



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

(21) BR 102013019135-3 A2

(22) Data do Depósito: 26/07/2013

(43) Data da Publicação: 06/09/2016



* B R 1 0 2 0 1 3 0 1 9 1 3 5 A

(54) Título: ANTÍGENOS DE METALOPROTEASE OU PEPTÍDEOS DERIVADOS PARA O CONTROLE DO CARRAPATO

(51) Int. Cl.: C07K 14/435; A61K 38/17; A61P 33/14; C12N 15/12

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

(72) Inventor(es): ITABAJARA DA SILVA VAZ JÚNIOR, CARLOS TERMIGNONI, ABID ALI, MELINA GARCIA GUIZZO, LUCAS TIRLONI, LUÍS FERNANDO PARIZI, ADRIANA SEIXAS

(57) Resumo: ANTIGENOS DE METALOPROTEASE ou PEPTÍDEOS DERIVADOS PARA CONTROLE DO CARRAPATO A presente invenção se caracteriza como uma vacina contra o carrapato bovino contendo uma metaloprotease encontrada, principalmente, na glândula salivar de carrapatos adultos, bem como em lan/a, produzida a partir de partes do antígeno obtido por extragão e cromatografia de tecidos e/ou ? uidos de carrapatos, por extragão e cromatografia de órgãos de carrapatos ou por ser produzida em outros organismos por meio de técnicas de DNA recombinante. A imunização com metaloprotease resultou na redução da viabilidade do carrapato completar seu ciclo biológico, de forma que o antígeno pode ser utilizado como vacina, isoladamente ou em conjunto com outros antígenos, para prevenir a infestação por carrapatos ole bovinos e outras espécies de animais.

ANTÍGENOS DE METALOPROTEASE OU PEPTÍDEOS DERIVADOS PARA CONTROLE
DO CARRAPATO

Refere-se o presente invento ao isolamento, caracterização de uma proteína do carrapato bovino, *Rhipicephalus microplus*. A proteína isolada, denominado Met4-Bm, é uma metaloprotease encontrada, principalmente, na glândula salivar de carrapatos adultos, bem como em larva. A imunização com a metaloprotease resultou na redução do número de fêmeas de carrapato que completam a fase de alimentação em bovinos, de forma que a proteína ou peptídeos derivados, obtida por extração e cromatografia de tecidos e/ou fluídos de carrapatos, por extração e cromatografia de órgãos de carrapatos ou produzida em outros organismos por meio de técnicas de DNA recombinante, pode ser utilizada como vacina para prevenir a infestação, isoladamente ou em conjunto com outros antígenos já descritos ou a serem descritos.

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasita hematófago que causa importantes perdas produtivas na bovinocultura, além de transmitir protozoários como *Babesia bovis* e *B. bigemina* que causam a tristeza parasitária bovina. O controle do carrapato *R. microplus* atualmente é feito com acaricidas. O fato dos acaricidas apresentarem alto custo, poluírem o ambiente e do aparecimento de linhagens de carrapatos resistentes, induziram a procura de métodos alternativos para o controle do parasita. O nosso grupo de pesquisa atualmente tem procurado identificar proteínas alvos para o controle do carrapato.

A caracterização de moléculas envolvidas no metabolismo do carrapato é capaz de auxiliar o desenvolvimento de métodos alternativos de controle. As metaloproteases caracterizam-se como um dos componentes salivares envolvidos com o repasto sanguíneo e a transmissão de patógenos em outros carrapatos.

A metaloprotease é uma enzima bastante estudada, desde suas características cinéticas e físico-químicas à elucidação de sua estrutura em diversos organismos. No entanto, não há trabalhos na literatura que descrevam as características de uma metaloproteína de *R. microplus* com potencial imunoprotetor contra o carrapato bovino.

Diferentes metaloproteases foram identificadas em carrapatos. Em *Ixodes ricinus* cinco metaloproteases foram caracterizadas. Através do silenciamento gênico demonstrou-se que o nocaute de duas delas, Metis-1 e Metis-2, impediu o sucesso do repasto sanguíneo. Em *R. microplus* foram caracterizadas cinco metaloproteases da família das reprotolisinas e três das astacinas. O silenciamento das metaloproteases da família das reprotolisinas BmMP1, BmMP2 e BmMP3 quando combinadas foi capaz de diminuir a taxa de oviposição, bem como a deleção das metaloproteases da família das astacinas As51 e As70. Técnicas de silenciamento gênico permitem o acesso à função proteica identificando alvos promissores para um controle vacinal. Em *Haemaphysalis longicornis* seis sequências gênicas codificantes para metaloproteases foram identificadas. Em *Rhipicephalus sanguineus*

demonstrou-se a presença de sete sequências através de um transcriptoma de glândula salivar.

A escolha da Metaloprotease 4 de *R. microplus*, Met4-Bm, como alvo vacinal foi baseada nos efeitos da vacinação do carrapato *Haemaphysalis longicornis* com uma metaloprotease que causou mortalidade em ninfas e adultos. A Met4-Bm é a sequência gênica com maior identidade com a HLMP1 de *Haemaphysalis longicornis*. Em *Ixodes ricinus* a metaloprotease Metis-1, cujos anticorpos têm reação cruzada com Metis-2, também foi utilizada como antígeno vacinal. A imunização interferiu no repasto sanguíneo, afetando o ganho de peso das fêmeas adultas e a taxa de oviposição.

A clonagem da região codificadora da metaloprotease Met4-Bm, para gerar a proteína recombinante rMet4-Bm, foi realizada utilizando a técnica de PCR. Para a clonagem, oligonucleotídeos baseados nas regiões carboxi e amino terminal da metaloprotease foram utilizados na reação de PCR para amplificar a sequência do cDNA da metaloprotease de glândula salivar de *R. microplus*. O produto do PCR correspondeu a um fragmento de 1680 bp, referente à sequência do cDNA da metaloprotease. O fragmento gerado foi purificado a partir de banda do gel de agarose, e inserido no vetor de clonagem pGEM-T e bactérias *Escherichia coli* (linhagem TOP10) foram transformadas com o plasmídeo resultante. O plasmídeo recombinante foi extraído através da técnica de minipreparação e a sequência de ácidos nucleicos determinada por sequenciamento. A sequência de aminoácidos preditos da metaloprotease de

R. microplus foi verificada por análise comparativa com sequências de metaloproteases obtidas no GenBank.

A seguir foram projetados oligonucleotídeos para que a região codificadora da Met4-Bm fosse clonada no vetor de expressão pET-5a, utilizando como enzimas de restrição NheI e BamHI. A partir da construção pGEM-T-Met4-Bm foi realizado um PCR com Elongase. Diferentes condições de reação foram testadas e a que resultou na amplificação do inserto de 1680 pb foi utilizada. O inserto amplificado foi purificado e hidrolisado, juntamente com o vetor e com as enzimas de restrição NheI e BamHI. Para a ligação, o inserto e o vetor, numa proporção 3:1, foram ligados com a enzima T4 DNA Ligase. A reação foi mantida a 16°C por 18 horas originando a construção pET-5a-Met4-Bm.

As bactérias *E. coli* linhagem TOP10 foram transformadas com a construção resultante (pET-5a-Met4-Bm) pelo método de eletroporação. Das colônias bacterianas transformantes obtidas, uma colônia isolada foi inoculada em 1,5 mL de LB contendo ampicilina e crescida por 16 horas a 37°C sob agitação constante. O plasmídeo recombinante foi extraído por minipreparação e a sequência de ácidos nucléicos determinada por sequenciamento.

As bactérias *E. coli* linhagem BL21 (DE3) RIL foram transformadas por eletroporação para inserção do plasmídeo recombinante pET-5a-Met4-Bm. As bactérias transformadas foram plaqueadas em placa contendo ágar LB e o antibiótico ampicilina e incubadas por 18 horas em estufa a 37°C. Uma colônia isolada, de cada transformante, foi inoculada em 25 mL de meio SOB

contendo ampicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e crescida 18 horas a 37°C sob agitação de 180 rpm. Após o cultivo, as células foram coletadas por centrifugação a 5.000 g por 5 minutos a 4°C e ressuspensas em meio novo sem antibiótico, e usadas para inocular 500 mL de meio SOB. Estes frascos foram incubados a 37°C sob agitação de 180 rpm até alcançar densidade ótica de 0,4 no comprimento de onda de 600 nm. Para indução da expressão da proteína, foi adicionado isopropil- β -D-galactosídeo (IPTG) na concentração final de 1 mM e o cultivo incubado por 4 horas a 37°C . As células cultivadas foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e o sedimento ressuspenso em 20 ml de tampão fosfato monobásico de sódio 20 mM, pH 7,4 contendo 1 mg/ml de lisozima, incubando-se durante uma hora a 37°C . As células foram congeladas e descongeladas três vezes. A amostra foi descongelada no último ciclo e centrifugada ($12.000 \times g$ durante 20 min) coletando-se o sobrenadante. O sedimento foi lavado com tampão fosfato 20 mM, imidazol 30 mM e NaCl 0,5 M, pH, 7,4 e centrifugado a 10000 g durante 10 minutos e o sobrenadante foi recolhido. A lavagem com tampão foi repetida e o sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 12000 g durante 30 minutos a 4°C . O sobrenadante foi separado por filtração com filtros de porosidade $0,45 \mu\text{m}$ e separado por métodos cromatográficos em uma coluna com resina com metal imobilizado (níquel) previamente lavada com água destilada e equilibrada com tampão fosfato 20 mM, imidazol 30 mM e NaCl 0,5 M, pH, 7,4. Após a aplicação da amostra, as proteínas bacterianas ligadas foram lavadas com 15 ml de tampão fosfato 20 mM, imidazol 30 mM e NaCl 0,5 M, pH, 7,4. A proteína

recombinante foi eluída em dois tampões de eluição, primeiro tampão de eluição (fosfato 20 mM, pH 7,4, NaCl 0,5 M, imidazol 100 mM) e em seguida por um segundo tampão de eluição (pH 7,4, NaCl 0,5 M, imidazol 500 mM) originando 3 ml de proteína recombinante rMet4-Bm.

A sequência deduzida da Met4-Bm contém 559 aminoácidos, com massa molecular predita de 62,505 kDa por subunidade e ponto isoelétrico predito de 6,45 e possui características de enzimas pertencentes à classe das metaloproteases.

Para testar a capacidade da rMet4-Bm de induzir uma resposta imunológica protetora, bovinos com idade de 8 meses foram inoculados por via intramuscular por 4 vezes com intervalos de 15 dias entre cada inoculação. Os inóculos foram preparados com 100 µg de rMet4-Bm suspensa no adjuvante Montanide 888 e Marcol 52. Após 15 dias da última inoculação, os 4 bovinos imunizados e 3 bovinos controles (inoculados apenas com o adjuvante em PBS) foram infestados com 20.000 larvas de *R. microplus*. Os animais foram mantidos em baias individuais e os carrapatos que completavam o ciclo biológico no hospedeiro eram coletados, contados e pesados. A eficácia da rMet4-Bm em induzir uma resposta imunológica protetora em bovinos foi calculada pelo número de fêmeas que completaram a fase de alimentação

O coeficiente de redução do número de fêmeas ingurgitadas é calculado como a razão entre o número médio de fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo nos bovinos vacinados e o número médio de fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo nos bovinos não vacinados (controle). O número de

fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo em cada bovino estão colocados na tabela I.

Tabela I: Resultado da vacinação de bovinos e desafio com carrapatos.

Grupo	Animal	Número de carrapatos (n)
Vacinado	381	1069
	382	1801
	383	908
	384	2409
Total		6187
Média		1547
Desvio Padrão		694
Controle	385	3061
	386	2099
	387	2965
Total		8125
Média		2708
Desvio Padrão		530

a) Diferença (%)= $100 \times (1 - (\text{valor médio do grupo vacinado} / \text{valor médio do grupo controle}))$.

D.P. = Desvio Padrão.

A capacidade de anticorpos inibirem a atividade da metaloprotease permite caracterizar a Met4-Bm como um potencial antígeno vacinal para o desenvolvimento de uma vacina contra o carrapato bovino.

Reivindicações

- 1-Antígenos de metaloprotease ou peptídeos derivados para controle do carrapato, **caracterizados** por compreender um ou mais antígenos, de metaloprotease selecionados dentre aqueles que apresentam a sequência de aminoácidos SEQ ID NO:1, tendo pesos moleculares de 62 kDa e um adjuvante oleoso ou metálico, em um veículo fisiologicamente aceitável
- 5
- 2- Antígenos de metaloprotease ou peptídeos derivados para controle do carrapato de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados** pelo fato das proteínas terem pelo menos, 80% de identidade para a sequência definida pela
- 10 SEQ ID NO:1.
- 3- Antígenos de metaloprotease ou peptídeos derivados para controle do carrapato de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados** pelo fato das proteínas estarem em uma concentração de 0,01 a 5,0 mg/ml.

Resumo**ANTÍGENOS DE METALOPROTEASE OU PEPTÍDEOS DERIVADOS PARA CONTROLE DO
CARRAPATO**

A presente invenção se caracteriza como uma vacina contra o carrapato
5 bovino contendo uma metaloprotease encontrada, principalmente, na glândula
salivar de carrapatos adultos, bem como em larva, produzida a partir de partes do
antígeno obtido por extração e cromatografia de tecidos e/ou fluídos de
carrapatos, por extração e cromatografia de órgãos de carrapatos ou por ser
produzida em outros organismos por meio de técnicas de DNA recombinante. A
10 imunização com metaloprotease resultou na redução da viabilidade do carrapato
completar seu ciclo biológico, de forma que o antígeno pode ser utilizado como
vacina, isoladamente ou em conjunto com outros antígenos, para prevenir a
infestação por carrapatos de bovinos e outras espécies de animais.