

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
“POLIPEPTÍDEOS ANTIGÊNICOS DE VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO”.

[0001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório U.S. No. 62.652.199, depositado em 3 de abril de 2018, que é incorporado neste documento por referência em sua totalidade.

[0002] O presente pedido contém uma Listagem de Sequências que foi submetida eletronicamente em formato ASCII e é aqui incorporada por referência em sua totalidade. A dita cópia ASCII, criada em 27 de março de 2019, é denominada 2019-03-27_01121-0031-00PCT_SL_ST25.txt e tem 187.354 bytes de tamanho.

[0003] Mesmo com muitos sucessos no campo da vacinologia, novos avanços são necessários para proteger os seres humanos contra muitas doenças infecciosas potencialmente fatais. Muitas vacinas licenciadas atualmente dependem de tecnologias com décadas de idade para produzir patógenos vivos atenuados ou mortos inativados, que carregam preocupações de segurança inerentes e, em muitos casos, estimulam apenas respostas imunes fracas e de curta duração que exigem a administração de doses múltiplas. Embora os avanços na engenharia genética e bioquímica tenham possibilitado o desenvolvimento de agentes terapêuticos para desafiar os alvos de doenças, essas aplicações no campo da vacinologia não foram totalmente realizadas. As tecnologias de proteínas recombinantes agora permitem a concepção de antígenos ideais. Além disso, as nanopartículas têm demonstrado cada vez mais o potencial para a apresentação ideal do antígeno e entrega de fármaco direcionada. Foi demonstrado que as nanopartículas com vários antígenos anexados têm maior avidéz de ligação fornecida pela exibição multivalente de suas cargas moleculares, e uma capacidade de cruzar barreiras biológicas com mais eficiência devido ao seu tamanho nanoscópico. As nanopartículas de

ferritina de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) fusionadas à proteína hemaglutinina (HA) do vírus influenza permitiram uma estabilidade do antígeno melhorada e uma imunogenicidade aumentada em modelos de influenza em camundongos (ver Kanekiyo e outros, *Nature* 499: 102 a 106 (2013)). Esta proteína de fusão se auto-montou em uma nanopartícula octaedricamente simétrica e apresentou 8 picos de HA trimérica para fornecer uma resposta imune robusta em vários modelos pré-clínicos quando usada com um adjuvante.

[0004] O vírus sincicial respiratório (VSR) é uma das principais causas de doenças respiratórias graves em bebês e uma das principais causas de doenças respiratórias em idosos. Continua a ser uma necessidade de vacina não atendida, apesar de décadas de pesquisa. Embora a necessidade de uma vacina seja clara, o desenvolvimento de uma vacina contra o VSR foi bloqueado na década de 1960, quando um ensaio clínico usando um vírus VSR inativado por formalina tornou a doença, após a infecção por VSR, mais grave em bebês. Ver, Hurwitz (2011) *Expert Rev Vaccines* 10 (10): 1415 a 1433. Mais recentemente, os programas clínicos usando um antígeno F de VSR em sua conformação pós-fusão não conseguiram obter eficácia suficiente em adultos. Ver, Faloon e outros (2017) *JID* 216: 1362 a 1370. No entanto, os antígenos F de VSR estabilizados na conformação pré-fusão podem produzir uma resposta de neutralização superior à dos antígenos pós-fusão que falharam na clínica.

[0005] Aqui, é apresentado um conjunto de novos polipeptídeos, nanopartículas, composições, métodos e usos envolvendo polipeptídeos de VSR. Novos polipeptídeos de F do VSR foram gerados, incluindo polipeptídeos nos quais um epítipo do polipeptídeo de VSR que é compartilhado entre F de VSR pré-fusão e F de VSR pós-fusão é bloqueado, por exemplo, por um N-glicano em um sítio de glicosilação adicionado por uma mutação. Também foram gerados polipeptídeos

antigênicos e nanopartículas compreendendo esses novos polipeptídeos de VSR e ferritina. Os polipeptídeos de ferritina antigênicos compreendendo polipeptídeos G do VSR também foram gerados. Além disso, os polipeptídeos antigênicos auto-adjuvantes compreendendo polipeptídeos de VSR e ferritina foram desenvolvidos em que porções imunoestimulatórias, tal como adjuvantes, foram diretamente ligadas quimicamente ao polipeptídeo antigênico. A conjugação direta de uma porção imunoestimulatória ao polipeptídeo antigênico permite a co-entrega direcionada da porção imunoestimulatória e do polipeptídeo de VSR em uma única entidade macromolecular, que pode diminuir muito o potencial de toxicidade sistêmica que é temida com vacinas tradicionais que compreendem antígenos e moléculas imunoestimulatórias, tal como adjuvantes como moléculas separadas. A co-entrega de porções imunoestimulatórias juntamente com polipeptídeos de VSR em uma entidade macromolecular e sua apresentação multivalente também pode reduzir a dose geral necessária para obter proteção, reduzindo encargos e custos de fabricação.

SUMÁRIO

[0006] É um objetivo desta descrição fornecer composições, kits, métodos e usos que podem fornecer uma ou mais das vantagens discutidas acima, ou pelo menos fornecer ao público uma escolha útil. Conseqüentemente, as seguintes modalidades são descritas neste documento.

[0007] A modalidade 1 é um polipeptídeo antigênico de VSR compreendendo um polipeptídeo de F de VSR, em que um epítipo do polipeptídeo de VSR, que é compartilhado entre F de VSR pré-fusão e F de VSR pós-fusão, é bloqueado.

[0008] A modalidade 2 é um polipeptídeo antigênico de VSR compreendendo um polipeptídeo de F de VSR, em que o polipeptídeo

de F de VSR compreende os resíduos de aminoácidos 62 a 69 e 196 a 209 da SEQ ID NO: 26 e uma asparagina correspondendo à posição 328, 348 ou 507 da SEQ ID NO: 26.

[0009] A modalidade 3 é o polipeptídeo antigênico de VSR da modalidade 2, em que um epítipo do polipeptídeo de VSR, que é compartilhado entre F de VSR pré-fusão e F de VSR pós-fusão, é bloqueado.

[0010] A modalidade 3b é o polipeptídeo antigênico de VSR da modalidade 1 ou 3, em que o epítipo bloqueado é um epítipo do sítio antigênico 1 de F de VSR.

[0011] A modalidade 3c é o polipeptídeo antigênico de VSR da modalidade 1 ou 3 a 3b, em que dois ou mais epítipos compartilhados entre F de VSR pré-fusão e F de VSR pós-fusão são bloqueados.

[0012] Modalidade 3d é o polipeptídeo antigênico de VSR da modalidade 1 ou 3 a 3c, em que dois ou mais epítipos do sítio antigênico 1 de F de VSR são bloqueados.

[0013] A modalidade 3e é o polipeptídeo antigênico de VSR da modalidade 1 ou 3 a 3d, em que um ou mais, ou todos os epítipos que se sobrepõem topologicamente com o epítipo bloqueado também estão bloqueados.

[0014] A modalidade 3f é o polipeptídeo antigênico de VSR da modalidade 3e, em que o epítipo bloqueado é um epítipo do sítio antigênico 1 de F de VSR.

[0015] A modalidade 4 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades anteriores, compreendendo um F de VSR pré-fusão.

[0016] A modalidade 5 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades anteriores, que é reconhecido por um anticorpo específico de F de VSR pré-fusão selecionado a partir de D25 ou AM14.

[0017] A modalidade 6 é o polipeptídeo antigênico de VSR da modalidade 4 ou 5, em que o F de VSR pré-fusão compreende um epítipo não encontrado no F de VSR pós-fusão.

[0018] A modalidade 7 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades 1 a 3, compreendendo um F de VSR pós-fusão.

[0019] A modalidade 8 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades 1 ou 3 a 6, em que o epítipo é bloqueado com um N-glicano ligado à asparagina.

[0020] A modalidade 9 é o polipeptídeo antigênico de VSR da modalidade 7, em que a asparagina corresponde a um resíduo não asparagina em uma sequência de F de VSR de ocorrência natural (SEQ ID NO: 26), opcionalmente em que o resíduo não asparagina corresponde à posição 328, 348 ou 507 da SEQ ID NO: 26.

[0021] A modalidade 10 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades anteriores, compreendendo ainda uma proteína ferritina.

[0022] A modalidade 11 é o polipeptídeo antigênico de VSR da modalidade 11, em que a ferritina compreende uma mutação que substitui um aminoácido exposto na superfície por uma cisteína.

[0023] A modalidade 12 é um polipeptídeo antigênico de VSR compreendendo um polipeptídeo de F de VSR e uma proteína ferritina, em que a proteína ferritina compreende uma mutação que substitui um aminoácido exposto na superfície por uma cisteína.

[0024] A modalidade 13 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades 11 a 12, em que a ferritina compreende uma ou mais mutações E12C, S26C, S72C, A75C, K79C, S100C e S111C de ferritina de *H. pylori* ou uma ou mais mutações correspondentes em uma ferritina não de *H. pylori* determinadas por alinhamento de pares ou estrutural.

[0025] A modalidade 14 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades 10 a 13, compreendendo uma ou mais porções imunoestimulatórias ligadas à ferritina por meio de um aminoácido exposto na superfície, opcionalmente em que o aminoácido exposto na superfície é uma cisteína resultante de uma mutação.

[0026] A modalidade 15 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades 10 a 14, em que a ferritina compreende uma mutação que substitui uma asparagina exposta na superfície por um aminoácido não asparagina, opcionalmente em que a asparagina está na posição 19 da ferritina de *H. pylori*, ou uma posição análoga em uma ferritina de não *H. pylori*, conforme determinado por alinhamento de pares ou estrutural.

[0027] A modalidade 16 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades 10 a 15, em que a ferritina compreende uma mutação que substitui uma cisteína interna por um aminoácido não cisteína, opcionalmente em que a cisteína interna está na posição 31 da ferritina de *H. pylori*, ou uma posição que corresponde à posição 31 da ferritina de *H. pylori*, conforme determinado por alinhamento de pares ou estrutural.

[0028] A modalidade 17 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades 12 a 16, em que o polipeptídeo de F de VSR compreende um epítipo não encontrado no F de VSR pós-fusão que é um epítipo de sítio 0, opcionalmente em que o epítipo de sítio 0 compreende resíduos de aminoácido 62 a 69 e 196 a 209 da SEQ ID NO: 26.

[0029] A modalidade 18 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades anteriores, em que o polipeptídeo de F de VSR compreende uma asparagina em uma posição correspondente à posição 328 da SEQ ID NO: 26.

[0030] A modalidade 19 é o polipeptídeo antigênico de VSR de

qualquer uma das modalidades anteriores, em que o polipeptídeo de F de VSR compreende uma asparagina em uma posição correspondente à posição 348 da SEQ ID NO: 26.

[0031] A modalidade 20 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades anteriores, em que o polipeptídeo de F de VSR compreende uma asparagina em uma posição correspondente à posição 507 da SEQ ID NO: 26.

[0032] A modalidade 21 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades anteriores, em que o polipeptídeo de F de VSR compreende uma leucina em uma posição correspondente à posição 498 da lisina da SEQ ID NO: 26.

[0033] A modalidade 22 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades anteriores, em que o polipeptídeo de F de VSR compreende uma prolina em uma posição correspondente à posição 217 da isoleucina da SEQ ID NO: 26.

[0034] A modalidade 23 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades anteriores, em que o polipeptídeo de F de VSR compreende um aminoácido que não a cisteína em uma posição correspondente à posição 155 da SEQ ID NO: 26 e / ou um outro aminoácido que não a cisteína na posição correspondente à posição 290 da SEQ ID NO: 26.

[0035] A Modalidade 24 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades anteriores, compreendendo uma serina em uma posição correspondente à posição 155 da SEQ ID NO: 26 e / ou uma serina em uma posição correspondente à posição 290 da SEQ ID NO: 26.

[0036] A modalidade 25 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades anteriores, em que o polipeptídeo de F de VSR carece de um sítio de clivagem pela furina, opcionalmente em que um ligante está presente no lugar do sítio de clivagem pela furina.

[0037] A modalidade 26 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades anteriores, em que o polipeptídeo de F de VSR compreende uma sequência tendo pelo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 99,5% de identidade com os aminoácidos 1 a 478 da SEQ ID NO: 17.

[0038] A Modalidade 27 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades anteriores, em que o polipeptídeo de F de VSR compreende uma sequência tendo pelo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 99,5% de identidade com a sequência de SEQ ID NO: 17.

[0039] A modalidade 28 é o polipeptídeo antigênico de VSR da modalidade 20 ou 21, compreendendo os aminoácidos 1 a 478 da SEQ ID NO: 17.

[0040] A Modalidade 29 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades 1 a 19, em que o polipeptídeo de F de VSR compreende uma sequência tendo pelo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 99,5% de identidade com os aminoácidos 1 a 478 da SEQ ID NO: 23.

[0041] A Modalidade 30 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades 1 a 19 ou 23, em que o polipeptídeo de F de VSR compreende uma sequência tendo pelo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 99,5% de identidade com a sequência de SEQ ID NO: 23.

[0042] A modalidade 31 é o polipeptídeo antigênico de VSR da modalidade 23 ou 24, compreendendo os aminoácidos 1 a 478 da SEQ ID NO: 23.

[0043] A modalidade 32 é o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades anteriores, compreendendo a sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 3 a 23.

[0044] A modalidade 32a é o polipeptídeo antigênico de VSR da

reivindicação 32, compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 17.

[0045] A modalidade 32b é o polipeptídeo antigênico de VSR da reivindicação 32, compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 23.

[0046] A modalidade 33 é uma partícula de ferritina compreendendo o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades 10 a 32b.

[0047] A modalidade 34 é uma composição que compreende o polipeptídeo antigênico de VSR ou partícula de ferritina de qualquer uma das modalidades anteriores e um polipeptídeo G de VSR.

[0048] A modalidade 34b é a composição da modalidade 34, em que a composição compreende a partícula de ferritina, e a partícula de ferritina compreende o polipeptídeo G de VSR, opcionalmente em que o polipeptídeo G de VSR é quimicamente conjugado à partícula de ferritina.

[0049] A modalidade 34c é a composição da modalidade 34 ou 34b, em que o polipeptídeo G de VSR não é glicosilado.

[0050] A modalidade 35 é uma composição que compreende o polipeptídeo antigênico de VSR ou partícula de ferritina de qualquer uma das modalidades 1 a 33, ou a composição de qualquer uma das modalidades 34 a 34c, compreendendo ainda um carreador farmacologicamente aceitável.

[0051] A modalidade 36 é o polipeptídeo antigênico de VSR, partícula de ferritina ou composição de qualquer uma das modalidades 1 a 35 para uso em um método para produzir uma resposta imune ao VSR ou para proteger um sujeito contra a infecção por VSR.

[0052] A Modalidade 37 é um método para produzir uma resposta imune ao VSR ou proteger um sujeito contra a infecção por VSR, compreendendo administrar qualquer um ou mais polipeptídeos antigênicos de VSR, partícula de ferritina ou composição de qualquer uma das modalidades 1 a 36 a um sujeito.

[0053] A modalidade 38 é o polipeptídeo antigênico de VSR, partícula de ferritina, composição ou método de qualquer uma das modalidades 36 a 37, em que o sujeito é um ser humano.

[0054] A modalidade 39 é um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo antigênico de VSR de qualquer uma das modalidades 1 a 32b, opcionalmente em que o ácido nucleico é um mRNA.

[0055] A modalidade 39b é uma composição ou kit compreendendo o ácido nucleico da modalidade 39 e um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo G de VSR, opcionalmente em que um ou ambos os ácidos nucleicos são mRNAs.

[0056] Objetivos e vantagens adicionais serão apresentados em parte na descrição que se segue, e em parte serão óbvios a partir da descrição, ou podem ser aprendidos pela prática. Os objetivos e vantagens serão realizados e alcançados por meio dos elementos e combinações particularmente apontados nas reivindicações em anexo.

[0057] Deve ser entendido que tanto a descrição geral anterior quanto a descrição detalhada a seguir são apenas exemplificativas e explicativas e não são restritivas das reivindicações.

[0058] Os desenhos em anexo, que são incorporados e constituem uma parte desta especificação, ilustram várias modalidades e, juntamente com a descrição, servem para explicar os princípios aqui descritos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0059] As Figuras 1A a 1D mostram uma estrutura de polipeptídeo de VSR Pré-F-NP exemplificativa. (Figura 1A) Diagrama linear que lista os números dos resíduos correspondentes ao N-terminal de cada segmento. A numeração é de acordo com a SEQ ID NO: 26. Os domínios 1-3 são indicados com DI, DII e DIII, respectivamente, e a região A de repetição hepta (HRA) e a região B de repetição hepta (HRB) também estão marcados. A ferritina C-terminal é marcada

(Nanopartícula de Ferritina). Os fragmentos F1 e F2 da porção F de VSR estão marcados abaixo do desenho. A região entre o fragmento F1 e F2, onde o fragmento de peptídeo 27 (p27), o peptídeo de fusão (FP) e os sítios de clivagem pela furina (sítios de furina) foram deletados e substituídos por um ligante flexível para formar construtos F de cadeia simples, é representada como uma linha e marcada acima do desenho. As estrelas acima do diagrama indicam as localizações aproximadas dos sítios de glicosilação manipulados E328N, S348N e R507N. (Figura 1B) Modelo estrutural da porção F de VSR pré-fusão indicando epítomos neutralizantes chave (Nab) para anticorpos D25, AM14, 101F e Palivizumab. A região aproximada de epítomos estruturais pré-fusão e pós-fusão compartilhados é indicada com um triângulo branco. As localizações dos sítios de glicosilação modificados exemplificativos E328N, S348N e R507N são marcadas. Os sítios de glicosilação manipulados mapeiam para regiões estruturalmente compartilhadas entre as conformações pré-fusão e pós-fusão e longe de epítomos neutralizantes chave reconhecidos por anticorpos tal como D25, AM14, 101F e Palivizumab. Como tal, os construtos contendo esses sítios de glicano manipulados ainda se ligam aos anticorpos neutralizantes acima (dados não mostrados). (Figura 1C) Modelo estrutural da nanopartícula de proteína F de VSR pré-fusão (Pré-F-NP) com regiões HRA e HRB sombreadas mais escuras. Os construtos Pré-F-NP dobrados resultantes podem formar 24 monômeros que exibem os epítomos chave listados na Figura 1B. (Figura 1D) Médias de classe 2D de micrografias eletrônicas do construto de VSR Pré-F-NP RF8085 (SEQ ID NO: 1) mostrando simetria de porções de trímero F de VSR na nanopartícula de ferritina de 24 monômeros.

[0060] A Figura 2 mostra a expressão em pequena escala de vários construtos de Pré-F-NP expressos em meio condicionado de células 293 conforme medido por Western blot de anticorpo D25. RF8090 é

SEQ ID NO: 2, que é uma variante de clonagem usada na expressão de CHO com a mesma sequência de RF8085, ou seja, SEQ ID NO: 1. RF8085 e RF8090 são construtos de Pré-F-NP que abrigam as mutações de dissulfeto e de preenchimento de cavidade de DS-CAV com as deleções e o ligante de cadeia única descrito na Figura 1A fusionado N-terminalmente à ferritina. RF8100-RF8105 e RF8108-RF8112 têm as sequências de SEQ ID NOs: 3 a 8 e 11 a 14, respectivamente. scF-pFerr = proteína de fusão do polipeptídeo de F de VSR e ferritina. As mutações que parecem melhorar a expressão do construto em relação ao referencial RF8090 são indicadas abaixo do Western blot. Mutações notáveis incluem a adição de sítios de glicano por meio das mutações E328N, S348N e R507N e a mutação de capeamento da hélice central I327P, que aumentou a expressão e a secreção da nanopartícula F de VSR no meio condicionado, conforme medido por Western blot.

[0061] A Figura 3 mostra a expressão de RF8085 (SEQ ID NO: 1; construto de controle) e RF8106 (SEQ ID NO: 9; compreendendo uma mutação I217P como em RF8108 e sem a mutação dissulfeto (DS) de DS-CAV1) conforme medido pela análise de Western blot de meios condicionados a partir da expressão de 293. Substituir o DS pela mutação de capeamento da hélice central I217P aumentou significativamente a expressão. Substituir o DS pela mutação de capeamento da hélice central não afeta a ligação do construto aos anticorpos específicos de pré-fusão D25 e AM14.

[0062] A Figura 4 mostra os resultados da purificação de cromatografia de exclusão por tamanho do construto RF8106 (SEQ ID NO: 9). O volume de retenção da nanopartícula RF8106 de aproximadamente 65 ml na coluna SEC preparatória Superose 6 é consistente com uma nanopartícula de 24 monômeros dobrada, sugerindo que as mutações em RF8106 não impediram a formação de

nanopartículas.

[0063] As Figuras 5A a 5B mostram a análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS) de RF8106 não reduzido (5A) e reduzido (5B). Como a análise SEC, o DLS demonstra que o Pré-F-NP de VSR formou a nanopartícula dobrada esperada. Os dados reduzidos mostram ainda que a partícula não foi rompida por redução, que foi realizada antes da conjugação do adjuvante à cisteína exposta na superfície introduzida na ferritina por uma mutação (ver Figura 6).

[0064] A Figura 6 mostra uma análise em gel de SDS-PAGE corado com Coomassie de RF8106 com e sem conjugação com o agonista de TLR9 CpG. O aumento do deslocamento do gel da nanopartícula tratada com CpG demonstrou que o adjuvante CpG pode ser adicionado à nanopartícula F de VSR até aproximadamente 40 a 50% de conclusão. A conjugação de CpG ou outras porções imunoestimulatórias, tal como o agonista de TLR7/8 SM7/8, não inibiu a capacidade da partícula de se ligar aos anticorpos específicos pré-fusão D25 e AM14.

[0065] A Figura 7 mostra Western blot de nanopartículas compreendendo F de VSR com (RF8117, SEQ ID NO: 17) e sem glicanos adicionais (RF8085, SEQ ID NO: 1; e RF8113, SEQ ID NO: 16). RF8113 é como RF8106, mas a cisteína exposta na superfície S111C (usando numeração de resíduo de ferritina, ou seja, correspondendo às posições na sequência de ferritina de SEQ ID NO: 208) de RF8106 foi substituída por uma cisteína exposta na superfície K79C (também usando numeração de resíduo de ferritina) para colocar o sítio de conjugação mais longe da porção Pré-F. Como RF8106, RF8113 retém a expressão melhorada sobre a molécula de referência RF8085. RF8117 é como RF8113, mas compreende ainda as três mutações de glicosilação identificadas na Figura 2, ou seja, E328N, S348N e R507N, para melhorar ainda mais a expressão e bloquear os epítomos não neutralizantes compartilhados entre as conformações de

F pré-fusão e F pós-fusão, conforme descrito na Figura 1B.

[0066] A Figura 8 mostra a expressão de construtos F de VSR com diferentes substituições em potenciais sítios de clivagem de protease similar à tripsina. Foi observado na expressão da linhagem de células CHO de RF8090 (mesma sequência de proteína que RF8085 com uma sequência de DNA diferente adaptada ao vetor de expressão de CHO) que o polipeptídeo foi cortado entre a porção F e a porção de ferritina, resultando em expressão reduzida. Pelas massas resultantes da porção F, estimou-se que a proteólise poderia estar ocorrendo perto de HRB, região de ligação da rã-touro do construto Pré-F-NP. Mutações de resíduos de lisina e arginina nesta região (resíduos ~ 450 a 550) foram exploradas para eliminar a potencial proteólise similar à tripsina do construto. As mutações em RF8122 (SEQ ID NO: 18) em relação a RF8117 (K498L e K508Q) forneceram expressão melhorada em células 293 e podem reduzir ou eliminar a proteólise em células CHO. Mutações alternativas limitaram a expressão.

[0067] As Figuras 9A a B. Expressão de RF8090, RF8117 e RF8140 em células CHO transfectadas de forma estável. O rendimento da expressão de RF8090 (SEQ ID NO: 2) foi observado em níveis baixos. Mutações para substituir o dissulfeto de DS-CAV1 e mutações para o ligante entre a porção F e a porção de ferritina para eliminar potenciais sítios de clivagem pela tripsina foram introduzidas como descrito acima nos construtos RF8117 (SEQ ID NO: 17) e RF8140 (SEQ ID NO: 23), que foram clonados em células CHO de expressão estável. (Figura 9A) A expressão de RF8117 e RF8140 a partir de três e quatro grupos de células CHO, respectivamente, em meio condicionado por CHO foi comparada com os rendimentos de RF8090 em meio condicionado por CHO por análise de D25-Western blot. Todos os três grupos de CHO para RF8117 e todos os quatro grupos de CHO para RF8140 expressam para rendimentos mais elevados do que RF8090. (Figura 9B) Expressão

de RF8117 em meio condicionado por CHO conforme medida pelo anticorpo específico F de pré-fusão D25 por Octeto. O painel esquerdo mostra a resposta de RF8140 purificado a partir de meios 293 de concentrações conhecidas representadas graficamente contra a resposta de ligação a D25 em uma ponta de Proteína A fornecendo uma curva padrão. Os pontos individuais representam as respostas à ligação D25 do meio condicionado por CHO RF8117. O painel direito mostra o rendimento calculado de RF8117 ou RF8140 em meio condicionado por grupo de CHO com base na resposta de ligação a D25. Ambos RF8117 e RF8140 foram expressos no meio conforme medido pela ligação a D25 e AM14, demonstrando que, como as células 293, as células CHO são capazes de expressar os Pré-F-NPs de uma maneira dobrada que retém a estrutura do trímero F pré-fusão.

[0068] As Figuras 10A a B mostram a resposta de anticorpos neutralizantes para Pré-F-NP RF8117. (Figura 10A) Comparação de titulações de neutralização de VSR produzidas por imunização de Alta Dose (1 µg) e Baixa Dose (0,1 µg) de DS-CAV1 (Trímero Pré-F, SEQ ID NO: 25), Trímero F pós-fusão (trímero pós-F; SEQ ID NO: 24) ou Pré-F-NP com glicosilação manipulada (Pré-F-NP; RF8117, SEQ ID NO: 17) foi medida por ensaio com células VERO. Todos os polipeptídeos de VSR foram administrados com o adjuvante AF03 como aqui descrito. Por todo o documento, a menos que indicado de outra forma, AF03 foi administrado com o polipeptídeo ou nanopartícula de VSR, mas não conjugado a ela. Polipeptídeos e doses de VSR são marcados abaixo do eixo x. A análise estatística de respostas a altas doses em relação à imunização Pré-F-NP é indicada. (Figura 10B) Comparação de titulações de neutralização de VSR produzidas por imunização de Alta Dose (1 µg) e Baixa Dose (0,1 µg) com DS-CAV1 (Trímero Pré-F), pré-F-NP sem glicosilação manipulada (RF8113, SEQ ID NO: 16) ou Pré-F-NP com glicosilação manipulada (RF8117, SEQ ID NO: 17) conforme

medido pelo ensaio com células VERO. Todos os polipeptídeos de VSR foram administrados com o adjuvante AF03 (não conjugado a qualquer polipeptídeo ou nanopartícula) como aqui descrito. Os polipeptídeos e doses de VSR são marcados abaixo do eixo x.

[0069] As Figuras 11A a D mostram a comparação do anticorpo de ligação ao trímero F pré-fusão de VSR (DS-CAV1) e anticorpos neutralizantes de VSR produzidos por imunização com trímero F pós-fusão (SEQ ID NO: 24) ou Pré-F-NP (RF8140 SEQ ID NO: 23) em modelos de camundongos ou primatas não humanos. (Figura 11A) As respostas de anticorpos de ligação ao trímero F pré-fusão produzidas em camundongos a partir da imunização entre F pós-fusão e Pré-F-NP (RF8140, SEQ ID NO: 23) são comparadas. (Figura 11B) As respostas de anticorpos neutralizantes produzidas em camundongos a partir da imunização com F pós-fusão e Pré-F-NP (RF8140, SEQ ID NO: 23) são mostradas. (Figura 11C) As respostas do anticorpo de ligação ao trímero F pré-fusão produzidas em primatas não humanos por Pré-F-NP com ou sem adjuvante (AF03, indicado entre parênteses abaixo) são comparadas. (Figura 11D) As titulações de neutralização de VSR produzidas por imunização com Pré-F-NP (RF8140, SEQ ID NO: 23) com e sem adjuvante AF03 são comparadas. Em camundongos, Pré-F-NP produz uma resposta de ligação a F pré-fusão e resposta de neutralização de VSR mais altas em comparação com o trímero pós-fusão. Em primatas não humanos, o Pré-F-NP produz uma potente resposta de neutralização.

[0070] As Figuras 12A a 12B mostram que os sítios de glicosilação manipulados bloqueiam os epítomos pós-fusão. (Figura 12A) A resposta de anticorpo a F pré-fusão (DS-CAV1) produzida por imunização com Pré-F-NP sem glicosilação manipulada (RF8113) ou Pré-F-NP com glicosilação manipulada (Partícula Gly manipulada) em alta dose (1 µg) e baixa dose (0,1 µg) medida pelo Octeto é mostrada. (Figura 12B) A

resposta de anticorpo ao trímero pós-fusão produzida por imunização com Pré-F-NP sem glicosilação manipulada (RF8113) ou Pré-F-NP com glicosilação manipulada (RF8117) em alta dose (1 µg) e baixa dose (0,1 µg) medida por Octet é mostrada. Como acima, todos os polipeptídeos de VSR foram misturados com AF03 durante a imunização. Enquanto RF8113 e RF8117 produzem respostas robustas de anticorpos para F pré-fusão, a resposta de anticorpos a F pós-fusão produzida por RF8117 é muito reduzida. Isto é devido ao mapeamento de glicanos manipulados para os epítomos pré-fusão e pós-fusão compartilhados (Figura 2B).

[0071] As Figuras 13A a C mostram o bloqueio de epítomos não neutralizantes por sítios de glicosilação manipulados. (Figura 13A) Comparação de titulações de neutralização de VSR produzidas por imunização com Pré-F-NP com sítios de glicosilação de ocorrência natural (“Partícula de glicano de ocorrência natural”; RF8113, SEQ ID NO: 16) versus Pré-F NP com sítios de glicosilação adicionais manipulados (“Partícula de Glicano+”; RF8117, SEQ ID NO: 17) na dose de 0,1 µg em estudos com camundongo, conforme medido pelo ensaio com células VERO. (Figura 13B) Comparação de respostas de anticorpo de ligação a trímero F pós-fusão de VSR produzidas por imunização com partícula de glicano de ocorrência natural (RF8113, SEQ ID NO: 16) versus partícula de Glicano+ (RF8117, SEQ ID NO: 17) na dose de 0,1 µg em estudos em camundongo. (Figura 13C) Relação das titulações de neutralização medidas para as titulações de ligação dos painéis A e B demonstrando que os glicanos manipulados não reduziram a resposta funcional do anticorpo neutralizante, mas diminuíram os anticorpos não neutralizantes produzidos para os epítomos pré-fusão / pós-fusão compartilhados (Figura 1B), melhorando assim a relação de anticorpos neutralizantes / de ligação.

[0072] As Figuras 14A a D mostram a caracterização de peptídeo

de domínio central G de VSR (Gcc) conjugado à nanopartícula de ferritina. (Figura 14A) Gel de SDS-PAGE corado com Coomassie mostrando a conjugação de clique do domínio central de G de VSR (SEQ ID NO. 29) com a nanopartícula de ferritina, formando o antígeno Gcc-NP. (Figura 14B) Modelo estrutural de Gcc-NP. (Figura 14C) Comparação de respostas de Gcc-anticorpo de ligação produzidas por imunização com peptídeo Gcc isoladamente (peptídeo Gcc, SEQ ID NO. 29) versus peptídeo Gcc conjugado a nanopartículas (Gcc-NP) em estudos em camundongo. Uma resposta representativa a partir de soros de animais virgens de tratamento é mostrada na caixa branca, enquanto as respostas da pós-segunda imunização são mostradas em caixas cinza claro e as respostas de pós-terceira imunização são mostradas em caixas cinza escuro. (Figura 14D) Comparação de titulações de neutralização de VSR produzidas por imunização com peptídeo Gcc (SEQ ID NO. 29) versus Gcc-NP em estudos em camundongo após a terceira injeção, conforme medido por ensaio com células HAE. Os soros de animais virgens de tratamento e os soros de animais imunizados com o peptídeo Gcc foram agrupados e as titulações são mostrados como barras.

[0073] As Figuras 15A a C mostram a coadministração Pré-F-NP de VSR (RF8140) e Gcc-NP produz uma resposta de neutralização. Os camundongos foram imunizados com Pré-F-NP (RF8140) isoladamente, Gcc-NP isoladamente ou Pré-F-NP e Gcc-NP combinados na dose de 1 µg por antígeno. Todas as imunizações foram adjuvantadas com AF03 como acima. (Figura 15A) A imunização de camundongos com RF8140 isoladamente (Pré-F-NP) ou RF8140 e Gcc-NP (Pré-F-NP + Gcc-NP) produziu anticorpos que se ligam ao trímico F pré-fusão. (Figura 15B) A imunização de camundongos com Gcc-NP isoladamente (Gcc-NP) ou RF8140 e Gcc-NP (Pre-F-NO + Gcc-NP) produziu anticorpos que se ligam ao peptídeo Gcc. (Figura 15C) Animais

imunizados com Pré-F-NP isoladamente, Gcc-NP isoladamente ou a coadministração de Pré-F-NP e Gcc-NP produzem uma resposta de neutralização pós-segunda e pós-terceira imunização, conforme medido por Ensaio de neutralização de HAE. A coadministração de Pré-F-NP + Gcc-NP produziu uma resposta de neutralização superior à produzida pela imunização apenas com Pré-F-NP.

[0074] As Figuras 16A a B mostram que a coadministração de Pré-F-NP e Gcc-NP não interfere com a produção de anticorpos que se ligam ao trímero F de pré-fusão ou nanopartícula de Gcc. As titulações de neutralização medidas pelo ensaio de células VERO sensíveis a F estão à esquerda na Figura 16A, enquanto as titulações de neutralização medidos pelo ensaio HAE sensíveis a F e G são mostradas à direita na Figura 16B. As imunizações de animais foram como na Figura 15. Os polipeptídeos de VSR usados na imunização estão abaixo do eixo horizontal. As barras pretas representam soros reunidos a partir dos grupos de imunização descritos na Figura 15 e são marcados de forma similar. Os soros de animais virgens de tratamento também são mostrados como barras pretas e marcados para comparação. Os soros depletados com o trímero F pré-fusão estão em branco, logo à direita da barra preta correspondente. Os soros depletados com ectodomínio de G estão em barras listradas diagonalmente, logo à direita da barra preta correspondente. O soro depletado com o trímero F pré-fusão seguido pela depleção com o ectodomínio de G está em uma barra listrada verticalmente. (Figura 16A) As titulações de neutralização foram observadas em ensaios com células VERO para soros a partir de imunização com RF8140 e coadministração de RF8140 + Gcc-NP, mas não soros de animais virgens de tratamento ou soros de imunização com Gcc-NP isoladamente. A depleção dos soros a partir dos grupos RF8140 ou RF8140 + Gcc-NP com o trímero F pré-fusão reduziu as titulações de

neutralização mensuráveis. (Figura 16B) As titulações de neutralização foram observadas em ensaios com células HAE para soros de animais imunizados com RF8140, Gcc-NP ou RF8140 coadministrado com Gcc-NP. Os soros de animais virgens de tratamento não apresentaram resposta de neutralização. O soro de animais imunizados com RF8140 que é depletado com o tríplice F pré-fusão tem uma redução na titulação de neutralização mensurável. O soro de animais imunizados com Gcc-NP que está depletado com ectodomínio de G tem uma redução na titulação de neutralização mensurável. O soro de animais imunizados com uma coadministração de RF8140 e Gcc-NP não tem uma titulação de neutralização mensurável reduzida quando depletado com o tríplice F pré-fusão isoladamente, mas tem uma titulação de neutralização mensurável reduzida quando depletado com ambos os tríplices de F pré-fusão e ectodomínio de G. Juntos, esses dados sugerem que a coadministração com o Pré-F-NP e Gcc-NP não interfere com as respectivas capacidades dos antígenos para produzir anticorpos neutralizantes para F ou G pré-fusão.

[0075] As Figuras 17A a B mostram que adjuvantar RF8117 ou RF8140 com AF03, SPA09 ou Alume produz uma resposta de neutralização superior em camundongos em relação ao RF8117 sem adjuvante. (Figura 17A) As titulações de neutralização para soros a partir de camundongos imunizados com RF8117 sem adjuvante (Sem Adj), com adjuvante com Alume ou com adjuvante com AF03 são mostradas conforme medidas pelo ensaio com células VERO. (Figura 17B) As titulações de neutralização para soros de camundongos imunizados com RF8117 sem adjuvante (Sem Adj), RF8117 com adjuvante SPA09 ou RF8140 com adjuvante AF03 são mostradas como medidas pelo ensaio com células VERO. Em todos os casos, tanto para RF8117 quanto para RF8140, em camundongos virgens de tratamento, os grupos com adjuvante produziram um titulação de neutralização mais

alta do que os grupos sem adjuvante.

[0076] As Figuras 18A a B mostram que adjuvantar RF8140 com AF03 ou SPA09 produz uma resposta de neutralização superior em primatas não humanos (NHPs) em relação a imunizações com RF8140 sem adjuvante. (Figura 18A) As respostas do tríplice F de pré-fusão medidas em soros de NHP após imunização com RF8140 sem adjuvante (Sem Adj), com adjuvante AF03 ou com adjuvante SPA09 (duas doses de SPA09 foram usadas, conforme indicado abaixo) conforme medidas por ELISA. Em todos os pontos no tempo, adjuvantar com AF03 ou SPA09 produz uma resposta de neutralização superior. (Figura 18B) As titulações de neutralização para soros a partir de NHPs imunizados com RF8140 ou sem adjuvante (Sem Adj), com adjuvante AF03 ou com adjuvante SPA09 (duas doses de SPA09 foram usadas, conforme indicado abaixo) conforme medido pelo ensaio com células VERO. Em todos os casos, a imunização com RF8140 com adjuvante produz uma titulação de neutralização mais alta do que os grupos sem adjuvante em todos os pontos no tempo.

[0077] As Figuras 19A a B mostram que a conjugação de RF8140 com o agonista de TLR7/8 SM7/8 ou o agonista de TLR9 CpG produz uma titulação superior de ligação a F pré-fusão em relação ao RF8140 sem adjuvante isoladamente. (Figura 19A) As respostas de ligação ao tríplice F de pré-fusão medidas em soros de camundongos virgens de tratamento, camundongos imunizados com RF8140 sem adjuvante, camundongos imunizados com RF8140 conjugado com adjuvante SM7/8, RF8140 adjuvantado com 130 ng de SM7/8 ou RF8140 adjuvantado com 20 µg de SM7/8 são mostradas. RF8140 conjugado com SM7/8 produz uma titulação de ligação ao tríplice F pré-fusão mais alta do que grupos sem adjuvante ou adjuvantados com SM7/8. (Figura 19B) As respostas de ligação ao tríplice F de pré-fusão medidas em soros de camundongos virgens de tratamento, camundongos

imunizados com RF8140 sem adjuvante, camundongos imunizados com RF8140 conjugado com adjuvante CpG, RF8140 adjuvantado com 680 ng de CpG ou RF8140 adjuvantado com 20 µg de SM7/8 são mostradas. RF8140 conjugado com SM7/8 produz uma titulação de ligação ao trímero F pré-fusão mais alta do que grupos sem adjuvante ou com adjuvante SM7/8.

[0078] As Figuras 20A a G mostram que as vacinas candidatas de subunidade F produzem anticorpos neutralizantes pré-F direcionados e uma resposta das células T CD4⁺ Th1 no sistema MIMIC. (Figura 20A) As titulações anti-pré-F no sistema MIMIC foram medidas por AF após a iniciação com cada Ag na concentração de equivalente molar de F com 10 ng / ml de pre-F NP (n = 48 a 49 doadores por grupo). (Figura 20B) As titulações de microneutralização foram medidas e são representadas em unidades internacionais / ml (IU / ml). (Figura 20C) Uma razão entre anti-pré-F e pós-F > 1 representa um nível mais alto de anticorpo pré-ligação a F versus anticorpo pós-ligação a F, enquanto um valor de razão < 1 representa uma resposta Ab maior para pós-ligação a F. (Figura 20D) A produção de TNFα em células T CD154⁺ / CD4⁺ ativadas reestimuladas com células alvo carregadas com proteína F foi medida usando citometria de fluxo, n = 48. A significância estatística foi determinada por comparação múltipla de Tukey-Kramer-HSD (Figura 20E) A titulação de anticorpos pré-existente em indivíduos humanos (soroestado) está fortemente correlacionada com a magnitude da resposta imune do VSR no sistema MIMIC. O gráfico de regressão linear mostra que a resposta anti-pré-F IgG no soro de cada doador versus a resposta anti-pré-F IgG total foi gerada por software ou algoritmo e o valor p para o declive comum foi analisado pelo método estatístico (n = 50). O eixo Y representa os níveis de anti-pré-F IgG obtidos após a iniciação com VSR. (Figura 20 F) Como na Figura 20E, o gráfico de regressão linear mostrando anti-pré-F IgG no soro de cada

doador versus anti-pré-F IgG total após a iniciação com candidatos de vacina de subunidade F (pós-F em quadrados, pré-F-NP em círculos e DC-Cav1 em losangos). As titulações circulantes pré-existentes de anti-pré-F IgG variaram de 199.800 a 3.037.600.000. Cada ponto representa o valor de IgG de cada doador individual. (Figura 20G) Comparação de respostas de anticorpos de ligação a Gcc produzidas por tratamento com peptídeo Gcc isoladamente (peptídeo Gcc) versus peptídeo Gcc conjugado a nanopartículas (Gcc-NP) em células B humanas. Um grupo sem tratamento é mostrado para comparação como acima.

[0079] As Figuras 21A a C mostram as titulações de anticorpos neutralizantes produzidas por uma dose baixa (0,5 µg) de nanopartículas de ferritina-Gcc de VSR ("Gcc-NP"). São mostradas as titulações de neutralização de HAE de cepa de VSR A produzidas a partir da imunização com Gcc-NP de VSR contendo a sequência de Gcc de VSR A2 (formulada com AF03), de soros colhidos duas semanas após a segunda imunização (2wp2) (Figura 21A) ou duas semanas após a terceira imunização (2wp3) (Figura 21B), com soros virgens de tratamento e hiperimunes como controles negativos e positivos. Também é mostrada uma titulação de neutralização de HAE de cepa B de VSR obtida a partir da imunização com Gcc-NP de VSR contendo a sequência de Gcc de VSR A2 (formulada com AF03), a partir de soros colhidos duas semanas após a terceira imunização (2wp3) (Figura 21C).

[0080] As Figuras 22A a B mostram as respostas de anticorpos de ligação ao antígeno da cepa A2 de VSR produzidas por Gcc-NP de VSR. (Figura 22A) Respostas de anticorpos de ligação a Gcc produzidos para a cepa Gcc A2 medidas duas semanas após a segunda injeção (caixas cinza claro) e duas semanas após a terceira injeção (caixas cinza escuro) produzidas pela alta dose (5 µg) de Gcc-NP de VSR. A resposta do soro do camundongo virgem de tratamento é mostrada como um controle negativo. (Figura 22B) Respostas de

anticorpos de ligação a Gcc produzidos para a cepa Gcc A2 medidas duas semanas após a segunda injeção (caixas cinza claro) e duas semanas após a terceira injeção (caixas cinza escuras) produzidas pela baixa dose (0,5 µg) de Gcc-NP de VSR.

[0081] As Figuras 23A a B mostram as respostas de anticorpos de ligação ao antígeno da cepa B1 de VSR produzidos por Gcc-NP de VSR. (Figura 23A) Respostas de anticorpos de ligação a Gcc produzidos para a cepa Gcc B1 medidas duas semanas após a segunda injeção (caixas cinza claro) e duas semanas após a terceira injeção (caixas cinza escuro) produzidas por uma alta dose (5 µg) de Gcc-NP de VSR. A resposta do soro do camundongo virgem de tratamento é mostrada como um controle negativo. (Figura 23B) Respostas de anticorpos de ligação a Gcc produzidas para a cepa Gcc B1 medidas duas semanas após a segunda injeção (caixas cinza claro) e duas semanas após a terceira injeção (caixas cinza escuro) produzidas por uma baixa dose (0,5 µg) de Gcc-NP de VSR.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0082] São fornecidos polipeptídeos de VSR, que podem ser antigênicos quando administrados isoladamente, com adjuvante como uma molécula separada, e / ou como parte de uma nanopartícula (por exemplo, partícula de ferritina ou partícula de lumazina sintase), que podem ser autoadjuvantes. Em algumas modalidades, os polipeptídeos antigênicos de VSR compreendem um polipeptídeo de F de VSR e uma ferritina, e / ou um polipeptídeo de F de VSR no qual um epítipo do polipeptídeo de VSR que é compartilhado entre F de VSR pré-fusão e F de VSR pós-fusão é bloqueado. Os polipeptídeos de F de VSR que dirigem a produção de anticorpos contra a conformação de F de VSR pré-fusão induziram uma maior resposta de anticorpos *in vivo* ao F de VSR de pré-fusão em comparação com F de VSR pós-fusão. Também são descritos neste documento os polipeptídeos G de VSR

compreendendo a totalidade ou parte de G de VSR, e pode ainda compreender uma ferritina. As proteínas G de VSR e F de VSR são essenciais para a ligação e fusão de VSR às células hospedeiras.

[0083] F de VSR existe em dois estados conformacionais, as conformações pré-fusão e pós-fusão. Em seu estado nativo pré-fusão, F de VSR é um trímero composto por 3 protômeros. Assim, a imunização com polipeptídeos de F de VSR na conformação pré-fusão pode ter propriedades melhoradas. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de F de VSR é manipulado para induzir imunidade contra F de VSR na conformação pré-fusão. G de VSR é uma proteína de ligação responsável por associar o VSR às células epiteliais das vias aéreas humanas.

[0084] A. Definições

[0085] “Sítio antigênico 0” ou “epítoto do sítio 0”, tal como aqui utilizado, refere-se a um sítio localizado no ápice do trímero F de VSR pré-fusão, compreendendo os resíduos de aminoácidos 62 a 69 e 196 a 209 de F de VSR de ocorrência natural (SEQ ID NO: 26). O epítoto do sítio 0 é um sítio de ligação para anticorpos que têm especificidade para F de VSR pré-fusão, tal como D25 e AM14, e a ligação de anticorpos ao epítoto do sítio 0 bloqueia a ligação na superfície celular de VSR (ver McLellan e outros, Science 340 (6136): 1113 a 1117 (2013)).

[0086] “Estabilidade do antígeno”, tal como aqui utilizado, refere-se à estabilidade do antígeno ao longo do tempo ou em solução.

[0087] “Substituições de preenchimento de cavidade”, tal como aqui utilizado, refere-se a substituições hidrofóbicas manipuladas para preencher cavidades presentes no trímero F de VSR pré-fusão.

[0088] “Proteína F” ou “proteína F de VSR” refere-se à proteína de VSR responsável por dirigir a fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira durante a entrada viral.

[0089] “Polipeptídeo F de VSR” ou “polipeptídeo de F” refere-se a um polipeptídeo compreendendo pelo menos um epítipo da proteína F.

[0090] “Adição de glicano”, tal como aqui utilizado, refere-se à adição de mutações que introduzem sítios de glicosilação não presentes em F de VSR de ocorrência natural, que podem ser manipulados para aumentar a expressão do construto, aumentar a estabilidade do construto, ou bloquear epítopos compartilhados entre a conformação pré-fusão e pós-fusão. Uma proteína modificada compreendendo adições de glicano teria mais glicosilação e, portanto, um peso molecular mais alto. A adição de glicano pode reduzir a extensão em que um polipeptídeo de F de VSR produz anticorpos para a conformação de F de VSR pós-fusão.

[0091] “Proteína G” ou “proteína G de VSR”, como aqui utilizado, refere-se à proteína de ligação responsável por associar VSR com células epiteliais das vias aéreas humanas. Uma sequência de aminoácidos de G de VSR de ocorrência natural exemplificativa é fornecida como SEQ ID NO: 27. A proteína G de VSR compreende um ectodomínio (aproximadamente aminoácidos 66 a 297 de G de VSR (SEQ ID NO: 27)) que reside extracelularmente. Dentro do ectodomínio de VSR, G é uma região central conservada (Gcc ou CCR, aproximadamente aminoácidos 151 a 193 de SEQ ID NO: 27). O CCR de G de VSR compreende um motivo CX3C. O motivo CX3C medeia a ligação da proteína G ao receptor CX3CR1.

[0092] “Capeamento de hélice PRO” ou “capeamento de hélice de prolina”, conforme usado neste documento, refere-se a quando um cap de hélice compreende uma prolina, que pode estabilizar a formação de hélice.

[0093] “Substituições de estabilização intra-protômero”, tal como aqui utilizado, descreve substituições de aminoácidos em F de VSR que estabilizam a conformação pré-fusão estabilizando a interação dentro

de um protômero do trímero F de VSR.

[0094] “Substituições de estabilização inter-protômero”, tal como aqui utilizado, descreve substituições de aminoácidos em F de VSR que estabilizam a conformação pré-fusão estabilizando a interação dos protômeros do trímero F de VSR entre si.

[0095] “Clivagem de protease”, tal como aqui utilizado, refere-se à proteólise (às vezes também chamada de “corte” na técnica) de resíduos susceptíveis (por exemplo, lisina ou arginina) em uma sequência de polipeptídeos.

[0096] “Pós-fusão”, tal como aqui utilizado em relação a F de VSR, refere-se a uma conformação estável de F de VSR que ocorre após a fusão do vírus e das membranas celulares.

[0097] “Pré-fusão”, tal como aqui utilizado em relação a F de VSR, refere-se a uma conformação de F de VSR que é adotada antes da interação vírus-célula.

[0098] “Protômero”, tal como aqui utilizado, refere-se a uma unidade estrutural de uma proteína oligomérica. No caso de F de VSR, uma unidade individual do trímero F de VSR é um protômero.

[0099] “Ferritina” ou “proteína ferritina”, tal como aqui utilizado, refere-se a uma proteína com identidade de sequência detectável para ferritina de *H. pylori* (SEQ ID NO: 208 ou 209) ou outra ferritina aqui discutida, tal como ferritina de *P. furiosus*, ferritina de *Trichoplusia ni*, ou ferritina humana, que serve para armazenar ferro, por exemplo, intracelularmente ou em tecidos ou para transportar ferro na corrente sanguínea. Tais ferritinas exemplificativas, incluindo aquelas que ocorrem como duas cadeias de polipeptídeos, conhecidas como cadeias pesadas e leves (por exemplo, ferritina de *T. ni* e ferritina humana), são discutidas em detalhes abaixo. Em algumas modalidades, uma ferritina compreende uma sequência tendo pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%,

99% ou 99,5% de identidade com uma sequência de ferritina aqui descrita, por exemplo, na Tabela 1 (Tabela de Sequência). Uma ferritina pode ser um fragmento de uma sequência de ocorrência natural de comprimento total.

[0100] “Ferritina de ocorrência natural”, tal como aqui utilizado, refere-se a uma ferritina cuja sequência consiste de uma sequência de ocorrência natural. As ferritinas também incluem ferritina de comprimento total ou um fragmento de ferritina com uma ou mais diferenças em sua sequência de aminoácidos a partir de uma ferritina de ocorrência natural.

[0101] Como usado aqui, um “monômero de ferritina” se refere a uma única molécula de ferritina (ou, quando aplicável, uma única cadeia pesada ou leve de ferritina) que não foi montada com outras moléculas de ferritina. Um “multímero de ferritina” compreende vários monômeros de ferritina associados. Uma “proteína ferritina” inclui ferritina monomérica e ferritina multimérica.

[0102] Conforme usado neste documento, “partícula de ferritina” refere-se à ferritina que se auto-montou em uma forma globular. As partículas de ferritina são às vezes chamadas de “nanopartículas de ferritina” ou simplesmente “nanopartículas”. Em algumas modalidades, uma partícula de ferritina compreende 24 monômeros de ferritina (ou, quando aplicável, 24 cadeias pesadas e leves totais).

[0103] “Ferritina híbrida”, tal como aqui utilizado, refere-se à ferritina que compreende ferritina de *H. pylori* com uma extensão amino terminal da ferritina de rã-touro. Uma sequência exemplificativa usada como uma extensão amino terminal da ferritina de rã-touro aparece como SEQ ID NO: 217. Na ferritina híbrida, a extensão amino terminal da ferritina de rã-touro pode ser fusionada com a ferritina de *H. pylori* de modo que os sítios de ligação da porção imunoestimulatória sejam distribuídos uniformemente na superfície da partícula de ferritina. “Ligante de rã-

touro”, conforme usado neste documento, é um ligante que compreende a sequência da SEQ ID NO: 217. A ferritina híbrida também é às vezes chamada de “bfpFerr” ou “ferritina bfp”. Qualquer um dos construtos que compreendem uma sequência de rã-touro pode ser fornecido sem a sequência de rã-touro, tal como, por exemplo, sem um ligante ou com um ligante alternativo. Sequências de ligante de rã-touro exemplificativas são fornecidas na Tabela 1. Onde a Tabela 1 mostra um ligante de rã-touro, o mesmo construto pode ser feito sem um ligante ou com um ligante alternativo.

[0104] “N-glicano”, tal como aqui utilizado, refere-se a uma cadeia de sacarídeo ligada a uma proteína no nitrogênio da amida de um resíduo N (asparagina) da proteína. Como tal, um N-glicano é formado pelo processo de N-glicosilação. Este glicano pode ser um polissacarídeo.

[0105] “Glicosilação”, tal como aqui utilizado, refere-se à adição de uma unidade de sacarídeo a uma proteína.

[0106] “Resposta imune”, tal como aqui utilizado, refere-se a uma resposta de uma célula do sistema imunológico, tal como uma célula B, célula T, célula dendrítica, macrófago ou polimorfonucleócito, a um estímulo, tal como um antígeno ou vacina. Uma resposta imune pode incluir qualquer célula do corpo envolvida em uma resposta de defesa do hospedeiro, incluindo, por exemplo, uma célula epitelial que secreta um interferon ou uma citocina. Uma resposta imune inclui, mas não está limitada a, uma resposta imune inata e / ou adaptativa. Tal como aqui utilizado, uma “resposta imune protetora” refere-se a uma resposta imune que protege um sujeito de infecção (por exemplo, evita a infecção ou previne o desenvolvimento de doença associada à infecção). Os métodos de medição das respostas imunes são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, medir a proliferação e / ou atividade de linfócitos (tal como células B ou T), secreção de citocinas ou

quimiocinas, inflamação, produção de anticorpos e similares. Uma “resposta de anticorpo” é uma resposta imune na qual anticorpos são produzidos.

[0107] Conforme usado neste documento, um “antígeno” se refere a um agente que produz uma resposta imune e / ou um agente que é ligado por um receptor de células T (por exemplo, quando apresentado por uma molécula de MHC) ou a um anticorpo (por exemplo, produzido por uma célula B) quando exposto ou administrado a um organismo. Em algumas modalidades, um antígeno produz uma resposta humoral (por exemplo, incluindo a produção de anticorpos específicos para o antígeno) em um organismo. Alternativamente, ou adicionalmente, em algumas modalidades, um antígeno produz uma resposta celular (por exemplo, envolvendo células T cujos receptores interagem especificamente com o antígeno) em um organismo. Um antígeno particular pode produzir uma resposta imune em um ou vários membros de um organismo alvo (por exemplo, camundongos, coelhos, primatas, humanos), mas não em todos os membros da espécie do organismo alvo. Em algumas modalidades, um antígeno produz uma resposta imune em pelo menos cerca de 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% dos membros de uma espécie de organismo alvo. Em algumas modalidades, um antígeno se liga a um anticorpo e / ou receptor de células T, e pode ou não produzir uma resposta fisiológica específica em um organismo. Em algumas modalidades, por exemplo, um antígeno pode se ligar a um anticorpo e / ou a um receptor de células T *in vitro*, independentemente de tal interação ocorrer *in vivo*. Em algumas modalidades, um antígeno reage com os produtos da imunidade humoral ou celular específica, incluindo aqueles induzidos por imunogenes heterólogos. Os antígenos incluem proteínas ferritina antigênicas compreendendo ferritina (por exemplo, compreendendo

uma ou mais mutações) e um polipeptídeo não ferritina (por exemplo, polipeptídeo de VSR) como aqui descrito.

[0108] Uma “porção imunoestimulatória”, tal como aqui utilizado, refere-se a uma porção que é covalentemente ligada a uma ferritina ou polipeptídeo antigênico de ferritina e que pode ativar um componente do sistema imunológico (isoladamente ou quando ligado à ferritina ou polipeptídeo antigênico de ferritina). As porções imunoestimulatórias exemplificativas incluem agonistas de receptores do tipo Toll (TLRs), por exemplo, TLR 4, 7, 8 ou 9. Em algumas modalidades, uma porção imunoestimulatória é um adjuvante.

[0109] “Adjuvante”, tal como aqui utilizado, refere-se a uma substância ou veículo que aumenta não especificamente a resposta imune a um antígeno. Os adjuvantes podem incluir, sem limitação, uma suspensão de minerais (por exemplo, alume, hidróxido de alumínio, ou fosfato) em que o antígeno é adsorvido; uma emulsão de água em óleo ou de óleo em água em que a solução de antígeno é emulsificada em óleo mineral ou em água (por exemplo, adjuvante incompleto de Freund). Às vezes, micobactérias mortas são incluídas (por exemplo, adjuvante completo de Freund) para aumentar ainda mais a antigenicidade. Os oligonucleotídeos imunoestimuladores (por exemplo, um motivo CpG) também podem ser usados como adjuvantes (por exemplo, ver Patentes U.S. Nos. 6.194.388, 6.207.646, 6.214.806, 6.218.371, 6.239.116, 6.339.068, 6.406.705, e 6.429.199). Os adjuvantes também podem incluir moléculas biológicas, tal como agonistas do receptor do tipo Toll (TLR) e moléculas coestimulatórias. Um adjuvante pode ser administrado como uma molécula separada em uma composição ou ligado covalentemente (conjugado) à ferritina ou a um polipeptídeo antigênico de ferritina.

[0110] Um “polipeptídeo antigênico de VSR” é usado neste documento para se referir a um polipeptídeo compreendendo toda ou

parte de uma sequência de aminoácidos de VSR de comprimento suficiente para que a molécula seja antigênica em relação ao VSR. A antigenicidade pode ser uma característica da sequência de VSR como parte de um construto que compreende ainda uma sequência heteróloga, tal como uma ferritina e / ou porção imunoestimulatória. Ou seja, se uma sequência de VSR é parte de um construto que compreende ainda uma sequência heteróloga, então é suficiente que o construto possa servir como um antígeno que gera anticorpos anti-VSR, independentemente de a sequência de VSR sem a sequência heteróloga poder fazê-lo.

[0111] “Polipeptídeo antigênico de ferritina” e “proteína ferritina antigênica” são usados aqui de forma intercambiável para se referir a um polipeptídeo que compreende uma ferritina e um polipeptídeo não ferritina (por exemplo, um polipeptídeo de VSR) de comprimento suficiente para que a molécula seja antigênica em relação ao polipeptídeo não ferritina. O polipeptídeo antigênico de ferritina pode compreender ainda uma porção imunoestimulatória. A antigenicidade pode ser uma característica da sequência de não ferritina como parte do construto maior. Ou seja, é suficiente que o construto possa servir como um antígeno contra o polipeptídeo não ferritina, independentemente de se o polipeptídeo não ferritina sem a ferritina (e porção imunoestimulatória se aplicável) poderia fazê-lo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo não ferritina é um polipeptídeo de VSR, caso em que o polipeptídeo antigênico de ferritina também é um “polipeptídeo antigênico de VSR”. Para ser claro, no entanto, um polipeptídeo antigênico de VSR não precisa compreender ferritina. “Polipeptídeo antigênico” é usado neste documento para se referir a um polipeptídeo que é um ou ambos de um polipeptídeo antigênico de ferritina e um polipeptídeo antigênico de VSR.

[0112] “Autoadjuvante”, tal como aqui utilizado, refere-se a uma

composição ou polipeptídeo compreendendo uma ferritina e uma porção imunoestimulatória diretamente conjugada com a ferritina, de modo que a ferritina e a porção imunoestimulatória estejam na mesma entidade molecular. Um polipeptídeo antigênico de ferritina compreendendo um polipeptídeo não ferritina pode ser conjugado a uma porção imunoestimulatória para gerar um polipeptídeo autoadjuvante.

[0113] Um aminoácido “exposto na superfície”, tal como aqui utilizado, refere-se a um resíduo de aminoácido em uma proteína (por exemplo, uma ferritina) com uma cadeia lateral que pode entrar em contato com moléculas de solvente quando a proteína está em sua conformação tridimensional após a multimerização, se aplicável. Assim, por exemplo, no caso da ferritina que forma 24 monômeros, um resíduo de aminoácido exposto na superfície é aquele cuja cadeia lateral pode entrar em contato com o solvente quando a ferritina é montada como 24 monômeros, por exemplo, como uma ferritina multimérica ou partícula de ferritina.

[0114] Conforme usado neste documento, um “sujeito” se refere a qualquer membro do reino animal. Em algumas modalidades, “sujeito” se refere a humanos. Em algumas modalidades, “sujeito” se refere a animais não humanos. Em algumas modalidades, os sujeitos incluem, mas não estão limitados a, mamíferos, pássaros, répteis, anfíbios, peixes, insetos e / ou vermes. Em certas modalidades, o sujeito não um ser humano é um mamífero (por exemplo, um roedor, um camundongo, um rato, um coelho, um macaco, um cachorro, um gato, uma ovelha, gado, um primata e / ou um porco). Em algumas modalidades, um sujeito pode ser um animal transgênico, animal geneticamente modificado, e / ou um clone. Em certas modalidades da presente invenção, o sujeito é um adulto, um adolescente ou uma criança. Em algumas modalidades, os termos “indivíduo” ou “paciente” são usados e se destinam a ser intercambiáveis com “sujeito”.

[0115] Conforme usado neste documento, o termo “vacinação” ou “vacinar” refere-se à administração de uma composição destinada a gerar uma resposta imune, por exemplo, a um agente causador de doenças. A vacinação pode ser administrada antes, durante e / ou após a exposição a um agente causador de doenças e / ou ao desenvolvimento de um ou mais sintomas e, em algumas modalidades, antes, durante e / ou logo após a exposição ao agente. Em algumas modalidades, a vacinação inclui múltiplas administrações, apropriadamente espaçadas no tempo, de uma composição de vacinação.

[0116] A descrição descreve sequências de ácidos nucleicos e sequências de aminoácidos com um certo grau de identidade com uma determinada sequência de ácido nucleico ou sequência de aminoácidos, respectivamente (uma sequência de referência).

[0117] “Identidade de sequências” entre duas sequências de ácido nucleico indica a porcentagem de nucleotídeos que são idênticos entre as sequências. A “identidade de sequências” entre duas sequências de aminoácidos indica a porcentagem de aminoácidos que são idênticos entre as sequências.

[0118] Os termos “% idêntica”, “% de identidade” ou termos similares se destinam a se referir, em particular, à porcentagem de nucleotídeos ou aminoácidos que são idênticos em um alinhamento ideal entre as sequências a serem comparadas. A dita porcentagem é puramente estatística, e as diferenças entre as duas sequências podem ser, mas não necessariamente, distribuídas aleatoriamente ao longo de todo o comprimento das sequências a serem comparadas. As comparações de duas sequências são geralmente realizadas comparando-se as ditas sequências, após o alinhamento ideal, com relação a um segmento ou “janela de comparação”, a fim de identificar regiões locais das sequências correspondentes. O alinhamento ideal para uma comparação pode ser realizado manualmente ou com a ajuda do

algoritmo de homologia local de Smith e Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482, com a ajuda do algoritmo de homologia local de Needleman e Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, com a ajuda do algoritmo de busca de similaridade de Pearson e Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 2444, ou com a ajuda de programas de computador usando os ditos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N e TFASTA em Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

[0119] A identidade percentual é obtida determinando-se o número de posições idênticas às quais as sequências a serem comparadas correspondem, dividindo-se esse número pelo número de posições comparadas (por exemplo, o número de posições na sequência de referência) e multiplicando-se esse resultado por 100.

[0120] Em algumas modalidades, o grau de identidade é dado para uma região que é pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90% ou cerca de 100% do comprimento inteiro da sequência de referência. Por exemplo, se a sequência de ácido nucleico de referência consiste de 200 nucleotídeos, o grau de identidade é dado para pelo menos cerca de 100, pelo menos cerca de 120, pelo menos cerca de 140, pelo menos cerca de 160, pelo menos cerca de 180 ou cerca de 200 nucleotídeos, em algumas modalidades em nucleotídeos contínuos. Em algumas modalidades, o grau de identidade é dado para o comprimento inteiro da sequência de referência.

[0121] As sequências de ácido nucleico ou sequências de aminoácidos tendo um determinado grau de identidade com uma determinada sequência de ácido nucleico ou sequência de aminoácidos, respectivamente, podem ter pelo menos uma propriedade funcional da dita sequência, por exemplo, e em alguns casos, são

funcionalmente equivalente à dita sequência dada. Uma propriedade importante inclui a capacidade de agir como uma citocina, em particular quando administrada a um sujeito. Em algumas modalidades, uma sequência de ácido nucleico ou sequência de aminoácidos tendo um determinado grau de identidade com uma determinada sequência de ácido nucleico ou sequência de aminoácidos é funcionalmente equivalente à dita sequência.

[0122] Conforme usado neste documento, o termo “kit” refere-se a um conjunto embalado de componentes relacionados, tal como um ou mais compostos ou composições e um ou mais materiais relacionados, tal como solventes, soluções, tampões, instruções, ou dessecantes.

B. Polipeptídeos antigênicos de VSR compreendendo um polipeptídeo de F de VSR compreendendo uma ou mais asparaginas em certas posições

[0123] São fornecidos aqui polipeptídeos antigênicos de VSR que compreendem um polipeptídeo de F de VSR. O polipeptídeo de F de VSR pode compreender toda a sequência de F de VSR ou uma porção de F de VSR. Em algumas modalidades, um epítipo do polipeptídeo de VSR que é compartilhado entre F de VSR pré-fusão e F de VSR pós-fusão é bloqueado. O bloqueio de um epítipo reduz ou elimina a geração de anticorpos contra o epítipo quando o polipeptídeo antigênico de VSR é administrado a um sujeito. Isso pode aumentar a proporção de anticorpos que têm como alvo um epítipo específico para uma conformação particular de F, tal como a conformação pré-fusão. Como F tem a conformação pré-fusão em vírus que ainda não entraram nas células, uma proporção aumentada de anticorpos que têm como alvo F pré-fusão pode fornecer um maior grau de neutralização (por exemplo, expresso como uma relação de neutralização para ligação, conforme descrito neste documento). O bloqueio pode ser conseguido manipulando-se uma porção volumosa, tal como um N-glicano na

vizinhança do epítopo compartilhado. Por exemplo, um sítio de N-glicosilação não presente em F de ocorrência natural pode ser adicionado, por exemplo, por mutação de um resíduo apropriado em asparagina. Em algumas modalidades, o epítopo bloqueado é um epítopo do sítio antigênico 1 de F de VSR. Em algumas modalidades, dois ou mais epítopos compartilhados entre F de VSR pré-fusão e F de VSR pós-fusão são bloqueados. Em algumas modalidades, dois ou mais epítopos do sítio antigênico 1 de F de VSR são bloqueados. Em algumas modalidades, um ou mais ou todos os epítopos que se sobrepõem topologicamente com o epítopo bloqueado também são bloqueados, opcionalmente em que o epítopo bloqueado é um epítopo do sítio antigênico 1 de F de VSR.

[0124] Em algumas modalidades, o polipeptídeo de F de VSR compreende uma asparagina correspondente à posição 328, 348 ou 507 da SEQ ID NO: 26. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende asparaginas que correspondem a pelo menos duas das posições 328, 348, ou 507 da SEQ ID NO: 26. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende asparaginas que correspondem às posições 328, 348 ou 507 da SEQ ID NO: 26. Conforme descrito nos exemplos, verificou-se que tais asparaginas podem funcionar como sítios de glicosilação. Além disso, sem desejar estar vinculado a qualquer teoria particular, os glicanos nestes sítios podem inibir o desenvolvimento de anticorpos para epítopos próximos, que incluem epítopos comuns à proteína F de VSR pré e pós-fusão, quando o polipeptídeo é administrado a um sujeito. Em algumas modalidades, a glicosilação da asparagina correspondente à posição 328, 348 ou 507 da SEQ ID NO: 26 bloqueia pelo menos um epítopo compartilhado entre F de VSR pré-fusão e F de VSR pós-fusão, tal como um epítopo do sítio antigênico 1. A inibição do desenvolvimento de anticorpos para epítopos comuns à proteína F de VSR pré e pós-fusão

pode ser benéfica porque pode direcionar o desenvolvimento de anticorpos contra epítomos específicos para a proteína F de VSR pré-fusão, tal como o epítomo do sítio 0, que pode ter mais atividade neutralizante eficaz do que anticorpos para outros epítomos de F de VSR. O epítomo do sítio 0 envolve os resíduos de aminoácidos 62 a 69 e 196 a 209 da SEQ ID NO: 26. Consequentemente, em algumas modalidades, o polipeptídeo de F de VSR compreende os resíduos de aminoácidos 62 a 69 e 196 a 209 da SEQ ID NO: 26.

[0125] Dever-se-ia notar que os construtos descritos neste documento podem ter deleções ou substituições de comprimento diferente em relação a F de VSR de ocorrência natural. Por exemplo, no construto da SEQ ID NO: 23 e outros, as posições 98 a 144 da sequência de ocorrência natural (SEQ ID NO: 26) são substituídas por GSGNVGL (posições 98 a 104 da SEQ ID NO: 23; também SEQ ID NO: 31), resultando em uma remoção líquida de 40 aminoácidos, de modo que as posições 328, 348 ou 507 da SEQ ID NO: 26 correspondem às posições 288, 308 e 467 da SEQ ID NO: 23. Em geral, as posições nos construtos aqui descritos podem ser mapeadas na sequência de ocorrência natural da SEQ ID NO: 26 por alinhamento de pares, por exemplo, usando o algoritmo de Needleman-Wunsch com parâmetros padrão (matriz EBLOSUM62, penalidade de lacuna 10, penalidade por extensão de lacuna 0,5). Ver também a discussão de alinhamento estrutural fornecida neste documento como uma abordagem alternativa para identificar as posições correspondentes.

[0126] Em algumas modalidades, o polipeptídeo de F de VSR compreende mutações que adicionam glicanos para bloquear os epítomos no antígeno pré-fusão que são estruturalmente similares àqueles na superfície de F de VSR pós-fusão. Em algumas modalidades, os glicanos são adicionados para bloquear especificamente os epítomos que podem estar presentes na conformação pós-fusão de F de

VSR. Em algumas modalidades, os glicanos são adicionados para bloquear epítomos que podem estar presentes na conformação pós-fusão de F de VSR, mas não afetam um ou mais epítomos presentes na conformação pré-fusão de F de VSR, tal como o epítomo do sítio 0.

[0127] Em algumas modalidades, os glicanos adicionados em um ou mais sítios de glicosilação discutidos acima aumentam a secreção em sistemas de expressão, tal como células de mamíferos, em comparação com outros construtos.

[0128] Em algumas modalidades, o polipeptídeo de F de VSR compreende uma sequência tendo pelo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 99,5% de identidade com os aminoácidos 1 a 478 da SEQ ID NO: 17. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de F de VSR compreende uma sequência tendo pelo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 99,5% de identidade com a sequência de SEQ ID NO: 17. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de F de VSR compreende os aminoácidos 1 a 478 da SEQ ID NO: 17. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de F de VSR compreende a sequência de SEQ ID NO: 17.

[0129] Em algumas modalidades, o polipeptídeo de F de VSR compreende uma sequência tendo pelo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 99,5% de identidade com os aminoácidos 1 a 478 de SEQ ID NO: 23. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de F de VSR compreende uma sequência tendo pelo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 99,5% de identidade com a sequência de SEQ ID NO: 23. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de F de VSR compreende os aminoácidos 1 a 478 da SEQ ID NO: 23. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de F de VSR compreende a sequência de SEQ ID NO: 23.

[0130] Em algumas modalidades, o polipeptídeo de F de VSR compreende a sequência DS-CAV1 (como descrito, por exemplo, por McLellan, JS, e outros, Science 342 (6158): 592 a 598 (2013)) (SEQ ID NO: 25) em que outras modificações são feitas incluindo pelo menos

uma, duas ou três das asparaginas descritas acima.

[0131] Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende ainda uma proteína ferritina. A proteína ferritina pode compreender ainda qualquer uma das características descritas abaixo na seção relativa à ferritina, ou uma combinação das mesmas.

[0132] O polipeptídeo de F de VSR pode compreender ainda qualquer uma das características adicionais estabelecidas na discussão a seguir, ou qualquer combinação viável de tais características.

Construtos de Cadeia Única

[0133] Em algumas modalidades, o polipeptídeo de VSR é um construto de cadeia única, por exemplo, um polipeptídeo de VSR que não tem sítios de clivagem pela furina. Em algumas modalidades, um F de VSR não tem um ou mais sítios de clivagem pela furina. Os construtos que não têm sítios de clivagem pela furina são expressos como polipeptídeos únicos que não são clivados nos fragmentos F1 / F2 biológicos da proteína F nativa.

Substituições de Aminoácidos

[0134] Em algumas modalidades, um F de VSR compreende uma única substituição de aminoácido em relação a uma sequência de ocorrência natural. Em algumas modalidades, um F de VSR compreende mais de uma única substituição de aminoácido, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 substituições em relação a uma sequência de ocorrência natural. Uma sequência de ocorrência natural exemplificativa é SEQ ID NO: 26.

[0135] Em algumas modalidades, uma substituição de aminoácidos ou par de substituições de aminoácidos são substituições estabilizadoras inter-protômero. As substituições exemplificativas que podem ser estabilizadoras inter-protômero são V207L; N228F; I217V e E218F; I221L e E222M; ou Q224A e Q225L, usando a numeração de posição de SEQ ID NO: 26.

[0136] Em algumas modalidades, uma substituição de aminoácidos ou par de substituições de aminoácidos são estabilizadoras intra-protômero. As substituições exemplificativas que podem ser estabilizadoras intra-protômero são V220I; e A74L e Q81L, usando a numeração de posição de SEQ ID NO: 26.

[0137] Em algumas modalidades, uma substituição de aminoácidos é estabilização de hélice, isto é, prevista para estabilizar o domínio helicoidal de F de VSR. A estabilização do domínio helicoidal pode contribuir para a estabilidade do epítopo do sítio 0 e da conformação pré-fusão de F de VSR geralmente. As substituições exemplificativas que podem ser estabilizadoras de hélice são N216P ou I217P, usando a numeração de posição de SEQ ID NO: 26.

[0138] Em algumas modalidades, uma substituição de aminoácido é o capeamento de hélice. Em algumas modalidades, uma substituição de aminoácido é capeamento de hélice PRO. O capeamento de hélice é baseado na observação biofísica de que, enquanto um sítio de mutação de resíduo de prolina em uma hélice alfa pode romper a formação da hélice, uma prolina no N-terminal de uma região helicoidal pode ajudar a produzir a formação helicoidal estabilizando os ângulos de ligação PHI / PSI. As substituições exemplificativas que podem ser capeamento de hélice são N216P ou I217P, usando a numeração de posição de SEQ ID NO: 26

[0139] Em algumas modalidades, uma substituição de aminoácido substitui uma mutação dissulfeto de DS-CAV1. Em algumas modalidades, o dissulfeto manipulado de DS-CAV1 é revertido para de ocorrência natural (mutações C69S e / ou C212S de DS-CAV1, usando a numeração de posição de SEQ ID NO: 26). Em algumas modalidades, um ou mais resíduos C de DS-CAV1 são substituídos por um resíduo S para eliminar uma ligação dissulfeto. Em algumas modalidades, a substituição C69S ou C212S usando a numeração de posição da SEQ

ID NO: 26 elimina uma ligação dissulfeto. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de F de VSR compreende tanto C69S quanto C212S usando a numeração de posição de SEQ ID NO: 26. Em algumas modalidades, substituir tais cisteínas e, assim, eliminar uma redução de blocos de ligação dissulfeto (ou seja, aceitação de elétrons a partir de um agente de redução) do polipeptídeo de F de VSR. Em algumas modalidades, uma substituição I217P usando a numeração de posição da SEQ ID NO: 26 está compreendida em um antígeno em vez da substituição em C69 e / ou C212. A posição 217 na SEQ ID NO: 26 corresponde à posição 177 na SEQ ID NO: 23.

[0140] Em algumas modalidades, uma substituição de aminoácidos evita a proteólise por tripsina ou proteases similares à tripsina. Em algumas modalidades, a substituição de aminoácidos que impede tal proteólise está na região B de repetição hepta (HRB) da região de F de VSR. O aparecimento de fragmentos consistentes com a proteólise de um construto de ferritina F de VSR que compreendia uma região de HRB de ocorrência natural sugeriu que uma lisina ou arginina nesta região estava sendo alvo de proteólise. Uma substituição de aminoácidos para remover um resíduo K ou R pode ser denominada nocaute (KO). Em algumas modalidades, um K ou R é substituído por L ou Q. Em algumas modalidades, um K é substituído por L ou Q. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de F de VSR compreende K498L e / ou K508Q, usando a numeração de posição de SEQ ID NO: 26. As posições correspondentes na SEQ ID NO: 23 são 458 e 468, respectivamente. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de F de VSR compreende K498L e K508Q.

[0141] Em algumas modalidades, uma substituição de aminoácidos adiciona glicanos. Em algumas modalidades, uma substituição de aminoácidos aumenta a glicosilação ao adicionar glicanos aos polipeptídeos de F de VSR. As substituições para adicionar glicanos

também podem ser chamadas de glicosilação manipulada, em comparação com a glicosilação nativa (sem glicanos adicionais).

[0142] Em algumas modalidades, a substituição de aminoácidos para adicionar glicanos foi a substituição por um N. Em algumas modalidades, a substituição de aminoácidos por um N permite a glicosilação ligada a N. Em algumas modalidades, a substituição por um N é acompanhada pela substituição por um T ou S na segunda posição de aminoácido C-terminal para o N, que forma um motivo de glicosilação NxT/S. Em algumas modalidades, o N é exposto na superfície. Como mostrado nos exemplos abaixo, as mutações que aumentaram a glicosilação podem fornecer expressão aumentada de um polipeptídeo compreendendo um polipeptídeo de F de VSR.

Alterações nas Propriedades do Polipeptídeo de F de VSR Com Base nas Modificações

[0143] As modificações na sequência de aminoácidos de F de VSR podem alterar as propriedades de um polipeptídeo de F de VSR. Uma propriedade de um polipeptídeo de F de VSR pode incluir qualquer característica estrutural ou funcional do polipeptídeo de F de VSR.

[0144] Em algumas modalidades, uma única modificação na sequência de aminoácidos altera múltiplas propriedades do polipeptídeo de F de VSR. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de F de VSR pode compreender várias modificações que alteram diferentes propriedades de um polipeptídeo de F de VSR. Em algumas modalidades, várias modificações produzem uma alteração maior nas propriedades de um polipeptídeo de F de VSR.

[0145] Em algumas modalidades, várias modificações podem ter um efeito aditivo em uma propriedade particular. Por exemplo, duas substituições de aminoácidos para adicionar glicanos podem produzir um maior aumento na glicosilação do polipeptídeo de F de VSR em comparação com qualquer uma das substituições de aminoácidos

únicas.

[0146] Em algumas modalidades, várias modificações afetam diferentes propriedades de um polipeptídeo de F de VSR. Por exemplo, uma ou mais substituições de aminoácidos para aumentar a glicosilação podem ser feitas em conjunto com uma ou mais substituições de aminoácidos para bloquear a redução.

[0147] Em algumas modalidades, as modificações em um polipeptídeo de F de VSR estabilizam a conformação pré-fusão.

[0148] Em algumas modalidades, as modificações estabilizam o epítipo do sítio 0 (também conhecido como sítio antigênico 0) de F de VSR pré-fusão, conforme descrito, por exemplo, por McLellan e outros, *Science* 340 (6136): 1113 a 1117 (2013). Em algumas modalidades, uma modificação que estabiliza o epítipo do sítio 0 é a estabilização inter-protômero. Em algumas modalidades, uma modificação que estabiliza o epítipo do sítio 0 estabiliza F pré-fusão, conforme medido pela ligação do Sítio 0 e do Sítio V, conforme medido pela ligação aos anticorpos D25 ou AM14, respectivamente.

[0149] Em algumas modalidades, as modificações aumentam a expressão de F de VSR em sistemas de expressão. Em algumas modalidades, as modificações aumentam a secreção de F de VSR em sistemas de expressão. Em algumas modalidades, as modificações aumentam a estabilidade de F de VSR recombinante após a expressão. Essa alteração pode ocorrer em qualquer tipo de sistema de expressão, tal como bacteriano, fúngico, de inseto ou de mamífero.

[0150] Em algumas modalidades, as substituições de aminoácidos que introduzem uma prolina aumentam a expressão em comparação com outros construtos. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácidos que adicionam glicanos aumentam a expressão em comparação com outros construtos. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácidos que substituem K ou R por outros

aminoácidos aumentam a expressão em comparação com outros construtos. Um aumento observável na expressão pode resultar de qualquer mecanismo que aumenta o rendimento de uma corrida de fermentação ou outro processo de produção, incluindo a inibição relativa da clivagem ou degradação da protease e / ou aumento da estabilidade na célula hospedeira ou no meio extracelular. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácidos que substituem um ou mais resíduos K na região HRB de F de VSR por outros aminoácidos aumentam a expressão em comparação com outros construtos.

[0151] Em algumas modalidades, as substituições de aminoácidos que substituem K por outros aminoácidos aumentam a estabilidade de polipeptídeos de F de VSR. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácidos que substituem um ou mais resíduos K na região HRB de F de VSR por outros aminoácidos aumentam a estabilidade dos polipeptídeos de F de VSR. Em algumas modalidades, esta estabilidade aumentada é devido a uma redução na clivagem pela protease.

[0152] Em algumas modalidades, um F de VSR compreende mutação(ões) que remove(m) um dissulfeto, por exemplo, para evitar a conjugação após a redução. Em algumas modalidades, a substituição I217P bloqueia a redução do polipeptídeo de F de VSR. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácidos que substituem K por outros aminoácidos bloqueiam a redução do polipeptídeo de F de VSR na presença de um agente redutor.

[0153] Em algumas modalidades, os construtos de cadeia única aumentam a expressão em comparação com outros construtos.

[0154] Em algumas modalidades, o polipeptídeo de F de VSR compreende a sequência DS-CAV1 (SEQ ID NO: 25) (conforme descrito por McLellan, J.S., e outros, Science 342 (6158): 592 a 598 (2013)). Em algumas modalidades, o polipeptídeo de F de VSR compreende a sequência de DS-CAV1 na qual outras modificações são feitas, por

exemplo, incluindo pelo menos uma, duas ou três das asparaginas descritas acima.

C. Polipeptídeos de G de VSR

[0155] Tal como aqui utilizado, um polipeptídeo de G de VSR pode compreender à sequência inteira de G de VSR ou uma porção de G de VSR. Um polipeptídeo de G de VSR pode compreender modificações em comparação com uma sequência de ocorrência natural. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de G de VSR é um G de VSR modificado em comparação com G de VSR de ocorrência natural (SEQ ID NO: 27).

[0156] Em algumas modalidades, essas modificações são alterações no aminoácido do polipeptídeo de G de VSR em comparação com G de VSR de ocorrência natural

[0157] Em algumas modalidades, o polipeptídeo de G de VSR compreende todo ou parte do ectodomínio de G de VSR (SEQ ID NO: 28 ou posições correspondentes). Em algumas modalidades, o polipeptídeo de G de VSR compreende toda ou parte da região Gcc (aminoácidos 151 a 193 de G de VSR (SEQ ID NO: 27)). Em algumas modalidades, o polipeptídeo de G de VSR compreende um motivo CX3C. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de G de VSR se liga ao receptor CX3CR1. A região Gcc é tanto conservada quanto imunogênica e, portanto, pode ser usada para produzir anticorpos com ampla atividade contra cepas de VSR. Em algumas modalidades, um Gcc de VSR cepa A é fornecido como mostrado em SEQ ID NO: 32. Em algumas modalidades, um Gcc de VSR cepa B é fornecido como mostrado em SEQ ID NO: 33.

[0158] Em algumas modalidades, o polipeptídeo de G de VSR não é glicosilado. Por exemplo, um polipeptídeo de G de VSR pode não ter sítios de glicosilação NXS/TX, devido ao truncamento ou mutação de resíduos N ou S/T (por exemplo, para Q ou A, respectivamente), ou uma combinação dos mesmos.

[0159] Em algumas modalidades, o polipeptídeo de G de VSR é parte de um polipeptídeo antigênico de ferritina. Por exemplo, o polipeptídeo de G de VSR pode ser conjugado a uma ferritina como aqui descrito, tal como através de uma cisteína exposta na superfície na ferritina. Em algumas modalidades, esta nanopartícula de ferritina é uma proteína de fusão também compreendendo um polipeptídeo de F de VSR, tal como qualquer um dos polipeptídeos compreendendo um polipeptídeo de F de VSR e uma proteína ferritina descrita acima.

D. Polipeptídeos Antigênicos de VSR Compreendendo Ferritina

[0160] Também é fornecido aqui um polipeptídeo antigênico de VSR compreendendo uma ferritina e um polipeptídeo de VSR. O polipeptídeo de VSR pode ser um polipeptídeo de F de VSR, tal como qualquer um dos polipeptídeos de F de VSR aqui descritos. O polipeptídeo de F de VSR pode compreender a sequência inteira de F de VSR ou uma porção de F de VSR. O polipeptídeo de F de VSR pode compreender uma ou mais modificações (por exemplo, substituição de aminoácidos) em comparação com uma sequência de ocorrência natural. O polipeptídeo de VSR pode ser um polipeptídeo de G de VSR, tal como qualquer um dos polipeptídeos de G de VSR aqui descritos.

[0161] Em algumas modalidades, a ferritina no polipeptídeo é uma ferritina de ocorrência natural. Em algumas modalidades, a ferritina é bacteriana, de inseto, fúngica, de ave ou de mamífero. Em algumas modalidades, a ferritina é humana. Em algumas modalidades, a ferritina é bacteriana.

[0162] Em algumas modalidades, a ferritina é uma ferritina de cadeia leve e / ou cadeia pesada. Em algumas modalidades, a ferritina é uma ferritina de inseto, tal como ferritina de cadeia pesada de *Trichoplusia ni* (SEQ ID NO: 211) ou ferritina de cadeia leve de *Trichoplusia ni* (SEQ ID NO: 212). Em algumas modalidades, a ferritina é uma ferritina humana, tal como a ferritina de cadeia pesada humana

(SEQ ID NO: 214 ou FTH1, GENE ID No: 2495) ou ferritina de cadeia leve humana (SEQ ID NO: 215 ou FTL, GENE ID No: 2512). Em algumas modalidades, uma nanopartícula de ferritina compreende 24 subunidades totais de ferritina de cadeia pesada e ferritina de cadeia leve, como em nanopartículas de ferritina humana ou de *Trichoplusia ni*. As nanopartículas de ferritina de *T. ni* podem compreender 12 subunidades de ferritina de cadeia pesada e 12 subunidades de ferritina de cadeia leve.

[0163] Em algumas modalidades, um polipeptídeo antigênico de VSR compreende uma ferritina de cadeia leve e um polipeptídeo de VSR. Em algumas modalidades, um polipeptídeo antigênico de VSR compreende uma ferritina de cadeia pesada e um polipeptídeo de VSR. Em algumas modalidades, um polipeptídeo antigênico de VSR compreendendo uma ferritina de cadeia leve e um polipeptídeo de VSR que pode se montar com uma ferritina de cadeia pesada que não está ligada a um polipeptídeo de VSR. Em algumas modalidades, um polipeptídeo antigênico de VSR compreendendo uma ferritina de cadeia pesada e um polipeptídeo de VSR que pode ser montado com uma ferritina de cadeia leve que não está ligada a um polipeptídeo de VSR. Uma ferritina não ligada a um polipeptídeo de VSR (ou, mais geralmente, um polipeptídeo não ferritina) pode ser chamada de uma “ferritina nua”.

[0164] Em algumas modalidades, um polipeptídeo antigênico compreendendo uma ferritina de cadeia pesada e um polipeptídeo pode se montar com um polipeptídeo antigênico compreendendo uma ferritina de cadeia leve e um polipeptídeo de VSR para permitir a apresentação de dois dos mesmos polipeptídeos ou polipeptídeos diferentes não ferritina em uma única nanopartícula de ferritina. Em algumas modalidades, os dois polipeptídeos diferentes não ferritina são polipeptídeos de VSR. Em algumas modalidades, os dois polipeptídeos

diferentes não ferritina são codificados por VSR e um agente infeccioso diferente. Em algumas modalidades, o polipeptídeo não ferritina diferente de um agente infeccioso diferente é de um vírus ou uma bactéria.

[0165] Em algumas modalidades, um polipeptídeo antigênico compreendendo uma ferritina de cadeia pesada e um polipeptídeo não ferritina pode se montar com um polipeptídeo compreendendo uma ferritina de cadeia leve e um polipeptídeo não ferritina para produzir uma composição bivalente, em que um ou ambos os polipeptídeos não ferritina são polipeptídeos de VSR, tal como polipeptídeos de F ou G de VSR, por exemplo, um polipeptídeo de F ou G de VSR aqui descrito.

[0166] Em algumas modalidades, a ferritina é ferritina de *H. pylori* (ver SEQ ID NO: 208 ou 209 para uma sequência de ferritina exemplificativa de *H. pylori*), opcionalmente com uma ou mais mutações, tal como aquelas aqui descritas. Em algumas modalidades, a homologia de sequência inferior entre a ferritina de *H. pylori* (ou outras ferritinas bacterianas) e a ferritina humana pode diminuir o potencial de autoimunidade quando usada como uma plataforma de vacina (ver Kanekiyo e outros, Cell 162, 1090 a 1100 (2015)).

[0167] Em algumas modalidades, a ferritina é ferritina de *Pyrococcus furiosus* (NCBI seq WP_011011871.1) com uma ou mais mutações aqui descritas.

[0168] Em algumas modalidades, a ferritina compreende uma sequência tendo mais de 70%, mais de 75%, mais de 80%, mais de 85%, mais de 90%, mais de 95%, mais de 97%, mais de 98% ou mais de 99% de identidade com uma ferritina de ocorrência natural.

[0169] Em algumas modalidades, uma nanopartícula é fornecida compreendendo um polipeptídeo antigênico de VSR, conforme descrito neste documento, compreendendo um polipeptídeo de VSR e uma ferritina.

[0170] Em algumas modalidades, uma proteína diferente capaz de

formar uma nanopartícula é substituída por ferritina. Em algumas modalidades, esta proteína é lumazina sintase (ver Ra e outros, Clin Exp Vaccine Res 3: 227 a 234 (2014)). Em algumas modalidades, esta proteína é a lumazina sintetase sorotipo 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7. As sequências de lumazina sintase exemplificativas são fornecidas como SEQ ID NO: 216 e 219. Em algumas modalidades, a lumazina sintase compreende uma sequência tendo 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99% de identidade com a SEQ ID NO: 216 ou 219.

1. Cisteína Para Conjugação

[0171] Em algumas modalidades, a ferritina é mutada para fornecer uma alça química para a conjugação de uma porção imunoestimulatória e / ou polipeptídeo de VSR. Isso pode ser conseguido com uma mutação substituindo um aminoácido não cisteína exposto na superfície por uma cisteína. Para evitar dúvidas, linguagem tal como “substituir um aminoácido exposto na superfície por uma cisteína” implica necessariamente que o aminoácido exposto na superfície na sequência de ocorrência natural ou pré-mutação não é cisteína. Outra abordagem para fornecer uma alça química para a conjugação de uma porção imunoestimulatória ou polipeptídeo de VSR é incluir um segmento de aminoácidos, tal como um ligante, N- ou C-terminal à ferritina, em que o segmento de aminoácidos compreende um cisteína. Em algumas modalidades, esta cisteína (seja substituindo um aminoácido exposto na superfície ou em um ligante N- ou C-terminal) é não pareada, o que significa que ela não tem uma cisteína parceira apropriada para formar uma ligação dissulfeto. Em algumas modalidades, essa cisteína não altera a estrutura secundária da ferritina. Em algumas modalidades, essa cisteína não altera a estrutura terciária da ferritina.

[0172] Em algumas modalidades, essa cisteína pode ser usada para conjugar agentes, tal como porções imunoestimulatórias, à ferritina. Em algumas modalidades, essa cisteína fornece um grupo tiol

livre que é reativo. Em algumas modalidades, os agentes conjugados a esta cisteína na ferritina são expostos na superfície de uma partícula de ferritina montada. Em algumas modalidades, essa cisteína pode interagir com moléculas e células do sujeito após a administração enquanto a partícula de ferritina é montada.

[0173] Em algumas modalidades, a presença desta cisteína permite a conjugação de uma ou mais porções imunoestimulatórias, por exemplo, adjuvantes. Em algumas modalidades, a conjugação da porção imunoestimulatória não ocorreria na ausência dessa cisteína.

[0174] Em algumas modalidades, o aminoácido não cisteína que é substituído por uma cisteína é selecionado a partir de E12, S72, A75, K79, S100 e S111 de ferritina de *H. pylori*. Assim, em algumas modalidades, o aminoácido exposto na superfície que é substituído em favor da cisteína é um resíduo de aminoácido que corresponde a E12, S26, S72, A75, K79, S100 ou S111 de ferritina de *H. pylori*. Aminoácidos análogos podem ser encontrados em ferritina de não *H. pylori* por alinhamento de pares ou estrutural. Em algumas modalidades, o aminoácido não cisteína que é substituído por uma cisteína pode ser selecionado a partir de um aminoácido que corresponde a S3, S19, S33, I82, A86, A102 e A120 da ferritina de cadeia leve humana. Em algumas modalidades, o aminoácido exposto na superfície a ser substituído por uma cisteína é selecionado com base no entendimento de que se o aminoácido nativo fosse substituído por cisteína, seria reativo em um multímero ou partícula de ferritina montada e / ou que essa cisteína não rompe a estabilidade do multímero ou partícula de ferritina e / ou que essa cisteína não leva à redução nos níveis de expressão da ferritina.

[0175] Em algumas modalidades, a ferritina compreende uma mutação E12C. Em algumas modalidades, o resíduo E12C pode ser usado para conjugar agentes (por exemplo, porções imunoestimulatórias e / ou polipeptídeos de VSR) à ferritina. Em

algumas modalidades, o resíduo E12C fornece um grupo tiol livre que é reativo. Em algumas modalidades, os agentes conjugados ao resíduo E12C em monômeros de ferritina são expressos na superfície em um multímero ou partícula de ferritina montada. Em algumas modalidades, vinte e quatro resíduos E12C (um de cada monômero) estão presentes na superfície de um multímero ou partícula de ferritina.

[0176] Em algumas modalidades, a ferritina compreende uma mutação S26C. Em algumas modalidades, o resíduo S26C pode ser usado para conjugar agentes (por exemplo, porções imunoestimulatórias e / ou polipeptídeos de VSR) à ferritina. Em algumas modalidades, o resíduo S26C fornece um grupo tiol livre que é reativo. Em algumas modalidades, os agentes conjugados ao resíduo S26C em monômeros de ferritina são expressos na superfície em um multímero ou partícula de ferritina montada. Em algumas modalidades, vinte e quatro resíduos S26C (um de cada monômero) estão presentes na superfície de um multímero ou partícula de ferritina.

[0177] Em algumas modalidades, a ferritina compreende uma mutação S72C. Em algumas modalidades, o resíduo S72C pode ser usado para conjugar agentes (por exemplo, porções imunoestimulatórias e / ou polipeptídeos de VSR) à ferritina. Em algumas modalidades, o resíduo S72C fornece um grupo tiol livre que é reativo. Em algumas modalidades, os agentes conjugados ao resíduo S72C em monômeros de ferritina são expressos na superfície em um multímero ou partícula de ferritina montada. Em algumas modalidades, vinte e quatro resíduos S72C (um de cada monômero) estão presentes na superfície de um multímero ou partícula de ferritina.

[0178] Em algumas modalidades, a ferritina compreende uma mutação A75C. Em algumas modalidades, o resíduo A75C pode ser usado para conjugar agentes (por exemplo, porções imunoestimulatórias e / ou polipeptídeos de VSR) à ferritina. Em algumas modalidades,

o resíduo A75C fornece um grupo tiol livre que é reativo. Em algumas modalidades, os agentes conjugados ao resíduo A75C em monômeros de ferritina são expressos na superfície em um multímero ou partícula de ferritina montada. Em algumas modalidades, vinte e quatro resíduos A75C (um de cada monômero) estão presentes na superfície de um multímero ou partícula de ferritina.

[0179] Em algumas modalidades, a ferritina compreende uma mutação K79C. Em algumas modalidades, o resíduo K79C pode ser usado para conjugar agentes (por exemplo, porções imunoestimulatórias e / ou polipeptídeos de VSR) à ferritina. Em algumas modalidades, o resíduo K79C fornece um grupo tiol livre que é reativo. Em algumas modalidades, os agentes conjugados ao resíduo K79C em monômeros de ferritina são expressos na superfície em um multímero ou partícula de ferritina montada. Em algumas modalidades, vinte e quatro resíduos K79C (um de cada monômero) estão presentes na superfície de um multímero ou partícula de ferritina.

[0180] Em algumas modalidades, a ferritina compreende uma mutação S100C. Em algumas modalidades, o resíduo S100C pode ser usado para conjugar agentes (por exemplo, porções imunoestimulatórias e / ou polipeptídeos de VSR) à ferritina. Em algumas modalidades, o resíduo S100C fornece um grupo tiol livre que é reativo. Em algumas modalidades, os agentes conjugados ao resíduo S100C em monômeros de ferritina são expressos na superfície em um multímero ou partícula de ferritina montada. Em algumas modalidades, vinte e quatro resíduos de S100C (um de cada monômero) estão presentes na superfície de um multímero ou partícula de ferritina.

[0181] Em algumas modalidades, a ferritina compreende uma mutação S111C. Em algumas modalidades, o resíduo S111C pode ser usado para conjugar agentes (por exemplo, porções imunoestimulatórias e / ou polipeptídeos de VSR) à ferritina. Em algumas modalidades,

o resíduo S111C fornece um grupo tiol livre que é reativo. Em algumas modalidades, os agentes conjugados ao resíduo S111C em monômeros de ferritina são expressos na superfície em um multímero ou partícula de ferritina montada. Em algumas modalidades, vinte e quatro resíduos S111C (um de cada monômero) estão presentes na superfície de um multímero ou partícula de ferritina.

2. Remoção de Cisteína Interna

[0182] Em algumas modalidades, a ferritina compreende uma mutação que substitui uma cisteína interna por um aminoácido não cisteína. A remoção de um resíduo de cisteína interno nativo pode garantir que haja apenas uma cisteína não pareada por monômero de ferritina e evitar reações indesejadas, tal como a formação de dissulfeto e pode resultar em um resultado mais estável e eficiente (por exemplo, apresentação de adjuvante). Em algumas modalidades, C31 de ferritina de *H. pylori* é substituída por um aminoácido não cisteína. Em algumas modalidades, C31 de ferritina *H. pylori* é substituída por uma serina (C31S), embora qualquer resíduo não cisteína possa ser usado, por exemplo, alanina, glicina, treonina ou asparagina. Aminoácidos análogos podem ser encontrados em ferritina de não *H. pylori* por alinhamento de pares ou estrutural. Assim, em algumas modalidades, a cisteína interna que é substituída em favor de uma não cisteína é um resíduo de aminoácido que se alinha com C31 da ferritina de *H. pylori*. Sequências exemplificativas de ferritina mostrando uma mutação C31S são mostradas em SEQ ID NOS: 201-207. Em algumas modalidades, quando mais de uma cisteína interna está presente na ferritina, duas ou mais (por exemplo, cada) cisteínas internas são substituídas por um aminoácido não cisteína, tal como serina ou um aminoácido selecionado a partir de serina, alanina, glicina, treonina ou asparagina.

3. Glicosilação

[0183] A glicosilação compatível com humanos pode contribuir para

a segurança e eficácia em medicamentos recombinantes. A aprovação regulatória pode depender da demonstração da glicosilação apropriada como um atributo crucial de qualidade (ver Zhang e outros, *Drug Discovery Today* 21 (5): 740 a 765 (2016)). Os N-glicanos podem resultar da glicosilação das cadeias laterais da asparagina e podem diferir na estrutura entre humanos e outros organismos, tal como bactérias e leveduras. Assim, pode ser desejável reduzir ou eliminar a glicosilação não humana e / ou a formação de N-glicano em ferritina de acordo com a descrição. Em algumas modalidades, o controle da glicosilação da ferritina melhora a eficácia e / ou a segurança da composição, especialmente quando usada para vacinação humana.

[0184] Em algumas modalidades, a ferritina é mutada para inibir a formação de um N-glicano. Em algumas modalidades, uma ferritina mutada tem glicosilação reduzida em comparação com sua ferritina de ocorrência natural correspondente.

[0185] Em algumas modalidades, a ferritina compreende uma mutação que substitui uma asparagina exposta na superfície por um aminoácido não asparagina. Em algumas modalidades, a asparagina exposta na superfície é N19 de ferritina de *H. pylori* ou uma posição que corresponde à posição 31 de ferritina de *H. pylori* conforme determinado por alinhamento de pares ou estrutural. Em algumas modalidades, a mutação de tal asparagina, por exemplo, N19 da ferritina de *H. pylori*, diminui a glicosilação da ferritina. Em algumas modalidades, a mutação substitui a asparagina por uma glutamina. Em algumas modalidades, a ferritina é uma ferritina de *H. pylori* que compreende uma mutação N19Q. SEQ ID NOS: 201-207 são sequências de ferritina exemplificativas compreendendo mutações N19Q.

[0186] Um mamífero exposto a uma proteína glicosilada produzida em bactérias ou leveduras pode gerar uma resposta imune à proteína glicosilada, porque o padrão de glicosilação de uma determinada

proteína em bactérias ou leveduras pode ser diferente do padrão de glicosilação da mesma proteína em um mamífero. Assim, algumas proteínas terapêuticas glicosiladas podem não ser apropriadas para produção em bactérias ou leveduras.

[0187] Em algumas modalidades, a glicosilação diminuída de ferritina por mutação de aminoácidos facilita a produção de proteínas em bactérias ou leveduras. Em algumas modalidades, a glicosilação diminuída da ferritina reduz o potencial para efeitos adversos em mamíferos após a administração de ferritina mutada que é expressa em bactérias ou leveduras. Em algumas modalidades, a reatogenicidade em um sujeito humano de uma ferritina mutada produzida em bactérias ou leveduras é menor porque a glicosilação é reduzida. Em algumas modalidades, a incidência de respostas de hipersensibilidade em sujeitos humanos é menor após o tratamento com uma ferritina mutada com glicosilação reduzida em comparação com a ferritina de ocorrência natural.

[0188] Em algumas modalidades, a degradação em um sujeito de uma composição que compreende uma ferritina mutada com glicosilação reduzida é mais lenta em comparação com uma composição que compreende uma ferritina de ocorrência natural, ou uma composição que compreende uma ferritina correspondente com glicosilação de ocorrência natural. Em algumas modalidades, uma composição que compreende uma ferritina mutada com glicosilação reduzida tem depuração reduzida em um sujeito em comparação com uma composição que compreende uma ferritina de ocorrência natural, ou uma composição que compreende uma ferritina correspondente com glicosilação de ocorrência natural. Em algumas modalidades, uma composição que compreende uma ferritina mutada com glicosilação reduzida tem uma meia-vida sérica mais longa em comparação com a ferritina de ocorrência natural, ou uma composição que compreende

uma ferritina correspondente com glicosilação de ocorrência natural.

4. Combinações de Mutações

[0189] Em algumas modalidades, uma ferritina compreende mais de um tipo de mutação aqui descrita. Em algumas modalidades, a ferritina compreende uma ou mais mutações independentemente selecionadas a partir de: uma mutação para diminuir a glicosilação, uma mutação para remover uma cisteína interna, e uma mutação para gerar uma cisteína exposta na superfície. Em algumas modalidades, a ferritina compreende uma mutação para diminuir a glicosilação, uma mutação para remover uma cisteína interna, e uma mutação para gerar uma cisteína exposta na superfície.

[0190] Em algumas modalidades, a ferritina compreende uma mutação N19Q, uma mutação C31S e uma mutação para gerar uma cisteína exposta na superfície. Em algumas modalidades, a ferritina compreende uma mutação N19Q, uma mutação C31S e uma mutação E12C. Em algumas modalidades, a ferritina compreende uma mutação N19Q, uma mutação C31S e uma mutação S72C. Em algumas modalidades, a ferritina compreende uma mutação N19Q, uma mutação C31S e uma mutação A75C. Em algumas modalidades, a ferritina compreende uma mutação N19Q, uma mutação C31S e uma mutação K79C. Em algumas modalidades, a ferritina compreende uma mutação N19Q, uma mutação C31S e uma mutação S100C. Em algumas modalidades, a ferritina compreende uma mutação N19Q, uma mutação C31S e uma mutação S111C. Em algumas modalidades, a ferritina compreende mutações correspondentes a qualquer um dos conjuntos de mutações anteriores, em que as mutações correspondentes mudam um N para um Q, um C para um S e um aminoácido exposto na superfície não cisteína para uma cisteína nas posições determinado pelo alinhamento de pares da sequência de aminoácidos da ferritina para uma sequência de aminoácidos de ferritina de *H. pylori* (SEQ ID

NO: 208 ou 209).

[0191] As ferritinas exemplificativas compreendendo mais de um tipo de mutação são fornecidas em SEQ ID NOS: 201-207.

5. Alinhamento Estrutural

[0192] Conforme discutido neste documento, as posições de mutações correspondentes às descritas em relação a um determinado polipeptídeo (por exemplo, ferritina de *H. pylori*) podem ser identificadas por alinhamento de pares ou estrutural. O alinhamento estrutural é relevante para grandes famílias de proteínas, tal como ferritina, onde as proteínas compartilham estruturas similares, apesar da variação de sequência considerável e muitos membros da família foram estruturalmente caracterizados, e também podem ser usados para identificar posições correspondentes em diferentes versões de outros polipeptídeos aqui descritos, tal como polipeptídeos de VSR (por exemplo, F ou G de VSR). O banco de dados de proteínas (PDB) compreende estruturas 3D para muitas ferritinas, incluindo aquelas listadas abaixo com seus números de acesso.

[0193] 2jd6, 2jd7 - PfFR - *Pyrococcus furiosus*. 2jd8 - PfFR + Zn. 3a68 - soFR do gene SferH4 - soja. 3a9q - soFR do gene SferH4 (mutante). 3egm, 3bvf, 3bvi, 3bvk, 3bvl - HpFR - *Helicobacter pylori*. 5c6f - HpFR (mutante) + Fe. 1z4a, 1vlg - FR - *Thermotoga maritima*. 1s3q, 1sq3, 3kx9 - FR - *Archaeoglobus fulgidus*. 1krq - FR - *Campylobacter jejuni*. 1eum - EcFR - *Escherichia coli*. 4reu - EcFR + Fe. 4xgs - EcFR (mutante) + Fe₂O₂. 4ztt - EcFR (mutante) + Fe₂O + Fe₂ + Fe + O₂. 1qgh - LiFR - *Listeria innocua*. 3qz3 - VcFR - *Vibrio cholerae*. 3vnx - FR - *Ulva pertusa*. 4ism, 4isp, 4itt, 4itw, 4iwj, 4iwk, 4ixk, 3e6s - PnmFR - Multissérie de pseudo-nitschia. 4zkh, 4zkw, 4zkk, 4zl5, 4zl6, 4zlw, 4zmc - PnmFR (mutante) + Fe. 1z6o - FR - *Trichoplusia ni*. 4cmy - FR + Fe - *Chlorobaculum tepidum*. Cadeia leve de ferritina (FTL). 1lb3, 1h96 - mFTL - camundongo. 1rcc, 1rcd, 1rci - bFTL + tartarato + Mg. 1rc, 1rcg

- bFTL + tartarato + Mn. 3noz, 3np0, 3np2, 3o7r - hoFTL (mutante) - cavalo. 3o7s, 3u90 - hoFTL. 4v1w - hoFTL - cryo EM. 3rav, 3rd0 - hoFTL + barbitúrico. Cadeias leves + pesadas de ferritina: 5gn8 - hFTH + Ca.

[0194] O alinhamento estrutural envolve a identificação de resíduos correspondentes em duas (ou mais) sequências polipeptídicas (i) modelando a estrutura de uma primeira sequência usando a estrutura conhecida da segunda sequência ou (ii) comparando as estruturas da primeira e segunda sequências onde ambas são conhecidas e identificam o resíduo na primeira sequência posicionado de forma mais similar a um resíduo de interesse na segunda sequência. Os resíduos correspondentes são identificados em alguns algoritmos com base na minimização da distância do carbono alfa nas estruturas sobrepostas (por exemplo, qual conjunto de carbonos alfa pareados fornece um desvio mínimo quadrático minimizado para o alinhamento). Ao identificar as posições em uma ferritina não *H. pylori* correspondente às posições descritas em relação à ferritina de *H. pylori*, a ferritina de *H. pylori* pode ser a “segunda” sequência. Quando uma ferritina não *H. pylori* de interesse não tem uma estrutura conhecida disponível, mas está mais intimamente relacionada a outra ferritina não *H. pylori* que tem uma estrutura conhecida do que a ferritina de *H. pylori*, pode ser mais eficaz modelar a ferritina não *H. pylori* de interesse usando a estrutura conhecida da ferritina não *H. pylori* intimamente relacionada e, em seguida, comparar esse modelo com a estrutura da ferritina de *H. pylori* para identificar o resíduo correspondente desejado na ferritina de interesse. Existe uma vasta literatura sobre modelagem e alinhamento estrutural; as descrições representativas incluem US 6859736; US 8738343; e aqueles citados por Aslam e outros, *Electronic Journal of Biotechnology* 20 (2016) 9 a 13. Para uma discussão sobre a modelagem de uma estrutura com base em uma estrutura ou estruturas relacionadas conhecidas, consultar, por exemplo, Bordoli e outros,

Nature Protocols 4 (2009) 1 a 13, e as referências citadas no mesmo.

6. Porções Imunoestimulatórias; Adjuvantes; Polipeptídeos de VSR Conjugados

[0195] Em algumas modalidades, um polipeptídeo de VSR e / ou uma porção imunoestimulatória, tal como um adjuvante, é ligado a um aminoácido exposto na superfície. Em algumas modalidades, o aminoácido exposto na superfície é uma cisteína, por exemplo, resultante de uma mutação discutida acima. Em algumas modalidades, o aminoácido exposto na superfície é uma lisina, aspartato ou glutamato. Procedimentos de conjugação usando glutaraldeído (para a conjugação de uma lisina com um ligante ou porção contendo amino) ou uma carbodiimida (por exemplo, 1-ciclohexil-3- (2-morfolin-4-il-etil) carbodiimida ou 1-etil-3- (3-dimetil-aminopropil) carbodiimida (EDC; EDAC) para conjugar um aspartato ou glutamato a um ligante ou porção contendo amino, ou uma lisina a um ligante ou porção contendo carboxila) são descritos, por exemplo, no Capítulo 4 de Holtzhauer, M., Basic Methods for the Biochemical Lab, Springer 2006, ISBN 978-3-540-32785-1, disponível em www.springer.com.

[0196] Em algumas modalidades, uma porção imunoestimulatória, tal como um adjuvante, é ligada a um aminoácido exposto na superfície de ferritina. Em algumas modalidades, mais de uma porção imunoestimulatória, tal como um adjuvante, é ligada a um aminoácido de ferritina exposto na superfície. Em algumas modalidades, vinte e quatro porções imunoestimulatórias são ligadas a um multímero ou partícula de ferritina (por exemplo, uma porção para cada monômero na partícula de ferritina de *H. pylori*). Em algumas modalidades com múltiplas porções imunoestimulatórias ligadas a uma nanopartícula de ferritina, todas as porções imunoestimulatórias são idênticas. Em algumas modalidades com múltiplas porções imunoestimulatórias ligadas a uma nanopartícula de ferritina, as porções

imunoestimulatórias não são idênticas.

a) Tipos de Porções Imunoestimulatórias; Adjuvantes

[0197] Qualquer porção imunoestimulatória que pode ser ligada a um aminoácido exposto na superfície (por exemplo, cisteína) pode ser usada em ferritinas de acordo com esta descrição. Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória é um agonista de células B.

[0198] Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória não é hidrofóbica. Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória é hidrofílica. Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória é polar. Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória é capaz de ligação de hidrogênio ou ligação iônica, por exemplo, compreende um doador de ligação de hidrogênio, aceitador de ligação de hidrogênio, porção catiônica ou porção aniônica. Uma porção é considerada catiônica ou aniônica se for ionizada em solução aquosa em um pH fisiologicamente relevante, tal como pH 6, 7, 7,4 ou 8.

[0199] Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória é um adjuvante. Em algumas modalidades, o adjuvante compreende um padrão molecular associado a patógenos (PAMP). Em algumas modalidades, o adjuvante é um agonista do receptor tipo Toll (TLR) ou estimulador dos genes do interferon (STING). Em algumas modalidades, o adjuvante ativa a sinalização de TLR em células B e / ou T. Em algumas modalidades, o adjuvante regula a resposta imune adaptativa.

(1) Agonistas de TLR2

[0200] Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória é um agonista de TLR2. Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória estimula a sinalização de TLR2. Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória é um ligando de pequena molécula sintético de TLR2. Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória é um agonista de pequena molécula sintético de sinalização de TLR2.

[0201] Em algumas modalidades, o agonista de TLR2 é

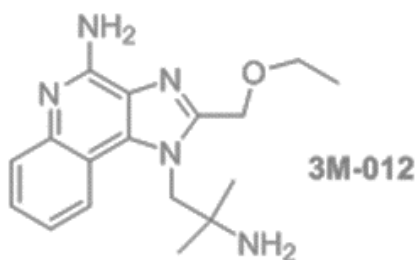
PAM2CSK4, FSL-1 ou PAM3CSK4.

(2) Agonistas de TLR7/8

[0202] Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória é um agonista de TLR7 e / ou TLR8 (isto é, um agonista de pelo menos um dentre TLR7 e TLR8). Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória estimula a sinalização de TLR7 e / ou TLR8. Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória é um ligando de pequena molécula sintético de TLR7 e / ou TLR8. Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória é um agonista de pequena molécula sintético de sinalização de TLR7 e / ou TLR8.

[0203] Em algumas modalidades, o agonista de TLR7 e / ou TLR8 é de fita simples (ssRNA). Em algumas modalidades, o agonista de TLR7 e / ou TLR8 é uma imidazoquinolina. Em algumas modalidades, o agonista de TLR7 e / ou TLR8 é um análogo de nucleosídeo.

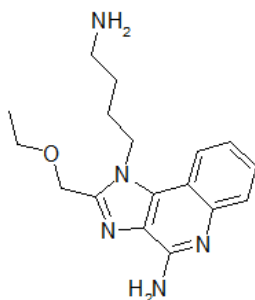
[0204] Em algumas modalidades, o agonista de TLR7 e / ou TLR8 é um agonista do receptor do tipo Toll de imidazoquinolinamina (TLR), tal como 3M-012 (3M Pharmaceuticals). A estrutura de 3M-012 livre é:



[0205] Entende-se que uma porção imunoestimulatória, tal como 3M-012 ou qualquer porção aqui discutida, pode ser conjugada a uma ferritina substituindo um átomo periférico apropriado da porção (por exemplo, um hidrogênio) por uma ligação a uma ferritina aqui descrita, por exemplo, no enxofre de uma cisteína exposta na superfície ou um ligante ligado a tal enxofre. Assim, quando conjugado a uma ferritina, a estrutura da porção imunoestimulatória será ligeiramente diferente da estrutura da molécula livre.

[0206] Em algumas modalidades, o agonista de TLR7 e / ou TLR8

é SM 7/8a. A estrutura de SM 7/8a livre é:



[0207] Ver, por exemplo, Nat Biotechnol. Novembro de 2015; 33 (11): 1201-10. doi: 10.1038/nbt.3371.

(3) Agonistas de TLR9

[0208] Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória é um agonista de TLR9. Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória estimula a sinalização de TLR9. Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória é um ligando de pequena molécula sintético de TLR9. Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória é um agonista de pequena molécula sintético de sinalização de TLR9.

[0209] Em algumas modalidades, o agonista de TLR9 é um oligodeoxinucleotídeo CpG (ODN). Em algumas modalidades, o agonista de TLR9 é um CpG ODN não metilado. Em algumas modalidades, o CpG ODN compreende uma estrutura de fosforotioato (PS) parcial ou completa em vez da estrutura de fosfodiéster (PO) natural encontrada no DNA comum.

[0210] Em algumas modalidades, o CpG ODN é um ODN de Classe B, que compreende um ou mais motivos CpG de 6 monômeros compreendendo 5' Purina (Pu)-Pirimidina (Py)-C-G-Py-Pu 3'; tem uma estrutura totalmente fosforotioato (isto é, modificada com PS); e tem um comprimento de 18 a 28 nucleotídeos. Em algumas modalidades, o CpG ODN compreende a sequência de SEQ ID NO: 210, opcionalmente compreendendo ligações fosforotioato na estrutura.

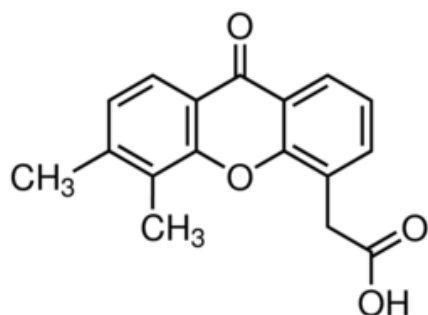
[0211] Em algumas modalidades, o agonista de TLR9 compreende

uma sequência imunoestimulatória (ISS). Em algumas modalidades, o agonista de TLR9 é ISS-1018 (Dynavax) (SEQ ID NO: 210).

(4) Agonistas de STING

[0212] Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória é um agonista de STING (estimulador da proteína dos genes interferon, também conhecido como estimulador do retículo endoplasmático IFN). Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória estimula a sinalização de STING. Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória é um ligante de pequena molécula sintético de STING. Em algumas modalidades, a porção imunoestimulatória é um agonista de pequena molécula sintético de sinalização de STING.

[0213] Em algumas modalidades, o agonista de STING é um dinucleotídeo cíclico (CDN). Ver, por exemplo, Danilchanka e outros, Cell 154: 962 a 970 (2013). CDNs exemplificativos incluem cdA, cdG, cAMP-cGMP e 2'-5', 3'-5' cGAMP (ver Danilchanka e outros para estruturas). Os agonistas de STING também incluem agonistas sintéticos, tal como DMXAA



b) Polipeptídeos de VSR Conjugados

[0214] Em algumas modalidades, um polipeptídeo de VSR é conjugado a um aminoácido de ferritina exposto na superfície. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de VSR torna a proteína ferritina antigênica. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de VSR é antigênico isoladamente, enquanto em algumas modalidades, o polipeptídeo de VSR é antigênico devido à sua associação com a

ferritina. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de VSR é qualquer um dos polipeptídeos de F ou G de VSR aqui descritos.

c) Conjugação

[0215] Em algumas modalidades, uma cisteína exposta na superfície (por exemplo, resultante de uma mutação aqui descrita) ou uma cisteína em um ligante peptídico ligado à ferritina (por exemplo, N-terminalmente à ferritina) é usada para conjugar uma porção imunoestimulatória, tal como um adjuvante ou um polipeptídeo de VSR a uma ferritina. Em algumas modalidades, um ligante é conjugado a tal cisteína, cujo ligante pode ser subsequentemente conjugado a uma porção imunoestimulatória, tal como um adjuvante ou um polipeptídeo de VSR. Em algumas modalidades, tal cisteína cria uma alça química para reações de conjugação para ligar um adjuvante, ligante, ou um polipeptídeo de VSR. Em algumas modalidades, os bioconjugados são produzidos, em que uma porção imunoestimulatória, tal como um adjuvante ou um polipeptídeo de VSR, é ligada a uma ferritina após a redução de tal cisteína. Em algumas modalidades, a cisteína é uma cisteína exposta na superfície não pareada, isto é, que não tem uma cisteína parceira em uma posição apropriada para formar uma ligação dissulfeto. Em algumas modalidades, a cisteína é uma cisteína não pareada que compreende uma cadeia lateral de tiol livre.

(1) Tipos de Reações Químicas de Conjugação

[0216] Qualquer tipo de reação química pode ser usado para conjugar a porção imunoestimulatória, tal como um adjuvante, ou um polipeptídeo de VSR com a ferritina, por exemplo, por meio da reação de um aminoácido exposto na superfície, tal como cisteína ou outro aminoácido, tal como Lys, Glu ou Asp.

[0217] Em algumas modalidades, a conjugação é realizada usando reação química de clique. Conforme usado neste documento, “reação química de clique” se refere a uma reação entre um par de grupos

funcionais que reagem rápida e seletivamente (isto é, “clique”) entre si. Em algumas modalidades, a reação química de clique pode ser realizada em condições aquosas suaves. Em algumas modalidades, uma reação química de clique tira vantagem de uma cisteína na superfície da ferritina, tal como uma cisteína resultante da mutação de um aminoácido exposto na superfície, para realizar a reação química de clique usando um grupo funcional que pode reagir com a cisteína.

[0218] Uma variedade de reações que cumprem os critérios para a reação química de clique é conhecida no campo, e um versado na técnica poderia usar qualquer uma de uma série de metodologias publicadas (ver, por exemplo, Hein e outros, Pharm Res 25 (10): 2216 a 2230 (2008)). Uma ampla gama de reagentes disponíveis comercialmente para reação química de clique pode ser usada, tal como os de Sigma Aldrich, Jena Bioscience, ou Lumiprobe. Em algumas modalidades, a conjugação é realizada usando reação química de clique, conforme descrito nos Exemplos abaixo.

[0219] Em algumas modalidades, a reação química de clique ocorre após a redução da ferritina.

[0220] Em algumas modalidades, a reação química de clique pode ser uma reação de clique de 1 etapa. Em algumas modalidades, a reação química de clique pode ser uma reação de clique em 2 etapas.

[0221] Em algumas modalidades, as reações compreendem reações químicas de clique livres de metal. Em algumas modalidades, a(s) reação(ões) compreende(m) troca de tiol-maleimida e / ou dissulfeto.

Reação Química de Clique Livre de Metal

[0222] A reação química de clique livre de metal pode ser usada para reações de conjugação para evitar a oxidação potencial de proteínas. A reação química de clique livre de metal tem sido usada para formar conjugados de anticorpos (ver van Geel e outros, Bioconjugate

Chem. 2015, 26, 2233 a 2242).

[0223] Em algumas modalidades, a reação química de clique sem metal é usada em reações para ligar o adjuvante à ferritina. Em algumas modalidades, a conjugação livre de cobre é usada nas reações para ligar o adjuvante à ferritina. Em algumas modalidades, a reação química de clique livre de metal usa biciclo[6.1.0]nonyne (BCN). Em algumas modalidades, a reação química de clique livre de metal usa dibenzoazaciclooctina (DBCO). Em algumas modalidades, BCN ou DBCO reage com um grupo azida.

[0224] DBCO tem alta especificidade para grupos azida por meio de uma reação de clique promovida por cepa na ausência de um catalisador, resultando em alto rendimento de um triazol estável. Em algumas modalidades, DBCO reage com azida na ausência de catalisador de cobre.

[0225] Em algumas modalidades, a reação química de clique livre de metal é usada em uma reação de clique de 1 etapa. Em algumas modalidades, a reação química de clique livre de metal é usada em uma reação de clique de 2 etapas.

Troca de Tiol-Maleimida e Dissulfeto

[0226] As ferritinas aqui descritas podem compreender uma cisteína compreendendo um tiol, também conhecido como sulfidril, que está disponível para reação com grupos químicos reativos à sulfidril (ou que pode ser disponibilizada por meio de redução). Assim, a cisteína permite a modificação quimiosseletiva para adicionar uma porção imunoestimulatória, tal como um adjuvante, à ferritina. Em condições básicas, a cisteína será desprotonada para gerar um nucleófilo tiolato, que pode reagir com eletrófilos moles, tal como maleimidas e iodoacetamidas. A reação da cisteína com uma maleimida ou iodoacetamida resulta em uma ligação carbono-enxofre.

[0227] Em algumas modalidades, um grupo químico reativo à

sulfidrilas reage com a cisteína exposta na superfície ou cisteína no ligante da ferritina. Em algumas modalidades, o grupo químico reativo à sulfidrilas é uma haloacetila, maleimida, aziridina, acrilóila, agente de arilação, vinilsulfona, piridil dissulfeto ou TNB-tiol.

[0228] Em algumas modalidades, o grupo químico reativo à sulfidrilas se conjuga à sulfidrilas da cisteína por alquilação (isto é, formação de uma ligação tioéter). Em algumas modalidades, o grupo químico reativo à sulfidrilas se conjuga com a sulfidrilas da cisteína por troca de dissulfeto (isto é, formação de uma ligação dissulfeto).

[0229] Em algumas modalidades, a reação para conjugar uma porção imunoestimulatória, tal como um adjuvante, à ferritina é uma reação tiol-maleimida.

[0230] Em algumas modalidades, o grupo químico reativo à sulfidrilas é uma maleimida. Em algumas modalidades, a reação de uma maleimida com a cisteína resulta na formação de uma ligação tioéster estável, por exemplo, que não é reversível. Em algumas modalidades, a maleimida não reage com tirosinas, histidinas ou metioninas na ferritina. Em algumas modalidades, as maleimidas que não reagiram são extintas no final da reação pela adição de um tiol livre, por exemplo, em excesso.

[0231] Em algumas modalidades, a reação para conjugar uma porção imunoestimulatória, tal como um adjuvante, à ferritina é uma troca de tiol-dissulfeto, também conhecida como uma troca de dissulfeto. Em algumas modalidades, a reação envolve a formação de um dissulfeto misto compreendendo uma porção do dissulfeto original. Em algumas modalidades, o dissulfeto original é a cisteína introduzida na ferritina por mutação de um aminoácido exposto na superfície ou adição de um ligante N-terminal.

[0232] Em algumas modalidades, o grupo químico reativo à sulfidrilas é um piridil ditiol. Em algumas modalidades, o grupo químico

reativo à sulfidrilas é um grupo TNB-tiol.

(2) Ligantes Conjugados

[0233] Em algumas modalidades, uma porção imunoestimulatória, tal como um adjuvante ou um polipeptídeo de VSR, é ligada à ferritina por meio de um ligante que está covalentemente ligado a um aminoácido exposto na superfície, tal como uma cisteína. Em algumas modalidades, o ligante compreende um polietileno glicol, por exemplo, um ligante PEG. Em algumas modalidades, o ligante polietileno glicol (por exemplo, PEG) aumenta a solubilidade em água e a eficiência de ligação da ferritina ligada à porção imunoestimulatória, tal como um adjuvante. O ligante PEG tem entre 2 e 18 PEGs de comprimento, por exemplo, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, PEG14, PEG15, PEG16, PEG17 e PEG18.

[0234] Em algumas modalidades, o ligante compreende uma maleimida. Em algumas modalidades, o ligante compreende os componentes da porção imunoestimulatória (ISM) - ligante - maleimida. Em algumas modalidades, o ISM - ligante - maleimida é conjugado à ferritina em uma reação química de clique de 1 etapa por reação da maleimida com uma cisteína da ferritina. Em algumas modalidades, o ISM do adjuvante - ligante - maleimida é SM7/8a. Em algumas modalidades, o ligante do ISM - ligante - maleimida é PEG4. Em algumas modalidades, o ISM -ligante - maleimida é SM7/8a - PEG4 - maleimida.

[0235] Em algumas modalidades, um protocolo de reação química de clique de 2 etapas é usado com um ligante compreendendo um grupo químico reativo à sulfidrilas em uma extremidade e um grupo reativo à amina na outra extremidade. Em tal protocolo de reação química de clique de 2 etapas, um grupo químico reativo à sulfidrilas reage com uma cisteína da ferritina, enquanto o grupo reativo à amina reage com um reagente ligado ao ISM. Desta forma, o ISM é conjugado à ferritina por

meio de um conjunto de reagentes químicos de 2 cliques.

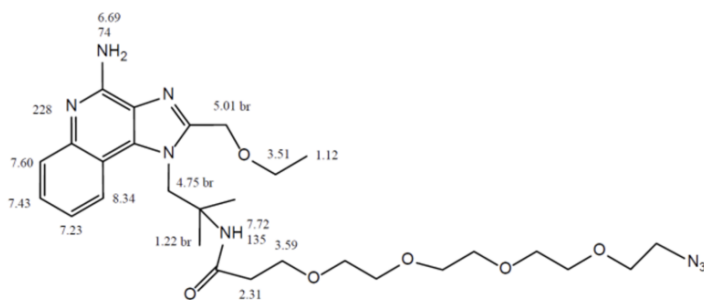
[0236] Em algumas modalidades do protocolo de reação química de clique de 2 etapas, o grupo químico reativo à sulfidrina é maleimida. Em algumas modalidades do protocolo de reação química de clique de 2 etapas, a maleimida reage com a cisteína introduzida na ferritina por mutação de um aminoácido exposto na superfície ou adição de um ligante N-terminal.

[0237] Em algumas modalidades do protocolo de reação química de clique de 2 etapas, o grupo reativo à amina é DBCO. Em algumas modalidades do protocolo de reação química de clique de 2 etapas, o DBCO reage com um grupo azida ligado a um ISM.

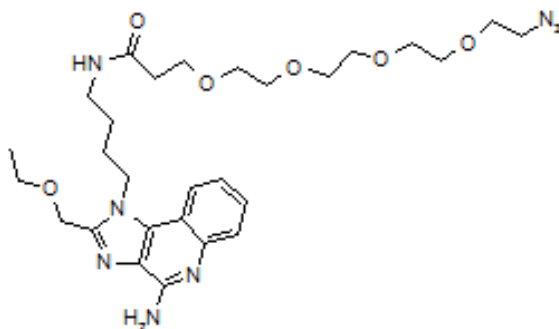
[0238] Em algumas modalidades, uma maleimida - ligante - DBCO é usado. Em algumas modalidades, a maleimida - ligante - DBCO é conjugado com ferritina após a ferritina ser reduzida. Em algumas modalidades, a maleimida - ligante - reagente é conjugada à ferritina por reação da maleimida com a cisteína da ferritina em uma primeira etapa. Em algumas modalidades, o DBCO é usado para se ligar a um ISM ligado à azida. Em algumas modalidades, o ISM ligado à azida é ISS-1018. Em algumas modalidades, o adjuvante ligado à azida é 3M-012 ou CpG.

[0239] Em algumas modalidades, um ligante com um grupo reativo é adicionado ao ISM. Em algumas modalidades, o ligante é um ligante PEG4-azida ou um ligante PEG4-maleimida.

[0240] Em algumas modalidades, um ligante PEG4-azida é conjugado com 3M-012. Uma estrutura exemplificativa de 3M-012 conjugada a um ligante PEG4-azida é:

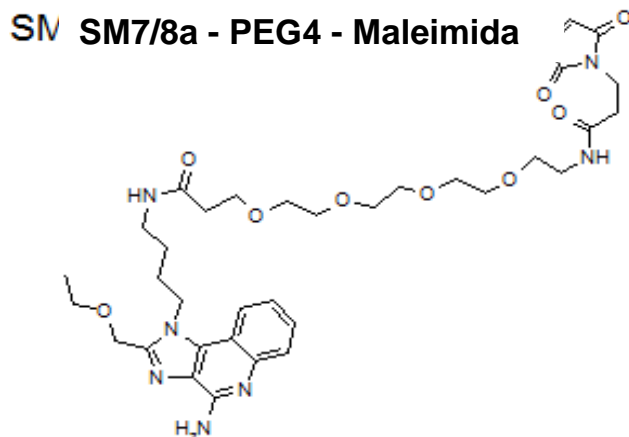


[0241] Em algumas modalidades, um ligante PEG4-azida é conjugado com SM7/8a. Uma estrutura exemplificativa de SM7/8a conjugada a um ligante PEG4-azida é:



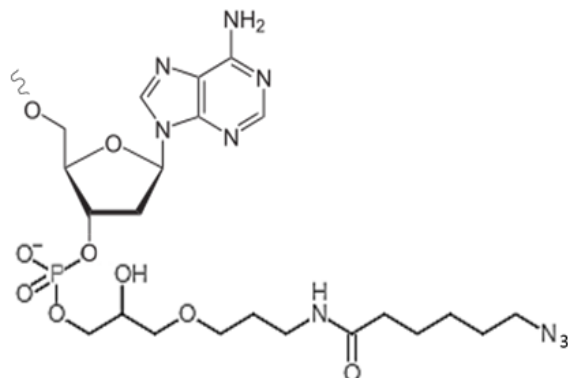
SM SM7/8a - PEG4 - Azida

[0242] Em algumas modalidades, um ligante PEG4-maleimida é conjugado com SM7/8a. Uma estrutura exemplificativa de SM7/8a conjugada a um ligante PEG4-maleimida é:



[0243] Em algumas modalidades, um grupo azida é conjugado com ISS-1018. Uma estrutura exemplificativa de ISS-1018 conjugada a um

ligante NHS éster-azida é:



E. Ligantes

[0244] Em algumas modalidades, um ligante separa a sequência de aminoácidos do polipeptídeo de VSR a partir da sequência de aminoácidos da ferritina. Qualquer ligante pode ser usado. Em algumas modalidades, o ligante é um ligante peptídico, que pode facilitar a expressão do polipeptídeo antigênico de ferritina como uma proteína de fusão (por exemplo, a partir de um único quadro de leitura aberto). Em algumas modalidades, o ligante é um ligante glicina-serina. Em algumas modalidades, o ligante glicina-serina é GS, GGGS (SEQ ID NO: 226), 2XGGGS (SEQ ID NO: 227) (ou seja, GGGSGGGS (SEQ ID NO: 227)) ou 5XGGGS (SEQ ID NO: 228). O ligante pode ser N- ou C-terminal à ferritina.

[0245] Em algumas modalidades, o ligante tem 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o ligante tem cerca de 2 a 4, 2 a 6, 2 a 8, 2 a 10, 2 a 12 ou 2 a 14 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o ligante tem pelo menos 15 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o ligante tem pelo menos 25 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o ligante tem pelo menos 30 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o ligante tem pelo menos 35 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o ligante tem

pelo menos 40 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o ligante é menor ou igual a 60 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o ligante é menor ou igual a 50 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o ligante tem cerca de 16, 28, 40, 46 ou 47 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o ligante é flexível. Em algumas modalidades, o ligante compreende uma cisteína, por exemplo, para uso como um sítio para a conjugação de uma porção imunoestimulatória (por exemplo, adjuvante); um ligante exemplificativo compreendendo uma cisteína é fornecido como SEQ ID NO: 225. Em algumas modalidades, o ligante compreende uma sequência tendo pelo menos 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% de identidade com SEQ ID NO: 225, e compreende ainda uma cisteína correspondente à cisteína em SEQ ID NO: 225. Em algumas modalidades, o ligante compreende pelo menos 25 aminoácidos (por exemplo, 25 a 60 aminoácidos), em que uma cisteína está localizada em uma posição que varia do 8º aminoácido do N-terminal ao 8º aminoácido do C-terminal, ou dentro de 10 aminoácidos do resíduo central ou ligação do ligante.

[0246] Em algumas modalidades, o ligante compreende aminoácidos glicina (G) e / ou serina (S). Em algumas modalidades, o ligante compreende ou consiste de aminoácidos glicina (G), serina (S), asparagina (N) e / ou alanina (A) e, opcionalmente, uma cisteína como discutido acima. Em algumas modalidades, o ligante compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 222. Em algumas modalidades, o ligante compreende GGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 220), GGSGSGSNSSASSGASSGGASGGSGGSG (SEQ ID NO: 221), GGSGSASSGASASGSSNGSGSGSGSNSSASSGASSGGASGGSGGSG (SEQ ID NO: 222), ou GS. Em algumas modalidades, o ligante

compreende FR1 (SEQ ID NO: 223) ou FR2 (SEQ ID NO: 224).

[0247] Em algumas modalidades, a ferritina compreende ferritina de *H. pylori* com a extensão amino terminal da ferritina de rã-touro (que será chamada de ferritina híbrida). Em algumas modalidades, essa ferritina híbrida forma multímeros com sítios de ligação de polipeptídeo de VSR distribuídos uniformemente na superfície (ver Kanekiyo 2015). Em algumas modalidades, as proteínas de fusão N-terminal com ferritina híbrida permitem a apresentação de um polipeptídeo de VSR na superfície da nanopartícula de ferritina. Em algumas modalidades, uma ferritina compreende um glutamato em uma posição correspondente à posição 13 da SEQ ID NO: 208 (ferritina híbrida, que compreende esse glutamato) ou na posição 6 na SEQ ID NO: 209 (ferritina de *H. pylori* de ocorrência natural, posição 6 na qual está isoleucina). Em combinação com um ligante de rã-touro, acredita-se que esse glutamato preserve a ponte de sal conservada encontrada nas ferritinas humanas e de rã-touro (6R e 14E nas ferritinas de cadeia leve humana e de subunidade inferior de rã-touro). Ver Kanekiyo e outros, Cell 162, 1090 a 1100 (2015)).

[0248] Em algumas modalidades, um polipeptídeo de VSR é ligado à ferritina por meio de um ligante de cisteína - trombina - histidina. Em algumas modalidades, este ligante é usado para conjugar diretamente uma porção (por exemplo, porção imunoestimulatória ou polipeptídeo de VSR) à ferritina via reação química de clique. Uma sequência exemplificativa compreendendo um ligante cisteína - trombina - histidina é SEQ ID NO: 218. A reação química de clique adequada para reações de conjugação envolvendo o ligante cisteína - trombina - histidina é discutida acima.

[0249] Em algumas modalidades, um ligante compreendendo uma cisteína como um sítio de conjugação para uma porção imunoestimulatória, tal como um adjuvante, é usado em um construto que

compreende uma molécula de ferritina sem uma cisteína exposta na superfície não pareada, ou em um construto que compreende um molécula de ferritina compreendendo uma cisteína exposta na superfície não pareada.

[0250] Em algumas modalidades, um construto não compreende um ligante. Em algumas modalidades, um construto compreende um ligante. Em algumas modalidades, um construto compreende dois ou mais de dois ligantes.

F. Composições; Usos e Métodos de Vacinação

[0251] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece métodos de imunização de um sujeito contra a infecção com VSR. A presente invenção fornece ainda métodos para produzir uma resposta imune contra o VSR em um sujeito. Em algumas modalidades, os presentes métodos compreendem administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica aqui descrita a um sujeito. Em algumas modalidades, os presentes métodos compreendem administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um polipeptídeo antigênico de VSR, polipeptídeo antigênico de ferritina, ou nanopartícula aqui descrito a um sujeito.

[0252] Em algumas modalidades, é fornecida uma composição compreendendo qualquer um ou mais dos polipeptídeos, nanopartículas ou proteínas de fusão aqui descritos e um veículo, adjuvante ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

[0253] Em algumas modalidades, um polipeptídeo, nanopartícula ou composição aqui descrita é administrado a um sujeito, tal como um ser humano, para imunizar contra infecção causada por VSR. Em algumas modalidades, um polipeptídeo ou proteína de fusão aqui descrito é administrado a um sujeito, tal como um ser humano, para produzir uma resposta imune protetora para infecção futura por VSR. Em algumas modalidades, qualquer um ou mais dos polipeptídeos,

nanopartículas ou composições aqui descritos são fornecidos para uso na imunização contra infecção causada por VSR. Em algumas modalidades, qualquer um ou mais dos polipeptídeos, nanopartículas ou composições aqui descritos são fornecidos para uso na produção de uma resposta imune protetora para infecção futura por VSR. Em algumas modalidades, a resposta imune protetora diminui a incidência de infecção por VSR, pneumonia, bronquiolite ou asma.

[0254] Em algumas modalidades, uma composição compreende um polipeptídeo de F de VSR aqui descrito. Em algumas modalidades, uma composição compreende um polipeptídeo de G de VSR aqui descrito. Em algumas modalidades, uma composição compreende um polipeptídeo de F de VSR aqui descrito e um polipeptídeo de G de VSR. Em algumas modalidades, uma composição compreende um polipeptídeo de G de VSR aqui descrito e um polipeptídeo de F de VSR. Em algumas modalidades, uma composição compreende um polipeptídeo de F de VSR aqui descrito e um polipeptídeo de G de VSR aqui descrito.

[0255] Em algumas modalidades, uma composição compreendendo um polipeptídeo de F de VSR aqui descrito produz uma resposta de neutralização superior ao VSR em comparação com a imunização com um polipeptídeo de F de VSR pós-fusão. Em algumas modalidades, a imunização com um polipeptídeo de F de VSR aqui descrito (por exemplo, um polipeptídeo ou nanopartícula compreendendo um polipeptídeo de F de VSR aqui descrito) produz uma titulação mais alta de anticorpos dirigidos contra F de VSR pré-fusão em comparação com a imunização com F de VSR pós-fusão. Em algumas modalidades, a imunização com um polipeptídeo de F de VSR aqui descrito produz uma titulação mais baixa de anticorpos dirigidos contra F de VSR pós-fusão em comparação com a imunização com F de VSR pós-fusão. Em algumas modalidades, a imunização com um polipeptídeo de F de VSR

aqui descrito produz uma relação maior de anticorpo total sendo dirigido contra F de VSR pré-fusão em comparação com a imunização com F de VSR pós-fusão. A imunização com um antígeno de VSR aqui descrito pode fornecer melhor proteção contra VSR em comparação com a imunização com F de VSR pós-fusão. Epítomos presente em F de VSR pós-fusão, e compartilhado com F pré-fusão, podem ser não neutralizantes e em alguns casos foi sugerido que produzem anticorpos que aumentam a infecção por VSR. Em algumas modalidades, uma composição compreendendo um polipeptídeo de F de VSR aqui descrito produz uma resposta de neutralização superior ao VSR enquanto diminui os anticorpos dirigidos contra F de VSR pós-fusão. Assim, em algumas modalidades, uma composição compreendendo um polipeptídeo de F de VSR descrito neste documento produz uma maior titulação de neutralização de VSR para resposta de ligação a F pós-fusão.

[0256] Em algumas modalidades, a imunização com um antígeno VSR aqui descrito produz um perfil de segurança melhorado em comparação com a imunização com um F de VSR pós-fusão. Este perfil de segurança melhorado pode estar relacionado ao bloqueio de epítomos não neutralizantes ou epítomos fracamente neutralizantes presentes na conformação pós-fusão. Foi descrito que os anticorpos que se ligam à conformação pós-fusão podem aumentar a infecção por VSR por meio de infecção viral mediada por anticorpos. Assim, os anticorpos pós-fusão que não neutralizam significativamente o vírus VSR podem aumentar a infecção por VSR, tal como aqueles que reconhecem a conformação pré-fusão e pós-fusão.

[0257] Em algumas modalidades, uma composição compreendendo um polipeptídeo de G de VSR aqui descrito produz uma resposta de neutralização ao VSR.

[0258] Em algumas modalidades, uma composição

compreendendo um polipeptídeo de F de VSR e G de VSR aqui descrito produz uma resposta de neutralização ao VSR. Em algumas modalidades, uma composição compreendendo um polipeptídeo de F de VSR e G de VSR aqui descrito fornece proteção melhorada contra VSR, por exemplo, uma titulação de neutralização mais alta do que uma composição que não compreende ambos os antígenos.

1. Sujeitos

[0259] Em algumas modalidades, o sujeito é um mamífero. Em algumas modalidades, o sujeito é um ser humano.

[0260] Em algumas modalidades, o sujeito é um adulto (maior ou igual a 18 anos de idade). Em algumas modalidades, o sujeito é uma criança ou adolescente (com menos de 18 anos de idade). Em algumas modalidades, o sujeito é idoso (com mais de 60 anos de idade). Em algumas modalidades, o sujeito é um adulto não idoso (maior ou igual a 18 anos de idade e menor ou igual a 60 anos).

[0261] Em algumas modalidades, mais de uma administração da composição é administrada ao sujeito. Em algumas modalidades, uma administração de reforço melhora a resposta imune.

[0262] Em algumas modalidades, qualquer um ou mais dos polipeptídeos antigênicos ou composições aqui descritas são para uso em um mamífero, tal como um primata (por exemplo, primata não um ser humano, tal como um macaco (por exemplo, um macaco, tal como rhesus ou cynomolgus) ou macaco grande), roedor (por exemplo, camundongo ou rato), ou mamífero domesticado (por exemplo, cão, coelho, gato, cavalo, ovelha, vaca, cabra, camelo, ou burro). Em algumas modalidades, qualquer um ou mais dos polipeptídeos antigênicos ou composições aqui descritas são para uso em um pássaro, tal como uma ave (por exemplo, frango, peru, pato, ganso, galinha, ou cisne).

2. Adjuvantes

[0263] Conforme descrito neste documento, os adjuvantes podem ser conjugados à ferritina por meio de um aminoácido exposto na superfície, por exemplo, uma cisteína. O adjuvante não conjugado também pode ser administrado juntamente com os polipeptídeos antigênicos de ferritina descritos neste documento a um sujeito. Em algumas modalidades, a administração de adjuvante juntamente com o polipeptídeo antigênico de ferritina produz uma titulação mais alta de anticorpos contra o polipeptídeo de VSR no sujeito em comparação com a administração do polipeptídeo de VSR isoladamente, ou polipeptídeo antigênico de ferritina isoladamente, sem o adjuvante. Um adjuvante pode promover uma resposta imune mais precoce, mais potente ou mais persistente ao polipeptídeo antigênico.

[0264] Em algumas modalidades, uma composição compreende um adjuvante. Em algumas modalidades, uma composição compreende mais de um adjuvante. Em algumas modalidades, uma composição não compreende um adjuvante.

[0265] Em algumas modalidades, um adjuvante compreende alumínio. Em algumas modalidades, um adjuvante é fosfato de alumínio. Em algumas modalidades, um adjuvante é Alume (Alyhydrogel '85 2%; Brenntag – Cat# 21645-51-2).

[0266] Em algumas modalidades, um adjuvante é um adjuvante orgânico. Em algumas modalidades, um adjuvante é um adjuvante à base de óleo. Em algumas modalidades, um adjuvante compreende uma nanoemulsão de óleo em água.

[0267] Em algumas modalidades, um adjuvante compreende esqualeno. Em algumas modalidades, o adjuvante que compreende esqualeno é Ribí (sistema adjuvante Sigma Cat # S6322-1vl), AddavaxTM MF59, AS03 ou AF03 (ver US9703095). Em algumas modalidades, o adjuvante que compreende esqualeno é uma nanoemulsão.

[0268] Em algumas modalidades, um adjuvante compreende um polímero de ácido poliacrílico (PAA). Em algumas modalidades, o adjuvante que compreende PAA é SPA09 (ver WO 2017218819).

[0269] Em algumas modalidades, um adjuvante compreende óleos não metabolizáveis. Em algumas modalidades, o adjuvante é Adjuvante Incompleto de Freund (IFA).

[0270] Em algumas modalidades, um adjuvante compreende óleos não metabolizáveis e Mycobacterium tuberculosis morta. Em algumas modalidades, o adjuvante é Adjuvante Completo de Freund (CFA).

[0271] Em algumas modalidades, um adjuvante é um lipopolissacarídeo. Em algumas modalidades, um adjuvante é monofosforil A (MPL ou MPLA).

3. Composições Farmacêuticas

[0272] Em várias modalidades, é fornecida uma composição farmacêutica que compreende um polipeptídeo antigênico de ferritina aqui descrito e / ou entidades relacionadas. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é uma composição imunogênica (por exemplo, uma vacina) capaz de produzir uma resposta imune, tal como uma resposta imune protetora contra um patógeno.

[0273] Por exemplo, em algumas modalidades, as composições farmacêuticas podem compreender um ou mais dos seguintes: (1) uma proteína ferritina antigênica compreendendo (i) uma mutação que substitui um aminoácido exposto na superfície por uma cisteína e (ii) um polipeptídeo de VSR; (2) uma proteína ferritina antigênica compreendendo (i) uma mutação que substitui um aminoácido exposto na superfície por uma cisteína e uma porção imunoestimulatória ligada à cisteína; e (ii) um polipeptídeo de VSR; (3) proteína ferritina antigênica compreendendo (i) uma cisteína exposta na superfície, (ii) um ligante peptídico N-terminal para a proteína ferritina, e (iii) um polipeptídeo de VSR N-terminal para o ligante peptídico; (4) uma proteína ferritina

antigênica compreendendo: (i) uma mutação que substitui um aminoácido exposto na superfície por uma cisteína e uma porção imunoestimulatória ligada à cisteína, (ii) uma mutação que substitui a cisteína interna na posição 31 de ferritina de *H. pylori*, ou uma mutação de uma cisteína interna em uma posição que é análoga à posição 31 de uma ferritina não *H. pylori* determinada por alinhamento de pares ou estrutural, por um aminoácido não cisteína, (iii) uma mutação que substitui uma asparagina exposta na superfície por um aminoácido não asparagina, e (iv) um polipeptídeo de VSR; ou (5) uma partícula de ferritina compreendendo qualquer uma das proteínas de ferritina anteriores. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica compreende um polipeptídeo antigênico de VSR compreendendo um polipeptídeo de F de VSR, em que um epítopo do polipeptídeo de VSR que é compartilhado entre F de VSR pré-fusão e F de VSR pós-fusão é bloqueado, e / ou um polipeptídeo antigênico de VSR compreendendo um polipeptídeo de F de VSR, em que o polipeptídeo de F de VSR compreende os resíduos de aminoácidos 62 a 69 e 196 a 209 da SEQ ID NO: 26 e uma asparagina correspondendo à posição 328, 348 ou 507 da SEQ ID NO: 26, opcionalmente em que o polipeptídeo antigênico de VSR compreende ainda ferritina.

[0274] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece composições farmacêuticas que compreendem anticorpos ou outros agentes relacionados com os polipeptídeos antigênicos aqui descritos. Em uma modalidade, a composição farmacêutica compreende anticorpos que se ligam a e / ou competem com um polipeptídeo antigênico aqui descrito. Alternativamente, os anticorpos podem reconhecer partículas virais compreendendo o componente polipeptídeo de VSR de um polipeptídeo antigênico aqui descrito.

[0275] Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas aqui descritas são administradas isoladamente ou em combinação com

um ou mais agentes para aumentar uma resposta imune, por exemplo, um adjuvante descrito acima. Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica compreende ainda um adjuvante descrito acima.

[0276] Em algumas modalidades, a composição farmacêutica compreende ainda um carreador ou excipiente farmacêuticamente aceitável. Conforme usado neste documento, o termo “carreador” refere-se a um diluente, adjuvante, excipiente ou veículo com o qual uma composição farmacêutica é administrada. Em modalidades exemplificativas, os carreadores podem incluir líquidos estéreis, tal como, por exemplo, água e óleos, incluindo óleos de petróleo, animal, vegetal ou de origem sintética, tal como, por exemplo, óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de gergelim e similares. Em algumas modalidades, os carreadores são ou incluem um ou mais componentes sólidos. Os carreadores farmacêuticamente aceitáveis também podem incluir, mas não estão limitados a, solução salina, solução salina tamponada, dextrose, glicerol, etanol e combinações dos mesmos. Como usado aqui, um excipiente é qualquer agente não terapêutico que pode ser incluído em uma composição farmacêutica, por exemplo, para fornecer ou contribuir para uma consistência desejada ou efeito estabilizador. Excipientes farmacêuticos adequados incluem, mas não estão limitados a, amido, glicose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, giz, gel de sílica, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite em pó desnatado, glicerol, propileno, glicol, água, etanol e similares. Em várias modalidades, a composição farmacêutica é estéril.

[0277] Em algumas modalidades, a composição farmacêutica contém pequenas quantidades de agentes molhantes ou emulsificantes, ou agentes tamponantes de pH. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas de podem incluir qualquer um de uma variedade de aditivos, tal como estabilizadores, tampões ou

conservantes. Além disso, agentes auxiliares, estabilizadores, espessantes, lubrificantes e agentes corantes podem ser incluídos.

[0278] Em várias modalidades, a composição farmacêutica pode ser formulada para se adequar a qualquer modo de administração desejado. Por exemplo, a composição farmacêutica pode assumir a forma de soluções, suspensões, emulsões, gotas, comprimidos, pílulas, grânulos, cápsulas, cápsulas contendo líquidos, cápsulas de gelatina, pós, formulações de liberação sustentada, supositórios, emulsões, aerossóis, aspersões, suspensões, pó liofilizado, suspensão congelada, pó dessecado, ou qualquer outra forma adequada para uso. Considerações gerais sobre a formulação e a fabricação de agentes farmacêuticos podem ser encontradas, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences, 19 ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995; aqui incorporado por referência.

[0279] A composição farmacêutica pode ser administrada por meio de qualquer via de administração. As vias de administração incluem, por exemplo, oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutânea, intranasal, mucosa, epidural, sublingual, intranasal, intracerebral, intravaginal, transdérmica, retal, por instilação intratraqueal, instilação brônquica, inalação, ou tópica. A administração pode ser local ou sistêmica. Em algumas modalidades, a administração é realizada por via oral. Em outra modalidade, a administração é por injeção parentérica. Em alguns casos, a administração resulta na liberação do polipeptídeo antigênico de ferritina aqui descrito na corrente sanguínea. O modo de administração pode ser deixado a critério do médico.

[0280] Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é adequada para administração parentérica (por exemplo, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal e subcutânea). Essas composições podem ser formuladas como, por exemplo, soluções, suspensões,

dispersões, emulsões e similares. Elas também podem ser fabricadas na forma de composições sólidas estéreis (por exemplo, composição liofilizada), que podem ser dissolvidas ou suspensas em meio injetável estéril imediatamente antes do uso. Por exemplo, a administração parentérica pode ser realizada por injeção. Em tais modalidades, os injetáveis são preparados em formas convencionais, isto é, como soluções ou suspensões líquidas, formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em líquido antes da injeção, ou como emulsões. Em algumas modalidades, as soluções e suspensões de injeção são preparadas a partir de pós estéreis, pós liofilizados, ou grânulos.

[0281] Em uma outra modalidade, a composição farmacêutica é formulada para entrega por inalação (por exemplo, para entrega direta aos pulmões e ao sistema respiratório). Por exemplo, a composição pode assumir a forma de uma aspensão nasal ou qualquer outra formulação de aerossol conhecida. Em algumas modalidades, as preparações para administração por inalação ou aerossol compreendem uma pluralidade de partículas. Em algumas modalidades, tais preparações podem ter um tamanho médio de partícula de cerca de 1, cerca de 2, cerca de 3, cerca de 4, cerca de 5, cerca de 6, cerca de 7, cerca de 8, cerca de 9, cerca de 10, cerca de 11, cerca de 12 ou cerca de 13 micra. Em algumas modalidades, as preparações para administração por inalação ou aerossol são formuladas como um pó seco. Em algumas modalidades, as preparações para administração por inalação ou aerossol são formuladas como um pó úmido, por exemplo, através da inclusão de um agente molhante. Em algumas modalidades, o agente molhante é selecionado a partir do grupo que consiste de água, solução salina ou outro líquido de pH fisiológico.

[0282] Em algumas modalidades, a composição farmacêutica de acordo com a invenção é administrada como gotas na cavidade nasal ou bucal. Em algumas modalidades, uma dose pode compreender uma

pluralidade de gotas (por exemplo, 1 a 100, 1 a 50, 1 a 20, 1 a 10, 1 a 5, etc.).

[0283] A presente composição farmacêutica pode ser administrada em qualquer dose apropriada para atingir um resultado desejado. Em algumas modalidades, o resultado desejado é a indução de uma resposta imune adaptativa de longa duração contra a fonte de um polipeptídeo de VSR presente em um polipeptídeo antigênico de ferritina presente na composição. Em algumas modalidades, o resultado desejado é uma redução na intensidade, gravidade, frequência e / ou atraso do início de um ou mais sintomas de infecção. Em algumas modalidades, o resultado desejado é a inibição ou prevenção da infecção. A dose necessária variará de sujeito para sujeito dependendo da espécie, idade, peso e condição geral do sujeito, a gravidade da infecção a ser evitada ou tratada, a composição particular a ser usada, e seu modo de administração.

[0284] Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas de acordo com a invenção são administradas em doses únicas ou múltiplas. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas são administradas em doses múltiplas administradas em dias diferentes (por exemplo, estratégias de vacinação de sensibilização - reforço). Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é administrada como parte de um regime de reforço.

[0285] Em várias modalidades, a composição farmacêutica é coadministrada com um ou mais agentes terapêuticos adicionais. A coadministração não requer que os agentes terapêuticos sejam administrados simultaneamente, se o momento de sua administração for tal que as atividades farmacológicas do agente terapêutico adicional e do(s) ingrediente(s) ativo(s) na composição farmacêutica se sobreponham no tempo, exercendo assim um efeito terapêutico combinado. Em geral, cada agente será administrado em uma dose e

em um cronograma determinado para esse agente.

4. Ácido Nucleico / mRNA

[0286] Também é fornecido um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo antigênico aqui descrito. Em algumas modalidades, o ácido nucleico é um mRNA. Qualquer ácido nucleico capaz de sofrer tradução resultando em um polipeptídeo é considerado um mRNA para os fins desta descrição.

5. Kits

[0287] Também são fornecidos aqui kits que compreendem um ou mais polipeptídeos antigênicos, ácidos nucleicos, partículas de ferritina antigênicas, partículas de lumazina sintase antigênicas, composições ou composições farmacêuticas aqui descritas. Em algumas modalidades, um kit compreende ainda um ou mais de um solvente, solução, tampão, instruções, ou dessecante.

Tabela 1 (Tabela de Sequência): Descrição das Sequências

Descrição	Sequência	SEQ ID NO
RF8085 NIH DS-CAV1 com ligante de cadeia única SGSGS (SEQ ID NO: 229) em ferritina de rã-touro (bf) hp N19Q_C31S_S111C (controle) (mesma sequência de proteína de 2, expressa com vetor de clonagem de transfecção transiente)	MELLILKANAITTILTAVTFPCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTEQLQMLGSGNVGLGGAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVLSNGVSVLTFKVLDLKNYIDKQLLPILNKQSC SISN IETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKILMSNNVQIVRQOQSYSIMCIIKEEVLAVVQQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGNSICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAECKVQSNRVFCDTMSRTPSEVNLGNVDIFN PKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYKTKCTASNKNGRIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDIELKLLNEQVKNEMQSSNLYMSMSSWYTHSL DGAGLFLPDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTISISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEVEVLFKIDLDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	1
RF8090: NIH DS-CAV1 com ligante de cadeia única SGSGS (SEQ ID NO: 229) em ferritina de rã-touro (bf) hp N19Q_C31S_S111C (controle) mesma sequência de proteína de 1, expressa com vetor de clonagem usado para a geração de linhagem de células CHO	MELLILKANAITTILTAVTFPCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTEQLQMLGSGNVGLGGAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVLSNGVSVLTFKVLDLKNYIDKQLLPILNKQSC SISN IETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKILMSNNVQIVRQOQSYSIMCIIKEEVLAVVQQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGNSICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAECKVQSNRVFCDTMSRTPSEVNLGNVDIFN PKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYKTKCTASNKNGRIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDIELKLLNEQVKNEMQSSNLYMSMSSWYTHSL DGAGLFLPDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTISISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEVEVLFKIDLDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	2
RF8100: Adicionar um único sitio de glicano T324N a VSR scF_SGSGS-bf-pFerr_N19Q_C31S_S111C]	MELLILKANAITTILTAVTFPCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTEQLQMLGSGNVGLGGAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVLSNGVSVLTFKVLDLKNYIDKQLLPILNKQSC SISN IETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKILMSNNVQIVRQOQSYSIMCIIKEEVLAVVQQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGNSICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAECKVQSNRVFCDTMSRTPSEVNLGNVDIFN PKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYKTKCTASNKNGRIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDIELKLLNEQVKNEMQSSNLYMSMSSWYTHSL DGAGLFLPDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTISISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEVEVLFKIDLDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	3
RF8101: Adicionar um único sitio de glicano E328N a VSR scF_SGSGS-bf-pFerr_N19Q_C31S_S111C	MELLILKANAITTILTAVTFPCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTEQLQMLGSGNVGLGGAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVLSNGVSVLTFKVLDLKNYIDKQLLPILNKQSC SISN IETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKILMSNNVQIVRQOQSYSIMCIIKEEVLAVVQQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGNSICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAECKVQSNRVFCDTMSRTPSEVNLGNVDIFN PKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYKTKCTASNKNGRIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDIELKLLNEQVKNEMQSSNLYMSMSSWYTHSL DGAGLFLPDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTISISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEVEVLFKIDLDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	4
RF8102: Adicionar um único sitio de glicano K390T a VSR scF_SGSGS-bf-pFerr_N19Q_C31S_S111C	MELLILKANAITTILTAVTFPCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTEQLQMLGSGNVGLGGAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVLSNGVSVLTFKVLDLKNYIDKQLLPILNKQSC SISN IETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKILMSNNVQIVRQOQSYSIMCIIKEEVLAVVQQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGNSICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAECKVQSNRVFCDTMSRTPSEVNLGNVDIFN PKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYKTKCTASNKNGRIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDIELKLLNEQVKNEMQSSNLYMSMSSWYTHSL DGAGLFLPDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTISISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEVEVLFKIDLDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	5
RF8103: Adicionar um único sitio de glicano S348N a VSRscF_SGSGS-bf-pFerr_N19Q_C31S_S111C	MELLILKANAITTILTAVTFPCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTEQLQMLGSGNVGLGGAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVLSNGVSVLTFKVLDLKNYIDKQLLPILNKQSC SISN IETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKILMSNNVQIVRQOQSYSIMCIIKEEVLAVVQQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGNSICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAECKVQSNRVFCDTMSRTPSEVNLGNVDIFN PKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYKTKCTASNKNGRIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDIELKLLNEQVKNEMQSSNLYMSMSSWYTHSL DGAGLFLPDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTISISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEVEVLFKIDLDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	6
RF8104: Adicionar um único sitio de glicano Y478S a VSR scF_SGSGS-bf-pFerr_N19Q_C31S_S111C	MELLILKANAITTILTAVTFPCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTEQLQMLGSGNVGLGGAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVLSNGVSVLTFKVLDLKNYIDKQLLPILNKQSC SISN IETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKILMSNNVQIVRQOQSYSIMCIIKEEVLAVVQQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGNSICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAECKVQSNRVFCDTMSRTPSEVNLGNVDIFN PKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYKTKCTASNKNGRIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDIELKLLNEQVKNEMQSSNLYMSMSSWYTHSL DGAGLFLPDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTISISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEVEVLFKIDLDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	7
RF8105: Adicionar um único sitio de glicano R507N a VSR scF_SGSGS-bf-pFerr_N19Q_C31S_S111C	MELLILKANAITTILTAVTFPCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTEQLQMLGSGNVGLGGAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVLSNGVSVLTFKVLDLKNYIDKQLLPILNKQSC SISN IETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKILMSNNVQIVRQOQSYSIMCIIKEEVLAVVQQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGNSICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAECKVQSNRVFCDTMSRTPSEVNLGNVDIFN PKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYKTKCTASNKNGRIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDIELKLLNEQVKNEMQSSNLYMSMSSWYTHSL DGAGLFLPDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTISISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEVEVLFKIDLDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS	8

87/118

RF8106: RF8108 com I217P que aumenta a expressão, e remoção de ligação dissulfeto (DS) de DS-CAV1 removido, resultando em expressão ainda mais alta relativa a RF8085 (ou RF8090)	mellilkanaitiltavtfcfasgqniteefyqstcsavskgylsalrtgwytsvitieislknkcnctgdakvklkqeldkyknavtelqllmgsgnvglgaiasgvavskvlhlegevniksallstnkavvslngsvlftfkvldlknidkqllpilnkqsc sisnpteviefqqknrlleitrefsvnagvttpvstymtlnsellslindmpitndqkklmsnqvivrqqsysimsiieevlayvqplpygvidtpcwklhtspcttntkegsniclrrtdrgwycdnagsvffpqaetckvqsnrvfcdtmnsrtlpsevnlnv difnpydkimtsktdvsssvitslgaivscygtkctasnkngriiktfnsgcdyvsnkgvdtvsvngntlyvvnkqegkslyvkgepiinfydpfvpsdefdasisqvnkinqslafirkdellsdsgsgsesqvrqqfskdieklleqvnmqemqssnlymsmsswsy thslgdagflfdhaaeeyehakkliflnennvpvqltsisapehkfegltqifqkayehqehisesinnvdhaikckdhatfnflqwyvaeqheeevlfkdildkielignenhgyladqyvkgiakrsks	9
RF8107: Substituição de prolina (I217P) de RF8108 e substituição de cavidade hidrofóbica de RF8111 (N228L) juntamente com a remoção de ligação dissulfeto de DS-CAV1	mellilkanaitiltavtfcfasgqniteefyqstcsavskgylsalrtgwytsvitieislknkcnctgdakvklkqeldkyknavtelqllmgsgnvglgaiasgvavskvlhlegevniksallstnkavvslngsvlftfkvldlknidkqllpilnkqsc sisnpteviefqqknrlleitrefsvnagvttpvstymtlnsellslindmpitndqkklmsnqvivrqqsysimsiieevlayvqplpygvidtpcwklhtspcttntkegsniclrrtdrgwycdnagsvffpqaetckvqsnrvfcdtmnsrtlpsevnlnv difnpydkimtsktdvsssvitslgaivscygtkctasnkngriiktfnsgcdyvsnkgvdtvsvngntlyvvnkqegkslyvkgepiinfydpfvpsdefdasisqvnkinqslafirkdellsdsgsgsesqvrqqfskdieklleqvnmqemqssnlymsmsswsy thslgdagflfdhaaeeyehakkliflnennvpvqltsisapehkfegltqifqkayehqehisesinnvdhaikckdhatfnflqwyvaeqheeevlfkdildkielignenhgyladqyvkgiakrsks	10
RF8108: Substituição de prolina I217P para estabilizar a hélice central pré-fusão (enquanto DS de DS-CAV1 presente) e aumentar a expressão	MELLILKANAITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCTGDQKVLKIQELDKYKNAVTEQLLGMGSGNVLGGAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGSVLFTFKVLDLKNYIDKQLLPILNKQSC PETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNQQVIVRQQSYSIMCIIEEVLAYVQPLPYGVIDTPCWKLHTSPCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSRTLPSEVNLCNVDFIN PKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTCTASNKNGRIIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVNGNTLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKDELLSGSGSESQVRQQFSKIDIEKLLEQVNMKEMQSSNLYMSMSSWSTHSL DGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKIDLDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIKRSKS	11
RF8109: Preenchimento da cavidade hidrofóbica de Q224L em VSR scF_SGSGS-bf-pFerr_N19Q_C31S_S111C	MELLILKANAITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCTGDQKVLKIQELDKYKNAVTEQLLGMGSGNVLGGAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGSVLFTFKVLDLKNYIDKQLLPILNKQSC SISN IETVIEFLQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNQQVIVRQQSYSIMCIIEEVLAYVQPLPYGVIDTPCWKLHTSPCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSRTLPSEVNLCNVDFIN PKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTCTASNKNGRIIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVNGNTLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKDELLSGSGSESQVRQQFSKIDIEKLLEQVNMKEMQSSNLYMSMSSWSTHSL DGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKIDLDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIKRSKS	12
RF8110: Substituições de preenchimento de cavidade hidrofóbica de Q224L e Q225V em VSR scF_SGSGS-bf-pFerr_N19Q_C31S_S111C	MELLILKANAITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCTGDQKVLKIQELDKYKNAVTEQLLGMGSGNVLGGAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGSVLFTFKVLDLKNYIDKQLLPILNKQSC SISN IETVIEFLQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNQQVIVRQQSYSIMCIIEEVLAYVQPLPYGVIDTPCWKLHTSPCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSRTLPSEVNLCNVDFIN PKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTCTASNKNGRIIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVNGNTLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKDELLSGSGSESQVRQQFSKIDIEKLLEQVNMKEMQSSNLYMSMSSWSTHSL DGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKIDLDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIKRSKS	13
RF8111: Substituição de preenchimento de cavidade hidrofóbica de N228L em VSR scF_SGSGS-bf-pFerr_N19Q_C31S_S111C	MELLILKANAITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCTGDQKVLKIQELDKYKNAVTEQLLGMGSGNVLGGAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGSVLFTFKVLDLKNYIDKQLLPILNKQSC SISN IETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNQQVIVRQQSYSIMCIIEEVLAYVQPLPYGVIDTPCWKLHTSPCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSRTLPSEVNLCNVDFIN PKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTCTASNKNGRIIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVNGNTLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKDELLSGSGSESQVRQQFSKIDIEKLLEQVNMKEMQSSNLYMSMSSWSTHSL DGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKIDLDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIKRSKS	14
RF8112 Substituição de preenchimento de cavidade hidrofóbica de N228F em VSR scF_SGSGS-bf-pFerr_N19Q_C31S_S111C	MELLILKANAITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNCTGDQKVLKIQELDKYKNAVTEQLLGMGSGNVLGGAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGSVLFTFKVLDLKNYIDKQLLPILNKQSC SISN IETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNQQVIVRQQSYSIMCIIEEVLAYVQPLPYGVIDTPCWKLHTSPCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSRTLPSEVNLCNVDFIN PKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTCTASNKNGRIIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVNGNTLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKDELLSGSGSESQVRQQFSKIDIEKLLEQVNMKEMQSSNLYMSMSSWSTHSL DGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNVDHAIKCKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKIDLDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIKRSKS	15
RF8113 (Mutaçao I217P de RF8106 enquanto removendo DS de DS-CAV1 e com ferritina Wt ser111 e CYS manipulado de K79C para conjugação)	mellilkanaitiltavtfcfasgqniteefyqstcsavskgylsalrtgwytsvitieislknkcnctgdakvklkqeldkyknavtelqllmgsgnvglgaiasgvavskvlhlegevniksallstnkavvslngsvlftfkvldlknidkqllpilnkqsc sisnpteviefqqknrlleitrefsvnagvttpvstymtlnsellslindmpitndqkklmsnqvivrqqsysimsiieevlayvqplpygvidtpcwklhtspcttntkegsniclrrtdrgwycdnagsvffpqaetckvqsnrvfcdtmnsrtlpsevnlnv difnpydkimtsktdvsssvitslgaivscygtkctasnkngriiktfnsgcdyvsnkgvdtvsvngntlyvvnkqegkslyvkgepiinfydpfvpsdefdasisqvnkinqslafirkdellsdsgsgsesqvrqqfskdieklleqvnmqemqssnlymsmsswsy thslgdagflfdhaaeeyehakkliflnennvpvqltsisapehkfegltqifqkayehqehisesinnvdhaikckdhatfnflqwyvaeqheeevlfkdildkielignenhgyladqyvkgiakrsks	16
RF8117 (Combinações de mutações de expressão / secreção aprimoradas bem sucedidas acima (Figura 2): No DS, I217P, E328N, S348N, R507N, ferritinK79C)	mellilkanaitiltavtfcfasgqniteefyqstcsavskgylsalrtgwytsvitieislknkcnctgdakvklkqeldkyknavtelqllmgsgnvglgaiasgvavskvlhlegevniksallstnkavvslngsvlftfkvldlknidkqllpilnkqsc sisnpteviefqqknrlleitrefsvnagvttpvstymtlnsellslindmpitndqkklmsnqvivrqqsysimsiieevlayvqplpygvidtpcwklhtspcttntkegsniclrrtdrgwycdnagsvffpqaetckvqsnrvfcdtmnsrtlpsevnlnv difnpydkimtsktdvsssvitslgaivscygtkctasnkngriiktfnsgcdyvsnkgvdtvsvngntlyvvnkqegkslyvkgepiinfydpfvpsdefdasisqvnkinqslafirkdellsdsgsgsesqvrqqfskdieklleqvnmqemqssnlymsmsswsy thslgdagflfdhaaeeyehakkliflnennvpvqltsisapehkfegltqifqkayehqehisesinnvdhaikckdhatfnflqwyvaeqheeevlfkdildkielignenhgyladqyvkgiakrsks	17
RF8122 (RF8117 acima com K498L adicional e K508Q para remover clivagem pela protease (baseado em LYS) e estabilidade/expressão aumentada)	mellilkanaitiltavtfcfasgqniteefyqstcsavskgylsalrtgwytsvitieislknkcnctgdakvklkqeldkyknavtelqllmgsgnvglgaiasgvavskvlhlegevniksallstnkavvslngsvlftfkvldlknidkqllpilnkqsc sisnpteviefqqknrlleitrefsvnagvttpvstymtlnsellslindmpitndqkklmsnqvivrqqsysimsiieevlayvqplpygvidtpcwklhtspcttntkegsniclrrtdrgwycdnagsvffpqaetckvqsnrvfcdtmnsrtlpsevnlnv difnpydkimtsktdvsssvitslgaivscygtkctasnkngriiktfnsgcdyvsnkgvdtvsvngntlyvvnkqegkslyvkgepiinfydpfvpsdefdasisqvnkinqslafirkdellsdsgsgsesqvrqqfskdieklleqvnmqemqssnlymsmsswsy thslgdagflfdhaaeeyehakkliflnennvpvqltsisapehkfegltqifqkayehqehisesinnvdhaikckdhatfnflqwyvaeqheeevlfkdildkielignenhgyladqyvkgiakrsks	18

RF8123 (RF8117 com C's em 69 e 212 nocaute para conjugação específica à ferritina CYS: C69V, C212V)	mellilkanaittiltavtfcfasgnqiteefyqstcsavskgylsalrtgwytvitielsnikenkngtdakvklkqeldkyknavtelqllmgsngvlggalaasgvavskvlhlegevniksallstnkavvslngvsvltfkvldlknyidkqllpilkqscsisnietviefqqknnrleitrefsvnagvtppvstymtlnsellslindmpitndqkklmsnnvqivrqqssysimsiikeevlayvvlplygvidtpcwklhtsplcttntkngsnicltrtdrgwycdnagnvsffpqaetckvqsnrvfcdtmnsrtlpsevnlnvdfnpydkckimtsktdvsssvitslgaivscygtkctasnkrgiiktfnsgcdyvsnkqgdvtsvgnltlyvvnkqegkslyvkgepiinfydpvlvpsdefdasisqvnelinqsafinqsdellsgsgsesqvrqqfskdiekllneqvnkemqssnlymsswsythsldgagflfdhaaeeyehakkliflnennvpvqltsisapehcfegltqifqkayehqehisesinnivdhaikskdhatfnflqwyvaeqheeevfkildkielignenhgyladqyvkgiakrks	19
RF8134 (RF8122 como com mutações K528N e K532N para limitar a instabilidade da proteólise)	mellilkanaittiltavtfcfasgnqiteefyqstcsavskgylsalrtgwytvitielsnikenkngtdakvklkqeldkyknavtelqllmgsngvlggalaasgvavskvlhlegevniksallstnkavvslngvsvltfkvldlknyidkqllpilkqscsisnietviefqqknnrleitrefsvnagvtppvstymtlnsellslindmpitndqkklmsnnvqivrqqssysimsiikeevlayvvlplygvidtpcwklhtsplcttntkngsnicltrtdrgwycdnagnvsffpqaetckvqsnrvfcdtmnsrtlpsevnlnvdfnpydkckimtsktdvsssvitslgaivscygtkctasnkrgiiktfnsgcdyvsnkqgdvtsvgnltlyvvnkqegkslyvkgepiinfydpvlvpsdefdasisqvnelinqsafinqsdellsgsgsesqvrqqfsndienllneqvnkemqssnlymsswsythsldgagflfdhaaeeyehakkliflnennvpvqltsisapehcfegltqifqkayehqehisesinnivdhaikskdhatfnflqwyvaeqheeevfkildkielignenhgyladqyvkgiakrks	20
RF8135: RF8122 como com mutações K465N e K470N para limitar a instabilidade da proteólise	mellilkanaittiltavtfcfasgnqiteefyqstcsavskgylsalrtgwytvitielsnikenkngtdakvklkqeldkyknavtelqllmgsngvlggalaasgvavskvlhlegevniksallstnkavvslngvsvltfkvldlknyidkqllpilkqscsisnietviefqqknnrleitrefsvnagvtppvstymtlnsellslindmpitndqkklmsnnvqivrqqssysimsiikeevlayvvlplygvidtpcwklhtsplcttntkngsnicltrtdrgwycdnagnvsffpqaetckvqsnrvfcdtmnsrtlpsevnlnvdfnpydkckimtsktdvsssvitslgaivscygtkctasnkrgiiktfnsgcdyvsnkqgdvtsvgnltlyvvnkqegkslyvkgepiinfydpvlvpsdefdasisqvnelinqsafinqsdellsgsgsesqvrqqfsndienllneqvnkemqssnlymsswsythsldgagflfdhaaeeyehakkliflnennvpvqltsisapehcfegltqifqkayehqehisesinnivdhaikskdhatfnflqwyvaeqheeevfkildkielignenhgyladqyvkgiakrks	21
RF8136: RF8122 como com mutações K465N, K470N, K528N e K532N para limitar a instabilidade da proteólise	mellilkanaittiltavtfcfasgnqiteefyqstcsavskgylsalrtgwytvitielsnikenkngtdakvklkqeldkyknavtelqllmgsngvlggalaasgvavskvlhlegevniksallstnkavvslngvsvltfkvldlknyidkqllpilkqscsisnietviefqqknnrleitrefsvnagvtppvstymtlnsellslindmpitndqkklmsnnvqivrqqssysimsiikeevlayvvlplygvidtpcwklhtsplcttntkngsnicltrtdrgwycdnagnvsffpqaetckvqsnrvfcdtmnsrtlpsevnlnvdfnpydkckimtsktdvsssvitslgaivscygtkctasnkrgiiktfnsgcdyvsnkqgdvtsvgnltlyvvnkqegkslyvkgepiinfydpvlvpsdefdasisqvnelinqsafinqsdellsgsgsesqvrqqfsndienllneqvnkemqssnlymsswsythsldgagflfdhaaeeyehakkliflnennvpvqltsisapehcfegltqifqkayehqehisesinnivdhaikskdhatfnflqwyvaeqheeevfkildkielignenhgyladqyvkgiakrks	22
RF8140: RF8122 com R523Q no ligante de rã-touro mutado para impedir a potencial proteólise em células CHO	MELLILKANAITTILTAFTVFCFASGNQITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRLPRFMYTLNNAKKTNTVLSKRRRRAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNGVSVLTFKVLDLKNYIDKQLLPILNKQSCSISNPETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPPVSTYMLTNSSELLSINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSSYSIMSIIKEEVLAYVVLPLYGVIDTPCWKLHTSPCLCTTNTKNGSNICLTRDRGWYCDNAGNVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSRTLPSEVNLCNVDFPNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKRGIIKTFNSGCDYVSNKQGDVTSVGNLTLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEIINQSLAFINQSDSELLSGSGSESQVQQQFSDIEKLLNEQVNEKQSNLYMSSWSYTHSLDAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSAPEHCFEGLTQIFQKAYEHQEHISESINNIVDHAIKSKDHTFNFLQWYVAEQHEEEVFKILDILDKIELIGNENHGLYADQYVKGIASRKS	23
Pós-F, molécula de controle de referência	MELLILKANAITTILTAFTVFCFASGNQITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRLPRFMYTLNNAKKTNTVLSKRRRRAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPILNKQSCSISNPETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPPVSTYMLTNSSELLSINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSSYSIMSIIKEEVLAYVVLPLYGVIDTPCWKLHTSPCLCTTNTKNGSNICLTRDRGWYCDNAGNVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSRTLPSEVNLCNVDFPNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKRGIIKTFNSGCDYVSNKQGDVTSVGNLTLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEIINQSLAFIRKSDHELLGLEVLVQGGPHHHHHHSAWHPQFEK	24
DS-CAV1, molécula de controle positivo	mellilkanaittiltavtfcfasgnqiteefyqstcsavskgylsalrtgwytvitielsnikenkngtdakvklkqeldkyknavtelqllmqstpatnnrarrlprfmytlinnakktntvlskrrrrflgflvgvsaasgvavskvlhlegevniksallstnkavvslngvsvltfkvldlknyidkqllpilkqscsisnietviefqqknnrleitrefsvnagvtppvstymtlnsellslindmpitndqkklmsnnvqivrqqssysimsiikeevlayvvlplygvidtpcwklhtsplcttntkngsnicltrtdrgwycdnagnvsffpqaetckvqsnrvfcdtmnsrtlpsevnlnvdfnpydkckimtsktdvsssvitslgaivscygtkctasnkrgiiktfnsgcdyvsnkqgdvtsvgnltlyvvnkqegkslyvkgepiinfydpvlvpsdefdasisqvnelinqsafinqsdellsgsgsesqvrqqfsndienllneqvnkemqssnlymsswsythsldgagflfdhaaeeyehakkliflnennvpvqltsisapehcfegltqifqkayehqehisesinnivdhaikskdhatfnflqwyvaeqheeevfkildkielignenhgyladqyvkgiakrks	25
Ocorrência natural, F Nativo de VSR (cepa A2)	MELLILKANAITTILTAFTVFCFASGNQITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRLPRFMYTLNNAKKTNTVLSKRRRRAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPILNKQSCSISNPETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPPVSTYMLTNSSELLSINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSSYSIMSIIKEEVLAYVVLPLYGVIDTPCWKLHTSPCLCTTNTKNGSNICLTRDRGWYCDNAGNVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSRTLPSEVNLCNVDFPNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKRGIIKTFNSGCDYVSNKQGDVTSVGNLTLYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEIINQSLAFIRKSDHELLHNVNAGKSTTNTMIIIVIIIVILLSLIAVGLLKYCARSTPVTLTKDQSGLGINNIAFSN	26
G de VSR cepa A Nativa UniProtKB/Swiss-Prot: P27022.1	MSKNKQRTAKTLERTWDTLNHLLFISSCLYKLNKLSVAQITLSILAMIISTSLIIVAIIFIASANHKITSTTTIIQDATNQIKNTTPTYLQNPQLGISPSNPSDITSLITLIDTTPGVKSTLQSTTVGTRKNTTTQ AQPNKPTTKQRQNKPPSKPNDPHEVFNVPVPCISCNPNPCWAIKRIIPNKKPGKRTTKPKTKPKTKTKGPKPQTTSKEAPTTPTEPTINTTKTNIITLTLTNTTRNPELTSQMETFHSTSEGNPSPSQVSI TSEYPSQSSPPNTPR	27
Ecotodominio de G de VSR, resíduos 66 a 297	NHKVTLTIAIQDATSQIKNTTPTYLQDPQLGISFNSLSEITSTTTILASTPFGVRSNLQPTTVTKTKNTTTQTPSKPTTKQRQNKPPNNDPHEVFNVPVPCISCNPNPCWAIKRIIPNKKPGKRTTKPKTKPKTKTKDKHKPQTKPKPEVPTTKPEEPTINTTKTNIITLTLTNTTRNPELTSQMETFHSTSEGNLSPSQVSTTSEHPSQSSPPNTPR	28
Peptídeo de G de VSR A2 para conjugação com ligante Azido N-terminal e glutamatos de flanqueamento (aa 151 a 193)	Azido-PEG4-SGGSSGSSEEEGGRQKPNNDPHEVFNVPVPCISCNPNPCWAIKRIIPNKKKEE	29
Oligodeoxinucleotídeo CpG (asteriscos indicam ligações fosforotioato)	T*G*A*C*T*G*T*G*A*A*C*G*T*T*C*G*A*G*A*T*G*A	30
Sequência de substituição em RF8117 substituída para as posições 98 a 144 de SEQ ID NO: 26 (F de VSR de ocorrência natural)	GSGNVGL	31

Gcc de VSR (região central conservada) cepa A2 res 151 a 193	RQNKPPNPNNDHFVFNVPSCISNNPTCWAICKRIPNKK	32
Gcc de VSR (região central conservada) cepa B1	RKNPPKKPKDDYHFEVFNVPSCICGNQLCKSICKTIPNKK	33
	Não usado	34-200
bfpFerritin-N19Q/C31S/S26C	ESQVRQQFSKDIKLLNEQVNMKQSSNLYMCMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSSAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAITSKDHATFNFLQWVVAEQHEEEVLFKDIIDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK	201
bfpFerritin-N19Q/C31S/S72C	ESQVRQQFSKDIKLLNEQVNMKQSSNLYMCMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSSAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAITSKDHATFNFLQWVVAEQHEEEVLFKDIIDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK	202
bfpFerritin-N19Q/C31S/A75C	ESQVRQQFSKDIKLLNEQVNMKQSSNLYMCMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSSAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAITSKDHATFNFLQWVVAEQHEEEVLFKDIIDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK	203
bfpFerritin-N19Q/C31S/K79C	ESQVRQQFSKDIKLLNEQVNMKQSSNLYMCMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSSAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAITSKDHATFNFLQWVVAEQHEEEVLFKDIIDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK	204
bfpFerritin-N19Q/C31S/S100C	ESQVRQQFSKDIKLLNEQVNMKQSSNLYMCMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSSAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAITSKDHATFNFLQWVVAEQHEEEVLFKDIIDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK	205
bfpFerritin-N19Q/C31S/S111C	ESQVRQQFSKDIKLLNEQVNMKQSSNLYMCMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSSAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAITSKDHATFNFLQWVVAEQHEEEVLFKDIIDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK	206
bfpFerritin-N19Q/C31S/E12C	ESQVRQQFSKDIKLLNEQVNMKQSSNLYMCMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSSAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAITSKDHATFNFLQWVVAEQHEEEVLFKDIIDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK	207
Ferritina de <i>H. pylori</i> exemplificativa com ligante de rã-touro	ESQVRQQFSKDIKLLNEQVNMKQSSNLYMCMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSSAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAITSKDHATFNFLQWVVAEQHEEEVLFKDIIDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK	208
Ferritina de <i>H. pylori</i> exemplificativa (Acesso a GenBank AAD06160.1) (sem ligante de rã-touro ou Met N-terminal)	LSKDIKLLNEQVNMKQSSNLYMCMSSWSYTHSLDGAGLFLFDHAAEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSSAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAITSKDHATFNFLQWVVAEQHEEEVLFKDIIDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK	209
CpG (ISS-1018)	TGACTGTGAACGTTCCGAGATGA	210
Ferritina de cadeia pesada de <i>Trichoplysia ni</i>	TQCINVPVQPKDWITMHRSCRNMRRQIQMEVGASLQYLAMGAHFSKDVNRPGFAQLFFDAASEEREHAMKLEIYLLMRGELTNDVSSLLQVRPPTRSRWKGGVEALEHALSMESDVTKSIRNVIKACEDDSEFNDYHLVDYLTGDFLEEQYKGRDLGAKASTLKKLMD RHEALGEF IFDKKLLGIDV	211
Ferritina de cadeia leve de <i>Trichoplysia ni</i>	ADTCYNDVALDCGITSNSLALPRCNAVYGEYSGHNVATELQAYAKHLERSYDYLSSAAYFNNVQTNRAGFSKLPKLSDEAWSKTIIDIKHVTKRGEHMFDQHSMTKTERKNVTAENHELEALAKALDTQKELAERAFYIHRATRNSQHLHDPETAQVLEEEFIEDHA EKIRTLAGHTSDLKFFITANNHDLALYVDFEYLQKTV	212
Ferritina de <i>Pyrococcus furiosus</i>	MLSERMLKALNDQNLRELYSAYLYFAMAAYFEDLGLGFANWKAQAEIEIGHALRFYNY IYDRNGRVELDEIPKPKKEWESPLKAFEAAYEHEKFIKSIYELAALAEKDYSTRAFL EWFINEQVEEASVKKILDKLKFADKSPQILFMLDKEL SARAPKLPGLLMQGGGE	213
Ferritina humana de cadeia pesada	MTTASTSQRVQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYFDRDDVALKNFAKYFLHQSHREHAELMKLQNRGGRIPLQDIKPKDCDDWESGLNAMECALHLEKNVQSSLELHLKLATDKNDPHLCDFIETHYVNEQVKAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLAEYLF KHTLGDSDES	214
Ferritina humana de cadeia leve (peptídeo sinal está sublinhado)	<u>MDSKGSQKGSRLLLLVSNLLLPQGVLA</u> SSQIRQNYSTDEVAANVSNLVNLYLQASYVYLSLGFYDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREYERLLKMQNRGRALFQDIKPKPAEDWGTTPDAMKAAMALEKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLEHFLDEEVKLIK KMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD	215
lumazina sintase a partir de Aquifex aeolicus	MQIYEGKLTAEGLRFGIVASRFNHALVDRIVEGAI DCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIPVAAGELARKEDDAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLANLSELRKPIITFGVITADTLEQAIERAGTKHGKNGWEAALSAIEMANLFKSLR	216
Ligante de rã-touro	ESQVRQQF	217
Ligante Cisteina-Trombina-His (a cisteína está com sublinhado duplo)	<u><u>QLVFRGSLEHHHHHH</u></u>	218
6,7-dimethyl-8-ribitillumazina sintase de <i>E. coli</i>	MNIIEANVATPDARVAITTIARFNNFINDSLLEGAIDALKRIGQKVDENITVWVWPAYELPLAAGALAKTGKVDVIALGTVIRGGTAHFYVAGGASNGLAHQDSEIPVAFVGLTTESIEQAIERAGTKAGNKGAEALTALEMIVLKAIKA	219
Ligante de 16 aminoácidos	GGGGSGGGSGGGGGG	220
Ligante de 28 aminoácidos	GGSGSNSASGASGGASGGSGGGG	221
Ligante de 46 aminoácidos	GGSGSASGASGSSNGSGSGSNGSASGASGGASGGSGGGG	222
FR1	GGSGSASAEAAKAAKAGGGGGG	223
FR2	GGSGSASAEAAKAAKAAKASGGGGG	224
Ligante de 47 aminoácidos compreendendo um C para conjugação	SGGGSGSASGASGSSCSGSGSGSSASGASGGSGGGGGG	225

[0288] Esta descrição e modalidades exemplificativas não devem ser tomadas como limitantes. Para os fins dessa especificação e reivindicações em anexo, a menos que indicado ao contrário, todos os números que expressam quantidades, porcentagens ou proporções, e outros valores numéricos usados na especificação e nas reivindicações devem ser entendidos como sendo modificados em todos os casos pelo termo “cerca de”, na medida em que ainda não tenham sido modificados. “Cerca de” indica um grau de variação que não afeta substancialmente as propriedades do assunto descrito, por exemplo, dentro de 10%, 5%, 2% ou 1%. Conseqüentemente, a menos que indicado ao contrário, os parâmetros numéricos estabelecidos na seguinte especificação e nas reivindicações em anexo são aproximações que podem variar dependendo das propriedades desejadas que se buscam obter. No mínimo, e não como uma tentativa de limitar a aplicação da doutrina dos equivalentes ao escopo das reivindicações, cada parâmetro numérico deve pelo menos ser interpretado face ao número de dígitos significativos relatados e aplicando técnicas de arredondamento comuns.

[0289] Observa-se que, conforme utilizado neste relatório descritivo e nas reivindicações em anexo, as formas singulares “um”, “uma” e “o”, “a” e qualquer uso no singular de qualquer palavra incluem referentes plurais, a menos que expressamente e inequivocamente limitado a um referente. Conforme usado neste documento, o termo “incluir” e suas variantes gramaticais se destinam a ser não limitantes, de modo que a citação de itens em uma lista não exclua outros itens similares que podem ser substituídos ou adicionados aos itens listados.

EXEMPLOS

[0290] Os exemplos a seguir são fornecidos para ilustrar certas modalidades descritas e não devem ser interpretados como limitando o escopo desta descrição de qualquer forma.

1. Concepção e Caracterização de Modificações em Polipeptídeos de F de VSR

[0291] Como outras proteínas F de paramixovírus, F de VSR é expresso como uma proteína precursora com um peptídeo sinal N-terminal e uma região transmembrana C-terminal que ancora a proteína à superfície viral. F de VSR sofre clivagem intracelular pela protease furina para liberar um peptídeo de fusão hidrofóbico (“FP” na Figura 1A), cujo papel é se ligar à célula alvo durante a infecção. Adjacente ao peptídeo de fusão está a região A de repetição hepta (HRA), enquanto a região B de repetição hepta (HRB) é adjacente ao domínio transmembrana.

[0292] As estruturas de cristal de trímeros do ectodomínio de F de VSR em suas conformações pré-fusão e pós-fusão demonstram como as regiões HRA e HRB sofrem um rearranjo significativo para conduzir o evento de fusão celular (Figura 1B) (ver Swanson, K.A., e outros, Proc Natl Acad Sci USA 108 (23): p. 9619-24 (2011); McLellan, J.S., e outros, Science 342 (6158): 592 a 598 (2013); McLellan, J.S., e outros, J Virol 85 (15): 7788-96 (2011); e McLellan, J.S., e outros, Science 342 (6158): p. 592-8 (2013)). Na conformação pré-fusão, a região A de repetição hepta (HRA) está associada com a cabeça globular, e a ponta do peptídeo de fusão está principalmente enterrada no centro da proteína. A conformação pré-fusão contém uma série de hélices e envolve certos contatos entre os protômeros para formar um trímero pré-fusão.

[0293] Uma série de substituições de aminoácidos foi concebida para ser estabilizadora inter-protômero. Substituições exemplificativas incluem V207L; N228F; I217V e E218F; I221L e E222M; ou Q224A e Q225L. Toda a numeração de sequência de aminoácidos de F de VSR nos exemplos usa a numeração de SEQ ID NO: 26.

[0294] As substituições de aminoácidos foram concebidas para serem estabilizadoras de hélice. Como tal, prevê-se que essas

substituições estabilizem o domínio helicoidal de F de VSR. Substituições exemplificativas incluem N216P ou I217P.

[0295] As substituições de aminoácidos foram concebidas para serem estabilizadoras intra-protômero. As substituições exemplificativas incluem V220I; ou A74L e Q81L.

[0296] As substituições de aminoácidos foram concebidas para serem de capeamento de hélice. As substituições exemplificativas incluem N216P ou I217P.

[0297] As substituições de aminoácidos foram concebidas para diminuir a agregação. As substituições exemplificativas incluem V192E e L61Q.

[0298] Outras substituições de aminoácidos foram concebidas para preencher a cavidade através da introdução de aminoácidos hidrofóbicos, tal como N228F.

[0299] As substituições de aminoácidos E328N, S348N e R507N foram concebidas para adicionar sítios de glicosilação, substituindo resíduos não asparagina por asparagina. Foi suposto que a adição de glicanos não nativos poderia ser usada para bloquear epítomos que são expostos em F de VSR pós-fusão (Figura 1B) na superfície da proteína F pré-fusão.

[0300] Os construtos F de VSR de interesse foram gerados como proteínas de fusão de cadeia única (scF) com uma ferritina híbrida compreendendo um ligante de ferritina de rã-touro N-terminal e ferritina de *H. pylori* (pFerr) (Figura 1A). A ferritina compreendia uma cisteína exposta na superfície resultante de uma mutação K79C ou S111C (a numeração da sequência da ferritina corresponde à SEQ ID NO: 208).

[0301] A geração das várias sequências de codificação de Pré-F-NP de VSR e de ferritina foi realizada usando práticas de clonagem padrão conhecidas no campo. De um modo geral, o DNA para construtos de F de VSR com as substituições descritas foi sintetizado e

clonado em um vetor de expressão de mamífero por Genscript. F de VSR DS-CAV1 e trímeros F pós-fusão foram gerados de forma similar aos protocolos publicados anteriormente (ver McLellan, J.S., e outros, *Science* 342 (6158): 592 a 598 (2013)). O construto DS-CAV1 reteve o domínio de trimerização C-terminal de F de VSR e combinou-o com substituições hidrofóbicas de preenchimento de cavidade. F de VSR DS-CAV1 compreende uma multinação dissulfeto S155C-S290C (DS) e um S190F-V207L (CAV1).

[0302] Os vetores que codificam nanopartículas de F de VSR - ferritina, ferritina nua (isto é, não ligada a F de VSR) e trímeros F de VSR foram transfectados para células 293EXPI, e os produtos de expressão foram colhidos a partir do meio condicionado após 4 dias. As nanopartículas de F de VSR foram purificadas por uma série de purificações de coluna Q aniônica (GE Healthcare, Cat # 17-1154-01) em pH 7,0 e 8,5 seguido de purificação Superose 6 SEC em PBS (GE Healthcare Cat # 90-1000-42) usando métodos convencionais de cromatografia. Os trímeros pré-fusão e os trímeros pós-fusão DS-CAV1 foram armazenados a -80°C e as nanopartículas de F de VSR foram armazenadas a 4°C.

[0303] Para determinar a conformação de nanopartículas de F de VSR, a microscopia eletrônica foi realizada. As preparações de nanopartículas de F de VSR (30 µg / mL em Tris a 25 mM, NaCl a 50 mM) foram absorvidas em uma grade revestida de carbono de 400 mesh (Electron Microscopy Sciences) e coradas com formato de uranila a 0,75%. Um microscópio JEOL 1200EX, operado a 80 kV, foi usado para analisar as amostras. As micrografias foram tiradas com ampliação de 65.000x e as médias das classes 2D foram preparadas usando métodos convencionais no campo por EM Company Nanoimaging Services, INC (San Diego, CA) (Figura 1D).

[0304] A expressão e a secreção de polipeptídeos compreendendo

esses polipeptídeos de F de VSR e ferritina (SEQ ID NOs: 1 a 8 e 11 a 15) por células EXPI 293 transientemente transfectadas (Invitrogen) foram avaliadas por Western blot anti-F de VSR. Todos os Western blots anti-F de VSR usaram o anticorpo D25 específico do sítio 0 descrito por McLellan e outros, Science 340 (6136): 1113 a 1117 (2013) e Patente US 8.562.996. Conforme mostrado na Figura 2, muitos construtos foram expressos e secretados com sucesso.

[0305] O polipeptídeo RF8085 (SEQ ID NO: 1) representa um mutante de cadeia única do F de VSR DS-CAV1 publicado (ver McLellan, J.S., e outros, Science 342 (6158): 592 a 598 (2013)) fusionado N-terminalmente a nanopartículas de ferritina. Esse construto compreende um mutante duplo de F de VSR S155C-S290C (DS) que retém o sítio antigênico 0.

[0306] O polipeptídeo RF8106 (SEQ ID NO: 9) tem uma substituição I217P em vez das 2 cisteínas substituídas em DS-CAV1. Como mostrado na Figura 3, o construto RF8106 teve uma expressão significativamente melhor em células 293 EXPI transfectadas transientemente conforme avaliado a partir de meio condicionado após 4 dias por Western blot anti-F de VSR.

[0307] A cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) de RF8106 mostrou a eluição de um pico principal em um tempo de retenção consistente com uma partícula de ferritina montada fusionada ao antígeno de VSR consistente com uma nanopartícula de proteína de fusão (Pré-F-NP, Figura 4). A análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS) de RF8106 foi feita nos estados reduzido (Figura 5B) e não reduzido (Figura 5A). A redução foi por tratamento com 2 mM de TCEP. RF8106 tinha um raio de aproximadamente 15 nm, o que é consistente com a incorporação em uma nanopartícula (24 monômeros) tanto no estado reduzido quanto no estado não reduzido. A estabilidade da proteína de fusão a agentes redutores facilita a conjugação de

adjuvantes às proteínas de fusão para formar nanopartículas autoadjuvantes, conforme descrito abaixo.

[0308] Em seguida, a conjugação de um adjuvante à proteína de fusão do polipeptídeo de F de VSR e ferritina (Pré-F-NP) foi avaliada. Verificou-se que a cisteína da superfície livre na ferritina pode ser usada para ligar uma porção adicional à proteína de fusão scF-pFerr. A Figura 6 mostra a conjugação bem-sucedida de um oligodeoxinucleotídeo (ODN) CpG com a sequência T * G * A * C * T * G * T * G * A * A * A * C * G * T * T * C * G * A * G * A * T * G * A (SEQ ID NO: 30; os asteriscos indicam ligações fosforotioato) a RF8106, como evidenciado por um aumento no peso molecular conforme avaliado por gel de SDS-PAGE corado com Coomassie.

[0309] O efeito da adição de sítios de glicosilação usando substituições E328N, S348N e R507N (RF8117, SEQ ID NO: 17) foi avaliado em células 293EXPI transientemente transfectadas com este construto como uma proteína de fusão com ferritina (ou seja, como construtos Pré-F-NP). RF8117 também contém uma substituição I217P, como em RF8113. Como mostrado na Figura 7, a expressão aumentada foi observada para RF8117 em comparação tanto com o construto de controle RF8085 quanto com o construto RF8113 (SEQ ID NO: 16, que compreende uma substituição de prolina de I217P, mas não as substituições de E328N, S348N e R507N). RF8113 é similar ao RF8106 descrito anteriormente, exceto que a cisteína ferritina manipulada está no resíduo de ferritina K79C em vez de S111C. O construto RF8117 também mostrou um aumento no peso molecular de RF8113 e RF8117, indicando o sucesso da adição de glicanos.

[0310] A Figura 8 resume as modificações nas nanopartículas de F de VSR que aumentaram a estabilidade proteolítica de Pré-F-NP. O construto inicial foi RF8117 (acima). Quando o construto anterior RF8085 foi clonado no vetor CHO como RF8090 e transfectado para

células CHO, foi observado que algum material foi cortado entre a porção F e a porção de ferritina. Suspeitou-se que os resíduos de arginina ou lisina na região HRB ou o ligante entre a porção F e a porção de ferritina estavam sendo cortados por proteases similares à tripsina. Mutações em resíduos de lisina e arginina dentro da região foram testadas em relação à expressão em células 293. A Figura 8 identifica as mutações K498L e R508Q (em RF8122, SEQ ID NO: 18) como não afetando ou aumentando a expressão em relação ao RF8117. Essas mutações, com R523Q, foram combinadas com as mutações de RF8117 aqui mencionadas para formar o construto RF8140 (SEQ ID NO: 23).

[0311] Maiores melhoras na expressão (aproximadamente 5 vezes) foram observadas com a combinação de modificações de cadeia única e prolina (I217P) na expressão de células 293 (construtos exemplificativos com essas substituições incluem RF8106 (SEQ ID NO: 9) e RF8113 (SEQ ID NO: 16)) com melhora adicional na expressão e solubilidade resultante da adição de modificações no sítio de glicosilação de F de VSR (construtos exemplificativos RF8117 (SEQ ID NO: 17) e RF8140 (SEQ ID NO: 23)). Todos esses construtos têm o peptídeo de fusão e regiões peptídicas p27 (aminoácidos 98 a 144 de SEQ ID NO: 26) substituídas pela sequência GSGNVGL (SEQ ID NO: 31). No entanto, quando RF8090 foi expresso em linhagens de células de fabricação de CHO, bandas de F de VSR adicionais em Western blots foram observadas, sugerindo que o construto era susceptível à proteólise, talvez clivagem similar à tripsina em um resíduo de arginina ou lisina.

[0312] A potencial função da susceptibilidade à protease também foi investigada. A substituição de resíduos K (nocaute ou KO) na região HRB e no ligante entre a porção de F e a porção de ferritina foram feitas, uma vez que foram previstos como possíveis sítios de clivagem

mediada por K inicialmente observados na linhagem de células de fabricação de CHO. Conforme mostrado nas Figuras 9A e 9B, RF8117 e RF8140 ambos expressam níveis elevados em relação a RF8090 na linhagem de células de fabricação de CHO, conforme medido por Western blot de D25 ou análise de Octet de D25 e AM14.

[0313] Estes dados indicam que os construtos de cadeia única e modificações de aminoácidos para capeamento de hélice, aumento da glicosilação, e eliminação de lisinas ou argininas susceptíveis à clivagem por protease podem melhorar a expressão de polipeptídeos de F de VSR, incluindo antígenos de VSR Pré-F-NP.

2. Caracterização de Proteínas de Fusão de F de VSR e Nanopartículas de Ferritina

[0314] Antes dos estudos em animais, as concentrações de nanopartículas de DS-CAV1 e F de VSR foram analisadas por ligação usando Octet. A ligação dos antígenos pré-fusão aos anticorpos específicos pré-fusão D25 e AM14 também foi medida usando um instrumento FortéBio Octet. Todos os ensaios foram realizados em PBS a 30° C. Os anticorpos foram carregados nas pontas dos sensores de Proteína A (ProA) (fortéBio # 18-5013) por 400 segundos para permitir que a captura alcance quase a saturação. As pontas do biossensor foram então equilibradas por 90 segundos em PBS, seguido por associação ao antígeno em concentrações conhecidas em PBS por 300 segundos, seguida pela dissociação do antígeno em PBS. A análise de dados e o ajuste da curva, assumindo uma interação de 1:1, foram realizados com o software Octet Data Analysis HT10.0 usando uma curva padrão externa de ligação de um Pré-F-NP purificado em concentração conhecida. Um resultado de ensaio exemplificativo para determinar a concentração de Pré-F-NP em meio condicionado por CHO é mostrado na Figura 9B.

3. Caracterização *In vivo* da Resposta Imune a Polipeptídeos de F

de VSR

[0315] Para avaliar a resposta *in vivo* aos antígenos de VSR em camundongos, camundongos BALBc fêmeas foram imunizados intramuscularmente com antígenos de VSR em doses especificadas nas semanas 0, 3 e 6. A menos que indicado de outra forma, os antígenos de VSR (por exemplo, nos experimentos das Figuras 10A a B e 12A a B, entre outros) foram adjuvantados com AF03 com uma estratégia de misturação à beira do leito. Ou seja, 50 µl da solução de proteína relevante foram misturados com 50 µl de adjuvante AF03 de Sanofi (uma emulsão à base de esqualeno; ver Klucker e outros, J Pharm Sci. Dez 2012; 101 (12): 4490-500) imediatamente antes para injeção de 50 µl em cada perna traseira. Para grupos sem adjuvante, os antígenos foram misturados como acima, mas o AF03 foi substituído por um volume equivalente de PBS. Para antígenos misturados com SPA09 ou Alume, o procedimento acima foi realizado substituindo o AF03 por um volume equivalente de SPA09 ou Alume, respectivamente. Nenhum efeito adverso a partir da imunização foi observado para qualquer formulação. O sangue foi coletado 1 dia antes da primeira imunização e pelo menos 2 semanas após cada injeção (ou seja, semanas 2, 5 e 8). A menos que especificado de outra forma, os dados mostrados foram para 2 semanas após a terceira injeção (semana 8, também indicada como 2wp3). Tipicamente, foram analisados os soros de animais pré-imunizados (denotado como virgens de tratamento), duas semanas após a segunda injeção (pós-2ª ou 2wp2) ou duas semanas após a terceira injeção (pós-3ª ou 2wp3).

[0316] Para o ensaio de neutralização de células Vero, o soro foi inativado por calor por 30 minutos a 56° C. Uma série de quatro diluições do soro inativado foi feita em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com Soro Fetal Bovino (FBS) a 2%, GlutaMAX a 1% e antibiótico - antimetabólico a 1%. Os estoques virais de VSR foram

combinados 1:1 com as diluições de soro e incubados por 1,5 horas a 37° C. A mistura de vírus - soro foi então adicionada a placas de 24 poços contendo monocamadas de células Vero confluentes a 100 µL por poço e incubadas por 1,5 horas a 37° C, CO₂ a 5%. O inóculo foi então coberto com 1 mL por poço de metil celulose a 0,75% em DMEM suplementado com FBS a 2%, GlutaMAX a 2% e antibiótico-antimitótico a 2%. Após 5 dias de incubação a 37° C, CO₂ a 5%, a sobreposição foi removida e as monocamadas foram fixadas com metanol gelado durante 20 minutos.

[0317] As placas foram então lavadas uma vez em água e bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% em solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 30 minutos em temperatura ambiente com agitação suave. A solução de bloqueio foi então substituída por 200 µL por poço de leite em pó a 2% em PBS contendo uma diluição de 1:2000 de anticorpo anti-VSR conjugado com peroxidase de rábano silvestre (Abcam AB20686). Após 3 horas de incubação em temperatura ambiente, as placas foram lavadas 2 vezes com água, desenvolvidas com substrato TrueBlue HRP, lavadas mais duas vezes em água e secas ao ar.

[0318] As placas coradas foram contadas usando um microscópio de dissecação. As titulações de anticorpos neutralizantes foram determinadas no desfecho de redução de 60% de controles de vírus neutralizados simulados usando a fórmula: titulação de redução de placa de 60% = $(C / V \times 0,4 - \text{Baixo}) / (\text{Alto} - \text{Baixo}) \times (\text{HSD} - \text{LSD}) + \text{LSD}$, onde C / V = média das placas de VSR em poços de controle de vírus simulado neutralizado, Baixo e Alto são o número médio de placas de VSR nas duas diluições que abrangem o valor C / V x 0,4 para uma amostra de soro, e o HSD e LSD são as diluições de soro superior e inferior.

[0319] Para o ensaio de neutralização de HAE, o soro foi inativado

por calor durante 30 minutos a 56°C. Uma série de quatro diluições em série do soro inativado foi feita em Meio Basal PneumaCult™-ALI (Stem Cell Technologies; 05002) suplementado com Suplemento PneumaCult™-ALI 10X (Stem Cell Technologies; 05003) e Antibiótico / Antimicótico a 1% (portanto, meio). Os estoques virais de VSR foram combinados 1:1 com as diluições de soro e incubados por 1,5 horas a 37° C. A mistura de vírus - soro foi então adicionada a placas de 24 poços contendo células HAE totalmente diferenciadas a 50 µL por poço e incubadas durante 1,5 horas a 37°C, CO₂ a 5%. Após a incubação, o inóculo foi removido, os poços foram lavados duas vezes com meio para remover o vírus não ligado e incubados por mais 20 horas a 37° C, CO₂ a 5%. Os eventos de infecção em culturas infectadas com VSR expressando o repórter mKate (TagFP635) foram contados em um microscópio de fluorescência.

[0320] Para detectar a infecção com VSR que não expressa o repórter mKate, os epitélios pseudoestratificados foram lavados extensivamente com meio para remover o muco, em seguida, fixados com paraformaldeído a 4% por 30 minutos em temperatura ambiente, permeabilizados com Triton X-100 a 0,25% por 30 minutos, e bloqueados com DMEM suplementado com FBS a 2% durante 1 hora a 37°C. A solução de bloqueio foi substituída por 100 µL por poço de mistura de Ab monoclonal anti-VSR de camundongo (Millipore; MAB 858-4) diluída 1:200 em DMEM suplementado com FBS a 2%, e as placas foram incubadas a 37° C por 2 horas. As placas foram então lavadas 3 vezes com PBS suplementado com Tween 20 a 0,05%. 100 µL de IgG anti-camundongo de cabra (H + L) (Invitrogen; A11001) diluídos 1:200 em DMEM suplementado com FBS a 2% foram adicionados por poço, e as placas foram incubadas durante a noite a 4° C. Na manhã seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS suplementado com Tween 20 a 0,05%, o sinal fluorescente foi estabilizado com ProLong Gold AntiFade

com DAPI (Thermo Fisher Scientific; P36935) e contado em um microscópio fluorescente. As titulações de anticorpos neutralizantes foram determinadas no desfecho de redução de 60% como acima.

[0321] Para a ligação anti-F, tanto F pré-fusão (DS-CAV1) ou F pós-fusão foram ligados a pontas de anticorpos anti-HIS no Octeto. A menos que especificado, toda ligação anti-F se refere à ligação do trímero F anti-pré-fusão (DS-CAV1). O trímero F de VSR (DS-CAV1 ou F pós-fusão) marcado com His6 (SEQ ID NO: 230) foi pré-carregado nas pontas do sensor Anti-Penta-HIS (HIS1K) (FortéBio # 18-5122) por 400 segundos para permitir que a captura alcance quase a saturação. As pontas do biossensor foram então equilibradas por 90 segundos em tampão de lavagem Octet, seguido por associação de soros diluídos por 300 segundos. As respostas finais da curva de associação foram medidas usando o software Octet Data Analysis HT10.0, e a resposta foi multiplicada pela fator de diluição (100 ou 300) para obter a resposta final relatada.

[0322] Para a ligação anti-Gcc, um dímero trimerizado do peptídeo Gcc com uma etiqueta HIS C-terminal foi usado em uma ponta Octet similar ao acima. O hexâmero Gcc (cepa A2) marcado com His6 (SEQ ID NO: 230) foi pré-carregado nas pontas do sensor Anti-Penta-HIS (HIS1K) (FortéBio # 18-5122) por 400 segundos para permitir que a captura alcance quase a saturação. As pontas do biossensor foram então equilibradas por 90 segundos em tampão de lavagem Octet, seguido por associação de soros diluídos por 300 segundos. As respostas finais da curva de associação foram medidas usando o software Octet Data Analysis HT10.0 e a resposta foi multiplicada pelo fator de diluição (100 ou 300) para obter a resposta final relatada.

[0323] Para estudos em primatas não humanos (NHP), os NHPs foram pré-selecionados quanto à resposta de VSR (as linhas de base foram encontradas abaixo dos limites de detecção para todos os

ensaios). Os NHPs foram imunizados com 50 µg de RF8140 com adjuvante denotado similar ao protocolo para camundongo acima, mas com maior volume de adjuvante (Figura 11C a D e Figura 18).

[0324] Para o estudo em primatas não humanos, os ensaios de neutralização em células VERO foram realizados conforme descrito acima. A ligação pré-F foi avaliada pelo ensaio ELISA abaixo.

[0325] As amostras de soro de NHP foram diluídas em série 2 vezes (diluição inicial 1:100) e incubadas em placas revestidas com F de VSR solúvel bloqueado (Sinobiological # 11049-V08B) (1 µg / mL, 100 µL / poço) por 1 h em 37°C. Os IgGs específicos de F de VSR foram detectados usando IgG anti-macaco conjugado com peroxidase de rábano silvestre (BioRad AAI42P, diluição 1:10.000) por 90 minutos a 37°C. As placas foram desenvolvidas usando 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB Tebu-Bio) e interrompidas com ácido clorídrico a 1 N (Prolabo # 30024290). A densidade óptica (OD) foi medida a 450 nm - 650nm com um leitor de microplaca (SpectraMax). As titulações de IgG específicas de sF de VSR foram calculadas usando o software SoftmaxPro, para a faixa de valores de OD de 0,2 a 3,0, a partir da curva de titulação (soro hiperimune de camundongo padrão colocado em cada placa).

[0326] As titulações de IgG desta referência, expressas em unidades ELISA arbitrárias (EU), corresponderam ao log₁₀ da diluição recíproca fornecendo uma OD de 1,0. O limite de detecção de anticorpos foi de 20 (1,3 log₁₀) EU. Todas as titulações finais foram expressas em log₁₀ para representação gráfica. Para cada titulação < 1,3 log₁₀, uma titulação arbitrária de 1,0 log₁₀ foi atribuída.

[0327] Para avaliar a imunidade mediada por células no estudo em NHP, o kit IFN γ / IL-2 FluoroSpot (FS-2122-10, Mabtech) foi usado seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, a membrana das placas de IPFL foram pré-molhadas com etanol a 35% e os

anticorpos de captura (anti-IFN γ e anti-IL-2) foram revestidos durante a noite a 4°C.

[0328] As placas foram então bloqueadas por 2 horas a 37°C com 200 μ L / poço de meio de incubação de células contendo soro fetal de vitela (FCS) a 10%. O meio foi removido e os estímulos adicionados nos poços: antígeno de F de comprimento total (estimulação específica do antígeno), anti-CD3 (controle positivo) ou meio de cultura de células (controle não estimulado). As células mononucleares do sangue periférico de macaco (PBMCs) foram descongeladas e numeradas. 400.000 células foram adicionadas por poço e incubadas por 24h a 37°C em uma incubadora umidificada com CO $_2$ a 5%.

[0329] Para a detecção, as células foram removidas e os anticorpos de detecção (anti-IFN γ e anti-IL-2 conjugados) foram adicionados e incubados 2h em temperatura ambiente. Os reagentes conjugados com fluoróforo foram então adicionados e incubados 1h em temperatura ambiente. As placas foram esvaziadas, secas e armazenadas no escuro em temperatura ambiente até a análise. O mAb anti-CD3 foi usado como controle positivo e respostas de > 500 de contagem de células formadoras de pontos (SFC) / milhão de PBMCs foram encontradas em todas as amostras, verificando a qualidade aceitável da amostra. Os pontos detectados nos poços não estimulados (meio de cultura de células) foram subtraídos para células estimuladas com antígeno de F.

[0330] Para a análise de células humanas (ou células B), os experimentos foram realizados de forma similar ao experimento de referência de Dauner, e outros Vaccine 2017 Out 4; 35 (41): 5487 a 5494 (Figura 20). As células não foram tratadas (tratadas com PBS) ou tratadas com polipeptídeos de F de VSR ou G de VSR conforme indicado em doses de 100 ng. As respostas de ligação a F e ligação a G foram realizadas usando o ensaio luminex descrito na literatura com microesferas revestidas com pré-trímero F (DS-CAV1) ou ectodomínio

de G, respectivamente.

[0331] RF8117 (SEQ ID NO: 17) compreende sítios de glicosilação manipulados em E328N, S348N e R507N, os quais, como mencionado acima, não evitam a ligação a D25 ou AM14. Para demonstrar que esta nanopartícula pré-fusão produz uma resposta imune similar a outros antígenos pré-fusão (DS-CAV1), foram imunizados camundongos em grupos de 5 ou com trímero pré-F (DS-CAV1), F pós-fusão ou RF8117 a 1 µg ou doses de 0,1 µg, todas com adjuvante AF03, três vezes com três semanas entre as injeções. O soro foi testado quanto à titulação de neutralização duas semanas após a terceira imunização usando o ensaio em células VERO. RF8117 na dose mais alta produziu uma titulação de neutralização similar ao controle pré-fusão e superior ao controle pós-fusão. Na dose mais baixa, RF8117 produziu uma titulação de neutralização mais alta do que o controle pré-fusão e o controle pós-fusão (Figura 10A).

[0332] O Pré-F-NP de VSR abriga sítios de glicosilação manipulados para bloquear os epítomos compartilhados entre a conformação pré-fusão e pós-fusão. Foi avaliado se esses glicanos estavam inibindo a resposta de neutralização. RF8117, com glicanos manipulados (SEQ ID NO: 17), foi comparado com RF8113 (similar a RF8117, mas sem os glicanos manipulados; SEQ ID NO: 16) e controle de trímero pré-fusão (DS-CAV1). Os camundongos em grupos de 5 foram imunizados com doses de 1 µg ou 0,1 µg, todas com adjuvante AF03, três vezes com três semanas entre as injeções. O soro foi testado quanto à titulação de neutralização duas semanas após a terceira imunização usando o ensaio em células VERO. Não houve diferença significativa em qualquer dose entre os construtos RF8113 e RF8117 conforme avaliado pela titulação de neutralização (Figura 10B).

[0333] Para demonstrar que os nocautes de lisina e arginina mencionados neste documento de RF8140 (SEQ ID NO: 23) não

perturbam a capacidade do antígeno de produzir uma resposta de neutralização, comparou-se a imunogenicidade de RF8140 (SEQ ID NO: 25) com a do trímero F pós-fusão (SEQ ID NO: 24) em camundongos (Figuras 11A e B). Em dose baixa (0,1 µg) RF8140 (SEQ ID NO: 25) produziu uma titulação de neutralização superior para o trímero pós-fusão (SEQ ID NO: 24). Para demonstrar que RF8140 (SEQ ID NO: 23) produz uma resposta imune em NHPs, imunizou-se NHPs com RF8140 (SEQ ID NO: 25) com adjuvante (AF03) ou sem adjuvante. A Figura 11C mostra a resposta de ligação a F de VSR (titulação de ELISA) enquanto a Figura 11D compara as titulações de neutralização de VSR produzidas por imunização com Pré-F-NP (RF8140, SEQ ID NO: 23). Tanto RF8140 sem adjuvante quanto RF8140 com adjuvante (SEQ ID NO: 25) produzem uma resposta imune em NHPs.

[0334] Tendo mostrado que os sítios de glicosilação manipulados de RF8117 (SEQ ID NO: 17) e RF8140 (SEQ ID NO: 23) não evitam que esses antígenos produzam uma resposta de neutralização, deseja-se demonstrar que eles não bloqueiam os epítomos de neutralização ou bloqueiam fracamente os epítomos compartilhados entre a conformação pré-fusão e pós-fusão (Figura 12). A resposta de anticorpo a F pré-fusão (DS-CAV1, SEQ ID NO: 25) produzido por imunização com Pré-F-NP sem glicosilação manipulada (RF8113, SEQ ID NO: 16) ou Pré-F-NP com glicosilação manipulada (Partícula Gly Manipulada, RF8117 SEQ ID NO: 17) em alta dose (1 µg) e baixa dose (0,1 µg) conforme medido por Octet (Figura 12A). As respostas produzidas por qualquer Pré-F-NP foram similares. A resposta de anticorpo ao trímero pós-fusão produzida por imunização com Pré-F-NP sem glicosilação manipulada (RF8113, SEQ ID NO: 16) ou Pré-F-NP com glicosilação manipulada (RF8117, SEQ ID NO: 17) em alta dose (1 µg) e baixa dose (0,1 µg) conforme medido por Octet (Figura 12B). As respostas de ligação a F pós-fusão produzidas por RF8117 (SEQ ID NO: 17) foram significativamente mais

baixas do que aquelas produzidas por RF8113 (SEQ ID NO: 16). Portanto, enquanto RF8113 e RF8117 produzem respostas robustas de anticorpos para F pré-fusão, a resposta de anticorpos de F pós-fusão produzida por RF8117 é muito reprimida. Isto ocorre devido ao mapeamento de glicanos manipulados para os epítomos pré-fusão e pós-fusão compartilhados (Figura 2B).

[0335] Para demonstrar ainda que os sítios de glicosilação manipulados bloqueiam os epítomos não neutralizantes, mas desviam a titulação de anticorpos neutralizantes para não neutralizantes, analisou-se os dados acima de uma maneira diferente (Figura 13). As titulações de neutralização de VSR medidas por ensaio em células VERO produzidas por imunização com Pré-F-NP com sítios de glicosilação de ocorrência natural (Partícula de glicano de ocorrência natural; RF8113, SEQ ID NO: 16) versus Pré-F-NP com sítios de glicosilação adicionais manipulados (Partícula de Glicano+; RF8117, SEQ ID NO: 17) em estudos em camundongo foram comparadas e não mostraram nenhuma diferença significativa (Figura 13A). A comparação de respostas de anticorpos de ligação ao trímero F de VSR pós-fusão produzidas por imunização com partícula de glicano de ocorrência natural (RF8113, SEQ ID NO: 16) versus Partícula de glicano+ (RF8117, SEQ ID NO: 17) em estudos em camundongos mostrou uma resposta de ligação a F pós-fusão reprimida para o Pré-F-NP com glicanos manipulados (Figura 13B). Para demonstrar que os glicanos manipulados não reduzem a resposta de anticorpos neutralizantes funcionais, mas reduzem a resposta dos anticorpos não neutralizantes produzidas para os epítomos pré-fusão / pós-fusão compartilhados, melhorando assim a relação de anticorpos neutralizantes para anticorpos totais produzida pelos construtos de glicano manipulados, a razão de titulação de neutralização para resposta de ligação a F foi traçada (Figura 13C). Portanto, os Pré-F-NPs com os glicanos manipulados produzem um perfil de

neutralização superior para ligação de anticorpos em estudos em camundongo.

[0336] Para demonstrar que a nanopartícula de ferritina pode ser usada para melhorar a imunogenicidade do antígeno de domínio central G de VSR, foi desenvolvido um método para conjugar quimicamente o peptídeo Gcc (SEQ ID NO: 29) com a nanopartícula de ferritina. A ferritina abrigando a mutação S111C aqui descrita pode ser conjugada com o peptídeo Gcc (SEQ ID NO: 29) sintetizado com um grupo maleimida em um ligante PEG4 ligado ao N-terminal através de um grupo NHS. O peptídeo Gcc com uma maleimida N-terminal foi sintetizado e purificado por HPLC por Peptides International (Louisville, KY, EUA). Quando o antígeno maleimida-Gcc é adicionado à partícula de ferritina S111C, a maleimida se conjuga com a cisteína livre e forma um Gcc-NP que pode ser observado pelo gel SDS-PAGE corado com Coomassie (Figura 14A). Embora a conjugação seja tipicamente 50% a 90% eficiente, um modelo de uma nanopartícula de ferritina – peptídeo Gcc (100% conjugados) é mostrado na Figura 14B.

[0337] Para determinar se o Gcc-NP produz uma resposta imune superior ao peptídeo Gcc (SEQ ID NO: 29), 5 camundongos por grupo foram imunizados com o peptídeo Gcc ou Gcc-NP (1,3 µg de dose mista 1:1 com RIBI para cada imunização). A resposta de ligação a Gcc (Octet) duas semanas após a segunda imunização e duas semanas após a terceira imunização foi comparada com um grupo representativo de soros de camundongos virgens de tratamento (Figura 14C). A resposta de neutralização produzida pela imunização com o peptídeo Gcc (SEQ ID NO. 29) versus Gcc-NP em estudos em camundongos após a terceira injeção também foi comparada em ensaios de neutralização de HAE (Figura 14D). Gcc-NP produz uma resposta imune superior ao peptídeo Gcc isoladamente, conforme avaliado tanto pela resposta de ligação a Gcc quanto pela resposta de neutralização.

[0338] Para demonstrar que a coadministração de VSR Pré-F-NP (RF8140) e Gcc-NP não interfere com a capacidade do antígeno de produzir uma resposta imune, os camundongos foram imunizados com Pré-F-NP isoladamente (RF8140, SEQ ID NO: 23), Gcc-NP (ferritina conjugada com peptídeo Gcc SEQ ID NO: 29), ou Pré-F-NP (RF8140, SEQ ID NO: 23) combinado com Gcc-NP (Figura 15A a C). Todas as imunizações foram adjuvantadas com AF03. Os camundongos imunizados com RF8140 isoladamente (Pré-F-NP) ou RF8140 e Gcc-NP (Pré-F-NP + Gcc-NP) desenvolveram anticorpos que se ligam ao trímero F pré-fusão (DS-CAV1, SEQ ID: 25), enquanto os camundongos imunizados com Gcc-NP não se ligam ao mesmo. Os camundongos imunizados com Gcc-NP isoladamente (Gcc-NP) ou RF8140 e Gcc-NP desenvolveram anticorpos que se ligam ao peptídeo Gcc, enquanto os camundongos imunizados apenas com RF8140 não se ligam ao mesmo. Os animais imunizados com Pré-F-NP isoladamente, Gcc-NP isoladamente ou a coadministração de Pré-F-NP e Gcc-NP desenvolveram uma resposta de neutralização pós-segunda e pós-terceira imunização, conforme medido pelo ensaio de neutralização de HAE.

[0339] Para determinar se a coadministração de Pré-F-NP de VSR e Gcc-NP interferiu com a capacidade do antígeno de produzir anticorpos neutralizantes, os anticorpos neutralizantes para F e G foram estudados em um ensaio de depleção (Figuras 16A a B). Para demonstrar que a adição de Gcc-NP não interfere com a capacidade de Pré-F-NP de produzir uma resposta de neutralização, as titulações de neutralização foram medidas pelo ensaio de células VERO sensíveis a F para os grupos mencionados acima (Figura 16A). Os soros de animais virgens de tratamento também foram testados para avaliar a qualidade da depleção do antígeno. No ensaio VERO, os soros de camundongos imunizados com RF8140 (SEQ ID NO: 23) isoladamente ou RF8140 misturado com Gcc-NP produziram respostas de neutralização

similares, enquanto Gcc-NP não pareceu produzir resposta de neutralização no ensaio em células VERO sensível ao anticorpo F. Quando os anticorpos que se ligam ao trímico pré-fusão (DS-CAV1, SEQ ID: 25) foram depletados dos soros reunidos a partir de animais imunizados com RF8140 (SEQ ID NO: 23) isoladamente ou imunizados com RF8140 (SEQ ID: 23) e Gcc-NP, uma redução nas titulações de neutralização mensurável foi observada no ensaio em células VERO. Quando os grupos acima foram medidos quanto à titulação de neutralização no ensaio de células HAE, todos os grupos de imunização foram observados quanto a se desenvolveram uma resposta de neutralização no ensaio de sensibilidade a F e G (Figura 16B). Os soros agrupados a partir de animais imunizados com RF8140 (SEQ ID NO: 23) isoladamente produziram uma resposta de neutralização no ensaio HAE que poderia ser depletada com o trímico F pré-fusão (DS-CAV1, SEQ ID NO: 25). Os soros agrupados a partir de animais imunizados com Gcc-NP isoladamente desencadearam uma resposta de neutralização no ensaio HAE que poderia ser depletada com o ectodomínio de G (SEQ ID NO: 28). Os soros agrupados a partir de animais imunizados com Pré-F-NP (RF8140, SEQ ID NO: 23) e Gcc-NP produziram uma resposta de neutralização no ensaio HAE que não foi totalmente depletada por DS-CAV1 (SEQ ID NO: 25), mas foi totalmente depletada por depleções subsequentes com DS-CAV1 e ectodomínio de G (SEQ ID NO: 28). Juntos, esses dados sugerem que a coadministração com o Pré-F-NP e Gcc-NP não interfere com a capacidade do antígeno de produzir anticorpos neutralizantes para F ou G pré-fusão, respectivamente.

[0340] Para demonstrar o efeito de adjuvantar RF8117 (SEQ ID NO: 17) ou RF8140 (SEQ ID NO: 23), os camundongos foram doseados com esses construtos misturados com AF03, SPA09 ou Alume. Na Figura 17A, os camundongos foram imunizados com 10 µg de antígeno

misturado com adjuvante, enquanto na Figura 17B, os camundongos foram imunizados com 1 µg de antígeno misturado com adjuvante. Na Figura 17A, as titulações de neutralização foram medidas pelo ensaio em células VERO no ponto no tempo de duas semanas após a terceira imunização. São mostrados os soros de camundongos imunizados com RF8117 (SEQ ID NO: 17) sem adjuvante (Sem Adj), adjuvantado com Alume, ou adjuvantado com AF03. Na Figura 17B, as titulações de neutralização foram medidas por ensaio em células VERO para soros de camundongos imunizados com RF8117 (SEQ ID NO: 17) com adjuvante AF03, RF8117 (SEQ ID NO: 17) com adjuvante SPA09, ou RF8140 com adjuvante AF03. Em todos os casos, para RF8117 (SEQ ID NO: 17) ou RF8140 (SEQ ID NO: 23), em camundongos virgens de tratamento, os grupos com adjuvante produzem uma titulação de neutralização mais alta do que os grupos sem adjuvante. Os camundongos imunizados com RF8117 (SEQ ID NO: 17) ou RF8140 (SEQ ID NO: 23) misturado com AF03 produziram uma resposta de neutralização similar, sugerindo que as mutações de lisina e arginina adicionadas de RF8140 (SEQ ID NO: 23) não interferem com a capacidade de pré-F-NP de produzir uma resposta de neutralização.

[0341] Para explorar ainda mais o efeito adjuvante de AF03 e SPA09, primatas não humanos (NHPs) foram imunizados com RF8140 sem adjuvante, com adjuvante AF03, ou com duas doses de SPA09 (Figura 18A). Os NHPs foram imunizados com 50 µg de antígeno misturado com o adjuvante indicado nos dias 0 e 29 e a resposta imune foi medida por ELISA ou resposta de neutralização em células VERO nos pontos no tempo indicados. As respostas de ELISA do trímico F pré-fusão foram medidas em soros de NHP após imunização com RF8140 sem adjuvante (Sem Adj), com adjuvante AF03, ou com adjuvante SPA09 (foram utilizadas doses de 500 µg e 2000 µg de SPA09). Em todos os pontos no tempo, o adjuvante AF03 ou SPA09

produz uma resposta de neutralização superior. As titulações de neutralização de soros para os grupos NHP acima também foram medidas por ensaio em células VERO (Figura 18B). Em todos os casos, a imunização com RF8140 com adjuvante produziu uma titulação de neutralização mais alta do que os grupos sem adjuvante em todos os pontos no tempo.

[0342] O efeito da conjugação direta de RF8140 (SEQ ID NO: 23) ao agonista de TLR7/8 SM7/8 ou agonista de TLR9 CpG foi testado. O antígeno foi conjugado com as moléculas pequenas SM7/8 ou CpG e os camundongos foram doseados com uma dose de 10 µg. RF8140 contém uma mutação em sua sequência de ferritina substituindo um aminoácido exposto na superfície por uma cisteína (K79C), que pode ser usada para conjugação por reação química de clique. Para comparação, os camundongos foram doseados com RF8140 sem adjuvante (Sem Adj), ou com adjuvante misturando com a molécula pequena em uma alta dose ou baixa dose (não conjugada), como indicado na Figura 19. O soro de animais pós-segunda e pós-terceira imunização foi testado quanto à ligação ao trímero F pré-fusão.

[0343] Na Figura 19A, a resposta de ligação ao trímero F de pré-fusão foi medida em soros de camundongos virgens de tratamento, camundongos imunizados com RF8140 sem adjuvante (SEQ ID NO: 23), camundongos imunizados com RF8140 (SEQ ID NO: 23) conjugado com Adjuvante SM7/8, RF8140 (SEQ ID NO: 23) adjuvantado com 130 ng de SM7/8, ou RF8140 (SEQ ID NO: 23) adjuvantado com 20 µg de SM7/8. RF8140 (SEQ ID NO: 23) conjugado com SM7/8 produz uma titulação de ligação ao trímero F pré-fusão mais alta do que os grupos sem adjuvante ou adjuvantados com SM7/8.

[0344] Na Figura 19B, a resposta de ligação ao trímero F pré-fusão também foi medida em soros de camundongos virgens de tratamento, camundongos imunizados com RF8140 sem adjuvante (SEQ ID NO:

23), camundongos imunizados com RF8140 (SEQ ID NO: 23) conjugado com adjuvante CpG, RF8140 (SEQ ID NO: 23) adjuvantado com 680 ng de CpG, ou RF8140 (SEQ ID NO: 23) adjuvantado com 20 µg de CpG. RF8140 (SEQ ID NO: 23) conjugado com SM7/8 produz uma titulação de ligação ao tríplice F pré-fusão mais alta do que os grupos sem adjuvante ou adjuvantados com SM7/8.

[0345] Para demonstrar a capacidade do antígeno Pré-F-NP e do antígeno Gcc-NP de produzir uma resposta em células humanas, os experimentos foram realizados com a plataforma MIMIC (Figuras 20A a D). A plataforma MIMIC é composta unicamente por células imunes humanas autólogas capazes de gerar respostas inatas e adaptativas específicas de antígeno de forma rápida e reproduzível mediante provocação. Documentos anteriores demonstraram a capacidade do sistema MIMIC de recapitular perfis imunes *in vivo* contra alvos diversos como HBV, toxoide do tétano, anticorpos monoclonais, YF-VAX, e respostas de células B à influenza. As respostas de anticorpo de ligação ao tríplice F de VSR pré-fusão produzidas por tratamento com RF8140 Pré-F-NP (SEQ ID NO: 23) versus tríplice F pós-fusão (SEQ ID NO: 24) foram comparadas em células B humanas, e uma resposta de linha de base representativa é mostrada para comparação (sem tratamento) (Figura 20A). As razões de respostas medidas de ligação ao tríplice F pré-fusão (DS-CAV1, SEQ ID NO: 25) versus tríplice F pós-fusão (SEQ ID NO: 24) produzidas por tratamento com Pré-F-NP (RF8140, SEQ ID NO: 23) versus F Pós-fusão (SEQ ID NO: 24) em células B humanas são mostradas na Figura 20C. Os anticorpos a partir de MIMIC produzidos por tratamento com diferentes antígenos de F foram medidos usando o ensaio em células VERO (Figura 20B). As titulações de neutralização produzidas por tratamento com Pré-F NP (RF8140, SEQ ID NO: 23) versus tríplice F pós-fusão (SEQ ID NO: 24) em células B humanas foram comparadas a um grupo sem tratamento mostrando

que RF8140 (SEQ ID NO: 23) produziu uma resposta de neutralização superior em células humanas.

[0346] A magnitude da resposta de Ab à infecção por VSR ou aos candidatos à vacina de subunidade F foi determinada com base no soroestado dos sujeitos humanos investigados em estudos MIMIC, que foi avaliado por análise de regressão linear. Os doadores com titulações circulantes pré-existentes mais elevadas de IgG anti-pré-F produziram significativamente mais IgG anti-pré-F após o tratamento com VSR (Figura 20E, $p = 0,0041$) e após a sensibilização pós-F (Figura 20F, $p = 0,0019$). Embora a correlação não tenha alcançado significância estatística, pré-F também mostrou uma relação entre o nível de Ab induzido e o nível de Ab pré-existente. É digno notar que, ao contrário de outros tratamentos, o pré-F-NP produziu um nível comparativamente alto de IgG anti-pré-F de doadores com baixo nível de anti-pré-F IgG pré-existente a partir de doadores com alto Ab pré-existente (Figura 20F). Isso indica que o pré-F-NP é capaz de resgatar (ou aumentar) a resposta de Ab, mesmo a partir de doadores com baixo nível de IgG pré-existente de forma eficaz.

[0347] Para demonstrar que Gcc-NP produz uma resposta de anticorpo G superior a do peptídeo Gcc (SEQ ID NO: 29) isoladamente, as células humanas foram tratadas com o peptídeo Gcc isoladamente (SEQ ID NO: 29) ou peptídeo Gcc conjugado com nanopartículas (Gcc-NP) em células B humanas. Gcc-NP desencadeou uma resposta de anticorpo de ligação a G superior (Figura 20G). Combinados, esses dados sugerem que o Pré-F-NP e o Gcc-NP desencadearão respostas imunes na imunização humana.

4. Caracterização *In vivo* da Resposta Imune à Nanopartículas de Ferritina - Gcc de VSR

[0348] Gcc-NP de VSR foi preparado conforme descrito acima. Para avaliar a resposta *in vivo* ao Gcc-NP de VSR em camundongos,

camundongos BALBc fêmeas foram imunizados por via intramuscular com antígenos de VSR em doses especificadas nas semanas 0, 3 e 6 com uma alta dose (5 µg) ou baixa dose (0,5 µg) de antígeno. A menos que indicado ao contrário, Gcc-NP de VSR foi adjuvantado com AF03 com uma estratégia de mistura à beira do leito. Ou seja, 50 µl da solução de proteína foram misturados com 50 µl de adjuvante AF03 de Sanofi (uma emulsão à base de esqualeno; ver Klucker e outros, J Pharm Sci. 2012 dez; 101 (12): 4490-500) imediatamente antes de injeção de 50 µl em cada perna traseira. Nenhum efeito adverso da imunização foi observado. O sangue foi coletado 1 dia antes da primeira imunização e pelo menos 2 semanas após cada injeção (ou seja, semanas 2, 5 e 8). A menos que especificado de outra forma, os dados mostrados foram para 2 semanas após a terceira injeção (semana 8, também denotado como 2wp3). Tipicamente, os soros foram analisados a partir de animais pré-imunizados (denotados como virgens de tratamento), duas semanas após a segunda injeção (pós-2ª ou 2wp2) ou duas semanas após a terceira injeção (pós-3ª ou 2wp3).

[0349] Para o ensaio de neutralização de HAE, o soro foi inativado por calor por 30 minutos a 56°C. Uma série de quatro diluições em série do soro inativado foi feita em Meio Basal PneumaCult™-ALI (Stem Cell Technologies; 05002) suplementado com Suplemento PneumaCult™-ALI 10X (Stem Cell Technologies; 05003) e Antibiótico / Antimicótico a 1% (portanto, meio). Os estoques virais de VSR foram combinados 1:1 com as diluições de soro e incubados por 1,5 horas a 37°C. A mistura de vírus - soro foi então adicionada a placas de 24 poços contendo células HAE totalmente diferenciadas a 50 µL por poço e incubadas durante 1 hora a 37°C, CO₂ a 5%. Após a incubação, o inóculo foi removido, os poços foram lavados duas vezes com meio para remover o vírus não ligado e incubados por mais 20 horas a 37°C, CO₂ a 5%. Os eventos de infecção em culturas infectadas com VSR expressando o

repórter mKate (TagFP635) foram contados em um microscópio de fluorescência.

[0350] Para detectar a infecção com VSR que não expressa o repórter mKate (neutralização da cepa B de VSR), os epitélios pseudoestratificados foram lavados extensivamente com meio para remover o muco e, em seguida, fixados com paraformaldeído a 4% por 30 minutos em temperatura ambiente, permeabilizados com Triton X-100 a 0,25% por 30 minutos e bloqueados com DMEM suplementado com FBS a 2% por 1 hora a 37°C. A solução de bloqueio foi substituída por 100 µL por poço de mistura de Ab monoclonal anti-VSR de camundongo (Millipore; MAB 858-4) diluída 1:200 em DMEM suplementado com FBS a 2%, e as placas foram incubadas a 37°C por 2 horas. As placas foram então lavadas 3 vezes com PBS suplementado com Tween 20 a 0,05%. 100 µL de IgG anti-camundongo de cabra (H + L) (Invitrogen; A11001) diluídos 1:200 em DMEM suplementado com FBS a 2% foram adicionados por poço, e as placas foram incubadas durante a noite a 4°C. Na manhã seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS suplementado com Tween 20 a 0,05%, o sinal fluorescente foi estabilizado com ProLong Gold AntiFade com DAPI (Thermo Fisher Scientific; P36935) e contado em um microscópio de fluorescência. As titulações de anticorpos neutralizantes foram determinadas no desfecho de redução de 60%.

[0351] Para demonstrar que a maior multivalência melhora a produção da resposta de neutralização por antígenos G de VSR, os camundongos foram imunizados com antígenos F de VSR. Todas as imunizações foram adjuvantadas com AF03. Os camundongos foram imunizados com Gcc-NP de VSR formulado com AF03 e as titulações de neutralização foram medidas 2 semanas após a segunda injeção e 2 semanas após a terceira injeção (Figuras 21A a C). Gcc-NP de VSR produziu uma resposta de neutralização em relação a soros de

camundongos virgens de tratamento. Em ambas as 2 semanas após a segunda injeção (Figura 21A) e 2 semanas após a terceira injeção (Figura 21B), os camundongos imunizados com Gcc-NP, contendo Gcc da cepa A2, apresentaram respostas de neutralização para a cepa A de VSR. Às 2 semanas após a terceira injeção, Gcc-NP também produziu uma resposta de neutralização para a cepa B1 de VSR (Figura 21C).

[0352] Para a ligação anti-Gcc, um dímero trimerizado do peptídeo Gcc com uma etiqueta HIS C-terminal foi usado em uma ponta Octet. Um hexâmero Gcc marcado com His6 (cepa A2) ou hexâmero Gcc marcado com His6 (cepa B1) foi pré-carregado nas pontas do sensor Anti-Penta-HIS (HIS1K) (FortéBio # 18-5122) por 400 segundos para permitir que a captura alcance quase a saturação. As pontas do biossensor foram então equilibradas por 90 segundos em Tampão de lavagem Octet, seguido por associação de soros diluídos por 300 segundos. As respostas finais da curva de associação foram medidas usando o software Octet Data Analysis HT10.0 e a resposta foi multiplicada pelo fator de diluição (100 ou 300) para obter a resposta final relatada.

[0353] Para determinar se o Gcc-NP de VSR produz uma resposta imune de ligação a Gcc, os soros das imunizações descritas acima foram testados quanto à sua capacidade de se ligar ao hexâmero Gcc A2 ou hexâmero Gcc B1. As respostas de ligação a Gcc em alta dose (Figura 22A e Figura 23A) e baixa dose (Figura 22B e Figura 23B) foram testadas 2 semanas após a segunda imunização e 2 semanas após a terceira imunização. Para a cepa A2 (Figuras 22A a B) e a cepa B1 (Figuras 23A a B), Gcc-NP de VSR produziu uma resposta de ligação em relação aos soros de camundongos virgens de tratamento.

5. Resposta a Pré-F-NP e Gcc-NP em Células Humanas

[0354] Para demonstrar a capacidade de Pré-F-NP e Gcc-NP de

produzir uma resposta em células humanas, os experimentos são realizados com a plataforma MIMIC. A plataforma MIMIC é composta unicamente por células imunes humanas autólogas capazes de gerar respostas inatas e adaptativas específicas de antígeno de forma rápida e reproduzível mediante provocação. Documentos anteriores demonstraram a capacidade do sistema MIMIC de recapitular perfis imunes *in vivo* contra alvos diversos como HBV, toxoide do tétano, anticorpos monoclonais, YF-VAX, e respostas de células B à influenza. As respostas de anticorpos de ligação ao trímero F de VSR pré-fusão produzidas por tratamento com Pré-F-NP RF8140 (SEQ ID NO: 23) versus trímero F pós-fusão (SEQ ID NO: 24) são comparadas em células B humanas, e são comparadas com uma resposta de linha de base representativa. As razões de respostas de ligação medidas ao trímero F pré-fusão (DS-CAV1, SEQ ID NO: 25) versus trímero F pós-fusão (SEQ ID NO: 24) produzidas por tratamento com Pré-F-NP (RF8140, SEQ ID NO: 23) versus F pós-fusão (SEQ ID NO: 24) em células B humanas. Os anticorpos de MIMIC produzidos por tratamento com diferentes antígenos de F são medidos usando o ensaio em células VERO. As titulações de neutralização produzidas por tratamento com Pré-F-NP (RF8140, SEQ ID NO: 23) versus trímero F pós-fusão (SEQ ID NO: 24) em células B humanas são comparadas com um grupo sem tratamento, mostrando que RF8140 (SEQ ID NO: 23) produz uma resposta de neutralização superior em células humanas. Para demonstrar que Gcc-NP produz uma resposta de anticorpo de ligação a G superior a do peptídeo Gcc (SEQ ID NO: 29) isoladamente, as células humanas são tratadas com o peptídeo Gcc isoladamente (SEQ ID NO: 29) ou peptídeo Gcc conjugado com nanopartículas (Gcc-NP) em células B humanas. Gcc-NP produz uma resposta de anticorpo de ligação a G superior. Assim, Pré-F-NP e Gcc-NP produzirão respostas imunes na imunização humana.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo antigênico de VSR compreendendo um polipeptídeo de F de VSR, caracterizado pelo fato de que um epítopo do polipeptídeo de VSR que é compartilhado entre F de VSR pré-fusão e F de VSR pós-fusão é bloqueado.

2. Polipeptídeo antigênico de VSR compreendendo um polipeptídeo de F de VSR, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de F de VSR compreende os resíduos de aminoácidos 62 a 69 e 196 a 209 da SEQ ID NO: 26 e uma asparagina correspondendo à posição 328, 348 ou 507 da SEQ ID NO: 26.

3. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que um epítopo do polipeptídeo de VSR que é compartilhado entre F de VSR pré-fusão e F de VSR pós-fusão é bloqueado.

4. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende um F de VSR pré-fusão.

5. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que é reconhecido por um anticorpo específico de F de VSR pré-fusão selecionado a partir de D25 ou AM14.

6. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que o F de VSR pré-fusão compreende um epítopo não encontrado em F de VSR pós-fusão

7. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que compreende um F de VSR pós-fusão.

8. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 3 a 6, caracterizado pelo fato de que o epítopo é bloqueado com um N-glicano ligado à asparagina.

9. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a asparagina corresponde a um resíduo não asparagina em uma sequência de F de VSR de ocorrência natural (SEQ ID NO: 26), opcionalmente em que o resíduo não asparagina corresponde à posição 328, 348, ou 507 da SEQ ID NO: 26.

10. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma proteína ferritina.

11. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a ferritina compreende uma mutação que substitui um aminoácido exposto na superfície por uma cisteína.

12. Polipeptídeo antigênico de VSR compreendendo um polipeptídeo de F de VSR e uma proteína ferritina, caracterizado pelo fato de que a proteína ferritina compreende uma mutação que substitui um aminoácido exposto na superfície por uma cisteína.

13. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com a reivindicação 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que a ferritina compreende uma ou mais mutações de E12C, S26C, S72C, A75C, K79C, S100C e S111C de ferritina de *H. pylori* ou uma ou mais mutações correspondentes em uma ferritina não *H. pylori* determinadas por alinhamento de pares ou estrutural.

14. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 13, caracterizado pelo fato de que compreende uma ou mais porções imunoestimulatórias ligadas à ferritina por meio de um aminoácido exposto na superfície, opcionalmente em que o aminoácido exposto na superfície é uma cisteína resultante de uma mutação.

15. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 10 a 14, caracterizado pelo fato de que a ferritina compreende uma mutação que substitui uma asparagina exposta na superfície por um aminoácido não asparagina, opcionalmente em que a asparagina está na posição 19 da ferritina de *H. pylori*, ou uma posição análoga em uma ferritina não *H. pylori*, conforme determinado por alinhamento de pares ou estrutural.

16. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 15, caracterizado pelo fato de que a ferritina compreende uma mutação que substitui uma cisteína interna por um aminoácido não cisteína, opcionalmente em que a cisteína interna está na posição 31 da ferritina de *H. pylori*, ou um posição que corresponde à posição 31 da ferritina de *H. pylori* conforme determinado por alinhamento de pares ou estrutural.

17. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 16, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de F de VSR compreende um epítipo não encontrado em F de VSR pós-fusão que é um epítipo do sítio 0, opcionalmente em que o epítipo do sítio 0 compreende os resíduos de aminoácidos 62 a 69 e 196 a 209 da SEQ ID NO: 26.

18. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de F de VSR compreende uma asparagina em uma posição correspondente à posição 328 da SEQ ID NO: 26.

19. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de F de VSR compreende uma asparagina em uma posição correspondente à posição 348 da SEQ ID NO: 26.

20. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de F de VSR compreende uma asparagina em uma

posição correspondente à posição 507 de SEQ ID NO: 26.

21. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de F de VSR compreende uma leucina em uma posição correspondente à posição 498 da lisina de SEQ ID NO: 26.

22. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de F de VSR compreende uma prolina em uma posição correspondente à posição 217 da isoleucina de SEQ ID NO: 26.

23. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de F de VSR compreende um aminoácido diferente de cisteína em uma posição correspondente à posição 155 de SEQ ID NO: 26 e / ou um aminoácido que não cisteína na posição correspondendo à posição 290 da SEQ ID NO: 26.

24. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende uma serina em uma posição correspondente à posição 155 da SEQ ID NO: 26 e / ou uma serina em uma posição correspondente à posição 290 da SEQ ID NO: 26.

25. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de F de VSR carece de um sítio de clivagem pela furina, opcionalmente em que um ligante está presente no lugar do sítio de clivagem pela furina.

26. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de F de VSR compreende uma sequência tendo pelo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 99,5% de identidade com aminoácidos 1 a 478 da SEQ ID NO: 17.

27. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de F de VSR compreende uma sequência tendo pelo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 99,5% de identidade com a sequência da SEQ ID NO: 17.

28. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com a reivindicação 26 ou 27, caracterizado pelo fato de que compreende os aminoácidos 1 a 478 da SEQ ID NO: 17.

29. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de F de VSR compreende uma sequência tendo pelo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 99,5% de identidade com os aminoácidos 1 a 478 da SEQ ID NO: 23.

30. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19 ou 29, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de F de VSR compreende uma sequência tendo pelo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 99,5% de identidade com a sequência de SEQ ID NO: 23.

31. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com a reivindicação 29 ou 30, caracterizado pelo fato de que compreende os aminoácidos 1 a 478 da SEQ ID NO: 23.

32. Polipeptídeo antigênico de VSR, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende a sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 3-23.

33. Partícula de ferritina, caracterizada pelo fato de que compreende o polipeptídeo antigênico de VSR como definido em qualquer uma das reivindicações 10 a 32.

34. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende o polipeptídeo antigênico de VSR ou partícula de ferritina como definida em com qualquer uma das reivindicações precedentes, e um

polipeptídeo de G de VSR.

35. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende o polipeptídeo antigênico de VSR ou partícula de ferritina como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 33, ou composição como definida na reivindicação 34, compreendendo ainda um carreador farmacologicamente aceitável.

36. Polipeptídeo antigênico de VSR, partícula de ferritina ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35, caracterizados pelo fato de que são para uso em um método para produzir uma resposta imune a VSR ou para proteger um sujeito contra infecção por VSR.

37. Método para produzir uma resposta imune ao VSR ou proteger um sujeito contra a infecção por VSR, caracterizado pelo fato de que compreende administrar qualquer um ou mais do polipeptídeo antigênico de VSR, partícula de ferritina, ou composição como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 36 a um sujeito.

38. Polipeptídeo antigênico de VSR, partícula de ferritina, composição ou método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 37, caracterizados pelo fato de que o sujeito é um ser humano.

39. Ácido nucleico que codifica o polipeptídeo antigênico de VSR, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 32, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico é um mRNA.

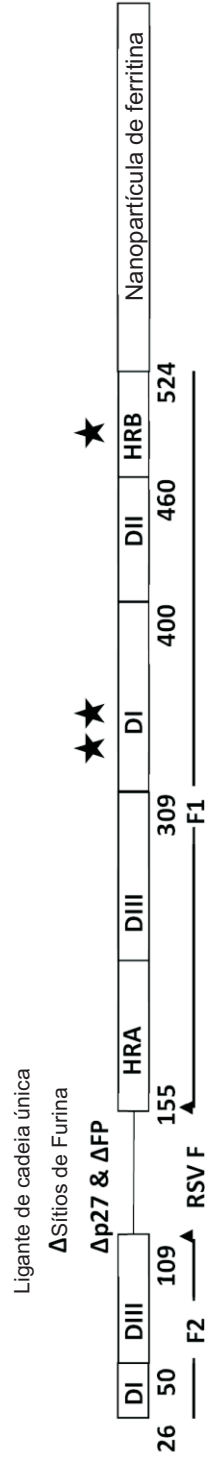


FIG. 1A

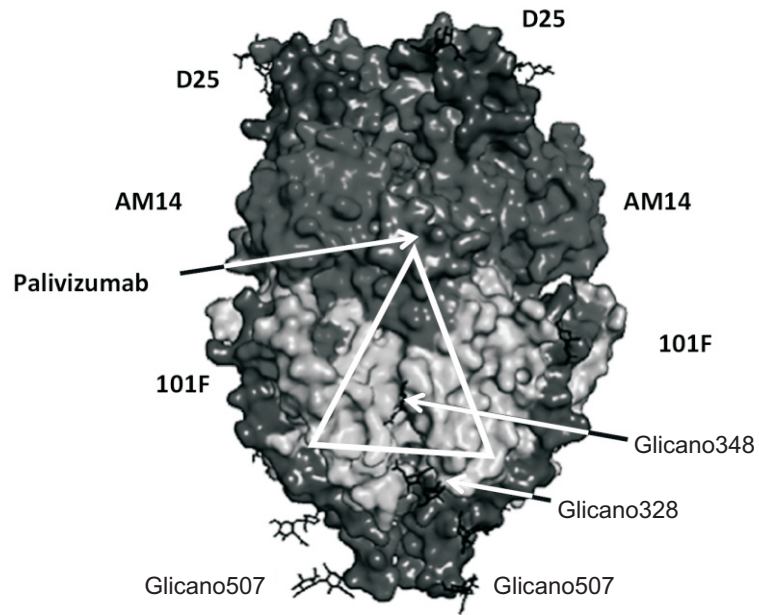


FIG. 1B



FIG. 1C

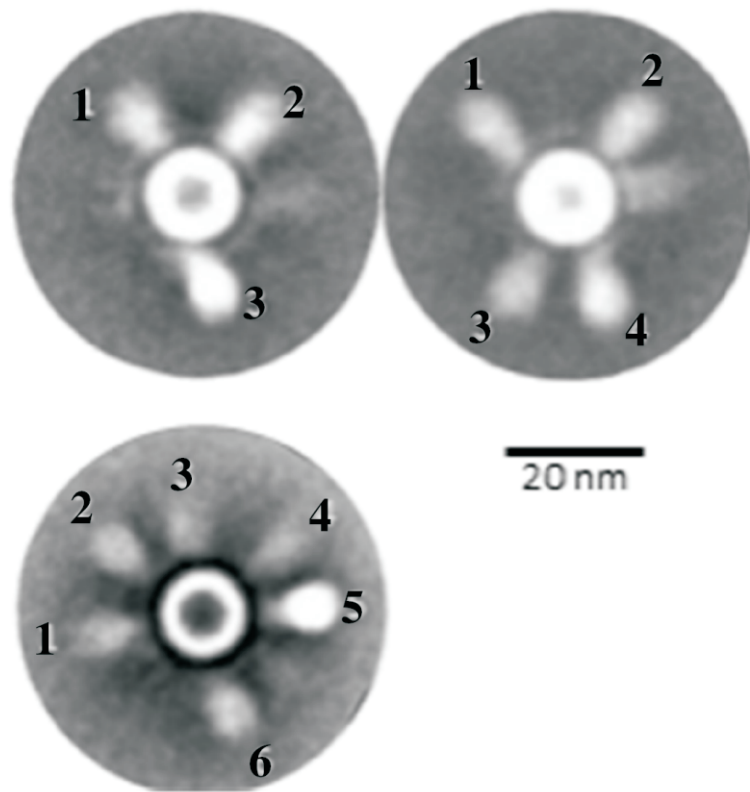
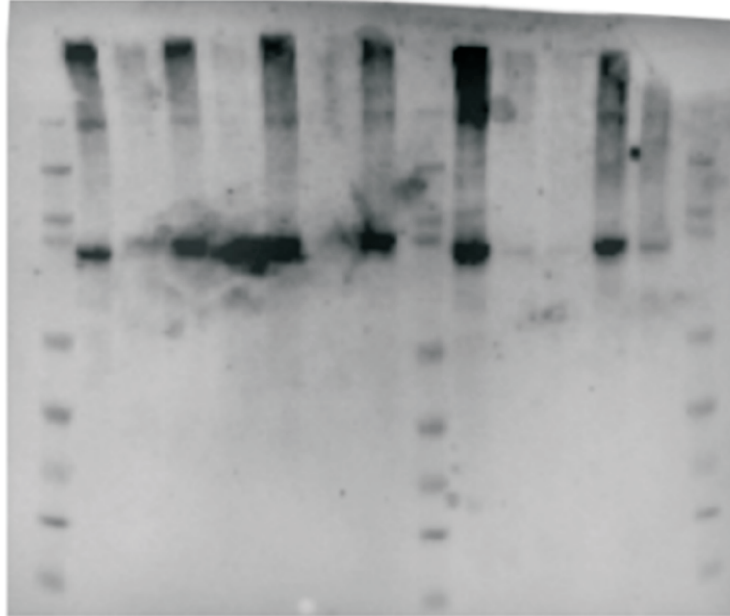


FIG. 1D

Faixa 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Faixa #	Nível de expressão no meio
1. Escada	
2. RF8090: NIH DS-CAV1 scF-bf-pFerr	Sim (Referencial)
3. RF8100: Adição de glicano T324N	Fraco, expressão reduzida
4. RF8101: Adição de glicano E328N	Sim, expressão aumentada
5. RF8102: Adição de glicano K390T	Fraco, expressão reduzida
6. RF8103: Adição de glicano S348N	Sim, expressão aumentada
7. RF8104: Adição de glicano Y478S	Não, expressão reduzida
8. RF8105: Adição de glicano R507N	Sim, expressão aumentada
9. Escada	
10. RF8108: Adição de prolina I217P	Sim, expressão aumentada
11. RF8109: Preenchimento de cavidade Q224L	Fraco, expressão reduzida
12. RF8110: Preenchimento de cavidade Q224L e Q225L	Fraco, expressão reduzida
13. RF8111: Preenchimento de cavidade N228L	Sim, igual ou expressão aumentada
14. RF8112: Preenchimento de cavidade N228L	Fraco, expressão reduzida
15. Escada	

FIG. 2

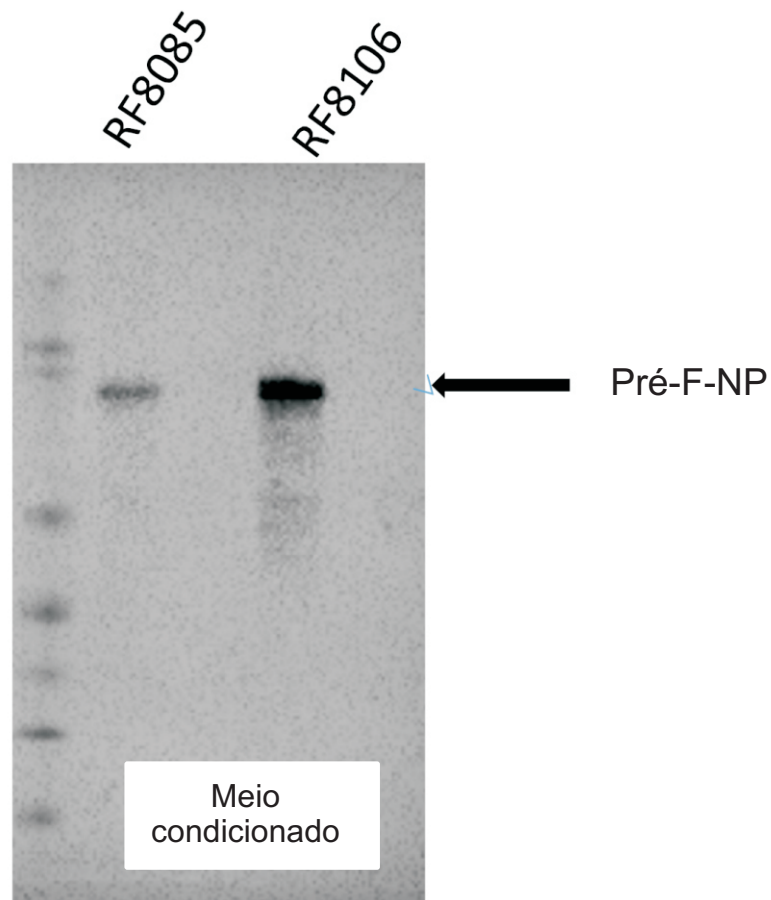


FIG. 3

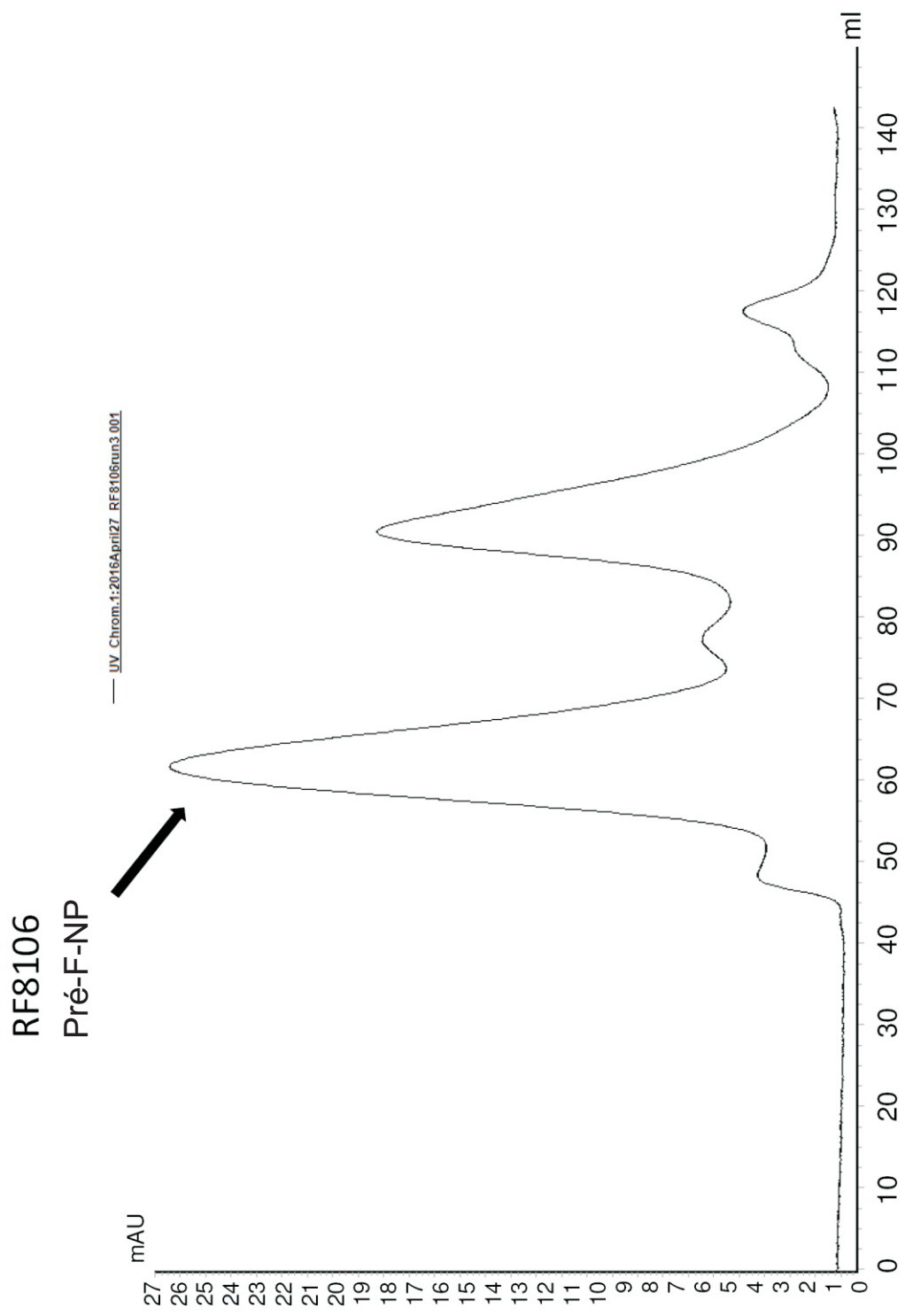


FIG. 4

7/33

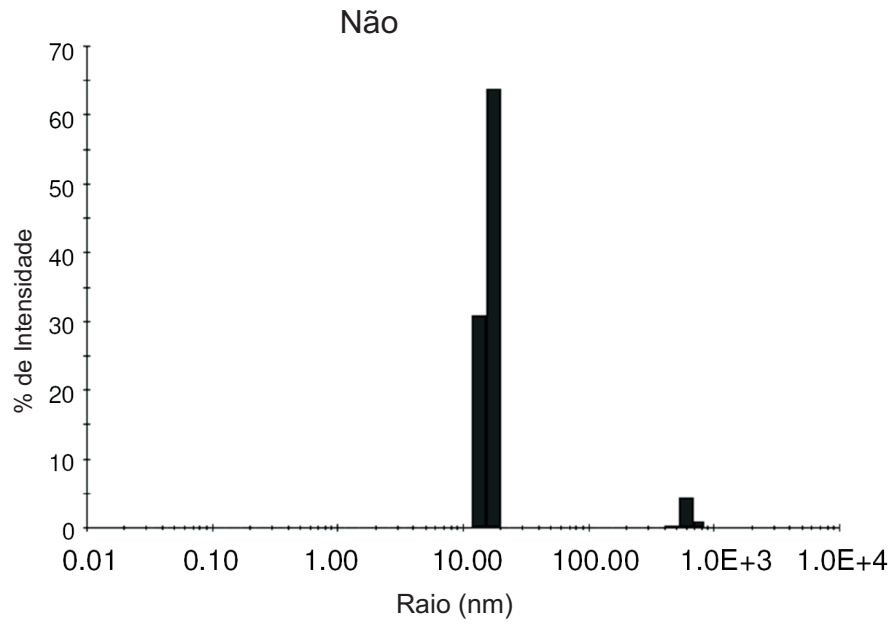


FIG. 5A

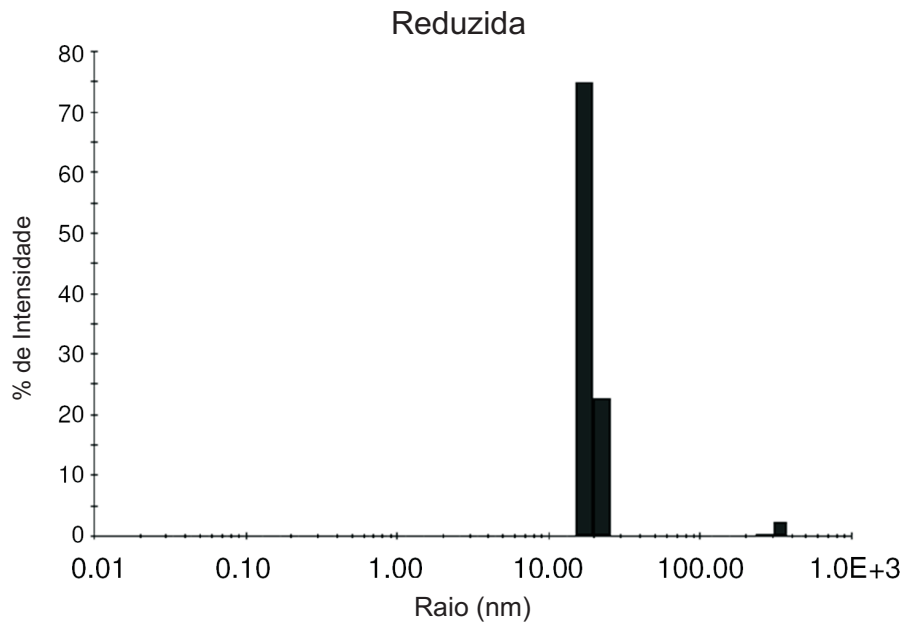


FIG. 5B

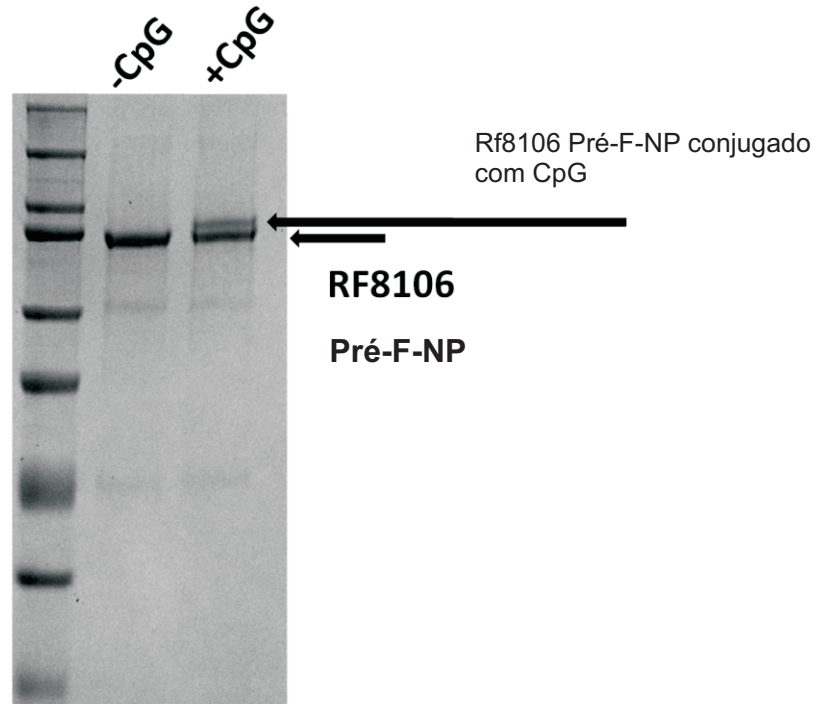


FIG. 6

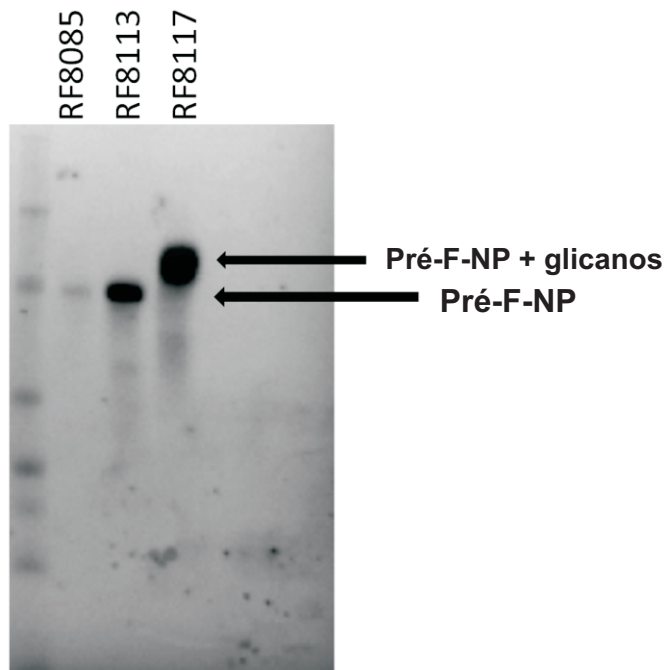


FIG. 7

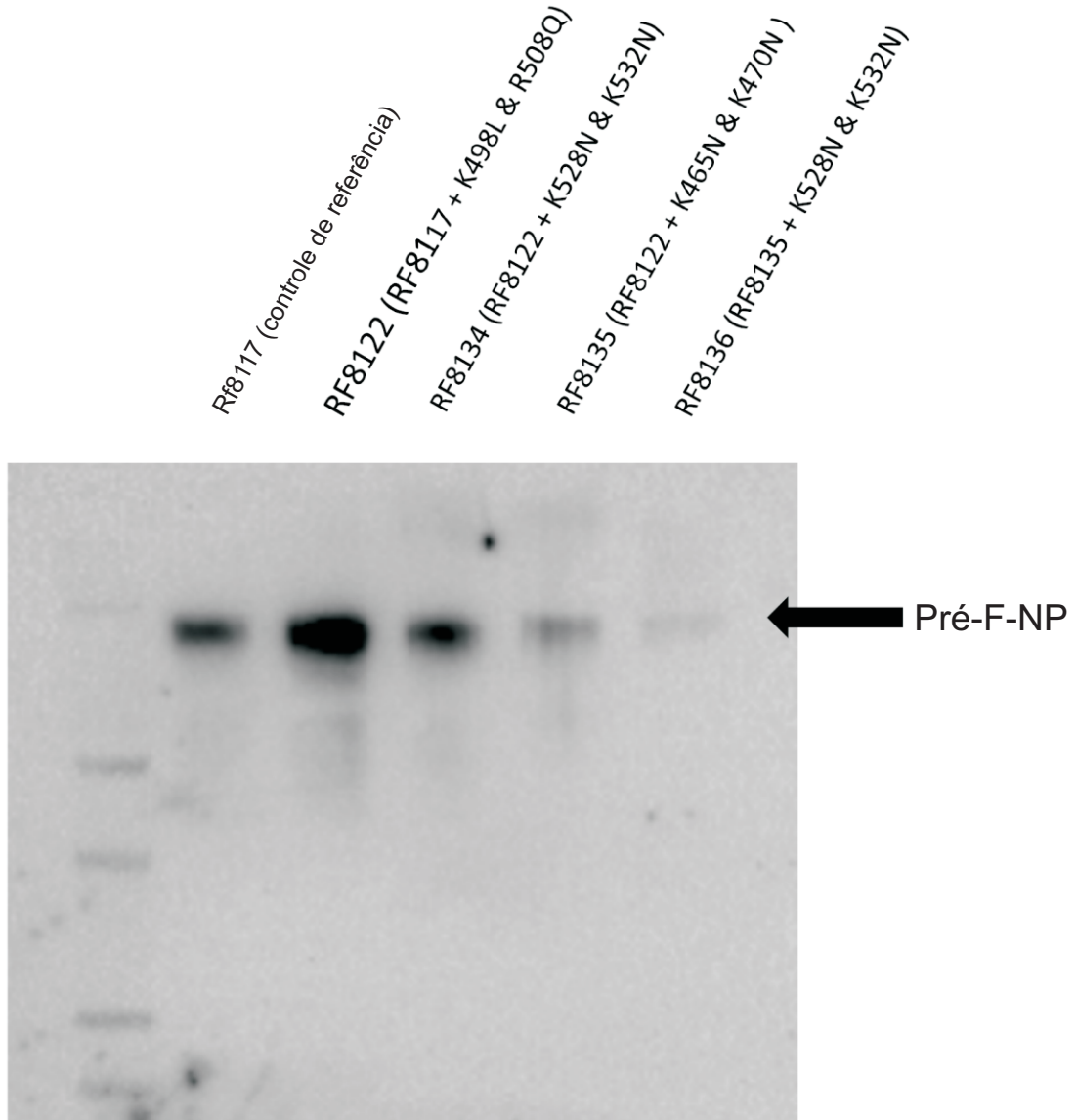


FIG. 8

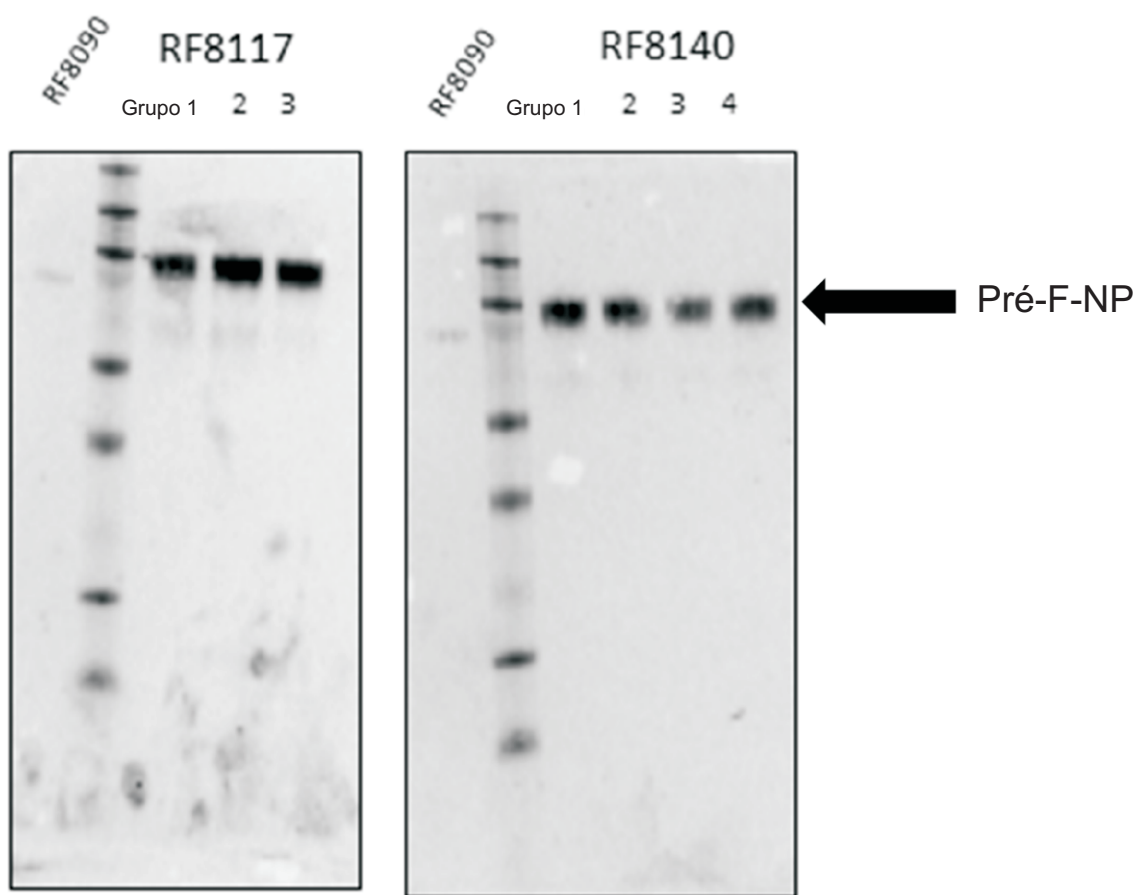
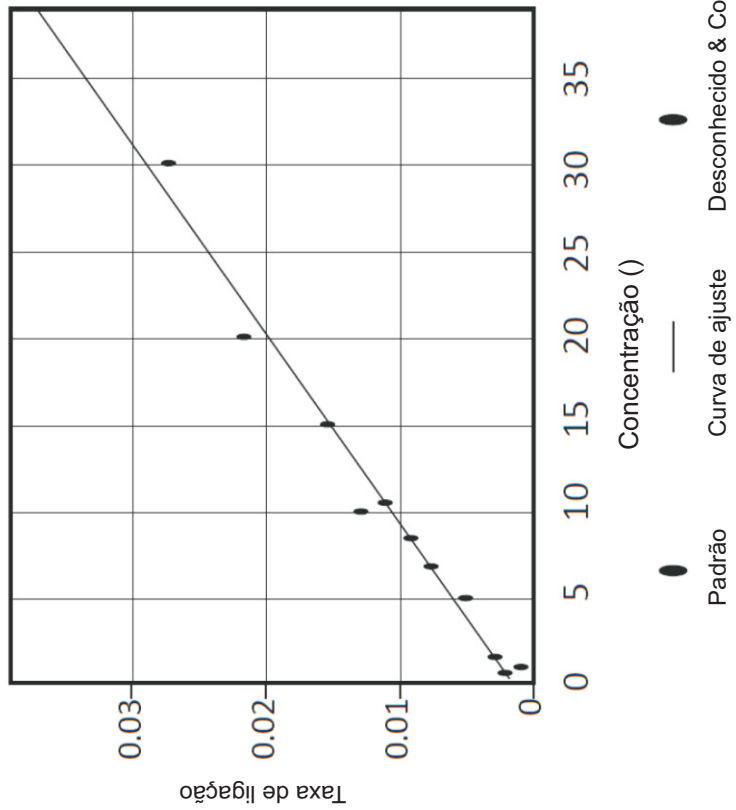


FIG. 9A



ID de amostra	Concentração por poço	Fator de diluição	Conc. Calc. (Mg. litro)
1:3 RF8117 Dia 5	0.7413	3	2,22
1:3 RF8117 Dia 7	1.63	3	4,9
1:3 RF8117 Dia 11	10.4	3	31,3
1:3 RF8140 Dia 5	6.73	3	20,2
1:3 RF8140 Dia 7	8.46	3	25,4
1:3 RF8140 Dia 11	6.85	3	20,6

FIG. 9B

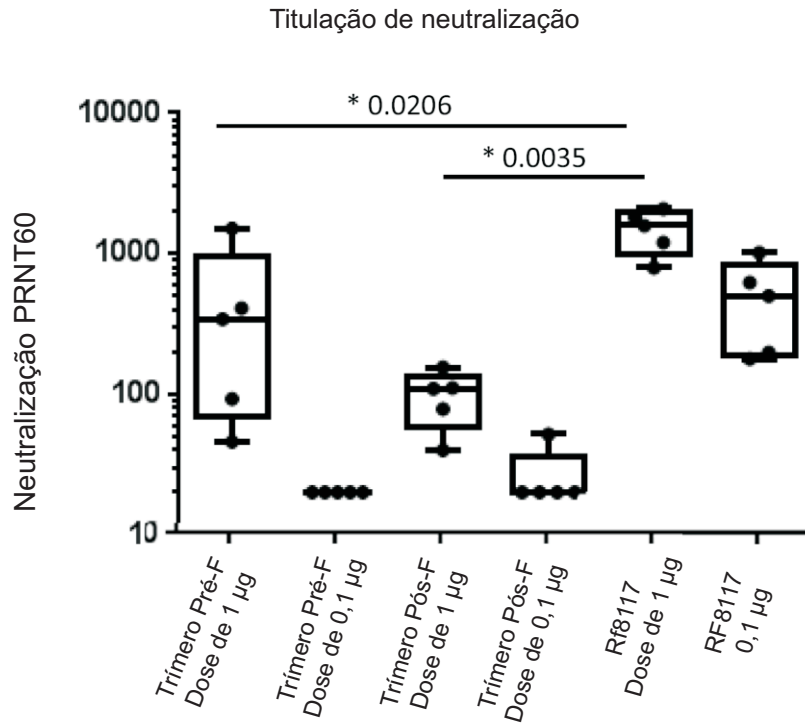


FIG. 10A

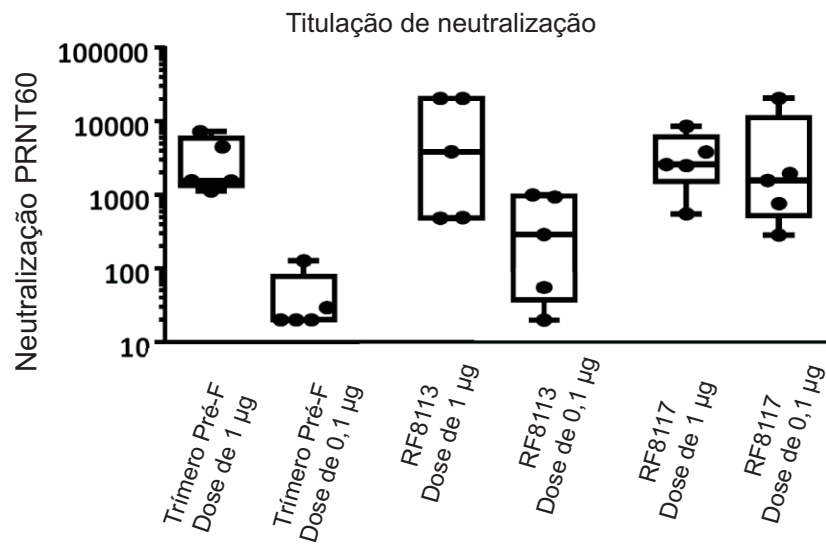


FIG. 10B

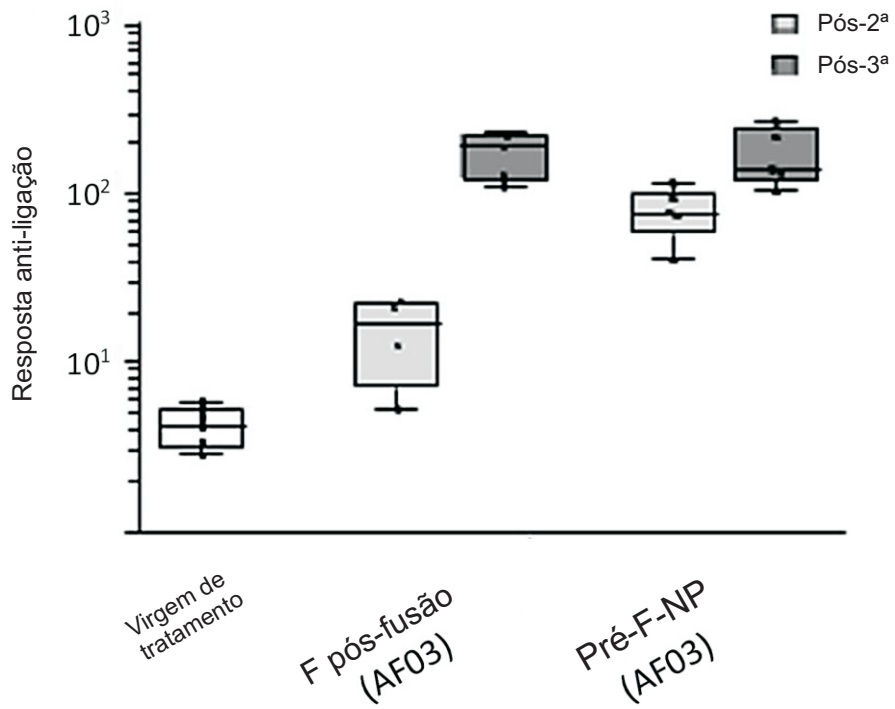


FIG. 11A

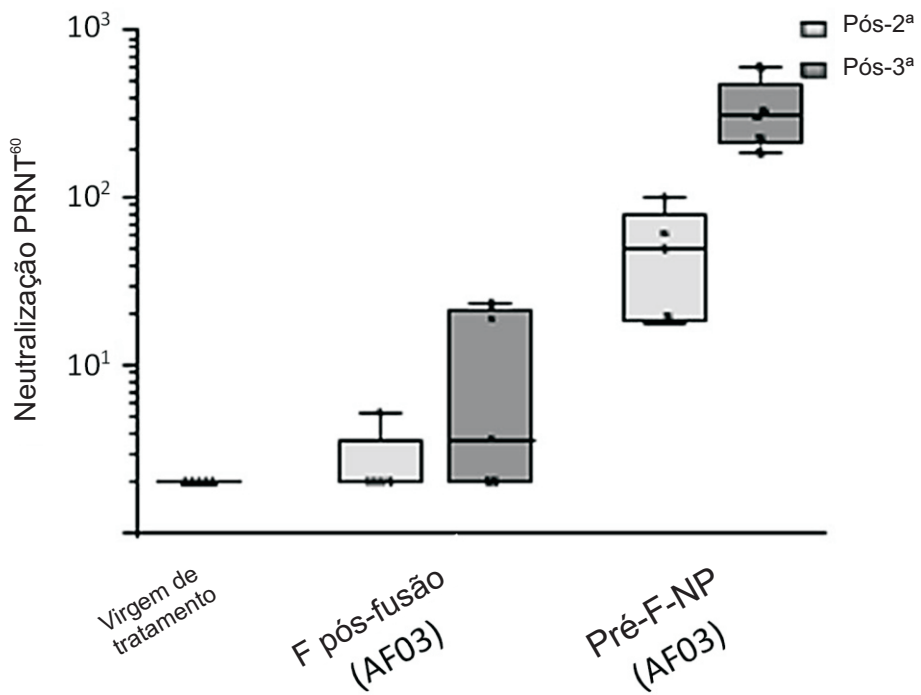


FIG. 11B

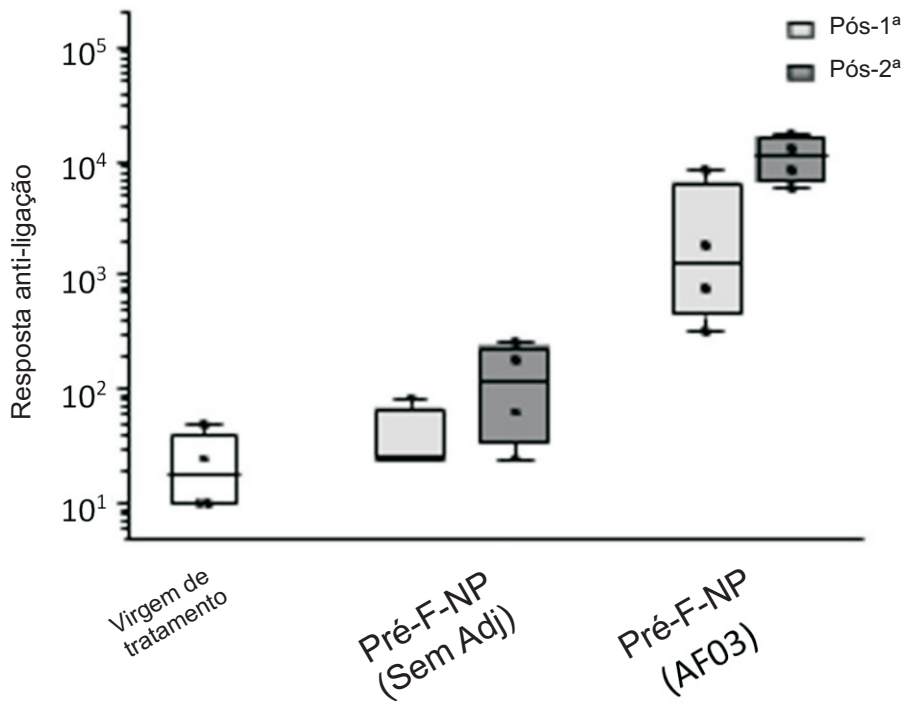


FIG. 11C

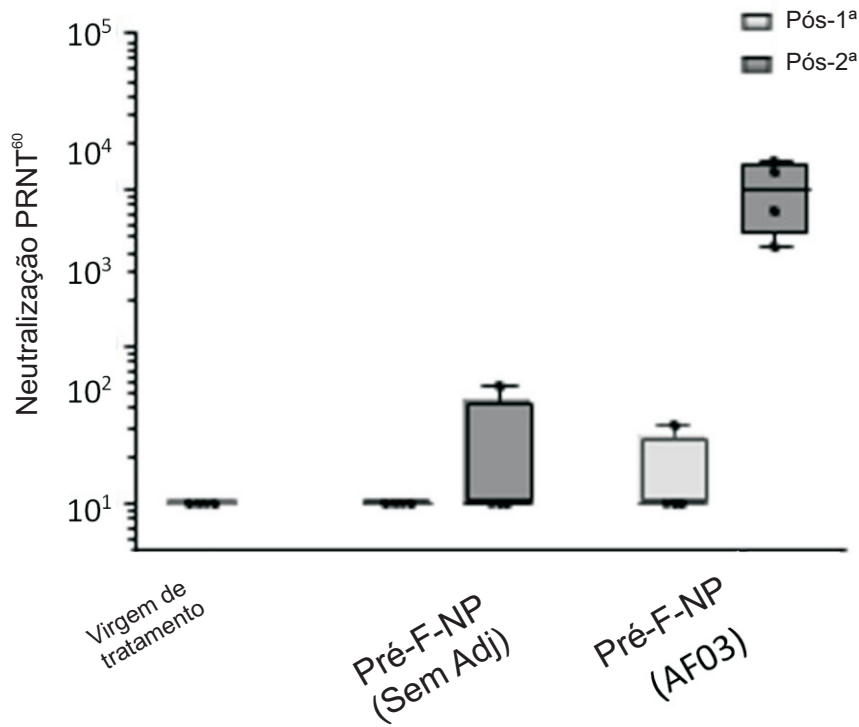


FIG. 11D

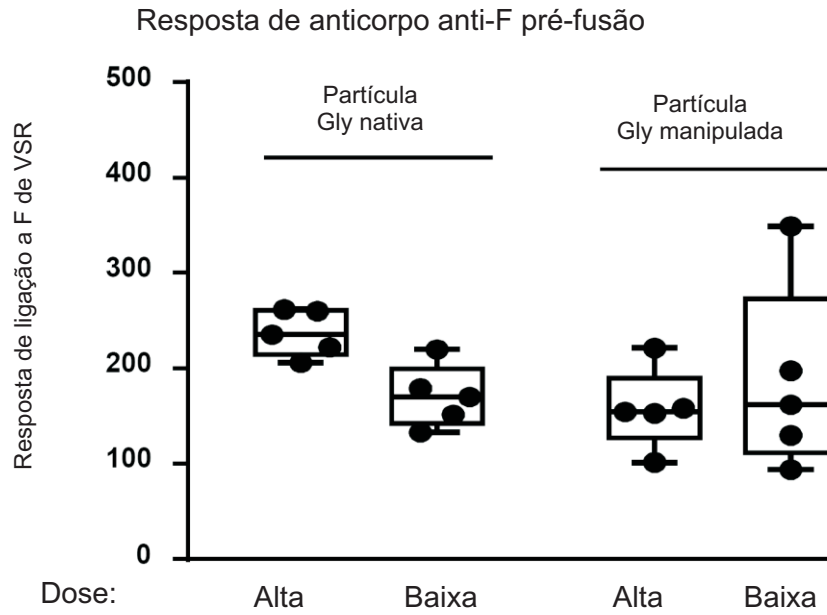


FIG. 12A

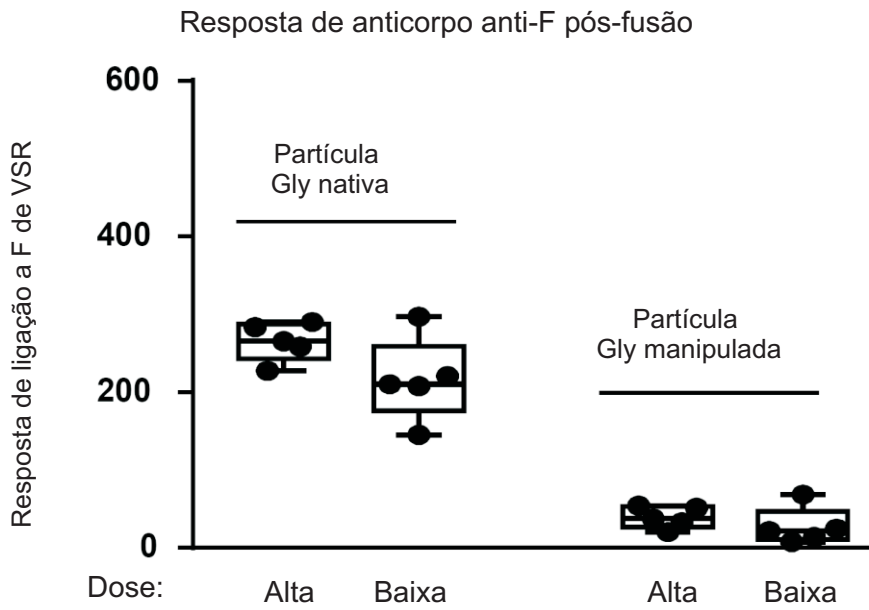


FIG. 12B

16/33

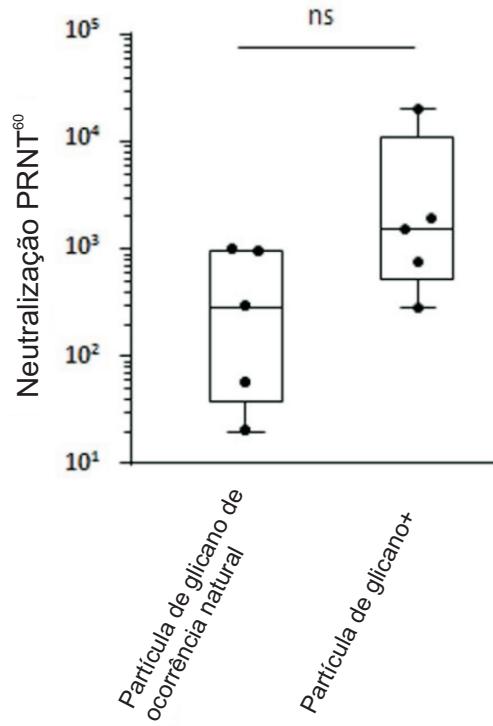


FIG. 13A

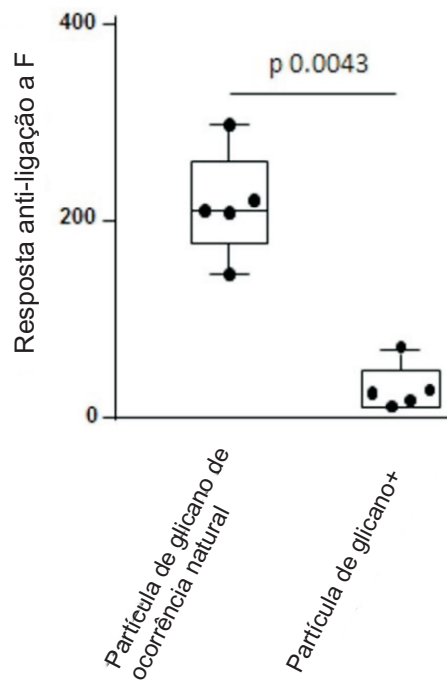


FIG. 13B

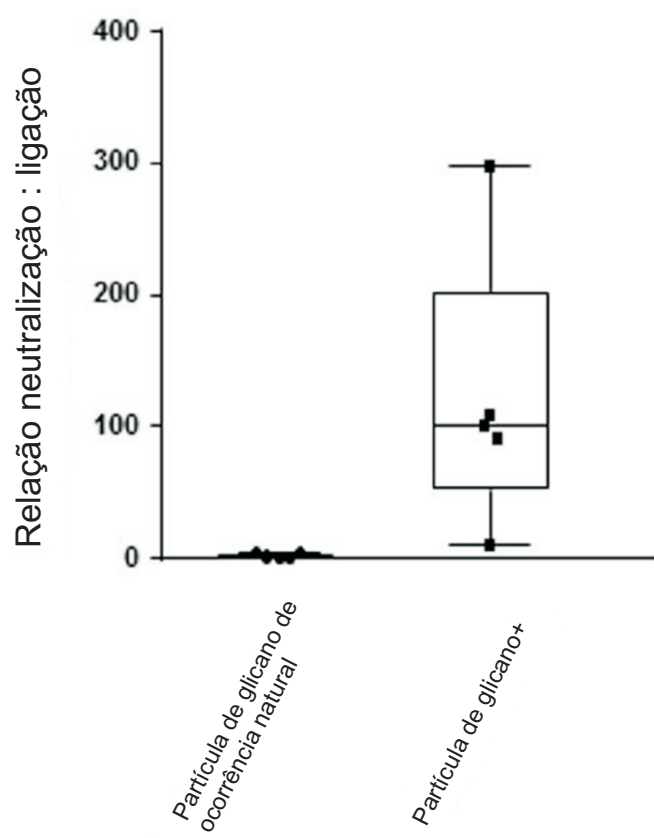


FIG. 13C

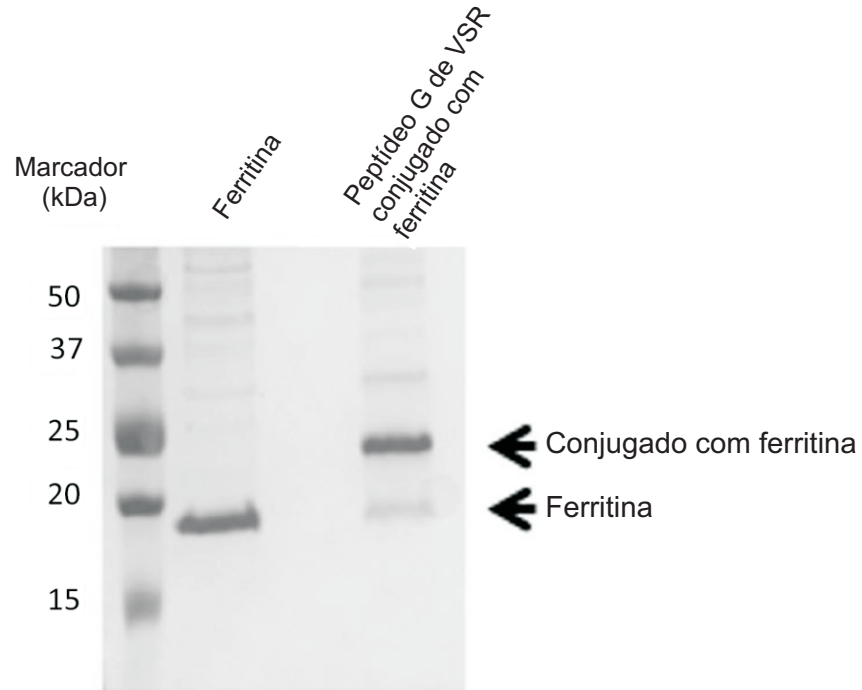
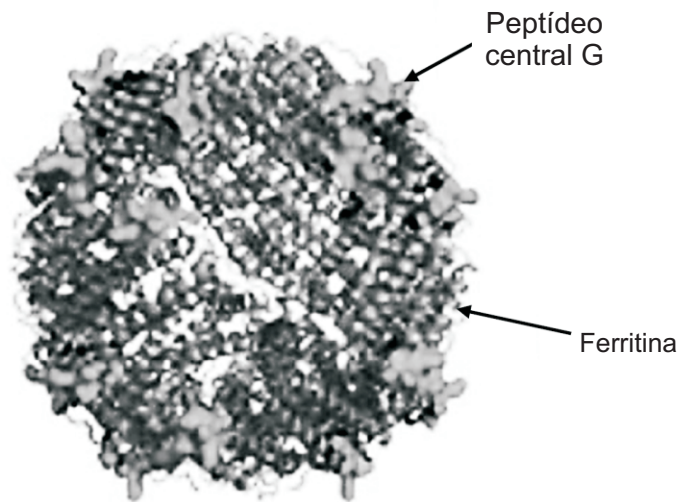


FIG. 14A



Modelo estrutural de Peptídeo de G de VSR conjugado à ferritina

FIG. 14B

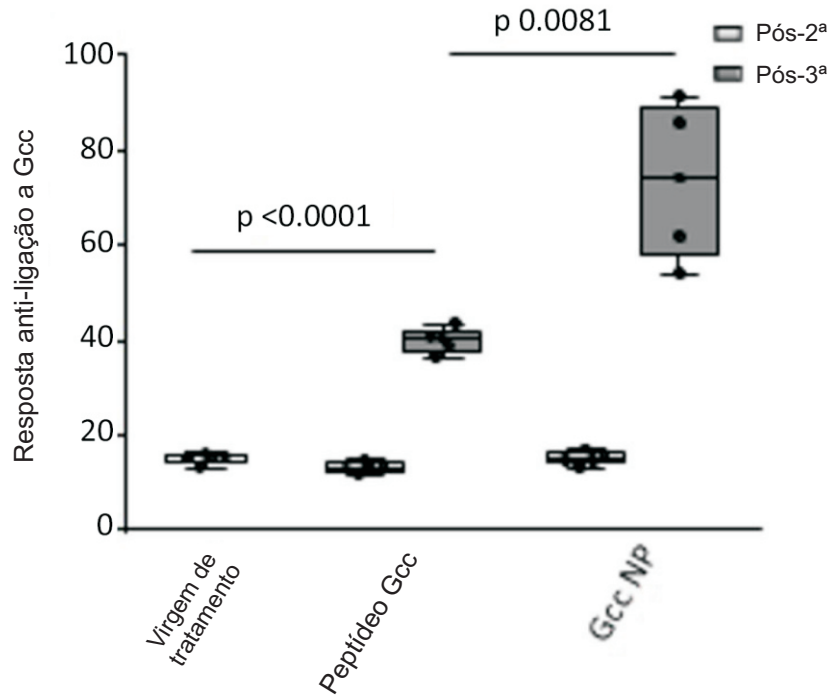


FIG. 14C

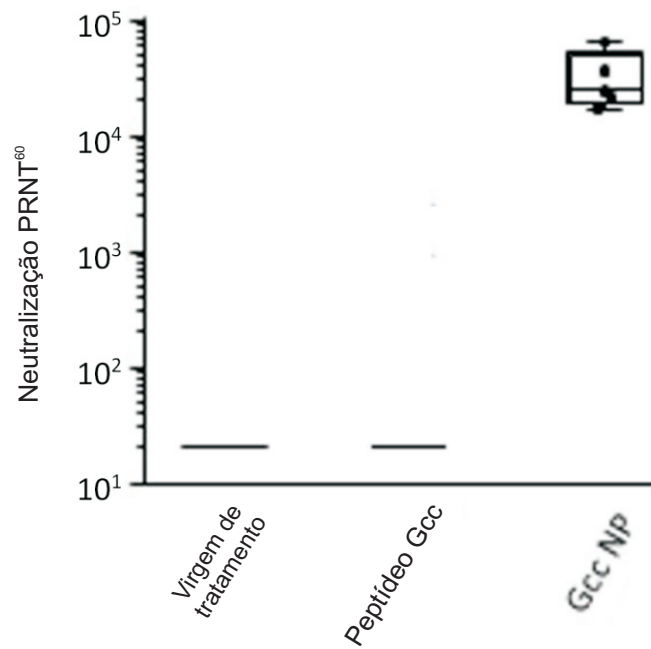


FIG. 14D

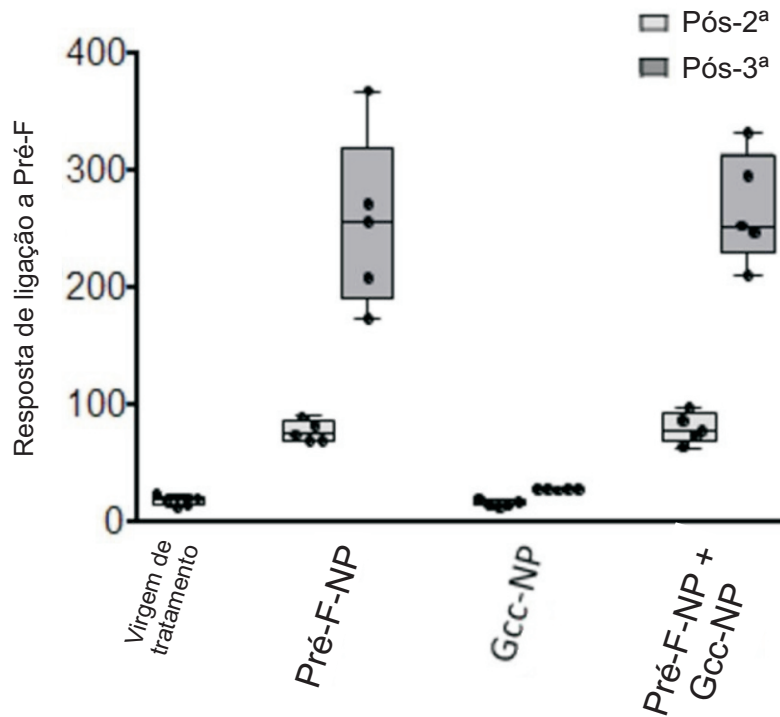


FIG. 15A

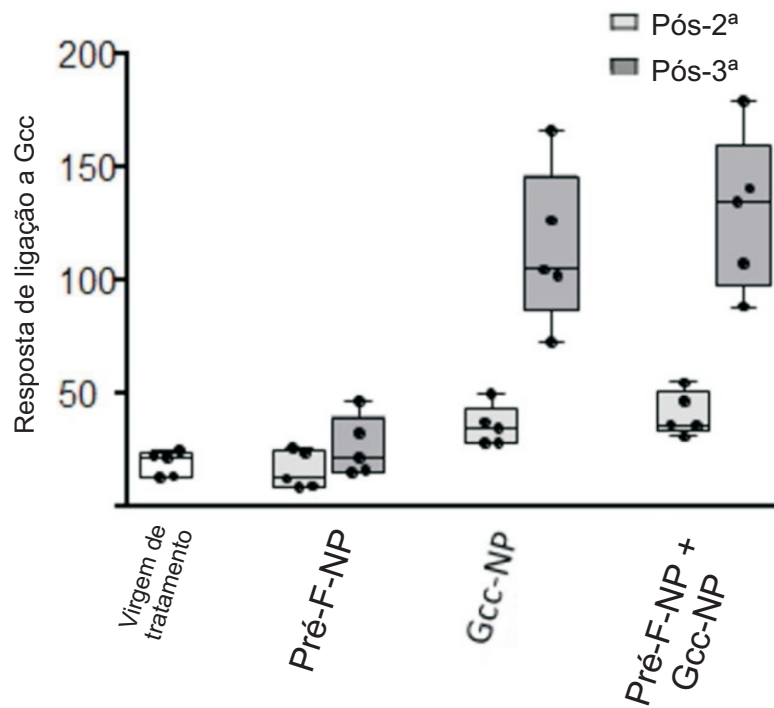


FIG. 15B

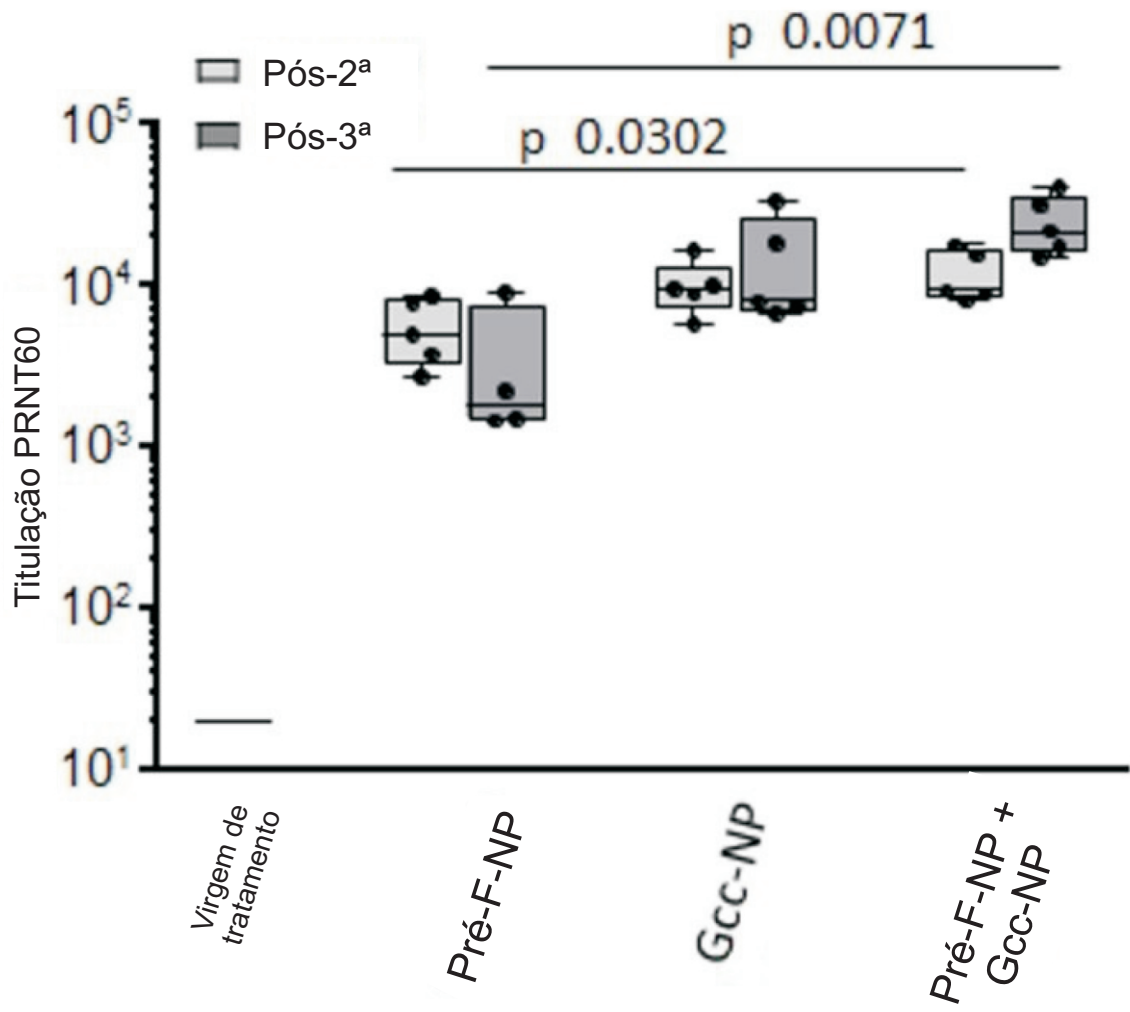


FIG. 15C

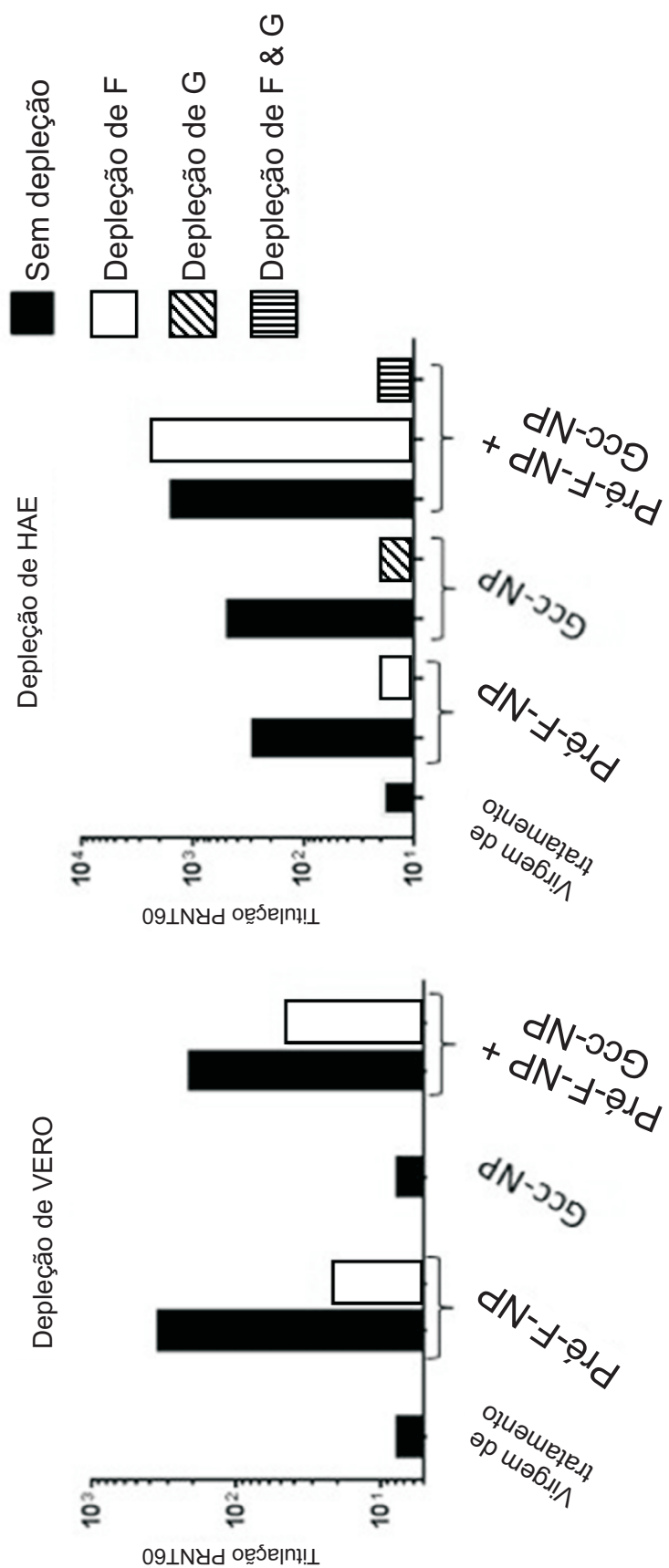


FIG. 16A

FIG. 16B

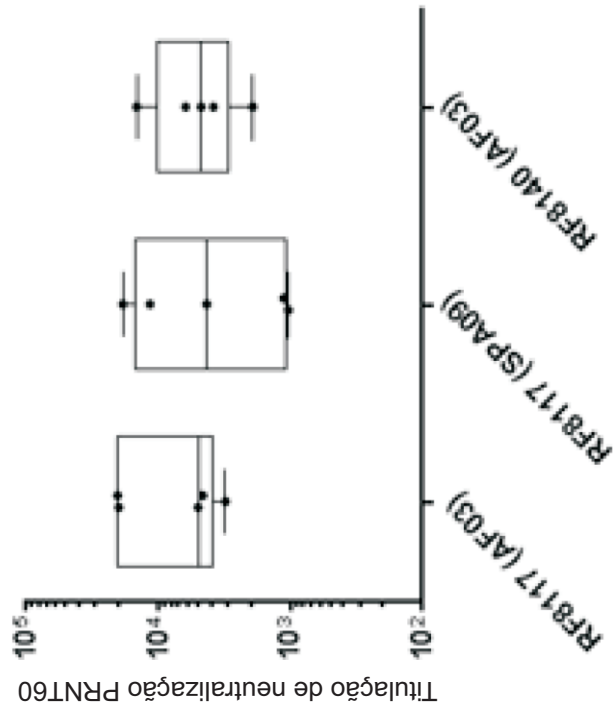


FIG. 17B

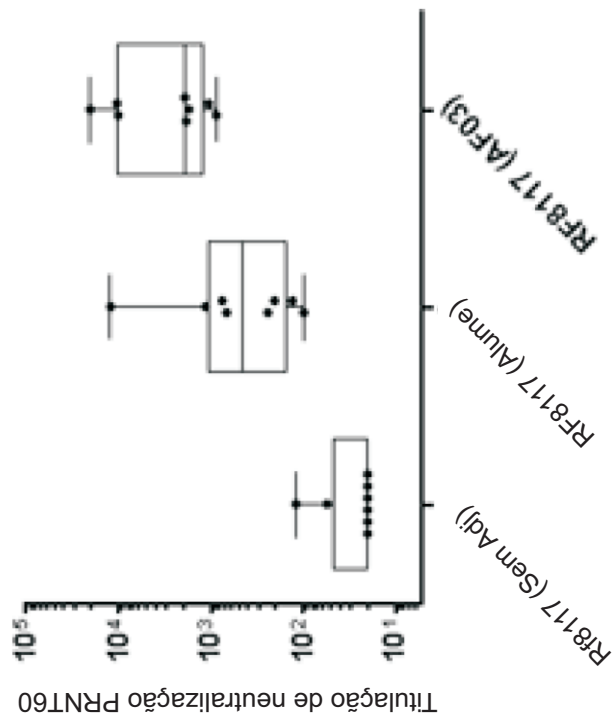


FIG. 17A

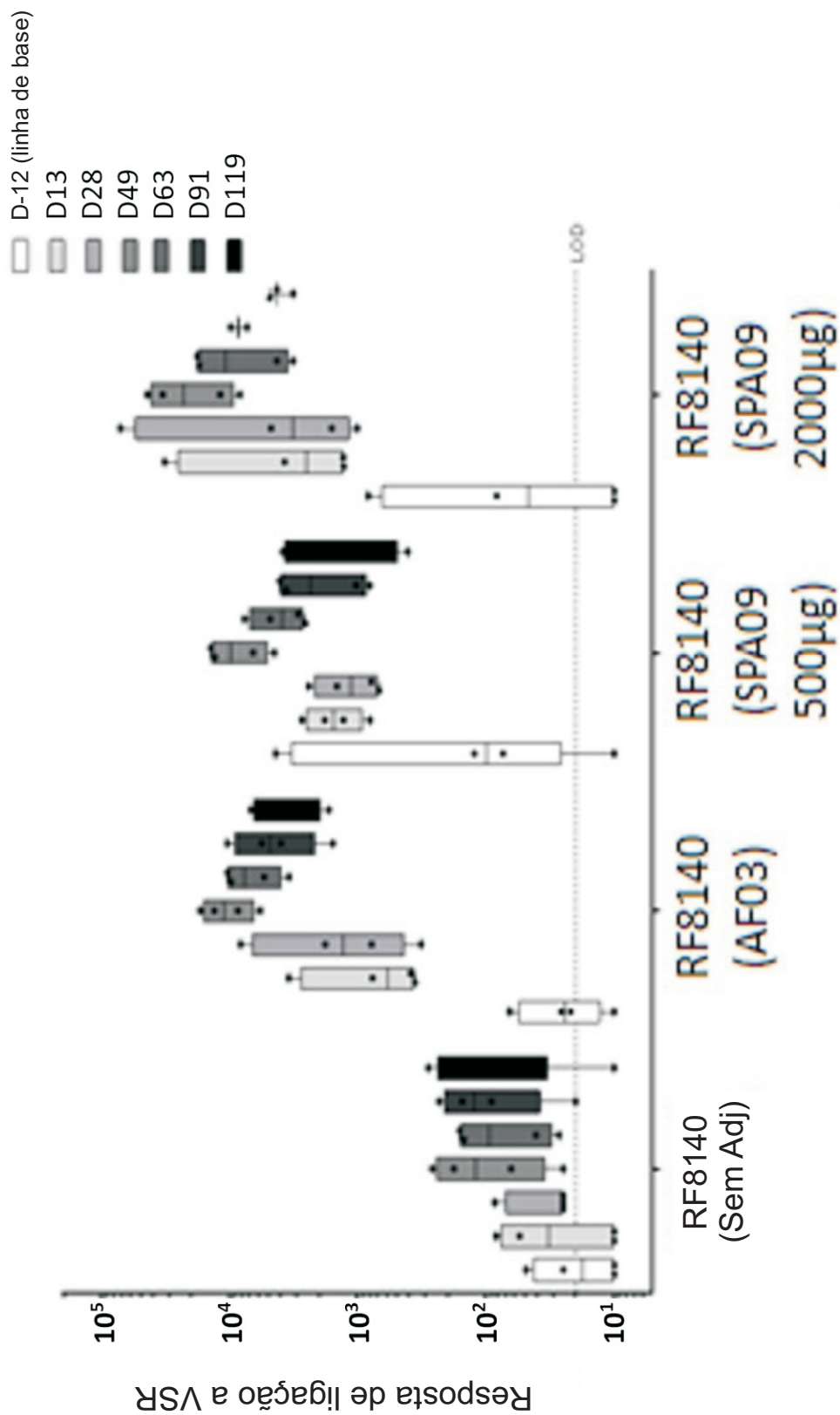


FIG. 18A

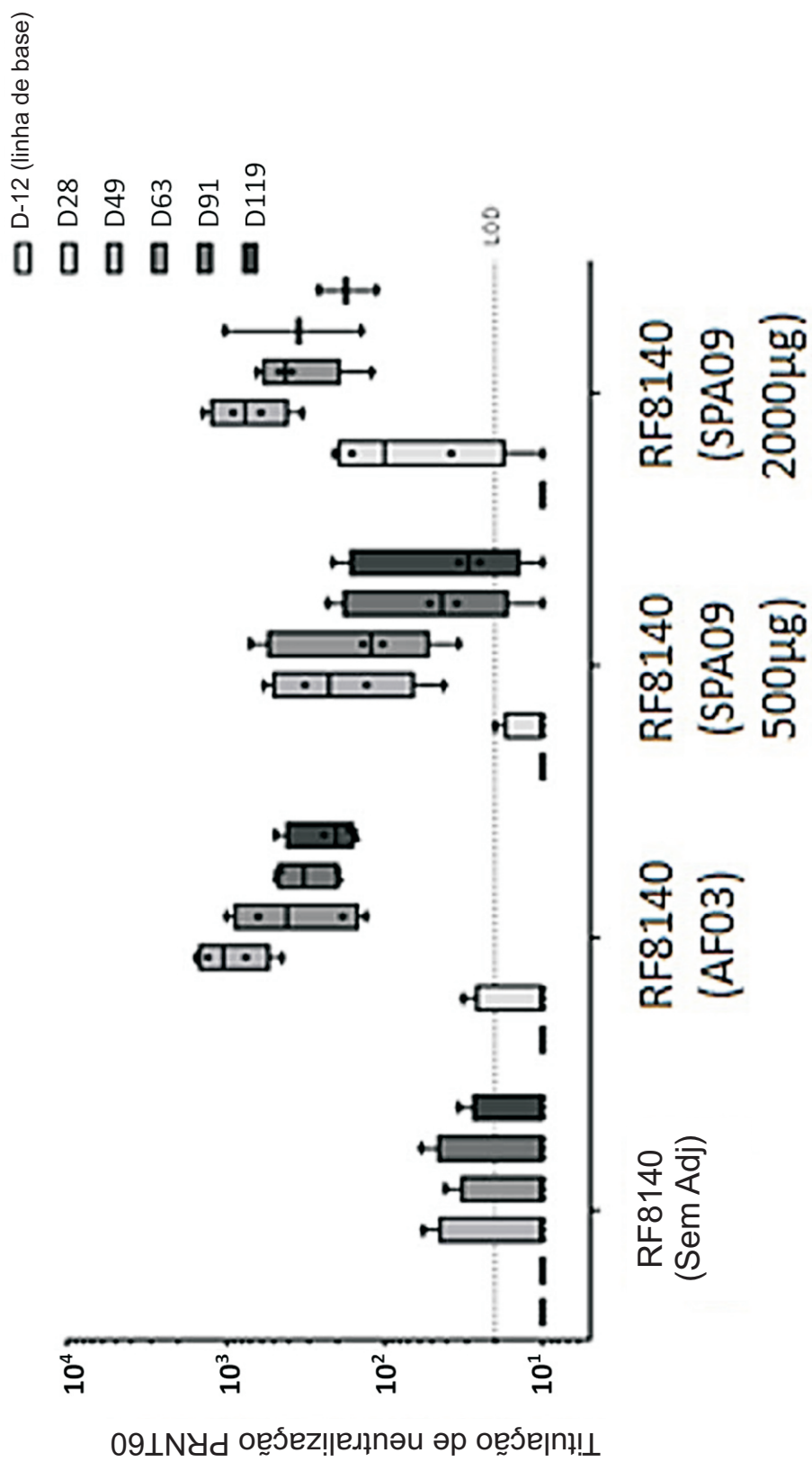


FIG. 18B

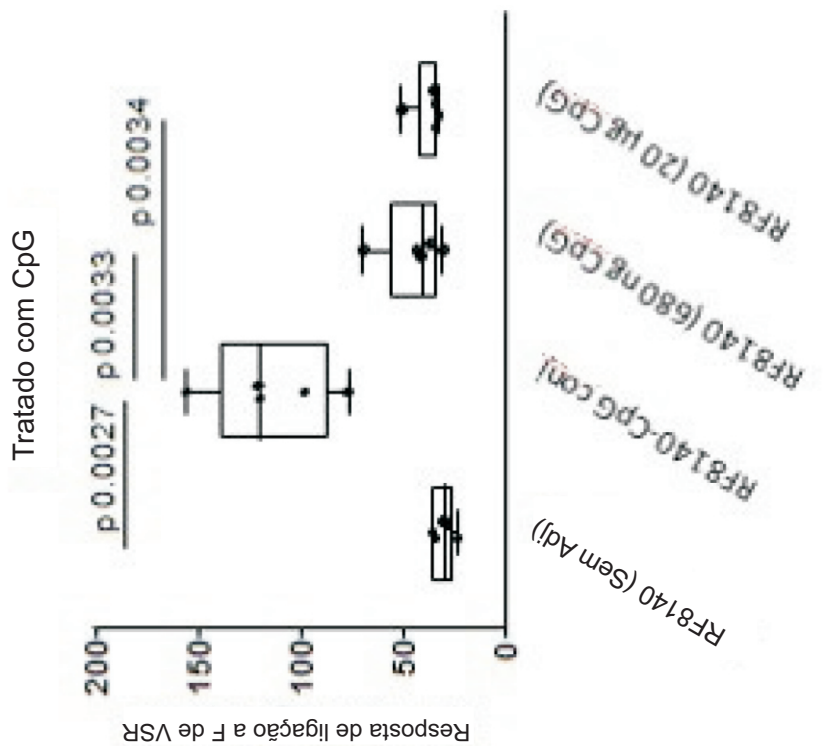


FIG. 19B

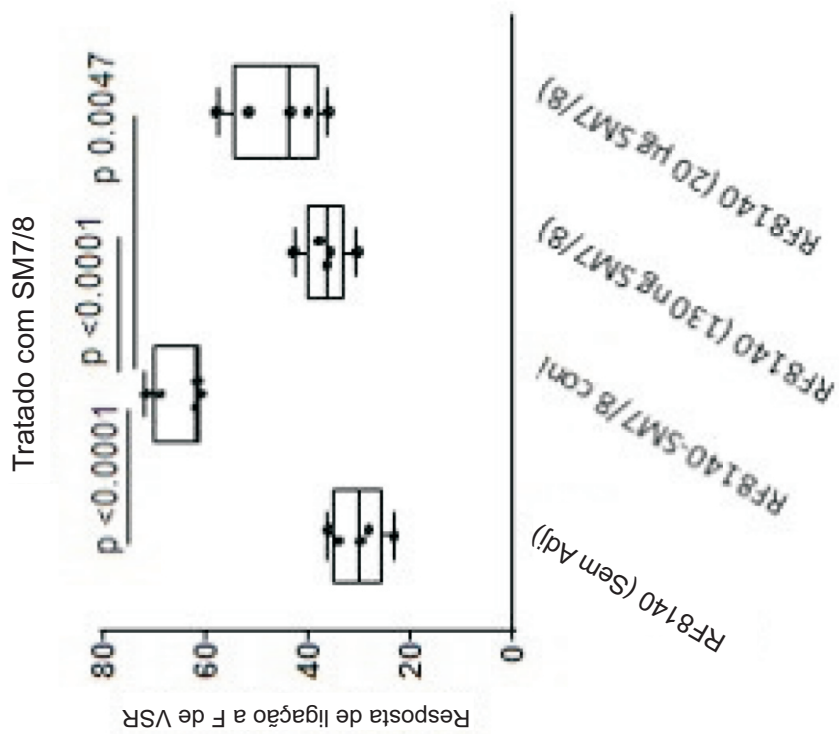


FIG. 19A

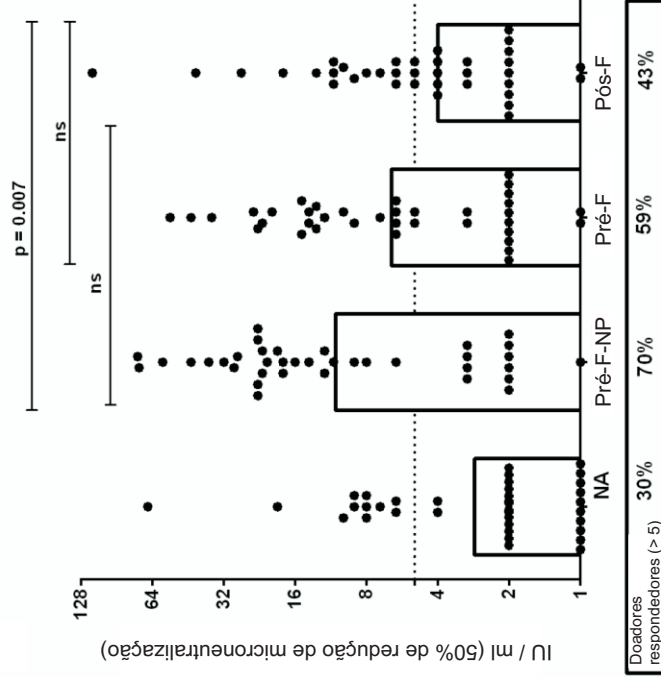


FIG. 20B

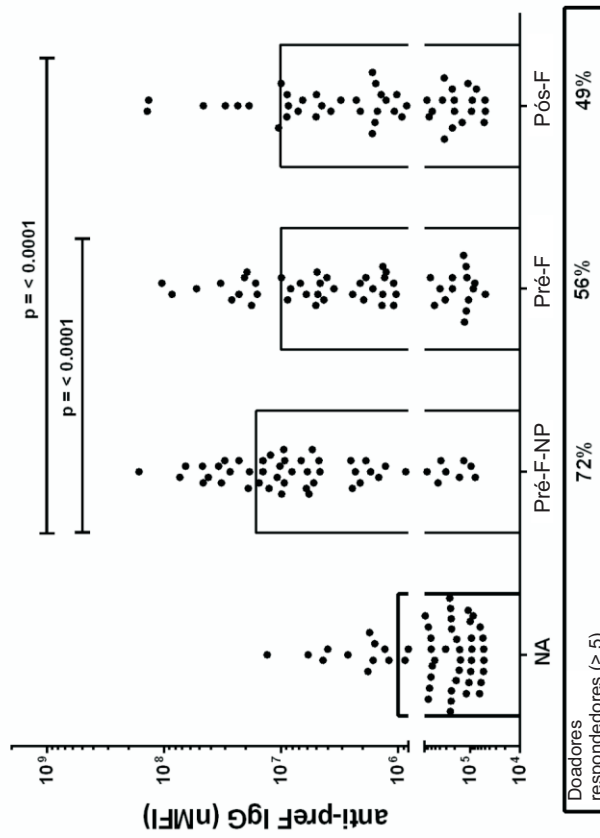


FIG. 20A

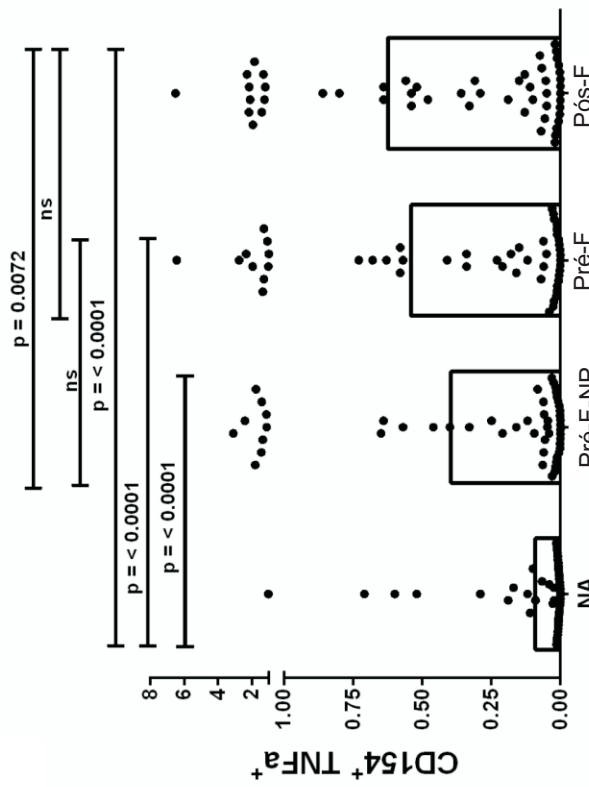


FIG. 20D

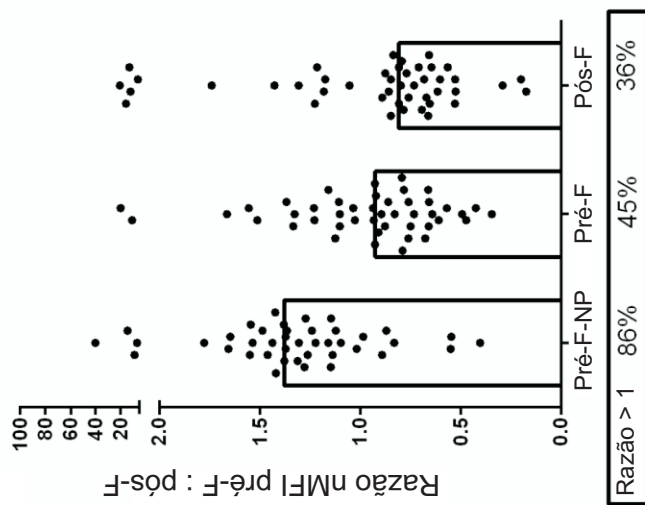


FIG. 20C

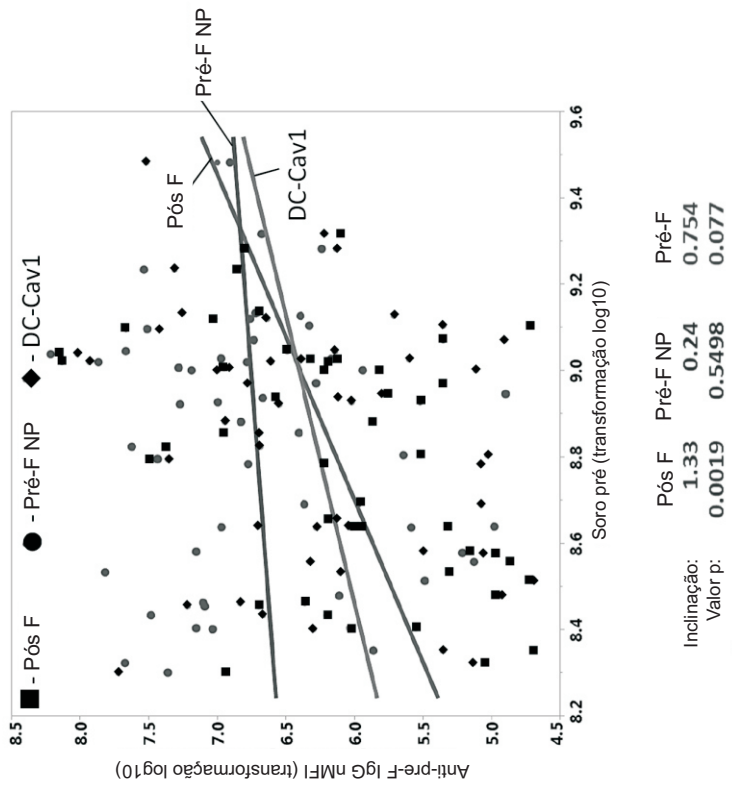


FIG. 20F

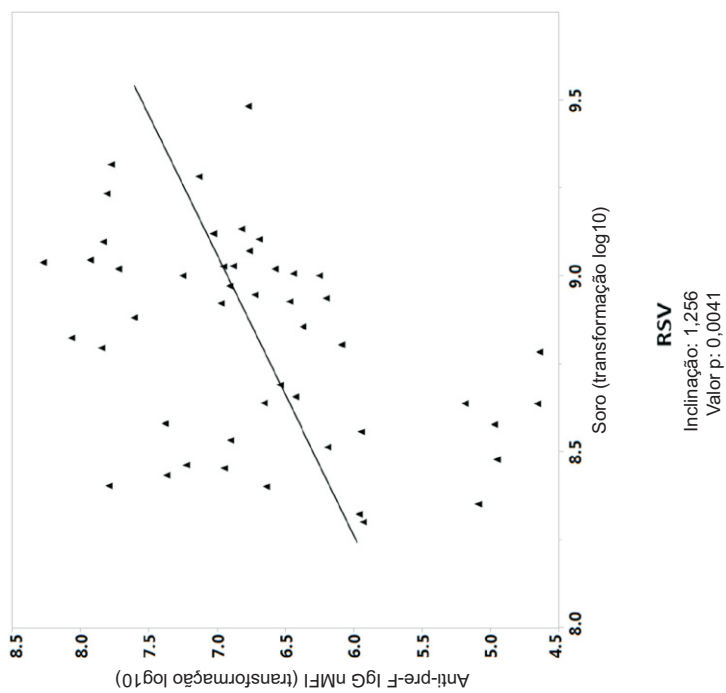


FIG. 20E

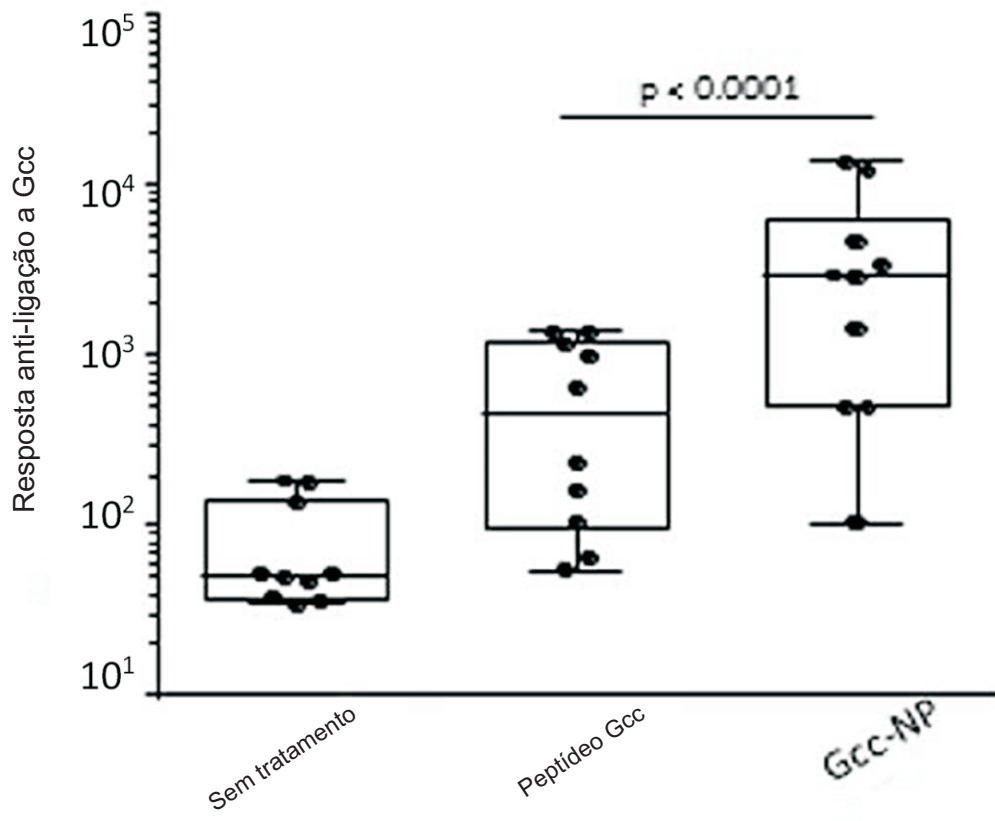


FIG. 20G

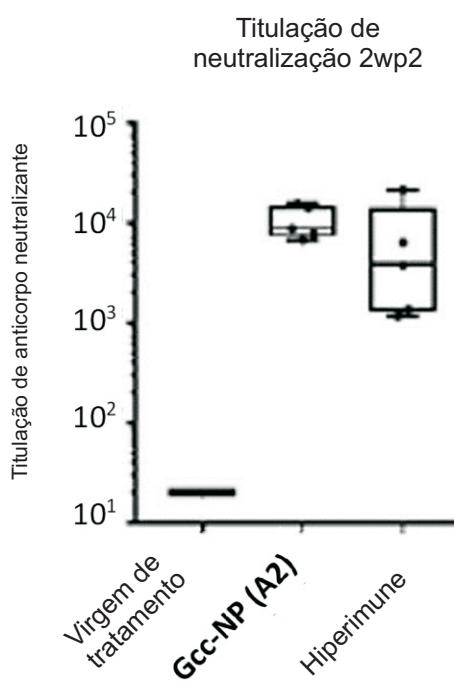


FIG. 21A

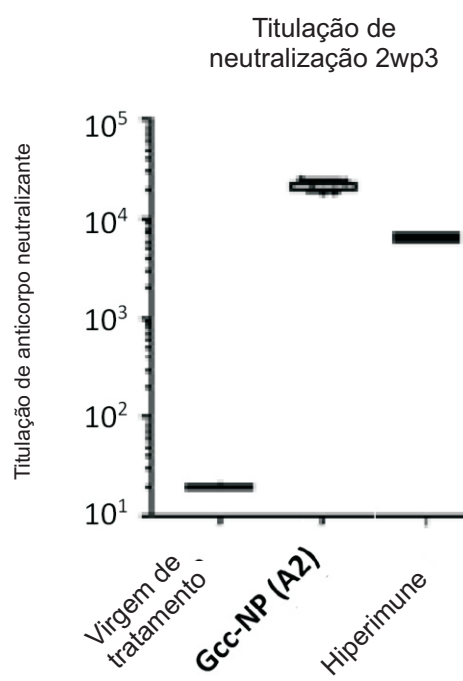


FIG. 21B

Titulação de neutralização 2wp3
Cepa B1

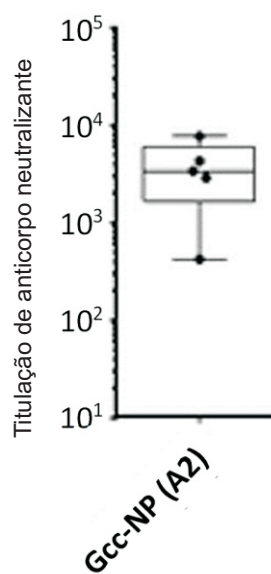


FIG. 21C

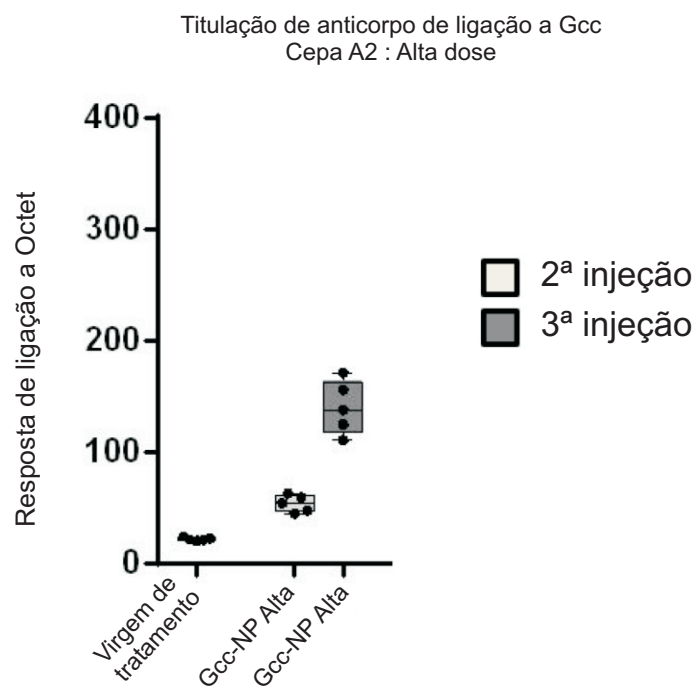


FIG. 22A

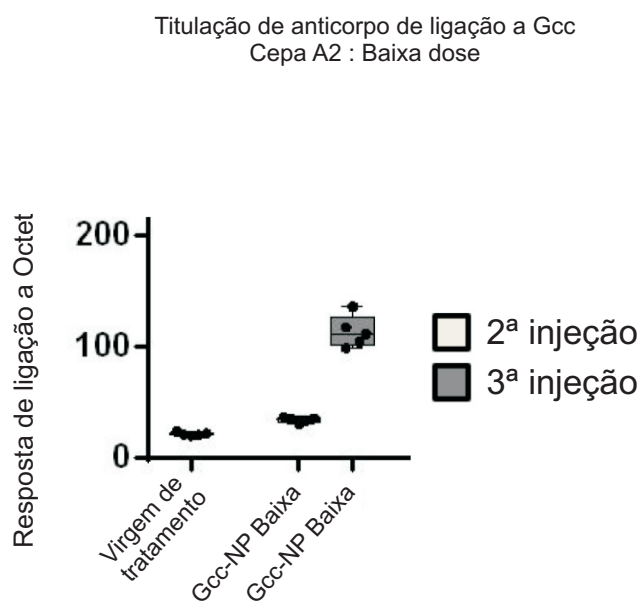


FIG. 22B

Titulação de anticorpo de ligação a Gcc
Cepa B1 : Alta dose

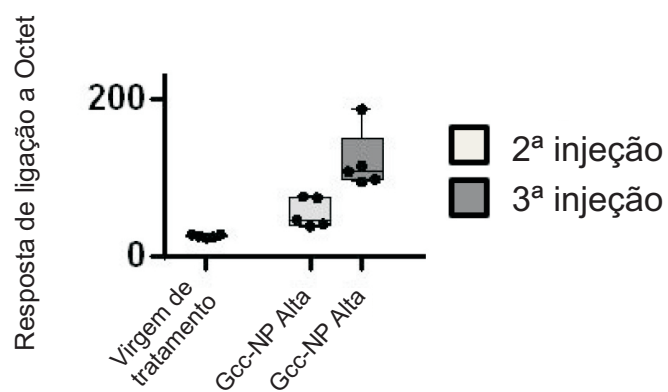


FIG. 23A

Titulação de anticorpo de ligação a Gcc
Cepa B1 : Baixa dose

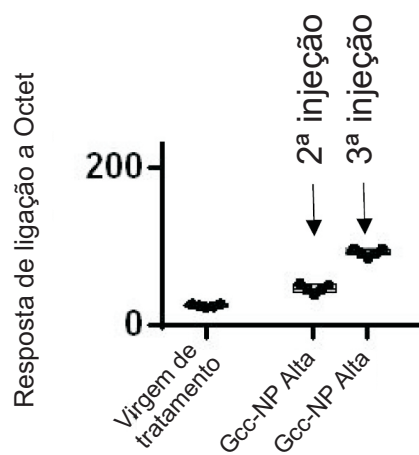


FIG. 23B

RESUMO

Patente de Invenção: **“POLIPEPTÍDEOS ANTIGÊNICOS DE VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO”**.

A presente invenção refere-se a polipeptídeos antigênicos de vírus sincicial respiratório (VSR) para uso na produção de anticorpos contra VSR. Também são descritos polipeptídeos antigênicos compreendendo um polipeptídeo de VSR e uma proteína ferritina.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: listagem de sequência p249328.TXT
- Data de Geração do Código: 29/09/2020
- Hora de Geração do Código: 14:25:27
- Código de Controle:
 - Campo 1: 626344CE582B0A12
 - Campo 2: B875E646C4A052F2