



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

(21) BR 102015017673-2 A2

(22) Data do Depósito: 24/07/2015

(43) Data da Publicação: 31/01/2017



* B R 1 0 2 0 1 5 0 1 7 6 7 3 A

(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):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE, INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA

(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

(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 α). 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. 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 α) 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 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 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 ressuspendidas 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 μ m 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.

GRUPO	CARRAPATOS (N)	CARRAPATOS (g)	POSTURA (g)	ECLOSÃO DE OVOS (%)
controle				
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
vacinado				
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 proteínas Bm05 e Bm86uy

2 - "VACINA CONTRA O CARRAPATO BOVINO" de acordo com a reivindicação 1, **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*

3 - "VACINA CONTRA O CARRAPATO BOVINO" de acordo com as reivindicações 1 e 2, **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

4 - "VACINA CONTRA O CARRAPATO BOVINO" de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizada pelo** fato das proteínas terem pelo menos 90% de identidade para as sequências definidas pela reivindicação 2

5 - "VACINA CONTRA O CARRAPATO BOVINO" de acordo com as reivindicações 1-4, **caracterizada pelo** fato das proteínas estarem presentes na concentração variando de 0,01 a 5,0 mg/ml

6 - "USO DE DUAS PROTEÍNAS" como definidas nas reivindicações de 1 a 5 **caracterizado por** ser em uma formulação de uma vacina contra o carrapato

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.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Nome do Requerente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<120> Título da invenção: Vacina contra o carrapato bovino contendo duas proteínas ou peptídeos derivados.

<160> Número de sequências constantes do pedido: 2 (duas)

<210> SEQ ID NO: 01

<211> tamanho: 177 aminoácidos

<212> Tipo: Proteína

<223> Fonte original da molécula: diversos tecidos do carrapato *Rhipicephalus microplus*

<400> SEQ ID NO: 01

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

<210> SEQ ID NO: 02

<211> tamanho: 656 aminoácidos

<212> Tipo: Proteína

<223> Fonte original da molécula: intestino do carrapato
Rhipicephalus microplus

<400> SEQ ID NO: 02

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

235 Arg Gly Phe Thr Val Ala Glu Asp Gly Ile Thr Cys Lys 247
248 Ser Ile Pro Tyr Pro Gly Gly Cys Thr Val Glu Gln Lys 260
261 Gln Thr Cys Arg Pro Thr Glu Asn Cys Arg Val His Ala 273
274 Gly Lys Val Leu Cys Glu Cys Pro Trp Asn Gln His Leu 286
287 Val Gly Asp Lys Cys Ile Gly Asp Cys Val Glu Asn Lys 299
300 Cys His Glu Glu Phe Thr Asp Cys Gly Val Tyr Met Asn 312
313 Arg Gln Ser Cys Phe Cys Pro Trp Lys Ser Arg Lys Pro 325
326 Gly Pro Asn Val Asn Ile Asn Ala Cys Leu Leu Asn Glu 338
339 Tyr Tyr Tyr Met Val Ser Phe Thr Pro Asn Ile Ser Leu 351
352 His Ser Asp His Cys Asp Trp Tyr Glu Asp Arg Val Leu 364
365 Glu Ala Ile Arg Thr Ser Ile Gly Lys Glu Val Phe Lys 377
378 Val Glu Ile Leu Asn Cys Thr Gln Asn Ile Lys Ala Arg 390
391 Leu Ile Ala Glu Lys Pro Leu Ser Lys His Val Leu Arg 403
404 Lys Leu Gln Ala Cys Glu His Pro Ile Gly Glu Trp Cys 416
417 Met Met Tyr Pro Lys Leu Leu Ile Lys Lys Asn Ser Ala 429
430 Thr Glu Ile Glu Glu Glu Asn Leu Cys Asp Ser Leu Leu 442
443 Lys Asn Gln Glu Ala Ala Tyr Lys Gly Gln Asn Lys Cys 455
456 Val Lys Val Asp Asn Leu Phe Trp Phe Gln Cys Ala Asp 468
469 Gly Tyr Thr Thr Thr Tyr Glu Met Thr Arg Gly Arg Leu 481
482 Arg Arg Ser Val Cys Lys Ala Gly Val Ser Cys Asn Glu 494
495 Asn Glu Gln Ser Glu Cys Ala Asn Lys Gly Gln Ile Cys 507
508 Val Tyr Glu Asn Gly Lys Ala Asn Cys Gln Cys Pro Pro 520
521 Asp Thr Lys Pro Gly Glu Ile Gly Cys Ile Glu Arg Thr 533
534 Thr Cys Asn Pro Lys Glu Ile Gln Glu Cys Gln Asp Lys 546

547 Lys Leu Glu Cys Val Tyr Lys Asn His Lys Ala Glu Cys 559
560 Lys Cys Pro Asp Asp His Glu Cys Ser Arg Glu Pro Ala 572
573 Lys Asp Ser Cys Ser Glu Glu Asp Asn Gly Lys Cys Gln 585
586 Ser Ser Gly Gln Arg Cys Val Met Glu Asn Gly Asn Ala 598
599 Val Cys Lys Glu Lys Ser Asp Ala Thr Thr Ala Ser Thr 611
612 Thr Thr Thr Lys Ala Lys Asp Lys Asp Pro Asp Pro Gly 624
625 Lys Ser Ser Ala Ala Ala Val Ser Ala Thr Gly Leu Leu 637
638 Leu Leu Arg Ala Ala Thr Ser Val Thr Ala Ala Ser Leu 650
651 His His His His His His

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



17D4DB265EA4DC5

Campo 2



9C5AAE2816050FA

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: listagem de sequencia.txt
- Data de Geração do Código: 22-07-2015
- Hora de Geração do Código: 11:13:36
- Código de Controle:
 - Campo 1: 17D4DB265EA4DC5
 - Campo 2: 9C5AAE2816050FA