



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

(21) **PI0905528-2 A2**

(22) Data de Depósito: 30/10/2009  
(43) Data da Publicação: 21/06/2011  
(RPI 2111)



\* B R P I 0 9 0 5 5 2 8 A 2 \*

(51) *Int.Cl.:*  
A61K 38/52 2006.01  
A61K 39/00 2006.01  
A61P 33/14 2006.01

(54) Título: **COMPOSIÇÃO DE TRIOSE FOSFATO ISOMERASE OU PEPTÍDEOS DERIVADOS**

(73) Titular(es): UENF-Universidade Est. do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

(72) Inventor(es): Aoi Masuda, Carlos Jorge Logullo de Oliveira, Itabajara da Silva Vaz Junior, Jorge Luiz da Cunha Moraes, Luiz Carlos Saramago Gonçalves, Sandra Estrazulas Farias

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO DE TRIOSE FOSFATO ISOMERASE OU PEPTÍDEOS DERIVADOS. Composição de triose fosfato isomerase ou peptídeos derivados, caracterizada como uma vacina contra o carrapato bovino contendo uma triose fosfato isomerase encontrada, principalmente, no embrião, produzida a partir de partes do antígeno obtido por extração e cromatografia de tecidos e/ou fluidos de carrapatos, por extração e cromatografia de órgãos de carrapatos ou por ser produzida em outros organismos por meio de técnicas de DNA recombinante. O uso de anticorpos para a triose fosfato isomerase resultou na inibição da atividade enzimática da proteína TIM recombinante e da proteína TIM presente em órgãos do carrapato, e em redução da viabilidade de linhagem celular de embrião de carrapato, 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.



**COMPOSIÇÃO DE TRIOSE FOSFATO ISOMERASE OU PEPTÍDEOS  
DERIVADOS**

Refere-se o presente invento ao isolamento, caracterização de uma proteína do carrapato bovino, *Boophilus microplus*. A proteína isolada, denominado TIM-Bm, é uma triose fosfato isomerase encontrada, principalmente, no embrião, mas também presente em diversos órgãos dos carrapatos adultos como no intestino, corpo gorduroso e ovário. Anticorpos contra a triose fosfato isomerase resultaram na inibição da atividade enzimática da proteína TIM-Bm recombinante, em inibição da enzima TIM nativa presente no intestino, corpo gorduroso e ovário de teleóginas adultas, além de redução da viabilidade de linhagem celular de embrião de carrapato (BME26), 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 *Boophilus microplus* é o principal causador de perdas econômicas na pecuária, como queda na produção de carne e leite, danos ao couro, além de transmitir protozoários como *Babesia bovis* e *B. bigemina* que causam a tristeza parasitária bovina. O controle do carrapato *B. 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.

O estudo do metabolismo energético durante a embriogênese em carrapatos mostra que a embriogênese do *R. microplus* pode ser dividida, metabolicamente, em duas etapas principais: Uma fase inicial, até a celularização (formação do blastoderma celular), onde o metabolismo é basicamente glicolítico, sendo o glicogênio o principal combustível metabólico e a segunda fase, após a celularização, caracterizada por uma intensa degradação de aminoácidos, provocando um acúmulo de glicose e glicogênio nestes ovos. O conjunto de nossos resultados nos faz acreditar que há um importante mecanismo de controle da mobilização e síntese das principais reservas desses embriões e que uma alteração ou intervenção neste processo pode provocar sérios danos ao carrapato possibilitando, assim, o controle deste organismo.

A triose fosfato isomerase (TIM) é uma importante enzima da via glicolítica que catalisa a isomerização reversível de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a gliceraldeído 3-fosfato (G3-P). O mecanismo de catálise desta reação envolve três resíduos que participam do sítio ativo e são essenciais para catálise: Glu 167, localizado no extremo amino da folha- $\beta$ 6, no qual seu grupamento carboxílico atua como base retirando um próton do substrato; a His 95 que está localizada no extremo amino da folha- $\beta$ 4\*, cujo anel imidazólico atua como eletrófilo polarizando o grupo carbonílico do substrato, permitindo sua enolização e por último a lys 13 que está localizada no extremo amino da folha- $\beta$ 1, sendo responsável pela especificidade da enzima pelo seu substrato.

A maior parte das TIMs descritas são homodímeros com peso molecular de aproximadamente 27 kDa por subunidade. No entanto, em *Pyrococcus woesi* é um tetrâmero e em *Thermotoga maritima* é uma parte do produto de fusão com a fosfoglicerato quinase. Todas as TIMs são da família das

proteínas barril  $\alpha / \beta$ , onde cada monômero tem como característica principal ser formado por 8 folhas- $\beta$  unidas a 8  $\alpha$ -hélices por loops.

5 A interfase ocupa uma grande porção do dímero, aproximadamente 1476 Å; com o loop 3 ocupando uma função central interligando os monômeros. Devido a este fato, os aminoácidos que formam esta região são extremamente importantes na estabilidade da TIM e conseqüentemente são alvos em potencial para o desenho de drogas como mecanismos  
10 de inibição seletiva desta enzima. Outro importante ponto para inibição é a região próxima ao sítio ativo.

A possibilidade do uso de resíduos não conservados de aminoácidos para produzir inibição seletiva de enzimas homólogas de diferentes espécies tem sido amplamente  
15 explorado com a TIM. Este mecanismo está baseado na reação de drogas com aminoácidos específicos que não se conservaram durante a evolução possibilitando inibição espécie específica da enzima. O efeito do composto p-toluenotiosulfonato (DTNB) que reage com cisteínas  
20 estruturalmente expostas foi estudado em diferentes espécies. Esta droga não inibe as TIMs de *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*, mas inibem as TIMs de galinha e de *Schizosaccharomyces pombe* por terem uma cisteína na posição 217 que as tornam mais susceptíveis a  
25 ação da droga devido a maior exposição estrutural deste resíduo nestas espécies.

Outro resíduo bastante explorado é o aminoácido 14, que está localizado no loop 3 tendo função central na estabilidade da TIM. Este resíduo não é conservado e varia  
30 em diferentes espécies: em humano e coelho temos uma metionina nesta posição; em levedura uma leucina e em *T. cruzi* uma cisteína. Esta modificação neste resíduo entre espécies tem sido usado com sucesso para inibir a TIM de *T. cruzi* sem inibir a TIM de humano. O mecanismo de inibição

baseia-se na reação específica entre drogas com a cys 14 do *T. cruzi* provocando alteração estrutural de sua TIM e consequentemente perda da função biológica.

Atualmente se conhece a estrutura cristalográfica de 5 15 TIMs, incluindo mutantes e complexos com ligantes, sendo cinco de parasitas (endoparasitos) e uma de ectoparasito (*R. microplus*). A principal característica desta TIM de carrapato (rBmTIM) é o maior número de resíduos de cisteínas (resíduo alvo para desenho de drogas para 10 inibição da TIM) já descrito em todas as espécies até o momento.

Dentro do contexto de inibição seletiva da TIM usando resíduos de cisteínas como alvo, a rBmTIM não possui cisteína 14. Entretanto, em sua composição apresenta outros 15 nove resíduos de cisteína por monômero a serem explorados. Estes resíduos são cisteína 7, 25, 43, 51, 66, 86, 126, 143 e 217. A resolução da estrutura cristalina da rBmTIM mostra que os resíduos 43 e 51, que estão mais próximos entre si, não fazem pontes dissulfetos e as distâncias entre eles é 20 de 3.4 Å e 3.55 Å nos monômeros A e B, respectivamente.

A comparação entre a estrutura tridimensional do monômero da rBmTIM e do monômero da TIM de *Bos taurus*, indica que os resíduos de cisteína 43, 66, 126 e 217 têm um resíduo correspondente e que os resíduos 7, 25, 51, 86 e 25 143 são não-conservados na rBmTIM. Este fato possibilita que estes resíduos sejam utilizados como alvo para inibição da TIM do parasito *R. microplus* sem inibir a TIM do seu hospedeiro.

Recentemente plasmídeos contendo o gene da TIM de 30 *Schistosoma japonicum* foi usado como vacina em suínos, sendo capaz de proteger contra desafios da infecção do parasita. Neste estudo foi mostrado que esta vacina reduz em 43,8 % o número de vermes totais, 53,6 % o numero de

vermes fêmeas e 54 % o número de ovos no fígado além de diminuir as patologias hepáticas associados aos ovos.

A TIM é uma das enzimas mais estudadas, desde suas características cinéticas e físico-químicas à elucidação de sua estrutura em diversos organismos. No entanto, não há trabalhos na literatura que descreva estas características em artrópodes, como o carrapato bovino *Boophilus microplus* ou mosquitos, como o *Aedes Aegypt* e o *Anopheles gambiae*. Estas espécies estão envolvidas na transmissão de doenças como babesiose e erlichiose, no caso do carrapato e dengue e malária, no caso dos mosquitos. Isto os torna ótimos alvos para o estudo da TIMs e possivelmente o desenho de drogas inibidoras e/ou vacinas contra estes vetores.

A clonagem da região codificadora da TIM foi realizada utilizando a técnica de PCR. Para a clonagem oligonucleotídeos baseado em regiões carboxi terminal e amino terminal da TIM foram utilizados na reação de PCR para amplificar a seqüência do cDNA da TIM de ovos de *B. microplus*. O produto do PCR correspondeu a um fragmento de 780 bp, referente a seqüência do cDNA da TIM foi purificado a partir banda de gel de agarose. O fragmento foi clonado no vetor pGEM-TEasy e bactérias *E. coli* (linhagem DH5 $\alpha$ ) foram transformadas com o plasmídeo resultante. O plasmídeo recombinante foi extraído através do miniprep e obtido a seqüência de ácidos nucléicos determinada. A seqüência de aminoácidos preditos da TIM de *B. microplus* foi verificada por análise comparativa com seqüências da TIM obtidas no GenBank.

A seguir foram projetados oligonucleotídeos para que a região codificadora da TIM-Bm fosse clonada no vetor de expressão pET5a, utilizando como enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*. A partir da construção pGEM-Teasy-TIM foi realizado um PCR com Taq DNA Polimerase. Diferentes condições de reação foram testadas e a que resultou na

amplificação do inserto de 750 pb. O inserto amplificado foi purificado e hidrolisado, juntamente com o vetor, com as enzimas de restrição *NdeI* 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 pET5a-TIM.

As bactérias *E.coli* linhagem DH5 $\alpha$  foram transformadas com a construção resultante (pET5a-TIM) pelo método de eletroporação. Das colônias bacterianas transformantes obtidas, uma colônia isolada foi inoculada em 1,5 mL de LB contendo ampicilina (50 mg/mL) e crescida por 16 horas a 37°C sob agitação constante. O plasmídeo recombinante foi extraído através do miniprep e obtido a seqüência de ácidos nucléicos determinada.

As bactérias *E. coli* linhagem AD494 DE pLysS foram transformadas por eletroporação para inserção do plasmídeo recombinante pET5a-TIM. As bactérias transformadas foram plaqueadas em placa contendo ágar LB e antibiótico ampicilina (50 mg/mL) 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  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e crescida 18 horas a 37°C sob agitação de 180 rpm. Após o cultivo, as células foram coletadas por centrifugação a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e ressuspendidas em meio novo com 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 0,8 no comprimento de onda de 600 nm. Para indução da expressão da proteína, foi adicionado isopropiltio- $\beta$ -D-galactosídeo (IPTG) na concentração final de 1 mM e o cultivo incubado por 18 horas a 25°C. As células cultivadas foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e o sedimento ressuspenso em tampão fosfato de sódio 10 mM, acrescido de 300 mM de NaCl, pH 6,5. Para lisar as células,

essas foram congeladas e descongeladas 3 vezes e sonicadas 5 vezes com ultra-som por 30 s, com intervalos de 1 minuto e amplitude de 40 Mhz. As frações solúvel e insolúvel foram separadas por centrifugação a 10.000 g por 10 minutos a 5 4°C.

O sobrenadante do lisado das células com foi submetido à cromatografia de afinidade por níquel em resina sepharose-Ni<sup>2+</sup> previamente equilibrada com tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 60 mM, pH 7,4. Após a 10 aplicação da amostra, seguiu-se um teste de eluição onde utilizou-se um gradiente de imidazol para obtenção da proteína TIM-Bm eluída.

A sequência deduzida da TIM-Bm contém 249 aminoácidos, com massa molecular predita de 27,188 kDa por subunidade e 15 ponto isoelétrico predito de 8,69 e possui domínios característicos da superfamília das proteínas TIM. A análise da sua sequência ainda mostra que esta proteína apresenta nove resíduos de cisteína por monômero, o maior teor deste resíduo em todas as TIMs conhecidas . O grau de 20 identidade da TIM-Bm com a TIM de bovino da espécie *Bos taurus* é de 66,3%. A comparação entre o monômero da rTIM-Bm com o monômero da TIM de *Bos taurus* e mostrou que o posicionamento espacial das cisteínas é peculiar na rTIM-Bm, os resíduos de cisteína 43, 66, 126 e 217 da rTIM-Bm 25 têm resíduos correspondentes na TIM de bovino e que os resíduos 7, 25, 51, 86 e 143 são resíduos não conservados, presentes exclusivamente na rTIM-Bm. O uso de agentes derivatizantes de cisteínas, DTNB e MMTS, provocaram inibição de até 70 % da atividade da enzima rTIM-Bm, 30 mostrando a viabilidade do desenvolvimento de inibidores específicos desta enzima em carrapato.

Camundongos receberam por via intraperitonal inoculação de TIM emulsificada com adjuvante completo de Freund. O animal cujo soro apresentou, no teste de ELISA,

anticorpos anti-TIM foi sacrificado para obtenção de células esplênicas para realização da fusão celular. Células SP2/0-G14 foram fusionadas com esplenócitos para obtenção de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-TIM.

A capacidade de interferência dos anticorpos monoclonais anti-TIM recombinante na atividade da TIM nativa foi testada nos diferentes tecidos de teleóquina: corpo gorduroso, ovário e intestino. Os tecidos foram incubados com duas diferentes concentrações de cada mAb, ou quando controle, incubados sem anticorpo ou com um anticorpo não relacionado.

Foi possível observar que os dois mAbs produzidos contra a enzima recombinante tem a capacidade de reconhecer a enzima nativa e também de inibir sua atividade. A maior capacidade de interferência ocorreu no ovário, com uma inibição de 81%, seguida do corpo gorduroso (74%) e intestino (48%) e foi alcançada pelo mAb BrBm38. Já o mAb BrBm37 conseguiu inibir a atividade da TIM no ovário em 28,5%, no corpo gorduroso em 56% e no intestino em 23.9%. A incubação dos tecidos com um anticorpo não relacionado não interferiu na atividade desta enzima.

A linhagem BME26 é uma linhagem celular derivada de células embrionárias do *R. microplus*. A viabilidade celular desta linhagem na presença dos mAbs BrBm37 e BrBm38 foi testada através da adição destes anticorpos ao meio de cultura das células, e a sua proliferação celular foi avaliada no período uma semana. Como controle as células foram cultivadas na ausência dos mAbs e também na presença de um anticorpo monoclonal não relacionado na mesma concentração dos mAbs BrBm37 e BrBm38. Cada poço de cultura recebeu 50µg do respectivo mAb dissolvidos em 50µL de PBS, ou no caso do controle sem anticorpo, 50µL de PBS. Após sete dias de cultura celular na presença dos mAbs a

contagem das células foi de  $47,3 \pm 5,5$  células  $\times 10^4$  por mL de meio de cultura no grupo controle, foi de  $25,33 \pm 0,57$  ( $p=0,008$ ), no grupo mAb BrBm37,  $6,8 \pm 2,2$  ( $p>0,001$ ) no grupo do mAb BrBm38 e no grupo do anticorpo não relacionado (OC3) foi de  $49,3 \pm 5,1$ .

A capacidade de anticorpos inibirem a atividade da TIM isolada ou presente em células em cultivo permite caracterizar a TIM como um antígeno com potencial vacinal para o desenvolvimento de uma vacina contra o carrapato bovino.

## LISTAGENS DAS SEQUÊNCIAS

## 1) Informações Gerais do Pedido de Patente

Dados do Requerente:

Nome: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

5      Endereço completo: Rua Sarmento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90050-170

    Título da invenção: Composição de triose fosfato isomerase ou peptídeos derivados

    Número de seqüências constantes do pedido: 1 (uma)

10

## 2) Informações Gerais da Seqüências

Número identificador: Seq. ID n°: 01

a) tamanho: 249 aminoácidos

b) Tipo: Proteína

15

Características da molécula seqüenciada:

a) Tipo: Proteína

b) Nome: TIM-Bm

Outras informações relevantes

Fonte original da molécula: ovo do carrapato Boophilus

20 microplus

Atividade enzimática: triose fosfato isomerase

Descrição da seqüência SEQ ID NO: 1

25      001 Met Ala Ala Arg Arg Phe Cys Val Gly Gly Asn Trp Lys 013

    014 Met His Gly Ser Lys Asn Ser Ile Arg Asp Ile Cys Asn 026

    027 Thr Leu Lys Gly Ala Ser Leu Asp Pro Asn Val Glu Val 039

30      040 Ile Val Ala Cys Pro Ala Pro Tyr Leu Asp Tyr Cys Arg 052

    053 Ser Leu Leu Pro Pro Ser Val Ala Leu Ala Ala Gln Asn 065

35      066 Cys Tyr Lys Val Glu Gln Gly Ala Phe Thr Gly Glu Ile 078

    079 Ser Pro Gly Met Ile Lys Asp Cys Gly Gly Gln Trp Val 091

    092 Ile Leu Gly His Ser Glu Arg Arg His Val Phe Lys Glu 104

40      105 Asp Asp Val Leu Ile Gly Glu Lys Ile Lys His Ala Leu 117

118 Glu Ser Gly Leu Asn Val Ile Ala Cys Ile Gly Glu Leu 130  
131 Leu Glu Asp Arg Glu Ala Gly Arg Thr Glu Glu Val Cys 143  
5 144 Phe Arg Gln Ile Lys His Ile Ala Ser Asn Val Lys Asp 156  
157 Trp Ser Lys Val Val Ile Ala Tyr Glu Pro Val Trp Ala 169  
10 170 Ile Gly Thr Gly Lys Thr Ala Thr Pro Asp Gln Ala Gln 182  
183 Glu Val His Ser Lys Val Arg Asn Trp Leu Ser Thr Asn 195  
196 Val Ser Ala Asp Val Ala Ser Lys Val Arg Ile Gln Tyr 208  
15 209 Gly Gly Ser Val Asn Ala Gly Asn Cys Lys Glu Leu Gly 221  
222 Arg Lys Pro Asp Ile Asp Gly Phe Leu Val Gly Gly Ala 234  
20 235 Ser Leu Lys Pro Glu Phe Val Gln Ile Ile Asn Ala Met 247  
248 Gln Gly 249

**REIVINDICAÇÕES**

1. "Composição de triose fosfato isomerase ou peptídeos derivados", caracterizada por compreender um ou mais antígenos de triose fosfato isomerase selecionados dentre aqueles que apresentam a sequência de aminoácidos SEQ ID NO:1, tendo pesos moleculares de 27kDa e um adjuvante oleoso ou metálico, em um veículo fisiologicamente aceitável.  
5
2. "Composição de triose fosfato isomerase ou peptídeos derivados" de acordo com a reivindicação 1 caracterizada pelo fato das proteínas terem pelo menos, 80% de identidade para a sequência definida pela SEQ ID NO:1.  
10
3. "Composição de triose fosfato isomerase ou peptídeos derivados" de acordo com a reivindicação 1 caracterizada pelo fato das proteínas estarem em uma concentração de 0,01 a 5,0 mg/ml.  
15

**RESUMO****COMPOSIÇÃO DE TRIOSE FOSFATO ISOMERASE OU PEPTÍDEOS****DERIVADOS**

5 "Composição de triose fosfato isomerase ou peptídeos  
derivados", caracterizada como uma vacina contra o  
carrapato bovino contendo uma triose fosfato isomerase  
encontrada, principalmente, no embrião, produzida a partir  
de partes do antígeno obtido por extração e cromatografia  
10 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. O uso de anticorpos para a triose fosfato  
isomerase resultou na inibição da atividade enzimática da  
15 proteína TIM recombinante e da proteína TIM presente em  
órgãos do carrapato, e em redução da viabilidade de  
~~linhagem celular de embrião de carrapato, 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.