

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

(21) BR 112019018251-9 A2



(22) Data do Depósito: 02/03/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 23/06/2020

(54) **Título:** CORONAVÍRUS, VACINAS COMPREENDENDO OS MESMOS, E MÉTODOS PARA A PREVENÇÃO DE DOENÇA

(51) **Int. Cl.:** C12N 7/00; C12N 9/12; A61K 39/215; A61K 39/00.

(30) **Prioridade Unionista:** 03/03/2017 US 62/466,779.

(71) **Depositante(es):** LOYOLA UNIVERSITY CHICAGO; THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF AGRICULTURE.

(72) **Inventor(es):** SUSAN BAKER; XUFANG DENG; MATTHEW HACKBART; ROBERT METTELMAN; ANNA MIELECH; AMORNRAT O'BRIEN; KAY FAABERG; KELLY MILTON LAGER.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2018020678 de 02/03/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/160977 de 07/09/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 02/09/2019

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se aos coronavírus, a vacinas compreendendo os mesmos, e a métodos para a prevenção de doença. Uma modalidade da presente invenção inclui um coronavírus vivo e atenuado compreendendo um gene da replicase variante codificando poliproteínas compreendendo uma proteína não estrutural (nsp)-15, o gene da replicase o qual codifica a nsp15 e provoca quaisquer modificações, incluindo mutações e/ou deleções, que afetem a estabilidade ou a atividade da nsp15.

FIG. 1A

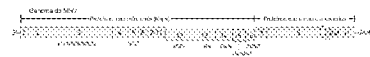


FIG. 1B

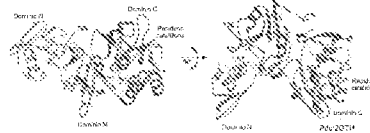


FIG. 1C

Gene	Sequence	Protein
ORF1	5'-[Sequence]-3'	ORF1p
ORF2	5'-[Sequence]-3'	S
ORF3a	5'-[Sequence]-3'	E
ORF3b	5'-[Sequence]-3'	M
ORF4	5'-[Sequence]-3'	N
ORF5	5'-[Sequence]-3'	ORF5p
ORF6	5'-[Sequence]-3'	ORF6p
ORF7a	5'-[Sequence]-3'	ORF7ap
ORF7b	5'-[Sequence]-3'	ORF7bp
ORF8	5'-[Sequence]-3'	ORF8p

FIG. 1D

Gene	Sequence
ORF1	5'-[Sequence]-3'
ORF2	5'-[Sequence]-3'
ORF3a	5'-[Sequence]-3'
ORF3b	5'-[Sequence]-3'
ORF4	5'-[Sequence]-3'
ORF5	5'-[Sequence]-3'
ORF6	5'-[Sequence]-3'
ORF7a	5'-[Sequence]-3'
ORF7b	5'-[Sequence]-3'
ORF8	5'-[Sequence]-3'

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**CORONAVÍRUS, VACINAS COMPREENDENDO OS MESMOS, E MÉTODOS PARA A PREVENÇÃO DE DOENÇA**".

REFERÊNCIA CRUZADA COM PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisória U.S. No. 62/466.779, registrado em 3 de março de 2017, cujo conteúdo é incorporado aqui, a este pedido de patente, por meio de referência.

DECLARAÇÃO REFERENTE A ESTUDO PATROCINADO PELO GOVERNO FEDERAL (N.T.: DOS ESTADOS UNIDOS)

[002] Esta invenção foi produzida com suporte do governo segundo Grant ou Contract No. R01 AI085089 concedido pelo *National Institutes of Health*, e Agricultural Research Service Project 5030-32000-118-11S concedido pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. O governo tem determinados direitos na invenção.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] A presente invenção refere-se de modo geral a coronavírus. A invenção refere-se particularmente a vacinas e métodos de produção das mesmas para os coronavírus existentes e emergentes.

[004] Os coronavírus são espécies de vírus pertencentes à subfamília Coronavirinae na família Coronaviridae, e são vírus de RNA de sentido positivo que infectam os seres humanos e os animais e provocam doença respiratória, gastrointestinal ou neurológica. Os coronavírus podem se originar de reservatórios animais para provocar epidemias importantes em seres humanos, exemplificados pelo coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS-CoV) em 2002 a 2003 e pelo coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), o qual foi reconhecido como um vírus emergente em 2012. Notavelmente, estes vírus podem se replicar no citoplasma dos macrófagos, um tipo de célula considerada como sendo uma sentinela

inata crucial para detectar e eliminar patógenos invasores. Os coronavírus codificam múltiplos antagonistas do interferon que provavelmente funcionam impedindo e retardando a ativação do interferon tipo I (IFN) e genes estimulados pelo interferon (ISGs) e a expressão de uma constelação de antagonistas contribui para a patogênese. Um estudo recente usando infecção de camundongos pelo SARS-CoV documentou que a produção retardada e limitada de interferon contribui para doença.

[005] As abordagens de vacinas existentes para as doenças por coronavírus são baseadas em atenuação natural espontânea, inativação do vírus, e proteínas estruturais virais recombinantes através de vetores de expressão. As vacinas candidatas existentes não provocam respostas imunes protetoras robustas. Esta falta de proteção de longo termo pode ser devida a indução de resposta imune inata ineficaz, tal como interferons tipo 1, os quais são moléculas cruciais para promover a imunidade adaptiva e a memória imune.

[006] Em vista do acima exposto, pode ser reconhecido que existe um desejo contínuo de tratar os coronavírus e que seria desejável se estivesse disponível uma vacina para a inoculação de sujeitos contra vários coronavírus, incluindo uma vacina que possa estimular tanto uma forte resposta imune inata quanto uma proteção imune adaptiva eficaz.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[007] A presente invenção proporciona coronavírus mutantes, vacinas compreendendo coronavírus mutantes, métodos de produção de vacinas, e métodos de prevenção de doença em sujeitos.

[008] De acordo com um aspecto da invenção, é proporcionado um coronavírus vivo e atenuado que inclui um gene da replicase variante codificando poliproteínas compreendendo uma proteína não estrutural (nsp)-15. O gene da replicase codifica a nsp15 e provoca

quaisquer modificações, incluindo mutações e/ou deleções, que afetem a estabilidade ou a atividade da nsp15.

[009] Outros aspectos da invenção incluem genes da replicase variante compreendendo os coronavírus acima descritos, proteínas codificadas pelos referidos genes da replicase variante, plasmídeos compreendendo os referidos genes da replicase variante, vacinas compreendendo os coronavírus acima mencionados, e métodos para o tratamento ou a prevenção de uma doença em um sujeito por administração de uma tal vacina ao sujeito.

[0010] De acordo com outro aspecto da invenção, é proporcionado um método de prevenção de uma doença em um sujeito que inclui a ativação do interferon tipo I no sujeito, em que a ativação do interferon tipo I reduz a patogenicidade de um coronavírus.

[0011] De acordo com outro aspecto da invenção, é proporcionado um método de produção de uma vacina que inclui a modificação de um coronavírus selvagem para produzir um coronavírus vivo e atenuado compreendendo um gene da replicase variante codificando poliproteínas e provocando uma modificação, incluindo mutações e/ou deleções, em uma proteína não estrutural (nsp)-15 que afeta a estabilidade ou a atividade da nsp15. Pode ser produzida uma vacina que inclui o coronavírus e um veículo. A administração da vacina a um sujeito provoca a ativação do interferon tipo I no sujeito, o qual reduz a patogenicidade do coronavírus selvagem.

[0012] Os efeitos técnicos do coronavírus conforme descrito acima de modo preferencial incluem a capacidade de inoculação de um sujeito com um coronavírus que provoca a ativação do interferon tipo I, o qual limita a replicação, a disseminação, e doença virais.

[0013] Outros aspectos e vantagens desta invenção serão adicionalmente reconhecidos a partir da descrição detalhada que se segue.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0014] As FIGS. 1A a 1D incluem um diagrama esquemático do genoma do coronavírus murino salientando a proteína não estrutural 15 e o resíduo conservado treonina 98. A FIG. 1A é um diagrama esquemático do genoma do vírus da hepatite do camundongo (MHV) A59 (MHV-A59). PLP1/2: protease papaína-like 1/2; ADRP, ADP-ribose-1'-monofosfatase; 3CL^{pro}, protease 3C-like; RDRP, polimerase de RNA dependente de RNA; Hel, helicase; ExoN, exonuclease 3'→5'; NendoU, endoribonuclease específica do uridilato do Nidovírus; 2'OMT, ribose-2'-O-metiltransferase. A FIG. 1B representa a estrutura cristalina de nsp15, em que o domínio N, o domínio M, e o domínio C são indicados em 90° de rotação. T98 é mostrada em relação a L57 (domínio N) e os resíduos catalíticos (domínio C). Protein Data Base ID: 2GTH. A FIG. 1 C indica sítios de mutação(ões) para cada genótipo de coronavírus e indicação de indução de interferon tipo I em macrófagos derivados de medula óssea infectada com vírus (BMDMs). A FIG. 1 D indica o alinhamento de sequências de região de T98 de nsp15 de cepas típicas de sub-grupos de coronavírus usando Clustal W.

[0015] As FIGS. 2A a 2D indicam que o vírus mutante da nsp15 do MHV ativa a expressão de interferon tipo I e é prejudicado para replicação nos BMDMs. A FIG. 2A indica os níveis de IFN- α 11 mRNA nos BMDMs infectados com MHV selvagem (WT) ou N15m1 por RT-PCR quantitativo. Os valores foram normalizados para β -actina e analisados usando T teste não pareado. A FIG. 2B indica os níveis de proteína IFN α secretada no sobrenadante de BMDMs infectados detectados por ELISA quantitativo. Os valores foram analisados usando teste 2way-Anova. AS FIGS. 2C e 2D indicam a cinética de crescimento de WT e N15m1 nos BMDMs B6 e BMDMs ifnar^{-/-}, respectivamente (MOI de 0,1). Os títulos virais de sobrenadantes foram coletados em hpi indicado e os títulos foram determinados por ensaio de placa usando células 17CI-1. Os valores foram analisados usando T teste não pareado. Os

dados são representativos de 2 a 3 experimentos independentes e são apresentados como Média \pm Desvio Padrão.

[0016] As FIGS. 3A a 3D indicam que o vírus mutante da nsp15 do MHV induz uma rápida morte celular apoptótica nos BMDMs. A FIG. 3A indica que os BMDMs foram infectados com MHV selvagem, N15m1, ou N15m1 inativado com UV (UV-N15m1). A 24 hpi, a viabilidade celular dos BMDMs infectados com vírus foi quantificada usando ensaio CellTiter Glo. Os valores foram analisados usando T teste não pareado. A FIG. 3B indica que os BMDMs foram infectados com MHV selvagem, ou N15m1 e em seguida tratados com ou DMSO, zVAD (20 μ M), Necrostatin-1 (Nec-1) (25 μ M), ou VX-765 (20 μ M). A viabilidade celular foi medida a 24 hpi por ensaio CellTiter Glo. Os valores foram analisados usando T teste não pareado. A FIG. 3C indica que os BMDMs foram inoculados com MHV selvagem ou N15m1 e zVAD (20 μ M) foi adicionado ao meio. A 24 hpi, a atividade da caspase 3/7 foi determinada por um teste de atividade da caspase 3/7-Glo. Os valores foram apresentados em unidades de luz relativa (RLU) e analisados usando o teste 2-way Anova. A FIG. 3D indica que os BMDMs foram infectados com MHV selvagem ou N15m1 e os lisados celulares foram coletados em pontos do tempo indicados. Detecção por Western blot de caspase 3 clivada e proteína N. Todas as infecções são em uma MOI de 0,1. Os dados são representativos de 2 a 3 experimentos independentes e são apresentados como Média \pm Desvio Padrão.

[0017] As FIGS. 4A a 4D indicam que a infecção pelo vírus mutante da nsp15 do MHV ativa os sensores de dsRNA do hospedeiro. A FIG. 4A indica que os BMDMs foram infectados com MHV selvagem ou N15m1 (MOI de 0,1). A 16 hpi, as células foram lisadas e 40 μ g de lisado celular foi detectado para fosfo-eIF2a, eIF2a e proteína N viral por *western blot*. Calnexina serve como um controle de carga. A FIG. 4B indica que o inibidor de PKR bloqueia apoptose induzida por

N15m1 nos BMDMs B6. As células foram infectadas com WT ou N15m1 (MOI de 0,1) e em seguida tratadas com o inibidor de PKR C16 (1 μ M). As células foram coletadas e avaliadas para a atividade da caspase 3/7 em pontos do tempo indicados. Os valores foram apresentados em unidades de luz relativa (RLU) e analisados usando o teste 2-way Anova. A FIG. 4C indica um padrão de degradação do RNA de 300 ng de RNA total extraído dos BMDMs infectados usando um bioanalisador (MOI de 1). Os números de integridade do RNA (RIN) e as posições dos rRNAs 28S, 18S, e tRNA são mostrados na parte inferior e à direita da imagem, respectivamente. A FIG. 4D indica um padrão de degradação do RNA de RNAs dos BMDMs infectados (MOI de 0,1) tratados com inibidor de C16 (1 μ M) ou zVAD (20 μ M) a 18 hpi. Os dados são representativos de 2 a 3 experimentos independentes.

[0018] As FIGS. 5A a 5D indicam que a mutação T98M provoca instabilidade da proteína nsp15. A FIG. 5A indica que os BMDMs infectados com vírus WT ou N15m1 em uma MOI de 0,1 foram lisados a 16 hpi, e proteína N viral, nsp15, e β -actina foram detectadas por *western blotting*. A FIG. 5B indica que WT e T98M mutante de nsp15 foram expressos e purificados a partir de *E. coli*. Coloração por azul de Coomassie mostrou as nsp15 e T98M marcadas com Sumo e purificadas, as quais foram detectadas por anticorpo contra nsp15 usando *western blotting* (parte inferior). A FIG. 5C indica a análise do deslocamento térmico por Fluorimetria de Varredura Diferencial (DSF) da proteína selvagem nsp15 (preto) e mutante nsp15-T98M (vermelho). A FIG. 5D indica que uma molécula de RNA radiomarcada R16.4 foi tratada ao longo do tempo com WT Nsp15 ou T98M na presença de 5 mM de Mn²⁺. No ponto do tempo indicado, uma alíquota da reação foi analisada sobre um gel de poliacrilamida desnaturante a 20%. A sequência de RNA R16.4 é mostrada acima da imagem do gel. O único uridilato, na posição 13, está sublinhado. Os dados são representativos de 2 a 3

experimentos independentes.

[0019] As FIGS. 6A a 6D indicam que o vírus N15m3 (nsp15-H262A) fenocopia o vírus N15m1 na perda de antagonismo do interferon. A FIG. 6A indica que os BMDMs B6 foram infectados com vírus WT ou mutantes de nsp15 (N15m1 ou N15m3) em uma MOI de 0,1. A 12 hpi, o RNA total foi extraído e analisado para os níveis de mRNA de IFN- α 11. Os valores foram apresentados como Média \pm Desvio Padrão e analisados usando T teste não pareado. A FIG. 6B indica que os BMDMs B6 ou ifnar^{-/-} foram infectados com WT ou N15m3 em uma MOI de 0,1. Em pontos do tempo indicados, os sobrenadantes celulares foram coletados para ensaio de placa em células 17CL-1. Os valores foram apresentados como Média \pm Desvio Padrão e analisados usando T teste não pareado. A FIG. 6C indica que os BMDMs B6 foram infectados com WT ou N15m3 em uma MOI de 0,1 e colhidos para análise da atividade da caspase 3/7 em pontos do tempo indicados. Os valores foram apresentados como Média \pm Desvio Padrão e analisados usando T teste não pareado. A FIG. 6D indica o padrão de degradação do RNA de 500 ng de RNA total extraído dos BMDMs infectados usando um bioanalisador (MOI de 0,1). Os números de integridade do RNA (RIN) e as posições dos rRNAs 28S, e 18S são apontados para a parte inferior e para a direita da imagem, respectivamente. Os dados são representativos de 2 a 3 experimentos independentes.

[0020] As FIGS. 7A e 7B indicam que a mutação de Nsp15 afeta a distribuição de dsRNAs nos BMDMs infectados com vírus. Nas FIGS. 7A e 7B, os BMDMs foram infectados com WT ou N15m3 em MOI de 0,1. As células foram fixadas a 6 hpi e coradas com anti-dsRNA, anti-nsp2/3, e Hoescht 33342 (FIG. 7A) ou anti-dsRNA, anti-nsp15, e Hoescht 33342 (FIG. 7B). Foram criadas superfícies para *puncta* com base na fluorescência do dsRNA, e foi medida a fluorescência de nsp dentro de cada superfície. O número de focos de 25 imagens foi con-

tado usando o programa de software IMARIS. A proporção de dsRNA/nsp2/3 foi calculada dividindo os focos de dsRNA total pelo número de focos de nsp2/3 (FIG. 7A). A percentagem de co-localização de nsp15 com dsRNA foi calculada dividindo os focos de dsRNA+ nsp15+ pelos focos de dsRNA total. Os valores foram analisados por T teste não pareado. Barra de escala: 5 μ M.

[0021] As FIGS. 8A a 8G indicam que o vírus mutante de Nsp15 de MHV é altamente atenuado em camundongos e induz uma resposta imune protetora. A FIG. 8A indica a carga viral em órgãos de camundongos infectados com vírus selvagem (WT) ou N15m1. Camundongos C57BL/6J de seis semanas de idade (n=4) foram inoculados por via intraperitoneal com $6,0 \times 10^4$ PFU de vírus. O fígado e o baço foram coletados em pontos do tempo indicados e testados para o título viral por ensaio de placa. A linha tracejada vermelha é uma indicação do limite de detecção. A FIG. 8B indica que os camundongos C57BL/6J foram inoculados por via intraperitoneal com $6,0 \times 10^4$ PFU de vírus. Em 24 hpi, os linfonodos mesentéricos (MLN) foram coletados e os genomas virais foram medidos por RT-PCR quantitativo tendo por alvo o gene N. Os valores são normalizados para β -actina. ^{***}, $p < 0,001$, T teste não pareado. A FIG. 8C indica patologia do fígado por coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E) conforme indicado por setas em camundongos selvagens (WT) e infectados com N15m1. Os dados são representativos de 5 camundongos. Nas FIGS. 8D e 8E, os camundongos foram inoculados por injeção intracraniana (IC) com 600 PFU de vírus selvagem (WT) ou N15m1. A patogenicidade viral foi medida pela percentagem de perda de peso corporal (FIG. 8D) e pela percentagem de sobrevivência (FIG. 8E). Nas FIGS. 8F e 8G, camundongos naive de treze semanas de idade e camundongos infectados com N15m1 da FIG. 8D foram estimulados com $6,0 \times 10^3$ PFU de vírus WT por inoculação intracraniana (IC). A patogenicidade viral foi medida

pela percentagem de perda de peso corporal (FIG. 8F) e pela percentagem de sobrevivência (FIG. 8G). Os números de camundongos (n) são indicados. Os p valores da taxa de sobrevivência foram calculados usando teste de log-rank.

[0022] As FIGS. 9A e 9B indicam que o vírus da diarreia epidêmica porcina (PEDV) mutante deficiente de EndoU aumenta a produção de interferon tipo I em macrófagos porcinos infectados. A FIG. 9A é um diagrama esquemático de clones infecciosos de PEDV selvagem (icPEDV) e um vírus mutante de nsp15 de PEDV (icPEDV-deEndoU). A FIG. 9B indica que Vero as células foram infectadas com 0,1 unidade de formação de placa/célula de ou icPEDV ou icPEDV-deEndoU. Em pontos do tempo indicados, os sobrenadantes celulares foram coletados para titulação viral. Os dados demonstram que tanto icPEDV quanto icPEDV-deEndoU se propagaram de modo eficaz em células Vero e apresentaram uma cinética de crescimento similar. A FIG. 9C indica que macrófagos alveolares porcinos primários (PAMs) foram infectados com ou vírus icPEDV ou icPEDV-deEndoU e coletados em pontos do tempo indicados. O RNA total foi extraído das células coletadas e foi transcrito em cDNA. A produção de interferons tipo I (IFN- α e IFN- β) foi avaliada examinando seus níveis de mRNA usando PCR quantitativo. Os dados demonstram que o vírus mutante PEDV deEndoU estimula um nível elevado significativo de produção de IFN tipo I em PAMs em comparação com a infecção por PEDV selvagem (N.D. = não detectado).

[0023] As FIGS. 10A e 10B indicam que N15m1, mas não o vírus N3m, induz ativação do IFN. A FIG. 10A indica que os BMDMs foram infectados com MHV selvagem ou N15m1 (MOI de 0,1). A 12 hpi, as células infectadas foram fixadas com 4% de formaldeído e coradas com Hoechst 33342 (núcleo; azul), antinucleocapsídeo (N; vermelho), e anti-ISG54 (verde). A imunofluorescência foi detectada por micros-

copia confocal. A FIG. 10B indica que os BMDMs foram infectados com MHV selvagem (WT), N3m, ou N15m1 (MOI de 0,1). Os níveis de mRNA de IFN- α 11 foram determinados a 12 hpi por RT-PCR quantitativo. Valores normalizados para β -actina. n.s., não significativo, T teste não pareado.

[0024] As FIGS. 11A e 11B indicam que N15m1 induz uma rápida morte celular apoptótica. A FIG. 11A indica que os BMDMs B6 foram infectados com MHV selvagem (WT), N15m1, ou N15m1 inativado com UV (UV-N15m1). Em 24 hpi, o efeito citopático foi observado sob microscopia de campo brilhante. A FIG. 11 B indica que a condensação da cromatina nuclear (setas pretas) indicativa de apoptose foi determinada por microscopia eletrônica nos BMDMs tratados com estauroporina (1 μ M) ou infectados com MHV selvagem ou N15m1 a 16 hpi.

[0025] As FIGS 12A e 12B indicam que apoptose induzida por N15m1 pode ser inibida por inibidor de PKR C16 e requer receptores de IFN tipo I. A FIG. 12A indica que os BMDMs B6 foram infectados com WT ou N15m1 em uma MOI de 0,1. O efeito citopático e a viabilidade celular foram avaliados a 18 hpi. **** $p < 0,0001$, T teste não pareado. A FIG. 12B indica que os BMDMs B6 ou *ifnar*^{-/-} foram infectados com WT ou N15m1 em uma MOI de. A atividade da Caspase 3/7 foi medida a 18 hpi por um ensaio de Caspase 3/7-Glo. **** $p < 0,0001$, teste 2-way Anova. Os dados são representativos de 2 a 3 experimentos independentes. Os dados na FIG. 12B são mostrados em unidades de luz relativa (RLU) e são apresentados como Média \pm Desvio Padrão.

[0026] A FIG. 13 indica que a mutação T98M altera a oligomerização de nsp15. Foi usada Dispersão de Luz Dinâmica para avaliar a percentagem de monômero e hexâmero presentes em concentrações crescentes de nsp15 selvagem (WT) e T98M.

[0027] As FIGS. 14A e 14B indicam que N15m3 induz uma rápida morte celular nos BMDMs B6. Os BMDMs B6 foram infectados com

vírus selvagem (WT), N15m1, ou N15m3 em uma MOI de 0,1. A FIG. 14A indica que a 24 hpi, a viabilidade celular foi determinada usando ensaio CellTiter Glo. Os valores foram analisados por T teste não pareado. A FIG. 14B indica que a 12 hpi, as células foram coletadas e 20 ug de lisado total foi usado para a detecção de nsp15, proteína N, e controle de carga (β -actina).

[0028] As FIGS. 15A e 15B indicam que a atividade da endonuclease de Nsp15 não altera a quantidade de dsRNA nos BMDMs infectados. BMDMs B6 (FIG. 15A) ou *ifnar^{-/-}* (FIG. 15B) foram infectados com vírus selvagem (WT) ou N15m3 em uma MOI de 0,1. A 6 hpi, as células foram coradas para dsRNA e analisadas por citometria de fluxo.

[0029] As FIGS. 16A e 16B indicam que Nsp15 afeta a distribuição de dsRNA nos BMDMs infectados. Os BMDMs foram infectados com WT ou N15m3 em uma MOI de 0,1. As células foram fixadas a 6 hpi e coradas com anti-dsRNA, anti-nsp2/3, e Hoescht 33342. O número de focos de 25 imagens foi contado usando o programa de software IMARIS. A FIG. 16A indica que o número de focos de dsRNA e nsp2/3 foram contados nos BMDMs *ifnar^{-/-}*. A FIG. 16B indica a localização de dsRNA e nsp2/3 nos BMDMs B6. O número de focos de dsRNA e nsp2/3 foram contados e a proporção de dsRNA/nsp2/3 foi calculada dividindo os focos de dsRNA total pelo número de focos de nsp2/3 (FIG. 16A). Os valores foram analisados por T teste não pareado. Barra de escala: 5 μ M.

[0030] As FIGS. 17A e 17B indicam que os vírus mutantes Nsp15 são atenuados em camundongos C57BL/6, mas não em camundongos *ifnar^{-/-}*. Camundongos C57BL/6 de seis semanas de idade (n=5) foram inoculados por via intraperitoneal com $6,0 \times 10^4$ PFU de vírus. Em 5 dpi, foi determinada a patologia do fígado por coloração com H&E (FIG. 17A). Os fígados foram coletados em 3 e 5 dpi e testados para o título viral por ensaio de placa usando células 17CI-1 (FIG. 17B). A linha tra-

cejada vermelha indica o limite de detecção.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0031] A presente invenção proporciona coronavírus mutantes, vacinas compreendendo coronavírus mutantes, métodos de produção de vacinas, e métodos de prevenção de doença.

[0032] Os vírus de RNA que se replicam através de intermediários de dsRNA podem ser detectados como "não auto" ("*non-self*") pelos sensores de dsRNA do hospedeiro, incluindo receptores citoplasmáticos semelhantes a RIG (RLRs). A ativação de RLRs estimula a produção de interferon, o qual regula positivamente sensores de dsRNA adicionais, tais como PKR e o sistema OAS/RNase L, e centenas de genes estimulados por interferon antiviral (ISGs). Além disso, o interferon secretado a partir de células infectadas por vírus que sentem com sucesso o dsRNA pode induzir um estado antiviral nas células vizinhas e limitar a replicação de vírus de RNA potencialmente invasores. Portanto, muitos vírus desenvolveram estratégias para seqüestrar dsRNA de modo a escapar da detecção pelos sensores do hospedeiro. Esta invenção apresenta uma função previamente não reconhecida para o coronavírus nsp15 no bloqueio da ativação de sensores de dsRNA nos macrófagos, deste modo permitindo a replicação viral e a disseminação do vírus da progênie.

[0033] De modo a investigar o antagonismo para o coronavírus da resposta do interferon, investigações levando à presente invenção testaram a cepa A59 do vírus da hepatite de camundongo (MHV-A59), um modelo de coronavírus que se replica em múltiplos tipos de células murinas, incluindo os macrófagos, e pode causar hepatite aguda ou encefalite letal, dependendo do sítio de injeção. O RNA genômico viral tem trinta e dois kilobases e dois terços do genoma codifica uma grande poliproteína replicase, enquanto o restante do genoma codifica para proteínas estruturais e proteínas acessórias específicas da cepa (Fig.

1A). A poliproteína replicase é processada por proteases virais em dezesseis proteínas não estruturais (nsp's). As nsp's virais agregam junto com o retículo endoplasmático do hospedeiro para gerar membranas convolutas e vesículas de dupla membrana (DMVs), as quais são os sítios de síntese de RNA viral. A replicação do RNA do coronavírus prossegue através da geração de um conjunto aninhado de RNAs de cadeia negativa que servem como os modelos para síntese de novos genomas de cadeia positiva e mRNAs. Intermediários de RNA de cadeia dupla (dsRNA), potentes estimuladores de sensores citoplasmáticos inatos, são produzidos durante este processo e visualizados em associação com os DMVs. Uma potencial função para as DMVs dos coronavírus pode ser seqüestrar o dsRNA viral para longe dos sensores de dsRNA do hospedeiro. No entanto, não está claro se as DMVs isoladas são suficientes para prevenir a ativação da resposta imune inata do hospedeiro. As investigações reportadas aqui, neste pedido de patente, surpreendentemente mostraram que a proteína não estrutural 15 do coronavírus (nsp15), um componente de Nidovírus altamente conservado (coronavírus e arterivírus) com atividade de endoribonuclease, age em conjunto com o complexo de replicação viral para limitar a exposição do dsRNA viral aos sensores de dsRNA do hospedeiro.

[0034] Nsp15 é uma proteína não estrutural gerada por processamento, mediado por protease viral, da poliproteína replicase (Fig. 1A). Análise bioinformática revelou que a nsp15 contém um domínio com homologia distante com endoribonucleases celulares, denominado NendoU, o qual é altamente conservado nos Nidovírus dos vertebrados. Estudos estruturais e bioquímicos revelaram que SARS-CoV e MHV nsp15, e o arterivírus ortólogo nsp11 podem se agregar para formar oligômeros e clivar moléculas de ssRNA e de dsRNA com uma preferência pelo uridinilato 3'. No entanto, a função da atividade da en-

endoribonuclease na replicação e na patogênese do do Nidovírus não foi bem entendida previamente. Os pesquisadores não foram capazes de recuperar vírus 229E CoV humano codificando um mutante do sítio catalítico da endoribonuclease, e portanto concluíram que nsp15 foi essencial para replicação do coronavírus; ao passo que MHV codificando mutações de sítios catalíticos de nsp15 replicaram até títulos reduzidos (cerca de um log) em linhagens celulares de fibroblastos.

[0035] Investigações levando à presente invenção determinaram que nsp15 não é requerido para síntese de RNA viral per se, porém age mediando a evasão de sensores de dsRNA do hospedeiro. Especificamente, coronavírus codificando mutações em nsp15, as quais ou tornam nsp15 instável ou desativa a atividade da endoribonuclease, ativam o interferon e sensores de dsRNA PKR e OAS para promover morte celular apoptótica nos macrófagos. Portanto, nsp15 é essencial para infecção por vírus e disseminação em camundongos, e que um vírus mutante nsp15 pode induzir uma resposta imune protetora.

[0036] Modalidades não limitantes da invenção serão agora descritas em referência a investigações experimentais lendo até a invenção.

[0037] Foram usados métodos de triagem para identificar os mecanismos usados pelos coronavírus para bloquear a resposta imune inata, particularmente a ativação do interferon tipo I (IFN- α/β). Estas triagens identificaram um isolado viral, designado N15m1, op qual provocou a produção de IFN- α depois de infecção de macrófagos derivados da medula óssea murina (BMDMs) (resumido na Fig. 1C). Sequenciamento profundo do RNA genômico viral revelou que N15m1 contém uma mutação em nsp15 (treonina 98 para metionina) e uma mutação em nsp3 (arginina 971 para alanina [R971A]). A infecção de macrófagos com N15m1 ativou a transcrição do IFN- α conforme detectado por PCR quantitativo (qPCR) (Fig. 2A), e aumentou a quantidade de proteína IFN- α secretada, conforme detectado por ELISA (Fig. 2B).

Uma consequência da ativação do de interferon tipo I foi a regulação positiva do ISG54 estimulado pelo interferon, conforme detectado por coloração imunofluorescente (Fig. 10A). O resíduo treonina-98 em nsp15 é altamente conservado nos coronavírus (Fig. 1 D) e pode ser crucial para a funcionalidade. Além disso, foi produzido um vírus mutante nsp3 "limpo", designado N3m (Fig. 1 C), o qual abriga somente a mutação R971A. N3m conservou a capacidade para antagonizar interferon como o vírus selvagem (WT) (Fig. 10B), sugerindo adicionalmente que a mutação T98M em nsp15 é responsável pela perda de antagonismo do IFN- α .

[0038] De modo a determinar se a expressão de IFN- α e ISGs alterou a cinética da replicação viral ou o título viral, BMDMs selvagens (B6) e deficiente de receptor de interferon tipo I (*ifnar*^{-/-}) foram infectados com ou vírus selvagem (WT) ou N15m1 em uma baixa multiplicidade de infecção (MOI de 0,1), e a produção de vírus foi monitorada ao longo do tempo. A replicação de N15m1 foi significativamente retardada e reduzida nos BMDMs B6 e o nível de vírus da progênie produzido foi significativamente menor do que o do vírus selvagem depois de 8 hpi (Fig. 2C). Esta deficiência de replicação de N15m1 não foi observada nos BMDMs *ifnar*^{-/-} uma vez que N15m1 teve cinética similar ao vírus selvagem (Fig. 2D), consistente com a ideia de que o interferon limita a replicação do vírus. Tomados em conjunto, concluiu-se que a mutação T98M em nsp15 resulta em um vírus que falha em bloquear a ativação do interferon tipo I nos macrófagos. Estes resultados indicam que a nsp15 selvagem funciona como um antagonista do IFN tipo I no contexto de infecção viral.

[0039] Ao realizar os experimentos da cinética de crescimento descritos acima, observou-se que os macrófagos infectados com N15m1 morreram mais rapidamente do que as células infectadas com ou vírus selvagem ou vírus inativado por UV. Conforme mostrado na

Figura 3A, os BMDMs infectados com N15m1 tiveram uma viabilidade celular significativamente menor a 24 hpi (vide também a Fig. 11 A). Além disso, o inibidor da pan-caspase zVAD, mas não o inibidor da RIPK1 Nec-1 ou o inibidor da caspase-1 VX-765, apreventou morte celular induzida por vírus (Fig. 3B). Estes resultados indicarem que infecção por N15m1 ativa a morte celular apoptótica ao invés de necroptose dependente de RIPK1/RIPK3 ou piroptose mediada pela caspase-1. Esta descoberta foi corroborada avaliando outras marcas de apoptose: aumento da atividade da caspase-3/7 nos BMDMs infectados com N15m1 que é inibida por zVAD (Fig. 3C); a ativação da via de apoptose dependente da caspase 3/7 também foi demonstrada através da detecção de níveis aumentados de produtos da caspase-3 clivados (Fig. 3D); e foram observadas cromatina condensada e marginalizada, e fragmentação nuclear por microscopia eletrônica (EM) em BMDMs infectados com N15m1 comparados com infectados com vírus selvagem (Fig. 11 B). Tomados em conjunto, estes dados demonstraram que infecção com N15m1 induz apoptose nos macrófagos, sugerindo que nsp15 selvagem não somente antagoniza a ativação do interferon tipo I, mas também previne a morte celular apoptótica.

[0040] A síntese do interferon tipo I e morte celular apoptótica são acionadas por sensores do hospedeiro associados à membrana ou citoplasmáticos que reconhecem o dsRNA viral. A ativação, dependente de dsRNA, dos genes estimulados pelo interferon 2'5'-oligoadenilato sintetase (OAS) e proteína quinase R (PKR) pode acionar a morte celular apoptótica. Estudos anteriores mostraram que nsp15 de SARS-CoV e MHV é uma endoribonuclease viral e pode tanto se ligar a quanto clivar moléculas de RNA (ssRNA e dsRNA). Portanto, foi sugerida a hipótese de que nsp15 selvagem pode bloquear a síntese de interferon e prevenir apoptose seqüestrando dsRNA dos sensores do hospedeiro. De modo a avaliar se nsp15 previne a ativação de senso-

res de dsRNA, foram avaliados os níveis de eIF2 α fosforilado, um indicador da ativação de PKR, e degradação do RNA ribossômico (rRNA), um indicador de sinalização do sistema 2'5'-OAS/RNaseL ativo. Foi observado aumento da fosforilação de eIF2 α nos BMDMs infectados com N15m1 em comparação com infecção pelo vírus selvagem (Fig. 4A). A adição do inibidor da quinase PKR específico C16 reduziu significativamente os níveis de ativação da caspase 3/7 que é associada com apoptose em células infectadas com N15m1 (Fig. 4B e 12A).

[0041] A ativação da via 2'5'-OAS/RNaseL também foi observada, conforme revelado por degradação do rRNA a 12 e 24 hpi (Fig. 4C). A degradação do rRNA do hospedeiro não foi inibida por zVAD ou C16 (Fig. 4D), indicando que a ativação de 2'5'-OAS/RNaseL não foi uma consequência da apoptose, e foi independente da via PKR. Finalmente, clivagem da caspase-3 ou a ativação da caspase-3/7 nos macrófagos infectados com N15m1 foram dependentes do receptor de IFN (Fig. 4C e 12B), sugerindo adicionalmente que a apoptose observada depende de genes estimulados pelo interferon. Tomados em conjunto, estes dados sugeriram que durante a infecção por N15m1 dos macrófagos, a detecção do dsRNA viral aciona a fosforilação do eIF2 α , a degradação do RNA, a ativação da caspase 3/7, e apoptose. Estes resultados corroboraram a hipótese de que nsp15 selvagem funciona prevenindo a ativação, mediada por dsRNA, de respostas imunes inatas.

[0042] A mutação T98M se situa na interface entre o domínio N-terminal e o domínio médio de nsp15 (Fig. 1 B), o qual pode afetar a estabilidade ou a montagem de oligômeros. Na verdade, foi visto que o nível de nsp15 foi significativamente reduzido em células infectadas com N15m1 quando comparadas com células infectadas com selvagem, ao passo que o nível de proteínas N foi somente minimamente reduzido (Fig. 5A). A diminuição do nível de nsp15 nos BMDMs B6 infectados com N15m1 foi não somente devida à redução da replicação

viral porque a redução também foi observada em BMDMs *ifnar^{-/-}* infectados com N15m1 (Fig. 5A), onde ambos os vírus tiveram níveis similares de proteína N e cinéticas de crescimento similares (Fig. 2D). A redução da detecção também não é devida à afinidade dos anticorpos contra nsp15 para proteína mutada uma vez que tanto as proteínas nsp15 selvagens quanto T98M nsp15 purificadas a partir de *E. coli* foram detectadas de maneira equivalente por antissoro policlonal contra nsp15 (Fig 5B, parte inferior). Estes resultados sugeriram que a mutação T98M desestabiliza nsp15, resultando em uma diminuição no nível da proteína em estado estacionário em células infectadas com N15m1.

[0043] De modo a avaliar adicionalmente o efeito da mutação T98M sobre a proteína nsp15, versões de códons otimizados das proteínas nsp15 selvagem e T98M foram clonadas e expressas como proteínas de fusão SUMO em *E. coli* (Fig. 3B, parte superior). Com base na estrutura da nsp15, o marcador SUMO não vai afetar a montagem de oligômeros, tais como hexâmeros previamente reportados para nsp15. De modo a avaliar adicionalmente se a mutação T98M desestabiliza a proteína, foi utilizada fluorimetria de varredura diferencial (DSF) para medir a estabilidade da nsp15 em resposta ao calor (Fig. 5C). nsp15 selvagem apresenta uma grande transição para o estado desnaturado a 47°C. Em contraste, o mutante T98M desnaturou a 40°C, sete graus menos do que a nsp15 selvagem, indicando adicionalmente que a mutação T98M torna a nsp15 menos estável.

[0044] Usando espectrometria de dispersão dinâmica da luz (DLS), foi visto que a maioria da nsp15 selvagem se aglomera para formar oligômeros em uma concentração de proteína de 0,05 mg/ml (Fig. 13). Em contraste, a maior parte do mutante nsp15-T98M foi detectada sob a forma monomérica sob estas condições (Fig. 13). De modo a determinar se oligomerização prejudicada ou falta de oligomerização de nsp15-T98M afetou a atividade da endoribonuclease, foi conduzida

uma avaliação que descobriu que o mutante T98M apresentou uma significativa redução na atividade de clivagem de RNA em comparação com a proteína selvagem (Fig.5D). Em conjunto, as caracterizações *in vitro* das proteínas nsp15 selvagem e T98M demonstraram que a mutação T98M diminui a estabilidade das proteínas e prejudica a atividade da endoribonuclease. Estes resultados foram interpretados para demonstrar adicionalmente que um gene da replicase variante codificando poliproteínas compreendendo nsp15 e provocando quaisquer modificações, incluindo mutação(ões) e/ou deleção(ões), em nsp15 tem a capacidade para afetar a estabilidade (desestabilizar) ou a atividade (inativar) de nsp15.

[0045] Como a mutação T98M provoca a perda de proteína e prejudica a atividade da endoribonuclease de nsp15, foram realizados experimentos de modo a determinar se a atividade da endoribonuclease é crucial para a fuga dos sensores de dsRNA do hospedeiro. Foi gerado um vírus mutante com uma forma inativa endonucleolítica de nsp15 (H262A), designado como N15m3. Foi visto que a infecção de macrófagos com N15m3 resultou em transcrição elevada de IFN- α (Fig. 6A), deficiência de replicação nos BMDMs B6, mas não nos BMDMs *ifnar*^{-/-} (Fig. 6B), rápida morte celular apoptótica (Fig. 6C e 14A), e degradação do rRNA (Fig. 6D), demonstrando que N15m3 fenocopia o vírus N15m1. A mutação H262A não afetou o nível de nsp15 em estado estacionário, uma vez que N15m3, diferentemente de N15m1, expressou níveis de nsp15 similares ao vírus selvagem nos BMDMs *ifnar*^{-/-} (Fig. 14B). Portanto, foi determinado que a perda de atividade de endoribonuclease (H262A) recapitula os fenótipos associados com a perda de proteína nsp15 pela mutação T98M. No total, estes resultados indicaram que a atividade da endoribonuclease de nsp15 é importante para a fuga de sensores de dsRNA do hospedeiro.

[0046] nsp15 de MHV purificada a partir de *E. coli* apresenta ativi-

dade de endonuclease na presença de manganês e a substituição da Histidina catalítica 262 com Alanina (H262A) resultou em uma enzima inativa. Portanto, o vírus N15m3 foi escolhida uma vez que abriga a forma inativa catalítica de nsp15 (H262A) de modo a determinar adicionalmente o papel da atividade da endoribonuclease na prevenção da ativação dos sensores de dsRNA do hospedeiro. Como infecção pelo CoV produz intermediários do dsRNA durante a replicação do vírus, foi sugerida a hipótese de que nsp15 pode degradar o dsRNA viral para prevenir a acumulação de dsRNA. De modo a testar esta hipótese, ou BMDMs B6 ou BMDMs ifnar^{-/-} foram infectados com vírus selvagem ou N15m3 e foi medido o nível de dsRNA. De maneira surpreendente, não foi observado um aumento no nível de dsRNA em células infectadas com N15m3, conforme medido pela intensidade de fluorescência de dsRNA ou pela porcentagem de células positivas para dsRNA usando citometria de fluxo (Fig. 15), implicando que a função antagonista de nsp15 pode não ser mediada através de degradação do dsRNA viral.

[0047] Acreditava-se que dsRNA de CoV se associasse principalmente com o complexo de replicação e que fosse enterrado nos DMVs, os quais se imagina que protejam o RNA viral contra os sensores do hospedeiro. Portanto, foi sugerida a hipótese de que a nsp15 pode funcionar para manter a associação de dsRNA com o complexo de replicação ou para facilitar o empacotamento do dsRNA dentro dos DMVs. Deste modo, foi previsto que o vírus mutante nsp15 pode gerar mais dsRNAs "livres", e que estes dsRNAs livres ativam os sensores do hospedeiro. De modo a testar esta hipótese, foi avaliada a localização subcelular de dsRNA e complexo de replicação (nsp2/3 como um indicador) por imunofluorescência usando anticorpos específicos. De maneira interessante, foi visto que infecção por N15m3 produziu mais focos de dsRNA que não co-localizaram com nsp2/3, particular-

mente nos BMDMs *ifnar*^{-/-} (Fig. 7A).

[0048] De modo a quantificar o dsRNA "livre", o número de focos de dsRNA e nsp2/3 foi contado usando o programa do software IMARIS. Foi visto que no caso de ter números similares de focos de nsp2/3 nos BMDMs *ifnar*^{-/-}, N15m3 produziu mais focos de dsRNA do que o vírus selvagem (Fig. 7A painel da esquerda e 16A). O número de focos de dsRNA "livres" e a proporção de dsRNA/nsp2/3 de N15m3 foram significativamente maiores do que os do vírus selvagem (Fig. 7A painel da direita). Nos BMDMs B6, o vírus N15m3 produziu números similares de focos de dsRNA porém significativamente menos focos de nsp2/3 devido à replicação prejudicada (Fig. 6B). Observou-se que a proporção de dsRNA/nsp2/3 ainda foi maior em N15m3 do que no vírus selvagem (Fig. 16B), consistente com os resultados obtidos de BMDMs *ifnar*^{-/-} (Fig. 7A). Tomados em conjunto, estes dados sugerem que nsp15 pode não afetar a quantidade de dsRNA na célula, mas funciona mantendo a associação de dsRNA com nsp2/3, e posterior empacotamento de dsRNA dentro dos DMVs.

[0049] De modo a entender adicionalmente a relação entre nsp15 e dsRNA, as localizações de nsp15 e dsRNA foram examinadas. Acreditava-se que nsp15 se associa com RNA viral recém sintetizado em puncta característicos que contêm proteínas replicases virais, e são considerados como sendo os sítios para síntese de RNA viral. Nsp15 e dsRNA foram visualizados por imunofluorescência usando anticorpos específicos. Foi visto que o número de focos de dsRNA que co-localizou com nsp15 foi significativamente reduzido em células infectadas com N15m3 em comparação com células infectadas com WT (Fig 7B). Estes resultados adicionalmente corroboraram que nsp15 pode se associar com dsRNA e o complexo de replicação viral. Portanto, concluiu-se que a perda da atividade de endoribonuclease pode romper a associação de dsRNA e o complexo de replicação, resultan-

do em mais dsRNA "livre" a ser sentido pelos sensores do hospedeiro.

[0050] Como os vírus mutantes de nsp15 induzem uma robusta resposta de interferon e ativam os sensores de dsRNA do hospedeiro, foram realizadas investigações adicionais de modo a determinar se a perda de antagonismo mediado por nsp15 das respostas imunes inatas altera a patogênese do coronavírus murino. Para este fim, foi empregado um modelo de infecção não letal no qual se esperou que os títulos de WT MHV-A59 atingissem o pico no dia cinco depois da infecção. Os camundongos foram injetados por via intraperitoneal com 60.000 PFU e os fígados e os baços foram coletados nos dias três e cinco depois da infecção para medir a replicação viral. De modo interessante, um ensaio de placa de rotina para enumerar as partículas infecciosas foi negativo para vírus nos camundongos inoculados com N15m1 (Fig. 8A). O ensaio de RT-qPCR mais sensível para detectar mRNA do gene N do MHV identificou mínimos níveis de RNA de N15m1 nos linfonodos mesentéricos (MLN) no dia um depois da infecção mas não em momentos posteriores (Fig. 8B e dados não mostrados). Exame histológico dos fígados revelou lesões típicas associadas com infecção por MHV selvagem, mas não em camundongos infectados com N15m1 (Fig. 8C). De modo similar, os camundongos infectados com N15m3 não apresentaram sinais de patologia do fígado similar aos camundongos infectados com N15m1 (Fig. 17A).

[0051] Foi usado um modelo de estímulo letal de modo a determinar se o vírus N15m1 foi atenuado. Somente é necessário 600 PFU de vírus selvagem introduzido dentro do crânio de um camundongo para induzir encefalite letal. Os camundongos infectados com vírus selvagem perderam peso corporal e sucumbiram à infecção por volta do dia sete depois da infecção. Em contraste, todos os camundongos infectados com N15m1 sobreviveram à infecção, apresentando somente perda de peso transitória no dia um depois da infecção, e ganharam

peso ao longo do tempo (Fig. 8D e 8E). Estes dados revelam que N15m1 é profundamente atenuado e não apresenta patogênese mesmo neste sensível modelo in vivo. Além disso, os camundongos *ifnar^{-/-}* foram infectados por via intraperitoneal com 50 PFU de ou vírus selvagens ou mutantes, e todos os camundongos rapidamente sucumbiram à infecção, corroborando o conceito de que a perda de função de antagonismo do IFN de nsp15 nos vírus mutantes é responsável por atenuação durante a infecção de camundongos B6 (Fig.17B). De modo importante, a inoculação com N15m1 protegeu totalmente os camundongos contra um estímulo com 6000 PFU (10 vezes a dose letal) de MHV selvagem (Fig. 8F e 8G).

[0052] No total, estas investigações experimentais demonstraram a função de nsp15 durante infecção por vírus selvagem para evitar que dsRNA viral venha a ativar os sensores do hospedeiro. A perda de nsp15 durante a replicação viral resultou em rápida detecção de dsRNA, ativação do interferon tipo I, 2'5'-OAS/RNaseL e PKR, o qual limita a replicação, a disseminação e a doença virais. Foi demonstrado que na ausência de sinalização de IFN, vírus mutantes nsp15 replicam de modo similar ao vírus selvagem, indicando que a atividade da endoribonuclease de nsp15 não é requerida para síntese de RNA viral. Ao invés, nsp15 é crucial para descarrilar a resposta imune inata para replicação de coronavírus em macrófagos.

[0053] O efeito de nsp15 como um antagonista de sensores de dsRNA é distinto dos estudos anteriores de antagonistas codificados por replicase de coronavírus. CoVs codificam uma 2'0-metiltransferase (nsp16) para proporcionar uma estrutura de cobertura nas extremidades 5' de seu mRNA para evitar o reconhecimento pelos PRRs do hospedeiro. Vírus mutantes SARS-CoV e MHV que carecem de atividade de 2'0-metiltransferase dispararam a resposta de IFN tipo I e foram atenuados nos macrófagos e em camundongos. nsp1 de SARS-

CoV e MHV pode prevenir a indução de IFN por degradação do mRNA do hospedeiro; no entanto, infecção dos macrófagos com um mutante de deleção nsp1 não alterou a indução de IFN, mas ao contrário, foi atenuada nos camundongos B6. CoVs codificam um domínio de protease semelhante a papaína essencial (PLP2 ou PLpro) dentro da nsp3, o qual pode desregular a resposta imune inata por clivagem de moléculas de ubiquitina de substratos celulares. Como a nsp15 é altamente conservada em todos os coronavírus, incluindo coronavírus relativamente benignos tais como HCoV-229E e OC43, os quais provocam resfriados comuns, é possível que nsp15 seja fundamental para a capacidade do vírus para prevenir o reconhecimento de sensores de dsRNA do hospedeiro nos macrófagos possibilitando a disseminação do vírus para os órgãos alvo.

[0054] Estudos anteriores mostraram que os coronavírus codificam fatores virais para impedir a ativação de sensores do hospedeiro, mediada pelo dsRNA, tais como o sistema OAS/RNase L e PKR. Por exemplo, a cepa de coronavírus murino usada nas investigações acima mencionadas também codifica a proteína acessória ns2, a qual é outro importante antagonista do sistema OAS/RNase L. Ns2 codifica uma enzima 2',5'-fosfodiesterase (PDE), a qual cliva o 2',5'-oligoadenilato, o produto de OAS, para prevenir a degradação do rRNA, mediada pela RNase L, nos macrófagos. De maneira interessante, o ns2 do coronavírus confere um efeito específico para o fígado assim como infecção intracraniana com o vírus mutante ns2 permanece letal. Foi visto que os vírus mutantes nsp15 com um ns2 intacto foram capazes de induzir a degradação do rRNA nos macrófagos e foram altamente atenuados tanto em modelos de hepatite quanto de encefalite em camundongo. Investigações das proteínas acessórias de MERS-CoV revelaram que NS4b tem uma atividade de PDE similar a ns2 de MHV e inibe a atividade da RNase L. MERS-CoV NS4a codifica

uma proteína de ligação ao dsRNA que limita a ativação de PKR. A deleção de NS4a no contexto do vírus não foi suficiente para ativar PKR e a geração de uma resposta de estresse, e portanto, MERS-CoV deve ter mecanismos redundantes para suprimir o reconhecimento e a ativação de sensores de dsRNA. Os resultados apresentados aqui indicam que nsp15 pode servir como um fator viral conservado para suprimir a ativação de sensores de dsRNA durante infecção pelo CoV, e que a supressão adicional de PKR e/ou OAS/RNase L por ns2, NS4a, ou NS4b pode proporcionar mecanismos de controle específicos para tecidos ou redundantes que provavelmente contribuem para a patogênese viral.

[0055] O um ou mais mecanismos exatos que a nsp15 usa para suprimir a ativação de sensores de RNA viral ainda precisam ser determinados, particularmente com respeito ao papel da atividade da endoribonuclease nsp15 no antagonismo de sensores de dsRNA. Com relação à atividade da ribonuclease, foi demonstrado que dois vírus codificando a atividade da ribonuclease funcionam na supressão de respostas imunes inatas. A RNase Erns do pestivirus age como um receptor de chamariz enzimaticamente ativo que degrada o RNA viral em compartimentos endolisossômicos, o qual limita a exposição do RNA aos sensores de dsRNA do hospedeiro. A nucleoproteína do Lassa vírus também contém um domínio de exonuclease 3' a 5' que digere o dsRNA livre e é essencial para suprimir a translocação do fator três regulador do interferon e ativação do sistema de resposta imune inata do hospedeiro. Portanto, foi razoável supor que a nsp15 pode degradar o dsRNA viral para prevenir a detecção pelos sensores de dsRNA do hospedeiro. Não obstante, não foram observados níveis de dsRNA aumentado em macrófagos infectados com vírus mutante da nsp15 (Fig. 14), sugerindo que a nsp15 pode ter alvos específicos ao invés de RNA amplamente degradante. Estes estudos mostraram que a

nsp15 pode manter a associação do dsRNA com o complexo de replicação ou mediar o empacotamento de dsRNA do DMV.

[0056] Em vista do acima exposto, as investigações acima mencionadas proporcionaram um entendimento dos mecanismos usados pelos coronavírus para modularem de modo eficaz a resposta imune inata em macrófagos e proporcionam várias novas direções para o desenvolvimento de terapias tendo por alvo a nsp15 e o desenvolvimento de vacinas vivas e atenuadas. Por exemplo, acredita-se que sujeitos podem ser inoculados contra vários coronavírus por aplicação de uma vacina compreendendo um coronavírus vivo e atenuado compreendendo um gene da replicase variante codificando poliproteínas e provocando uma modificação, incluindo mutação(s) ou deleção(ões), em nsp15 que afeta a estabilidade ou a atividade da nsp15, como um exemplo particular porém não limitante, uma proteína compreendendo uma mutação de aminoácido de treonina para metionina na posição 98 ou de histidina catalítica para alanina na posição 262. A vacina pode incluir um veículo farmacologicamente aceitável tal como, mas não limitado a água, salina, salina tamponada, tampão de fosfato, soluções alcoólicas/aquosas, emulsões ou suspensões.

[0057] Como a nsp15 é altamente conservada em todos os coronavírus, acredita-se que a abordagem acima descrita possa ser estendida para gerar vacinas para todos os coronavírus existentes e emergentes (Coronavirinae). Portanto, acredita-se que possam ser produzidas vacinas com sucesso formando mutações em nsp-15 de vários coronavírus incluindo, mas não limitados a, o coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS-CoV), o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), os coronavírus humanos 229E (HCoV-229E), OC43 (HCoV-OC43), HKU1 (HCoV-HKU1), e NL63 (HCoV-NL63), o vírus da peritonite infecciosa dos felinos (FIPV), o coronavírus canino (CCoV), o vírus da bronquite infecciosa (IBV) das

galinhas, o coronavírus bovino (B0C0V), e os coronavirus porcinos incluindo o vírus da gastroenterite transmissível (TGEV), o coronavírus porcino delta (PDCoV), o vírus da diarreia epidêmica porcina (PEDV), o coronavírus respiratório porcino (PRCV), e o coronavírus da encefalomielite hemaglutinante porcina (PHE-CoV).

[0058] A inativação de nsp15/EndoU do vírus da diarreia epidêmica porcina (PEDV) por mutação de um clone infeccioso resulta em um vírus que replica de maneira eficaz em cultura de tecido porém ativa a resposta imune inata para gerar interferons em macrófagos infectados (Fig. 9). A inativação da atividade da nsp15/EndoU em qualquer coronavírus que infecte seres humanos ou animais vai gerar uma cepa de vacina do vírus. Esta inativação possibilita a rápida ativação do interferon em macrófagos infectados com vírus, os quais podem então estimular a resposta imune adaptativa. Isto pode ser demonstrado em múltiplas espécies de coronavírus e resulta em um vírus que estimula a ativação da resposta imune inata, por exemplo, a resposta do interferon Tipo I.

[0059] A corroboração de aspectos do estudo e conclusões discutidas acima foram publicadas em Deng et al., "*Coronavirus non structural protein 15 mediates evasion of dsRNA sensors and limits apoptosis in macrophages*," *Proceedings of the National Academy of Sciences* May 2017, 1 14 (21) E4251 -E4260; DOI: 10.1073/pnas.16183101 14, e em Kindler et al., "*Early endonuclease-mediated evasion of RNA sensing ensures efficient coronavirus replication*," *PLoS Pathog* 13(2): e1006195. doi: 10.1371/journal.ppat.1006195 (2017). Os conteúdos integrais destes dois trabalhos são incorporados aqui, a este pedido de patente, por meio de referência.

[0060] Detalhes adicionais relativos às investigações descritas aqui, neste pedido de patente, são proporcionados abaixo como discussões de procedimentos experimentais usados durante as investi-

gações. As discussões referidas não se destinam a estabelecer limitações para o âmbito da invenção, mas ao invés são proporcionadas para revelar o âmbito e detalhes particulares das investigações.

[0061] A discussão que se segue descreve alguns procedimentos experimentais relativos às FIGS. 1A a 8G.

[0062] Células, anticorpos, e produtos químicos. Células de tumor cerebral tardio (DBT) foram cultivadas em meio MEM suplementado com caldo de fosfato de triptose a 10%, 5% de soro de feto de vitelo inativado pelo calor (FCS), 2% de penicilina/estreptomicina, e 2% de glutamina. Células BHK-21 expressando o receptor do MHV (BHK-R) foram cultivadas em meio DMEM) suplementado com 10% de FCS e G418 (0,8 mg/ml) (SV30069, HyClone). A linhagem celular 17CI-1 foi mantida em 5% de FCS DMEM. Soro de coelho anti-nsp2/3 (anti-D3) e soro anti-nsp15 (anti-D23). O antinucleocapsídeo de camundongo (J3.3) foi da University of Wisconsin, Madison. Anticorpos adquiridos comercialmente: dsRNA (K1, Scicons), ISG54 (PA3845, ThermoFisher), eIF2a (sc-133132) e p-eIF2a (sc-12412) foram da Santa Cruz. Os inibidores químicos foram das seguintes fontes: inibidor da pancaspase zVAD (627610, Millipore), Necrostatin-1 (Nec-1) (480065, Millipore), inibidor de PKR C16 (527450, Millipore), estaurosporina (ALX-380-014, Enzo Life Sciences) e VX-765 (F7120, UBPbio).

[0063] Vírus e sequenciamento profundo. A cepa de MHV selvagem A59 (GenBank acesso no. AY910861) foi gerada por genética reversa. Para gerar vírus de MHV mutantes, modificações de nucleotídeos foram incorporadas dentro dos fragmentos de cDNA do genoma de MHV-A59 através de mutagênese de PCR (iniciadores disponíveis segundo solicitação). Foi realizada a produção subsequente de vírus por genética reversa. Os vírus resgatados foram purificados por placa, propagados sobre células BHK-R, e titulados sobre células 17CI-1. Os vírus mutantes foram mantidos exclusivamente em células BHK-R.

Todas as preparações de estoques de vírus e os isolados purificados por placa usados neste estudo foram submetidos a sequenciamento profundo do genoma completo (laboratório de diagnóstico da Kansas State University).

[0064] Infecção e experimentos com camundongos. Os BMDMs em placas de 12 ou 24 cavidades foram infectados com as cepas virais indicadas em uma MOI de 0,1 ou 1 em meio livre de soro. Para a análise da cinética de crescimento, os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados em pontos do tempo indicados e titulados por ensaio de placa sobre células 17Cl-1. Para infecção dos camundongos, todos os experimentos foram realizados usando protocolos revisados e aprovados pelo IACUC da Loyola University Chicago. Para infecções intracranianas (i.e.), camundongos fêmeas C57BL/6J de seis semanas de idade (Jackson Laboratory) foram inoculados com 600 PFU de vírus e monitorados para o peso corporal diariamente e submetidos a eutanásia quando a perda de peso foi acima de 25% de acordo com o protocolo do IACUC. Para infecção intraperitoneal (i.p.), camundongos de seis semanas de idade foram injetados com 60.000 PFU e os órgãos foram coletados em pontos do tempo indicados. A evidência de patologia do fígado foi determinada por coloração com H&E.

[0065] Ensaio de morte celular. A viabilidade celular e a atividade da Caspase 3/7 foram medidas usando CellTiter Glo (G7571 , Promega) ou CaspaseGlo 3/7 (G8091 , Promega) respectivamente, de acordo com o protocolo do fabricante, com modificação.

[0066] Ensaio de fluorimetria de varredura diferencial (DSF). DSF foi realizada na máquina de PCR em tempo real Stratagene MX3005P. As amostras contêm 1x SYPRO Orange, e 10 μ M da proteína recombinante. Todas as amostras foram aquecidas em uma taxa de 0,5°C/min, e foram determinadas a intensidade de fluorescência e a T_m (temperatura de fusão).

[0067] Ensaio de clivagem de RNA. O ensaio de clivagem de RNA padrão usou 1×10^4 CPM de substrato de RNA radiomarcado na extremidade 5' (concentração de final RNA de $1 \mu\text{M}$) e $0,026 \mu\text{M}$ de Nsp15 em 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM de KCl, 1 mM de ditioneitol, 5 mM de MnCl_2 a 30°C . As reações da endoribonuclease foram terminadas pela adição de um tampão de carregamento de gel que continha 7,5 M de ureia. Os produtos foram separados por eletroforese em géis de poliácridamida a 20% contendo 7,5 M de ureia. Os géis foram embalados em plástico e expostos a uma tela do PhosphorImager para quantificação usando o software Molecular Dynamics.

[0068] A discussão que se segue descreve alguns procedimentos experimentais relativos às FIGS. 10A a 17B.

[0069] Células, anticorpos, e outros reagentes. Células de tumor cerebral tardio (DBT) foram cultivadas em meio mínimo essencial (MEM) (61 100-061, Gibco) suplementado com caldo de fosfato de triptose a 10%, 5% de soro de feto de vitelo inativado pelo calor (FCS), 2% de penicilina/estreptomicina, e 2% de glutamina. Células 21 de rim de bebê de hamster expressando o receptor do MHV (BHK-R) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (12100-046, Gibco) suplementado com 10% de FCS inativado pelo calor e G418 (0,8 mg/ml) (SV30069, HyClone) para manter seleção para expressão de receptores do MHV. A linhagem celular 17Cl-1 foi mantida em 5% de FCS DMEM. Foi gerada a cepa A59 de MHV selvagem (GenBank acesso no. AY910861) por genética reversa e foi sequenciado o genoma total. Macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) diferenciados (vide abaixo) foram mantidos em meio de macrófagos da medula óssea (BMM) contendo DMEM (10-017-CV, Corning) suplementado com 30% de sobrenadante de células L929, 20% de FCS, 1% de L-glutamina, 1% de piruvato de sódio, e 1% de penicilina/estreptomicina. Soro de coelho anti-nsp2/3 (anti-D3) e soro anti-nsp15

(anti- D23). O antinucleocapsídeo de camundongo (J3.3) foi da University of Wisconsin, Madison. Anticorpos adquiridos comercialmente: anticorpo de camundongo anti- β actina (A00702, Genscript), anticorpo de camundongo anti-calnexina (610523, BD), anticorpo de asno anti-coelho-HRP (711 -035-152, Jackson ImmunoResearch), anticorpo de cabra anticamundongo-HRP (1010-05, SouthernBiotech), dsRNA (K1, Scicons), ISG54 (PA3845, ThermoFisher), eIF2a (sc-133132) e p-eIF2a (sc-12412) foram da Santa Cruz. Os inibidores químicos foram das seguintes fontes: inibidor da pan-caspase zVAD (627610, Millipore), Necrostatin-1 (Nec-1) (480065, Millipore), inibidor de PKR C16 (527450, Millipore), e VX-765 (F7120, UBPbio).

[0070] Produção de macrófagos derivados da medula óssea. Medula óssea foi coletada dos fêmures de camundongos C57BL/6J (000664, Jackson Labs) ou *ifnar*^{-/-} obtidos da Washington University em St. Louis. 5×10^6 células da medula óssea foram laminadas em placas de petri de 100 x 26 mm (25387-030, VWR) com 15 mL de meio BMM com 50 μ M de β -mercaptoetanol. Depois de 3 dias de incubação a 37°C/5% de CO₂, 10 mL de meio BMM foi adicionado. Depois de outros 3 dias de diferenciação, os BMDMs foram lavados em 1x PBS a frio, incubados por 30 min a 4°C em 10 mL 1x PBS e em seguida delicadamente enxaguados das placas por pipetagem manual. 1×10^7 células/mL foram suspensas em meio BMM com 10% de DMSO e armazenadas em fase líquida de nitrogênio líquido até a utilização. Para a preparação de sobrenadante de células L929, $3,75 \times 10^5$ células L929 foram laminadas em 75 mL de meio (DMEM [10-017-CV, Corning], 10% de FCS, 1% de L- glutamina, 1% de piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não essenciais, e 1% de penicilina/estreptomicina) em um frasco T150 (10-126-34, Thermofisher). Depois de 6 dias de incubação a 37°C/5% CO₂, o sobrenadante foi coletado, filtrado, e armazenado a -20°C até a utilização. Para infecções virais, os BMDMs fo-

ram degelados e laminados em placas de petri de 100 x 26 mm em meio BMM sem β -mercaptoetanol. Depois de 3 dias de incubação a 37°C/5% de CO₂, as células foram laminadas sobre placas de cultura de tecido para experimentos de infecção subsequentes depois de 24 horas de incubação.

[0071] Vírus mutantes e sequenciamento profundo. De modo a gerar vírus mutantes MHV, modificações de nucleotídeos foram incorporadas no genoma do MHV-A59 através de mutagênese por PCR (iniciadores disponíveis segundo solicitação) de fragmentos de cDNA. Foi realizada produção de vírus subsequente por genética reversa. RNA genômico viral de transcrição in vitro (mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit; AM1344, Invitrogen Ambion) de fragmentos de cDNA ligados foi eletroporado em células BHK-R. O sobrenadante celular foi coletada como estoque viral depois de observação de efeitos citopáticos. Clones infecciosos foram purificados por placa, propagados sobre células BHK-R, e titulados sobre células 17CI-1. Os vírus mutantes foram mantidos exclusivamente em células BHK-R, as quais não produzem ou respondem ao interferon. Todas as preparações de estoques de vírus e os isolados purificados por placa usados neste estudo foram submetidos a sequenciamento profundo do genoma completo (laboratório de diagnóstico da Kansas State University). Em resumo, o RNA viral foi extraído de estoques de vírus usando o kit QIAamp MinElute Virus Spin Kit (57704, QIAGEN), usado para gerar uma biblioteca de cDNA e seqüenciado por tecnologia Miseq ou Ion Torrent. Sequências de MHV mutantes foram alinhadas ao constructo sintético de MHV selvagem-A59 (GenBank acesso no. AY910861).

[0072] Avaliação da replicação viral por ensaio de placa. De modo a determinar a cinética de crescimento viral, os BMDMs em placas de 24 cavidades foram infectados com cepas virais indicadas em uma MOI de 0,1 em meio livre de soro. Depois de 1 h de incubação, o ino-

culo foi substituído com meio completo fresco. Sobrenadantes da cultura celular foram coletados em pontos do tempo indicados e titulados por ensaio de placa sobre células 17CI-1. De modo a determinar o título viral nos órgãos, uma porção de tecido foi homogeneizada com 1,0 mm de contas de dia. zircônia/silício (11079110z, BioSpec Products) usando um homogenizador automatizado (6,0 m/seg, duração de 40 seg) (MP Biomedicals) em meio DMEM livre de soro. Os órgãos homogeneizados foram centrifugados a 10.000 x g por 5 min e os sobrenadantes clarificados foram titulados para placas virais sobre células 17CI-1. Foram obtidos títulos de três ensaios independentes para cada amostra. Foram gerados gráficos da cinética viral usando o software Prism 7 (GraphPad Software, Inc.).

[0073] Ensaios da morte celular. A viabilidade celular e a atividade da Caspase 3/7 foram medidas usando CellTiter Glo (G7571 , Promega) ou CaspaseGlo 3/7 (G8091 , Promega) respectivamente, de acordo com o protocolo do fabricante, com modificação. Em resumo, $3,0 \times 10^5$ BMDMs/ cavidade foram laminados em placas de 24 cavidades e infectados em uma MOI de 0,1 por 1 h em meio livre de soro. O meio foi substituído com meio completo, ou para a adição de inibidores químicos, o inoculo viral foi substituído com meio BMM completado contendo a concentração indicada de inibidores. Os BMDMs infectados foram incubados por 24 horas a 37°C/5% de CO₂. Os BMDMs foram lavados duas vezes com 1x PBS e lisados com 100 µL de mistura de reagente Glo/meio (a 1:1). 50 µL de lisado celular foi usado para medir o sinal de luminescência. Foram realizados desvio padrão e T teste não pareado were sobre triplicatas técnicas e os dados são representativos de três experimentos independentes. Foram gerados gráficos da viabilidade celular usando o software Prism 7 (GraphPad Software, Inc.).

[0074] Imunofluorescência. Os BMDMs ($1,5 \times 10^5$ células/ cavida-

de) foram laminados sobre uma sobrelâmina de vidro em uma placa de 24 cavidades por 24 h e em seguida infectados com vírus selvagem ou mutante em uma MOI de 0,1 em meio livre de soro. A 6 ou 12 hpi, as células infectadas foram fixadas com 4% de formaldeído em 0,095 M de tampão PIPES (P1851, Sigma), permeabilizadas com 0,1 % de Triton X-100 (T8787, Sigma) em 1x PBS, e bloqueadas com 2% de BSA. Anticorpos primários e secundários foram usados como se segue: anti-NSP2/3 (1 : 1500), anti-dsRNA (1 : 500), anti-ISG54 (1 : 500), antinucleocapsídeo (1 : 500), anticorpo de asno anticoelho IgG alexafluor 488 (1 : 1000) (A- 21441, Invitrogen), e anticorpo de cabra anticamundongo IgG Alexa Fluor 568 (1 : 1000) (A1 1004, Thermofisher). Os núcleos foram visualizados com Hoescht 33342 (1 :2500) (H1339, Life Technologies). As células foram fotografadas coletando imagens em pilha Z (*Z-stack*) com um microscópio fluorescente de campo amplo Deltavision (Applied Precision, GE) equipado com uma câmera digital (CoolSNAP HQ, Photometries). Foram feitas imagens com uma lente de 20x ou 100x. As amostras foram excitadas com luz gerada por um módulo de iluminação em estado sólido Insight SSI (Applied Precision, GE) e deconvoluídas com o software de deconvolução SoftWoRx (Applied Precision, GE). Todas as imagens foram coletadas sob condições de aquisição idênticas e processadas usando Imaris 7.6.4 (Bitplane).

[0075] Análise FACS. Os BMDMs ($6,0 \times 10^5$) foram laminados em uma placa de 12 cavidades (Corning) por 24 h e em seguida infectados com vírus selvagem ou mutante em uma MOI de 0,1. A 6 hpi, as células foram coletadas e fixadas com 4% de formaldeído em 1x PBS, permeabilizadas com 0,1 % de Triton X- 100 em 1x PBS, e bloqueadas com 1x PBS contendo 2% de FCS e 0,5% de azida de sódio. As células foram marcadas com corante de viabilidade fixável (65-0865-14, eBioscience) e anticorpos contra os anticorpos primários e secundários.

rios indicados, anticorpo de asno anticoelho alexafluor 488 e anticorpo primário de cabra anticamundongo marcado com Alexa Fluor 568. As células foram analisadas usando um analisador celular LSR Fortessa (BD Bioscience). Dados da citometria de fluxo foram analisados usando o software FlowJo (Treestar).

[0076] Quantificação da produção de IFN- α por PCR quantitativo de transcrição reversa (RT- qPCR) e ELISA. Os BMDMs em uma placa de 12 ou 24 cavidades foram pseudo-infectados ou infectados com vírus em uma MOI de 0,1 ou 1. Em pontos do tempo indicados, células de monocamada foram usadas para extração de RNA usando um RNeasy Mini Kit (74104, QIAGEN), enquanto os sobrenadantes da cultura celular foram coletados para ELISA. De modo a determinar a produção de mRNA de IFN- α 11, de beta-actina ou de gene N de MHV-A59, os RNAs totais foram extraídos e uma quantidade igual de RNA (~1 μ g) foi usada para síntese de cDNA usando o kit Rt² HT First Strand Kit (330401 , QIAGEN). PCR quantitativo foi realizado com iniciadores específicos para IFN- α 11 de camundongo (PPM03050B-200, QIAGEN), β -actina de camundongo (PPM02945B-200, QIAGEN) ou gene N de MHV-A59 usando RT² SYBR Green qPCR Mastermix (330502, QIAGEN) no sistema Bio-Rad CFX96. O termociclador foi ajustado como se segue: uma etapa a 95°C (10 min), 40 ciclos de 95°C (15 s), 60°C (1 min) e leitura da placa, uma etapa a 95°C (10 s) e uma curva de fusão de 65°C a 95°C em incrementos de 0,5 °C/ 0,05 s. As amostras foram avaliadas em triplicata e os dados são representativos de 3 experimentos independentes. De modo a medir o IFN- α secretado, 50 μ L de sobrenadante da cultura celular foi usado para ensaio usando um kit ELISA de IFN- α de camundongo (BMS6027, eBioscience) de acordo com as instruções do fabricante. Foram gerados gráficos usando o software Prism 7 (GraphPad Software, Inc.).

[0077] Microscopia eletrônica. 6,0 x 10⁵ BMDMs B6 foram lamina-

dos por cavidade em uma placa de 12 cavidades (Corning) em 1 mL de meio BMM. Depois de 24 h, as células foram infectadas com vírus a 0,1 MOI em meio DMEM livre de soro. Células de controle foram tratadas com meio BMM. Depois de um período de 1 h de incubação a 37°C/5% de CO₂, o meio foi substituído com meio BMM. Controles não infectados foram tratados com 1 µM de estaurosporina (ALX-380-014, Enzo Life Sciences) preparada em meio BMM para induzir apoptose. As células foram adicionalmente incubadas a 37°C/5% de CO₂ por 16 h e em seguida preparadas para EM. As células foram lavadas em 1x PBS e em seguida incubadas por 30 min a 4°C em 1x PBS. As células foram delicadamente coletadas das placas usando uma pipeta, peletizadas a 1200 rpm por 5 min a 4°C e fixadas (4% de glutaraldeído em 0,1 M de tampão de cacodilato). Seções celulares foram preparadas e fotografadas pela Electron Microscopy Core Facility na Loyola University Chicago, Maywood, IL.

[0078] *Western blotting.* Placas de 12 cavidades (Corning) contendo 6,0 x10⁵ BMDMs B6/cavidade em meio BMM foram tratadas com meio ou infectadas com vírus a 0,1 MOI em meio DMEM livre de soro por 1 hora a 37°C/5% de CO₂. O meio foi substituído com meio BMM fresco e as células foram retornadas para a incubadora. Depois de 6, 12 ou 24 horas, as células foram lisadas em 100 µl de tampão de lise a frio (20 mM de tris pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1 mM de EGTA, 1 mM de EDTA, 1 % de Triton X-100, 2,5 mM de pirofosfato de sódio, 1 mM de β-glicerofosfato, 1 mM de orto-vanadato de sódio, 1 pg/mL de leupeptina, 1 mM de PSMF) e raspadas dentro de tubos. Células em tampão de lise foram incubadas sobre gelo por 10 min e em seguida peletizadas a 14.000 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante livre de células foi diluído em 2x tampão de amostra (10% de glicerol, 5% de β-ME, 3% de SDS, 7,5 mg/mL de Trizma-base, azul de bromofenol). As amostras foram separadas por eletroforese através de 12% de acril-

mida PAGE-gel e transferidas para membranas PVDF Immuno-Blot (162-0177, Bio-Rad) usando o sistema de transferência semi-seco (Bio-Rad). As membranas foram suspensas em tampão de bloqueio, contendo 5% em peso/volume de leite em pó desnatado em 1x TBST (salina Tris-tamponada + 1% de Tween-20), por 1,5 h em temperatura ambiente. De modo a detectar caspase-3 ativada, anticorpo monoclonal de coelho para caspase-3 clivada (Asp175; Cell Signaling Technology) foi aplicado (1 : 1000) de um dia para o outro a 4°C com delicada agitação. Um segundo conjunto de membranas, usado para determinar a expressão de proteína celular através de anti- β actina de camundongo (1 : 5000) ou replicação de vírus relativa através de proteína de camundongo-anti-J3.3 N (1 : 200), foram incubadas por 1,5 h em temperatura ambiente. Todas as membranas foram lavadas três vezes em 1x TBST e foi aplicado anticorpo secundário, de asno anticoelho-HRP (1 :2500) para caspase-3 monoclonal ou de cabra anticamundongo-HRP (1 :5000) para proteína N e β -actina, por 1,5 h em temperatura ambiente com delicada agitação. As membranas foram lavadas três vezes com 1x TBST e a quimiluminescência foi visualizada usando o reagente Western Lightning Plus-ECL (50-904- 9326, PerkinElmer, Inc.).

[0079] Purificação da proteína Nsp15 de MHV recombinante a partir de *E. coli*. As sequências de cDNA de Nsp15 de MHV selvagem e T98M foram amplificadas usando os iniciadores apropriados e subclonadas no vetor pET-His-SUMO usando o PCR de fusão. Os construtos abrigando o gene mutante T98M ou Nsp15 selvagem foram transformados em células pLys Rosetta (DE3). Uma única colônia foi inoculada em 100 mL de caldo TB (Terrific Broth) na presença de 50 pg/mL de ampicilina e 17 pg/mL de cloranfenicol e incubada a 37°C de um dia para o outro. Em seguida a cultura foi transferida para 3 L de meio TB e cultivada até a OD₆₀₀ ter atingido 0,8. A temperatura foi diminuída

para 16 °C e IPTG foi adicionado até uma concentração final de 0,2 mM por 20 h. As células foram coletadas por centrifugação a 8000 x g por 10 min e os péletes celulares foram suspensos em tampão de lise contendo 10% de glicerol, 50 mM de HEPES (pH 7,0), 400 mM de NaCl, 5 mM de β -ME e 10 mM de imidazol. O lisado foi centrifugado a 15.000 x g por 30 min e o sobrenadante foi carregado sobre uma coluna de Ni-NTA. A coluna de Ni-NTA foi em seguida lavada três vezes com tampão de lise contendo 20 mM de imidazol. A proteína foi elutriada com tampão de elutriação contendo 500 mM de imidazol e em seguida o tampão foi alterado para 10% de glicerol, 20 mM de Tris-Cl (pH 7.5) e 5 mM de β -ME. A amostra foi adicionalmente purificada por Mono Q-Sepharose com um gradiente de tampão Tris contendo 0 a 1 M de NaCl. Nsp15 foi quantificada por SDS-PAGE comparada com uma concentração conhecida de BSA, e armazenada a -80 °C em um tampão contendo 10% de glicerol, 20 mM de Tris-Cl, pH 7,5, 300 mM de NaCl e 10 mM de β -ME.

[0080] Dispersão dinâmica da luz (DLS). Proteínas de MHV recombinante Nsp15 ou T98M foram diluídas em tampão de armazenamento (10% de glicerol, 20 mM de Tris-Cl, pH 7,5, 300 mM de NaCl e 5 mM de β -ME) em diferentes concentrações. Foi realizada medição do tamanho por dispersão dinâmica da luz Zetasizer Nano-S (Malvern Instruments) em temperatura ambiente. Cada amostra foi medida no mínimo três vezes. São mostradas a intensidade média e as distribuições de tamanho.

[0081] Ensaio de fluorimetria de varredura diferencial (DSF). Foi realizada DSF na máquina de PCR em tempo real Stratagene MX3005P. As amostras contêm 1x SYPRO Orange, 10 μ M da proteína recombinante. Todas as amostras foram aquecidas em uma taxa de 0,5°C/min, e foram determinadas a intensidade da fluorescência e a T_m (temperatura de fusão).

[0082] Análise de RNA por Bioanalyzer. Quantidades iguais de RNA total purificado a partir dos BMDMs foram analisadas em um Bioanalyzer Agilent 2100 usando RNA Nano LabChips.

[0083] Experimentos com camundongos. Todos os experimentos foram realizados usando protocolos revisados e aprovados pelo IACUC da Loyola University Chicago. Camundongos C57BL/6J foram adquiridos do Jackson Laboratory. Para infecções intracranianas (i.e.), camundongos de seis semanas de idade foram inoculados com 600 PFU em 20 µl de MHV selvagem ou mutante. Os camundongos infectados foram monitorados para o peso corporal diariamente e submetidos a eutanásia quando a perda de peso foi acima de 25% de acordo com o protocolo do IACUC. Foram gerados gráficos da taxa de sobrevivência usando o software Prism 7 (GraphPad Software, Inc.). Foi conduzida análise estatística da taxa de sobrevivência com o teste de log rank. Para infecção intraperitoneal (i.p.), camundongos de seis semanas de idade foram injetados com 60.000 PFU em 100 µl de 1x PBS. Os órgãos foram coletados em pontos do tempo indicados e avaliados para a replicação viral. A evidência de patogênese viral foi determinada por coloração com Hematoxilina e Eosina.

[0084] Alinhamento de sequências. Região T98 de Nsp15 de cepas típicas de sub-grupos de coronavírus usando Clustal W. Coronavírus alfa: NL63 (cepa Amsterdam I, AY567487), PEDV (cepa CV777, NC_003436); coronavírus beta: MHV, (cepa A59, AY910861); SARS-CoV (cepa MA15, FJ882957); MERS-CoV (cepa EMC, JX869059); coronavírus gama: IBV (cepa Beaudette, NC_001451); coronavírus delta: PDCoV (KJ567050).

[0085] Apesar da invenção ter sido descrita em termos de modalidades e estudos específicos ou particulares, deve ser evidente que podem ser adotadas alternativas por um perito na arte. Por exemplo, os coronavírus mutados específicos podem diferir dos descritos ou po-

dem ter mutações adicionais. Por conseguinte, deve ser entendido que a invenção não é necessariamente limitada a qualquer modalidade descrita aqui, neste pedido de patente, ou ilustrada nos desenhos. Além disso, deve ser entendido que a fraseologia e a terminologia empregadas acima são para os fins de descrever as modalidades e os estudos revelados, e não servem necessariamente como limitações para o âmbito da invenção. Portanto, o âmbito da invenção deve ser limitado somente pelas reivindicações que se seguem.

REIVINDICAÇÕES

1. Coronavírus vivo e atenuado, caracterizado pelo fato de que compreende um gene da replicase variante codificando poliproteínas compreendendo uma proteína não estrutural (nsp)-15, o gene da replicase codificando a nsp15 e provocando quaisquer modificações, incluindo mutações e/ou deleções, que afetem a estabilidade ou a atividade da nsp15.

2. Coronavírus de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a modificação compreende uma mutação de aminoácido de treonina para metionina na posição 98 ou de histidina catalítica para alanina na posição 262.

3. Coronavírus de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o coronavírus é uma mutação de um coronavírus selvagem.

4. Coronavírus de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o coronavírus selvagem é um vírus *Coronavirinae*.

5. Coronavírus de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o vírus *Coronavirinae* é escolhido entre o grupo consistindo em coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS-CoV), coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), coronavírus humanos 229E (HCoV-229E), OC43 (HCoV-OC43), HKU1 (HCoV-HKU1), e NL63 (HCoV-NL63), vírus da peritonite infecciosa dos felinos (FIPV), coronavírus canino (CCoV), vírus da bronquite infecciosa (IBV) das galinhas, coronavírus bovino (BOCoV), e coronavirus porcinos incluindo o vírus da gastroenterite transmissível (TGEV), o coronavírus porcino delta (PDCoV), o vírus da diarreia epidêmica porcina (PEDV), o coronavírus respiratório porcino (PRCV), e o coronavírus da encefalomielite hemaglutinante coronavírus porcina (PHE-CoV).

6. Gene da replicase variante caracterizado pelo fato de ser de um gene da replicase como definido na reivindicação 1.

7. Proteína, caracterizada pelo fato de ser codificada pelo gene da replicase variante como definido na reivindicação 6.

8. Plasmídeo, caracterizado pelo fato de que compreende o gene da replicase variante como definido na reivindicação 6.

9. Vacina, caracterizada pelo fato de que compreende o coronavírus como definido na reivindicação 1 e um veículo.

10. Método para prevenção de uma doença em um sujeito, caracterizado pelo fato de que o método compreende a administração da vacina como definida na reivindicação 9 ao sujeito.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a administração da vacina provoca a ativação do interferon tipo I no sujeito o qual reduz a patogenicidade do coronavírus em relação a um coronavírus expressando um gene da replicase selvagem correspondente.

12. Método de prevenção de uma doença em um sujeito, caracterizado pelo fato de que o método compreende a ativação do interferon tipo I no sujeito, em que a ativação do interferon tipo I reduz a patogenicidade de um coronavírus.

13. Método de produção de uma vacina, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

modificação de um coronavírus selvagem para produzir um coronavírus vivo e atenuado compreendendo um gene da replicase variante codificando poliproteínas e provocando uma modificação, incluindo mutações e/ou deleções, em uma proteína não estrutural (nsp)-15 que afeta a estabilidade ou a atividade da nsp15; e

produção de uma vacina compreendendo o coronavírus e um veículo;

em que a administração da vacina a um sujeito provoca a

ativação do interferon tipo I no sujeito o qual reduz a patogenicidade do coronavírus selvagem.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a modificação compreende uma mutação de aminoácido de treonina para metionina na posição 98 ou de histidina catalítica para alanina na posição 262.

15. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o coronavírus selvagem é um vírus *Coronavirinae*.

16. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o vírus *Coronavirinae* consiste em coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS-CoV), coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), coronavírus humanos 229E (HCoV-229E), OC43 (HCoV-OC43), HKU1 (HCoV-HKU1), e NL63 (HCoV-NL63), vírus da peritonite infecciosa dos felinos (FIPV), coronavírus canino (CCoV), vírus da bronquite infecciosa (IBV) das galinhas, coronavírus bovino (B0C0V), e coronavirus porcinos incluindo o vírus da gastroenterite transmissível (TGEV), o coronavírus porcino delta (PDCoV), o vírus da diarreia epidêmica porcina (PEDV), o coronavírus respiratório porcino (PRCV), e o coronavírus da encefalomielite hemaglutinante porcina (PHE-CoV).

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende a administração da vacina ao sujeito.

18. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende a administração da vacina ao sujeito.

FIG. 1A

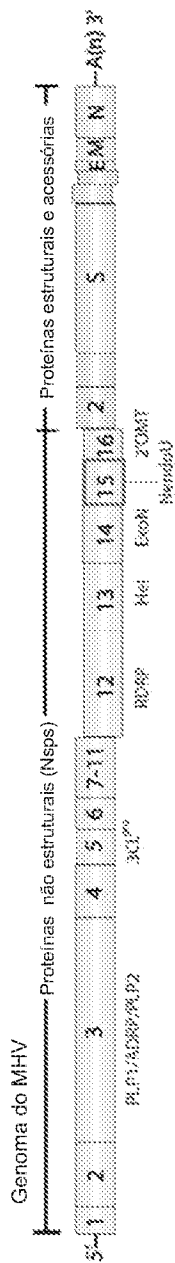


FIG. 1B

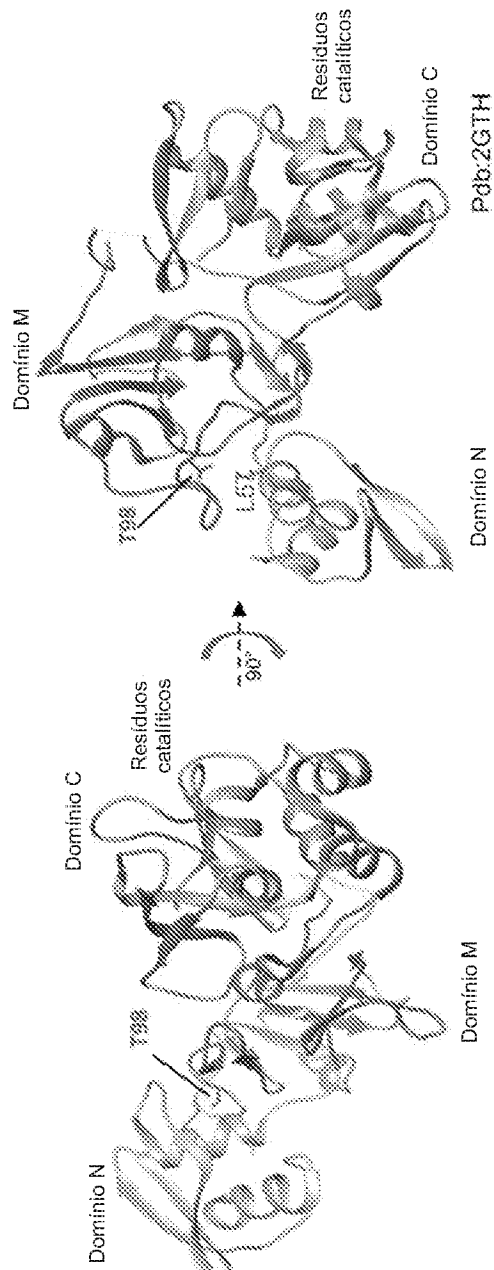


FIG. 1C

Cepa Viral	Genótipo	Indução do IFN
Nsp3	Nsp15	-
Selvagem	%EQRK _{G73}	-
N15m1	%EQA _K G _{G73}	↑
N3m	%EQA _K G _{G73}	-

FIG. 1D

Genótipo	T98
MHV	FCSS ^Y YK ^V CKY ^Y
SARS-CoV	AHVSTIGVCTMT
MERS-CoV	YGTATIGVCKY ^Y
NL63	FTCYTHSVCKY ^Y
PEDV	LTTF ^K KDVCKY ^Y
IBV	LYRNTVKVCAY ^Y
PDCoV	IFQY ^I INVSTY ^Y

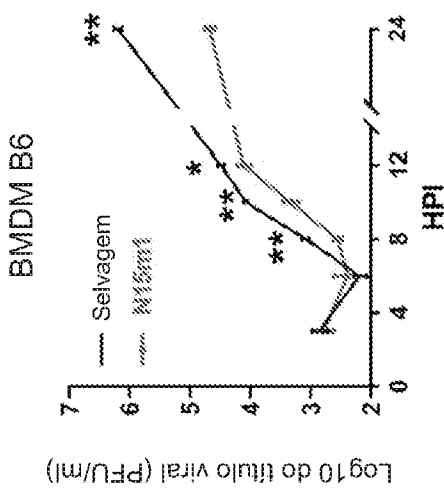
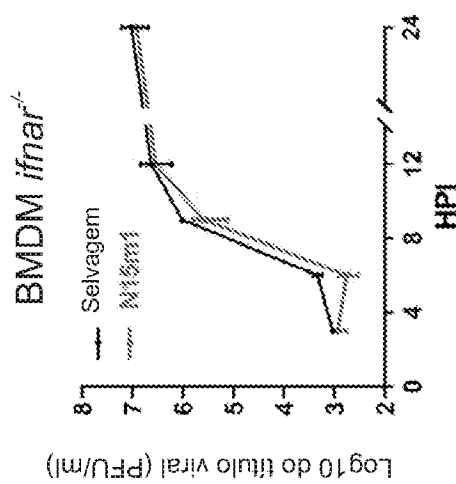
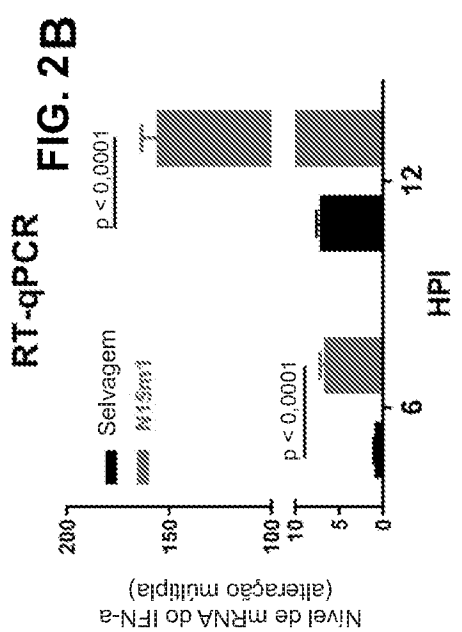
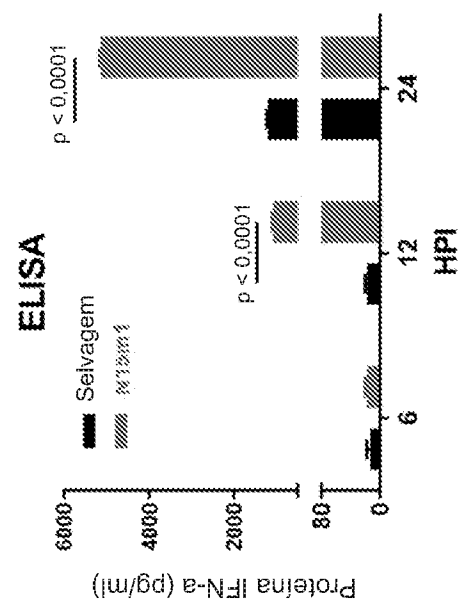


FIG. 2A

FIG. 2B

FIG. 2C

FIG. 2D

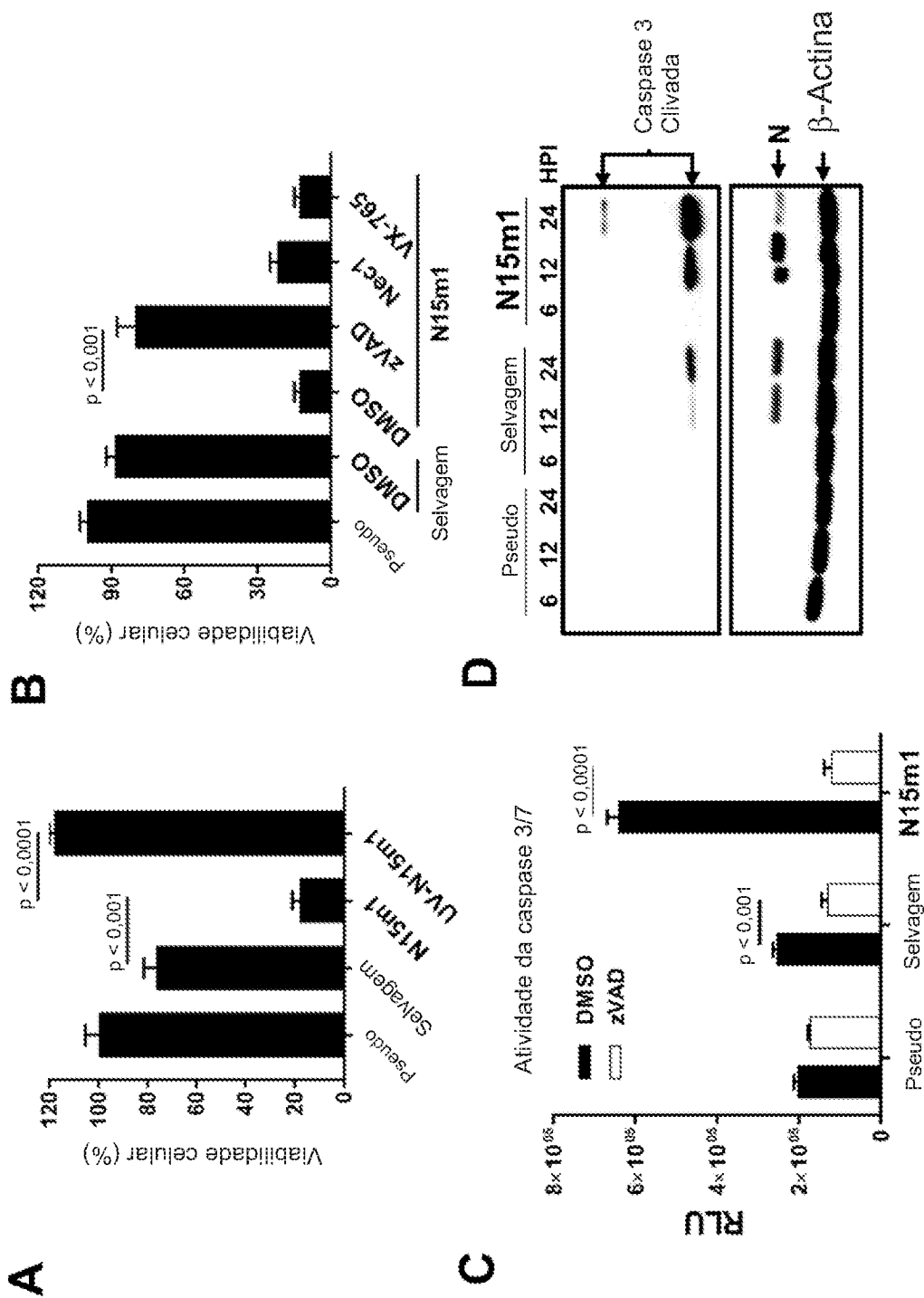


FIG. 3

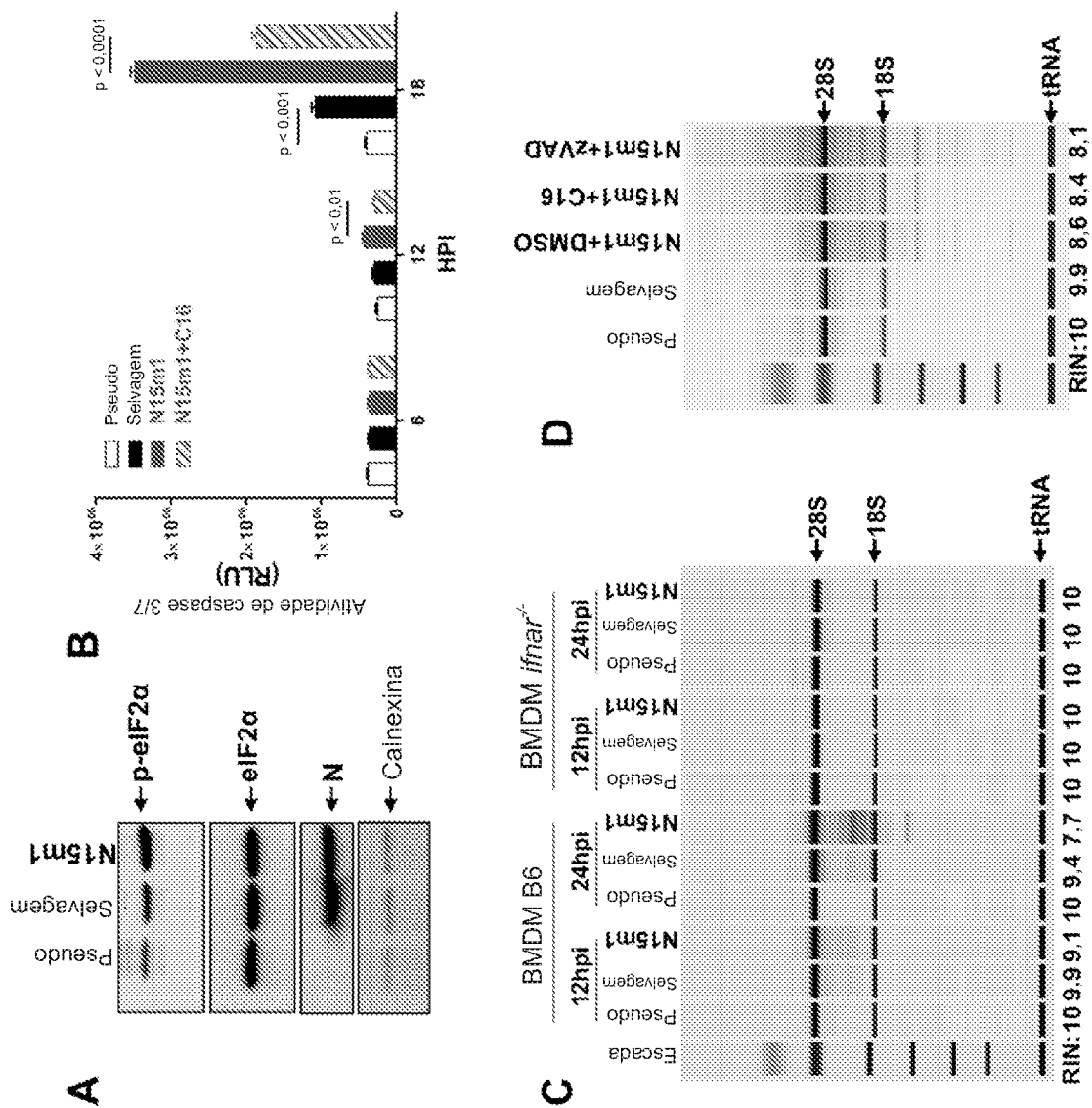


FIG. 4

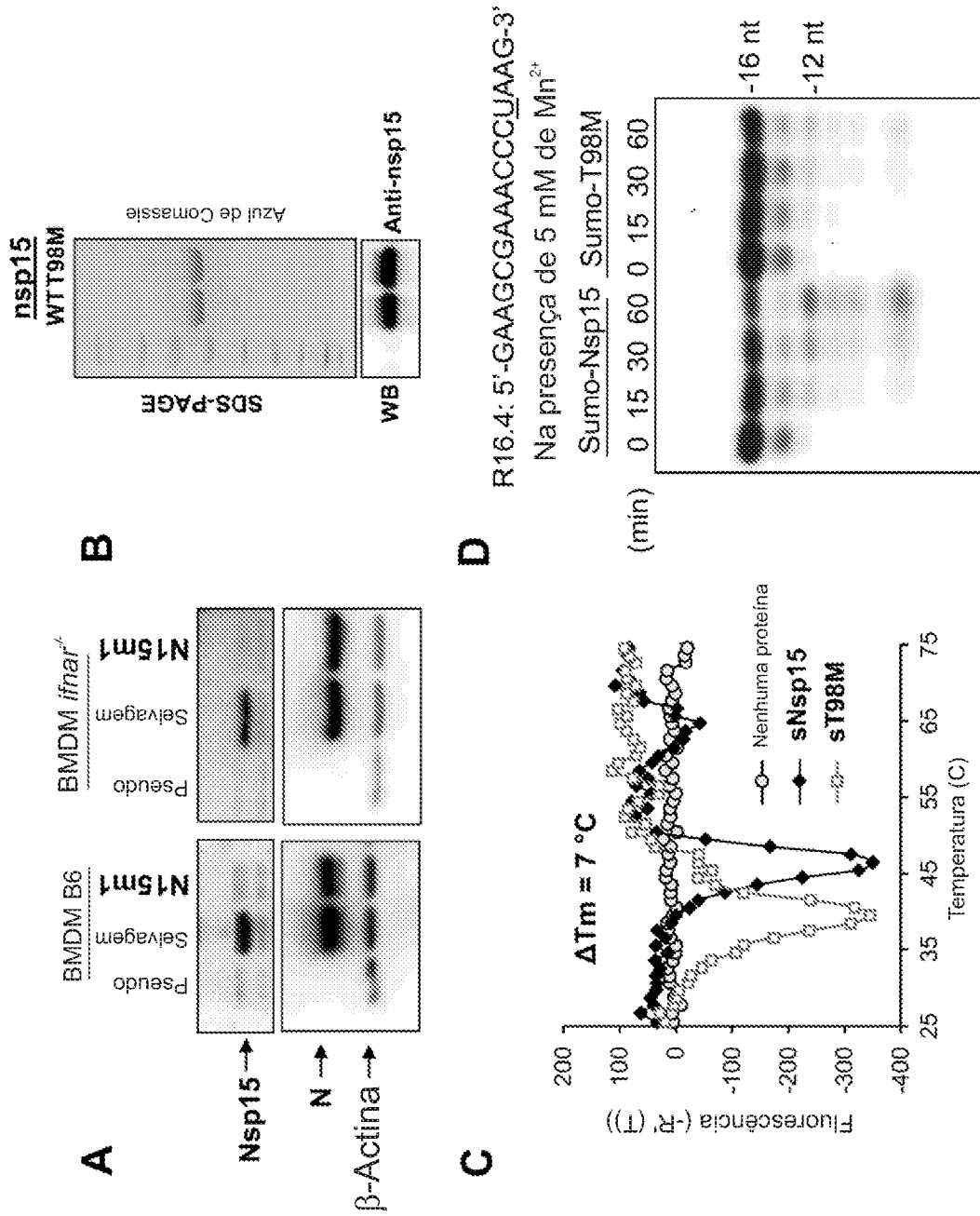


FIG. 5

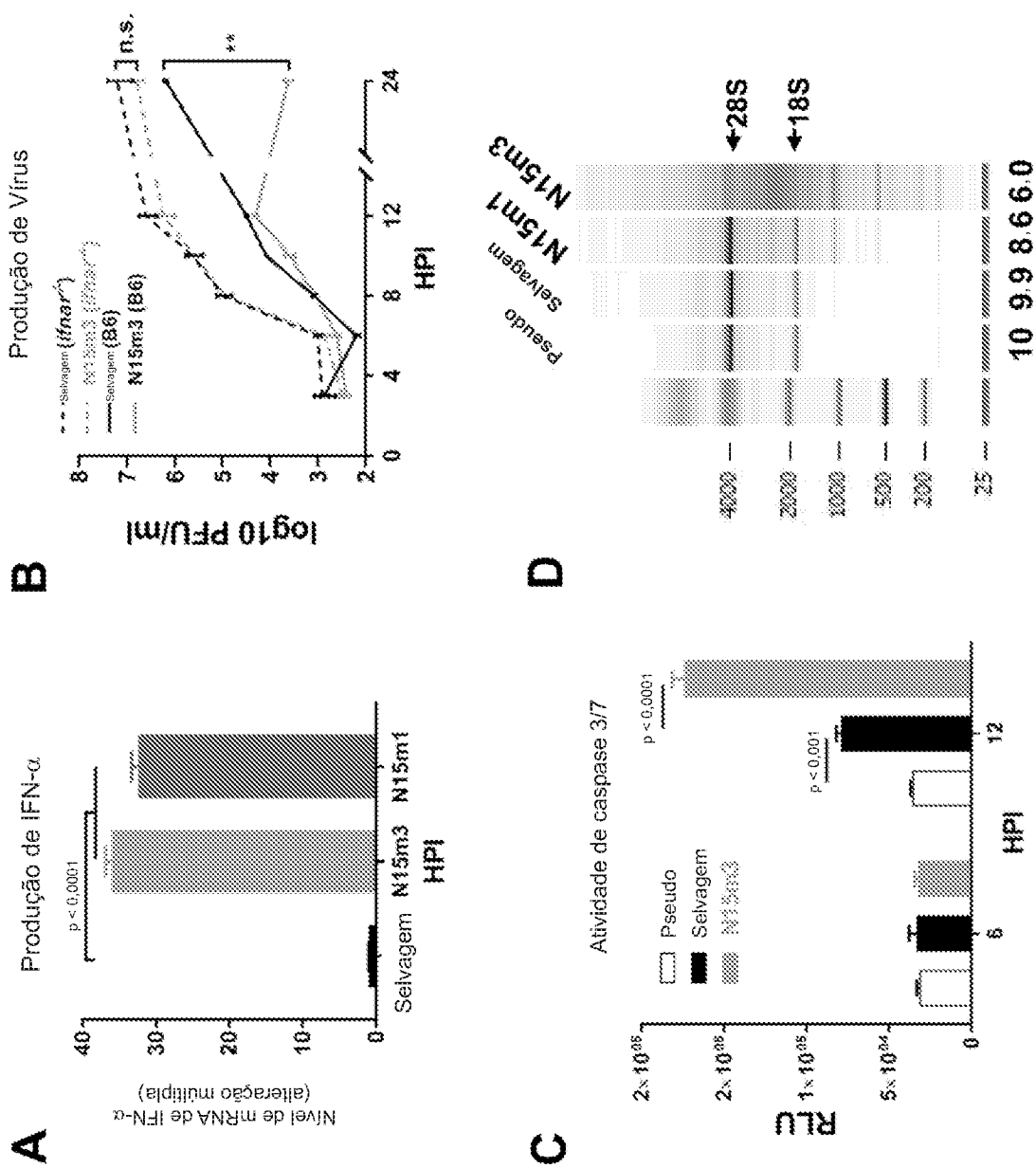


FIG. 6

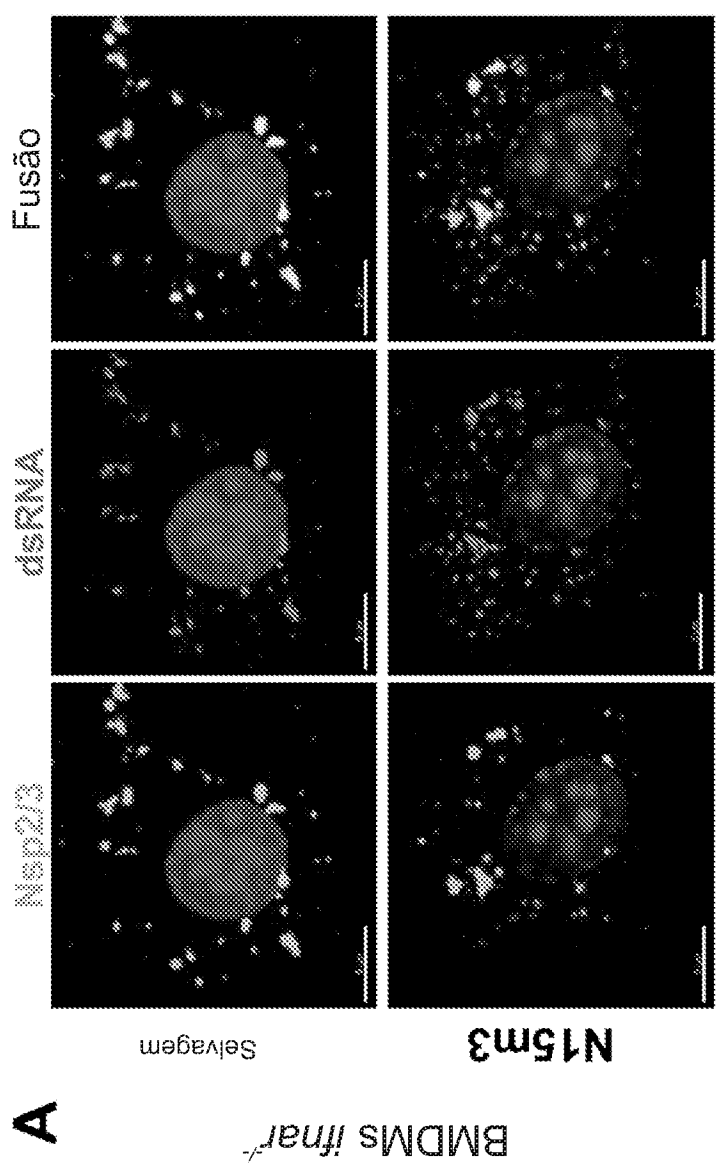
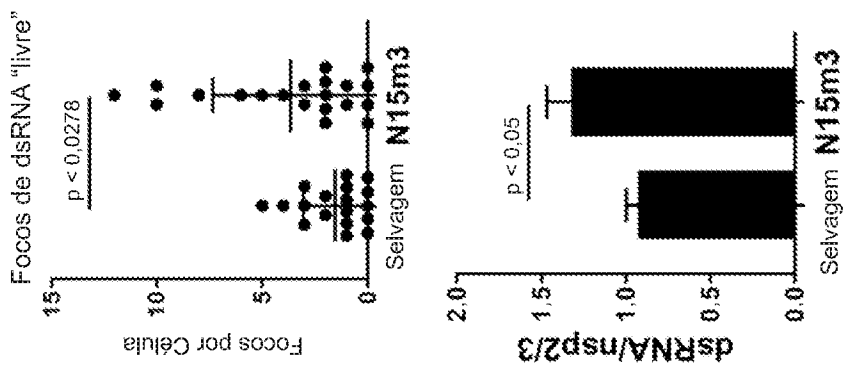


FIG. 7A

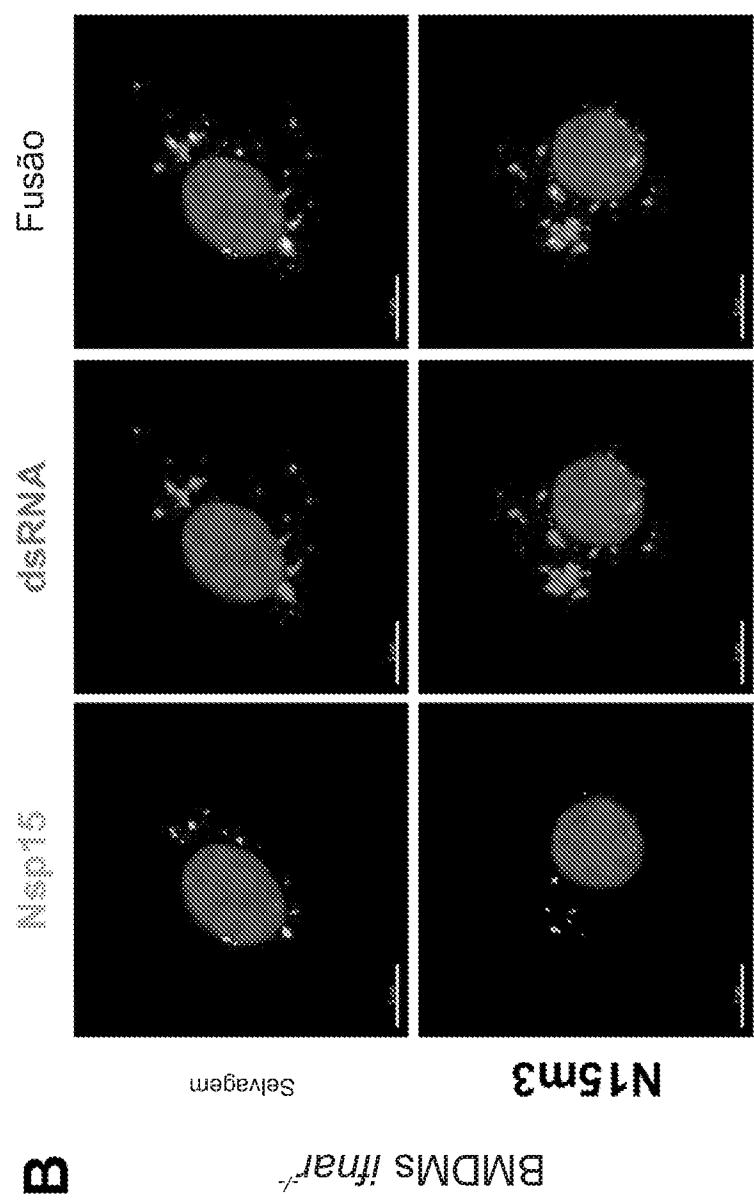
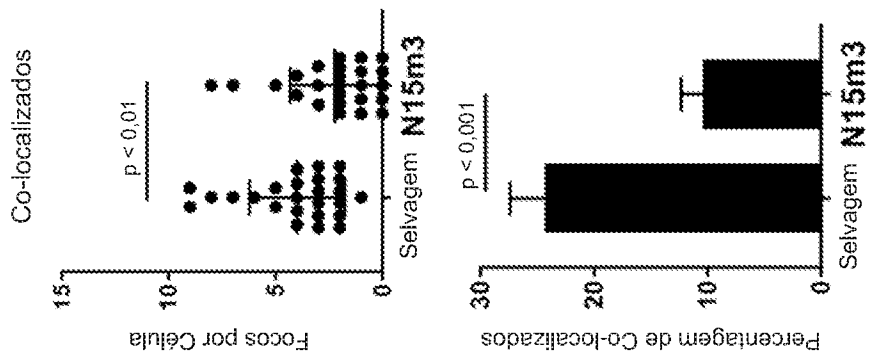


FIG. 7B

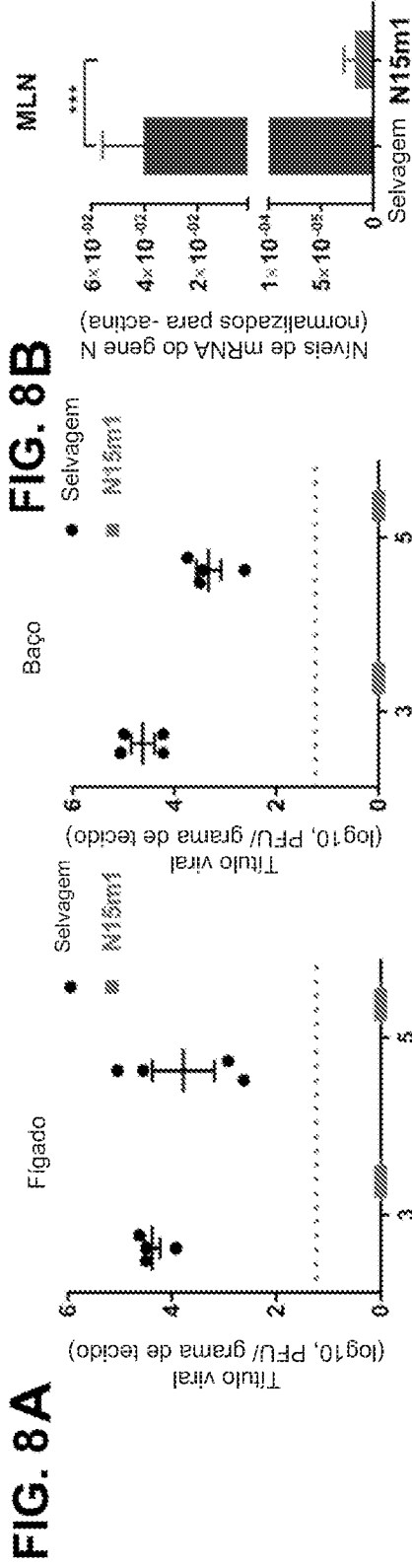


FIG. 8E

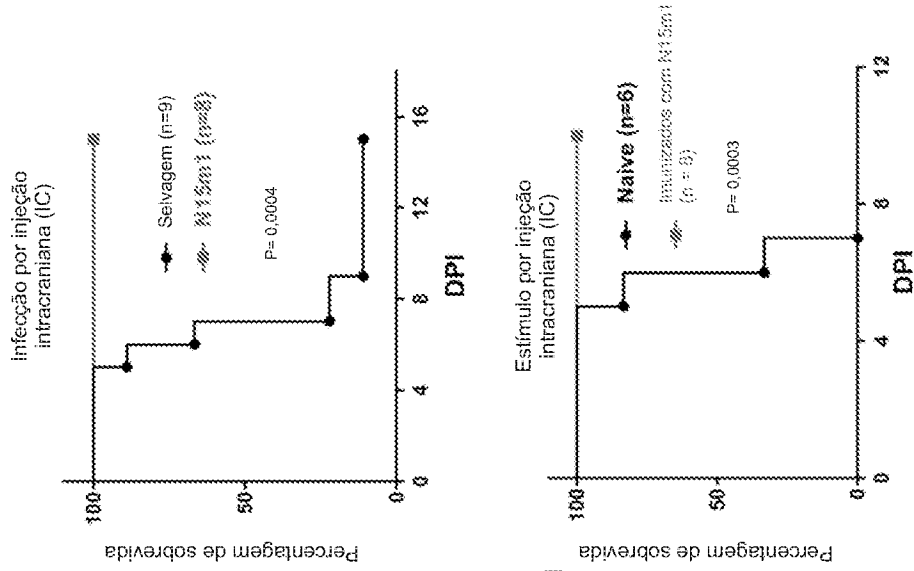


FIG. 8D

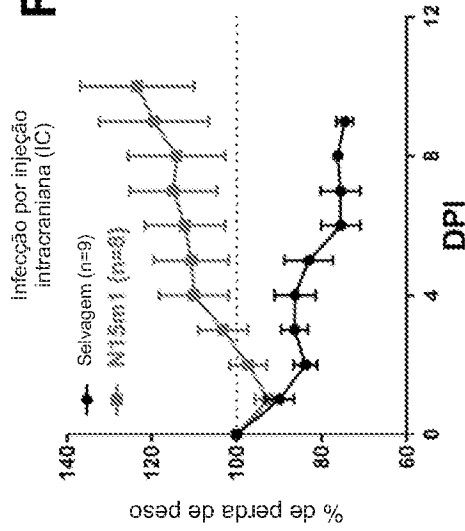
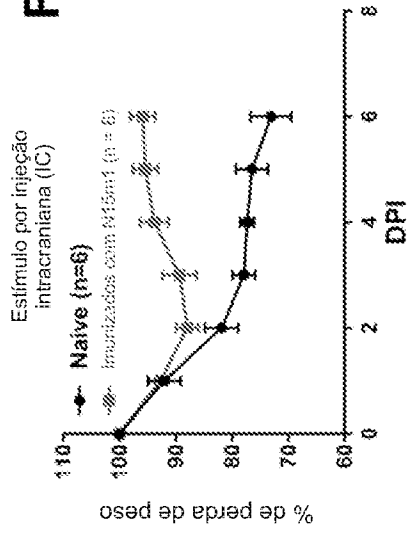


FIG. 8F



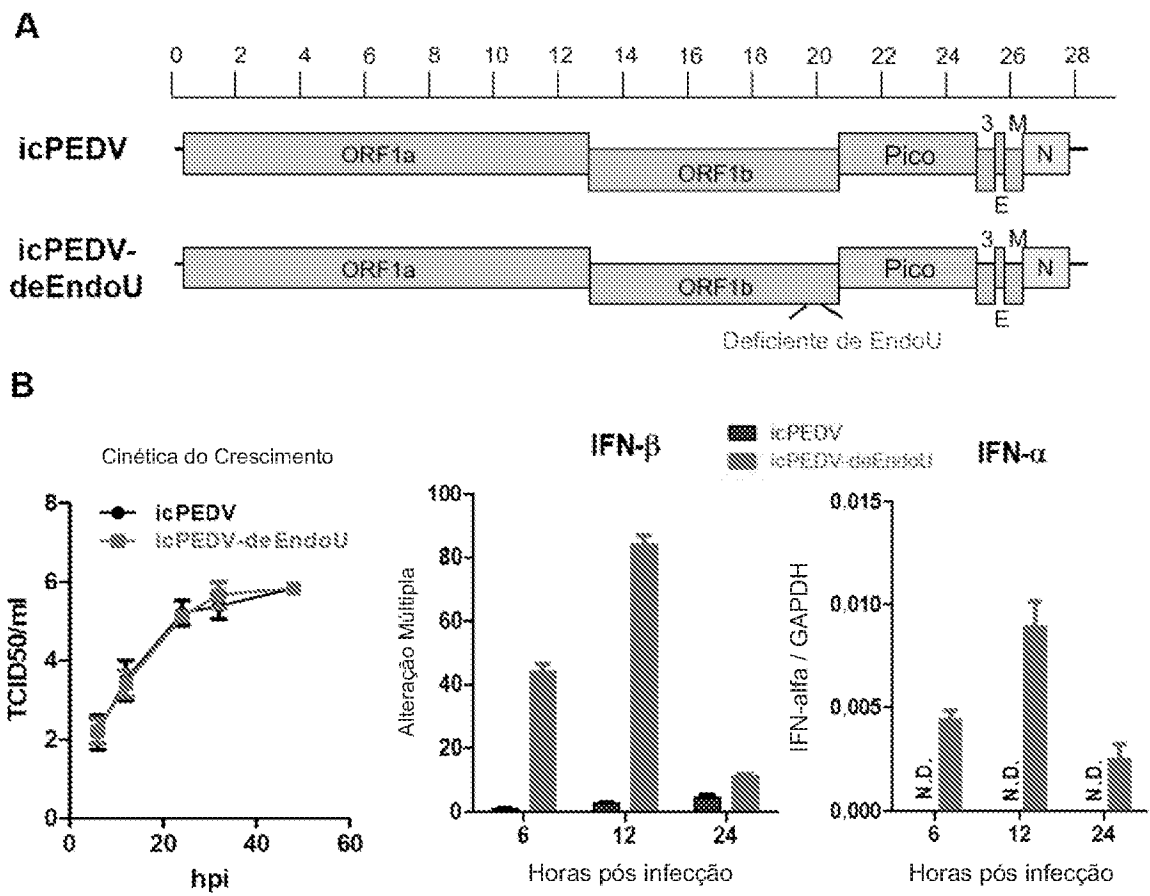
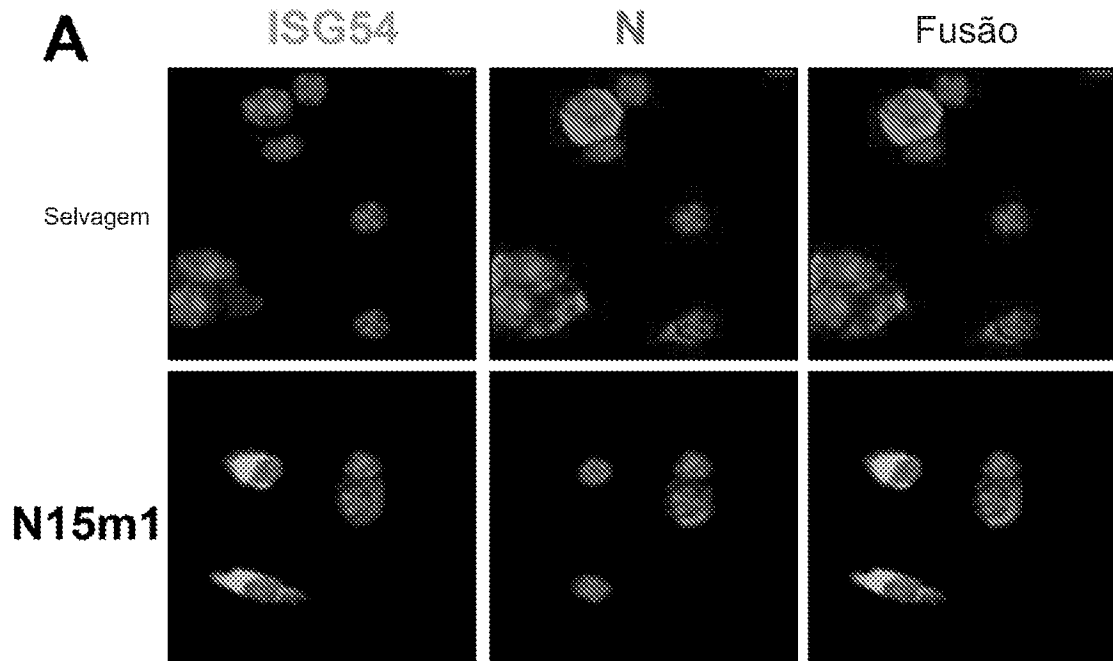


FIG. 9



B

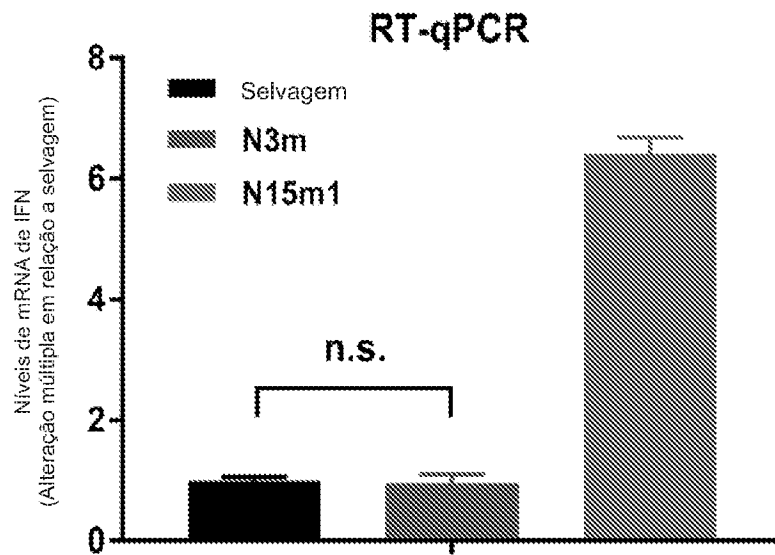


FIG. 10

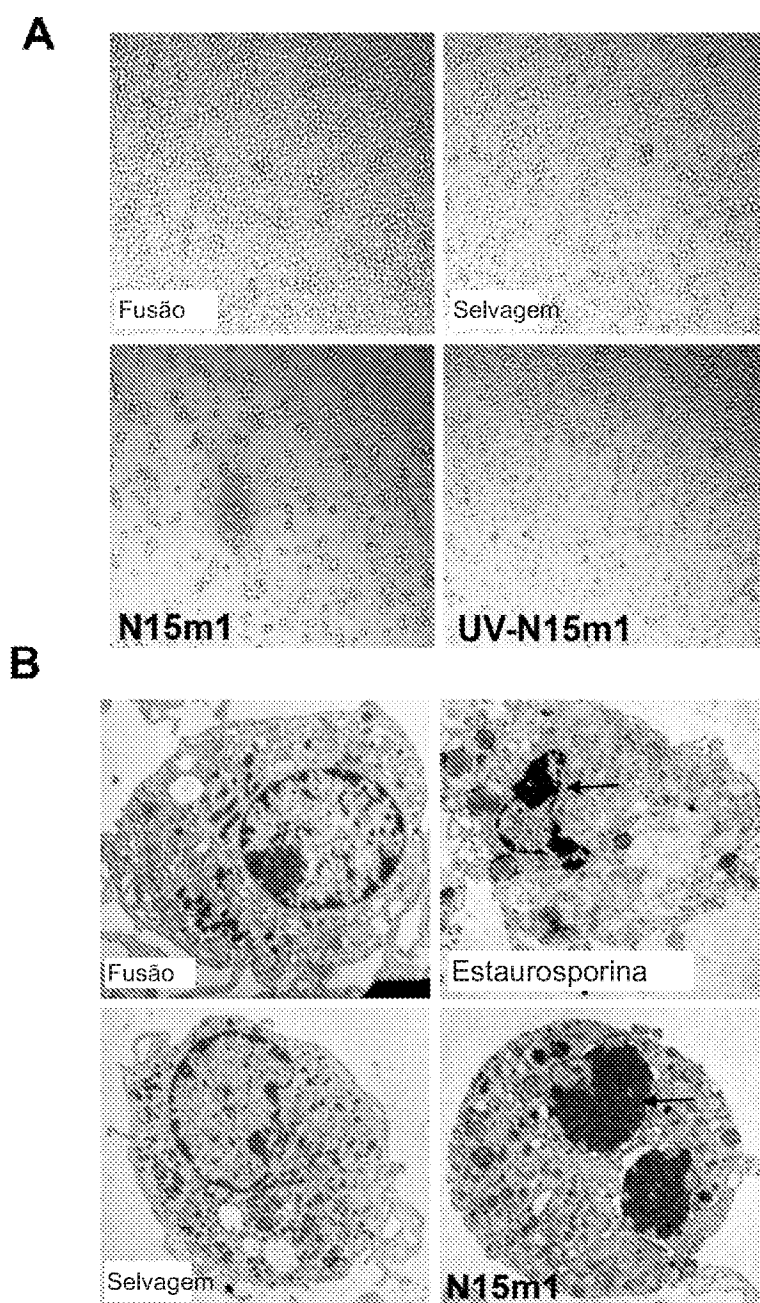


FIG. 11

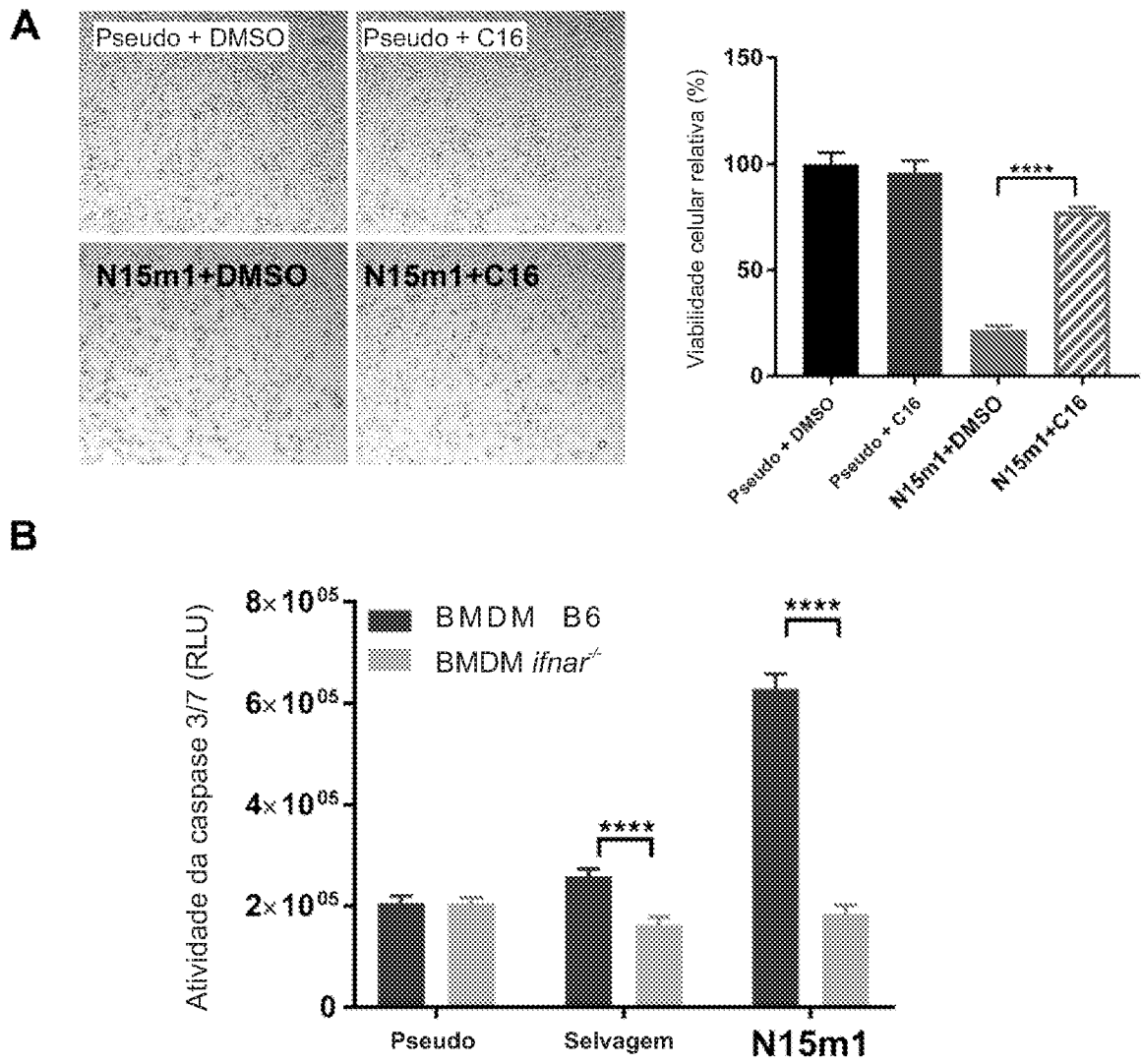


FIG. 12

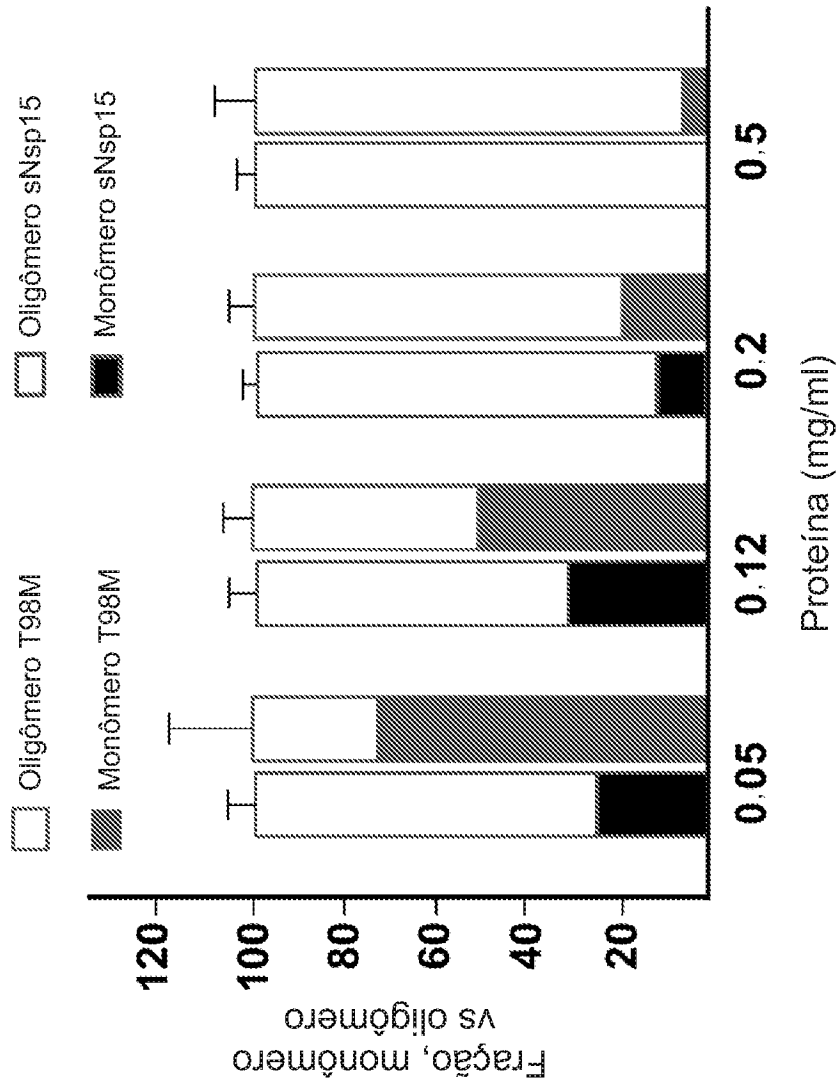


FIG. 13

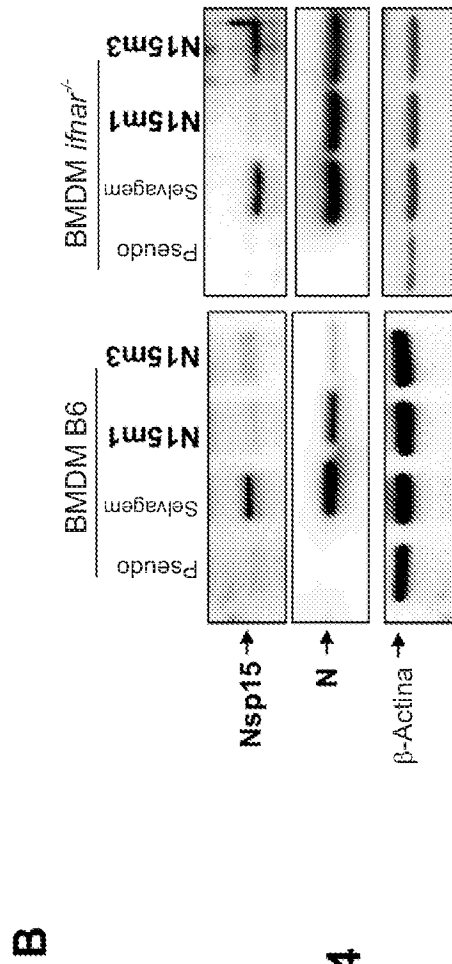
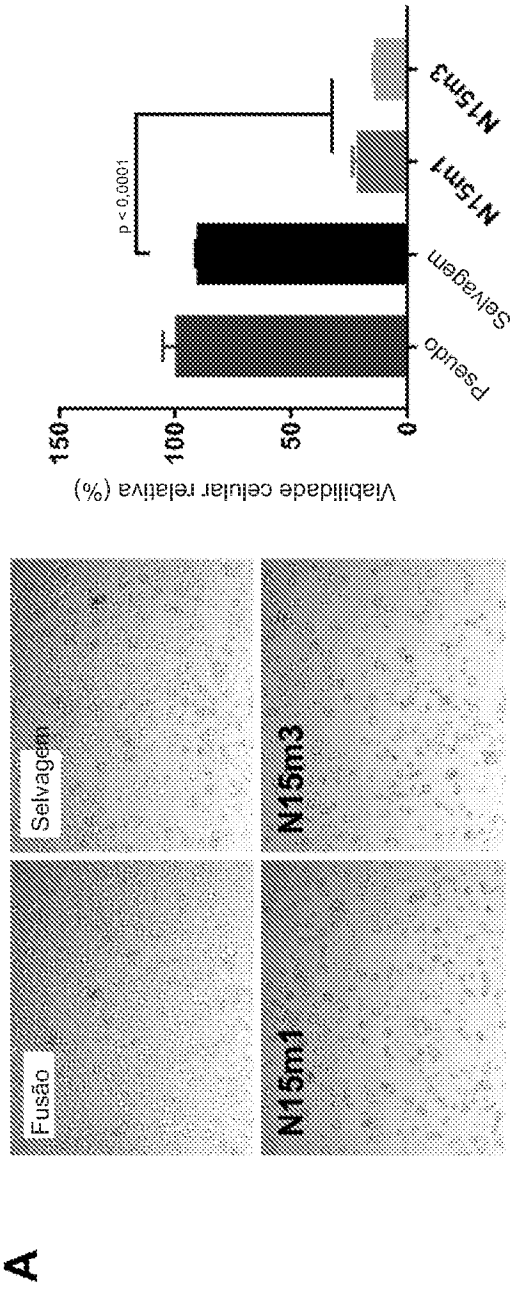
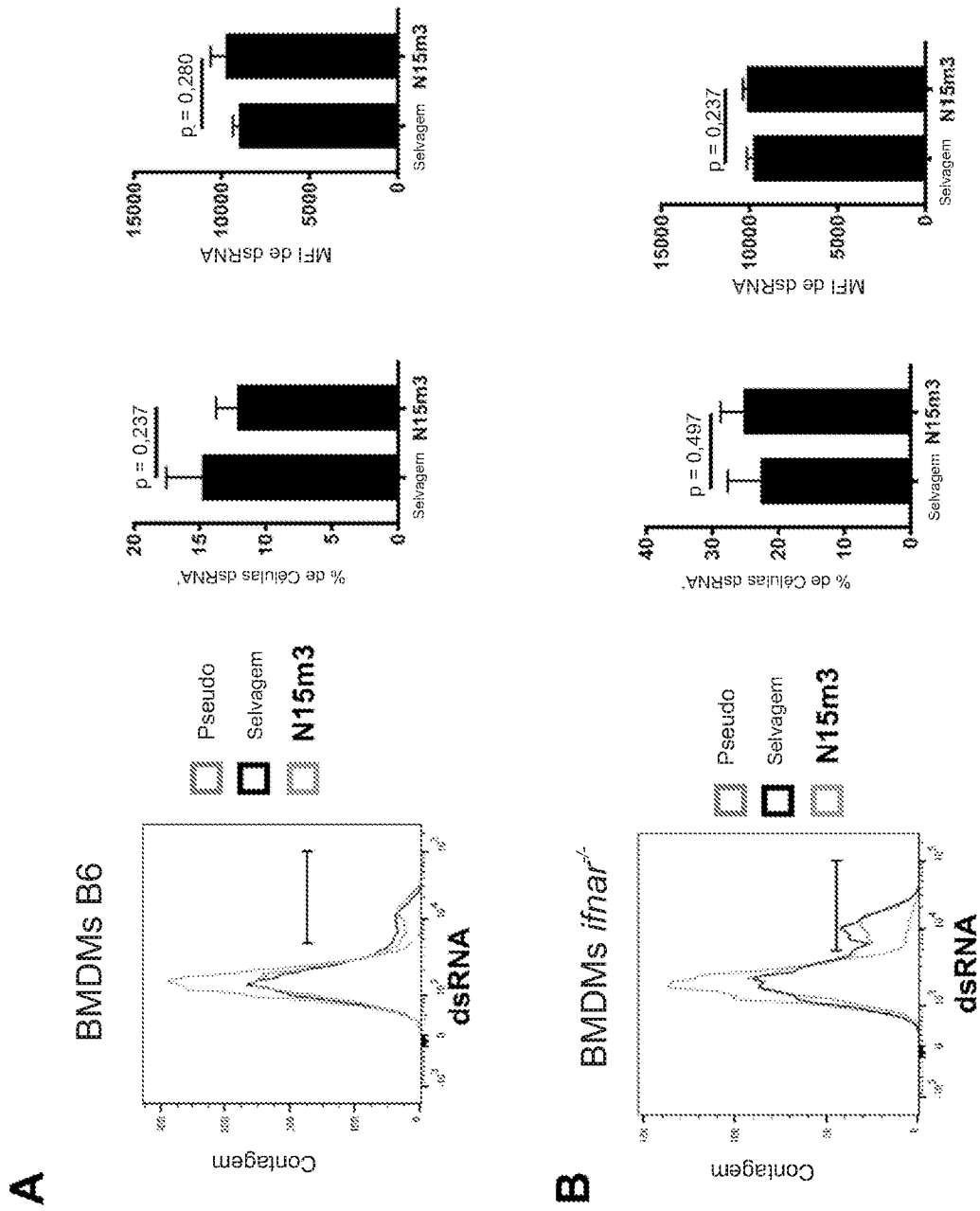


FIG. 14



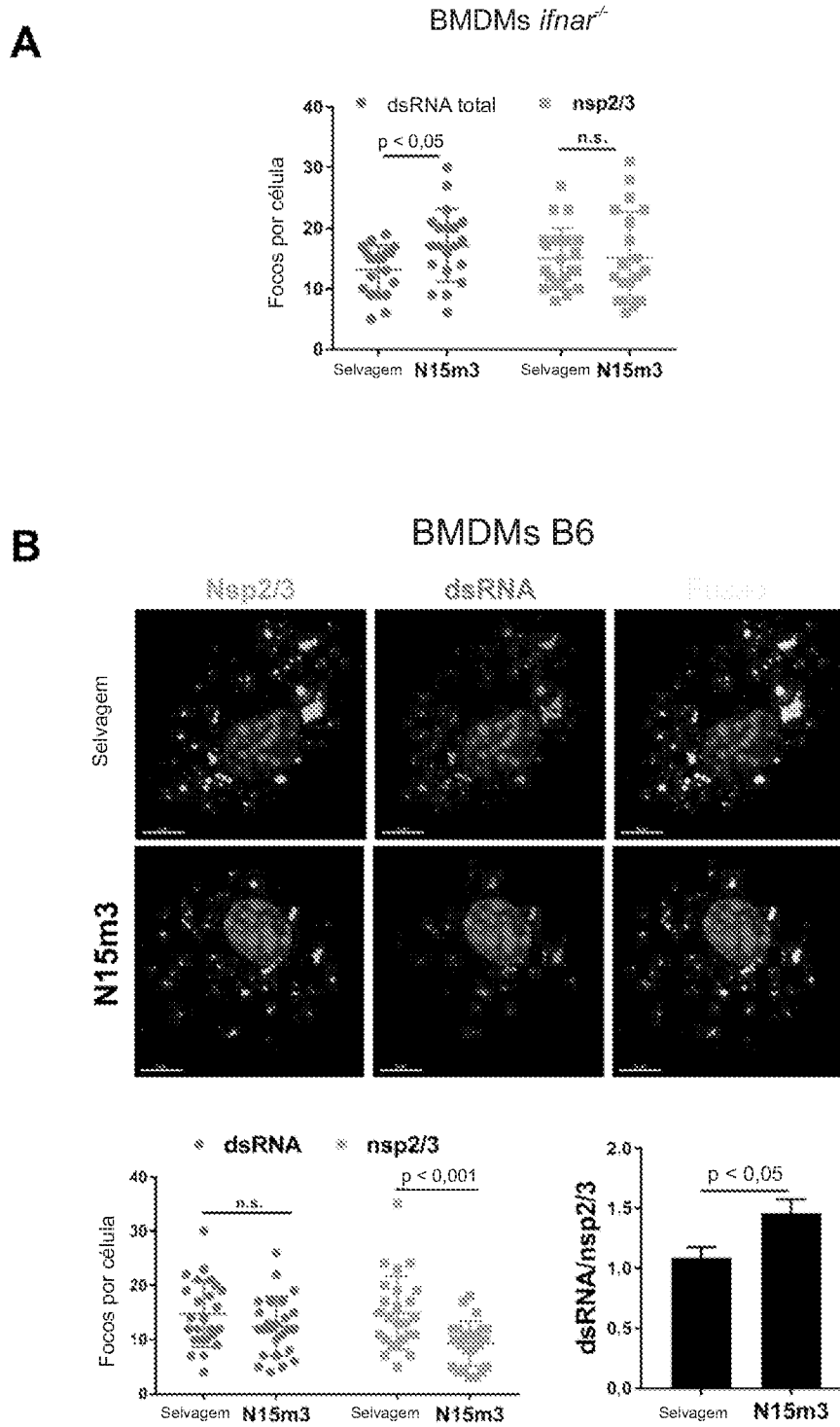
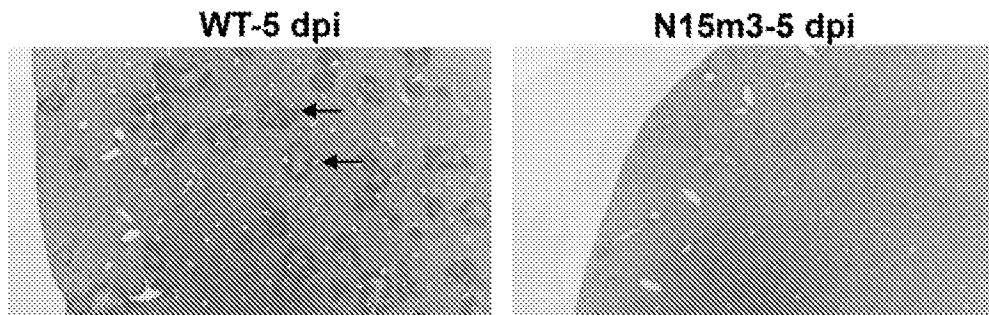
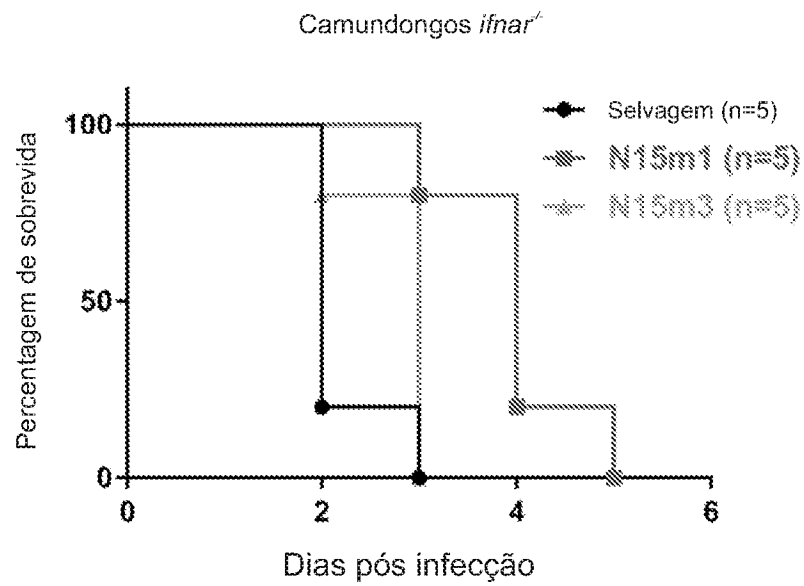


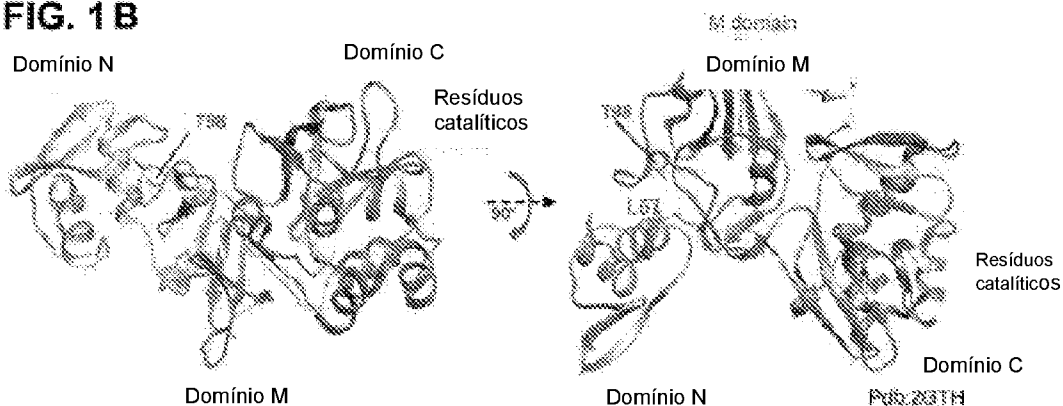
FIG. 16

A**B****FIG. 17**

RESUMO

Patente de Invenção: "CORONAVÍRUS, VACINAS COMPREENDENDO OS MESMOS, E MÉTODOS PARA A PREVENÇÃO DE DOENÇA".

FIG. 1B



A presente invenção refere-se aos coronavírus, a vacinas compreendendo os mesmos, e a métodos para a prevenção de doença. Uma modalidade da presente invenção inclui um coronavírus vivo e atenuado compreendendo um gene da replicase variante codificando poliproteínas compreendendo uma proteína não estrutural (nsp)-15, o gene da replicase o qual codifica a nsp15 e provoca quaisquer modificações, incluindo mutações e/ou deleções, que afetem a estabilidade ou a atividade da nsp15.