



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 0401466-9 A**



(22) Data de Depósito: 20/04/2004  
(43) Data de Publicação: 29/11/2005  
(RPI 1821)

(51) Int. Cl<sup>7</sup>.:  
A61K 39/12  
A61K 31/185

(54) Título: **COMPOSIÇÃO PARA INATIVAÇÃO VIRAL, PROCESSO DE INATIVAÇÃO VIRAL, VACINA E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE VACINA**

(71) Depositante(s): Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ (BR/RJ)

(72) Inventor(es): Fausto Stauffer Junqueira de Souza, Joari Marques de Miranda, Fabiana Avila Carneiro, Gisele Machado, Andrea Thompson da Poian

(74) Procurador: Alves, Vieira, Lopes & Atem Advogados

(57) Resumo: "COMPOSIÇÃO PARA INATIVAÇÃO VIRAL, PROCESSO DE INATIVAÇÃO VIRAL, VACINA E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE VACINA". A presente invenção refere-se a uma composição para inativação viral que compreende solução aquosa de DEPC (dietilpirocarbonato); a referida composição é útil para a inativação do vírus VSV em um processo de inativação viral, que por sua vez é útil para a preparação de vacinas.

## Relatório descritivo

### Composição para Inativação Viral, Processo de Inativação Viral, Vacina e Processo de Produção de Vacina

#### 5 Campo da Invenção

A presente invenção refere-se genericamente a uma composição para inativação viral, a um processo de inativação viral, a uma vacina contra o VSV e a um processo para a produção de vacina contra a VSV. Mais especificamente, refere-se a uma composição que inibe a infecção e a  
10 replicação viral, bem como o desenvolvimento da patologia estomatite vesicular em animais. A presente invenção refere-se adicionalmente a um processo de inativação viral através do contato do vírus da VSV com a substância DEPC. A inativação do VSV possibilita a obtenção de uma vacina contras as patologias causadas pelo mesmo.

15

#### Antecedentes da Invenção

A estomatite vesicular causada pelo VSV afeta bovinos, eqüinos e suínos, e suas manifestações clínicas incluem vesiculação e/ou ulceração severa na língua e nos tecidos orais, podendo, às vezes, provocar lesões nos pés e nas  
20 tetas dos animais acometidos, o que resulta em uma substancial perda de produtividade (Letchworth, G. J. *et al.* (1999) *Vet. J.* **157**, 239-260). Os sintomas desta doença são indistingüíveis daqueles observados na febre aftosa, exceto por afetar também eqüinos. A estomatite vesicular causada pelo VSV ocorre anualmente desde o sudeste dos Estados Unidos até o norte da América do Sul,  
25 passando pelo México e por toda a América Central. Nestas regiões, os sorotipos predominantes são VSV New Jersey (VSV-NJ) e VSV Indiana (VSV-IN). No Brasil, é endêmico o sorotipo Indiana 3, ou Alagoas (Federer, K. E. *et al.* (1967) *Res. Vet. Sci.* **8**, 103-117; Andrade, C. M. *et al.* (1980) *An. Microbiol. (Rio de Janeiro)* **25**, 81-87). Outros vesiculovírus são endêmicos na Índia e na África.  
30 Nos Estados Unidos os dois surtos mais recentes ocorreram em 1997 e 1998, afetando principalmente eqüinos (McCluskey, B. J. *et al.* (1999) *J. Am. Vet. Med.*

Assoc. **215**, 1259-1262). Em 1995, um grande surto atingiu rebanhos bovinos causando um impacto significativo na indústria de carne do Colorado (Bridges, V. E. *et al.* (1997) *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **211**, 556-560).

Para infectar uma célula, os vírus devem aderir à superfície celular, 5 penetrar na célula e tornar seu genoma suficientemente exposto às maquinarias enzimáticas virais e celulares para sua transcrição e tradução. A identificação de uma série de proteínas e enzimas virais essenciais para a replicação dos vírus e suficientemente diferentes das proteínas celulares viabilizou o desenvolvimento de drogas direcionadas exclusivamente a alvos virais que seriam, em princípio, 10 inofensivas às proteínas celulares. A maioria destas drogas inibe enzimas envolvidas na replicação viral, como é o caso, por exemplo, do aciclovir, que após processamento intracelular se torna um potente inibidor da DNA polimerase do vírus do herpes (Crumpacker *et al.* (1979) *Antimicrob. Agents Chemother.* **15**, 642-645); ou dos inibidores nucleosídicos e não-nucleosídicos 15 da transcriptase reversa dos retrovírus (Autran, B. *et al.* (1997) *Science* **277**, 112-116). Recentemente, o impedimento da entrada dos vírus nas células hospedeiras também vem se mostrando um alvo importante em terapias anti-virais.

#### A fusão de membranas no processo de infecção viral

20 Na classificação dos vírus um dos critérios de separação dos mesmos ocorre em função da presença ou ausência de envelopes. Para efeitos da presente invenção, serão abordados os aspectos envolvendo somente os vírus envelopados.

A internalização dos vírus envelopados sempre envolve uma etapa de 25 fusão de membranas, que pode ser a fusão direta de seu envelope com a membrana plasmática da célula, ou sua fusão com a membrana do compartimento endossomal após a acidificação (Lanzrein, M. *et al.* (1994) *Biochem. J.* **302**, 313-320; Hernandez, L. D. *et al.* (1996) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 627-661; Weissnhorn, W. *et al.* (1999) *Mol. Membr. Biol.* **16**, 3-9). A 30 fusão de membranas mediada pelos vírus envelopados é sempre catalisada

por glicoproteínas presentes no envelope viral, que sofrem mudanças conformacionais seja pela interação com o receptor na membrana plasmática, seja em decorrência da diminuição do pH no interior do endossoma, causando a exposição de regiões hidrofóbicas que interagem com a membrana alvo  
5 (Gaudin, Y. *et al.* (1995) *J. Gen. Virol.* 76, 1541-1556; Hernandez, L. D. *et al.* (1996) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 627-661; Weissnhorn, W. *et al.* (1999) *Mol. Membr. Biol.* 16, 3-9).

No primeiro caso, o mecanismo de fusão melhor caracterizado é aquele mediado pelas glicoproteínas gp120/gp41 do HIV-1 (Chan, D. C. & Kim, P. S.  
10 (1998) *Cell* 93, 681-684). A interação entre a gp120 e o receptor celular para o vírus (a molécula de CD4 e uma proteína co-receptora, CCR5 ou CXCR4) resulta em uma série de mudanças conformacionais no complexo gp120/gp41 culminando com a inserção do peptídeo hidrofóbico presente na gp41 na membrana da célula hospedeira. A proteína gp41 se dobra, formando uma  
15 estrutura conhecida como *hairpin* (grampo de cabelo) (Chan, D. C. *et al.* (1997) *Cell* 89, 263-273). Peptídeos derivados da região C-terminal da gp41 interferem na formação desta estrutura e inibem de forma bastante efetiva a infecção do HIV-1 (Wild, C. T. *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 9770-9774). Um destes peptídeos, denominado T-20, está atualmente em testes clínicos em  
20 humanos, apresentando excelentes resultados (Kilby, J. M. *et al.* (1998) *Nat. Med.* 4, 1302-1307).

No caso da fusão endossomal, a glicoproteína de fusão mais bem estudada é a do vírus influenza, a hemaglutinina (HA), cuja estrutura foi resolvida com resolução atômica tanto em pH neutro como em pH ácido (Wilson,  
25 I. A. *et al.* (1981) *Nature* 289, 366-372, Bullough, P. A. *et al.* (1994) *Nature* 371, 37-43). Em resposta à diminuição do pH, a HA sofre uma grande mudança conformacional, expondo um peptídeo hidrofóbico que se liga à membrana-alvo.

### O vírus da estomatite vesicular

O vírus da estomatite vesicular (VSV) é o membro mais estudado da família Rhabdoviridae, um grupo de vírus com grande abrangência de hospedeiros (plantas, animais invertebrados e vertebrados). Os rhabdovírus são formados por um capsídeo ribonucleico helicoidal envolto por uma membrana lipídica (Wagner, R. R. (1987) Em "The rhabdoviruses". R. R. Wagner, ed. Plenum Press, New York, pp 9-74). O capsídeo ribonucleico é composto por uma fita simples de RNA fortemente associado a uma proteína principal - a proteína N - e a duas outras proteínas - L e P - que juntas constituem a RNA polimerase viral. O envelope lipídico está associado a duas proteínas: a glicoproteína G, integral à membrana, cujos trímeros formam as espículas virais, e a proteína M, que interage com a face interna da membrana e com o capsídeo ribonucleico. O VSV se liga aos receptores celulares através da proteína G, sendo esta, então, responsável pela adsorção e infectividade viral. A entrada do vírus na célula se dá por endocitose mediada por receptor e sua replicação depende da acidificação endossomal (Matlin, K. S. *et al.* (1982) J. Mol. Biol. 156, 609-631).

### A fusão de membranas mediada pelo vírus da estomatite vesicular

A membrana do VSV possui aproximadamente 1.200 moléculas da proteína G, a glicoproteína de superfície deste vírus, sendo essa proteína envolvida em pelo menos dois passos importantes do processo de infecção do VSV: o reconhecimento da célula com conseqüente adsorção à superfície desta, e o processo de fusão de membranas, fundamental à liberação do genoma viral no citoplasma.

A fusão de membranas mediada pela proteína G depende da diminuição do pH (White, J. *et al.* (1981) J. Cell Biol. 89, 674-679). As mudanças conformacionais necessárias para a fusão têm sido motivo de vários estudos. Até o presente mostrou-se que em pH ácido ocorre a estabilização do trímero da proteína G (Doms, R. W. *et al.* (1987) J. Cell Biol. 105, 1957-1969). Os trímeros da proteína G apresentam estabilidade diferencial na presença de

octilglicosídeo e Triton X-100, sugerindo que o ambiente que circunda a seqüência de ancoramento na membrana também influencia a interação entre as subunidades da proteína G (Wilcox, M. D. *et al.* (1992) *Biochemistry* 31, 10458-10464). A proteína G não apresenta nem um domínio de fusão típico, nem uma outra seqüência hidrofóbica óbvia além da sua porção transmembrana. Desta forma, o que se acredita é que haja a formação de um domínio cuja estrutura terciária gere um ambiente hidrofóbico capaz de interagir com a membrana e mediar a fusão. Durrer e colaboradores mostraram que durante as transições conformacionais decorrentes da acidificação, um segmento do ectodomínio tornava-se capaz de interagir com membranas (Durrer, P. *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 29, 17575-17581). A fragmentação da proteína com brometo de cianogênio revelou que este segmento estava contido entre os aminoácidos 59-221.

Substituições de aminoácidos em regiões do ectodomínio da proteína G vêm sendo usadas como outra estratégia de localização do peptídeo de fusão do VSV. Mutações em resíduos presentes na região 117-137, que são altamente conservadas nos vesiculovírus, sugeriram que esta região continha o domínio de fusão (Zhang, L. & Ghosh, H. P. (1994) *J. Virol.* 68, 2186-2193; Fredericksen, B. e Whitt, M. A. (1995) *J. Virol.* 69, 1435-1443). A substituição dos resíduos de glicina, prolina e ácido aspártico conservados ou aboliram a fusão de membranas mediada pela proteína ou modificaram o pH ótimo da reação. Mutações em outra região conservada, entre os aminoácidos 395-418, também aboliram ou diminuíram a atividade de fusão (Shokralla, S. *et al.* (1998) *Virology* 256, 119-129). A importância do domínio transmembrana na fusão de membranas mediada pelo VSV também foi estudada (Odell, D. *et al.* (1997) *J. Virol.* 71, 7996-8000; Cleverley, P. Z. & Lenard, J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3425-3430). Estes trabalhos mostraram a importância de 6 resíduos presentes neste domínio (GLIIGL) e levaram à proposição de que seria necessária a dobra deste segmento em uma das glicinas para que ocorresse a formação do poro de fusão e a hemifusão propriamente dita.

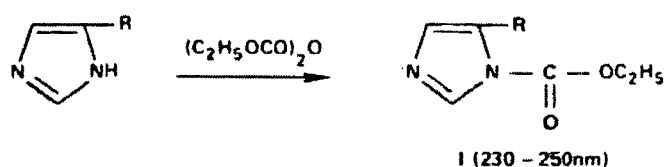
Recentemente, as mudanças estruturais sofridas por esta proteína em função da diminuição do pH e de sua interação com vesículas lipídicas foram caracterizadas, simulando o processo de endocitose do vírus e a fusão de membranas (Carneiro, F. A. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 62-67). Nesse trabalho, à medida que o pH diminui, uma dramática mudança conformacional na proteína ocorre. Primeiramente, há a exposição de um domínio hidrofóbico que interage com a membrana alvo, e em seguida ocorre perda de estruturas secundária e terciária, que, em pHs mais baixos ainda, se reorganizam em uma nova estrutura (Carneiro, F. A. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 62-67). As características e a termodinâmica da interação entre a proteína G e vesículas de diferentes composições lipídicas também foram estudadas através do uso da microscopia de força atômica, calorimetria e espectroscopia de fluorescência (Carneiro, F. A. *et al.* (2002) *J. Virol.* 76, 3756-3764). Em diferentes etapas do ciclo de infecção do vírus independente do reconhecimento da membrana, da interação com esta membrana em pH baixo, e da catálise da fusão de membranas propriamente dita, as interações determinantes são interações eletrostáticas entre regiões da proteína positivamente carregadas e fosfolipídeos negativamente carregados.

Esses resultados sugerem que as mudanças estruturais sofridas pela proteína G durante a acidificação, assim como a aquisição da capacidade de interagir com membranas negativamente carregadas, ocorrem em uma faixa de pH bastante estreita, entre 6,2 e 5,8. Esta é exatamente a faixa de pH na qual ocorre a protonação da cadeia lateral do aminoácido histidina ( $pK \sim 6,04$ ). Isso sugeriu que a protonação de resíduos de histidina presentes na proteína G seria necessária para o desencadeamento do processo de fusão. Por esse motivo para efeitos da presente invenção, a substância Dietilpirocarbonato (DEPC), cujo mecanismo de modificação específica de histidinas vem sendo estudado há anos, foi utilizada no desenvolvimento da presente invenção.

Na faixa de pH entre 5.5 e 7.5, DEPC é razoavelmente específico para reação com resíduos de histidina (Lundblad, R. L. & Noyes, C. M. (1984) em "Chemical reagents for protein modification", CRC Press, Boca Raton, Florida).

DEPC reage com resíduos de histidina em sistemas modelo e em proteínas, e resulta na substituição de uma das posições de nitrogênio do anel imidazol, gerando N-carbetoxihistidina (Miles, E. W. (1977) *Meth. Enzymol.* **47**, 431-442), como mostrado na equação 1:

5



A formação do N-carbetoxihistidina pode ser acompanhada espectrofotometricamente, com um máximo de absorção entre 230 e 250 nm (Ovádi, J. et al. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* **2**, 455-500).

10 Existem descritos na literatura vários exemplos do uso de DEPC para estudar a função de resíduos de histidina em diversas proteínas (Lundblad, R. L. & Noyes, C. M. (1984) em "Chemical reagents for protein modification", CRC Press, Boca Raton, Florida).

A partir de experimentos envolvendo vírus VSV e DEPC foi possível  
 15 mostrar que o vírus modificado perdia a capacidade de mediar a fusão de membranas devido à inibição das mudanças conformacionais na proteína G. Além disso, as seqüências modificadas pelo DEPC foram identificadas através de experimentos de espectrometria de massa, o que permitiu, a partir do uso de peptídeos sintéticos, identificar o peptídeo de fusão do VSV e caracterizar  
 20 os requerimentos necessários à sua participação na fusão de membranas mediada pelo vírus (Carneiro, F. A. et al. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 13789-13794).

Dentre as patentes relacionadas com a inativação do VSV, a patente norte americana US 4,556,556, de 1985, refere-se a um composto químico que  
 25 atua sobre partícula viral, tornando-a inativa ou atenuada, e possibilitando sua utilização em formulação de vacinas. Neste caso, o autor descreve uma vacina contra o VSV contendo partículas virais inativadas pela associação psoraleno e luz ultravioleta. Por intermédio da análise dos resultados de titulação viral,



dosagem de anticorpos em modelos animais e sobrevivência dos animais vacinados expostos ao vírus selvagem, foi demonstrado que o VSV inativado desta forma mantém sua imunogenicidade e é completamente não infeccioso, podendo por isso ser administrado com segurança como vacina. Por outro  
5 lado, a presente invenção produz efeito semelhante através da manipulação de uma única substância.

A patente europeia EP 0822819 propõe uma emulsão formada por um solvente e um carreador de óleo para aplicação tópica a fim de inibir a infecção causada particularmente pelos vírus envelopados de uma maneira geral. Essa  
10 emulsão possui a capacidade de inibir a infecção viral e a replicação. Contudo, a presente invenção produz efeito idêntico a partir da manipulação somente do solvente orgânico DEPC (dietilpirocarbonato).

O pedido norte americano US 2004/0047844 propõe compostos alquil-aminos capazes de inativar bactérias, fungos, leveduras, micoplasmas, células  
15 de mamíferos ou de outros animais, vírus ou vírus envelopados como Flaviviridae, Retroviridae, Togaviridae, Rhabdoviridae, Herpesviridae, VSV, SFV, HIV, MuLV, BVDV, e CMV. Particularmente os ingredientes ativos são aminas anfipáticas carregadas e/ ou óxidos de amina anfipáticos carregados. Ao contrário da presente invenção, para que os compostos ativos funcionem de  
20 forma eficaz, a solução deve estar dentro de uma faixa de pH específica (5,0 a 8,0), sendo preferencialmente 7,2, o que acarreta em maiores cuidados na confecção do composto de inativação biológica da US 2004/0047844A1.

Um outro exemplo de inativação viral está descrito na patente norte americana US 6,369,048. Nesse trabalho a inativação é realizada através do  
25 contato, em condições específicas, da composição biológica com um solvente orgânico pertencente ao grupo dos triacilfosfatos. Essa metodologia é útil na inativação dos vírus não envelopados e dessa forma, diminui a capacidade, bem como inibe a infecção e a replicação viral. Entretanto, a presente invenção atua inativando o vírus VSV, que compreende um vírus envelopado.

O VSV também pode ser inativado por tratamento com formalina, com  $\beta$ -propiolactona ou com luz UV (Bachmann M. F. *et al.* (1993) *J. Virol.* 67, 3917-3922; Bachmann M. F. *et al.* (1994) *Med. Microbiol. Immunol.* 183, 95-104). Nestes casos, o vírus inativado não foi capaz de induzir a produção de IgG, embora a resposta de IgM tenha se mantido inalterada. Apenas o vírus inativado por luz UV foi capaz suscitar resposta de linfócitos T citotóxicos (Bachmann M. F. *et al.* (1994) *Med. Microbiol. Immunol.* 183, 95-104). Porém, a presente invenção supera os resultados acima, ao impedir o aparecimento do infiltrado inflamatório nos cortes histológicos de animais infectados e tratados com a presente invenção, característico da reação inflamatória.

Mais recentemente, o rearranjo genético do VSV vem sendo apontado como uma forma eficiente de atenuação viral (Wertz, G. W. *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3501-3506; Flanagan, E. B. *et al.* (2001) *J. Virol.* 75, 6107-6114). O afastamento do gene da proteína N da região promotora reduziu os níveis de transcrição e da síntese da proteína N com conseqüente uma atenuação da replicação do vírus e de sua letalidade para camundongos (Wertz, G. W. *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3501-3506). A literatura patentária inclui o pedido de patente US2003/0124146, que propõe a construção de um vetor recombinante Rhabdovírus expressando um polipeptídeo antigênico do vírus da estomatite vesicular, por exemplo, a fim resultar em uma resposta imune pelo hospedeiro. Pelo fato da presente invenção não utilizar a tecnologia do DNA recombinante, a mesma permite o barateamento das etapas da produção o que economicamente permite um volume maior de produção e conseqüentemente, um beneficiamento para mais animais.

Outras patentes referem-se a compostos químicos que interferem no ciclo de vida dos vírus, ou seja, poderiam ser utilizados para o tratamento de infecções virais (drogas antivirais). É o caso da patente norte americana US 4,396,628, de 1983, que demonstra que a dansilcadaverina é mais eficaz que a amantadina e outros agentes antivirais no bloqueio da entrada do VSV em

células de camundongo. Outros compostos químicos, como compostos que contêm hipericina ou pseudohipericina (US 4,898,891, de 1990); 3-deazoadenosina (US 4,148,888, de 1979); e bases fracas parcialmente solúveis em água (EP 0095833, de 1983), também foram patenteados como  
5 antivirais. Contudo, tais mecanismos apenas atuam na diminuição da taxa de replicação viral e não propõem o desenvolvimento de uma composição de inativação viral capaz de inativar o vírus, ou seja, inibindo a infecção e a replicação do vírus VSV, bem como impedindo o desenvolvimento patológico da estomatite vesicular.

10 A presente invenção propõe a inativação do vírus VSV (vírus da estomatite vesicular) através da utilização de uma substância orgânica, o DEPC (dietilpirocarbonato). A eficiência dessa metodologia é dose dependente de DEPC, porém a dose ideal não apresenta efeito citotóxico para as células infectadas pelo vírus. Dessa forma, a presente invenção resolve o problema da  
15 inativação do vírus VSV de forma simples, menos custosa e eficaz.

### **Sumário da invenção**

É objeto da presente invenção uma composição para inativação viral, mais especificamente a inativação do vírus VSV causador da doença estomatite vesicular. Essa composição possui uma solução aquosa contendo o  
20 solvente orgânico DEPC (dietilpirocarbonato) e o vírus VSV. Ao inativar o vírus VSV, a presente invenção impede a infecção e a replicação do vírus VSV, bem como o desenvolvimento patológico da estomatite vesicular.

É um adicional objeto da presente invenção o processo de inativação viral através da contactação do mesmo com uma solução aquosa contendo o  
25 composto orgânico DEPC (dietilpirocarbonato).

Em um aspecto, os vírus inativados pelo processo da presente invenção são úteis na preparação de vacinas contra as doenças que os referidos vírus acarretam. É, portanto, um adicional objeto da presente invenção uma vacina  
30 contra as patologias causadas pelo VSV.

Em ainda outro aspecto, sendo, por tanto ainda outro objeto da presente

invenção, é provido um processo para a preparação de vacinas.

### **Breve Descrição das Figuras**

**Figura 1:** Microscopia ótica das células BHK21 tratadas ou não com DEPC após 20 horas pós-infecção com o VSV. Tratamento com DEPC inibe o efeito citopático induzido pelo VSV. Células BHK<sub>21</sub> foram infectadas com VSV tratado ou não com DEPC em diferentes concentrações. As células foram examinadas por microscopia ótica 20 horas pós-infecção. (A) Célula não infectada; (B) célula infectada com VSV tratado com DEPC 0,5 mM; (C) 0,1 mM; (D) 0,05 mM; (E) 0,01 mM; e (F) célula infectada com VSV não tratado (F). Foi utilizada uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 0,1.

**Figura 2:** Gráfico representativo da taxa de mortalidade de camundongos BALB/c infectados com VSV tratado ou não com DEPC acompanhados diariamente por 5 semanas. Sobrevivência de camundongos BALB/c infectados com VSV não tratado ou tratado com DEPC. Camundongos BALB/c foram inoculados por via intranasal com  $2,0 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> de VSV não tratado (●) ou tratado com 0,5 mM de DEPC (○). A taxa de mortalidade dos camundongos foi acompanhada diariamente por 5 semanas. Como grupo controle, camundongos foram infectados somente com PBS contendo 0,5 mM de DEPC (▲).

**Figura 3:** Cortes histológicos longitudinais passando pelo ventrículo lateral de camundongos inoculados com VSV ou com VSV tratado com DEPC. A e B - Cortes longitudinais passando pelo ventrículo lateral de camundongos inoculados com VSV (A) ou com VSV tratado com DEPC (B). Observa-se presença de infiltrado inflamatório caracterizando ventriculite (\*) em A, o que não foi observado em B (\*). HC – hipocampo (A e B barra = 50µm). C e D - Cortes longitudinais na região do bulbo olfatório corados por hematoxilina e eosina mostram a presença de infiltrado inflamatório subpial em C (seta), o que não foi observado em D (seta). CG - camada glomerular (C e D barra = 30 12,5µm).

### **Descrição Detalhada da Invenção**

De acordo com a presente invenção, a composição de inativação viral proposta impede a fusão de membranas mediada pelo vírus da estomatite vesicular, inibindo sua replicação nas células-alvo e desenvolvimento da patologia característica em modelo animal. Estes efeitos se devem à modificação de resíduos de histidina presentes na glicoproteína, localizados na superfície viral, a proteína G, pelo tratamento do vírus com dietilpirocarbonato (DEPC). A fim de potencializar o resultado da presente invenção, outros componentes podem ser usados em combinação com a composição da presente invenção. Para efeitos da mesma, os componentes podem ser químicos compreendendo substâncias orgânicas ou inorgânicas e/ ou outros componentes tais como, a irradiação ultra-violeta, a irradiação ultra-sônica, radiação iônica como a X, gama e beta ou radiação eletrônica. Adicionalmente, para efeitos da presente invenção o termo "inativação" compreende inibir a infecção e a replicação viral, bem como o desenvolvimento da patologia característica da estomatite vesicular.

Os exemplos descritos a seguir ilustram, mas não limitam a presente invenção.

### **EXEMPLOS**

#### **20 EXEMPLO 1- Efeitos do vírus VSV tratado com DEPC em amostras biológicas**

##### **A. Inibição do efeito citopático induzido pelo VSV pelo tratamento viral com DEPC**

Muitos vírus são capazes de induzir morte celular, levando a lise das células infectadas (Levine *et al.* (1993) *Nature* 361, 739-742; Agol, V. I. *et al.* (1998) *Virology* 252, 343-353). Nos últimos estágios da infecção pelo VSV, mudanças morfológicas que antecedem a morte celular causada pelo vírus, conhecidas como efeito citopático, podem ser observadas microscopicamente. O efeito citopático induzido pelo VSV é caracterizado por células arredondadas e encolhidas, núcleo deformado e cromatina condensada.

Durante a infecção de células BHK<sub>21</sub>, o efeito citopático clássico ocorre 16-20 horas pós-infecção. Sendo assim, as alterações morfológicas destas células foram observadas por microscopia após 20 horas de infecção com VSV controle e modificado com concentrações crescentes de DEPC (figura 1).

- 5 As imagens mostram uma inibição progressiva do efeito citopático induzido pelo VSV a medida que a concentração de DEPC utilizada para modificação viral aumenta. Estes resultados mostram ainda que o DEPC não é citotóxico nestas concentrações.

#### B. Inativação do VSV modificado com DEPC

- 10 Para determinar o número de partículas infectantes remanescentes nas amostras de VSV modificadas com DEPC, o VSV modificado por 15 minutos com concentrações crescentes de DEPC (0.01, 0.05, 0.1 e 0.5 mM) foi titulado pelo método de TCID<sub>50</sub> (tabela I).

**Tabela I: Titulação das amostras de VSV modificadas com DEPC.**

[DEPC] (mM)	Título (pfu/ml)
0	$1.80 \times 10^7$
0.01	$1.40 \times 10^7$
0.05	$1.60 \times 10^6$
0.1	$4.56 \times 10^4$
0.5	0

15

Comparando os títulos obtidos para as amostras modificadas com aquele obtido para o VSV controle, observamos que o tratamento com DEPC inativa o vírus de forma dose dependente. A pré-incubação do VSV com DEPC 0.5 mM inibiu completamente a infecção, havendo uma perda completa do título viral.

20

#### C. Inibição da replicação do VSV modificado com DEPC

Para avaliar a replicação do VSV, os sobrenadantes de células BHK<sub>21</sub> infectadas com uma amostra de vírus controle e com uma amostra de vírus modificado com 0.5 mM de DEPC foram coletados em 4, 8, 12, 16, 20 e 24

horas após a infecção. A replicação viral foi estimada pela presença de partículas virais infectantes nos sobrenadantes coletados quantificadas pelo método de TCID<sub>50</sub> (tabela II).

5 **Tabela II: Titulação dos sobrenadantes das culturas infectadas com VSV e VSV modificado com 0.5 mM DEPC.**

Tempo pós-infecção (horas)	Título (TCID <sub>50</sub> /ml)	
	VSV	VSV-DEPC
4	4,52 x 10 <sup>2</sup>	0
8	4,65 x 10 <sup>2</sup>	0
12	8,00 x 10 <sup>2</sup>	0
16	2,56 x 10 <sup>4</sup>	0
20	3,03 x 10 <sup>4</sup>	0
24	6,40 x 10 <sup>3</sup>	0

Os resultados obtidos mostram claramente que o tratamento com DEPC 0.5 mM inibe completamente a replicação do VSV.

10

D. Efeito da modificação do VSV com DEPC sobre a taxa de mortalidade de camundongos infectados

A inativação do vírus in vivo foi analisada através de curvas de sobrevivência de camundongos BALB/c inoculados com VSV controle e VSV modificado por pré-incubação com DEPC 0.5 mM (figura 2). Os camundongos 15 controles foram inoculados somente com uma solução de DEPC 0.5 mM.

O percentual de sobrevivência de camundongos infectados com VSV controle foi de aproximadamente 40%. Já no grupo que foi inoculado com VSV tratado com DEPC, o perfil da curva de sobrevivência foi semelhante ao do 20 grupo controle, com percentual maior que 85% 35 dias após a inoculação.

E. Efeito do tratamento do VSV com DEPC na resposta inflamatória no SNC

O VSV, quando inoculado intranasal, inicialmente se replica nos receptores olfatórios, sendo propagado para o SNC através do nervo olfatório

em menos de 12 horas. No bulbo olfatório, o vírus se replica de forma invasiva, alcançando o ventrículo após 4-5 dias de infecção (Reiss e cols. (1998) Ann N Y Acad Sci. 855, 751-761). Como resposta à replicação viral, ocorre uma reação inflamatória nestas regiões do SNC. A fim de confirmar a inativação viral *in vivo*, cortes histopatológicos do encéfalo corados pela H-E foram examinados. Nos cortes de camundongos infectados com VSV não tratado, observamos infiltrado inflamatório em resposta a infecção viral (figuras 3A e C). No entanto, os cortes histológicos de camundongos infectados com VSV tratado com DEPC 0,5 mM mostram que houve uma inibição completa da resposta inflamatória (figuras 3B e D).

#### F. Efeitos da presente invenção nos vírus envelopados

A presente invenção compreende também a inativação dos vírus pertencentes às famílias: Herpesviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Hepadnavirida, Filoviridae, Arenaviridae, Retroviridae, e Rhabdoviridae, sendo preferencialmente o VSV.

#### G. Amostras Biológicas

As amostras biológicas cujo vírus presente na mesma possa ser inativado compreendem os animais, mais especificamente os mamíferos e as suspensões celulares, mais especificamente as de animais.

### **EXEMPLO 2: Ensaio realizados**

#### A. Ensaio para propagação do vírus

VSV indiana foi propagado em monocamadas de células BHK<sub>21</sub>. As células foram crescidas em placas, a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub>, usando 10 mL de meio de cultura "Dulbecco's modified Eagle's medium" (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), antibióticos - gentamicina (5mg/mL), ampicilina (10mg/mL) - e anfotericina B (5mg/mL), tamponado com bicarbonato de sódio. Após ficarem confluentes, o meio foi removido e a monocamada de células foi infectada com VSV em uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 0,1. Após 30 minutos de infecção com o vírus na presença



de 9 mL de DMEM não suplementado, adicionamos 1 mL de FBS, e mantivemos a cultura por 16-20 horas. Após a observação do efeito citopático, coletamos o meio de cultura e centrifugamos em uma centrífuga Sorvall a 5.000 rpm, por 10 minutos, em rotor GSA.

5

#### B. Ensaio para a purificação do vírus

O sobrenadante clarificado foi centrifugado em rotor Beckman Ti45 a 30.000rpm, por 2,5 horas. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em tampão 3E (Tris 0,12M; acetado de sódio 0,06M; EDTA 3 mM; pH 7,4) e centrifugado em gradiente contínuo de 5-40 % de sacarose (em tampão 3E) por 1 hora a 39.000 rpm, em rotor Beckman SW-41. A banda referente ao vírus foi coletada, dialisada contra tampão Tris-HCl 10mM pH 7,5. O estoque de vírus foi mantido em freezer -70°C. O título viral foi determinado por método de TCID<sub>50</sub> (Reed, L. J. & Muench, H. (1938) Am. J. Hyg. 27, 493-497) em monocamadas de células BHK<sub>21</sub> com 80% de confluência em placas de 96 poços.

15

#### C. Ensaio em células BHK<sub>21</sub> do vírus VSV tratado com DEPC

Soluções de DEPC foram preparadas antes do experimento pela diluição do reagente em etanol e posteriormente em PBS 1x. A concentração do estoque de DEPC era determinada pela reação com imidazol 10mM (Miles, E. W. (1977) Meth. Enzymol. 47, 431-442. Para inativação viral, VSV foi pré-incubado com diferentes concentrações de DEPC por 15 minutos a 25°C, variando de 0,01 a 0,5 mM. A pré-incubação do VSV com volume equivalente de etanol foi realizado como controle do experimento. A quantidade de etanol na solução final de incubação era menor que 1%.

25

Para estudo da inibição de infecção *in vitro*, foi determinado o TCID<sub>50</sub> do VSV controle e modificado com DEPC 0,01; 0,05; 0,1; e 0,5 mM. Além disso, monocamadas de células BHK<sub>21</sub> em placas de 6 poços foram infectadas com VSV controle e modificado com DEPC 0,005; 0,01; 0,05; e 0,1 mM numa m.o.i.

30

de 0,1. Após 20 horas de infecção, fotos foram tiradas em microscópio de contraste de fase, acoplado a uma câmera fotográfica (aumento de 10x).

Para estudo da inibição de replicação, infectamos monocamadas de células BHK<sub>21</sub> em placas de 6 poços com VSV controle e modificado com 0,5 mM em uma m.o.i. de 0,1. Após 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas, os sobrenadantes foram coletados para determinação do TCID<sub>50</sub>.

#### D. Ensaio em camundongos BALB/c do vírus VSV tratado com DEPC

Foram selecionados camundongos BALB/c do sexo masculino com seis a oito semanas de idade. Para realização da curva de sobrevivência, estes camundongos foram divididos em três grupos: controle, VSV e VSV-DEPC. No grupo VSV, os camundongos foram infectados com dose de  $2,0 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> de VSV. No grupo VSV-DEPC, antes da inoculação o VSV foi tratado com DEPC 0,5 mM como descrito acima. No controle, foram inoculados somente DEPC 0,5 mM diluído em PBS. Em todos os grupos, a inoculação foi feita por via intranasal e com mesmo volume. Os camundongos foram acompanhados diariamente por 45 dias.

#### E. Efeitos no sistema nervoso central (SNC)

Para avaliar a inibição da infecção do VSV tratado com DEPC no SNC, camundongos infectados com VSV controle e que apresentavam sinais e sintomas da doença foram sacrificados e seus encéfalos fixados com formalina 10% e incluídos em parafina. Cortes histológicos longitudinais com  $5\mu$  e foram corados por hematoxilina e eosina para observação de alterações morfológicas. O mesmo foi feito com os encéfalos de camundongos infectados com VSV tratado com 0,5 mM de DEPC. Os cortes foram analisados e fotografados em microscópio Olympus BX50.

Os versados na arte apreciarão que a aplicação, a um animal, de uma composição compreendendo o VSV inativado conforme a presente invenção pode proporcionar a obtenção de resposta imune protetiva no referido animal. Conseqüentemente, está compreendida no escopo da presente invenção uma

vacina contra as patologias causadas pelo VSV e também um processo de produção da referida vacina.

### Reivindicações

#### Composição para Inativação Viral, Processo de Inativação Viral, Vacina e Processo de Produção de Vacina

- 5 1. Composição para inativação viral caracterizada pelo fato de compreender o solvente orgânico DEPC (dietilpirocarbonato) em solução aquosa.
2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de adicionalmente compreender anidrido etoxifórmico, dietiloxidiformato e dietildicarbonato.
- 10 3. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de adicionalmente compreender outras substâncias úteis para a inativação viral.
4. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de ser destinada à inativação de vírus envelopados selecionados das famílias virais: Rhabdoviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Orthomyxoviridae, Coronaviridae,
- 15 Bunyaviridae, Arenaviridae, Hepadnavirida, Paramyxoviridae, Herpesviridae, Filoviridae, e Retroviridae.
5. Processo de inativação viral caracterizado por compreender a contactação do vírus com uma solução aquosa contendo DEPC (dietilpirocarbonato).
6. Vacina caracterizada pelo fato de compreender o vírus VSV inativado com
- 20 um solvente orgânico DEPC (dietilpirocarbonato) em solução aquosa.
7. Processo de produção de vacina caracterizado pelo fato de compreender a inativação do vírus VSV com um solvente orgânico DEPC (dietilpirocarbonato) em solução aquosa.

Figura 1

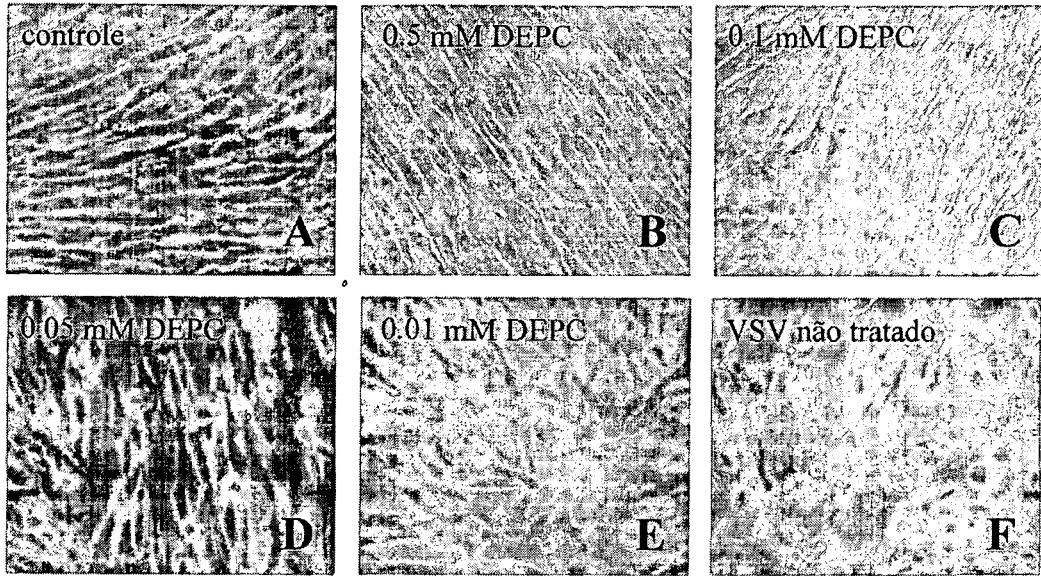


Figura 2

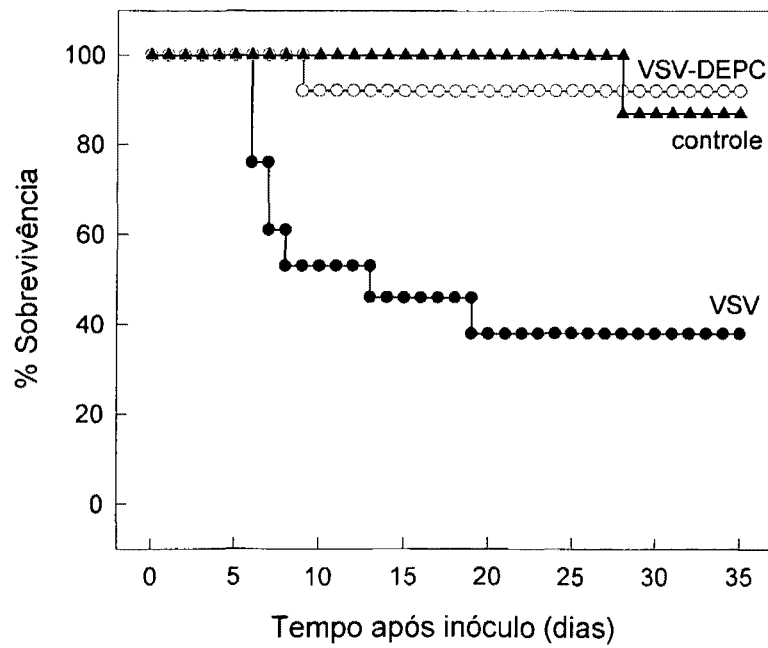
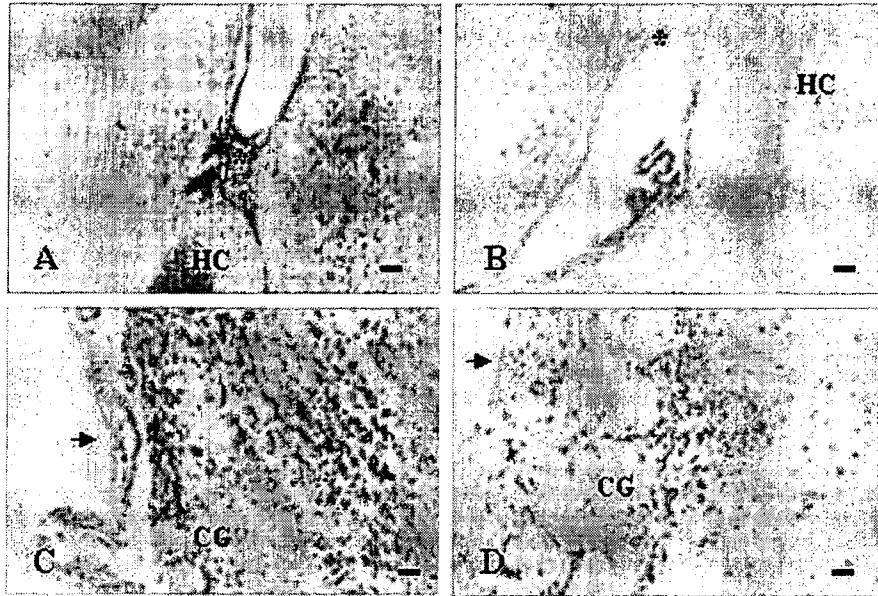


Figura 3



**Resumo****Composição para Inativação Viral, Processo de Inativação Viral, Vacina e  
Processo de Produção de Vacina**

- 5           A presente invenção refere-se a uma composição para inativação viral que compreende solução aquosa de DEPC (dietilpirocarbonato); a referida composição é útil para a inativação do vírus VSV em um processo de inativação viral, que por sua vez é útil para a preparação de vacinas.