



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 102015017673-2 B1



(22) Data do Depósito: 24/07/2015

(45) Data de Concessão: 29/06/2021

---

(54) **Título:** VACINA CONTRA O CARRAPATO BOVINO CONTENDO DUAS PROTEÍNAS OU PEPTÍDEOS DERIVADOS

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

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA; UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE; INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA; UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.

(72) **Inventor(es):** ITABAJARA DA SILVA VAZ JUNIOR; URUGUAYSITO BENAVIDES PERALTA; ADRIANA SEIXAS; ANA CAROLINA ACEVEDO DA ROSA; LUCAS TIRLONI; GABRIELA ALVES SABADIN; MARÍA FERNANDA ALZUGARAY; LUÍS FERNANDO PARIZI; JACQUELINE MAISONNAVE; MONICA PATRICIA BERASAIN; MARIA ANGÉLICA SOLARI; ULISES CUORE.

(57) **Resumo:** Vacina contra o carrapato bovino contendo duas proteínas ou peptídeos derivados, caracterizada pelo isolamento de dois antígenos de carrapato bovino, *Rhipicephalus microplus*. Estes antígenos, as proteínas Bm05 e Bm86uy, são isolados de tecidos de carrapato e caracterizadas por compreender das sequências de aminoácidos SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2, não têm funções biológicas conhecidas. O uso destas proteínas obtidas por purificação a partir de tecidos de carrapato, síntese química ou produzida em outros organismos por meio de técnicas de DNA recombinante, em bovinos, como imunógeno é capaz de gerar resposta protetora contra carrapatos de forma que os antígenos podem ser utilizados como vacinas para prevenir a infestação, isoladamente ou em conjunto com outros antígenos.

VACINA CONTRA O CARRAPATO BOVINO CONTENDO DUAS PROTEÍNAS OU  
PEPTÍDEOS DERIVADOS

[001] Refere-se o presente invento a identificação e caracterização de dois antígenos do carrapato bovino, *Rhipicephalus microplus*. Os antígenos isolados, denominados Bm05 e Bm86uy, caracterizados por compreender das sequências de aminoácidos SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2, não têm funções biológicas conhecidas. O uso deste antígeno como imunógeno em bovinos é capaz de induzir uma resposta imunológica, de forma que os antígenos podem ser utilizados como vacina para prevenir a infestação, isoladamente ou em conjunto com outros antígenos já descritos ou a serem descritos.

[002] 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 microplus* é o mais importante ectoparasita dos rebanhos bovinos do estado do Rio Grando do Sul, causando diversos danos no couro devido à reação inflamatória no local de fixação do carrapato e queda na produção de leite e carne, principal fonte de proteína consumida no país.

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

dessa estratégia é dependente da identificação dos genes e caracterização de moléculas fisiológicas funcionais do carrapato. Testes de imunização com diferentes antígenos do parasita fornecem evidências de que o controle destes 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.

[004] A viabilidade do uso de vacina contra o carrapato foi reforçada com a constatação de que anticorpos funcionais, presentes no sangue de bovinos imunizados, também são encontrados na hemolinfa dos carrapatos alimentados nesses bovinos. Entretanto, a pesquisa de antígenos com potencial protetor constitui um grande desafio para o desenvolvimento de uma vacina, sendo o objeto de estudo de vários grupos de pesquisa. A eficácia das vacinas comerciais que usam a Bm86, uma proteína de intestino do *R. microplus* identificada por um grupo de pesquisa australiano, varia entre 51% e 91%, dependendo das características da população de carrapato e da condição nutricional dos bovinos. Foi sugerido que a variação de eficácia observada entre diferentes regiões do mundo seja decorrente de variações na sequência da Bm86 entre diferentes cepas de *R. microplus*. Análises de populações de carrapatos da Argentina mostraram polimorfismos no gene da Bm86 que

resultam em uma proteína solúvel, em vez da proteína de membrana detectada em carrapatos da Austrália e de Cuba, tornando estes carrapatos resistentes ao efeito da vacinação. Para contornar essa resistência, uma nova vacina recombinante foi produzida baseada no gene da Bm95 (homólogo ao da Bm86). Esta vacina mostrou-se eficaz para proteger os bovinos de infestações, tanto de carrapatos da Argentina como de Cuba. Posteriormente, a partir de análise da Bm86 e da avaliação *in silico* de algumas propriedades da proteína, como o potencial hidrofóbico e hidrofílico, foram desenvolvidos peptídeos sintéticos derivados dessa glicoproteína. Estes peptídeos, usados como antígenos vacinais em bovinos, apresentaram uma eficácia entre 81% e 35%.

[005] Devido ao fato de formulações utilizando-se a Bm86 como antígeno vacinal nem sempre conferirem níveis de proteções adequadas para o controle do *R. microplus*, diversos grupos de pesquisa vêm tentando identificar novos candidatos a antígenos para o controle desse e de outros carrapatos. Conseqüentemente, outras proteínas com potencial vacinal que estimulam o sistema imune do hospedeiro a interferir em diversas etapas do ciclo de vida do carrapato têm sido descritas. Diversos grupos vêm isolando e caracterizando proteínas de carrapatos presentes em diferentes vias metabólicas que, quando utilizadas como imunógenos vacinais,

induziram proteção contra a infestação por *R. microplus*. Análises de populações de carrapatos do Uruguai e Brasil mostraram a presença de polimorfismos no gene da Bm86 em isolados do Uruguai e Brasil, inclusive em regiões que foram consideradas importantes para desenvolvimento de imunoproteção. Com o objetivo de contornar a baixa eficácia de vacinas baseadas em Bm86, nosso grupo de pesquisa isolou a região codificante do gene de Bm86 de isolados do Uruguai e produziu a proteína recombinante Bm86uy, correspondente ao gene presente nestes isolados.

[006] Uma proteína sem função biológica conhecida, Hq05, foi descrita em *Haemaphysalis qinghaiensis*. Ela foi capaz de induzir uma resposta imune protetora em coelhos contra infestação de carrapato. Quando comparado, a sequência de aminoácidos de Hq05 está relacionada com uma sequência isolada do *Boophilus annulatus* (Ba05) com que tem um elevado grau de similaridade. Análises posteriores, mostraram a presença de proteínas similares em *Hyalomma dromedarii* e *Rhipicephalus* sp com um peso molecular semelhante ao obtido em *B. annulatus*, sugerindo que o gene Ba05 é conservado entre as espécies. A proteína recombinante do carrapato *Haemaphysalis qinghaiensis* (rHq05) foi usada para imunizar ovelhas. A vacinação de ovelhas com rHq05 levou a uma proteção imunológica, que resultou em uma redução de 40% do

número de ovos postos pelos carrapatos em comparação com o grupo de controle. Estes resultados mostraram que rHq05 poderia ser um bom candidato para uma vacina contra carrapatos. Recentemente, nosso grupo de pesquisa detectou a presença de uma proteína homóloga (Bm05) no carrapato *R. microplus*. A proteína recombinante Bm05 foi expressa em larga escala, purificada e caracterizada. A Bm05 tem um elevado grau de conservação com outras proteínas similares a Hq05, o que a torna uma candidata interessante no que diz respeito ao desenvolvimento de uma vacina com ação para várias espécies de carrapatos. A Bm05 também foi usada para um ensaio de vacinação em bovinos usando Bm05 e Bm86uy.

[007] No entanto, mesmo com todas estas demonstrações de que a imunização pode ser um método eficiente no controle de carrapato, vacinas contra carrapatos 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 imunidade total.

[008] As clonagens das regiões codificadoras da Bm05 e Bm86uy foram realizadas utilizando as técnicas de RT-PCR. Para a clonagem, *primers* baseados em regiões conhecidas de genes de outros organismos e de *R. microplus* presentes em banco de transcritos públicos, foram utilizados na reação de PCR para amplificar as sequências codificantes das proteínas

em cDNAs de tecidos de *R. microplus*. Os produtos do PCR corresponderam a fragmentos de 513 e 1950 bp, referente as sequências codificadoras do cDNA da Bm05 e Bm86uy, respectivamente. Os fragmentos foram clonados no vetor pGEM-T, sendo posteriormente transformadas com os plasmídeos resultantes em bactérias *E. coli* (linhagem DH5 $\alpha$ ). Os plasmídeos recombinantes foram extraídos através da técnica de minipreparação e as sequências de ácidos nucléicos determinadas. As sequências de aminoácidos preditas da Bm05 e Bm86Uy de *R. microplus* foram verificadas por análise comparativa com sequências obtidas no GenBank. As clonagens das regiões codificadoras da Bm05 e Bm86uy em plasmídeos para expressão foram realizadas utilizando as técnicas de PCR. Para a clonagem, *primers* específicos para os genes foram utilizados na reação de PCR para amplificar as sequências codificantes inseridas nos plasmídeos pGEM-T. Os produtos do PCR corresponderam a fragmentos de 531 e 1968 bp, referente as sequências codificadora do cDNA da Bm05 e Bm86uy, respectivamente, e adição, ao final das sequências, de 18 nucleotídeos codificantes de 6 aminoácidos histidinas. Os fragmentos foram clonados em vetores PET e bactérias *E. coli* (linhagem DH5 $\alpha$ ) foram transformadas com os plasmídeos resultantes. Os plasmídeos recombinantes foram extraídos através da técnica de minipreparação e as sequências de

ácidos nucleicos determinadas. As sequências de aminoácidos preditas da Bm05 e Bm86uy de *R. microplus* foram verificadas por análise comparativa com sequências obtidas no GenBank.

[009] As bactérias *E. coli* linhagem TOP10 foram transformadas com as construções resultantes (pET-Bm05 e pET-Bm86uy) pelo método de eletroporação. Das colônias bacterianas transformantes obtidas, uma colônia de cada plasmídeo foi inoculada em 1,5 mL de LB contendo ampicilina e crescida por 16 horas a 37°C sob agitação constante. Os plasmídeos recombinantes foram extraídos por minipreparação e as sequências de ácidos nucleicos determinadas por sequenciamento.

[0010] As bactérias *E. coli* linhagem BL21 (DE3) e BL21 (DE3) RIL foram transformadas por eletroporação para inserção do plasmídeo recombinante pET-Bm05 e pET-Bm86uy, respectivamente. As bactérias transformadas foram cultivadas 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 ( $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) e crescida 18 horas a 37°C sob agitação de 180 rpm. Após o cultivo, as células foram coletadas por centrifugação a 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 cultivos foram incubados a

37°C sob agitação de 180 rpm até alcançarem densidade ótica de 0,6 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 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 x 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 µm 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. As proteínas recombinantes foram eluídas com tampão de

eluição (fosfato 20 mM, pH 7,4, NaCl 0,5 M, imidazol 200 mM) originando as proteínas recombinantes purificadas Bm05 e Bm86uy.

[0011] As sequências deduzidas da Bm05 e Bm86uy contém 171 e 674 aminoácidos e massas moleculares preditas de 19,1 kDa e 70 kDa, respectivamente.

[0012] Para testar a capacidade das Bm05 e Bm86uy de induzirem uma resposta imunológica protetora, bovinos com idade de 6 meses foram inoculados por via intramuscular por 3 vezes com intervalos de 10 dias entre cada inoculação. Os inóculos foram preparados com 200 µg de Bm05 e 100 µg de Bm86uy suspensas no adjuvante Montanide 888 e Marcol 52. Após 15 dias da última inoculação, os 3 bovinos imunizados e 3 bovinos controles (inoculados apenas com o adjuvante em PBS) foram infestados com 6.000 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, amostras 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 dos ovos. 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.

[0013] A eficácia dos antígenos Bm05 e Bm86uy em induzirem uma resposta imunológica protetora em bovinos foi calculada segundo a fórmula:

[0014]  $Eficácia (\%) = 100[1 - (CRT \times CRO \times CRF)]$ , onde:  
CRT: corresponde ao coeficiente de redução do número de teleóginas; CRO: corresponde ao coeficiente de redução da ovopostura e; CRF: corresponde ao coeficiente de redução da fertilidade dos ovos.

[0015] 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 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 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.

[0016] 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.

[0017] Tabela I: Resultado da vacinação de bovinos e desafio com carrapatos.

<b>GRUPO</b>	<b>CARRAPATOS (N)</b>	<b>CARRAPATOS (g)</b>	<b>POSTURA (g)</b>	<b>ECLOSÃO DE OVOS (%)</b>
<b>controle</b>				
box 5	1938	541,44	20,055	86
box 6	1988	562,04	21,275	75
box 7	1751	540,345	17,065	73
total	5677	1643,82	58,395	234
média	1892	548	19,46	78
±DP	125	12,22	2,16	0,07
<b>vacinado</b>				
box 8	254	53,278	14,021	2
box 9	736	199,754	18,498	49
box 10	356	96,795	14,84	45
total	1346	349,827	47,359	96
média	449	116	15,8	32
±DP	254	75,22	2,38	0,15
Diferença %	76,26.	78,83.	18,80.	58,97.

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 das larvas e peso dos ovos.

D.P. = Desvio Padrão.

[0018] A capacidade de anticorpos reduzirem o número e a capacidade de reprodução dos carrapatos permite caracterizar as Bm05 e Bm86uy como potenciais antígenos vacinais para o desenvolvimento de uma vacina contra o carrapato bovino.

**REIVINDICAÇÕES**

1 - "VACINA CONTRA O CARRAPATO BOVINO CONTENDO DUAS PROTEÍNAS OU PEPTÍDEOS DERIVADOS", **caracterizada por** compreender das sequências de aminoácidos SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2, um adjuvante oleoso ou metálico, em um veículo fisiologicamente aceitável, denominado Bm05-Bm86uy, do carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

2 - "VACINA CONTRA O CARRAPATO BOVINO", de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** ser a proteína obtida por purificação a partir de tecidos de carrapato, síntese química ou produzida em outros organismos por meio de técnicas de DNA recombinante

3 - "VACINA CONTRA O CARRAPATO BOVINO", de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizada pelo** fato das proteínas estarem presentes na concentração variando de 0,01 a 5,0 mg/ml

4 - "USO DE DUAS PROTEÍNAS", de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado por** ser em uma formulação de uma vacina contra o carrapato.