



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. **EXPEDIENTE No.**

04130178

54. **TÍTULO**

**Antígenos Protectores Para el
control de infestaciones por especie
de ixods**

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

A61K39/00

71. **SOLICITANTE**

**The Board of Regents for
Oklahoma State University.**

DOMICILIO

Oklahoma (Estados Unidos)

74. **APODERADO**

Juan Pablo Cedeno

22. **BOGOTÁ, D. C.,**

Dic 30/04

2020X1

Juan Pablo Cedeno

Brigada f Goko SD

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 04130178 00000000

Folios: 50

Fecha (AMD): 2004-12-30 16:35:54

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACT 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

29-Nov-04

1

☒ Patente de Invención

SOLICITUD DE:

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I

☒ Capítulo II

ver folio 224

2

SOLICITANTE

(71)

Nombre: THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA
STATE UNIVERSITY

Dirección: 203 Whitehurst, Oklahoma
State University, Stillwater
OKLAHOMA 74078 - ESTADOS UNIDOS

Nacionalidad o domicilio: OKLAHOMA - ESTADOS UNIDOS

Lugar de Constitución:

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.

NIT

C.E.

Otro

Cual: _____

Número:

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS

Dirección: AV 22 No 37-31 Oficina 202

Teléfono: 244.40.96

Fax:

2.44.24.96

E-mail: jmda@mdelaw.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.

NIT

C.E.

Otro

Cual

Número: 19.270.956

T.P. 43.308 C.S.J

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: JOSE DE JESUS DE LA FUENTE
CATHERINE M. KOCAN
CONSUELO GARCÍA - ALMAZÁN
JOSE CARLOS GARCÍA - GARCÍA
EDMOUR F. BLOUIN

Dirección: VER ANEXO

Nacionalidad o Domicilio:

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US03/13229 Fecha 29 de Abril de 2003

Publicación Internacional No. WO 03/093416 Fecha 13-NOV-03

6

Título (54)

ANTÍGENOS PROTECTORES PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES POR ESPECIE
DE IXODES

7

Clasificación Internacional (51) A61K 39/00

8

Prioridad

SI

☐

NO

☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

29-04-2002

2002/0374251?

9

Comprobante de pago No. 04 - 94,986

\$422.000.00

Fecha:

Diciembre 9 de 2004

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

2020-F06 (02-04-01)

Fecha límite ingreso a fase
nacional: 2004-11-29

Publicación oficina americana: US 2004 022795
2004-02-05

10

ANEXOS

2

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☐

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones

☒

Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico

☐

Arte final 12X12 cm.

☐

De ser el caso, información de otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas total o parcialmente con la invención de esta solicitud.

☐

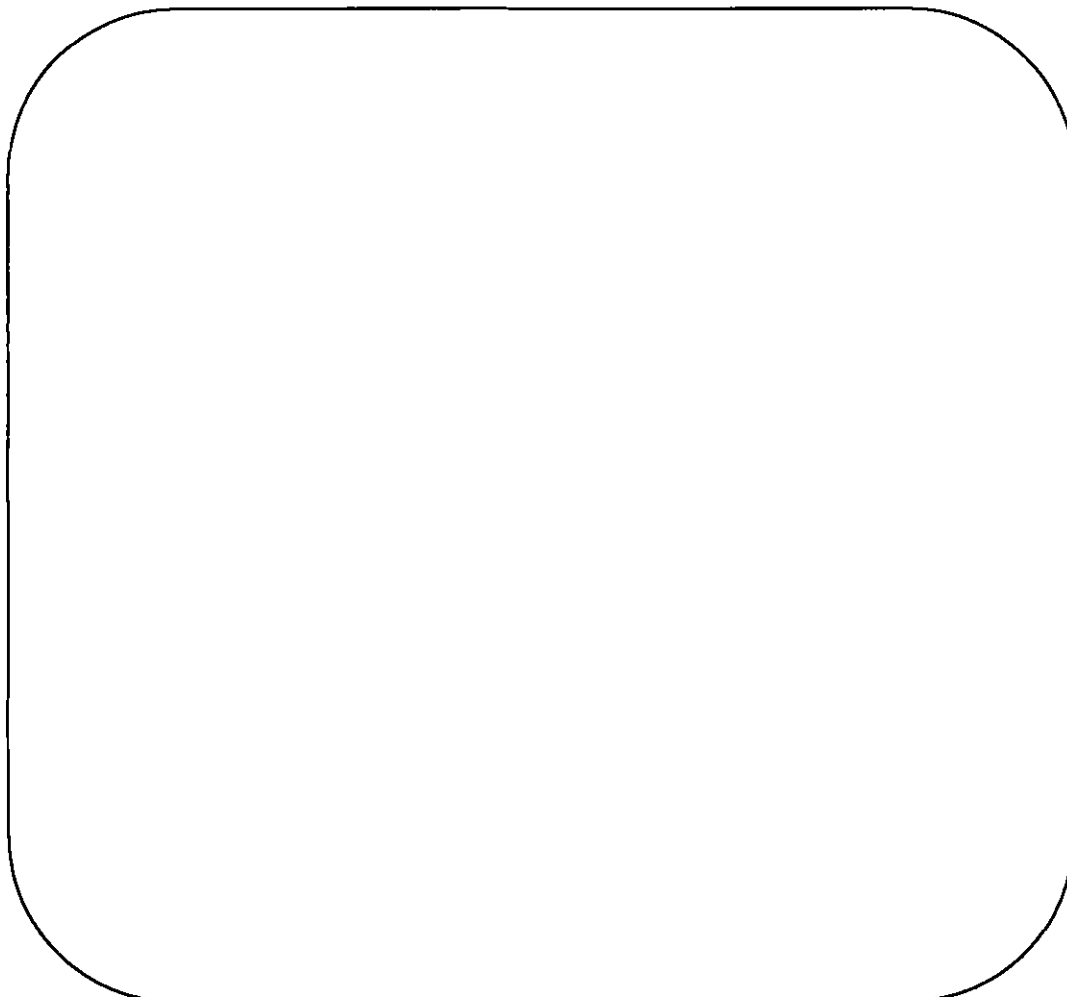
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional, Nuevas Reivindicaciones

☐

Otros: Informe de Búsqueda de Antecedentes Internacional

11

FIGURA CARACTERISTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS

FIRMA:

C.C. 19.270.955, T.P. 43.308

INVENTORES:

DE LA FUENTE, José de Jesús: 400 Squires Landing.

Apt. M-5 Stillwater, OK 74074 (US)

KOCAN Katherine, M.: 3909 E 92nd Street, Perkins.

OK 74059 (US)

GARCÍA - ALMAZAN, Consuelo: 835 Connel, Stillwater,

OK 74075 (US)

GARCÍA - GARCÍA, José Carlos: 700 W. Scott Ave..

Apt. 137. Stillwater, OK 74075 (US)

BLOUIN, Edmour, F.: 3909 E. 92nd Stree, Perkins,

OK 74059 (US)

4

Este recibo debe ser utilizado
Únicamente para tramites de
Mario Delgado Echeverry e Hijos Ltda.
Marca: Antígenos foliculares
para el control.....

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 94,986
FECHA : DICIEMBRE 9 DE 2004

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 84130176 00000000 Folios: 50
Fecha (AMD): 2004-12-30 16:35:54
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE HACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
MARIO DELGADO ECHEVERRY	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	31557180	09/12/2004	2,694,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
		TOTAL :	\$ 422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

"ANTÍGENOS PROTECTORES PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES POR ESPECIE DE *IXODES*"

Historial de la Invención

Campo Técnico:

- 5 La presente invención se refiere a la identificación de antígenos protectores contra infestaciones por garrapatas de la especie *Ixodes*, secuencias de genes y proteínas codificadas para estos antígenos; vacunas relacionadas y métodos útiles para inducir a una respuesta inmunológica; siendo estos protectores contra la
- 10 interferencia por garrapatas de la especie *Ixodes*.

Historial:

- Las garrapatas son parásitos de animales salvajes y domésticos y de los seres humanos, transmiten infecciones patógenas incluyendo hongos, bacterias, virus y protozoarios.
- 15 Actualmente, las garrapatas ocupan el segundo lugar en el mundo vector de enfermedades humanas con relación a los mosquitos, pero ellas son consideradas como el vector más importante de patógenos en América del Norte (Parola y Raoult, 2001). La especie *Ixodes* es distribuida mundialmente y actúa como vector de
- 20 enfermedades humanas causadas por la *Borrelia burgdorferi* (Enfermedad de Lyme); *Anaplasma phagocytophila* (erliquiosis granulocítica humana); *Coxiella burnetti* (fiebre Q); *Francisella tularensis* (tularemia); *B. afzelii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiaria* y *B. Garinii*; *Rickettsia helvetica*, *R. japonica* y *R. Australis*; *Babesia*
- 25 *divergens* y encefalitis originaria de la garrapata (TBE) y virus de la fiebre hemorrágica de Ornsk (Estrada-Pefia y Jongejan, 1999; Parola y Raoult, 2001). En el este y sudeste de los Estados Unidos y Canadá, *I. scapularis* (La garrapata de piernas negras ["the black legged tick"]) es el principal vector de *B. burgdorferi* "sensu stricto" y

A. phagocytophila (Estrada-Pefia y Jongejan, 1999; Parola y Raoult, 2001).

El control de infestaciones por garrapata es difícil y frecuentemente impracticable para garrapatas con huéspedes múltiples, tal como, la especie *Ixodes*. Actualmente, el control de garrapatas es efectuado por gestión integrada de plagas, en el cual son adaptados diferentes métodos de control para un área o contra una especie de garrapata, con la debida consideración para sus efectos ambientales. Recientemente, el desarrollo de vacunas contra la especie *Boophilus* de huésped único, proporcionó nuevas posibilidades para la identificación de antígenos protectores para inmunización contra infestaciones por garrapatas (Willadsen, 1997; Willadsen y Jongejan, 1999; de la Fuente y otros, 1999; 2000; de Vos y otros, 2001). El antígeno de intestino *B. microplus* BM86 incluido en formulaciones comerciales de vacuna TickGARD (Hoechst Animal Health, Australia) y Gavac (Heber Biotec S. A., Habana, Cuba); también comprueba protección parcial contra los géneros de garrapata *Hyalomma* y *Rhipicephalus* (De la Fuente y otros, 2000, de Vos y otros, 2001). Mientras tanto, la inmunización con BM86 falló al proteger contra la especie *Amblyomma* filogenéticamente más distante (de Vos y otros, 2001). Estos resultados sugieren que el uso del Bm86 o un gen próximo relacionado para la producción de vacunas contra la especie *Ixodes* u otros géneros de garrapata filogenéticamente distantes de la especie *Boophilus* (Black y Piesman, 1994); podría ser impracticable. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos antígenos protectores es necesaria para identificar los candidatos a vacuna contra infestaciones con estas especies de garrapata de importancia médica y veterinaria. El control de garrapatas por

vacuna podría evitar la contaminación ambiental y la selección de garrapatas resistentes a medicamentos que resultan de aplicaciones repetidas de acaricidas (de la Fuente y otros, 1998; Garcia-Garcia y otros, 1999). Las vacunas antigarrapatas también
5 permiten la inclusión de antígenos múltiples, para el alcance de una amplia gama de especies de garrapatas y para la incorporación de antígenos bloqueadores de patógenos.

La vacunación con moléculas de ADN y cADN fue usada para inducir una respuesta inmunológica protectora contra *B. microplus* y
10 varios patógenos en animales de laboratorio y ganado (De Rose y otros, 1999; Drew y otros, 1999; van Drunen Littel-van den Hurk y otros, 2001; Kofta y Wedrychowicz, 2001). Una nueva técnica, inmunización de biblioteca de expresión (ELI) en combinación con el análisis de secuencia, provee un método alternativo para la
15 identificación del antígeno de vacuna potencial, con base en la exploración rápida de los genes expresos sin conocimiento previo de los antígenos codificados por los clones de cADN. ELI fue relatada en primer lugar para *Mycoplasma pulmonis* (Barry y otros, 1995) y desde entonces ha sido utilizada para virus y patógenos
20 unicelulares y multicelulares (Manoutcharian y otros, 1998; Alberti y otros, 1998; Brayton y otros, 1998; Melby y otros, 2000; Smooker y otros, 2000; Moore y otros, 2002; Singh y otros, 2002). Sin embargo, la identificación de clones protectores individuales no fue relatada y está previsto que la identificación de antígenos
25 protectores será más difícil conforme aumente la complejidad de los genomas.

Aunque varios informes en la literatura han demostrado por ELI que bibliotecas pueden ofrecer un grado de protección (Barry y otros, 1995; Manoutcharian y otros, 1998; Alberti y otros, 1998;

Brayton y otros, 1998; Melby y otros, 2000; Smooker y otros, 2000; Moore y otros, 2002; Singh y otros, 2002); ningún informe aplicó ELI en artrópodos y específicamente, en garrapatas. Varias vacunas fueron desarrolladas para proteger seres humanos contra patógenos transmitidos por *Ixodes*, incluyendo virus TBE y *B. burgdorferi*. Sin embargo, no está claro si estas vacunas protegerán contra todas las clases de patógenos y genotipos. La inclusión de inmunógenos de garrapata en vacunas específicas al patógeno podría aumentar su efecto protector y aumentar su eficacia (Nuttall, 1999). Esta metodología de bloqueo de transmisión es soportada por la evidencia de que la resistencia del huésped a garrapatas produce alguna protección contra la transmisión originaria de la garrapata de virus y *B. burgdorferi* (Wikel y otros, 1997). Además de la vacuna contra la *B. microplus* demostró la contribución para el control de enfermedades originarias de garrapatas (de la Fuente y otros, 1998; 1999).

Sumario de la Invención

La presente invención está basada en nuestra identificación por ELI y por el análisis de secuencia de clones cADN protectores contra infestaciones experimentales con *I. scapularis*. Este es el primer ejemplo de la aplicación de ELI para artrópodos y específicamente, para garrapatas. Los antígenos protectores son homólogos a endopeptidasas, nucleotidasas, proteínas de corium, receptores vitelogenina, proteínas de reconocimiento de peptidoglicano, proteínas ricas en glutamina y alanina, proteínas ribosomales, β -adaptina, proteína precursora del Beta-amiloide, Bloqueo de proliferación (Bop1), lectina. canales de cloruro, polimerasas de ARN, ATPases y proteínas de choque por calor. Estos antígenos inducen una respuesta inmunológica en huéspedes

vacunados, interfiriendo tanto en el desarrollo de la garrapata como en la actividad proalimentación, la cual podría ser debido a la expresión de los cADN codificando inmunosupresores de la garrapata, anticoagulantes y otras proteínas con antigenicidad baja y actividad de proalimentación; o ellos podrían codificar las proteínas homólogas a las proteínas del huésped con actividad antigarrapata; cuya neutralización resulta en una actividad de proalimentación de la garrapata. Estos antígenos protectores, aunque identificados para *I. scapularis*, pueden tener protección cruzada entre especies de *Ixodes*, considerando el alto grado de conservación de secuencias de gen y función de proteína entre especies del mismo género. Una 5'-nucleotidasa fue identificada y caracterizada en *B. microplus* por Liyou y otros (1999; 2000); Pero ellos no analizaron su capacidad de protección. Aunque a primera vista sorprende la capacidad de protección de las preparaciones de proteína ribosomales y de choque por calor, fue documentada previamente en otros organismos (Elad y Segal, 1995; Silva, 1999; Melby y otros, 2000; Cassataro y otros, 2002) pero nunca en garrapatas. El efecto de la vacunación de cADN en infestación experimental por *I. scapularis* en ratones fue evidenciado por la reducción de la cantidad de larvas ingurgitadas, por el desarrollo retardado de las larvas, por la inhibición del cambio para etapas de ninfa y por el apareamiento de larvas con coloración roja visiblemente damnificadas. Estos efectos también, fueron registrados en experimentos de vacunación con BM86 y BM95 recombinantes contra infestaciones con *B. microplus*, incluyendo la coloración roja en algunas garrapatas, atribuida a la fuga de sangre para hemolinfa de la garrapata (Garcia-Garcia y otros, 2000). De esta manera, en una configuración de la presente invención, están

provistas secuencias de cADN, fragmentos de codificación de proteína de las mismas y secuencias de proteínas derivadas para antígenos protectores de *I. scapularis* comprendiendo antígenos homólogos a la endopeptidasas, nucleotidasas, proteínas de corium receptores vitelogenina, proteínas de reconocimiento de peptidoglicano, proteínas ricas en glutamina y alanina, proteínas ribosómicas, β adaptina, proteína precursora de Beta-amiloide, Bloqueo de proliferación (BOP1); lectinas, canales de cloruro, polimerasas de ARN, ATPases y proteínas de choque por calor.

10 En otra configuración de la presente invención, está provista una composición de vacuna comprendiendo las proteínas recombinantes protectoras *I. scapularis* y/o cADN modificados separadamente o que pueden opcionalmente ser combinados con adyuvantes, para aumentar la eficacia de protección de

15 preparaciones de vacuna contra la especie *Ixodes*, donde la composición de vacuna comprende aún un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. También, la composición de la vacuna puede, opcionalmente, ser combinada con componentes de patógeno originario de la garrapata para proveer un medio para

20 controlar las infecciones originarias de la garrapata, donde la composición de la vacuna comprende aún un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y un adyuvante.

En otra configuración de la presente invención, está provista un método para incluir una respuesta inmunológica en un mamífero

25 para proveer protección inmunológica, el cuál reduce o afecta las infestaciones por garrapatas de la especie *Ixodes* y/o transmisión de patógenos originarios de la garrapata; método que comprende la administración a una población de riesgo y reserva de mamíferos, de una cantidad eficaz de una composición de vacuna,

comprendiendo las proteínas recombinantes protectoras *I. scapularis* con un adyuvante o componentes de patógeno originaria de la garrapata para proveer un medio de control de infestaciones por garrapatas y para reducir la transmisión a los seres humanos de infecciones originarias de la garrapata, donde la composición de la vacuna comprende inclusive un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Para una mejor comprensión de la presente invención, así como de sus objetivos y ventajas, se mostrará con más claridad a los especializados en la técnica, a partir de la siguiente descripción detallada, donde se explica sólo la configuración preferida de la invención; simplemente a través de la ilustración de la mejor manera considerada para ejecutar la invención; Se observará que la invención puede ser modificada en varios aspectos, los cuales, no estarán fuera del alcance y espíritu de la invención. Consecuentemente, la descripción debe ser considerada como de naturaleza ilustrativa y no restrictiva.

Breve Descripción De los Dibujos

La Figura 1 es un resumen de la metodología de ELI de cADN usada para identificar antígenos protectores contra infestaciones por *I. scapularis*.

La Figura 2A es un gráfico ilustrando los resultados de una búsqueda primaria de agrupamientos de cADN (A-H, 1-4, A5) por ELI V, los ratones de control inyectados solamente con 1µg de vector de ADN. * $\alpha < 0,01$, ** $\alpha < 0,05$ (Prueba *post-hoc* de Tukey para comparaciones de par después de ANOVA).

Las cantidades en las cajas representan valores para la inhibición de infestación por garrapata, con relación al grupo de control.

La Figura 2B es un gráfico ilustrando los resultados de una búsqueda primaria de agrupamientos de cADN (A6-A10, B-H 5-8) por ELI V, ratones de control inyectados solamente con 1µg de vector de ADN. * $\alpha < 0,01$, ** $\alpha < 0,05$ (Prueba *post-hoc* de Tukey para comparaciones de par después de ANOVA).

Las cantidades en las cajas representan valores para la inhibición de infestación por garrapata, con relación al grupo de control.

La Figura 3 es un gráfico ilustrando los resultados de una búsqueda terciaria por ELI de subagrupamientos de cADN formados de acuerdo con la función prevista de proteínas codificadas. Apenas son mostrados grupos con $I \geq 15\%$ (barras blancas). La cantidad de larvas ingurgitadas por ratón está expresada como la media $\pm$ SD (barras negras). Los ratones de control fueron inyectados con cADN mitocondriales (MT). * $P \leq 0,05$ (t-prueba del Estudiante).

15 Descripción Detallada de la Invención

Antes de explicar detalladamente la presente invención, es importante comprender que ésta no está limitada en su aplicación a los detalles de la construcción ilustrada y de las etapas aquí descritas. La invención significa puede tener otras configuraciones y ser practicada o ejecutada de varias maneras. Es sobrentendido que la fraseología y terminología empleada aquí, tiene como objetivo su descripción y no su limitación.

La presente invención deriva de las secuencias presentadas en la Lista de Secuencia anexada a ella e incorporada aquí. En especial, están provistas 25 secuencias separadas y distintas, comprendiendo 14 moléculas cADN clonadas y 11 secuencias de aminoácidos deducidas de polipéptidos codificados, las referidas secuencias son aisladas e identificadas como poseedoras de la utilidad declarada, de acuerdo con la metodología experimental

descrita a continuación.

Ejemplo 1: Construcción de una biblioteca de cADN de I. scapularis y búsqueda de antígenos protectores por ELI.

Células de garrapata

- 5 Las monocapas de células IDE8 (ATCC CRL 1973) originalmente derivadas de *I. scapularis* embrionarios, fueron mantenidas a 31°C en medio L-15B complementado con 5% de suero bovino fetal, caldo de fosfato de triptosa y concentrado de lipoproteína bovina según Munderloh y otros. (1994). Las células
10 fueron subcultivadas a 1:5 – 1:10 cuando las monocapas alcanzaron una densidad de aproximadamente 10^7 células / frasco T-25. El medio fue substituido semanalmente.

Construcción de la biblioteca

- Una biblioteca de expresión de cADN fue construida en el
15 vector pEXP1 conteniendo el promotor CMV(ilegible) de citomegalovirus fuerte (Clontech). Debido al hecho de que planificamos alcanzar las etapas de larva iniciales de *I. scapularis*, elegimos construir nuestra biblioteca a partir de poli(A)+ARN derivadas de células IDE8 embrionarias de *I. scapularis* cultivadas.
20 La biblioteca de cADN contenía 4.4×10^6 clones independientes y una titulación de aproximadamente 10^{10} cfu/ml con más de 93% de los clones con inserciones de cADN. El tamaño promedio de cADN fue de 1,7 kb (0,5-4,0 kb).

Búsqueda primaria

- 25 El esquema general para identificación de antígenos protectores a través de ELI, fraccionamiento secuencial y análisis de secuencia es mostrado en la Figura 1.

Fueron preparadas noventa y seis placas LBA (maestro) conteniendo un promedio de 41 (30-61) clones de cADN por placa.

Asimismo, se realizaron réplicas y se agruparon los clones de cada placa, inoculados en Luria-Bertani con 50 µg de ampicilina, cultivados durante 2 h en una placa de 96 pocillos y ADN de plasmídeo purificado de cada pocillo (Sistema de purificación de ADN de plasmídeo Wizard SV 96, Promega, Madison, WI, EUA). Se utilizaron hembras de ratones BALB/c, con 5-6 semanas de edad en el momento de la primera vacunación. Los ratones fueron tratados de acuerdo con los estándares definidos en la "Guide for Care and Use of Laboratory Animals". Los ratones fueron inyectados con una jeringa de tuberculina de 1 ml y una aguja de calibre 27 en los días 0 y 14. Tres ratones por grupo fueron, inmunizados por inyección IM en la cadera con 1 µg de ADN/dosis en PBS 50 µl. Fueron incluidos como control, dos grupos de 3 ratones cada uno. Un grupo fue inyectado solamente con 1 µg de vector de ADN y el segundo sólo con solución salina. Dos semanas después de la última inmunización, los ratones fueron infestados con 100 larvas de *I. scapularis* por ratón. Las garrapatas fueron criadas artificialmente en las instalaciones de creación de garrapatas de "Oklahoma State University" a través de la alimentación de las larvas en ratones, ninfas en conejos y adultos en ovejas, usando para la infestación en nuestros experimentos, las larvas obtenidas de huevos desovados por una única hembra. Doce horas después de la infestación por garrapatas, las larvas que no fueron agregadas, fueron contadas para calcular la cantidad de larvas agregadas por ratón y los ratones fueron transferidos para nuevas jaulas. Las larvas saciadas que caían de cada ratón, fueron colectadas diariamente y contadas durante 7 días. La inhibición de la infestación por garrapatas (I) para cada grupo de prueba fue calculada con relación a los controles inmunizados con el vector, como $[1 - (n/c) \times$

$\frac{<RL>ic}{<RL>in}] \times 100$, donde $<RL>$ es la cantidad promedio de larvas saciadas recuperadas por ratones para cada grupo de prueba; $<RL>$ es la cantidad promedio de larvas saciadas, recuperadas por ratón para cada grupo de control; $<RL>$ es la cantidad promedio de larvas anexadas por ratón para el grupo de control y $<RL>$ es la cantidad promedio de larvas anexadas por ratón para cada grupo de prueba.

Los agrupamientos de 41 (30-61) clones de cADN de *I. scapularis* fueron examinados por ELI. Sólo 33 agrupamientos de cADN y controles fueron analizados por experimento. El nivel promedio de infestación por garrapata fue de 50 ± 13 y 56 ± 15 y 56 ± 15 y 54 ± 18 larvas / ratón para ratones inmunizados con cADN y ratones de control, respectivamente ($P > 0,05$) (Tabla 1). La cantidad promedio de larvas ingurgitadas recuperadas por ratón fue de 9 ± 3 y 13 ± 4 en los ratones inmunizados con cADN y 16 ± 4 y 17 ± 3 en el grupo inmunizado con el vector de control ($P < 0,05$) (Tabla 1).

Ninguna reducción fue observada en la cantidad de larvas colectadas de ratones que recibieron el ADN del vector si se compara con los controles inmunizados con solución salina. La cantidad máxima de larvas ingurgitadas fue colectada 3 a 4 días después de la infestación. Mientras tanto, en ratones inmunizados con los agrupamientos cADN B5, A8 y A10 (Figura 2) se registró un retardo en el desarrollo de las larvas de 1 a 2 días. La inhibición promedio de infestación por garrapata (I) fue de $49 \pm 28\%$ y $30 \pm 22\%$ (Tabla 1). Después de los experimentos abarcando el análisis de 66 agrupamientos (2705 clones) 9 agrupamientos protectores (351 clones) fueron seleccionados produciendo una inhibición de infestación por garrapata $\geq 60\%$ (Figura 2A y 2B y Tabla 1). Cuando

iniciamos estos experimentos, habíamos planificado explorar más de 4000 clones de cADN, considerando la complejidad del genoma de la garrapata. Mientras tanto, para nuestra sorpresa 9 agrupamientos de cADN protectores fueron identificados después de la búsqueda de 66 agrupamientos conteniendo 2705 clones de cADN. Este resultado probablemente refleja la posibilidad de interferir con la infestación por garrapata en muchos niveles diferentes que comprenden un grupo de productos de gene. Resultados de experimentos de vacunación contra garrapatas empleando antígenos recombinantes soportan esta visión (analizada por Mulenga y otros, 2000). Debido a la complejidad del procedimiento de búsqueda en ratones vacunados y desafiados con las larvas de garrapata, era difícil trabajar con más de 9 agrupamientos de cADN protectores. Por lo tanto, no continuamos la búsqueda de nuevos agrupamientos de cADN y enfocamos nuestra atención en los 9 agrupamientos seleccionados después de la búsqueda primaria.

Búsqueda secundaria

La búsqueda secundaria fue realizada para verificar la capacidad protectora de agrupamientos de cADN seleccionados después de la búsqueda primaria (Figura 2A y 2B). Después de la búsqueda primaria de 66 agrupamientos de cADN (2705 clones) fueron seleccionados 9 agrupamientos con $\geq 60\%$ para la búsqueda secundaria (nueva búsqueda); empleando 5 ratones por grupo, conforme lo descrito anteriormente. Para los cambios, fueron mantenidas las larvas ingurgitadas en una atmósfera de 95% de humedad. El cambio de las larvas fue evaluado por medio de un examen de las ninfas de la garrapata, bajo estéreomicroscopio después de 34 días de la última colecta de larvas. La inhibición del

cambio (M) para cada grupo de prueba fue calculada con relación a los controles inmunizados con vector como $[1-(ML_n/ML_c \times RL_c/RL_n)] \times 100$, donde ML_n es la cantidad de ninfas para cada grupo de prueba; ML_c es la cantidad de ninfas para el grupo de control, RL_c es la cantidad de larvas recuperadas para el grupo de control y RL_i es la cantidad de larvas recuperadas para cada grupo de prueba. Ratones de control fueron inmunizados con el agrupamiento de cADN F2 ($I=0\%$) negativo o sólo con solución salina. Fue incluido un grupo inmunizado por inyección SC con dos dosis de 100 μ g de proteínas de célula de la garrapata IDE8 total por dosis en adyuvante incompleto de Freund.

Los 9 agrupamientos de cADN protectores dieron resultados positivos en la búsqueda secundaria (datos no presentados). Los niveles de infestación por garrapata fueron más altos en este experimento (promedio de 85 ± 6 y 84 ± 3 larvas / ratones para ratones inmunizados con cADN y de control, respectivamente; $P > 0,05$). Sin embargo, la cantidad promedio de larvas ingurgitadas recuperadas por ratón fue de 39 ± 7 y 26 ± 6 para ratones de control e inmunizados con cADN, respectivamente ($P < 0,05$). El grupo inmunizado con proteínas de célula de la garrapata IDE8 total fue protegido con $I=33\%$. Nuevamente, ninguna reducción fue observada en la cantidad de larvas colectadas de ratones que recibieron el control de cADN (agrupamiento negativo F2 después de la búsqueda primaria; Fig. 2A) si se compara con los controles inmunizados con solución salina.

En la búsqueda secundaria, el cambio de las larvas ingurgitadas fue evaluado después de 34 días. El cambio fue afectado en todos los grupos, excepto en un grupo de prueba inmunizado con cADN. La inhibición del cambio en ratones

inmunizados con cADN de prueba, si se compara con el grupo inmunizado con cADN de control, sufrió una variación de 0% a 12% ($6\pm 4\%$). La inhibición del cambio fue más del 50% sólo en las larvas colectadas de ratones inmunizados con agrupamientos de cADN B5 y A10, que mostraron un retardo en el desarrollo de la larva de 1 a 2 días como en la búsqueda primaria. No se observó ninguna diferencia entre los ratones de control inmunizados con cADN y con solución salina. Entre las larvas que no se transformaron en ninfas, algunas estaban visiblemente damnificadas y presentaban una coloración roja intensa. El porcentaje de larvas rojas en ratones inmunizados con cADN sufrió una variación entre 3% y 18% ($7\pm 5\%$) mientras que en los grupos inmunizados con solución salina y cADN de control, las larvas rojas representaron el 6% y 4%, respectivamente.

15 *Búsqueda terciaria*

Para la búsqueda terciaria, 64 clones fueron agrupados en 16-subagrupamientos, cada uno conteniendo de 1 a 17 plasmídeos, de acuerdo con la función prevista de proteínas codificadas (por ejemplo, todos los plasmídeos que codificaron proteínas histona fueron agrupados juntos) y usados con 4 subagrupamientos; conteniendo 182 clones de función desconocida o con secuencias sin homología, con base de datos de secuencia, para inmunizar 4 ratones por grupo. Los ratones fueron inmunizados con 0,3 μg /plasmídeo/dosis en 50 μl de PBS y evaluados conforme lo descrito arriba. Los ratones de control fueron inmunizados con un agrupamiento de 20 plasmídeos conteniendo cADN mitocondriales.

Los niveles de infestación fueron similares en todos los grupos de prueba (72 ± 2 larvas / ratón) y en los ratones de control (69 ± 2 larvas / ratón) ($P>0,05$). La cantidad de larvas ingurgitadas

recuperadas por ratón también fue similar entre los ratones de prueba (16 ± 7) y de control (14 ± 6) ($P > 0,05$). Mientras tanto, los grupos inmunizados con subagrupamientos de cADN conteniendo clones con endopeptidasa, nucleotidasa, proteínas ribosomales, proteínas de choque por calor, proteínas ricas en glutamina y alanina putativas y 3 de los subagrupamientos con función desconocida o con secuencias sin homología con base de datos de secuencia tenían $I \geq 15\%$ (Figura 3). Además de esto, entre ellos, los grupos inmunizados con subagrupamientos conteniendo clones con una endopeptidasa, nucleotidasa putativa y dos de los subagrupamientos de cADN con función desconocida o con secuencias sin homología con base de datos de secuencia resultaron en niveles menores de infestación comparados con los ratones de control ($P \leq 0,05$) y $I \geq 40\%$ (Figura 3). Clones homólogos a proteínas de corium, receptores de vitelogenina y proteínas de reconocimiento de peptidoglicano fueron seleccionados por su capacidad de protección potencial en otras etapas de desarrollo de la garrapata.

Análisis estadístico

La cantidad de larvas anexadas por ratón y la cantidad de larvas ingurgitadas recuperadas por ratón, 7 días después de la infestación fueron comparados por Análisis de Variación (ANOVA) seguido de una serie de pruebas *post-hoc* de Tukey para comparaciones de par entre ratones inmunizados con cADN e inmunizados con vector de ADN de control (Búsqueda primaria) y por la prueba t del Estudiante entre ratones inmunizados con agrupamientos de cADN positivos y el agrupamiento de control negativo F2 cADN (Búsqueda secundaria) o entre ratones inmunizados con subagrupamientos de cADN de prueba y ratones

de control inmunizados con cADNA mitocondriales (Búsqueda terciaria).

Ejemplo 2: Análisis de la secuencia de clones protectores

Se efectuaron secuencias de los 351 clones de cADN en los
5 nueve agrupamientos que resultaron positivos en la búsqueda secundaria. El ADN de los clones individuales en estos agrupamientos fue purificado (sistema de purificación de ADN de plasmídeo Wizard SV 96, Promega) a partir de la placa principal (maestra) y la secuencia fue efectuada parcialmente. En la mayoría
10 de los casos, fue obtenida una secuencia mayor que 700 nucleótidos. Las secuencias de los nucleótidos fueron analizadas usando el programa AlignX (Vector NTI Suite V 5,5, InforMax, North Bethesda, MD, EUA). Fue utilizado BLAST (Altschul y otros, 1990) para investigar las bases de datos NCBI, con la finalidad de
15 identificar las secuencias previamente clonadas que puedan tener homología con aquellas colocadas en secuencia por nosotros. El análisis de la secuencia permitió el agrupamiento de los clones de acuerdo con la identidad de la secuencia para las bases de ADN y previó la función de proteína. Los clones protectores seleccionados
20 después de la búsqueda terciaria fueron colocados totalmente en secuencia.

La comparación con las bases de datos de la secuencia, permitió identificar secuencias con relación a los genes previamente relatados con la función conocida en 152 (43%) de los clones (Tabla
25 2). Cincuenta y siete por ciento de las secuencias eran homólogas a los genes con función conocida, 85% eran homólogas a las secuencias de artrópodos. Noventa y tres clones (61%) contenían secuencias homólogas a *Drosophila melanogaster*, 5 (3%) a otros insectos y 32 (21%) a especies de garrapata *Ixodes*. Treinta por

ciento de los clones fueron eliminados a partir del análisis adicional con base en su identidad de secuencia, incluyendo aquellos conteniendo secuencias similares (Tabla 2). Los clones protectores incluían antígenos homólogos a endopeptidasa, nucleotidasas, proteínas de corium, receptores de vitelogenina, proteínas de reconocimiento de peptidoglicano, proteínas ricas en glutamina y alanina, proteínas ribosomales y proteínas de choque por calor.

Resumen de los resultados

Los resultados obtenidos con los diversos clones protectores identificados en la Lista de Secuencia juntamente con ciertas proteínas seleccionadas expresas, están resumidas en la Tabla 4.

SEQ ID N^o: 1 Denota el clone designado 4E6, donde el fragmento codificando la proteína relevante fue identificado como comprendiendo los residuos 1-117, que codifican el polipéptido mostrado en la SEQ ID N^o: 2.

SEQ ID N^o: 3 Denota el clone designado 4D8, donde el fragmento codificando la proteína relevante fue identificado como comprendiendo los residuos 80-575, que codifican el polipéptido mostrado en la SEQ ID N^o: 4.

SEQ ID N^o: 5 Denota el clone designado 4F8, donde el fragmento codificando la proteína relevante fue identificado como comprendiendo los residuos 1-951, que codifican el polipéptido mostrado en la SEQ ID N^o: 6.

SEQ ID N^o: 7 Denota el clone designado 4G11, donde el fragmento codificando la proteína relevante fue identificado como comprendiendo los residuos 1-697, que codifican el polipéptido mostrado en la SEQ ID N^o: 8.

SEQ ID N^o: 9 Denota el clone designado 4D6, donde el fragmento codificando la proteína relevante fue identificado como

comprendiendo los residuos 198-1025, que codifican el polipéptido
mostrado en la SEQ ID N^o: 10.

SEQ ID N^o: 11 Denota el clone designado 3E1, donde el
fragmento codificando la proteína relevante fue identificado como
5 comprendiendo los residuos 3-578, que codifican el polipéptido
mostrado en la SEQ ID N^o: 12.

SEQ ID N^o: 13 Denota el clone designado 1C10, donde el
fragmento codificando la proteína relevante fue identificado como
comprendiendo los residuos 1-1119, que codifican el polipéptido
10 mostrado en la SEQ ID N^o: 14.

SEQ ID N^o: 15 Denota el clone designado 3E10, donde el
fragmento codificando la proteína relevante fue identificado como
comprendiendo los residuos 51-1544, que codifican el polipéptido
mostrado en la SEQ ID N^o: 16.

15 SEQ ID N^o:17 Denota el clone designado 4F11, donde el
fragmento codificando la proteína relevante fue identificado como
comprendiendo los residuos 31-2295, que codifican el polipéptido
mostrado en la SEQ ID N^o: 18.

SEQ ID N^o:19 Denota el clone designado 3C12, donde el
20 fragmento codificando la proteína relevante fue identificado como
comprendiendo los residuos 6-332, que codifican el polipéptido
mostrado en la SEQ ID N^o: 20.

SEQ ID N^o:21 Denota el clone designado 2C12, donde el
fragmento codificando la proteína relevante fue identificado como
25 comprendiendo los residuos 3-137, que codifican el polipéptido
mostrado en la SEQ ID N^o: 22.

SEQ ID N^os: 22, 23 24 denotan, respectivamente, los clones
1A9, 1B2 y 4A4, cada uno comprendiendo una secuencia parcial sin
polipéptido asociado.

Conforme lo mencionado anteriormente, la presente invención se refiere a las secuencias identificadas en la Lista de Secuencias. De forma general, la invención se refiere a las secuencias provistas de cADN y a cualquier secuencia de nucleótido codificando una proteína que sea capaz de hacer surgir un anticuerpo u otra respuesta inmunológica (por ejemplo, respuesta de la célula T del sistema inmunológico); el cual reconozca un epítipo(s) de las secuencias de aminoácido ilustradas en la Lista de Secuencia, incluyendo menos que las secuencias completas de cADN y mutantes de la misma. De esta manera, la secuencia de nucleótido puede codificar una proteína que sea el antígeno entero, codificado por las bases indicadas de forma variada; O un fragmento o derivado del antígeno o un producto de fusión del antígeno o fragmento y otra proteína, teniendo en cuenta que la proteína que sea producida de esta secuencia, sea capaz de hacer surgir un anticuerpo u otra respuesta inmunológica que reconozca un epítipo(s) de las secuencias de aminoácidos provistas.

Como un resultado, la invención abarca secuencias de ADN que son codificadas y/o expresas en células apropiadas transformadas, proteínas que puedan ser el antígeno en su longitud total, fragmento de antígeno o un producto de fusión de este antígeno, fragmento de antígeno o derivado de antígeno con otra proteína.

Proteínas incluidas dentro de la presente invención poseen una secuencia de aminoácido ilustrada en la Lista de Secuencia. Otras proteínas incluidas consisten de un fragmento de la referida secuencia capaz de hacer surgir un anticuerpo u otra respuesta inmunológica que reconozca un epítipo(s) de las secuencias de aminoácido ilustradas y un mutante de la referida secuencia capaz

de hacer surgir un anticuerpo u otra respuesta inmunológica que reconozca un epítipo(s) de estas secuencias de aminoácido.

Las secuencias de nucleótido pueden insertarse en cualquiera de una amplia variedad de vectores de expresión, por medio de
5 diversos procedimientos. Estos procedimientos y otros son considerados ya conocidos por los especializados en la técnica. Vectores adecuados incluyen secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas; por ejemplo, derivados de SV40; plasmídeos bacterianos; ADN de fagos; plasmídeo de fermento;
10 vectores derivados de combinaciones de plasmídeos y ADNS de fago, ADN viral tal como baculovirus, vacinia, adenovirus, virus de la varicela ("fowl pox"); pseudo-rabia, etc. La secuencia de ADN apropiada debe estar operativamente unida al vector en una secuencia(s) de control de expresión apropiada (promotor) para
15 dirigir la síntesis de mRNA. Como ejemplos representativos de estos promotores, pueden ser mencionados los promotores LTR o SV40, el lac o trp de *E. coli*, el promotor PL lambda de fago y otros promotores conocidos por controlar la expresión de genes en células procarióticas y eucarióticas o sus virus. El vector de
20 expresión también incluye una secuencia no codificadora para un local de ligación de ribosoma para iniciación de traducción y un finalizador de transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión.

El vector conteniendo la secuencia de cADN apropiada
25 conforme lo descrito anteriormente, así como un promotor o secuencia de control apropiado, puede ser empleado para transformar un huésped apropiado, de manera que permita que el huésped exprese la proteína. Ejemplos de organismos y células hospederas incluyen clases bacterianas (por ejemplo, *E. coli*,

Seudomonas, *Bacillus*, *Salmonella*, etc.); hongos (por ejemplo, fermentos y otros hongos); huéspedes animales o vegetales (por ejemplo, ratón, cerdo o células de tejido animal y humano). La selección del huésped es considerada por estar dentro del alcance
5 de aquellos especializados en la técnica.

También es entendido que la secuencia de cADN apropiada, presente en el vector cuando es introducida en un huésped, puede expresar parte o sólo una porción de la proteína, que es codificada dentro de la terminología indicada; Siendo suficiente que la proteína
10 expresa sea capaz de hacer surgir un anticuerpo u otra respuesta inmunológica que reconozca un epítipo(s) de las secuencias listadas de aminoácido.

Los cADNS aislados y/o polipéptidos expresados por el huésped transformado por el vector pueden ser colectados por
15 métodos que ocurrieron con aquellos especializados en la técnica y usados como una vacuna para protección de un mamífero, tal como un bovino, porcino, ser humano, etc., contra la infestación de la especie *Ixodes*. Estas proteínas recombinantes protectoras y/o cADN modificados son usadas en una cantidad eficaz para inducir
20 una respuesta inmunológica contra las garrapatas de la especie *Ixodes* y sus patógenos asociados, pueden usarse en combinación con un vehículo adecuado fisiológicamente aceptable. El término "inducir una respuesta inmunológica" cuando es utilizado con relación a la vacuna descrita aquí, significa que la vacuna impide la
25 enfermedad asociada con una especie de garrapata específica o reduce la gravedad de la enfermedad.

El vehículo empleado en conjunto con la vacuna puede ser cualquiera de una amplia variedad de vehículos. Como ejemplos representativos de vehículos adecuados, puede mencionarse el

aceite mineral, polímeros sintéticos, etc. Vehículos para vacunas son ampliamente conocidos en la técnica y la selección de un vehículo adecuado es considerado por estar dentro del alcance de aquellos especializados en la técnica. La selección de un vehículo
5 adecuado también depende de la manera en la cual la vacuna debe ser administrada.

La presente invención provee un método de inmunización de un mamífero susceptible, contra las infestaciones y enfermedad causada por la especie *Ixodes* con la vacuna descrita arriba. Para
10 alcanzar los objetivos de esta invención, la vacuna es administrada en una cantidad eficaz. La vacuna puede ser administrada por cualquiera de los métodos bien conocidos de aquellos especializados en la técnica, por ejemplo, por inyección intramuscular, subcutánea, intraperitoneal o intravenosa.
15 Alternativamente, la vacuna puede ser administrada por vía intranasal u oralmente. También es comprendido que la vacuna puede incluir componentes activos, tales como, componentes de patógenos originados de las garrapatas o adyuvantes en adición al antígeno(s) o fragmentos descritos anteriormente aquí.

20 El huésped expresando el antígeno puede ser utilizado para transmitir el antígeno a animales no humanos, a través de la introducción de células de huésped muertas o viables que sean capaces de propagarse en el animal. La incorporación directa de las secuencias de cADN en las células hospederas también puede ser
25 utilizada para introducir las secuencias en células animales para expresión de antígeno *in vivo*.

Bibliografía

Las siguientes referencias son incorporadas como referencia:
Alberti E, Acosta A, Sarmiento ME, Hidalgo C, Vidal T, Fachado A,

- Fonte L, Izquierdo L, Infante JF, Finlay CM, Sierra G. *"Imunoresposta celular e humoral específica em camundongos Balb/c imunizados com uma biblioteca genômica de expressão de Trypanosoma cruzi."* Vaccine 1998; 16: 608-12.
- 5 Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. *"Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico."* J Mol Biol 1990; 215: 403-10.
- Barry MA, Lai, WC, Johnston AS, *"Protección contra la infección por micoplasma utilizando inmunización con biblioteca de expresión."*
- 10 Nature 1995; 377: 632-5.
- Black WC IV, Piesman J. *"Filogenia de taxonomías de garrapatas blandas y duras (Ácaros: Ixodidae) con base en secuencias de 16S rADN mitocondriales."* Proc Natl Sci U S A 1994; 91: 10034-8.
- Brayton KA, Vogel SW, Allsopp BA, *"Inmunización por biblioteca de expresión para identificar los antígenos protectores de Cowdria ruminantium."* Ann N Y Acad Sci 1998; 849: 369-71.
- Cassataro J, Velikovsky CA, Giambartolomei GH, Estein S, Bruno L, Cloeckert A, Bowden RA, Spitz M, Fossati CA. *"Imunogenicidad de la proteína del factor homólogo de la ribosoma recombinante de*
- 20 *Brucella melitensis y su cADN."* Vaccine 2002; 20: 1660-9.
- de la Fuente J, Rodriguez M, Redondo M, Montero C, Garcia-Garcia JC, Mendez L, Serrano E, Valdes M, Enriquez A, Canales M, Ramos E, Boue O, Machado H, Leonart R, de Armas CA, Rey S, Rodriguez JL, Artilles M, Garcia L, *"Estudos de campos e análises*
- 25 *custo-efetivas de vacinação contra carrapato bovino com Gavac" Boophilus microplus.* Vaccine 1998; 16: 366-73.
- de la Fuente J, Rodriguez M, Montero C, Redondo M, Garcia-Garcia JC, Mendez L, Serrano E, Valdes M, Enriquez A, Canales M, Ramos E, Boue O, Machado H, Leonart R, *"Vacinação contra*

- carrapato (Boophilus spp.): a experiência com a vacina Gavac à base de Bm86.*" Genet Anal 1999; 15: 143-8.
- de la Fuente J, Rodríguez M, Garcia-Garcia JC, "Controlé imunológico de carrapatos por meio de vacinação com antígenos intestinais de *Boophilus microplus*." Ann N Y Acad Sci 2000; 916: 617-21.
- De Rose R, McKenna RV, Cobon G, Tennent J, Zakrewski H, Galé K, Wood PR, Scheerlinck JP, Willadsen P. "Antígeno Bm86 induce una inmuno-respuesta protectora contra *Boophilus microplus* después de la vacunación de ADN y proteínas en ovejas." Vet Immunol immunopathol 1999; 71: 151-60.
- De Vos S, Zeinstra L, Taoufik O, Willadsen P, Jongejan F. "Evidencia de la utilidad de antígeno Bm86 de *Boophilus microplus* en la vacunación contra otras especies de garrapata." Exp Appl Acarol 2001; 25: 245-61.
- Drew DR, Lighttowers M, Strugnelli RA. "Vacunación con antígeno expresivo de plasmídeo ADN a partir de formas genómicas o de gen de cADN induce inmuno-respuestas humorales equivalentes." Vaccine 1999; 18: 692-702.
- Elad D, Segal E. "Inmunogenicidad en becerros de fracción ribosomal cruda de *trichophyton verrucosum*: una selección de campo." Vaccine 1995; 13: 83-7.
- Estrada-Peña A, Jongejan F. "Garrapatas alimentándose de sangre humana: Un análisis de los registros de *Ixodoidea* que pican a humanos con referencia especial a transmisión patogénica." Exp Appl Acarol 1999; 23: 685-715.
- Garcia-Garcia JC, Gonzalez IL, Gonzalez DM, Valdes M, Mendez L, Lamberti J, D'Agostino B, Citroni D, Fragoso H, Ortiz M, Rodriguez M, de la Fuente J. "Variaciones secuenciales en los lugares del

- Bm86 del Boophilus microplus y las implicaciones en la inmunoprotección del ganado vacunado con este antígeno.* Exp Appl Acarol 1999; 23: 883-95.
- Kofta W, Wedrychowicz H. "Vacunación c-ADN contra infecciones parasíticas: Ventajas y desventajas". Vet Parasitol 2001; 100: 3-12.
- Liyou N, Hamilton S, Elvin C, Willadsen P, "Clonado y expresión de ecto 5'-nucleotidasa de la garrapata bovina *Boophilus microplus*", Insect Mol Biol 1999; 8: 257-66.
- Liyou N, Hamilton S, McKenna R, Elvin C, Willadsen P, "Localización y estudios funcionales sobre el 5'-nucleotidasa de la garrapata bovina *Boophilus microplus*." Exp Appl Acarol 2000; 24: 235-46.
- Manoutcharian K, Terrazas LI, Gevorkian G, Govezensky T, "Protección contra cisticercosis murina utilizando inmunización con biblioteca de expresión de cADN." Immunol Lett 1998; 62: 131-6.
- Melby PC, Ogden GB, Flores HA, Zhao W, Geldmacher C, Biediger NM, Ahuja SK, Uranga J, Melendez M. "Identificación de candidatos a la vacuna para leishmaniosis visceral experimental por inmunización con fracciones secuenciales de una biblioteca de expresión de cDNA." Infect Immun 2000; 68: 5595-602.
- Moore RJ, Ienghaus C, Sheedy AS, Doran TJ. "Vectores perfeccionados para la aplicación de inmunización de biblioteca de expresión para la infección *Mycoplasma hyopneumoniae* en puercos." Vaccine 2001; 20: 115-20.
- Munderloh UG, Wang YLM, Chen C, Kurtti TJ. "Establecimiento, mantenimiento y descripción de líneas celulares de la garrapata *Ixodes scapularis*." J Parasitol 1994; 80: 533-43.
- Nuttal PA. "Interacciones patógeno-garrapata-huésped: *Borrelia burgdoferi* y virus TBE." Zentralbl Bakteriol 1999; 289: 492-505.

- Parola O, Raoult D. "*Doenças bacterianas vindas do carrapato que surgiram na Europa.*" Clin Microbiol Infect 2001; 7: 80-3.
- Silva CL. "*O uso potencial de proteínas de choque de calor para a vacinação contra infecções micobacterianas.*" Microbes and Infection 1999; 1: 429-35.
- Singh RA, Wu L, Barry MA. "*Generación de respuestas celulares CD8 T por el genoma en ratones transgénicos HLA-A *0201 por una vacuna de inmunización de la biblioteca de expresión HIV-1 ubiquitina.*" Immunol 2002; 168: 379-91.
- 10 Smooker PM, Setiady YY, Rainczuk A, Spithill TW. "*Inmunización de bibliotecas de expresión protege ratones contra un desafío con malaria virulenta de roedores.*" Vaccine 2000; 18: 2533-40.
- van Drunen Littel-van den Hurk S, Loehr BI, Babiuk LA. "*Inmunización de stock vivo con vacunas de ADN: Estudios actuales y prospectos futuros.*" Vaccine 2001; 19: 2474-9.
- 15 Wikel SK, Ramachandra RN, Bergman DK, Burkot TR, Piesman J. "*Infestación con ninfas libres de patógeno de la garrapata Ixodes scapularis induce la resistencia del huésped a la transmisión de Borrelia burgdoferi por garrapatas.*" Infect Immun 1997; 65: 335-8.
- 20 Willadsen P. "*Nuevas vacunas para ectoparásitos.*" Vet Parasitol 1997; 71: 209-22.
- Willadsen P, Jongejan F. "*Inmunología de la interacción garrapata-huésped y el control de garrapatas y enfermedades llegadas de la garrapata.*" Parasitol Today 1999; 15: 258-62.
- 25 Tabla 1. Selección primaria de la biblioteca de *I. scapularis* cADN por ELI en ratones.

Grupo experimental ¹	Cantidad de acumulación pasados por la selección (Números de clones)	Promedio ± SD número de larvas agregadas por ratón ²	Promedio ± SD número de larvas digeridas por ratones ³	Promedio ± SD inhibición de infestación de garrapata (I) ⁴	Número de pocillos seleccionados para la selección secundaria
---------------------------------	--	---	---	---	---

¹ Fueron preparados noventa y seis placas LBA
conteniendo un promedio de 41 cADN por placa. También se
5 realizaron réplicas y los clones de cada placa fueron acumulados,
inoculados, cultivados durante 2 horas en una placa de 96 pocillos y
plasmídeo ADN purificado de cada acumulación de ELI. Se
inmunizaron tres ratones por grupo, cada uno dos veces con 1 µg
de ADN/dosis en 50 µl de PBS durante dos semanas no
10 consecutivas. Dos grupos de 3 ratones cada uno, fueron incluidos
como controles. Un grupo recibió inyección de vector ADN y el otro
recibió sólo una inyección salina.

² Quince días después de la última inmunización, los
ratones fueron infestados con 100 larvas de *I. scapularis* por ratón.
15 Doce horas más tarde, las larvas que no se agregaron fueron
contadas para calcular la cantidad de larvas agregadas por ratón y
luego los ratones fueron transferidos para nuevas jaulas.

³ Las larvas devoradas que salían de cada ratón se
colectaban diariamente contadas después de 7 días.

20 ⁴ La inhibición de infestación de la garrapata (I) de cada
grupo de prueba fue calculada con relación a los controles vector-
inmunizados por la fórmula $[1-(RL_n/RL_c \times RL_i/RL_{in})] \times 100$, donde
RL_n es la cantidad promedio de larvas repletas recuperadas por
ratón en cada grupo de prueba, RL_c es la cantidad promedio de

larvas repletas recuperadas por ratón por grupo de control, RLic es la cantidad promedio de larvas agregadas por ratón por grupo de control y RLin es la cantidad promedio de larvas agregadas por ratón en cada grupo de prueba.

Experimento 1	33 (1383)	50±13 (33 – 80)	9±3 (2 – 42)	39±55% (- 183 – 87%)	6 (>75%)
Controles inmunizados de ADN del vector para experimento 1	-----	56±13 (45 – 67)	16±4 (5 - 27)	-----	-----
Experimento 2	33 (1322)	56±15 (29-79)	13±4 (1 - 27)	27±28% (-53 – 89%)	3 (>60%)
Controles inmunizados de ADN del vector para experimento 2	-----	54±18 (36 – 73)	17±3 (6 - 28)	-----	-----

Tabla 2. Clasificación de los clones en acumulaciones protectoras por función de proteína putativa de acuerdo con la identidad de los base de datos secuenciales.

Función de proteína putativa	Número de clones
Biosintética	2
Catabolismo	4
Adhesión celular	2
Ciclo celular ^a	2
Citoesqueletal ^a	8
Defensa	2
Estructura o replicación de ADN ^a	3
Matriz extracelular	3
Endocitosis	2
Metabolismo energético	10
Homeostasis	2
Morfoгенética	9
Mitocondrial ^a	34
Síntesis o procesamiento de proteína ^{a, b}	34
Síntesis o procesamiento de ARN ^a	7
Proteínas de choque de calor	4
Transducción de señales	16
Transporte	8
Desconocido	199
TOTAL	351

¹ Eliminada de la selección posterior de los antígenos protectores. Otros clones fueron eliminados por contener secuencias similares.

^b Excepto para proteínas ribosomales.

5 Tabla 3. Agrupamiento de los clones de acuerdo con la función pronosticada de proteínas codificadas en subacumulación de la selección terciaria.

Subacumulación (N° de Clones)	Clone	Acumulo ¹
Ribosomal	1A2, 1A10, 1C11 1F6 2F8, 2F10 3A10, 2C3, 3D2, 3D10 3G9, 3G10 4D11, 4D12, 4E7	A5 D1 A10 E8 B4 E3 F1
Proteína de membrana (7)	1D8, 1D11, 1E10 2B12 2H5 3C9 3G11	D1 A10 E8 B4 E3
ATPase (6)	1A9, 1B2, 1C9 2C9 4A4 4G12	A5 A10 C3 F1
Canal celular / transportador (5)	1F4 2H11 4A12 4G10, 4G11	D1 E8 C3 F1
Desarrollo-específico prematuro (4)	1C8 3F4 4C7 4G9	A5 E3 C3 F1
Receptor acoplado a la proteína G (4)	2B7, 2C12 2F12	A10 E8

¹ Acumulación de cADN se refiere a acumulación positiva después de las selecciones primaria y secundaria (Fig. 2A y 2B).

	4C9	C3
Receptor del factor de crecimiento (3)	2E8 3B8, 3C8	B5 B4
Lectina (3)	3E10 4E8, 4C8	E8 C3
Vitelogenina (3)	1F12	D1

	4A6 4G2	C3 F1
Choque de calor (3)	1C10 1F10 3F6	A5 D1 E3
Semejante a EGF (2)	2H4 4C10	E8 C3
Proteína secretada (2)	2F9 3C12	E8 B4
Rico en Glutamina y Alanina (2)	4D6, 4E6	F1
Adaptina (1)	3E1	E3
Endopeptidasa (1)	4D8	F1
nucleotidasa (1)	4F8	F1

Tabla 4: Resumen de los resultados con los clones *I. scapularis*.

Clon de cADN	Proteína pronosticada	Inhibición de infestación de garrapata	Inhibición de retoño	Eficacia
4D8	Endopeptidasa	40*/54**	7*/8**	44**/58**
4F8	nucleotidasa	50*/54**	17*/-9**	58*/61**
1C10	HSP70	17*	ND	ND
4D6	Rico en Glu-Ala	61*	11	66*
4E6	Rico en Glu-Ala	20*/46*	16**	55**
3E1	B-adaptina (región del apéndice)	27*	5*	31*
2C12	Proteína precursora beta-amiloide (APP)	-8***	ND	ND
4F11	Bloqueo de proliferación Bop 1	-39***	ND	ND
3E10	Lectina de ligación de manosa	-48*/-10***	ND	ND
4G11	Canal de cloruro	38***	30	57
3C12	Polimerasa de ARN III	-104***	ND	ND
1A9, 1B2, 4A4	ATPase	-57***	ND	ND

Los ratones fueron inmunizados con ADN de plasmídeo de expresión conteniendo cADN conforme es descrito arriba (*) o con 5 100 µg/dosis de proteína recombinante expresada en *E. coli* (**). I, M y E fueron calculados conforme se describe anteriormente. ND quiere decir “no determinado”.

*** Resultado de una actividad pro-alimentación. Este efecto se debe a la expresión de codificación de cADNA para

inmunosupresantes de garrapata, anticoagulantes y otras proteínas con baja antigenicidad y actividad pro-alimentación. Alternativamente, ellos pueden codificar homólogos de proteínas para hospedar proteínas con actividad antigarrapata, donde la
5 neutralización resulta en una actividad pro-alimentación.

Con relación a lo expuesto anteriormente, se notará que son alcanzados los diversos objetivos de la invención y que otros resultados ventajosos son evidentes. Como pueden realizarse varias alteraciones en las moléculas, proteínas de ADN anteriores,
10 etc. sin salir del alcance de la invención, la intención es que todas las materias contenidas en la descripción anterior o exhibidas en los dibujos anexados deben ser interpretadas como ilustrativas y no en un sentido limitativo. Después de describir la invención con un cierto grado de particularidad, se comprende que ésta no se limita a la(s)
15 configuración(es) establecida aquí, para propósitos de ejemplificación, pero debe limitarse sólo al alcance de la reivindicación o reivindicaciones en anexo, incluyendo el rango completo de equivalencia al cual cada elemento de reivindicación es titulado.

REIVINDICACIONES:

1. Una molécula aislada de cADN que codifique un polipéptido antigénico asociado al *Ixodes*, donde la referida molécula tenga una secuencia de nucleótido que comprenda por lo menos los residuos
5 1-117 de la SEQ ID NO: 1.
2. Un vector de expresión que comprenda la molécula de cADN aislada de la reivindicación 1.
3. Una célula aislada transformada por el vector de expresión de la reivindicación 2.
- 10 4. Una vacuna que comprenda una cantidad inmunizante eficaz de inmunógeno seleccionado a partir del grupo que contiene (i) la molécula de cADN aislada de la reivindicación 1, (ii) el polipéptido codificado por la molécula de cADN aislada de la reivindicación 1 y (iii) una combinación de la molécula de cADN aislada de la
15 reivindicación 1 y el polipéptido codificado, que comprenda inclusive un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
5. Un método de inducción de inmuno-respuesta en mamíferos contras las garrapatas de las especies *Ixodes* y sus patógenos asociados, que comprenda la administración de la vacuna de la
20 reivindicación 4 para mamíferos.
6. El polipéptido codificado por la molécula de cADN aislada de la reivindicación 1.
7. Una molécula de cADN que codifique un *Ixodes* asociado al polipéptido antigénico, donde la referida molécula tenga una
25 secuencia de nucleótido que comprenda por lo menos los residuos 80-575 de la SEQ ID NO: 3.
8. Un vector de expresión que comprenda la molécula de cADN aislada de la reivindicación 1.
9. Una célula aislada transformada por el vector de expresión de la

reivindicación 8.

10. Una vacuna que comprenda una cantidad inmunizante eficaz de inmunógeno seleccionado a partir del grupo que contiene (i) la molécula de cADN aislada de la reivindicación 7, (ii) el polipéptido
5 codificado por la molécula de cADN aislada de la reivindicación 7 y (iii) una combinación de la molécula de cADN aislada de la reivindicación 7 y el polipéptido codificado, que comprenda inclusive un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
11. Un método de inducción de inmuno-respuesta en mamíferos
10 contras las garrapatas de las especies *Ixodes* y sus patógenos asociados, que comprenda la administración de la vacuna de la reivindicación 10 a mamíferos.
12. El polipéptido codificado por la molécula de cADN aislada de la reivindicación 7.
- 15 13. Una molécula de cADN que codifique un *Ixodes* asociado al polipéptido antigénico, donde la referida molécula tenga una secuencia de nucleótido que comprenda por lo menos los residuos 10-951 de la SEQ ID NO: 5.
14. Un vector de expresión que comprenda la molécula de cADN
20 aislada de la reivindicación 13.
15. Una célula aislada transformada por el vector de expresión de la reivindicación 14.
16. Una vacuna que comprenda una cantidad inmunizante eficaz de inmunógeno seleccionado a partir del grupo que contiene (i) la
25 molécula de cADN aislada de la reivindicación 13, (ii) el polipéptido codificado por la molécula de cADN aislada de la reivindicación 13, y (iii) una combinación de la molécula de cADN aislada de la reivindicación 13 y el polipéptido codificado, que comprenda inclusive un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

17. Un método de inducción de inmuno-respuesta en mamíferos contras las garrapatas de las especies *Ixodes* y sus patógenos asociados, que comprenda la administración de la vacuna de la reivindicación 16 a mamíferos.
- 5 18. El polipéptido codificado por la molécula de cADN aislada de la reivindicación 13.
19. Una molécula de cADN que codifique un *Ixodes* asociado al polipéptido antigénico, donde la referida molécula tenga una secuencia de nucleótido que comprenda por lo menos los residuos
- 10 1-697 de la SEQ ID NO: 7.
20. Un vector de expresión que comprenda la molécula de cADN aislada de la reivindicación 19.
21. Una célula aislada transformada por el vector de expresión de la reivindicación 20.
- 15 22. Una vacuna que comprenda una cantidad inmunizante eficaz de inmunógeno seleccionado a partir del grupo que contiene (i) la molécula de cADN aislada de la reivindicación 19, (ii) el polipéptido codificado por la molécula de cADN aislada de la reivindicación 19, y (iii) una combinación de la molécula de cADN aislada de la
- 20 reivindicación 19 y el polipéptido codificado, que comprenda inclusive un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
23. Un método de inducción de inmuno-respuesta en mamíferos contras las garrapatas de las especies *Ixodes* y sus patógenos asociados, que comprenda la administración de la vacuna de la
- 25 reivindicación 22 a mamíferos.
24. El polipéptido codificado por la molécula de cADN aislada de la reivindicación 19.
25. Una molécula de cADN que codifique un *Ixodes* asociado al polipéptido antigénico, donde la referida molécula tenga una

- secuencia de nucleótido que comprenda por lo menos los residuos 198-1025 de la SEQ ID NO: 9.
26. Un vector de expresión que comprenda la molécula de cADN aislada de la reivindicación 25.
- 5 27. Una célula aislada transformada por el vector de expresión de la reivindicación 26.
28. Una vacuna que comprenda una cantidad inmunizante eficaz de inmunógeno seleccionado a partir del grupo que contiene (i) la molécula de cADN aislada de la reivindicación 25, (ii) el polipéptido
- 10 codificado por la molécula de cADN aislada de la reivindicación 25, y (iii) una combinación de la molécula de cADN aislada de la reivindicación 25 y el polipéptido codificado, que comprenda inclusive un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
29. Un método de inducción de inmuno-respuesta en mamíferos
- 15 contras las garrapatas de las especies *Ixodes* y sus patógenos asociados, que comprenda la administración de la vacuna de la reivindicación 28 a mamíferos.
30. El polipéptido codificado por la molécula de cADN aislada de la reivindicación 25.
- 20 31. Una molécula de cADN que codifique un *Ixodes* asociado al polipéptido antigénico, donde la referida molécula tenga una secuencia de nucleótido que comprenda por lo menos los residuos 3-578 de la SEQ ID NO: 11.
32. Un vector de expresión que comprenda la molécula de cADN
- 25 aislada de la reivindicación 31.
33. Una célula aislada transformada por el vector de expresión de la reivindicación 32.
34. Una vacuna que comprenda una cantidad inmunizante eficaz de inmunógeno seleccionado a partir del grupo que contiene (i) la

molécula de cADN aislada de la reivindicación 31, (ii) el polipéptido codificado por la molécula de cADN aislada de la reivindicación 31, y (iii) una combinación de la molécula de cADN aislada de la reivindicación 31 y el polipéptido codificado, que comprenda
5 inclusive un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

35. Un método de inducción de inmuno-respuesta en mamíferos contras las garrapatas de las especies *Ixodes* y sus patógenos asociados, que comprenda la administración de la vacuna de la reivindicación 34 a mamíferos.

10 36. El polipéptido codificado por la molécula de cADN aislada de la reivindicación 31.

37. Una molécula de cADN que codifique un *Ixodes* asociado al polipéptido antigénico, donde la referida molécula tenga una secuencia de nucleótido que comprenda por lo menos los residuos
15 1-1119 de la SEQ ID NO: 13.

38. Un vector de expresión que comprenda la molécula de cADN aislada de la reivindicación 37.

39. Una célula aislada transformada por el vector de expresión de la reivindicación 38.

20 40. Una vacuna que comprenda una cantidad inmunizante eficaz de inmunógeno seleccionado a partir del grupo que contiene (i) la molécula de cADN aislada de la reivindicación 37, (ii) el polipéptido codificado por la molécula de cADN aislada de la reivindicación 37, y (iii) una combinación de la molécula de cADN aislada de la
25 reivindicación 37 y el polipéptido codificado, que comprenda inclusive un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

41. Un método de inducción de inmuno-respuesta en mamíferos contras las garrapatas de las especies *Ixodes* y sus patógenos asociados, que comprenda la administración de la vacuna de la

reivindicación 40 a mamíferos.

42. El polipéptido codificado por la molécula de cADN aislada de la reivindicación 37.

43. Una molécula de cADN que codifique un *Ixodes* asociado al
5 polipéptido antigénico, donde la referida molécula tenga una
secuencia de nucleótido que comprenda por lo menos los residuos
51-1544 de la SEQ ID NO: 15.

44. Un vector de expresión que comprenda la molécula de cADN
aislada de la reivindicación 43.

10 45. Una célula aislada transformada por el vector de expresión de la
reivindicación 44.

46. Una vacuna que comprenda una cantidad inmunizante eficaz de
inmunógeno seleccionado a partir del grupo que contiene (i) la
molécula de cADN aislada de la reivindicación 43, (ii) el polipéptido
15 codificado por la molécula de cADN aislada de la reivindicación 43,
y (iii) una combinación de la molécula de cADN aislada de la
reivindicación 43 y el polipéptido codificado, que comprenda
inclusive un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

47. Un método de inducción de inmuno-respuesta en mamíferos
20 contras las garrapatas de las especies *Ixodes* y sus patógenos
asociados, que comprenda la administración de la vacuna de la
reivindicación 46 a mamíferos.

48. El polipéptido codificado por la molécula de cADN aislada de la
reivindicación 43.

25 49. Una molécula de cADN que codifique un *Ixodes* asociado al
polipéptido antigénico, donde la referida molécula tenga una
secuencia de nucleótido que comprenda por lo menos los residuos
31-2295 de la SEQ ID NO: 17.

50. Un vector de expresión que comprenda la molécula de cADN

aislada de la reivindicación 49.

51. Una célula aislada transformada por el vector de expresión de la reivindicación 50.

52. Una vacuna que comprenda una cantidad inmunizante eficaz de
5 inmunógeno seleccionado a partir del grupo que contiene (i) la
molécula de cADN aislada de la reivindicación 49, (ii) el polipéptido
codificado por la molécula de cADN aislada de la reivindicación 49,
y (iii) una combinación de la molécula de cADN aislada de la
reivindicación 49 y el polipéptido codificado, que comprenda
10 inclusive un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

53. Un método de inducción de inmuno-respuesta en mamíferos
contras las garrapatas de las especies *Ixodes* y sus patógenos
asociados, que comprenda la administración de la vacuna de la
reivindicación 52 a mamíferos.

15 54. El polipéptido codificado por la molécula de cADN aislada de la
reivindicación 49.

55. Una molécula de cADN que codifique un *Ixodes* asociado al
polipéptido antigénico, donde la referida molécula tenga una
secuencia de nucleótido que comprenda por lo menos los residuos
20 6-332 de la SEQ ID NO: 19.

56. Un vector de expresión que comprenda la molécula de cADN
aislada de la reivindicación 55.

57. Una célula aislada transformada por el vector de expresión de la
reivindicación 56.

25 58. Una vacuna que comprenda una cantidad inmunizante eficaz de
inmunógeno seleccionado a partir del grupo que contiene (i) la
molécula de cADN aislada de la reivindicación 55, (ii) el polipéptido
codificado por la molécula de cADN aislada de la reivindicación 55,
y (iii) una combinación de la molécula de cADN aislada de la

- reivindicación 55 y el polipéptido codificado, que comprenda inclusive un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
59. Un método de inducción de inmuno-respuesta en mamíferos contras las garrapatas de las especies *Ixodes* y sus patógenos asociados, que comprenda la administración de la vacuna de la reivindicación 58 a mamíferos.
60. El polipéptido codificado por la molécula de cADN aislada de la reivindicación 55.
61. Una molécula de cADN que codifique un *Ixodes* asociado al polipéptido antigénico, donde la referida molécula tenga una secuencia de nucleótido que comprenda por lo menos los residuos 3-137 de la SEQ ID NO: 21.
62. Un vector de expresión que comprenda la molécula de cADN aislada de la reivindicación 61.
- 15 63. Una célula aislada transformada por el vector de expresión de la reivindicación 62.
64. Una vacuna que comprenda una cantidad inmunizante eficaz de inmunógeno seleccionado a partir del grupo que contiene (i) la molécula de cADN aislada de la reivindicación 61, (ii) el polipéptido codificado por la molécula de cADN aislada de la reivindicación 61, y (iii) una combinación de la molécula de cADN aislada de la reivindicación 61 y el polipéptido codificado, que comprenda inclusive un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 20 65. Un método de inducción de inmuno-respuesta en mamíferos contras las garrapatas de las especies *Ixodes* y sus patógenos asociados, que comprenda la administración de la vacuna de la reivindicación 64 a mamíferos.
- 25 66. El polipéptido codificado por la molécula de cADN aislada de la reivindicación 61.

67. Una molécula de cADN que comprenda una secuencia de nucleótido exhibida en SEQ ID NO: 23.
68. Un vector de expresión que comprenda la molécula de cADN aislada de la reivindicación 67.
- 5 69. Una célula aislada transformada por el vector de expresión de la reivindicación 68.
70. Una vacuna que comprenda una cantidad inmunizante eficaz de la molécula de cADN de la reivindicación 67 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 10 71. Un método de inducción de inmuno-respuesta en mamíferos contras las garrapatas de las especies *Ixodes* y sus patógenos asociados, que comprenda la administración de la vacuna de la reivindicación 70 a mamíferos.
72. Una molécula de cADN que comprenda una secuencia de nucleótido exhibida en SEQ ID NO: 24.
- 15 73. Un vector de expresión que comprenda la molécula de cADN aislada de la reivindicación 72.
74. Una célula aislada transformada por el vector de expresión de la reivindicación 73.
- 20 75. Una vacuna que comprenda una cantidad inmunizante eficaz de la molécula de cADN de la reivindicación 72 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
76. Un método de inducción de inmuno-respuesta en mamíferos contras las garrapatas de las especies *Ixodes* y sus patógenos asociados, que comprenda la administración de la vacuna de la
- 25 77. Una molécula de cADN que comprenda una secuencia de nucleótido exhibida en SEQ ID NO: 25.
78. Un vector de expresión que comprenda la molécula de cADN

aislada de la reivindicación 77.

79. Una célula aislada transformada por el vector de expresión de la reivindicación 78.

80. Una vacuna que comprenda una cantidad inmunizante eficaz de la molécula de cADN de la reivindicación 77 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

81. Un método de inducción de inmuno-respuesta en mamíferos contra las garrapatas de las especies *Ixodes* y sus patógenos asociados, que comprenda la administración de la vacuna de la reivindicación 80 a mamíferos.

RESUMEN

"ANTÍGENOS PROTECTORES PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES POR ESPECIE DE *IXODES*"; La presente invención está basada en nuestra identificación por ELI y por análisis de secuencia de clones cADN protectores contra infestaciones experimentales con *I. scapularis*. Este es el primer ejemplo de la aplicación de ELI para artrópodos y específicamente, para garrapatas. Los antígenos protectores son homólogos a endopeptidasas, nucleotidasas, proteínas de corium, receptores vitelogenina, proteínas de reconocimiento de peptidoglicano, proteínas ricas en glutamina y alanina, proteínas ribosomales, β -adaptina, proteína precursora del Beta-amiloide, Bloqueo de proliferación (Bop1), lectinas, canales de cloruro, polimerasas de ARN, ATPases y proteínas de choque por calor. Estos antígenos inducen una respuesta inmunológica en huéspedes vacunados que, interfiere tanto en el desarrollo de la garrapata como, resulta en la actividad proalimentación; que podría ser debido a la expresión de los cADN codificando inmunosupresores de la garrapata, anticoagulantes y otras proteínas con antigenicidad baja y actividad

de proalimentación; o ellos podrían codificar las proteínas homólogas a las proteínas del huésped con actividad antigarrapata, cuya neutralización resulta en una actividad de proalimentación de la garrapata.

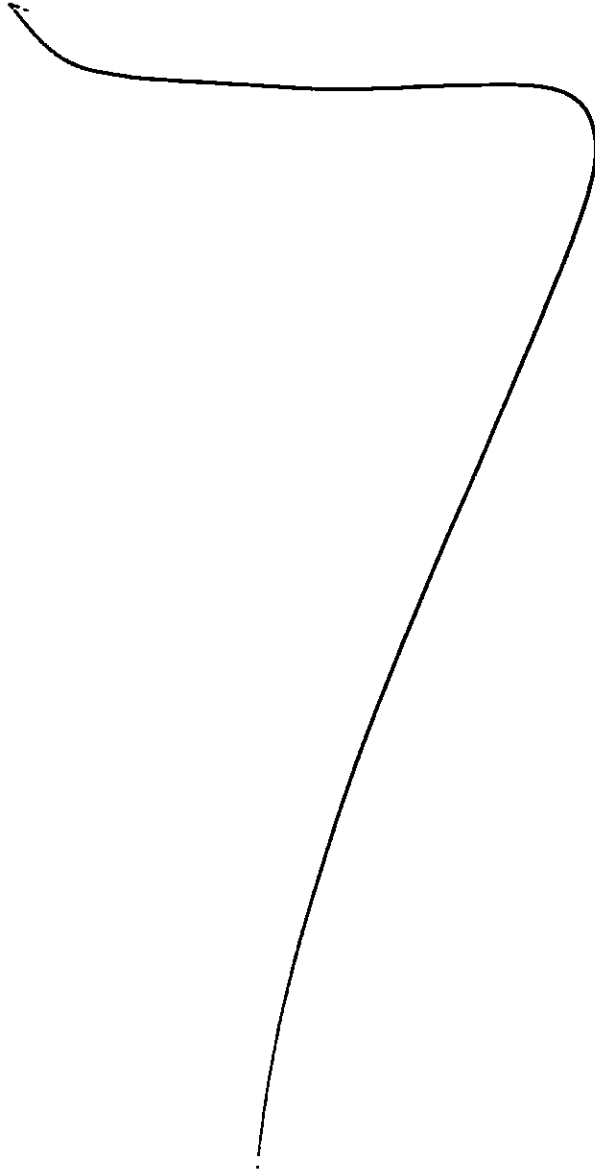


Fig. 1

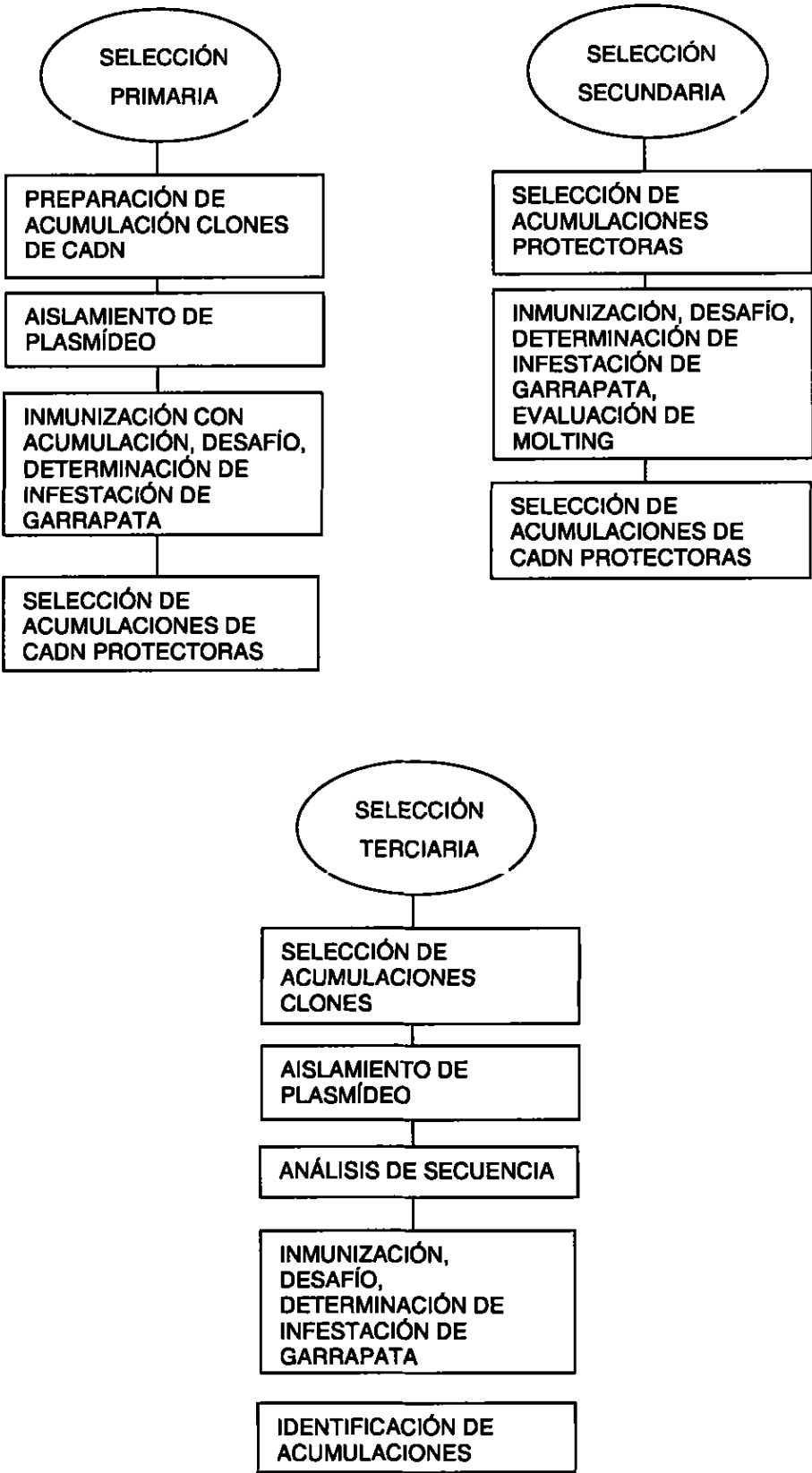


Fig. 2A

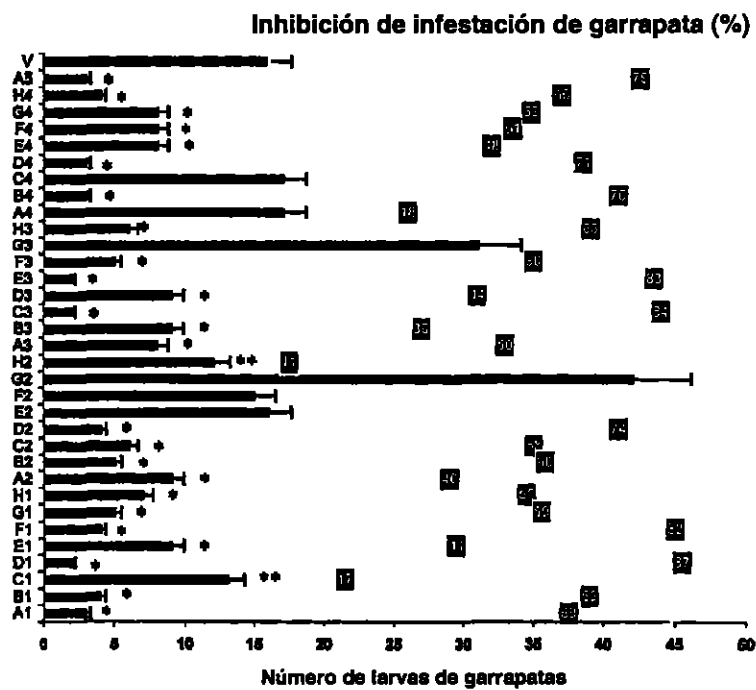
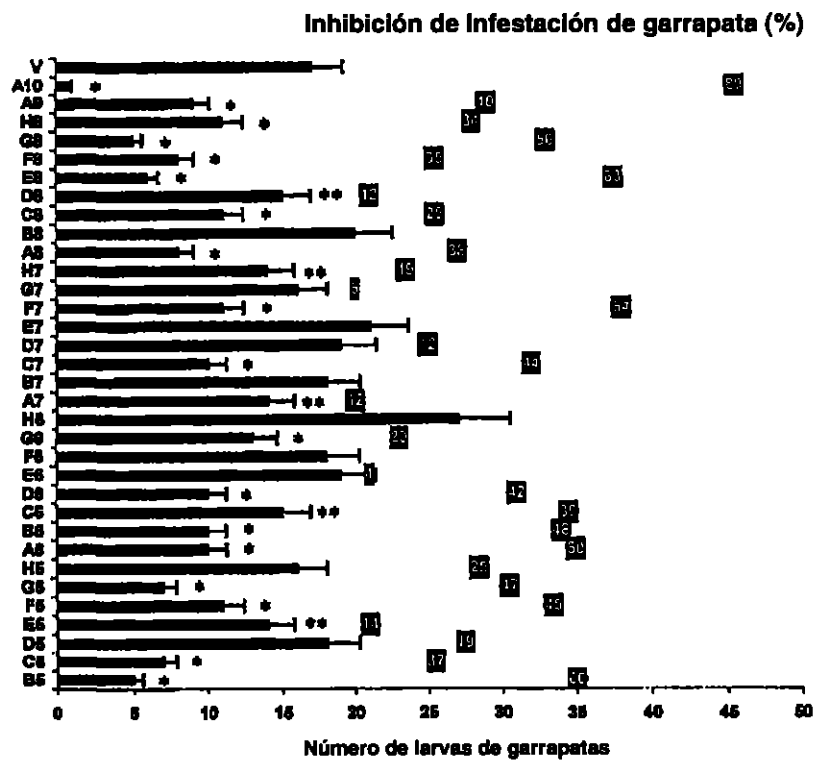


Fig. 2B



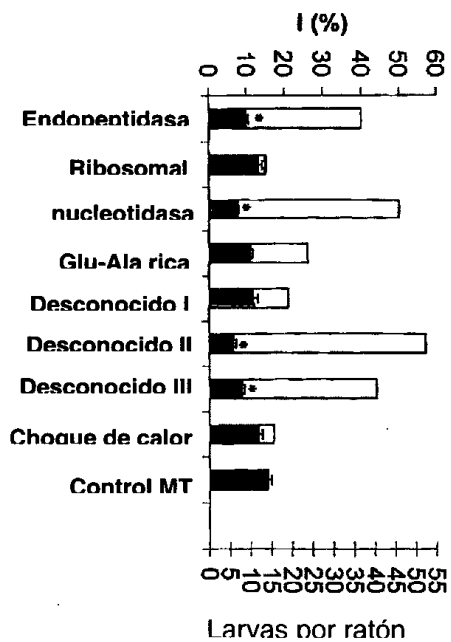


Fig. 3

50

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
Indicacion de que se solicita la concesion de una patente	()	()
Datos de Identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	()	()
Descripción de la invención	()	()
Dibujos de ser estos pertinentes	()	()
Comprobante de Pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial () ()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud () ()
- Representación grafica o fotografica del Diseño Industrial o muestra del Material que Incorpora el diseño () ()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas () ()

COMPLETA () INCOMPLETA () ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado () ()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud () ()
- Representación grafica del esquema de trazado () ()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas () ()

COMPLETA INCOMPLETA () ()

Firma Responsable

Fecha

SEÑOR

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 04130178 00000001

Folios: 7

Fecha (AMD): 2005-03-14 17:09:43

Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE MACI 329 COMPLETADO

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REF:

**PATENTE PCT ANTÍGENOS PROTECTORES PARA EL CONTROL
DE INFESTACIONES PARA ESPECIES DE IXODES**

Expediente No. : 04 - 130.178.

JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS, Abogado, mayor y vecino de Bogotá, e identificado con Cédula de Ciudadanía No. 19.270.955 de Bogotá y Tarjeta Profesional de Abogado No. 43.308 del Ministerio de Justicia se dirige a usted, para manifestarle:

El día 28 de noviembre de 2004, correspondiente al domingo, se presentó un hecho imprevisible en nuestra firma, consistente en una inundación proveniente del baño que está al lado de mi oficina, que ocasionó un daño, especialmente de las unidades de computador de mi oficina.

Dicha información que dejó mi computador parcialmente inservible, originó que no se cumpliera un término dentro de la oportunidad legal establecida, ya que nos llevó mas de un mes recuperar la información contenida en una unidad prácticamente inservible, unidad que contenía la información referente a la presente patente.

Lo anterior, ocasionó que la patente de la referencia fuera radicada fuera de término, por un hecho imprevisible que nos fue imposible evitar, lo que afectó el normal desempeño de las actividades de nuestra firma, por lo que solicito a su digno Despacho, tener en cuenta que en el presente caso hubo fuerza mayor o caso fortuito, ya que de no presentarse los hechos a que hago relación, no hubiéramos incurrido en la radicación extemporánea de la información referente a la patente a que hacemos referencia.

Corroboro lo expuesto, con declaraciones juradas que acompaño al presente expediente y que certifican sobre personas que les consta el hecho o que tuvieron que intervenir para solucionar las consecuencias de dicho acontecimiento imprevisto.

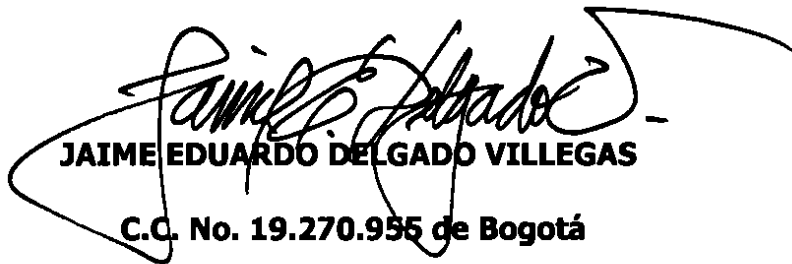
Por lo expuesto, solicito a su digno Despacho considerar dichos hechos imprevisibles que se salieron de nuestro control y que ocasionaron un perjuicio a la firma que no fue posible evitar y por lo tanto solicito se tenga en cuenta lo anterior, para darle un curso normal a la

presente patente.

Anexos:

1. Acta de Declaración extraproceso No. 667, presentada ante el Notario 26 de Bogotá, el día 17 de febrero de 2005, del Sr. JOSE VICENTE ROA identificado con cédula de ciudadanía No. 19.09048 de Bogotá.
2. Acta de Declaración extraproceso No. 668, presentada ante el Notario 26 de Bogotá, el día 17 de febrero de 2005, de la Sra. DIANA CECILIA CORSO LEYVA identificada con cédula de ciudadanía No. 51.704.095 de Bogotá.
3. Acta de Declaración Juramentada con fines extraprocesales No. 64233 del 17 de febrero de 2005, presentada ante el Notario 19 de Bogotá, del Sr. JAIRO MONCADA CERON identificado con cédula de ciudadanía No. 4.136.837 de Iza.
4. Copia auténtica de la factura de venta No. 163 del Enero 04 de 2005, por concepto de recuperación información y reinstalación del sistema operativo, controladores y aplicativos.
5. Acta extraprocesal No. 6722/2005 del 23 de febrero de 2005, presentada ante el Notario Dieciocho de Bogotá, de JOSE IGNACIO MORENO BAYONA identificado con cédula de ciudadanía No. 80.504.988 de Bogotá.

Atentamente.


JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS
C.C. No. 19.270.955 de Bogotá

T.P. No. 43.308 del Consejo Superior de la Judicatura

ACTA DE DECLARACIÓN EXTRAPROCESO
ARTÍCULO 299 DEL CÓDIGO DE PROCEDIMIENTO CIVIL
Y DECRETO 1557 DE 1989

Nº 667

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, Departamento de Cundinamarca, República de Colombia, a los diecisiete (17) días del mes de febrero de dos mil cinco (2.005), compareció a la Notaría Veintiséis (26) del Círculo, JOSE VICENTE ROA, mayor de edad, quien se identifica con cédula de ciudadanía número 19.090.458 de Bogotá, manifestó su voluntad de declarar bajo la gravedad del juramento y a sabiendas de las implicaciones legales que acarrea jurar en falso, especialmente los Art. 442 del Código penal y 266, 267 y 269 del Código de Procedimiento Penal, lo siguiente:

1o.) "Me llamo como quedó escrito, residente en la Carrera 71 No. 67-02, barrio: Estrada Europa de Bogotá, estado civil: casado, ocupación: Plomería."

2o.) "Declaro que el día 28 de noviembre de 2.004, como a las cinco de la tarde me pidió un servicio de plomería, la doctora XIMENA DELGADO, en la Av. 22 No. 37-31 Of. 202, de ésta ciudad, donde funcionan las oficinas de "MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS LTDA." y le cambié el tubo perforado del sanitario de dicha oficina porque cuando llegué la encontré inundada."

Para constancia se firma la presente declaración, con destino a: SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO.

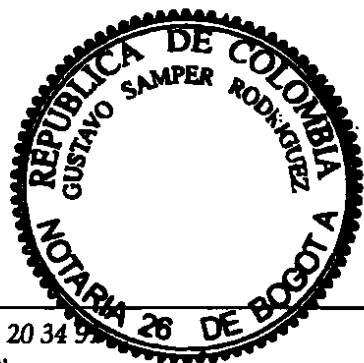
Jose Vicente Roa

JOSE VICENTE ROA

C.C. Nº 1909048374

Gustavo Samper Rodríguez
GUSTAVO SAMPER RODRÍGUEZ
NOTARIO

lamm.



Calle 40 A # 13 - 65 PBX: 2 85 87 75 Fax : 3 20 34 91

Página Web: www.notaria26bogota.com

e.mail: notaria26@notaria26bogota.com

notaria26@cfb.net.co

Bogotá, D.C. - Colombia

Norberto Salamanca F.

Notaría 19 – Bogotá
WWW.NOTARIA19.COM

ACTA DECLARACIÓN JURAMENTADA CON FINES
EXTRAPROCESALES No. 64233.- FEBRERO 17/ 05 – 2:56 p.m.

Ante mí, Norberto Salamanca F., Notario 19 del Círculo Notarial de Bogotá, D.C., COMPARECIÓ, quien se identificó como JAIRO ANTONIO MONCADA CERON, con cédula de ciudadanía 4.136.837 de Iza, domiciliado y residente en Bogotá, en la Calle 30 No. 85-46, Casa 60. Barrio Modelia. Teléfono: 4281321, de 31 años de edad. Actualmente Independiente, de estado civil: unión libre y manifestó su voluntad de declarar bajo juramento en los términos del Decreto 1.557 de 1989; numeral 130, Art. 1, Decreto 2282 de 1989 y Art. 299 del Código de Procedimiento Civil, en la siguiente forma:

1.- Que me encuentro en la plenitud de mis facultades mentales y no tengo impedimento legal alguno para formular la siguiente declaración, aceptando expresamente las consecuencias penales por falsedad o falso testimonio y civiles a que haya lugar, en caso de manifestar hechos que no sean ciertos y con destino a : SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, para aportar como prueba

2.- Que el día 29 de Noviembre de 2004 me llamaron a mi empresa ENERLASER, con Nit. 4136837-7 para realizar una revisión de un equipo de computo en las instalaciones de la empresa MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS LTDA., haciendo esta revisión al computador del Dr. JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS se encontró que la CPU se encontraba mojada por inundación de la oficina del mencionado doctor. La CPU se retiró ya que no se podía colocar en funcionamiento. Después de secarla se encontró que el disco duro no funcionaba y la información no era posible recuperarla por tal motivo se procedió a hacer un rescate de la información lo cual tuvo varios inconvenientes y el equipo se entregó en funcionamiento con un nuevo disco duro y la información recuperada el día 29 de Diciembre de 2004 .

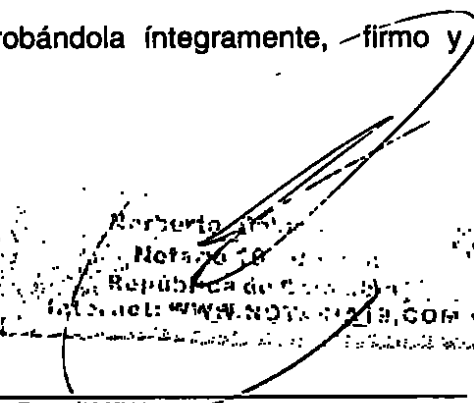
Finalmente, procedí a revisar mi declaración y aprobándola íntegramente, firmo y estampo mi huella ID.-

DECLARANTE


JAIRO ANTONIO MONCADA CERON



EXCELENTE
CEL: 315 2191919


Norberto Salamanca F.
Notario 19
República de Colombia
Tel: 315 2191919
E-mail: www.notaria19.com

COPIA DIGITALIZADA
www.notaria19.com

Calle 62 No. 10-84 - PBX: 6401919- 5420742 - Fax: 5430741 -
Escrituración: 5431016 - 5945015 - Cel. 315 2191919 -
Conciliaciones: 3462666 - Remates: 3466051 - Firma Digital - Certificación Electrónica: 300 2199919
Celular: 311 2191919 - E-mail: NOTARIA19@NOTARIA19.COM
Su escritura por Internet e información legal y de interés ciudadano: WWW.NOTARIA19.COM
Chat y videoconferencia sobre asuntos notariales: chatnotaria19@hotmail.com
E-mail privado Notario: notario19bogota@hotmail.com
Factura: 64233 / am.

ACTA DE DECLARACIÓN EXTRAPROCESO
DECRETO 1557 DE 1989 Y ARTÍCULO 299
DEL CÓDIGO DE PROCEDIMIENTO CIVIL

Nº 668

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, Departamento de Cundinamarca, República de Colombia, a los diecisiete (17) días del mes de febrero de dos mil cinco (2.005), compareció a la Notaría Veintiséis (26) del Circulo, **DIANA CECILIA CORSO LEYVA**, mayor de edad, quien se identifica con cédula de ciudadanía número 51.704.095 de Bogotá, manifestó su voluntad de declarar bajo la gravedad del juramento y a sabiendas de las implicaciones legales que acarrea jurar en falso, especialmente los Art. 442 del Código penal y 266, 267 y 269 del Código de Procedimiento Penal, lo siguiente:

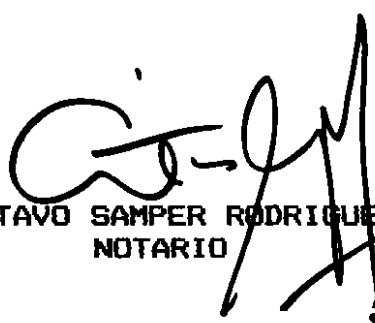
1o.) "Me llamo como quedó escrito, residente en la Carrera 70C No. 2-28 Int. 10 Apto. 401, barrio: Urbanización Portal de Techo 1 de Bogotá, estado civil: casada, ocupación: Secretaria."

2o.) "Declaro que el día 29 de noviembre de 2.004, a primera hora fui informada de la idundación que ocurrió en la oficina del doctor JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS, la cual ocasionó el daño de la C.P.U. y la pérdida correspondiente de la información allí contenida, del mismo doctor, después de esto me dediqué a recuperar información durante el 29, 30 de noviembre y todo el mes de diciembre. Hago ésta declaración para dejar constancia que la información pertenete a la solicitud de patente PCT denominada ANTIGENOS PROTECTORES PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES POR ESPECIES DE IXODES se encontraba entre la información perdida y la cual pude recuperar hasta el 29 de diciembre de 2.004 en las horas de la tarde."

Para constancia se firma la presente declaración, con destino a: SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO.


DIANA CECILIA CORSO LEYVA
C.C. Nº 51.704.095 Bogotá




GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO

lamm.



Notaria Dieciocho (18) del Círculo de Bogotá
carrera 13 No. 27-20
PBX: 3346292 - Fax: 2831769
e-mail: noti18bogota@y1

No. 6722/2005

ACTA EXTRAPROCESAL

El suscrito, GERMAN DYUELA COPABAN Notario Dieciocho (18) Encargado de Bogotá, da fe que la declaración contenida en esta acta han sido emitida por quien la otorga.. Hoy veintitres (23) de febrero del año dos mil cinco (2005), compareció: JOSE IGNACIO MORENO BAYONA mayor de edad vecina de Bogotá, de estado civil soltero con unión marital de hecho, identificado con la cédula de ciudadanía número 80.504.988 expedida en Bogotá, residente en la calle 1538# 16-74, de la Ciudad de Bogotá, D.C. y dijo: PRIMERO; Que esta declaración la hace bajo la gravedad del juramento, se refiere a hechos de los cuales tienen conocimiento personal y directo y no poseen ningún impedimento para hacerla. SEGUNDO; Que la declaración extraprocesal que aquí consta está destinada a servir de prueba sumaria en evento autorizado por la ley y, en consecuencia, tendrá el valor que dicha ley le asigne, de conformidad con el artículo 10. del Decreto 1.557 del 14 de julio de 1989. TERCERO: Bajo la gravedad del juramento y a sabiendas de las sanciones penales que acarrea el perjurio, manifiesto que el pasado 28 de noviembre del año 2004, llegue a mi sitio de trabajo (MARIO DELGADO ECHEVERRI E HIJOS LTDA), ubicado en la Avenida 22 No.37-31, como a las 4:00 PM, donde laboro como dependiente judicial. El motivo de ir a mi sitio de trabajo era el de recoger unos papeles que necesitaba para mis labores del día lunes, y los cuales había olvidado el día viernes. Cuando ingrese a la oficina me di cuenta que la oficina se encontraba inundada; fui a verificar que había pasado y encontré que en el baño personal del Dr. JAIME EDUARDO DELGADO mi jefe, había un escape de agua fuerte. Cuando me di cuenta que la CPU del Dr. estaba en el piso y bastante mojada,. me dirigí hacia la cocina y baje los tacos de la luz para prevenir un corto circuito, al igual que cerré el registro del agua, de inmediato avise a la gerente administrativa la Dra. JIMENA DELGADO quien se encontraba en la casa de su señora madre y la cual queda en el mismo edificio de la oficina. Ella inmediatamente llegó a la oficina y al notar la inundación llamó al plomero. En dicha inundación aparte de la C.P.U. que se mojó totalmente, se mojaron varios documentos importantes. Hago esta declaración para los fines que sean necesarios.

Para constancia se firma.

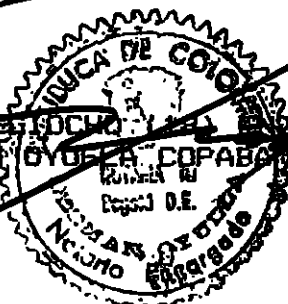
EL DECLARANTE

JOSE IGNACIO ROSEN BAYONA

C.C.No.

Tel 6711577

EL NOTARIO DICTANDO EL ENCARGADO
GERMAN OYUELA COPABA



Derechos \$7710
Luz.m



NIT. 4.136.837-7 - Tarifa 7X1000
ICA Actividad Económica 6426
Resolución DIAN No. 320000103973
2001/11/09 del 001 al 500
RENOVACIÓN 320000103973
FECHA 2003/11/13

58 7
CALLE 100 No. 19-61 OF 1008
TELS: 424 36 53 - 635 67 67
FAX: 635 69 25 - CEL: 257 13 96
E-MAIL: enerlaser@latinmail.com

REGIMEN COMUN
Representante Legal JAIRO MONCADA

FACTURA DE VENTA N° 163

Señores: MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS Ltda	MES 01	DIA 04	AÑO 2005	PEDIDO: -----
	FORMA DE PAGO: Contado			VENCE:
	NIT.: 800.020.909-7			

REF.	DESCRIPCION	CANT.	V. UNITARIO	VALOR TOTAL
	Recuperacion Informacion de disco Duro 250 MB Recuperados	1	\$99.000	\$99.000
	Reinstalacion sistema Operativo, Controladores y Aplicativos en equipo Compaq EVO.	1	\$30.000	\$30.000


ENERLASER
Jairo Moncada
GERENTE

La presente Factura Cambiaria se asimila en todos sus efectos a la Letra de Cambio, según Artículo 774 del Código de Comercio.

Se hace constar que la firma de persona distinta al comprador, supone que dicha persona está autorizada por el comprador para firmar y recibir, confesar la deuda y obligar al comprador.

Firma Cliente:

Sello C.C. ó NIT.

M.D.E.

DESCUENTO \$

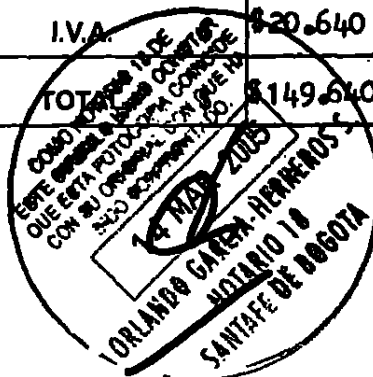
SUBTOTAL \$ \$129.000

I.V.A.

\$20.640

TOTAL

\$149.640



59

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RADICACIÓN: 4-130178

EDICTO No. 9027

**LA SECRETARÍA GENERAL AD-HOC
HACE SABER:**

Que esta Superintendencia profirió Resolución No. 14575 de 24-JUN-2005. Que el contenido de la parte resolutive es como sigue: El Superintendente de Industria y Comercio.

RESUELVE

ARTICULO PRIMERO: Declarar retirada la solicitud de patente de invención de que se da cuenta en la parte considerativa.

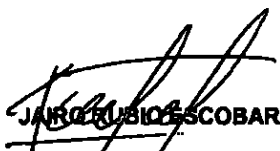
ARTICULO SEGUNDO: Notificar personalmente al doctor Jaime Eduardo Delgado Villegas, el contenido de la presente resolución, entregándole copia de la misma, advirtiéndole que contra ella proceda el recurso de reposición ante

el Superintendente de Industria y Comercio al momento de notificarse o dentro de los 5 días hábiles siguientes.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

Dada en Bogotá D.C., a los **24 JUN. 2005**

EL SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO,


JAIME RUBIO ESCOBAR

Para notificar a los interesados, se fija el presente EDICTO en lugar visible al público en la SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, por el término de (10) diez días hábiles contados a partir de las 8:30 a.m. de hoy.

Secretaría General Ad-Hoc 28-JUL-2005 

Secretaría General Ad-Hoc

EDICTO No. 9027

Este edicto se desfija hoy 10-AGO-2005 a las cinco (5:00 p.m.) 