



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

(21) BR 102014005445-6 A2

(22) Data do Depósito: 10/03/2014

(43) Data da Publicação: 01/12/2015

(RPI 2343)



* B R 1 0 2 0 1 4 0 0 5 4 4 5 A

(54) **Título:** CISTEÍNO ENDOPEPTIDASE RECOMBINANTE OU PEPTÍDEOS DERIVADOS UTILIZADOS PARA O CONTROLE DE CARRAPATOS

(51) **Int. Cl.:** A61K 39/00; A61K 38/48; C12N 9/64; A61P 33/14

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS

(72) **Inventor(es):** DAIANE PATRICIA OLDIGES, AOI MASUDA, ITABAJARA DA SILVA VAZ JÚNIOR, ADRIANA SEIXAS, CARLOS TERMIGNONI

(57) **Resumo:** CISTEÍNO ENDOPEPTIDASE RECOMBINANTE OU PEPTÍDEOS DERIVADOS UTILIZADOS PARA O CONTROLE DE CARRAPATOS. Cisteíno endopeptidase recombinante ou peptídeos derivados utilizados para o controle de carrapatos, caracterizada pela produção por síntese química ou produzida em outros organismos por meio de técnicas de DNA recombinante de um antígeno do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Este antígeno isolado é uma enzima com atividade hidrolítica sobre a vitelina, presente em tecidos do carrapato. O uso dessa proteína, em bovinos, como imunógeno, é capaz de gerar resposta protetora contra carrapatos. Portanto, o antígeno pode ser utilizado isoladamente ou em conjunto com outros antígenos como vacina para prevenir a infestação do carrapato.

Relatório Descritivo

CISTEÍNO ENDOPEPTIDASE RECOMBINANTE OU PEPTÍDEOS DERIVADOS UTILIZADOS

PARA O CONTROLE DE CARRAPATOS

001 Refere-se o presente invento a produção e caracterização de um antígeno do carrapato *Rhipicephalus microplus*. O antígeno isolado, denominado de Cisteíno endopeptidase degradadora de vitelina (VTDC Erec), é uma enzima com atividade hidrolítica sobre a vitelina, presente em vários tecidos do carrapato. O uso deste antígeno como imunógeno em bovinos é capaz de induzir uma resposta imunológica, de forma que o antígeno pode ser utilizado como vacina para prevenir a infestação, isoladamente ou em conjunto com outros antígenos já descritos ou a serem descritos.

002 O carrapato *R. microplus*, é um ectoparasita hematófago de grande importância econômica. Ele parasita os bovinos e causa significativos prejuízos econômicos aos criadores. Os danos gerados são a redução na produção de leite e carne, tendo em vista a grande perda de sangue e do apetite; redução do valor do couro em função das lesões causadas por reações inflamatórias nos locais de fixação; transmissão de agentes de doenças como a babesiose e a anaplasnose, que juntas, geram o quadro denominado tristeza parasitária bovina; e também pelos custos gerados pela prevenção dos

parasitos (compra e aplicação de acaricidas). Este parasito é encontrado entre as latitudes 32 norte e 35 sul, que compreende as principais regiões produtoras de carne bovina. Considerando uma perda anual por animal de cerca de US\$ 10,00 este carrapato causa a pecuária brasileira (aproximadamente 200 milhões de cabeças) uma perda de cerca de dois bilhões de dólar por ano.

003 Proteínas do carrapato já foram testadas em ensaios de imunização de animais, como é o caso da glicoproteína BYC (*Boophilus* Yolk pro-cathepsin), da THAP (*Tick Heme-binding Aspartic proteinase*), da GST (Glutathione S-transferase), da VTDC native (Vitellin Degrading Cysteine endopeptidase), da BmCL1 (cathepsin L-like endopeptidase), da CRT (calreticulina) e de inibidores de tripsina (BmTIs). Essas proteínas induziram a produção de anticorpos e conferiram algum grau de imunoproteção, interferindo no sucesso reprodutivo do carrapato.

004 O uso de vacinas se mostra atrativo por ser seguro para o ambiente, para os consumidores e para o hospedeiro. Já foi comprovado que bovinos são capazes de produzir uma resposta immune em resposta a imunizações com extratos brutos de carrapatos, bem como com proteínas purificadas destes extratos. A utilização da proteína recombinante Bm86 deu origem às primeiras vacinas comerciais.

005 Durante o desenvolvimento de vacinas carrapaticidas duas fontes de candidatos a antígenos vacinais foram caracterizados: os antígenos expostos e os antígenos ocultos. No primeiro grupo estão os antígenos presentes na saliva, que são inoculados durante a hematofagia. Antígenos ocultos, por sua vez estão normalmente escondidos do sistema imune do hospedeiro, por não ter contato direto com ele. A desvantagem da utilização de antígenos ocultos se deve ao de fato não ocorrer uma imunização contínua pelo próprio parasito, sendo necessária a aplicação periódica da vacina.

006 O uso vacinas anti-carrapatos foi iniciado em dois países no início dos anos 90: Cuba e Austrália. Ambas as vacinas utilizam o antígeno recombinante Bm86, glicoproteína imunogênica presente nas células do tubo digestivo do carrapato, aparentemente envolvida na endocitose. É importante ressaltar que mesmo quando ocorre a utilização das vacinas baseadas na proteína Bm86 a aplicação de acaricidas ainda é necessária para controlar o carrapato. As vacinas lançadas no mercado apenas reduzem a quantidade e periodicidade da utilização de acaricidas, mas não eliminam a necessidade de sua aplicação concomitantemente, antes (dias ou meses) ou após a administração das vacinas (dias ou meses).

007 As duas vacinas comerciais citadas anteriormente não são eficientes no Brasil, devido a diferenças na proteína Bm86 das populações de carrapato brasileiras, em relação às presentes na Austrália e em Cuba. Para a produção de uma vacina economicamente viável e que seja eficiente no nosso país, é necessário identificar novas moléculas de importância fisiológica e com potencial imunoprotetor.

008 A purificação da VTDCÉ nativa, a partir de tecidos e ovos de carrapato, foi realizada por cromatografia e resultou em um antígeno que induziu uma proteção parcial contra futuras infestações do carrapato bovino.

009 A clonagem da região codificadora da Cisteíno Endopeptidase Recombinante (VTDCÉrec) foi realizada utilizando as técnicas de PCR. Para a clonagem, primers baseado em regiões do gene da enzima foram utilizados na reação de PCR para amplificar a sequência da região codificante do cDNA da VTDCÉ de ovário de *R. microplus*. O produto do PCR correspondeu a um fragmento de 285 bp, referente a sequência do cDNA da VTDCÉ e foi purificado a partir banda de gel de agarose. O fragmento foi clonado no vetor pGEM-T e bactérias *E. coli* (linhagem Top 10) foram transformadas com o plasmídeo resultante. O plasmídeo recombinante foi extraído através de miniprep (preparação de DNA plasmidial através de lise alcalina com SDS) e a

sequência de ácidos nucleicos foi determinada. A sequência de aminoácidos da VTDCE de *R. microplus* foi deduzida a partir da sequência de ácidos nucleicos.

010 A partir da construção pGEM-T-VTDCE foi realizada a hidrolize do material com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI*, resultando na liberação de um inserto de 279 pb que foi purificado a partir do gel de agarose. O vetor de expressão pET também foi clivado com as enzimas *NcoI* e *XhoI* e purificado. O inserto e o vetor foram ligados com a enzima T4 DNA Ligase, em uma reação mantida a 16°C por 18 horas originando a construção pET-VTDCE.

011 Bactérias *E. coli* linhagem BL21(DE3)Star foram transformadas com o DNA do plasmídeo pET-VTDCE, pelo método de choque térmico e plaqueadas em ágar LB, contendo o antibiótico ampicilina (100 µg/ml). Uma única colônia foi isolada e inoculada em 25 ml de meio SOB incompleto contendo ampicilina, e crescida sob agitação constante a 180 rpm, 37°C por 16 horas. Após, 5 mL do cultivo foram inoculados em 500 ml de meio SOB incompleto em erlenmeyer de dois litros e incubado sob agitação constante a 180 rpm, 37°C até alcançar a densidade ótica 0,6 no comprimento de onda de 600 nm. Para a indução da expressão da proteína, o isopropil-β-D tiogalactopiranosídeo (IPTG) foi adicionado

para concentração final de 1 mM, e então incubado sob agitação constante a 180 rpm, 37°C, por 2 horas. As células cultivadas foram centrifugadas a 10000 g por 5 minutos a 4°C. Desprezado o sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em 50 ml tampão fosfato com 50 mM de Imidazol (20 mM Fosfato de Sódio, 0,5 M NaCl, 50mM Imidazol, pH 7,4). A lise das células ocorreu através de sonicação em uma amplitude de 40 MHz, por 30 segundos. Este processo foi repetido cinco vezes por com intervalos de 1 minuto em banho de gelo. Logo após, foram centrifugadas a 10000 g durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi filtrado em filtro 0,47 µm.

012 A purificação da VTDCCE recombinante (VTDCCErec) foi realizada por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, sendo utilizado o íon metálico Ni⁺⁺ para este fim. As eluições foram feitas com tampão fosfato (20 mM Fosfato de Sódio, 0,5 M NaCl, pH 7,4) contendo 100 ou 500 mM de imidazol.

013 Amostras foram analisadas por SDS-PAGE 12%. As frações protéicas foram misturadas a 25% do volume de tampão de amostra para SDS-PAGE, fervidas por 5 minutos e aplicadas no gel. O gel foi submetido à eletroforese em tampão de

corrida com corrente de 10 mA e posteriormente corado com Coomassie Blue G-250.

014 Para testar a capacidade da VTDCerec de induzir uma resposta imunológica e comparar com a resposta induzida pela VTDCe nativa um coelho foi imunizado com a rVTDCe. A partir de um gel de poliacrilamida onde foi aplicada uma amostra de rVTDCe purificada, foi recortada a banda referente à proteína de interesse. Este material foi macerado e misturado ao adjuvante oleoso e inoculado em um coelho. Foram realizados três inóculos, contendo aproximadamente 100 µg de proteína por dose, com intervalos de 15 dias entre cada uma.

015 Para testar a capacidade da VTDCerec de induzir uma resposta imunológica protetora, um grupo de 18 bovinos foram imunizados com uma vacina multi-antigênica contendo 200 µg de cada uma das seguintes proteínas: VTDCerec, BYCrec e GST-H1. Este material foi misturado ao adjuvante oleoso Marcol Montanide e aplicado de por via intramuscular. Como grupo controle foram utilizados 20 animais, inoculados somente com adjuvante e PBS. Foram realizadas no total 4 inoculações com 21 dias de intervalo. Os bovinos foram mantidos por 6 meses em campo nativo e submetidos a infestações naturais por carrapatos.

016 Para analisar a resposta imunológica desenvolvida pelos animais, 10 mL de sangue foram retirados de cada animal nos dias 1, 21, 42, 63, 84, 112, e 140, além disso, cada animal teve seu peso aferido. Nas mesmas datas também foi realizada a contagem fêmeas adultas (carrapatos com tamanho entre 4.5 mm e 8.0 mm). O índice de proteção foi calculado a partir da quantidade de fêmeas contadas.

017 Como resultado foi possível verificar que nos bovinos imunizados os carrapatos apresentaram uma menor capacidade de completarem o ciclo biológico, em relação aos carrapatos dos bovinos controles. O índice de proteção final obtido pela imunização foi de 62%. Também foi verificada uma diferença de aproximadamente 60% no ganho de peso médio dos bovinos vacinados em relação aos bovinos não vacinados, que foi significativamente diferente dos animais controles, indicando que a vacinação exerceu influência durante o período experimental.

REIVINDICAÇÕES

1- "Cisteíno endopeptidase recombinante ou peptídeos derivados utilizados para o controle de carrapatos", caracterizada por compreender um ou mais antígenos da proteína Cisteíno Endopeptidase Degradadora de Vitelina recombinante selecionados dentre aqueles que apresentam a sequência de aminoácidos SEQ ID N°:1, tendo pesos moleculares de aproximadamente 16kDa e um adjuvante oleoso ou metálico, em um veículo fisiologicamente aceitável

2- "Cisteíno endopeptidase recombinante ou peptídeos derivados utilizados para o controle de carrapatos" de acordo com a reivindicação 1 caracterizada pelo fato das proteínas terem pelo menos, 80% de identidade para a sequência definida pela SEQ ID N°:1.

3- "Cisteíno endopeptidase recombinante ou peptídeos derivados utilizados para o controle de carrapatos" de acordo com a reivindicação 1 caracterizada pelo fato das proteínas estarem em uma concentração de 0,01 a 5,0 mg/ml.

4- "Cisteíno endopeptidase recombinante ou peptídeos derivados utilizados para o controle de carrapatos" de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por ser a proteína obtida por síntese química ou produzida em outros organismos por meio de técnicas de DNA recombinante,

6- Uso de uma proteína caracterizada por compreender da proteína Cisteíno endopeptidase recombinante caracterizada, por ser compreendido da sequência de aminoácidos SEQ ID N°:1 como definida nas reivindicações 1-5 para formulação de uma vacina.

Resumo**CISTEÍNO ENDOPEPTIDASE RECOMBINANTE OU PEPTÍDEOS DERIVADOS UTILIZADOS****PARA O CONTROLE DE CARRAPATOS**

Cisteíno endopeptidase recombinante ou peptídeos derivados utilizados para o controle de carrapatos, caracterizada pela produção por síntese química ou produzida em outros organismos por meio de técnicas de DNA recombinante de um antígeno do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Este antígeno isolado é uma enzima com atividade hidrolítica sobre a vitelina, presente em tecidos do carrapato. O uso dessa proteína, em bovinos, como imunógeno, é capaz de gerar resposta protetora contra carrapatos. Portanto, o antígeno pode ser utilizado isoladamente ou em conjunto com outros antígenos como vacina para prevenir a infestação do carrapato.