



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

(21) BR 102018072554-8 A2



(22) Data do Depósito: 01/11/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 16/11/2021

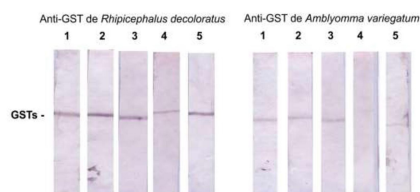
(54) **Título:** COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA E USO DA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA

(51) **Int. Cl.:** A61K 38/45; A61P 33/14.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL; NATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH ORGANISATION.

(72) **Inventor(es):** ITABAJARA DA SILVA VAZ JUNIOR; CHARLES NDAWULA; LUÍS FERNANDO PARIZI.

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA E USO DA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA. A presente invenção refere-se a uma composição imunogênica compreendendo um complexo imunogênico formado por Glutathione S-transferases de carrapatos ou peptídeos derivados e seu uso para o controle de carrapatos. Mais especificamente, esse complexo foi obtido pelo isolamento de quatro proteínas de quatro espécies de carrapato, *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Rhipicephalus decoloratus* e *Haemaphysalis longicornis*. A invenção situa-se nos campos da Bioquímica, Biologia Molecular e Medicina Veterinária.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA E USO DA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA

Campo Técnico da Invenção

[0001] A presente invenção refere-se a uma composição imunogênica compreendendo um complexo imunogênico formado por glutathione S-transferases de carrapatos e seu uso para o controle de carrapatos. A invenção situa-se nos campos da Bioquímica, Biologia Molecular e Medicina Veterinária.

Histórico da Invenção

[0002] No Brasil, as infestações pelo carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* podem causar perdas econômicas na ordem de US\$ 3,24 bilhões, representando um dos maiores fatores na queda de produtividade na bovinocultura brasileira, impactando a produção pecuária pela redução do ganho de peso, redução na produção de leite dos animais e perda na qualidade do couro. Essas perdas são atribuídas principalmente à espoliação de grandes quantidades de sangue (acarretando em anemia, anorexia, emagrecimento, apatia, e em casos mais extremos em morte dos animais). A qualidade do couro é prejudicada devido às reações inflamatórias no local de fixação do parasita.

[0003] Além dos distúrbios associados diretamente ao parasitismo, o *R. microplus* também é motivo de preocupação por ser o vetor dos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemia* e das bactérias *Anaplasma marginale* e *Anaplasma centrale*, agentes causadores da tristeza parasitária bovina (TPV).

[0004] O controle de infestações por carrapatos é baseado no uso de acaricidas químicos. Contudo o surgimento de populações resistentes aos princípios ativos dos acaricidas é frequente. Além do mais, os métodos de controle químico são frequentemente criticados pelo seu custo e por apresentarem a inconveniência de poderem gerar resíduos químicos no leite e carne destinados ao consumo humano, tornando crescente o estudo de métodos alternativos.

[0005] Para o desenvolvimento de vacinas faz-se necessário usar de estratégias para priorizar a escolha de antígenos dentro de uma plethora de candidatos. Uma seleção racional de antígenos poderá ser obtida através do estudo de vias fisiológicas cruciais para o desenvolvimento do parasita. Dentre essas vias, os mecanismos utilizados para a aquisição de sangue, incluindo a contraposição às defesas do hospedeiro (sistema hemostático e sistema imune), digestão do sangue ingerido e sobrevivência ao estresse oxidativo imposto pela ingestão de grande quantidade de sangue são vias de grande interesse para a identificação de moléculas que possam compor uma vacina contra o carrapato bovino.

[0006] Experimentos de vacinação de bovinos com algumas proteínas estudadas e caracterizadas pelo nosso grupo demonstraram que imunizando bovinos com as proteínas BYC nativa ou recombinante, VTDC e glutathione S-transferases (GST), é possível inibir funções biológicas que resultam em redução do desenvolvimento embrionário e/ou da ovogênese. Entretanto, é consenso de que um único antígeno não será suficiente para o controle do carrapato por vacinação. O aumento na eficácia vacinal originar-se-á da descoberta de antígenos adicionais que ataquem diferentes alvos do parasita. O número de antígenos com efeito imunoprotetor tem aumentado e esse campo ainda necessita ser explorado de forma mais efetiva.

[0007] Tendo em vista a exploração de novos alvos de controle, se faz necessário o estudo de moléculas que estejam diretamente em contato com tecido do hospedeiro tais como proteínas da glândula salivar ou secretadas na saliva do carrapato.

[0008] 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, o uso de coquetéis vacinais ou vacinas de subunidades poderia resultar na maximização da proteção conferida pela vacinação mono antigênica utilizando-se glutathione S-transferase do *Haemaphysalis longicornis*.

[0009] As glutathione S-transferases (GSTs) formam uma família multifuncional de enzimas que catalisam a conjugação da glutathione a várias outras moléculas, estando presentes em organismos aeróbicos. Entre suas funções pode-se destacar o transporte intracelular, a participação em processos digestivos, a proteção contra o estresse oxidativo, a síntese de prostaglandinas e, principalmente, a detoxificação de substâncias tóxicas. O potencial de uso da GST em uma vacina contra parasitas vem sendo estudado há mais de 20 anos. Esses trabalhos demonstram o potencial da GST em proteger significativamente a infestação por parasitas.

[0010] A glutathione S-transferase de *Haemaphysalis longicornis* (GST-HI), teve o gene clonado e foi caracterizada bioquimicamente. Estando a GST presente em vários tecidos e diferentes estágios do carrapato, essa proteína teve o potencial de ser um alvo interessante para compor um antígeno vacinal, pois a resposta imunológica desenvolvida contra essa proteína poderia atuar em diferentes momentos do ciclo de vida e interferir em diferentes processos fisiológicos do carrapato. Anticorpos gerados contra a GST de *H. longicornis* reagiram contra GST de *R. sanguineus* e *R. microplus*, justificando o seu uso em uma vacina contra diferentes espécies de carrapatos. Posteriormente, a GST-HI recombinante expressa em *Escherichia coli* foi utilizada com imunógeno em uma vacina experimental e mostrou induzir uma resposta imune que causou uma redução de 57% na infestação pelo *R. microplus* nos bovinos vacinados, comprovando o potencial da GST como antígeno em uma vacina.

[0011] Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados documentos que demonstram que o potencial uso de GST como antígeno vacinal está sendo estudado em diversas espécies de patógenos/parasitas.

[0012] Um outro artigo de Liu, Chun Y et al. "Cloning and expression of a *Trichinella spiralis* putative glutathione S-transferase and its elicited protective immunity against challenge infections." *Parasites & Vectors* (2017) de um grupo da Zhengzhou University descreve o uso de uma GST de *Trichinella spiralis*, um

nematoide, como antígeno vacinal, obtendo uma redução de aproximadamente 35% no número de parasitas.

[0013] Diversos outros grupos de pesquisa têm usado GST para proteção contra os trematódeas *Schistosoma japonicum*, *S. mansoni* e *S. haematobium* (Tebeje BM, Harvie M, You H, Loukas A, McManus DP. Schistosomiasis vaccines: where do we stand? *Parasites & Vectors*. 2016;9:528. doi:10.1186/s13071-016-1799-4)., Para o *Necator americanus*, outro nematódeo, também existe pesquisa para o uso de GST como antígeno vacinal (Hotez PJ, Diemert D, Bacon KM, et al. The Human Hookworm Vaccine. *Vaccine*. 2013;31(Suppl 2):B227-B232. doi:10.1016/j.vaccine.2012.11.034). Estes dados mostram que a GST está sendo pesquisada como antígeno vacinal em outros parasitas, além do carrapato.

[0014] No Brasil não existem pedidos de patente concedidos para o uso de GST como antígeno vacinal. No mundo é possível identificar diferentes patentes para o uso de GST como antígeno vacinal contra *Fasciola hepatica* (por exemplo, EP0456662A4) e contra *N. americanus* (por exemplo, US8211438B2), mas nenhuma delas resultaram ainda em produtos comerciais.

[0015] Nenhum dos documentos citados acima é referente as proteínas das espécies da presente invenção. Não são obtidas de carrapatos nem são usadas para controle de carrapato. Apesar de as proteínas terem o mesmo nome (GST) são sequências diferentes e foram obtidas por metodologias diferentes.

[0016] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

[0017] Sendo que a solução aqui proposta resolve, entre outros problemas, a necessidade de múltiplas vacinas específicas para cada espécie de carrapato, uma vez que os animais alvo podem ser parasitados por mais de uma espécie.

Sumário da Invenção

[0018] Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir de uma composição que compreende um complexo formado por Glutathione S-transferases de carrapatos ou peptídeos derivados para o biocontrole de carrapatos em bovinos.

[0019] A invenção apresenta uma vacina capaz de reduzir a infestação de carrapatos, tendo entre suas principais vantagens a melhora nos índices de proteção contra mais de uma espécie de carrapato (aumento do espectro de atividade).

[0020] Em um primeiro objeto a invenção revela uma composição imunogênica que compreende um complexo formado por Glutathione S-transferases de carrapatos ou peptídeos derivados, um adjuvante oleoso ou metálico em um veículo fisiologicamente aceitável.

[0021] Em um segundo objeto a invenção revela um processo de obtenção da composição imunogênica revelada, compreendendo as seguintes etapas:

- a) Clonagem da região codificante dos genes das GST dos carrapatos *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Haemaphysalis longicornis*. e *Rhipicephalus decoloratus* em plasmídeos para expressão em sistema heterólogo;
- b) Expressão das proteínas recombinantes em um sistema expressão em sistema heterólogo;
- c) Purificação das proteínas recombinantes;
- d) Caracterização da antigenicidade e imunogenicidade das proteínas recombinantes;
- e) Formulação da composição imunogênica contendo mais de uma proteína;
- f) Realização de experimentos de vacinação de animais e desafio com carrapato para determinação da capacidade protetora da vacina.

[0022] Em um terceiro objeto a invenção revela um uso para a composição imunogênica sendo ele para o biocontrole de carrapatos.

[0023] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados

pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve descrição das Figuras

[0024] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, são apresentadas as presentes figuras:

[0025] A figura 1 descreve o reconhecimento cruzado, analisado por Western-blot, entre soro anti-GST de *R. decoloratus* e *A. variegatum* para as diferentes GSTs de carrapatos. As figuras mostram a reatividade dos soros de animal imunizado com GST de *R. decoloratus* e um imunizado com GST de *A. variegatum*. No Western-blot foram usadas, como antígenos, GST de *R. appendiculatus* (1), *R. decoloratus* (2), *A. variegatum* (3), *R. microplus* (4), e *H. longicornis* (5).

[0026] A figura 2 descreve o reconhecimento cruzado, analisado por ELISA entre soro anti-GST de *R. decoloratus* e *A. variegatum* para as diferentes GSTs de carrapatos. A figuras mostra a reatividade dos soros de três animais imunizados com uma mistura de GSTs de *R. decoloratus* e *A. variegatum*; um imunizado com GST de *R. decoloratus* e um imunizado com GST de *A. variegatum*. No ELISA foram usadas, como antígenos, GST de *R. appendiculatus* (1), *R. decoloratus* (2), *A. variegatum* (3), *R. microplus* (4), e *H. longicornis* (5).

Descrição detalhada da Invenção

[0027] A presente invenção descreve uma composição compreendendo um complexo imunogênico formado por Glutathione S-transferases de carrapatos ou peptídeos derivados utilizados para o controle de carrapatos, obtidos pelo isolamento de quatro proteínas de quatro espécies de carrapato, *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Rhipicephalus decoloratus* e *Haemaphysalis longicornis*.

[0028] Estes antígenos, as proteínas Glutathione S-transferases, são isolados de

tecidos de carrapato e compreendem as sequências de aminoácidos SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:4, são enzimas com atividades de transferases, presentes em vários tecidos do carrapato. 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.

[0029] Em um primeiro objeto a invenção revela uma composição imunogênica compreendendo um complexo formado por Glutathione S-transferases de carrapatos ou peptídeos derivados, um adjuvante oleoso ou metálico em um veículo fisiologicamente aceitável.

[0030] Em uma concretização da invenção as ditas proteínas Glutathione S-transferases são de carrapatos *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Rhipicephalus decoloratus* e *Haemaphysalis longicornis*.

[0031] Em uma concretização da composição imunogênica as proteínas Glutathione S-transferases das SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 ou SEQ ID NO:4

[0032] Em uma concretização da invenção as proteínas utilizadas na composição imunogênica revelada tem pelo menos 90% de identidade com as sequências SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:4, fragmentos ou variações das sequências ou uma combinação das mesmas. Os termos “fragmentos” e “variações das sequências” referem-se a peptídeos que são deduzidos das moléculas aqui reveladas e mostram as mesmas propriedades bioquímicas (por exemplo, atividade imunogênica para as espécies de carrapato *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Rhipicephalus decoloratus* e *Haemaphysalis longicornis*), são comparáveis ou idênticos as moléculas derivadas das quatro SEQ IDs aqui reveladas. O termo “variação de sequência” inclui modificações tais como fragmentação substituições de aminoácido (por exemplo, com outros aminoácidos naturais ou

não naturais ou derivados de aminoácido), anulações ou adições. "Variações de sequência" também referem-se às moléculas derivadas das SEQ IDs em que pelo menos 1, preferivelmente pelo menos 2, mais preferivelmente pelo menos 3, ainda mais preferivelmente pelo menos 4 resíduos de aminoácido estão alterados.

[0033] Em uma concretização da invenção as sequências de aminoácidos das proteínas Glutathione S-transferases, utilizadas na composição, compreendem a SEQ ID NO:1, ou SEQ ID NO:2, ou SEQ ID NO:3 ou a SEQ ID NO:4 ou uma combinação das mesmas.

[0034] Em outra concretização da composição imunogênica, as proteínas são as sequências de aminoácidos SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:4 ou uma combinação das mesmas.

[0035] Em uma concretização da invenção a concentração das proteínas utilizadas na composição imunogênica são de 0,001 a 5,0 mg/ml.

[0036] Em um segundo objeto a invenção revela um processo de produção da composição imunogênica compreendendo as seguintes etapas:

- a) Clonagem da região codificante dos genes das GST dos carrapatos *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus Appendiculatus*, *Haemaphysalis longicornis* e *Rhipicephalus decoloratus* em plasmídeos para expressão em sistema heterólogo;
- b) Expressão das proteínas recombinantes em um sistema expressão em sistema heterólogo;
- c) Purificação das proteínas recombinantes;
- d) Caracterização da antigenicidade e imunogenicidade das proteínas recombinantes;
- e) Formulação da composição imunogênica contendo mais de uma proteína;
- f) Realização de experimentos de vacinação de animais e desafio com carrapato para determinação da capacidade protetora da vacina.

[0037] Em um terceiro objeto a invenção revela um uso para a composição

imunogênica sendo ele para o biocontrole de carrapatos.

[0038] Em uma concretização o biocontrole de carrapatos ocorre via imunização dos animais hospedeiros de carrapatos na forma de uma vacina.

[0039] Em uma concretização a invenção descreve o uso da composição imunogênica para animais bovinos.

[0040] Em uma concretização a invenção descreve o uso da composição imunogênica para os carrapatos *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Rhipicephalus decoloratus* e *Haemaphysalis longicornis*.

Exemplos – Concretizações

[0041] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

[0042] Baseado nos dados prévios dos índices de proteção induzido pela glutathione S-transferase do *Haemaphysalis longicornis*. Os genes de GST dos carrapatos *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus* e *Rhipicephalus decoloratus* foram clonados e as proteínas expressadas em *Escherichia coli* e caracterizadas bioquimicamente. Anticorpos gerados contra as GST de *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus* e *Rhipicephalus decoloratus* reagiram contra GST de *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus Appendiculatus*, *Rhipicephalus decoloratus*, *Haemaphysalis longicornis*, *Rhipicephalus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*, justificando o uso de uma combinação de mais de uma GST em uma vacina contra diferentes espécies de carrapatos.

[0043] Para obter-se as sequências codificantes das GSTs, foi extraído o RNA total do ovário de *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus* e *Rhipicephalus decoloratus*, carrapatos economicamente importantes da África. Oligoiniciadores foram projetados para amplificar as sequências de GST através do cDNA obtido a partir dos RNA mensageiros de cada carrapato. Essas sequências foram inseridas em vetor de clonagem bacteriano e sequenciadas.

Após a determinação das sequências completas das GSTs, novos oligoiniciadores foram projetados para inserção das sequências de GSTs em vetores de expressão. Após a obtenção dos plasmídeos com insertos adequados, estes foram utilizados na transformação de cepas de *Escherichia coli* para expressão das proteínas recombinantes. As expressões foram realizadas em meio Luria Bertani com 1mM de IPTG por 6 horas a 37 °C e 160 rpm. As células bacterianas foram recuperadas e lisadas por sonicação. As proteínas das frações solúveis dos lisados foram purificadas por cromatografia de afinidade a glutationa. As amostras purificadas foram dialisadas em PBS e suas concentrações estimadas por espectrofotometria.

[0044] Coelhos foram imunizados com as GSTs recombinantes de *A. variegatum*, *R. decoloratus*, *R. appendiculatus*, *R. microplus* e *H. longicornis* para analisar a imunogenicidade e reconhecimento cruzado dessas proteínas. Após 3 inoculações, foram coletados os sangues dos coelhos para obtenção do soro. Análises sorológicas por Western blot revelaram que todas as GSTs testadas são imunogênicas. O maior nível de reconhecimento cruzado (em torno de 60%) foi verificado pelo soro anti-GST de *A. variegatum* e *R. decoloratus*, que reconheceram GSTs de *R. appendiculatus*, *R. microplus*, *H. longicornis* e *R. sanguineus* (figura 1). Por outro lado, o soro anti-GST de *R. appendiculatus* reconheceu cruzadamente apenas em torno de 20% as GSTs dos outros carrapatos.

[0045] Nos animais imunizados com uma composição de GSTs de *A. variegatum* e *R. decoloratus* foi observado anticorpos que reconheceram GSTs de *A. variegatum*, *R. decoloratus*, *A. variegatum*, *R. microplus* e *H. longicornis* (figura 2), mostrando que a imunização de duas GSTs induz anticorpos que reconhecem GST de cinco espécies de carrapatos.

[0046] As GSTs de *A. variegatum* e *R. decoloratus* foram selecionadas para um ensaio de vacinação multi-antigênico contra *R. sanguineus* em coelhos. Dois grupos de 3 coelhos foram inoculados com as GSTs recombinantes (grupo teste) ou apenas com veículo (grupo controle). Após 3 inoculações, os coelhos foram

infestados com carrapatos adultos de *R. sanguineus* (40 fêmeas e 40 machos por coelho). A vacina contendo as duas GSTs mostrou induzir uma resposta imune que causou uma redução de 37% na infestação pelo *Rhipicephalus sanguineus* em coelhos (tabela 1), comprovando o potencial do complexo de GSTs como antígeno em uma vacina.

Tabela 1: Parâmetros biológicos de fêmeas adultas de *Rhipicephalus sanguineus* alimentadas em coelhos imunizados com Av-GST e Ra-GST e coelhos controle.

| Grupos | Fêmeas adultas | | | |
|-----------------|-----------------------|-------------------|-------------|--------------|
| | Fêmeas alimentadas a | Peso das fêmeas b | Postura c | Ecloração d |
| Controle | 19,7 ± 3,0 | 85,5 ± 5,0 | 0,57 ± 0,02 | 0,09 ± 0,02 |
| Vacina | 12,3 ± 2,1 | 97,1 ± 5,5 | 0,56 ± 0,03 | 0,093 ± 0,02 |
| Redução | 37,3%* | -13,6% | 2,5% | -3,7% |

a Número de fêmeas alimentadas recuperadas nos coelhos (médias ± D.P.).

b Peso (mg) de fêmeas alimentadas (médias ± D.P.).

c Peso total dos ovos pelo peso total das fêmeas alimentadas.

d Peso total das larvas pelo peso total dos ovos.

*p < 0.05 (Student's t-test).

[0047] Assim sendo, o desenvolvimento de uma vacina contendo um complexo de glutatona S-transferase de diferentes carrapatos induziu bons índices de imunização contra uma infestação de carrapato de uma espécie diferente das GSTs utilizadas na imunização, mostrando a capacidade de uma vacina com um complexo de glutatona S-transferase induzir uma resposta imune com proteção heteróloga.

[0048] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes e alternativa

Reivindicações

1. Composição imunogênica **caracterizada** por compreender um complexo formado por proteínas Glutathione S-transferases de carrapatos ou peptídeos derivados, um adjuvante oleoso ou metálico em um veículo fisiologicamente aceitável.
2. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo dito complexo formado por proteínas Glutathione S-transferases serem de carrapatos *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Rhipicephalus decoloratus* e *Haemaphysalis longicornis*.
3. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, **caracterizada** por compreender proteínas com pelo menos 90% de identidade com as sequências SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:4, fragmentos ou variações das sequências ou uma combinação das mesmas.
4. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizada** pelas proteínas compreenderem as sequências de aminoácidos SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:4 ou uma combinação das mesmas.
5. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizada** pelas proteínas consistirem das sequências de aminoácidos SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:4 ou uma combinação das mesmas.
6. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizada** pelas ditas proteínas estarem presentes em concentração de 0,01 a 5,0 mg/ml.
7. Processo de obtenção de composição imunogênica conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** por compreender as seguintes etapas:
 - a) Clonagem da região codificante dos genes das GST dos carrapatos

Amblyomma variegatum, *Rhipicephalus Appendiculatus*, *Haemaphysalis longicornis* e *Rhipicephalus decoloratus* em plasmídeos para expressão em sistema heterólogo;

b) Expressão das proteínas recombinantes em um sistema expressão em sistema heterólogo;

c) Purificação das proteínas recombinantes;

d) Caracterização da antigenicidade e imunogenicidade das proteínas recombinantes;

e) Formulação da composição imunogênica contendo mais de uma proteína;

f) Realização de experimentos de vacinação de animais e desafio com carrapato para determinação da capacidade protetora da vacina.

8. Uso da composição imunogênica conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** por ser para o biocontrole de carrapatos.

9. Uso da composição imunogênica de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo dito biocontrole de carrapatos ocorrer via imunização de animais hospedeiros de carrapatos na forma de vacina.

10. Uso da composição imunogênica de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelos ditos animais serem bovinos.

11. Uso da composição imunogênica de acordo com a reivindicação 8 **caracterizado** pelos ditos carrapatos serem *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Rhipicephalus decoloratus* e *Haemaphysalis longicornis*.

Figuras

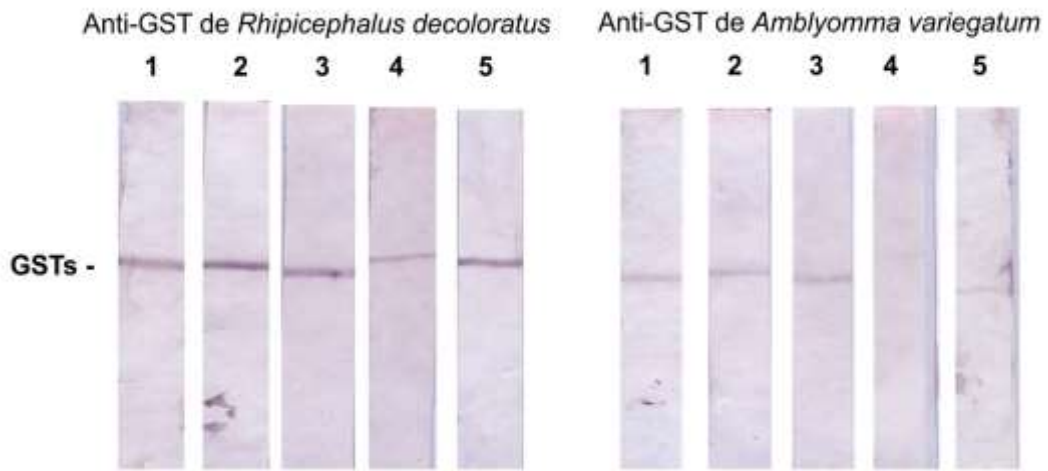


Figura 1

Elisa de GST de 5 espécies e carrapatos sondadas com soro obtido pela imunização de GSTs de *A. variegatum* e *R. decoloratus*

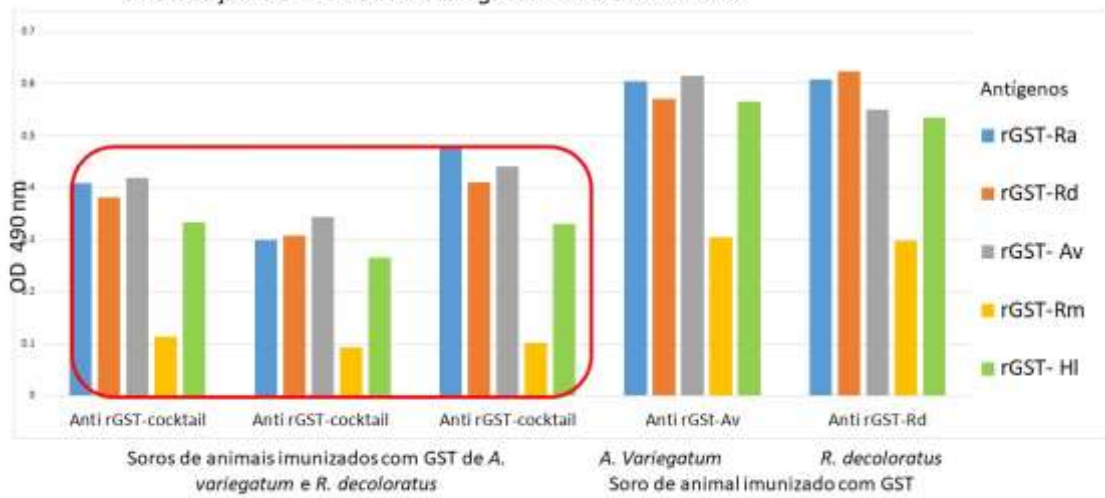


Figura 2

Resumo**COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE
COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA E USO DA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA**

A presente invenção refere-se a uma composição imunogênica compreendendo um complexo imunogênico formado por Glutathione S-transferases de carrapatos ou peptídeos derivados e seu uso para o controle de carrapatos. Mais especificamente, esse complexo foi obtido pelo isolamento de quatro proteínas de quatro espécies de carrapato, *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Rhipicephalus decoloratus* e *Haemaphysalis longicornis*. A invenção situa-se nos campos da Bioquímica, Biologia Molecular e Medicina Veterinária.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: UFRGS-ComplexoImunogênicoGlutathionaS-Transf-Listagem-
- Data de Geração do Código: 01/11/2018
- Hora de Geração do Código: 14:00:41
- Código de Controle:
 - Campo 1: 7EDEF04CE477C91B
 - Campo 2: A00F4D14BEB945C5