



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

(21) **PI0901170-6 A2**

(22) Data de Depósito: 31/03/2009
(43) Data da Publicação: 16/11/2010
(RPI 2080)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/435
A61K 38/45
A61K 39/00
A61P 33/14

(54) Título: **GLUTATIONA S-TRANSFERASE OU PEPTÍDEOS DERIVADOS UTILIZADOS PARA O CONTROLE DO CARRAPATO**

(73) Titular(es): Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

(72) Inventor(es): Aoi Masuda, Itabajara da Silva Vaz Junior, Luis Fernando Parizi

(57) Resumo: GLUTATIONA 5-TRANSFERASE OU PEPTÍDEOS DERIVADOS UTILIZADOS PARA O CONTROLE DO CARRAPATO. "Glutaciona S-transferase ou peptídeos derivados utilizados para o controle do carrapato", caracterizada pelo isolamento de um antígeno do carrapato *Haemaphysalis longicornis*. Este antígeno isolado é uma enzima com atividade de transferase, presente nos ovos e tecidos do carrapato, ou produzido em outros organismos por meio de técnicas de DNA recombinante. 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.



**"GLUTATIONA S-TRANSFERASE OU PEPTÍDEOS DERIVADOS UTILIZADOS
PARA O CONTROLE DO CARRAPATO".**

Refere-se o presente invento a identificação e caracterização de um antígeno do carrapato *Haemaphysalis longicornis*. O antígeno isolado, denominado GST-H1, é uma enzima com atividade de transferase, presente nos ovos do carrapato, mas também 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.

Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores de carne bovina do mundo, possui um rebanho bovino de aproximadamente 200 milhões de cabeças, produzindo aproximadamente 8,5 milhões de toneladas de carne e 23 bilhões de leite por ano. O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o mais importante ectoparasita dos rebanhos bovinos do Estado, causando diversos danos no couro devido a reação inflamatória no local de fixação do carrapato e queda na produção de leite e carne, principal fonte de proteína consumida no país.

O controle imunológico surgiu como uma tecnologia adicional no controle desse parasita. Entretanto, o sucesso

dessa estratégia é dependente da clonagem de genes e caracterização de moléculas fisiológicas funcionais do carrapato. Testes de imunização com diferentes antígenos do parasita fornecem evidências de que o controle destes
5 ectoparasitas pode ser realizado através da vacinação. É necessário também, além da identificação de proteínas capazes de induzir uma resposta imune protetora, o conhecimento dos mecanismos de resposta imunológica dos hospedeiros.

Duas vacinas baseadas no antígeno recombinante Bm86 já
10 foram desenvolvidas contra o carrapato *R. microplus*, sendo possível verificar a redução no número, o peso e a capacidade de reprodução das fêmeas. Na Austrália, por exemplo, a vacinação contra carrapatos bovinos levou a uma redução de 56% no número de carrapatos e 72% de redução da eficácia de
15 reprodução. Em Cuba e Austrália o uso da vacina reduziu o número de tratamentos com acaricidas, como também a incidência de anaplasnose e babesiose, sendo capaz de controlar populações de carrapatos resistentes a carrapaticidas.

20 Proteínas do carrapato já foram testadas em ensaios de imunização de animais, como é o caso da glicoproteína BYC e inibidores de tripsina (BmTIs). Essas proteínas induziram a produção de anticorpos e conferiram algum grau de

imunoproteção, interferindo no sucesso reprodutivo do carrapato.

Outras proteínas envolvidas em diferentes funções fisiológicas do carrapato têm sido caracterizadas por diversos grupos de pesquisa, como a THAP (*Tick Heme-binding Aspartic proteinase*), a GST (Glutathione S-transferase), a VTDC (Vitellin Degrading Cysteine endopeptidase), a BmCL1 (cathepsin L-like endopeptidase) e a CRT (calreticulina).

O efeito imunoprotetor da BYC recombinante (rBYC) expressa em *Escherichia coli* foi avaliado. O soro dos bovinos imunizados com rBYC reconheceu a proteína nativa com título entre 125 e 4000. Os bovinos imunizados quando desafiados com 20.000 larvas de *R. microplus* apresentaram uma proteção de 25,24% que é similar à alcançada com a proteína nativa, o qual teve uma proteção entre 36%, considerando o peso dos carrapatos, oviposição e eclosão.

Diferentemente da Bm86, o primeiro antígeno usado em vacina contra carrapato, os anticorpos gerados após a imunização com BYC, interferiram no aparelho digestório, afetando principalmente a eclosão das larvas, efeito que é consistente com o papel proposto para esta enzima na degradação de vitelo durante a embriogênese.

No entanto, mesmo com todas estas demonstrações de que a imunização pode ser um método eficiente no controle de

carrapato, vacinas contra carrapato devem ser empregadas dentro de um contexto de controle integrado, isto é, em conjunto com acaricidas, já que os métodos de vacinação disponíveis, atualmente, não conferem proteção total.

5 A purificação da GST-H1 nativa, a partir de tecidos e ovos de carrapato, foi realizada por cromatografia de afinidade a glutathione utilizando a coluna GSTrap FF de 5 ml (GE Healthcare). A amostra foi aplicada na coluna previamente equilibrada com tampão de ligação. Em seguida, a coluna foi
10 lavada com o tampão de ligação até a remoção das proteínas não ligadas. Posteriormente as proteínas foram eluídas com o tampão de eluição. As frações eluídas foram dialisadas em PBS e concentradas por liofilização.

 Amostras de GST-H1 foram analisadas por SDS-PAGE 14%. As
15 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.

20 A clonagem da região codificadora da GST-H1 foi realizada utilizando as técnicas de PCR e 5'RACE e 3'RACE. Para a clonagem, primers degenerados, baseado em regiões conservadas da GST de outros organismos foram utilizados na reação de PCR para amplificar a seqüência parcial do cDNA da GST de larvas

de *H. longicornis*. O produto do PCR correspondeu a um fragmento de 400 bp, referente a seqüência parcial do cDNA da GST e foi purificado a partir banda de gel de agarose. O fragmento foi clonado no vetor pGEM-TEasy e bactérias *E. coli* (linhagem DH5 α) 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 seqüência de ácidos nucléicos foi determinada. A seqüência de aminoácidos preditos da GST de *H. longicornis* foi verificada por análise comparativa com seqüências da GST obtidas no GenBank.

Para clonar o cDNA completo da GST-H1, foram realizados 5'RACE e 3'RACE utilizando iniciadores específicos para a GST de *H. longicornis*, baseado na seqüência de ácidos nucléicos do fragmento de 400 bp. Para o 3'RACE foi utilizado o System for Rapid Amplification of cDNA Ends Kit (invitrogen) e um primer adaptador contendo oligo-(dT) de acordo com instruções do kit.

O cDNA foi sintetizado a partir de larvas do carrapato, o qual o primer utilizado foi 5'-CAATGCGGTCCACAAA-3' e a enzima transcriptase reversa (M-MLV RT). O cDNA amplificado do PCR foi feito com primer ancorador (AUAP) e um primer nested específico. Um segundo primer nested específico foi utilizado para uma segunda reação de PCR. O produto do PCR

foi clonado no vetor pGEM-TEasy. O plasmídeo recombinante foi extraído através do miniprep e obtido a seqüência de ácidos nucleicos determinada. A seqüência de aminoácidos preditos da GST de *H. longicornis* foi verificada por análise comparativa com seqüências da GST obtidas no GenBank.

Para clonar o cDNA completo da GST-H1 foi realizado PCR utilizando iniciadores específicos para a GST de *H. longicornis*, baseado na seqüência de ácidos nucleicos dos fragmentos obtidos por 5'RACE e 3'RACE. O produto do PCR foi clonado no vetor pGEM-T Easy. O plasmídeo recombinante foi extraído através do miniprep e a seqüência de ácidos nucleicos determinada.

Foram projetados *primers* para que a região codificante do gene da GST-H1 presente na construção pGEM-TEasy-GST-H1 fosse clonada no vetor de expressão pET43a. A partir da construção pGEM-TEasy-GST-H1 foi realizado um PCR, que resultou na amplificação de um inserto de 669pb. O inserto de 669pb amplificado foi purificado e hidrolisado, juntamente com o vetor, com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*. 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 pET43a-GST-H1.

Bactérias *E. coli* linhagem AD494 foram transformadas com o DNA do plasmídeo pET43/GST-H1, pelo método de choque

térmico e plaqueadas em ágar SOB completo, contendo o antibiótico ampicilina (100 µg/ml). Uma única colônia foi isolada e inoculada em 25 ml de meio SOB contendo ampicilina, e crescida sob agitação constante a 180 rpm, 37°C por 16

5 horas. Após, o cultivo foi inoculado em 500 ml de meio SOB completo 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)

10 foi adicionado para concentração final de 1 mM, e então incubado sob agitação constante a 180 rpm, 30°C, por 16 horas. As células cultivadas foram centrifugadas a 3000 g por 5 minutos a 4°C. Desprezado o sobrenadante, o sedimento foi ressuspensado em 50 ml de água. Foi então congelado a -70°C e

15 descongelado em temperatura ambiente, este processo foi repetido três vezes para ocorrer a lise das células, que então foram sonicadas na amplitude de 40 MHz cinco vezes por 30 segundos cada, com intervalo de um minuto, em banho de gelo. Logo após, foram centrifugadas a 3000 g durante 5

20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi filtrado em filtro 0,47 µm.

A purificação da GST-H1 recombinante (rGST-H1) foi realizada por cromatografia de afinidade a glutathiona

utilizando a coluna GStrap FF de 1 ml (GE Healthcare). A amostra foi aplicada na coluna previamente equilibrada com tampão de ligação. Em seguida, a coluna foi lavada com o tampão de ligação até a remoção das proteínas não ligadas. 5 Posteriormente as proteínas foram eluídas com o tampão de eluição. As frações eluídas foram dialisadas em PBS.

Amostras de rGST-H1 foram analisadas por SDS-PAGE 14%. As frações protéicas foram misturadas a 25% do volume de tampão de amostra para SDS-PAGE, fervidas por 5 minutos e 10 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.

Para testar a capacidade da rGST-H1 de induzir uma resposta imunológica protetora, bovinos com idade de 8 meses foram 15 inoculados por via intramuscular por 6 vezes com intervalos de 15 dias entre cada inoculação. Os inóculos foram preparados com 200 µg (1^a, 2^a, 3^a e 4^a) e 400 µg (5^a e 6^a) de rGST-H1 suspensa no adjuvante Montanide 888 e Marcol 52. Na 5^a e 6^a imunizações, foram adicionados 1mg de saponina aos 20 inóculos. 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. Diariamente, uma amostra de pelo menos 5 g de fêmeas ingurgitadas, obtidas de cada bovino, eram incubadas em estufa a 28°C com 85% de umidade relativa do ar para realização da postura. Após 20 dias de postura, a massa de ovos posta foi pesada e os ovos incubados. Após o final do período de eclosão, as larvas foram separadas e pesadas.

A eficácia da rGST-H1 em induzir uma resposta imunológica protetora em bovinos foi calculada segundo a fórmula:

10 Eficácia (%) = $100[1 - (CRT \times CRO \times CRF)]$, onde:

CRT: corresponde ao coeficiente de redução do número de teleóginas;

CRO: corresponde ao coeficiente de redução da ovopostura e;

15 CRF: corresponde ao coeficiente de redução da fertilidade dos ovos.

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 de fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo nos bovinos não vacinados (controle). O coeficiente de redução de ovoposição é calculado como a razão entre o peso médio dos ovos gerados durante a postura de 5 gramas de fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo nos bovinos vacinados e o peso médio dos ovos gerados durante a postura de 5 gramas

20

de fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo nos bovinos não vacinados. O coeficiente de redução de fertilidade dos ovos é calculado como a razão entre a média da soma do peso das larvas obtidas dos ovos provenientes de fêmeas alimentadas em bovinos vacinados e a média da soma do peso das larvas obtidas dos ovos provenientes de fêmeas alimentadas em bovinos não vacinados.

O número de fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo em cada bovino, o índice de capacidade de postura das fêmeas ingurgitadas, tomadas como amostra, que completaram o ciclo em cada bovino (5,0 gramas de fêmeas ingurgitadas) e o índice de fertilidade dos ovos provenientes da postura das teleóginas tomadas como amostra que completaram o ciclo em cada bovino estão colocados na tabela I.

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

| Grupo | Número de | | Índice | |
|-------------------------------|-----------------------|------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| | Anima carrapatos l | (n) | Capacidade de postura ^b | Fertilidade dos ovos ^c |
| Controle | 372 | 1712 | 0,443 | 0,393 |
| | 373 | 1305 | 0,452 | 0,351 |
| | 374 | 471 | 0,471 | 0,305 |
| Média | 1163 | | 0,455 | 0,350 |
| ±DP | 633 | | 0,014 | 0,044 |
| Vacinado | 375 | 340 | 0,462 | 0,297 |
| | 376 | 464 | 0,441 | 0,370 |
| | 377 | 406 | 0,454 | 0,304 |
| | 378 | 972 | 0,453 | 0,317 |
| Média | 546 | | 0,453 | 0,322 |
| ±DP | 289 | | 0,01 | 0,033 |
| Diferença (%) ^a | 53,08 | | 0,60 | 7,99 |

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

5 b) Proporção entre peso das fêmeas e peso dos ovos.

c) Proporção entre peso das larvas e peso dos ovos.

D.P. = Desvio Padrão.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

Seqüência de aminoácidos da proteína SEQ ID NO: 1

MAPILGYWDIRGLAQPIRLLLLAHADV KVEDKRYSCGPPPDFDRSAWLKEKHTLGLEFPNLP

YYIDGDVKLTQSMAILRYLARKHGLDGKTEAEKQRVDVTEQQFADFRMNWVRMCYNPDFDK

5 LKVDYLKNLPDALKSFSEYLGKHKFFAGDHVTYVDFIAYEMLAQHLLLAPDCLKDFPNLKA

FVDRIEALPHVAAYLKSDKCISWPLNGDMASFGSRLQKKPHHHHHH

DEPOSITANTE

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, CNPJ
92.969.856/0001-98, Endereço: Av. Paulo Gama, 110, 90040-060,
Porto Alegre, RS.

INVENTORES

1. Itabajara da Silva Vaz Junior, CPF 485117220-68, Endereço:
Rua Jary 619/t3/apt 504, 91350-170 Porto Alegre, RS.
2. Aoi Masuda, CPF 686882028-34, Endereço: Rua Farias Santos,
5 589/301, 90670-150, Porto Alegre, RS.
3. Luis Fernando Parizi, CPF 006898490-10, Endereço: Av.
Guido Mondim 848, 90230-260, Porto Alegre, RS.

REIVINDICAÇÕES

- 1- "Glutathione S-transferase ou peptídeos derivados
utilizados para o controle do carrapato", caracterizada por
compreender da proteína glutathione S-transferase
5 caracterizada, por ser compreendida da seqüência de
aminoácidos SEQ ID NO:1 e um adjuvante oleoso ou metálico, em
um veículo fisiologicamente aceitável, denominado GST-H1, do
carrapato *Haemaphysalis longicornis*,
- 2- "Glutathione S-transferase ou peptídeos derivados
10 utilizados para o controle do carrapato" de acordo com a
reivindicação 1, caracterizada por ser a segunda fração de
proteína obtida na cromatografia de afinidade em resina
sefarose glutathione, de um extrato de ovos ou tecidos de
carrapato,
- 15 3- "Glutathione S-transferase ou peptídeos derivados
utilizados para o controle do carrapato" 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,
- 20 4- "Glutathione S-transferase ou peptídeos derivados
utilizados para o controle do carrapato" de acordo com a
reivindicação 1-3, caracterizada pelo fato da proteína ter
pelo menos 90% de identidade para a seqüência definida pela
reivindicação 1,

- 5- "Glutathione S-transferase ou peptídeos derivados utilizados para o controle do carrapato" de acordo com a reivindicação 1-3, caracterizada pelo fato da proteína estar presente na concentração variando de 0,01 a 5,0 mg/ml,
- 5 6- Uso de uma proteína caracterizada por compreender a proteína glutathione S-transferase caracterizada, por ser compreendida a sequência de aminoácidos SEQ ID NO:1 como definida nas reivindicações 1-5 para formulação de uma vacina.

PT 090 1170-6

RESUMO

**GLUTATIONA S-TRANSFERASE OU PEPTÍDEOS DERIVADOS UTILIZADOS
PARA O CONTROLE DO CARRAPATO**

"Glutathione S-transferase ou peptídeos derivados utilizados
5 para o controle do carrapato", caracterizada pelo isolamento
de um antígeno do carrapato *Haemaphysalis longicornis*. Este
antígeno isolado é uma enzima com atividade de transferase,
presente nos ovos e tecidos do carrapato, ou produzido em
outros organismos por meio de técnicas de DNA recombinante. O
10 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.