



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

(21) BR 102015019740-3 A2

(22) Data do Depósito: 17/08/2015

(43) Data da Publicação: 21/02/2017



(54) **Título:** USO DE SERPINAS DE CARRAPATO OU PEPTÍDEOS DERIVADOS COMO VACINA CONTRA O CARRAPATO

(51) **Int. Cl.:** A61K 38/57; C07K 14/81; A61P 37/04

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM

(72) **Inventor(es):** ITABAJARA DA SILVA VAZ JUNIOR; LUCAS TIRLONI; TAE KWON KIM; MARIANA LONER COUTINHO; ABID ALI; ADRIANA SEIXAS; CARLOS TERMIGNONI; ALBERT MULENGA

(57) **Resumo:** USO DE SERPINAS DE CARRAPATO OU PEPTÍDEOS DERIVADOS COMO VACINA CONTRA O CARRAPATO. A presente invenção descreve o uso de Serpinas de carrapato ou peptídeos derivados como vacina caracterizada pelo isolamento de três antígenos de carrapato bovino, *Rhipicephalus microplus*. Estes antígenos, as proteínas RmSerpín-3, RmSerpín-6 e RmSerpín-17, são isolados de tecidos de carrapato e caracterizadas por compreender das sequências de aminoácidos SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:3, com atividades inibitórias de serino-proteases, mas sem ter 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 animais, como imunógeno é capaz de gerar resposta protetora contra carrapatos de forma que os antígenos possam ser utilizados como vacinas para prevenir a infestação, isoladamente ou em conjunto com outros antígenos.

USO DE SERPINAS DE CARRAPATO OU PEPTÍDEOS DERIVADOS COMO VACINA CONTRA  
O CARRAPATO

**[001]** Refere-se o presente invento a identificação e caracterização de três antígenos do carrapato bovino, *Rhipicephalus microplus*. Os antígenos isolados, denominados RmSerpín-3, RmSerpín-6 e RmSerpín-17, caracterizados por compreender das sequências de aminoácidos SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:2, com atividades inibitórias de serino-proteases, mas sem ter funções biológicas conhecidas. O uso deste antígeno como imunógeno em animais 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]** O carrapato *R. microplus* é um parasita monoxênico, sendo o seu principal hospedeiro o bovino, embora possa parasitar com menor frequência outros animais como os bubalinos, os ovinos, os equídeos e os cervídeos. O parasitismo acarreta perdas na produção de leite e carne, dano ao couro causado pelas lesões e reações inflamatórias nos pontos de fixação do carrapato e a transmissão de protozoários do gênero *Babesia* e da riquetsia *Anaplasma marginale*. Estima-se que, anualmente, as perdas decorrentes da infestação pelo *R. microplus* cheguem a 1 bilhão de dólares americanos no Brasil.

**[003]** Atualmente, o método de controle para o carrapato *R. microplus* é realizado através do uso de acaricidas. Entretanto, os compostos químicos com frequência não são usados corretamente, acelerando a seleção de populações de carrapatos resistentes aos princípios ativos utilizados. Devido ao pequeno período de tempo entre as gerações, o *R. microplus* pode sofrer seleção de resistência aos compostos químicos mais rapidamente que os outros carrapatos. Esse método de controle apresenta ainda outras desvantagens, como os problemas criados pela contaminação da carne, leite e do meio ambiente. Uma série de compostos como as avermectinas, o amitraz, os organofosforados e os piretróides têm se mostrado já ineficientes contra

algumas populações de *R. microplus*. Devido aos problemas associados ao uso do controle químico, a aplicação de formas alternativas de controle desse parasito se torna vital para alcançar maior produtividade no campo.

**[004]** Durante o repasto sanguíneo, os carrapatos, dependendo da espécie, necessitam permanecer fixados desde poucos minutos até vários dias nos seus hospedeiros. Portanto, é provável que as diferentes estratégias de alimentação desses parasitas influenciem o tipo de resposta imune gerada pelos hospedeiros. Sabe-se que os carrapatos precisam contrapor o sistema imune inato (inflamação) durante a primeira infestação, e o sistema imune inato e adquirido durante as infestações subsequentes. A resposta imunológica inata e adquirida contra os carrapatos é observada em bovinos infestados através da ação de anticorpos, do sistema complemento ou por reações de hipersensibilidade, e envolvem células apresentadoras de antígenos, citocinas, linfócitos B e T, granulócitos, entre outras células e moléculas. Também foi demonstrado a transferência passiva de imunidade através da transferência de soro de bovinos resistentes ao *R. microplus* para bovinos sensíveis, sugerindo o envolvimento de anticorpos na resistência adquirida. Entre os mecanismos de contraposição às defesas imunológicas dos hospedeiros já identificados em diferentes espécies de carrapatos encontram-se os fatores de imunossupressão, inibidores do sistema complemento, da citotoxicidade, da resposta inflamatória e competição antigênica.

**[005]** 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. Posteriormente, a partir de análise da Bm86 e da

avaliação *in silico* de algumas propriedades da proteína, como potencial hidrofóbico e hidrofílico, foram desenvolvidos peptídeos sintéticos derivados dessa glicoproteína. Estes peptídeos, usados como antígenos vacinais em bovinos, apresentaram uma eficácia entre 35% e 81%.

**[006]** Devido ao fato de que formulações que utilizam a Bm86 como antígeno vacinal nem sempre conferem níveis de proteções adequadas para o controle do *R. microplus*, diversos grupos de pesquisa vêm realizando esforços para 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. Proteínas de carrapatos presentes em diferentes vias metabólicas quando utilizadas como imunógenos vacinais induziram proteção contra a infestação por *R. microplus*.

**[007]** Inibidores da superfamília das serpinas (*serine protease inhibitors*) possuem entre 350-500 aminoácidos com massa molecular variando de 40-60 kDa e participam de uma variedade de funções fisiológicas em diferentes organismos. As serpinas de carrapatos possuem atividade anticoagulante e imunossupressora. A imunização de hospedeiros com serpinas recombinantes induz uma resposta imune com capacidade de reduzir infestações de *Ixodes ricinus*, *Haemaphysalis longicornis* e *Rhipicephalus appendiculatus*. Essas observações demonstram a importância dessas proteínas na fisiologia do carrapato, na relação parasita-hospedeiro e na transmissão de patógenos.

**[008]** Uma estratégia para aumentar a eficácia de uma vacina é combinar dois ou mais antígenos. Em carrapatos, a aplicação dessa alternativa mostrou-se promissora após experimentos demonstrando o aumento dos níveis de proteção conferidos por vacinas que continham mais de um antígeno na formulação vacinal. Assim sendo, a identificação de novas proteínas com potencial para uso em vacina, bem como a melhor caracterização das proteínas já identificadas é importante para aumentar a proteção conferida pelas já testadas. Neste enfoque, também se procura identificar e caracterizar proteínas similares em diferentes espécies de carrapatos que possam servir de

base para o desenvolvimento de uma vacina útil no controle de diferentes espécies de carrapatos.

**[009]** A expressão de três proteínas sem função biológica conhecida RmSerpín-3, RmSerpín-6 e RmSerpín-17, foram identificadas em glândula salivar de *Rhipicephalus microplus*. A análise da sequência de aminoácidos indica que elas são inibidores de serino-proteases.

**[0010]** As proteínas recombinantes RmSerpín-3, RmSerpín-6 e RmSerpín-17 foram expressas em larga escala, purificadas e caracterizadas. As RmSerpín-3, RmSerpín-6 e RmSerpín-17 apresentam um elevado grau de conservação com outros inibidores de serino-proteases, o que a torna uma candidata interessante no que diz respeito ao desenvolvimento de uma vacina com ação para carrapatos. As RmSerpín-3, RmSerpín-6 e RmSerpín-17 também foram usadas para um ensaio de imunização de coelhos.

**[0011]** Anticorpos gerados contra as RmSerpín-3, RmSerpín-6 e RmSerpín-17 foram capazes de inibir a atividade destas serpinas, sugerindo um potencial imunoprotetor contra infestação de carrapato.

**[0012]** As clonagens das regiões codificadoras da RmSerpín-3, RmSerpín-6 e RmSerpín-17 foram realizadas utilizando as técnicas de RT-PCR. Para a clonagem, *primers* baseados em regiões conhecidas dos três genes de *R. microplus* presentes em um banco de transcritos, 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 1200, 1200 e 1178 bp, referente às sequências codificadoras do cDNA da RmSerpín-3, RmSerpín-6 e RmSerpín-17, 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 nucleicos determinadas. As sequências de aminoácidos preditas da RmSerpín-3, RmSerpín-6 e RmSerpín-17 de *R. microplus* foram verificadas por análise comparativa com sequências obtidas no GenBank e banco de transcritos. As clonagens das regiões codificadoras da RmSerpín-3,

RmSerpín-6 e RmSerpín-17 em plasmídeos para expressão foram realizadas utilizando a técnica de PCR. Para a clonagem, *primers* específicos para os genes foram utilizados na reação de PCR para amplificar as sequências codificantes inseridas nos plasmídeos pPICZ $\alpha$ C. Os produtos do PCR corresponderam a fragmentos de 1164, 1215 e 1143 bp, referente as sequências codificadora do cDNA da RmSerpín-3, RmSerpín-6 e RmSerpín-17, respectivamente, sem a região codificante do peptídeo sinal, e adição ao final das sequências, de 18 nucleotídeos codificantes de 6 aminoácidos histidinas. Os fragmentos foram clonados em vetores pPICZ $\alpha$ C, resultando nos plasmídeos pPICZ $\alpha$ C-RmSerpín-3, pPICZ $\alpha$ C-RmSerpín-6 e pPICZ $\alpha$ C-RmSerpín-17 referentes as sequências da RmSerpín-3, RmSerpín-6 e RmSerpín-17, respectivamente. 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. Os plasmídeos de expressão pPICZ $\alpha$ C-RmSerpín-3, pPICZ $\alpha$ C-RmSerpín-6 e pPICZ $\alpha$ C-RmSerpín-17 foram linearizados com *Sac* I e eletroporados em *Pichia pastoris* cepa X-33

**[0013]**As colônias transformadas foram seleccionadas em placas com meio de cultura contendo agar, extrato de levedura, peptona e dextrose (YPD) contendo zeocina (100  $\mu$ g/mL) e incubadas a 28 °C.

**[0014]**Das colônias de leveduras transformantes obtidas, uma colônia de cada plasmídeo foi inoculada em 1,5 mL de meio complexo com glicérol tamponado crescida por 5 dias a 28 °C sob agitação constante. Subsequentemente, as células foram usadas para inocular o meio complexo com metanol e crescida por 5 dias a 28°C sob agitação constante. Diariamente a expressão da proteína foi induzida pela adição de metanol para uma concentração final de 0,5 %. As proteínas recombinantes em meios de cultura foram precipitadas por saturação com sulfato de amônio (525 g / L de meio) com agitação durante a noite a 4 °C. O precipitado foi sedimentado a 12000 rpm durante 1 h a 4 °C e ressuscitado em, e dialisada contra tampão (20 mM Tris-HCl, 500 mM de NaCl, pH 7,4). Para verificar a expressão de RmSerpín-3, RmSerpín-6 e RmSerpín-17

amostras foram resolvidas em um SDS-PAGE 12.5 %, seguida da análise por Western-blot, utilizando um anticorpo para o marcador de hexa histidina C-terminal.

**[0015]** 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 Tris-HCl 20 mM, imidazol 5 mM e NaCl 0,15 M, pH, 7,4. Após a aplicação da amostra, as proteínas da levedura ligadas foram lavadas com 15 ml de tampão Tris-HCl 20 mM, imidazol 5 mM e NaCl 0,15 M, pH, 7,4. As proteínas recombinantes foram eluídas com tampão de eluição (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, imidazol 100 mM) originando as proteínas recombinantes purificadas RmSerpín-3, RmSerpín-6 e RmSerpín-17.

**[0016]** Para testar a capacidade das RmSerpín-3, RmSerpín-6 e RmSerpín-17 de induzirem uma resposta imunológica, três coelhos com idade de 2 meses foram inoculados por via intramuscular por 3 vezes com intervalos de 10 dias entre cada inoculação. Os inóculos foram preparados com 150 µg de proteínas suspensas no adjuvante Montanide 888 e Marcol 52. Após 15 dias da última inoculação, os soros dos 3 coelhos imunizados foram coletados e os anticorpos purificados por cromatografia de afinidade numa resina de Sepharose de proteína G.

**[0017]** A reatividade dos três soros contra as três serpinas foi testado por ELISA e Western-blot. Para o ELISA, RmSerpín-3, RmSerpín-6 e RmSerpín-17 purificadas foram utilizados para revestir placas de 96 poços de poliestireno (200 ng / poço) durante 1 h a 37 °C. Solução salina tamponada com adição de 0,05% de Tween 20 (PBS-T) foi usada como solução de bloqueio durante 1 h a 37 °C. IgG de coelho purificada contra RmSerpín-3, RmSerpín-6 ou RmSerpín-17 foram adicionadas aos poços. Após três lavagens em PBS-T, os poços foram incubados com uma diluição de anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase. A reação foi revelada com 100 µL de solução de substrato cromogênico em tampão citrato-fosfato a 100 mM, pH 5,0, e a reação foi incubada no escuro durante 15 minutos.



Foi possível observar que os anticorpos produzidos contra as proteínas recombinante tem a capacidade de reconhecer a proteína específica e apresentam reatividade contra as outras serpins. A maior capacidade de reconhecimento ocorreu entre a RmSerpín -6 e RmSerpín -17. Os dados estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1.** Reatividade de anticorpos policlonais contra serpinas recombinantes determinado por ELISA

Anticorpo	Reatividade cruzada (%) *		
	RmSerpín -3	RmSerpín -6	RmSerpín -17
Anti- RmSerpín -3	100	47 ( $\pm 10$ )	40 ( $\pm 9$ )
Anti- RmSerpín -6	35 ( $\pm 10$ )	100	31 ( $\pm 6$ )
Anti- RmSerpín -17	46 ( $\pm 10$ )	56 ( $\pm 14$ )	100

\* Comparada para a reatividade primária. Resultados mostrados como media e desvio padrão

**[0018]** Para obter informação sobre a atividade inibitória das RmSerpín-3, RmSerpín-6 ou RmSerpín-17, sobre diversas enzimas, suas atividades inibidoras foram avaliadas contra um painel de serino-proteinases de mamíferos, relacionadas com mecanismos da resposta imune contra parasitas: trombina bovina, elastase pancreática suína, tripsina pancreática bovina,  $\alpha$ -quimotripsina de pâncreas bovino, calicreína pancreática suína, quimase humana, triptase humana, plasmina humana. Um micromolar de cada proteína recombinante foi pré-incubada com cada proteinase, durante 15 minutos a 37°C em 20 mM Tris-HCl, NaCl 150 mM, BSA a 0,1%, pH 7,4. Após, o substrato correspondente para cada uma das enzimas foi adicionado num volume de reacção de 100  $\mu$ l e a reacção foi medida a OD<sub>405 nm</sub> a cada 11 s durante 30 min a 30°C. O perfil inibitório de RmSerpín-3, RmSerpín-6 ou RmSerpín-17 contra o painel de proteinases de mamíferos mostrou um padrão de atividade inibitória contra enzimas do tipo tripsina e quimotripsina (Tabela 2). A incubação de RmSerpín-3 inibiu a atividade de quimotripsina, catepsina L, elastase pancreática e quimase (10 L), a incubação da RmSerpín-6 inibiu a atividade de tripsina, plasmina, factor Xa, factor XIa e quimotripsina e a



incubação da RmSerpín-17 inibiu a atividade de tripsina, plasmina, catepsina L, quimotripsina e o factor XIa (Tabela 2).

**Tabela 2.** Efeito das serpinas sobre a atividade de diferentes enzimas

	RmSerpín-3 (1 µM)	RmSerpín-06 (1 µM)	RmSerpín-17 (1 µM)
Quimotripsina	96,9 ± 1,1	24,2 ± 7,3	89,7 ± 2,9
Fator IXa (300 nM)	s.i	s.i	s.i
Catepsina G (166 nM)	78,7 ± 0,2	n.i	78,8 ± 0,2
Factor XIa (3,68 nM)	s.i	62,8 ± 11,1	98,0 ± 1,2
Tripsina (24,6 nM)	s.i	73,5 ± 11,9	87,1 ± 4,8
Fator Xa (5,8 nM)	s.i	32,7 ± 10,6	n.i
Elastase (21,6 nM)	92,6 ± 2,4	n.i	n.i
Plasmina (10 nM)	s.i	24,1 ± 4,9	58,3 ± 13,5
Quimase (10 U)	23,3 ± 4,6	n.i	n.i
Fator XIIa (7,6 nM)	s.i	s.i	s.i
Trombina (43 U)	s.i	s.i	s.i
u-PA (47,2 nM)	s.i	s.i	s.i
Tryptase (10 U)	s.i	s.i	s.i
t-PA (32 nM)	s.i	s.i	s.i
Proteinase-3 (68 U)	s.i	s.i	s.i
calicreína (33 U)	s.i	s.i	s.i

s.i: sem atividade inibitória ou atividade inibitória menor que 20%.

**[0019]**A seguir foi realizada a análise da capacidade de anticorpos anti-serpinas inibirem a atividade inibitória das RmSerpín-3, RmSerpín-6 ou RmSerpín-17. Para isto, as atividades inibidoras das serpinas foram avaliadas contra o mesmo painel de serino-proteinases na presença dos anticorpos anti-serpinas.

**[0020]**IgG de coelho purificados a partir de anti-soros contra serpinas foram usadas para verificar se a ligação dos anticorpos nas serpinas poderia bloquear a atividade inibitória da serpina. As RmSerpín-3, RmSerpín-6 ou RmSerpín-17

foram pré-incubadas com IgG durante 30 min a 37 °C. Após, a enzima foi adicionada e antes da adição dos diferentes substratos seguiu-se uma nova incubação de 15 minutos a 37 ° C. A hidrólise do substrato foi medida a OD 405 nm a cada 11 s durante 15 min a 30 °C. Os dados mostram que anticorpos contra uma serpina apresentam reatividade e inibem a atividade de todas as serpinas testadas. Os dados da capacidade inibitória dos anticorpos frente as serpinas estão apresentados na tabela 3.

**Tabela 3.** Efeito inibitório de anticorpos sobre a atividade de serpinas recombinantes, determinado por ELISA

Soro	Inibição da atividade da serpina pelo anticorpo (%)*
RmSerpinerpin -3 (sem soro)	0
RmSerpín-3 + anti-rRmSerpín-3 (0,8 µM)	66,70
RmSerpín-3 + anti-rRmSerpín-3 (1,7 µM)	64,27
RmSerpín-3 + anti-rRmSerpín-3 (2,6 µM)	66,81
RmSerpín-6 (sem soro)	0
RmSerpín-6 + anti-rRmSerpín-6 (1 µM)	18,99
RmSerpín-6 + anti-rRmSerpín-6 (2 µM)	48,843
RmSerpín-6 + anti-rRmSerpín-6 (3 µM)	50,47
RmSerpín-17(sem soro)	0
RmSerpín-17 + anti-rRmSerpín-17 (1 µM)	85,68
RmSerpín-17 + anti-rRmSerpín-17 (2 µM)	84,11
RmSerpín-17 + anti-rRmSerpín-17 (3 µM)	84,37

\*Efeito inibitório calculado em relação a atividade da serpina na ausência de anticorpos.

**[0021]**A capacidade de anticorpos inibirem a atividade da serpinas permite caracterizar as serpinas RmSerpín-3, RmSerpín-6 ou RmSerpín-17 como antígenos com potencial vacinal para o desenvolvimento de uma vacina contra o carrapato.

## REIVINDICAÇÕES

1. USO DE SERPINAS DE CARRAPATO OU PEPTÍDEOS DERIVADOS COMO VACINA CONTRA O CARRAPATO **caracterizado por** ser compreendido das proteínas RmSerpín-3, RmSerpín-6 e RmSerpín-17
2. USO DE SERPINAS DE CARRAPATO OU PEPTÍDEOS DERIVADOS de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelas** proteínas serem compreendidas das sequências de aminoácidos SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:3, um adjuvante oleoso ou metálico, em um veículo fisiologicamente aceitável, denominado RmSerpín-3-6-17, do carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
3. USO DE SERPINAS DE CARRAPATO OU PEPTÍDEOS DERIVADOS de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** serem as proteínas obtidas por purificação a partir de tecidos de carrapato, síntese química ou produzidas em outros organismos por meio de técnicas de DNA recombinante
4. USO DE SERPINAS DE CARRAPATO OU PEPTÍDEOS DERIVADOS de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizado pelo** fato das proteínas terem pelo menos 90% de identidade para as sequências definidas pela reivindicação 2
5. USO DE SERPINAS DE CARRAPATO OU PEPTÍDEOS DERIVADOS de acordo com as reivindicações 1 a 4, **caracterizado pelo** fato das proteínas estarem presentes na concentração variando de 0,01 a 5,0 mg/ml
6. USO de três proteínas como definidas nas reivindicações 1- 5 para formulação de uma vacina.

## RESUMO

### USO DE SERPINAS DE CARRAPATO OU PEPTÍDEOS DERIVADOS COMO VACINA CONTRA O CARRAPATO

A presente invenção descreve o uso de Serpinas de carrapato ou peptídeos derivados como vacina caracterizada pelo isolamento de três antígenos de carrapato bovino, *Rhipicephalus microplus*. Estes antígenos, as proteínas RmSerpín-3, RmSerpín-6 e RmSerpín-17, são isolados de tecidos de carrapato e caracterizadas por compreender das sequências de aminoácidos SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:3, com atividades inibitórias de serino-proteases, mas sem ter 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 animais, como imunógeno é capaz de gerar resposta protetora contra carrapatos de forma que os antígenos possam ser utilizados como vacinas para prevenir a infestação, isoladamente ou em conjunto com outros antígenos.

### LISTAGENS DE SEQUÊNCIAS

<110> Nome do Requerente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
 <120> Título da invenção: Uso de serpinas de carrapato ou peptídeos derivados como vacina contra o carrapato bovino.

<160> Número de sequências constantes do pedido: 3 (três)

<210> SEQ ID NO: 01

<211> tamanho: 405 aminoácidos

<212> Tipo: Proteína

<223> Fonte original da molécula: glândula salivar do carrapato  
*Rhipicephalus microplus*

<400> SEQ ID NO: 01

001 Met Val Ala Lys Phe Leu Phe Leu Ala Ser Ala Leu Ala 013  
 014 Val Ala His Cys Glu Thr Asp Asp Ser Thr Leu Leu Ala 026  
 027 Arg Ala His Asn Gln Leu Ala Val Asn Leu Leu Lys Glu 039  
 040 Leu Ala Thr Glu Asn Pro Ser Ser Asn Val Phe Phe Ser 052  
 053 Pro Thr Ser Ile Ala Ala Ala Phe Gly Met Ala Tyr Leu 065  
 066 Gly Ala Arg Gly Gly Ser Glu Ser Glu Leu Asn Ser Val 078  
 079 Phe Gly His Ala Asp Val Gly Leu Thr Asp Arg Ser Arg 091  
 092 Leu Leu Thr Ala Tyr Lys Asn Leu Leu Glu Leu Ser Ala 104  
 105 Ser Pro Asn Val Thr Leu Asp Val Ala Asn Met Val Leu 117  
 118 Ala Gln Asp Arg Phe Pro Ile Ser Asp Ser Tyr Lys Gln 130  
 131 Gln Leu Arg Glu Ile Phe Asp Ala Asp Leu Arg Ser Ala 143  
 144 Asn Phe Val Glu Asp Gly Pro Arg Val Ala Ala Glu Val 156  
 157 Asn Ala Trp Val Arg Glu Lys Thr Arg Gly Lys Ile Ser 169  
 170 Gly Ile Leu Pro Glu Gly Gln Pro Leu Asp Ile Val Leu 182  
 183 Phe Ile Leu Asn Ala Val Tyr Phe Lys Gly Thr Trp Val 195  
 196 Thr Lys Phe Asp Ala His Arg Thr Ile Asn Lys Pro Phe 208  
 209 Leu Asn Leu Gly Thr Thr Glu Val Ser Lys Pro Ala Met 221  
 222 His Leu Lys Ala Arg Phe Pro Tyr Ala Arg Val Glu Pro 234

235 Leu His Ala Ser Ala Leu Glu Ile Pro Tyr Glu Gly Asp 247  
248 Arg Phe Thr Met Val Val Leu Leu Pro Asp Asn Ala Thr 260  
261 Gly Leu Ala Ala Val Arg Asn Gly Leu Ser Leu Ala Ala 273  
274 Leu Glu Asp Val Gly Ser Arg Leu Ser Phe Arg Asp Val 286  
287 Ile Leu Gln Leu Pro Lys Phe Asp Met Ser Leu Ser Tyr 299  
300 Gly Leu Val Pro Ala Met Lys Ala Ile Gly Leu Asn Ser 312  
313 Val Phe Gly Gly Ser Ala Asp Phe Ser Gly Ile Ser Glu 325  
326 Ala Val Pro Leu Val Ile Ser Asp Val Leu His Lys Ala 338  
339 Ala Val Glu Val Asn Glu Glu Gly Thr Ile Ala Thr Ala 351  
352 Val Thr Gly Leu Gly Phe Val Pro Leu Ser Ala His Tyr 364  
365 Asn Pro Pro Pro Pro Ile Glu Phe Thr Val Asp His Pro 377  
378 Phe Ile Phe Tyr Ile Arg Asp Arg Ser Thr Asn Arg Val 390  
391 Leu Phe Ile Gly Glu Val Asn Thr Leu His His His His 403  
404 His His



<210> SEQ ID NO: 02

<211> tamanho: 405 aminoácidos

<212> Tipo: Proteína

<223> Fonte original da molécula: glândula salivar do carrapato  
*Rhipicephalus microplus*

<400> SEQ ID NO: 02

001 Met Lys Pro Leu Val Ala Val Ala Thr Leu Leu Ala Leu 013  
014 Ser Cys Leu Gln Leu Ser Leu Cys Gln Thr Glu Gln Glu 026  
027 His Lys Leu Val Ala Ala Asn Asn Gln Phe Ala Ile His 039  
040 Leu Leu Lys Val Leu Pro Ser Leu Pro Asn Glu Asn Val 052  
053 Phe Phe Ser Pro Tyr Ser Leu Ser Thr Ala Leu Gly Met 065  
066 Ala Phe Ile Gly Ala Arg Gly Asp Thr Leu Glu Glu Leu 078  
079 Ser Gln Ala Leu Gly Tyr Lys Ala Leu Ser Leu Ser Glu 091  
092 Ser Asp Val Arg Glu Ala Phe Ala Leu Gln Asn Asn Arg 104  
105 Leu Gln Ala His Ala Arg Gln Ala Gly Leu Asp Val Ala 117  
118 Asn Ser Ala Ala Val Gln Gln Gly Leu Asp Val Ile Asp 130  
131 Thr Tyr Tyr Asp Ala Leu Asn Arg Thr Phe Asn Ala His 143  
144 Val Phe Asn Val Asp Phe Gln Gly Asn Gly Gln Gln Ala 156  
157 Val Asp Thr Ile Asn Glu Trp Val Lys Gln Ala Thr His 169  
170 Ser Lys Ile Asp Lys Leu Phe His Glu Pro Leu Asp Thr 182  
183 Asp Thr Arg Leu Val Leu Met Asn Ala Ile Leu Phe Lys 195  
196 Gly Leu Trp Glu Arg Gln Phe Asn Pro Ser His Thr Thr 208  
209 Lys His Val Phe Tyr Asn Gly Gly Ile Gln Gly Thr Pro 221  
222 Val Asp Thr Met Phe Leu Arg His Thr Thr Arg Arg Gly 234  
235 Phe Ser Val Glu Leu Gln Ser Lys Val Leu Glu Leu Pro 247  
248 Tyr Arg Asp Ser Asp Tyr Ser Met Val Ile Val Leu Pro 260  
261 Glu Glu Arg Asp Gly Ala Asp Ala Val Lys Gln Val Leu 273  
274 Thr Ile Asp Lys Leu Asn Ile Ala Val Gly Ser Leu Thr 286  
287 Ser Gly Pro Val Ala Ile Ser Leu Pro Lys Phe Lys Ile 299

300 Asp Lys Leu Asn Pro Leu Lys Ser Asn Leu Thr Ser Leu 312  
313 Gly Leu Arg Lys Met Phe Gly Ser Glu Ala Asp Leu Ser 325  
326 Gly Ile Thr Gly Asp Arg Arg Leu Tyr Val Ser Asp Val 338  
339 Leu Gln Arg Ala Val Val Glu Val Asn Glu Glu Gly Thr 351  
352 Glu Ala Ala Ala Val Thr Gly Val Ile Gly Val Asn Arg 364  
365 Ile Gly Ile Glu Pro Phe Leu Phe Thr Ala Asp His Pro 377  
378 Phe Leu Phe Phe Ile Arg Asp Arg Lys Thr Asn Glu Ile 390  
391 Phe Phe Ala Gly Gln Val Asn Val Leu His His His His 403  
404 His His

<210> SEQ ID NO: 03

<211> tamanho: 398 aminoácidos

<212> Tipo: Proteína

<223> Fonte original da molécula: glândula salivar do carrapato  
*Rhipicephalus microplus*

<400> SEQ ID NO: 03

001 Met Lys Ile Ile Ile Cys Leu Ala Gly Leu Leu Ala Leu 013  
014 Cys Tyr Gly Gln Glu Glu His Lys Val Thr Ala Ala Asn 026  
027 Asn His Phe Gly Phe Lys Leu Leu Asn Ala Ile Pro Val 039  
040 Ser Pro Gln Thr Asn Leu Phe Tyr Ser Pro Tyr Ser Val 052  
053 Ser Thr Ala Met Ala Met Ala Tyr Val Gly Ala Arg Gly 065  
066 Glu Thr Gln Arg Asp Leu His Glu Thr Leu Gly Tyr Ser 078  
079 Ser Val Gly Leu Thr Pro Asp His Val Pro Ser Ala His 091  
092 Ala Gln His Thr His Leu Leu Arg Ala Pro Ser Asn Ser 104  
105 Thr Leu Arg Val Ala Asn Ala Ala Val Val Gln Glu Asn 117  
118 Tyr Thr Val Thr Asp Glu Tyr Leu Gly Leu Leu Arg Gln 130  
131 Ser Phe Asp Ala Glu Val Ser Val Ser Ser Leu His Asp 143  
144 Glu Gln Ser Val Arg Ala Ile Asn Asp Trp Val Lys Asn 156  
157 Lys Thr Glu Gln Lys Ile Glu Lys Leu Leu Ser Glu Pro 169  
170 Leu Pro Pro Asn Thr Arg Leu Val Leu Leu Asn Ala Ile 182  
183 Tyr Phe Lys Gly Val Trp Asn Val Pro Phe Asp Ala Arg 195  
196 Gly Thr Gln Lys Arg Pro Phe Phe Asn Ala Gly Thr Glu 208  
209 Ile Val Glu Val Asp Thr Met Tyr Glu Gln Ile Ser Ala 221  
222 Gly Tyr Ala Arg Asp Asp Glu Thr Asn Ala Asp Val Leu 234  
235 Asp Leu Pro Tyr Ala Gly Leu Asp Tyr Ser Leu Thr Ile 247  
248 Ile Leu Pro Arg Glu Arg Thr Gly Val Asp Ala Leu Arg 260  
261 Gln Asn Leu Ser Trp Pro Ile Phe Gln Arg Leu Leu Ser 273  
274 Lys Leu Asn Met Asn Ser Pro Met Glu Val Ser Leu Pro 286  
287 Lys Phe Lys Ile Glu Gly Ser Tyr Lys Leu Lys Ala Pro 299

300 Leu Ser Ala Leu Gly Ala Ser Lys Ala Phe Asp Glu Arg 312  
313 Tyr Ala Asp Phe Ser Gly Ile Ser Gly Ala Arg Asp Leu 325  
326 Thr Ile Tyr Asp Val Val His Lys Ala Val Val Glu Val 338  
339 Asn Glu Glu Gly Ser Glu Ala Ala Gly Ala Thr Ala Val 351  
352 Ile Phe Tyr Thr Lys Ser Ala Ala Val Gly Ile Pro Phe 364  
365 Val Val Asp His Pro Phe Leu Phe Phe Ile Arg Asn Arg 377  
378 His Thr Gly Asp Val Leu Phe Ala Gly Gln Val Asn His 390  
391 Leu His His His His His His His