

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

(21) **PI0619089-8 A2**

(22) Data de Depósito: 01/12/2006
(43) Data da Publicação: 13/09/2011
(RPI 2123)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/07
C12N 7/06

(54) **Título:** PARTÍCULAS VIRAIS DE PLANTAS E MÉTODOS PARA A INATIVAÇÃO DA MESMA

(30) **Prioridade Unionista:** 02/12/2005 US 60/742,197

(73) **Titular(es):** Dow Global Technologies Inc.

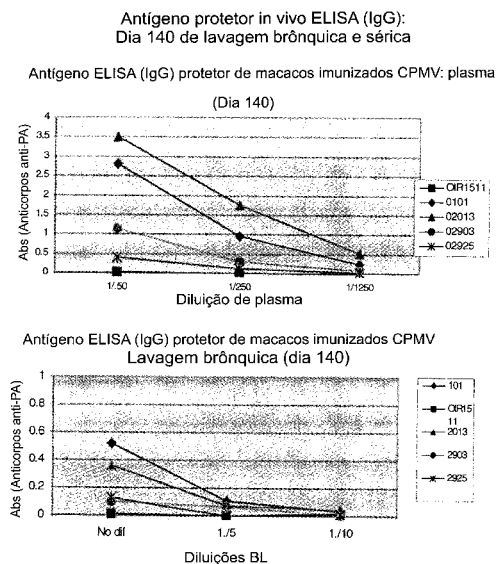
(72) **Inventor(es):** Jamie P. Phelps, Lada Rasochova

(74) **Procurador(es):** Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2006046160 de 01/12/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/085147 de 17/07/2008

(57) **Resumo:** PARTÍCULAS VIRAIS DE PLANTAS E MÉTODOS PARA A INATIVAÇÃO DA MESMA. A presente invenção refere-se aos vírus de plantas, produzidos por plantas, para uso como vacinas e similares. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a métodos de inativação simples, e partículas virais de plantas obtidas, desta maneira. A invenção descrita no presente documento proporciona meios e métodos para produzir uma vacina segura baseada em uma exibição de epitopos derivados de um agente patogênico sobre as superfícies de partículas similares a vírus de plantas inativado. Essa invenção ensina a inativação de partículas virais de plantas quiméricas e a integração da etapa de inativação no procedimento de purificação de partícula viral. O método de inativação torna o vírus incapaz de infectar plantas e a integridade de partículas virais é mantida.





Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PARTÍCULAS VIRAIS DE PLANTAS E MÉTODOS PARA A INATIVAÇÃO DA MESMA**".

DIREITOS GOVERNAMENTAIS

- 5 Esta invenção foi realizada em parte com suporte do governo sob Grant Nº 1U01AI054641-01 outorgada pelo Instituto Nacional de Saúde. O governo tem certos direitos nesta invenção.

REFERÊNCIA REMISSIVA A PEDIDOS DE DEPÓSITO CORRELATOS

- 10 Este pedido reivindica a prioridade de Pedido Provisório Nº de Série U.S. 60/742.197, depositado em 2 de dezembro de 2005, cuja descrição está incorporada à guisa de referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

- 15 A presente invenção refere-se geralmente a vírus de plantas, produzidos por plantas, para uso como vacinas e similares. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a métodos de inativação de vírus e a partículas virais de plantas como vacinas e similares.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

- 20 A vacinação pode proteger indivíduos e todas as populações de agentes infecciosos. O desenvolvimento seguro e eficaz de vacinas, entretanto, nem sempre é fácil devido a inúmeros motivos que variam de identificação de antígenos eficazes a preocupações de segurança com vacinas desenvolvidas. O uso de vírus como veículos de peptídeos estranhos foi explorado no campo de vacinas virais de composto. Tais vacinas são à base de vírus quiméricos, que são híbridos de componentes virais diferentes de
- 25 animais. Geralmente, o componente principal de tais híbridos é derivado de um vírus que é ou se tornou inócuo, e o menor componente é um componente antigênico de um vírus patogênico. Por exemplo, um poxvírus, tal como, varíola ou um poliovírus atenuado pode ser usado como um vetor para componentes imunogênicos de outros vírus animais inclusive vírus huma-
- 30 nos.

Entretanto, tais técnicas conforme discutido acima podem ser desvantajosas. Tais vacinas são produzidas a partir de vírus desenvolvidos

em sistemas de cultura celular, que podem ser onerosos de se criar e executar. A abordagem de vírus de compósito envolve a manipulação genética de vida, vírus infectante de animais, com o risco de causar mutações para novas formas do vírus com infecciosidade, antigenicidade e/ou patogenicidade alterada. Ademais, o vírus animal usado como o vetor pode ser um vírus ao qual o animal já pode ter sido exposto, e o animal já pode estar produzindo anticorpos ao vetor. Desta maneira, o vetor pode ser destruído pelo sistema imune antes de o sítio antigênico incorporado do segundo vírus induzir uma resposta imune.

10 Inúmeros métodos foram usados para a inativação de vírus em mamíferos. Esses incluem: radiação UV, radiação UV/psoraleno, produtos químicos à base de Pentose, Microondas, Formalina, BPL, pH, temperatura, e incubação em cloreto de amônio. A radiação UV foi usada para inativar vírus de plantas recombinantes. *Veja, por exemplo, Langeveld et al. (2001)*
15 "Inactivated Recombinant Plant Virus Protects Dogs from a Lethal Challenge with Canine Parvovirus", *Vaccine* 19:3661-3670.

 As patentes que refere-se a métodos para produzir as partículas e ao uso das partículas, particularmente como vacinas incluem Patente U.S. Nº 6.110.466, que discute partículas montadas de um vírus de planta que contém um peptídeo estranho predeterminado como parte da proteína capsidial do vírus e a Patente Nº U.S. 6.884.623 que discute as partículas montadas de um vírus de planta que contém um inserto peptídico estranho na proteína capsidial do vírus, onde o sítio do inserto é, de preferência, isento de repetições diretas de sequência que flanqueiam o inserto.

25 A Patente U.S. Nº 5.602.242 refere-se a vírus de RNA recombinante para encapsidação de sequências virais geneticamente engenheiradas em capsídeos heterólogos, de preferência, com capa em formato de bastão. Esta patente também refere-se a métodos para produzir e utilizar tais vírus recombinantes, especificamente com relação à transfecção de plantas para realizar alterações genotípicas e fenotípicas nas plantas. Meios para deletar ou inativar genes de proteína capsidial viral estão descritos em
30 Ahlquist et al. (1981) "Complete Nucleotide Sequence of Brome Mosaic Ví-

rus RNA3" *J. Mol. Biol.* 153:23-38.

Burge *et al.*, "Effect of Heat on Vírus Inactivation by Ammonia", *Appl. Environ. Microbiology*, Aug 46(2):446-51, 1983, discute o efeito do calor sobre a inativação do vírus com cloreto de amônio. O bacteriófago f2 e poliovírus 1 (um vírus de mamífero envelopado) foram estudados. Temperaturas acima de 40°C foram consideradas prejudiciais ao vírus testado no presente documento. Cramer WN, *et al.* "Kinetics of vírus inactivation by ammonia", *Appl Environ Microbiology*, Mar 45(3):760-5, 1983, como Burge *et al.*, usaram cloreto de amônio, em uma faixa de pHs, para tratar a rede de esgotos em uma tentativa de inativar os vírus. Novamente, o bacteriófago f2 e poliovírus 1 (cepa CHAT) foram estudados. Os resultados deste testes são registrados para mostrar que a taxa de inativação do poliovírus foi muito menos influenciada, se de alguma forma, pelo efeito de concentração de NH_4^+ do que a taxa de inativação de f2. O documento discute possíveis aplicações da metodologia de plantas em tratamento de esgoto como uma possível alternativa de cloro, particularmente elementos do grupo enterovírus.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção inclui métodos para inativar um vírus de planta através da administração de sulfato de amônio em um material vegetal selecionado do grupo que consiste em plantas, tecido vegetal, células vegetais e protoplastos em um pH acima de 8,0 para produzir uma partícula similar ao vírus inativado (VLP); incubar o material vegetal durante pelo menos dez horas; e então colher a VLP inativada do material vegetal. Esses métodos podem incluir a incorporação de um peptídeo estranho no vírus. O vírus pode estar em um vírus RNA não-envelopado. A VLP inativada pode apresentar um peptídeo um peptídeo bioativo heterólogo. O sulfato de amônio é administrado a uma concentração de 0,5M a 1,0M, geralmente a 0,7M. O pH é geralmente 9,0 e o material vegetal pode ser incubado em temperatura ambiente. A VLP é não-infecciosa, devido ao fato de esta ser desprovida de ao menos uma parte de RNA presente no vírus de planta. Adicionalmente, essa não pode iniciar a infecção mediante inoculação e é incapaz de se replicar.

A presente invenção também pode incluir a inativação de partículas virais de plantas quiméricas e a integração da etapa de inativação no procedimento de purificação de partícula viral. O método de inativação torna o vírus incapaz de infectar as plantas. A integridade da partícula viral é mantida ao mesmo tempo em que o RNA genômico viral infeccioso que está presente dentro da partícula viral é destruído. Esses métodos podem ser representados em escala e podem ser integrados no processo de purificação.

A presente invenção também inclui métodos para produzir uma VLP não-infecciosa através da administração de sulfato de amônio no material vegetal selecionado do grupo que consiste em plantas, tecidos vegetais, células vegetais e protoplastos e é desprovido de ao menos uma parte do RNA presente em um vírus de planta em um pH acima de 8,0; incubar o material vegetal durante pelo menos dez horas; e colher a VLP inativada do material vegetal, onde a VLP não é capaz de se replicar.

Adicionalmente, as modalidades da presente invenção podem incluir uma vacina, onde a vacina inclui um vírus e esse inclui um peptídeo estranho incorporado no vírus e a vacina é produzida através de um método que compreende administrar sulfato de amônio no material vegetal selecionado do grupo que consiste em plantas, tecidos vegetais, células vegetais e protoplastos em um pH acima de 8,0 para produzir uma VLP inativada; incubar o material vegetal durante pelo menos dez horas; e então, colher a VLP inativada do material vegetal. O peptídeo de VLP apresentado pode obter uma resposta imune quando a VLP for administrada em um mamífero. A vacina pode ser usada para vírus da gripe, vírus da encefalite eqüina do leste, parvovirose canina, ou *Bacillus anthracis*. Adicionalmente, a vacina pode ser uma vacina de subunidade, onde o peptídeo é uma parte de um antígeno e a parte é eficaz como uma vacina.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra o RNA extraído de um vírus ativo PA10 e um vírus inativado PA10 executado em 1,2 % de gel agarose colorido com brometo de etídio que ilustra o RNA genômico do CPMV 1 e 2 no vírus ativo e

RNA degradado na preparação de vírus inativo.

A Figura 2 ilustra um cromatograma AIEC de PA7E.

As Figuras 3 a 5 mostram a inativação de RNA por PA9, PA11 e PA18.

5 A Figura 6 mostra o gel SDS-PAGE de uma análise de estabilidade de temperatura realizada em 5 dias por PA1S.

A Figura 7 ilustra anticorpos anti-PA em macacos imunizados com CPMV-PA conforme detectado por ELISA.

10 A Figura 8 mostra anticorpos anti-PA (IgG) em soro e lavado brônquico no 140º dia.

BREVE DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

- | | | |
|----|--------------|---|
| 15 | SEQ ID NO:1 | é a sequência peptídica do Epitopo PA1 usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção. |
| 15 | SEQ ID NO:2 | é a sequência peptídica do Epitopo PA2 usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção. |
| 20 | SEQ ID NO:3 | é a sequência peptídica do Epitopo PA3 usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção. |
| 20 | SEQ ID NO:4 | é a sequência peptídica do Epitopo PA3E usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção. |
| 25 | SEQ ID NO:5 | é a sequência peptídica do Epitopo PA4 usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção. |
| 25 | SEQ ID NO:6 | é a sequência peptídica do Epitopo PA5 usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção. |
| 30 | SEQ ID NO:7 | é a sequência peptídica do Epitopo PA6 usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção. |
| 30 | SEQ ID NO:8 | é a sequência peptídica do Epitopo PA7 usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção. |
| 30 | SEQ ID NO:9 | é a sequência peptídica do Epitopo PA7E usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção. |
| 30 | SEQ ID NO:10 | é a sequência peptídica do Epitopo PA8 usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção. |
| | SEQ ID NO:11 | é a sequência peptídica do Epitopo PA9 usado de acordo |

- com o Exemplo 3 da presente invenção.
- SEQ ID NO:12 é a sequência peptídica do Epitopo PA10 usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção.
- SEQ ID NO:13 é a sequência peptídica do Epitopo PA11 usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção.
- 5 SEQ ID NO:14 é a sequência peptídica do Epitopo PA12 usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção.
- SEQ ID NO:15 é a sequência peptídica do Epitopo PA13 usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção.
- 10 SEQ ID NO:16 é a sequência peptídica do Epitopo PA14 usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção.
- SEQ ID NO:17 é a sequência peptídica do Epitopo PA15 usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção.
- SEQ ID NO:18 é a sequência peptídica do Epitopo PA16 usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção.
- 15 SEQ ID NO:19 é a sequência peptídica do Epitopo PA17 usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção.
- SEQ ID NO:20 é a sequência peptídica do Epitopo PA18 usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção.
- 20 SEQ ID NO:21 é a sequência peptídica do Epitopo PA19 usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção.
- SEQ ID NO:22 é a sequência peptídica do Epitopo PA20 usado de acordo com o Exemplo 3 da presente invenção.
- SEQ ID NO:23 é a sequência de aminoácido do antígeno protetor (PA) da presente vacina contra antraz.
- 25 SEQ ID NO:24 é a sequência de aminoácido do epítipo M2e do vírus da gripe.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

- A presente invenção será descrita agora de forma mais completa a seguir com referência às figuras em anexo, onde as modalidades da invenção são mostradas. Esta invenção pode ser, entretanto, incorporada de diversas formas diferentes e não deve ser interpretada como limitadora das
- 30

modalidades apresentadas.

A presente invenção refere-se em parte a novos métodos de inativação de vírus para preparar novas partículas similares a vírus de plantas para uso como vacinas e similares. Métodos para inativação de vírus são descritos no presente documento. A presente invenção proporciona exemplos de inativação de partículas virais de plantas quiméricas e da integração da etapa de inativação no procedimento de purificação de partícula viral. O método de inativação torna o vírus incapaz de infectar plantas. As modalidades da presente invenção podem incluir meios e métodos para produzir uma vacina segura baseada em uma exibição de epitopos derivados de um agente patogênico sobre a superfície de partículas similares a vírus de plantas inativado.

As modalidades da presente invenção incluem um procedimento eficaz e representado em escala para inativação de vírus para produzir partículas similares a vírus (VLPs) que são desprovidas do genoma infeccioso completo do vírus. Tais modalidades incluem utilizar um tampão de sulfato de amônio, geralmente em pH 9, como o tampão de extração inicial. O sulfato de amônio está referido como não-tóxico e aceitável pelas autoridades reguladoras.

As modalidades da presente invenção incluem a inativação viral com sulfato de amônio em uma faixa de pH de aproximadamente 9,0. A inativação viral pode ocorrer por meio da clivagem e degradação de RNA. As partículas virais podem se tornar permeabilizadas permitindo a entrada de íons de amônio no vírus. Portanto, a incubação com íons de amônio deveria ser realizada em um pH acima de 8,0, pois nesse nível de pH o vírus "se dissemina" e "abre" sua estrutura, desta maneira, permitindo a penetração das moléculas pequenas através da capa viral.

A presente invenção também pode proporcionar novas partículas similares a vírus RNA, desprovidas do RNA tipicamente associado com essas, onde as ditas partículas similares a vírus compreendem um antígeno apropriadamente apresentado.

As modalidades da presente invenção incluem métodos para a

integração de inativação de partículas de maneira contínua com outras operações de purificação. Estes métodos podem incluir casos em que o tecido vegetal é coletado e homogeneizado em um tampão de extração, onde o tampão consiste de sulfato de amônio em pH 9 a 0,7 M e é incubado em temperatura ambiente durante cerca de 20 h. Após a incubação, as partículas não são mais infecciosas em plantas e não podem iniciar a infecção mediante inoculação. As mesmas condições em pH 7,0 não inativaram o vírus e temperaturas maiores, isto é, 40° C foram consideradas prejudiciais à estrutura do vírus.

10 Etapas e Parâmetros de Processo Adicionais

As modalidades da presente invenção também podem incluir moer/homogeneizar o material vegetal no tampão de inativação, incubar a pasta fluida em um tampão de inativação para degradar o RNA genômico viral, e purificar as partículas virais resultantes. O material moído pode ser, adicionalmente, clarificado por centrifugação/filtração antes da incubação no tampão de inativação. Após a incubação, as partículas podem ser precipitadas por PEG ou através do aumento da molaridade de sulfato de amônio a um nível que faz com que a partícula se precipite a partir da solução. As etapas de cromatografia e troca de tampão geralmente seguem a etapa de inativação. A etapa de inativação pode ser integrada em qualquer ponto no procedimento de purificação. Por exemplo, em alguns procedimentos, a inativação foi integrada no processo da seguinte maneira: CPMV ligado à coluna HIC em 0,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7 ► CPMV ligado por lavado com 0,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 9 ► Eluição de CPMV com 0,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 9. As seguintes faixas podem ser utilizadas: 0,5 a 1,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH acima de 8,0 e temperatura entre 10 a 40°C.

Tipos e Seleção de Vírus Que Podem Ser Usados para Preparar VLPs

As vacinas da presente invenção podem estar na forma de antígenos e fundidas com proteínas capsidiais de vírus RNA não-envelopados (+, -, e/ou de cadeia dupla). As modalidades da presente invenção podem incluir vírus RNA de plantas juntamente com vírus RNA icosaédricos de plantas. Embora o vírus do mosaico do caupi esteja exemplificado aqui, os

métodos da presente invenção podem ser aplicados a outros vírus similares. Por exemplo, alguns vírus preferidos, para uso de acordo com a presente invenção, são:

Tabela 1

Tabela 1			
Nome	Acrônimo	Gênero	Família
Vírus do mosqueado suave clorótico do caupi	CCMV	<i>Bromovirus</i>	Bromoviridae
Vírus do mosaico do caupi	CPMV	<i>Comovirus</i>	Comoviridae
Vírus do enfezamento do tomateiro	TBSV	<i>Tombusvirus</i>	Tombusviridae
Vírus do mosaico da alfafa	AMV	<i>Alfamovirus</i>	Bromoviridae
Vírus do mosaico do capim bromo	BMV	<i>Bromovirus</i>	Bromoviridae
Vírus do mosaico do feijoeiro do sul	SBMV	<i>Sobemovirus</i>	Tombusviridae

5 A presente invenção pode ser aplicada a qualquer vírus RNA de planta. Para demonstrar este sistema, o comovírus do mosaico do caupi (CPMV) foi selecionado. A estrutura tridimensional do CPMV é conhecida, essa permite a identificação de sítios adequados para modificação sem rompimento da estrutura de partícula. Até agora, os vírus de pelo menos

10 nove gêneros de vírus de plantas e três vírus satélite ssRNA do subgrupo 2 tiveram suas estruturas terciária e quaternária resolvidas e em alta resolução. Algumas destas estão listadas acima na Tabela 1.

Um grupo exemplificado de vírus de plantas para uso como vetores é aquele cujas proteínas capsidiais possuem uma estrutura em β -barril.

15 Uma vantagem do uso de vírus que possuem uma estrutura em β -barril é que as alças entre os filamentos individuais de β -folha proporcionam sítios convenientes para a inserção de peptídeos estranhos. A modificação de uma ou mais alças pode ser uma estratégia para a expressão de peptídeos estranhos de acordo com a presente invenção. Também são possíveis inserções em outras regiões da proteína capsidial, tais como, inserções na

20 terminação-N e/ou terminação-C.

Todos os vírus de plantas que possuem simetria icosaédrica cujas estruturas foram resolvidas para se adaptar à dobra β -barril de oito cadeias como exemplificado por CPMV, e é provável que isto represente uma estrutura comum em todos os vírus icosaédricos. Todos tais vírus são adequados para uso nesta invenção para a apresentação de seqüências peptídicas estranhas, que podem ocorrer nas alças entre as β -cadeias e/ou na terminação-N e/ou terminação-C.

Os métodos para modificar as seqüências de DNA para inserir seqüências heterólogas ou estranhas são bem-conhecidos na técnica. Geralmente, a seqüência de RNA viral é convertida em uma transcrição de cDNA de comprimento total e clonada em um vetor, então modificada ao inserir um segmento de DNA estranho em uma região capaz de tolerar tal inserção sem interromper a replicação de RNA, formação de partícula ou atrapalhar a infecciosidade.

Os comovírus consistem em um grupo de pelo menos quatorze vírus de plantas que infectam predominantemente legumes. Seus genomas consistem em duas moléculas de RNA senso positivo de cadeia única de diferentes tamanhos que são separadamente encapsidadas em partículas isométricas de aproximadamente 28 nm de diâmetro. Os dois tipos de partículas de nucleoproteína são chamados de componente intermediário (M) e inferior (B) como uma consequência de seu comportamento em gradientes de densidade de cloreto de cério, os RNAs dentro das partículas que são conhecidos como RNA M e B, respectivamente. Ambos os tipos de partículas possuem uma composição de proteína idêntica que consiste em 60 cópias cada de uma proteína capsidial grande (VP37) e uma pequena (VP23). Além das partículas de nucleoproteína, as preparações de comovírus contêm uma quantidade variável de capsídeos vazios (apenas proteína) que são conhecidos como componente superior (T).

No caso do tipo de elemento do grupo comovírus, o vírus do mosaico do caupi (CPMV), sabe-se que tanto o RNA M como B são poliadenilados e possuem uma proteína pequena (VPg) covalentemente ligada à sua terminação 5'. Estudos mais limitados sobre outros comovírus sugerem

que estas características sejam divididas pelos RNAs de todos os elementos do grupo. Ambos os RNAs de CPMV foram seqüenciados e mostrados para consistir em nucleotídeos 3481 (M) e 5889 (B), excluindo-se as caudas poli (A) (van Wezenbeek et al. 1983; Lomonossoff and Shanks, 1983). Ambos os
5 RNAs contêm um único quadro de leitura aberto longo. A expressão dos produtos de gene viral ocorre através da síntese e clivagem subsequente de grandes polipeptídeos precursores. Ambos os RNAs são requeridos para infecção de todas as plantas. O maior RNA B é capaz de replicação independente em protoplastos, embora nenhuma partícula viral seja produzida
10 nesse caso (Goldbach et al., 1980). Esta observação, juntamente com estudos genéticos anteriores, foi estabelecido que as proteínas capsidiais são codificadas por RNA M, e a formação de partículas virais infecciosas depende da presença tanto do RNAs genômicos virais B como M.

Uma vantagem da família Comoviridae é que seu capsídeo contém sessenta cópias cada de 3 β -barris diferentes que podem ser individualmente manipulados. Todas as outras famílias e gêneros de vírus listados acima possuem estruturas tridimensionais similares, porém com um único tipo de β -barril. (No caso de CPMV, por exemplo, o inserto estranho pode ser feito imediatamente antes do resíduo de prolina 23 (Pro²³) na alça β B- β C
20 da proteína capsidial pequena (VP23)). Veja Patente Nº U.S.6.884.623.

A presente invenção também pode ser aplicada a vírus de plantas icosaédricas (incluindo aqueles que contêm estruturas em β -barril) cujas estruturas de cristal ainda não foram determinadas. Quando houver uma homologia de seqüência significativa dentro dos genes da proteína capsidial entre um vírus cuja estrutura de cristal é desconhecida e um segundo vírus cuja estrutura de cristal é conhecida, o alinhamento das estruturas primárias
25 irá permitir que os locais das alças entre as β -cadeias sejam deduzidos [vide Dolja, V. V. and Koonin, E. V. (1991) J. Gen. Virol., 72, pp 1481-1486]. Ademais, quando um vírus possuir apenas homologia de seqüência de proteína capsidial mínima com aqueles vírus cuja estrutura de cristal foi determinada,
30 os alinhamentos estruturais primários podem ser usados em conjunto com algoritmos de predição estruturais secundários e terciários apropriados para

permitir a determinação do local de sítios de inserção potenciais.

O CPMV e o vírus do mosqueado do feijoeiro (BPMV) mostram que as estruturas 3-D de BPMV e CPMV são muito similares e são típicas da família Comoviridae em geral.

5 CPMV compreende duas subunidades, as proteínas capsidiais pequenas (S) e as grandes (L), dessas há 60 cópias cada por partícula viral. As seqüências peptídicas estranhas podem ser expressas tanto a partir das proteínas L como S ou de ambas as proteínas capsidiais sobre o mesmo vírion.

10 CPMV é o vírus RNA bipartido. Para manipular o genoma de qualquer vírus RNA para expressar peptídeos estranhos, clones de cDNA do RNA podem ser usados. Os clones de cDNA de comprimento total de ambas as moléculas de RNA de CPMV estão disponíveis, esses podem ser manipulados para inserir seqüências de oligonucleotídeo que codificam um pep-
15 tídeo estranho. Os clones de cDNA do genoma dos vírus RNA de plantas podem ser usados para gerar transcrições *in vitro* que são infecciosas quando inoculadas em plantas.

Em um aspecto adicional da presente invenção, os clones de cDNA de RNAs de CPMV M e B foram construídos, onde o clone de cDNA
20 do RNA M contém uma seqüência de oligonucleotídeo inserida que codifica um peptídeo estranho, esses fazem uso da seqüência promotora de mosaico das nervuras da mandioca (CsVMV) ligada às extremidades 5' dos cDNAs virais para gerar transcrições infecciosas na planta. Esta técnica supera alguns dos problemas encontrados com o uso de transcrições geradas *in*
25 *vitro* e é aplicável a todos os vírus RNA de plantas.

Outros vírus podem incluir vários bromovírus, em particular o vírus do mosqueado clorótico do caupi (CCMV) e os sobemovírus, em particular, o vírus do mosaico do feijoeiro do sul (SBMV). Um segmento de RNA de um vírus tripartido também pode ser usado. Exemplos de tais vírus úteis
30 são os vírus tripartidos de Bromoviridae, tal como o vírus do mosaico do capim bromo (BMV) e vírus do mosqueado clorótico do caupi (CCMV), que são embalados em capsídeos in icosaédricos.

O genoma de BMV é dividido entre RNA's mensageiros senso 1, 2 e 3 de 3,2, 2,9 e 2,1 kb respectivamente. A proteína capsidial é codificada por RNA subgenômico 4 que é formado de RNA3. Para que as células sejam infectadas com RNA3 de BMV, as proteínas codificadas por RNA's de BMV 1 e 2 devem estar presentes. Estes três RNA's de BMV são separadamente encapsidados em partículas idênticas. Cada partícula contém 180 proteínas capsidiais. A proteína capsidial pode ser modificada para suportar inserções de peptídeo.

As proteínas capsidiais dos inúmeros vírus indicados na Tabela 1 foram comparadas. A similaridade dos elementos estruturais secundários e sua organização espacial são ilustradas na Figura 10 das Patentes norte-americanas No: 6.884.623. Qualquer alça que se situa entre as β -cadeias pode ser usada para inserção de epitopos estranhos. Entretanto, as inserções são feitas de modo que as adições fiquem expostas tanto sobre a superfície interna como externa do vírus e de modo que a montagem das subunidades de proteína capsidial e a infecciosidade do vírus não sejam eliminadas. A seleção de uma alça particular pode ser feita utilizando o conhecimento da estrutura de subunidades de proteína capsidial individuais e suas interações umas com as outras, conforme indicado pela estrutura de cristal, de modo que seja improvável que qualquer inserção interfira com a montagem do vírus. A seleção do sítio de inserção preciso pode ser feito, inicialmente, pela inspeção da estrutura de cristal, seguida por experimentação *in vivo* para identificar o sítio ótimo.

Desta maneira, a estrutura tridimensional de um vírus de plantas pode ser examinada para identificar partes de uma proteína capsidial que estão particularmente expostas à superfície do vírus e são, portanto, potencialmente bons sítios para inserção. A sequência de aminoácido da parte exposta de uma proteína capsidial também pode ser examinada para aminoácidos que rompem estruturas α -helicoidais, devido ao fato de se tratar de sítios potencialmente bons para inserção. Exemplos de aminoácidos adequados são prolina e hidroxiprolina, que em uma cadeia polipeptídica interrompem a α -hélice e criam um entortamento ou curva rígida na estrutura. As

terminações N e C da proteína capsidial também são sítios atraentes para inserções.

Tipos de Antígenos e Epitopos

As modalidades da presente invenção podem incluir métodos para vacinas de subunidade; isto é, o antígeno apresentado representa apenas um segmento ou segmentos de um antígeno que é conhecido como eficaz. Tais vacinas (antígenos) podem ser inerentemente mais seguras do que vacinas de organismos inteiros ou de proteínas inteiras, pois estas são desprovidas de toda a funcionalidade associada com o processo infectivo ou patologia da doença.

As modalidades da presente invenção podem incluir métodos para desenvolver uma vacina de subunidade contra os efeitos de infecção por antraz (*Bacillus anthracis*). Nessa vacina contra antraz, SEQ ID No: 23, os antígenos de subunidade representam segmentos de cerca de 25 amino-ácidos derivados do autodenominado antígeno protetor ou PA. Essa proteína é conhecida como eficaz no aumento de imunidade a antraz e é a base de uma nova geração de vacina contra antraz.

As vacinas contra parvovirose canina também podem ser produzidas. Veja, por exemplo, Langeveld *et al.* (2001) "Inactivated Recombinant Plant Virus Protects Dogs from a Lethal Challenge with Canine Parvovirus", *Vaccine* 19:3661-3670 e Langeveld *et al.* (1995) "Full Protection in Mink Against Mink Enteritis Virus with New Generation Canine Parvovirus Vaccines Based on Synthetic Peptide or Recombinant Protein", *Vaccine* 13:1033-1037. Essas vacinas de subunidade à base de partícula viral já provaram ser eficazes contra um patógeno viral (Parvovirus) e protegeram os animais de um desafio letal com o agente infeccioso. As partículas quiméricas estão sendo atualmente produzidas em plantas de feijão-caupi mediante a infecção da planta com os RNAs ou DNAs virais recombinantes pré-engenheirados. Mediante à inoculação, o vírus recombinante espalha célula-a-células e à longa distância. Isso resulta em uma infecção sistêmica de plantas. O tecido vegetal infectado é coletado, e as partículas virais quiméricas são extraídas, formuladas, e usadas como vacinas. De acordo com as

modalidades da presente invenção, pode ser vantajoso inativar os candidatos à vacinação para satisfazer as exigências para a proteção ambiental.

Os presentes métodos de inativação podem ser aplicados não só a partículas que exibem epitopos antigênicos que são, então, usados como vacinas, como também a partículas que exibem qualquer outro peptídeo útil, tal como, peptídeos de marcação, peptídeos antimicrobianos, e similares. Esta tecnologia também pode ser aplicada às partículas tipo selvagem ou modificadas que são, então, usadas para ligação covalente de diversas partes à superfície da partícula. Isto inclui a ligação de proteínas inclusive proteínas, peptídeos, carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos, agentes de detecção (tais como, corantes fluorescentes), agentes radioativos, ligantes de marcação antigênicos, e similares. Os complexos de partícula podem ser usados como vacinas bem como para entrega dos agentes associados a tecidos marcados e similares. Esta tecnologia também pode ser aplicada antes da encapsulação de diversos agentes, tais como, fármacos, ácidos nucleicos estranhos para expressão de genes, toxinas estranhas e similares dentro das partículas que são, então, usadas para administração e entrega do agente encapsulado.

Incluídos entre os diversos epitopos de peptídeo que podem ser usados de acordo com a presente invenção, e expressos sobre a superfície dos capsídeos, estão aqueles de patógenos virais e bacterianos e cânceres inclusive aqueles de vírus influenza, vírus da encefalite eqüina do leste e *B. anthracis*.

O peptídeo estranho, que pode ser incorporado em vírus de plantas (vide, por exemplo, WO 92/18618), pode ser de tipos bem diversos. Pode haver algumas limitações devido à natureza e tamanho do peptídeo estranho e do sítio no qual este está localizado ou sobre a partícula viral. A sequência de peptídeo não deveria interferir na capacidade de o vírus modificado se organizar quando cultivado *in vivo*. Neste relatório descritivo o termo "estranho", como aplicado a um peptídeo ou ao ácido nucleico que o codifica, significa peptídeos ou sequências de ácido nucleico que não são nativos de vírus de plantas usados como um vetor. Tais sequências podem ser

alternativamente descritas como seqüências exógenas ou heterólogas. O termo "peptídeo" inclui pequenos peptídeos e polipeptídeos. O peptídeo contém, geralmente, mais de 5 resíduos de aminoácido.

As partículas virais modificadas podem ser formadas de qualquer peptídeo biologicamente útil. Exemplos de tais peptídeos são hormônios peptídicos; enzimas; fatores de crescimento; antígenos de origem protozoária, viral, bacteriana, fungosa ou animal; anticorpos inclusive anticorpos anti-idiotípicos; imunorreguladores e citocinas, *por exemplo*, interferons e interleucinas; receptores; adesinas; e partes ou precursores de qualquer um dos tipos anteriores de peptídeo.

Entre a grande variedade de seqüências peptídicas bioativas apresentadas em vetores de vírus de plantas (de acordo com WO 92/18618, por exemplo) dá-se importância especial aos peptídeos antigênicos que são a base de vacinas, particularmente, vacinas virais e bacterianas em animais (inclusive seres humanos). Deve ser observado que as vacinas podem possuir aplicações profiláticas (isto é, prevenção de doenças) ou terapêuticas (isto é, tratamento de doenças). Para aplicações de vacina, proporciona-se um sistema de apresentação de epitopo especialmente atraente. Quando usado para tais aplicações, o componente peptídico antigênico ficará localizada apropriadamente sobre a partícula viral para ser facilmente reconhecida pelo sistema imune, por exemplo, pelo local sobre uma parte exposta da proteína capsidial do vírus. Desta maneira, em algumas modalidades da presente invenção fica estabelecido que há partículas montadas de um vírus de planta modificado que contêm um antígeno derivado de um patógeno, por exemplo, patógeno viral ou bacteriano em animais, incorporado em uma posição exposta sobre a superfície da proteína capsidial do vírus de planta. A partícula viral de planta modificada montada pode ser usada como o agente imunogênico de uma vacina. Tais partículas virais de plantas modificadas montadas que apresentam peptídeos antigênicos também possuem aplicações como o componente de apresentação de antígeno de um ensaio imunodiagnóstico para detecção de, por exemplo, patógenos de animais (inclusive seres humanos) e doenças.

Nas modalidades da presente invenção, a VLP antigênica é inativada e/ou se torna não-infecciosa enquanto mantém a integridade dos antígenos. Desta maneira, isso remove o risco de transmissão involuntária de partículas virais infecciosas, mesmo que se trate de vírus de plantas. Isso

5 pode reduzir bastante as preocupações regulatórias. Desta maneira, a transmissão e disseminação do vírus de plantas em plantas, após ser administrado no indivíduo ou animal que está sendo tratado, são bem reduzidas. Este sistema é altamente versátil com relação ao tamanho do peptídeo estranho que pode ser inserido na proteína capsidial viral. Desta maneira, os

10 peptídeos que contêm até 38 ou mais aminoácidos podem ser usados de acordo com a presente invenção.

Métodos de Administração

Os métodos de administração destes vírus, agora recombinantes, podem incluir um aerossol administrado em to membranas mucosas.

15 Entretanto, diversos métodos de administração podem ser usados de acordo com a presente invenção. Esses incluem administrações injetáveis (IP, IM, SC), ou administrações transdérmicas, intranasais ou orais.

Vírus Candidatos, sua Morfologia de Capsídeo e Inserção de Antígenos/Epitopos nos mesmos

20 O segmento de polinucleotídeo que codifica o peptídeo estranho pode ser inserido em qualquer local na proteína capsidial do vírus original que não interfere na capacidade de o vírus se replicar e infectar o hospedeiro, e isso permite a produção e apresentação apropriadas do peptídeo sobre a partícula viral modificada. Geralmente, o polinucleotídeo estranho é inserido

25 de modo que esse seja produzido como parte ou como fusão com a proteína capsidial.

As transcrições de RNA são preparadas, *in vivo*, tal como, em hospedeiros bacterianos, ou *in vitro*, como conhecido na técnica, e usadas para inocular um hospedeiro vegetal ou tecido vegetal apropriado. O RNA

30 pode ser usado na forma encapsidada ou em solução, desde que a encapsidação ocorra dentro do organismo hospedeiro. Alternativamente, o DNA viral fundido com o promotor da RMA polimerase DNA-dependente pode ser u-

sado para iniciar a transcrição dos RNAs virais *in vivo* no hospedeiro vegetal. O RNA transcrito é, então, capaz de iniciar a infecção viral no hospedeiro vegetal.

Conforme será entendido por aquele versado na técnica, um determinado vírus pode requerer condições especiais para infecciosidade e replicação ótima, inclusive a presença de genes que atuam em cis ou em trans, sendo que todos estes podem estar presentes quando infectam-se a planta ou tecido vegetal. Por exemplo, para a infecciosidade de RNA3 de BMV, a presença de RNA1 e 2 de BMV é necessária. Ademais, a infecção por um vírus que possui os genes de especificidade de hospedeiro para um determinado hospedeiro em algumas circunstâncias permite a infecção do hospedeiro por um segundo vírus que normalmente não afeta aquele hospedeiro, por exemplo, os vírus TMV e BMV misturados irão infectar tanto a cevada como o tabaco mesmo que o BMV sozinho não contamine o tabaco e o TMV sozinho não contamine a cevada (Hamilton and Nichols (1977) *Phytopathology*, 67:484-489).

As plantas podem ser transfectadas sob condições de campo e/ou estufa. A abrasão do tecido da folha é geralmente requerida para a transfecção. As plantas podem ser inoculadas a qualquer momento durante o ciclo de crescimento, de preferência, quando as plantas estiverem jovens. A seleção do vírus e os detalhes de modificação serão questões de seleção dependendo dos parâmetros conhecidos e entendidos pelos versados na técnica.

Além de modificar a proteína capsidial, outros genes adequados podem ser inseridos no genoma viral original para expressão na planta hospedeira. Esses incluem genes para a produção de peptídeos, proteínas, produtos farmacêuticos comercialmente úteis, ou qualquer outro polipeptídeo útil em plantas. Em geral, qualquer gene heterólogo cujo produto de expressão é funcional dentro da célula vegetal pode ser inserido no sistema de expressão viral descrito acima no presente documento.

A própria proteína capsidial modificada pode ser inserida em um genoma de um vírus heterólogo. Para garantir a fidelidade de tradução do

gene heterólogo da proteína capsidial também pode ser necessário modificar o códon ATG de iniciação de tradução pela proteína capsidial original se essa não estiver deletada, e isso pode ser realizado por meios conhecidos na técnica, tal como, substituição oligonucleotídeo-dirigida. Se a sequência de proteína capsidial que será adicionada possuir seu próprio códon de iniciação de tradução, deleção ou inativação do códon de iniciação, a proteína original é necessária; alternativamente, entretanto, esse pode ser mantido e usado para iniciar a tradução da sequência de proteína capsidial adicionada, desde que qualquer alteração de sequência de aminoácido introduzida dessa forma não interfira no empacotamento de RNA e formação de capsídeo.

Uma grande variedade de hospedeiros vegetais e células vegetais suscetíveis pode ser usada. Essas incluem quaisquer plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas, tecidos da planta bem como células vegetais desenvolvidas em cultura de suspensão ou que formam um calo.

15 Etapas Adicionais do Processo

Para produzir as partículas virais modificadas, o ácido nucléico viral da planta pode ser modificado ao introduzir uma sequência de nucleotídeo que codifica o peptídeo estranho (tal como, um antígeno viral ou bacteriano animal) como uma fusão com parte do genoma viral da planta que codifica a proteína capsidial, infectam plantas ou células vegetais com o ácido nucléico viral modificado, e colher partículas montadas do vírus modificado. Os vírus isolados são, então, inativados de acordo com a presente invenção.

A sequência de ácido nucléico que codifica o peptídeo estranho é tipicamente introduzida na parte do genoma viral da planta que codifica uma parte exposta da proteína capsidial. Este procedimento pode ser realizado através da manipulação de um cDNA correspondente ao RNA de um vírus RNA. No caso de um vírus RNA, uma transcrição de RNA do DNA modificado é geralmente preparada para inoculação de células vegetais, ou de preferência, plantas inteiras, para atingir uma etapa de multiplicação antes da colheita de partículas montadas do vírus modificado. Alternativamente, os clones de cDNA de vírus RNA podem ser construídos em plasmídeos de modo que as extremidades 5' das sequências de codificação de proteína

capsidial viral sejam diretamente fundidas com o sítio de iniciação transcripcional de um promotor ativo no hospedeiro vegetal. O peptídeo estranho é inicialmente expresso como parte da proteína capsidial e é, assim, produzido como parte da partícula viral inteira. O peptídeo pode ser, assim, produzido
5 como uma molécula conjugada destinada para uso como tal. Alternadamente, a modificação genética do vírus pode ser projetada para permitir a liberação do peptídeo desejado da partícula viral mediante a aplicação de agentes apropriados que irão causar a clivagem da partícula viral. Isto pode ser obtido ao inserir o aminoácido que flanqueia o peptídeo de interesse que é sensível à hidrólise ácida. Por exemplo, os aminoácidos asp-pro podem ser en-
10 genheirados para flanquear o peptídeo inserido e o peptídeo pode ser liberado da partícula por meio de tratamento com um ácido suave.

Para produzir o vírus modificado em uma escala comercial, não é necessário preparar um inoculante ineficaz (transcrição de DNA ou RNA)
15 para cada lote de produção de vírus. De preferência, um inoculante inicial pode ser usado para infectar plantas; o vírus modificado resultante pode ser amplificado nas plantas para produzir o vírus ou RNA viral total como inoculante para lotes subseqüentes.

O RNA ou DNA estranho pode ser inserido no genoma viral das
20 plantas em uma variedade de configurações. Por exemplo, esse pode ser inserido como uma adição ao ácido nucléico existente que codifica a proteína capsidial ou como uma substituição da parte da seqüência existente que codifica a proteína capsidial. Esta seleção deve ser determinada em parte pela estrutura da proteína capsidial e pela facilidade com que as adições ou
25 substituições podem ser feitas sem interferência na capacidade do vírus geneticamente modificado para organização nas partículas em plantas. A determinação do tamanho permissível e mais apropriado de adição ou deleção para os propósitos desta invenção pode ser obtida em cada caso particular, possivelmente com alguma experimentação adicional, devido à presente
30 descrição. O uso de insertos adicionais parece oferecer mais flexibilidade do que os insertos de substituição, em alguns casos.

A multiplicação de vírus modificados em plantas é capaz de pro-

duzir campos significativos. Como indicado acima, a seqüência de nucleotídeo heteróloga inserida pode incluir aquela que codifica aminoácidos que são facilmente clivados de modo que, após uma etapa de multiplicação, o material desejado possa ser separado das partículas virais. Por exemplo, 5 alguém poderia inserir dois peptídeos na proteína capsidial - um será usado para purificação da partícula modificada por, por exemplo, purificação por afinidade e clivado após a purificação; o outro poderia ser um peptídeo antigênico que será mantido sobre a partícula e usado para vacinação. Como uma alternativa de clivagem total do peptídeo, pode ser possível e desejado 10 em alguns casos, liberar o peptídeo em uma forma em que permaneça intacto dentro da maior parte do capsídeo.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, dois sítios de enzima de restrição diferentes podem ser selecionados dentro do ácido nucléico viral que codifica a proteína capsidial e o ácido nucléico é limitado 15 utilizando as enzimas de restrição apropriadas. Os pares de oligonucleotídeos complementares são sintetizados codificando o peptídeo estranho que se deseja inserir na proteína capsidial viral. Os oligonucleotídeos terminam em extremidades que são compatíveis com os sítios de enzimas de restrição permitindo, assim, a inserção no ácido nucléico viral limitado. Este procedi- 20 mento resulta na introdução de uma seqüência de nucleotídeo que codifica um peptídeo estranho na seqüência de proteína capsidial.

Como usado aqui, o termo "vírus RNA híbrido" ou "vírus RNA modificado" refere-se às seqüências de RNA viral recombinante que compreendem seqüências virais infecciosas derivadas de um vírus RNA, e um 25 segmento de polinucleotídeo de um epitopo/antígeno/peptídeo derivado de outra fonte. Desta maneira, antes da inativação, os RNAs virais híbridos ou modificados desta invenção são seqüências de RNA que compreendem seqüências virais infecciosas derivadas de um vírus RNA, e um segmento de polinucleotídeo de um epitopo/antígeno/peptídeo derivado de outro vírus, 30 bactéria, ou outras fontes. O termo "vírion RNA híbrido" ou "partícula viral híbrida" pode ser usado para se referir à forma encapsidada de tais vírus. Uma seqüência de RNA viral original adequada para receber um segmento

polinucleotídeo codificado por peptídeo inserido é um exemplo de uma sequência correspondente àquela de um vírus RNA. Essas sequências, quando modificadas por inserção ou de outra forma, são "derivadas da" sequência viral original/naturalmente ocorrente.

- 5 Tais sequências virais devem, no mínimo, possuir as funções de replicabilidade no hospedeiro e a capacidade de infectar o hospedeiro. Os determinantes de tais funções podem ser requeridos em cis ou em outros casos podem ser fornecidos em trans. Um exemplo de uma condição de replicação satisfatória em trans é a necessidade da presença das proteínas
- 10 codificadas por RNA's 1 e 2 de BMV para permitir que o RNA3 de BMV se replique em um hospedeiro. Ao contrário, certos sinais de replicação devem estar presentes em cis (isto é, diretamente ligados a derivados de RNA3) para permitir a replicação de derivados de RNA3 através do mecanismo induzido na célula infectada por RNA's 1 e 2. Outro exemplo de funções trans
- 15 são proteínas codificadas por RNA1 de CPMV para permitir que o RNA2 de CPMV se replique em um hospedeiro. Ao contrário, certos sinais de replicação devem estar presentes em cis (isto é, diretamente ligados a derivados de RNA2) para permitir a replicação de derivados de RNA2 através do mecanismo induzido na célula infectada por RNA1.
- 20 Também pode ser desejado que as sequências virais originais possuam sítios adequados para a adição de polinucleotídeos codificados por peptídeo estranhos ou heterólogos. Os termos "estranho" e "heterólogo" com referência a estes segmentos e sequências de polinucleotídeo significam
- 25 sequências que não estão no vírus original em natureza. Similarmente, o peptídeo estranho ou heterólogo refere-se aqui ao antígeno ou epitopo que foi adicionado ao sistema de expressão/produção viral. Tais polinucleotídeos estranhos ou sequências podem ser inseridos em qualquer local sem causar interferência nas funções necessárias das sequências virais originais, isto é, a capacidade de se replicar e infectar um hospedeiro. Com referência à ex
- 30 pressão em um hospedeiro, um polinucleotídeo "heterólogo" ou "isolado" é um que não está naturalmente presente no local no hospedeiro onde este foi colocado. É desejado que a colocação dos segmentos codificadores por

peptídeo heterólogo não interfira nas funções necessárias das seqüências virais originais.

Os segmentos de ácido nucléico inseridos não precisam ser naturalmente ocorrentes, porém podem ser compósitos modificados de mais de um segmento de codificação, ou codificam mais de um peptídeo/polipeptídeo. O RNA também pode ser modificado ao combinar inserções e deleções para controlar o comprimento total ou outras propriedades da molécula de RNA modificada.

As seqüências de RNA estranhas inseridas podem ser de origem não-viral ou viral, e podem corresponder tanto ao RNA como ao DNA em natureza. Estas podem ser de origem procariótica ou eucariótica, contanto que estejam em uma forma que possam ser diretamente traduzidas pelo mecanismo de tradução da célula receptora ou de outra forma reconhecidas e utilizadas para suas funções funcionais, estruturais ou reguladoras.

Qualquer planta pode ser infectada com uma seqüência de RNA desta invenção, como será avaliado pelo versado na técnica, ao proporcionar especificidade de hospedeiro e funções de replicação apropriadas. Com as construções apropriadas, outros organismos eucarióticos também podem ser infectados, bem como células simples e culturas de tecido. Esta invenção não se limita a nenhuma classe determinada de hospedeiro ou tipo de vírus RNA.

O termo "infecção sistêmica" significa infecção espalhada através do sistema do organismo hospedeiro para envolver mais do que as células no sítio de inoculação original. O organismo hospedeiro total não precisa ser infectado; certos tecidos podem ser marcados para infecção. Os tecidos preferidos são tecidos das folhas.

O termo "transfectado" como aplicado ao organismo hospedeiro significa a incorporação das seqüências virais desta invenção nas células do organismo de tal maneira que sejam replicadas nestas. Para a transfecção, o organismo não precisa ser sistemicamente infectado, porém pode ser sistemicamente infectado. Entretanto, a disseminação sistêmica do vírus não é requerida na presente invenção.

Os métodos para iniciação de infecção do organismo hospedeiro são bem-conhecidos na técnica, e qualquer método adequado pode ser usado. Um método preferido para a infecção de plantas é colocar a planta ferida em contato com uma solução que contém o vírus ou RNA viral para
5 fazer com que o vírus se replique ou contamine a planta.

As modalidades da presente invenção podem utilizar vírus de plantas como sistemas de vetor para produzir polipeptídeos tipo vacina e outros na e por meio das plantas. Um aspecto da presente invenção refere-se a partículas organizadas de um vírus RNA de planta que contém um pep-
10 tídeo estranho predeterminado como parte da proteína capsidial do vírus, onde o RNA foi removido ou se tornou não-infeccioso utilizando os métodos da presente invenção. A presente invenção também pode incluir partículas organizadas de um vírus de planta que exibe um peptídeo estranho, onde a exibição interna é possível. A presente invenção também inclui vírus que são
15 desprovidos de RNA infeccioso.

Como aplicado à preparação de vacinas, a presente invenção pode apresentar vantagens sobre as vacinas convencionais, vacinas recombinantes baseadas em vírus ou bactérias animais, e vacinas peptídicas inclusive: 1) custos de produção mais baixos, visto que rendimentos muito al-
20 tos de partículas virais puras são obteníveis de plantas infectadas, e nenhuma etapa de produção de cultura de tecido é necessária; 2) segurança aperfeiçoada, visto que os vírus de plantas são incapazes de infectar e se replicar em animais, e assim, não serão capazes de se modificar em formas virulentas, conforme pode ser o caso com vacinas virais animais convencionais
25 e recombinantes; 3) estabilidade excepcional como comovírus visto que as preparações purificadas podem ser secas e armazenadas durante muitos anos sem perder a eficácia; 4) falta de conjugação do peptídeo resultando em imunogenicidade aumentada exibindo, assim, o peptídeo sobre a superfície das partículas; e 5) vírus menores permitindo a introdução de genes
30 quiméricos por manipulação *in vitro* como comparada com a recombinação homóloga *in vivo* (transfecção).

Exceto onde indicado em contrário, os termos "um", "uma", e "o"

como usado aqui refere-se a ao menos um.

Todas as patentes, pedidos de patente, pedidos provisórios, e publicações referidas ou citadas aqui estão incorporadas à guisa de referência em sua totalidade à medida que estes não são incompatíveis com os ensinamentos explícitos deste relatório descritivo.

A seguir estão exemplos que ilustram procedimentos para praticar a invenção. Estes exemplos não deveriam ser interpretados como limitadores. Todas as porcentagens são por peso e todas as proporções de mistura de solvente são por volume exceto onde observado em contrário.

10 EXEMPLOS

Exemplo 1 - Sumário de Inativação de Partículas de CPMV

Mais de 16 partículas de CPMV diferentes (conduzindo epitopos diferentes) bem como vírus CPMV do tipo selvagem foram inativados utilizando este procedimento. O RNA foi isolado de vírus inativados e é executado em um gel para determinar se o RNA está degradado. As partículas inativadas também foram inoculadas em plantas para testar a capacidade de induzir infecção. Nenhuma das plantas inoculadas produziu infecção viral. O RNA isolado de partículas virais inativadas foi degradado em cada caso testado (vide Figura 1 como exemplo).

20 Exemplo 2 - Exemplos Adicionais de Inativação de CPMV

Um estudo foi feito para determinar se 0,8 M de sulfato de amônio pode inativar o CPMV enquanto preserva sua integridade. 0,8 M de sulfato de amônio foi usado como parte do presente processo de purificação. O aumento no pH durante o processo poderia permeabilizar o vírus, porém também poderia aumentar a concentração de NH_3 livre.

A conclusão deste estudo foi que 0,8 M de sulfato de amônio em pH 9 e em pH 7 tanto a 22°C como 40°C preservou a integridade do vírus e que a infecciosidade do vírus foi perdida apenas em pH 9. Os experimentos de controle onde o CPMV foi incubado em 30 mM de Tris-HCl a 22 e 40°C produziram partículas de CPMV completamente infectivas. A partir destes resultados, foi, adicionalmente, concluído que a combinação de 0,8 M de sulfato de amônio e pH 9 que é requerida para causar a inativação e não a

temperatura ou sulfato de amônio separadamente. Os experimentos neste estudo foram realizados em um sap celular moído ajustado para concentração de sulfato de amônio e pH apropriados e houve uma preocupação que um composto na pasta fluida estava causando inativação (por exemplo, psoralenos). Para provar ou invalidar isso, um segundo estudo foi realizado para determinar se partículas de CPMV purificadas podem ser inativadas utilizando uma combinação de sulfato de amônio e pH 9. Diversos produtos químicos de grau de pureza foram usados para determinar se algumas impurezas nos produtos químicos eram responsáveis pela inativação. Uma matriz experimental foi configurada e todas as condições testadas como mostrado na Tabela 1. 0,7 M de sulfato de amônio foi usado como parte do processo reotimizado de modo que uma fácil integração fosse possível.

Tabela 2 - Uma matriz experimental para estudo de inativação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 22 °C durante 20 h.

Nº	Pureza $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Concentração $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	30mM Tris-HCl
1	ANALAR	0,1	Sim
2	ARISTAR	0,5	Não
2		0,7	

As concentrações de 0,5 M e 0,7 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 9 inativaram o CPMV enquanto com aquela de 0,1 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 9 isso não ocorreu. A Figura 1 mostra RNA, extraído de vírus ativo e inativado, executado em 1,2 % de gel agarose e colorido com EtBr. Os resultados mostram a presença de RNA 1 e 2 genômico de CPMV no vírus ativo, e RNA degradado na preparação de vírus inativo. Os mesmos resultados foram obtidos em mais de 15 outras partículas virais quiméricas e no vírus tipo selvagem.

Exemplo 3 - Partículas de CPMV quimérico usadas nos experimentos de inativação.

As partículas quiméricas de CPMV foram engenheiradas para expressar peptídeos derivados da proteína antígeno protetor ("PA") de *Bacillus anthracis*. Os peptídeos foram expressos sobre as proteínas capsidiais grandes e/ou pequenas de CPMV, utilizando os métodos descritos nas pa-

tentes U.S. 5.874.087, 5.958.422, e 6.110.466. Os seguintes peptídeos foram expressos:

Tabela 3

Tabela 3.		
Epitopo	Seqüência Peptídica	SEQ ID NO:
PA1	SNSRKKRSTSAGPTVPDRDNDGIPD	1
PA2	SPEARHPLVAAYPIVHVDMENIILS	2
PA3	RIIFNGKDLNLVERRIAAVNPSDPL	3
PA3E	ERIIFNGKDLNLVERRIAAVNPSDPL	4
PA4	RQDGKTFIDFKKYNDKLPLYISNPN	5
PA5	SDFEKVTGRIDKNVSPEARHP	6
PA6	HVDMENIILSKNEDQSTQNTDSQTR	7
PA7	TDSQTRTISKNTSTSRHTHTSEVHGN	8
PA7E	ETDSQTRTISKNTSTSRHTHTSEVHGN	9
PA8	HGNAEVHASFFDIGGSVSAGFSNSN	10
PA9	SNSNSSTVAIDHSLSLAGERT	11
PA10	ETMGLNTADTARLNANIR	12
PA11	EPTTSLVLGKNQTLATIKAKENQE	13
PA12	PSKNLAPIALNAQDDFSSTPITMN	14
PA13	SEVLPQIQETTARIIFNGKD	15
PA14	NGKDLNLVERRIAAVNPSDPLETTK	16
PA15	ETTKPDMTLKEALKIAFGFNEPNGN	17
PA16	QGKDITEFDNFQQT SQNIKNQ	18
PA17	DRNNIAVGADSVVKEAHRE	19
PA18	REVINSSTEGLLL NIDKDIRKILSG	20
PA19	DMLNISSLRQDGKTFIDFK	21
PA20	TKENTIINPSENGDTSTNGIKK	22

Exemplo 4 - Produção de Partículas de CPMV Quimérico em Plantas.

- 5 Sementes de feijão-caupi da Califórnia nº 5 de Ferry Morse, código do produto 1450, foram germinadas durante a noite em temperatura ambiente em toalhas de papel úmidas. As sementes germinadas foram transferidas para o solo. Sete dias após a germinação as mudas foram inoculadas com WT ou partículas de CPMV quimérico. Após a inoculação, as

plantas se desenvolveram a 25°C com um fotoperíodo de 16 horas à luz 8 horas no escuro durante duas a três semanas. As folhas que mostraram sintomas foram colhidas e congeladas a -80°C antes da purificação.

Exemplo 5 - Inativação de Partículas de CPMV Quimérico e Purificação de

5 Partículas Semelhantes a Vírus CPMV Quimérico Inativado

40g de tecido da folha de CPMV foram congelados a -80°C. O tecido da folha congelado foi esmagado pelas mãos e despejado em um misturador de alta velocidade Waring, código de produto 8011S. 120ml de tampão de inativação frio (0,5M de sulfato de amônio, 0,03M de base Tris
10 pH 9,00, 0,2mM de PMSF) foram despejados nas folhas esmagadas. As folhas foram trituradas 2 vezes durante 3 segundos em alta velocidade. A solução foi decantada em uma garrafa centrífuga de 500ml. O misturador foi lavado com 30ml de tampão de inativação frio e a lavagem foi despejada em uma garrafa centrífuga de 500ml. A solução foi centrifugada a 15.000G du-
15 rante 30 minutos para remover os resíduos celulares da planta. O sobrenadante foi decantado em um cilindro graduado e incubado para inativar o vírus durante 20 horas em temperatura ambiente. Para precipitar o vírus CPMV, a solução de PEG 6000 fria (20% de PEG 6000, 1M de NaCl) foi adicionada ao sobrenadante para conduzir a concentração de PEG final para
20 4% de PEG 6000 com 0,2M de NaCl, e a solução foi suavemente misturada. A solução foi permitida para se precipitar durante 1 hora em gelo. A solução precipitada de vírus foi, então, centrifugada a 15.000G durante 30 minutos para coletar o pélete viral CPMV. O sobrenadante foi despejado e o vírus foi imediatamente ressuspenso no tampão de ligação de troca aniônica (30mM
25 de base Tris, pH 7,50). Para purificar, adicionalmente, as partículas similares a vírus, a mistura de proteína foi fracionada por cromatografia de troca aniônica utilizando a resina de troca aniônica forte POROS 50 HQ de Applied Biosystems, código de produto 1-2559-11. O gradiente de volume da coluna
30 era a partir do tampão A, 30mM de base Tris, pH 6,75, até o tampão B, 30mM de base Tris, pH 6,75 com 1M de NaCl. A cromatografia foi realizada com um AKTAexplorer de Amersham Biosciences, código de produto 18-1112-41. A Figura 2 ilustra o cromatograma AIEC de PA7E. Todas as amos-

tras listadas no Exemplo 3 foram processadas utilizando o método descrito neste Exemplo com resultados similares. Dois picos maiores foram detectados. O traço azul é a absorvência a 280, o traço vermelho é a absorvência a 260, o traço verde é o tampão B em porcentagem, e o traço marrom é a condutividade. As marcações em vermelho na parte inferior do cromatograma são as frações. O primeiro pico no gradiente, que continha as partículas similares a vírus desejadas, teve o tampão trocado por tampão PBS, pH 7,4 utilizando um concentrador giratório de membrana de corte de 100 kDa, código do produto UFC910096. As amostras foram então armazenadas a -80°

5 C. O segundo pico continha a partícula clivada infectada. Um gel SDS-PAGE foi preparado, com a carga AIEC de precipitado PA7E PEG, CPMV WT padrão, e as frações AIEC PA7E. SDS-PAGE foi executado em um Invitrogen Nupage 4-12% de Bis-Tris, 12 gel, código de produto NP0322. O tampão de corrida era um tampão de corrida MES SDS da Invitrogen Nupage, código

10 de produto NP0002. O gel estava sendo executado com uma queda de voltagem de 200V durante 35 minutos. Lane 1 continha 5ul do marcador ladder Invitrogen SeeBlue Plus2, código de produto LC5925. Lane 2 continha o precipitado PA7E de PEG ressuspenso que foi carregado na coluna AIEC. Lane 3 continha CPMV WT. Lanes 4 a 8 continham as partículas alvo purifi-

15 cadas PA7E correspondentes ao pico 1 AIEC que foram coletadas e processadas, adicionalmente. Lanes 9 a 10 continham o infectado de partículas clivadas PA7E correspondente ao pico 2 AIEC.

20

Exemplo 6 - Análise de Partículas Semelhantes a Vírus Quimérico Inativado - Extração de RNA Genômico Viral.

25 O Ambion RNAqueous, código de produto 1912, o kit foi usado para extrair o RNA genômico viral das amostras de CPMV inativado purificado por. As partículas virais de CPMV que não foram inativadas foram usadas como um controle (amostras ativas). As Figuras 3 a 5 mostram os resultados de inativação de RNA para PA9, PA10, PA11, PA12, e PA18. Todas as a-

30 mostradas listadas no Exemplo 3 foram processadas utilizando o método descrito no Exemplo 6 com resultados similares. Precast 1,2% de E-Gels de Invitrogen, código de produto G501801, foi usado para visualizar o RNA ex-

traído nas Figuras 1 a 3. Todos os marcadores ladder nas Figuras 3 a 5 tinham cargas de 1ul de 1 KB PLUS Ladder, código de produto 10787-026. Nas Figuras 3, lane 1 é 1ul de marcador ladder. Lane 2 é ativo PA9. Lane 3 é inativado PA9. Lane 4 é marcador ladder. Lane 5 é PA10 ativo, lane 6 é PA10 inativo. Lane 7 é marcador ladder. Nas Figuras 4, lane 1 é 1ul de ladder. Lane 2 é PA11 ativo. Lane 3 é PA11 inativado. Lane 4 é ladder. Lane 5 é PA12 ativo, lane 6 é PA12 inativo. Lane 7 é marcador ladder. Nas Figuras 5, lane 1 é 1ul de marcador ladder. Lane 2 é PA18 ativo. Lane 3 é PA18 inativado. O RNA genômico viral foi degradado nas amostras inativadas como indicado pela detecção de "mancha", porém o RNA1 e RNA2 genômico de CPMV de comprimento total foram detectados em amostras que não foram submetidas à inativação.

Exemplo 7 - Análise de Partículas Semelhantes a Vírus CPMV Quimérico-Estabilidade por SDS-PAGE.

A estabilidade das proteínas capsidiais grandes e pequenas foi avaliada com SDS-PAGE. A Figura 6 mostra o gel SDS-PAGE de uma análise de estabilidade de temperatura de 5 dias para PA1S como um exemplo. SDS-PAGE foi executado em um Invitrogen Nupage 4-12% de Bis-Tris, 12 gel, código de produto NP0322. O gel estava sendo executado com uma queda de voltagem de 150V durante 60 minutos. O tampão de corrida era um tampão de corrida MES SDS da Invitrogen Nupage, código de produto NP0002. Lane 1 continha 7ul de Invitrogen Benchmark Unstained Protein Ladder, código de produto 10747-012. Lane 2 continha partículas virais inativadas PA1S incubadas em temperatura ambiente durante 5 dias. Lane 3 continha partículas virais inativadas PA1S incubadas a 4°C durante 5 dias. Lane 4 continha partículas virais inativadas PA1S incubadas a -20C durante 5 dias. Não detectou-se degradação de proteína.

Exemplo 8 - Análise de Partículas Semelhantes a Vírus CPMV Quimérico Inativado- Estabilidade por SEC.

A integridade das partículas similares a vírus organizadas foi avaliada utilizando cromatografia de exclusão por tamanho (SEC). Todas as amostras listadas no Exemplo 3 foram analisadas utilizando SEC com resul-

tados similares. A coluna SEC usada foi uma coluna analítica com 30cm x 7,8mm Tosoh TskGel G5000 SEC de Supelco com tamanho de microesferas de 10 microns, código de produto 08023. A fase móvel de SEC possuía 0,1M de NaPO₄ pH 7,00. Um único pico foi detectado correspondente às

5 partículas virais organizadas. As partículas de CPMV organizadas foram eluídas a partir da coluna com um tempo de retenção de 14,0 minutos.

Exemplo 9 - Análise de Partículas Semelhantes a Vírus CPMV Quimérico Inativado- Infecciosidade em Plantas.

As partículas de CPMV quimérico inativado listadas no Exemplo

10 3 foram testadas por sua capacidade de infectar plantas. As sementes de feijão-caupi da Califórnia nº 5 de Ferry Morse, código do produto 1450, foram germinadas durante a noite em temperatura ambiente em toalhas de papel úmidas. As sementes germinadas foram transferidas para o solo. Sete dias após a germinação dez mudas foram inoculadas com WT ou partículas

15 de CPMV quimérico. Após a inoculação, as plantas se desenvolveram a 25°C com um fotoperíodo de 16 horas à luz 8 horas no escuro durante duas a três semanas e observou-se a formação de sintomas. As plantas inoculadas com WT inativado ou partículas de CPMV quimérico não mostraram sintomas, porém as plantas inoculadas com WT ativo ou partículas de CPMV

20 quimérico mostraram sintomas típicos de infecção por CPMV. As folhas inoculadas com WT inativado ou partículas de CPMV quimérico foram colhidas e processadas para isolamento de partícula viral. 40g de tecido vegetal foram congelados -80C. O tecido da folha congelado foi esmagado pelas mãos e despejado em um misturador de alta velocidade Waring, código de

25 produto 8011S. 120ml de 30mM base Tris frio pH 7,50 0,2mM de PMSF foram despejados nas folhas esmagadas. As folhas foram trituradas 2 vezes durante 3 segundos em alta velocidade. A solução foi decantada em uma garrafa centrífuga de 500ml. O misturador foi lavado com 30ml de tampão frio e a lavagem foi despejada em uma garrafa centrífuga de 500ml. A solu-

30 ção foi centrifugada a 15.000G durante 30 minutos para remover os resíduos celulares da planta. O sobrenadante foi decantado em um cilindro graduado. Para precipitar o vírus CPMV, a solução de PEG 6000 fria (20% de PEG

6000, 1M de NaCl) foi adicionada ao sobrenadante para conduzir a concentração de PEG final para 4% de PEG 6000 com 0,2M de NaCl, e a solução foi suavemente misturada. A solução foi permitida para se precipitar durante 1 hora em gelo. A solução precipitada de vírus foi, então, centrifugada a 15.000G durante 30 minutos para coletar as partículas virais no pélete. O sobrenadante foi despejado e o pélete foi imediatamente ressuspensão no tampão de PBS, pH 7,4. As amostras foram avaliadas pela presença de partícula viral com SDS-PAGE. SDS-PAGE foi executado em 4 a 12% de Bis-Tris de Invitrogen Nupage, 12 gel, código de produto NP0322. O gel foi executado com uma queda de voltagem de 150V durante 60 minutos. O tampão de corrida era um tampão de corrida MES SDS da Invitrogen Nupage, código de produto NP0002. Nenhuma partícula viral foi detectada.

Exemplo 10 - Imunização de Camundongos com Partículas de CPMV Inativado que Contêm Epitopo PA.

Camundongos fêmea Balb/c com 7 semanas de idade foram injetados três vezes de forma intraperitoneal com 100 µg de CPMV-PA inativado purificado na presença de adjuvante. Os camundongos de controle receberam partículas de CPMV inativado com peptídeo ou apenas o adjuvante em PBS, pH 7,0. 100 µl de adjuvante Ribi (R-700; Ribi Immunochem Research, Hamilton, Montana) misturados com 100 µl da amostra foram usados. O volume total usado para administração é 200 µl. As injeções foram dadas em intervalos de 3 semanas.

Para imunização intranasal, CPMV-PA inativado, sem adjuvantes, foi administrado em camundongos anestesiados. Um volume total de 100 µl foi administrado nas duas narinas (50 µl em cada narina). Os camundongos de controle receberam CPMV inativado com peptídeo não-relacionado ou apenas PBS, pH 7,0.

As amostras de sangue foram obtidas 1 dia antes da primeira administração e 2 semanas após cada uma das duas administrações subsequentes.

O sumário dos estudos de imunização de camundongos é proporcionado abaixo:

Tabela 4

Adjuvante	Tratamento	Rota	Dose	Nº de camundongos
Sim	CPMV-PA	IP	3x100 ug/200 ul	5
Sim	CPMV-control	IP	3x100 ug/200 ul	5
Sim	PBS, pH 7.0	IP	3xN/A/200 ul	3
Não	CPMV-PA	IN	3x100 ug/100 ul	5
Não	CPMV-control	IN	3x100 ug/100 ul	5
Não	PBS, pH 7.0	IN	3xN/A/100 ul	3

Exemplo 11 - Imunização de Primatas Não-Humanos com Partículas de CPMV Inativado que Contêm Epitopos PA.

As partículas de CPMV inativado que contêm epitopos PA foram testadas por sua capacidade de gerar respostas de anticorpos aos peptídeos de antraz co-expressos quando administrados em macacos rhesus. Quatro macacos foram imunizados de forma intramuscular com as construções peptídicas de CPMV-PA inativado e um macaco com o controle de CPMV tipo selvagem inativado. Cada dose imunizante consiste em 2 mg da mistura de vírus-peptídeo de todas as 16 construções de PA-CPMV. Os animais foram vacinados nos dias 0, 7, 14, e 28.

Os anticorpos IgG e IgA foram monitorados utilizando ensaios ELISA com proteína PA como um alvo. Três a cinco ml de sangue foram retirados em heparina em cada dia de imunização. As células e plasma foram separados e criopreservados. Os macacos anestesiados com cloridrato de cetamina foram submetidos à broncoscopia nos dias 0, 14 e 28 e espécimes de lavagem brônquica obtidos e criopreservados. Os lavados brônquicos e plasma foram derretidos e os títulos de anticorpo IgG e IgA medidos em ensaios ELISA. Altos títulos tanto de anticorpos IgG como IgA foram detectados no plasma e lavado brônquico. Os resultados são mostrados na Figura 7 e 8.

Exemplo 12 - Imunização de Camundongos com Partículas de CPMV Inativado que Contêm o Epitopo M2e do Vírus Influenza

Camundongos fêmeas Balb/c com 7 semanas de idade foram injetados três vezes de forma intraperitoneal com 100 µg de CPMV inativado que expressa um peptídeo M2 influenza na presença de um adjuvante. A

seqüência é SLLTEVETPIRNEGCRNDSSD (SEQ ID NO: 24). Os camundongos de controle receberam partículas de CPMV inativado com peptídeo não-relacionado ou apenas adjuvante em PBS, pH 7,0. 100 µl de adjuvante Ribi (R-700; Ribi Immunochem Research, Hamilton, Montana) misturados com 100 µl da amostra foram usados. O volume total volume usado para administração é 200 µl. As injeções foram dadas em intervalos de 3 semanas.

Para imunização intranasal, o CPMV inativado que contém um peptídeo M2e influenza, sem adjuvantes, foi administrado em camundongos anestesiados. Um volume total de 100 µl foi administrado nas duas narinas (50 µl em cada narina). Os camundongos de controle receberam mice inativado com peptídeo não-relacionado ou apenas PBS, pH 7,0.

As amostras de sangue foram obtidas 1 dia antes da primeira administração e 2 semanas após cada uma das duas administrações subsequentes.

O sumário dos estudos de imunização de camundongos é fornecido abaixo:

Tabela 6				
Adjuvante	Tratamento	Rota	Dose	Nº de camundongos
Sim	CPMV-M2e	IP	3x100 ug/200 ul	5
Sim	CPMV-control	IP	3x100 ug/200 ul	5
Sim	PBS, pH 7.0	IP	3xN/A/200 ul	3
Não	CPMV-M2e	IN	3x100 ug/100 ul	5
Não	CPMV-control	IN	3x100 ug/100 ul	5
Não	PBS, pH 7.0	IN	3xN/A/100 ul	3

A descrição anterior é ilustrativa da presente invenção, e não deve ser interpretada como uma limitação da mesma. A invenção é definida pelas seguintes reivindicações, com seus equivalentes incluídos no presente documento.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Rasochova, Lada
 Phelps, Jamie Patrick
 <120> "PARTÍCULAS VIRAIS DE PLANTAS E MÉTODOS PARA A INATIVAÇÃO DA MESMA".
 5 <130> DOW-200P
 <160> 24
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 25
 10 <212> PRT
 <213> Bacillus anthracis
 <400> 1
 Ser Asn Ser Arg Lys Lys Arg Ser Thr Ser Ala Gly Pro Thr Val Pro
 1 5 10 15
 15 Asp Arg Asp Asn Asp Gly Ile Pro Asp
 20 25
 <210> 2
 <211> 25
 <212> PRT
 20 <213> Bacillus anthracis
 <400> 2
 Ser Pro Glu Ala Arg His Pro Leu Val Ala Ala Tyr Pro Ile Val His
 1 5 10 15
 Val Asp Met Glu Asn Ile Ile Leu Ser
 25 20 25
 <210> 3
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Bacillus anthracis
 30 <400> 3
 Arg Ile Ile Phe Asn Gly Lys Asp Leu Asn Leu Val Glu Arg Arg Ile
 1 5 10 15

Ala Ala Val Asn Pro Ser Asp Pro Leu

20

25

<210> 4

<211> 26

5 <212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 4

Glu Arg Ile Ile Phe Asn Gly Lys Asp Leu Asn Leu Val Glu Arg Arg

1

5

10

15

10 Ile Ala Ala Val Asn Pro Ser Asp Pro Leu

20

25

<210> 5

<211> 25

<212> PRT

15 <213> Bacillus anthracis

<400> 5

Arg Gln Asp Gly Lys Thr Phe Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys

1

5

10

15

Leu Pro Leu Tyr Ile Ser Asn Pro Asn

20

20

25

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

25 <400> 6

Ser Asp Phe Glu Lys Val Thr Gly Arg Ile Asp Lys Asn Val Ser Pro

1

5

10

15

Glu Ala Arg His Pro

20

30 <210> 7

<211> 25

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 7

His Val Asp Met Glu Asn Ile Ile Leu Ser Lys Asn Glu Asp Gln Ser

1 5 10 15

5 Thr Gln Asn Thr Asp Ser Gln Thr Arg

20 25

<210> 8

<211> 25

<212> PRT

10 <213> Bacillus anthracis

<400> 8

Thr Asp Ser Gln Thr Arg Thr Ile Ser Lys Asn Thr Ser Thr Ser Arg

1 5 10 15

Thr His Thr Ser Glu Val His Gly Asn

15 20 25

<210> 9

<211> 26

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

20 <400> 9

Glu Thr Asp Ser Gln Thr Arg Thr Ile Ser Lys Asn Thr Ser Thr Ser

1 5 10 15

Arg Thr His Thr Ser Glu Val His Gly Asn

20 25

25 <210> 10

<211> 25

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 10

30 His Gly Asn Ala Glu Val His Ala Ser Phe Phe Asp Ile Gly Gly Ser

1 5 10 15

Val Ser Ala Gly Phe Ser Asn Ser Asn

20 25

<210> 11

<211> 21

<212> PRT

5 <213> Bacillus anthracis

<400> 11

Ser Asn Ser Asn Ser Ser Thr Val Ala Ile Asp His Ser Leu Ser Leu

1 5 10 15

Ala Gly Glu Arg Thr

10 20

<210> 12

<211> 18

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

15 <400> 12

Glu Thr Met Gly Leu Asn Thr Ala Asp Thr Ala Arg Leu Asn Ala Asn

1 5 10 15

Ile Arg

<210> 13

20 <211> 24

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 13

Glu Pro Thr Thr Ser Leu Val Leu Gly Lys Asn Gln Thr Leu Ala Thr

25 1 5 10 15

Ile Lys Ala Lys Glu Asn Gln Glu

20

<210> 14

<211> 24

30 <212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 14

Pro Ser Lys Asn Leu Ala Pro Ile Ala Leu Asn Ala Gln Asp Asp Phe
 1 5 10 15
 Ser Ser Thr Pro Ile Thr Met Asn
 20

5 <210> 15
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Bacillus anthracis
 <400> 15

10 Ser Glu Val Leu Pro Gln Ile Gln Glu Thr Thr Ala Arg Ile Ile Phe
 1 5 10 15
 Asn Gly Lys Asp
 20

15 <210> 16
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Bacillus anthracis
 <400> 16

Asn Gly Lys Asp Leu Asn Leu Val Glu Arg Arg Ile Ala Ala Val Asn

20 1 5 10 15
 Pro Ser Asp Pro Leu Glu Thr Thr Lys
 20 25

<210> 17
 <211> 25

25 <212> PRT
 <213> Bacillus anthracis
 <400> 17

Glu Thr Thr Lys Pro Asp Met Thr Leu Lys Glu Ala Leu Lys Ile Ala

1 5 10 15

30 Phe Gly Phe Asn Glu Pro Asn Gly Asn
 20 25

<210> 18

<211> 23

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 18

5 Gln Gly Lys Asp Ile Thr Glu Phe Asp Phe Asn Phe Asp Gln Gln Thr

1 5 10 15

Ser Gln Asn Ile Lys Asn Gln

20

<210> 19

10 <211> 20

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 19

Asp Arg Asn Asn Ile Ala Val Gly Ala Asp Glu Ser Val Val Lys Glu

15 1 5 10 15

Ala His Arg Glu

20

<210> 20

<211> 25

20 <212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 20

Arg Glu Val Ile Asn Ser Ser Thr Glu Gly Leu Leu Leu Asn Ile Asp

1 5 10 15

25 Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser Gly

20

25

<210> 21

<211> 19

<212> PRT

30 <213> Bacillus anthracis

<400> 21

Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser Leu Arg Gln Asp Gly Lys Thr Phe Ile

1 5 10 15
 Asp Phe Lys
 <210> 22
 <211> 22
 5 <212> PRT
 <213> Bacillus anthracis
 <400> 22
 Thr Lys Glu Asn Thr Ile Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp Thr Ser
 1 5 10 15
 10 Thr Asn Gly Ile Lys Lys
 20
 <210> 23
 <211> 764
 <212> PRT
 15 <213> Bacillus anthracis
 <400> 23
 Met Lys Lys Arg Lys Val Leu Ile Pro Leu Met Ala Leu Ser Thr Ile
 1 5 10 15
 Leu Val Ser Ser Thr Gly Asn Leu Glu Val Ile Gln Ala Glu Val Lys
 20 20 25 30
 Gln Glu Asn Arg Leu Leu Asn Glu Ser Glu Ser Ser Ser Gln Gly Leu
 35 40 45
 Leu Gly Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Asn Phe Gln Ala Pro Met Val Val
 50 55 60
 25 Thr Ser Ser Thr Thr Gly Asp Leu Ser Ile Pro Ser Ser Glu Leu Glu
 65 70 75 80
 Asn Ile Pro Ser Glu Asn Gln Tyr Phe Gln Ser Ala Ile Trp Ser Gly
 85 90 95
 Phe Ile Lys Val Lys Lys Ser Asp Glu Tyr Thr Phe Ala Thr Ser Ala
 30 100 105 110
 Asp Asn His Val Thr Met Trp Val Asp Asp Gln Glu Val Ile Asn Lys
 115 120 125

Ala Ser Asn Ser Asn Lys Ile Arg Leu Glu Lys Gly Arg Leu Tyr Gln
130 135 140
Ile Lys Ile Gln Tyr Gln Arg Glu Asn Pro Thr Glu Lys Gly Leu Asp
145 150 155 160
5 Phe Lys Leu Tyr Trp Thr Asp Ser Gln Asn Lys Lys Glu Val Ile Ser
165 170 175
Ser Asp Asn Leu Gln Leu Pro Glu Leu Lys Gln Lys Ser Ser Asn Ser
180 185 190
Arg Lys Lys Arg Ser Thr Ser Ala Gly Pro Thr Val Pro Asp Arg Asp
10 195 200 205
Asn Asp Gly Ile Pro Asp Ser Leu Glu Val Glu Gly Tyr Thr Val Asp
210 215 220
Val Lys Asn Lys Arg Thr Phe Leu Ser Pro Trp Ile Ser Asn Ile His
225 230 235 240
15 Glu Lys Lys Gly Leu Thr Lys Tyr Lys Ser Ser Pro Glu Lys Trp Ser
245 250 255
Thr Ala Ser Asp Pro Tyr Ser Asp Phe Glu Lys Val Thr Gly Arg Ile
260 265 270
Asp Lys Asn Val Ser Pro Glu Ala Arg His Pro Leu Val Ala Ala Tyr
20 275 280 285
Pro Ile Val His Val Asp Met Glu Asn Ile Ile Leu Ser Lys Asn Glu
290 295 300
Asp Gln Ser Thr Gln Asn Thr Asp Ser Glu Thr Arg Thr Ile Ser Lys
305 310 315 320
25 Asn Thr Ser Thr Ser Arg Thr His Thr Ser Glu Val His Gly Asn Ala
325 330 335
Glu Val His Ala Ser Phe Phe Asp Ile Gly Gly Ser Val Ser Ala Gly
340 345 350
Phe Ser Asn Ser Asn Ser Ser Thr Val Ala Ile Asp His Ser Leu Ser
30 355 360 365
Leu Ala Gly Glu Arg Thr Trp Ala Glu Thr Met Gly Leu Asn Thr Ala
370 375 380

Asp Thr Ala Arg Leu Asn Ala Asn Ile Arg Tyr Val Asn Thr Gly Thr
 385 390 395 400
 Ala Pro Ile Tyr Asn Val Leu Pro Thr Thr Ser Leu Val Leu Gly Lys
 405 410 415
 5 Asn Gln Thr Leu Ala Thr Ile Lys Ala Lys Glu Asn Gln Leu Ser Gln
 420 425 430
 Ile Leu Ala Pro Asn Asn Tyr Tyr Pro Ser Lys Asn Leu Ala Pro Ile
 435 440 445
 Ala Leu Asn Ala Gln Asp Asp Phe Ser Ser Thr Pro Ile Thr Met Asn
 10 450 455 460
 Tyr Asn Gln Phe Leu Glu Leu Glu Lys Thr Lys Gln Leu Arg Leu Asp
 465 470 475 480
 Thr Asp Gln Val Tyr Gly Asn Ile Ala Thr Tyr Asn Phe Glu Asn Gly
 485 490 495
 15 Arg Val Arg Val Asp Thr Gly Ser Asn Trp Ser Glu Val Leu Pro Gln
 500 505 510
 Ile Gln Glu Thr Thr Ala Arg Ile Ile Phe Asn Gly Lys Asp Leu Asn
 515 520 525
 Leu Val Glu Arg Arg Ile Ala Ala Val Asn Pro Ser Asp Pro Leu Glu
 20 530 535 540
 Thr Thr Lys Pro Asp Met Thr Leu Lys Glu Ala Leu Lys Ile Ala Phe
 545 550 555 560
 Gly Phe Asn Glu Pro Asn Gly Asn Leu Gln Tyr Gln Gly Lys Asp Ile
 565 570 575
 25 Thr Glu Phe Asp Phe Asn Phe Asp Gln Gln Thr Ser Gln Asn Ile Lys
 580 585 590
 Asn Gln Leu Ala Glu Leu Asn Ala Thr Asn Ile Tyr Thr Val Leu Asp
 595 600 605
 Lys Ile Lys Leu Asn Ala Lys Met Asn Ile Leu Ile Arg Asp Lys Arg
 30 610 615 620
 Phe His Tyr Asp Arg Asn Asn Ile Ala Val Gly Ala Asp Glu Ser Val
 625 630 635 640

Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile Asn Ser Ser Thr Glu Gly Leu
 645 650 655
 Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser Gly Tyr Ile
 660 665 670
 5 Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu Gly Leu Lys Glu Val Ile Asn Asp Arg
 675 680 685
 Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser Leu Arg Gln Asp Gly Lys Thr Phe
 690 695 700
 Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Pro Leu Tyr Ile Ser Asn
 10 705 710 715 720
 Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu Asn Thr Ile
 725 730 735
 Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp Thr Ser Thr Asn Gly Ile Lys Lys
 740 745 750
 15 Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys Gly Tyr Glu Ile Gly
 755 760
 <210> 24
 <211> 22
 <212> PRT
 20 <213> Bacillus anthracis
 <400> 24
 Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Gly Cys Arg
 1 5 10 15
 Cys Asn Asp Ser Ser Asp
 25 20

REIVINDICAÇÕES

1. Método para inativar um vírus de planta que compreende:
administrar sulfato de amônio no material vegetal que expressão
uma partícula similar a vírus em que o material vegetal é selecionado do
5 grupo que consiste em plantas, tecidos vegetais, células vegetais e proto-
plastos em um pH acima de 8,0;
incubar o material vegetal durante pelo menos dez horas para
produzir uma partícula similar a vírus (VLP); e
colher a VLP inativada do material vegetal.
- 10 2. Método, de acordo com a reivindicação 1, que compreende
adicionalmente ao menos um peptídeo estranho incorporado no vírus.
3. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o dito vírus
consiste em um vírus RNA não-envelopado.
4. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a dita VLP
15 inativada apresenta um peptídeo bioativo heterólogo.
5. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o dito peptí-
deo é um antígeno.
6. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o dito pep-
tídeo é um epitopo.
- 20 7. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o sulfato de
amônio é administrado em uma concentração de 0,5M a 1,0M.
8. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o pH é pH
9,0.
9. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o material
25 vegetal é incubado entre 10°C a 40°C.
10. Método, de acordo com a reivindicação 2, em que o dito mé-
todo compreende ligar o dito vírus da planta a uma coluna de cromatografia
por interação hidrofóbica em 0,7 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 7, vírus ligado me-
diante lavagem com 0,7 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 9, e eluir o dito vírus com
30 0,7 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 9.
11. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o vírus
possui um capsídeo que é icosaédrico.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o vírus é de uma família selecionada do grupo que consiste em Bromoviridae, Comoviridae, e Tombusviridae.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o vírus é de um gênero selecionado do grupo que consiste em *Bromovirus*, *Comovirus*, *Tombusvirus*, *Alfavirus*, e *Sobemovirus*.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o vírus é selecionado do grupo que consiste em vírus do mosaico do feijão caupi, vírus do mosqueado clorótico do feijão caupi, vírus do enfezamento do tomateiro, vírus do mosaico da alfafa, vírus do mosaico do capim bromo e vírus do mosaico do feijoeiro do sul

15. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o vírus compreende proteínas capsidiais e os peptídeos são antígenos fundidos com proteínas capsidiais.

16. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o peptídeo é selecionado do grupo que consiste em um hormônio peptídico, uma enzima, um fator do crescimento, um anticorpo, um imunorregulador, e uma citocina.

17. Método, de acordo com a reivindicação 3, em que o dito método compreende, adicionalmente, converter uma sequência de RNA viral em uma transcrição de cDNA de comprimento total, clonar o dito cDNA em um vetor, e modificar o dito cDNA ao inserir um segmento de DNA estranho em uma região capaz de tolerar tal inserção sem interromper a replicação de RNA, formação de partícula ou infecciosidade.

18. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o peptídeo estranho incorporado no vírus é selecionado do grupo que consiste em uma subunidade de vírus influenza, vírus da encefalite eqüina do leste, parvovirose canina, e *Bacillus anthracis*.

19. Método para produzir uma VLP não-infecciosa que compreende:

administrar sulfato de amônio no material vegetal selecionado do grupo que consiste em plantas, tecidos vegetais, células vegetais e proto-

plastos e falta ao menos uma parte do RNA presente em um vírus de planta em um pH acima de 8,0;

incubar o material vegetal durante pelo menos dez horas; e

colher a VLP inativada do material vegetal, onde a dita VLP não

5 é capaz de se replicar.

20. Vacina que compreende uma VLP em que a dita vacina compreende ao menos um peptídeo estranho incorporado no vírus e a vacina é produzida por um método que compreende administrar sulfato de amônio no material vegetal selecionado do grupo que consiste em plantas, tecidos vegetais, células vegetais e protoplastos em um pH acima de 8,0 para
10 produzir uma VLP inativada; incubar o material vegetal durante ao menos dez horas; e colher a VLP inativada do material vegetal.

21. Vacina, de acordo com a reivindicação 20, em que o peptídeo de VLP apresentado obtém uma resposta imune quando a dita VLP for
15 administrada em um mamífero.

22. Vacina, de acordo com a reivindicação 20, em que a vacina serve para vírus influenza, vírus da encefalite eqüina do leste, parvovirose canina ou *Bacillus anthracis*.

23. Vacina, de acordo com a reivindicação 20, em que o peptídeo é um epitopo.
20

24. Vacina, de acordo com a reivindicação 23, em que o epitopo é um patógeno viral, um patógeno bacteriano ou câncer.

25. Vacina, de acordo com a reivindicação 20, em que a dita vacina é uma vacina de subunidade, em que o dito peptídeo é uma parte de um antígeno e a dita parte é eficaz como uma vacina.
25

26. Vacina, de acordo com a reivindicação 20, em que o dito peptídeo estranho compreende SEQ ID NO: 23.

Faixas:

- 1 Marcador de tamanho
- 2 Vírus ativo PA10
- 3 Vírus inativo PA10
- 4 Marcador de tamanho

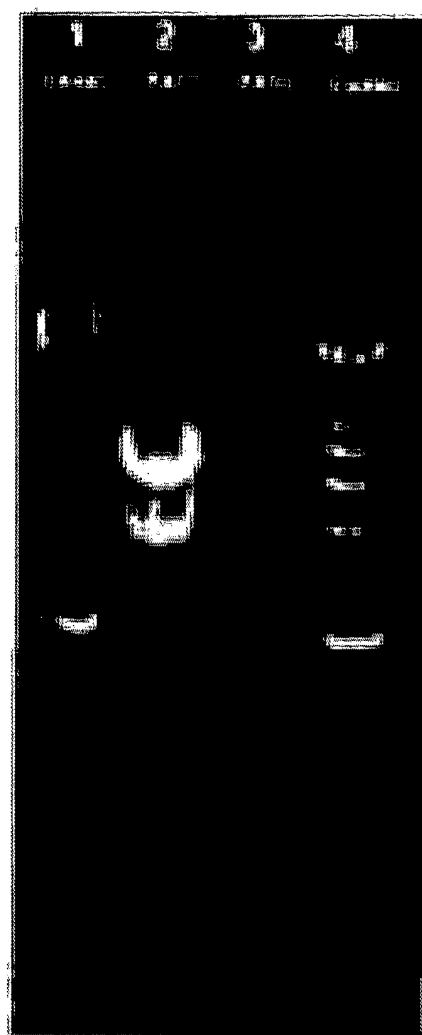


FIG 1

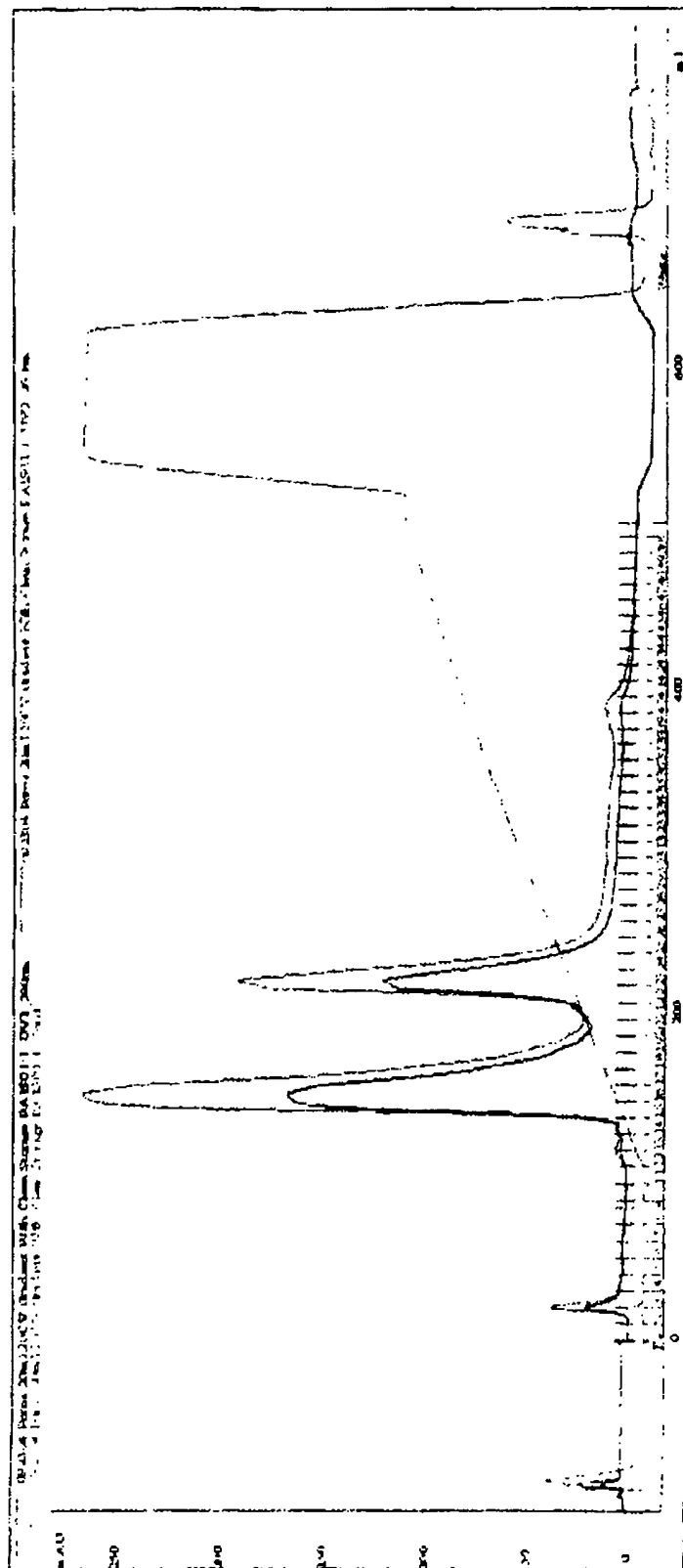


FIG 2



FIG 3

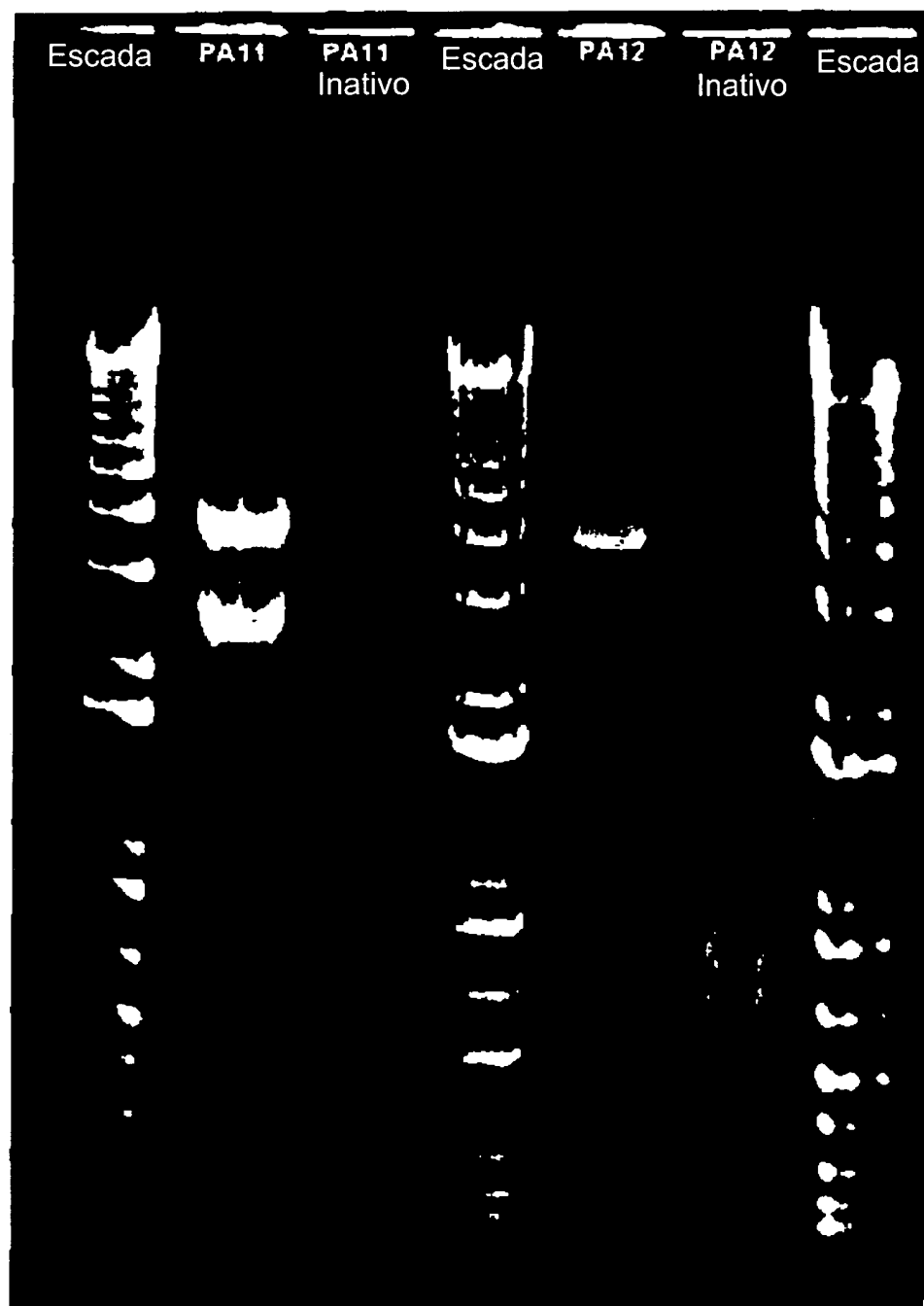


FIG 4

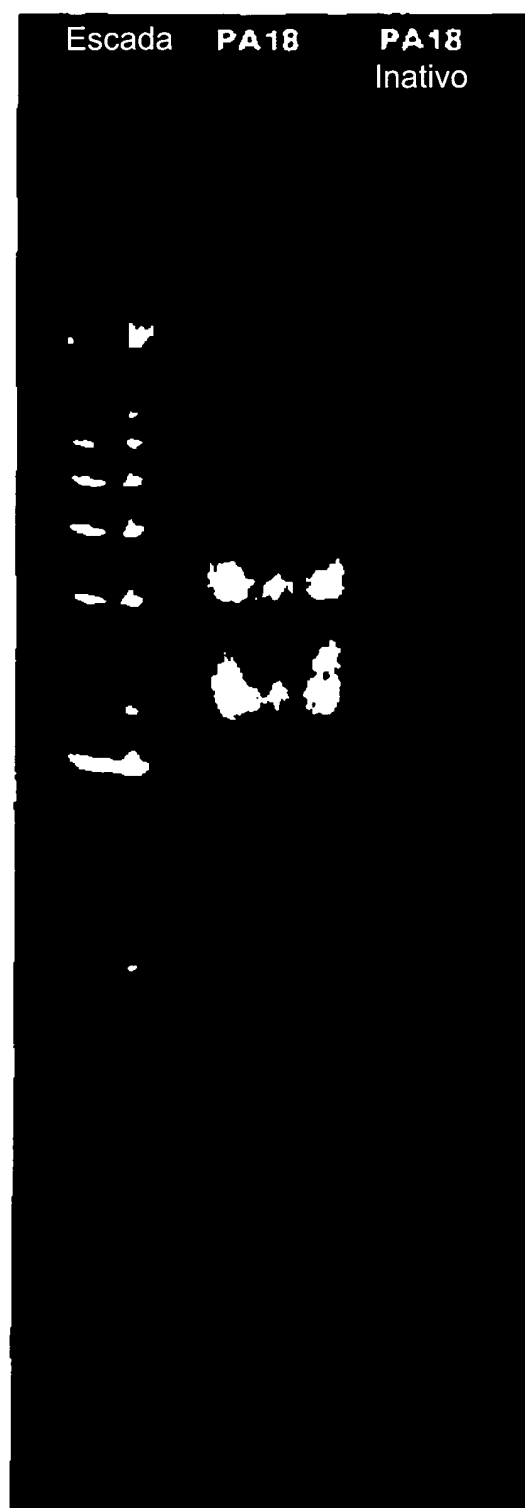


FIG 5

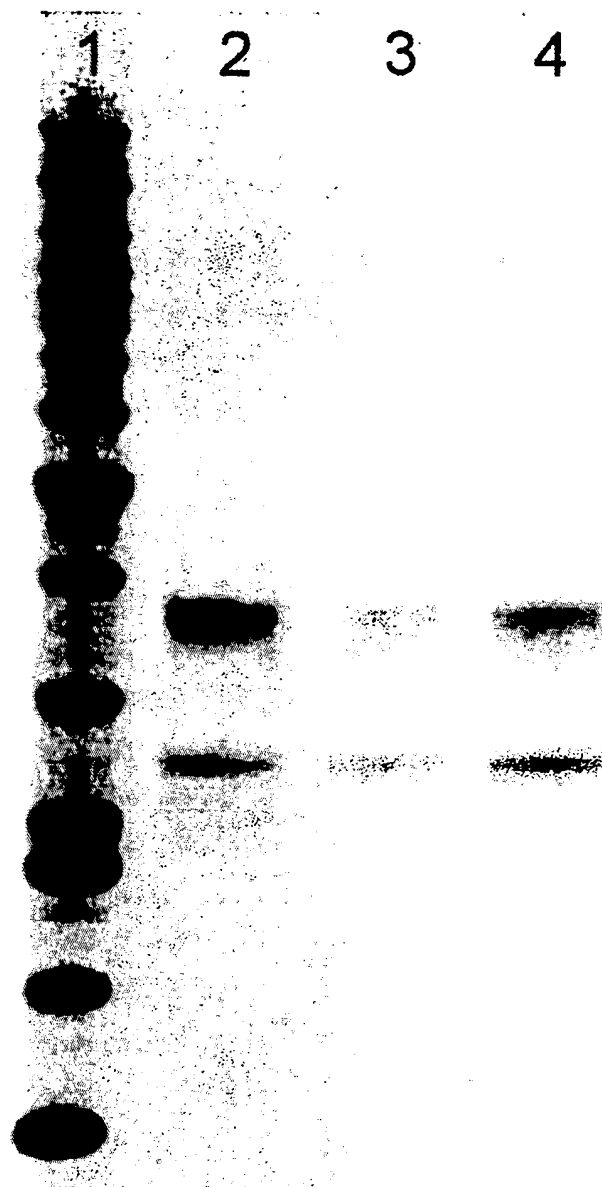


FIG 6

Macacos imunizados ao CPMV
Anticorpos anti-PA
(ELISA, 150 diluição de plasma)

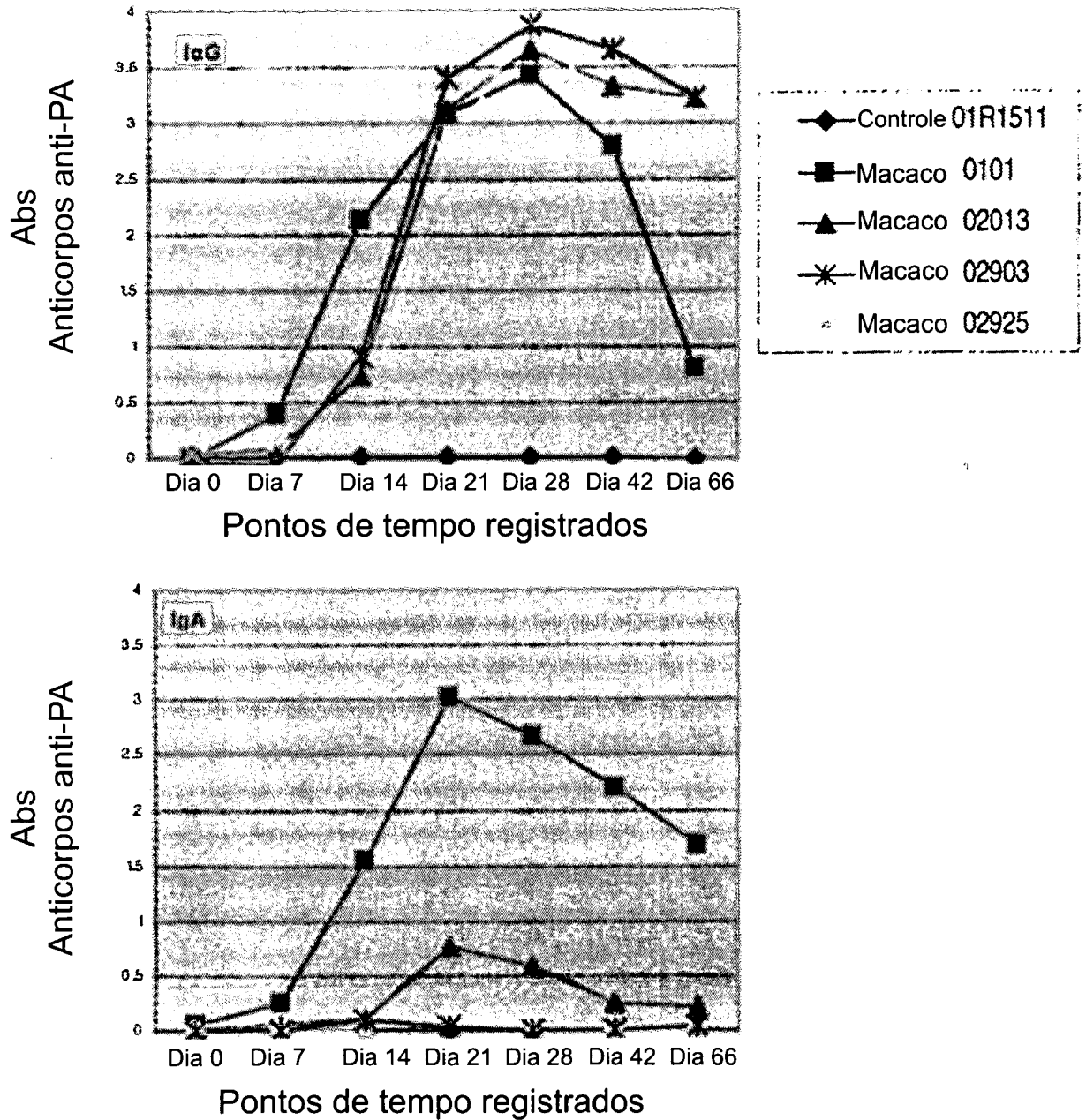
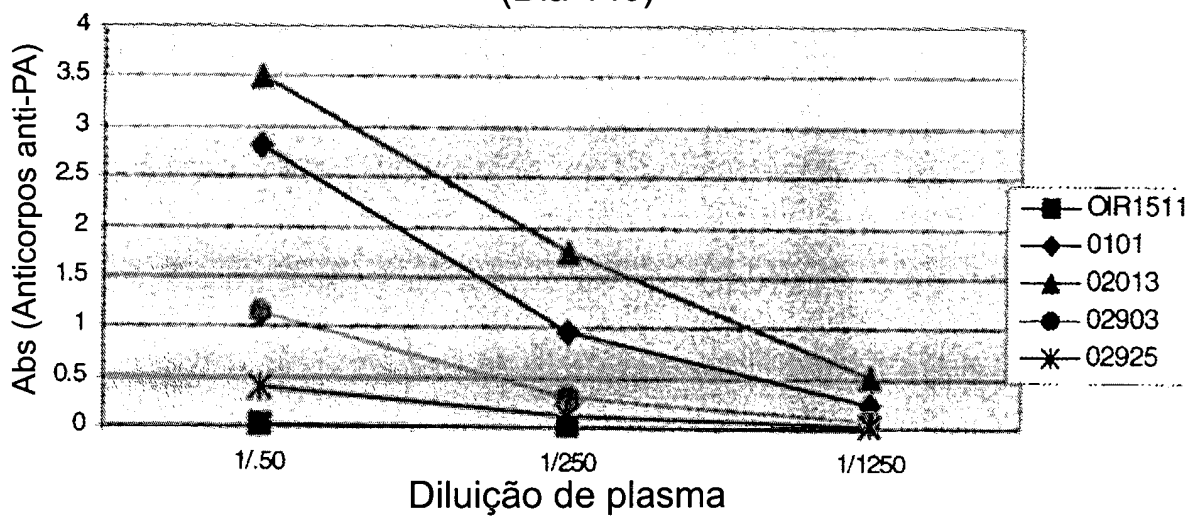


FIG 7

Antígeno protetor in vivo ELISA (IgG):
Dia 140 de lavagem brônquica e sérica

Antígeno ELISA (IgG) protetor de macacos imunizados CPMV: plasma

(Dia 140)



Antígeno ELISA (IgG) protetor de macacos imunizados CPMV
Lavagem brônquica (dia 140)

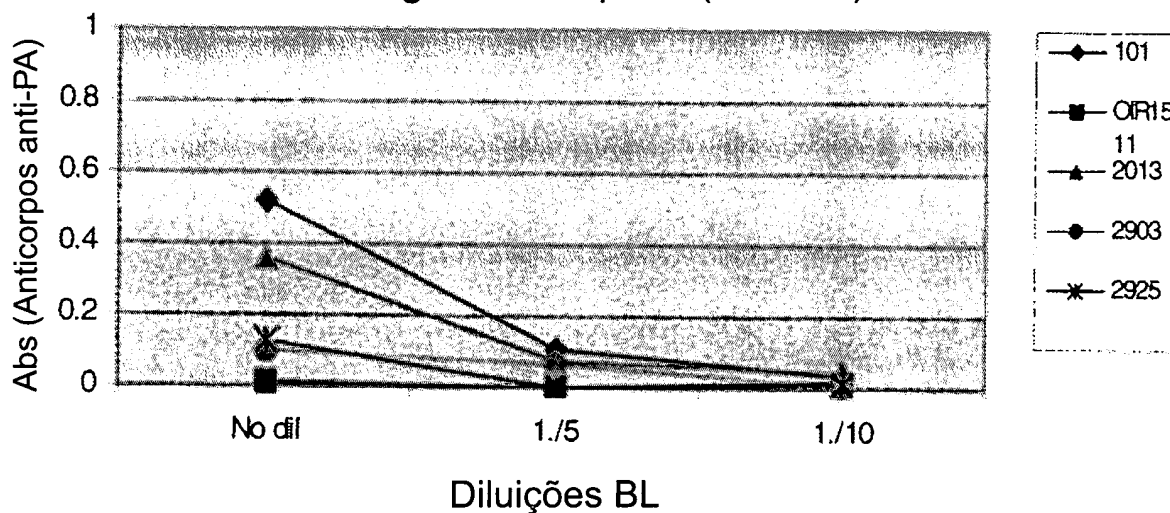


FIG 8

RESUMO

Patente de Invenção: "PARTÍCULAS VIRAIS DE PLANTAS E MÉTODOS PARA A INATIVAÇÃO DA MESMA".

A presente invenção refere-se aos vírus de plantas, produzidos por plantas, para uso como vacinas e similares. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a métodos de inativação simples, e partículas virais de plantas obtidas, desta maneira. A invenção descrita no presente documento proporciona meios e métodos para produzir uma vacina segura baseada em uma exibição de epitopos derivados de um agente patogênico sobre as superfícies de partículas similares a vírus de plantas inativado. Essa invenção ensina a inativação de partículas virais de plantas quiméricas e a integração da etapa de inativação no procedimento de purificação de partícula viral. O método de inativação torna o vírus incapaz de infectar plantas e a integridade de partículas virais é mantida.