

INPI

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



Consulta à Base de Dados do INPI

[\[Pesquisa Base Marcas | Pesquisa Base Desenhos | Ajuda? \]](#)[» Consultar por: Base Patentes](#) | [Finalizar Sessão](#)**Depósito de pedido nacional de Patente**

(21) Nº do Pedido: PI9903530-8 A2

(22) Data do Depósito: 05/08/1999

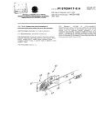
(51) Classificação: C12N 9/64 ; A61K 38/17 ; A61K 39/00

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

(71) Nome do Depositante: Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul (BR/RS)

(72) Nome do Inventor: Aoi Masuda / Carlos Jorge Logullo De Oliveira / Hatisaburo Masuda / Itabajara Da Silva Vaz Junior / João Carlos Gonzales / Marcos Henrique Ferreira Sorgine / Pedro Lagerblad De Oliveira

(74) Nome do Procurador: Raquel Santos Mauler

[Leia-me antes](#)

REIVINDICAÇÃO

1-“Composição de protease aspártica ou peptídeos derivados”,
caracterizada por compreender um ou mais antígenos de
proteases aspárticas selecionados dentre aqueles que
5 apresentam as sequências de aminoácidos SEQ ID NO:1 e SEQ ID
NO:2, nas porções amino-terminais, tendo pesos moleculares de
37 kDa e 32kDa e um adjuvante oleoso ou metálico, em um
veículo fisiologicamente aceitável

2- “Composição de protease aspártica ou peptídeos derivados”
10 de acordo com a reivindicação 1 caracterizada pelo fato das
proteínas terem nas porções amino-terminais, pelo menos, 90%
de identidade para as seqüências definidas pela SEQ ID NO:1 e
SEQ ID NO:2.

3- “Composição de protease aspártica ou peptídeos derivados”
15 de acordo com a reivindicação 1 caracterizada pelo fato das
proteínas estarem em uma concentração de 0,01 a 5,0 mg/ml.

RESUMO

"Composição de protease aspártica ou peptídeos derivados", caracterizada como uma vacina contra o carrapato bovino contendo uma protease aspártica encontrada, principalmente, no ovo, 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. 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, isoladamente ou em conjunto com outros antígenos, para prevenir a infestação por carrapatos de bovinos e outras espécies de animais.

“Composição de protease aspártica ou peptídeos derivados”.

Refere-se o presente invento ao isolamento, caracterização e uso como antígeno vacinal de uma proteína do carrapato bovino, *Boophilus microplus*. A proteína isolada, 5 denominado BAP, é uma protease aspártica encontrada, principalmente, no ovo. O uso da proteína como imunógeno em bovinos resulta em significativa redução da viabilidade dos carrapatos, de forma que a proteína ou peptídeos derivados, 10 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 15 outros antígenos já descritos ou a serem descritos.

As perdas econômicas causadas pelo *B. microplus* são estimadas em quase 1 bilhão de dólares ao ano no Brasil, quando contabilizados a queda na produção de carne e leite, a mortalidade, a redução da natalidade, os gastos no seu 20 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 25 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 resistências 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 expressado 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. Apesar do fato de que tanto a BYC como a BAP são proteases aspárticas(ou precursor) encontradas no ovo do carrapato, a possibilidade de que as duas sejam o mesmo antígeno pode ser descartada, uma vez que anticorpos

policlonais contra BAP 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 BAP, confirmando que se tratam de antígenos distintos.

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 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 em diversos tecidos, incluindo ovário e corpo gorduroso.

A proteinase aspártica de *B. microplus* (BAP) foi purificada a partir de ovos, por meio de cromatografia de troca aniônica, troca catiônica e de quelação de ácido iminodiacético carregada com cobre (IDA-Cu²⁺). Para a purificação, ovos foram homogeneizados, na presença de inibidores de proteinases e centrifugados. A fase protéica solúvel foi aplicada em uma coluna de DEAE-Toyopearl equilibrada em tampão Tris-HCl e eluída com três gradientes contínuos de 0 a 100 mM de NaCl em Tris-HCl, 100 a 300 mM de NaCl e 300 a 500 mM de NaCl. As frações com BAP foram

concentradas e aplicadas em uma coluna de SP-Toyopearl equilibrada em tampão fosfato de sódio. A amostra foi eluída com um gradiente contínuo de 0 a 210 mM de NaCl em tampão fosfato. As frações com BAP foram concentradas e aplicadas em
5 uma coluna com resina de agarose recoberta por ácido iminodiácético (IDA) equilibrada com tampão fosfato carregada com Cu^{2+} . A amostra foi eluída com um gradiente contínuo de 0 a 300 mM de glicina em tampão fosfato com 0,2 M NaCl. A proteína purificada foi dialisada contra água e concentrada.

10 A proteinase foi encontrada na forma de dois peptídeos de massas moleculares de, aproximadamente, 32 KDa e 37 KDa, correspondentes a mesma proteína com diferentes clivagens proteolíticas. As seqüências amino-terminais dos peptídeos, obtidas por degradação automatizada de Edman em um
15 microsequenciador de aminoácidos PORTON, modelo 2095, foram, respectivamente, ALGDPIPIILTNYNM QFYGIITXGXPPQ e EFALQLGWHDPXVTEIRGRALGDPI.

Foi observado que, em pH ácido, a BAP apresenta uma atividade proteolítica contra vitelina, sendo essa atividade
20 inibida pela presença de pepstatina indicando tratar-se de uma proteinase aspártica.

Pela incubação de diversos órgãos de carrapato (túbulos de Malpighi, aparelho digestivo, ovário e corpo gorduroso), dissecados de uma fêmea recém-caída do bovino, em meio de
25 cultura contendo ^{35}S -metionina, seguido de imunoprecipitação

com anticorpo específico e proteína A de *S. aureus* foi determinado que os locais de síntese da BAP são, principalmente, ovário e corpo gorduroso, sendo, entretanto, sintetizada nos outros órgãos do carrapato. Por SDS-PAGE e western-blot, foi observada a presença de BAP durante toda embriogênese e durante o desenvolvimento larval.

Para testar a capacidade da BAP de induzir uma resposta imunológica protetora, bovinos com idade de 6 meses foram inoculados por via intramuscular por 4 vezes com intervalos de 10 dias entre cada inoculação com 100 µg de BAP suspensa no adjuvante Quil A. Após 15 dias da última inoculação os 3 bovinos imunizados e 3 bovinos controles (inoculados apenas com o adjuvante) foram infestados com 30.000 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 eram colocadas e mantidas em câmara 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.

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

$$\text{eficácia (\%)} = 100[1 - (\text{CRT} \times \text{CRO} \times \text{CRF})], \text{ onde:}$$

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.

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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	Animal	Número de carrapatos (n)	Índice	
			Capacidade de postura ^b	Fertilidade dos ovos ^c
Controle	101	3352	0,472	1,00
	102	2171	0,457	1,00
	103	2030	0,426	1,00
	Média	2518	0,450	1,00
	±EP	726	0,020	0,00
Vacinado	107	1681	0,462	1,00
	108	1910	0,419	1,00
	109	2552	0,416	0,99
	Média	2048	0,430	1,00
	±EP	452	0,030	0,00
Diferença (%) ^a		18,67	4,33	0,19

5

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.

10

E.P. = Erro Padrão.

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 protease aspártica ou
peptídeos derivados

Número de seqüências constantes do pedido: 2 (duas)

10

2) Informações Gerais da Seqüências

Número identificador: Seq. ID n°: 01

a) tamanho: 25 aminoácidos

b) Tipo: Proteína

15 Características da molécula seqüenciada:

a) Tipo: Proteína

b) Nome: THAP

Outras informações relevantes

20 Fonte original da molécula: ovo do carrapato Boophilus
microplus

Atividade enzimática: protease aspártica

Descrição da seqüência SEQ ID NO: 1

25 01 Glu Phe Ala Leu Gln Leu Gly Trp His Asp Pro Xaa Val 13
14 Thr Glu Ile Arg Gly Arg Ala Leu Gly Asp Pro Ile 24

Número identificador: Seq. ID n°: 02

a) tamanho: 29 aminoácidos

b) Tipo: Proteína

30 Características da molécula seqüenciada:

a) Tipo: Proteína

b) Nome: THAP

Outras informações relevantes

Fonte original da molécula: ovo do carrapato *Boophilus microplus*

Atividade enzimática: protease aspártica

5 Descrição da seqüência SEQ ID NO: 2

01 Ala Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ile Ile Leu Thr Asn Tyr 13

14 Asn Asn Met Gln Phe Tyr Gly Ile Ile Thr Xaa Gly Xaa 26

27 Pro Pro Gln 29

Depositantes

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CGC/CPF:92.969.856/0001-98, endereço Rua Sarmento Leite 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.
2. Universidade Federal do Rio de Janeiro, CGC 33.663.683/0001-16, Endereço Cidade Universitária, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ.
3. Aoi Masuda, CPF 686882028-34, Endereço Rua Laurindo 355/apt 33, 90040-140, Porto Alegre, RS.
4. Carlos Jorge Logullo de Oliveira CPF 717713797-15, Endereço Rua Pereira Nunes 6/apt 301, 24240-480, Niterói, RJ.
5. Hatisaburo Masuda CPF 184084788-34, Endereço Rua Uçá 184/apt 104, 21940-480, Rio de Janeiro, RJ.
6. Itabajara da Silva Vaz Junior CPF 485117220-68, Endereço Av. Protásio Alves 8500/bloco B2/apt 201, 91260-000, Porto Alegre, RS.
7. João Carlos Gonzales CPF 003 628 160/34, Endereço Rua Teixeira de Carvalho, 266, 90.880-300, Porto Alegre, RS.
8. Marcos Henrique Ferreira Sorgine CPF 037642127-48, Endereço Rua Barão de Itapagipe 427 casa 2, 20261-000, Rio de Janeiro, RJ.
9. Pedro Lagerblad de Oliveira CPF 801256627-34, Endereço Rua Humaita 102/ casa 15, Botafogo, 22261-001, Rio de Janeiro, RJ.

Inventores:

1. Aoi Masuda, biomédica, Rua Laurindo 355/apt 33, 90040-140, Porto Alegre, RS.
2. Carlos Jorge Logullo de Oliveira, químico, Rua Pereira Nunes 6/apt 301, 24240-480, Niterói, RJ
3. Hatisaburo Masuda, professor universitário, Rua Uçá 184/apt 104, 21940-480, Rio de Janeiro, RJ.
4. Itabajara da Silva Vaz Junior, professor universitário, Av. Protásio Alves 8500/bloco B2/apt 201, 91260-000, Porto Alegre, RS.
5. João Carlos Gonzales, professor universitário, Rua Teixeira de Carvalho, 266, 90.880-300, Porto Alegre, RS.
6. Marcos Henrique Ferreira Sorgine, biólogo, Rua Barão de Itapagipe 427 casa 2, Tijuca, 20261-000, Rio de Janeiro, RJ.
7. Pedro Lagerblad de Oliveira, professor universitário, Rua Humaita 102/ casa 15, Botafogo, 22261-001, Rio de Janeiro, RJ.

Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras

Aoi Masuda

Carlos Jorge Logullo de Oliveira

Hatisaburo Masuda

Itabajara da Silva Vaz Junior

João Carlos Gonzales

Marcos Henrique Ferreira Sorgine

Pedro Lagerblad de Oliveira

