



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

(21) BR 112020004747-3 A2



(22) Data do Depósito: 11/09/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 24/09/2020

(54) Título: COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA DE CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

(51) Int. Cl.: A61K 39/245; A61P 31/12; A61K 39/00.

(30) Prioridade Unionista: 13/09/2017 EP 17306179.7.

(71) Depositante(es): SANOFI PASTEUR.

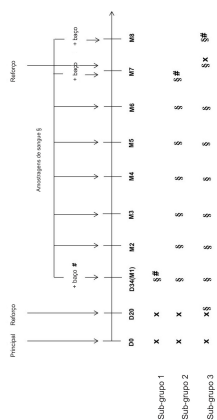
(72) Inventor(es): PASCAL CHAUX; RAFAELA DUMAS; JEAN HAENSLER; SYLVIE PICHON; FABIENNE PIRAS-DOUCE.

(86) Pedido PCT: PCT EP2018074369 de 11/09/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/052975 de 21/03/2019

(85) Data da Fase Nacional: 10/03/2020

(57) Resumo: A invenção refere-se a uma composição imunogênica compreendendo um antígeno do HCMV gB, um antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 e um adjuvante indutor de Th1. Ainda se refere à composição imunogênica para uso como uma vacina contra o HCMV.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA DE CITOMEGALOVÍRUS HUMANO"**.

[0001] A invenção refere-se a uma composição imunogênica compreendendo um antígeno de HCMV gB, um antígeno complexo de HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 e um adjuvante indutor de Th1. Refere-se ainda à composição imunogênica para uso como uma vacina contra o HCMV.

Antecedentes da invenção

[0002] O citomegalovírus humano (HCMV) é um vírus ubíquo que pertence à família do vírus Herpes. O vírus é composto por um ácido desoxirribonucleico (DNA) linear de fita dupla, contido em um capsídeo cercado por um tegumento e envolto em uma bicamada lipídica com picos de glicoproteínas em sua superfície. Como outros membros dessa família, o HCMV possui as características de latência e reativação. O HCMV possui a capacidade de infectar e ser latente em muitas células.

[0003] No hospedeiro imunocompetente, a maioria das infecções por HCMV é assintomática ou muito leve, com alguns sintomas não específicos, tais como fadiga, mal-estar, febre moderada, linfadenopatia, hepatomegalia ou um ligeiro aumento das enzimas hepáticas. A mononucleose heterofílica negativa é observada em aproximadamente 10% dos indivíduos anteriormente saudáveis.

[0004] Por outro lado, as manifestações clínicas podem ser muito graves em recém-nascidos infectados no útero e em adultos imunossuprimidos pela AIDS ou no contexto de transplante de órgãos sólidos ou medula óssea.

[0005] A prevalência da infecção pelo HCMV aumenta com a idade e é afetada por fatores socioeconômicos. Pesquisas sorológicas mostraram maior prevalência nos países em desenvolvimento e em grupos socioeconômicos mais baixos dos países desenvolvidos. Para mulhe-

res em idade fértil, a proporção de mulheres soropositivas para o HCMV varia de aproximadamente 50% nos grupos de renda alta e média dos países desenvolvidos a mais de 80% nas populações de baixa renda. Pesquisas executadas em diferentes países da Europa Ocidental nas duas últimas décadas na população geral, incluindo diferentes faixas etárias, mulheres e homens, apresentaram globalmente que a soroprevalência do HCMV em crianças e adolescentes varia entre 40 e 50%, enquanto que em indivíduos mais velhos (40 anos ou mais), a soroprevalência do HCMV é maior do que 80%.

[0006] O HCMV é espalhado durante um período prolongado nas secreções de indivíduos infectados, incluindo urina, saliva, leite, sêmen, secreções genitais; o HCMV é assim transmitido horizontalmente (através do contato íntimo de criança para criança, de criança para pais e entre parceiros sexuais) ou verticalmente de mãe para feto ou bebê através da placenta ou no nascimento através de contatos com fluidos corporais e amamentação ou pela exposição aos produtos sanguíneos ou órgãos transplantados.

[0007] O HCMV é a causa mais comum de infecção congênita no mundo desenvolvido. Infecção congênita refere-se à infecção transmitida da mãe para o feto antes do nascimento do recém-nascido. A cada ano, nos Estados Unidos, estima-se que 8.000 bebês sofrem de deficiências, incluindo retardo mental, cegueira e surdez neurosensorial, como um resultado de uma infecção congênita pelo HCMV.

[0008] Entre os recém-nascidos infectados congênitos, 5% a 10% apresentam manifestações importantes ao nascimento, tais como microcefalia, coriorretinite, calcificações intracranianas, hepatoesplenomegalia, hepatite, icterícia, hiperbilirrubinemia direta, trombocitopenia, petéquias e anemia. Entre esses recém-nascidos com doença congênita pelo HCMV, a taxa de mortalidade é de aproximadamente 10% na primeira infância e entre os sobreviventes, de 50 a 90% terão sequelas

tais como retardo mental, paralisia cerebral, perda auditiva neurossensorial ou deficiência visual.

[0009] Muitos bebês com infecção congênita pelo HCMV são assintomáticos ao nascimento. Estudos de acompanhamento demonstraram que aproximadamente 15% dos lactentes assintomáticos ao nascimento e identificados como soropositivos para o HCMV no período neonatal através da triagem virológica terão sequelas tais como perda auditiva ou anormalidades do sistema nervoso central.

[0010] No total, aproximadamente 17.000 crianças nascidas a cada ano na Europa e nos EUA terão sequelas permanentes.

[0011] As infecções congênitas pelo HCMV são mais frequentes e mais graves quando a infecção primária ocorre no primeiro trimestre da gravidez do que quando a infecção primária ocorre mais tarde na gravidez. No geral, uma infecção primária pelo HCMV durante a gravidez está associada a um risco de 40% de transmissão ao feto.

[0012] Meios eficazes para prevenir ou tratar a infecção materna por HCMV durante a gravidez ou infecção congênita por HCMV não estão atualmente disponíveis.

[0013] O HCMV também é um patógeno viral importante nos receptores de transplante de órgãos e medula óssea e em pacientes com AIDS. A taxa de morbidez associada ao HCMV em receptores de transplante de órgãos sólidos soronegativos ao HCMV se aproxima de 60%. No transplante de órgão sólido, a doença é a mais grave quando pacientes soronegativos recebem enxerto de um doador positivo para o HCMV. Em contraste, no transplante de medula óssea ou de células-tronco, a doença é mais grave em indivíduos soropositivos para o HCMV que recebem células de um doador soronegativo, mostrando que a origem da infecção pelo HCMV é a reativação da infecção endógena.

[0014] O HCMV provoca pneumonite, hepatite, doença gastrointes-

tinal, supressão da medula óssea e retinite em aproximadamente 15% dos receptores de aloenxerto. Além dessas doenças diretas dos órgãos finais, o HCMV tem sido associado a efeitos indiretos, tais como rejeição de enxertos, aterosclerose acelerada e imunossupressão, que podem levar às infecções bacterianas ou fúngicas.

[0015] O desenvolvimento de uma vacina contra o HCMV é, portanto, considerado um dos principais objetivos de saúde pública nos relatórios de priorização de vacinas do Institute of Medicine (Kathleen R, Stratton, Jane S, Durch, Lawrence RS. Editors committee to study priorities for Vaccine Development Division of Health Promotion and Disease Prevention Institute of Medicine. In: *Vaccines for the 21st century: A tool for decision making*. Washington D.C.: National Academy Press; 2000). Muitas vacinas candidatas foram descritas, mas, até agora, nenhuma foi licenciada (Plotkin *et al.*, *Vaccines*, 6th edition, Ed. Elsevier, 2013, Schleiss *et al.*, *Cytomegalovirus vaccines*, pages 1032-1041).

[0016] Uma vacina de glicoproteína-B do citomegalovírus com adjuvante MF59 apresentou resultados promissores em um ensaio controlado por placebo aleatório de fase 2 em receptores de transplante (Griffiths *et al.*, *Lancet*, 2011, 377(9773):1256-63). Um ensaio de fase 2, controlado por placebo, aleatório, duplo-cego, em mulheres em idade fértil, avaliou a mesma vacina que consiste em glicoproteína B do envoltório do HCMV recombinante com adjuvante MF59, em comparação com o placebo. Os resultados mostraram 50% de eficácia na prevenção da aquisição de HCMV do HCMV primário. No entanto, os resultados de imunogenicidade mostraram que o nível de anticorpos neutralizantes (Ab) induzidos pela formulação gB/MF59 está no nível máximo um mês após a administração da 3ª dose e depois diminui rapidamente (Pass *et al.*, *The New England Journal of Medicine*, 2009, 360:1191-9).

[0017] Como uma consequência, existe uma necessidade de melhorar a eficácia da vacina contra o HCMV, em particular para encontrar uma vacina que aumente os níveis de anticorpos neutralizantes e induza proteção duradoura, induzindo resposta imune persistente. Também existe uma necessidade de encontrar uma vacina contra o HCMV que induza mais particularmente uma resposta imune mais ampla.

Descrição da invenção

[0018] Inesperadamente, os inventores da presente invenção encontraram agora uma nova composição imunogênica que atende a esses requisitos.

[0019] A presente invenção se refere, assim, a uma composição imunogênica compreendendo um antígeno de HCMV gB, um antígeno complexo de HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 e um adjuvante indutor de Th1.

[0020] Em particular, dito adjuvante indutor de Th1 compreende:

- um agonista de TLR-4; ou
- um sal polimérico de ácido poliacrílico com um peso molecular médio ponderado Mw na faixa de 350 a 650 kDa.

[0021] Em uma modalidade, dito adjuvante indutor de Th1 compreende um agonista de TLR-4.

[0022] Em particular, dito agonista de TLR4 está em combinação com um sistema de liberação tal como nanossuspensão aquosa, fosfato de cálcio, lipossomas, virossomas, ISCOMs, micro e nanopartículas ou emulsões.

[0023] Mais particularmente, dito sistema de liberação é uma emulsão de óleo-em-água.

[0024] Em particular, dito agonista de TLR-4 é selecionado de E6020 (número CAS: 287180-63-6) e um agonista de TLR-4 GLA (número CAS 1246298-63-4).

[0025] Em uma modalidade, dito adjuvante indutor de Th1 compreende um sal de polímero de ácido poliacrílico linear ou ramificado com um peso molecular médio ponderado Mw na faixa de 350 a 650 kDa, em particular PAA225000.

[0026] Em particular, dito antígeno de HCMV gB compreende uma ou várias mutações no sítio de clivagem endoproteolítica.

[0027] Mais particularmente, dito antígeno de HCMV gB é um polipeptídeo gB de comprimento total, um polipeptídeo gB de comprimento total que carece de pelo menos uma parte do domínio da transmembrana, um polipeptídeo gB de comprimento total que carece substancialmente de todo o domínio da transmembrana, um polipeptídeo gB de comprimento total que carece de pelo menos uma parte do domínio intracelular, um polipeptídeo gB de comprimento total que carece substancialmente de todo o do domínio intracelular ou um polipeptídeo gB de comprimento total que carece substancialmente tanto do domínio da transmembrana quanto do domínio intracelular.

[0028] Mais particularmente, dito antígeno de HCMV gB é gBdTm.

[0029] Em particular, no dito antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131, o antígeno gH carece de pelo menos uma parte do domínio da transmembrana, de preferência o antígeno gH carece substancialmente de todo o domínio da transmembrana.

[0030] Mais particularmente, dito gH compreende o ectodomínio de todo o comprimento do gH codificado pelo gene UL75.

[0031] Ainda particularmente, na composição imunogênica de acordo com a invenção, o HCMV gB e o HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 são os únicos antígenos do HCMV.

[0032] A presente invenção refere-se ainda à composição imunogênica de acordo com a invenção para uso como uma vacina contra o HCMV.

[0033] Em particular, dita vacina aumenta os níveis de anticorpos neutralizantes e/ou a persistência.

Composição imunogênica

[0034] Como mencionado anteriormente, a composição imunogênica de acordo com a invenção compreende:

- um antígeno de HCMV gB;
- um antígeno do complexo pentamérico de HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131; e
- um adjuvante indutor de Th1.

[0035] O "HCMV" é utilizado para citomegalovírus humano e é qualquer cepa de citomegalovírus humano.

[0036] Os termos "compreendendo"/"compreende"/"compreendem"/"compreendido" abrangem "incluindo"/"inclui"/"incluem"/"incluído" respectivamente, assim como "consistindo"/"consiste"/"consistem"/"consistiram" respectivamente, por exemplo, uma composição "compreendendo" X pode consistir exclusivamente em X ou pode incluir algo adicional, por exemplo, X + Y.

[0037] "Antígeno" conforme utilizado nesta invenção possui o significado comum conhecido por uma pessoa versada na técnica. Em particular, refere-se a qualquer molécula contendo um ou mais epítopos (lineares, conformacionais ou ambos) que provoque uma resposta imunológica.

[0038] No contexto da presente invenção, um antígeno inclui ainda uma proteína tendo modificações, tais como eliminações, adições e substituições na sequência nativa, contanto que a proteína mantenha imunogenicidade suficiente. Essas modificações podem ser deliberadas, por exemplo, através da mutagênese direcionada ao sítio ou podem ser acidentais, tais como mutações que ocorrem durante a expressão dos antígenos em uma célula hospedeira. O antígeno também pode ser uma proteína ou seu fragmento codificado por uma sequên-

cia de consenso.

[0039] Os antígenos que podem ser utilizados em uma composição imunogênica de acordo com a invenção são, em particular, um antígeno de HCMV gB e um antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131.

Antígeno de HCMV gB

[0040] O antígeno de HCMV gB de acordo com a presente invenção é um polipeptídeo gB de comprimento total ou um polipeptídeo derivado de gB que induz anticorpos de neutralização.

[0041] O gB é codificado pelo gene UL55 do genoma do HCMV. O tamanho da forma nativa de gB (ou gp130) depende do tamanho da estrutura de leitura aberta (ORF), que pode variar um pouco de acordo com a cepa. Por exemplo, a ORF da cepa AD169, que possui 2717 pb de comprimento, codifica um gB de comprimento total de 906 aminoácidos, enquanto que a ORF da cepa de Towne codifica um gB de comprimento total de 907 aminoácidos. As sequências proteicas destas duas cepas estão descritas na US 2002/0102562 (figura 2), incorporada por referência na sua totalidade. A forma nativa de gB contém uma sequência de sinal de aminoácido que normalmente é de 23 a 25 aminoácidos de comprimento, seguida por um domínio extracelular contendo um sítio de clivagem endoproteolítica entre os resíduos arginina 460 e serina 461, por um domínio transmembranar e por um domínio intracelular. Geralmente, o gB de comprimento total é esgotado da sequência de sinal de aminoácido como uma consequência dos mecanismos pós-translacionais que ocorrem nas células. Será bem entendido que o gB de comprimento total adequado para os propósitos da invenção abrange tanto o gB de comprimento total das cepas de HCMV Towne e AD169, quanto outras cepas equivalentes. Vários domínios antigênicos indutores de anticorpos de neutralização foram descritos. Notavelmente, inclui o domínio que está localizado entre os

resíduos de aminoácido 461 e 680 do gp 130, sendo este domínio subdividido em dois domínios descontínuos, o domínio entre os resíduos 461 e 619 e o domínio entre os resíduos 620 e 680 (US 5.547.834). Também inclui o domínio antigênico 1 (AD-1) localizado entre os resíduos de aminoácido 560 e 640 (Schoppel K. *et al.*, Virology, 1996, 216:133-45) ou o domínio antigênico 2 (AD-2) localizado entre os resíduos de aminoácido 65 e 84 (Axelsson F *et al.*, Vaccine, 2007, 26:41-6) ou entre os resíduos de aminoácido 27 e 84 (Burke HG *et al.*, PLoS pathogens, 2015, 11:e1005227). Consequentemente, um polipeptídeo que compreende em sua sequência de aminoácido uma sequência homóloga a um ou vários dos domínios antigênicos citados acima também é adequado para os propósitos da invenção. O termo "uma sequência homóloga a" pretende significar uma sequência de aminoácido na qual existe pelo menos 80% de identidade com a sequência de aminoácido do domínio antigênico sendo considerada do gB nativo originário da cepa Towne ou AD169 (que são descritas na US 2002/0102562). Tipicamente, a homologia de sequência é baseada em uma identidade de sequência de pelo menos 90% e, ainda mais especificamente, a homologia de sequência é completa (identidade de sequência de 100%).

[0042] Como aqui utilizado, uma primeira sequência tendo pelo menos x% de identidade com uma segunda sequência significa que x% representa o número de aminoácidos da primeira sequência que são idênticos aos seus aminoácidos correspondentes da segunda sequência quando ambas as sequências estão alinhadas de maneira ideal por meio de um alinhamento global, em relação ao comprimento total da segunda sequência de aminoácido. Ambas as sequências são alinhadas de maneira ideal quando x for o máximo. O alinhamento e a determinação da porcentagem de identidade podem ser realizados manual ou automaticamente utilizando um algoritmo de alinhamento

global, por exemplo, o algoritmo Needleman and Wunsch, descrito em Needleman and Wunsch, J. Mol Biol., 48, 443-453 (1970), com, por exemplo, os seguintes parâmetros para comparação de sequência de polipeptídeos: matriz de comparação: BLOSUM62 de Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89, 10915-10919 (1992), penalidade de descontinuidade: 8 e penalidade de extensão da abertura: 2; e os seguintes parâmetros para comparação de sequência de polinucleotídeo: matriz de comparação: combina = +10, incompatibilidade = 0; penalidade de descontinuidade: 50 e penalidade de extensão aberta: 3.

[0043] Um programa que pode ser utilizado com os parâmetros acima está disponível publicamente como o programa "gap" do Genetics Computer Group, Madison WI. Os parâmetros acima mencionados são os parâmetros padrão, respectivamente, para comparações de peptídeos (juntamente sem penalidade para aberturas finais) e para comparações de ácido nucleico.

[0044] Entre os peptídeos ou polipeptídeos derivados de gB que são adequados para o objetivo da invenção está a gp 55, como descrito na US 5.547.834. É derivado da clivagem de gB no sítio de clivagem endoproteolítica; a sua sequência de aminoácido corresponde àquela que está entre o resíduo de serina 461 e a extremidade C-terminal. As formas truncadas do gp 55 também podem ser utilizadas, tais como um gp 55 exaurido de toda ou parte da sequência da transmembrana e de toda ou parte do domínio C-terminal intracelular (por exemplo, um peptídeo tendo uma sequência homóloga à sequência de aminoácido do gB nativo entre os resíduos 461 e 646) ou um gp 55 exaurido de toda ou parte do domínio C-terminal intracelular (por exemplo, um peptídeo tendo uma sequência homóloga à sequência de aminoácido do gB nativo entre os resíduos 461 e 680). Tais formas truncadas do gp 55 também são descritas na US 5.547.834, incorpo-

rada por referência na sua totalidade.

[0045] Também é possível utilizar uma forma submetida à mutação de gB de comprimento total que transporta uma ou várias mutações no sítio de clivagem endoproteolítico, de tal modo que este se torne ineficaz. Em particular, as mutações estão localizadas entre os resíduos 457 e 460 da sequência de gp130 e, mais particularmente, estão localizadas na arginina 460 e/ou lisina 459 e/ou arginina 457. Nesse aspecto, a forma submetida à mutação do gB de comprimento total transporta todo o domínio extracelular com todos os domínios que são alvos de anticorpos de neutralização. Tais formas submetidas à mutação podem ser secundariamente exauridas de toda ou parte da sequência da transmembrana e/ou de toda ou parte do domínio C-terminal intracelular, a fim de permitir sua secreção no hospedeiro quando produzido como proteínas recombinantes e sua fácil purificação a jusante. Tais derivados de gB são preferidos na medida em que substancialmente todos os domínios que são alvos de anticorpos de neutralização são conservados.

[0046] Portanto, em um aspecto da invenção, o HCMV gB compreende uma ou várias mutações no sítio de clivagem endoproteolítica e, em particular, o HCMV gB é adicionalmente selecionado dentre o grupo de um HCMV gB de comprimento total, um HCMV gB de comprimento total que carece de pelo menos uma parte do domínio transmembranar, um polipeptídeo gB de comprimento total que carece substancialmente de todo o domínio transmembranar, um polipeptídeo gB de comprimento total que carece de pelo menos uma parte do domínio intracelular, um HCMV gB de comprimento total que carece substancialmente de todo o domínio intracelular e um polipeptídeo de HCMV gB de comprimento que carece substancialmente tanto do domínio transmembranar quanto do domínio intracelular.

[0047] A expressão "que carece substancialmente de todo o domí-

nio intracelular" ou "que carece substancialmente de todo o domínio transmembrantar" significa que pelo menos 80% da sequência de aminoácido que corresponde ao dito domínio é excluída.

[0048] No contexto da presente invenção, por "que carece de pelo menos uma parte de um domínio" significa que carece de pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60% ou pelo menos 70%, mas que carece de menos do que 80% do domínio.

[0049] Em uma modalidade, o antígeno de HCMV gB é o ectodomínio de gB, isto é, um gB de comprimento total exaurido de toda a sequência da transmembrana e de todo o domínio C-terminal intracelular. O "ectodomínio" é a parte de uma proteína ancorada na transmembrana que se estende além da membrana para dentro do espaço extracelular.

[0050] O antígeno de HCMV gB de acordo com a presente invenção também pode conter outras mutações e/ou eliminações e/ou adições. Por exemplo, o antígeno de HCMV gB pode conter pelo menos uma eliminação ou substituição de aminoácido em pelo menos um do domínio de loop de fusão 1 (FL1) e do domínio de loop de fusão 2 (FL2) localizado no domínio extracelular conforme descrito na EP2627352. Alternativamente ou, além disso, pode conter uma eliminação de pelo menos uma parte da sequência líder como descrito na EP2627352. O antígeno de HCMV gB de acordo com a presente invenção também pode compreender uma mutação que resulta em um sítio de glicosilação dentro da superfície hidrofóbica 1 (resíduos de aminoácidos 154 a 160 e 236 a 243) como descrito na WO2016 092460. Em particular, dito sítio de glicosilação é um sítio de N-glicosilação compreendendo um motivo N-X-S/T/C, em que X é qualquer resíduo de aminoácido (mas preferivelmente não prolina). O antígeno de HCMV gB pode compreender uma mutação que resulta em um sítio

de glicosilação, em que dito sítio de glicosilação está (1) dentro da superfície hidrofóbica 2 (resíduos de aminoácido 145-167 e 230-252); ou (2) em um resíduo que esteja dentro de 20 angstroms do loop de fusão 1 (FL1) (resíduos de aminoácidos 155 a 157) e/ou loop de fusão 2 (FL2) (resíduos de aminoácidos 240 a 242), conforme descrito na WO2016092460. O antígeno de HCMV gB pode compreender uma sequência heteróloga que é de pelo menos 12 resíduos de comprimento no C-terminal, como descrito na WO2016092460. Em particular, a proteína de gB pode ser uma proteína de fusão em que a sequência heteróloga é fundida no C-terminal do ectodomínio.

[0051] Postula-se que o HCMV gB nativo seja um homotrímero com base na estrutura de cristalografia 3D das proteínas de gB nos vírus relacionados, vírus do Herpes Simplex 1 (HSV-1) gB e vírus Epstein Barr (EBV) gB, que são homotrímeros (Heldwein *et al.*, Science, 2006, 313:217-220; Backovic *et al.*, PNAS, 2009, 106(8):2880-2885). O antígeno de HCMV gB de acordo com a presente invenção pode estar em uma forma trimérica (forma nativa) e/ou hexamérica (dímero da forma nativa trimérica) e/ou dodecamérica (dímero de hexâmero). Em particular, a parte do antígeno de HCMV gB da composição imunogênica de acordo com a presente invenção não está substancialmente na forma monomérica, mais particularmente não em uma forma monomérica. A expressão "não está substancialmente em uma forma monomérica" significa que menos do que 20%, em particular menos do que 10%, em particular menos do que 5%, do antígeno de HCMV gB está em uma forma monomérica.

[0052] De acordo com uma modalidade, o antígeno gB compreende uma sequência de aminoácido que possui pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 1. Em particular, dito antígeno gB compreende uma sequência de aminoácido que possui pelo menos 85% de identidade, pelo menos 90% identidade, pelo menos 95% de identi-

dade, pelo menos 97% de identidade, pelo menos 98% de identidade, pelo menos 99% de identidade ou mesmo 100% de identidade com a SEQ ID NO: 1:

SSTRGTSATHSHHSSHTTSAAHSRSGSVSQRVTSSQTVSHGVNETIY
 NTTLKYGDVVGVTTKYPYRVCSMAQGTDLIRFERNIVCTSMKPINE
 DLDEGIMVVYKRNIVAHTFKVRVYQKVLTFRRSYAYIHTTYLLGSNTE
 YVAPPMWEIHHINSHSQCYSSYSRVIAGTVFVAYHRDSYENKTMQLM
 PDDYSNTHSTRYVTVKDQWHSRGSTWLYRETCNLNCMVTITTARSK
 YPYHFFATSTGDVVDISPFYNGTNRNASYFGENADKFFIFPNYTIVSD
 FGRPNSALETHRLVAFLERADSVISWDIQDEKNVTCQLTFWEASERTI
 RSEAEDSYHFSSAKMTATFLSKKQEVNMSDSALDCVRDEAINKLQQI
 FNTSYNQTYEKYGNVSVFETTGGVLVFWQGIKQKSLVELERLANRSS
 LNLTHNTTQTSTDGNNATHLSNMESVHNLVYAQLQFTYDTLRGYINR
 ALAQIAEAWCVDQRRRTLEVFKELSKINPSAILSAIYNKPAAARFMGDVL
 GLASCVTINQTSVKVLRDMNVKESPGRCYSRPVVIFNFANSSYVQYG
 QLGEDNEILLGNHRTEECQLPSLKIFIAGNSAYEYVDYLFKRMIDLSSI
 STVDSMIALDIDPLENTDFRVLELYSQKELRSSNVFDLEEIMREFNSYK
 QRVKYVEDKRLCMQPLQNLFPYLVSADGTTVTSGNTKDTSLQAPPS
 YEESVYNNGRKGPGPPSSDASTAAPPYTNEQAYQMLLALVRLDAEQ
 RAQQNGTDSLGGTGTQDKGQKPNLLDRLRHRKNGYRHLKDSDEE
 ENV.

[0053] Em uma modalidade preferida, o antígeno gB compreende uma sequência de aminoácido que possui 100% de identidade com a SEQ ID NO: 1.

[0054] Um antígeno de HCMV gB que é particularmente adequado no contexto da presente invenção é uma forma truncada do gB de comprimento total exaurido de todo ou parte do domínio C-terminal e/ou exaurido de todo ou parte da sequência da transmembrana e no qual o sítio de clivagem é ineficaz. Uma forma truncada de gB que é particularmente preferida corresponde àquela que é descrita na US

6.100.064, denominada gBdTM, incorporada por referência na sua totalidade. Na US 6.100.064, a sequência de sinal foi formulada uma hipótese como 24 aminoácidos de comprimento e as posições de aminoácido foram indicadas de acordo com a figura 10. Os inventores descobriram que essa sequência de sinal é, de fato, de 25 aminoácidos. Na figura 10 da US 6.100.064, todas as posições de aminoácidos indicadas no C-terminal da Ser-1 (isto é, C-terminal na sequência de sinal) devem ser assim reduzidas a partir de 1. Portanto, o gBdTM carrega três mutações no sítio da clivagem (Arginina 432 é substituída por Threonine, Lisina 434 é substituída por Glutamina e Arginina 435 é substituída por Treonina; levando em consideração as posições renumeradas) e uma eliminação na região da transmembrana entre os resíduos de aminoácido valina 676 e arginina 751 (levando em consideração as posições renumeradas), de modo que o domínio extracelular esteja diretamente conectado ao domínio citoplasmático. Esse polipeptídeo derivado de gB é mais fácil de purificar, pois é produzido por células recombinantes que expressam este produto sob uma forma secretada. A forma resultante é um polipeptídeo de 806 aminoácidos de comprimento deletado de sua sequência de sinal e de sua região da transmembrana quando é derivado da cepa gB Towne.

[0055] A proteína do HCMV gB aqui descrita ou os peptídeos ou polipeptídeos dela derivados podem ser sintetizados por qualquer método bem conhecido da pessoa versada na técnica. Tais métodos incluem a síntese química convencional, em fase sólida (R. B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85 (14), 2149–2154 (1963)), ou em fase líquida, síntese enzimática (K. Morihara, Trends in Biotechnology, 5(6), 164-170 (1987)) a partir de aminoácidos constitutivos ou seus derivados, síntese de proteínas sem células (Katzen et al., Trends in Biotechnology, 23(3), 150-156 (2005)), assim como métodos de produção biológica por tecnologia recombinante.

[0056] Por exemplo, o antígeno de HCMV gB pode ser obtido utilizando um processo de produção biológica com uma célula hospedeira recombinante. Em um tal processo, um cassete de expressão, contendo um ácido nucleico que codifica um antígeno de HCMV gB como aqui descrito, é transferido para dentro de uma célula hospedeira, que é cultivada em condições que permitem a expressão da proteína correspondente. A proteína assim produzida pode então ser recuperada e purificada. Os métodos para a purificação de proteínas são bem conhecidos da pessoa versada. A proteína recombinante obtida pode ser purificada a partir de lisados e extratos celulares ou do sobrenadante do meio de cultura, através de métodos utilizados individualmente ou em combinação, tais como fracionamento, métodos cromatográficos, métodos de imunoafinidade utilizando anticorpos mono- ou policlonais específicos, etc. Em particular, a proteína recombinante obtida é purificada a partir do sobrenadante do meio de cultura.

[0057] A proteína de HCMV gB ou os peptídeos ou polipeptídeos dela derivados são geralmente obtidos por técnicas de DNA recombinante e purificados de acordo com os métodos bem conhecidos daqueles versados na técnica. Os métodos descritos na US 6.100.064 e na US 2002/0102562, incorporadas por referência na sua totalidade, podem ser utilizados em particular.

[0058] Por exemplo, o antígeno gB de acordo com a invenção é uma glicoproteína recombinante, que é produzida nas culturas de células de ovário de hamster chinês (CHO). O gene gB da cepa Towne do HCMV pode ser submetido à mutagênese para remover o sítio de clivagem e a parte transmembranar da molécula, a fim de facilitar a secreção na cultura de células, como descrito na US 6.100.064. A molécula secretada é um polipeptídeo de 806 aminoácidos, mantendo 19 potenciais sítios de glicosilação ligados a N, e também é chamada gBdTm. O processo de purificação envolveu etapas de afinidade e

cromatografia de troca iônica.

Antígeno complexo pentamérico de HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131

[0059] Outra parte do antígeno da composição imunogênica de acordo com a invenção é o antígeno complexo pentamérico de HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131.

[0060] Dito complexo pentamérico é montado através de ligações de dissulfeto e interações não covalentes entre os cinco componentes para formar um complexo funcional capaz de apresentar epitopos conformacionais (Ciferri *et al.*, PNAS, 2015, 112(6):1767 – 1772; Wen *et al.*, Vaccine, 2014, 32(30):3796–3804).

[0061] O referido complexo já foi descrito e é conhecido pela pessoa versada na técnica. É em particular descrito em Ryckman *et al.* (Journal of Virology, January 2008, p.60-70) e no pedido de patente WO2014/005959. Dito complexo pentamérico de HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 pode, em particular, compreender um polipeptídeo de HCMV gH modificado, em que dito polipeptídeo não carece de pelo menos uma parte do domínio transmembranar (TM). Em algumas modalidades, o polipeptídeo gH pode reter uma parte do domínio TM natural, mas não o suficiente para deixar a proteína permanecer em uma bicamada lipídica. Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo gH carece substancialmente de todo o domínio transmembranar. Em uma modalidade mais preferida, o polipeptídeo gH carece do domínio TM natural completo.

[0062] Assim, o polipeptídeo gH pode conter até 10 aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 aminoácidos) do domínio TM natural gH.

[0063] No contexto da presente invenção, por "carece de pelo menos uma parte de um domínio" significa carece de pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60% ou pelo menos 70%, mas carece de menos do

que 80% do domínio.

[0064] A expressão "carece substancialmente de todo o domínio intracelular" ou "carece substancialmente de todo o domínio transmembranar" significa que pelo menos 80% da sequência de aminoácido que corresponde ao dito domínio é excluída.

[0065] Alternativamente ou além disso, carecer de uma parte ou de todo o domínio TM, o polipeptídeo pode carecer de uma parte ou substancialmente todo ou todo o domínio intracelular do HCMV gH.

[0066] Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo gH carece substancialmente de todo o domínio intracelular. Em uma modalidade mais preferida, o polipeptídeo gH carece do domínio intracelular natural de comprimento total.

[0067] Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo gH carece de todo o domínio TM e todo o domínio intracelular.

[0068] Em uma modalidade, dito gH compreende o ectodomínio do gH de comprimento total codificado pelo gene UL75.

[0069] A glicoproteína H do HCMV (gH), que é codificada pelo gene UL75, é uma glicoproteína de vírion essencial com relação à possibilidade de contaminação e que é conservada entre os membros dos vírus alfa, beta e gama-herpes. Ela forma um complexo estável com gL, e a formação desse complexo facilita a expressão da superfície celular do gH. Com base nas estruturas cristalinas dos complexos HSV-2 e EBV gH/gL, a subunidade gL e os resíduos N-terminais de gH formam um domínio globular em uma extremidade da estrutura (a "cabeça"), que está implicada nas interações com gB e ativação da fusão da membrana. O domínio C-terminal do gH, proximal à membrana viral (a 'cauda'), também está implicado na fusão da membrana. Em uma modalidade, o polipeptídeo gH no complexo pentamérico aqui descrito compreende uma sequência de aminoácido que possui pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 2. Em particular, o antígeno gH

compreende uma sequência de aminoácido que possui pelo menos 85% de identidade, pelo menos 90% de identidade, pelo menos 95% de identidade, pelo menos 97% de identidade, pelo menos 98% de identidade, pelo menos 99% de identidade ou até 100% de identidade com a SEQ ID NO: 2:

RYGAEAVSEPLDKAFHLLLNTYGRPIRFLRENTTQCTYNNSLRNSTVV
 RENAI SFNFFQSYNQYYVFHMPRCLFAGPLAEQFLNQVDLTETLERY
 QQRLNTYALVSKDLASYRSFSQQLKAQDSLGEQPTTVPPPIDLSIPHV
 WMPPQTTPHGWTESHTTSGLHRPHFNQTCILFDGHDLLFSTVTPCL
 HQGFYLIDELRYVKITLTEDFFVVTVSIDDDTPMLLIFGHLPRVLFKAPY
 QRDNFILRQTEKHELLVLVKKDQLNRHSYLKDPDFLDAALDFNYLDLS
 ALLRNSFHRYAVDVLKSGRCQMLDRRTVEMAFAYALALFAAARQEE
 AGAQVSVPRALDRQAALLQIQEFMITCLSQTTPRRTLLLYPTAVDLAK
 RALWTPNQITDITSLVRLVYILSKQNQQHLIPQWALRQIADFALKLHKT
 HLASFLSAFARQELYLMGSLVHSMLVHTTERREIFIVETGLCSLAELS
 HFTQLLAHPHHEYLSPLYTPCSSSGRRDHSLERLTRLFPDATVPATV
 PAALSILSTMQPSTLETFPDLFCLPLGESFSALTVSEHVSYYVTNQYLI
 KGISYPVSTTVVGQSLIITQTDSQTKCELTRNMHTTHSITAALNISLEN
 CAFQCQSALLEYDDTQGVINIMYMHDSDDVLFALDPYNEVVVSSPRTH
 YLMLLKNGTVLEVTDVVVDATDSR.

[0070] Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo gH compreende uma sequência de aminoácido que possui 100% de identidade com a SEQ ID NO: 2.

[0071] A glicoproteína L do HCMV (gL) é codificada pelo gene UL115. Acredita-se que a gL é essencial para a replicação viral e todas as propriedades funcionais conhecidas da gL estão diretamente associadas à sua dimerização com a gH. O complexo gL/gH é necessário para a fusão das membranas virais e plasmáticas, levando à entrada do vírus na célula hospedeira.

[0072] De acordo com uma modalidade, o polipeptídeo gL no

complexo pentamérico aqui descrito compreende uma sequência de aminoácido que possui pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 3. Em particular, o antígeno gL compreende uma sequência de aminoácido que possui pelo menos 85% identidade, pelo menos 90% de identidade, pelo menos 95% de identidade, pelo menos 97% de identidade, pelo menos 98% de identidade, pelo menos 99% de identidade ou até 100% de identidade com a SEQ ID NO: 3:

AAVSVAPTAAEKVPAECPELTRRCLLGEVFQGDKEYESWLRPLVNVT
GRDGPLSQLIRYRPVTPEAANSVLLDEAFLDTLALLYNNPDQLRALLT
LLSSDTAPRWMTVMRGYSECGDGSPAVYTCVDDLCRGYDLTRLSYE
RSIFTEHVLGFELVPPSLFNVVVAIRNEATR TNRAVRLPVSTAA APEGI
TLFYGLYNAVKEFCLRHQLDPPLLRHLDKYYAGLPPELKQTRVNLPA
HSRYGPQAVDAR.

[0073] Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo gL compreende uma sequência de aminoácido que possui 100% de identidade com a SEQ ID NO: 3.

[0074] De acordo com uma modalidade, o polipeptídeo UL128 no complexo pentamérico aqui descrito compreende uma sequência de aminoácido que possui pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 4. Em particular, o antígeno UL128 compreende uma sequência de aminoácido que possui pelo menos 85% identidade, pelo menos 90% de identidade, pelo menos 95% de identidade, pelo menos 97% de identidade, pelo menos 98% de identidade, pelo menos 99% de identidade ou até 100% de identidade com a SEQ ID NO: 4:

EECCFEFNVNHPPERCYDFKMCNRFTVALRCPDGEVCYSPEKTAEIRG
IVTTMTHSLTRQVVHNKLTSCNYNPLYLEADGRIRCGKVNDKAQYLLG
AAGSVPYRWINLEYDKITRIVGLDQYLESVKKHKRLDVCRAKMGYMLQ.

[0075] Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo de UL128 compreende uma sequência de aminoácido que possui 100% de identidade com a SEQ ID NO: 4.

[0076] UL130 é o gene central e o maior (214 códons) da posição UL131A-128. A translação conceitual do gene prediz uma sequência de sinal N-terminal longa (25 aminoácidos) que precede uma proteína hidrófila contendo dois potenciais sítios de glicosilação ligados a N (Asn85 e Asn118) dentro de um domínio putativo de quimiocina (aminoácidos 46 a 120) e um sítio adicional de N-glicosilação (Asn201) próximo à extremidade de uma região C-terminal exclusiva. Prevê-se que o UL130 carece de um domínio TM.

[0077] Foi relatado de ser uma glicoproteína luminal secretada de forma ineficaz a partir das células infectadas, mas é incorporada ao envoltório do vírion como uma forma amadurecida por Golgi (Patrone, *et al.*: "Human Cytomegalovirus UL130 Protein Promotes Endothelial Cell Infection through a Producer Cell Modification of the Virion.", *Journal of Virology* 79 (2005): 8361-8373).

[0078] De acordo com uma modalidade, o polipeptídeo de UL130 no complexo pentamérico aqui descrito compreende uma sequência de aminoácido que possui pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 5. Em particular, o antígeno de UL130 compreende uma sequência de aminoácido que possui pelo menos 85% identidade, pelo menos 90% de identidade, pelo menos 95% de identidade, pelo menos 97% de identidade, pelo menos 98% de identidade, pelo menos 99% de identidade ou mesmo 100% de identidade com a SEQ ID NO: 5:

SPWSTLTANQNPSPLWSKLTYSKPHDAATFYCPFIYPSPPRSPLQFSG
FQRVLTGPECRNETLYLLYNREGQTLVERSSTWVKKVIWYLSGRNQTI
LQRMPRTASKPSDGNVQISVEDAKIFGAHMPKQTKLLRFVNDGTRY
QMCVMKLESWAHVFRDYSVSFQVRLTFTEANNQTYTFCTHPNLIV.

[0079] Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo de UL130 compreende uma sequência de aminoácido que possui 100% de identidade com a SEQ ID NO: 5.

[0080] A função de UL131, também chamada UL131A, é necessá-

ria para a replicação do HCMV não apenas nas células endoteliais, mas também nas células epiteliais. De acordo com uma modalidade, o polipeptídeo de UL131A no complexo pentamérico aqui descrito compreende uma sequência de aminoácido que possui pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 6. Em particular, o antígeno de UL131A compreende uma sequência de aminoácido que possui pelo menos 85% identidade, pelo menos 90% de identidade, pelo menos 95% de identidade, pelo menos 97% de identidade, pelo menos 98% de identidade, pelo menos 99% de identidade ou mesmo 100% de identidade com a SEQ ID NO: 6:

QCQRETAEKNDYYRVPHYWDACSRALPDQTRYKYVEQLVDLTNLNYH
YDASHGLDNFDVLKRINVTEVSLLISDFRRQNRGGTNKRTTFNAAG
SLAPHARSLEFSVRLFAN.

[0081] Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo de UL131 compreende uma sequência de aminoácido que possui 100% de identidade com a SEQ ID NO: 6. As SEQ ID NOs: 2 a 6 são da cepa BE/28/2011 (Genbank ID KP745669, Kremkow *et al.*, 2015).

[0082] Na parte do antígeno complexo pentamérico da composição imunogênica da invenção, gH, gL e UL128 podem ser ligados por meio de ligações dissolúveis, mas UL130 e UL131A podem ser incorporados ao complexo pentamérico por interações não covalentes. Por exemplo, a proteína UL130 e/ou a proteína UL131A é incorporada no complexo pentamérico por interações não covalentes. Além disso, a proteína UL130 e/ou a proteína UL131A podem ser interligadas por interações não covalentes.

[0083] Uma faixa de epitopos conformacionais para o complexo pentamérico é conhecida. Por exemplo, Macagno (Macagno *et al.*: "Isolation of human monoclonal antibodies that potently neutralize human cytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex.", *Journal of Virology* 84 (2010): 1005-13)

isolou um painel de anticorpos monoclonais humanos que neutralizam a infecção por HCMV de células endoteliais, epiteliais e mielóides. Em uma modalidade, a parte do antígeno do complexo pentamérico da composição imunogênica da invenção possui um ou mais dos epítopos conformacionais identificados por Macagno (2010).

[0084] Cada proteína do antígeno do complexo pentamérico pode conter mutações, tais como inserções, eliminações e substituições, contanto que essas mutações não sejam prejudiciais ao uso das proteínas como antígenos. Além disso, essas mutações não devem impedir a capacidade das proteínas de formar um complexo pentamérico de acordo com a invenção. A capacidade de formar um complexo pentamérico da invenção pode ser testada através de execução da purificação de proteínas e da análise das proteínas por PAGE não redutora, Western blot e/ou cromatografia de exclusão por tamanho. Se as proteínas fazem parte de um complexo, todas elas podem estar presentes em uma única faixa em um gel PAGE nativo e/ou estar presentes em um pico isolado em um cromatograma de exclusão por tamanho.

[0085] A expressão de dito complexo pentamérico pode ser realizada de acordo com os métodos conhecidos pela pessoa versada na técnica. É possível mencionar, por exemplo, o método descrito em Hoffmann *et al.* (Biotechnology and Bioengineering, 2015).

[0086] Os sistemas de expressão adequados para uso no contexto da presente invenção são bem conhecidos da pessoa versada na técnica e muitos são descritos com detalhes em Doyle (Doyle, ed. High Throughput Protein Expression and Purification: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology). Humana Press, 2008). Geralmente, qualquer sistema ou vetor que seja adequado para manter, propagar e expressar moléculas de ácido nucleico para produzir um polipeptídeo no hospedeiro requerido pode ser utilizado. A sequência de nucleotídeo apropriada pode ser inserida em um sistema de expressão

por qualquer uma de várias técnicas bem conhecidas e de rotina, tais como, por exemplo, aquelas descritas em Sambrook (Sambrook, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000). Geralmente, o gene de codificação pode ser colocado sob o controle de um elemento de controle, tal como um promotor e, opcionalmente, um operador, de modo que a sequência de DNA que codifica o peptídeo desejado seja transcrita no RNA na célula hospedeira transformada. Exemplos de sistemas de expressão adequados incluem, por exemplo, sistemas cromossômicos, epissomais e derivados de vírus, incluindo, por exemplo, vetores derivados de: plasmídeos bacterianos, bacteriófagos, transpósons, epissomas de levedura, elementos de inserção, elementos cromossômicos de levedura, vírus tais como baculovírus tais como descrito no pedido de patente WO2015170287, papovavírus tais como SV40, vírus vaccinia, adenovírus, vírus da varíola, vírus da pseudorraiva e retrovírus, ou suas combinações, tais como aqueles derivados de elementos genéticos de plasmídeo e bacteriófago, incluindo cosmídeos e fagídeos. Os cromossomos artificiais humanos (HACs) também podem ser empregados para fornecer fragmentos de DNA maiores do que podem ser contidos e expressos em um plasmídeo.

[0087] Para expressar as cinco proteínas recombinantes diferentes do antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 simultaneamente e de maneira equimolar, existem várias possibilidades. Uma primeira possibilidade (1) para a parte do antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 da composição imunogênica da presente invenção é construir um único vetor contendo todas as cinco ORFs sob o controle dos mesmos ou semelhantes elementos reguladores (promotor, intensificador, sinal de junção, sinal de terminação...) e, opcionalmente, um sistema de seleção para a seleção da linhagem celular. O vetor pode conter cinco casse-

tes de expressão (por exemplo, como descrito em Albers *et al.*, J. Clin. Invest., 2015, 125(4): 1603-1619; ou em Cheshenko *et al.*, Gene Ther., 2001, 8(11): 846-854), ou os cinco componentes (gH, gL, UL128, UL130 e UL131) podem ser fundidos em uma única ORF com elementos que acionam a própria maturação adequada da poliproteína nas cinco proteínas do antígeno do complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 (por exemplo, sequências autocliváveis como descrito em Szymczak-Workman *et al.*, Cold Spring Harb. Protoc., 2012, 2012 (2): 199-204). Nesse segundo caso, a equimolaridade é garantida, assumindo que toda a clivagem ocorra corretamente. Outra possibilidade (2) para a parte de antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 da composição imunogênica da presente invenção é construir cinco vetores cada um expressando um componente do antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 e, opcionalmente, um sistema de seleção para seleção da linhagem celular. Os cinco vetores são co-transfectados na linhagem celular alvo. Qualquer sistema intermediário entre a possibilidade (1) e a possibilidade (2) também pode ser projetado para minimizar o número de vetores requeridos e manter cada vetor em um tamanho razoável (menor do que 12 kb, por exemplo).

[0088] Sistemas de expressão adequados incluem microrganismos tais como bactérias transformadas com bacteriófagos recombinantes, vetores de expressão de DNA plasmídico ou cosmídeo; levedura transformada com vetores de expressão de levedura; sistemas de células de inseto infectadas ou transfectadas com vetores de expressão de vírus (por exemplo, baculovírus, tal como descrito no pedido de patente WO2015170287); sistemas de células vegetais transformados com vetores de expressão de vírus (por exemplo, vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou com vetores de expressão bacteriana (por exemplo, plasmídeos Ti ou pBR322); ou

sistemas de células animais. Os sistemas de translação sem células também podem ser empregados para produzir as proteínas.

[0089] Exemplos de sistemas adequados de expressão genética celular vegetal incluem aqueles descritos na Patente US 5.693.506; Patente US 5.659.122; Patente US 5.608.143 e Zenk (1991): "Chasing the enzymes of secondary metabolism: Plant cell cultures as a pot of gold." *Phytochemistry*, 30(12), pp 3861-3863. Zess NaukUMK Tornu, 13: 253-256. Em particular, todas as plantas das quais os protoplastos podem ser isolados e cultivados para dar plantas regeneradas inteiras podem ser utilizadas, de modo que plantas inteiras são recuperadas e contêm o gene transferido. Praticamente todas as plantas podem ser regeneradas a partir de células ou tecidos cultivados, incluindo, mas não limitadas a estas, todas as principais espécies de cana-de-açúcar, beterraba, algodão, frutas e outras árvores, legumes e hortaliças.

[0090] As células HEK293 são adequadas para expressão transitória das proteínas do HCMV do complexo pentâmero de acordo com a invenção devido à sua alta capacidade de transfecção por várias técnicas, incluindo os métodos de fosfato de cálcio e polietilenimina (PEI). Uma linhagem celular útil de HEK293 é aquela que expressa a proteína EBNA1 do EBV, tal como a 293-6E (Loignon, et al.: "Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN α 2b in HEK293 cells.", *BMC Biotechnology* 8 (2008): 65). As células HEK293 transformadas foram mostradas de secretar altos níveis da proteína no meio de crescimento, permitindo assim a purificação de tais complexos de proteínas diretamente do meio de crescimento.

[0091] As células de CHO são hospedeiras de mamífero particularmente adequadas para a produção industrial das proteínas do HCMV e, em particular, para a produção industrial do antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131, parte da composição imunogênica de acordo com a invenção.

[0092] A transfecção pode ser realizada por uma variedade de métodos bem conhecidos na técnica, incluindo o uso de fosfato de cálcio, eletroporação, ou através da mistura de um lipídio catiônico com o material para produzir lipossomos que se fundem com a membrana celular e depositam sua carga no interior.

[0093] Os métodos para purificar proteínas recombinantes do sobrenadante celular ou de corpos de inclusão são bem conhecidos na técnica. Em particular, a parte do antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 da composição imunogênica de acordo com a invenção pode ser purificada por cromatografia de exclusão por tamanho.

[0094] Em particular, a composição imunogênica de acordo com a invenção não compreende um vírus HCMV.

[0095] Em particular, a composição imunogênica de acordo com a invenção é uma composição imunogênica como aqui descrita, em que o HCMV gB e o complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 são os únicos antígenos do HCMV.

Adjuvante indutor de Th1

[0096] "Adjuvante", como aqui utilizado, possui o significado comumente conhecido por uma pessoa versada na técnica. Em particular, refere-se a agentes ou substâncias que modulam a imunogenicidade de um antígeno. "Modular a imunogenicidade" inclui aumentar a magnitude e/ou duração de uma resposta imune gerada por um antígeno. Mais especificamente, os adjuvantes também podem ser classificados de acordo com o tipo de resposta imune que induzem na presença do antígeno. Os adjuvantes que podem ser utilizados em uma composição imunogênica de acordo com a invenção são adjuvantes indutores de Th1.

[0097] Um adjuvante "indutor de Th1" pode ser definido como um adjuvante que intensifica a resposta de Th1 a um antígeno ou a uma

combinação de antígenos.

[0098] Uma resposta imune pode ser amplamente dividida em duas categorias extremas, sendo uma resposta imune humoral ou mediada por células (tradicionalmente caracterizada por mecanismos de proteção de anticorpos e efetores celulares, respectivamente). Essas categorias de resposta foram denominadas respostas do tipo Th1 (resposta mediada por células) e respostas imunes do tipo Th2 (resposta humoral). Em camundongos, as respostas do tipo Th1 são frequentemente caracterizadas pela geração de anticorpos do subtipo IgG2a ou IgG2c (dependendo da cepa do camundongo), enquanto que em seres humanos podem corresponder aos anticorpos do tipo IgG1 e IgG3. As respostas imunes do tipo Th2 são caracterizadas pela geração de uma ampla faixa de isótipos de imunoglobulina, incluindo em camundongos IgG1, IgA e IgM. As respostas imunes do tipo Th1 e do tipo Th2 também são caracterizadas por diferentes padrões de secreção de citocinas (Mosmann *et al.*, Annual Review of Immunology, 1989, 7: 145-173; Constant *et al.*, Annual Review of Immunology, 1997, 15: 297-322). Uma resposta imune do tipo Th1 está associada a um aumento da produção de citocinas IFN- γ e/ou IL-2 pelos linfócitos T, enquanto uma resposta imune do tipo Th-2 está associada ao aumento da produção de citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e/ou IL-10. A distinção das respostas imunes do tipo Th1 e Th2 não é absoluta. Na realidade, um indivíduo irá sustentar uma resposta imune que é descrita como sendo predominantemente Th1 ou predominantemente Th2. Tradicionalmente, os melhores indicadores do equilíbrio Th1:Th2 da resposta imune após uma vacinação ou infecção incluem a medição direta da produção de citocinas Th1 ou Th2 por linfócitos T *in vitro* após estimulação com antígeno e/ou a medição (pelo menos em camundongos) da relação de IgG1:IgG2a,c de respostas de anticorpos específicos do antígeno.

[0099] Da mesma forma, no escopo da composição imunogênica de acordo com a invenção, um adjuvante que induz predominantemente uma resposta imune do tipo Th1 é considerado como um adjuvante indutor de Th1. De preferência, os adjuvantes que podem ser utilizados em uma composição imunogênica de acordo com a invenção induzem predominantemente uma resposta imune do tipo Th1.

[00100] Como mencionado anteriormente, isso pode ser determinado pela medição da relação de IgG1:IgG2a,c em camundongos. Um aumento de INF- γ é um indicador adicional de resposta Th1 predominante. De preferência, uma produção reduzida de IL-5 é observada.

[00101] De preferência, os adjuvantes indutores de Th1 que podem ser utilizados na composição imunogênica de acordo com a invenção compreendendo um antígeno de HCMV gB e um antígeno complexo do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 induzem um perfil de resposta mais tendencioso para Th1 do que MF59 em uma composição compreendendo o mesmo antígeno de HCMV gB e o mesmo antígeno complexo do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131.

[00102] MF59 é uma emulsão de óleo-em-água à base de esqualeno descrita no pedido de patente WO90/14837, Patentes US Nos. 6.299.884 e 6.451.325, e em Ott *et al.*, "MF59 -- Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines" in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Powell, M.F. and Newman, M.J. eds.) Plenum Press, New York, 1995, pp. 277-296).

[00103] Em particular, os adjuvantes indutores de Th1 que podem ser utilizados na composição imunogênica de acordo com a invenção compreendendo um antígeno de HCMV gB e um antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 induzem uma relação mais baixa de IgG1:IgG2a,c em camundongos do que a MF59 em uma composição compreendendo o mesmo antígeno de HCMV gB e o mesmo antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/

UL130/UL131.

[00104] Mais particularmente, os adjuvantes indutores de Th1 que podem ser utilizados na composição imunogênica de acordo com a invenção compreendendo um antígeno de HCMV gB e um antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 induzem um nível de INF- γ mais alto em camundongos do que a MF59 em uma composição compreendendo o mesmo antígeno de HCMV gB e o mesmo antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131.

[00105] Ainda mais particularmente, os adjuvantes indutores de Th1 que podem ser utilizados na composição imunogênica de acordo com a invenção compreendendo um antígeno de HCMV gB e um antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131, induzem um nível mais baixo de IL-5 em camundongos do que a MF59 em uma composição compreendendo o mesmo antígeno HCMV gB e o mesmo antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131.

[00106] Ainda mais particularmente, os adjuvantes indutores de Th1 que podem ser utilizados na composição imunogênica de acordo com a invenção compreendendo um antígeno de HCMV gB e um antígeno do complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131, induzem uma relação mais baixa de IgG1:IgG2a,c e um nível mais elevado de INF- γ em camundongos do que a MF59 em uma composição compreendendo o mesmo antígeno de HCMV gB e o mesmo antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131.

[00107] Em particular, os adjuvantes indutores de Th1 que podem ser utilizados na composição imunogênica de acordo com a invenção compreendendo um antígeno de HCMV gB e um antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 induzem uma relação de IgG1:IgG2a,c mais baixa e um nível mais baixo de IL-5 em ca-

camundongos do que a MF59 em uma composição compreendendo o mesmo antígeno de HCMV gB e o mesmo antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131.

[00108] Mais particularmente, os adjuvantes indutores de Th1 que podem ser utilizados na composição imunogênica de acordo com a invenção compreendendo um antígeno de HCMV gB e um antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 induzem uma relação de IgG1:IgG2a,c mais baixa, um nível mais elevado de INF- γ e um nível mais baixo de IL-5 em camundongos do que a MF59 em uma composição compreendendo o mesmo antígeno de HCMV gB e o mesmo antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131.

[00109] Em particular, a composição imunogênica de acordo com a invenção é uma composição imunogênica que compreende:

- um antígeno de HCMV gB;
- um antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131; e
- um adjuvante indutor de Th1, em que dito adjuvante indutor de Th1 induz em camundongos uma relação mais baixa de IgG1:IgG2a,c e/ou um nível mais elevado de INF- γ e/ou um nível mais baixo de IL-5 do que a MF59 em uma composição compreendendo o mesmo antígeno de HCMV gB e o mesmo antígeno do complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131.

[00110] Em particular, o adjuvante indutor de Th1 de acordo com a invenção compreende:

- um agonista de TLR-4; ou
- um sal polimérico de ácido poliacrílico linear ou ramificado com um peso molecular médio ponderado Mw na faixa de 350 a 650 kDa.

[00111] Em particular, uma composição imunogênica de acordo

com a invenção é uma composição imunogênica compreendendo:

- um antígeno de HCMV gB;
- um antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131; e
- um adjuvante indutor de Th1, em que dito adjuvante indutor de Th1 compreende:
 - um agonista de TLR-4 selecionado do grupo que consiste em um lipopolissacarídeo, um monofosforil lipídeo A (MPL), um monofosforil lipídeo A 3-de-O-acilado (3D-MPL), um adjuvante de glicopiranosil lipídico (GLA), um adjuvante lipídico de segunda geração (SLA), um dímero fosfolipídico conectado por uma cadeia principal não carboidrato e um fosfato de aminoalquil glucosaminida, ou um derivado deste; ou
 - um sal polimérico de ácido poliacrílico com um peso molecular médio ponderado Mw na faixa de 350 a 650 kDa.

[00112] Em uma modalidade, dito adjuvante indutor de Th1 compreende um agonista de TLR-4.

[00113] Um agonista de TLR (receptor do tipo toll) é entendido de significar um ligante natural de TLR, um imitador de ligante de TLR, um ligante de TLR sintético ou químico, uma célula ou partícula incluindo um padrão molecular associado aos patógenos, um patógeno microbiano, uma bactéria, um vírus e partícula do tipo viral.

[00114] O TLR4 (receptor tipo toll 4) é um receptor expresso por células apresentadoras de antígeno do sistema imunológico; ele está envolvido em mecanismos de defesa precoce contra infecções gram-bacterianas. O lipopolissacarídeo (LPS) das gram-bactérias é o ligante natural do TLR4; ativa o receptor, que desencadeia uma cascata de eventos bioquímicos, em particular a ativação do fator de transcrição Nf-Kappa B e a produção de citocinas pró-inflamatórias. A capacidade de um composto para estimular a via do TLR4 pode ser avaliada por

métodos conhecidos por aqueles versados na técnica, como descrito, por exemplo, no Journal of Biological Chemistry, (2001), vol 276(3), page 1873-1880.

[00115] Exemplos de agonistas de TLR4 incluem monofosforil lipídeo A (MPL), ou um derivado do mesmo, particularmente monofosforil lipídeo A 3-de-O-acilado (3D-MPL), como descrito na GB2211502 ou na US4912094, ou um derivado destes, dissacarídeo hexaacila fosforilado também chamado adjuvante de glucopiranosil lipídeo ou GLA (número CAS 1246298-63-4) ou um seu derivado, adjuvante lipídico de segunda geração (SLA), tal como descrito em Carter *et al.*, Clin. Transl. Immunology, 2016, 5(11):e108 ou EP2437753 ou US9480740, ou seu derivado, fosfatos de aminoalquil glucosaminida (AGPs), como descrito na WO 98/50399 ou na WO 01/034617, ou um derivado destes, em particular RC529 descrito na US 6.113.918, ou seu derivado, e compostos químicos ou um dímero fosfolipídico (homodímero ou heterodímero) conectado por uma cadeia principal não carboidrato, conforme descrito na US 2003/0153532 ou na US 2005/0164988, ou seu derivado, em particular os compostos identificados e exemplificados na US 2003/0153532 com os seguintes nomes: ER803022 (número CAS: 287180-56-7), ER803058 (número CAS: 287180-57-8), ER803732 (número CAS: 287106-29-0), ER803789 (número CAS: 287180-61-4), ER804053 (número CAS: 287180-62-5), ER804057 (número CAS: 287180-63-6), ER804058 (número CAS: 287180-65-8), ER804059 (número CAS: 287180-64-7), ER 8044442 (número CAS: 287180-78-3), ER 804764 (número CAS: 287180-87-4), ER111232 (número CAS: 287180-48-7), ER112022 (número CAS: 287180-46-5), ER112048 (número CAS: 287106-02-9), ER112065 (número CAS: 287180-49-8), ER112066 (número CAS: 287180-50-1), ER113651 (número CAS: 287180-51-2), ER118989 (número CAS: 287180-52-3), ER119327 (número CAS: 287180-54-5) e ER119328 (número CAS: 287180-55-

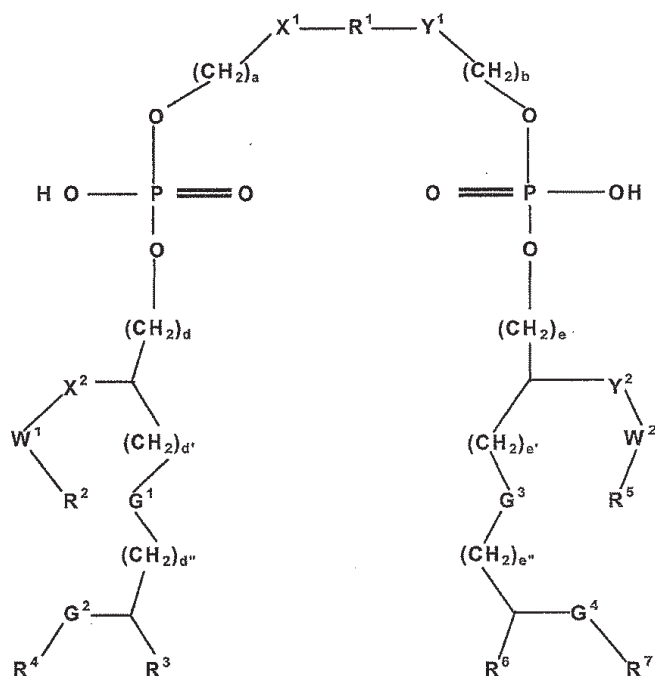
6), ou um derivado destes. Estes compostos possuem de uma forma geral um ou vários carbonos assimétricos. Quando esses compostos possuem um ou vários carbonos assimétricos, eles podem ser utilizados como uma mistura de isômeros ópticos ou sob a forma de um isômero específico.

[00116] Em particular, o referido agonista do TLR-4 é selecionado de um dímero fosfolipídico conectado por uma cadeia principal não carboidrato e um agonista do GLA TLR-4.

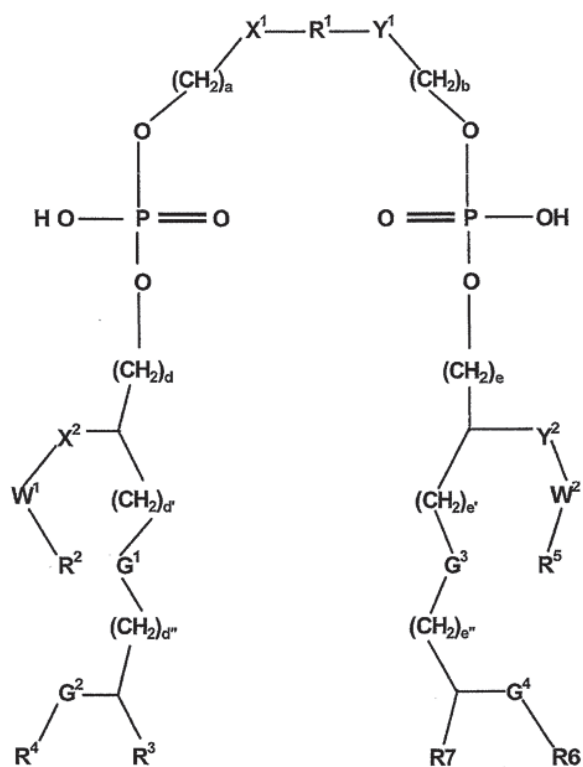
[00117] Em particular, o agonista do TLR4 é um dímero fosfolipídico conectado por uma cadeia principal não carboidrato.

[00118] Em particular, o agonista do TLR4 é um composto químico ou um dímero fosfolipídico conectado por uma cadeia principal não carboidrato de fórmula I, II, III ou IV:

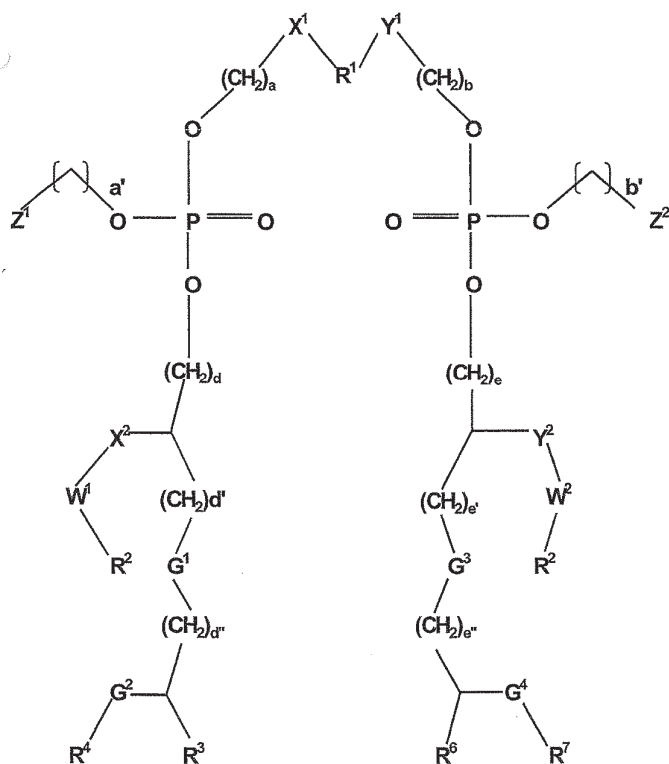
Composto ou dímero fosfolipídico conectado por uma cadeia principal não carboidrato de fórmula I



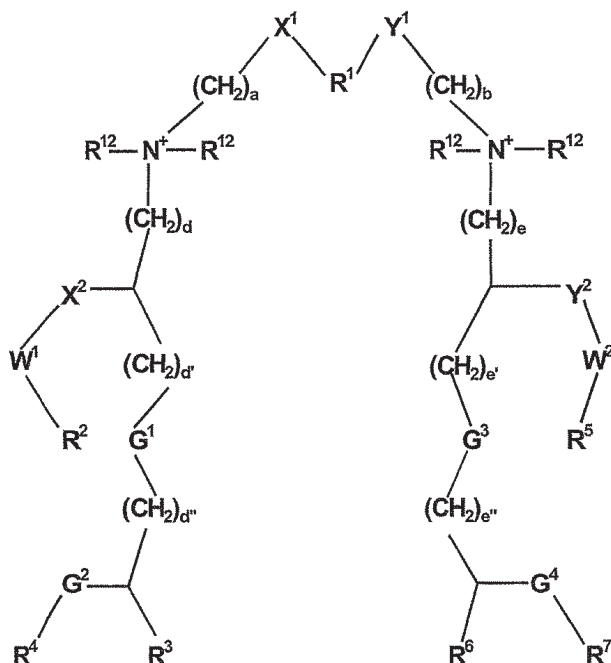
Composto ou dímero fosfolipídico conectado por uma cadeia principal não carboidrato de fórmula II



Composto ou dímero fosfolipídico conectado por uma cadeia principal não carboidrato de fórmula III



Composto ou dímero fosfolipídico conectado por uma cadeia principal não carboidrato de fórmula IV



em que, para cada fórmula I, II, III ou IV, R¹ é selecionado do grupo que consiste em:

- a) C(O);
- b) C(O)-(C₁-C₁₄ alquil)-C(O), em que dita C₁-C₁₄ alquila é opcionalmente substituída com uma hidroxila, um C₁-C₅ alcóxi, um C₁-C₅ alquilenodióxi, um (C₁-C₅ alquil)amino ou uma (C₁-C₅ alquil)arila, em que dita porção de arila de dita (C₁-C₅ alquil)arila é opcionalmente substituída com um C₁-C₅ alcóxi, um (C₁-C₅ alquil)amino, um (C₁-C₅ alcóxi)amino, um (C₁-C₅ alquil)amino(C₁-C₅ alcóxi), -O-(C₁-C₅ alquil)amino (C₁-C₅ alcóxi), -O-(C₁-C₅ alquil)amino-C(O)-(C₁-C₅ alquil)-C(O)OH, ou -O-(C₁-C₅ alquil)amino-C(O)-(C₁-C₅ alquil)-C(O)-(C₁-C₅) alquila;
- c) uma alquila compreendendo uma cadeia linear ou ramificada C₂-C₁₅, opcionalmente substituída com uma hidroxila ou um alcóxi; e

d) $-C(O)-(C_6-C_{12} \text{ arileno})-C(O)-$ em que dito arileno é opcionalmente substituído com uma hidroxila, um halogênio, um nitro ou um amino;

a e b são independentemente 0, 1, 2, 3 ou 4;

d, d', d'', e, e' e e'' são independentemente 0, 1, 2, 3 ou 4;

X^1 , X^2 , Y^1 e Y^2 são independentemente selecionados do grupo que consiste em nulo, um oxigênio, NH e N ($C(O)(C_1-C_4 \text{ alquila})$), e $N(C_1-C_4 \text{ alquila})$;

W^1 e W^2 são independentemente selecionados do grupo que consiste em uma carbonila, um metileno, uma sulfona e um sulfóxido;

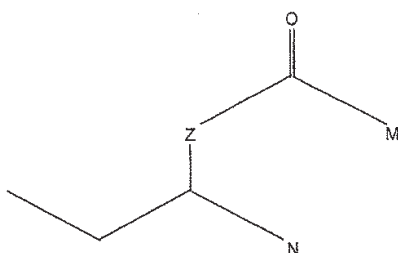
R^2 e R^5 são independentemente selecionados do grupo que consiste em:

a) uma C_2 a C_{20} alquila de cadeia reta ou cadeia ramificada, que é opcionalmente substituída com um oxo, uma hidroxila ou um alcóxi;

b) uma C_2 a C_{20} alquenila ou dialquenila de cadeia reta ou cadeia ramificada, que é opcionalmente substituída com um oxo, uma hidroxila ou um alcóxi;

c) um C_2 a C_{20} alcóxi de cadeia reta ou cadeia ramificada, que é opcionalmente substituída com um oxo, uma hidroxila ou um alcóxi;

d) $NH-(C_2 \text{ a } C_{20} \text{ alquila de cadeia reta ou cadeia ramificada})$, em que dito grupo alquila é opcionalmente substituído com um oxo, um hidróxi ou um alcóxi; e



em que Z é selecionado do grupo que consiste em um O e NH, e M e N são independentemente selecionados do grupo que consiste em uma alquila, uma alquenila, um alcóxi, um acilóxi, um alquilamino e um acilamino compreendendo uma C₂-C₂₀ cadeia linear ou ramificada;

R³ e R⁶ são independentemente selecionados do grupo que consiste em uma C₂ a C₂₀ alquila ou alquenila de cadeia reta ou cadeia ramificada, opcionalmente substituída com um oxo ou um fluoro;

R⁴ e R⁷ são independentemente selecionados do grupo que consiste em uma C(O)-(C₂ a C₂₀ alquila ou alquenila de cadeia reta ou cadeia ramificada), uma C₂ a C₂₀ alquila de cadeia reta ou cadeia ramificada, um C₂ a C₂₀ alcóxi de cadeia reta ou cadeia ramificada, e uma C₂ a C₂₀ alquenila de cadeia reta ou cadeia ramificada; em que ditos grupos alquila, alquenila ou alcóxi podem ser independente e opcionalmente substituídos com uma hidroxila, um fluoro ou um C₁-C₅ alcóxi;

G₁, G₂, G₃ e G₄ são independentemente selecionados do grupo que consiste em um oxigênio, um metileno, um amino, um tiol, -C(O)NH-, -NHC(O)-, e -N(C(O)(C₁-C₄ alquil))-;

ou G²R⁴ ou G⁴R⁷ podem ser em conjunto um átomo de hidrogênio ou uma hidroxila;

e em que, para a fórmula III:

a' e b' são independentemente 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, de preferência 2;

Z¹ é selecionados do grupo que consiste em -OP(O)(OH)₂, -P(O)(OH)₂, -OP(O)(OR⁸)(OH) onde R⁸ é uma C₁-C₄ cadeia de alquila, -OS(O)₂OH, -S(O)₂OH, -CO₂H, -OB(OH)₂, -OH, -CH₃, -NH₂ e -NR⁹₃ onde R⁹ é uma C₁-C₄ cadeia de alquila;

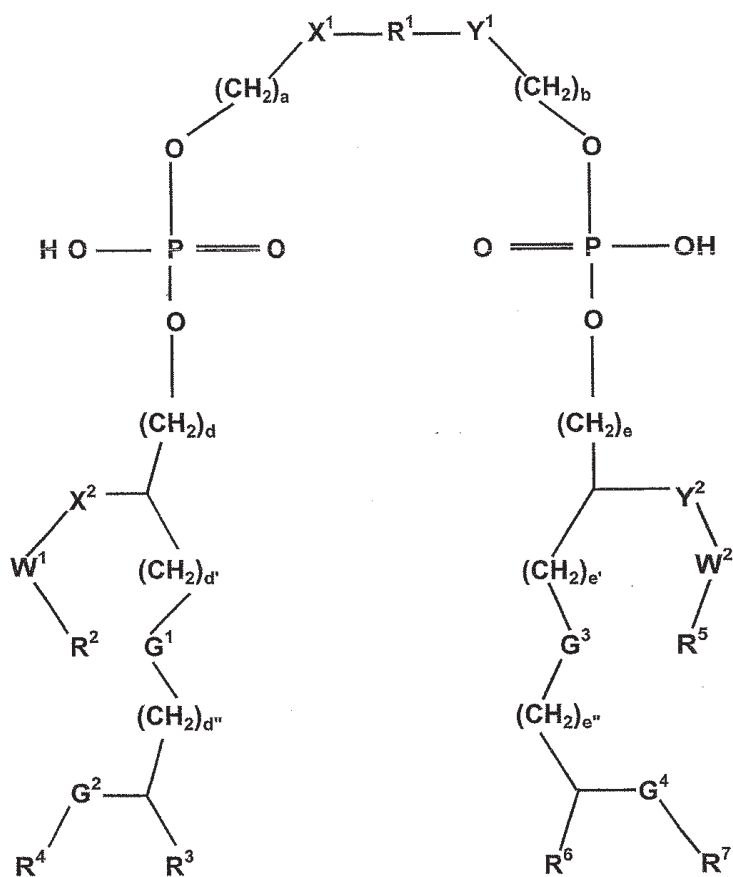
Z² é selecionado do grupo que consiste em -OP(O)(OH)₂, -P(O)(OH)₂, -OP(O)(OR¹⁰)(OH) onde R¹⁰ é uma C₁-C₄ cadeia de alquila, -OS(O)₂OH, -S(O)₂OH, -CO₂H, -OB(OH)₂, -OH, -CH₃, -NH₂ e -NR¹¹ onde R¹¹ é uma C₁-C₄ cadeia de alquila;

e em que, para a fórmula IV:

R^{12} é H ou uma C_1 - C_4 cadeia de alquila;

ou um sal farmaceuticamente aceitável do composto ou do dímero fosfolipídico conectado por uma cadeia principal não carboidrato de fórmula I, II, III ou IV.

[00119] Em particular, o agonista de TLR4 de acordo com a invenção é um composto químico ou dímero fosfolipídico conectado por uma cadeia principal não carboidrato de fórmula I,



ou um sal farmaceuticamente aceitável deste composto ou dímero fosfolipídico conectado por uma cadeia principal não carboidrato.

[00120] Preferivelmente,

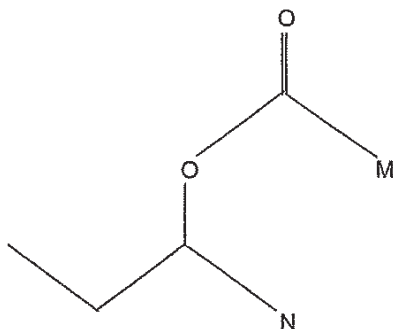
R^1 é $C(O)$ ou $C(O)-(CH_2)_n-C(O)$, n sendo 1, 2, 3 ou 4,

a , b , d , d' , d'' , e , e' e e'' são independentemente 1 ou 2,

X_1 , X_2 , Y_1 e Y_2 são NH ,

W_1 e W_2 são $C(O)$,

R^2 e R^5 são independentemente selecionados do grupo que consiste em uma C_{10} - C_{15} alquila de cadeia reta opcionalmente substituída com um oxo, uma NH -(C_{10} - C_{15} alquila de cadeia reta), e



em que M e N são independentemente uma C_2 a C_{20} alquila ou alquênica de cadeia reta,

R_3 e R_6 são C_5 - C_{10} alquilas de cadeia reta,

R_4 e R_7 são selecionados do grupo que consiste em um hidrogênio, $C(O)$ -(C_8 - C_{12} alquila de cadeia reta) ou $C(O)$ (C_8 - C_{12} alquênica de cadeia reta),

G_1 e G_3 são um oxigênio ou $-NH(CO)-$,

G_2 e G_4 são um oxigênio.

[00121] Em particular, o agonista de TLR4 de acordo com a invenção é um dímero fosfolipídico simétrico (homodímero) conectado por uma cadeia principal não carboidrato. Mais particularmente, o dímero fosfolipídico simétrico conectado por uma cadeia principal não carboidrato é um dímero de um triacil fosfolipídeo. Mais particularmente, o referido agonista do TLR-4 é E6020 (número CAS: 287180-63-6).

[00122] Em particular, dito agonista do TLR-4 é GLA (número CAS 1246298-63-4).

[00123] Esses agonistas de TLR4 também podem ser combinados com um sistema de liberação tal como fosfato de cálcio, lipossomas, virossomas, ISCOMs, micro e nanopartículas ou emulsões.

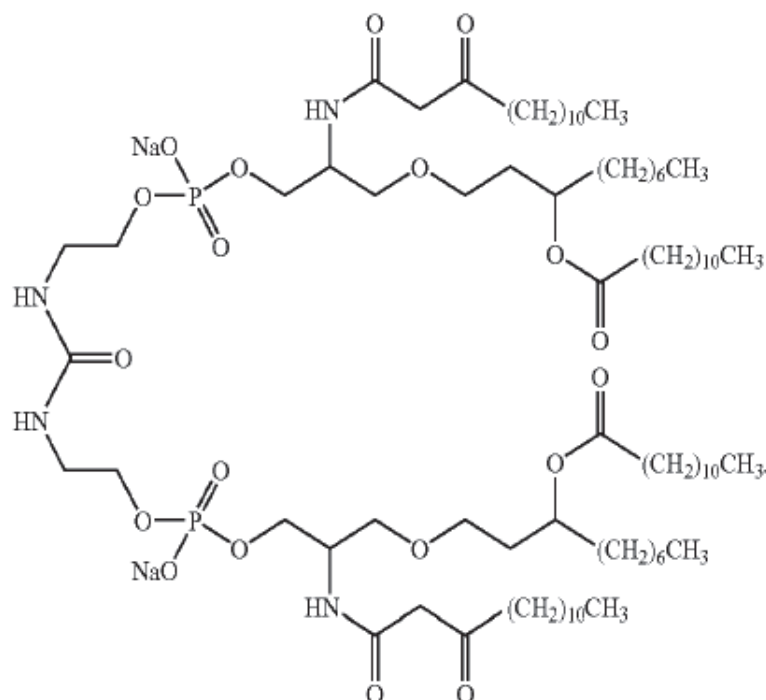
[00124] Como tal, em particular, o agonista de TLR4 de acordo com a invenção está em combinação com um sistema de liberação, tal como nanossuspensão aquosa, fosfato de cálcio, lipossomas, virosso-

mas, ISCOMs, micro e nanopartículas ou emulsões.

[00125] Tais sistemas de liberação foram descritos anteriormente e são bem conhecidos pela pessoa versada na técnica.

[00126] Em particular, dito agonista do TLR-4 é selecionado entre E6020 (número CAS: 287180-63-6) e um agonista do GLA TLR-4 (número CAS 1246298-63-4).

[00127] Como um exemplo de formulação adequada de um agonista de TLR4 combinado com um sistema de liberação, pode-se citar uma emulsão de óleo-em-água compreendendo como agonista de TLR4 o composto ER 804057 (agora chamado E6020) (número CAS: 287180-63-6), que é o sal dissódico do composto tendo a seguinte fórmula química:



[00128] Os quatro carbonos assimétricos do E6020 estão todos na configuração R (R,R,R,R). Essa emulsão pode ser obtida, por exemplo, por técnicas de microfluidização, como descrito na WO 2004/060396 ou por um processo de temperatura de inversão de fase (processo PIT), como descrito na WO 2007/080308.

[00129] Como tal, em particular, o agonista de TLR4 de acordo com

a invenção está em combinação com uma emulsão de óleo-em-água, mais particularmente, uma emulsão de óleo-em-água à base de esqualeno.

[00130] Uma emulsão de óleo-em-água adequada para o propósito da invenção compreende um óleo metabolizável (em que o volume de óleo representa 0,5 a 20% do volume total da emulsão (v/v), em particular 1 a 10% (v/v) e, mais particularmente, 1 a 5% (v/v)), uma solução aquosa (em que o volume da solução aquosa representa 80 a 99,5% do volume total (v/v), em particular 90 a 99% (v/v)) e um ou vários agentes emulsificantes (em que a quantidade total do agente emulsificante representa 0,001 a 5% da quantidade total da emulsão (p/p), em particular 0,001 a 2% (p/p), e mais particularmente de 0,01 a 2% (p/p)). O óleo metabolizável é geralmente aquele que possui cerca de 6 a cerca de 30 átomos de carbono, incluindo, mas não limitado, alcanos, alquenos, alquinos e seus ácidos e álcoois correspondentes, seus éteres e ésteres e suas misturas. O óleo pode ser essencialmente qualquer óleo vegetal, óleo de peixe, óleo animal ou óleo sinteticamente preparado que possa ser metabolizado pelo corpo do indivíduo humano ao qual as composições de emulsão serão administradas e que não seja substancialmente tóxico para o indivíduo. O óleo metabolizável pode ser um hidrocarboneto insaturado tendo de 20 a 40 carbonos ou um hidrocarboneto poliinsaturado ramificado tendo de 20 a 40 átomos de carbono, por exemplo, terpenóides. Um terpenóide insaturado conhecido como esqualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosaeno e seu análogo saturado, esqualano, são frequentemente preferidos. Os óleos de peixe, incluindo esqualeno e esqualano, são facilmente disponíveis de fontes comerciais ou podem ser obtidos por métodos conhecidos na técnica. Outro óleo comumente utilizado é o tocoferol. Quando uma composição inclui um tocoferol, qualquer um dos α , β , γ , δ , ϵ ou ξ tocoferóis pode ser utilizado, mas são preferidos

os α -tocoferóis. Um número substancial de agentes emulsificantes adequados (também referidos como tensoativos, detergentes e assim por diante) é utilizado nas ciências farmacêuticas, muitos dos quais são úteis na composição da emulsão da presente invenção, contanto que sejam suficientemente não tóxicos. Há vários agentes emulsificantes projetados especificamente e comumente utilizados em situações biológicas. Por exemplo, vários detergentes biológicos (tensoativos) são listados como tal pela Sigma Chemical. Esses tensoativos são divididos em quatro tipos básicos: aniônico, catiônico, zwitteriônico e não iônico.

[00131] Exemplos de detergentes aniônicos incluem ácido algínico, ácido caprílico, ácido cólico, ácido 1-decanossulfônico, ácido desoxicólico, ácido 1-dodecanossulfônico, N-lauroilsarcosina e ácido taurocólico.

[00132] Detergentes catiônicos incluem brometo de dodeciltrimetilamônio, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzildimetilhexadecilamônio, cloreto de cetilpiridínio, cloreto de metilbenzetônio e dodecil sulfato de 4-picolina.

[00133] Exemplos de detergentes zwitteriônicos incluem 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-l-propanossulfonato (geralmente abreviado CHAPS), 3-[(colamidopropil)dimetilammoniol]-2-hidróxi-l-propanossulfonato (geralmente abreviado CHAPSO), N-dodecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanossulfonato, fosfatidilcolina e liso-alfa-fosfatidilcolina.

[00134] Exemplos de detergentes não iônicos incluem decanoil-N-metilglucamida, éter dietileno glicol monopentílico, n-dodecil beta-D-glucopiranosídeo, poloxâmeros, condensados de óxido de etileno de álcoois graxos (por exemplo, aqueles vendidos sob o nome comercial Lubrol), éteres de polioxietileno de ácidos graxos (particularmente ácidos graxos C12-C20), ésteres de ácido graxo de polioxietileno sorbita-

no (por exemplo, vendidos sob o nome comercial Tween®) e ésteres de ácido graxo de sorbitano (por exemplo, vendidos sob o nome comercial Span®).

[00135] Um grupo particularmente útil de tensoativos são os tensoativos não iônicos à base de sorbitano. Estes tensoativos são tipicamente preparados por desidratação do sorbitol para fornecer 1,4-sorbitano, que é então reagido com um ou mais equivalentes de um ácido graxo. A porção substituída por ácido graxo pode ser ainda reagida com óxido de etileno para fornecer um segundo grupo de tensoativos.

[00136] Os tensoativos de sorbitano substituídos por ácido graxo são tipicamente produzidos pela reação de 1,4-sorbitano com um ácido graxo tal como ácido láurico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico ou um ácido graxo de cadeia longa semelhante para fornecer mono-éster de 1,4-sorbitano, sesquiéster de 1,4-sorbitano ou triéster de 1,4-sorbitano. Os nomes comuns para alguns desses tensoativos incluem, por exemplo, monolaurato de sorbitano, monopalmitato de sorbitano, monoestearato de sorbitano, mono-oleato de sorbitano, sesquioleato de sorbitano e trioleato de sorbitano. Esses tensoativos são disponíveis comercialmente sob os nomes SPAN® ou ARLACEL®. Os tensoativos SPAN® e ARLACEL® são lipofílicos e geralmente são solúveis ou dispersáveis em óleo. Eles também são solúveis na maioria dos solventes orgânicos. Na água são geralmente insolúveis, mas dispersíveis. Geralmente esses tensoativos terão um número de equilíbrio hidrófilo-lipofílico (HLB) entre 1,8 e 8,6. Esses tensoativos podem ser facilmente produzidos por meios conhecidos na técnica ou são comercialmente disponíveis.

[00137] Um grupo relacionado de tensoativos compreende monoésteres de polioxietileno sorbitano e triesters de polioxietileno sorbitano. Estes materiais são tipicamente preparados pela adição de óxido de

etileno a um monoéster ou triéster de 1,4-sorbitano. A adição de polioxietileno converte o tensoativo mono- ou triéster de sorbitano lipofílico em um tensoativo hidrófilo geralmente solúvel ou dispersível em água e solúvel em graus variáveis em líquidos orgânicos. Os tensoativos TWEEN® podem ser combinados, por exemplo, com um tensoativo de monoéster ou triéster de sorbitano relacionado para promover a estabilidade da emulsão. Os tensoativos TWEEN® geralmente possuem um valor de HLB que cai entre 9,6 e 16,7. Os tensoativos TWEEN® estão disponíveis comercialmente de vários fabricantes, por exemplo, ICI America's Inc., Wilmington, Del., sob a marca registrada ATLAS® surfactants.

[00138] Outro grupo de tensoativos não iônicos que podem ser utilizados isoladamente ou em conjunto com os tensoativos SPAN®, ARLACEL® e/ou TWEEN® são os ácidos graxos de polioxietileno produzidos pela reação do óxido de etileno com um ácido graxo de cadeia longa. O tensoativo mais comumente disponível deste tipo é sólido sob o nome MYRJ® e é um derivado de polioxietileno de ácido esteárico. Os tensoativos MYRJ® são hidrófilos e solúveis ou dispersíveis em água, como os tensoativos TWEEN®. Os tensoativos MYRJ® podem ser misturados, por exemplo, com os tensoativos TWEEN® ou com TWEEN®/SPAN® ou com misturas de tensoativo ARLACEL® para uso na formação de emulsões. Os tensoativos MYRJ® podem ser produzidos por métodos conhecidos na técnica ou são disponíveis comercialmente na ICI America's Inc.

[00139] Outro grupo de tensoativos não iônicos à base de polioxietileno são os éteres de ácido graxo de polioxietileno derivados dos álcoois laurílico, acetílico, estearílico e oleílico. Estes materiais são tipicamente preparados como acima pela adição de óxido de etileno a um álcool graxo. O nome comercial desses tensoativos é BRIJ®; os tensoativos BRIJ® podem ser hidrófilos ou lipofílicos, dependendo do ta-

manho da porção de polioxietileno no tensoativo. Embora a preparação desses compostos esteja disponível na técnica, eles também estão facilmente disponíveis de tais fontes comerciais como a ICI America's Inc.

[00140] Outros tensoativos não iônicos que podem ser utilizados na prática desta invenção são, por exemplo: polioxietilenos, ésteres de ácidos graxos poliols, éteres de polioxietileno, éteres graxos de polioxipropileno, derivados de cera de abelha contendo polioxietileno, derivados de polioxietileno lanolina, glicerídeos graxos de polioxietileno, ésteres de ácido graxo glicerol ou outros álcoois de ácido polioxietileno ou derivados de éter de ácidos graxos de cadeia longa de 12 a 22 átomos de carbono. De preferência, o éter polioxietileno alquílico é selecionado do grupo que consiste em cetareth-12 (vendido sob o nome Eumulgin® B1), cetareth-20 (Eumulgin® B2), estareth-21 (Eumulgin® S21), ceteth-20 (Simulsol® 58 ou Brij® 58), ceteth-10 (Brij® 56), estareth-10 (Brij® 76), estareth-20 (Brij® 78), oleth-10 (Brij® 96 ou Brij® 97) e oleth-20 (Brij® 98 ou Brij® 99). O número atribuído para cada nome químico corresponde ao número de unidades de óxido de etileno na fórmula química. Em um aspecto particular, o éter polioxietileno alquílico é BRIJ® 56 ou éter polioxietileno cetostearílico (12), fornecido pela empresa Cognis sob o nome Eumulgin™ B1. Entre os tensoativos à base de éster de sorbitano e éster de mannide com um HLB menor do que 9 que são particularmente adequados, pode-se mencionar o mono-oleato de sorbitano vendido sob o nome Dehymuls SMOTM ou Span®80. Entre os surfactantes à base de éster de mannide, menção pode ser feita do mono-oleato de mannide vendido pela empresa Sigma ou pela empresa Seppic sob o nome Montanide 80™.

[00141] Dois ou mais tensoativos podem ser combinados na parte de emulsão da composição da presente invenção.

[00142] A solução aquosa da parte de emulsão O/A da composição

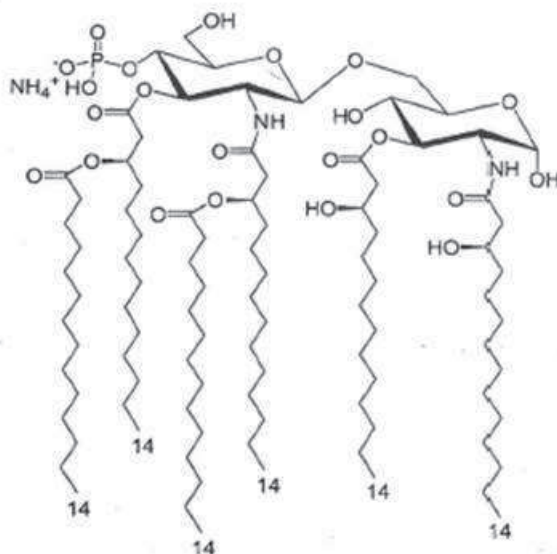
da presente invenção é solução salina tamponada ou água não adulterada. Visto que a composição da invenção se destina à administração parenteral, é preferível preparar soluções tamponadas finais utilizadas como vacinas, de modo que a tonicidade, isto é, osmolalidade, seja essencialmente a mesma que os fluidos fisiológicos normais, a fim de evitar inchaço pós-administração ou rápida absorção da composição devido às concentrações diferenciais de íons entre a composição e os fluidos fisiológicos. Também é preferível tamponar a solução salina para manter um pH compatível com as condições fisiológicas normais. Além disso, em certos casos, pode ser necessário manter o pH em um nível específico para garantir a estabilidade do antígeno gB e do antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131, se estiverem presentes na emulsão O/A.

[00143] Qualquer tampão fisiologicamente aceitável pode ser utilizado nesta invenção, mas são preferíveis tampões de fosfato. Outros tampões aceitáveis tais como acetato, tris, bicarbonato, carbonato, citrato ou similares, podem ser utilizados como substitutos dos tampões de fosfato. O pH do componente aquoso estará preferivelmente entre 6,0 e 8,0.

[00144] A parte de emulsão O/A da composição da presente invenção pode compreender componentes suplementares que podem ser adicionados no momento da preparação da emulsão O/A ou adicionados assim que a emulsão O/A estiver preparada.

[00145] Um exemplo pode ser fornecido de AF04, uma emulsão de óleo-em-água (O/W) à base de esqualeno que contém E6020, que foi obtida de acordo com o processo descrito na WO 2007/080308.

[00146] O agonista do GLA TLR-4 (Número CAS 1246298-63-4) é o composto tendo a seguinte fórmula química:



[00147] O GLA pode ser adquirido, por exemplo, no catálogo da Avanti Polar com a referência 699800 (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA).

[00148] Em particular, o GLA está em combinação com um sistema de liberação tal como fosfato de cálcio, lipossomas, virossomas, ISCOMs, micro e nanopartículas ou emulsões. Preferivelmente, o GLA está em combinação com uma emulsão de óleo-em-água, mais particularmente, uma emulsão de óleo-em-água à base de esqualeno.

[00149] Exemplo pode ser dado de GLA-SQEM, uma emulsão de óleo-em-água (O/W) à base de esqualeno que contém GLA.

[00150] Na Tabela 1 abaixo, a quantidade das diferentes matérias-primas utilizadas para obter 100 ml de GLA-SQEM com uma concentração de 10% de esqualeno é mencionada. A emulsão final contém 4% (v/v) de esqualeno (34 mg/ml) e 100 µg/ml de GLA, em 22,5 mM de fosfato de amônio.

Tabela 1

Preparação em 10% de esqualeno	% de Massa (p/v)	Quantidade para 100 ml	Referência
Fase aquosa (90%):			
Fosfato de Amônio 25 mM pH 6,1 qsp 90ml		87,7 ml	

Preparação em 10% de esqualeno	% de Massa (p/v)	Quantidade para 100 ml	Referência
Fase aquosa (90%):			
Poloxâmoro 188 (Pluronic F68)	0,09	90,0 mg	P5556 da SIGMA
Glicerol	2,25	2,25 g	24388238 Normapur da VWR Prolabo
Fase oleosa (10%)			
Esqualeno 10% v/v (85,6 mg/ml)	8,56	10,0 ml	1208076 da SOPHIM, redistilado para remover peróxidos
Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC)	1,9	1,90 g	850345P da Avanti Polar Lipids
GLA	0,025	25,0 mg	699800P da Avanti Polar Lipids

[00151] A fase oleosa é preparada por aplicação de energia sonora em um banho de 55 a 60°C. Em seguida, a fase aquosa é adicionada à fase oleosa (pesagem). Uma pré-emulsão é obtida após a homogeneização no Ultra Turrax T25 (IKA) em 9500 r/min, durante 2 ciclos de 30 segundos. Depois, a microfluidificação é feita no Emulsiflex C3 durante 20 passagens em uma pressão de ar de 55 psi (pressão de homogeneização entre 1450 e 1600 bar). A emulsão é então diluída 2,5 vezes em um tampão de fosfato de amônio 25 mM, para obter a emulsão GLA-SQEM final em 4% de esqualeno. A emulsão é filtrada estéril ao redor de 40°C com uma seringa de 10 ml e um filtro Acrodisc 0,8-0,2µm Supor Membrane (PALL n°PN4187).

[00152] Outros adjuvantes adequados que compreendem um agonista de TLR4 são AS01, que compreende 3D-MPL e QS21 em uma formulação lipossômica ou AS02, que compreende 3D-MPL e QS21 formulados em uma emulsão de óleo-em-água (Garçon et al., Exp. Rev. of Vaccines, 2007, 6(5):723-739, EP0671948).

[00153] Em uma modalidade, dito adjuvante indutor de Th1 compreende um sal de polímero de ácido poliacrílico linear ou ramificado com um peso molecular médio ponderado Mw na faixa de 350 a 650 kDa.

[00154] Dito polímero é um polímero linear ou ramificado de ácido poliacrílico, mas não é um polímero reticulado.

[00155] Por "polímero de ácido poliacrílico", entende-se um polímero que é composto exclusivamente de unidades de ácido acrílico. Assim, na forma de um sal, dito sal polimérico de ácido poliacrílico é composto exclusivamente de unidades correspondentes a um sal de ácido acrílico ou é composto exclusivamente de unidades correspondentes à forma de ácido livre do ácido acrílico e de unidades correspondentes a um sal de ácido acrílico.

[00156] Um polímero linear ou ramificado de ácido poliacrílico é obtido pela polimerização apenas do ácido acrílico como monômero. A polimerização é, na maioria das vezes, realizada através da polimerização radical, utilizando um agente oxidante como iniciador ou catalisador. Os agentes oxidantes mais utilizados são o persulfato (peroxi-dissulfato), por exemplo, persulfato de sódio ou potássio. Os polímeros de ácido poliacrílico ramificados são, por exemplo, descritos em *Macromolecules* 2011, 44, 5928–5936. Quando o polímero de acordo com a invenção é linear, sua inclinação de Mark Houwink é maior ou igual a 0,7 (Yan J.K., Pei J.J., Ma H.L., Wang Z.B. 2015. Effects of ultrasound on molecular properties, structure, chain conformation and degradation kinetics of carboxylic curdlan. *Carb. Polymers*. 121, 64-70).

[00157] O sal polimérico do ácido poliacrílico pode estar na forma sólida (precipitado ou em pó) ou de preferência em uma formulação líquida. Uma formulação líquida incluirá o sal polimérico de ácido poliacrílico e uma solução aquosa. De preferência, essa formulação possui um pH na faixa de 5,5 a 8,0. Este pH pode ser obtido pela incorporação de uma base, como NaOH, na solução aquosa. A solução aquosa pode ser uma solução aquosa tamponada, obtida com um tampão tal como um tampão de fosfato, um TRIS (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol), Hepes (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanossulfônico-

co), histidina ou tampão de citrato. A formulação líquida também pode compreender um ou vários sais adicionais, tais como NaCl.

[00158] Em particular, o referido sal polimérico de ácido poliacrílico linear ou ramificado é composto exclusivamente por unidades correspondentes a um sal de ácido acrílico ou é composto exclusivamente por unidades que correspondem à forma de ácido livre de ácido acrílico e por unidades que correspondem a um sal de ácido acrílico.

[00159] Vantajosamente, dito sal polimérico de ácido poliacrílico compreende menos de 0,005%, preferivelmente menos que 0,001% p/p de agentes oxidantes, com base no peso seco total do referido sal polimérico de ácido poliacrílico e/ou compreende menos do que 0,005%, preferivelmente menos do que 0,001% p/p de persulfatos, com base no peso seco total de dito sal polimérico de ácido poliacrílico.

[00160] Em uma modalidade mais particular, dito polímero de ácido poliacrílico é um sal com Na⁺.

[00161] Nas modalidades particulares, o referido sal de polímero de ácido poliacrílico possui um índice de polidispersividade abaixo ou igual a cerca de 4, preferivelmente abaixo ou igual a cerca de 2,5.

[00162] Nas modalidades particulares, dito sal de polímero de ácido poliacrílico possui um peso molecular médio ponderado Mw na faixa de 380 a 620 kDa e um índice de polidispersividade abaixo ou igual a 4; ou possui um peso molecular médio ponderado Mw na faixa de 400 a 600 kDa e um índice de polidispersividade abaixo ou igual a 4; ou possui um peso molecular médio ponderado Mw na faixa de 380 a 620 kDa e um índice de polidispersividade abaixo ou igual a 2,5; ou possui um peso molecular médio ponderado Mw na faixa de 400 a 600 kDa e um índice de polidispersividade abaixo ou igual a 2.

[00163] Vantajosamente, o referido sal polimérico de ácido poliacrílico compreende menos de 0,005% p/p de monômero de ácido acrílico na forma de ácido livre ou na forma de sal, com base no peso seco

total do referido sal polimérico de ácido poliacrílico.

[00164] De acordo com as modalidades vantajosas, o referido sal de polímero de ácido poliacrílico está em uma formulação líquida que possui um pH na faixa de 5,5 a 8,0.

[00165] De acordo com as modalidades vantajosas, o referido sal polimérico de ácido poliacrílico está em uma solução aquosa tampoadada, em particular com um tampão fosfato, ou um TRIS, Hepes, histidina ou tampão de citrato.

[00166] De acordo com as modalidades vantajosas, dito sal de polímero de ácido poliacrílico é diafiltrado e esterilizado.

[00167] Quando o sal polimérico de ácido poliacrílico ou a formulação líquida do sal polimérico de ácido poliacrílico é diafiltrada, a esterilização ocorre após a diafiltração.

[00168] De acordo com a invenção, o peso molecular médio ponderado Mw é obtido por cromatografia de exclusão por tamanho. Vantajosamente, três detectores serão utilizados após a coluna de cromatografia de exclusão por tamanho: um detector de dispersão da luz em ângulo reto, um detector de índice de refração e um viscosímetro diferencial de quatro capilares. O dn/dc utilizado para a determinação do Mw é determinado de preferência utilizando o detector de índice de refração com um painel de polímeros de ácido poliacrílico de concentração conhecida. O teor de persulfato e o teor de monômero de ácido acrílico na forma de ácido livre ou na forma de sal podem ser determinados por Cromatografia de Troca Aniônica de Alta Eficiência com detecção condutimétrica.

[00169] Um processo para a preparação desse polímero compreende, por exemplo, as seguintes etapas sucessivas:

- a) ter uma solução de um polímero de ácido poliacrílico,
- b) purificar a solução do polímero de ácido poliacrílico, a fim de eliminar impurezas, e

c) esterilizar a solução purificada do polímero de ácido poli-acrílico.

[00170] Um processo para o armazenamento de uma solução desse sal polimérico compreende, por exemplo, o processo de preparação acima mencionado, seguido por uma etapa de armazenamento do polímero obtido, em solução.

[00171] Em particular, o referido sal polimérico de ácido poliacrílico linear ou ramificado com um peso molecular médio ponderado Mw na faixa de 350 a 650 kDa é PAA225000.

[00172] O produto denominado PAA225000 (Ref. 18613, sal de sódio) pode ser obtido da Polysciences Europe (Eppelheim, Germany) na forma de uma solução concentrada. Pode ser diluído com água para obter uma concentração de 20 mg/ml e mantido sob agitação na temperatura ambiente durante 12 horas. O pH pode ser ajustado para 7,55 com HCl e a solução pode ser submetida à diálise na temperatura ambiente contra a solução aquosa de NaCl 150 mM (3 banhos consecutivos) através do uso de cassetes de diálise de corte de 2kDa (Thermo Fischer Scientific, Courtaboeuf, France). A solução pode então ser filtrada através de uma membrana de PVDF de 0,22 µm para esterilização. O peso molecular do sal polimérico pode então ser medido e ser de 488 550 Da. Seu Mn pode ter 129 070 Da e seu IP 3,8.

[00173] O polímero pode então ser armazenado a + 4°C, como uma solução que compreende 20 mg/ml de polímero em solução aquosa de NaCl 150 mM. Esta solução pode então ser misturada com PBS 1C concentrado 10 vezes com água estéril, a fim de obter uma solução salina compreendendo 2 mg/ml de sal de polímero.

[00174] Qualquer outro adjuvante indutor de Th1 pode ser utilizado na composição da invenção. Como exemplos de adjuvantes conhecidos por induzir predominantemente uma resposta imune do tipo Th1, pode-se citar o que se segue: adjuvantes ou combinações de adjuvan-

tes compreendendo uma saponina tal como aquelas descritas na WO8809336 ou na US5057540, em particular QS21 e seus componentes sintéticos ou análogos semissintéticos, um agonista de TLR3 tal como PolyI:C e seus derivados, um agonista de TLR5 tal como flagelina e seus derivados, um agonista de TLR7 ou um agonista de TLR7/8 tal como imidazoquinolina e seus derivados tais como aqueles descritos na EP1318835, um agonista de TLR8 tal como motolimod, também conhecido como VTX-2337 (como descrito em Lu *et al.*, Clin Cancer Res, 2012, 18(2):499-509) e seus derivados ou agonistas de TLR8 desenvolvidos pela Dynavax, um agonista de TLR9 tal como CpG oligodesoxinucleotídeos e seus derivados, tais como descritos em Vollmer *et al.*, Expert Opin. Biol. Ther., 2005, 5(5):673-682, em particular ISS1018 ou CpG 7909, um agonista de receptores do tipo RIG-I (RLR), tal como agonista de RIG-I, em particular RNA de 5' trifosfato ou agonistas de pequeno peso molecular da Kineta, ou um estimulador de agonista dos genes do interferon (STING), em particular dinucleotídeos cíclicos (por exemplo, c-di-AMP, c-di-GMP, c-di-GAMP), um poli[di(carboxilatofenóxi)fosfazeno] (PCPP) como descrito em Payne *et al.*, Dev Biol Stand. 1998, 92:79-87, um poli[di(carboxilatoetilfenóxi)] fosfazeno (PECP) como descrito em Dar A *et al.*, Vet Immunol Immunopathol., 2012, 146(3-4):289-95, ou um Carbopol.

[00175] Esses adjuvantes indutores de Th1 podem ser combinados com um sistema de administração tal como nanossuspensão aquosa, fosfato de cálcio, lipossomas, virossomas, ISCOMs, micro e nanopartículas, emulsões.

[00176] O adjuvante e os antígenos da composição imunogênica de acordo com a invenção podem ser formulados com qualquer veículo farmacêuticamente aceitável. No contexto da invenção, a expressão "veículo farmacêuticamente aceitável" refere-se a um veículo fisiologicamente aceitável para administração a um ser humano, mantendo a

atividade fisiológica da composição imunogênica de acordo com a invenção, isto é, sua capacidade de induzir uma resposta imune. Um veículo farmacêuticamente aceitável exemplar é um tampão de soro fisiológico. Outros veículos fisiologicamente aceitáveis são conhecidos daqueles versados na técnica e são descritos, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences (18th edition), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, Pa. Uma composição imunogênica como aqui descrita pode opcionalmente conter substâncias auxiliares farmacêuticamente aceitáveis conforme requerido para se aproximar das condições fisiológicas, tais como agentes de ajuste do pH e tamponantes, agentes de ajuste da tonicidade, agentes umectantes e semelhantes como, por exemplo, acetato de sódio, lactato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina, albumina do soro humana, aminoácidos essenciais, aminoácidos não essenciais, cloridrato de L-arginina, sacarose, desidrato de D-trealose, sorbitol, tris(hidroximetil) aminometano e/ou ureia. Além disso, a composição de vacina pode opcionalmente compreender aditivos farmacêuticamente aceitáveis, incluindo, por exemplo, diluentes, aglutinantes, estabilizantes e conservantes.

[00177] O pH da composição imunogênica está geralmente entre 5,5 e 8, e mais preferivelmente entre 6,5 e 7,5 (por exemplo, ao redor de 7). O pH estável pode ser mantido pelo uso de um tampão, por exemplo, um tampão Tris, um tampão de citrato, um tampão de fosfato, um tampão Hepes ou um tampão de histidina. Assim, a composição imunogênica geralmente inclui um tampão. As composições imunogênicas podem ser isotônicas em relação aos seres humanos. A composição imunogênica também pode compreender um ou vários sais adicionais, tais como NaCl.

[00178] As composições imunogênicas podem ser esterilizadas por técnicas convencionais de esterilização ou podem ser filtradas esté-

reis. As soluções aquosas resultantes podem ser acondicionadas e armazenadas na forma líquida ou liofilizada, a preparação liofilizada sendo reconstituída com um veículo aquoso estéril antes da administração. Em uma modalidade preferida, as composições imunogênicas são acondicionadas e armazenadas como micropellets através de um processo de granulação como descrito na WO2009109550. Cada micropellet pode compreender o antígeno gB, o antígeno complexo pentamérico gH/gL/UL128/UL130/UL131 e o adjuvante indutor de Th1 opcionalmente com a emulsão de óleo-em-água. Como alternativa, o antígeno gB, o antígeno complexo pentamérico gH/gL/UL128/UL130/UL131 e o adjuvante indutor de Th1, opcionalmente com a emulsão de óleo-em-água, podem ser compreendidos isoladamente ou em qualquer combinação em diferentes micropellets ou após reconstituição aquosa para obter a composição da invenção.

[00179] O adjuvante e a parte de antígenos da composição imunogênica de acordo com a invenção são geralmente misturados entre si se não houver incompatibilidade entre os produtos ou, alternativamente, o adjuvante pode ser adicionado extemporaneamente antes da administração a um indivíduo.

[00180] Em uma modalidade, a composição imunogênica da invenção é preparada como uma mistura pronta para uso do antígeno do HCMV gB, o antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 e o adjuvante indutor de Th1.

[00181] Em outra modalidade, a composição imunogênica da invenção é preparada extemporaneamente, imediatamente antes da administração aos indivíduos humanos. Assim, a invenção fornece kits que incluem os vários componentes prontos para a mistura. O kit permite que o antígeno do HCMV gB, o antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131, o adjuvante indutor de Th1 e, opcionalmente, a emulsão óleo-em-água sejam mantidos separada-

mente até o momento do uso.

[00182] Esses componentes são fisicamente separados um do outro dentro do kit, e essa separação pode ser alcançada de várias maneiras. Por exemplo, eles podem estar em recipientes separados, tais como frascos. Em alguns arranjos, todos os componentes são mantidos separadamente até o momento do uso. De preferência, o antígeno gB e o antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 estão no mesmo recipiente e o adjuvante indutor de Th1 e, opcionalmente, a emulsão de óleo-em-água está (estão) em outro recipiente. O conteúdo dos frascos pode ser misturado, por exemplo, removendo o conteúdo de um frasco e adicionando-o ao outro frasco, ou removendo separadamente o conteúdo de todos os frascos e misturando-os em um novo recipiente. Em um exemplo, um ou mais componentes do kit estão nas seringas e o outros nos recipientes tais como um frasco. A seringa pode ser utilizada (por exemplo, com uma agulha) para inserir seu conteúdo em outro recipiente para mistura, e a mistura pode ser retirada na seringa. O conteúdo misturado da seringa pode então ser administrado a um paciente, normalmente através de uma nova agulha estéril. Em outra disposição, os componentes do kit são mantidos juntos, mas separadamente na mesma seringa. Quando a seringa é acionada (por exemplo, durante a administração a um paciente), o conteúdo das câmaras é misturado. Essa disposição evita a necessidade de uma etapa de mistura separada no momento do uso. Os componentes do kit estarão geralmente na forma aquosa. Em algumas disposições, um ou mais componentes estão na forma seca (por exemplo, na forma liofilizada ou como micropartículas), com os outros componentes estando na forma aquosa. Os componentes podem ser misturados a fim de reativar o componente seco e fornecer uma composição aquosa para administração a um paciente. Um ou mais componentes liofilizados podem estar localizados dentro de um

frasco ou em uma seringa. Os componentes secos podem incluir estabilizantes tais como manitol, sacarose ou dodecil maltosídeo, assim como suas misturas, por exemplo, misturas de lactose/sacarose, misturas de sacarose/manitol, etc. Em algumas disposições, todos os componentes estão na forma seca (por exemplo, em uma forma liofilizada ou em micropellets), mantidos no mesmo recipiente ou separadamente em vários recipientes e o kit contém outro recipiente contendo uma solução aquosa para a reconstituição da vacina.

[00183] Consequentemente, a invenção fornece um kit compreendendo: (i) um primeiro componente do kit que compreende um antígeno do HCMV gB e um antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 e (ii) um segundo componente do kit que compreende um adjuvante indutor de Th1 e opcionalmente compreende emulsão de óleo-em-água; e o uso desse kit para prevenir a infecção pelo HCMV.

[00184] Em uma modalidade preferida, a composição imunogênica da invenção está disponível em um frasco/seringa como uma mistura pronta para uso do antígeno do HCMV gB, do antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 e do adjuvante indutor de Th1.

[00185] A composição imunogênica, de acordo com a invenção, pode ser administrada por qualquer via adequada, tal como através da administração de mucosa (por exemplo, intranasal ou sublingual), administração parenteral (por exemplo, via intramuscular, subcutânea, transcutânea ou intradérmica) ou administração oral. Como observado pela pessoa versada na técnica, uma vacina da presente invenção é adequadamente formulada para ser compatível com a via de administração pretendida.

[00186] A composição imunogênica de acordo com a invenção pode ser administrada isoladamente ou com veículos farmacêuticos adequados e pode estar na forma sólida ou líquida, tal como comprimidos,

cápsulas, pós, soluções, suspensões ou emulsões.

[00187] Para uso como aerossóis, a composição imunogênica de acordo com a invenção em solução ou suspensão pode ser acondicionada em um recipiente de aerossol pressurizado juntamente com propulsores adequados, por exemplo, propulsores de hidrocarboneto como propano, butano ou isobutano com adjuvantes convencionais. Os materiais da presente invenção também podem ser administrados em uma forma não pressurizada, tal como em um nebulizador ou atomizador.

Usos

[00188] Como mencionado anteriormente, a invenção também se refere a uma composição imunogênica como aqui descrita para uso como uma vacina contra o HCMV.

[00189] Em particular, a vacina contra o HCMV de acordo com a invenção é uma vacina de subunidade.

[00190] Refere-se ainda a um método de prevenção da infecção pelo HCMV em um paciente com sua necessidade, compreendendo a administração de uma quantidade imunologicamente eficaz da composição imunogênica de acordo com a invenção.

[00191] O "HCMV" é utilizado como descrito anteriormente e uma infecção por HCMV pode, em particular, se relacionar com uma infecção materna por HCMV durante a gravidez ou uma infecção congênita.

[00192] Em particular, dita vacina/composição imunogênica aumenta a neutralização dos níveis de anticorpo e/ou a persistência. Mais particularmente, a referida vacina/composição imunogênica compreendendo um antígeno do HCMV gB, um antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 e um adjuvante indutor de Th1 induz níveis mais elevados de anticorpos de neutralização e/ou persistência do que uma vacina/composição imunogênica compreendendo o mesmo antígeno do HCMV gB, o mesmo antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 e adjuvante MF59.

[00193] Por "vacina", como aqui utilizado, entende-se uma composição imunogênica que é administrada para induzir uma resposta imune que protegerá ou tratará um indivíduo de uma enfermidade, em particular devido a esse agente. A vacina da presente invenção destina-se ao uso como uma vacina preventiva (profilática), para administração ao indivíduo antes da infecção, com a intenção de prevenir a infecção inicial (e/ou recorrente). No caso particular da infecção congênita pelo HCMV, a presente invenção destina-se ao uso como uma vacina preventiva para meninas adolescentes e mulheres em idade fértil antes da gravidez, a fim de impedir a transmissão vertical do HCMV da mãe para o feto ou para o bebê.

[00194] Uma composição imunogênica de acordo com a invenção compreende uma quantidade imunologicamente eficaz dos antígenos e adjuvantes aqui descritos. Uma "quantidade imunologicamente eficaz" é uma quantidade que, quando administrada a um indivíduo, é eficaz para provocar uma resposta imune contra o antígeno utilizado. Essa quantidade pode variar de acordo com a saúde e a condição física do indivíduo a ser tratado, sua idade, a capacidade do sistema imunológico do indivíduo de produzir anticorpos, o grau de proteção desejado, a formulação da vacina, a avaliação do médico responsável pelo tratamento da situação médica. Esta quantidade pode ser determinada por métodos de rotina pela pessoa versada na técnica.

[00195] "Indivíduo" aqui mencionado é utilizado de maneira semelhante para "paciente" e refere-se a um ser humano, em particular mulheres em idade fértil (16 a 45 anos) e meninas adolescentes (11 a 15 anos), independentemente do seu estado sorológico do CMV, assim como um homem, uma criança ou um paciente candidato ao transplante de órgão sólido ou célula tronco. Em particular, dito paciente ou indivíduo é suscetível a contrair o HCMV.

[00196] Um "anticorpo de neutralização" como descrito nesta inven-

ção, possui o significado conhecido por uma pessoa versada na técnica e destina-se a cobrir um anticorpo que neutraliza seu alvo diretamente, por exemplo, através do bloqueio da entrada do vírus em uma célula hospedeira, assim como através do bloqueio da disseminação viral de célula para célula. Os anticorpos de neutralização são anticorpos funcionais capazes de proteger de seus alvos. Alguma ilustração dos métodos disponíveis para determinar o aumento dos níveis de anticorpos de neutralização e/ou persistência é fornecida na parte experimental do presente pedido.

[00197] A vacina de acordo com a invenção pode ser administrada por qualquer via normalmente utilizada para administrar uma vacina. Um regime que leve à indução da resposta imune esperada será utilizado. Geralmente, o cronograma de imunização inclui várias administrações. A quantidade da composição imunogênica administrada é suficiente para produzir a resposta imune desejada e é determinada pela pessoa versada na técnica.

[00198] Uma vacina de acordo com a presente invenção pode ser administrada em múltiplas doses. Por exemplo, uma vacina de acordo com a presente invenção pode ser administrada em uma, duas ou três doses. Quando uma vacina de acordo com a presente invenção é administrada em três doses, a primeira dose e a terceira dose são preferivelmente administradas com aproximadamente doze meses de intervalo. Por exemplo, uma vacina da presente invenção pode ser administrada em uma primeira dose, uma segunda dose e uma terceira dose, em que a referida segunda dose deve ser administrada cerca de um a três meses após dita primeira dose e em que a dita terceira dose deve ser administrada ao redor de seis a doze meses após a referida primeira dose. Alternativamente, as três doses podem ser administradas em zero meses, em cerca de um a dois meses (por exemplo, ao redor de um mês e meio) e em cerca de seis meses.

[00199] Uma vacina de acordo com a presente invenção pode ser administrada em duas doses. De preferência, a primeira dose e a segunda dose são administradas com aproximadamente um, três, seis, oito ou nove meses de intervalo.

[00200] Uma vacina de acordo com a presente invenção pode ser administrada em uma dose única.

[00201] Opcionalmente, as administrações de reforço de uma vacina de acordo com a presente invenção podem ser utilizadas, por exemplo, entre seis meses e dez anos, por exemplo, seis meses, um ano, três anos, cinco anos ou dez anos após a imunização inicial (isto é, após a administração da última dose programada no regime inicial de imunização).

[00202] Todas as referências aqui citadas, incluindo artigos ou resumos de jornal, pedidos de patentes publicadas, patentes emitidas ou outras referências, são aqui inteiramente incorporadas por referência, incluindo todos os dados, tabelas, figuras e textos apresentados nas referências citadas.

[00203] No escopo da presente invenção, deve ficar entendido que "uma composição imunogênica para uso" é equivalente "ao uso de uma composição imunogênica" e, em particular, que "uma composição imunogênica para uso como vacina" é equivalente "ao uso de uma composição imunogênica como uma vacina" e "ao uso de uma composição imunogênica para a fabricação de um medicamento destinado a ser utilizado como vacina".

[00204] A invenção será ainda ilustrada pelas seguintes figuras e exemplos.

FIGURAS

Figura 1: Cronograma do estudo

Figura 2: Cinética dos títulos de anticorpos de neutralização específicos para a cepa do HCMV BAD-rUL131-Y4 GFP medidos por

ensaio de soroneutralização em células epiteliais com (painel A) ou sem complemento (painel B) em soros coletados do dia 20 ao dia 257 de camundongos imunizados nos dias 0, 20 e 227 com 2 µg de CMV-gB e pentâmero sem ou com diferentes adjuvantes.

Figura 3: Títulos de anticorpos de neutralização específicos para a cepa do HCMV BAD-rUL131-Y4 GFP medidos por ensaio de soroneutralização em células epiteliais com (painel A) ou sem complemento (painel B) e em fibroblastos com (painel C) ou sem complemento (painel D) em soros coletados no dia 34 de camundongos imunizados nos dias 0 e 20 com 2 µg de CMV-gB e pentâmero sem ou com diferentes adjuvantes.

Figura 4: Títulos de anticorpos de neutralização específicos da cepa do HCMV BAD-rUL131-Y4 GFP medidos por ensaio de soroneutralização em células epiteliais com (painel A) ou sem complemento (painel B) e em fibroblastos com (painel C) ou sem complemento (painel D) em soros coletados no dia 208 de camundongos imunizados nos dias 0 e 20 com 2 µg de CMV-gB e pentâmero sem ou com diferentes adjuvantes.

Figura 5: Títulos de anticorpos de neutralização específicos para a cepa de HCMV BAD-rUL131-Y4 GFP medidos por ensaio de soroneutralização em células epiteliais com (painel A) ou sem complemento (painel B) e em fibroblastos com (painel C) ou sem complemento (painel D) em soros coletados no dia 257 de camundongos imunizados nos dias 0, 20 e 227 com 2 µg de CMV-gB e pentâmero sem ou com diferentes adjuvantes.

Figura 6: Títulos de anticorpos IgG1 e IgG2c anti-gB específicos para CMV-gB (painel A) ou para CMV-pentâmero (painel B) medidos por ELISA em soros coletados nos dias 34, 208 e 257 de camundongos imunizados nos dias 0, 21 e 227 com 2 µg de CMV-gB e pentâmero sem ou com diferentes adjuvantes.

Figura 7: Relações médias de anticorpos IgG1/IgG2c calculadas no dia 34, 208 e 257 para cada grupo de camundongos imunizados em 0, 21 e 227 com 2 µg de CMV-gB e pentâmero com MF59 ou com diferentes adjuvantes.

Figura 8: Frequências de células secretoras de citocinas IL-5 e IFN-γ (células secretoras de citocinas/10⁶ esplenócitos) após a estimulação *ex vivo* com CMV-gB recombinante (painel A) ou CMV-pentâmero (painel B) monitorado nos dias 34, 208 e 257 em esplenócitos de camundongos imunizados nos dias 0, 20 e 227 com 2 µg de CMV-gB e pentâmero sem ou com diferentes adjuvantes.

Figura 9: Porcentagens de IgG1 e IgG2c de plasmablastos secretores de anticorpos específicos para CMV-gB (painel A) ou CMV-pentâmero (painel B) nos dias 34, 208 e 257 de camundongos imunizados nos dias 0, 20 e 227 com 2 µg de CMV-gB e pentâmero sem ou com diferentes adjuvantes.

Figura 10: Porcentagens de IgG1 e IgG2c de células de memória B secretoras de anticorpos específicas para CMV-gB (painel A) ou CMV-pentâmero (painel B) nos dias 34, 208 e 257 de camundongos imunizados nos dias 0, 20 e 227 com 2 µg de CMV-gB e pentâmero sem ou com diferentes adjuvantes.

Figura 11: Títulos de anticorpos de neutralização específicos para a cepa de HCMV BAD-rUL131-Y4 GFP medidos por ensaio de soroneutralização em células epiteliais ARPE-19 ou em fibroblastos MRC-5 na presença de complemento em soros coletados em D20 de camundongos imunizados em D0 com doses diferentes de Pentâmero CMV-gB e CMV- gH/gL/UL128/UL130/UL131 formulado com adjuvante PAA.

Figura 12: Títulos de anticorpos de neutralização específicos para a cepa de HCMV BAD-rUL131-Y4 GFP medidos por ensaio de soroneutralização em células epiteliais ARPE-19 na presença (12A) ou ausência (12B) de complemento em soros coletados em D35 de

camundongos imunizados em D0 e D21 com diferentes doses de pentâmero de CMV-gB e CMV- gH/gL/UL128/UL130/UL131 formulado com adjuvante PAA.

Figura 13: Quantificação de células produtoras de citocinas IFN- γ em esplenócitos de camundongos após estimulação *ex vivo* com pentâmero CMV-gB, CMV-gB, CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131 (painel A) ou pools de peptídeo CMV-pentâmero (painel B) medidos pelo ensaio ELISPOT em esplenócitos coletados em D35 de camundongos imunizados em D0 e D21 com 3 μ g de CMV-gB e 3 μ g de pentâmero CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131 formulado com adjuvante PAA.

EXEMPLOS

Tabela 2

Lista de abreviações

Acrônimo/Abreviação	Designação / Descrição
CMV	Citomegalovírus
D	Dia
ELISA	Ensaio Imunossorvente Ligado à Enzima
EU	Unidade de ELISA
IFNg	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
M	Mês
N/A	Não Aplicável
SN	Soroneutralização
W	Semana

EXEMPLO 1

Material e métodos

Material

Produtos testados nos exemplos

[00205] Os produtos são descritos na Tabela 3. Camundongos

C57BL/6J fêmeas com 7 semanas de idade foram imunizados pela via intramuscular (IM) (perna traseira, quadríceps) sob um volume de 50 µl em D0 e D20 e D227.

Tabela 3

Nome do Produto	Concentração	Fonte ou composição
Pentâmero CMV	1 mg/ml	The Native Antigen company, Oxford UK
gB (CMV)	685,5 µg/ml	gBdTM obtido como descrito na US 6.100.064, que é um polipeptídeo longo 806 AA
PAA225000 (PAA)	8 mg/ml PAA 225000	Polysciences Europe GmbH, Hirschberg an der Bergstrasse, Germany
MF59	4% esqualeno	Quantidade por ml: Esqualeno 39,0 mg Polissorbato 80 4,7 mg Trioleato de sorbitano 4,7 mg Citrato de sódio, desidratado 2,65 mg Ácido cítrico, monoidratado 0,17 mg Água para injeções q.s.p. 1 ml
AF04	5% esqualeno, 0,04 mg/ml de E6020	Obtido de acordo com o processo descrito na WO 2007/080308.
GLA-SQEM	4% esqualeno, 0,1 mg/ml de GLA	GLA da Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA GLA-SQEM é obtido de acordo com o processo descrito acima na descrição da invenção

Métodos

Definição de Grupo

[00206] Os grupos de estudo estão descritos na seguinte Tabela 4. Os camundongos foram alocados aleatoriamente em um dos seguintes 7 grupos. Cada grupo é diferenciado em 3 subgrupos, isto é, A => A1, A2 e A3, dependendo da análise do momento que requer a eutanásia do mouse para coletar os baços (dias 34, 208 e 257), conforme resumido no cronograma de estudo da figura 1. Trinta e cinco camun-

camundongos/grupo foram incluídos como se segue: 10 camundongos/subgrupo para os subgrupos 1 e 2, e 15 camundongos no subgrupo 3, a fim de compensar possíveis mortes intercorrentes que podem acontecer durante um período de oito meses. Para os grupos controle, apenas 5 camundongos/subgrupo foram incluídos nos subgrupos A1, A2 e A3 e, para o grupo B, apenas 5 camundongos/subgrupo B1 e B2 foram incluídos e 10 camundongos para o subgrupo B3.

Tabela 4

Grupos	Subgrupos (número de camundongo)	Produtos sob teste				
		Substância ativa		Adjuvante		Via de adm.
		Nome	dose	Nome	Dose	
A (15)	A1 (5)	PBS	-	-	-	IM
	A2 (5)					50 µl em D0, D21
	A3 (5)					IM 50 µl em D0, D21, M7
B (20)	B1 (5)	gB + Pentâmero	2 µg 2 µg	-	-	IM
	B2 (5)					50 µl em D0, D21
	B3 (10)					IM 50 µl em D0, D21, M7
C (35)	C1 (10)	gB + Pentêmero	2 µg 2 µg	MF59	2% Esqualeno	IM
						50 µl em D0, D21
	C2 (10)					IM 50 µl em D0, D21, M7
	C3 (15)					
D (35)	D1 (10)	gB + Pentâmero	2 µg 2 µg	PAA	200 µg	IM
	D2 (10)					50 µl em D0, D21
	D3 (15)					IM 50 µl em D0, D21, M7

Grupos	Subgrupos (número de camundongo)	Produtos sob teste				
		Substância ativa		Adjuvante		Via de adm.
		Nome	dose	Nome	Dose	
E (35)	E1 (10)	gB + Pentâmero	2 µg 2 µg	AF04	1 µg E6020, 2.5% Esqualeno	IM 50µl em D0, D21
	E2 (10)					IM 50 µl em D0, D21,M7
	E3 (15)					
F (35)	F1 (10)	gB + Pentâmero	2 µg 2 µg	GLA- SQEM	2.5 µg GLA , 2% Esqualeno	IM 50 µl em D0, D21
	F2 (10)					IM 50 µl em D0, D21,M7
	F3(15)					

Amostragem Biológica e Testes Analíticos

• Amostragem biológica

[00207] Amostras de sangue foram coletadas de todos os animais sob anestesia. A anestesia foi executada com Imalgene® (1,6 mg de cetamina) e Rompun (0,32 mg de xilazina) administradas em um volume de 200 µl por via intraperitoneal. Ao redor de 1 ml de sangue foi coletado em frascos contendo ativador de coágulo e separador de soro (BD Vacutainer SST ref 367783). Após uma noite a +4°C, o sangue foi centrifugado em 3000 rpm durante 20 minutos e o soro foi coletado e armazenado a -20°C até a análise.

[00208] Para ensaios de resposta celular, os baços foram coletados em condições estéreis e os esplenócitos foram isolados assim que possível após a amostragem do baço.

• Testes Analíticos

Ensaio de soroneutralização

[00209] Esta técnica é utilizada para titular os anticorpos de neutralização funcionais presentes nos soros de animais imunizados com CMV-gB + pentâmero + adjuvante. Com base na capacidade do Citomegalovírus de infectar fibroblastos MRC5 e células ARPE-19 (células epiteliais humanas), um soro contendo anticorpos funcionais específicos contra CMV-gB e/ou CMV-pentâmero pode inibir a infecção viral das células.

[00210] Resumidamente, $2,5 \times 10^4$ fibroblastos MRC5 ou células ARPE-19 foram dispensados em placas escuras de 96 cavidades no dia anterior ao ensaio de microneutralização (MN). No D0, os soros foram inativados pelo calor a 56°C durante 30 min. As amostras de soro foram diluídas duas vezes em série em DMEM/F12 1% FBS, começando de 1/10 a 1/10240 em uma placa de 96 cavidades profundas e incubadas com 4,2log FFU/ml da cepa do vírus BADrUL131-Y4 CMV (fornecido por Thomas Shenk, como descrito em Wang *et al.*, J. Virol., 2005, 79(16):10330-10338), titulando 4,89 ou 4,71 log FFU/ml em células ARPE-19 ou MRC5, respectivamente) durante 60 min a 37°C em uma incubadora de cultura de células a 5% de CO₂. As misturas de soro/vírus foram então transferidas para as células MRC5 ou ARPE-19 e incubadas a 37°C em uma incubadora de cultura de células a 5% de CO₂. A incubação foi executada em 3 dias para as células MRC5 e em 4 dias para as células ARPE.

[00211] Em D3 ou D4, após a remoção do sobrenadante da cultura, as células foram fixadas com 100 µl de formol a 1% em PBS durante 1 hora na temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com PBS e secas ao ar livre na temperatura ambiente antes da análise na leitora de placas fluorescente Microvision para contar células infectadas em cada cavidade.

[00212] Como controle, duas cavidades de controle celular (sem vírus) e seis cavidades com células infectadas com metade da diluição viral contendo 4,2 log FFU/ml estavam presentes em cada placa. A média dessas seis cavidades definiu o limiar de soroneutralização, determinado como 50% do valor do sinal específico. Os títulos de desfecho de neutralização foram definidos como o recíproco da última diluição que ficou abaixo do valor calculado de sinal específico de 50%. Os títulos de neutralização (μ PRNT₅₀) foram definidos para cada soro individual como a última diluição que induziu redução de 50% das células infectadas, isto é, a última diluição que induziu células infectadas inferiores do que o valor de sinal específico calculado de 50%. Os títulos médios geométricos de anticorpos de neutralização foram calculados para cada grupo.

Ensaio ELISA

[00213] Os anticorpos IgG1 e IgG2c no soro direcionados contra o antígeno CMV-gB ou contra o antígeno CMV-pentâmero foram titulados por um ensaio ELISA robótico de acordo com o seguinte procedimento.

[00214] As microplacas de 96 cavidades Dynex foram revestidas durante a noite a 4°C com 1 μ g/cavidade de CMV-gB ou CMV-pentâmero, em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6 (Sigma). As placas foram então bloqueadas pelo menos 1 hora a 37°C com 150 μ l/cavidade de leite PBS Tween (PBS pH 7,1, 0,05% Tween 20, 1% (p/v) de leite em pó desnatado (DIFCO)). Todas as próximas incubações foram realizadas em um volume final de 100 μ l, seguido de 3 lavagens com PBS pH 7,1, 0,05% de Tween 20. Uma diluição dupla em série das amostras de soro foi executada em leite PBS-Tween (partindo de 1/1000 ou 1/10000) e foi adicionada às cavidades. As placas foram incubadas durante 90 min a 37°C. Após as lavagens, anticorpos conjugados IgG1 ou IgG2c de anti-camundongo de cabra peroxidase

(Southern Biotech) diluídos em leite PBS-Tween em 1/2000 foram adicionados às cavidades e as placas foram incubadas durante 90 min a 37°C. As placas foram ainda lavadas e incubadas no escuro durante 30 min a 20°C com 100 µl/cavidade de uma solução de substrato de Tetra Metil Benzidina (TMB) pronta para uso (TEBU). A reação foi interrompida com 100 µl/cavidade de HCl 1M (Prolabo).

[00215] A densidade óptica (DO) foi medida em 450 nm a 650 nm com uma leitora de placas (VersaMax - Molecular Devices). Os títulos de anticorpos IgG1 ou IgG2c foram calculados utilizando o software CodUnit, para a faixa de valores de OD de 0,2 a 3,0 a partir da curva de titulação (soro hiperimune imune de camundongo de referência colocado em cada placa). O título de IgG1 ou IgG2c desta referência, expresso em unidades ELISA arbitrárias (UE), corresponde ao log₁₀ da diluição recíproca, fornecendo uma OD de 1,0. O limiar de detecção de anticorpo foi de 10 unidades ELISA (1,0 log₁₀). Todos os títulos finais foram expressos em log₁₀ (Log).

[00216] As relações de IgG1/IgG2c foram calculadas utilizando os valores aritméticos individuais e a média geométrica das relações individuais de IgG1/IgG2c foi calculada para cada grupo.

FLUOROSPOT

[00217] O immunospot ligado a fluorescência (FLUOROSPOT) é utilizado para detectar e enumerar células individuais que secretam as citocinas IFN-γ e IL-5.

[00218] Em D0, a membrana das microplacas de 96 cavidades com fundo de IPFL (Multiscreen) foi pré-umedecida durante 1 minuto com 25 µl de etanol a 35%. O etanol foi então removido e cada cavidade foi lavada duas vezes com 200 µl de PBS 1X. As microplacas foram então revestidas com um anticorpo de IFN-γ anti-camundongo de rato ou anticorpo de IL-5 anti-camundongo de rato (10 µg/ml, Pharmingen) diluído em 1/100 e 1/50 respectivamente e foram incubadas durante a noi-

te a 4°C.

[00219] Em D1, as placas foram lavadas com PBS e depois bloqueadas pelo menos 2 h a 37°C com RPMI 10% de FBS. Após a lavagem das placas, 5×10^5 esplenócitos isolados recentemente/cavidade foram incubados durante a noite com o antígeno CMV-gB (0,1 µg/ml), CMV-pentâmero (0,1 µg / ml) ou concanavalina A (Con A, 2,5 µg/ml) como um controle positivo, na presença de IL-2 de murino (10 U / ml).

[00220] Em D2, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS 1X-BSA a 0,1% (200 µl/cavidade). Após a etapa de lavagem, 100 µl/cavidade dos anticorpos biotinilados anti-IFN-γ ou IL5 anti-camundongo foram adicionados a 1 µg/ml em PBS1X-BSA a 0,1% durante 2 horas na temperatura ambiente, no escuro. As placas foram lavadas novamente 3 vezes com PBS 1X-BSA a 0,1% (200 µl/cavidade). Em seguida, 100 µl/cavidade de estreptavidina-PE em 1 µg/ml com PBS 1X-BSA a 0,1% foram incubados durante 1 hora na temperatura ambiente, no escuro.

[00221] As placas foram ainda lavadas 6 vezes com PBS 1X-BSA a 0,1% (200 µl/cavidade). As placas foram armazenadas a 5°C ± 3°C no escuro até a leitura.

[00222] Cada mancha, que corresponde a uma célula secretora de IFN-γ ou IL5 (SC de IFN-γ ou SC de IL5), foi enumerada com uma leitora automática de placas FLUOROSPOT (Microvision). Os resultados foram expressos como número de células secretoras de IFN-γ ou IL-5 por 10^6 esplenócitos.

Ensaio FLUOROSPOT de IgG, IgG1 e IgG2c

[00223] O immunospot ligado à fluorescência (FLUOROSPOT) é utilizado para detectar e enumerar células B individuais que secretam anticorpos, independentemente da especificidade do antígeno (IgG1, IgG2c ou IgG total).

[00224] Em D0, a membrana das microplacas de 96 cavidades com fundo de IPFL (Multiscreen) foi pré-umedecida durante 1 minuto com

25 µl de etanol a 35%. O etanol foi então removido e cada cavidade foi lavada duas vezes com 200 µl de PBS 1X. As microplacas foram então revestidas com antígeno CMV-gB (10 µg/ml, Sanofi), CMV-pentâmero (10 µg/ml, NAC) ou anticorpo de IgG total (10 µg/ml, KPL) diluído em 1/68, 1/100 e 1/100 respectivamente e foram incubadas durante a noite a 4°C. Em D1, as placas foram lavadas com PBS e depois bloqueadas pelo menos 2 h a 37°C com RPMI 10% de FBS.

[00225] Após a lavagem das placas, 5×10^5 esplenócitos/cavidade recém-isolados para o antígeno CMV-gB ou CMV-pentâmero e $2,5 \times 10^5$ esplenócitos recém-isolados/cavidade para o anticorpo IgG total durante 5 horas.

[00226] Após 5 horas, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS 1X e armazenadas a 4°C durante a noite.

[00227] Em D2, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS 1X-BSA a 0,1% (200 µl/cavidade). Após a etapa de lavagem, 100 µl/cavidade dos anticorpos de IgG totais IgG1 PE anti-camundongo ou IgG2c FITC anti-camundongo foram adicionados respectivamente em 4, 2 ou 0,5 µg/ml em PBS1X-BSA 0,1% durante 2 horas na temperatura ambiente, no escuro. As placas foram lavadas novamente 6 vezes com PBS 1X-BSA a 0,1% (200 µl/cavidade). As placas foram armazenadas a 5°C ± 3°C no escuro até a leitura.

[00228] Cada mancha, correspondente a uma célula secretora de anticorpos (ASC) (IgG1 ASC, IgG2c ASC ou IgG ACS total), foi enumerada com uma leitora automático de placas FLUOROSPOT (Microvision). Os resultados foram expressos como número de células secretoras de anticorpos por 10^6 esplenócitos.

Resultados

Resposta humoral

[00229] Análise longitudinal da resposta de anticorpos de neutralização em células epiteliais ARPE-19 entre os dias 20 e 257

[00230] A atividade de neutralização contra a cepa do vírus BADrUL131-Y4 CMV nas células epiteliais (ARPE-19) foi monitorada por ensaios de soroneutralização em amostras de soro intermediárias individuais coletadas mensalmente de todos os animais dos subgrupos 3 do dia 20 ao dia 257 (isto é, nos dias 20, 34 62, 90, 118, 153, 187, 226 e 257). A técnica de soroneutralização é detalhada na seção de materiais e métodos e os dados brutos são mostrados nas Tabelas 5 a-b.

Tabelas 5 a-b

Grupo		Soro	ARPE D20 +C	ARPE M1 +C	ARPE M2 +C	ARPE M3 +C	ARPE M4 +C	ARPE M5 +C	ARPE M6 +C	ARPE M7 +C	ARPE M8 +C
A	PBS	GMT	24	16	25	29	23	21	17	22	16
B	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg	GMT	33	133	212	183	191	136	164	90	1026
C	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg MF59 : 2,3% esqualeno	GMT	220	3625	3516	3748	3562	2034	2973	1058	6792
D	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg PAA : 200 µg	GMT	879	15990	11598	10962	10724	10266	8681	5792	37166
E	Pentâmero : 2 µg gB : 2 µg AF04 : 1µg E6020, 2,5% esqualeno	GMT	383	12648	9288	7833	9048	5653	4494	3559	17936
F	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg GLA-SQEM : 2,5µg GLA, 2% esqualeno	GMT	976	30755	20844	15957	17068	11231	11156	8505	35897

a- Subgrupo 3 - intermediário - Soroneutralização ARPE com complemento

Grupo		Soro	ARPE D20 - C	ARPE M1 - C	ARPE M2 - C	ARPE M3 - C	ARPE M4 - C	ARPE M5 - C	ARPE M6 - C	ARPE M7 +C	ARPE M8 +C
A	PBS	GMT	30	16	18	13	71	22	12	12	13
B	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg	GMT	32	94	138	170	109	122	92	65	815
C	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg MF59 : 2,3% esqualeno	GMT	74	2020	1973	1928	1264	1174	1028	655	5449
D	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg PAA : 200 µg	GMT	83	3297	4890	3768	3589	3289	3580	2201	28657
E	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg AF04 : 1µg E6020, 2,5% esqualeno	GMT	91	3734	3354	3918	2728	2344	2359	1274	11910
F	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg GLA-SQEM : 2,5µg GLA, 2% esqualeno	GMT	106	8048	7446	7774	5392	4812	3459	2883	9150

b- Subgrupo 3 - intermediário - Soroneutralização ARPE sem complemento

[00231] Os títulos médios geométricos (GMT) e os títulos neutralizantes individuais são mostrados na Figura 2.

M1 = D34, M2 = D62, M3 = D90, M4 = D118, M5 = D153, M6 = D187, M7 = D226, M8 = D257.

[00232] Os perfis de titulação de anticorpos de neutralização cinéticos semelhantes foram detectados na presença e ausência de complemento no ensaio de neutralização de base epitelial como representado na Figura 2, painéis A e B, respectivamente.

[00233] Para o grupo administrado com CMV-gB não adjuvante e pentâmero, foi detectada uma resposta baixa de anticorpos de neutralização no dia 20 (GMT = 33 e 32, com ou sem complemento, respectivamente) e depois aumentada até o dia 62 para atingir um platô com GMT variando de 90 a 212 ou de 65 a 170, na presença ou ausência de complemento, entre o dia 62 e o dia 226. A 3ª injeção no dia 226 reforçou os títulos de anticorpos de neutralização, conforme detectados nos dias 257 com GMT = 1026 ou 815, na presença ou ausência de complemento, respectivamente.

[00234] Para todos os grupos de adjuvante (MF59, PAA, AF04 e GLA-SQEM), os títulos de anticorpos de neutralização foram detectados na presença ou ausência de complemento no dia 20 (isto é, 20 dias após a primeira injeção) com GMTs em 220 ou 74, respectivamente, para o grupo C3 administrado com CMV-gB e pentâmero adjuvante com MF59 e com GMTs ≥ 383 e ≥ 83 para os grupos D3 a F3 administrados com as outras formulações adjuvantes. No dia 34 (isto é, 14 dias após a 2ª injeção), todos os grupos adjuvantes apresentaram o pico da resposta após 2 injeções com GMTs variando de 3625 a 30755 ou de 2020 a 8048, na presença ou na ausência de complemento, respectivamente.

[00235] Durante o período de 6 meses (entre os dias 34 e 226), os títulos de anticorpos de neutralização epiteliais diminuíram levemente

para títulos variando de 1058 a 8505 ou de 655 a 2883, na presença ou na ausência de complemento, respectivamente. Da mesma forma, a terceira injeção no dia 226 aumentou os títulos de anticorpos de neutralização, conforme detectados nos dias 257, com GMTs variando de 6792 (isto é, para MF59-) a 37166 (isto é, para PAA-) ou de 5449 (isto é, para MF59-) a 28657 (isto é, para o grupo adjuvante -PAA), na presença ou na ausência de complemento, respectivamente.

[00236] Para comparar os diferentes grupos adjuvantes, isto é, SPA09, AF04 e GLA-SQEM com a referência MF59, um modelo estatístico misturado com 2 fatores fixos (grupo e tempo) foi executado em títulos de anticorpos de neutralização repetidos entre os dias 34 a 226.

[00237] Com relação à comparação de grupos, como apresentado na Tabela 6, na presença de complemento, os títulos de anticorpos de neutralização obtidos em camundongos administrados com CMV-gB e pentâmero adjuvante com MF59 não foram significativamente superiores aos títulos de anticorpos de neutralização obtidos em camundongos administrados com CMV não adjuvante -gB e pentâmero, enquanto que todos os outros grupos adjuvantes (isto é, PAA, AF04 e GLA-SQEM) foram significativamente superiores aos títulos de anticorpos de neutralização obtidos em camundongos administrados com CMV-gB e pentâmero adjuvante com MF59 (todos os valores $p < 0,001$).

[00238] Na ausência de complemento, os títulos de anticorpos de neutralização obtidos em camundongos administrados com CMV-gB e pentâmero adjuvante com MF59 não foram significativamente superiores aos títulos de anticorpos de neutralização obtidos em camundongos administrados com CMV-gB e pentâmero não adjuvantes. Os títulos de anticorpos de neutralização obtidos em camundongos administrados com CMV-gB e pentâmero adjuvante com AF04 não foram significativamente superiores aos títulos de anticorpos de neutralização obtidos em camundongos administrados com CMV-gB e pentâmero

adjuvantes com MF59, enquanto que todos os outros grupos adjuvantes (isto é, PAA e GLA-SQEM) foram significativamente superiores aos títulos de anticorpos de neutralização obtidos em camundongos administrados com CMV-gB e pentâmero com adjuvante MF59 (todos os valores $p < 0,009$). Os títulos de anticorpos de neutralização obtidos em camundongos administrados com CMV-gB e pentâmero adjuvantes com AF04 foram significativamente superiores aos títulos de anticorpos de neutralização obtidos em camundongos administrados com CMV-gB e pentâmero não adjuvantes (todos os valores $p < 0,001$).

Tabela 6

Ensaio de neutralização de ARPE-19	Na presença de Complemento	Na ausência de Complemento
Comparação	Valor P*	Valor P*
(B3) não adjuvante vs (C3) MF59	1,000 (NS)	1,000 (NS)
(D3) PAA vs (C3) MF59	<0,001 (S) <i>x4,2</i>	0,009 (S) <i>x2,4</i>
(E3) AF04 vs (C3) MF59	<0,001 (S) <i>x2,8</i>	0,077 (NS)
(F3) GLA-SQEM vs (C3) MF59	<0,001 (S) <i>x6,6</i>	<0,001 (S) <i>x4,0</i>

[00239] Comparação estatística dos diferentes grupos dentro dos títulos de anticorpos de neutralização repetidos estimados entre os dias 34 a 226 (teste de superioridade, *valores p com ajuste de Dunnett, NS: não significativo ou S: superioridade significativa, quando significativo o aumento da dobra é indicado em itálico).

Resposta detalhada de anticorpos de neutralização nas células epiteliais (ARPE-19) e fibroblastos (MRC-5) nos dias 34 (M1), 208 (M7) e 257 (M8)

[00240] A atividade de neutralização contra a cepa do vírus BADrUL131-Y4 CMV em células epiteliais (ARPE-19) e fibroblastos (MRC-5) foi monitorada por ensaios de soroneutralização em amostras de soro individuais coletadas de todos os animais dos subgrupos 1, 2

e 3, respectivamente, nos dias 34 (2 semanas após a segunda imunização), 208 (7 meses após a série de vacinação primária) e 257 (1 mês após a injeção de reforço no M7). A técnica de soroneutralização é detalhada na seção de materiais e métodos e os dados brutos são mostrados nas Tabelas 7 a-f.

Tabelas 7 a-f

Grupo		Soro	ARPE J34 +C	ARPE J34 -C
A	PBS	GMT	12	12
B	Pentâmero : 2 µg gB : 2 µg	GMT	46	43
C	Pentâmero : 2 µg gB : 2 µg MF59 : 2,3% esqualeno	GMT	4168	1934
D	Pentâmero : 2 µg gB : 2 µg PAA : 200 µg	GMT	14698	3862
E	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg AF04 : 1µg E6020, 2,5% esqualeno	GMT	7179	2919
F	Pentâmero : 2 µg gB : 2 µg GLA-SQEM : 2,5µg GLA, 2% esqualeno	GMT	13302	3146

a.- Subgrupo 2- Soroneutralização ARPE D234 (D208)

Grupo		Soro	ARPE M7 +C	ARPE M7 -C
A	PBS	GMT	14	17
B	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg	GMT	46	51
C	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg MF59 : 2,3% esqualeno	GMT	3739	1834

D	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg PAA : 200 µg	GMT	4484	2230
E	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg AF04 : 1µg E6020, 2,5% esqualeno	GMT	6101	2718
F	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg GLA-SQEM : 2,5µg GLA, 2% esqualeno	GMT	7719	1758

b- Subgrupo 2- Soroneutralização ARPE M7 (D208)

Grupo		Soro	ARPE M8 +C	ARPE M8 -C
A	PBS	GMT	16	13
B	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg	GMT	1026	815
C	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg MF59 : 2,3% esqualeno	GMT	6792	5449
D	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg PAA : 200 µg	GMT	37166	28657
E	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg AF04 : 1µg E6020, 2,5% esqualeno	GMT	17936	11910
F	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg GLA-SQEM : 2,5µg GLA, 2% esqualeno	GMT	8505	9150

c- Subgrupo 3- Soroneutralização ARPE M8 (D257)

Grupo		Soro	MRC5 D34 +C	MRC5D34 -C
A	PBS	GMT	5	5

B	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg	GMT	8	5
C	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg MF59 : 2,3% esqualeno	GMT	636	71
D	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg PAA : 200 µg	GMT	2699	84
E	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg AF04 : 1µg E6020, 2,5% esqualeno	GMT	1477	153
F	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg GLA-SQEM : 2,5µg GLA, 2% esqualeno	GMT	3131	146

d- Subgrupo 1- Soroneutralização MRC5 - D34

Grupo		Soro	MRC5 M7 +C	MRC5 M7 -C
A	PBS	GMT	5	5
B	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg	GMT	5	5
C	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg MF59 : 2,3% esqualeno	GMT	147	27
D	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg PAA : 200 µg	GMT	500	39
E	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg AF04 : 1µg E6020, 2,5% esqualeno	GMT	451	48
F	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg GLA-SQEM : 2,5µg GLA,	GMT	913	14

	2% esqualeno			
--	--------------	--	--	--

e- Subgrupo 2- Soroneutralização MRC5 M7 (D208)

Grupo		Soro	MRC5 M8 +C	MRC5 M8 -C
A	PBS	GMT	5	5
B	Pentâmero : 2 µg gB : 2 µg	GMT	29	15
C	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg MF59 : 2,3% esqualeno	GMT	695	151
D	Pentâmero : 2 µg gB : 2 µg PAA : 200 µg	GMT	6645	536
E	Pentâmero: 2 µg gB : 2 µg AF04 : 1µg E6020, 2,5% esqualeno	GMT	1977	438
F	Pentâmero : 2 µg gB : 2 µg GLA-SQEM : 2,5µg GLA, 2% esqualeno	GMT	6152	427

f- Subgrupo 3- Soroneutralização MRC5 M8 (D257)

[00241] Os títulos médios geométricos (GMT), assim como os títulos de neutralização individuais, estão representados na Figura 3, Figura 4 e Figura 5.

[00242] Perfis semelhantes de anticorpos de neutralização foram observados em ensaios de neutralização baseados em epitélio e fibroblasto, com títulos de neutralização mais elevados monitorados no ensaio de neutralização de base epitelial com GMTs pelo menos 5 vezes ou 11 vezes maiores na presença ou na ausência de complemento, respectivamente.

[00243] No dia 34, isto é, 14 dias após a segunda injeção, nenhum ou baixos títulos de anticorpos de neutralização foram detectados em

camundongos imunizados com CMV-gB e pentâmero não adjuvantes ($\text{GMT} \leq 8$ em MRC-5 e ≤ 46 nas células ARPE-19, respectivamente). Para todos os grupos adjuvantes CMV-gB e pentâmero, foi observado um efeito adjuvante acentuado com um aumento de 14 a 337 vezes nos títulos SN em MRC-5 e de 44 a 319 vezes nas células ARPE-19, independentemente da presença ou ausência de complemento, comparado ao grupo não adjuvante.

[00244] Com relação aos títulos de anticorpos de neutralização nas células epiteliais ARPE-19 na presença de complemento (Figura 3, painel A), um efeito adjuvante com títulos de anticorpos de neutralização significativamente mais elevados do que o MF59 foi observado com PAA e GLA-SQEM (pelo menos 3 a 4,2 vezes mais elevados, teste de superioridade, ajuste de Dunnet unilateral, todos os valores $p < 0,001$), mas não com AF04 (apenas 1,7 vez mais elevado, valor de $p = 0,08$).

[00245] Ao contrário, em relação aos títulos de anticorpos de neutralização nas células ARPE-19 na ausência de complemento (Figura 3, painel B), os adjuvantes PAA, AF04 e GLA-SQEM aumentaram ligeiramente os títulos de anticorpos de neutralização em comparação com o MF59 (1,5 a 2 vezes de aumento nos títulos de anticorpos de neutralização em comparação àqueles induzidos por MF59), mas as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas (todos os valores $p > 0,091$).

[00246] Com relação aos títulos de anticorpos de neutralização nos fibroblastos MRC-5 na presença de complemento (Figura 3, painel C), foi observado um efeito adjuvante com títulos de anticorpos de neutralização significativamente mais elevados do que o MF59 com todos os adjuvantes testados PAA, AF04 e GLA-SQEM (pelo menos 2,3 a 6 vezes mais elevados, teste de superioridade, ajuste Dunnet unilateral, todos os valores $p < 0,002$).

[00247] Por fim, com relação aos títulos de anticorpos de neutralização nos fibroblastos MRC-5 na ausência de complemento (Figura 3, painel D), os títulos de anticorpos de neutralização induzidos por PAA, AF04 e GLA-SQEM não mostraram ser significativamente mais elevados do que aqueles obtidos com MF59 (valores $p > 0,093$). No dia 208 (Figura 4), isto é, 7 meses após a 2ª injeção, nenhum ou baixos títulos de anticorpos de neutralização foram detectados em camundongos imunizados com CMV-gB e pentâmero não adjuvantes ($\text{GMT} \leq 5$ em MRC-5 e ≤ 50 nas células ARPE-19, respectivamente). Nos subgrupos adjuvantes 2, nenhuma redução significativa dos títulos de neutralização nas células epiteliais ARPE-19 foi apresentada em comparação com os títulos detectados no dia 34 (em camundongos dos subgrupos 1), independentemente da presença ou ausência de complemento, enquanto que a redução significativa foi evidenciada nos títulos de anticorpos de neutralização nos fibroblastos MRC-5 (diminuição de 2,3 a 5,4 vezes na presença de complemento, todos os valores $p < 0,016$; diminuição de 3 a 10 vezes na ausência de complemento, todos os valores $p < 0,001$).

[00248] Com relação aos títulos de anticorpos de neutralização nas células epiteliais ARPE-19 na presença ou ausência de complemento (Figura 4, painéis A e B), nenhuma diferença significativa foi detectada entre os adjuvantes testados e o parâmetro comparativo MF59. Com relação aos títulos de anticorpos de neutralização nos fibroblastos MRC-5 na presença de complemento (Figura 4, painel C), os títulos de anticorpos de neutralização induzidos por PAA e GLA-SQEM foram significativamente mais elevados do que aqueles induzidos por MF59 (pelo menos 3,4 a 11,9 vezes mais elevados, teste de superioridade, ajuste Dunnet unilateral, todos os valores $p \leq 0,015$).

[00249] Finalmente, com relação aos títulos de anticorpos de neutralização nos fibroblastos MRC-5 na ausência de complemento (Figura

ra 4, painel D), os títulos de anticorpos de neutralização induzidos por PAA e AF04 foram significativamente mais elevados do que aqueles induzidos por MF59 (2 a 4,4 vezes de aumento, teste de superioridade, ajuste Dunnet unilateral, todos os valores $p < 0,019$).

[00250] No dia 257 (Figura 5), isto é, 30 dias após a 3ª injeção, os títulos de anticorpos de neutralização em camundongos imunizados com CMV-gB e pentâmero não adjuvantes aumentaram significativamente em comparação com os títulos detectados no dia 34 nas células ARPE-19 (GMT = 1062 ou 815 em células ARPE-19 com e sem complemento, respectivamente). Ao contrário, os títulos de anticorpos de neutralização em camundongos imunizados com CMV-gB e pentâmero não adjuvantes permaneceram baixos nos fibroblastos MRC-5 (GMT = 29 ou 15 nos fibroblastos MRC-5 com e sem complemento, respectivamente).

[00251] Em todos os subgrupos adjuvantes 3, exceto MF59, os títulos de anticorpos de neutralização detectados no dia 257 após a terceira injeção foram significativamente mais elevados do que aqueles detectados no dia 34 após a segunda injeção, independentemente do tipo de célula e da presença ou ausência de complemento (todos os valores $p \leq 0,002$).

[00252] No dia 257, com relação à comparação de adjuvantes com a referência MF59, todos os adjuvantes (por exemplo, PAA e AF04), exceto GLA-SQEM, induziram títulos de anticorpos de neutralização mais elevados do que MF59, independentemente do tipo de célula e da presença ou ausência de complemento (teste superioridade, ajuste Dunnet unilateral, todos os valores $p \leq 0,05$). Em relação ao GLA-SQEM, os títulos de anticorpos de neutralização dependentes de complemento induzidos foram significativamente mais elevados do que aqueles induzidos por MF59 (5,3 ou 8,9 vezes mais elevados nas células ARPE-19 ou MRC-5 respectivamente, teste de superioridade, ajus-

te Dunnet unilateral, todos os valores $p < 0,001$), enquanto que na ausência de complemento, a neutralização induzida não foi significativamente diferente, seja qual for o tipo de célula.

[00253] Em D208, isto é, até 7 meses após a 2ª injeção, a composição que compreende gB + Pentâmero + AF04 ou PAA ou GLA-SQEM fornece níveis mais elevados de anticorpos de neutralização do que uma composição que compreende gB + Pentâmero + MF59, mostrando uma melhor persistência da funcionalidade dos anticorpos. No D257, 1 mês após o reforço, o aumento medido do anticorpo de neutralização reflete a resposta de memória e apresenta títulos mais elevados para a composição compreendendo gB + Pentâmero + AF04 ou PAA ou GLA-SQEM do que uma composição compreendendo gB + Pentâmero + MF59.

[00254] Todos estes resultados mostram que a composição imunogênica compreendendo gB + Pentâmero + AF04 ou PAA ou GLA-SQEM fornece níveis mais elevados de anticorpos de neutralização e persistência do que uma composição compreendendo gB + Pentâmero + MF59.

Respostas de Anticorpos de IgG1 e IgG2c

[00255] As respostas de anticorpos de IgG1 e IgG2c específicos de CMV gB provocadas pelos antígenos do CMV gB e pentâmero administrados sem ou com adjuvantes diferentes foram medidas por ELISA em amostras de soro individuais coletadas de todos os animais dos subgrupos 1, 2 e 3 em, respectivamente, dias 34 (2 semanas após a segunda imunização), 208 (7 meses após a série de vacinação primária) e 257 (1 mês após a injeção de reforço em M7). Os títulos médios de anticorpos ELISA (log 10 EU) estão representados na Figura 6. A técnica ELISA é detalhada na seção material e método.

[00256] Com relação às respostas dos anticorpos IgG1 e IgG2c, perfis semelhantes foram obtidos, independentemente da especificida-

de do antígeno de CMV, gB ou pentâmero, qualquer que seja o momento analisado.

[00257] Em relação aos títulos de anticorpos IgG1, todos os adjuvantes testados aumentaram significativamente os títulos de anticorpos de IgG1 em comparação com o grupo não adjuvante. Nenhuma diferença significativa foi mostrada para AF04 quando comparado ao MF59, independentemente do antígeno e do momento. Um efeito adjuvante com títulos de IgG1 significativamente mais baixos do que MF59 foi observado para PAA nos dias 34 e 208 (redução de pelo menos 2,4 vezes, todos os valores $p \leq 0,045$, teste de diferença, ajuste Dunnet unilateral), mas não no dia 257 após a 3ª injeção de reforço. Em comparação com a referência MF59, o GLA-SQEM induziu títulos IgG1 anti-gB significativamente mais baixos (redução de pelo menos 2,5 vezes, todos os valores $p \leq 0,033$, teste de diferença, ajuste Dunnet unilateral) em todos os momentos testados e títulos IgG1 antipentâmeros mais baixos (redução de pelo menos 2,7 vezes, todos os valores $p \leq 0,005$, teste de diferença, ajuste Dunnet unilateral) nos dias 208 e 257. Em relação aos títulos de anticorpos de IgG2c, todos os adjuvantes testados aumentaram significativamente os títulos de anticorpos de IgG2c em comparação com o grupo não adjuvante. Foi observado um efeito adjuvante com títulos IgG2c significativamente mais elevados do que o MF59 para todos os adjuvantes testados, isto é, PAA, AF04 e GLA-SQEM (pelo menos 11 vezes maior; todos os valores $p < 0,001$, teste de diferença, ajuste Dunnet unilateral) para IgG2c específico para gB ou pentâmero, qualquer que seja o momento.

Relação de IgG1/IgG2c por ELISA

[00258] Para avaliar a orientação Th2/Th1, as relações IgG1/IgG2c foram calculadas para todos os grupos adjuvantes e são detalhadas na Figura 7.

[00259] Como mostrado na Figura 7, as relações IgG1/IgG2c calcu-

ladas para CMV-pentâmero foram menores do que aquelas calculadas para CMV-gB e tentaram ser constantes, independentemente do momento. A emulsão de esqualeno MF59 mostrou um perfil de resposta distorcido por Th2 com a relação IgG1/IgG2 ≥ 85 para CMV-gB ou ≥ 18 para CMV-pentâmero, qualquer que seja o momento. Para todos os outros adjuvantes testados, foram obtidas relações mais baixas de IgG1/IgG2c do que MF59, com a relação IgG1/IgG2c específica para gB $\geq 7,1$ e específica para pentâmero $\geq 2,1$ com relação a AF04 e inferior ou igual a 2,4 ou 0,8 (específica para gB e pentâmero, respectivamente) com relação a PAA e GLA-SQEM, indicando um perfil de resposta mais polarizado por Th1 do que MF59 e que AF04, PAA e GLA-SQEM são adjuvantes indutores de Th1.

Resposta Celular

• Células secretoras de citocinas IL5 e IFN- γ monitoradas por FLUOROSPOT

[00260] As frequências celulares secretoras de IL5 e IFN- γ foram medidas por FLUOROSPOT em esplenócitos coletados de todos os animais dos subgrupos 1, 2 e 3, respectivamente, dias 34 (2 semanas após a segunda imunização), 208 (7 meses após a série primária de vacinação) e 257 (1 mês após a injeção de reforço em M7). Durante o ensaio FLUOROSPOT, cada suspensão de esplenócitos foi estimulada *ex vivo* durante a noite com 0,1 μ g/ml de CMV-gB recombinante ou CMV-pentâmero.

[00261] A técnica FLUOROSPOT é detalhada na seção de materiais e métodos.

[00262] Conforme mostrado na Figura 8, no dia 34, após estimulação com CMV-gB (painel A), nenhuma ou muito baixa frequência de célula secretor de IL-5 (SC) foi detectada em todos os grupos (média geométrica < 22 células secretoras de IL-5/ 10^6 esplenócitos), exceto para o grupo CMV-gB e pentâmero com adjuvante MF59 (média geo-

métrica de 60 células secretoras de IL-5/ 10^6 esplenócitos). Do mesmo modo, nenhuma ou poucas frequências de células secretoras de IFN- γ foram detectadas em todos os grupos (média geométrica < 20 células secretoras de IFN- γ / 10^6 esplenócitos).

[00263] Por outro lado, altas frequências de células secretoras de citocinas foram detectadas após a estimulação com CMV-pentâmero (Figura 8, painel B). No que diz respeito às células secretoras de IL-5, altas frequências de SC de IL-5 foram detectadas em camundongos administrados com MF59 (444 SC de IL-5/ 10^6 esplenócitos). As secreções de IL-5 detectadas nos grupos administrados com PAA e GLA-SQEM foram significativamente menores do que aquelas obtidas com MF59 (valores $p \leq 0,002$, teste de diferença, ajuste Dunnet unilateral), enquanto que não foram registradas diferenças significativas com AF04.

[00264] Com relação às frequências das células secretoras de IFN- γ , todos os adjuvantes testados, isto é, PAA, AF04 e GLA-SQEM, registraram um aumento significativo de 8 a 29 vezes na produção de IFN- γ , em comparação com MF59 (todos os valores $p \leq 0,001$, teste de diferença, ajuste Dunnet unilateral).

[00265] No dia 208, como mostrado na Figura 8, as frequências de células secretoras tanto de IL-5 quanto de IFN- γ foram baixas, qualquer que fosse o antígeno de estimulação.

[00266] No dia 257, as respostas de IL-5 e IFN- γ após estimulação com CMV-gB e CMV-pentâmero aumentaram em comparação com o dia 34, no entanto, os perfis Th1/Th2 foram conservados. No que diz respeito às células secretoras de IL-5, foram detectadas altas frequências de IL-5 SC em camundongos administrados com MF59 (268 e 2284 esplenócitos IL-5 SC/ 10^6 após estimulação com CMV-gB ou pentâmero, respectivamente).

[00267] As secreções de IL-5 detectadas nos grupos administrados

com PAA, AF04 e GLA-SQEM foram significativamente menores do que aquelas obtidas com MF59 (valores $p \leq 0,003$, teste de diferença, ajuste Dunnet unilateral).

[00268] Em relação às frequências das células secretoras de IFN- γ , todos os adjuvantes testados, isto é, PAA, AF04 e GLA-SQEM, registraram um aumento significativo das frequências de IFN- γ SC em comparação com MF59 (todos os valores $p \leq 0,001$, teste de diferença, unilateral Ajuste de Dunnet).

[00269] Em conjunto, todos os adjuvantes testados induziram um perfil de resposta geral mais tendencioso para Th-1 do que MF59, consistente com a tendência indicada pela relação IgG1/IgG2c.

[00270] Consistente com a tendência indicada pela relação IgG1/IgG2c, em conjunto, todos os adjuvantes testados induziram um perfil de resposta celular global distorcido de Th-1, enquanto que MF59 induziu um perfil de resposta celular global distorcido de Th2.

• Plasmablastos secretores de anticorpos de IgG1 e IgG2c monitorados por ELISPOT

[00271] As frequências de plasmablastos secretores de anticorpos de IgG1 e IgG2c foram medidas por FLUOROSPOT *ex vivo* em esplenócitos coletados de todos os animais dos subgrupos 1, 2 e 3, respectivamente, dias 34 (2 semanas após a segunda imunização), 208 (7 meses após a série de vacinação primária) e 257 (1 mês após a injeção de reforço em M7). Durante o ensaio ELISPOT, cada suspensão de esplenócitos foi depositada em cavidades revestidos com CMV-gB recombinante ou CMV-pentâmero para capturar anticorpos específicos de IgG1 ou IgG2c apresentados na superfície celular de plasmablasto. As células de IgG1 e IgG2c CMV-gB e as células secretoras de anticorpos específicas para pentâmero são enumeradas e relatadas de acordo com o total de células secretoras de IgG; a porcentagem de IgG1 ou IgG2c na IgG total é calculada. A técnica FLUOROSPOT é

detalhada na seção de materiais e métodos.

[00272] Como apresentado na Figura 9, as médias das frequências de células secretoras de anticorpos de IgG1 (ASC) no dia 34 variaram entre 3,8% e 20,12%, sem diferenças significativas entre todos os adjuvantes testados. Em relação às frequências de IgG2c ASC, % baixo foi detectado quando os camundongos foram administrados com CMV-gB e pentâmero adjuvante com MF59. Por outro lado, CMV-gB e pentâmero adjuvante com PAA, AF04 e GLA-SQEM induziram um % significativamente mais elevado de IgG2c ASC do que MF59 (todos os valores $p < 0,001$, teste de diferença, ajuste Dunnet unilateral), qualquer que seja a especificidade do antígeno CMV-gB ou CMV-pentâmero.

[00273] Como esperado, em relação à ASC detectada no dia 208, as respostas foram baixas, indicando que 6 meses após a série de vacinação primária, baixas taxas de plasmablastos circulantes foram detectadas nos baços de camundongos.

[00274] Trinta dias após a 3ª injeção (no dia 257), as frequências de ASC, IgG1 ou IgG2c específicas para CMV-gB ou CMV-pentâmero, aumentaram em comparação ao dia 208. Novamente, as médias das frequências de ASC de IgG1 no dia 257 estavam variando entre 3,1% e 9%, sem diferenças significativas entre todos os adjuvantes testados. Em relação às frequências de ASC de IgG2c, baixo % foi detectado quando os camundongos foram administrados com CMV-gB e pentâmero adjuvante com MF59. Ao contrário, CMV-gB e pentâmero adjuvante com PAA, AF04 e GLA-SQEM induziram um % mais elevado de ASC de IgG2c do que MF59 (todos os valores $p < 0,001$, teste de diferença, ajuste Dunnet unilateral), qualquer que seja a especificidade do antígeno CMV-gB ou CMV-pentâmero.

• Anticorpos de IgG1 e IgG2c que secretam células de memória B monitoradas por FLUOROSPOT

[00275] As frequências das células secretoras de anticorpos de

IgG1 e IgG2c foram medidas por FLUOSPOT no dia 34, 208 e 257 em esplenócitos de células B ativados e enriquecidos cultivados durante 4 dias após a estimulação *in vitro* com IL-2 e R848. A técnica FLUOSPOT é detalhada na seção de materiais e métodos.

[00276] Conforme apresentado na Figura 10, as médias das frequências de células secretoras de anticorpos de IgG1 (ASC) no dia 34 variaram entre 1,24% e 4,68%, sem diferenças significativas entre todos os adjuvantes testados e com perfis semelhantes em relação à especificidade do antígeno, CMV-gB ou CMV-pentâmero. Em relação às frequências de ASC de IgG2c, baixo % foi detectado quando os camundongos foram administrados com CMV-gB e pentâmero adjuvante com MF59. No lado oposto, CMV-gB e pentâmero adjuvante com PAA, AF04 e GLA-SQEM induziram um % significativamente mais elevado de ASC de IgG2c do que MF59 (todos os valores $p < 0,001$, teste de diferença, ajuste Dunnet unilateral), qualquer que seja a especificidade do antígeno CMV-gB ou CMV-pentâmero.

[00277] No que diz respeito à ASC detectada no dia 208, células de memória B foram detectadas principalmente para ASC de IgG1 específica para CMV-pentâmero com a % variando de 1,6% a 3,24% independentemente do adjuvante testado. Em relação às frequências de ASC IgG2c, um baixo % foi detectado quando os camundongos foram administrados com CMV-gB e pentâmero adjuvante com MF59. Por outro lado, CMV-gB e pentâmero adjuvante com PAA, AF04 e GLA-SQEM induziram o % mais elevado de ASC de IgG2c do que MF59 (todos os valores $p < 0,001$, teste de diferença, ajuste Dunnet unilateral).

[00278] Trinta dias após a 3ª injeção (no dia 257), as médias das frequências de ASC de IgG1 variaram entre 1,1% e 3,75%, sem diferenças significativas entre todos os adjuvantes testados.

[00279] Em relação às frequências de ASC de IgG2c, baixo % foi

detectado quando os camundongos foram administrados com CMV-gB e pentâmero adjuvante com MF59. Por outro lado, CMV-gB e pentâmero adjuvante com PAA e GLA-SQEM induziram um % significativamente mais elevado de ASC de IgG2c do que MF59 (todos os valores $p < 0,001$, teste de diferença, ajuste Dunnet unilateral), qualquer que seja a especificidade do antígeno, CMV-gB ou CMV-pentâmero.

[00280] Estes resultados mostram um nível de resposta de memória mais elevado com uma composição compreendendo gB + pentâmero + PAA ou AF04 ou GLA-SQEM do que uma composição compreendendo gB + pentâmero + MF59. É claro também que essa frequência mais elevada de células da memória, que é conhecida por ser o mediador da persistência da proteção, mantém um perfil de resposta predominante do tipo Th1.

EXEMPLO 2

Efeito complementar dos dois antígenos

[00281] Em uma concepção de estudo experimental, os inventores estudaram o efeito combinado de variação da dose dos dois antígenos na presença de adjuvante PAA. Para esse propósito, 11 grupos de 10 camundongos fêmeas C57/Bl6J recebidos por via intramuscular nos dias 0 e 22 doses variaram de 0 a 5 µg de pentâmero CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131 com ou sem doses variando de 1,2 a 5 µg de CMV-gB na presença de adjuvante PAA. A resposta do anticorpo foi avaliada por ELISA específico para pentâmero de gB e gH/gL/UL128/UL130/UL131 (subclasses IgG1/IgG2c) e ensaios de neutralização em D22 (com complemento, em células epiteliais ARPE-19) e D35 (com e sem complemento, em fibroblastos MRC5 e células epiteliais ARPE-19). A resposta celular foi avaliada em D35 por IFN-γ ELISPOT após estimulação *in vitro* com proteínas recombinantes de gB e pentâmero e pools de peptídeos de pentâmero.

[00282] As atividades de neutralização monitoradas nas células epi-

teliais ARPE-19 ou nos fibroblastos MRC-5 apresentaram perfis semelhantes, com títulos de neutralização mais elevados registrados nas células epiteliais do que nos fibroblastos (títulos de 2 a 5 vezes maiores nas células ARPE-19 do que nas células MRC-5).

[00283] No dia 20, (Figura 11), isto é, 20 dias após a 1ª administração, os títulos de anticorpos de neutralização que inibem a infecção de células epiteliais e fibroblastos na presença de complemento de coelho bebê aumentaram dependendo da dose administrada de gB e pentâmero gH/gL/UL128/UL130/UL131. Um aumento maior nos títulos de neutralização foi evidenciado quando a concentração de gB aumentou. Como representado na Figura 11, o gráfico de radar é orientado de acordo com a dosagem de gB e não com a dosagem de pentâmero. Portanto, um efeito linear significativo da adição de gB na parte superior do pentâmero gH/gL/UL128/UL130/UL131 foi observado nas atividades de neutralização monitoradas nas células epiteliais e nos fibroblastos ($p = 0,014$ nas células epiteliais e $p = 0,006$ nos fibroblastos).

[00284] Em resumo, na presença de complemento, a adição de gB na parte superior do pentâmero permite aumentar os títulos de SN nas células tanto epiteliais quanto fibroblásticas.

[00285] No dia 35, isto é, 14 dias após a 2ª administração, títulos de anticorpos de neutralização elevados que inibem a infecção tanto de células epiteliais quanto de fibroblastos na presença de complemento de coelho bebê foram detectados, independentemente das doses administradas de gB ou pentâmero gH/gL/UL128/UL130/UL131. As atividades de neutralização detectadas estavam em um platô sem efeito de dose significativo nem para o pentâmero nem para o gB (todos os valores $p \geq 0,240$) (Figura 12A).

[00286] No dia 35, as atividades de neutralização independentes do complemento que inibem a infecção tanto por células epiteliais quanto por fibroblastos na ausência de complemento de coelho bebê também

foram monitoradas.

[00287] Como representado na Figura 12B, na ausência de complemento, o gráfico de radar é orientado de acordo com as dosagens de pentâmero em vez das dosagens de gB, portanto, os títulos de anticorpos de neutralização independentes do complemento aumentaram muito quando a dose de pentâmero gH/gL/UL128/UL130/UL131 aumentou. Nenhum efeito dose significativo do gB foi evidenciado, enquanto que um efeito linear e quadrangular significativo foi observado para as doses crescentes do pentâmero gH/gL/UL128/UL130/UL131 ($p \leq 0,009$ para ambos os títulos de neutralização nas células ARPE-19 e MRC-5).

[00288] Em resumo, na ausência de complemento, a adição do pentâmero na parte superior de gB permite aumentar os títulos de SN nas células epiteliais e fibroblásticas.

[00289] Assim, o efeito complementar dos dois antígenos foi evidenciado pelo seu respectivo efeito na qualidade da resposta do anticorpo de neutralização. No que diz respeito à análise das respostas humorais funcionais, isto é, os anticorpos de neutralização dependentes e independentes do complemento, foi demonstrado que a combinação dos dois antígenos forneceu um modo de ação estendido para a neutralização do vírus. O CMV-gB permite aumentar os títulos de anticorpos de neutralização nas células epiteliais e fibroblastos na presença de complemento e o pentâmero CMV- gH/gL/UL128/UL130/UL131 permite alcançar o anticorpo de neutralização independente do complemento nas células epiteliais e fibroblastos.

[00290] Além disso, essa propriedade de ampliação da combinação de CMV-gB e pentâmero CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131 também foi observada nas respostas celulares induzidas. Como representado na Figura 13, painel A, uma resposta celular de IFN- γ específica foi detectada em esplenócitos de camundongos administrados com CMV-gB e

pentâmero CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131 formulados com adjuvante PAA. Uma resposta celular de IFN- γ específica mais elevada foi detectada após estimulação *ex vivo* com pentâmero recombinante CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131 do que a proteína recombinante CMV-gB. Para definir os epitopos celulares dentro do pentâmero CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131, esplenócitos de camundongos administrados com CMV-gB e pentâmero CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131 formulados com adjuvante PAA também foram estimulados *ex vivo* com pools de peptídeo de 15-mer cobrindo a sequência de cada proteína individual que constitui o pentâmero, isto é, gH, gL, UL128, UL130 e UL131. Como representado na Figura 13, painel B, uma resposta celular de IFN- γ específica sustentada foi detectada para todos os pools de peptídeo que cobrem a sequência de cada proteína individual que constitui o pentâmero, exceto UL128, para a qual a resposta celular de IFN- γ detectada foi baixa para a maioria dos camundongos testados.

[00291] Em resumo, a adição do pentâmero na parte superior de gB permite aumentar a resposta celular de IFN- γ , através da ampliação do número de epitopos celulares.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de que compreende:

- um antígeno de HCMV gB;
- um antígeno do complexo pentamérico de HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131; e
- um adjuvante indutor de Th1.

2. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que dito adjuvante indutor de Th1 induz em camundongos uma relação mais baixa de IgG1:IgG2a,c e/ou um nível de INF- γ mais elevado e/ou um nível mais baixo de IL-5 do que MF59 em uma composição compreendendo o mesmo antígeno do HCMV gB e o mesmo antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131.

3. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que dito adjuvante indutor de Th1 compreende:

- um agonista de TLR-4; ou
- um sal polimérico de ácido poliacrílico com um peso molecular médio ponderado Mw na faixa de 350 a 650 kDa.

4. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que dito adjuvante indutor de Th1 compreende:

- um agonista de TLR-4 selecionado do grupo que consiste em um lipopolissacarídeo, um monofosforil lipídeo A (MPL), um monofosforil lipídeo A 3-de-O-acilado (3D-MPL), um adjuvante de glicopiranosil lipídico (GLA), um adjuvante lipídico de segunda geração (SLA), um dímero fosfolipídico conectado por uma cadeia principal não carboidrato e um fosfato de aminoalquil glucosaminida, ou um derivado deste; ou

- um sal polimérico de ácido poliacrílico com um peso molecular médio ponderado Mw na faixa de 350 a 650 kDa.

5. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que dito adjuvante indutor de Th1 compreende um agonista de TLR-4.

6. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que dito agonista de TLR4 está em combinação com um sistema de liberação tal como nanossuspensão aquosa, fosfato de cálcio, lipossomas, virossomas, ISCOMs, micro e nanopartículas ou emulsões.

7. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que dito sistema de liberação é uma emulsão de óleo-em-água.

8. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 7, caracterizada pelo fato de que dito agonista de TLR-4 é selecionado de E6020 (número CAS: 287180-63-6) e um agonista de GLA TLR-4 (número CAS 1246298-63-4).

9. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que dito adjuvante indutor de Th1 compreende um sal polimérico de ácido poliacrílico linear ou ramificado com um peso molecular médio ponderado Mw na faixa de 350 a 650 kDa.

10. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que dito sal polimérico de ácido poliacrílico linear ou ramificado é PAA225000.

11. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que dito antígeno do HCMV gB compreende uma ou várias mutações no sítio de clivagem endoproteolítica.

12. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que dito antígeno do HCMV gB é um polipeptídeo gB de comprimento total, um polipeptídeo gB de comprimento total que carece de pelo menos uma parte do domínio da transmembrana, um polipeptídeo gB de comprimento total que carece substancialmente de todo o domínio da transmembrana, um polipeptídeo gB de comprimento total que carece de pelo menos uma parte do domínio intracelular, um polipeptídeo gB de comprimento total que carece substancialmente de todo o domínio intracelular ou um polipeptídeo gB de comprimento total que carece substancialmente tanto do domínio da transmembrana quanto do domínio intracelular.

13. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizada pelo fato de que dito antígeno do HCMV gB é gBdTm.

14. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que, no referido antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131, o antígeno gH carece de pelo menos uma parte do domínio da transmembrana, preferivelmente o antígeno gH carece substancialmente de todo o domínio da transmembrana.

15. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que dito gH compreende o ectodomínio do gH de comprimento total codificado pelo gene UL75.

16. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que o HCMV gB e o complexo pentamérico HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 são os únicos antígenos de HCMV.

17. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizada pelo fato de que é para uso como uma vacina contra o HCMV.

18. Composição imunogênica para uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que dita vacina aumenta os níveis de anticorpos de neutralização e/ou a persistência.

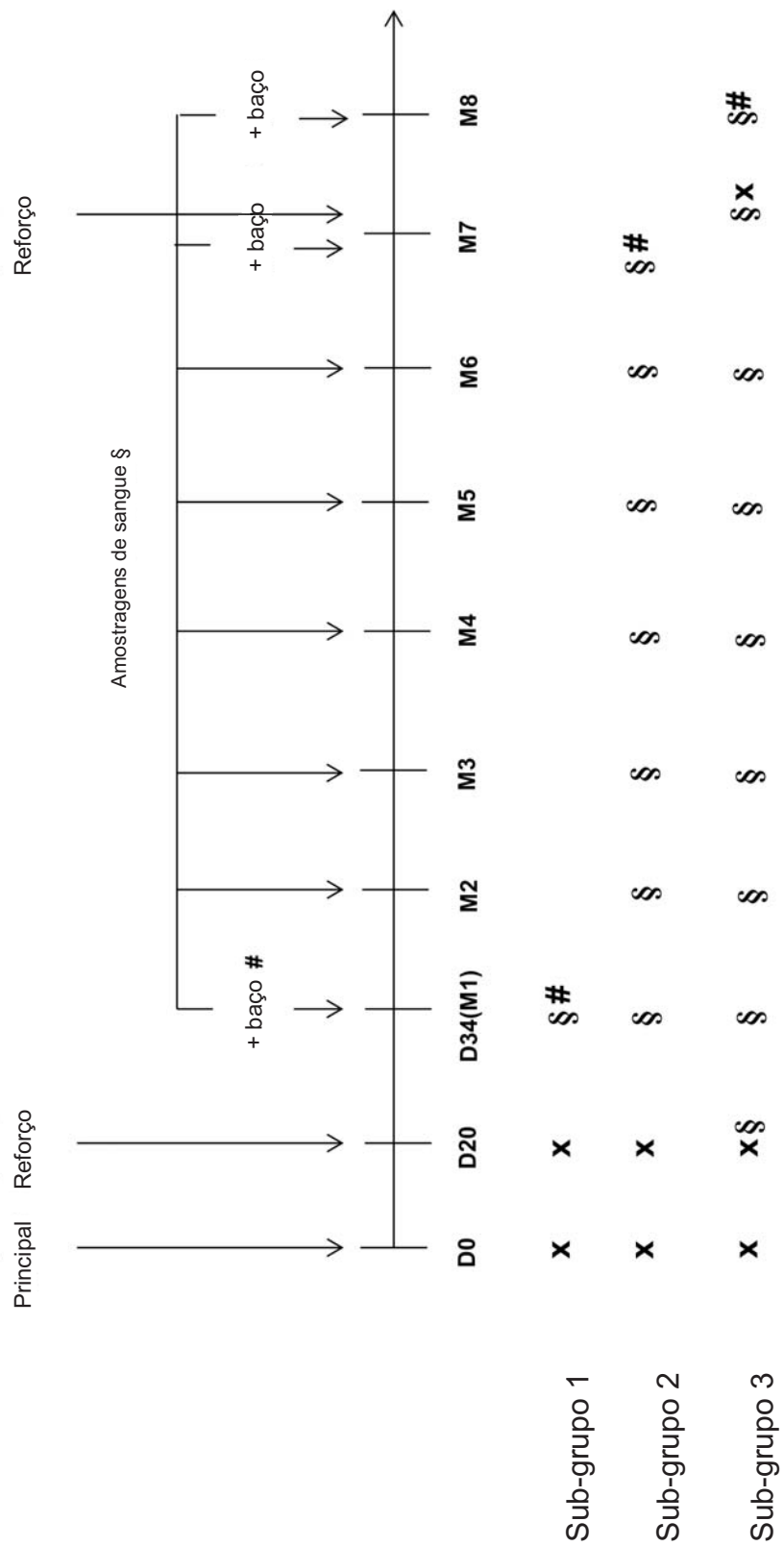
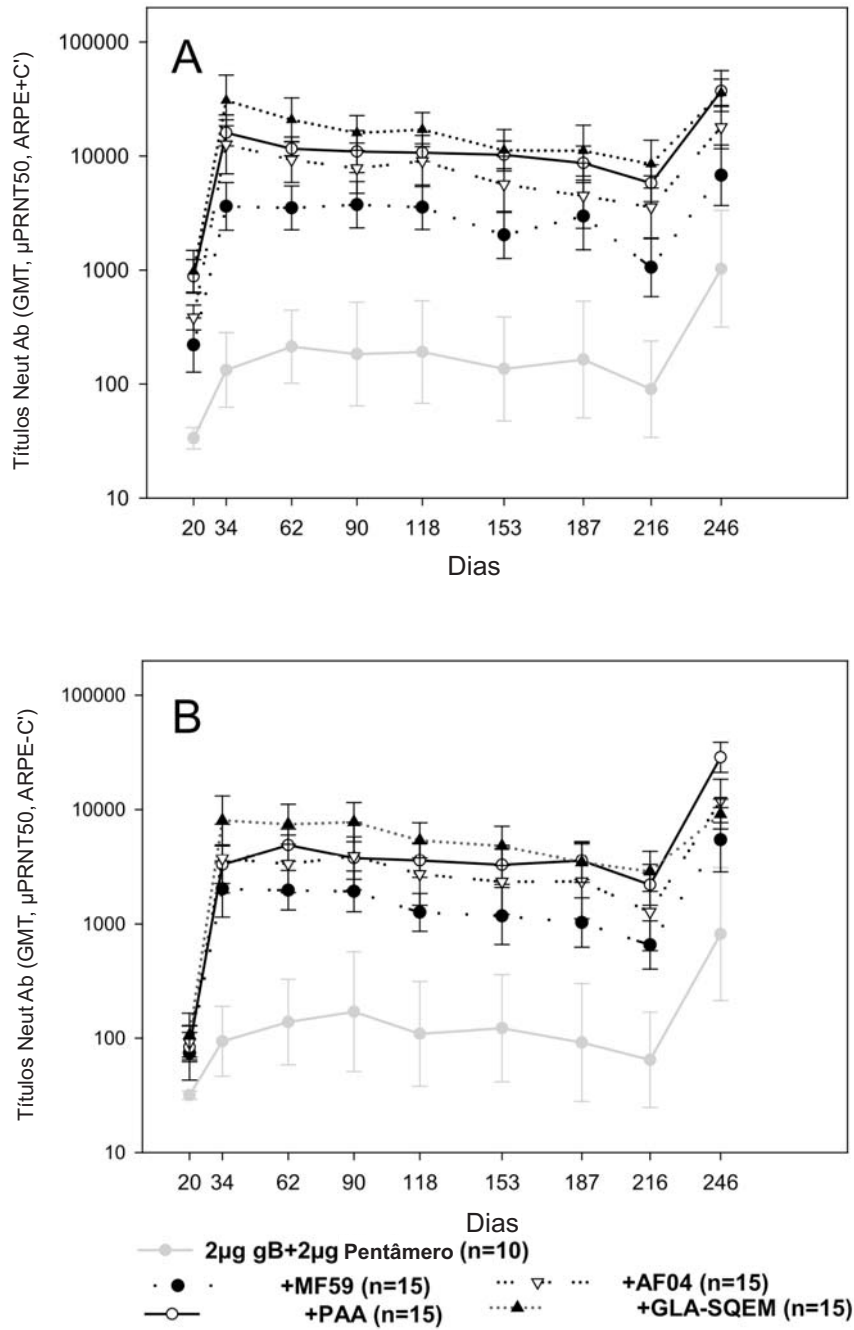
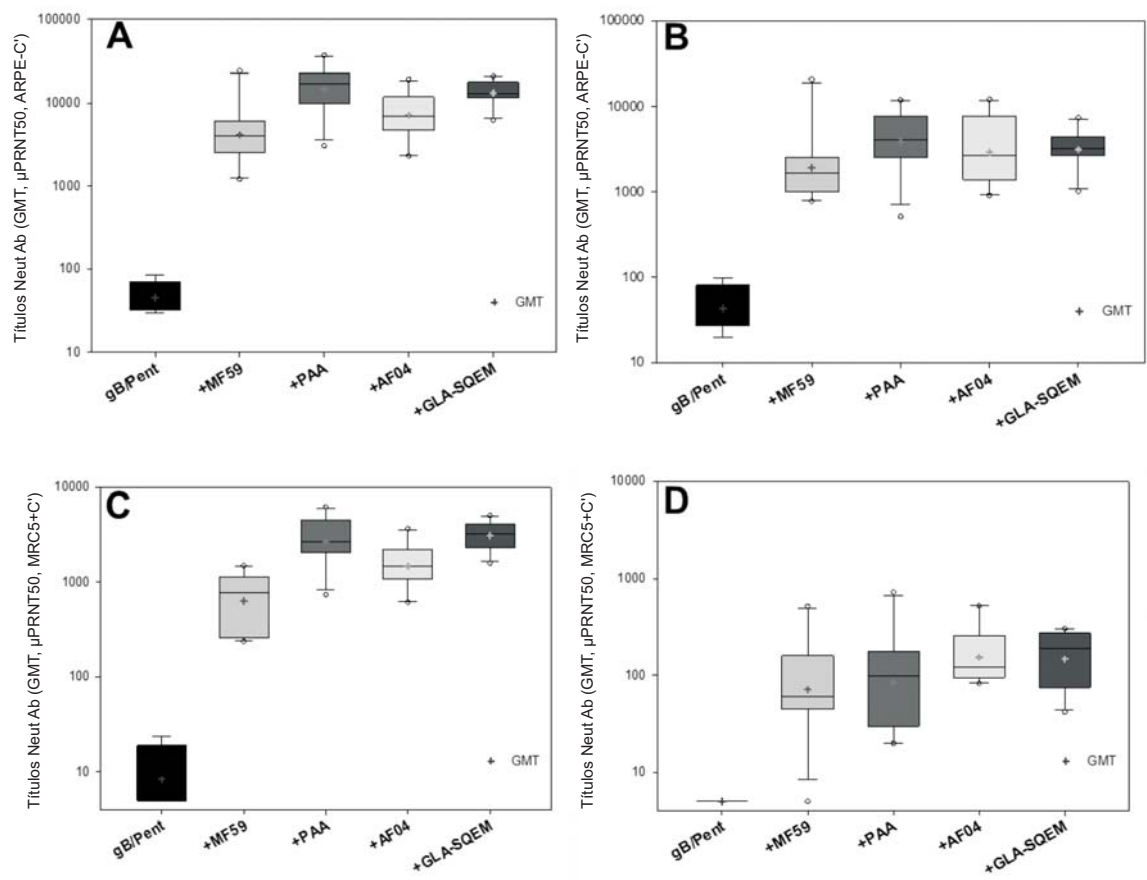
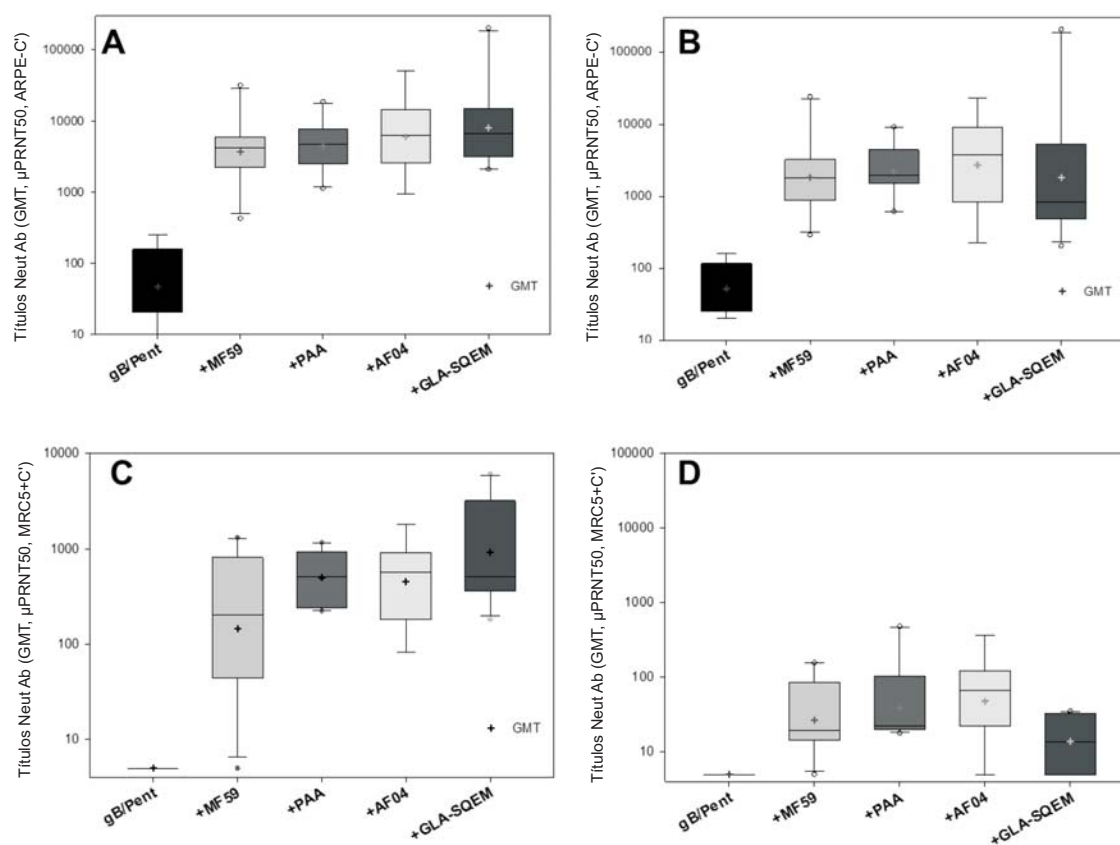
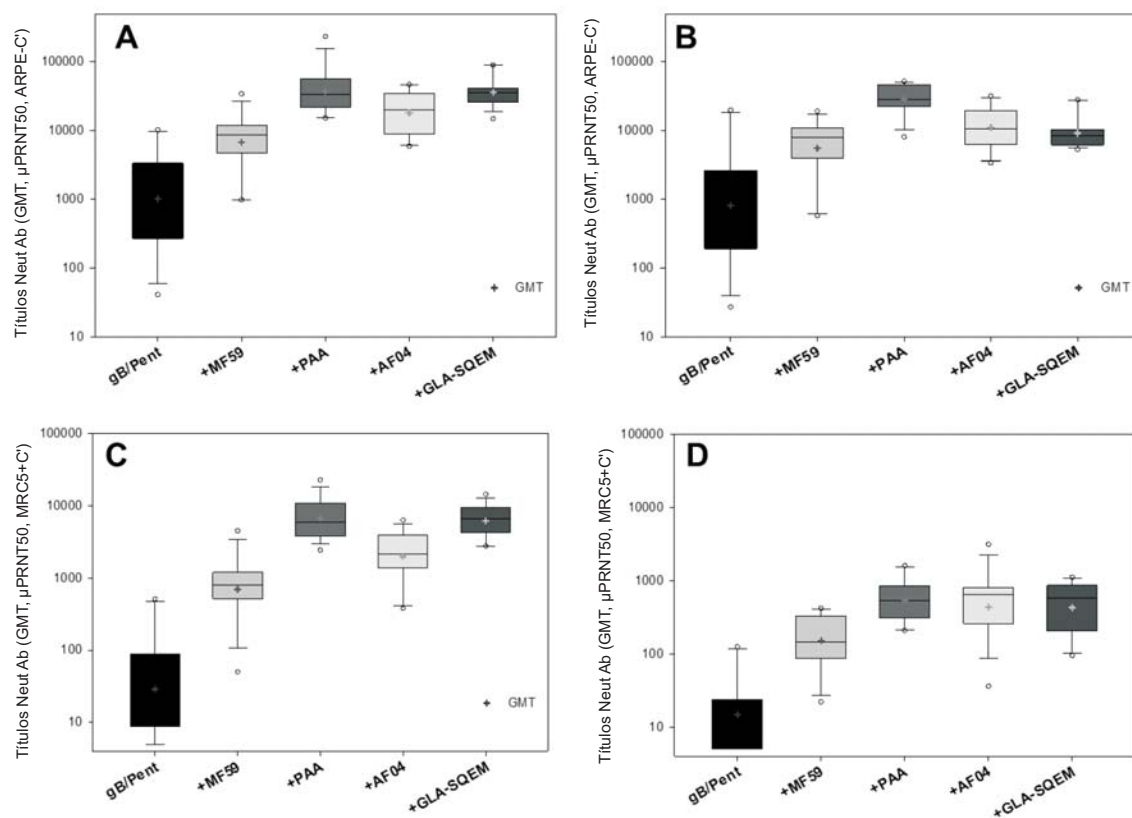


FIG. 1

**FIG. 2**

**FIG. 3**

**FIG. 4**

**FIG. 5**

A	Dia 34		Dia 208		Dia 257	
	Título de IgG1 (log10 EU)	Título de IgG2 (log10 EU)	Título de IgG1 (log10 EU)	Título de IgG2 (log10 EU)	Título de IgG1 (log10 EU)	Título de IgG2 (log10 EU)
PBS	1.00	1.00	1.00	1.39	1.11	1.27
gB e pentâmero	4.48	1.83	4.24	1.51	5.49	2.75
+MF59	6.10	4.00	5.45	3.52	6.18	4.13
+PAA	5.50	5.55	4.87	4.81	6.14	5.92
+AF04	6.00	5.14	5.48	4.49	6.17	5.29
+GLA-SQEM	5.70	5.32	4.93	4.76	5.74	5.57

B	Dia 34		Dia 208		Dia 257	
	Título de IgG1 (log10 EU)	Título de IgG2 (log10 EU)	Título de IgG1 (log10 EU)	Título de IgG2 (log10 EU)	Título de IgG1 (log10 EU)	Título de IgG2 (log10 EU)
PBS	1.00	1.00	1.00	1.14	1.00	1.08
gB e pentâmero	3.89	1.39	3.39	1.67	4.76	2.50
+MF59	5.48	4.22	4.75	3.45	5.62	4.04
+PAA	4.88	5.34	4.36	4.68	5.58	5.73
+AF04	5.64	5.30	4.84	4.32	5.53	5.22
+GLA-SQEM	5.44	5.55	4.14	4.65	5.18	5.62

FIG. 6

Adjuvantes	Tempo-ponto	MF59	PAA	AF04	GLA-SQEM
Relação de IgG1/IgG2c para gB	D34	124	0.9	7.1	2.4
	D208	85	1.2	9.7	1.5
	D257	110	1.7	7.7	1.5
Relação de IgG1/IgG2c para pentâmero	D34	18	0.3	2.2	0.8
	D208	20	0.5	3.2	0.3
	D257	30	0.7	2.1	0.4

FIG. 7

A	Dia 34		Dia 208		Dia 257	
	IL-5	IFN- γ	IL-5	IFN- γ	IL-5	IFN- γ
Formulação						
PBS	1.00	2.00	1.00	1.00	5.00	2.00
gB e pentâmero	22.00	5.00	2.00	2.00	125.00	6.00
+MF59	60.00	10.00	21.00	1.00	268.00	3.00
+PAA	5.00	15.00	9.00	1.00	38.00	11.00
+AF04	13.00	9.00	7.00	1.00	15.00	7.00
+GLA-SQEM	13.00	12.00	2.00	1.00	3.00	63.00

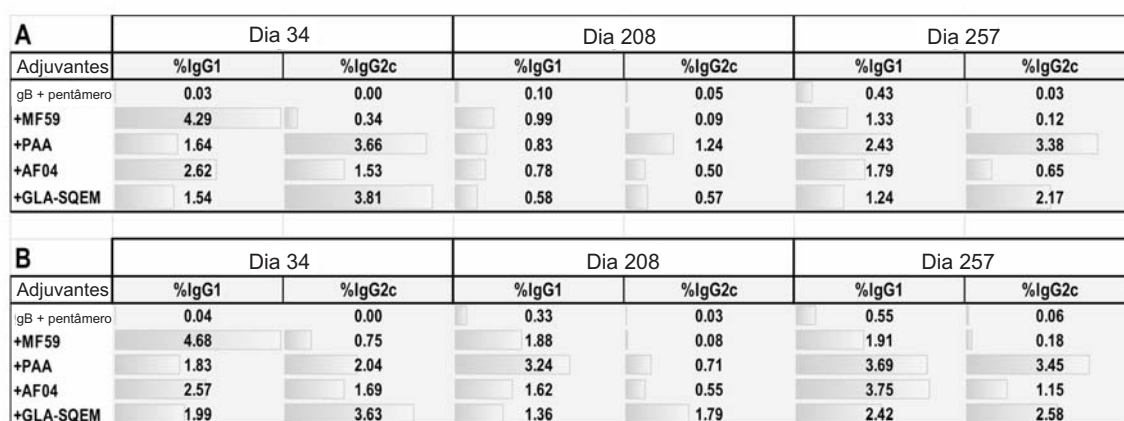
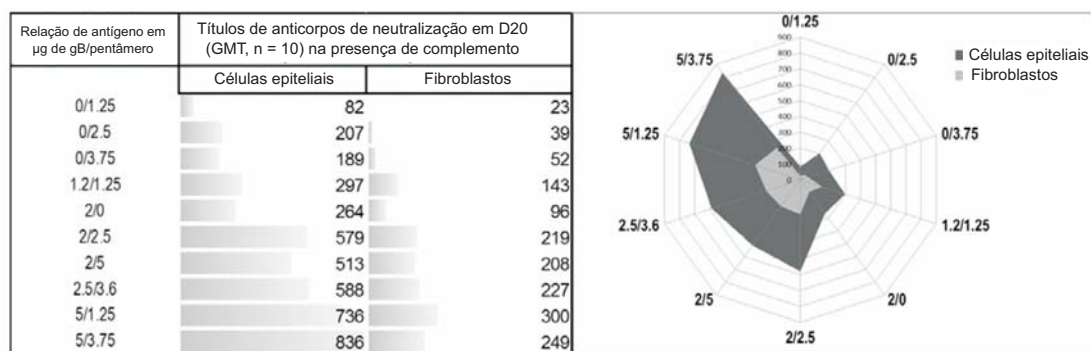
B	Dia 34		Dia 208		Dia 257	
	IL-5	IFN- γ	IL-5	IFN- γ	IL-5	IFN- γ
Formulation						
PBS	1.00	2.00	1.00	2.00	6.00	4.00
gB e pentâmero	251.00	7.00	140.00	1.00	3077.00	66.00
+MF59	444.00	26.00	277.00	1.00	2284.00	52.00
+PAA	82.00	462.00	108.00	16.00	330.00	848.00
+AF04	170.00	722.00	38.00	117.00	546.00	645.00
+GLA-SQEM	40.00	299.00	23.00	45.00	38.00	1405.00

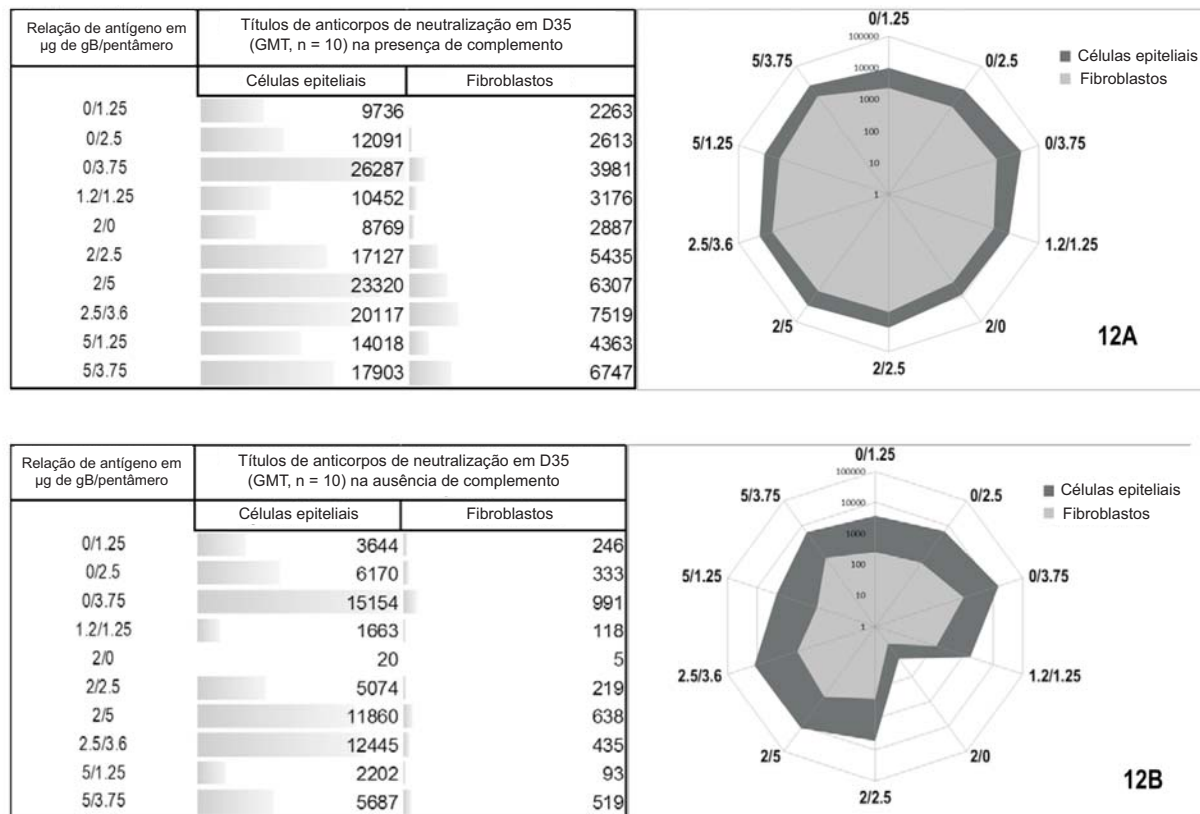
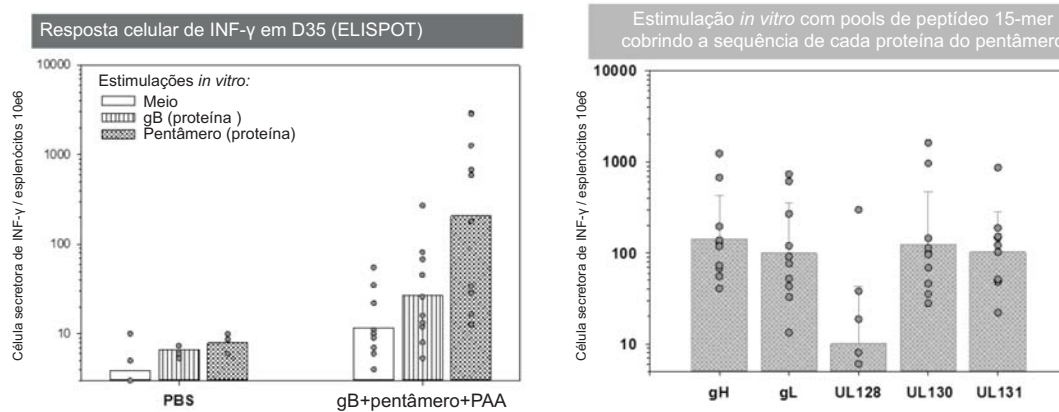
FIG. 8

A	Dia 34		Dia 208		Dia 257	
	%IgG1	%IgG2c	%IgG1	%IgG2c	%IgG1	%IgG2c
Adjuvantes						
gB + pentâmero	0.46	0.00	0.00	0.00	0.71	0.04
+MF59	12.37	0.63	0.58	0.09	3.95	0.42
+PAA	6.63	14.76	0.40	2.59	6.88	9.87
+AF04	20.12	12.24	0.57	0.30	7.42	2.87
+GLA-SQEM	4.03	3.26	0.35	1.11	2.44	4.62

B	Dia 34		Dia 208		Dia 257	
	%IgG1	%IgG2c	%IgG1	%IgG2c	%IgG1	%IgG2c
Adjuvantes						
gB + pentâmero	0.08	0.08	0.00	0.00	0.41	0.04
+MF59	7.02	0.95	0.34	0.11	3.54	0.32
+PAA	3.80	5.00	0.24	0.81	4.58	5.25
+AF04	12.03	15.00	0.64	0.55	9.00	3.81
+GLA-SQEM	7.15	4.00	0.08	1.67	3.11	5.59

FIG. 9

**FIG. 10****FIG. 11**

**FIG. 12****FIG. 13**

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA DE CITOMEGALOVÍRUS HUMANO"**.

A invenção refere-se a uma composição imunogênica compreendendo um antígeno do HCMV gB, um antígeno complexo pentamérico do HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 e um adjuvante indutor de Th1. Ainda se refere à composição imunogênica para uso como uma vacina contra o HCMV.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA P245724.TXT
- Data de Geração do Código: 10/03/2020
- Hora de Geração do Código: 08:58:34
- Código de Controle:
 - Campo 1: C9494FBDCEABE8B1
 - Campo 2: 9E2CCEBDC782281B