



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112014011229-0 B1**



**(22) Data do Depósito: 09/11/2012**

**(45) Data de Concessão: 13/10/2021**

**(54) Título:** PARTÍCULAS VÍRUS-LIKE (VLP), COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO A REFERIDA PARTÍCULA, MÉTODO DE PRODUÇÃO E USO DA MESMA

**(51) Int.Cl.:** C12N 15/63; A61K 39/245; A61K 39/295; A61P 31/22; A61P 37/04; (...).

**(30) Prioridade Unionista:** 01/06/2012 US 61/654,157; 11/11/2011 US 61/558,800.

**(73) Titular(es):** VARIATION BIOTECHNOLOGIES, INC..

**(72) Inventor(es):** DAVID E. ANDERSON; ANNE-CATHERINE FLUCKIGER.

**(86) Pedido PCT:** PCT IB2012002854 de 09/11/2012

**(87) Publicação PCT:** WO 2013/068847 de 16/05/2013

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 09/05/2014

**(57) Resumo:** PARTÍCULA VÍRUS-LIKE (VLP), MÉTODO PARA A PRODUÇÃO E USO DA MESMA, POLIPEPTÍDEO GB DE TRANSMEMBRANA MODIFICADA, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR, CÉLULA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E CONJUNTO DE POLINUCLEOTÍDEOS. A presente revelação fornece composições e métodos úteis para o tratamento de infecção por HCMV. Como aqui descrito, as composições e métodos se baseiam no desenvolvimento de composições imunogênicas que incluem partículas vírus -like (VLPs) que compreendem uma ou mais proteínas centrais do vírus de leucemia murina de Moloney (MMLV) e incluem um ou mais epitopos do HCMV como, por exemplo, de glicoproteínas do envelope gB e/ou gH e /ou proteína do tegumento pp65 do HCMV. Entre outras coisas, a presente invenção engloba o reconhecimento de que uma combinação de antígenos (por exemplo, glicoproteínas do envelope e proteínas estruturais) pode levar a respostas imunes benéficas, por exemplo, que incluem tanto uma resposta humoral (por exemplo, produção de anticorpos neutralizantes) quanto uma resposta celular (por exemplo, ativação de célula T).

**PARTÍCULAS VÍRUS-LIKE (VLP), COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA  
COMPREENDENDO A REFERIDA PARTÍCULA, MÉTODO DE PRODUÇÃO E  
USO DA MESMA**

**Referência cruzada com pedidos relacionados**

[001] Esse pedido reivindica o benefício do Pedido U.S. Provisório N° 61/558.800, depositado em 11 de novembro de 2011, e do Pedido U.S. Provisório N° 61/654.157, depositado em 1° de junho de 2012, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência em suas totalidades.

**Fundamentos**

[002] O citomegalovírus humano (HCMV), um  $\beta$ -herpesvírus, é um patógeno onipresente. Em uma pessoa imunocompetente, a infecção por HCMV é normalmente despercebida, que possui sintomas no máximo leves e não específicos. Em contraste, certos grupos de risco, por exemplo, em pacientes imunossuprimidos como, por exemplo, pacientes com AIDS ou receptores de transplante, e após infecção pré-natal, a infecção por HCMV possui manifestações sérias (Staras S.A. e cols., 2006 *Clin. Infect. Dis.* 43(9): 1.143-51; Hebart H. e cols., 2004 *Hum. Immunol.* 65(5):432-6; Rowshani A.T. e cols., 2005 *Transplantation* 79(4): 381-6). As terapias existentes incluem o uso de imunoglobulinas e agentes antivirais como, por exemplo, ganciclovir e seus derivados, que são mais eficazes quando usados profilaticamente ou muito precocemente durante infecção nas populações de risco. No entanto, as terapias existentes são caracterizadas por toxicidade significativa e eficácia limitada, especialmente para doença de surgimento tardio (Boeckh M., 2004 *Pediatr. Transplant* 8 (Supl. 5): 19-27; Limaye A.P., 2004

*Transplantation* 78(9): 1.390-6), e elas não tiveram impacto sobre a doença congênita pelo HCMV. O desenvolvimento de uma vacina eficaz para proteger contra doença pelo HCMV é reconhecido como uma prioridade de saúde pública importante (Arvin A.M. e cols., 2004 *Clin. Infect. Dis.* 39(2): 233-9).

### **Sumário**

[003] Entre outras coisas, a presente invenção fornece métodos e composições úteis para profilaxia, tratamento e/ou estudo da infecção pelo citomegalovírus humano (HCMV). Em algumas modalidades, a presente invenção fornece partículas vírus-like (VLPs) que compreendem uma ou mais proteínas centrais do vírus da leucemia murina de Moloney (MMLV) e incluem um ou mais epitopos do HCMV como, por exemplo, de glicoproteínas do envelope gB e/ou gH e/ou proteína do tegumento pp65 do HCMV. Entre outras coisas, a presente invenção engloba o reconhecimento de que uma combinação de antígenos (por exemplo, glicoproteínas do envelope e proteínas estruturais) podem levar à indução aumentada de respostas imunes benéficas, por exemplo, que incluem tanto uma resposta humoral (por exemplo, produção de anticorpos neutralizantes) quanto uma resposta celular (por exemplo, ativação de célula T). As VLPs fornecidas podem ser caracterizadas pelo fato de não conter DNA viral e serem não infecciosas.

[004] Em algumas modalidades, as VLPs fornecidas são circundadas por uma membrana lipídica, contendo opcionalmente um ou mais epitopos de glicoproteínas do envelope viral (por exemplo, gB e/ou gH) que são antígenos que participam na indução de anticorpos neutralizantes de vírus.

[005] Em algumas modalidades, as VLPs fornecidas contêm um ou mais epítopos de proteínas virais estruturais (por exemplo, pp65) que são antígenos que participam na indução de respostas imunes celulares (por exemplo, resposta de células T). Em algumas modalidades, as proteínas virais estruturais utilizadas (por exemplo, pp65) tanto estimulam a formação de células T *helper* quanto também induzem linfócitos T citotóxicos (CTL) contra HCMV.

[006] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece variantes de glicoproteínas do envelope viral (por exemplo, gB e/ou gH). Em algumas modalidades, uma glicoproteína do envelope viral variante é ou compreende uma proteína de fusão. Em algumas modalidades, uma variante de uma glicoproteína viral compreende um domínio de proteína heterólogo (por exemplo, um domínio transmembrana e/ou citoplasmático de uma proteína diferente). Em algumas modalidades, uma variante de uma proteína viral estrutural compreende um antígeno ou epítopo heterólogo. Em algumas modalidades, a presente invenção fornece VLPs que compreendem variantes de proteínas virais estruturais. Em algumas modalidades, uma variante de uma proteína viral estrutural é ou compreende uma proteína de fusão.

[007] Como usados nesse pedido, os termos "cerca de" e "aproximadamente" são usados como equivalentes. Quaisquer numerais usados nesse pedido com ou sem cerca de/aproximadamente visam englobar quaisquer flutuações normais observadas por aqueles habilitados na técnica relevante.

[008] Outras características, objetivos e vantagens da presente invenção são aparentes na descrição detalhada a

seguir. Deve ser subentendido, no entanto, que a descrição detalhada, embora indiquem modalidades da presente invenção, é apresentada apenas como ilustração, e não limitação. Várias alterações e modificações dentro do escopo da invenção serão evidentes para aqueles habilitados na técnica a partir da descrição detalhada.

#### **Breve descrição dos desenhos**

[009] Os desenhos têm apenas finalidade ilustrativa, e não para limitação.

[010] A **Figura 1** mostra o mapa de plasmídeo de expressão de DNA (A) e construção de plasmídeos de expressão recombinante exemplares (B).

[011] A **Figura 2** mostra análise FACS de antígenos de superfície heterólogos exemplares em células de empacotamento HEK 293 (A) e análise *western blot* de expressão de antígeno heterólogo em composições de VLP exemplares (B).

[012] As **Figuras 3(A)** e **(B)** mostram distribuição de tamanho de partícula e índice de polidispersibilidade para duas composições de VLP exemplares.

[013] A **Figura 4** mostra titulações de ELISA em camundongos tratados com composições de VLP gB/pp65 (A), gH-G/pp65 (B) ou gB/gH-G/pp65 (C) exemplares.

[014] A **Figura 5** mostra a atividade de anticorpos neutralizantes em camundongos tratados com composições de VLP exemplares (testadas em células de fibroblasto humano).

[015] A **Figura 6** mostra a atividade de anticorpos neutralizantes em camundongos tratados com composições de VLP exemplares (testadas em células epiteliais humanas).

[016] A **Figura 7** mostra a atividade de anticorpos

neutralizantes em camundongos tratados com composições de VLP exemplares versus uma proteína gB recombinante (testada em células de fibroblasto humano).

[017] A **Figura 8** mostra respostas de CTL antígeno-específicas em camundongos tratados com composições de VLPs exemplares expressas em células HEK 293, reveladas como frequência de CTL com base no declínio de CFSE, controle de células T CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (A) ou frequência de CTLs pp65-específicos proliferantes (B).

[018] A **Figura 9** mostra titulações de anticorpos anti-gB e neutralizantes em coelhos tratados com composições de VLPs exemplares expressas em células HEK 293 (testadas em células de fibroblasto humano).

[019] A **Figura 10** mostra titulações de anticorpos neutralizantes em coelhos tratados com composições de VLPs exemplares expressas em células HEK 293 (testadas em células epiteliais humanas).

[020] A **Figura 11** mostra imagens de microscopia eletrônica (EM) de coloração negativa de composições de VLPs exemplares expressas em células CHO purificadas por (A) filtração de fluxo tangencial (TFF) ou (B) cromatografia de troca aniônica (AEX).

[021] A **Figura 12** mostra titulações de anticorpos neutralizantes em coelhos tratados com composições de VLPs exemplares expressas em células CHO e purificadas por filtração de fluxo tangencial (TFF) e cromatografia de troca aniônica (AEX) (testadas em células de fibroblasto humano).

[022] A **Figura 13** mostra titulações de anticorpos neutralizantes em coelhos tratados com composições de VLPs

exemplares expressas em células CHO purificadas por filtração de fluxo tangencial (TFF) e cromatografia de troca aniônica (AEX) (testadas em células epiteliais humanas).

[023] A **Figura 14** mostra o índice de avidéz de anticorpos produzidos em coelhos tratados com composições de VLPs exemplares expressas em células CHO e purificadas por filtração de fluxo tangencial (TFF) e cromatografia de troca aniônica (AEX).

#### **Definições**

[024] A fim de que a presente invenção seja mais facilmente compreendida, certos termos serão primeiro definidos abaixo. Definições adicionais para os termos seguintes e para outros termos são apresentadas ao longo do relatório descritivo.

[025] *Aminoácido*: Como aqui usado, o termo "aminoácido", em seu sentido mais amplo, se refere a qualquer composto e/ou substância que pode ser incorporado em uma cadeia polipeptídica. Em algumas modalidades, um aminoácido possui a estrutura geral  $H_2N-C(H)(R)-COOH$ . Em algumas modalidades, um aminoácido é um aminoácido de ocorrência natural. Em algumas modalidades, um aminoácido é um aminoácido sintético; em algumas modalidades, um aminoácido é um D-aminoácido; em algumas modalidades, um aminoácido é um L-aminoácido. "Aminoácido padronizado" refere-se a qualquer um dos vinte L-aminoácidos padronizados comumente encontrados em peptídeos de ocorrência natural. "Aminoácido não padronizado" refere-se a qualquer aminoácido, que não seja aminoácido padronizado, independentemente de se ele é preparado sinteticamente ou

obtido de uma fonte natural. Como aqui usado, o termo "aminoácido sintético" engloba aminoácidos quimicamente modificados incluindo, sem limitação, sais, derivados de aminoácidos (por exemplo, amidas) e/ou substituições. Aminoácidos, incluindo aminoácidos carbóxi- e/ou amino-terminais em peptídeos, podem ser modificados por metilação, amidação, acetilação, grupos de proteção e/ou substituição com outros grupos químicos que podem alterar a meia-vida circulante do peptídeo, sem afetar de forma adversa sua atividade. Os aminoácidos podem participar em uma ligação dissulfeto. Aminoácidos podem compreender uma ou mais modificações pós-tradução, por exemplo, associação com uma ou mais entidades químicas (por exemplo, grupos metil, grupos acetato, grupos acetil, grupos fosfato, porções formil, grupos isoprenóides, grupos sulfato, porções de polietileno glicol, porções de lipídeo, porções de carboidrato, porções de biotina etc.). O termo "aminoácido" é usado de forma intercambiável com "resíduo de aminoácido", e pode se referir a um aminoácido livre e/ou a um resíduo de aminoácido de um peptídeo. Ficará evidente a partir do contexto no qual o termo é usado se ele se refere a um aminoácido livre ou a um resíduo de um peptídeo.

[026] *Antígeno*: Como aqui usado, o termo "antígeno" se refere a uma substância que contém um ou mais epitopos (lineares, conformacionais ou ambos) que são reconhecidos por anticorpos. Em certas modalidades, um antígeno é ou compreende um vírus ou um polipeptídeo viral. Em algumas modalidades, o termo "antígeno" se refere a um antígeno de subunidade (ou seja, um antígeno que é separado e distinto

de um vírus inteiro com o qual o antígeno está associado na natureza; por exemplo, um antígeno que está associado com uma partícula vírus-like). Alternativa ou adicionalmente, em algumas modalidades, o termo "antígeno" se refere a um vírus morto, atenuado ou inativado. Em certas modalidades, um antígeno é um "imunógeno".

[027] *Aproximadamente ou "cerca de"*: Como aqui usado, o termo "aproximadamente" ou "cerca de", como aplicado a um ou mais valores de interesse, se refere a um valor que é similar ao valor de referência estabelecido. Em certas modalidades, o termo "aproximadamente" ou "cerca de" se refere a uma faixa de valores que se enquadram dentro de 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, ou menos em qualquer direção (ou mais ou menos do que) do valor de referência estabelecido, a menos que estabelecido de forma diferente ou e outro modo evidente a partir do contexto (exceto quando esse número excedesse 100% de um valor possível).

[028] *Melhora*: Como aqui usado, o termo "melhora" significa a prevenção, redução ou atenuação de um estado, ou melhora do estado de um indivíduo. A melhora inclui, mas não exige, recuperação completa ou prevenção completa de uma doença, distúrbio ou condição (por exemplo, infecção por HCMV). O termo "prevenção" se refere a um retardo do surgimento de uma doença, distúrbio ou condição. A prevenção pode ser considerada completa quando o surgimento de uma doença, distúrbio ou condição foi retardada por um período de tempo predefinido.

[029] *Porção característica*: Como aqui usado, o termo uma "porção característica" de uma substância, no sentido

mais amplo, é aquela que compartilha um grau designado de identidade estrutural com a substância intacta. Em certas modalidades, uma porção característica compartilha pelo menos uma característica funcional com a substância intacta. Por exemplo, uma "porção característica" de uma proteína ou polipeptídeo é aquela que contém um trecho contínuo de aminoácidos, ou uma coleção de trechos contínuos de aminoácidos, que, juntos, são característicos de uma proteína ou polipeptídeo. Em algumas modalidades, cada um desses trechos contínuos geralmente contém pelo menos 2, 5, 10, 15, 20, 50, ou mais aminoácidos. Em geral, uma porção característica de uma substância (por exemplo, de uma proteína, anticorpos etc.) é aquela que, além da identidade de seqüência e/ou estrutural especificada acima, compartilha pelo menos uma característica funcional com a substância intacta relevante. Em algumas modalidades, uma porção característica pode ser biologicamente ativa.

[030] *Seqüência característica*: Uma "seqüência característica" é uma seqüência que é encontrada em todos os membros de uma família de polipeptídeos ou ácidos nucléicos e, portanto, pode ser usada por aqueles habilitados na técnica para definir membros da família.

[031] *Domínio citoplasmático*: Como é conhecido na técnica, polipeptídeos algumas vezes possuem domínios transmembrana, citoplasmáticos e/ou extracelulares. Em geral, um "domínio citoplasmático", como aqui usado, se refere a um domínio que possui um atributo de estar presente no citoplasma. Como será observado, não é necessário que cada aminoácido em um domínio citoplasmático esteja presente no citoplasma. Por exemplo, em algumas

modalidades, um domínio citoplasmático é caracterizado pelo fato de que um trecho ou porção designada de uma proteína está substancialmente localizada no citoplasma. Como é bem conhecido na técnica, seqüências de aminoácidos ou de ácidos nucleicos podem ser analisadas usando diversos algoritmos para prever a localização subcelular de proteína (por exemplo, localização citoplasmática). Programas desse tipo exemplares incluem Psort (PSORT.org), Prosite (prosite.expasy.org), entre outros.

[032] *Forma de dosagem*: Como aqui usados, os termos "forma de dosagem" e "forma de dosagem unitária" se referem a uma unidade fisicamente distinta de um agente terapêutico para o paciente a ser tratado. Cada unidade contém uma quantidade predeterminada de material ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado. Será subentendido, no entanto, que a dosagem total da composição será decidida pelo médico assistente dentro do escopo de uma avaliação médica consistente.

[033] *Regime de dosagem*: Um "regime de dosagem" (ou "regime terapêutico"), como o termo é aqui usado, é um conjunto de doses unitárias (tipicamente mais de uma) que são administradas individualmente a um indivíduo, tipicamente separadas por períodos de tempo. Em algumas modalidades, certo agente terapêutico possui um regime de dosagem recomendado, que pode envolver uma ou mais doses. Em algumas modalidades, um regime de dosagem compreende diversas doses, cada uma sendo separada da outra por um período de tempo da mesma duração; em algumas modalidades, um regime de dosagem compreende diversas doses e pelo menos dois períodos de tempo diferentes que separam doses

individuais.

[034] *Expressão*: Como aqui usada, a "expressão" de uma seqüência de ácidos nucleicos se refere a um ou mais dos seguintes eventos: (1) produção de um modelo de RNA a partir de uma seqüência de DNA (por exemplo, por transcrição); (2) processamento de um transcrito de RNA (por exemplo, por *splicing*, edição, formação de *cap* 5' e/ou formação de extremidade 3'); (3) tradução de um RNA em um polipeptídeo ou proteína; e/ou (4) modificação pós-tradução de um polipeptídeo ou proteína.

[035] *Domínio extracelular*: Como é conhecido na técnica, polipeptídeos algumas vezes possuem domínios transmembrana, citoplasmáticos e/ou extracelulares. Em geral, um "domínio extracelular", como aqui usado, se refere a um domínio que possui um atributo de estar presente fora de uma célula. Como será observado, não é necessário que cada aminoácido em um domínio extracelular esteja presente fora da célula. Por exemplo, em algumas modalidades, um domínio extracelular é caracterizado pelo fato de que um trecho ou porção designada de uma proteína está substancialmente localizada fora da célula. Como é bem conhecido na técnica, seqüências de aminoácidos ou de ácidos nucleicos podem ser analisadas usando diversos algoritmos para prever a localização subcelular de proteína (por exemplo, extracelular localização). Programas desse tipo exemplares incluem Psort (PSORT.org), Prosite (prosite.expasy.org), entre outros.

[036] *Proteína de fusão*: Como aqui usado, o termo "proteína de fusão" geralmente se refere a um polipeptídeo que inclui pelo menos dois segmentos, cada um deles

mostrando um grau elevado de identidade de aminoácidos para uma porção de peptídeo que (1) ocorre na natureza, e/ou (2) representa um domínio funcional de um polipeptídeo. Tipicamente, um polipeptídeo que contém pelo menos dois desses segmentos é considerado como sendo uma proteína de fusão se os dois segmentos são porções que: (1) não estão incluídas na natureza no mesmo peptídeo, e/ou (2) não foram ligadas previamente umas às outras em um único polipeptídeo, e/ou (3) foram ligadas umas às outras por meio da ação da mão do homem.

[037] *Gene*: Como aqui usado, o termo "gene" possui o seu significado compreendido na técnica. Será observado por aqueles habilitados na técnica que o termo "gene" pode incluir seqüências reguladoras gênicas (por exemplo, promotores, intensificadores etc.) e/ou seqüências de íntron. Será ainda observado que as definições de gene incluem referências aos ácidos nucléicos que não codificam proteínas, mas sim codificam moléculas de RNA funcionais como, por exemplo, tRNAs, agentes indutores de RNAi etc. Para fins de clareza observamos que, como usado no presente pedido, o termo "gene" geralmente se refere a uma porção de um ácido nucléico que codifica uma proteína; o termo pode opcionalmente englobar seqüências reguladoras, como será evidente a partir do contexto para aqueles habilitados na técnica. Essa definição não visa excluir a aplicação do termo "gene" a unidades de expressão que codificam não-proteína, mas sim tornar mais claro que, na maioria dos casos, o termo como usado nesse documento se refere a um ácido nucléico que codifica proteína.

[038] *Produto gênico ou produto de expressão*: Como aqui

usado, o termo "produto gênico" ou "produto de expressão" geralmente se refere a um RNA transcrito a partir do gene (pré- e/ou pós-processamento) ou um polipeptídeo (pré- e/ou pós-modificação) codificado por um RNA transcrito pelo gene.

[039] *Heterólogo*: Como aqui usado, o termo "heterólogo" com relação a uma proteína ou um polipeptídeo, se refere a uma proteína ou polipeptídeo que não ocorre naturalmente em um organismo particular, por exemplo, um retrovírus ou VLP. Em algumas modalidades, uma proteína ou polipeptídeo heterólogo não ocorre naturalmente em um vírion de retrovírus particular. Como aqui usado, o termo "heterólogo" com relação a um domínio de proteína geralmente se refere a um domínio de proteína que ocorre naturalmente em uma proteína particular.

[040] *Imunogênico*: Como aqui usado, o termo "imunogênico" significa capaz de produzir uma resposta imune em um animal hospedeiro contra uma entidade que não é do hospedeiro (por exemplo, um antígeno de HCMV). Em certas modalidades, essa resposta imune forma a base da imunidade protetora despertada por uma vacina contra um organismo infeccioso específico (por exemplo, um HCMV).

[041] *Resposta imune*: Como aqui usado, o termo "resposta imune" se refere a uma resposta despertada em um animal. Uma resposta imune pode se referir à imunidade celular, imunidade humoral, ou pode envolver ambas. Uma resposta imune também pode ser limitada a uma parte do sistema imune. Por exemplo, em certas modalidades, uma composição imunogênica pode induzir uma resposta de IFN $\gamma$  aumentada. Em certas modalidades, uma composição

imunogênica pode induzir uma resposta de IgA mucosa (por exemplo, como medida em lavagens nasais e/ou retais). Em certas modalidades, uma composição imunogênica pode induzir uma resposta de IgG sistêmica (por exemplo, como medida no soro). Em certas modalidades, uma composição imunogênica pode induzir anticorpos neutralizantes de vírus ou uma resposta de anticorpos neutralizantes.

[042] *Intensificar, aumentar ou reduzir*: Como aqui usados, os termos "intensificar", "aumentar" ou "reduzir", ou equivalentes gramaticais, indicam valores que são relativos a uma medição basal, por exemplo, uma medição no mesmo indivíduo antes do início do tratamento aqui descrito, ou uma medição em um indivíduo de controle (ou vários indivíduos de controle) na ausência do tratamento aqui descrito.

[043] *Indivíduo, pessoa, paciente*: Como aqui usados, os termos "pessoa", "indivíduo" ou "paciente" se referem a um ser humano ou a um indivíduo mamífero não humano. Em algumas modalidades, o indivíduo (também denominado "paciente" ou "indivíduo") que está sendo tratado é um indivíduo (feto, bebê, criança, adolescente ou adulto) que sofre de uma doença, por exemplo, infecção por HCMV. Em algumas modalidades, o indivíduo está em risco para infecção por HCMV. Em algumas modalidades, o indivíduo é um indivíduo imunocomprometido. Por exemplo, em algumas modalidades, o indivíduo imunocomprometido é selecionado do grupo que consiste em um indivíduo infectado pelo HIV, um paciente com AIDS, um receptor de transplante, um indivíduo pediátrico e uma mulher grávida. Em algumas modalidades, o indivíduo foi exposto à infecção por HCMV. Em algumas

modalidades, o indivíduo é um humano.

[044] *Isolada*: Como aqui usado, o termo "isolada" se refere a uma substância e/ou entidade que foi (1) separada de pelo menos alguns dos componentes com os quais estava associada quando inicialmente produzida (seja na natureza e/ou em um ambiente experimental), e/ou (2) produzida, preparada e/ou fabricada pela mão do homem. Substâncias e/ou entidades isoladas podem ser separadas por cerca de 10%, cerca de 20%, cerca de 30%, cerca de 40%, cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99%, ou mais do que cerca de 99% dos outros componentes com os quais estavam inicialmente associadas. Em algumas modalidades, agentes isolados são cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99%, ou mais do que cerca de 99% puros. Como aqui usado, uma substância é "pura" caso ela seja substancialmente livre de outros componentes. Como aqui usado, o cálculo da pureza percentual de substâncias e/ou entidades isoladas não deve incluir excipientes (por exemplo, tampão, solvente, água etc.).

[045] *Vinculador*: Como aqui usado, o termo "vinculador" se refere a, por exemplo, em uma proteína de fusão, uma seqüência de aminoácidos de um comprimento apropriado diferente daquele que aparece em uma posição particular na proteína natural e é geralmente projetado para ser flexível e/ou interpor uma estrutura, por exemplo, uma  $\alpha$ -hélice,

entre duas porções de proteína. Em geral, um vinculador permite que dois ou mais domínios de uma proteína de fusão retenham 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou mais da atividade biológica de cada um dos domínios. Um vinculador também pode ser denominado um espaçador.

[046] *Ácido nucléico*: Como aqui usado, o termo "ácido nucléico", em seu sentido mais amplo, se refere a qualquer composto e/ou substância que está ou pode ser incorporado em uma cadeia de oligonucleotídeos. Em algumas modalidades, um ácido nucléico é um composto e/ou substância que está ou pode ser incorporado em uma cadeia de oligonucleotídeos por meio de uma ligação fosfodiéster. Em algumas modalidades, "ácido nucléico" se refere a resíduos de ácidos nucléicos individuais (por exemplo, nucleotídeos e/ou nucleosídeos). Em algumas modalidades, "ácido nucléico" se refere a uma cadeia de oligonucleotídeos que compreende resíduos de ácidos nucléicos individuais. Como aqui usados, os termos "oligonucleotídeo" e "polinucleotídeo" podem ser usados de forma intercambiável. Em algumas modalidades, "ácido nucléico" engloba RNA, além de DNA e/ou cDNA de fita simples e/ou dupla. Além disso, os termos "ácido nucléico", "DNA", "RNA" e/ou termos similares incluem análogos de ácido nucléico, ou seja, análogos que possuem um arcabouço diferente de um arcabouço de fosfodiéster. Por exemplo, os denominados "ácidos nucléicos peptídicos", que são conhecidos na técnica e possuem ligações peptídicas ao invés de ligações fosfodiéster no arcabouço, são considerados dentro do escopo da presente invenção. O termo "seqüência de nucleotídeos que codifica uma seqüência de aminoácidos" inclui todas as seqüências de nucleotídeos que

são versões degeneradas entre elas e/ou codificam a mesma seqüência de aminoácidos. Seqüências de nucleotídeos que codificam proteínas e/ou RNA podem incluir íntrons. Ácidos nucléicos podem ser purificados de fontes naturais, produzidos com o uso de sistemas recombinantes de expressão e, opcionalmente, purificados, sintetizados quimicamente etc. Quando adequado, por exemplo, no caso de moléculas sintetizadas quimicamente, ácidos nucléicos podem compreender análogos de nucleosídeo como, por exemplo, análogos que possuem bases ou açúcares modificados quimicamente, modificações do arcabouço etc. Uma seqüência de ácidos nucléicos é apresentada na direção 5' a 3', a menos que indicado de forma diferente. O termo "segmento de ácido nucléico" é aqui usado para se referir a uma seqüência de ácidos nucléicos que é uma porção de uma seqüência de ácidos nucléicos mais longa. Em muitas modalidades, um segmento de ácido nucléico compreende pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou mais resíduos. Em algumas modalidades, um ácido nucléico é ou compreende nucleosídeos naturais (por exemplo, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina e desoxicitidina); análogos de nucleosídeos (por exemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metil adenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinil-citidina, C-5 propinil-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluoruridina, C5-iodouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-deaza-adenosina, 7-deaza-guanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxo-guanosina, O(6)-metilguanina e 2-tiocitidina); bases modificadas quimicamente; bases

modificadas biologicamente (por exemplo, bases metiladas); bases intercaladas; açúcares modificados (por exemplo, 2'-flúor-ribose, ribose, 2'-desóxi-ribose, arabinose e hexose); e/ou grupos fosfato modificados (por exemplo, ligações fosforotioatos e 5'-N-fosforamidita). Em algumas modalidades, a presente invenção é especificamente dirigida a "ácidos nucléicos não modificados", o que significa ácidos nucléicos (por exemplo, polinucleotídeos e resíduos, incluindo nucleotídeos e/ou nucleosídeos) que não foram modificados quimicamente a fim de facilitar ou obter liberação.

[047] *Farmacologicamente aceitável*: O termo "farmacologicamente aceitável", como aqui usado, se refere às substâncias que, dentro do escopo de uma avaliação médica consistente, são adequadas para uso em contato com os tecidos de seres humanos e animais sem toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica, ou outro problema ou complicação, compatível com uma proporção risco/benefício razoável.

[048] *Polipeptídeo*: Como aqui usado, um "polipeptídeo", em termos gerais, é uma fileira de pelo menos dois aminoácidos anexados entre eles por uma ligação peptídica. Em algumas modalidades, um polipeptídeo pode incluir pelo menos 3-5 aminoácidos, cada um deles anexado aos outros por meio de pelo menos uma ligação peptídica. Aqueles habilitados na técnica observarão que polipeptídeos algumas vezes incluem aminoácidos "não naturais" ou outras entidades que, no entanto, são capazes de se integrar em uma cadeia polipeptídica, opcionalmente.

[049] *Poliproteína*: Como aqui usado, o termo

"poliproteína", geralmente se refere a uma proteína que, após síntese, pode ser clivada para produzir vários polipeptídeos funcionalmente distintos. Uma poliproteína é tipicamente codificada por uma única seqüência de aminoácidos. Em algumas modalidades, uma poliproteína não clivada retém a atividade biológica de suas partes componentes. Alguns vírus produzem essas poliproteínas, por exemplo, uma poliproteína Gag, que pode ser retida como uma poliproteína funcional ou pode ser processada em vários polipeptídeos funcionalmente distintos. Funcionalmente, a poliproteína Gag é dividida em três domínios: o domínio de ligação de membrana, que direciona a poliproteína Gag à membrana celular; o domínio de interação que promove a polimerização de Gag; e o domínio tardio que facilita a liberação de vírions nascentes pela célula hospedeira. Em geral, a forma da proteína Gag que medeia a montagem da partícula viral é a poliproteína.

[050] *Porção de automontagem*: Em geral, uma "porção de automontagem", como aqui usada, se refere a um trecho relevante de uma entidade que adota um arranjo definido sem direcionamento ou gerenciamento por uma fonte externa. Em algumas modalidades, a entidade é uma proteína. Em algumas modalidades, a entidade é uma poliproteína. Em algumas dessas modalidades, o trecho relevante tem pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 ou mais resíduos. A automontagem pode ser exibida, por exemplo, dentro do contexto de uma célula (por exemplo, *in vivo*). Alternativa ou adicionalmente, a automontagem pode ser exibida fora do

contexto de uma célula (por exemplo, *in vitro*). A automontagem pode ser intramolecular (por exemplo, enovelamento) e/ou intermolecular. Em algumas modalidades, a automontagem pode ser macromolecular, em que entidades se automontam em uma estrutura macromolecular complexa e/ou estendida. Entidades automontadas podem exibir uma ampla gama de motivos estruturais incluindo, sem limitação, partículas, fibras, lâminas e fitas. Em algumas modalidades, a automontagem de uma entidade é importante para uma função biológica da entidade. Por exemplo, em algumas modalidades, a automontagem de um lipídeo leva à formação de uma estrutura da membrana celular. Em algumas modalidades, a automontagem de uma proteína (por exemplo, uma proteína viral estrutural) em um contexto celular leva à formação de uma estrutura de partícula (por exemplo, uma estrutura de partícula viral). Por exemplo, uma poliproteína estrutural viral pode conter uma seqüência de direcionamento que é capaz de direcionar sua localização a uma membrana celular de sua célula hospedeira (por exemplo, membrana plasmática, endossomo etc.) da qual a poliproteína estrutural viral pode brotar para formar uma VLP que contém material membranoso celular hospedeiro que circunda a poliproteína estrutural viral.

[051] *Homologia substancial*: A frase "homologia substancial" é aqui usada para se referir a uma comparação entre seqüências de aminoácidos ou de ácidos nucleicos. Como será observado por aqueles habilitados na técnica, duas seqüências são geralmente consideradas como sendo "substancialmente homólogas" caso contenham resíduos homólogos em posições correspondentes. Resíduos homólogos

podem ser resíduos idênticos. Alternativamente, resíduos homólogos podem ser resíduos não idênticos com características estruturais e/ou funcionais apropriadamente similares. Por exemplo, como é bem conhecido por aqueles habilitados na técnica, certos aminoácidos são tipicamente classificados como aminoácidos "hidrofóbicos" ou "hidrofílicos", e/ou as como tendo cadeias laterais "polares" ou "não polares". A substituição de um aminoácido por outro do mesmo tipo pode frequentemente ser considerada como uma substituição "homóloga".

[052] Como é bem conhecido nessa técnica, seqüências de aminoácidos ou de ácidos nucleicos podem ser comparadas usando qualquer um de diversos algoritmos, incluindo aqueles disponíveis em programas de computador comerciais como, por exemplo, BLASTN para seqüências de nucleotídeos e BLASTP, BLAST com lacunas e PSI-BLAST para seqüências de aminoácidos. Programas desse tipo exemplares são descritos em Altschul, e cols., "Basic Local Alignment Search Tool", *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990; Altschul, e cols., "Methods in Enzymology" 266: 460-480 (1996); Altschul, e cols., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a New Generation of Protein Database Search Programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3.389-3.402, 1997; Baxevanis, e cols., "Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins", Wiley, 1998; e Misener, e cols., (eds.), "Bioinformatics Methods and Protocols" ("Methods in Molecular Biology", Vol. 132), Humana Press, 1999. Além da identificação de seqüências homólogas, os programas mencionados acima tipicamente fornecem uma indicação do grau de homologia. Em algumas modalidades, duas seqüências são consideradas como

sendo substancialmente homólogas se pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) ou mais de seus resíduos correspondentes são homólogos ao longo de um trecho relevante de resíduos. Em algumas modalidades, o trecho relevante é uma seqüência completa. Em algumas modalidades, o trecho relevante tem pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 ou mais resíduos.

[053] *Identidade substancial*: A frase "identidade substancial" é aqui usada para se referir a uma comparação entre seqüências de aminoácidos ou de ácidos nucléicos. Como será observado por aqueles habilitados na técnica, duas seqüências são geralmente consideradas como sendo "substancialmente idênticas" caso contenham resíduos idênticos em posições correspondentes. Como é bem conhecido nessa técnica, seqüências de aminoácidos ou de ácidos nucléicos podem ser comparadas usando qualquer um de diversos algoritmos, incluindo aqueles disponíveis em programas de computador comerciais como, por exemplo, BLASTN para seqüências de nucleotídeos e BLASTP, BLAST com lacunas e PSI-BLAST para seqüências de aminoácidos. Programas desse tipo exemplares são descritos em Altschul, e cols., "Basic Local Alignment Search Tool", *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990; Altschul, e cols., "Methods in Enzymology" 266: 460-480 (1996); Altschul e cols., *Nucleic Acids Res.* 25: 3.389-3.402, 1997; Baxevanis e cols., "Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins", Wiley, 1998; e Misener, e cols.,

(eds.), "Bioinformatics Methods and Protocols" ("Methods in Molecular Biology", Vol. 132), Humana Press, 1999. Além da identificação de seqüências idênticas, os programas mencionados acima tipicamente fornecem uma indicação do grau de identidade. Em algumas modalidades, duas seqüências são consideradas como sendo substancialmente idênticas caso pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de seus resíduos correspondentes sejam idênticos ao longo de um trecho relevante de resíduos. Em algumas modalidades, o trecho relevante é uma seqüência completa. Em algumas modalidades, o trecho relevante tem pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 ou mais resíduos.

[054] "*Que sofre de*": Um indivíduo que esteja "sofrendo de" uma doença, distúrbio ou condição (por exemplo, infecção por HCMV) foi diagnosticado com e/ou exibe um ou mais sintomas da doença, distúrbio ou condição.

[055] "*Suscetível a*": Um indivíduo que é "suscetível a" uma doença, distúrbio ou condição (por exemplo, infecção por HCMV) está em risco para o desenvolvimento da doença, distúrbio ou condição. Em algumas modalidades, um indivíduo que é suscetível a uma doença, distúrbio ou condição não exibe nenhum sintoma da doença, distúrbio ou condição. Em algumas modalidades, um indivíduo que é suscetível a uma doença, distúrbio ou condição não foi diagnosticado com a doença, distúrbio e/ou condição. Em algumas modalidades, um indivíduo que é suscetível a uma doença, distúrbio ou condição é um indivíduo que foi exposto às condições

associadas ao desenvolvimento da doença, distúrbio ou condição (por exemplo, o indivíduo foi exposto ao HCMV).

[056] "*Os sintomas são reduzidos*": De acordo com a presente invenção, "sintomas são reduzidos" quando um ou mais sintomas de uma doença, distúrbio ou condição particular são reduzidos em magnitude (por exemplo, intensidade, severidade etc.) ou frequência. Para fins de clareza, um retardo no surgimento de um sintoma particular é considerado uma forma de redução da frequência daquele sintoma. Deseja-se que a presente invenção seja limitada apenas aos casos nos quais os sintomas são eliminados. A presente invenção especificamente contempla o tratamento em que um ou mais sintomas são reduzidos (e a condição do indivíduo é, assim, "melhorada"), apesar de não completamente eliminados.

[057] *Quantidade terapeuticamente eficaz*: Como aqui usado, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz" se refere a uma quantidade suficiente para conferir um efeito terapêutico no indivíduo tratado, em uma proporção risco/benefício razoável aplicável a qualquer tratamento médico. O efeito terapêutico pode ser objetivo (ou seja, mensurável por algum teste ou marcador) ou subjetivo (ou seja, o indivíduo dá uma indicação ou sente um efeito). Em particular, a "quantidade terapeuticamente eficaz" se refere a uma quantidade de uma proteína ou composição terapêutica eficaz para tratar, melhorar ou evitar uma doença ou condição desejada, ou para exibir um efeito terapêutico ou preventivo detectável, por exemplo, por melhora de sintomas associados à doença, prevenção ou retardo do surgimento da doença, e/ou também redução da

severidade ou frequência de sintomas da doença. Uma quantidade terapêuticamente eficaz é comumente administrada em um regime de dosagem que pode compreender múltiplas doses unitárias. Para qualquer composição imunogênica particular, uma quantidade terapêuticamente eficaz (e/ou uma dose unitária apropriada dentro de um regime de dosagem eficaz) pode variar, por exemplo, dependendo da via de administração, da combinação com outros agentes farmacêuticos. Além disso, a quantidade terapêuticamente eficaz (e/ou dose unitária) específica para qualquer paciente particular pode depender de diversos fatores, incluindo do distúrbio que está sendo tratado e da severidade do distúrbio; da atividade do agente farmacêutico específico empregado; da composição específica empregada; da idade, peso corporal, saúde geral, sexo e dieta do paciente; do momento da administração, da via de administração, e/ou da taxa de excreção ou metabolismo da composição imunogênica específica empregada; da duração do tratamento; e fatores semelhantes, como é bem conhecido nas técnicas médicas.

[058] *Domínio transmembrana*: Como é conhecido na técnica, polipeptídeos algumas vezes possuem domínios transmembrana, citoplasmáticos e/ou extracelulares. Em geral, um "domínio transmembrana", como aqui usado, se refere a um domínio que possui um atributo de estar presente na membrana (por exemplo, que transpõe uma porção ou toda uma membrana celular). Como será observado, não é necessário que cada aminoácido em um domínio transmembrana esteja presente na membrana. Por exemplo, em algumas modalidades, um domínio transmembrana é caracterizado pelo

fato de que um trecho ou porção designada de uma proteína está substancialmente localizada na membrana. Como é bem conhecido na técnica, seqüências de aminoácidos ou de ácidos nucléicos podem ser analisadas usando diversos algoritmos para prever a localização subcelular de proteína (por exemplo, transmembrana localização). Programas desse tipo exemplares incluem Psort (PSORT.org), Prosite (prosite.expasy.org), entre outros.

[059] *Tratamento*: Como aqui usado, o termo "tratamento" (também "tratar" ou "que trata") se refere a qualquer administração de uma composição imunogênica que, parcial ou completamente, alivia, melhora, reduz, inibe, retarda o surgimento de, reduz a severidade de e/ou reduz a incidência de um ou mais sintomas ou características de uma doença, distúrbio e/ou condição particular (por exemplo, infecção por HCMV) ou a predisposição à doença. Esse tratamento pode ser de um indivíduo que não exhibe sinais da doença, distúrbio e/ou condição relevante e/ou de um indivíduo que exhibe apenas sinais iniciais da doença, distúrbio e/ou condição. Alternativa ou adicionalmente, esse tratamento pode ser de um indivíduo que exhibe um ou mais sinais estabelecidos da doença, distúrbio e/ou condição relevante. Em certas modalidades, o termo "que trata" se refere à vacinação de um paciente.

[060] *Vacinação*: Como aqui usado, o termo "vacinação" se refere à administração de uma composição destinada a gerar uma resposta imune, por exemplo, a um agente causador de doença (por exemplo, HCMV). Para os objetivos da presente invenção, a vacinação pode ser administrada antes, durante e/ou depois da exposição a um agente causador de

doença e, em certas modalidades, antes, durante e/ou logo depois da exposição ao agente. Em algumas modalidades, vacinação inclui múltiplas administrações, apropriadamente espaçadas no tempo, de uma composição de vacinação.

[061] *Vetor*. Como aqui usado, "vetor" se refere a uma molécula de ácido nucléico que pode transportar outro ácido nucléico ao qual está associado. Em algumas modalidades, vetores são capazes de replicação extracromossômica e/ou expressão de ácidos nucléicos aos quais estão ligados em uma célula hospedeira como, por exemplo, uma célula eucariótica e/ou procariótica. Vetores capazes de dirigir a expressão de genes ligados operacionalmente são aqui denominados "vetores de expressão".

#### **Descrição detalhada de certas modalidades**

[062] Entre outras coisas, a presente invenção fornece métodos e composições úteis para profilaxia, tratamento, e/ou estudo de infecção pelo citomegalovírus humano (HCMV). Em algumas modalidades, a presente invenção fornece partículas vírus-*like* (VLPs) que compreendem uma ou mais proteínas centrais do vírus da leucemia murina de Moloney (MMLV) e incluem um ou mais epítopos do HCMV como, por exemplo, de glicoproteínas do envelope gB e/ou gH e/ou proteína do tegumento pp65 do HCMV. Entre outras coisas, a presente invenção engloba o reconhecimento de que uma combinação de antígenos (por exemplo, glicoproteínas do envelope e proteínas estruturais) pode levar à indução aumentada de respostas imunes benéficas, por exemplo, que incluem tanto uma resposta humoral (por exemplo, produção de anticorpos neutralizantes) quanto uma resposta celular (por exemplo, ativação de célula T). As VLPs fornecidas

podem ser caracterizadas pelo fato de não conter RNA ou DNA viral e serem não infecciosas. Em algumas modalidades, as VLPs fornecidas contêm RNA ou DNA viral e são infecciosas. Em algumas dessas modalidades, as VLPs fornecidas são úteis como uma vacina de DNA.

[063] Em algumas modalidades, a resposta imune humoral em um indivíduo é sustentada por pelo menos cerca de 1 mês, pelo menos cerca de 2 meses, pelo menos cerca de 3 meses, pelo menos cerca de 4 meses, pelo menos cerca de 5 meses, pelo menos cerca de 6 meses, pelo menos cerca de 7 meses, pelo menos cerca de 8 meses, pelo menos cerca de 9 meses, pelo menos cerca de 10 meses, pelo menos cerca de 11 meses, pelo menos cerca de 12 meses, pelo menos cerca de 13 meses, pelo menos cerca de 14 meses, pelo menos cerca de 15 meses, pelo menos cerca de 16 meses, pelo menos cerca de 17 meses, pelo menos cerca de 18 meses, pelo menos cerca de 19 meses, pelo menos cerca de 20 meses, pelo menos cerca de 21 meses, pelo menos cerca de 22 meses, pelo menos cerca de 23 meses, pelo menos cerca de 24 meses, pelo menos cerca de 28 meses, pelo menos cerca de 32 meses, pelo menos cerca de 36 meses, pelo menos cerca de 40 meses, pelo menos cerca de 44 meses, pelo menos cerca de 48 meses, ou mais tempo. Em algumas modalidades, a resposta imune celular em um indivíduo é sustentada por pelo menos cerca de 1 mês, pelo menos cerca de 2 meses, pelo menos cerca de 3 meses, pelo menos cerca de 4 meses, pelo menos cerca de 5 meses, pelo menos cerca de 6 meses, pelo menos cerca de 7 meses, pelo menos cerca de 8 meses, pelo menos cerca de 9 meses, pelo menos cerca de 10 meses, pelo menos cerca de 11 meses ou pelo menos 12 meses.

[064] Em algumas modalidades, as VLPs fornecidas são circundadas por uma membrana lipídica, contendo opcionalmente um ou mais epitopos de glicoproteínas do envelope viral (por exemplo, gB e/ou gH) que são antígenos que participam na indução de anticorpos neutralizantes de vírus.

[065] Em algumas modalidades, as VLPs fornecidas contêm um ou mais epitopos de proteínas virais estruturais (por exemplo, pp65) que são antígenos que participam na indução de respostas imunes celulares (por exemplo, resposta de células T). Em algumas modalidades, as proteínas virais estruturais utilizadas (por exemplo, pp65) tanto estimulam formação de células T helper (TH) quanto tanto induzem linfócitos T citotóxicos (CTL) contra HCMV.

[066] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece variantes de glicoproteínas do envelope viral (por exemplo, gB e/ou gH). Em algumas modalidades, uma glicoproteína do envelope viral variante é ou compreende uma proteína de fusão. Em algumas modalidades, uma variante de uma glicoproteína viral compreende um domínio de proteína heterólogo (por exemplo, um domínio transmembrana e/ou citoplasmático de uma proteína diferente). Em algumas modalidades, uma variante de uma proteína viral estrutural compreende um antígeno ou epitopo heterólogo. Em algumas modalidades, a presente invenção fornece VLPs que compreendem variantes de proteínas virais estruturais. Em algumas modalidades, uma variante de uma proteína viral estrutural é ou compreende uma proteína de fusão.

#### **I. Partículas vírus-like (VLPs)**

[067] Retrovírus são vírus de RNA envelopados que

pertencem à família *Retroviridae*. Após infecção de uma célula hospedeira por um retrovírus, o RNA é transcrito em DNA por meio da enzima transcriptase reversa. O DNA é então incorporado no genoma da célula hospedeira por uma enzima integrase e a seguir replica como parte do DNA da célula hospedeira. A família *Retroviridae* inclui os seguintes gêneros: *Alfa-retrovírus*, *Beta-retrovírus*, *Gama-retrovírus*, *Delta-retrovírus*, *Épsilon-retrovírus*, *Lentivírus* e *Espumavírus*. Os hospedeiros para essa família de retrovírus geralmente são vertebrados. Retrovírus produzem um vírion infeccioso que contém um nucleocapsídeo esférico (o genoma viral em complexo com proteínas virais estruturais) circundado por uma bicamada lipídica derivada da membrana da célula hospedeira.

[068] Vetores retrovirais podem ser usados para gerar vírions envelopados que são infecciosos e replicação-competentes ou replicação-defeituosos. Vetores retrovirais infecciosos replicação-competentes contêm todos os genes necessários para síntese de vírion e continuam a se autopropagar após ocorrer infecção da célula hospedeira. Vetores retrovirais infecciosos replicação-defeituosos não se espalham após a infecção inicial. Isso é obtido por substituição da maioria das regiões codificadoras do retrovírus com genes ou seqüências de nucleotídeos a serem transferidos, de tal forma que o vetor seja incapaz de produzir proteínas necessárias para rodadas adicionais de replicação.

[069] Alternativa ou adicionalmente, vetores retrovirais podem ser usados para gerar partículas vírus-like (VLPs) que não possuem um genoma derivado de

retrovírus e são tanto não infecciosos quanto não replicantes. Por causa das propriedades vantajosas das VLPs, as VLPs podem ser utilizadas como um sistema de liberação de antígeno. Além disso, como as VLPs são não infecciosas, elas podem ser administradas seguramente como uma composição imunogênica (por exemplo, uma vacina). VLPs são geralmente estruturalmente similares aos vírions envelopados descritos acima, mas não possuem um genoma derivado de retrovírus, tornando improvável que a replicação viral ocorra. A expressão de proteínas do capsídeo (por exemplo, Gag) de alguns vírus (por exemplo, vírus da leucemia murina, por exemplo, o vírus da leucemia murina de Moloney (MMLV)) leva à automontagem em partículas similares ao vírus nativo correspondente, cujas partículas são livres de material genético viral.

[070] Uma ampla variedade de VLPs foi preparada. Por exemplo, VLPs que incluem uma única ou múltiplas proteínas do capsídeo com ou sem proteínas do envelope e/ou glicoproteínas de superfície foram preparadas. Em alguns casos, VLPs são não envelopadas e se montam por expressão de apenas uma proteína principal do capsídeo, como mostrado para VLPs preparadas a partir de hepadnavírus (por exemplo, Engerix™, GSK e Recombivax HB™, Merck), papilomavírus (por exemplo, Cervarix™, GSK e Gardasil™, Merck), parvovírus ou poliomavírus. Em algumas modalidades, VLPs são envelopadas e podem compreender múltiplas proteínas antigênicas encontradas no vírus nativo correspondente. VLPs tipicamente se parecem com seu vírus nativo correspondente e podem ser estruturas particuladas multivalentes. Em algumas modalidades, proteínas antigênicas podem ser

apresentadas internamente dentro da VLP, como um componente da estrutura da VLP, e/ou sobre a superfície da VLP. A presente invenção engloba o reconhecimento de que a apresentação de um antígeno no contexto de uma VLP é vantajosa para indução de anticorpos neutralizantes contra o antígeno, quando comparada com outras formas de apresentação de antígeno, por exemplo, antígenos solúveis não associados a uma VLP. Anticorpos neutralizantes mais freqüentemente reconhecem estruturas terciárias ou quaternárias; isso freqüentemente exige a apresentação de proteínas antigênicas, como glicoproteínas do envelope, em sua conformação viral nativa. Alternativa ou adicionalmente, VLPs podem ser úteis para apresentação de antígenos em um contexto que induz imunidade celular (por exemplo, resposta de célula T). A presente invenção ainda engloba a percepção de que o uso de combinações de antígenos em sistemas de VLP pode gerar resposta imune aumentada.

#### **A. Proteínas estruturais**

[071] Em algumas modalidades, a presente invenção utiliza VLPs compostas por uma ou mais proteínas estruturais retrovirais (por exemplo, Gag). Em algumas modalidades, uma proteína estrutural para uso de acordo com a presente invenção é proteína estrutural de Alfa-retrovírus (por exemplo, vírus da leucose aviária), Beta-retrovírus (vírus do tumor mamário do camundongo), Gama-retrovírus (vírus da leucemia murina), Delta-retrovírus (vírus da leucemia bovina), Épsilon-retrovírus (vírus do sarcoma dérmico de Walley), Lentivírus (vírus da imunodeficiência humana 1) ou Espumavírus (vírus espumoso

do chimpanzé). Em certas modalidades, uma poliproteína estrutural é uma proteína estrutural do vírus da leucemia murina (MLV). Genomas desses retrovírus são facilmente disponíveis em bases de dados. Os genes de Gag de todos esses retrovírus possuem uma similaridade estrutural global e dentro de cada grupo de retrovírus estão conservados no nível de aminoácido. Proteínas Gag retrovirais primariamente funcionam na montagem viral. O gene de Gag na forma de uma poliproteína dá origem às proteínas estruturais centrais da VLP. O gene de Gag de MLV codifica um precursor de poliproteína de 65 kDa que é clivado proteoliticamente em 4 proteínas estruturais (Matriz (MA); p12; Capsídeo (CA); e Nucleocapsídeo (NC)), por MLV protease, no vírion maduro. Retrovírus montam capsídeo imaturo composto pela poliproteína Gag formada a partir do polipeptídeo Gag, mas desprovido de outros elementos virais como protease viral com Gag como a proteína estrutural da partícula do vírus imaturo. Funcionalmente, a poliproteína Gag é dividida em três domínios: o domínio de ligação de membrana, que direciona a poliproteína Gag à membrana celular; o domínio de interação que promove polimerização de Gag; e o domínio tardio que facilita a liberação de vírions nascentes pela célula hospedeira. A forma da proteína Gag que medeia a montagem da partícula viral é a poliproteína.

[072] Em algumas modalidades, uma proteína estrutural retroviral para uso de acordo com a presente invenção é um polipeptídeo Gag. Como aqui usado, o termo "polipeptídeo Gag" é o polipeptídeo estrutural derivado de retrovírus que é responsável pela formação das VLPs aqui descritas e se

refere a uma seqüência polipeptídica cuja seqüência de aminoácidos inclui pelo menos uma seqüência característica de Gag. Uma ampla variedade de seqüências de Gag de vários retrovírus é conhecida na técnica, e aqueles habilitados na técnica, em relação a essas seqüências, podem facilmente identificar seqüências que são características de proteínas Gag geralmente, e/ou de polipeptídeos Gag particulares.

[073] Um polipeptídeo Gag exemplar para uso de acordo com a presente invenção é mostrado como SEQ ID NO: 1 abaixo. Em algumas modalidades, um polipeptídeo Gag adequado é substancialmente homólogo a um polipeptídeo Gag retroviral conhecido. Por exemplo, um polipeptídeo Gag pode ser um polipeptídeo Gag retroviral modificado contendo uma ou mais substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos, quando comparado com um polipeptídeo Gag do tipo selvagem ou de ocorrência natural (por exemplo, SEQ ID NO: 1) retendo, ao mesmo tempo, atividade de automontagem substancial. Dessa forma, em algumas modalidades, um polipeptídeo Gag adequado à presente invenção é substancialmente homólogo a um polipeptídeo Gag de MMLV (SEQ ID NO: 1). Em algumas modalidades, um polipeptídeo Gag adequado à presente invenção possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais homóloga ao SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, um polipeptídeo Gag adequado à presente invenção é substancialmente idêntico a um polipeptídeo Gag de MMLV (SEQ ID NO: 1). Em algumas modalidades, um polipeptídeo Gag adequado à presente invenção possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%,

85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica ao SEQ ID NO: 1.

**Seqüência de aminoácidos de Gag de MMLV (SEQ ID NO: 1)**

MGQTVTTPLSLTLGHWKTJVEPJAFINQSV DVKKRRVWTFCSAEWPTFNVGWPRDGTFN  
 RDLITQVKIKVFSPPGPHGHPDQVPYIVTWEALAFDPPPWVKPFVHPKPPPPLPPSAPSL  
 PLEPPRSTPPRSSLYPALTPSLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLLEDPPPYPDRPPPSDR  
 DNGGGEATPAGEAPDPSMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQYWPFSSSD  
 LYNWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQLLGTLLTGEEKQRVLLEARKA  
 VRGDDGRPTQLPNEVDAAFPLEPDWDYTTQAGRNHLVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNLA  
 KVKGITQGPNESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSAPDIGRKLER  
 LEDLKKTLGLDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEERRRTEDEQKEKERDRRRH  
 REMSKLLATVVSGQKQDRQGGERRRSQLD RDQCAYCKEKGHWAKDCPKKPRGPRGPRPQ  
 TSLTLDD (SEQ ID NO: 1)

**Seqüência de nucleotídeos de Gag de MMLV (SEQ ID NO: 2)**

ATGGGCCAGACTGTTACCACTCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCCTGGAAAGATGTCGA  
 GCGGATCGCTCACAACCAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTTACCTTCTGCT  
 CTGCAGAATGGCCAACCTTTAACGTCGGATGGCCGCGAGACGGCACCTTTAACCGAGAC  
 CTCATCACCCAGGTTAAGATCAAGGTCTTTTCACCTGGCCCGCATGGACACCCAGACCA  
 GGTCCCCTACATCGTGACCTGGGAAGCCTTGGCTTTTGACCCCCCTCCCTGGGTCAAGC  
 CCTTTGTACACCCTAAGCCTCCGCTCCTCTTCCATCCGCCCCGTCTCTCCCCCTT  
 GAACCTCCTCGTTCGACCCCGCCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCTCACTCCTTCTCT  
 AGGCGCCAAACCTAAACCTCAAGTTCTTTCTGACAGTGGGGGGCCGCTCATCGACCTAC  
 TTACAGAAGACCCCCGCCTTATAGGGACCCAAGACCACCCCTTCCGACAGGGACGGA  
 AATGGTGGAGAAGCGACCCCTGCGGGAGAGGCACCGGACCCCTCCCAATGGCATCTCG  
 CCTACGTGGGAGACGGGAGCCCCCTGTGGCCGACTCCACTACCTCGCAGGCATTCCCCC  
 TCCGCGCAGGAGGAAACGGACAGCTTCAATACTGGCCGTTCTCCTCTTCTGACCTTTAC  
 AACTGGAAAAATAATAACCCTTCTTTTTCTGAAGATCCAGGTAAACTGACAGCTCTGAT  
 CGAGTCTGTTCTCATCACCCATCAGCCACCTGGGACGACTGTCAGCAGCTGTTGGGGA  
 CTCTGCTGACCGGAGAAGAAAAACAACGGGTGCTCTTAGAGGCTAGAAAGGCGGTGCGG  
 GGCGATGATGGGCGCCCCACTCAACTGCCCAATGAAGTCGATGCCGCTTTTCCCCTCGA

GCGCCCAGACTGGGATTACACCACCCAGGCAGGTAGGAACCACCTAGTCCACTATCGCC  
AGTTGCTCCTAGCGGGTCTCCAAAACGCGGGCAGAAGCCCCACCAATTTGGCCAAGGTA  
AAAGGAATAACACAAGGGCCCAATGAGTCTCCCTCGGCCTTCCTAGAGAGACTTAAGGA  
AGCCTATCGCAGGTACTCCTTATGACCCTGAGGACCCAGGGCAAGAACTAATGTGT  
CTATGTCTTTTCAATTTGGCAGTCTGCCCCAGACATTGGGAGAAAGTTAGAGAGGTTAGAA  
GATTTAAAAACAAGACGCTTGGAGATTTGGTTAGAGAGGCAGAAAAGATCTTTAATAA  
ACGAGAAACCCCGGAAGAAAGAGAGGAACGTATCAGGAGAGAAACAGAGGAAAAAGAAG  
AACGCCGTAGGACAGAGGATGAGCAGAAAGAGAAAGAGATCGTAGGAGACATAGA  
GAGATGAGCAAGCTATTGGCCACTGTCGTTAGTGGACAGAAACAGGATAGACAGGGAGG  
AGAACGAAGGAGGTCCCAACTCGATCGCGACCAGTGTGCCTACTGCAAAGAAAAGGGGC  
ACTGGGCTAAAGATTGTCCCAAGAAACCACGAGGACCTCGGGGACCAAGACCCAGACC  
TCCCTCCTGACCCTAGATGAC (SEQ ID NO: 2)

**Seqüência de nucleotídeos códon-otimizada de Gag de  
MLLV (SEQ ID NO: 3)**

ATGGGACAGACAGTCACTACACCCCTGAGCCTGACACTGGGACATTGGAAAGACGTGGA  
GAGGATTGCACATAACCAGAGCGTGGACGTGAAGAAACGGAGATGGGTACCTTTTGTCT  
CCGCCGAGTGGCCAACATTCAATGTGGGATGGCCCCGAGATGGCACCTTCAACCGGGAC  
CTGATCACTCAGGTGAAGATCAAGGTCTTCTCTCCAGGACCCACGGCCATCCAGATCA  
GGTGCCCTACATCGTCACCTGGGAGGCTCTGGCATTGACCCCCCTCCATGGGTGAAGC  
CTTTCGTCCACCCAAAACCACCTCCACCACTGCCTCCATCTGCCCCTAGTCTGCCACTG  
GAACCCCTCGGTCAACCCACCCAGAAGCTCCCTGTATCCCGCACTGACACCTAGCCT  
GGGGCCAAGCCTAAACCACAGGTGCTGTCTGATAGTGGCGGGCCTCTGATCGATCTGC  
TGACCGAGGACCCTCCACCATAACCGCGACCCACGACCTCCACCAAGCGACCGGGACGGA  
AACGGAGGAGAGGCTACACCCGCAGGCGAAGCCCCGATCCTAGTCCAATGGCATCAAG  
GCTGCGCGGGAGGCGGAACCTCCAGTGGCCGACTCAACCACAAGCCAGGCATTTCCAC  
TGAGGGCCGGGGAAATGGACAGCTCCAGTATTGGCCCTTCTCTAGTTCAGATCTGTAC  
AACTGGAAGAACAATAACCCTAGCTTCAGCGAGGACCCAGGCAAACCTGACCGCCCTGAT  
CGAATCCGTGCTGATTACCCACCAGCCACATGGGACGATTGTCAGCAGCTCCTGGGCA  
CCCTGCTGACCGGAGAGGAAAAGCAGAGAGTGTGCTGGAGGCTAGGAAAGCAGTCCGC  
GGGGACGATGGAAGGCCAACACAGCTCCCCAATGAGGTGGATGCCGCTTTCCTCTGGA

ACGGCCAGATTGGGACTATACTACCCAGGCTGGACGCAACCACCTGGTGCATTACCGGC  
AGCTCCTGCTGGCTGGACTGCAGAATGCAGGGCGCAGCCCCACTAACCTGGCCAAGGTG  
AAAGGAATCACCCAGGGCCCCAATGAGTCCCCTTCTGCATTCTGGAGCGGCTGAAGGA  
AGCCTACCGACGGTATACTCCCTACGATCCTGAGGACCCAGGCCAGGAAACCAACGTGA  
GTATGAGCTTCATCTGGCAGTCCGCTCCTGACATTGGCCGAAAACCTGGAGCGGCTGGAA  
GATCTGAAGAACAAGACCCTGGGCGACCTGGTGCGGGAGGCAGAAAAGATCTTCAACAA  
AAGGGAGACTCCAGAGGAACGGGAGGAAAGAATTAGAAGGGAAACAGAGGAAAAGGAGG  
AACGCCGACGGACTGAGGATGAACAGAAGGAGAAAGAAAGAGACCGGCGGCGGCACCGG  
GAGATGTCTAAGCTGCTGGCCACCGTGGTCAGTGGCCAGAAACAGGATCGACAGGGAGG  
AGAGCGACGGAGAAGCCAGCTCGATCGGGACCAGTGCGCCTATTGTAAGGAAAAAGGGC  
ATTGGGCTAAGGACTGCCCAAGAAACCCAGAGGCCACGCGGGCCCCGACCTCAGACT  
TCCCTGCTGACCCTGGACGAT (SEQ ID NO: 3)

**Seqüência de nucleotídeos códon-otimizada de Gag de  
MLLV (SEQ ID NO: 21)**

ATGGGACAGACCGTCACAACACCCCTGAGCCTGACCCTGGGACATTGGAAAGACGTGGA  
GAGGATCGCACATAACCAGAGCGTGGACGTGAAGAAACGGAGATGGGTACATTCTGCA  
GTGCTGAGTGGCCAACTTTTAATGTGGGATGGCCCCGAGACGGCACTTTCAACAGGGAT  
CTGATCACCCAGGTGAAGATCAAGGTCTTTAGCCCAGGACCTCACGGACATCCAGACCA  
GGTGCCTTATATCGTCACCTGGGAGGCACTGGCCTTCGATCCCCCTCCATGGGTGAAGC  
CATTTGTCCACCCAAAACACCTCCACCACTGCCTCCAAGTGGCCCTTCACTGCCACTG  
GAACCACCCCGGAGCACACCACCCCGCAGCTCCCTGTATCCTGCTCTGACTCCATCTCT  
GGGCGCAAAGCCAAAACACAGGTGCTGAGCGACTCCGGAGGACCACTGATTGACCTGC  
TGACAGAGGACCCCCACCATAACCGAGATCCTCGGCCTCCACCAAGCGACCGCGATGGA  
AATGGAGGAGAGGCTACTCCTGCCGGCGAAGCCCCTGACCCATCTCCAATGGCTAGTAG  
GCTGCGCGGCAGGCGGAGCCTCCAGTGGCAGATAGCACACATCCAGGCCTTCCCTC  
TGAGGGCTGGGGGAAATGGGCAGCTCCAGTATTGGCCATTTTCTAGTTCAGACCTGTAC  
AACTGGAAGAACAATAACCCCTCTTTCAGTGAGGACCCCGCAAACCTGACCGCCCTGAT  
CGAATCCGTGCTGATTACCCATCAGCCCACATGGGACGATTGTCAGCAGCTCCTGGGCA  
CCCTGCTGACCGGAGAGGAAAAGCAGCGCGTGTGCTGGAGGCTCGCAAAGCAGTCCGA  
GGGGACGATGGACGGCCACACAGCTCCCTAATGAGGTGGACGCCGCTTTTCCACTGGA

AAGACCCGACTGGGATTATACTACCCAGGCAGGGAGAAACCACCTGGTCCATTACAGGC  
AGCTCCTGCTGGCAGGCCTGCAGAATGCCGGGAGATCCCCACCAACCTGGCCAAGGTG  
AAAGGCATCACACAGGGGCTAATGAGTCACCAAGCGCCTTTCTGGAGAGGCTGAAGGA  
AGCTTACCGACGGTATACCCATACGACCCTGAGGACCCCGGACAGGAAACAAACGTCT  
CCATGTCTTTCATCTGGCAGTCTGCCCCAGACATTGGGCGGAAGCTGGAGAGACTGGAA  
GACCTGAAGAACAAGACCCTGGGCGACCTGGTGCGGGAGGCTGAAAAGATCTTCAACAA  
ACGGGAGACCCCCGAGGAAAGAGAGGAAAGGATTAGAAGGGAAACTGAGGAAAAGGAGG  
AACGCCGACGGACCGAGGACGAACAGAAGGAGAAAGAACGAGATCGGCGGCGGCACCGG  
GAGATGTCAAAGCTGCTGGCCACCGTGGTCAGCGGACAGAAACAGGACAGACAGGGAGG  
AGAGCGACGGAGAAGCCAGCTCGACAGGGATCAGTGCGCATACTGTAAGGAAAAAGGCC  
ATTGGGCCAAGGATTGCCCCAAAAAGCCAAGAGGACCAAGAGGACCAAGACCACAGACA  
TCACTGCTGACCCTGGACGAC (SEQ ID NO: 21)

[074] Tipicamente, na natureza, uma proteína Gag inclui uma extensão grande do terminal C que pode conter protease retroviral, transcriptase reversa e atividade enzimática de integrase. A montagem de VLPs, no entanto, geralmente não necessita da presença desses componentes. Em alguns casos, uma proteína Gag retroviral isoladamente (por exemplo, desprovida de uma extensão do terminal C, sem um ou mais de RNA genômico, transcriptase reversa, protease viral ou proteína do envelope) pode se automontar para formar VLPs tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Sharma S. e cols., 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10.803-8). A poliproteína Gag retroviral isoladamente pode oligomerizar e se montar em VLPs.

[075] Em algumas modalidades, um polipeptídeo Gag para uso de acordo com a presente invenção não possui uma extensão do terminal C e/ou contém uma extensão do terminal C modificada. Um polipeptídeo Gag pode opcionalmente incluir um ou mais polipeptídeos adicionais (por exemplo,

um antígeno heterólogo). Em algumas modalidades, um polipeptídeo Gag é co-expresso com um antígeno heterólogo (por exemplo, sob promotores separados e/ou como proteínas separadas). Em algumas modalidades, um polipeptídeo Gag é expresso como uma proteína de fusão com um antígeno heterólogo. O polipeptídeo Gag pode estar ligado a um antígeno heterólogo para criar uma proteína de fusão sem alteração da função de Gag. Por exemplo, uma seqüência codificadora para um antígeno heterólogo pode ser unida na seqüência codificadora do polipeptídeo Gag, por exemplo, na extremidade 3' da seqüência codificadora do polipeptídeo Gag. Em algumas modalidades, uma seqüência codificadora para um antígeno heterólogo pode ser unida *in frame* na seqüência codificadora do polipeptídeo Gag. Em algumas modalidades, uma seqüência codificadora de polipeptídeo Gag e o antígeno heterólogo podem ser expressos por um único promotor. Em algumas modalidades, um antígeno heterólogo é inserido (por exemplo, fundido) no terminal C de um polipeptídeo Gag. Sem se prender a uma teoria, acredita-se que a fusão de um polipeptídeo Gag de automontagem a um antígeno heterólogo crie uma proteína de fusão que atue como Gag não modificado e, como resultado, permitiria que o antígeno fosse incorporado nos componentes estruturais de uma VLP resultante. Em algumas modalidades, os componentes estruturais da VLP servem como imunógenos eficazes (por exemplo, para indução de resposta imune celular). Por exemplo, as VLPs fornecidas podem compreender um polipeptídeo Gag retroviral (por exemplo, Gag de MMLV) e um componente estrutural de HCMV (por exemplo, pp65). Em algumas dessas modalidades, pp65 é incorporado na VLP e

serve como um antígeno para despertar uma resposta imune contra HCMV.

[076] Um polipeptídeo de fusão Gag-pp65 exemplar para uso de acordo com a presente invenção é mostrado como o SEQ ID NO: 4 abaixo. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão de polipeptídeo Gag adequada inclui todo ou uma porção de um polipeptídeo Gag que é substancialmente homólogo a um polipeptídeo Gag retroviral conhecido e todo ou uma porção de um polipeptídeo pp65 que é substancialmente homólogo a um polipeptídeo pp65 conhecido. Por exemplo, uma proteína de fusão de polipeptídeo Gag-pp65 pode conter uma ou mais substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos, quando comparado com um polipeptídeo Gag e/ou polipeptídeo pp65 do tipo selvagem ou de ocorrência natural retendo, ao mesmo tempo, atividade de automontagem substancial. Dessa forma, em algumas modalidades, uma proteína de fusão de polipeptídeo Gag-pp65 adequada à presente invenção é substancialmente homóloga ao SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão de polipeptídeo Gag-pp65 adequada à presente invenção possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais homóloga ao SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão de polipeptídeo Gag-pp65 adequada à presente invenção é substancialmente idêntica ao SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão de polipeptídeo Gag-pp65 adequada à presente invenção possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica ao

SEQ ID NO: 4.

**Seqüência de aminoácidos de Gag de MMLV - pp65 de CMV  
(SEQ ID NO: 4)**

**MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNQSV DVKKRRWVTFCSAEWPTFNVGWPRDGTFNRD  
LITQVKIKVFSPPGPHGHPDQVPYIVTWEALAFDPPPWVKPFVHPKPPPPLPPSAPSLPL  
EPPRSTPPRSSLYPALTPSLGAKPKQVLSDSGGPLIDLLEDPPPYRDRPPPSDRDG  
NGGEATPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGNGQLQYWPFFSSDLY  
NWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLIHQPTWDDCQQLLGTLLTGEEKQRVLLLEARKAVR  
GDDGRPTQLPNEVDAAFPLERPDWDYTTQAGRNHLVHYRQLLLAGLQONAGRSPTNLAKV  
KGITQGPNESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSAPDIGRKLERLE  
DLKNKTLGDLVREAEEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEERRRTEDEQKEKERDRRRHR  
EMSKLLATWSGQKQDRQGGERRRSQLDRDQCA YCKEKGHWAKDCPKKPRGPRGPRPQTS  
LLTLDDCESRGRRCPEMISVLGPI SGHVLKAVFSRGDTPVLPHETRLQLTG I HVRVSQP  
SLILVSQYTPDSTPCHRGDNQLQVQHTYFTGSEVENVSVNVHNPTGRSICPSQEPM SIY  
VYALPLKMLNIP SINVHHYPSAAERKHRHLPVADAVIHASGQM WQARLTVSGLAWTRQ  
QNQWKEPDVYYTSAFVFP TKDVALRHVVCAHELVC SMENTRATKMQVIGDQYVKVYLES  
FCEDVPSGKLFMHVTLGSDVEEDLTMTRNPQPFMRPHERNGFTVLC PKMI IKPGKISHI  
MLDVAFTSHEHFGLLCPKSI PGLSISGNLLMNGQQIFLEVQAI RETVELRQYDPVAALF  
FFDIDLLLQRGPQYSEHPTFTS QYRIQ GKLEYRHTWDRHDEGAAQGDDDVWTS GSDSDE  
ELVTTERTKTPRVTGGGAMAGASTSAGRKRKSASSATACTAGVMTRGRLKAESTVAPEED  
TDESDNEIHNPAVFTWPPWQAGILARNLVPMVATVQGQNLKYQEFFWDANDIYRIFAE  
LEGVWQPAAQPKRRRRHRQDALPGPCIASTPKKHRG\* (SEQ ID NO: 4)**

(seqüência de aminoácidos de Gag de MMLV em negrito)

**Seqüência de nucleotídeos de Gag de MMLV - pp65 de CMV  
(SEQ ID NO: 5)**

**ATGGGCCAGACTGTTACCACTCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCACCTGGAAAGATGTCGA  
GCGGATCGCTCACAACCAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTTACCTTCTGCT  
CTGCAGAATGGCCAACCTTTAACGTCGGATGGCCGCGAGACGGCACCTTTAACCGAGAC  
CTCATCACCCAGGTTAAGATCAAGGTCTTTTCACCTGGCCCGCATGGACACCCAGACCA  
GGTCCCCTACATCGTGACCTGGGAAGCCTTGGCTTTTGACCCCCCTCCCTGGGTCAAGC**

CCTTTGTACACCCTAAGCCTCCGCCTCCTCTTCCCTCCATCCGCCCCGTCTCTCCCCCTT  
GAACCTCCTCGTTTCGACCCCGCCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCTCACTCCTTCTCT  
AGGCGCCAAACCTAAACCTCAAGTTCTTTCTGACAGTGGGGGGCCGCTCATCGACCTAC  
TTACAGAAGACCCCCGCCTTATAGGGACCCAAGACCACCCCTTCCGACAGGGACGGA  
AATGGTGGAGAAGCGACCCCTGCGGGAGAGGCACCGGACCCCTCCCAATGGCATCTCG  
CCTACGTGGGAGACGGGAGCCCCCTGTGGCCGACTCCACTACCTCGCAGGCATTCCCC  
TCCGCGCAGGAGGAAACGGACAGCTTCAATACTGGCCGTTCTCCTCTTCTGACCTTTAC  
AACTGGAAAAATAATAACCTTCTTTTTCTGAAGATCCAGGTAAACTGACAGCTCTGAT  
CGAGTCTGTTCTCATCACCCATCAGCCACCTGGGACGACTGTCAGCAGCTGTTGGGGA  
CTCTGCTGACCGGAGAAGAAAAACAACGGGTGCTCTTAGAGGCTAGAAAGGCGGTGCGG  
GGCGATGATGGGCGCCCCACTCAACTGCCCAATGAAGTCGATGCCGCTTTTCCCCTCGA  
GCGCCAGACTGGGATTACACCACCCAGGCAGGTAGGAACCACCTAGTCCACTATCGCC  
AGTTGCTCCTAGCGGGTCTCCAAAACGCGGGCAGAAGCCCCACCAATTTGGCCAAGGTA  
AAAGGAATAACACAAGGGCCCAATGAGTCTCCCTCGGCCTTCCCTAGAGAGACTTAAGGA  
AGCCTATCGCAGGTACTCCTTATGACCCCTGAGGACCCAGGGCAAGAACTAATGTGT  
CTATGTCTTTCATTTGGCAGTCTGCCCCAGACATTGGGAGAAAGTTAGAGAGGTTAGAA  
GATTTAAAAACAAGACGCTTGGAGATTTGGTTAGAGAGGCAGAAAAGATCTTTAATAA  
ACGAGAAACCCCGGAAGAAAGAGAGGAACGTATCAGGAGAGAAACAGAGGAAAAAGAAG  
AACGCCGTAGGACAGAGGATGAGCAGAAAGAGAAAGAGATCGTAGGAGACATAGA  
GAGATGAGCAAGCTATTGGCCACTGTCGTTAGTGGACAGAAACAGGATAGACAGGGAGG  
AGAACGAAGGAGGTCCCAACTCGATCGCGACCAGTGTGCCTACTGCAAAGAAAAGGGGC  
ACTGGGCTAAAGATTGTCCCAAGAAACCACGAGGACCTCGGGGACCAAGACCCAGACC  
TCCCTCCTGACCCTAGATGACTGTGAGTCGCGCGGTCCCGTTGTCCCGAAATGATATC  
CGTACTGGGTCCCATTTTCGGGGCACGTGCTGAAAGCCGTGTTTAGTCGCGGGCGACACGC  
CGGTGCTGCCGCACGAGACGCGACTCCTGCAGACGGGTATCCACGTGCGCGTGAGCCAG  
CCCTCGCTGATCCTGGTGTGCGAGTACACGCCCCGACTCGACGCCATGCCACCGCGGCGA  
CAATCAGCTGCAGGTGCAGCACACGTACTTTACGGGCAGCGAGGTGGAGAACGTGTCCG  
TCAACGTGCACAACCCACGGGCCGGAGCATCTGCCCCAGCCAAGAGCCCATGTGATC  
TATGTGTACGCGCTGCCGCTCAAGATGCTGAACATCCCCAGCATCAACGTGCACCACTA  
CCCGTCGGCGGCCGAGCGCAAACACCGACACCTGCCCGTAGCTGACGCTGTGATTCAG

CGTCGGGCAAGCAGATGTGGCAGGCGCGTCTCACGGTCTCGGGACTGGCCTGGACGCGT  
 CAGCAGAACCAGTGGAAAGAGCCCGACGTCTACTACACGTCAGCGTTTCGTGTTTCCCAC  
 CAAGGACGTGGCACTGCGGCACGTGGTGTGCGCGCACGAGCTGGTTTGCTCCATGGAGA  
 ACACGCGCGCAACCAAGATGCAGGTGATAGGTGACCAGTACGTCAAGGTGTACCTGGAG  
 TCCTTCTGCGAGGACGTGCCCTCCGGCAAGCTCTTTATGCACGTCACGCTGGGCTCTGA  
 CGTGGAAGAGGACCTGACGATGACCCGCAACCCGCAACCCTTCATGCGCCCCACGAGC  
 GCAACGGCTTTACGGTGTGTGTCCCAAAAATATGATAATCAAACCGGGCAAGATCTCG  
 CACATCATGCTGGATGTGGCTTTTACCTCACACGAGCATTTTGGGCTGCTGTGTCCCAA  
 GAGCATCCCGGGCCTGAGCATCTCAGGTAACCTATTGATGAACGGGCAGCAGATCTTCC  
 TGGAGGTGCAAGCGATACGCGAGACCGTGGAACTGCGTCAGTACGATCCCGTGGCTGCG  
 CTCTTCTTTTTTCGATATCGACTTGCTGCTGCAGCGCGGGCCTCAGTACAGCGAACACCC  
 CACCTTCACCAGCCAGTATCGCATCCAGGGCAAGCTTGAGTACCGACACACCTGGGACC  
 GGCACGACGAGGGTGCCGCCAGGGCGACGACGACGTCTGGACCAGCGGATCGGACTCC  
 GACGAGGAACTCGTAACCACCGAGCGCAAGACGCCCCGCGTTACCGGCGGCGGCCAT  
 GCGGGGCGCCTCCACTTCCGCGGGCCGCAAACGCAAATCAGCATCCTCGGCGACGGCGT  
 GCACGGCGGGCGTTATGACACGCGGCCGCTTAAGGCCGAGTCCACCGTCGCGCCCGAA  
 GAGGACACCGACGAGGATTCCGACAACGAAATCCACAATCCGGCCGTGTTACCTGGCC  
 GCCCTGGCAGGCCGGCATCCTGGCCCGCAACCTGGTGCCCATGGTGGCTACGGTTCAGG  
 GTCAGAATCTGAAGTACCAGGAGTTCTTCTGGGACGCCAACGACATCTACCGCATCTTC  
 GCCGAATTGGAAGGCGTATGGCAGCCCGCTGCGCAACCCAAACGTGCGCCGCCACCGGCA  
 AGACGCCTTGCCCGGGCCATGCATCGCCTCGACGCCCAAAAAGCACCGAGGTTAG

(SEQ ID NO: 5) (seqüência de nucleotídeos de Gag de MMLV em  
 negrito)

**Seqüência de nucleotídeos de Gag de MMLV - pp65 de CMV  
 códon-otimizada (SEQ ID NO: 6)**

**ATGGGACAGACAGTCACTACACCCCTGAGCCTGACACTGGGACATTGGAAAGACGTGGA  
 GAGGATTGCACATAACCAGAGCGTGGACGTGAAGAAACGGAGATGGGTACCTTTTGCT  
 CCGCCGAGTGGCCAACATTCAATGTGGGATGGCCCCGAGATGGCACCTTCAACCGGGAC  
 CTGATCACTCAGGTGAAGATCAAGGTCTTCTCTCCAGGACCCACGGCCATCCAGATCA  
 GGTGCCCTACATCGTCACCTGGGAGGCTCTGGCATTGACCCCCCTCCATGGGTGAAGC**

CTTTTCGTCCACCCAAAACCACCTCCACCCTGCCTCCATCTGCCCTAGTCTGCCACTG  
GAACCCCTCGGTCAACCCACCCAGAAGCTCCCTGTATCCCGCACTGACACCTAGCCT  
GGGGCCAAGCCTAAACCACAGGTGCTGTCTGATAGTGGCGGGCCTCTGATCGATCTGC  
TGACCGAGGACCCTCCACCATACCGCGACCCACGACCTCCACCAAGCGACCGGGACGGA  
AACGGAGGAGAGGCTACACCCGCAGGCGAAGCCCCGATCCTAGTCCAATGGCATCAAG  
GCTGCGCGGGAGGCGGAACCTCCAGTGGCCGACTCAACCACAAGCCAGGCATTTCCAC  
TGAGGGCCGGGGAAATGGACAGCTCCAGTATTGGCCCTTCTCTAGTTCAGATCTGTAC  
AACTGGAAGAACAATAACCTAGCTTCAGCGAGGACCCAGGCAAACCTGACCGCCCTGAT  
CGAATCCGTGCTGATTACCCACCAGCCACATGGGACGATTGTCAGCAGCTCCTGGGCA  
CCCTGCTGACCGGAGAGGAAAAGCAGAGAGTGCTGCTGGAGGCTAGGAAAGCAGTCCGC  
GGGACGATGGAAGGCCAACACAGCTCCCAATGAGGTGGATGCCGCTTTCCTCTGGA  
ACGGCCAGATTGGGACTATACTACCCAGGCTGGACGCAACCACCTGGTGCATTACCGGC  
AGCTCCTGCTGGCTGGACTGCAGAATGCAGGGCGCAGCCCCACTAACCTGGCCAAGGTG  
AAAGGAATCACCCAGGGCCCCAATGAGTCCCCTTCTGCATTCTGGAGCGGCTGAAGGA  
AGCCTACCGACGGTATACTCCCTACGATCCTGAGGACCCAGGCCAGGAAACCAACGTGA  
GTATGAGCTTCATCTGGCAGTCCGCTCCTGACATTGGCCGAAAACCTGGAGCGGCTGGAA  
GATCTGAAGAACAAGACCCTGGGCGACCTGGTGCGGGAGGCAGAAAAGATCTTCAACAA  
AAGGGAGACTCCAGAGGAACGGGAGGAAAGAATTAGAAGGGAAACAGAGGAAAAGGAGG  
AACGCCGACGGACTGAGGATGAACAGAAGGAGAAAGAAAGAGACCGGCGGCGGCACCGG  
GAGATGTCTAAGCTGCTGGCCACCGTGGTCAGTGGCCAGAAACAGGATCGACAGGGAGG  
AGAGCGACGGAGAAGCCAGCTCGATCGGGACCAGTGCGCCTATTGTAAGGAAAAAGGGC  
ATTGGGCTAAGGACTGCCCAAGAAACCCAGAGGCCACGCGGGCCCCGACCTCAGACT  
TCCCTGCTGACCCTGGACGATGCGGAGAGCCGGGGCCGGCGGTGCCAGAAATGATCTC  
TGTGCTGGGGCCATTAGTGGACATGTGCTGAAGGCCGTCTTCTCCAGGGGAGACACCC  
CCGTGCTGCCTCACGAGACTCGACTGCTGCAGACCGGCATCCATGTGCGGGTCTCCAG  
CCCTCTCTGATTCTGGTGTACAGTATACACCAGATAGCACTCCCTGCCACAGAGGAGA  
CAATCAGCTCCAGGTGCAGCATACTACTTTACAGGCTCCGAGGTGCAAAAACGTGTCTG  
TCAATGTGCACAACCCTACCGGCAGGAGCATCTGTCTTAGCCAGGAGCCAATGAGCATC  
TACGTGTACGCCCTGCCTCTGAAGATGCTGAATATCCCATCAATTAACGTCCACCATTA  
CCCTAGCGCAGCCGAACGGAAGCACAGACATCTGCCAGTGGCCGACGCTGTATCCATG

CCAGCGCAAACAGATGTGGCAGGCAAGACTGACCGTGTCCGGGCTGGCCTGGACAAGG  
 CAGCAGAATCAGTGAAGGAGCCCGACGTGTACTATAACCAGCGCCTTCGTGTTCCCTAC  
 CAAAGACGTGGCCCTGAGACATGTGGTGTGCGCACATGAGCTGGTGTGCAGCATGGAAA  
 AACTAGGGCCACCAAGATGCAGGTCATCGGCGATCAGTATGTCAAAGTGTACCTGGAG  
 AGTTTTTGCGAAGACGTGCCATCAGGGAAGCTGTTTCATGCATGTGACCCTGGGCAGCGA  
 TGTCGAGGAAGACCTGACCATGACAAGAAATCCACAGCCCTTTATGAGACCCCACGAGA  
 GGAATGGGTTCACTGTGCTGTGCCCAAGAACATGATCATTAAAGCCTGGAAAAATCAGT  
 CATATTATGCTGGATGTGGCCTTTACATCACACGAGCATTTCGGACTGCTGTGCCCAA  
 ATCCATCCCTGGACTGAGCATTTCGGCAATCTGCTGATGAACGGCCAGCAGATCTTCC  
 TGGAAGTGCAGGCCATCCGGGAGACCGTCAACTGCGACAGTATGACCCAGTGGCTGCA  
 CTGTTCTTTTTTCGACATCGACCTGCTGCTGCAGCGAGGACCACAGTACAGCGAGCACCC  
 TACTTTTACCTCCAGTATCGGATTCAGGGGAAGCTGGAGTACAGGCACACCTGGGATC  
 GCCATGACGAAGGAGCCGCTCAGGGGGACGATGACGTGTGGACATCTGGCAGTGATTCA  
 GACGAGGAACTGGTGACAACCTGAGCGAAAAACCCCCGGGTGACAGGAGGAGGGGCAAT  
 GGCAGGGGCCAGCACCAGCGCAGGGCGGAAGCGAAAAAGCGCCAGCAGCGCCACAGCAT  
 GTACCGCCGGCGTGATGACTAGAGGAAGGCTGAAGGCCGAGTCTACAGTCGCTCCCGAG  
 GAAGATACTGACGAGGATAGTGACAATGAAATCCACAACCCCGCCGTGTTACCTGGCC  
 ACCTTGGCAGGCAGGGATTCTGGCTCGCAACCTGGTCCCCATGGTGGCAACCGTCCAGG  
 GACAGAATCTGAAGTATCAGGAGTTTTTCTGGGATGCTAACGACATCTACCGGATTTTT  
 GCAGAGCTGGAAGGCGTGTGGCAGCCAGCAGCCAGCCCAAACGACGGAGACATCGACA  
 GGACGCTCTGCCAGGACCTTGTATCGCCAGCACACCAAAGAAGCACAGGGGCTAA

(SEQ ID NO: 6) (seqüência de nucleotídeos de Gag de MMLV em  
 negrito)

**Seqüência de nucleotídeos de Gag de MMLV - pp65 de CMV  
 códon-otimizada (SEQ ID NO: 22)**

**ATGGGACAGACCGTCACAACACCCCTGAGCCTGACCCTGGGACATTGGAAAGACGTGGA  
 GAGGATCGCACATAACCAGAGCGTGGACGTGAAGAAACGGAGATGGGTACATTCTGCA  
 GTGCTGAGTGGCCAACTTTTAATGTGGGATGGCCCCGAGACGGCACTTTCAACAGGGAT  
 CTGATCACCCAGGTGAAGATCAAGGTCTTTAGCCCAGGACCTCACGGACATCCAGACCA  
 GGTGCCTTATATCGTCACCTGGGAGGCACTGGCCTTCGATCCCCCTCCATGGGTGAAGC**

CATTTGTCCACCCAAAACCACCTCCACCCTGCCTCCAAGTGCCCTTCACTGCCACTG  
GAACCACCCCGGAGCACACCACCCCGCAGCTCCCTGTATCCTGCTCTGACTCCATCTCT  
GGGCGCAAAGCCAAAACCACAGGTGCTGAGCGACTCCGGAGGACCACTGATTGACCTGC  
TGACAGAGGACCCCCACCATACCGAGATCCTCGGCCTCCACCAAGCGACCGCGATGGA  
AATGGAGGAGAGGCTACTCCTGCCGGCGAAGCCCCTGACCCATCTCCAATGGCTAGTAG  
GCTGCGCGGCAGGCGCGAGCCTCCAGTGGCAGATAGCACCACATCCCAGGCCTTCCCTC  
TGAGGGCTGGGGGAAATGGGCAGCTCCAGTATTGGCCATTTTCTAGTTCAGACCTGTAC  
AACTGGAAGAACAATAACCCCTCTTTCAGTGAGGACCCCGGCAAACCTGACCGCCCTGAT  
CGAATCCGTGCTGATTACCCATCAGCCACATGGGACGATTGTCAGCAGCTCCTGGGCA  
CCCTGCTGACCGGAGAGGAAAAGCAGCGCTGCTGCTGGAGGCTCGCAAAGCAGTCCGA  
GGGACGATGGACGGCCACACAGCTCCCTAATGAGGTGGACGCCGCTTTTCCACTGGA  
AAGACCCGACTGGGATTATACTACCCAGGCAGGGAGAAACCACCTGGTCCATTACAGGC  
AGCTCCTGCTGGCAGGCTGCAGAATGCCGGGAGATCCCCACCAACCTGGCCAAGGTG  
AAAGGCATCACACAGGGGCCAATGAGTCACCAAGCGCCTTTTCTGGAGAGGCTGAAGGA  
AGCTTACCGACGGTATACCCATACGACCTGAGGACCCCGGACAGGAAACAAACGTCT  
CCATGTCTTTCATCTGGCAGTCTGCCCCAGACATTGGGCGGAAGCTGGAGAGACTGGAA  
GACCTGAAGAACAAGACCCTGGGCGACCTGGTGCGGGAGGCTGAAAAGATCTTCAACAA  
ACGGGAGACCCCCGAGGAAAGAGAGGAAAGGATTAGAAGGGAAACTGAGGAAAAGGAGG  
AACGCCGACGGACCGAGGACGAACAGAAGGAGAAAGAACGAGATCGGCGGCGGCACCGG  
GAGATGTCAAAGCTGCTGGCCACCGTGGTCAGCGGACAGAAACAGGACAGACAGGGAGG  
AGAGCGACGGAGAAGCCAGCTCGACAGGGATCAGTGCGCATACTGTAAGGAAAAAGGCC  
ATTGGGCCAAGGATTGCCCAAAAAGCCAAGAGGACCAAGAGGACCAAGACCACAGACA  
TCACTGCTGACCCTGGACGACTGCGAGAGCCGGGGCCGGCGGTGCCCAGAAATGATCTC  
TGTGCTGGGGCCATTAGTGGACATGTGCTGAAGGCCGTCTTCTCCAGGGGAGACACCC  
CCGTGCTGCCTCACGAGACTCGACTGCTGCAGACCGGCATCCATGTGCGGGTCTCCAG  
CCCTCTCTGATTCTGGTGTACAGTATACACCAGATAGCACTCCCTGCCACAGAGGAGA  
CAATCAGCTCCAGGTGCAGCATACTACTTTACAGGCTCCGAGGTGCAAAAACGTGTCTG  
TCAATGTGCACAACCCTACCGGCAGGAGCATCTGTCTTAGCCAGGAGCCAATGAGCATC  
TACGTGTACGCCCTGCCTCTGAAGATGCTGAATATCCCATCAATTAACGTCCACCATTA  
CCCTAGCGCAGCCGAACGGAAGCACAGACATCTGCCAGTGGCCGACGCTGTCTCATCCATG

CCAGCGGCAAACAGATGTGGCAGGCAAGACTGACCGTGTCCGGGCTGGCCTGGACAAGG  
CAGCAGAATCAGTGGAAAGGAGCCCGACGTGTACTATAACCAGCGCCTTCGTGTTCCCTAC  
CAAAGACGTGGCCCTGAGACATGTGGTGTGCGCACATGAGCTGGTGTGCAGCATGGAAA  
ACACTAGGGCCACCAAGATGCAGGTCATCGGCGATCAGTATGTCAAAGTGTACCTGGAG  
AGTTTTTGC GAAGACGTGCCATCAGGGAAGCTGTTTCATGCATGTGACCCTGGGCAGCGA  
TGTCGAGGAAGACCTGACCATGACAAGAAATCCACAGCCCTTTATGAGACCCCACGAGA  
GGAATGGGTTCACTGTGCTGTGCCCAAGAACATGATCATTAAAGCCTGGAAAAATCAGT  
CATATTATGCTGGATGTGGCCTTTACATCACACGAGCATTTCGGACTGCTGTGCCCCAA  
ATCCATCCCTGGACTGAGCATTTCGGCAATCTGCTGATGAACGGCCAGCAGATCTTCC  
TGGAAGTGCAGGCCATCCGGGAGACCGTCAACTGCGACAGTATGACCCAGTGGCTGCA  
CTGTTCTTTTTTCGACATCGACCTGCTGCTGCAGCGAGGACCACAGTACAGCGAGCACCC  
TACTTTTACCTCCCAGTATCGGATTCAGGGGAAGCTGGAGTACAGGCACACCTGGGATC  
GCCATGACGAAGGAGCCGCTCAGGGGGACGATGACGTGTGGACATCTGGCAGTGATTCA  
GACGAGGAACTGGTGACA ACTGAGCGAAAAACCCCCGGGTGACAGGAGGAGGGGCAAT  
GGCAGGGGCCAGCACCAGCGCAGGGCGGAAGCGAAAAAGCGCCAGCAGCGCCACAGCAT  
GTACCGCCGGCGTGATGACTAGAGGAAGGCTGAAGGCCGAGTCTACAGTCGCTCCCGAG  
GAAGATACTGACGAGGATAGTGACAATGAAATCCACAACCCCGCCGTGTTACCTGGCC  
ACCTTGGCAGGCAGGGATTCTGGCTCGCAACCTGGTCCCCATGGTGGCAACCGTCCAGG  
GACAGAATCTGAAGTATCAGGAGTTTTTCTGGGATGCTAACGACATCTACCGGATTTTTT  
GCAGAGCTGGAAGGCGTGTGGCAGCCAGCAGCCCAGCCCAAACGACGGAGACATCGACA  
GGACGCTCTGCCAGGACCTTGTATCGCCAGCACACCAAAGAAGCACAGGGGCTAA

(SEQ ID NO: 22) (seqüência de nucleotídeos de Gag de MMLV em negrito)

[077] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece ácidos nucléicos que codificam um polipeptídeo Gag ou uma porção característica de um polipeptídeo Gag. Em certas modalidades, os ácidos nucléicos podem ser DNA ou RNA, e podem ser de fita simples ou de fita dupla. Em algumas modalidades, os ácidos nucléicos da invenção podem incluir um ou mais nucleotídeos não naturais; em outras

modalidades, os ácidos nucleicos da invenção incluem somente nucleotídeos naturais.

#### **B. Proteínas do envelope**

[078] Em algumas modalidades, a presente invenção utiliza VLPs compostas por um ou mais polipeptídeos do envelope de HCMV (por exemplo, gB e/ou gH). Como aqui usado, o termo "polipeptídeo do envelope" se refere a uma seqüência polipeptídica cuja seqüência de aminoácidos inclui pelo menos uma seqüência característica de uma glicoproteína do envelope. Uma ampla variedade de seqüências de glicoproteína do envelope de vários vírus incluindo, sem limitação, HCMV, é conhecida na técnica e aqueles habilitados na técnica, em relação a essas seqüências, podem facilmente identificar seqüências que são características de glicoproteínas do envelope geralmente, e/ou de glicoproteínas do envelope particulares. Em algumas modalidades, um polipeptídeo do envelope compreende uma porção ou domínio citoplasmático, transmembrana e/ou extracelular.

[079] Em algumas modalidades, um polipeptídeo do envelope de HCMV inclui um domínio transmembrana e citoplasmático que não é encontrado na natureza na proteína de HCMV. Por exemplo, em algumas modalidades, um polipeptídeo do envelope de HCMV inclui um domínio transmembrana e citoplasmático de outra proteína de HCMV (por exemplo, gB ou gH). Em algumas modalidades, um polipeptídeo do envelope de HCMV inclui um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático encontrados na natureza no vírus da estomatite vesicular (VSV). Como é conhecido na técnica, polipeptídeos algumas vezes possuem

domínios transmembrana, citoplasmáticos e/ou extracelulares. Em geral, um "domínio transmembrana", como aqui usado, se refere a um domínio que possui um atributo de estar presente na membrana (por exemplo, que transpõe uma porção ou toda uma membrana celular). Como será observado, não é necessário que cada aminoácido em um domínio transmembrana esteja presente na membrana. Por exemplo, em algumas modalidades, um domínio transmembrana é caracterizado pelo fato de que um trecho ou porção designada de uma proteína está substancialmente localizada na membrana. Como é bem conhecido na técnica, seqüências de aminoácidos ou de ácidos nucleicos podem ser analisadas usando diversos algoritmos para prever a localização subcelular de proteína (por exemplo, transmembrana localização). Programas desse tipo exemplares incluem Psort (PSORT.org), Prosite (prosite.expasy.org), entre outros. Em geral, um "domínio citoplasmático", como aqui usado, se refere a um domínio que possui um atributo de estar presente no citoplasma. Como será observado, não é necessário que cada aminoácido em um domínio citoplasmático esteja presente no citoplasma. Por exemplo, em algumas modalidades, um domínio citoplasmático é caracterizado pelo fato de que um trecho ou porção designada de uma proteína está substancialmente localizada no citoplasma. Como é bem conhecido na técnica, seqüências de aminoácidos ou de ácidos nucleicos podem ser analisadas usando diversos algoritmos para prever a localização subcelular de proteína (por exemplo, localização citoplasmática). Programas desse tipo exemplares incluem Psort (PSORT.org), Prosite (prosite.expasy.org), entre outros.

[080] O domínio transmembrana de VSV-G funciona para direcionar a glicoproteína viral à membrana celular (Compton T. e cols., 1989 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4.112-4.116). A troca dos domínios transmembrana e citoplasmáticos de VSV-G para os domínios transmembrana e citoplasmáticos de outra proteína foi usada para direcionar uma proteína à membrana celular quando a proteína nativa não faz isso naturalmente ou precisa de proteínas acessórias co-expressas para que isso seja feito (Garrone P. e cols., 2011 *Sci. Transl. Med.* 94).

[081] Entre outras coisas, a presente invenção engloba o reconhecimento de que VLPs que contêm um componente estrutural de um vírus (por exemplo, MLV) e um ou mais antígenos de superfície heterólogos (por exemplo, proteína do envelope) são especialmente eficazes para liberação de antígeno e indução de uma resposta imune contra o antígeno heterólogo.

### **C. Antígenos heterólogos**

[082] Proteínas do envelope de HCMV, por exemplo, glicoproteínas gB e gH, são alvos importantes para a produção de anticorpos neutralizantes contra HCMV, na medida em que anticorpos neutralizantes são geralmente capazes de evitar infecção. Terapias para infecção por HCMV, por exemplo, uma vacina de subunidade de gB, foram desenvolvidas e testadas em animais experimentais e estudos clínicos. Os resultados desses estudos, no entanto, demonstraram que em humanos, a resposta de anticorpos não era duradoura e não suficientemente eficaz para o tratamento de HCMV em todos os casos. As razões que foram sugeridas para a eficácia limitada de vacinas de subunidade

baseadas exclusivamente em gB de HCMV, por sua vez, são variações nas respostas imunes cepa-específicas, indução inadequada de uma resposta imune celular e restrições estruturais no antígeno usado, cujos epítopos acredita-se que sejam conformação-dependentes. Os presentes inventores reconheceram que o desenvolvimento de uma vacina para HCMV que compreende um ou mais antígenos do polipeptídeo do envelope apresentados em sua conformação nativa na superfície de uma VLP leva à indução de anticorpos neutralizantes (por exemplo, por meio de uma resposta imune humoral) e uma vacina para HCMV que compreende um ou mais antígenos de proteína estrutural (por exemplo, proteína do tegumento pp65) leva à indução de células T *helper* (linfócitos T<sub>H</sub>) e células T citotóxicas (CTL) (por exemplo, por meio de uma resposta imune mediada por células). Anticorpos neutralizantes são geralmente formados contra proteínas do envelope viral, e especialmente contra glicoproteínas gB e gH do HCMV. Células T<sub>H</sub> são estimuladas por proteínas estruturais do tegumento de um vírus como, por exemplo, pp65 de HCMV (ppUL83). Além disso, pp65 tem um papel importante na indução de uma resposta de CTL contra HCMV.

[083] Será observado que as VLPs fornecidas podem compreender qualquer antígeno heterólogo, incluindo antígenos heterólogos de HCMV. Por exemplo, em algumas modalidades, uma VLP de acordo com a presente invenção compreende um ou mais polipeptídeos do envelope de HCMV. Em algumas modalidades, uma VLP de acordo com a presente invenção compreende um ou mais polipeptídeos estruturais de HCMV. Em algumas modalidades, uma VLP de acordo com a

presente invenção compreende um ou mais polipeptídeos do envelope de HCMV e um ou mais polipeptídeos estruturais de HCMV. Uma lista de antígenos de HCMV exemplares, mas não limitantes, é fornecida abaixo.

**gB - Complexo de glicoproteína (gC) I**

[084] O complexo de glicoproteína de HCMV mais plenamente caracterizado é o complexo de gB (gB; UL55). Foi demonstrado que soros de indivíduos CMV-soropositivos contêm anticorpos para gB, e até 70% da resposta de anticorpos neutralizantes em soros de convalescentes são gB-específicos (Marshall G.S. e cols., 1994 *J. Med. Virol.* 43: 77-83).

[085] Uma seqüência de aminoácidos e de ácidos nucléicos do polipeptídeo gB de HCMV exemplar é mostrada abaixo como o SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8, respectivamente. Em algumas modalidades, um polipeptídeo gB adequado é substancialmente homólogo a um polipeptídeo gB de HCMV conhecido. Por exemplo, um polipeptídeo gB pode ser um polipeptídeo gB de HCMV modificado que contém uma ou mais substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos, quando comparado com um polipeptídeo gB do tipo selvagem ou de ocorrência natural (por exemplo, SEQ ID NO: 7). Dessa forma, em algumas modalidades, um polipeptídeo gB adequado à presente invenção é substancialmente homólogo a um polipeptídeo gB de HCMV (SEQ ID NO: 7). Em algumas modalidades, um polipeptídeo de HCMV adequado à presente invenção possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais homóloga ao SEQ ID NO: 7. Em algumas modalidades, um polipeptídeo gB adequado à

presente invenção é substancialmente idêntico a um polipeptídeo gB de HCMV (SEQ ID NO: 7). Em algumas modalidades, um polipeptídeo gB adequado à presente invenção possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica ao SEQ ID NO: 7.

**Seqüência de aminoácidos de gB de HCMV (SEQ ID NO: 7)**

MESRIWCLVVCVNLCIVCLGAAVSSSSTRGTSATHSHSSHTTSAAHSRSGSVSQRVTS  
 SQTVSHGVNETIYNTTLKYGDVVGVNNTTKYPYRVCSMAQGTDLIRFERNIVCTSMKPIN  
 EDLDEGIMVVYKRNIVAHTFKVRVYQKVLTFRRSYAYIHTTYLLGSNTEYVAPPMWEIH  
 HINSHSQCYSSYSRVIAGTVFVAYHRDSYENKTMQLMPDDYSNTHSTRYVTVKDQWHSR  
 GSTWLYRETCNLNCMVTITTTARSKYPYHFFATSTGDVVDISPFYNGTNRNASYFGENAD  
 KFFIFPNYTIIVSDFGRPNSALETHRLVAFLERADSVISWDIQDEKNVTCQLTFWEASER  
 TIRSEAEDSYHFSSAKMTATFLSKQEVNMSDSALDCVRDEAINKLQOIFNTSYNQTYEK  
 YGNVSVFETTGLLVFWQGIKQKSLVELERLANRSSLNLTNRTRKSTDGNATHLSNME  
 SVHNLVYAQLQFTYDTRLGYINRALAQIAEAWCVDQRRTLEVFKELSKINPSAILSAIY  
 NKPIAARFMGDVGLGLASCVTINQTSVKVLRDMNVKESPGRCYSRPVVIFFANSYVQY  
 GQLGEDNEILLGNHRTEECQLPSLKIIFIAGNSAYEYVDYLFKRMIDLSSISTVDSMIAL  
 DIDPLENTDFRVLELYSQKELRSINVDLEEIMREFNSYKQRVKYVEDKVVDPLPPYLK  
 GLDDLMSGLGAAGKAVGVAIGAVGGAVASVVEGVATFLKNPFGAFTIILVAIAVVI IY  
LIYTRORRLCMOPLONLFPYLVSADGTTVTSGNTKDTSLQAPPSYEESVYNSGRKGP  
PSSDASTAAPPYTNEQAYQMLLALVRLDAEQRAQQNGTDSLQDGTGTQDQKPNLLDRL  
RHRKGYRHLKDSDEEENV \* (SEQ ID NO: 7) (TM e CD sublinhados)

**Seqüência de nucleotídeos de gB de HCMV (SEQ ID NO: 8)**

ATGGAATCCAGGATCTGGTGCCTGGTAGTCTGCGTAACTTGTGTATCGTCTGTCTGGG  
 TGCTGCGGTTTCCTCATCTTCTACTCGTGGAACCTCTGCTACTCACAGTCACCATTCTT  
 CTCATACGACGTCTGCTGCTCATTCTCGATCCGGTTCAGTCTCTCAACGCGTAACTTCT  
 TCCCAAACGGTCAGCCATGGTGTAAACGAGACCATCTACAACACTACCCTCAAGTACGG  
 AGATGTGGTGGGGTCAACACCACCAAGTACCCTATCGCGTGTGTTCTATGGCACAGG

GTACGGATCTTATTCGCTTTGAACGTAATATCGTCTGCACCTCGATGAAGCCCATCAAT  
GAAGACCTGGACGAGGGCATCATGGTGGTCTACAAACGCAACATCGTCGCGCACACCTT  
TAAGGTACGAGTCTACCAGAAGGTTTTGACGTTTCGTCTAGCTACGCTTACATCCACA  
CCACTTATCTGCTGGGCAGCAACACGGAATACGTGGCGCCTCCTATGTGGGAGATTCAAT  
CATATCAACAGTCACAGTCAGTGCTACAGTTCCTACAGCCGCGTTATAGCAGGCACGGT  
TTTCGTGGCTTATCATAGGGACAGCTATGAAAACAAAACCATGCAATTAATGCCCGACG  
ATTATTCCAACACCCACAGTACCCGTTACGTGACGGTCAAGGATCAATGGCACAGCCGC  
GGCAGCACCTGGCTCTATCGTGAGACCTGTAATCTGAATTGTATGGTGACCATCACTAC  
TGCGCGCTCCAAGTATCCCTATCATTTTTTCGCAACTTCCACGGGTGATGTGGTTGACA  
TTTCTCCTTTCTACAACGGAACATAATCGCAATGCCAGCTATTTTGGAGAAAACGCCGAC  
AAGTTTTTCATTTTTCCGAACTACACTATCGTCTCCGACTTTGGAAGACCGAATTCTGC  
GTTAGAGACCCACAGGTTGGTGGCTTTTCTTGAACGTGCGGACTCAGTGATCTCCTGGG  
ATATACAGGACGAGAAGAATGTTACTTGTCAACTCACTTTCTGGGAAGCCTCGGAACGC  
ACCATTCGTTCCGAAGCCGAGGACTCGTATCACTTTTCTTCTGCCAAAATGACCGCCAC  
TTTCTTATCTAAGAAGCAAGAGGTGAACATGTCCGACTCTGCGCTGGACTGTGTACGTG  
ATGAGGCCATAAATAAGTTACAGCAGATTTTCAATACTTCATACAATCAAACATATGAA  
AAATATGGAAACGTGTCCGTCTTTGAAACCACTGGTGGTTTGGTGGTGTCTGGCAAGG  
TATCAAGCAAAAATCTCTGGTGGAACTCGAACGTTTGGCCAACCGCTCCAGTCTGAATC  
TACTCATAATAGAACCAAAAGAAGTACAGATGGCAACAATGCAACTCATTTATCCAAC  
ATGGAGTCCGGTGACAAATCTGGTCTACGCCAGCTGCAGTTCACCTATGACACGTTGCG  
CGGTTACATCAACCGGGCGCTGGCGCAAATCGCAGAAGCCTGGTGTGTGGATCAACGGC  
GCACCCTAGAGGTCTTCAAGGAACTTAGCAAGATCAACCCGTCAGCTATTCTCTCGGCC  
ATCTACAACAAACCGATTGCCGCGCGTTTTCATGGGTGATGTCCTGGGTCTGGCCAGCTG  
CGTGACCATTAACCAAACCAGCGTCAAGGTGCTGCGTGATATGAATGTGAAGGAATCGC  
CAGGACGCTGCTACTCACGACCAGTGGTCATCTTTAATTTCCGCAACAGCTCGTACGTG  
CAGTACGGTCAACTGGGCGAGGATAACGAAATCCTGTTGGGCAACCACCGCACTGAGGA  
ATGTCAGCTTCCCAGCCTCAAGATCTTCATCGCCGGCAACTCGGCCTACGAGTACGTGG  
ACTACCTCTTCAAACGCATGATTGACCTCAGCAGCATCTCCACCGTCGACAGCATGATC  
GCCCTAGACATCGACCCGCTGGAAAACACCGACTTCAGGGTACTGGAACCTTTACTCGCA  
GAAAGAATTGCGTTCATCAACGTTTTTGTATCTCGAGGAGATCATGCGCGAGTTCAATT

CGTATAAGCAGCGGGTAAAGTACGTGGAGGACAAGGTAGTCGACCCGCTGCCGCCCTAC  
 CTCAAGGGTCTGGACGACCTCATGAGCGGCCTGGGCGCCGCGGGAAAGGCCGTTGGCGT  
 AGCCATTGGGGCCGTGGGTGGCGCGGTGGCCTCCGTGGTCGAAGGCCGTTGCCACCTTCC  
 TCAAAAACCCCTTCGGAGCCTTCACCATCATCCTCGTGGCCATAGCCGTCGTCATTATC  
ATTTATTTGATCTATACTCGACAGCGGCGTCTCTGCATGCAGCCGCTGCAGAACCTCTT  
TCCCTATCTGGTGTCCGCCGACGGGACCACCGTGACGTCGGGCAACACCAAAGACACGT  
CGTTACAGGCTCCGCCTTCTACGAGGAAAGTGTTTATAATTCTGGTCGAAAGGACCG  
GGACCACCGTCGTCTGATGCATCCACGGCGGCTCCGCCTTACACCAACGAGCAGGCTTA  
CCAGATGCTTCTGGCCCTGGTCCGTCTGGACGCAGAGCAGCGAGCGCAGCAGAACGGTA  
CAGATTCTTTGGACGGACAGACTGGCACGCAGGACAAGGGACAGAAGCCCAACCTGCTA  
GACCGACTGCGACACCGCAAAAACGGCTACCGACACTTGAAAGACTCCGACGAAGAAGA  
GAACGTCTGA (SEQ ID NO: 8) (TM e CD sublinhados)

**Seqüência de nucleotídeos de gB de HCMV códon-otimizada  
 (SEQ ID NO: 9)**

ATGGAGTCAAGGATTTGGTGCCTGGTCGTGTGCGTCAATCTGTGCATCGTCTGTCTGGG  
 GGCTGCCGTGTCATCAAGTTCTACAAGAGGCACCAGCGCCACCCACTCACACCATAGCT  
 CCCATACCACATCCGCCGCTCACTCCCGGTCTGGCAGCGTGAGCCAGAGAGTCACATCT  
 AGTCAGACCGTGAGCCACGGGGTCAACGAGACCATCTACAATACTACCCTGAAGTATGG  
 CGACGTGGTTCGGGGTGAACACAATAATACCCATATAGGGTCTGCAGTATGGCCCAGG  
 GCACTGATCTGATTAGATTTCGAAAGGAACATCGTGTGCACCAGCATGAAGCCCATTAAT  
 GAGGACCTGGATGAAGGGATCATGGTGGTCTACAAACGCAATATTGTGGCCCATACCTT  
 CAAGGTGCGAGTCTATCAGAAAGTGCTGACATTTTCGGAGATCTTACGCATATATCCACA  
 CCACATACCTGCTGGGGAGTAACACCGAGTATGTGGCTCCCCCTATGTGGGAAATTCAC  
 CATATCAATAGCCATTCCCAGTGCTACTCAAGCTACAGCAGAGTGATCGCTGGAACAGT  
 GTTCGTCGCATACCACAGAGACTCTTATGAGAACAAGACTATGCAGCTCATGCCCGACG  
 ATTACAGCAATACACATTCCACTAGATATGTGACAGTCAAAGATCAGTGGCACTCAAGG  
 GGCAGCACCTGGCTGTACCGCGAGACATGCAACCTGAATTGTATGGTACTATCACTAC  
 CGCTAGATCCAAGTACCCCTATCACTTCTTTGCAACTTCCACCGGGGACGTGGTCGATA  
 TTTCTCCTTTCTACAACGGCACAAACCGGAATGCATCTTATTTTGGGGAGAACGCCGAC  
 AAGTTCTTTATTTTCCCAAATTACACCATCGTGTCTGATTTTGGCAGACCCAACAGTGC

CCTGGAGACACATCGACTGGTGGCATTCCCTGGAACGGGCCGACTCCGTCATTTCTTGGG  
ACATCCAGGATGAGAAGAATGTGACCTGCCAGCTCACCTTCTGGGAGGCCAGCGAACGC  
ACCATCCGATCCGAGGCTGAAGATTCTTACCACTTCTCCTCTGCCAAAATGACAGCTAC  
TTTTCTGAGCAAGAAACAGGAGGTGAACATGTCTGACAGTGCTCTGGATTGCGTGCGGG  
ACGAAGCAATTAATAAGCTGCAGCAGATCTTCAACACATCATAACAACCAGACTTACGAG  
AAGTACGGAAACGTGAGCGTCTTCGAAACAACCTGGCGGGCTGGTGGTCTTTTGGCAGGG  
CATCAAGCAGAAATCCCTGGTGGAGCTGGAAAGGCTGGCCAATCGCAGTTCCTGAACC  
TGACTCATAATCGGACCAAGAGATCTACAGACGGAAACAATGCCACACATCTGTCTAAC  
ATGGAGAGTGTGCACAATCTGGTCTACGCTCAGCTCCAGTTTACCTACGACACACTGAG  
AGGCTATATTAACAGGGCACTGGCCAGATCGCTGAAGCATGGTGCCTGGATCAGAGGC  
GCACCCTGGAGGTCTTCAAGGAACTGTCCAAAATCAACCCTTCAGCAATTCTGAGCGCC  
ATCTACAATAAGCCAATTGCAGCCAGGTTTATGGGAGACGTGCTGGGCCTGGCCAGTTG  
CGTCACTATCAACCAGACCTCAGTGAAGGTCCTGCGCGATATGAATGTGAAAGAGAGTC  
CCGGCAGATGCTATTCACGGCCTGTGGTCATCTTCAACTTTGCTAATAGCTCCTACGTG  
CAGTATGGACAGCTCGGCGAGGACAACGAAATTCTGCTGGGGAATCACAGGACCGAGGA  
ATGTCAGCTCCCTAGCCTGAAGATTTTCATCGCTGGAAACTCCGCATACGAGTATGTGG  
ATTACCTGTTCAAGCGGATGATTGACCTGTCTAGTATCTCCAATGTGGATTCTATGATT  
GCCCTGGACATCGATCCACTGGAAAATACCGACTTCAGGGTGCTGGAGCTGTATAGCCA  
GAAGGAACTGCGCTCCATCAACGTGTTTCGATCTGGAGGAAATTATGAGAGAGTTTAATA  
GCTACAAGCAGAGGGTGAATATGTGCAAGATAAGGTGGTGCACCCCTGCCACCCTAC  
CTGAAAGGCCTGGACGATCTGATGAGCGGGCTGGGAGCTGCAGGGAAGGCAGTGGGAGT  
CGCTATCGGCGCAGTGGGAGGAGCCGTGGCCAGCGTGGTGCAGGGAGTGGCAACATTCC  
TGAAAACCCCTTCGGGGCCTTCACCATCATTCTGGTGGCAATCGCCGTGGTCATCATT  
ATCTACCTGATCTACACAAGGCAGCGGCGGCTGTGCATGCAGCCTCTGCAGAACCTGTT  
TCCATACCTGGTGAGCGCCGACGGGACCACAGTCACCTCAGGAAATACTAAGGATACCT  
CTCTGCAGGCCCCCCCAAGTTACGAGGAATCAGTGTATAACAGCGGCAGAAAAGGACCA  
GGACCACCTTCAAGCGACGCCAGCACTGCCGCTCCACCCTACACCAATGAGCAGGCCTA  
TCAGATGCTGCTGGCTCTGGTGCGCCTGGATGCCGAACAGCGAGCTCAGCAGAACGGGA  
CCGACTCCCTGGATGGACAGACCGGAACACAGGACAAGGGACAGAAACCTAATCTGCTG  
GATCGGCTGCGGCACAGAAAAACGGGTATAGGCACCTGAAGGACTCCGACGAAGAAGA

AAATGTCTAA (SEQ ID NO: 9) (TM e CD sublinhados)

[086] Em algumas modalidades, um polipeptídeo gB para uso de acordo com a presente invenção é desprovido de um domínio transmembrana e/ou domínio citoplasmático e/ou contém um domínio transmembrana e/ou um domínio citoplasmático modificado. Um polipeptídeo gB pode opcionalmente incluir um ou mais polipeptídeos adicionais (por exemplo, um polipeptídeo heterólogo do domínio transmembrana e/ou do domínio citoplasmático). Em algumas modalidades, um polipeptídeo gB é expresso como uma proteína de fusão com um polipeptídeo heterólogo. O polipeptídeo gB pode estar ligado a um polipeptídeo heterólogo para criar uma proteína de fusão sem alteração da função de gB e/ou antigenicidade. Por exemplo, uma seqüência codificadora para um polipeptídeo heterólogo pode ser unida na seqüência codificadora do polipeptídeo gB, por exemplo, na extremidade 3' da seqüência codificadora do polipeptídeo gB. Em algumas modalidades, uma seqüência codificadora para um polipeptídeo heterólogo pode ser unida *in frame* na seqüência codificadora do polipeptídeo gB. Em algumas modalidades, uma seqüência codificadora do polipeptídeo gB e o polipeptídeo heterólogo podem ser expressos por um único promotor. Em algumas modalidades, um polipeptídeo heterólogo é inserido (por exemplo, fundido) no terminal C de um polipeptídeo gB.

[087] Em algumas modalidades, um polipeptídeo heterólogo é ou compreende um domínio transmembrana e/ou domínio citoplasmático encontrado no vírus da estomatite vesicular (VSV). Em algumas modalidades, um gB que não possui um domínio transmembrana e/ou um domínio

citoplasmático é fundido a um domínio transmembrana e/ou domínio citoplasmático de VSV. Um polipeptídeo de fusão gB-VSV exemplar para uso de acordo com a presente invenção é mostrado abaixo como o SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão de polipeptídeo gB-VSV adequada inclui todo ou uma porção de um polipeptídeo gB que é substancialmente homólogo a um polipeptídeo gB conhecido e todo ou uma porção de um polipeptídeo do VSV que é substancialmente homólogo a um polipeptídeo do VSV conhecido. Por exemplo, uma proteína de fusão de polipeptídeo gB - VSV pode conter uma ou mais substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos, quando comparado com um polipeptídeo gB e/ou VSV do tipo selvagem ou de ocorrência natural. Dessa forma, em algumas modalidades, uma proteína de fusão de polipeptídeo gB-VSV adequada à presente invenção é substancialmente homóloga ao SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão de polipeptídeo gB-VSV adequada à presente invenção possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais homóloga ao SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão de polipeptídeo gB-VSV adequada à presente invenção é substancialmente idêntica ao SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão de polipeptídeo gB-VSV adequada à presente invenção possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica ao SEQ ID NO: 10. Como aqui usado, "gB-G" se refere a uma proteína de fusão gB de HMCV - TM/CTD de VSV.

**Seqüência de aminoácidos de gB-G de HCMV (SEQ ID NO:****10)**

MESRIWCLVVCVNLICIVCLGAAVSSSTRGTSATHSHSSHTTSAAHRSRSGSVSQRVTS  
 SQTVSHGVNETIYNTTLKYGDVVGVTTKYPYRVCSMAQGTDLIRFERNIVCTSMKPIN  
 EDLDEGIMVVYKRNIVAHTFKVRVYQKVLTFRRSYAYIHTTYLLGSNTEYVAPPMWEIH  
 HINSHSQCYSSYSRVIAGTVFVAYHRDSYENKTMQLMPDDYSNTHSTRYVTVKDQWHSR  
 GSTWLYRETCNLNCMVTITTARSKYPYHFFATSTGDVVDISPFYNGTNRNASYFGENAD  
 KFFIFPNYTIIVSDFGRPNSALETHRLVAFLERADSVISWDIQDEKNVTCQLTFWEASER  
 TIRSEAEDSYHFSSAKMTATFLSKQEVNMSDSALDCVRDEAINKLQQIFNTSYNQTYEK  
 YGNVSVFETTGLLVFWQGIKQKSLVELERLANRSSLNLTNRTRKRSTDGNNATHLSNM  
 ESVHNLVYAQLQFTYDTRLRGYINRALAQIAEAWCVDQRRRTLEVFKELSKINPSAILSAI  
 YNKPIAARFMGDVVLGLASCVTINQTSVKVLRDMNVKESPGRCYSRPVVI FNFANSSYVQ  
 YGQLGEDNEILLGNHRTEECQLPSLKIFIAGNSAYEYVDYLFKRMIDLSSI STVDSMIA  
 LDIDPLENTDFRVLELYSQKELRSINVFDLEEIMREFNSYKQRVKYVEDKVVDPLPPYL  
 KGLDDLMSGLGAAGKAVGVAIGAVGGAVASVVEGVATFLKNPFFFFIIGLIIGLFLVLRV  
GIHLCIKHKHTKKROIYTDIEMNRLGK\* (SEQ ID NO: 10) (TM e CTD  
 sublinhados)

**Seqüência de nucleotídeos de gB-G de HCMV (SEQ ID NO:****11)**

ATGGAATCCAGGATCTGGTGCCTGGTAGTCTGCGTAACTTGTGTATCGTCTGTCTGGG  
 TGCTGCGGTTTCCTCATCTTCTACTCGTGGAACCTTCTGCTACTCACAGTCACCATTCT  
 CTCATACGACGTCTGCTGCTCATTCTCGATCCGGTTCAGTCTCTCAACGCGTAACTTCT  
 TCCCAAACGGTCAGCCATGGTGTAAACGAGACCATCTACAACACTACCCTCAAGTACGG  
 AGATGTGGTGGGGTCAACACCACCAAGTACCCCTATCGCGTGTGTTCTATGGCACAGG  
 GTACGGATCTTATTCGCTTTGAACGTAATATCGTCTGCACCTCGATGAAGCCCATCAAT  
 GAAGACCTGGACGAGGGCATCATGGTGGTCTACAAACGCAACATCGTCGCGCACACCTT  
 TAAGGTACGAGTCTACCAGAAGGTTTTGACGTTTCGTCGTAGCTACGCTTACATCCACA  
 CCACTTATCTGCTGGGCAGCAACACGGAATACGTGGCGCCTCCTATGTGGGAGATTCAT  
 CATATCAACAGTCACAGTCAGTGCTACAGTTCCTACAGCCGCGTTATAGCAGGCACGGT  
 TTTCGTGGCTTATCATAGGGACAGCTATGAAAACAAAACCATGCAATTAATGCCCGACG

ATTATTCCAACACCCACAGTACCCGTTACGTGACGGTCAAGGATCAATGGCACAGCCGC  
GGCAGCACCTGGCTCTATCGTGAGACCTGTAATCTGAATTGTATGGTGACCATCACTAC  
TGCGCGCTCCAAGTATCCCTATCATTTTTTCGCAACTTCCACGGGTGATGTGGTTGACA  
TTTCTCCTTTCTACAACGGAATAATCGCAATGCCAGCTATTTTGGAGAAAACGCCGAC  
AAGTTTTTCATTTTTCCGAACTACACTATCGTCTCCGACTTTGGAAGACCGAATTCTGC  
GTTAGAGACCCACAGGTTGGTGGCTTTTCTTGAACGTGCGGACTCAGTGATCTCCTGGG  
ATATACAGGACGAGAAGAATGTTACTTGTCAACTCACTTTCTGGGAAGCCTCGGAACGC  
ACCATTTCGTTCCGAAGCCGAGGACTCGTATCACTTTTCTTCTGCCAAAATGACCGCCAC  
TTTCTTATCTAAGAAGCAAGAGGTGAACATGTCCGACTCTGCGCTGGACTGTGTACGTG  
ATGAGGCCATAAATAAGTTACAGCAGATTTTCAATACTTCATACAATCAAACATATGAA  
AAATATGGAAACGTGTCCGTCTTTGAAACCACTGGTGGTTTGGTGGTGTCTGGCAAGG  
TATCAAGCAAAAATCTCTGGTGGAACTCGAACGTTTGGCCAACCGCTCCAGTCTGAATC  
TTACTCATAATAGAACCAAAAGAAGTACAGATGGCAACAATGCAACTCATTTATCCAAC  
ATGGAGTCGGTGCACAATCTGGTCTACGCCAGCTGCAGTTCACCTATGACACGTTGCG  
CGGTTACATCAACCGGGCGCTGGCGCAAATCGCAGAAGCCTGGTGTGTGGATCAACGGC  
GCACCCTAGAGGTCTTCAAGGAACTTAGCAAGATCAACCCGTCAGCTATTCTCTCGGCC  
ATCTACAACAAACCGATTGCCGCGCTTTTCATGGGTGATGTCCTGGGTCTGGCCAGCTG  
CGTGACCATTAACCAAACCAGCGTCAAGGTGCTGCGTGATATGAATGTGAAGGAATCGC  
CAGGACGCTGCTACTCACGACCAGTGGTCATCTTTAATTTGCGCAACAGCTCGTACGTG  
CAGTACGGTCAACTGGGCGAGGATAACGAAATCCTGTTGGGCAACCACCGCACTGAGGA  
ATGTCAGCTTCCCAGCCTCAAGATCTTCATCGCCGCAACTCGGCCTACGAGTACGTGG  
ACTACCTCTTCAAACGCATGATTGACCTCAGCAGCATCTCCACCGTCGACAGCATGATC  
GCCCTAGACATCGACCCGCTGGAAAACACCGACTTCAGGGTACTGGAACCTTACTCGCA  
GAAAGAATTGCGTTCCATCAACGTTTTTGTCTCGAGGAGATCATGCGCGAGTTCAATT  
CGTATAAGCAGCGGGTAAAGTACGTGGAGGACAAGGTAGTCGACCCGCTGCCGCCCTAC  
CTCAAGGGTCTGGACGACCTCATGAGCGGCCTGGGCGCCGCGGGAAAGGCCGTTGGCGT  
AGCCATTGGGGCCGTGGGTGGCGCGGTGGCCTCCGTGGTTCGAAGGCGTTGCCACCTTCC  
TCAAAAACCCCTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTGGTTCTCCGA  
GTTGGTATCCATCTTTGCATTAATAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTATACAGA  
CATAGAGATGAACCGACTTGGAAGTAA (SEQ ID NO: 11) TM e CTD

sublinhados)

**Seqüência de nucleotídeos de gB-G de HCMV códon-otimizada (SEQ ID NO: 12)**

ATGGAGTCAAGGATTTGGTGTCTGGTCGTCTGCGTCAACCTGTGCATTGTCTGCCTGGG  
AGCCGCCGTCTCATCATCATCTACCCGAGGCACATCCGCCACTCACTCTCACCATAGCT  
CCCATAACCACATCCGCCGCTCACTCAAGAAGCGGGTCCGTGTCTCAGAGGGTCACATCT  
AGTCAGACCGTGAGCCATGGAGTCAACGAGACAATCTACAATACTACCCTGAAGTATGG  
AGACGTGGTTCGGCGTGAACACAATAACCCCTATAGGGTCTGCTCTATGGCCCAGG  
GGACAGATCTGATCCGATTTGAACGGAACATCGTGTGCACTAGCATGAAGCCTATCAAT  
GAGGACCTGGATGAAGGAATTATGGTGGTCTACAAACGAAATATCGTGGCCATACTTT  
TAAGGTGAGAGTCTATCAGAAAGTGCTGACCTTCCGGAGAAGCTACGCTTATATTCACA  
CCACATAACCTGCTGGGGTCCAACACCGAGTATGTGGCACCCCCTATGTGGGAAATCCAC  
CATATTAATAGTCATTCACAGTGCTACTCAAGCTACAGCAGAGTGATCGCTGGAACCGT  
GTTTCGTCGCATAACCACAGAGACAGTTATGAGAACAAGACAATGCAGCTCATGCCCGACG  
ATTACAGTAATAACCCATTCAACAAGATATGTGACCGTCAAAGATCAGTGGCACTCTCGC  
GGCAGTACCTGGCTGTACCGAGAGACATGCAACCTGAATTGTATGGTGACAATTACTAC  
CGCCAGAAGCAAGTACCCTTATCACTTCTTTGCTACCTCAACAGGGGACGTGGTCGACA  
TCAGCCCCTTCTACAACGGAACAAACCGGAATGCCTCCTATTTTCGGCGAGAACGCTGAC  
AAATTCTTTATCTTCCCAACTACACTATCGTGAGCGATTTTCGGCAGACCTAACAGTGC  
CCTGGAGACCCATCGGCTGGTGGCATTCTGGAAAGAGCCGACAGCGTGATCTCCTGGG  
ACATTCAGGATGAGAAGAATGTGACCTGCCAGCTCACCTTCTGGGAGGCCAGCGAAAGA  
ACCATCAGGTCCGAGGCAGAAGATTCTTACCCTTTTCTCTGCAAAAATGACTGCCAC  
CTTCTCTGTTCCAAGAAACAGGAGGTGAACATGAGCGACTCCGCACTGGATTGCGTGCGGG  
ACGAAGCCATCAATAAGCTGCAGCAGATCTTCAACACATCTTACAACCAGACTTACGAG  
AAGTACGGCAACGTGAGTGTCTTTGAAACAACCTGGCGGGCTGGTGGTCTTCTGGCAGGG  
GATCAAGCAGAAATCTCTGGTGGAGCTGGAACGGCTGGCCAATAGAAGTTCCTGAACC  
TGAATCATAATCGCACCAAGCGATCCACAGACGGAAACAATGCAACTCATCTGAGCAAC  
ATGGAGTCCGTGCACAATCTGGTCTACGCCAGCTCCAGTTCCTTACGACACCCTGCG  
AGGCTATATCAACCGGGCCCTGGCTCAGATTGCAGAAGCCTGGTGCCTGGATCAGAGGC  
GCACCCTGGAGGTCTTTAAGGAACTGAGCAAAATTAACCCATCTGCTATCCTGAGTGCA

ATCTACAATAAGCCCATCGCAGCCAGGTTTCATGGGGGACGTGCTGGGACTGGCCTCCTG  
 CGTCACTATCAACCAGACCTCTGTGAAGGTCCTGCGCGATATGAATGTGAAAGAGAGTC  
 CTGGCAGGTGTTATTCACGCCAGTGGTCATCTTCAACTTCGCTAATAGCTCCTACGTG  
 CAGTATGGCCAGCTCGGGGAGGACAACGAAATCCTGCTGGGAAATCACAGGACCGAGGA  
 ATGTCAGCTCCCAAGTCTGAAGATCTTTATTGCCGGCAACTCAGCTTACGAGTATGTGG  
 ATTACCTGTTCAAACGCATGATCGACCTGTCTAGTATTTCAACAGTGGATAGCATGATC  
 GCCCTGGACATTGATCCCCTGAAAATACTGACTTCAGGGTGCTGGAGCTGTATAGCCA  
 GAAGGAACTGCGCTCCATTAACGTGTTTGATCTGGAGGAAATCATGAGGGAGTTCAATT  
 CCTACAAGCAGCGGTGAAATATGTGGAAGATAAGGTGGTCGACCCTCTGCCACCCTAC  
 CTGAAAGGCCTGGACGATCTGATGAGCGGGCTGGGAGCTGCAGGCAAGGCAGTGGGAGT  
 CGCCATCGGAGCTGTGGGAGGCGCTGTTCGCATCCGTGGTCGAGGGAGTGGCTACCTTTC  
 TGAAGAACCCATTCTTTTTTCATCATCGGCCTGATCATTGGGCTGTTCCCTGGTGCTGAGA  
GTCGGCATCCACCTGTGCATTAAGCTGAAGCACACCAAGAAGAGGCAGATCTACACCGA  
TATTGAAATGAACAGACTGGGCAAGTGA (SEQ ID NO: 12) (TM e CTD  
 sublinhados)

### **Complexo de glicoproteína gH (gC) III**

[088] O complexo de gC III contém glicoproteínas gH (UL75), gL (UL115) e gO (UL74) (Urban M. e cols., 1996 *J. Gen. Virol.* 77: 1.537-47). Como gB, gH está conservado entre herpesvírus humanos patogênicos e tem um papel importante em diversas etapas durante a replicação do HCMV. HCMV codifica dois complexos de gH/gL: gH/gL/gO e um complexo de gH/gL/UL128/UL130/UL131 (Wang D. e Shenk T. 2005 *Proc. Natl. Acad. USA* 102: 18.153-8). O complexo que contém gO é geralmente suficiente para infecção de fibroblasto com HCMV, enquanto o complexo que contém UL128/UL130/UL131 é necessário a fim de que o HCMV infecte células endoteliais e epiteliais (Wang D. e Shenk T. 2005 *J. Virol.* 79 10.330-8). A infecção natural com HCMV tipicamente desperta anticorpos neutralizantes em titulação

elevada específicos para entrada na célula epitelial e foi demonstrado que anticorpos contra epitopos de gH/gL/UL128/UL130/UL131 podem compreender um componente significativo dessa atividade (Macagno A. e cols., 2010 *J. Virol.* 84: 1.005-13). Estudos imunológicos sobre gH demonstraram que em células de mamíferos a proteína precisa de polipeptídeos adicionais (como gL) para processamento e transporte corretos para a membrana celular (Urban M. e cols., 1996 *J. Gen. Virol.* 77: 1.537-1.547). Se expresso isoladamente, gH é encontrado exclusivamente no citoplasma e/ou membrana nuclear (Cranage M.P. e cols., 1988 *J. Virol.* 62: 1.416-1.422).

[089] Uma seqüência de aminoácidos e de ácidos nucléicos do polipeptídeo gH de HCMV exemplar é mostrada abaixo como o SEQ ID NO: 13 e SEQ ID NO: 14, respectivamente. Em algumas modalidades, um polipeptídeo gH adequado é substancialmente homólogo a um polipeptídeo gH de HCMV conhecido. Por exemplo, um polipeptídeo gH pode ser um polipeptídeo gH de HCMV modificado que contém uma ou mais substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos, quando comparado com um polipeptídeo gH do tipo selvagem ou de ocorrência natural (por exemplo, SEQ ID NO: 13). Dessa forma, em algumas modalidades, um polipeptídeo gH adequado à presente invenção é substancialmente homólogo a um polipeptídeo gH de HCMV (SEQ ID NO: 13). Em algumas modalidades, um polipeptídeo gH de HCMV adequado à presente invenção possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais homóloga ao SEQ ID NO: 13. Em algumas modalidades, um polipeptídeo gH adequado à

presente invenção é substancialmente idêntico a um polipeptídeo gH de HCMV (SEQ ID NO: 13). Em algumas modalidades, um polipeptídeo gH adequado à presente invenção possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica ao SEQ ID NO: 13.

**Seqüência de aminoácidos de gH de HCMV (SEQ ID NO: 13)**

MRPGLPSYLIVLAVCLLSHLLSSRYGAEAISEPLDKAFHLLLNTYGRPIRFLRENTTQC  
 TYNSSLRNSTVVRENAISFNFFQSYNQYYVFHMPCRCLFAGPLAEQFLNQVDLTETLERY  
 QQRLNTYALVSKDLASYRSFSQQLKAQDSLGEQPTTVPPPIDLSIPHVWMPPTTPHGW  
 TESHTTSGLHRPHFNQTCILFDGHDLLFSTVTPCLHQGFYLIDELRYVKITLTEDFFV  
 TVSIDDDTPMLLIIFGHLPRVLFKAPYQRDNFILRQTEKHELLVLVKKDQLNRHSYLKDP  
 DFLDAALDFNYLDLSALLRNSFHRYAVDVLKSGRCQMLDRRTVEMAFAYALALFAAARQ  
 EEAGAQVSVPRALDRQAALLQIQEFMITCLSQTTPRRTLLLYPTAVDLAKRALWTPNQI  
 TDITSLVRLVYILSKQNQQHLIPQWALRQIADFALKLHKTHLASFLSAFARQELYLMGS  
 LVHSMVHTTERREIFIVETGLCSLAELSHFTQLLAHPHHEYLSDLYTPCSSSGRRDHS  
 LERLTRLFPDATVPTTVPAAALSILSTMQPSTLETFPDLFCLPLGESFSALTVSEHVSIV  
 VTNQYLIKGISYPVSTTVVGQSLIITQTDSTKCELTRNMHTTHSITAALNISLENCAF  
 CQSALLEYDDTQGVINIMYMHDSDDVLFALDPYNEVVVSSPRTHYLMLLKGTVLEVTDV  
 VVDATDSRLLLMMSVYALSAIIGIYLLYRMLTC \* (SEQ ID NO: 13) (TM e  
 CTD sublinhados)

**Seqüência de nucleotídeos de gH de HCMV (SEQ ID NO: 14)**

ATGCGGCCAGGCTCCCCTCCTACCTCATCGTCCTCGCCGTCTGTCTCCTCAGCCACCT  
 ACTTTCGTCACGATATGGCGCAGAAGCCATATCCGAACCGCTGGACAAAGCGTTTCACC  
 TACTGCTCAACACCTACGGGAGACCCATCCGCTTCTGCGTGAAAACACCACCCAGTGT  
 ACCTACAATAGCAGCCTCCGTAACAGCACGGTCGTCAGGGAAAACGCCATCAGTTTCAA  
 CTTTTTCCAAAGCTATAATCAATACTATGTATTCCATATGCCTCGATGTCTTTTTGCGG  
 GTCCTCTGGCGGAGCAGTTTCTGAACCAGGTAGATCTGACCGAAACCCTGGAAAGATAC  
 CAACAGAGACTTAACACTTACGCGCTGGTATCCAAAGACCTGGCCAGCTACCGATCTTT

TTCGCAGCAGCTAAAGGCACAGGACAGCCTAGGTGAACAGCCCACCACTGTGCCACCAC  
CCATTGACCTGTCAATACCTCACGTTTGGATGCCACCGCAAACCACTCCACACGGCTGG  
ACAGAATCACATAACCACCTCAGGACTACACCGACCACACTTTAACCAGACCTGTATCCT  
CTTTGATGGACACGATCTACTATTCAGCACCGTCACACCTTGTTTGCACCAAGGCTTTT  
ACCTCATCGACGAACTACGTTACGTTAAAATAACACTGACCGAGGACTTCTTCGTAGTT  
ACGGTGTCCATAGACGACGACACCCATGCTGCTTATCTTCGGCCATCTTCCACGCGT  
ACTCTTTAAAGCGCCCTATCAACGCGACAACCTTTATACTACGACAACTGAAAAACAG  
AGCTCCTGGTGCTAGTTAAGAAAGATCAACTGAACCGTCACTCTTATCTCAAAGACCCG  
GACTTTCTTGACGCCGCACTTGACTTCAACTACCTGGACCTCAGCGCACTACTACGTAA  
CAGCTTTCACCGTTACGCCGTGGATGTACTCAAAGCGGTTCGATGTCAGATGCTGGACC  
GCCGCACGGTAGAAATGGCCTTCGCCTACGCATTAGCACTGTTTCGCAGCAGCCCGACAA  
GAAGAGGCCGGCGCCCAAGTCTCCGTCCCACGGGCCCTAGACCGCCAGGCCGCACTCTT  
ACAAATACAAGAATTTATGATCACCTGCCTCTCACAAACACCACCACGCACCACGTTGC  
TGCTGTATCCCACGGCCGTGGACCTGGCCAAACGAGCCCTTTGGACACCGAATCAGATC  
ACCGACATCACCAGCCTCGTACGCCTGGTCTACATACTCTCTAAACAGAATCAGCAACA  
TCTCATCCCCAGTGGGCACTACGACAGATCGCCGACTTTGCCCTAAAACCTACACAAAA  
CGCACCTGGCCTCTTTTCTTTCAGCCTTCGCGCGTCAAGAACTCTACCTCATGGGCAGC  
CTCGTCCACTCCATGCTAGTACATACGACGGAGAGACGCGAAATCTTCATCGTAGAAAC  
GGGCTCTGTTCATTAGCCGAGCTATCACACTTTACGCAGTTGCTAGCTCATCCGCACC  
ACGAATACCTCAGCGACCTGTACACACCCTGTTCCAGTAGCGGGCGACGCGATCACTCG  
CTCGAACGCCTCACACGTCTCTTCCCCGATGCCACCGTCCCCACTACCGTTCCCGCCG  
CCTCTCCATCCTATCTACCATGCAACCAAGCACGCTAGAAACCTTCCCCGACCTGTTTT  
GTCTGCCGCTCGGCGAATCCTTCTCCGCGCTGACCGTCTCCGAACACGTCAGTTATGTC  
GTAACAAACCAGTACCTGATCAAAGGTATCTCCTACCCTGTCTCCACCACCGTCGTAGG  
CCAGAGCCTCATCATCACCCAGACGGACAGTCAAACCTAAATGCGAACTGACGCGCAACA  
TGCATACCACACACAGCATCACAGCGGCGCTCAACATTTCCCTAGAAAACCTGCGCCTTT  
TGCCAAAGCGCCCTACTAGAATACGACGACACGCAAGGCGTCATCAACATCATGTACAT  
GCACGACTCGGACGACGTCTTTTTCGCCCTGGATCCCTACAACGAAGTGGTGGTCTCAT  
CTCCGCGAACTCACTACCTCATGCTTTTGA AAAACGGTACGGTCTTAGAAGTAACTGAC  
GTCGTCGTGGACGCTACCGACAGTCGTCTCCTCATGATGTCCGTCTACGCGCTATCGGC

CATCATCGGCATCTATCTGCTCTACCGCATGCTCAAGACATGCTGA (SEQ ID NO: 14) (TM e CTD sublinhados)

**Seqüência de nucleotídeos de gH de HCMV códon-otimizada (SEQ ID NO: 15)**

ATGAGACCTGGACTGCCTTCTTATCTGATTGTGCTGGCCGTCTGCCTGCTGTCACATCT  
GCTGAGTTCACGCTATGGGGCTGAGGCTATCTCCGAGCCACTGGACAAGGCTTTTCACC  
TGCTGCTGAACACCTACGGGAGACCCATTAGGTTCCCTGCGCGAGAATACCACACAGTGC  
ACATATAACAGCTCCCTGCGGAACAGCACTGTGGTCCGCGAAAACGCCATCTCTTTTAA  
TTTCTTTTCAGAGTTACAACCAGTACTACGTGTTCCATATGCCACGCTGTCTGTTTGCAG  
GACCCCTGGCCGAGCAGTTCCTGAACCAGGTGGACCTGACCGAGACACTGGAAAGATAC  
CAGCAGAGGCTGAATACCTATGCCCTGGTGAGTAAGGATCTGGCTTCATATCGGTCTTT  
CAGTCAGCAGCTCAAGGCCCAGGACTCACTGGGCGAGCAGCCTACTACCGTGCCCCCTC  
CAATCGATCTGAGCATTCCACACGTCTGGATGCCCCCTCAGACAACCTCCCCACGGCTGG  
ACCGAAAGCCATAACCACATCCGGGCTGCACAGACCCCATTTCAACCAGACATGCATCCT  
GTTTGATGGGCACGACCTGCTGTTTCAGCACTGTGACCCCTTGTCTGCATCAGGGATTCT  
ACCTGATCGATGAGCTGAGATATGTGAAAATTACACTGACTGAAGACTTCTTTGTGGTC  
ACCGTGAGCATCGACGATGACACACCAATGCTGCTGATTTTTGGACACCTGCCCCGGGT  
GCTGTTCAAGGCCCCCTACCAGCGAGACAACCTTTATTCTGCGGCAGACCGAGAAACACG  
AACTGCTGGTGCTGGTCAAGAAAGATCAGCTCAACAGGCATAGCTATCTGAAGGACCCC  
GACTTTCTGGATGCCGCTCTGGACTTCAACTACCTGGACCTGTCAGCACTGCTGCGGAA  
TAGCTTCCACAGATATGCCGTGGATGTCCTGAAATCCGGAAGATGCCAGATGCTGGACC  
GGAGAACCGTGGAGATGGCATTTCCTACGCTCTGGCACTGTTTCGAGCCGCTAGGCAG  
GAGGAAGCAGGCGCTCAGGTGTCCGTCCCTCGCGCACTGGATCGACAGGCAGCCCTGCT  
GCAGATCCAGGAGTTCATGATTACCTGTCTGTCTCAGACACCACCCAGAACTACCCTGC  
TGCTGTACCCCACTGCCGTGGACCTGGCTAAGAGGGCACTGTGGACCCCTAACCAGATC  
ACTGATATTACCTCTCTGGTGCGCCTGGTCTATATCCTGAGTAAACAGAATCAGCAGCA  
CCTGATCCCACAGTGGGCCCTGCGACAGATTGCCGACTTCGCTCTGAAGCTGCACAAAA  
CCCATCTGGCTTCCTTCTGTCTGCATTTGCCCGCCAGGAGCTGTACCTGATGGGCTCT  
CTGGTGCACAGTATGCTGGTCCATACAACTGAGAGGCGCGAAATCTTTATTGTGGAGAC  
AGGGCTGTGCAGCCTGGCTGAACTGTCCCACTTCACTCAGCTCCTGGCCCATCCTCACC

ATGAGTACCTGTCCGATCTGTATAACCCCATGTTCTAGTTCAGGCCGACGGGACCACTCT  
CTGGAACGACTGACTCGGCTGTTTCCTGATGCAACCGTGCCTACCACCGTGCCCGCCGC  
CCTGAGTATCCTGTCAACAATGCAGCCAAGCACACTGGAGACTTTCCTCCCGACCTGTTTT  
GCCTGCCTCTGGGGGAGTCATTCAGCGCCCTGACCGTGTGAGAACATGTCAGCTACGTG  
GTCACAAACCAGTATCTGATCAAGGGAATTTCCCTACCCCGTGTCTACTACCGTGGTCGG  
CCAGAGTCTGATCATTACCCAGACAGATTCACAGACTAAATGTGAGCTGACCCGGAATA  
TGCACACAACCTCATAGCATCACCGCCGCTCTGAACATTTCCCTGGAGAATTGCGCTTTT  
TGTCAGAGTGCACTGCTGGAATACGATGACACACAGGGCGTGATCAACATTATGTATAT  
GCACGATAGCGATGACGTGCTGTTTCGCTCTGGACCCCTACAACGAGGTGGTCGTGAGCT  
CCCCTCGCACTCATTATCTGATGCTGCTGAAGAATGGAACAGTGCTGGAAGTCACTGAT  
GTCGTGGTCGATGCCACAGACTCCCGGCTGCTGATGATGTCTGTGTACGCACTGTCCGC  
CATCATCGGCATCTATCTGCTGTATCGAATGCTGAAAACCTGTTGA (SEQ ID NO:  
15) (TM e CTD sublinhados)

[090] Em algumas modalidades, um polipeptídeo gH para uso de acordo com a presente invenção é desprovido de um domínio transmembrana e/ou domínio citoplasmático e/ou contém um domínio transmembrana e/ou um domínio citoplasmático modificado. Um polipeptídeo gH pode opcionalmente incluir um ou mais polipeptídeos adicionais (por exemplo, um polipeptídeo heterólogo do domínio transmembrana e/ou do domínio citoplasmático). Em algumas modalidades, um polipeptídeo gH é expresso como uma proteína de fusão com um polipeptídeo heterólogo. O polipeptídeo gH pode estar ligado a um polipeptídeo heterólogo para criar uma proteína de fusão sem alteração da função e/ou antigenicidade de gH. Por exemplo, uma seqüência codificadora para um polipeptídeo heterólogo pode ser unida na seqüência codificadora do polipeptídeo gH, por exemplo, na extremidade 3' da seqüência codificadora do polipeptídeo gH. Em algumas modalidades, uma seqüência

codificadora para um polipeptídeo heterólogo pode ser unida *in frame* na seqüência codificadora do polipeptídeo gH. Em algumas modalidades, uma seqüência codificadora do polipeptídeo gH e polipeptídeo heterólogo podem ser expressos por um único promotor. Em algumas modalidades, um polipeptídeo heterólogo é inserido (por exemplo, fundido) no terminal C de um polipeptídeo gH.

[091] Em algumas modalidades, um polipeptídeo heterólogo é ou compreende um domínio transmembrana e/ou domínio citoplasmático encontrado no vírus da estomatite vesicular (VSV). Em algumas modalidades, um gH que não possui um domínio transmembrana e/ou um domínio citoplasmático é fundido a um domínio transmembrana e/ou domínio citoplasmático de VSV. Um polipeptídeo de fusão gH-VSV exemplar para uso de acordo com a presente invenção é mostrado abaixo como o SEQ ID NO: 16. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão de polipeptídeo gH-VSV adequada inclui todo ou uma porção de um polipeptídeo gH que é substancialmente homólogo a um polipeptídeo gH de HCMV conhecido e todo ou uma porção de um polipeptídeo do VSV que é substancialmente homólogo a um polipeptídeo do VSV conhecido. Por exemplo, uma proteína de fusão de polipeptídeo gH - VSV pode conter uma ou mais substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos, quando comparado com um polipeptídeo gH e/ou VSV do tipo selvagem ou de ocorrência natural. Dessa forma, em algumas modalidades, uma proteína de fusão de polipeptídeo gH-VSV adequada à presente invenção é substancialmente homóloga ao SEQ ID NO: 16. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão de polipeptídeo gH-VSV adequada à presente invenção

possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais homóloga ao SEQ ID NO: 16. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão de polipeptídeo gH-VSV adequada à presente invenção é substancialmente idêntica ao SEQ ID NO: 16. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão de polipeptídeo gH-VSV adequada à presente invenção possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica ao SEQ ID NO: 16. Como aqui usado, "gH-G" se refere a uma proteína de fusão de gH de HCMV - TM/CTD de VSV.

**Seqüência de aminoácidos de gH - G de HCMV (SEQ ID NO: 16)**

MRPGLPSYLIVLAVCLLSHLLSSRYGAEAISEPLDKAFHLLLNTYGRPIRFLRENTTQC  
 TYNSSLRNSTVVRENAISFNFFQSYNQYYVFHMPCRCLFAGPLAEQFLNQVDLTETLERY  
 QQRLNTYALVSKDLASYRSFSQQLKAQDSLGEQPTTVPPPIDLSIPHVWMPQTPPHGW  
 TESHTTSGLHRPHFNQTCILFDGHDLLFSTVTPCLHQGFYLIDELRYVKITLTEDFFVV  
 TVSIDDDTPMLLIIFGHLPRVLFKAPYQRDNFILRQTEKHELLVLVKKDQLNRHSYLKDP  
 DFLDAALDFNYLDSLALLRNSFHRYAVDVLKSGRCQMLDRRTVEMAFAYALALFAAARQ  
 EEAGAQVSVPRALDRQAALLQIQEFMITCLSQTTPRRTLLLYPTAVDLAKRALWTPNQI  
 TDITSLVRLVYILSKQNQQHLIPQWALRQIADFALKLHKTHLASFLSAFARQELYLMGS  
 LVHSMVLVHTTERREIFIVETGLCSLAELSHFTQLLAHPHHEYLSDLYTPCSSSGRRDHS  
 LERLTRLFPDATVPTTVPAALSILSTMQPSTLETFPDLFCLPLGESFSALTVSEHVSIV  
 VTNQYLIKGISYPVSTTVVGQSLIITQTDSTKCELTRNMHTTHSITAALNISLENCAF  
 CQSALLEYDDTQGVINIMYMHDSDDVLFALDPYNEVVVSSPRTHYLMLLKNGTVLEVTD  
 VVVDATDSRFFFIIGLIIGLFLVLRVGIHLCIKHKHTKKRorYTDIEMNRLGK \*

(SEQ ID NO: 16) (TM e CTD sublinhados)

**Seqüência de nucleotídeos de gH - G de HCMV (SEQ ID NO: 17)**

ATGCGGCCAGGCTCCCTCCTACCTCATCGTCCTCGCCGTCTGTCTCCTCAGCCACCT  
ACTTTCGTACGATATGGCGCAGAAGCCATATCCGAACCGCTGGACAAAGCGTTTCACC  
TACTGCTCAACACCTACGGGAGACCCATCCGCTTCTGCGTGAAAACACCACCCAGTGT  
ACCTACAATAGCAGCCTCCGTAACAGCACGGTCGTCAGGGAAAACGCCATCAGTTTCAA  
CTTTTTCCAAAGCTATAATCAATACTATGTATTCCATATGCCTCGATGTCTTTTTGCGG  
GTCCTCTGGCGGAGCAGTTTCTGAACCAGGTAGATCTGACCGAAACCTGGAAAGATAC  
CAACAGAGACTTAACACTTACGCGCTGGTATCCAAAGACCTGGCCAGCTACCGATCTTT  
TTCGCAGCAGCTAAAGGCACAGGACAGCCTAGGTGAACAGCCCACCACTGTGCCACCAC  
CCATTGACCTGTCAATACCTCACGTTTGGATGCCACCGCAAACCACTCCACACGGCTGG  
ACAGAATCACATAACCACCTCAGGACTACACCGACCACACTTTAACCAGACCTGTATCCT  
CTTTGATGGACACGATCTACTATTCAGCACCGTCACACCTTGTTTGCACCAAGGCTTTT  
ACCTCATCGACGAACTACGTTACGTTAAAATAACACTGACCGAGGACTTCTTCGTAGTT  
ACGGTGTCCATAGACGACGACACACCCATGCTGCTTATCTTCGGCCATCTTCCACGCGT  
ACTCTTTAAAGCGCCCTATCAACGCGACAACCTTTATACTACGACAACTGAAAAACACG  
AGCTCCTGGTGCTAGTTAAGAAAGATCAACTGAACCGTCACTCTTATCTCAAAGACCCG  
GACTTTCTTGACGCCGCACTTGACTTCAACTACCTGGACCTCAGCGCACTACTACGTAA  
CAGCTTTCACCGTTACGCCGTGGATGTACTCAAAGCGGTTCGATGTCAGATGCTGGACC  
GCCGCACGGTAGAAATGGCCTTCGCCTACGCATTAGCACTGTTTCGCAGCAGCCCGACAA  
GAAGAGGCCGGCGCCCAAGTCTCCGTCCCACGGGCCCTAGACCGCCAGGCCGCACTCTT  
ACAAATACAAGAATTTATGATCACCTGCCTCTCACAAACACCACCACGCACCACGTTGC  
TGCTGTATCCCACGGCCGTGGACCTGGCCAAACGAGCCCTTTGGACACCGAATCAGATC  
ACCGACATCACCAGCCTCGTACGCCTGGTCTACATACTCTCTAAACAGAATCAGCAACA  
TCTCATCCCCAGTGGGCACTACGACAGATCGCCGACTTTGCCCTAAAACCTACACAAAA  
CGCACCTGGCCTCTTTTCTTTCAGCCTTCGCGCGTCAAGAACTCTACCTCATGGGCAGC  
CTCGTCCACTCCATGCTAGTACATACGACGGAGAGACGCGAAATCTTCATCGTAGAAAC  
GGGCTCTGTTTATTAGCCGAGCTATCACACTTTACGCAGTTGCTAGCTCATCCGCACC  
ACGAATACCTCAGCGACCTGTACACACCCTGTTCCAGTAGCGGGCGACGCGATCACTCG  
CTCGAACGCCTCACACGTCTCTTCCCCGATGCCACCGTCCCCACTACCGTTCCCGCCGC  
CCTCTCCATCCTATCTACCATGCAACCAAGCACGCTAGAAACCTTCCCCGACCTGTTTT  
GTCTGCCGCTCGGCGAATCCTTCTCCGCGCTGACCGTCTCCGAACACGTCAGTTATGTC

GTAACAAACCAGTACCTGATCAAAGGTATCTCCTACCCTGTCTCCACCACCGTCGTAGG  
 CCAGAGCCTCATCATCACCCAGACGGACAGTCAAATAAATGCGAACTGACGCGCAACA  
 TGCATACCACACACAGCATCACAGCGGCGCTCAACATTTCCCTAGAAAAGTGCGCCTTT  
 TGCCAAAGCGCCCTACTAGAATACGACGACACGCAAGGCGTCATCAACATCATGTACAT  
 GCACGACTCGGACGACGTCTTTTTCGCCCTGGATCCCTACAACGAAGTGGTGGTCTCAT  
 CTCCGCGAACTCACTACCTCATGCTTTTTGAAAACGGTACGGTCTTAGAAGTAACTGAC  
 GTCGTCGTGGACGCTACCGACAGTCGTTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACT  
ATTCTTGGTTCTCCGAGTTGGTATCCATCTTTGCATTAAATTAAGCACACCAAGAAAA  
GACAGATTTATACAGACATAGAGATGAACCGACTTGGAAGTAA (SEQ ID NO:  
 17) (TM e CTD sublinhados)

**Seqüência de nucleotídeos de gH - G de HCMV códon-  
 otimizada (SEQ ID NO: 18)**

ATGCGACCCGGACTGCCAAGCTACCTGATTGTCTGGCTGTCTGTCTGCTGTCACACCT  
 GCTGAGTTCAAGATATGGGGCCGAAGCCATCAGCGAGCCACTGGACAAGGCTTTCCACC  
 TGCTGCTGAACACCTACGGCAGACCCATTAGGTTTCTGCGCGAGAATACCACACAGTGC  
 ACATATAACAGCTCCCTGAGGAATAGCACTGTGGTCCGCGAAAACGCCATCTCTTTCAA  
 TTTCTTTCAGAGTTACAACCAGTACTACGTGTTCCATATGCCACGCTGTCTGTTTCGCAG  
 GACCCCTGGCCGAGCAGTTTCTGAACCAGGTGGACCTGACCGAGACACTGGAAAGATAC  
 CAGCAGAGGCTGAATACCTATGCCCTGGTGAGTAAGGATCTGGCTTCATATCGGTCTTT  
 CAGTCAGCAGCTCAAGGCCCAGGACTCTCTGGGAGAGCAGCCTACTACCGTGCCCCCTC  
 CAATCGATCTGAGTATTCCACACGTCTGGATGCCCCCTCAGACAACCTCCCCACGGATGG  
 ACCGAAAGCCATAACCACATCCGGCCTGCACAGACCCCACTTCAACCAGACATGCATCCT  
 GTTCGATGGCCACGACCTGCTGTTTTCCACTGTGACCCCTTGTCTGCATCAGGGGTTCT  
 ACCTGATCGATGAGCTGAGATATGTGAAGATTACACTGACTGAAGACTTCTTTGTGGTC  
 ACCGTGTCTATCGACGATGACACACCAATGCTGCTGATTTTCGGACACCTGCCCCGGGT  
 GCTGTTCAAGGCCCCCTACCAGCGAGACAACCTTCATCCTGCGGCAGACCGAGAAACACG  
 AACTGCTGGTGCTGGTCAAGAAAGATCAGCTCAACCGGCATTCTATCTGAAGGACCCC  
 GACTTCTGGATGCCGCTCTGGACTTTAACTACCTGGACCTGTCAGCACTGCTGCGGAA  
 TAGCTTTCACAGATATGCCGTGGATGTCCTGAAATCTGGGCGCTGCCAGATGCTGGACC  
 GGAGAACCGTGGAGATGGCATTGCCTACGCTCTGGCACTGTTTGCAGCCGCTCGGCAG

GAGGAAGCAGGAGCTCAGGTGAGTGTCCCTCGCGCACTGGATCGACAGGCAGCCCTGCT  
GCAGATCCAGGAGTTCATGATTACCTGTCTGAGCCAGACACCACCCAGAACTACCCTGC  
TGCTGTACCCCACTGCCGTGGACCTGGCTAAGAGGGCACTGTGGACCCCTAACCAGATC  
ACTGATATTACCAGCCTGGTGAGACTGGTCTATATCCTGTCCAAACAGAATCAGCAGCA  
CCTGATCCCACAGTGGGCCCTGAGGCAGATTGCCGACTTTGCTCTGAAGCTGCACAAAA  
CCCATCTGGCTTCCTTTCTGTCTGCATTCGCCAGACAGGAGCTGTACCTGATGGGATCT  
CTGGTGCACAGTATGCTGGTCCATACTGAGAGGCGGAAATCTTCATTGTGGAGAC  
AGGCCTGTGCAGCCTGGCTGAACTGTCCCACCTTTACTCAGCTCCTGGCCCATCCTCACC  
ATGAGTACCTGTCAGATCTGTATACCCCATGTTCTAGTTCAGGACGACGGGACCACAGC  
CTGGAACGACTGACTCGGCTGTTCCCTGATGCAACCGTGCCTACCACCGTGCCCGCCGC  
CCTGAGTATCCTGTCAACAATGCAGCCAAGCACACTGGAGACTTTTCCCGACCTGTTCT  
GCCTGCCTCTGGGCGAGAGCTTCAGCGCCCTGACCGTGAGCGAACATGTCAGCTACGTG  
GTCACAAACCAGTATCTGATCAAGGGGATTTCCCTACCCCGTGTCTACTACCGTGGTCCG  
ACAGTCCCTGATCATTACCCAGACAGATTCTCAGACTAAATGTGAGCTGACCAGAAATA  
TGCACACAACCTCATAGTATCACCGCCGCTCTGAACATTTCACTGGAGAATTGCGCTTTC  
TGTCAGTCCGCACTGCTGGAATACGATGACACACAGGGCGTGATCAACATTATGTATAT  
GCACGATTCTGATGACGTGCTGTTTGCTCTGGACCCCTACAACGAGGTGGTCGTGAGCT  
CCCCCAGAACTCATTATCTGATGCTGCTGAAGAATGGCACAGTGCTGGAAGTCACTGAT  
GTCGTGGTCGATGCCACAGACTCCCGCTTCTTTTTTCATCATTGGCCTGATCATTGGGCT  
GTTCTGGTGCTGCGAGTCGGCATCCACCTGTGCATCAAGCTGAAGCATACAAAGAAGA  
GACAGATCTACACCGATATTGAAATGAACAGGCTGGGCAAATGA (SEQ ID NO:  
18) (TM e CTD sublinhados)

[092] Em algumas modalidades, um polipeptídeo gH inclui um domínio transmembrana e/ou domínio citoplasmático encontrado em gB. Um exemplar nucleotídeo que codifica um polipeptídeo de fusão gH de HCMV - TM/CTD de gB de HCMV para uso de acordo com a presente invenção é mostrado abaixo como o SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, um polipeptídeo gH de HCMV - TM/CTD de gB de HCMV adequado à presente invenção é substancialmente homólogo ao

polipeptídeo codificado pelo SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, um polipeptídeo gH de HCMV - TM/CTD de gB de HCMV adequado à presente invenção possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais homólogo ao polipeptídeo codificado pelo SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, um polipeptídeo gH de HCMV - TM/CTD de gB de HCMV adequado à presente invenção é substancialmente idêntico ao polipeptídeo codificado pelo SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, um polipeptídeo gH de HCMV - TM/CTD de gB de HCMV adequado à presente invenção possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) ou mais idêntico ao polipeptídeo codificado pelo SEQ ID NO: 20.

**Seqüência de nucleotídeos de gH de HCMV - TM/CTD de gB de HCMV (SEQ ID NO: 20)**

ATGCGGCCAGGCTCCCTCCTACCTCATCGTCCTCGCCGTCTGTCTCCTCAGCCACCT  
ACTTTCGTCACGATATGGCGCAGAAGCCATATCCGAACCGCTGGACAAAGCGTTTCACC  
TACTGCTCAACACCTACGGGAGACCCATCCGCTTCTGCGTGAAAACACCACCCAGTGT  
ACCTACAATAGCAGCCTCCGTAACAGCACGGTTCGTCAGGGAAAACGCCATCAGTTTCAA  
CTTTTTCCAAAGCTATAATCAATACTATGTATTCCATATGCCTCGATGTCTTTTTGCGG  
GTCCTCTGGCGGAGCAGTTTCTGAACCAGGTAGATCTGACCGAAACCCTGGAAAGATAC  
CAACAGAGACTTAACACTTACGCGCTGGTATCCAAAGACCTGGCCAGCTACCGATCTTT  
TTCGCAGCAGCTAAAGGCACAGGACAGCCTAGGTGAACAGCCCACCACTGTGCCACCAC  
CCATTGACCTGTCAATACCTCACGTTTGGATGCCACCGCAAACCACTCCACACGGCTGG  
ACAGAATCACATAACCACCTCAGGACTACACCGACCACACTTTAACCAGACCTGTATCCT  
CTTTGATGGACACGATCTACTATTCAGCACCGTCACACCTTGTTTGCACCAAGGCTTTT  
ACCTCATCGACGAACTACGTTACGTTAAAATAACACTGACCGAGGACTTCTTCGTAGTT  
ACGGTGTCCATAGACGACGACACACCCATGCTGCTTATCTTCGGCCATCTTCCACGCGT

ACTCTTTAAAGCGCCCTATCAACGCGACAACCTTTATACTACGACAAACTGAAAAACACG  
AGCTCCTGGTGCTAGTTAAGAAAGATCAACTGAACCGTCACTCTTATCTCAAAGACCCG  
GACTTTCTTGACGCCGCACTTGACTTCAACTACCTGGACCTCAGCGCACTACTACGTAA  
CAGCTTTCACCGTTACGCCGTGGATGTACTCAAAGCGGTTCGATGTCAGATGCTGGACC  
GCCGCACGGTAGAAATGGCCTTCGCCTACGCATTAGCACTGTTTCGCAGCAGCCCGACAA  
GAAGAGGCCGGCGCCCAAGTCTCCGTCCCACGGGCCCTAGACCGCCAGGCCGCACTCTT  
ACAAATACAAGAATTTATGATCACCTGCCTCTCACAAACACCACCACGCACCACGTTGC  
TGCTGTATCCCACGGCCGTGGACCTGGCCAAACGAGCCCTTTGGACACCGAATCAGATC  
ACCGACATCACCGCCTCGTACGCCGTGGTCTACATACTCTCTAAACAGAATCAGCAACA  
TCTCATCCCCAGTGGGCACTACGACAGATCGCCGACTTTGCCCTAAAACCTACACAAAA  
CGCACCTGGCCTCTTTTCTTTCAGCCTTCGCGCGTCAAGAACTCTACCTCATGGGCAGC  
CTCGTCCACTCCATGCTAGTACATACGACGGAGAGACGCGAAATCTTCATCGTAGAAAC  
GGGCCTCTGTTTATTAGCCGAGCTATCACACTTTACGCAGTTGCTAGCTCATCCGCACC  
ACGAATACCTCAGCGACCTGTACACACCCTGTTCCAGTAGCGGGCGACGCGATCACTCG  
CTCGAACGCCTCACACGTCTCTTCCCCGATGCCACCGTCCCCACTACCGTTCCCGCCGC  
CCTCTCCATCCTATCTACCATGCAACCAAGCACGCTAGAAACCTTCCCCGACCTGTTTT  
GTCTGCCGCTCGGCGAATCCTTCTCCGCGCTGACCGTCTCCGAACACGTCAGTTATGTC  
GTAACAAACCAGTACCTGATCAAAGGTATCTCCTACCCTGTCTCCACCACCGTCGTAGG  
CCAGAGCCTCATCATCACCCAGACGGACAGTCAAACCTAAATGCGAACTGACGCGCAACA  
TGCATACCACACACAGCATCACAGCGGCGCTCAACATTTCCCTAGAAAACCTGCGCCTTT  
TGCCAAAGCGCCCTACTAGAATACGACGACACGCAAGGCGTCATCAACATCATGTACAT  
GCACGACTCGGACGACGTCTTTTTCGCCCTGGATCCCTACAACGAAGTGGTGGTCTCAT  
CTCCGCGAACTCACTACCTCATGCTTTTTGAAAAACGGTACGGTCTTAGAAGTAACTGAC  
GTCGTGCTGGACGCTACCGACAGTCGTT**TCGGAGCCTTCACCATCATCCTCGTGGCCAT**  
**AGCCGTCGTCATTATCATTTATTTGATCTATACTCGACAGCGGGCTCTCTGCATGCAGC**  
**CGCTGCAGAACCTCTTTCCCTATCTGGTGTCCGCCGACGGGACCACCGTGACGTCGGGC**  
**AACACCAAAGACACGTCGTTACAGGCTCCGCCTTCTACGAGGAAAGTGTTTATAATTC**  
**TGGTCGCAAAGGACCGGGACCACCGTCGTCGTGATGCATCCACGGCGGCTCCGCCTTACA**  
**CCAACGAGCAGGCTTACCAGATGCTTCTGGCCCTGGTCCGTCTGGACGCAGAGCAGCGA**  
**GCGCAGCAGAACGGTACAGATTCTTTGGACGGACAGACTGGCACGCAGGACAAGGGACA**

**GAAGCCCAACCTGCTAGACCGACTGCGACACCGCAAAAACGGCTACCGACACTTGAAG  
ACTCCGACGAAGAAGAGAACGTCTGA** (SEQ ID NO: 20) (sinal do  
peptídeo de gH sublinhado; TM-CTD de gB em negrito)

**Outros (incluindo Complexo de glicoproteína - gN e gM  
(gC) II)**

[093] Além de gB e gH, outras glicoproteínas do envelope podem ser úteis no desenvolvimento de vacinas. Por exemplo, o complexo de gcII, que contém gN (UL73) e gM (UL100), é de interesse particular. Análises proteômicas de vírions de HCMV demonstraram que gcII é a glicoproteína mais abundantemente expressa em partículas do vírus, enfatizando sua importância potencial na imunidade protetora (Varnum S.M. e cols., 2005 *Human Gene Ther.* 16: 1.143-50). A infecção por HCMV desperta uma resposta de anticorpos gcII-específica na maioria de indivíduos soropositivos (Shimamura M. e cols., 2006 *J. Virol.* 80: 4.591-600), e foi demonstrado que vacinas de DNA que contêm antígenos de gcII gM e gN despertam respostas de anticorpos neutralizantes em coelhos e camundongos (Shen S e cols., 2007 *Vaccine* 25: 3319-27).

**p65**

[094] A resposta imune celular ao HCMV inclui respostas de linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> de MHC classe II restritos CD4<sup>+</sup> e MHC classe I restritos, a diversos antígenos virais, muitos dos quais são encontrados no tegumento viral, a região da partícula viral que se situa entre o envelope e o nucleocapsídeo. Por exemplo, foi demonstrado que a proteína de HCMV pp65 (UL83) desperta uma resposta de linfócitos T CD8<sup>+</sup> significativa após infecção por HCMV (McLaughlin-Taylor E. 1994 *J. Med. Virol.* 43: 103-10). Essa proteína viral de

65 kDa é uma das proteínas estruturais de HCMV mais abundantemente expressas. Sequências de pp65 exemplares são aqui descritas.

**Outras (incluindo IE1, pp150)**

[095] Outras proteínas que despertam respostas de linfócitos T incluem a proteína imediata precoce-1 (IE1) (UL123) e pp150 (UL32) (Gibson L e cols., 2004 *J. Immunol.* 172: 2.256-64; La Rosa C e cols., 2005 *Human Immunol.* 66: 116-26).

[096] Como descrito acima, um polipeptídeo Gag pode opcionalmente incluir um ou mais polipeptídeos adicionais (por exemplo, um antígeno heterólogo). Em algumas modalidades, um polipeptídeo Gag é co-expresso com um antígeno heterólogo (por exemplo, sob promotores separados e/ou como proteínas separadas). O polipeptídeo Gag pode ser co-expresso com um antígeno heterólogo sem alteração da função de Gag. Sem se prender a uma teoria, acredita-se que a co-expressão de um polipeptídeo Gag de automontagem com um antígeno heterólogo do envelope permitirá que o antígeno seja incorporado no envelope ou na bicamada lipídica de uma VLP resultante. Em algumas modalidades, componentes do envelope da VLP servem como imunógenos eficazes (por exemplo, para indução de resposta imune humoral). Em algumas modalidades, um polipeptídeo Gag é expresso como uma proteína de fusão com um antígeno heterólogo. Por exemplo, uma seqüência codificadora para um antígeno heterólogo pode ser unida na seqüência codificadora do polipeptídeo Gag, por exemplo, na extremidade 3' da seqüência codificadora do polipeptídeo Gag. Em algumas modalidades, uma seqüência codificadora para um antígeno

heterólogo pode ser unida *in frame* na seqüência codificadora do polipeptídeo Gag. Em algumas modalidades, uma seqüência codificadora de polipeptídeo Gag e o antígeno heterólogo podem ser expressos por um único promotor. Em algumas modalidades, um antígeno heterólogo é inserido (por exemplo, fundido) no terminal C de um polipeptídeo Gag. Sem se prender a uma teoria, acredita-se que a fusão de um polipeptídeo Gag de automontagem a um antígeno heterólogo permitirá que o antígeno seja incorporado nos componentes estruturais de uma VLP resultante. Em algumas modalidades, os componentes estruturais da VLP servem como imunógenos eficazes (por exemplo, para indução de resposta imune celular). Por exemplo, as VLPs fornecidas podem compreender um polipeptídeo gag retroviral (por exemplo, gag de MLV) e um componente estrutural de HCMV (por exemplo, pp65). Em algumas dessas modalidades, pp65 é incorporado na VLP e serve como um antígeno para despertar uma resposta imune contra HCMV.

[097] As VLPs fornecidas podem conter uma proteína estrutural retroviral (por exemplo, polipeptídeo Gag) que é disposta e construída de tal forma que sofra automontagem para formar a VLP e está posicionada no interior da VLP. Em algumas modalidades, as VLPs fornecidas contêm uma proteína do envelope (por exemplo, gB e/ou gH) que é disposta e construída de tal forma que um ou mais epitopos da proteína do envelope (por exemplo, gB e/ou gH) sejam posicionados na superfície da VLP. Em algumas modalidades, as VLPs fornecidas contêm uma proteína de fusão estrutural (por exemplo, Gag/pp65) que é disposta e construída de tal forma que um ou mais epitopos da proteína estrutural (por

exemplo, pp65) sejam posicionados no interior da VLP.

## **II. Produção de VLPs**

[098] Será observado que uma composição que compreende VLPs tipicamente incluirá uma mistura de VLPs com uma gama de tamanhos. Será subentendido que os valores de diâmetro listados abaixo correspondem ao diâmetro mais freqüente dentro da mistura. Em algumas modalidades > 90% das vesículas em uma composição terão um diâmetro que se situa dentro de 50% do valor mais freqüente (por exemplo,  $1.000 \pm 500$  nm). Em algumas modalidades, a distribuição pode ser mais estreita, por exemplo, > 90% das vesículas em uma composição podem ter um diâmetro que se situa dentro de 40, 30, 20, 10 ou 5% do valor mais freqüente. Em algumas modalidades, sonificação ou ultra-sonificação pode ser usada para facilitar a formação de VLP e/ou para alterar o tamanho da VLP. Em algumas modalidades, filtração, diálise e/ou centrifugação podem ser usadas para ajustar a distribuição de tamanho da VLP.

[099] Em geral, VLPs produzidas de acordo com os métodos da presente revelação podem ser de qualquer tamanho. Em certas modalidades, a composição pode incluir VLPs com diâmetro na faixa de cerca de 20 nm até cerca de 300 nm. Em algumas modalidades, uma VLP é caracterizada por possuir um diâmetro dentro de uma faixa delimitada por um limite inferior de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 nm e delimitada por um limite superior de 300, 290, 280, 270, 260, 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180 ou 170 nm. Em algumas modalidades, VLPs dentro de uma população mostram um diâmetro médio dentro de uma faixa delimitada por um limite inferior de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 nm

e delimitada por um limite superior de 300, 290, 280, 270, 260, 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180 ou 170 nm. Em algumas modalidades, as VLPs em uma população possuem um índice de polidispersibilidade que é menor do que 0,5 (por exemplo, menor do que 0,45, menor do que 0,4 ou menor do que 0,3). Em algumas modalidades, o diâmetro da VLP é determinado por nanodimensionamento. Em algumas modalidades, o diâmetro da VLP é determinado por microscopia eletrônica.

#### **A. Produção de VLP *in vitro* / *ex vivo***

[100] As VLPs fornecidas de acordo com a presente invenção podem ser preparadas de acordo com metodologias gerais conhecidas por aqueles habilitados na técnica. Por exemplo, várias moléculas de ácido nucléico, genomas ou vetores ou plasmídeos reconstituídos podem ser preparados usando seqüências de vírus conhecidos. Essas seqüências estão disponíveis de bancos, e material pode ser obtido de várias coleções, plasmídeos publicados etc. Esses elementos podem ser isolados e manipulados com o uso de técnicas bem conhecidas por aqueles habilitados na técnica, ou isolados de plasmídeos disponíveis na técnica. Várias seqüências sintéticas ou artificiais também podem ser produzidas a partir de análise de computador ou por meio de seleção (alto rendimento) de bibliotecas. A expressão recombinante dos polipeptídeos para VLPs exige a construção de um vetor de expressão que contém um polinucleotídeo que codifica um ou mais polipeptídeos. Após um polinucleotídeo que codifica um ou mais polipeptídeos ter sido obtido, o vetor para produção do polipeptídeo pode ser produzido por tecnologia de DNA recombinante com o uso de metodologias conhecidas na

técnica. Vetores de expressão que podem ser utilizados de acordo com a presente invenção incluem, sem limitação, vetores de expressão de mamíferos, vetores de expressão de baculovírus, vetores de expressão de planta (por exemplo, vírus do mosaico da couve-flor (CaMV), vírus do mosaico do tabaco (TMV)), vetores de expressão de plasmídeo (por exemplo, plasmídeo Ti), entre outros.

[101] Um plasmídeo de expressão de VLP exemplar que pode ser usado de acordo com a presente invenção é mostrado abaixo como o SEQ ID NO: 19:

**Plasmídeo de expressão Propol II (SEQ ID NO: 19)**

```
CTAGAGAGCTTGGCCCATTCGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATT
GGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTA
ATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTA
CGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATG
ACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTA
TTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC
CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTA
TGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGAT
GCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAA
GTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTT
CCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTG
GGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATC
CACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGTCGACCGAT
CCTGAGAACTTCAGGGTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTTCGCTATTGT
AAAATTCATGTTATATGGAGGGGGCAAAGTTTTTCAGGGTGTGTTTAGAATGGGAAGAT
GTCCCTTGTATCACCATGGACCCTCATGATAATTTTGTCTTTCACTTTCTACTCTGT
TGACAACCATTGTCTCCTCTTATTTCTTTTCATTTTCTTGTAACTTTTTCGTAAACT
TTAGCTTGCATTTGTAACGAATTTTTAAATTCACTTTTGTTTATTTGTCAGATTGTAAG
TACTTTCTCTAATCACTTTTTTTTTCAAGGCAATCAGGGTATATTATATTGTAACCTCAG
```

ACAGTTTTAGAGAACAATTGTTATAATTAAATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAA  
ATTCTGGCTGGCGTGGAAATATTCTTATTGGTAGAAACAACACTACATCCTGGTCATCATC  
CTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATATACACTGTTTGAGATGAGGATAAAATACTC  
TGAGTCCAAACCGGGCCCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTTCTACAGC  
TCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCCTCGAG  
CGTACGCCTAGGGGATCCAGCGCTATTTAAATGCTAGCATGCATGTTAACCTGCAGGG  
GTACCGCGGCCGCAAGCTTAGATCCGTCGAGGAATTCACCTCAGGTGCAGGCTGCCT  
ATCAGAAGGTGGTGGCTGGTGTGGCCAATGCCCTGGCTCACAAATACCACTGAGATCTT  
TTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGG  
CTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCAC  
TCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAG  
AGTTTGGCAACATATGCCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTTGGCTATAAAGAGG  
TCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGA  
CTTGAGGTTAGATTTTTTTTTATATTTTGTTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTA  
AAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGT  
CATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGGAGATCCCTCGACGGATCGGCCGCAATTCGTAATC  
ATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACG  
AGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAA  
TTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAA  
TGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTC  
GCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAA  
AGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCA  
AAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAG  
GCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC  
CGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCT  
GTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGC  
GCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGC  
TGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTAT  
CGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAA  
CAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTA

ACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACC  
TTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGG  
TTTTTTTGTGGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTT  
TGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACACGTTAAGGGATTTTG  
GTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTT  
TAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCA  
GTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCC  
GTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGAT  
ACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAA  
GGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGT  
TGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCAT  
TGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTT  
CCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGGTTAGCTC  
CTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTA  
TGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACT  
GGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTG  
CCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCA  
TTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGT  
TCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGT  
TTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACAC  
GGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGT  
TATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGT  
TCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAA  
ATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCA  
AAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGG  
AACAAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTA  
TCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGT  
GCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGA  
AAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGC  
GCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGC

CGCTACAGGGCGCGTCCCATTTCGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCG  
GTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATT  
AAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGC  
GCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCT  
(SEQ ID NO: 19)

[102] As VLPs fornecidas podem ser preparadas de acordo com metodologias conhecidas na técnica. Por exemplo, em algumas modalidades, as VLPs fornecidas podem ser produzidas em qualquer sistema de expressão de proteína disponível. Tipicamente, o vetor de expressão é transferido para uma célula hospedeira por técnicas convencionais e as células transfectadas são então cultivadas por técnicas convencionais para produzir VLPs. Em algumas modalidades, as VLPs são produzidas usando transfecção transitória de células. Em algumas modalidades, as VLPs são produzidas usando células transfectadas estavelmente. Linhagens de células típicas que podem ser utilizadas para produção de VLP incluem, sem limitação, linhagens de células de mamíferos como, por exemplo, células de rim embrionário humano (HEK) 293, WI 38, de ovário de hamster chinês (CHO), rim de macaco (COS), HT1080, CIO, HeLa, de rim de filhote de hamster (BHK), 3T3, CI 27, CV-1, HaK, NS/O e L-929. Exemplos não limitantes específicos incluem, sem limitação, linhagem de mieloma de camundongo BALB/c (NSO/1, ECACC N°: 85110503); retinoblastos humano (PER.C6 (CruCell, Leiden, Holanda)); linhagem de rim de macaco CV1 transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linhagem de rim embrionário humano (células 293 ou 293 subclonadas para crescimento em cultura de suspensão, Graham e cols., *J. Gen. Virol.*, 36: 59 (1977)); células de rim de filhote de hamster (BHK, ATCC

CCL 10); células de ovário de hamster chinês +/-DHFR (CHO, Urlaub e Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4.216 (1980)); células camundongo de Sertoli (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251 (1980)); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim de macaco africano verde (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato-búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); células de tumor mamário de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather e cols., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; e uma linhagem de hepatoma humano (Hep G2). Em algumas modalidades, as linhagens de células que podem ser utilizadas para produção de VLP incluem células de inseto (por exemplo, Sf-9, Sf-21, Tn-368, Hi5) ou planta (por exemplo, Leguminosa, cereal ou tabaco). Será observado em algumas modalidades, particularmente quando a glicosilação é importante para a função da proteína, que células de mamíferos são preferíveis para expressão de proteína e/ou produção de VLP (veja, por exemplo, Roldao A e cols., 2010 *Expt. Rev. Vaccines* 9: 1.149-76).

[103] Será observado que pode ser escolhida uma cepa de célula que modula a expressão das seqüências inseridas, ou modifica e processa o produto gênico de uma forma específica. Essas modificações (por exemplo, glicosilação) e processamento (por exemplo, clivagem ou transporte até a membrana) de produtos de proteína podem ser importantes para geração de uma VLP ou função de um polipeptídeo de VLP

ou polipeptídeo adicional (por exemplo, um adjuvante ou antígeno adicional). Células diferentes possuem mecanismos característicos e específicos para processamento e modificação pós-tradução de proteínas e produtos gênicos. Linhagens de células ou sistemas hospedeiros apropriados podem ser escolhidos para assegurar a modificação e processamento corretos da proteína estranha expressa. Geralmente, células hospedeiras eucarióticas (também denominadas células de empacotamento (por exemplo, células de rim de embrião humano 293T)) que possuem maquinário celular apropriado para processamento correto do transcrito primário, glicosilação e fosforilação do produto gênico podem ser usadas de acordo com a presente invenção.

[104] As VLPs podem ser purificadas de acordo com técnicas conhecidas como, por exemplo, centrifugação, gradientes, ultracentrifugação em gradiente de sacarose, filtração de fluxo tangencial e cromatografia (por exemplo, cromatografia de troca iônica (ânion e cátion), de afinidade e coluna de separação por tamanho), ou solubilidade diferencial, entre outras. Alternativa ou adicionalmente, o sobrenadante celular pode ser usado diretamente, sem etapa de purificação. Entidades adicionais, por exemplo, antígenos ou adjuvantes adicionais, podem ser adicionados às VLPs purificadas.

[105] Em algumas modalidades, as seqüências de polinucleotídeos fornecidas são códon-otimizadas. A otimização de códons é bem conhecida na técnica e envolve a modificação do uso de códons de tal forma que níveis maiores de proteína sejam produzidos.

#### **B. Produção de VLP *in vivo***

[106] As VLPs fornecidas de acordo com a presente invenção podem ser preparadas como vacinas de DNA de acordo com métodos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, em algumas modalidades, um ou mais vetores ou plasmídeos, por exemplo, aqueles descritos acima, são administrados a um indivíduo de tal forma que as células receptoras expressem polipeptídeos codificados pelo vetor ou plasmídeo. Em algumas modalidades, células receptoras que expressam esses polipeptídeos produzem VLPs que compreendem os polipeptídeos.

### **C. eVLPs mono-, di-, trivalentes**

[107] De acordo com a presente invenção, células podem ser transfectadas com um único vetor de expressão, como aqui descrito. Em algumas modalidades, um único vetor de expressão codifica mais de um elemento de uma VLP (por exemplo, mais de uma das poliproteínas estruturais, polipeptídeo do tegumento de CMV, glicoproteína de CMV etc.). Por exemplo, em algumas modalidades, um único vetor de expressão codifica dois ou mais elementos de uma VLP. Em algumas modalidades, um único vetor de expressão codifica três ou mais elementos de uma VLP.

[108] Em algumas modalidades, as células são transfectadas com dois ou mais vetores de expressão. Por exemplo, em algumas modalidades, as células são transfectadas com um primeiro vetor que codifica um polipeptídeo Gag e um segundo vetor que codifica uma glicoproteína do envelope de HCMV (por exemplo, gB ou gB-G ou gH-G). Em algumas dessas modalidades, VLPs "monovalentes" que compreendem uma glicoproteína do envelope de HCMV (por exemplo, gB ou gB-G ou gH-G) são

produzidas. Em algumas modalidades, as células são transfectadas com um primeiro vetor que codifica um polipeptídeo Gag, um segundo vetor que codifica uma glicoproteína do envelope de HCMV (por exemplo, gB ou gB-G ou gH-G) e um terceiro vetor que codifica outra glicoproteína do envelope de HCMV (por exemplo, gB ou gB-G ou gH-G). Em algumas dessas modalidades, VLPs "bivalentes" que compreendem 2 glicoproteínas do envelope de HCMV (por exemplo, gB e gH-G ou gB-G e gH-G) são produzidas. Em algumas modalidades, as células são transfectadas com um primeiro vetor que codifica um polipeptídeo de fusão Gag-pp65 e um segundo vetor que codifica uma glicoproteína do envelope de HCMV (por exemplo, gB ou gB-G ou gH-G). Em algumas dessas modalidades, VLPs "bivalentes" que compreendem uma proteína estrutural de HCMV e uma glicoproteína do envelope de HCMV (por exemplo, gB ou gB-G ou gH-G) são produzidas. Em algumas modalidades, as células são transfectadas com um primeiro vetor que codifica um polipeptídeo de fusão Gag-pp65, um segundo vetor que codifica uma glicoproteína do envelope de HCMV (por exemplo, gB ou gB-G ou gH-G), e um terceiro vetor que codifica outra glicoproteína do envelope de HCMV (por exemplo, gB ou gB-G ou gH-G). Em algumas dessas modalidades, VLPs "trivalentes" que compreendem uma proteína estrutural de HCMV e 2 glicoproteínas do envelope de HCMV (por exemplo, gB e gH-G ou gB-G e gH-G) são produzidas.

[109] Em algumas modalidades, VLPs monovalentes, bivalentes ou trivalentes são misturadas. Por exemplo, em algumas modalidades, VLPs monovalentes e bivalentes são

misturadas para formar uma mistura de VLP trivalente. Em algumas modalidades, duas VLPs bivalentes são misturadas para formar uma mistura de VLP trivalente.

### **III. Infecção e tratamento de HCMV**

[110] O citomegalovírus humano (HCMV), um  $\beta$ -herpesvírus, é um patógeno onipresente. Em geral, a entrada dos herpesvírus nas células é um processo complexo iniciado por adsorção e ligação de receptor e seguido por fusão do envelope do vírus com uma membrana celular. A fusão geralmente ocorre na membrana plasmática ou em uma membrana endossômica. HCMV infecta vários tipos de células *in vivo*, incluindo células epiteliais, células endoteliais e fibroblastos (Plachter B. e cols., 1996 *Adv. Virus Res.* 46: 195-261). Ele se funde com as membranas plasmáticas de fibroblastos (Compton T. e cols., 1992 *Virology* 191: 387-395), mas entra em células epiteliais pigmentadas retinianas e células endoteliais da veia umbilical por meio de endocitose (Bodaghi B e cols., 1999 *J. Immunol.* 162: 957-964; Ryckman B.J. e cols., 2006 *J. Virol.* 80: 710-722). O mecanismo pelo qual os herpesvírus escolhem sua via de entrada permanece incerto. Presume-se geralmente que as vias de entrada sejam determinadas principalmente pela célula hospedeira, mas há evidências para papéis trópicos de glicoproteínas do vírion (Wang X. e cols., 1998 *J. Virol.* 72: 5.552-5.558). Como mencionado previamente, o HCMV codifica dois complexos de gH/gL: gH/gL/gO e gH/gL/UL128/UL130/UL131. O complexo que contém gO é suficiente para infecção de fibroblasto, enquanto o complexo que contém pUL128/UL130/UL131 é importante para infecção por HCMV de células endoteliais e epiteliais.

[111] O HCMV infecta 50-85% de adultos por volta de 40 anos de idade (Gershon A.A. e cols., 1997 em "Viral Infections of Humans", 4ª Edição, Nova York; Plenum Press: 229-251). A maioria dos indivíduos saudáveis que adquirem HCMV após o nascimento desenvolve poucos ou nenhum sintoma. No entanto, a doença pelo HCMV é a causa de morbidade e mortalidade significantes em indivíduos imunocomprometidos, por exemplo, receptores de transplantes de células hematopoiéticas (HCT) e transplantes de órgão sólido (SOT) (Pass R.F. 2001 "Cytomegalovirus", em "Fields Virology", 4ª Edição, Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkens: 2.675-2.705). Em populações de SOT ou HCT, a doença pelo HCMV pode ocorrer em decorrência de uma nova infecção transmitida pelo órgão do doador ou HCT, ou pode recorrer em consequência de reativação de vírus latente no receptor. Em indivíduos infectados pelo HIV, a infecção por HCMV acelera a progressão à AIDS e morte, apesar da disponibilidade de terapia anti-retroviral (Deayton J.R. e cols., 2004 *Lancet* 363: 2.116-2.121). Além disso, nos EUA, o HCMV é a infecção intra-uterina mais comum e causa anormalidades congênitas que resultam em morte ou defeitos graves no nascimento, incluindo surdez e retardo mental, em aproximadamente 8.000 bebês a cada ano (Stagon S. e cols., 1986 *JAMA* 256: 1.904-1.908).

[112] As respostas imunes que controlam o HCMV não são totalmente compreendidas. Por analogia com outros herpesvírus humanos, presume-se que respostas imunes tanto celulares quanto humorais tenham um papel importante (Kohl S. 1992 *Current topics in Microbiology and Immunology* 179: 75-88). Para CMV murídeo, foi demonstrado que uma resposta

de células T citotóxicas ou a transferência passiva de anticorpos neutralizantes é suficiente para proteger contra um ataque letal (Rapp M. e cols., 1993 "Multidisciplinary Approach to Understanding Cytomegalovirus Disease": 327-332; Reddehase M.J. e cols., 198 *J. Virology* 61: 3.102-3.108).

[113] O controle do CMV em pessoas imunocomprometidas está primariamente associado às respostas imunes celulares; linfócitos T tanto CD8<sup>+</sup> quanto CD4<sup>+</sup> parecem ser importantes para proteção contra doença por CMV (Gamadia L.E. e cols., 2003 *Blood* 101: 2.686-2.692; Cobbold M. e cols., 2005 *J. Exp. Med.* 202: 379-386). A resposta imune celular ao CMV inclui respostas de linfócitos T *helper* CD4<sup>+</sup> e de linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> aos diversos antígenos encontrados no tegumento viral, a região da partícula viral entre o envelope e o capsídeo. Um estudo recente de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> CMV-específicas de doadores saudáveis usou peptídeos superpostos de uma série de quadros de leitura aberta de CMV para identificar antígenos reconhecidos após infecção pelo CMV (Sylwester A.W. e cols., 2005 *J. Exp. Med.* 202: 673-685). A fosfoproteína do tegumento de CMV 65 (pp65) e a glicoproteína de superfície gB foram os antígenos mais frequentemente reconhecidos por células T CD4<sup>+</sup>, e pp65 também foi um dos antígenos mais frequentemente reconhecidos por células T CD8<sup>+</sup>.

[114] Em contraste com o ambiente de transplante, a resposta imune humoral materna contra o vírus parece ser importante na prevenção da doença pelo HCMV no recém-nascido. Anticorpos para glicoproteínas de superfície, especialmente gB, parecem ser cruciais para proteção contra

a transferência materno-fetal do CMV (Fowler K.B. e cols., 2003 *JAMA* 289: 1.008-1.011). Além disso, em um estudo anterior de vacinação, foi demonstrado que a proteção da reinfeção está correlacionada com anticorpos neutralizantes (Adler S.P. e cols., 1995 *J. Infectious Diseases* 171: 26-32). A resposta imune humoral ao CMV é dominada por respostas às glicoproteínas do envelope viral presentes no envelope externo da partícula do vírus (por exemplo, gB e gH).

[115] No caso do HCMV, a avaliação direta de funções imunológicas efetoras é difícil, na medida em que o vírus é estritamente espécie-específico e nenhum sistema de modelo animal está disponível. No entanto, CMV murídeo e CMV do porquinho-da-índia têm sido usados para avaliar estratégias de vacina nessas espécies hospedeiras.

[116] Uma vacina contra CMV que induz respostas protetoras tanto de células T quanto de anticorpos neutralizantes possui o potencial para evitar infecção ou melhorar a doença por CMV em consequência de infecção congênita ou transplante.

[117] O primeiro candidato a vacina para HCMV viva, atenuada, testado em humanos se baseava na cepa adaptada ao laboratório AD 169. Experimentos subseqüentes com outro isolado clínico adaptado ao laboratório, a cepa Towne, confirmaram que vacinas vivas atenuadas poderiam despertar anticorpos neutralizantes, bem como respostas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. A eficácia da vacina de Towne foi avaliada em uma série de estudos em receptores de transplante renal. Embora a vacina de Towne tenha fornecido impacto protetor na doença pelo HCMV, ela não conseguiu evitar infecção por

HCMV após transplante (Plotkin S.A. e cols., 1984 *Lancet* 1: 528-530). A vacina de Towne também foi avaliada em um estudo controlado por placebo de mães soronegativas que tinham crianças em creches, e ela não conseguiu evitar que essas mulheres adquirissem infecção de suas crianças infectadas pelo HCMV (Adler S.P. e cols., 1995 *J. Infectious Diseases* 171: 26-32). Uma interpretação desses estudos era que a vacina de Towne era excessivamente atenuada. Para explorar essa possibilidade, foi construída uma série de recombinantes genéticos nos quais regiões da cepa não atenuada "Toledo" de CMV substituíram as regiões correspondentes do genoma de Towne, resultando na construção de "quimeras" Towne/Toledo que contêm algumas, mas não todas, as mutações que contribuem para a atenuação da vacina de Towne (Heineman T.C. e cols. 2006 *J. Infect. Disease* 193: 1.350-1.360). A segurança e tolerabilidade de quatro "quimeras" Towne/Toledo estão sendo testadas em um experimento de Fase I. Preocupações de segurança de longo prazo sobre o risco potencial de estabelecimento de uma infecção latente por HCMV impediram o desenvolvimento posterior de vacinas vivas, atenuadas.

[118] O principal candidato a vacina de subunidade de CMV se baseia na glicoproteína do envelope, gB (a vacina purificada de gB recombinante é fabricada por Sanofi-Pasteur Vaccines) em função da habilidade dessa proteína para despertar respostas de alta titulação de anticorpos neutralizantes de vírus durante infecção natural. A vacina de gB recombinante desperta respostas de anticorpos neutralizantes e possui um perfil de segurança excelente; no entanto, ela exclui outros alvos de glicoproteína da

resposta de anticorpos neutralizantes e, principalmente, alvos de linfócitos T. A vacina necessita do adjuvante MF59 para otimizar a imunogenicidade. No experimento mais recente, essa vacina forneceu uma eficácia global de 50% para prevenção de infecção pelo CMV em um experimento clínico de Fase 2 em mulheres jovens (Pass R.F. e cols., 2009 *N. Engl. J. Med.* 360: 1.191-1.199). Outras proteínas virais que estão sendo avaliadas como candidatos a vacina de subunidade incluem pp65 e IE1, ambos despertando respostas de células T.

[119] As vacinas de DNA despertam respostas imunes celulares e humorais robustas em animais e são bem adequadas em termos de especificidade e precisão no design de vacinas. Vacinas de DNA foram desenvolvidas para CMV e se concentraram nas proteínas gB, IE1 e pp65 como os candidatos a imunógenos-alvo. Um candidato a vacina bivalente de DNA de CMV (Wloch M.K. 2008 *J. Infectious Diseases* 297: 1.634-1.642), que usa o DNA de plasmídeo que codifica pp65 e gB, e um candidato a vacina trivalente (Jacobson M.A. 2009 *Vaccine* 27: 1.540-1.548), que também inclui um terceiro plasmídeo que codifica o produto gênico de IE1, foram desenvolvidos por Vical Vaccines (Patente U.S. 7.410.795). A vacina trivalente de DNA isoladamente teve imunogenicidade mínima, independentemente da via de administração. No entanto, a vacina de DNA de CMV pareceu sensibilizar seguramente para uma resposta de memória aos antígenos de CMV observada após administração de um CMV vivo, atenuado (Towne).

[120] Em uma abordagem de vacina com vetor, o produto gênico de interesse é expresso no contexto de um veículo

não replicante (normalmente viral). Um exemplo disso é um vetor de canaripox denominado ALVAC desenvolvido por Virogenetics e Sanofi-Pasteur Vaccines, que é um poxvírus atenuado que replica prematuramente em células de mamíferos. ALVAC que expressa gB de CMV e ALVAC que expressa pp65 (U.S. 6.267.965) foram testados em experimentos clínicos. ALVAC-CMV(gB) não induziu anticorpos neutralizantes, mas sensibilizou para titulações de anticorpos neutralizantes maiores após infecção subsequente com o CMV da cepa Towne (Adler S.P. e cols. 1999 *J. Infectious Diseases* 180: 843-846), embora pareça que não reforçou titulações de anticorpos neutralizantes após imunização subsequente com vacina de subunidade gB/MF59 (Bernstein D.I. e cols. 2002 *J. Infectious Diseases* 185: 686-690). Um vetor de canaripox que expressa pp65, ALVAC-CMV(pp64), induziu respostas de CTL duradouras em todos os voluntários originalmente soronegativos, em frequências comparáveis com indivíduos naturalmente soropositivos (Berencsi K. e cols. 2001 *J. Infectious Diseases* 183: 1.171-1.179). Outra abordagem usada para expressar gB como uma vacina com vetor é o uso de um sistema de replicon de alfavírus por AlphaVax Inc. (U.S. 7.419.674). Essa abordagem envolve um sistema de vetor de replicon de RNA, com propagação defeituosa, de ciclo único, derivado de uma cepa atenuada de um alfavírus, o vírus da encefalite eqüina venezuelana (VEE), para produzir partículas de replicon vírus-like (VRPs) que expressam pp65, IE1 ou proteína gB (Berstein e cols., 2010 *Vaccine* 28: 484-493). Foi verificado que uma vacina de replicon de alfavírus de dois componente foi usada para expressar as três proteínas de

CMV como uma forma solúvel de gB de CMV (cepa Towne) e uma proteína de fusão pp65/IE1 (Reap E.A. e cols. 2007 *Vaccine* 25: 7.441-7.449) era segura e induzia níveis elevados de anticorpos neutralizantes e respostas de células T polifuncionais CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas. A titulação média geométrica (GMT) para o grupo de dose alta foi de cerca de metade da GMT em 12 indivíduos soropositivos naturalmente infectados por CMV, testados no ensaio.

[121] Um novo candidato para vacinação contra HCMV atualmente em desenvolvimento pré-clínico é a vacina de "corpo denso". Corpos densos (DBs) são partículas envelopadas, com replicação defeituosa, formadas durante a replicação de CMVs em cultura de células. Eles contêm tanto glicoproteínas do envelope quanto grandes quantidades de proteína pp65. DBs não são infecciosos e imunogênicos, mas incapazes de estabelecer infecção latente por HCMV no receptor da vacina. DBs demonstraram que são capazes de induzir anticorpos neutralizantes de vírus e respostas de células T em camundongos na ausência de expressão gênica viral (Pepperl S. e cols., 2000 *J. Virol.* 74: 6.132-6.146 - WO 00/53729 e U.S. 6.713.070).

#### **IV. Composições farmacêuticas**

[122] A presente invenção fornece composições farmacêuticas que compreendem VLPs fornecidas e/ou variantes de glicoproteína fornecidas. Em algumas modalidades, a presente invenção fornece uma VLP e pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável. Essas composições farmacêuticas podem opcionalmente compreender e/ou serem administradas em combinação com uma ou mais

substâncias terapeuticamente ativas adicionais. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas fornecidas são úteis em medicina. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas fornecidas são úteis como agentes profiláticos (ou seja, vacinas) no tratamento ou prevenção de HCMV ou de ramificações negativas associadas ou correlacionadas à infecção por HCMV. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas fornecidas são úteis em aplicações terapêuticas, por exemplo, em indivíduos que sofrem ou são suscetíveis à infecção por HCMV. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas são formuladas para administração a seres humanos.

[123] Por exemplo, as composições farmacêuticas aqui fornecidas podem ser fornecidas em uma forma injetável estéril (por exemplo, uma forma que é adequada à injeção subcutânea ou infusão intravenosa). Por exemplo, em algumas modalidades, as composições farmacêuticas são fornecidas em uma forma de dosagem líquida que é adequada para injeção. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas são fornecidas como pós (por exemplo, liofilizadas e/ou esterilizadas), opcionalmente sob vácuo, que são reconstituídos com um diluente aquoso (por exemplo, água, tampão, solução salina etc.) antes da injeção. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas são diluídas e/ou reconstituídas em água, solução de cloreto de sódio, solução de acetato de sódio, solução de álcool benzílico, solução salina tamponada com fosfato etc. Em algumas modalidades, o pó deve ser misturado gentilmente com o diluente aquoso (por exemplo, não agitado).

[124] Em algumas modalidades, as composições

farmacêuticas fornecidas compreendem um ou mais excipientes farmacêuticamente aceitáveis (por exemplo, conservante, diluente inerte, agente dispersante, agente tensoativo e/ou emulsificante, agente de tamponamento etc.). Excipientes adequados incluem, por exemplo, água, solução salina, dextrose, sacarose, trehalose, glicerol, etanol, ou similares, e combinações destes. Além disso, se desejado, a vacina pode conter substâncias auxiliares como, por exemplo, agentes umidificantes ou emulsificantes, agentes de tamponamento do pH, ou adjuvantes que aumentam a efetividade das vacinas. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas compreendem um ou mais conservantes. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas não contêm conservante.

[125] Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas são fornecidas em uma forma que pode ser refrigerada e/ou congelada. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas são fornecidas em uma forma que não pode ser refrigerada e/ou congelada. Em algumas modalidades, soluções reconstituídas e/ou formas de dosagem líquida podem ser armazenadas por certo período de tempo após reconstituição (por exemplo, 2 horas, 12 horas, 24 horas, 2 dias, 5 dias, 7 dias, 10 dias, 2 semanas, um mês, dois meses, ou mais tempo). Em algumas modalidades, o armazenamento das formulações de VLP por um período de tempo maior do que o especificado resulta em degradação da VLP.

[126] As formas de dosagem líquida e/ou soluções reconstituídas podem compreender matéria particulada e/ou descoloração antes da administração. Em algumas

modalidades, uma solução deve ser usada se descolorada ou turva e/ou se matéria particulada permanece após filtração.

[127] As formulações das composições farmacêuticas aqui descritas podem ser preparadas por qualquer método conhecido ou posteriormente desenvolvido na técnica de farmacologia. Em algumas modalidades, esses métodos preparatórios incluem a etapa de colocação do ingrediente ativo em associação com um ou mais excipientes e/ou um ou mais outros ingredientes acessórios, e depois, se necessário e/ou desejável, modelagem e/ou embalagem do produto em uma unidade de dose única ou multidose desejada.

[128] Uma composição farmacêutica de acordo com a invenção pode ser preparada, embalada e/ou vendida a granel, como uma dose unitária única e/ou como diversas doses unitárias únicas. Como aqui usada, uma "dose unitária" é uma quantidade distinta da composição farmacêutica que compreende uma quantidade predeterminada do ingrediente ativo. A quantidade do ingrediente ativo é geralmente igual a uma dose que seria administrada a um indivíduo e/ou uma fração conveniente de uma dose desse tipo como, por exemplo, metade ou um terço de uma dose desse tipo.

[129] Quantidades relativas de ingrediente ativo, excipiente farmacologicamente aceitável e/ou quaisquer ingredientes adicionais em uma composição farmacêutica de acordo com a invenção podem variar, dependendo da identidade, tamanho e/ou condição do indivíduo tratado e/ou dependendo da via pela qual a composição deve ser administrada. Apenas como exemplo, a composição pode compreender entre 0,1% e 100% (p/p) de ingrediente ativo.

[130] As composições farmacêuticas da presente invenção podem adicionalmente compreender um excipiente farmacêuticamente aceitável, que, como aqui usado, pode ser ou compreender solventes, meios de dispersão, diluentes ou outros veículos líquidos, auxiliares de dispersão ou suspensão, agentes tensoativos, agentes isotônicos, agentes espessantes ou emulsificantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubrificantes e semelhantes, como adequado à forma de dosagem particular desejada. "Remington's The Science and Practice of Pharmacy", 21<sup>a</sup> Edição, A.R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006) revela vários excipientes usados na formulação de composições farmacêuticas e técnicas conhecidas para sua preparação. Exceto quando qualquer meio excipiente convencional é incompatível com uma substância ou seus derivados, por exemplo, por produção de qualquer efeito biológico indesejável ou, de outro modo, interação de forma deletéria com qualquer outro componente (ou componentes) da composição farmacêutica, seu uso é contemplado como estando dentro do escopo dessa invenção.

[131] Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica é suficientemente imunogênica como uma vacina (por exemplo, na ausência de um adjuvante). Em algumas modalidades, a imunogenicidade de uma composição farmacêutica é aumentada por inclusão de um adjuvante. Qualquer adjuvante pode ser usado de acordo com a presente invenção. Um grande número de adjuvantes é conhecido; um compêndio útil de muitos desses compostos é preparado pelo "National Institutes of Health", e pode ser encontrado em [www.niaid.nih.gov/daids/vaccine/pdf/compendium.pdf](http://www.niaid.nih.gov/daids/vaccine/pdf/compendium.pdf). Veja

também Allison (1998, *Dev. Biol. Stand.*, 92: 3-11; aqui incorporado por referência), Unkeless e cols. (1998, *Annu. Rev. Immunol.*, 6: 251-281; aqui incorporados por referência), e Phillips e cols. (1992, *Vaccine*, 10: 151-158; aqui incorporado por referência). Centenas de adjuvantes diferentes são conhecidos na técnica e podem ser empregados na prática da presente invenção. Adjuvantes exemplares que podem ser utilizados de acordo com a invenção incluem, sem limitação, citocinas, adjuvantes do tipo gel (por exemplo, hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, fosfato de cálcio etc.); adjuvantes microbianos (por exemplo, seqüências de DNA imunomoduladoras que incluem motivos CpG; endotoxinas como, por exemplo, monofosforil lipídeo A; exotoxinas como, por exemplo, toxina colérica, toxina termolábil de *E. coli* e toxina de pertussis; muramil dipeptídeo etc.); adjuvantes de óleo-emulsão e à base de emulsificante (por exemplo, adjuvante de Freund, MF59 [Novartis], SAF etc.); adjuvantes particulados (por exemplo, lipossomos, microesferas biodegradáveis, saponinas etc.); adjuvantes sintéticos (por exemplo, copolímeros em bloco não iônicos, análogos de muramil peptídeo, polifosfazeno, polinucleotídeos sintéticos etc.); e/ou combinações destes. Outros adjuvantes exemplares incluem alguns polímeros (por exemplo, polifosfazenos; descritos na Patente U.S. 5.500.161, que é aqui incorporada por referência), Q57, QS21, esqualeno, tetrachlorodecaóxido etc. Excipientes farmacologicamente aceitáveis foram descritos previamente com mais detalhes na seção acima intitulada "Composições farmacêuticas".

## **V. Administração**

[132] As composições fornecidas e os métodos da presente revelação são úteis para profilaxia e/ou tratamento de infecção por HCMV em um indivíduo, incluindo adultos humanos e crianças. Em geral, no entanto, eles são usados com qualquer animal. Em certas modalidades, os métodos aqui apresentados podem ser usados para aplicações veterinárias, por exemplo, aplicações em caninos e felinos. Se desejado, os métodos aqui apresentados também podem ser usados com animais de criação como, por exemplo, raças de ovinos, aves, bovinos, suínos e eqüinos.

[133] Como aqui usados, os termos "pessoa", "indivíduo" ou "paciente" se referem a um humano ou a um indivíduo mamífero não humano. O indivíduo (também denominado "paciente" ou "pessoa") que está sendo tratado é um indivíduo (feto, bebê, criança, adolescente ou adulto) que sofre de uma doença, por exemplo, infecção por HCMV. Em algumas modalidades, o indivíduo está em risco para infecção por HCMV. Em algumas modalidades, o indivíduo é um indivíduo imunocomprometido. Por exemplo, em algumas modalidades, o indivíduo imunocomprometido é selecionado do grupo que consiste em um indivíduo infectado com HIV, um paciente com AIDS, um receptor de transplante, um indivíduo pediátrico e uma mulher grávida. Em algumas modalidades, o indivíduo foi exposto à infecção por HCMV. Em algumas modalidades, o indivíduo é um humano.

[134] As composições aqui descritas geralmente serão administradas em quantidades tais e por um tempo tal que sejam necessários ou suficientes para induzir uma resposta imune. Os regimes de dosagem podem consistir em uma dose

única ou diversas doses ao longo de um período de tempo. A quantidade exata de uma composição imunogênica (por exemplo, VLP) a ser administrada pode variar de indivíduo para indivíduo, e pode depender de vários fatores. Dessa forma, será observado que, em geral, a dose precisa usada será determinada pelo médico assistente e dependerá não somente do peso do indivíduo e da via de administração, mas também da idade do indivíduo e da severidade dos sintomas e/ou do risco de infecção. Em certas modalidades, uma quantidade particular de uma composição de VLP é administrada como uma dose única. Em certas modalidades, uma quantidade particular de uma composição de VLP é administrada como mais de uma dose (por exemplo, 1-3 doses que são separadas por 1-12 meses). Em certas modalidades, uma quantidade particular de uma composição de VLP é administrada como uma dose única em várias ocasiões (por exemplo, 1-3 doses que são separadas por 1-12 meses).

[135] Em algumas modalidades, uma composição fornecida é administrada em uma dose inicial e em pelo menos uma dose de reforço. Em algumas modalidades, uma composição fornecida é administrada em uma dose inicial e duas doses de reforço. Em algumas modalidades, uma composição fornecida é administrada em uma dose inicial e três doses de reforço. Em algumas modalidades, uma composição fornecida é administrada em uma dose inicial e quatro doses de reforço. Em algumas modalidades, uma composição fornecida é administrada em uma dose inicial e em pelo menos uma dose de reforço cerca de um mês, cerca de dois meses, cerca de três meses, cerca de quatro meses, cerca de cinco meses ou cerca de seis meses após a dose inicial. Em

algumas modalidades, uma composição fornecida é administrada em uma segunda dose de reforço cerca de seis meses, cerca de sete meses, cerca de oito meses, cerca de nove meses, cerca de dez meses, cerca de onze meses ou cerca de um ano após a dose inicial. Em algumas modalidades, uma composição fornecida é administrada em uma dose de reforço a cada 1 ano, 2 anos, 3 anos, 4 anos, 5 anos, 6 anos, 7 anos, 8 anos, 9 anos ou 10 anos.

[136] Em certas modalidades, as composições fornecidas podem ser formuladas para liberação parenteral, por exemplo, por injeção. Nessas modalidades, a administração pode ser, por exemplo, por via intravenosa, intramuscular, intradérmica ou subcutânea, ou por infusão ou técnicas de injeção sem agulha. Em certas modalidades, as composições podem ser formuladas para liberação peroral, liberação oral, liberação intranasal, liberação bucal, liberação sublingual, liberação transdérmica, liberação transcutânea, liberação intraperitoneal, liberação intravaginal, liberação retal ou liberação intracraniana.

### **Exemplos**

[137] Os exemplos seguintes descrevem alguns modos exemplares de produção e prática de certas composições que são aqui descritas. Deve ser subentendido que esses exemplos são apenas ilustrativos, e não visam limitar o escopo das composições e métodos aqui descritos.

#### **Exemplo 1: Construção de plasmídeos de expressão de DNA**

[138] Esse Exemplo descreve o desenvolvimento de plasmídeos de expressão e construções para expressão de seqüências gênicas recombinantes de HCMV (por exemplo, seqüências gênicas de fusão de gB, gB-G, gH-G e Gag/pp65).

Um plasmídeo de expressão padrão geralmente consiste em uma seqüência promotora de origem mamífera, uma seqüência de íntron, uma seqüência sinalizadora de poliadenilação (Poli A), uma seqüência de origem de replicação pUC (pUC - pBR322 é uma iniciação de origem/sítio de replicação colE1 e é usado para replicar plasmídeo em bactérias como, por exemplo, *E. Coli* (DH5 $\alpha$ )), e um gene de resistência antibiótica como um marcador selecionável para seleção de placa de plasmídeo. Dentro do plasmídeo, após o íntron, estão diversos sítios de enzima de restrição que podem ser usados para união em um gene ou seqüência gênica parcial de interesse.

[139] O plasmídeo de expressão Propol II contém o pHCMV (promotor precoce para HCMV), um Íntron de Beta-Globina (Íntron BGL), uma seqüência sinalizadora de poliadenilação de globina de coelho (Poli A), uma seqüência de origem de replicação pUC (pUC - pBR322 é uma iniciação de origem/sítio de replicação colE1 e é usado para replicar plasmídeo em bactérias como, por exemplo, *E. Coli* (DH5 $\alpha$ )), e um gene de resistência à ampicilina  $\beta$ -lactamase (Amp R - marcador selecionável para plasmídeo confere resistência à ampicilina) (100  $\mu$ g/ml) (Figura 1A).

[140] A Figura 1B revela plasmídeos de expressão recombinante exemplares. Por exemplo, para desenvolver uma construção de expressão de MMLV pHCMV-Gag ("MLV-Gag"), uma seqüência de DNA complementar (cDNA) que codifica uma poliproteína Gag de MMLV (Gag sem sua seqüência Pol do terminal C) foi clonada em um vetor de expressão Propol II (pHCMV). Para desenvolver uma construção de expressão de gB ("gB"), A de comprimento total seqüência de gB foi códon-

otimizada para expressão humana (GenScript), e foi clonada em um vetor de expressão Propol II que inclui a porção extracelular, domínio transmembrana (TM) e porção citoplasmática (Cito) de gB. Para desenvolver uma construção de expressão de gH-G ("gH-G"), a seqüência truncada de gH que codifica apenas a porção extracelular foi fundida junto com as porções TM e Cito de VSV-G e códon-otimizada para expressão humana (GenScript) e clonada em um vetor de expressão Propol II. Similarmente, para desenvolver uma construção de expressão de gB-G ("gB-G"), a seqüência truncada de gB que codifica apenas a porção extracelular foi fundida junto com as porções TM e Cito de VSV-G e códon-otimizada para expressão humana (GenScript) e clonada em um vetor de expressão Propol II. Para desenvolver uma construção de expressão de Gag/pp65 ("Gag/pp65"), uma seqüência que codifica a poliproteína Gag de MMLV (Gag sem sua seqüência Pol do terminal C) foi fundida com a seqüência de comprimento total de pp65 e códon-otimizada para expressão humana (GenScript) e clonada em um vetor de expressão Propol II.

[141] Plasmídeos de DNA foram amplificados em *E. coli* competente (DH5 $\alpha$ ) e purificados com kits de preparação livres de endotoxina de acordo com protocolos padronizados.

### **Exemplo 2: Produção de partículas vírus-like (VLPs)**

[142] Esse Exemplo descreve métodos para produção de partículas vírus-like (VLPs) que contêm vários antígenos recombinantes de HCMV descritos no Exemplo 1.

[143] Células HEK 293T (ATCC, CRL-11268) foram transfectadas transitoriamente usando métodos de fosfato de cálcio com um plasmídeo de expressão de DNA de MMLV-Gag e

cotransfectadas com um plasmídeo de expressão de DNA de gB ou de gB-G (dados não mostrados) ou de gH-G. Alternativamente, as células foram transfectadas com um plasmídeo de expressão de DNA de Gag/pp65 e cotransfectadas com um plasmídeo de expressão de DNA de gB ou de gB-G (dados não mostrados) ou de gH-G. Será observado que as células podem ser transfectadas com um plasmídeo de expressão de DNA de MMLV-Gag e cotransfectadas com um plasmídeo de expressão de DNA de gB e um de gH-G ou gB-G e um plasmídeo de expressão de DNA gH-G. A expressão de vários antígenos de HCMV pelas células HEK 293 foi confirmada por citometria de fluxo (Figura 2A). Após 48 a 72 horas de transfecção, os sobrenadantes que contêm as VLPs foram coletados e filtrados através de membranas de tamanho de poro de 0,45 µm e ainda concentrados e purificados por ultracentrifugação através de uma almofada de sacarose 20% em um rotor de Beckman SW32 (25.000 rpm, 2 horas, 4°C). Os péletes foram ressuspensos em PBS estéril livre de endotoxina (GIBCO) para obter estoques de VLP concentrados 500 vezes. A proteína total foi determinada em uma alíquota por um kit de ensaio de quantificação Bradford (BioRad). As VLPs purificadas foram armazenadas a -80°C até serem usadas. Cada lote de VLPs purificadas foi analisado quanto à expressão de proteína de fusão MMLV-Gag, gB, gH-G e/ou MMLV-Gag/pp65 por SDS-PAGE e *Western Blot* com anticorpos específicos para gB (anticorpos monoclonais de camundongo CH 28 para gB; Virusys Corporation; Pereira, L. e cols. 1984 *Virology* 139: 73-86), gH-G (anticorpos monoclonais de camundongo para anticorpos com tag anti-VSV-G P5D4; Abeam pic) e pp65 (anticorpos monoclonais de

camundongo para UL83/pp65 CH 12; Virusys Corporation; Pereira, L. e cols. 1982 *Infect. Immun.* 36: 924-932) (Figura 2B). Os anticorpos foram detectados usando quimioluminescência aumentada (ECL).

**Exemplo 3: Caracterização físico-química de partículas vírus-like (VLPs)**

[144] A análise físico-química de VLPs incluiu a distribuição de tamanho de partícula e avaliação do índice de polidispersibilidade usando um Instrumento Malvern Zeta-Sizer Nano Series (ZEN3600). Resultados exemplares obtidos pela análise de nanodimensionamento são mostrados nas Figuras 3A e 3B. Uma composição de VLP exemplar (composição de VLP bivalente gH-G/pp65) foi produzida em dois laboratórios diferentes usando os mesmos vetores de expressão recombinante e ambas as preparações de VLP geraram um tamanho de partícula médio de 150-180 nm em diâmetro. Isso é consistente com o tamanho de um vírion de CMV que supostamente tem 150-200 nm de tamanho (1997 *J. Pathol.* 182: 273-281). O baixo índice de polidispersibilidade (PdI) de 0,214-0,240 indica homogeneidade de produto ou uma distribuição de tamanho estreita.

**Exemplo 4: Imunogenicidade e atividade de neutralização de VLPs em camundongos**

[145] As composições de VLP preparadas como descrito no Exemplo 2 foram testadas em fêmeas de camundongos BALB/C com 6-8 semanas de idade (mínimo de 6 animais por grupo de teste). Os camundongos foram imunizados por via intraperitoneal com 200 µl de composições de VLP duas vezes, uma vez no dia 0 (Sensibilização) e uma vez no dia

56 (reforço da semana 8). Os camundongos foram tratados com 10 µg, 25 µg ou 50 µg (proteína total) de uma composição de VLP bivalente gB/Gag/pp65, uma composição de VLP bivalente gH-G/Gag/pp65 ou uma composição de VLP trivalente gB/gH-G/Gag/pp65. Para avaliar respostas imunes humorais em camundongos, foi coletado sangue de todos os camundongos nos grupos de estudo pré-imunização e depois pós-1<sup>a</sup> e -2<sup>a</sup> imunizações em 0, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 12 e 14 semanas. O design do estudo é resumido na Tabela 1.

**Tabela 1**

<b>Artigo de teste N°</b>	<b>Dose</b>	<b>Descrição do artigo de teste</b>	<b>Esquema de imunização (semanas)</b>
1	50 µg	VLPs bivalentes pp65/gB	0, 8
2	25 µg	VLPs bivalentes pp65/gB	0, 8
3	10 µg	VLPs bivalentes pp65/gB	0, 8
4	50 µg	VLPs bivalentes pp65/gH-G	0, 8
5	25 µg	VLPs bivalentes pp65/gH-G	0, 8
6	10 µg	VLPs bivalentes pp65/gH-G	0, 8
7	50 µg	VLPs trivalentes pp65/gB/gH-G	0, 8
8	25 µg	VLPs trivalentes pp65/gB/gH-G	0, 8
9	10 µg	VLPs trivalentes pp65/gB/gH-G	0, 8

[146] O ensaio imunabsorvente ligado à enzima (ELISA) foi realizado usando placas de ELISA disponíveis comercialmente (IBL International) revestidas com lisados derivados de células MRC-5 infectadas com HCMV cepa AD 169. O lisado de HCMV comercial bruto, que contém todos os antígenos relacionados ao CMV e é útil para detectar respostas imunes de IgG, foi usado como um controle positivo para determinar o teor de IgG para HCMV no soro do camundongo por ELISA. Diluições seriadas de soros de camundongo (diluição em TBS-T/BSA/DMEM FCS 10%) foram incubadas com as placas revestidas por 2 horas em temperatura ambiente. Após as placas serem lavadas, anticorpo secundário anti-camundongo raiz-forte conjugado à peroxidase (HRP) foi adicionado em uma diluição de 1/10.000 e incubado por 1 hora, seguido pela adição de solução de substrato de tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi interrompida por adição de HCl 1 N e a absorbância foi lida a 450 nm em uma leitora de placas de microplaca de ELISA. A Figura 4 mostra evidências de anticorpos persistentes e forte reforço de camundongos após a 2ª imunização em 8 semanas para cada uma das composições de VLP bivalente e trivalente.

[147] Respostas de anticorpos neutralizantes ao HCMV foram determinadas usando um ensaio de microneutralização. Uma quantidade-padrão de HCMV cepa VR1814 (uma cepa de CMV tropica para célula endotelial - Revello M.G. e cols. *J. Gen. Virol.* 82: 1.429-1.438) foi diluída com meio de infecção (DME contendo FBS inativado por aquecimento 1%, mistura de aminoácidos 1%, penicilina-estreptomicina 1% e PBS livre de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ ), e adicionada a um volume igual de

diluições seriadas de soro de teste inativado por aquecimento e incubada por 1 hora a 37°C em um aparelho rotatório. As misturas de soro/HCMV foram adicionadas a fibroblastos de prepúcio humano (HFF) ou células epiteliais pigmentadas retinianas (células ARPE-19) desenvolvidas em lamínulas em placas de cultura de tecido de 24 poços e incubadas por 2 horas a 37°C, CO<sub>2</sub> 5%. As placas foram lavadas com PBS duas vezes e depois cultivadas por 48 horas a 37°C, CO<sub>2</sub> 5%. As células foram fixadas com paraformaldeído 4%, reagidas com um anticorpo monoclonal anti-IE1 (anticorpo monoclonal de camundongo CH160 para IE1/2 ou anticorpo monoclonal CH443 para IE1; Virusys Corporation) por 1 hora em temperatura ambiente, seguidos por anticorpo de cabra anti-camundongo marcado com FITC por 45 minutos em temperatura ambiente. O número de células que expressam IE1 foi determinado por microscopia fluorescente. Pool de soros de camundongo (diluição 1:6) foi testado quanto à atividade neutralizante em cada ponto do tempo de coleta de sangue (0, 3, 6, 8 e 9 semanas) em duplicata. A Figura 5 mostra a indução de anticorpos neutralizantes em camundongos (testados em células de fibroblasto) após a 2ª imunização em 8 semanas para cada uma das composições de VLP bivalente e trivalente. A Figura 6 mostra a indução de anticorpos neutralizantes em camundongos (testados em células epiteliais) após a 2ª imunização em 8 semanas para cada uma das composições de VLP bivalente.

[148] Em outro estudo, composições de VLP monovalente de gB-G preparadas como descrito no Exemplo 2 foram testadas em fêmeas de camundongos BALB/C com 6-8 semanas de idade (mínimo de 8 animais por grupo de teste). Os

camundongos foram imunizados por via intraperitoneal com 200 µl de composições de VLP duas vezes, uma vez no dia 0 (Sensibilização) e uma vez no dia 56 (reforço da semana 8). Os camundongos foram tratados com quantidades equivalentes de 20 µg de teor de gB (determinado por ELISA) por injeção. Para avaliar respostas imunes humorais em camundongos, foi coletado sangue de todos os camundongos nos grupos de estudo pré-1<sup>a</sup> imunização e depois pós-1<sup>a</sup> imunização em 3 e 6 semanas e pré-2<sup>a</sup> imunização em 8 semanas e depois pós-2<sup>a</sup> imunização em 9 semanas a partir do início do estudo. O design do estudo é resumido na Tabela 2.

**Tabela 2**

<b>Artigo de teste N°</b>	<b>Dose</b>	<b>Descrição do artigo de teste</b>	<b>Esquema de imunização (semanas)</b>
1	20 µg	VLPs monovalentes de gB-G	0, 8
2	20 µg	gB recombinante	0, 8

[149] As respostas de anticorpos neutralizantes ao HCMV foram determinadas usando um ensaio de microneutralização em células de fibroblasto com base em um vírus (TB40) HCMV que expressa proteína fluorescente verde (GFP) - e análise citométrica de fluxo de células (GFP+) HFF infectadas. Para avaliar a presença de anticorpos neutralizantes em amostras de soro, o soro foi pré-incubado com HCMV que expressa GFP por um período de tempo suficiente para que os anticorpos neutralizantes reduzissem a infectividade do HCMV. Diluições seriadas da mistura pré-incubada de soro e HCMV foram usadas para contatar uma célula hospedeira (fibroblasto ou epitelial) suscetível à infecção por HCMV.

O número de células que expressam a construção do gene repórter (GFP) foi determinado por citometria de fluxo para calcular a titulação infecciosa da preparação de vírus. A Figura 7 revela titulações de anticorpo neutralizante para camundongos imunizados duas vezes em 0 e 8 semanas com VLPs monovalentes de gB-G versus gB recombinante. Soros coletados pré- e pós-imunizações, como descrito, foram reunidos em pool e testados em relação a uma hiperglobulina de CMV de controle positivo, Cytogam™, na presença de complemento de porquinho-da-índia 10%. Como mostrado na Figura 7, a composição de VLP de gB-G monovalente despertou uma neutralização mais rápida e potente de infecção de célula de fibroblasto do que aquela despertada por uma proteína gB recombinante.

[150] Como pode ser observado (ou como pode ser observado por aqueles habilitados na técnica após leitura do presente relatório descritivo), os dados demonstram, entre outras coisas, atividade surpreendentemente boa de VLPs, por exemplo, por VLPs que incluem gB-G, quando comparada com gB recombinante.

[151] Em outro estudo, composições de VLP bivalente de gB/Gag/pp65 preparadas como descrito no Exemplo 2 foram testadas em fêmeas de camundongos BALB/C com 6-8 semanas de idade (mínimo de 4 animais por grupo de teste). Os camundongos foram imunizados por via intraperitoneal com 200 µl de composições de VLP duas vezes, uma vez no dia 0 (Sensibilização) e uma vez no dia 56 (reforço da semana 8). Os camundongos foram tratados com VLPs bivalentes de gB/Gag/pp65 e esplenócitos foram coletados 14 dias mais tarde. Células T CD8<sup>+</sup> enriquecidas foram estimuladas

(proporção de 1:5) com esplenócitos transfectados por 24 horas com plasmídeo que codifica Gag/pp65 ou Gag para determinar frequências de CTLs dirigidas contra pp65 ou Gag. As frequências de CTL foram determinadas com base no declínio de CFSE, controle de células T CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (Figura 8A). O diagrama de dispersão mostra a frequência de CTLs proliferantes pp65-específicos após subtração das respostas dirigidas contra Gag (Figura 8B). Como revelado na Figura 8, VLPs bivalentes de gB/Gag/pp65 despertaram CTLs pp65-específicas em camundongos imunizados.

**Exemplo 5: Imunogenicidade e atividade de neutralização de VLPs em coelhos**

[152] Composições de VLP bivalente de gB/Gag/pp65 e gH-G/Gag/pp65 preparadas como descrito no Exemplo 2 foram testadas em coelhos Brancos da Nova Zelândia com 6-8 semanas de idade (mínimo de 6 animais por grupo de teste). Os coelhos foram imunizados por via intramuscular com 0,5 ml de composições de VLP três vezes, uma vez no dia 0 (Sensibilização) e uma vez no dia 56 (reforço da semana 8) e uma vez no dia 168 (reforço da semana 24). Os coelhos foram tratados com 25 µg ou 50 µg ou 100 µg (proteína total) de uma composição de VLP bivalente de gB/Gag/pp65, uma composição de VLP bivalente de gH-G/Gag/pp65 ou uma composição de VLP trivalente de gB/gH-G/Gag/pp65 (bivalente de gB/Gag/pp65 e gH-G/Gag/pp65 misturadas juntas em uma proporção de 1:1). Para avaliar respostas imunes humorais em coelhos, foi coletado sangue de todos os coelhos nos grupos de estudo pré-1<sup>a</sup> imunização e depois pós-1<sup>a</sup> imunização em 2, 4, 6 e 8 semanas e pós-2<sup>a</sup> imunização em 10, 13, 16, 20 e 24 semanas a partir do início do estudo e

depois pós-3<sup>a</sup> imunização em 26 e 28 semanas a partir do início do estudo. O design do estudo é resumido na Tabela 3.

**Tabela 3**

<b>Artigo de teste N°</b>	<b>Dose</b>	<b>Descrição do artigo de teste</b>	<b>Esquema de imunização (semanas)</b>
1	100 µg	VLPs bivalentes de gB/pp65	0, 8, 24
2	50 µg	VLPs bivalentes de gB/pp65	0, 8, 24
3	25 µg	VLPs bivalentes de gB/pp65	0, 8, 24
4	100 µg	VLPs bivalentes de gH-G/pp65	0, 8, 24
5	25 µg	VLPs bivalentes de gH-G/pp65	0, 8, 24
6	100 µg Cada	VLPs bivalentes de gB/pp65 + VLPs bivalentes de gH-G/pp65 (proporção de 1:1)	0, 8, 24
7	25 µg cada	VLPs bivalentes de gB/pp65 + VLPs bivalentes de gH-G/pp65	0, 8, 24

		(proporção de 1:1)	
--	--	--------------------	--

[153] Soros de coelhos individuais foram testados quanto a reatividade contra antígeno de gB recombinante por ELISA (tabulada no eixo esquerdo da Figura 9A). As respostas de anticorpos neutralizantes ao HCMV foram determinadas usando um ensaio de microneutralização em células de fibroblasto com base em um vírus CMV que expressa GFP (TB40) e análise citométrica de fluxo de células (GFP+) HFF infectadas como descrito no Exemplo 4 (tabulado no eixo direito da Figura 9B). Soros de coelho coletados pré- e pós-imunizações como descrito foram reunidos em pool e testados quanto à atividade neutralizante na presença de complemento contra HCMV que expressa GFP em fibroblastos HFF em relação a uma hiperglobulina de CMV de controle positivo, Cytogam™. As titulações dos pontos finais foram tabuladas e representam uma redução de 50% em células infectadas com CMV em relação a soros pré-imunização compatíveis (tabulados no eixo esquerdo da Figura 9A). Cinquenta mil células foram coletadas durante análise citométrica de fluxo de células (GFP+) infectadas (tabuladas no eixo direito da Figura 9B). Como mostrado na Figura 9, a composição de VLP bivalente de gB/Gag/pp65 despertou respostas de ligação de titulação elevada (A) e respostas de anticorpos neutralizantes de titulação elevada (B) em coelhos contra infecção de célula de fibroblasto.

[154] Soros de coelho reunidos em pool também foram testados quanto às respostas de anticorpos neutralizantes ao HCMV usando um ensaio de microneutralização em células

epiteliais com base em um vírus HCMV que expressa GFP (Towne TS15-rR) e análise citométrica de fluxo de células ARPE-19 infectadas (GFP+). Soros de coelho coletados pré- e pós-imunizações como descrito foram reunidos em pool e testados quanto à atividade neutralizante na presença de complemento contra HCMV que expressa GFP em células epiteliais ARPE-19 em relação a uma hiperglobulina de CMV de controle positivo, Cytogam™. Como mostrado na Figura 10, surpreendentemente, a combinação de composição de VLP bivalente de gB/Gag/pp65 e composição de VLP bivalente de gH-G/Gag/pp65 despertou uma resposta de anticorpos neutralizantes sinérgica e mais rápida em coelhos contra infecção da célula epitelial, em relação ao gB/Gag/pp65 ou gH/Gag/pp65.

[155] Como pode ser observado (ou como pode ser observado por aqueles habilitados na técnica após leitura do presente relatório descritivo), os dados demonstram, entre outras coisas, atividade surpreendentemente boa de VLPs, por exemplo, por uma combinação de VLPs que incluem gB/Gag/pp65 e VLPs que incluem gH-G/Gag/pp65, até mesmo quando comparadas com VLPs que incluem gB/Gag/pp65 ou VLPs que incluem gH- G/Gag/pp65.

**Exemplo 6: Produção escalonada e purificação de partículas vírus-like (VLPs)**

[156] VLPs foram produzidas e purificadas da seguinte forma. Células CHO foram transfectadas em uma densidade celular entre 1,5E06 a 2,0E06 células/ml com plasmídeos de escolha (preparados como descrito no Exemplo 1) em concentrações e proporções predeterminadas. DNA *stuffer* foi adicionado para elevar a concentração total de DNA até 1

µg/ml de cultura de células. Os plasmídeos usados para transfecção primeiro foram purificados por kits de purificação de plasmídeo MaxiPrep ou GigaPrep (Qiagen). O PEIMAX usado para transfecção para liberar DNA às células foi fornecido em uma proporção de 6:1 (PEI/DNA p/p). As células foram cultivadas por 72 horas, e depois as culturas foram centrifugadas a 4.000 rpm por 20 minutos, usando rotor JS-4.2A por Beckman Coulter, em garrafas de 1 litro. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de 0,8/0,45 µm (AcroPak 500 Capsule, Pall). O sobrenadante filtrado foi então concentrado por filtração de fluxo tangencial (TFF) e diafiltrado contra tampão contendo histidina. O material diafiltrado foi carregado em uma coluna de cromatografia de troca aniônica (AEX) onde o fluxo passante foi coletado. O fluxo passante foi então filtrado de forma estéril através de um filtro de 0,45 µm para ser dividido em alíquotas em volumes diferentes.

[157] O procedimento de TFF envolveu a sanitização de um dia para o outro de duas membranas de TFF (Pellicon 2 Mini, valor de corte de 500 kDa, área de superfície de 0,1 m<sup>2</sup>) em 0,5 M de NaOH por sua fixação em paralelo em um abrigo de aço inoxidável. Após injeção de água até o pH neutro no lado do retentado, bem como no lado do permeado, o tampão de fosfato (PBS) foi usado para equilibrar a membrana. O sobrenadante filtrado foi então carregado na alça de recirculação de retentado de TFF. A pressão de entrada inicial foi de 72,39 kPa em uma taxa de fluxo de permeado de 400 ml/min que era reduzida até cerca de 200 ml/min ao final da concentração. Após concentração até cerca de 10 a 20 vezes, a diafiltração com 5 volumes de 20

mM de histidina + 150 mM de NaCl, pH 5,5 foi feita. O material diafiltrado foi coletado e enxaguado com um volume igual de tampão-his após recirculação por mais 5 minutos com fluxo de permeado fechado. O retentado foi então coletado e reunido em pool com o retentado coletado previamente. Para manter a funcionalidade das membranas, as membranas foram enxaguadas com PBS por 10 minutos; com 0,5 M de NaOH por 40 minutos (após descargas de 200 ml através do permeado e retentado); e finalmente com água até o pH neutro no retentado e permeado. As membranas foram então armazenadas em 0,1 M de solução de NaOH em um refrigerador.

[158] Uma coluna cromatografia AEX foi usada para reduzir o teor de DNA, usando uma coluna de Sefarose HP de 20 ml HiLoad 16/10 em uma taxa de fluxo de 1,6 ml/min para equilíbrio com tampão de equilíbrio (20 mM de histidina + 150 mM de NaCl, pH 5,5), e uma taxa de fluxo de 3,2 ml/min para as etapas de carregamento, lavagem e raspagem. Procedimentos de limpeza foram realizados a 0,8 ml/min. Um registrador de gráfico foi usado para monitorar a absorbância de UV a 280 nm. Um sistema de cromatografia (Gradifrac GE Healthcare) foi usado, que foi esterilizado antes do uso. Primeiro etanol (20% v/v presente na coluna como um tampão de armazenamento) foi removido da coluna usando 5 volumes de coluna de Água Super Q (endotoxinas reduzidas). O tampão de equilíbrio foi passado para 5 volumes de coluna, seguidos por 5 volumes de coluna de tampão de raspagem (20 mM de histidina + 1.000 mM de NaCl, pH 5,5) para condicionar a coluna. O tampão de equilíbrio foi passado para 5 volumes de coluna novamente para preparar a coluna para carregamento. O carregamento foi

realizado a 3,2 ml/min, e depois a coluna foi lavada com 5 volumes de coluna de tampão de equilíbrio, ou até que a linha de base fosse observada. O fluxo passante foi coletado a partir do início do pico UV até a queda do pico UV até cerca de 10% da altura máxima do pico da absorbância UV durante o carregamento do material. A coluna foi então raspada por 5 volumes de coluna de tampão de raspagem (20 mM de histidina + 1.000 mM de NaCl, pH 5,5) e o pico foi coletado. Isso foi seguido por 5 volumes de coluna de outro tampão de raspagem (20 mM de histidina + 2.000 mM de NaCl, pH 5,5) para remover quaisquer proteínas e ácidos nucleicos fortemente ligados e o pico foi coletado. A coluna foi então lavada com 1 M de NaOH para remover quaisquer proteínas precipitadas a 0,8 ml/min para 4 volumes de coluna. A coluna foi então enxaguada com água a 0,8 ml/min até o pH neutro (normalmente 4-5 volumes de coluna). A coluna foi então passada por etanol 20% (4 volumes de coluna a 0,8 ml/min) para remover quaisquer lipoproteínas ou lipídeos (2 volumes de coluna). Nesse estágio, a coluna foi armazenada ou enxaguada com água (4 volumes de coluna) para reiniciar o ciclo para uma segunda batelada.

[159] A Figura 11 revela imagens de uma VLP monovalente de gB-G purificada produzida por células CHO e depois submetida aos métodos de purificação por TFF (Figura 11A) e AEX (Figura 11B), seguidos por métodos analíticos de microscopia eletrônica de coloração negativa. Como mostrado na Figura 11, VLPs monovalentes de gB-G intactas estão presentes após purificação por TFF (Figura 11 A) e AEX (Figura 11B).

#### **Exemplo 7: Imunogenicidade e atividade de neutralização**

### **de VLPs purificadas em coelhos**

[160] Composições de VLP monovalente de gB-G preparadas como descrito no Exemplo 6 foram testadas em coelhos Brancos da Nova Zelândia com 6-8 semanas de idade (mínimo de 6 animais por grupo de teste). Os coelhos foram imunizados por via intramuscular com 0,5 ml (teor de gB de 50 µg) de composições de VLP três vezes, uma vez no dia 0 (Sensibilização) e uma vez no dia 56 (reforço da semana 8) e uma vez no dia 168 (reforço da semana 24). Para avaliar respostas imunes humorais em coelhos, foi coletado sangue de todos os coelhos nos grupos de estudo pré-1<sup>a</sup> imunização e depois pós-1<sup>a</sup> imunização em 2, 4, 6 e 8 semanas e pós-2<sup>a</sup> imunização em 10, 13, 16, 20 e 24 semanas a partir do início do estudo. O design do estudo é resumido na Tabela 4.

**Tabela 4**

<b>Artigo de teste N°</b>	<b>Dose</b>	<b>Descrição do artigo de teste</b>	<b>Esquema de imunização (semanas)</b>
1	Teor de gB de 50 µg	VLPs monovalentes de gB-G (purificadas por TFF e AEX)	0, 8, 24

[161] A Figura 12 revela a neutralização potente de infecção de célula de fibroblasto que foi despertada por soro de coelhos imunizados com VLPs monovalentes de gB-G produzidas por células CHO purificadas por TFF/AEX ("eVLPs de gB" na Figura 12). Essa neutralização foi superior àquela obtida com uma hiperglobulina de CMV de controle positivo, Cytogam™. A Figura 12 também inclui dados

publicados de titulação de neutralização para vacina de Towne e vacina de subunidade de gB com adjuvante (gB+MF59™) (Cui X e cols. 2008 *Vaccine* 26: 5.760-5.766).

[162] A Figura 13 ilustra neutralização potente de infecção da célula epitelial que foi despertada por soro de coelhos imunizados com VLPs monovalentes de gB-G produzidas por células CHO purificadas por TFF/AEX ("eVLPs de gB" na Figura 13). Essa neutralização era comparável com aquela obtida com uma hiperglobulina de CMV de controle positivo, Cytogam™. Figura 13 também inclui dados publicados de titulação de neutralização para vacina de Towne e vacina de subunidade de gB com adjuvante (gB+MF59™) (Cui X e cols. 2008 *Vaccine* 26: 5.760-5.766).

[163] A Figura 14 revela o índice de avidéz de anticorpos despertados em coelhos imunizados com composições de VLP monovalente de gB-G produzidas por células CHO purificadas TFF/AEX. Soros de coelho reunidos em pool e uma hiperglobulina de CMV de controle positivo, Cytogam™ foram diluídos até 1:600.000 e testados contra antígeno de gB recombinante de comprimento total por ELISA na presença ou ausência de 5 M de uréia. A avidéz do anticorpo foi determinada como descrito previamente (Marshall B.C. e Adler S. 2003 *Viral Immunol.* 16: 491-500). Como mostrado na Figura 14, uma indução rápida de anticorpos neutralizantes de alta avidéz foi despertada em coelhos por imunização com VLPs monovalentes de gB-G produzidas por células CHO purificadas por TFF/AEX. A avidéz máxima dos anticorpos foi obtida após duas imunizações com VLP de gB-G.

#### **Outras modalidades**

[164] Outras modalidades da revelação serão evidentes para aqueles habilitados na técnica a partir da consideração do relatório descritivo ou da prática da revelação aqui descrita. Deseja-se que o relatório descritivo e os exemplos sejam considerados apenas exemplares, com o verdadeiro escopo da revelação sendo indicado pelas reivindicações seguintes. O teor de qualquer referência aqui citada é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DA LISTAGEM DE SEQÜÊNCIAS**

[165] O SEQ ID NO: 1 revela uma seqüência de aminoácidos de Gag de MMLV.

[166] O SEQ ID NO: 2 revela uma seqüência de nucleotídeos de Gag de MMLV.

[167] O SEQ ID NO: 3 revela uma seqüência de nucleotídeos códon-otimizada de Gag de MMLV.

[168] O SEQ ID NO: 4 revela uma seqüência de aminoácidos de Gag de MMLV - pp65 de CMV.

[169] O SEQ ID NO: 5 revela uma seqüência de nucleotídeos de Gag de MMLV - pp65 de CMV.

[170] O SEQ ID NO: 6 revela uma seqüência de nucleotídeos de Gag de MMLV - pp65 de CMV códon-otimizada.

[171] O SEQ ID NO: 7 revela uma seqüência de aminoácidos de gB de HCMV.

[172] O SEQ ID NO: 8 revela uma seqüência de nucleotídeos de gB de HCMV.

[173] O SEQ ID NO: 9 revela uma seqüência de nucleotídeos de gB de HCMV códon-otimizada.

[174] O SEQ ID NO: 10 revela uma seqüência de aminoácidos de gB-G de HCMV.

[175] O SEQ ID NO: 11 revela uma seqüência de nucleotídeos de gB-G de HCMV.

[176] O SEQ ID NO: 12 revela uma seqüência de nucleotídeos de gB-G de HCMV códon-otimizada.

[177] O SEQ ID NO: 13 revela uma seqüência de aminoácidos de gH de HCMV.

[178] O SEQ ID NO: 14 revela uma seqüência de nucleotídeos de gH de HCMV.

[179] O SEQ ID NO: 15 revela uma seqüência de nucleotídeos de gH de HCMV códon-otimizada.

[180] O SEQ ID NO: 16 revela uma seqüência de aminoácidos de gH - G de HCMV.

[181] O SEQ ID NO: 17 revela uma seqüência de nucleotídeos de gH - G de HCMV.

[182] O SEQ ID NO: 18 revela uma seqüência de nucleotídeos de gH - G de HCMV códon-otimizada.

[183] O SEQ ID NO: 19 revela uma seqüência de nucleotídeos do plasmídeo de expressão Propol II.

[184] O SEQ ID NO: 20 revela uma seqüência de nucleotídeos de gH de HCMV - TM/CTD de gB de HCMV.

[185] O SEQ ID NO: 21 revela uma seqüência de nucleotídeos códon-otimizada de Gag de MMLV.

[186] O SEQ ID NO: 22 revela uma seqüência de nucleotídeos de Gag de MMLV - pp65 de CMV códon-otimizada.

### REIVINDICAÇÕES

1. Partícula vírus-like (VLP) caracterizada por compreender:

uma proteína de fusão tendo uma sequência de aminoácido SEQ ID NO: 4; e

uma proteína de polipeptídeo compreendendo uma glicoproteína (gB), o polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 7.

2. VLP, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a porção N-terminal da proteína gag compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

3. Partícula vírus-like (VLP) caracterizada por compreender:

uma proteína de fusão tendo uma sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 4; e

um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 7.

4. Composição farmacêutica caracterizada por compreender a VLP, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

5. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por compreender ainda um adjuvante selecionado do grupo que consiste em uma citocina, um adjuvante do tipo gel, um adjuvante microbiano, um adjuvante de emulsão de óleo, um adjuvante à base de emulsificante, um adjuvante particulado, um adjuvante sintético, um adjuvante polimérico e uma combinação dos mesmos.

6. Método de produção de uma VLP, o método

caracterizado por compreender:

cotransfectar uma célula hospedeira com

um vetor compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína de fusão MLV gag-HCMV pp65 com a SEQ ID NO: 22, em que a proteína gag tem a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1 e é fundida à montante da proteína pp65 e

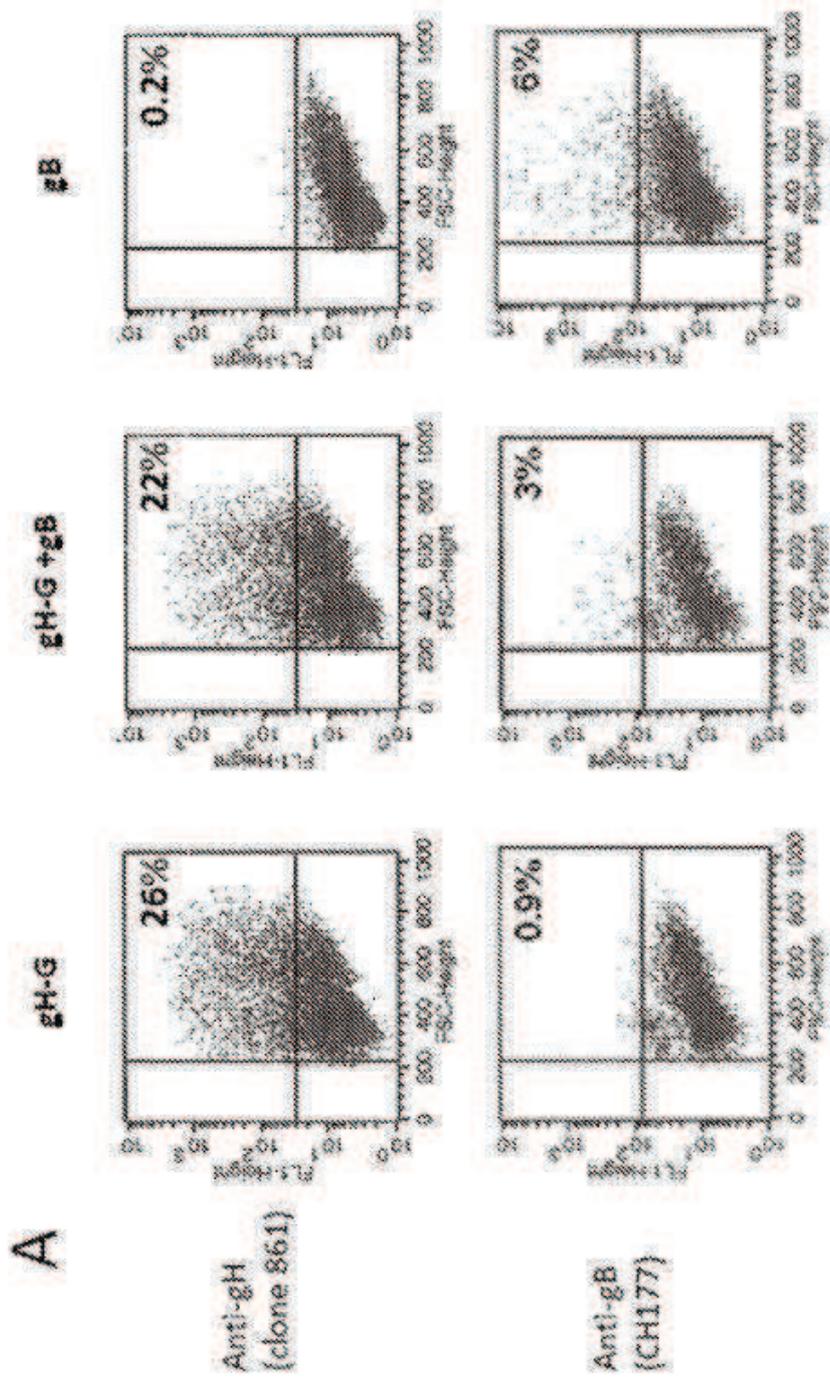
um vetor compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo gB encontrado no HCMV, em que a proteína gB tem a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 7; e

cultivar a célula hospedeira em um meio adequado sob condições que permitam a expressão das proteínas codificadas pelos vetores.

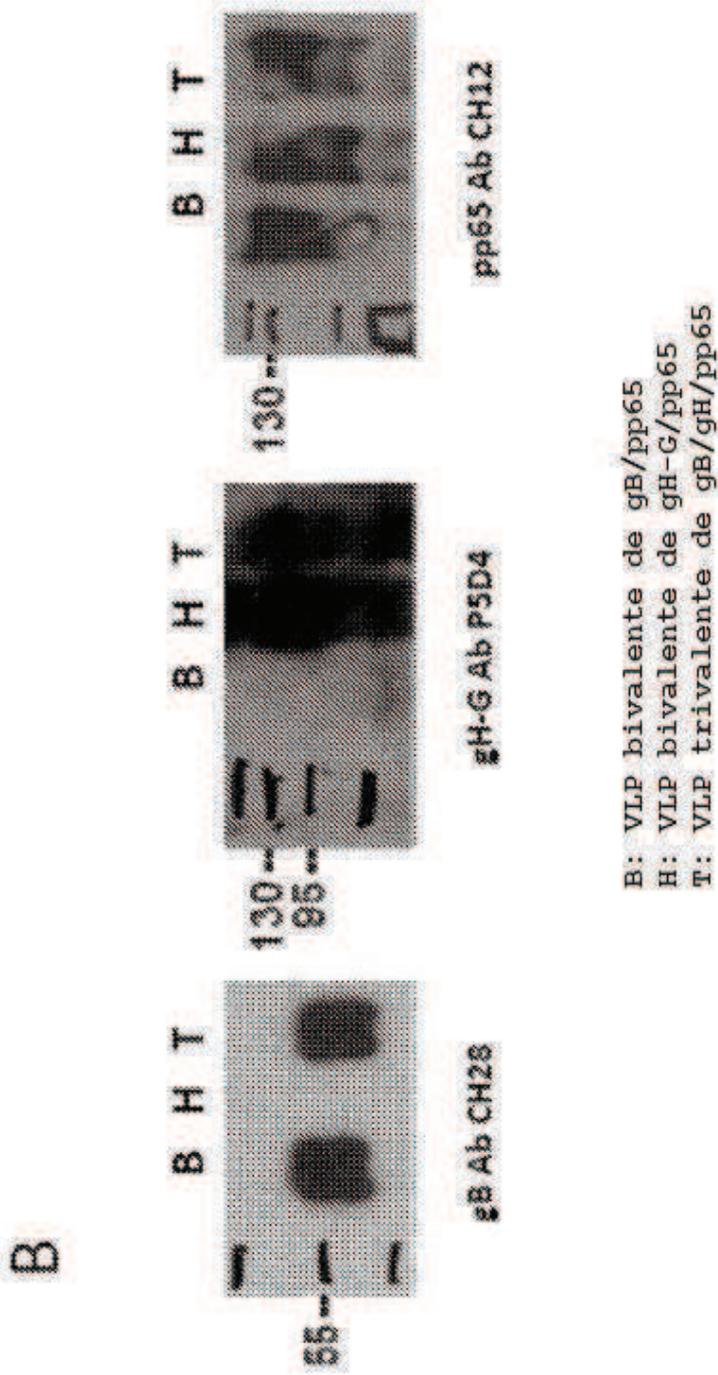
7. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizada por ser para uso na redução da frequência ou severidade ou no retardo do aparecimento de sintomas de infecção por HCMV em um indivíduo.

8. Uso da VLP, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado por ser para a preparação de um medicamento para redução da frequência ou severidade ou no retardo do aparecimento de sintomas de infecção por HCMV em um indivíduo.





**Figura 2**



**Figura 2**

A

Z-Average (d.nm): 103.4  
 PDI: 0.333  
 Intensity: 0.945

Pico	Diâm. (nm)	% Número	Largura (nm)
Pico 1:	69.72	40.68	37.82
Pico 2:	0.000	0.0	0.000
Pico 3:	0.000	0.0	0.000

Qualidade do resultado: Boa

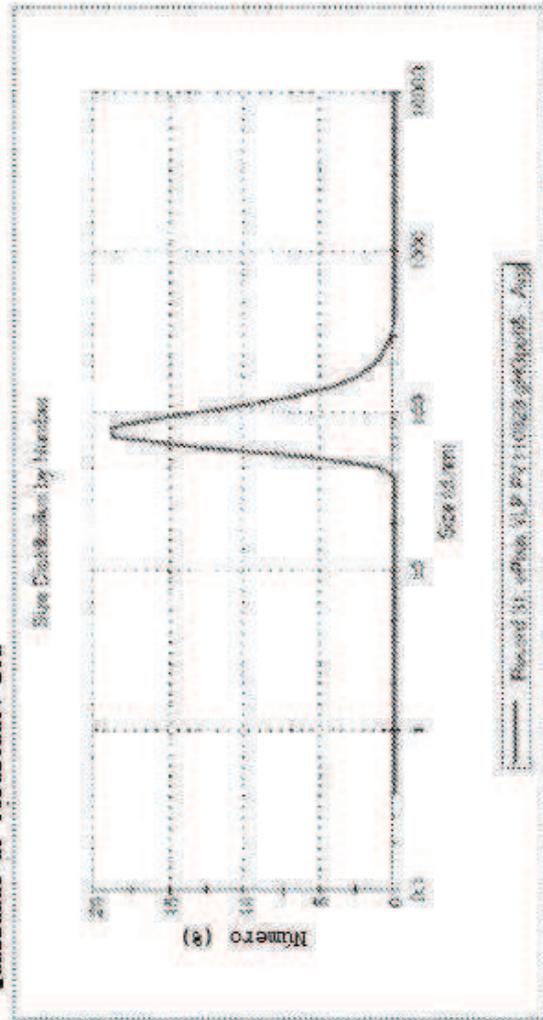
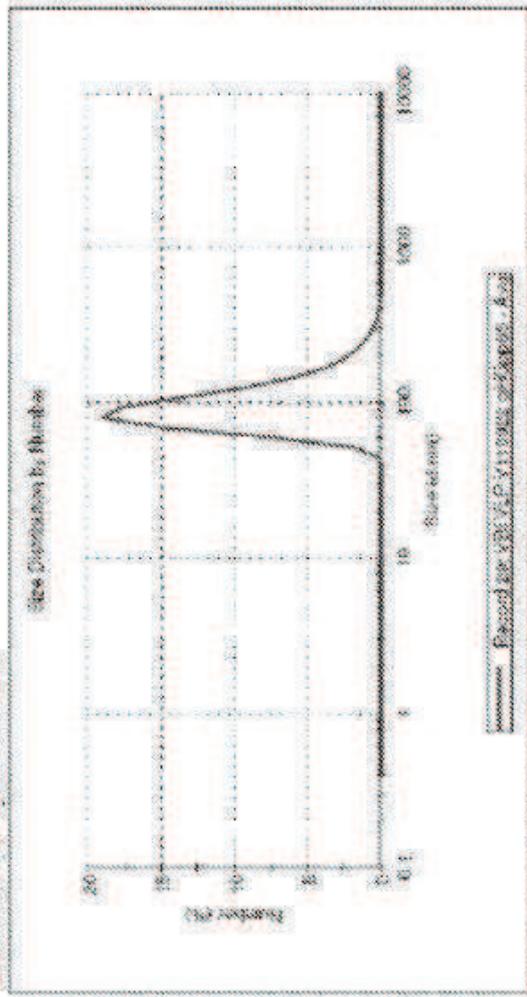


Figura 3

**B**

	Diâm. (nm)	№	Número	Largura (nm)
Z-Average (d.nm):	101.8	100.0		48.81
PDI:	0.922	0.0		0.000
Intensidade:	0.263	0.0		0.000

Qualidade do resultado: Boa



**Figura 3**

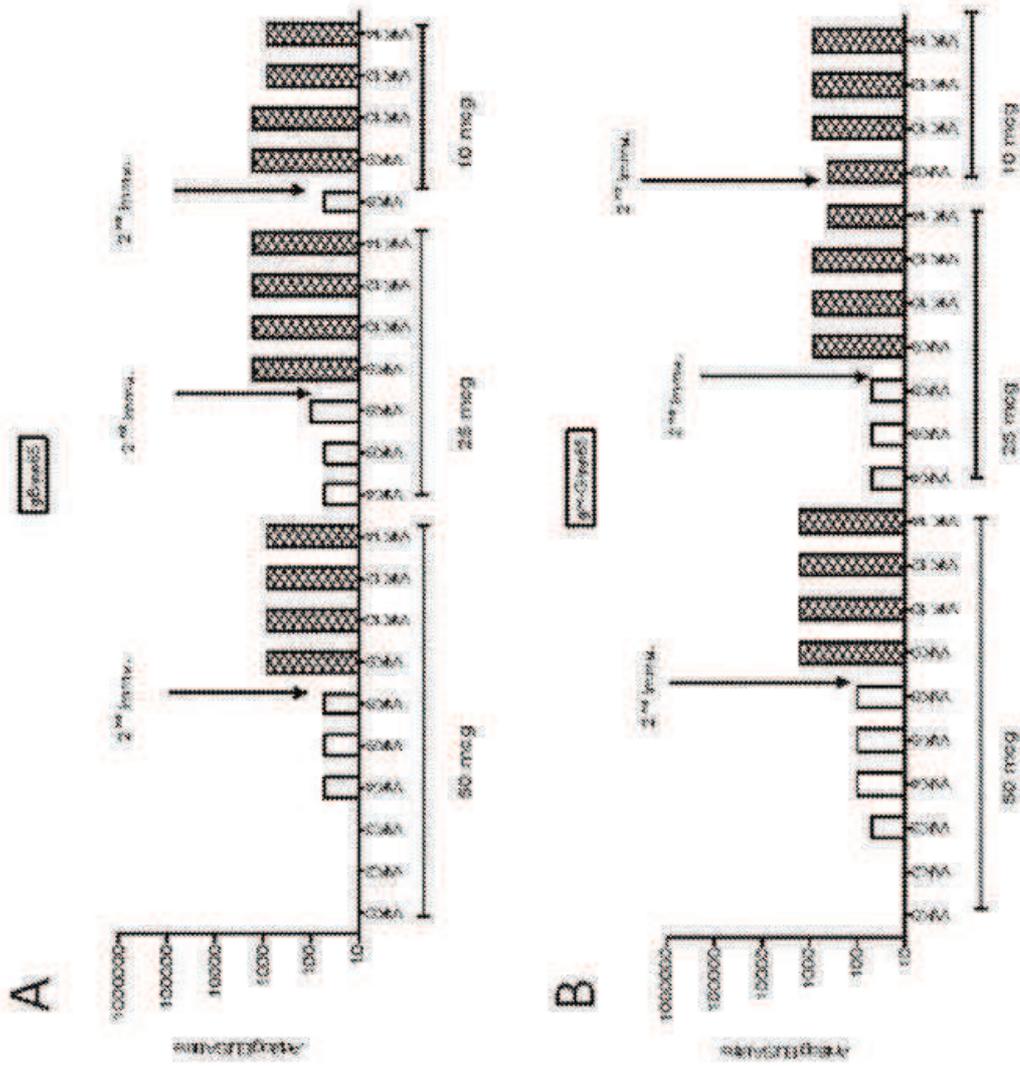


Figura 4

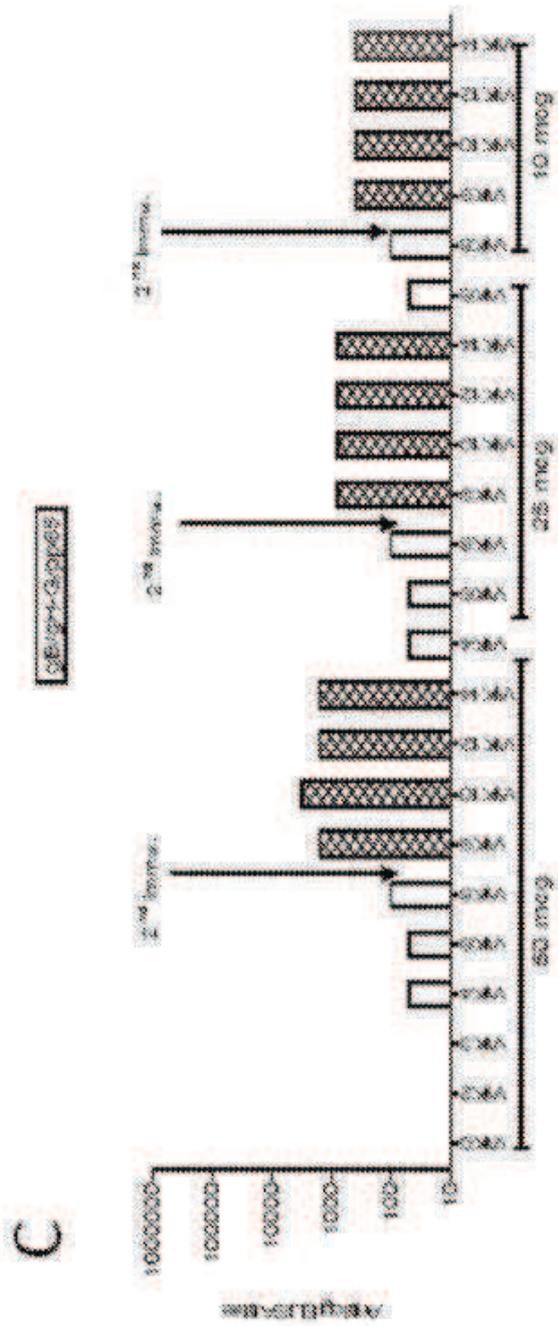


Figura 4

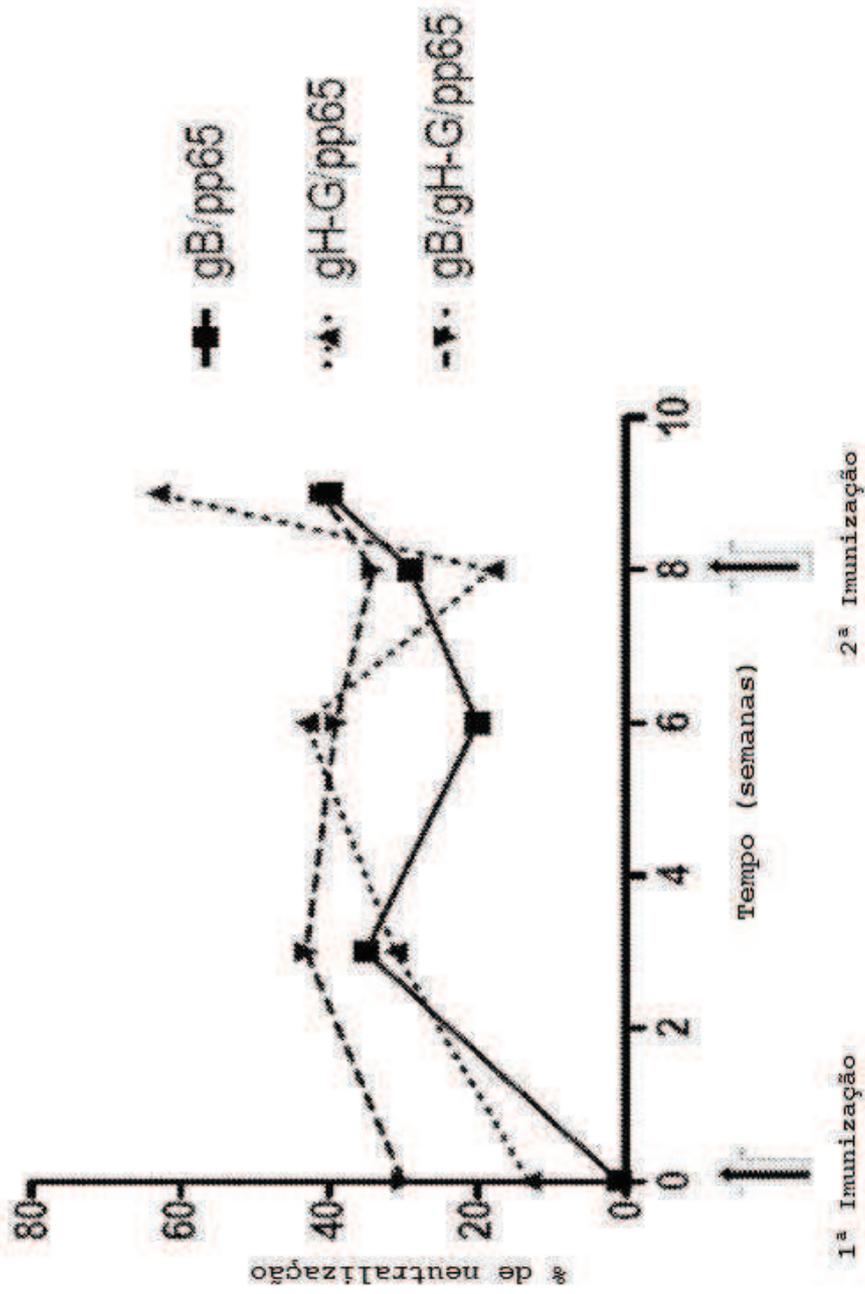


Figura 5

Neutralização de VR1814 em células epiteliais

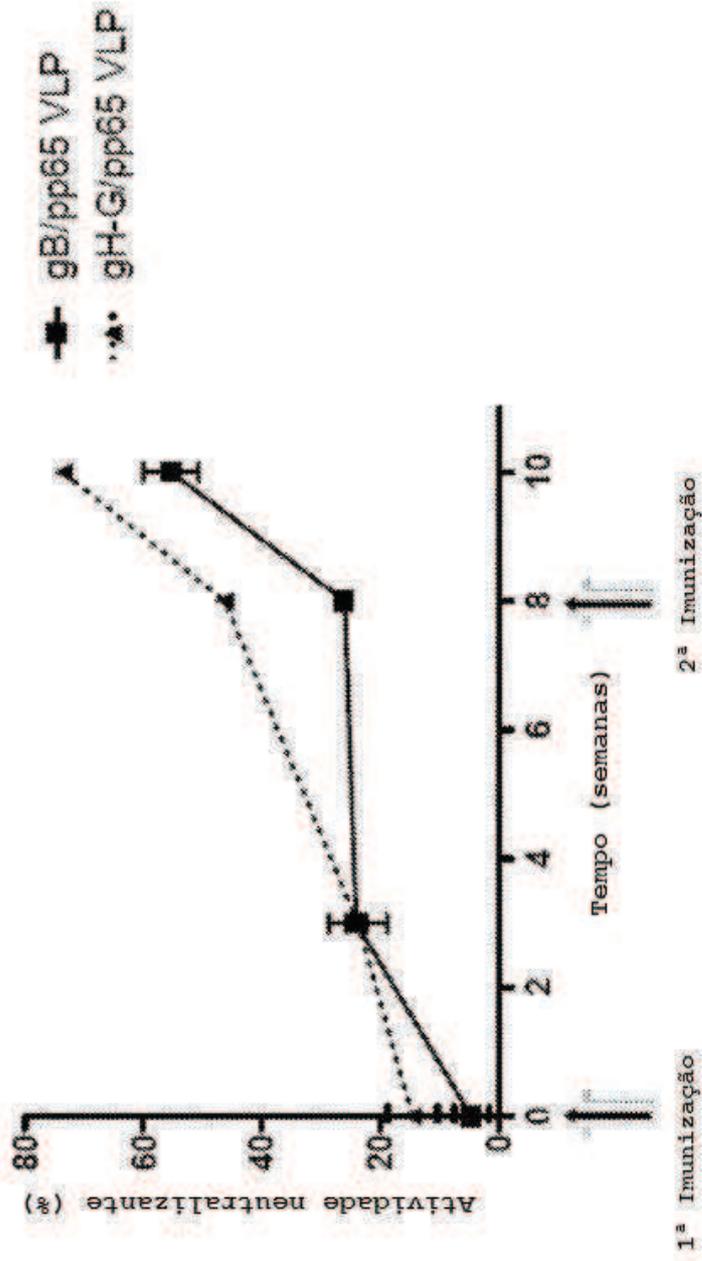


Figura 6

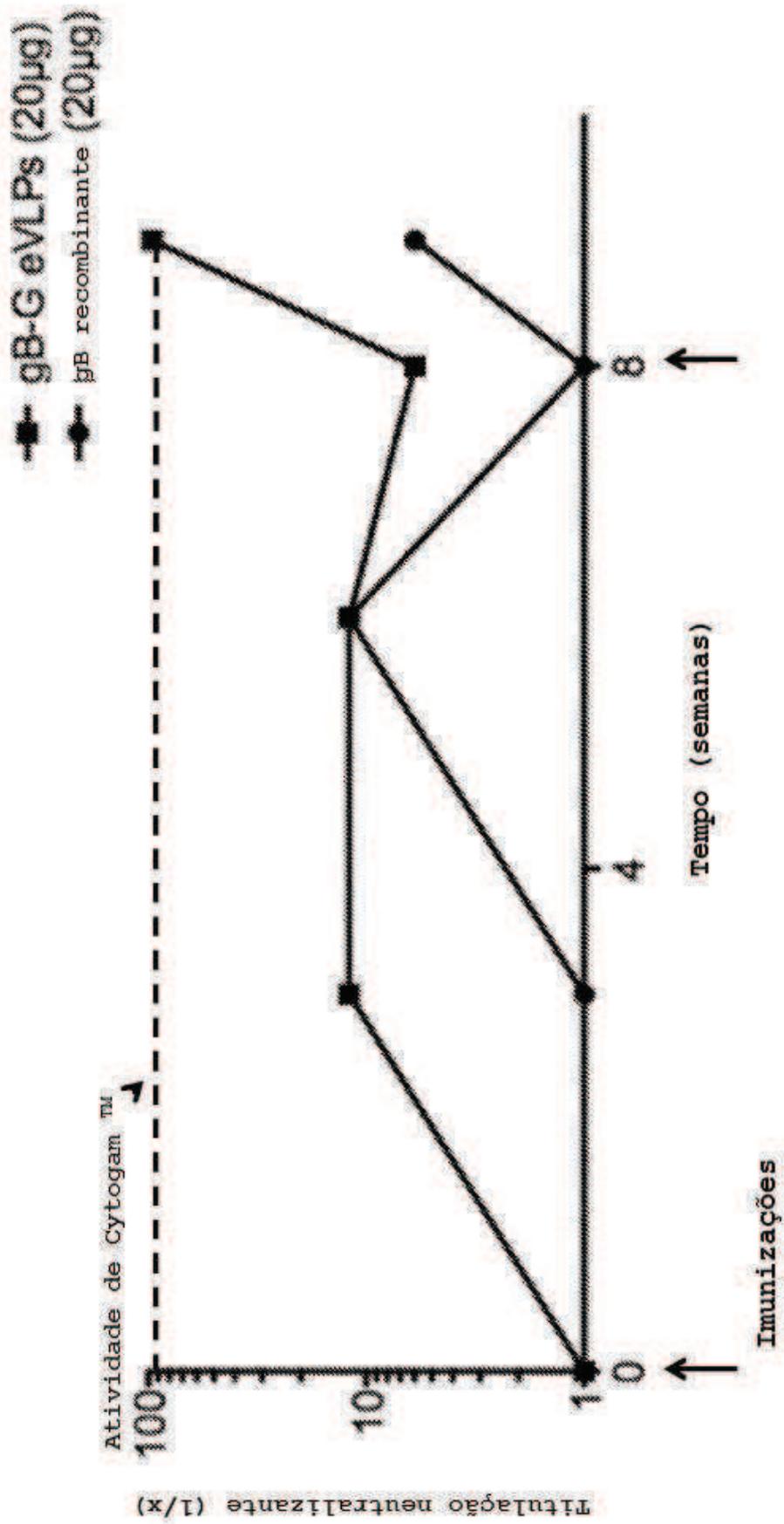


Figura 7

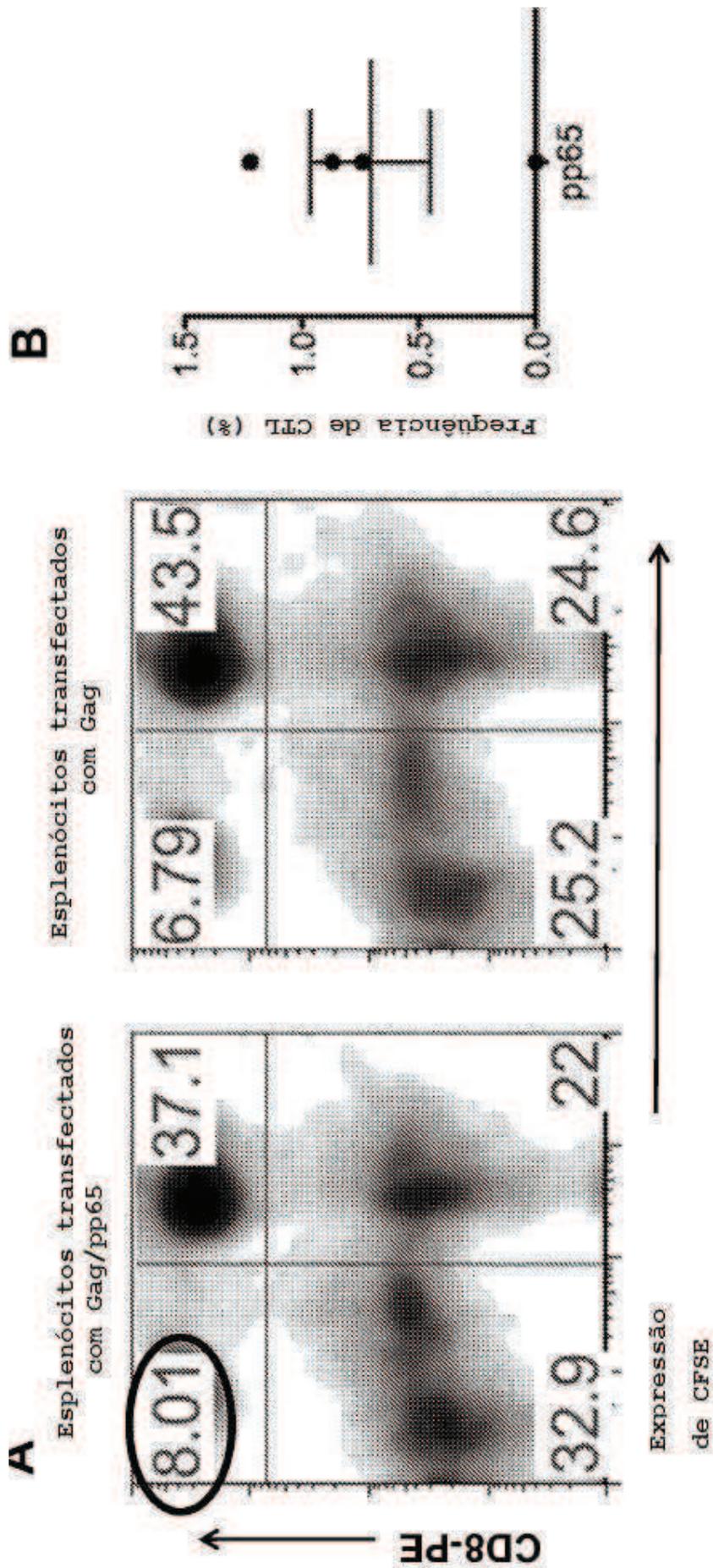


Figura 8

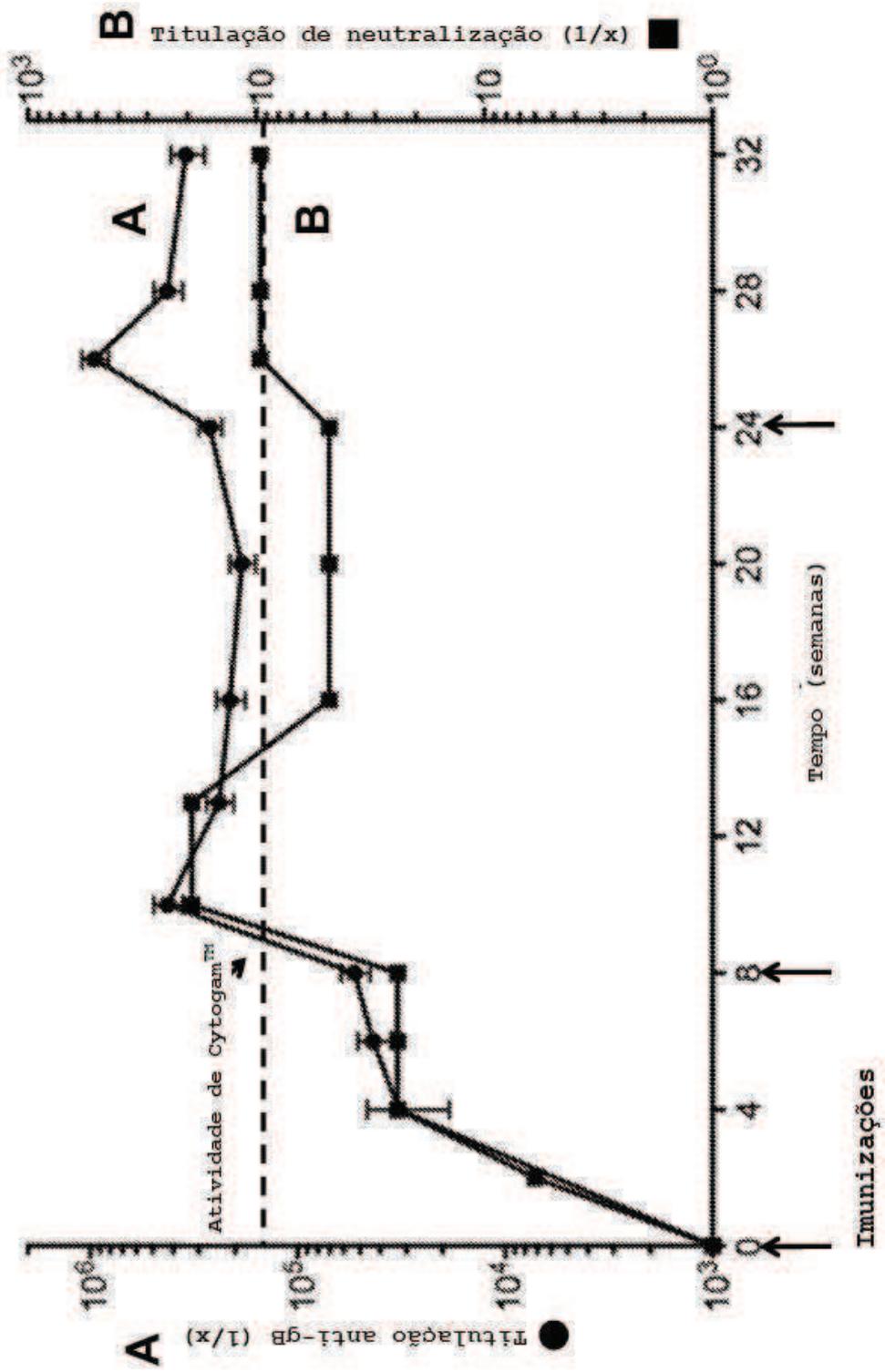


Figura 9

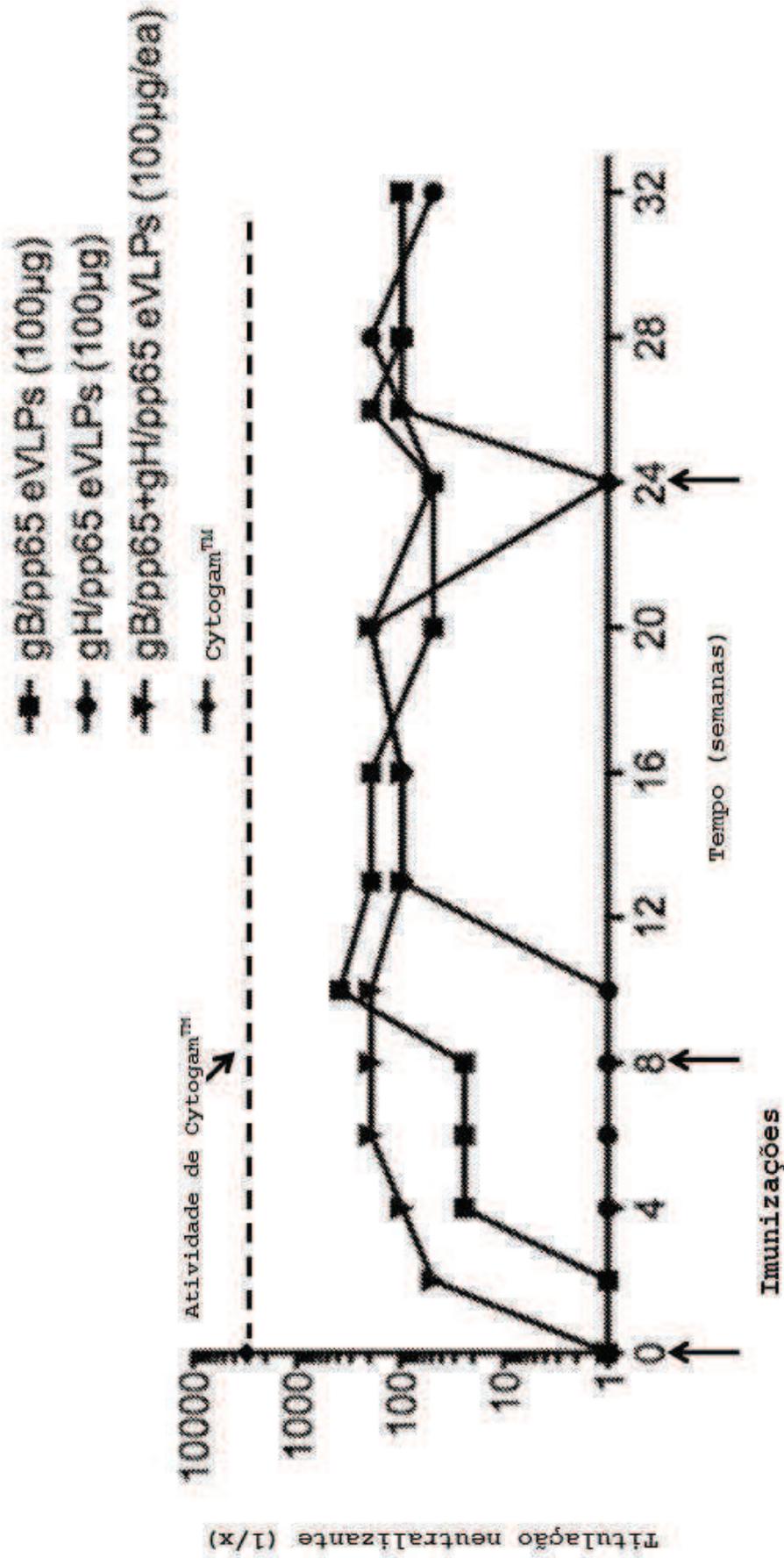
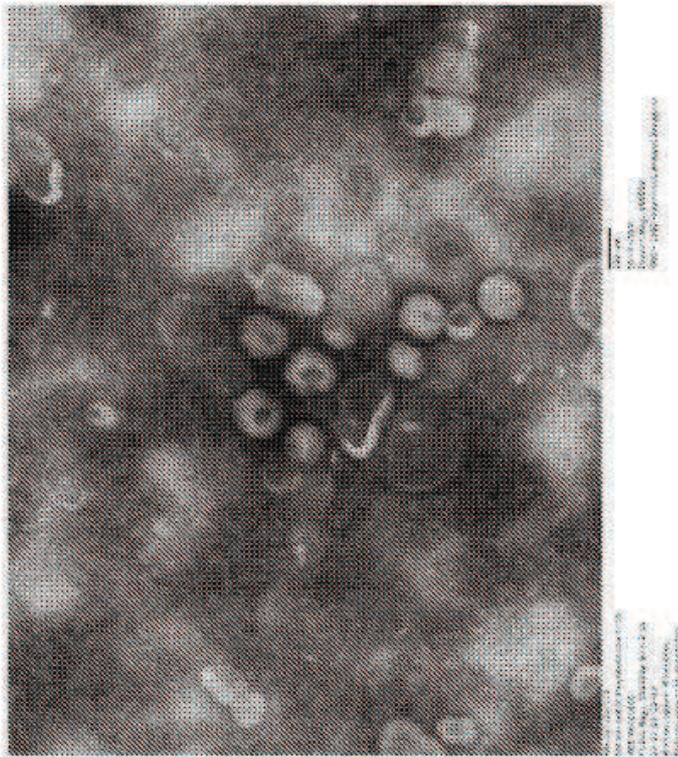


Figura 10

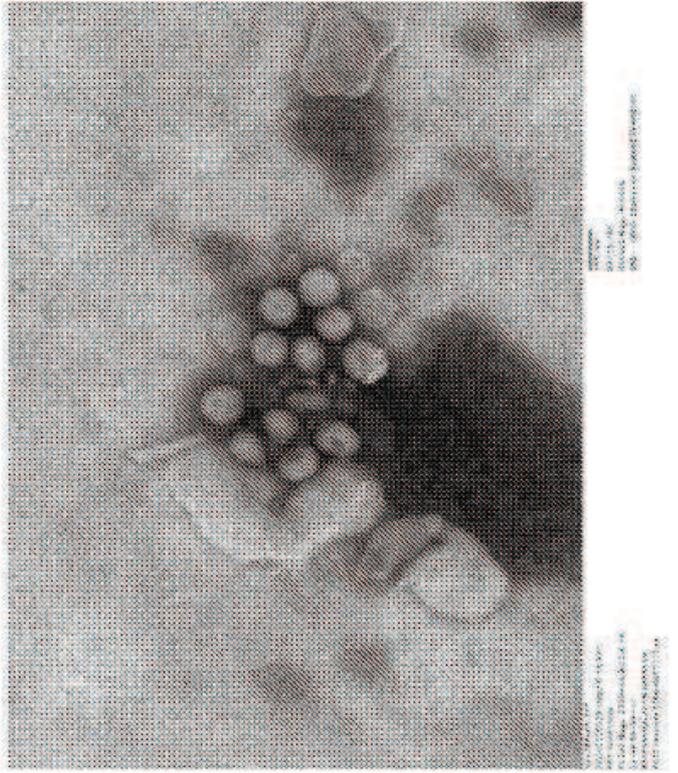
10L gB-G AEX

Dez 1 de retentado de diafiltração de gB-G  
Fluxo passante (conc. de 6,5 x)

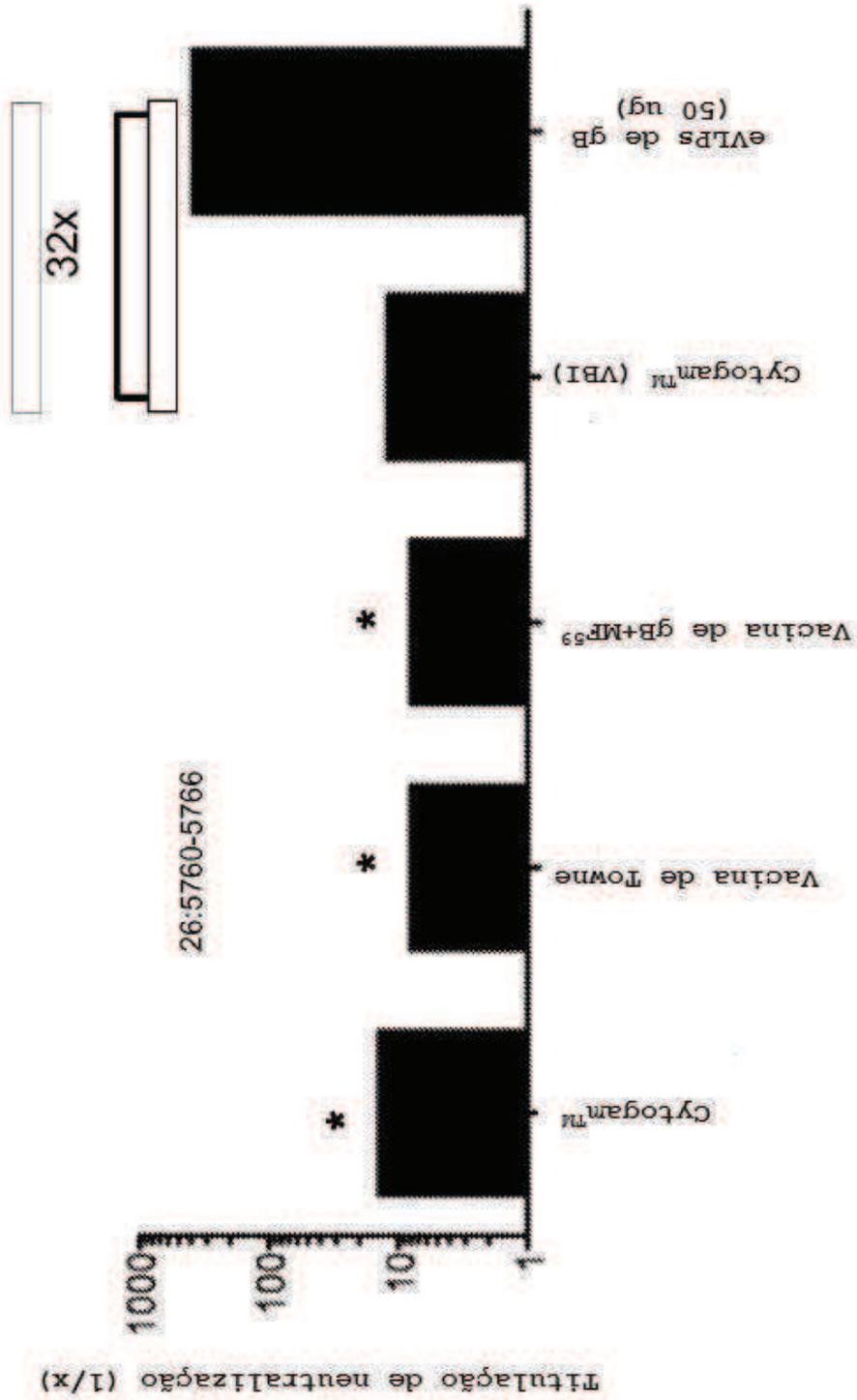
**A**



**B**

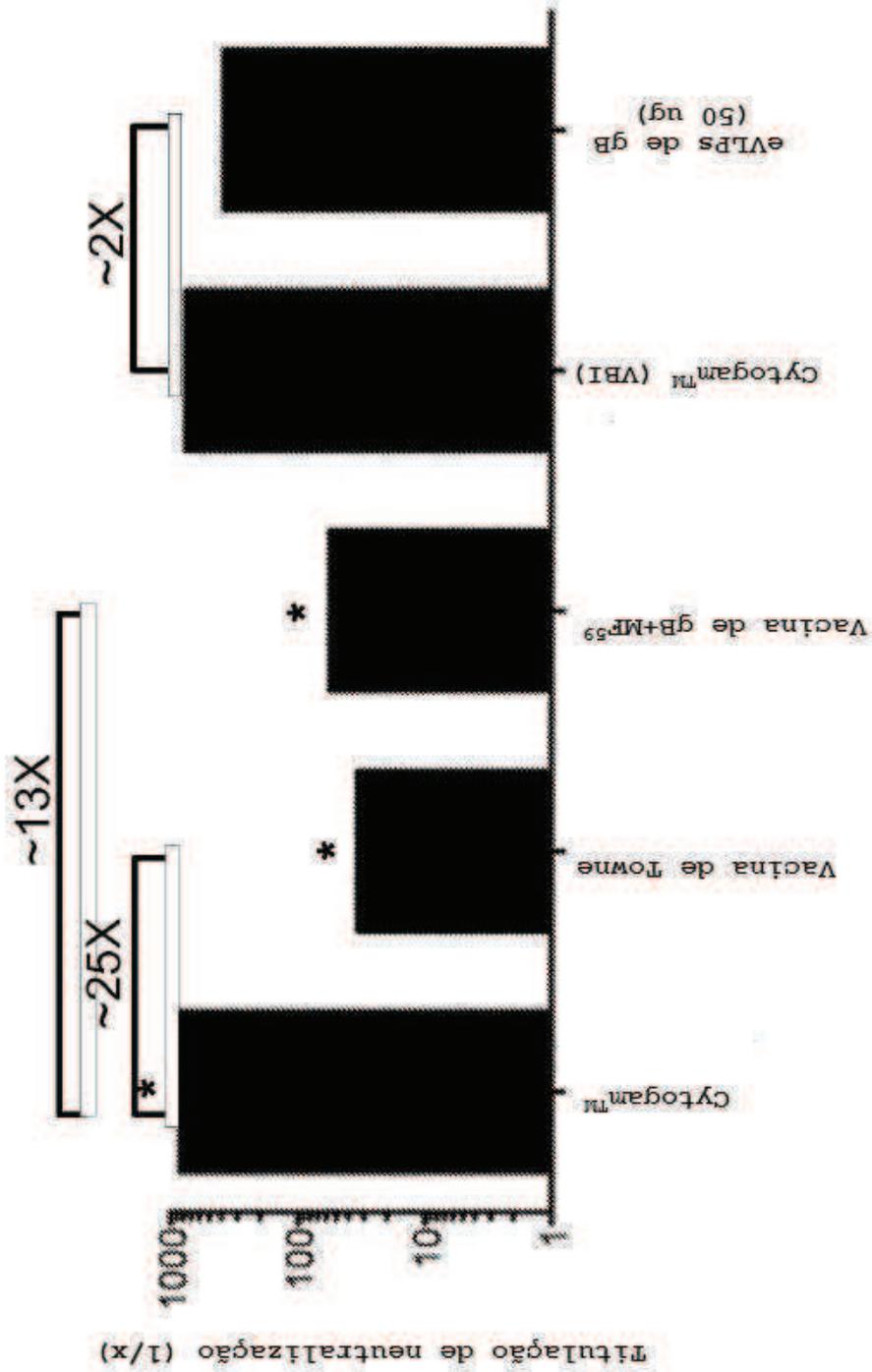


**Figura 11**



\* Fonte de dados: Dados de potência de CytoGam™, vacina viva-atenuada de Towne e vacina de subunidade de gB com adjuvante adaptados de Cui X. e cols., 2008 Vaccine, 26: 5.760-5.766.

Figura 12



\* Fonte de dados: Dados de potência de CytoGam™, vacina viva-atenuada de Towne e vacina de subunidade de gB com adjuvante adaptados de Cui X. e cols., 2008 Vaccine, 26: 5.760-5.766.

**Figura 13**

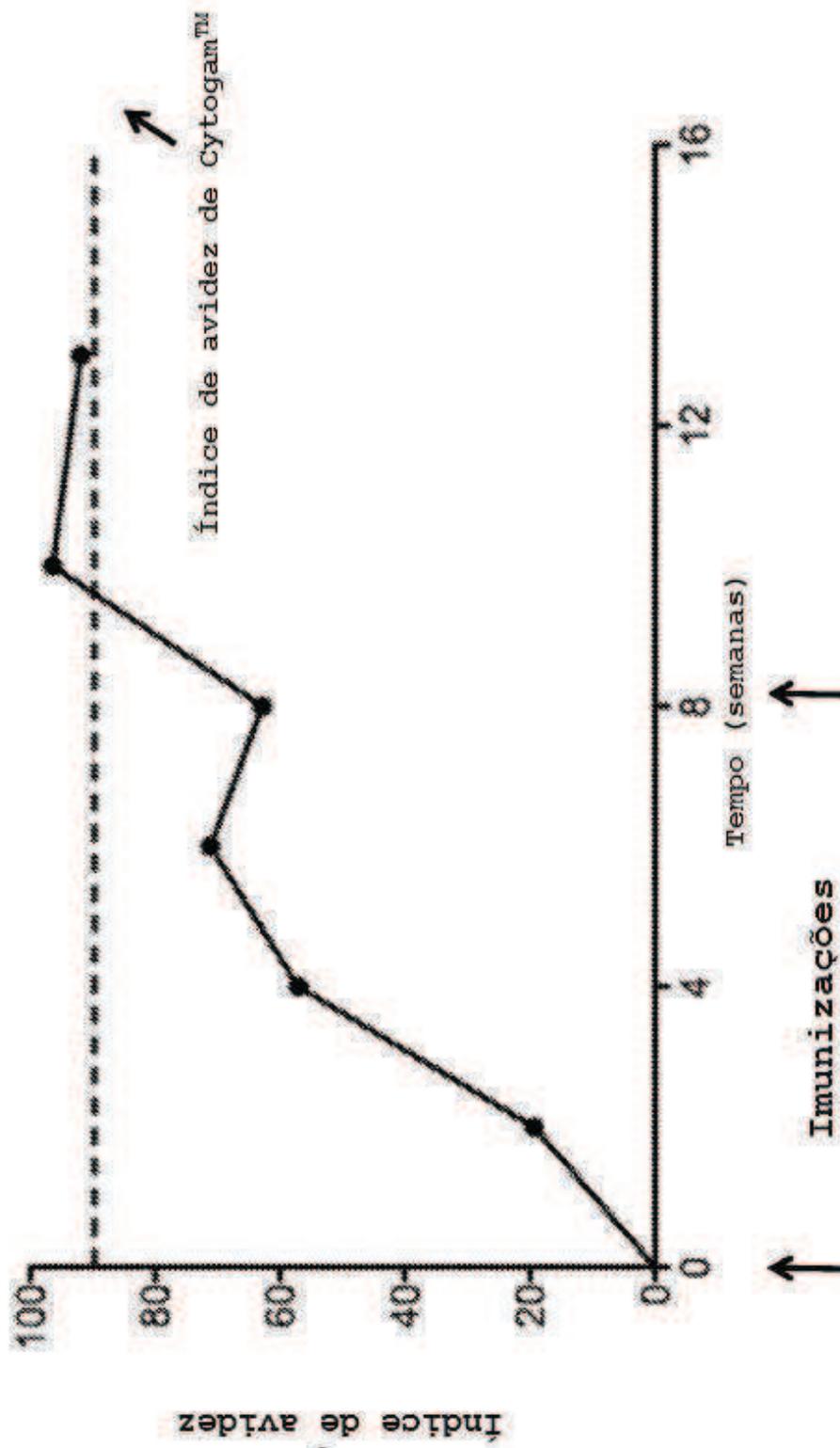


Figura 14