



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

(21) **PI0701760-0 A2**



* B R P I 0 7 0 1 7 6 0 A 2 *

(22) Data de Depósito: 18/07/2007
(43) Data da Publicação: 03/03/2009
(RPI 1991)

(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/385 (2009.01)
C07K 14/435 (2009.01)

(54) **Título: CISTEÍNO PROTEASE OU PEPTÍDEOS DERIVADOS UTILIZADOS PARA IMUNIZAÇÃO CONTRA O CARRAPATO**

(73) **Titular(es):** Adriana Seixas, Aoi Masuda, Carlos Termignoni, Itabajara da Silva Vaz Junior

(72) **Inventor(es):** Adriana Seixas, Aoi Masuda, Carlos Termignoni, Itabajara da Silva Vaz Junior

(57) **Resumo:** Cisteino protease ou peptídeos derivados utilizados para imunização contra o carrapato. Caracterizada como uma vacina contra o carrapato bovino contendo uma cisteino protease encontrada, principalmente, no ovo, obtida por extração e cromatografia de ovos, larvas e qualquer outro estágio, tecidos e/ou fluidos de carrapatos, por extração e cromatografia de órgãos de carrapatos ou produzidos em outros organismos por meio de técnicas de DNA recombinante. O uso da proteína como imunógeno em bovino resultou em redução da viabilidade dos carrapatos 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.



PI0701760

"Cisteína protease ou peptídeos derivados utilizados para imunização contra o carrapato".

Refere-se o presente invento ao isolamento, caracterização e uso como antígeno vacinal de uma proteína do carrapato bovino, *Boophilus microplus*. A proteína isolada, denominada VTDC, é uma cisteína protease encontrada, principalmente, no ovo. O uso da proteína como imunógeno em bovinos resulta em redução da viabilidade dos carrapatos, de forma que a proteína ou peptídeos dela derivados, obtida por extração e cromatografia de ovos, larvas e qualquer outro estágio, tecidos e/ou fluídos de carrapatos, por extração e cromatografia de órgãos de carrapatos, produzida por síntese química 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.

As perdas econômicas causadas pelo *B. microplus* são estimadas em quase 1 bilhão de dólares norte-americanos ao ano no Brasil, quando contabilizados a queda na produção de carne e leite, a mortalidade, a redução da natalidade, os gastos no seu controle e os prejuízos decorrentes da transmissão dos protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* e da riquetsia *Anaplasma marginale*, agentes que causam a Tristeza Parasitária Bovina.

A possibilidade do uso de vacinas para o controle de parasitas tem sido alvo de estudos, especialmente no que se

refere a *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, *Polyplax serrata*, *Stomoxys calcitrans*, *B. microplus* e *Amblyomma americanum*. No caso do carrapato *B. microplus*, as propostas para o desenvolvimento de vacinas têm por base o fato de que, após repetidas infestações, bovinos desenvolvem certo grau de resistência a novas infestações. O uso de vacinas contornaria o problema da resistência a drogas e ainda reduziria a possibilidade da presença de resíduos no leite e na carne.

Os trabalhos de desenvolvimento de vacinas contra *B. microplus* tiveram grande avanço com o achado de que a inoculação de uma fração purificada obtida de fêmeas parcialmente ingurgitadas era capaz de provocar diminuição no número de carrapatos que completavam o ciclo no bovino. Um antígeno presente nessa fração antigênica foi purificado e identificado como sendo uma glicoproteína de massa molecular de 89 KDa ligada à membrana. Essa proteína antigênica foi denominada Bm86. O gene da Bm86 foi clonado e expresso em *Escherichia coli*, *Aspergillus nidulans* e *A. niger*.

A proteína Bm86 é a base de duas vacinas comerciais lançadas no mercado. Essas vacinas, embora baseadas na proteína Bm86, utilizam proteínas de fusão diferentes, a proteína da TickGard[®] é obtida em *E. Coli* e a da Gavac[®] em *Pichia pastoris*. Essas vacinas, entretanto, não asseguram o grau de proteção necessário para suprimir o uso de acaricidas. Portanto, até que sejam descobertos novos

antígenos capazes de aumentar o grau de proteção, essas vacinas parecem servir apenas para aumentar o intervalo entre os tratamentos com acaricidas.

Baseados em observações que a vacinação com material purificado de carrapato contendo outros componentes, além da Bm86, induz uma proteção mais eficiente que aquela obtida somente pela vacinação com Bm86 foi possível purificar, de fêmeas adultas semi-ingurgitadas de *B. microplus*, outra proteína, denominada Bm91, com capacidade imunoprotetora. A Bm91 recombinante é capaz de aumentar a proteção induzida pela vacinação com a Bm86 recombinante. Apesar do aumento ser pequeno, a resposta produzida contra a Bm91 não interfere na resposta contra a Bm86, indicando a possibilidade do uso de uma vacina poliantigênica.

No Brasil, pesquisadores do Centro de Biotecnologia e da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em associação com pesquisadores do Departamento de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro isolaram, a partir de ovos de *B. microplus*, uma glicolipoproteína de 50 KDa, denominada BYC - "Boophilus Yolk pro-Cathepsin". A resposta imune induzida pela BYC afetou o desenvolvimento dos carrapatos que infestaram os bovinos imunizados. A THAP outra protease aspártica composta de dois peptídeos de massas moleculares de, aproximadamente, 32 KDa e 37 KDa, purificada de ovos de *B. microplus*, também foi capaz de desenvolver uma resposta imune em bovinos e

afetar os carrapatos que infestaram esses bovinos imunizados. Apesar do fato de que tanto a BYC como a THAP são aspartico proteases(ou precursores)encontradas no ovo do carrapato, a possibilidade de que as duas sejam o mesmo antígeno pode ser
5 descartada, uma vez que anticorpos policlonais contra THAP não reconhecem BYC em ensaio do tipo Western Blot. De outro lado, o experimento inverso, empregando o mesmo ensaio utilizando anticorpos policlonais contra BYC mostrou ausência de reatividade cruzada contra THAP, confirmando que se tratam
10 de antígenos distintos. Já a VTDCE, alvo desta patente, também presente em ovos de *B. microplus*, difere destas duas enzimas (BYC e THAP) por inúmeras características moleculares e funcionais, pertencendo a uma classe distinta de proteases: cisteíno proteases.

15 A utilização dos modelos matemáticos permitem inferir o impacto que o uso de uma vacina teria sobre populações de *B. microplus* e assim podem auxiliar na decisão quanto as estratégias a serem utilizadas para o controle do carrapato. Além disso, a obtenção de novos antígenos que possam
20 funcionar como alternativa e/ou complementar a ação daqueles já descritos constitui avanço importante no desenvolvimento de vacinas eficazes.

O antígeno isolado é uma proteína relativamente abundante no ovo do *B. microplus* e presente na hemolinfa e em outros
25 tecidos, incluindo ovário, e intestino.

A cisteíno proteinase de *B. microplus* (VTDCE) foi purificada a partir de ovos, por meio de duas cromatografias de troca aniônica em pH neutro e ácido, cromatografia de gel filtração e uma etapa de autólise. Para a purificação, ovos foram homogeneizados, o homogenizado foi centrifugado e filtrado através de uma sequência de filtros (AP20, 0,22 e 0,45 μm). A fase protéica solúvel foi aplicada em uma coluna de troca aniônica em resina Mono-Q (ou HiTrap-Q ou similares) equilibrada em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0 e eluída com gradiente de fosfato de sódio 10 mM contendo de 0 a 0,8 M de NaCl. As frações contendo VTDCE foram concentradas acidificadas com ácido cítrico (1 M) até pH 3,5-4,0 e incubadas a 37° C por aproximadamente 3 horas. A amostra foi centrifugada a 3000 g e o sobrenadante concentrado até 200 μl e aplicado em coluna de gel filtração Superdex-75 previamente equilibrada em tampão acetato de sódio 10 mM pH 4,0. As frações contendo VTDCE foram reunidas e aplicadas em coluna de troca aniônica (mono-Q) equilibrada em tampão acetato de sódio 10 mM pH 4,0 e eluída com um gradiente de 0 a 0,8 M de NaCl em tampão acetato de sódio 10 mM pH 4,0. A proteína purificada foi dialisada contra água e concentrada.

A protease foi encontrada na forma de dois peptídeos de massas moleculares de, aproximadamente, 22 KDa e 17 KDa, correspondentes a duas subunidades da mesma proteína. Por degradação automatizada de Edman em um microsequenciador de

aminoácidos Perkin-Elmer Corporation, foi identificada a seqüência de aminoácidos VDDPDIIAFDDVCLKGILMRRVREKA presente na proteína, podendo apresentar variantes com a substituição de um ou mais aminoácidos.

5 Foi observado que, em pH ácido, a VTDCE apresenta alta atividade proteolítica contra vitelina e outros substratos sintéticos, como N-Cbz-Phe-Arg-MCA, sendo essa atividade inibida pela presença de E-64 (L-trans-epoxisucinil-L-leucilamido(4-guanidino)-butano) indicando tratar-se de uma
10 cisteíno protease.

Por SDS-PAGE e western-blot, foi observada a presença de VTDCE durante toda embriogênese do carrapato e durante o desenvolvimento larval, assim como na hemolinfa, o que indica um sítio de síntese extra ovariano. A presença da VTDCE foi
15 também observada em diferentes órgãos do carrapato (aparelho digestivo, ovário, corpo gorduroso, glândula salivar e singânglio).

A VTDCE além da alta capacidade de hidrolisar vitelina, a principal proteína de reserva do carrapato, apresenta-se
20 associada a esta proteína o que foi comprovado por ensaios usando a enzima marcada com iodo radioativo. Essa associação pode ser rompida por incubação em pH ácido, quando a VT é hidrolisada e libera a enzima livre.

Para testar a capacidade da VTDCE de induzir uma resposta
25 imunológica protetora, bovinos com idade de 14 meses foram inoculados por via intramuscular por 5 vezes com intervalos

de 10 dias entre cada inoculação com 100 µg de VTDCE suspensa no adjuvante Montanide. Após 10 dias da última inoculação os 4 bovinos imunizados e 4 bovinos controles (inoculados apenas com o adjuvante em PBS) foram infestados com 20.000 larvas de *B. microplus*. Os animais foram mantidos em baias individuais e os carrapatos que completavam o ciclo biológico no hospedeiro eram coletados, contados e pesados. Uma amostra de 5 g de fêmeas ingurgitadas, obtidas de cada bovino, foram mantidas em estufa a 28° C com 85% de umidade relativa do ar para realizarem a postura, a massa de ovos posta foi pesada e os ovos incubados, após o final da eclosão as larvas foram separadas e pesadas.

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

15 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;

20 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 25 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 da postura de todas as fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo nos bovinos vacinados e o peso médio da postura de todas as 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 de ovos férteis obtidos de 5,0 gramas de ovos provenientes de fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo em animais vacinados e a média da soma do peso de ovos férteis obtidos de 5,0 gramas de ovos provenientes de fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo 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. A eficiência do antígeno, calculada com base na definição acima e nos dados apresentados na tabela 1 foi de 23% quando os bovinos foram desafiados com 20000 larvas de *Boophilus microplus*.

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

Grupo	Animal	Número de carrapatos (n)	Índice	
			Capacidade de postura ^b	Fertilidade dos ovos ^c
Controle	361	2415	0,415	0,330
	362	1915	0,399	0,320
	367	1198	0,433	0,286
	368	3245	0,402	0,309
	Média ±DP		2193 861	0,410 0,020
Vacinado	369	2019	0,400	0,294
	370	1584	0,407	0,357
	383	1303	0,404	0,276
	384	2586	0,388	0,258
	Média ±DP		1873 559	0,400 0,010
Diferença (%) ^a		14,6	3,06	4,81

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

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

c) Proporção entre peso dos ovos férteis e peso dos ovos.

D.P. = Desvio Padrão.

REIVINDICAÇÃO

1. "Cisteíno protease ou peptídeos dela derivados para imunização contra o carrapato", caracterizada pela administração à bovinos, em qualquer dosagem da mistura, de
5 antígeno ou de mistura de antígenos contendo cisteíno protease, inclusive seus variantes, e/ou contendo peptídeos derivados desta proteína, denominada VTDCE ("Vitellin Degrading Cysteine Endopeptidase"), do carrapato bovino, *Boophilus microplus*, pelo uso da proteína inteira e ou de
10 partes dela, quer estes antígenos ou partes deles tenham sido obtidos por extração e purificação de ovos, larvas e qualquer outro estágio, tecidos e/ou fluídos de carrapatos, por extração e purificação de órgãos de carrapatos ou produzidos por síntese química ou produzidos em outros organismos por
15 meio de técnicas de DNA recombinante.

RESUMO

"Cisteíno protease ou peptídeos derivados utilizados para imunização contra o carrapato", caracterizada como uma vacina contra o carrapato bovino contendo uma cisteíno protease encontrada, principalmente, no ovo, obtida por extração e cromatografia de ovos, larvas e qualquer outro estágio, tecidos e/ou fluídos de carrapatos, por extração e cromatografia de órgãos de carrapatos ou produzidos em outros organismos por meio de técnicas de DNA recombinante. O uso da proteína como imunógeno em bovino resultou em redução da viabilidade dos carrapatos 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.