5) (SEQ ID NO: 61) se modifica para contener un Cys libre expresado análogamente como se describe para murino IL-5 en Zou Y, et al., Vaccine 28 (2010) 3192-3200. Acoplamiento del cIL-5 así que modificado a VLP CMV-Ntt830 se realiza como sigue. Con el fin de
 15 acoplarse a VLPs de CMV-Ntt830-5 cIL son primero derivatizadas con exceso 30 veces de una cruz química heterobifunctional-liker, succinimidyl - 6-($\square$ -maleimidopropionamido) hexanoato (SMPH). El SMPH no unida se elimina por diálisis contra PBS. cIL-5 fue reducido por
 20 1 h con una cantidad equimolar de tri(2-carboxyethyl) clorhidrato de fosfina (TCEP) en PBS (pH 8.0). Reducido 5 cIL (80 $\square$ </g>M) fue incubado durante 4 horas a 22° C con 40 $\square$ </g>M de SMPH derivatizada CMV-Ntt830. 12 h contra pH 8.0 de PBS fue diálisis debida a la reacción.

25

Inmunización de perros con cIL-5 acoplado a VLPs de CMV-Ntt830

Grupos de cuatro perros hembra fueron inmunizados con VLPs de CMV-Ntt830 junto vía SMPH cIL-5 como se describe anteriormente. 50 µg de la composición son diluido en 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.3 a 500 µl y se inyecta por vía subcutánea el día 0 y día 14. Los perros fueron sangrados en días 0 (pre-inmune), día 14 y día 21, y los sueros se analizaron usando ELISA específica de cIL-5 y CMV-Ntt830.

10 ELISA

Las placas de ELISA se recubrieron ya sea con cIL-5 a una concentración de 10 µg/ml o VLPs de CMV-Ntt830 a una concentración de 2 µg/ml. Las placas fueron bloqueadas y luego se incubaron con suero de ratón en serie diluido. Se detectaron los anticuerpos encuadrados con marcada enzimáticamente anti-ratón IgG. Como control, también se analizaron sueros previamente inmunes de los mismos ratones (datos no mostrados). Todos los perros hicieron una clara y fuerte respuesta de IgG contra cIL-5 así como CMV-Ntt830.

20

EJEMPLO 21

Acoplamiento de IL-4 canino a CMV-Ntt830 e inducción de respuesta inmune

IL-4 canino (cIL-4) (SEQ ID NO: 62) se modifica para contener un Cys libre expresado análogamente como se

25

describe para murino IL-5 en Zou Y, et al., Vaccine 28 (2010) 3192-3200. Acoplamiento del cIL-4 así que modificado a VLP CMV-Ntt830 se realiza como sigue. Con el fin de acoplarse a VLPs de CMV-Ntt830-4 cIL son primero
 5 derivatizadas con exceso 30 veces de una cruz química heterobifunctional-liker, succinimidyl - 6-(α -maleimidopropionamido) hexanoato (SMPH). El SMPH no unida se elimina por diálisis contra PBS. cIL-4 fue reducido por 1 h con una cantidad equimolar de tri(2-carboxyethyl)
 10 clorhidrato de fosfina (TCEP) en PBS (pH 8.0). cIL-4 reducido (80 μ M) fue incubado durante 4 horas a 22° C con 40 μ M de SMPH derivatizada CMV-Ntt830. 12 h contra pH 8.0 de PBS fue diálisis debida a la reacción.

15 **Inmunización de perros con cIL-4 acoplado a VLPs de CMV-Ntt830**

Grupos de cuatro perros hembra fueron inmunizados con VLPs de CMV-Ntt830 junto vía SMPH cIL-4 como se describe anteriormente. 50 μ g de la composición son diluido en 20 mM
 20 HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.3 a 500 μ l y se inyecta por vía subcutánea el día 0 y día 14. Los perros fueron sangrados en días 0 (pre-inmune), día 14 y día 21, y los sueros se analizaron usando ELISA específica de cIL-4 y CMV-Ntt830.

25 **ELISA**

Las placas de ELISA se recubrieron ya sea con cIL-4 a una concentración de 10 µg/ml o VLPs de CMV-Ntt830 a una concentración de 2 µg/ml. Las placas fueron bloqueadas y luego se incubaron con suero de perro en serie diluido. Se detectaron los anticuerpos encuadrados con marcada enzimáticamente anti-ratón IgG. Como control, también se analizaron sueros previamente inmunes de los mismos ratones (datos no mostrados). Todos los perros hicieron una clara y fuerte respuesta de IgG contra cIL-4 así como CMV-Ntt830.

EJEMPLO 22

Acoplamiento de IL-13 canino a CMV-Ntt830 e inducción de respuesta inmune

IL-13 canino (cIL-13) (SEQ ID NO: 63) se modifica para contener un Cys libre expresado análogamente como se describe para murino IL-5 en Zou Y, et al., Vaccine 28 (2010) 3192-3200. Acoplamiento del cIL-13 así que modificado a VLP CMV-Ntt830 se realiza como sigue. Con el fin de acoplarse a VLPs de CMV-Ntt830-13 cIL son primero derivatizadas con exceso 30 veces de una cruz química heterobifuncional-*liker*, succinimidyl - 6-(□-maleimidopropionamido) hexanoato (SMPH). El SMPH no unida se elimina por diálisis contra PBS. cIL-13 fue reducido por 1 h con una cantidad equimolar de tri(2-carboxyethyl) clorhidrato de fosfina (TCEP) en PBS (pH 8.0). cIL-13

reducido (80 μ M) fue incubado durante 4 horas a 22° C con 40 μ M de SMPH derivatizada CMV-Ntt830. 12 h contra pH 8.0 de PBS fue diálisis debida a la reacción.

5 **Inmunización de perros con cIL-13 acoplado a VLPs de CMV-Ntt830**

Grupos de cuatro perros hembra fueron inmunizados con VLPs de CMV-Ntt830 junto vía SMPH cIL-13 como se describe anteriormente. 50 μ g de la composición son diluido en 20 mM
10 HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.3 a 500 μ l y se inyecta por vía subcutánea el día 0 y día 113. Los perros fueron sangrados en días 0 (pre-inmune), día 14 y día 21, y los sueros se analizaron usando ELISA específica de cIL-13 y CMV-Ntt830.

ELISA

15 Las placas de ELISA se recubrieron ya sea con cIL-13 en una concentración de 10 μ g/ml o VLPs de CMV-Ntt830 a una concentración de 2 μ g/ml. Las placas fueron bloqueadas y luego se incubaron con suero canino en serie diluido. Se
20 detectaron los anticuerpos encuadrados con marcada enzimáticamente anti-ratón IgG. Como control, también se analizaron sueros previamente inmunes de los mismos ratones (datos no mostrados). Todos los perros hicieron una clara y fuerte respuesta de IgG contra cIL-13 así como CMV-Ntt830.

EJEMPLO 23

Acoplamiento de IL-31 humano a CMV-Ntt830 e inducción de respuesta inmune

IL-31 humano (cIL-31) (SEQ ID NO: 43) se modifica para
 5 contener un Cys libre expresado análogamente como se
 describe para murino IL-5 en Zou Y, et al., Vaccine 28
 (2010) 3192-3200. Acoplamiento del hIL-31 así que
 modificado a VLP CMV-Ntt830 se realiza como sigue. Con el
 fin de acoplarse a VLPs de CMV-Ntt830- hIL-31 son primero
 10 derivatizadas con exceso 30 veces de una cruz química
 heterobifunctional-liker, succinimidyl - 6-(α -
 maleimidopropionamido) hexanoato (SMPH). El SMPH no unida
 se elimina por diálisis contra PBS. hIL-31 fue reducido por
 1 h con una cantidad equimolar de tri(2-carboxyethyl)
 15 clorhidrato de fosfina (TCEP) en PBS (pH 8.0). hIL-31
 reducido (80 μ M) fue incubado durante 4 horas a 22° C con
 40 μ M de SMPH derivatizada CMV-Ntt830. 12 h contra pH 8.0
 de PBS fue diálisis debida a la reacción.

20 **Inmunización de ratones con hIL-31 acoplado a VLPs de
 CMV-Ntt830**

Grupos de cuatro ratones BALB/c hembra fueron
 inmunizados con VLPs de CMV-Ntt830 junto vía SMPH IL-31
 como se describe anteriormente. 50 μ g de la composición son
 25 diluido en 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.3 a 500 μ l y se

inyecta por vía subcutánea el día 0 y día 113. Los perros fueron sangrados en días 0 (pre-inmune), día 14 y día 21, y los sueros se analizaron usando ELISA específica de hIL-31 y CMV-Ntt830.

5 **ELISA**

Las placas de ELISA se recubrieron ya sea con hIL-31 a una concentración de 10 µg/ml o VLPs de CMV-Ntt830 a una concentración de 2 µg/ml. Las placas fueron bloqueadas y luego se incubaron con suero de ratón en serie diluido. Los anticuerpos unidos se detectan con IgG anti-ratón enzimáticamente marcado. Como control, también se analizaron sueros previamente inmunes de los mismos ratones (datos no mostrados). Todos los ratones hicieron una clara y fuerte respuesta de IgG contra hIL-31 así como CMV-Ntt830.